مقاله پژوهشی

تأثیر پپتید وگلیکان-لیپوپلی ساکارید بر میزان تولید نیتریک اکساید توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمال موش(MSC) و القا آپوپتوز در سلول‌های T فعال شده توسط این سلول‌ها

الهام دارابی [*۱]، احمد مرشدی [۲]، نوروز دلیرژ [۳]، امیر توکمه‌چی [٤]، آرام مکاری‌زاده [٥]

تاریخ دریافت 1392/06/02 تاریخ پذیرش 1392/09/14

چکیده

پیش زمینه و هدف: سلول‌های بنیادی مزانشیمال، سلول‌های بالغی هستند که به عنوان سلول‌های پیش ساز غیر خون ساز و چند توانی معرفی می‌شوند. تحریک ویژه گیرنده‌ای شبه تول در سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمال می‌توانند پاسخ‌های ایمنی ناشی از این سلول‌ها را به سمت فنوتیپ‌های پیش التهابی یا ضدالتهابی جهت دهی کنند. هدف پژوهش حاضر بررسی تأثیر پپتید وگلیکان-لیپوپلی ساکارید بر روی پلاریزه شدن سلول‌های بنیادی به سمت فنوتیپ ضد التهابی و القا آپوپتوز در سلول‌های T.

مواد و روش کار: از استخوان فمور و تیبیا سوسپانسیون سلولی تهیه و به مدت ۲۴ساعت انکوبه شدند. جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی با تمایل به چسبیدن به فلاسک صورت گرفت. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم۷۰%، با آگونیست TLR در دو دوز بالا (۱۰نانوگرم/میلی لیتر) و پایین (۵نانوگرم/میلی لیتر) و به مدت ۱و۱۲ ساعت تیمار شدند. سپس مایع رویی سلول‌ها جهت اندازه گیری نیتریک اکساید جمع‌آوری شد. درصد آپوپتوز در سلول‌های T به روش فلو سایتومتری و رنگ‌آمیزی آکریدین – اورنج / پروپیوم آیداید (AO/PI) اندازه گیری شد.

یافته‌ها: MSCها که در دوز پایین(۵نانوگرم/میلی لیتر) و ۱۲ ساعت انکوباسیون با آگونیستTLR4 تیمار شده بودند افزایش معنی‌داری ($p\leq0.05$) در آپوپتوز القا شده در سلول‌هایT در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند. همچنین یافته‌ها افزایش معنی‌داری($p\leq0.05$) در میزان تولید نیتریک اکساید در دوز بالا (۱۰نانوگرم/میلی لیتر) و ۱ساعت انکوباسیون MSCهای تیمار شده با آگونیستTLR4نسبت به گروه کنترل نشان دادند.

بحث و نتیجه گیری: از پژوهش حاضر می‌توان نتیجه گرفت دوز آگونیست و مدت زمان تیمار سلول‌های بنیادی با آن می‌تواند تأثیرات مختلفی در فعالیت آپوپتوزی MSCها و تولید نیتریک اکساید داشته باشد.

واژگان کلیدی: آگونیست TLR، سلول‌های بنیادی مزانشیمال،آپوپتوز، نیتریک اکساید

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و چهارم، شماره دوازدهم، ص ۱۰۰٤-۹۹٦، اسفند ۱۳۹۲

آدرس مکاتبه: بخش میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه - ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، تلفن: ۰۹۳۷۱۹۹۰۲۴۴
Email: elidarabi@ymail.com

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمال جمعیت کم‌یابی از سلول‌های بنیادی بالغ غیر خون ساز توصیف می‌شوند، که از بافت‌های همبند تقریباً تمام ارگان‌ها از جمله عضله، استخوان، غضروف و غیره جدا شده‌اند(۱). این سلول‌ها نماینده بخش بسیار کوچکی از سلول‌های هسته دار در مغز استخوان هستند که در تنظیم بلوغ و مهاجرت سلول‌های بنیادی خون ساز به جریان خون شرکت دارند(۲). اهمیت این سلول‌ها به دلیل سهولت نسبی در جدا سازی و همچنین تکثیر در شرایط آزمایشگاهی می‌باشند که ویژگی‌های خاص یک بافت را نشان نمی‌دهند اما تحت تأثیر سیگنال‌های مناسب می‌توانند به سلول‌های تخصصی با فنوتیپ متفاوت از سلول ابتدایی تمایز یابند(۳).

