

## اثر سلول‌های بنیادی مزانشیمی پولاریزه شده با آگونیست‌های گیرنده‌های شبه تول (TLRs) و مایع رویی آن‌ها مشتق از مغز استخوان موش بر فعالیت سلول‌کشی سلول‌های کشنده طبیعی (NK Cells) در مقابل سلول‌های سرطانی Yac-1

محمد بابادی عکاشه<sup>۱</sup>، نوروز دلیرز<sup>۲\*</sup>، شهرام سیدی<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت ۱۴۰۳/۰۱/۲۸ تاریخ پذیرش ۱۴۰۳/۰۴/۱۲

### چکیده

**پیش‌زمینه و هدف:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌های پیش‌ساز چند توان، غیر خون‌ساز ساکن در مغز استخوان و سایر بافت‌ها می‌باشند. پتانسیل تعدیل ایمنی و تمایزی، این سلول‌ها را ابزار بسیار مناسبی برای درمان بسیاری از بیماری‌ها قرار می‌دهد. در این تحقیق اثر سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده مشتق از مغز استخوان موش و مایع رویی آن‌ها بر فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی بررسی شد.

**مواد و روش کار:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان‌های ران و درشت نی موش سوری جدا شدند. سلول‌های پاساژ سوم، با غلظت ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر از لیپو پلی ساکارید و Poly I-C به مدت یک ساعت تیمار شدند. سپس تأثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده و مایع رویی آن‌ها بر فعالیت سلول‌کشی سلول‌های کشنده طبیعی در مقابل سلول‌های سرطانی لنفوئیدی Yac-1 (به‌عنوان سلول هدف) با استفاده از دستگاه فلوسایتمتری بعد از ۱۲، ۲۴ و ۷۲ ساعت بررسی شد.

**یافته‌ها:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با لیپو پلی ساکارید و Poly I-C و مایع رویی آن‌ها به ترتیب باعث ۳۸ درصد و ۳۵ درصد کاهش در میزان سلول‌های مرده Yac-1 (آپوپتوز و نکروز) نسبت به سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار نشده (۴۴ درصد)، گردید. در مورد میزان زنده‌مانی سلول‌ها این تأثیر برعکس بود یعنی سلول‌های تیمار شده افزایش میزان زنده‌مانی را نشان دادند.

**بحث و نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی با لیپو پلی ساکارید باعث تقویت اثرات مہاری این سلول‌ها روی سلول‌های کشنده طبیعی می‌شود.

**کلیدواژه‌ها:** سلول بنیادی مزانشیمی، سلول کشنده طبیعی، لیپو پلی ساکارید، Poly I-C، رده سلولی Yac-1

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و پنجم، شماره سوم، ص ۲۰۳-۱۹۲، خرداد ۱۴۰۳

آدرس مکاتبه: ارومیه، کیلومتر یازده جاده سرو، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه میکروبیولوژی، تلفن: ۰۹۱۴۴۴۳۲۶۵۰

Email: n.delirezah@urmia.ac.ir, delirezah@gmail.com

### مقدمه

مولتیپل میلوما و بیماری‌های پرولیفراتیو دستگاه ایمنی نیز از سوی سازمان جهانی بهداشت جزء این دسته شناخته شده‌اند. از جمله عوامل ایجاد لنفوم در انسان ویروس اپشتاین بار (EBV) و در موش مولانی لوکمیا ویروس (MLV) است که رده سلولی Yac-1 نیز حاصل عفونت با این ویروس در موش است. امروزه از این رده سلولی به‌عنوان سلول هدف در سنجش میزان سلول‌کشی NK سل‌ها استفاده می‌شود(۱).