[۱] کارشناس ارشد، بخش میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی،دانشگاه ارومیه (نویسنده مسئول)
[۲] دانشیار، بخش میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی،دانشگاه ارومیه
[۳] استادیار، بخش میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی،دانشگاه ارومیه
[٤] استادیار، دانشگاه ارومیه، پژوهشکده آبزیان آرتمیا دانشگاه ارومیه
[٥] دانشجوی دکتری، بخش میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی،دانشگاه ارومیه

مطالعات متعدد حاکی از این است که سلول‌های بنیادی مزانشیمال سطح فعالی از فاکتورهای محلول (سایتوکاین و فاکتور رشد) را ترشح می‌کنند که قادرند به صورت پاراکرین بسیاری از فرایندهای همراه با بیماری‌های مختلف از جمله فعال کردن سلول‌های پیش‌ساز بنیادی موجود در بافت‌ها، آپوپتو، تحریک رگ زایی و مهار التهاب را تنظیم کنند(۴). در واقع این سلول‌های موجود در ارگان‌ها همانند سایر سلول‌های بنیادی، به عنوان منبعی از سلول‌ها برای جایگزینی و تولید مجدد در طول تغییر و تبدیل طبیعی سلول و تعمیر بافت‌های آسیب دیده و یا در پاسخ به عوامل بیولوژیکی عمل می‌کنند(۵). مطالعات فراوان حاکی از این است که TLR[1]ها به عنوان یکی از ایمونوسنسورها می‌توانند سبب تنظیم فعالیت سلول‌های بنیادی مزانشیمال گردند(۶). TLR ها گیرنده‌هایی هستند که الگوهای مولکولی همراه پاتوژن را شناسایی می‌کنند و فعال شدن سلول‌های ایمنی را ارتقا می‌بخشند. آگونیست‌های TLR شامل میکروب‌های خارج سلولی (مانند ترکیبات دیواره باکتری) و مولکول‌های داخل سلولی (مانند پروتئین شوک حرارتی) و ماتریکس داخل سلولی (مانند فیبرونکتین) است(۷). اکثر مطالعات روی این نکته تاکید دارند که بین تحریک TLR ویژه و پاسخ‌های ایمونومدیولاتوری ناشی از سلول‌های بنیادی مزانشیمال ارتباط وجود دارد. بنابراین با بررسی نقش سیگنالینگ منظم TLRها در بیولوژی این سلول‌ها، و دلالت این نقش بر ظرفیت ایمونوژنیسیتی و مهار ایمنی وابسته به این سلول‌ها، می‌توان از آن‌ها در سلول درمانی برای درمان نواقص ناشی از بیماری‌های التهابی استفاده کرد(۸). یکی از جنبه‌های اهمیت سلول‌های بنیادی مزانشیمال مهار فعالیت و تکثیر سلول‌های ایمنی است(۹). مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهد توانایی تنظیم پاسخ‌های ایمنی وابسته به تماس سلول به سلول و ترشح فاکتورهای محلول(IDO[2], NO, TGF-β[3]) توسط سلول‌های بنیادی مزانشمال در پاسخ به سایتوکاین‌های ترشح شده به‌وسیله سلول‌های ایمنی فعال شده است(۱۰). هرچند مکانیسم‌های مهار ایمنی توسط این سلول‌ها هنوز به طور کامل شناخته نشده است، اما یکی از کاندیدهای برجسته نیتریک اکساید است. نیتریک اکساید و گونه‌های فعال نیتروژن مشتق از آن می‌توانند با بسیاری از آنزیم‌ها، کانال‌های یونی و گیرنده‌های سلولی از جمله گیرنده سلولT واکنش دهند(۱۱). با یافتن مکانیسم‌هایی که سلول‌های بنیادی مزانشیمی فعالیت و عملکرد سلول‌های ایمنی را مهار می‌کنند می‌توان به کاربرد بهتر این سلول‌ها در درمان بسیاری از بیماری‌های خود ایمن که عامل اغلب آن‌ها سلول T است در آینده امیدوار بود. نظر به اینکه آگونیست‌هایی نظیر پپتید و گلیکان-لیپوپلی‌ساکارید[4] می‌توانند سلول‌های بنیادی مزانشیمال را به سمت فنوتیپ ضد التهابی که ترشح سایتوکاین‌های ایمونو ساپرسیو نظیر PGE2IDO,NO,TGF-β را موجب می‌شوند، بنابراین هدف پژوهش حاضر بررسی تأثیر (PGN-LPS) به عنوان آگونیست TLR با دو غلظت و زمان‌های مختلف بر روی پلاریزه شدن سلول‌های بنیادی به سمت فنوتیپ ضد التهابی و آپوپتوز القایی در سلول‌های T و نهایتاً تعیین دوز و زمان مناسب تحریک آگونیست بر پاسخ سلول‌های بنیادی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمال

۴۰ سر موش سوری با میانگین سنی ۷ تا۸ هفته با میانگین وزنی ۳۰گرم از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه خریداری شدند. حیوانات به روش قطع نخاعی بیهوش شدند. از دو استخوان فمور و تیبیا مغز استخوان به دست آمد(۱۲). سوسپانسیون سلولی به دست آمده با دور ۱۲۰۰rpm به مدت ۱۰دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. تعداد $۱۰^{۶}$ ×۱سلول به ازای هر میلی لیتر در محیط کشت DMEM[5] (Sigma-Aldrich- آمریکا) همراه با ده درصدFBS[6] (-Gibcoانگلستان) تهیه شد و به فلاسکT25 (Jetbiofil -- آلمان)منتقل و در دمای ۳۷ درجه با ۵درصد co_2 به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. بعد از گذشت مدت زمان اولین (۲۴ ساعت) انکوباسیون مایع رویی دور ریخته شد. سلول‌های غیر چسبنده همراه با مایع رویی از فلاسک خارج شدند و سلول‌های بنیادی مزانشیمال به کف فلاسک چسبیده باقی ماندند. تا رسیدن سلول‌ها به تراکم ۷۰درصد تعویض محیط کشت هر ۳تا۴ روز یک بار انجام گرفت.

تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمال با آگونیستTLR.

با رسیدن سلول‌ها به تراکم و بارآمدگی ۷۰ درصد، با اعمال گروه کنترل سلول‌ها به دو گروه تقسیم شده و از هر گروه سه تکرار انتخاب شد. یک گروه با دوز پایین (۵نانوگرم/میلی لیتر) و گروه دیگر با دوز بالا (۱۰ نانوگرم/میلی لیتر) (-PGN LPS)(آگونیست TLRتهیه شده در آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده آرتمیا) تیمار و هر سه گروه به مدت ۱و ۱۲ ساعت در

[1]. Toll like receptor
[2]. Indoleamine 2,3 dioxygenase
[3]. Transforming Growth Factor-β
[4]. Peptidoglican-lipopolysacarid
[5]. Dulbeccos Modified Eagle Medium
[6]. Fetal bovin serum

۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵درصد co_2انکوبه شدند. بعد از اتمام زمان انکوباسیون(۱و۱۲ ساعت) مایع روی سلول‌های بنیادی مزانشیمال جهت اندازه گیری نیتریک اکساید جمع‌آوری شد و سلول‌ها با محیط کشت تازه شست‌وشو داده شدند.

مجاور سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمال با سلول‌های T:

به منظور تعیین درصد آپوپتوز القایی در سلول‌های T توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمال، سلول‌هایT از طحال موش جداسازی شد و بعد از تحریک با PHA(Gibco-انگلستان) به مدت ۷۲ ساعت با سلول‌های مزانشیمال تیمار شده با آگونیست TLRمجاور شدند.

سنجش آپوپتوز با فلوسایتومتری:

بعد از ۷۲ ساعت سلول‌های Tموجود در مایع رویی سلول‌های بنیادی مزانشیمال جمع آوری و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰ سانتریفیوژ شدند. تعداد ۱×۱۰^{۶} سلول T به داخل هر لوله فالکون منتقل شد و۲ میکرولیتر $Anti\text{-}CD_3$ به آن‌ها اضافه شد و ۳۰دقیقه در تاریکی و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در مرحله بعد ۱۰ میکرولیتر رنگ آکریدین- اورنج به آن‌ها اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس با اضافه کردنPI توسط دستگاه فلوسایتومتری میزان آپوپتوز سلول‌هایT اندازه گیری شد(۱۲).

اندازه گیری نیتریک اکساید با تست گریس:

نیتریک اکساید ترکیبی بسیار ناپایدار است و به سرعت به نیتریت و نیترات تبدیل می‌شود. لذا غلظت نیتریت به عنوان شاخص تولید نیتریک اکساید در نظر گرفته می‌شود و میزان آن با واکنش رنگ سنجی گریس به روش میکرو پلیتی انجام پذیرفت(۱۳). به طور خلاصه۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی سلول‌های بنیادی مزانشیمال به چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه اضافه شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از معرف گریس ۱ همزمان به تمام چاهک‌ها اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. بلافاصله ۲۰ میکرولیتر از معرف گریس ۲ به چاهک‌ها اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. بر این اساس نیتریت موجود در چاهک‌ها در دمای اتاق به صورت طیفی از رنگ‌های ارغوانی با شدت‌های مختلف ظاهر شد که در طول موج ۵۴۰ نانومتر با دستگاه الیزا ریدر خوانده شد و با استفاده از منحنی استاندارد به دست آمده غلظت نیتریک اکساید بر حسب میکرو گرم بر میلی لیتر محاسبه شد.

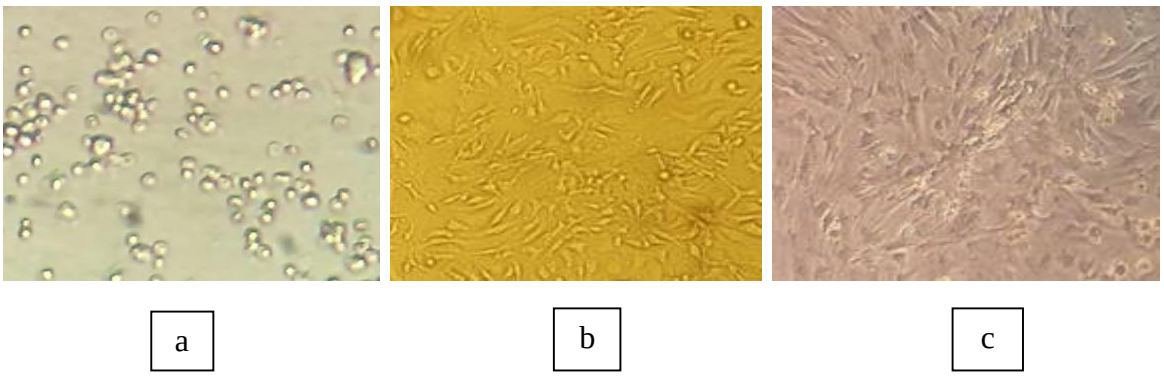
آنالیز داده‌ها:

در این مطالعه به منظور مقایسه میانگین داده‌ها در هر گروه با گروه کنترل از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون Tuky-HSDاستفاده شد.