بیماری لنفوم گروهی از تومورهای یاخته‌های خون‌ساز و بافت‌های لنفی است که از لنفوسیت‌ها به وجود می‌آید. گاهی واژه لنفوم تنها به تومورهای سرطانی اشاره دارد و به همه تومورها گفته نمی‌شود. علائم این بیماری شامل بزرگ شدن گره‌های لنفاوی، تب، تعرق، خارش، کاهش وزن و احساس خستگی است. معمولاً دو نوع لنفوم به نام‌های لنفوم هاجکین و لنفوم غیرهاجکین وجود دارد ولی

<sup>۱</sup> گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

<sup>۲</sup> گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول)

<sup>۳</sup> گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

قرار می‌دهد که در آن پاسخ‌های ایمنی و التهابی تشدید یابنده مسبب اصلی آسیب است (۸). فرار این سلول‌ها از شناسایی و مهار پاسخ ایمنی به دلیل خواص فنوتیپی و عملکردی آن‌ها است. اطلاعات موجود در زمینه ایمنی‌زایی کم سلول‌های بنیادی مزانشیمی در برابر سلول‌های ایمنی، امیدی برای کاربرد این سلول‌ها در درمان اختلالات ایمنی از جمله کنترل GVHD، خود ایمنی و پیوند اعضا به وجود آورده است از طرف دیگر می‌توان با پولاریزه نمودن این سلول‌ها به طرف پیش التهابی MSC1 در درمان سرطان نیز از آن‌ها سود جست (۹، ۱۰).

تحریک TLR خاص بر پاسخ‌های ایمنومدولاتوری سلول‌های بنیادی مزانشیمی تأثیر می‌گذارد. این سلول‌ها به دنبال تحریک TLR4 با LPS به سمت فنوتیپ (MSC 1) پیش التهابی و به دنبال تحریک TLR3 با Poly-I-C به سمت فنوتیپ ایمنوساپرسیو (MSC 2) پلاریزه می‌شوند (۱۱). اگرچه در حال حاضر مکانیسم دقیق سرکوب سیستم ایمنی به واسطه سلول‌های بنیادی مزانشیمی کاملاً مشخص نیست، اما در مجموع رفتار سلول‌های بنیادی مزانشیمی برآیند عملکرد عوامل محلول و مکانیسم‌های وابسته به تماس سلولی است (۱۲، ۱۳). به نظر می‌رسد که تقویت پتانسیل‌های تعدیل یا سرکوب ایمنی این سلول‌ها با مداخله در پذیرنده‌های شبه تول در سطح این سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند کاربرد درمانی تقویت‌شده‌ای در درمان بیماری‌های خود ایمنی و واکنش‌های ازدیاد حساسیتی داشته باشد (۱۴). علاوه بر این، قبل از کاربرد بالینی سلول‌های بنیادی، لازم است برهم‌کنش بین آن‌ها و ایمنی ذاتی و اکتسابی بررسی شود. شناسایی دقیق عوامل ایمنی‌زایی سلول‌های بنیادی، سبب توسعه راهبردهای درمانی برای مهار یا کنترل آسیب سلولی می‌شود. همچنین زمینه عملکرد مناسب مشتقات سلول‌های بنیادی در گیرنده پیوند را در درازمدت فراهم می‌کند (۱۵).

با توجه به استفاده روزافزون از سلول‌های بنیادی مزانشیمی و رویکرد جدید بر استفاده از سلول‌های بنیادی پلاریزه شده به علت پتانسیل‌های تقویت‌شده تعدیل و سرکوب ایمنی آن‌ها، نیاز است اثر این سلول‌ها بر فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی ایمنی به‌عنوان یکی از سلول‌های ایمنی بررسی شود (۱۶). بنابراین در این مطالعه بر آن شدیم تا تأثیر سلول‌های بنیادی پلاریزه شده با لیپوساکارید و Poly I-C و مایع رویی آن‌ها را بر عملکرد سلول کشی سلول‌های کشنده طبیعی مورد مطالعه قرار دهیم.