یافته‌ها

نتایج بررسی میکروسکوپی مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمال:

به طور روزانه فلاسک‌ها بامیکروسکوپ معکوس بررسی شدند. در روز اول جداسازی دیگر سلول‌های مغز استخوان نیز همراه سلول‌های بنیادی مزانشیمال در محیط کشت حضور داشتند. سلول‌ها بعد از این که به طور میانگین بین ۱۴-۱۰ روز با رسیدن به تراکم۷۰ درصد پاساژ داده شدند. جمعیت نسبتاً همگونی از سلول‌های بنیادی مزانشیمال با مرفولوژی سلول‌های دوکی شکل شبه فیبروبلاست در پاساژ سوم کشت سلولی به دست آمد. (تصویر۱).



تصویر۱. a.روز اول کشت، b.روز هفت کشت.c سلول‌ها بعد از پاساژ

نتایج حاصل از سنجش میزان آپوپتوز القا شده در سلول‌های T به روش رنگ آمیزی Acridin- orange/PI روش فلوسایتومتری:

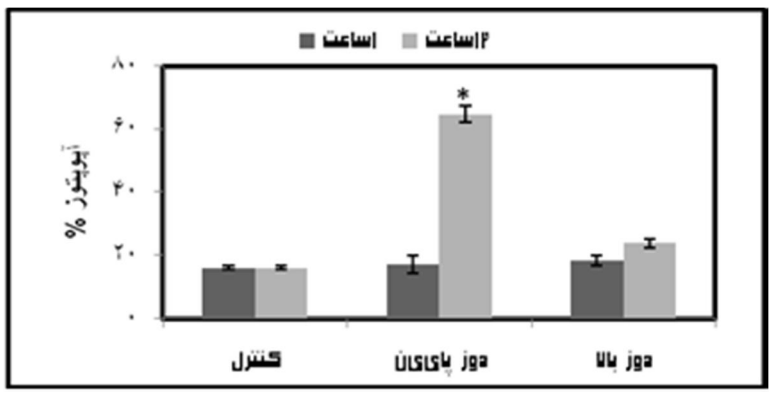
در این آزمایش درصد آپوپتوز سلولی تعیین گردید. به این ترتیب که در طی آپوپتوز فسفاتیدیل سرین از سطح داخلی غشا به سطح خارجی غشا سلول منتقل شده و Acridin- orange به فسفاتیدیل سرین موجود در سطح خارجی غشا متصل شده و توسط دستگاه فلوسایتومتری تشخیص داده می‌شود. همچنین PI نیز به DNA قطعه قطعه شده هسته سلول‌های مرده متصل شده و توسط دستگاه فلوسایتومتری قابل تشخیص خواهد بود.

در این جا سلول‌های رنگ شده با Acridin-orange در مرحله Early apoptosis قرار دارند و سلول‌های رنگ شده با PI دچار نکروز شده‌اند و سلول‌هایی که با هر دو رنگ شده‌اند دچار Late apoptosis شده‌اند. گروه کنترل هم توسط Acridin- orang رنگ شدند. سلول‌هایMSC که با سلول T مجاور نشده بودند به عنوان کنترل در نظر گرفته شد.

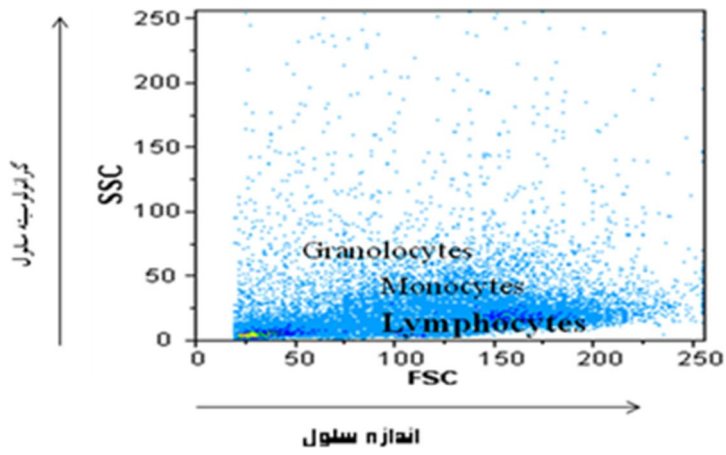
جدول (۱): تفکیک آپوپتوز و نکروز با استفاده از PI وAO.