سلول بنیادی به‌طور عام سلولی است که توان نوزایی<sup>۱</sup> و ظرفیت تولید انواع دیگر سلول‌ها را داشته باشد. خود نوزایی به معنای مجموع تکثیر و حفظ توان تکوین برای تمایز به انواع دیگر سلول‌ها است. سلول‌های بنیادی در مراحل مختلف تکوین قرار دارند و در نتیجه درجات متفاوتی از خود نوزایی و تمایز را نشان می‌دهند (۲).

بر اساس توان تمایزی و برگشت‌پذیری آن‌ها، سلول‌ها را می‌توان به انواع ذیل تقسیم نمود:

سلول‌های بنیادی همه توان<sup>۲</sup>؛ این سلول‌ها می‌توانند همه سلول‌ها اعم از سلول‌های فرد و سلول‌های برون جنینی (جفت) را بسازند مانند بلاستومرهای یک جنین دو سلولی که هر سلول آن می‌تواند یک فرد کامل را بسازد.

سلول‌های بنیادی پرتوان<sup>۳</sup>؛ سلول‌هایی هستند که می‌توانند غالب یا همه سلول‌های فرد را بسازند مثلاً سلول‌های بنیادی جنینی تحت شرایط خاص می‌توانند، یک فرد را بسازند، ولی قادر به ایجاد سلول‌های برون جنینی نیستند سلول‌هایی که از گندهای جنینی به دست می‌آیند و به آن‌ها سلول‌های زاینده جنینی (EG)<sup>۴</sup> گفته می‌شود نیز جزو این دسته از سلول‌ها هستند (۳).

سلول‌های بنیادی چند توان<sup>۵</sup>؛ تعداد محدودتری از انواع سلول‌ها را ایجاد می‌کنند مانند سلول‌های بنیادی واقع در بافت‌های بزرگسالان هستند (۴). از مهم‌ترین سلول‌های بنیادی بزرگسالان که امروزه توجه اکثر محققین را به خود جلب کرده است، می‌توان به سلول‌های بنیادی مزانشیم (MSCs) اشاره کرد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی سلول‌های پیش ساز چند توان، غیر خون‌ساز ساکن مغز استخوان و سایر بافت‌ها با منشأ مزانشیمی مثل استخوان، غضروف، ماهیچه، تاندون و چربی می‌باشند. فنوتیپ سلول‌های MSC-CD45، CD29+ و Sca-1+ است و بر اساس نوع تحریکی که از طرف TLRs دریافت می‌کنند می‌توانند به فنوتیپ‌های MSC1 (پیش التهابی) و MSC2 (ضدالتهابی) تمایز یابند. (۵) این سلول‌ها علاوه بر قدرت تمایز به سلول‌های رده خود، توانایی تمایز به سایر رده‌های سلولی با منشأ اندودرم و اکتودرم مثل سلول‌های کبدی، کلیوی، قلبی و حتی سلول‌های عصبی را دارا هستند. بنابراین اصطلاح پرتوان و چندتوان به‌طور متقابل جهت این سلول‌ها به‌کاربرده می‌شود (۶، ۷).

بخشی از مزیت کاربردی این سلول‌ها، مربوط به پتانسیل تعدیل ایمنی این سلول‌ها است که در کنار پتانسیل‌های تمایزی و ترمیمی، آن‌ها را انتخاب بسیار مناسبی برای درمان بیماری‌هایی از این دست