نوع سلولی	AO	PI
زنده	منفی	منفی
آپوپتوتیک اولیه	مثبت	منفی
آپوپتوتیک نهایی	مثبت	مثبت
نکروتیک	منفی	مثبت

با سنجش درصد آپوپتوز به کمک روش فلوسایتومتری، یافته‌ها افزایش معنی‌داری ($P\leq0.05$) در آپوپتوز سلول‌های T مجاور شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با پپتید و گلیکان –لیپوپلی ساکارید در دوز پایین (۵ng/ml) و مدت زمان ۱۲ ساعت در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند.

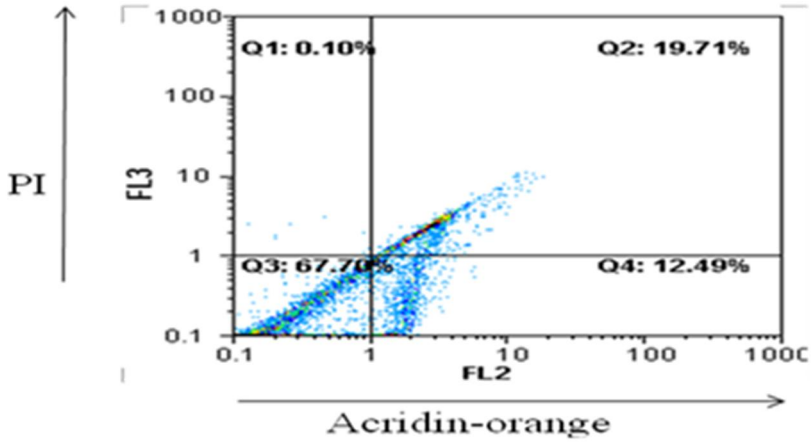


نمودار الف: سنجش آپوپتوز سلول Tدر دوزهای بالا (۱۰ng/ml) و پایین (۵ng/ml) پپتید و گلیکان- لیپوپلی ساکارید در زمان ۱و۱۲ ساعت انکوباسیون که بالاترین درصد آپوپتوز (۶۷.۷۹%) در دوز ۵ نانوگرم/میلی لیتر و در ۱۲ ساعت انکوباسیون نسبت به گروه کنترل مشاهده شد.* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p \leq ۰/۰۵$ می‌باشد.



شکل (۱): الگوی هیستوگرام فلوسایتومتری جهت بررسی سلول‌های T، محور عمودی (SSC) گرانولوسیته سلول و محور افقی (FSC) اندازه

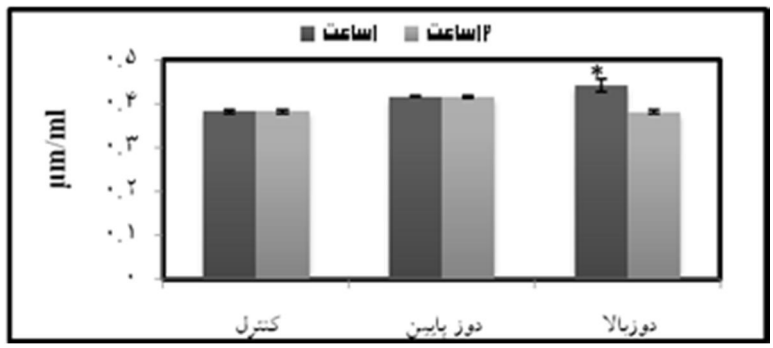
سلول را نشان می‌دهد.



شکل (۲): نمودار نقطه‌ای حاصل از بررسی آپوپتوز القا شده در سلول‌های T توسط MSCs.
محور عمودی (PI) و محور افقی(AO). Q_1: آپوپتوزاولیه، Q_2: آپوپتوز تأخیری، Q_3:سلول‌های زنده، Q_4: سلول‌های نکروتیک

نتایج حاصل از سنجش نیتریک اکساید:

نتایج به دست آمده از تست گریس حاکی از آن بود که در مایع رویی سلول‌های مزانشیمی تیمار شده با دوز بالا و پایین پپتید و گلیکان–لیپو پلی ساکارید بالاترین میزان نیتریک اکساید(۰/۴۱۴µm/ml) در دوز بالا (۱۰ng/ml) و در مدت زمان یک ساعت مشاهده گردید.



نمودار (ب): بررسی غلظت نیتریک اکساید تولید شده در مایع روی سلول‌های بنیادی مزانشیمال. بررسی‌های حاصل از تست گریس بیشترین نیتریک اکساید(۰/۴۱۴µm/ml)تولید شده را در مایه رویی سلول‌های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با دوز (۱۰ng/ml) و مدت زمان ۱ ساعت انکوباسون نسبت به گروه کنترل نشان داد. * نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح$p \leq ۰/۰۵$ می‌باشد