<sup>4</sup> - Embryonic Germ cells

<sup>5</sup> - Multipotent Stem Cells

<sup>1</sup> - Self-renewel

<sup>2</sup> - Totipotent Stem Cells

<sup>3</sup> - Pluripotent Stem cells

## مواد و روش کار

### جداسازی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی:

در این مطالعه تجربی موش‌های نژاد NMRI ماده با سن تقریبی ۶-۸ هفته که از انستیتو پاستور ایران تهیه شده بود با روش جابجایی مهره گردنی (طبق مصوب کمیته اخلاق پزشکی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه) کشته شدند. تحت شرایط استریل سلول‌های مغز استخوان ران و درشت نی به روش فلاشینگ جداسازی شده و پس از سانتریفیوژ (1200 rpm به مدت ۱۰ دقیقه) پلت سلولی حاصل با تراکم  $1 \times 10^5 \text{ Cell/ml}$  در فلاسک T25 حاوی محیط کشت (DMEM- (Gibco, Germany) که به آن ۲ میلی مولار L-Glutamine و 15% FBS (Sigma Alderich) (USA) اضافه شده بود، به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در حضور ۵ درصد  $\text{CO}_2$  کشت داده شدند. متعاقب تعویض محیط کشت سلول‌های غیر چسبنده حذف گردیده و کشت سلول‌های چسبنده ادامه یافت. تعویض محیط هر سه روز یکبار انجام گرفت و پس از رسیدن به 70% Confluence سلول‌های چسبنده با استفاده از 0.05% Trypsin-HAUI سلول‌ها از محیط کشت جدا گردیدند پس از سانتریفیوژ تعداد و درصد زنده‌مانی سلول‌های تریپسینه شده با لام نئو بار و رنگ‌آمیزی با تریپان بلو تعیین شد. سلول‌ها به‌منظور کشت مجدد به فلاسک کشت جدید منتقل شدند این عمل تا پاساژ سوم ادامه یافت. از سلول‌های پاساژ سوم برای مراحل بعدی استفاده شد (۱۷-۲۰).

**تحریک سلول‌های بنیادی مزانشیمی با LPS ( آگونیست TLR4 و Poly I-C (آگونیست TLR3) و تهیه مایع رویی آن‌ها (۱۴، ۲۱، ۲۲):**

جهت تحریک سلول‌های بنیادی مزانشیمی با آگونیست، از کشت‌های سلولی پاساژ سوم، پس از 70-80% confluence استفاده شد. محیط کشت درون فلاسک دور ریخته شده به یک فلاسک محیط کشت تازه حاوی  $10 \text{ ng/ml}$  LPS و به فلاسک دیگر  $10 \text{ ng/ml}$  Poly I-C اضافه شد. پس از گذشت یک ساعت مایع رویی کشت‌های سلولی حاوی آگونیست دور ریخته شد و متعاقب شستشو، محیط کشت جدید به فلاسک‌ها اضافه شد. یک فلاسک بدون تحریک با آگونیست به‌عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد. کشت‌های سلولی تیمار شده جهت بررسی تأثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر فعالیت سلول کشتی، سلول‌های کشتنده طبیعی نسبت به گروه شاهد مورد استفاده قرار گرفت از مایع رویی کشت ۴۸ ساعته سلول‌های مزانشیمی پولاریزه شده و شاهد نیز برای بررسی اثر آن‌ها بر میزان سلول کشتی سلول‌های NK استفاده شد.

### جداسازی لنفوسیت‌های طحال موش (۲۲):

طحال موش تحت شرایط استریل در محیط کشت (Gibco, RPMI 1640 (Germany) حاوی 10% FBS به حالت سوسپانسیون در آمد. سلول‌های تک هسته‌ای با استفاده از شیب گردانیت فایکول با دانسیته  $1.07 \times 10^6$  جداسازی شد. سلول‌های تک هسته‌ای طحالی به مدت 30 دقیقه در انکوباتور قرار داده شد تا سلول‌های فاگوسیت آن به ته ظرف بچسبند، سپس تعداد و زنده‌مانی سلول‌های افکتور شامل لنفوسیت‌های طحال با استفاده از تریپان بلو و لام نئو بار مشخص شده، سلول‌های حاصل به‌منظور سنجش فعالیت سلول کشتی NK سل‌ها در مقابل سلول‌های سرطانی Yac-1 به کار برده شد.