بحث

سلول‌های بنیادی مزانشیمال به عنوان سلول‌های پیش ساز غیر خون ساز و چند توانی معرفی می‌شوند که در طیف وسیعی از بافت‌های بالغ بدن یافت می‌شوند. ویژگی شاخص این سلول‌ها سهولت نسبی جداسازی و تکثیر در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد که در کنار پتانسیل سرکوب ایمنی و تمایزی کارآمد، این سلول‌ها را به ابزاری بالقوه در برنامه درمانی بیماری‌های خودایمن که طی آن پاسخ‌های التهابی خود واکنشگر سبب اصلی آسیب‌های بافتی است تبدیل نموده است. از این رو به نظرمی رسد که تقویت پتانسیل‌های تعدیل یا سرکوب ایمنی این سلول‌ها با مداخله در سنسورهای زودرس بیان شده در سطح این سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی بتواند کاربرد درمانی تقویت شده‌ای را برای این سلول‌ها در درمان بیماری‌های خود ایمن و التهابی به همراه داشته باشد(۱۴). TLRها یکی از گیرنده‌های ایمنی بیان شده در سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمال می‌باشد که می‌تواند طیف وسیعی از عملکردهای سلول را تحت‌الشعاع قرار دهند.

Tomchuck و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان دادند که نه تنها TLRهای مختلفی بر سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمال بیان می‌شوند بلکه متعاقب تحریک و متعهد شدن آگونیست‌های TLRها، این سلول‌ها قادر به مهاجرت، تهاجم و ترشح فاکتورهایی با تأثیرات قوی ایمونو مدیولاتوری هستند(۱۵). اخیراً مشخص شده است تحریک TLRهای ویژه در سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمال می‌تواند پاسخ‌های ایمنی منتج از این سلول‌ها را به سمت فنوتیپ‌های پیش التهابی(MSC-1) یا ضدالتهابی(MSC-2) جهت دهی کند. بر این اساس فنوتیپ پیش التهابی یک نوع پاسخ زودرس سلول به آسیب‌های بافتی بوده و پیش برنده مقطعی یاگذرای روند التهاب به وقوع پیوسته می‌باشند. در مقابل فنوتیپ ضدالتهابی نقشی مشابه مونوسیت‌ها در روند التیام و ترمیم جراحات و آسیب‌های بافتی دارند. یکی از توانمندی‌های فنوتیپ ضد التهابی افزایش تولید NO یا IDO و تقویت توانایی القاء آپوپتوزیس در سلول‌هایT فعال شده می‌باشد(۱۶). نیتریک اکساید تولید شده به سرعت از منبع تولیدی خود منتشر می‌شود اما غلظت فعال آن به سرعت تا حدود ۱۰۰µm/mlکاهش می‌یابد، بنابراین نیتریک اکساید می‌تواند تنها در مجاورت سلول‌های تولید کننده آن فعالیت و تأثیر خود را اعمال کند (۱۲). هرچند عملکرد ترمیم و ضدالتهابی سلول‌های بنیادی مزانشیمال در حال استراحت طی مطالعات متعدد مورد تایید قرارگرفته، به نظر می‌رسد که این توانایی در صورت جهت گیری این سلول‌ها به سمت فنوتیپ ضدالتهابی پاسخ‌های سرکوب کننده ایمنی تقویت شده‌ای را به دنبال داشته باشد. مطالعات نشان می‌دهند که از میان TLRهای مختلف بیان شده به‌وسیله سلول‌های بنیادی مزانشیمال،TLRهای ۲،۳،۴ بیشترین تأثیر را بر جهت گیری پاسخ این سلول‌ها به سمت فنوتیپ‌های یاد شده داشته باشند(۱۷). نخستین بار Mourez و همکاران نشان دادند که تحریک گیرنده‌هایTLR3وTLR4در سلول‌های مزانشیمال موشی منجر به افزایش تولید واسطه‌های پیش التهابی CCL5،IL-8،IL-6،IL-1 می‌شود (۱۸). همچنین در طی مطالعه‌ای موازی بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمال انسانی نتایج مشابهی به دست آمد. مطالعات بعدی نشان داد که علاوه بر نوع TLR درگیر، دوز آگونیست TLR بکار رفته و مدت زمان تحریک سلول‌ها با آگونیست مزبور می‌تواند در جهت‌گیری سلول به سمت یکی از دوفنوتیپ پیش‌التهابی و ضد التهابی مؤثر باشد. برخلاف نتایج به دست آمده از مطالعات قبلی Bunell و همکاران در سال ۲۰۱۰، Waterman و همکاران در سال ۲۰۱۰ به این نتیجه رسیدند که تحریک سلول‌های بنیادی مزانشیمال انسانی با آگونیستTLR3در دوزهای پایین و کوتاه مدت در جهت‌گیری سلول‌ها به سمت فنوتیپ ضدالتهابی و تحریک سلول‌ها با آگونیست TLR4 در دوزهای پایین و کوتاه مدت در جهت‌گیری سلول‌ها به سمت فنوتیپ پیش التهابی مؤثر می‌باشد(۶). مطالعات قبلی درگیری گیرنده‌TLR2را بر افزایش بقا و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمال داده‌اند با این حال Pevsener-Fischer و همکاران نشان دادند که درگیری این گیرنده‌ها تأثیری بر پتانسیل‌های ضدالتهابی سلول‌هایMSC ندارد(۱۹). هرچند Abarbanell و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان داده‌اند که تحریک این سلول‌ها با آگونیست‌های TLR2 به طور چشمگیری می‌تواند منجر به افزایش توانایی‌های ترمیمی این سلول‌ها در آسیب‌های میوکاردیت قلبی شود که نشان دهنده جهت گیری پاسخ‌های بنیادی مزانشیمال به سمت فنوتیپ ضدالتهابی می‌باشد (۲۰). همچنین مطالعات انجام گرفته تأثیرات سلول‌های مزانشیمال را بر مهار واکنش مختلط لنفوسیت بررسی کردند که در نهایت پی بردند که سلول‌های مزانشیمال MLR را نیز با واسطه نیتریک اکساید و سایتو کاین‌های التهابی مهار می‌کنند(۱۲). که این نتایج قویاً بیانگر این هستند که تولید نیتریک اکساید به‌وسیله سایتوکاین‌های القایی توسط سلول‌های مزانشیمال واسطه مهار تکثیر سلول‌هایT هستند در تلاش برای حل این تناقض‌ها یا همراهی با نتایج بدست آمده از مطالعات قبلی، در مطالعه حاضر اقدام به تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمال با آگونیست‌های TLR4 در برنامه‌های زمانی و دوز متفاوت گردید. در این پژوهش به دلیل شباهت بیشتر با ساختار باکتری از پپتد و گلیکان-لیپوپلی ساکارید به صورت هم زمان استفاده شد. در ادامه تغییرات فعالیت آپوپتوتیک سلول‌ها در مواجه با لنفوسیت‌های T فعال شده به عنوان شاخصی از تغییر جهت‌گیری سلول‌ها به سمت فنوتیپ‌های پیش التهابی یا ضدالتهابی مورد توجه قرار گرفت. نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان می‌دهد که فعالیت پروآپوپتوتیک MSCs در مواجه با لنفوستهایT در گروه تیمار شده با پپتید وگلیکان-لیپوپلی‌ساکارید در دوز حداقل افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد. در واقع با تحریک MSCs TLR4 اقدام به ترشح سایتوکاین‌های پیش التهابی می‌کنند. به نظر می‌رسد که سازوکار این تأثیر تا حد زیادی می‌تواند در نتیجه مشابهت با شیب غلظتی باشد که مولکول‌های حاصل از آسیب بافتی در مراحل پایانی روند التهاب در ریز محیط آسیب دارند و می‌توانند منجر به شکل‌گیری پاسخ‌های ضدالتهابی با آغاز روند ترمیم بافتی گردند. این نتایج می‌تواند در توافق با نتایج بدست آمده از مطالعات قبلی باشد که تأثیرات متفاوت برنامه‌های تحریک سازی سلول با پروتکل‌های دوز و زمان مختلف آگونیست‌های TLR در سلول‌های بنیادی مزانشیمال نشان می‌دهد. با توجه به اینکه در تیمارهای انجام پذیرفته بر روی