### کشت سل لاین توموری Yac-1 (۲۳، ۲۴):

کشت سلول مطابق پروتوکل ارائه شده توسط انستیتو پاستور ایران که رده سلولی از آنجا تهیه شده بود انجام گرفت. ویال حاوی سل لاین توموری Yac-1 از بانک ازت (196- درجه سانتی‌گراد) خارج و به بن ماری 37 درجه سانتی‌گراد منتقل شد، سپس با محیط کشت RPMI 1640 (Gibco, Germany) حاوی 10% FBS (Sigma Alderich, USA) جهت حذف DMSO که بسیار برای سلول سایتو توکسیک می‌باشد شستشو داده شد. سپس سلول‌ها در محیط کشت حاوی FBS به مدت چند روز کشت داده شد. تعداد و زنده‌مانی سلول‌ها با تریپان بلو و لام نئو بار مشخص شده به غلظت دلخواه برای سنجش NK آماده گردید.

### هم کشتی لنفوسیت‌های طحالی با سلول‌های بنیادی مزانشیمی تیمار شده با LPS و Poly I-C (۲۵):

جهت هم کشتی لنفوسیت‌ها با سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی تریپسینه شدند و سوسپانسیون سلولی با تراکم  $1 \times 10^5 \text{ cell/ml}$  تهیه شد. در ادامه سوسپانسیون سلولی با تراکم  $1 \times 10^6 \text{ cell/ml}$  از سلول‌های لنفوسیت تهیه شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی به نسبت ۱ به ۱۰ با لنفوسیت‌های طحالی در پلیت‌های شش خانهای کشت داده شدند. لنفوسیت‌های طحالی که در مجاورت سلول‌های بنیادی مزانشیمی تحریک نشده با آگونیست کشت داده شدند به‌عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند. نمونه‌های گروه کنترل و تیمار به مدت ۱۲، ۲۴ و ۷۲ ساعت در  $37^\circ\text{C}$  و 5%  $\text{CO}_2$  انکوبه شد. برای مجاور سازی PBMC با مایع رویی سلول‌های MSC، از مایع رویی ۴۸ ساعته استفاده شد و برای گروه تیمار، PBMC به تعداد  $1 \times 10^6$  سلول در مجاورت مایع رویی حاصل از کشت MSC پلاریزه شده و برای گروه کنترل، PBMC به تعداد  $1 \times 10^6$  سلول در مجاورت مایع رویی حاصل از

به گروه‌های کنترل و تیمار اضافه شد و گروه‌های کنترل و تیمار به مدت ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت داخل انکوباتور CO<sub>2</sub> دار با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. پس از اتمام مدت انکوباسیون، میزان زنده‌مانی سلول‌ها به روش MTT سنجیده شد.

#### تجزیه و تحلیل آماری:

در این مطالعه تعداد ۱۰ سر موش مورد استفاده قرار گرفت. هر آزمایش حداقل سه بار تکرار شد و میانگین داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ و آزمون‌های t-test و One-Way ANOVA تست Tukey آنالیز شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شده و داده‌ها در سطح معنی‌داری ( $P \leq 0/05$ ) بیان شدند. آنالیز نمودارهای دستگاه فلوسیتومتری با استفاده از نرم‌افزار FlowMax انجام گرفت.

#### یافته‌ها

در این مطالعه سلول‌های مزانشیم موش تا سه پاساژ کشت داده شده سپس با استفاده از LPS و Poly I-C پولاریزه و تأثیر خود این سلول‌های پولاریزه شده و مایع رویی آن‌ها در میزان سلول کشی سلول‌های کشنده طبیعی مورد بررسی قرار گرفت (شکل-۱).

کشت MSC پلاریزه نشده انکوبه شدند. گروه‌های کنترل و تیمار به مدت ۱۲، ۲۴، ۷۲ ساعت داخل انکوباتور CO<sub>2</sub> دار با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند.

#### مجاورسازی لنفوسیت‌ها تیمار شده با سلول‌های Yac-1

##### و بررسی میزان آپوپتوز (۲۵):

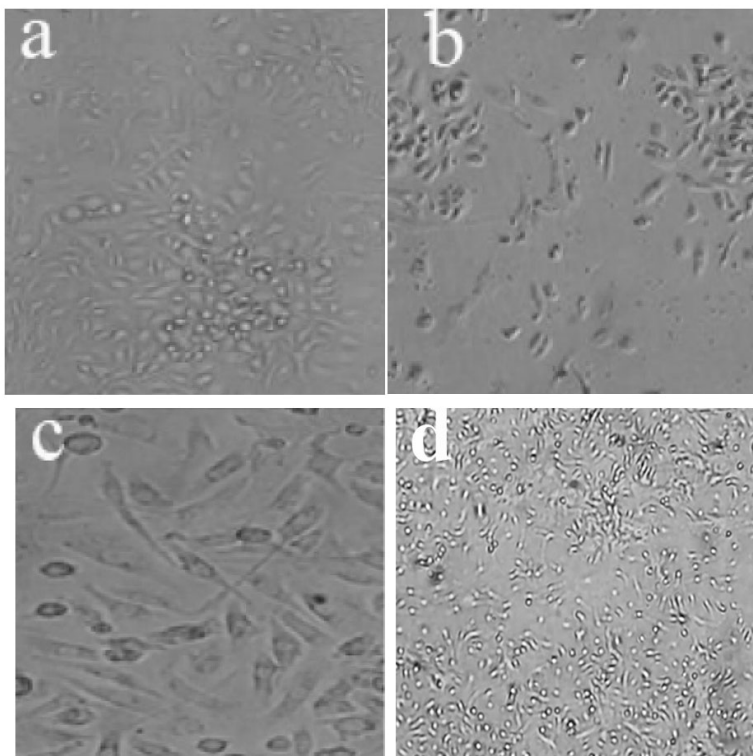
سلول‌های لنفوسیت تیمار شده به نسبت 1: 100 (Effector/Target) با سلول سرطانی Yac-1 مجاور شدند. سلول‌ها به مدت یک ساعت در دمای 37°C و 5% CO<sub>2</sub> انکوبه شدند.

میزان آپوپتوز القا شده در سلول‌های هدف (Yac-1) با استفاده از کیت Annexin/PI و به روش فلوسیتومتری انجام گرفت.