سلول‌های بنیادی مزانشیمال، روند افزایش القاء آپوپتوزیس در لنفوسیت‌هایTهمبستگی معنی‌داری را با روند تغییرات غلظت نیتریک اکساید مترشحه از این سلول‌ها نشان نمی‌دهد بنابراین تصور می‌شود که این سلول‌ها مکانیسم‌های مستقل ازNO را در القا آپوپتوزیسT بکار می‌گیرند.

نتیجه گیری

در نهایت می‌توان چنین نتیجه گرفت که تحریک‌های TLR سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمال موش با دوز مناسب آن آگونیست و مدت تماس آن با سلول مزانشیمال در invitro بتوانند سلول مزانشیمال را به سمت ضد التهابی و سرکوبگر سلول‌های T خود واکنش گر که عامل بیماری‌های التهابی و خود ایمن هستند، سوق دهند.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از تمام دوستان و کسانی که در انجام این پروژه یاری رساندند خصوصاً از آقایان مهندس علیاری و مهندس ثانی کارشناسان محترم آزمایشگاه ایمنی شناسی دانشکده دامپزشکی ارومیه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References:

1. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchimal stem cell revisiting history,concepts, and assay. Cell Stem Cell 2008; 2:313-9.
2. Prokop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science 1997; 276:71-4.
3. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. Int J Biochem Cell Biol 2004;36(4):568–84.
4. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal cell in health and disaes. Nat Rev immunol 2008; 8:726-36.
5. Caplan AL. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. J Pathol 2009; 217:318-24.
6. Waterman RS, Tomchuk SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymalsrem cell paradigm: Polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. Plos one 2010;4:e10088.
7. DelaRosa O, Lombardo E. Modulation of adult mesenchymal stem cells activity by toll-like receptors: implications on therapeutic potential. Mediators Inflamm 2010;1-9.
8. Steven EA, Robert PA.Variable expression of Toll Like receptor in mutine innate and adaptive immune cell. Int Immunology 2002; 14(9):1065-74.
9. Jones S, Horwood N, Cope Dazzi F. Theanti proliferative effect of mesenchymal stem cells is a fundamental property shared by all stromal cells. J Immunol 2007;179: 2824–31.
10. Aggarwal S, PittengerMF.Humanmesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood 2005;105:1815–22.
11. Niedbala W, Cai B, Liew FY. Role of nitric oxide in the regulation of T cell functions. Ann Rheum Dis 2006; 65 : 37–40.
12. Delirezh N, Moazzeni SM, Shokri F, Shokrgozar MA, Atri M, Kokhaei P. Autologous dendritic cells loaded with apoptotic tumor cells induce T cell-mediated immune responses against breast cancer in vitro. Cellular Immunology 2009; 257(1–2): 23-31.
13. Ghasemi A. Deproteinized methods of measuring serum nitric oxide graise metho. J Res Med 2007; 1(41):43-7.
14. Bittencourt RA de C, Pereira HR, Felisbino SL, Murador P, Oliveira APE de, Deffune E. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells. Acta Ortopédica Brasileira 2006;14(1):22–4.
15. Chen X, Armstrong MA, Li G. Mesenchymal stem cells in immunoregulation. Immunol Cell Biol 2006;84(5):413–21.
16. Bunnell BA, Betancourt AM, Sullivan DE. New concepts on the immune modulation mediated by