#### بررسی اثر مایع رویی سلول‌های مزانشیمی تیمار شده

##### بر زنده‌مانی سلول‌های PBMC:

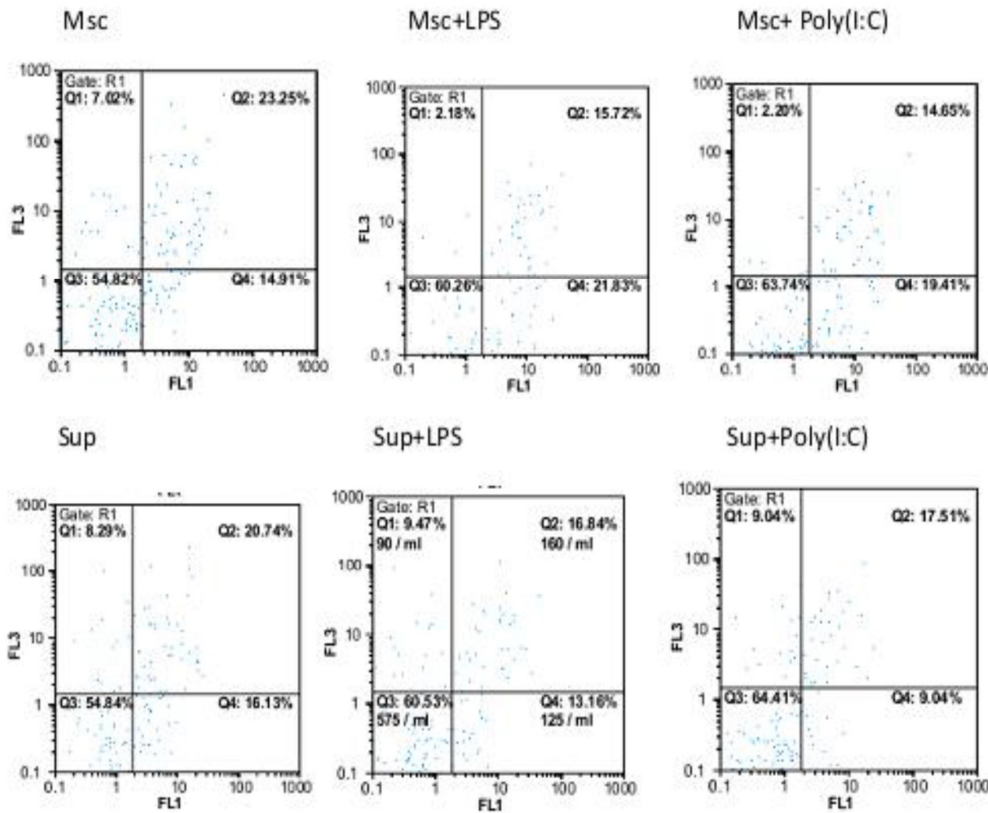
جهت مجاورسازی PBMC با مایع رویی سلول، از مایع رویی ۴۸ ساعته استفاده شد بدین‌صورت که جهت گروه تیمار، ۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام از مایع رویی حاصل از MSCs پلاریزه شده، در سه چاهک ریخته شد و برای گروه کنترل، ۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام از مایع رویی حاصل از MSCs پلاریزه نشده در سه چاهک ریخته شده سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی PBMC



شکل (۱): نمونه‌ای از کشت سلول‌های مزانشیمال موش MMRI. کشت اولیه (a)، کلنی‌های حاصل از رشد سلول‌های مزانشیمال (b)، سلول‌های کشت شده بعد از پاساژ اول (c)، سلول‌های کشت شده بعد از پاساژ سوم (d)، (بزرگنمایی 400×)

لنفوسیت‌های مجاور شده با MSCs پلاریزه شده با LPS و Poly I: C و مایع رویی آن‌ها می‌باشند. گروه‌های کنترل شامل لنفوسیت‌های مجاور شده با MSCs پلاریزه نشده و مایع رویی آن‌ها می‌باشد (شکل-۲).

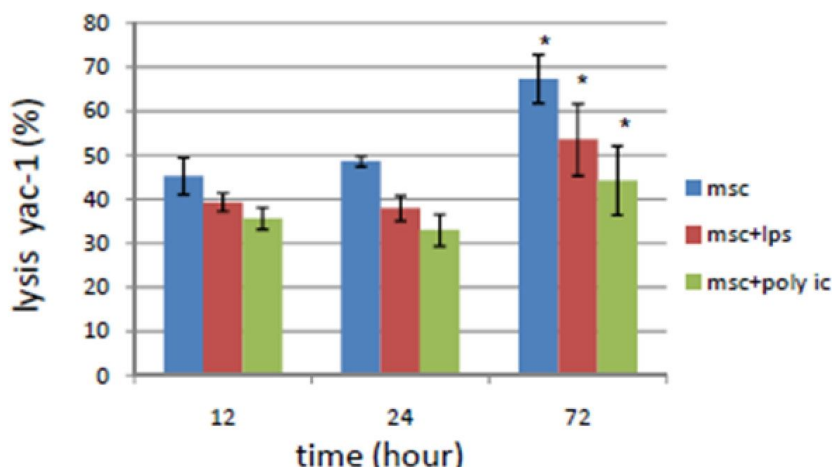
**نتایج سنجش میزان سلول‌کشی سلول‌های کشته طبیعی:**  
در این مطالعه اثر سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) پلاریزه شده و مایع رویی آن بر فعالیت سلول‌کشی سلول‌های کشته طبیعی مورد بررسی قرار گرفت. گروه‌های تیمار شامل