mesenchymal stem cells. Stem Cell Res Ther 2010;1(5):34.

17. Liotta F, Angeli R, Cosmi L, Fili L, ManuelliC.Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling. Stem Cells 2008; 26: 279–89.
18. Romieu-Mourez R, Francois M, Boivin MN, Bouchentouf M, Spaner DE. Cytokine modulation of TLR expression and activation in mesenchymal stromal cells leads to a proinflammatory phenotype. J Immunol 2009;182: 7963–73.
19. Pevsner-Fischer M, Morad V, Cohn-Sfady M, Rousso-Noori L, ZaninZ. Toll like receptors and their ligand control mesenchymal stem cell function. Blood 2007;109:1422-32.
20. AbarbanellAm,Wang Y, Herman JL,Weil BR, Poynter JA, Manukyan MC, Meldrum DR. Toll-Like receptor2 mediates Mesenchymal stem cell-associated mycocardial recavery and VEGF production following acute ischemia-reperfusion injury. AM J Physiol Heart CircPhysiol 2010; 298: H1529-H153

Original Article

EFFECT OF PEPTIDOGLYCAN-LIPOPOLYSACCHARIDE ON NITRIC OXIDE PRODUCTION BY RAT MESENCHYMAL STEM CELL (MSC) AND INDUCTION OF APOPTOSIS IN ACTIVATED T CELL WITH MSC

Elham Darabi[1], Ahmad Morshedi[2], Norouz Delirezh[3], Amir Tokmechi[4], Aram Mokarizade[5]*

Received: 24 Aug , 2013; Accepted: 5 Dec , 2013

Abstract

Background & Aims: Mesenchymal stem cells (MSCs) are adult cells which are identified as non-hematopoietic and pluripotent stem cells. Specific stimulation of toll like receptors on the surface of mesenchymal stem cells could change immune responses of these cells into the pre or anti-inflammation phenotype. The aim of this study was to evaluate the effect of peptidoglycan-lipopolysaccharide on the polarization of stem cells into the anti inflammation phenotype and apoptosis induction in T cells.

Materials & Methods: MSCs were isolated from the femoral and tibial bone marrow and re-suspended in DMEM media, and kept in 5% CO_2 incubator at 37°C for 24 hours. After that the cell concentration reached to 70 % treated with toll like receptor's agonist with high (10 ng/ml) and low (5 ng/ml) doses for 1 and 12 hours. Then supernatant of cell culture flask were collected for nitric oxide measurement. Apoptosis percentage in T cells was assayed by flowcytometry in the presence of Acridine orange/ propidium iodide (AO/PI).

Result: The percentage of apoptosis in activated T cells significantly ($P<0.05$) was higher in long term (12 h) and low dose (5 ngr/ml) treatment with TLR4 agonist than the control. Also, the finding indicated that the nitric oxide production significantly ($P<0.05$) was higher at short term (1 h) and high dose (10 ngr/ml) of TLR agonist in comparison to the control.

***Conclusion*:** It should be concluded that the amount of agonist and duration of treatment in stem cells can affect the apoptosis activity and nitric oxide production in MSCs.

Keywords: Toll like receptor's agonist, Mesenchymal stem cell, Apoptosis, Nitric oxide

Address: Microbiology Department, Veterinary Faculty, Urmia University, Urmia, Iran
Tel: +98 9371990244
Email: elidarabi@ymail.com

SOURCE: URMIA MED J 2014: 24(12): 1004 ISSN: 1027-3727

[1] *MSc, Microbiology Department, Veterinary Faculty, Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding Author)*
[2] *Associate Professor, Microbiology Department, Veterinary Faculty, Urmia University, Urmia, Iran*
[3] *Assistant Professor, Microbiology Department, Veterinary Faculty, Urmia University, Urmia, Iran*
[4] *Assistant Professor, Pathobiology & Quality Control Department, Artemia & Aquatic Animal Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran*
[5] *PhD Candidate, Microbiology Department, Veterinary Faculty, Urmia University, Urmia, Iran*