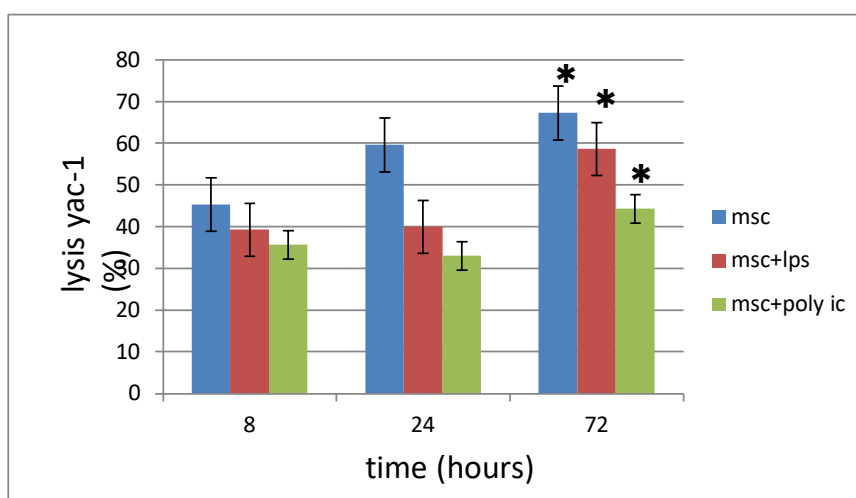
**شکل (۲):** نمونه‌ای از آنالیز فلو سایتمتری درصد لیز سلول‌های Yac-1. نکروز (Q1)، آپوپتوز ثانویه (Q2)، سلول‌های سالم (Q3) و آپوپتوز اولیه (Q4)، آنالیز فوق توسط نرم‌افزار Flow Max انجام شده است.

پلاریزه شده با Poly I-C نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود ( $P \leq 0.05$ ). درصد لیز سلول‌های سرطانی Yac-1 توسط سلول‌های کشته طبیعی پس از مجاورت با MSCs پلاریزه شده با LPS و Poly I-C نسبت به مایع رویی حاصل از آن‌ها در هیچ‌کدام اختلاف معنی‌داری نشان نداد ( $P \leq 0.05$ ) و به‌طور طبیعی میزان سلول‌کشی بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون بیشتر از ۱۲ و یا ۲۴ ساعت انکوباسیون بود ( $P \leq 0.05$ ) (شکل-۳ و شکل-۴).

بعد از ۱۲، ۲۴ و ۷۲ ساعت انکوباسیون، درصد لیز سلول‌های سرطانی Yac-1 توسط سلول‌های کشته طبیعی پس از مجاورت با MSCs پلاریزه شده با LPS و Poly I-C کاهش پیدا کرد که در مورد MSCs پلاریزه شده با Poly I-C نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود ( $P \leq 0.05$ ). مایع رویی حاصل از MSCs پلاریزه شده با LPS و Poly I-C نیز باعث مهار لیز سلول‌های سرطانی Yac-1 توسط سلول‌های کشته طبیعی شد. که در مورد مایع رویی MSCs



شکل (۳): مقایسه میزان سلول کشی سلول‌های کشنده طبیعی مجاور شده با MSCs پلاریزه شده بعد از ۱۲، ۲۴ و ۷۲ ساعت انکوباسیون. (\* نشان‌دهنده معنی‌دار بودن داده‌ها در سطح  $P \leq 0.05$  می‌باشد).



شکل (۴): مقایسه میزان سلول کشی سلول‌های کشنده طبیعی مجاور شده با مایع رویی MSCs پلاریزه شده بعد از ۱۲، ۲۴ و ۷۲ ساعت انکوباسیون. (\* نشان‌دهنده معنی‌دار بودن داده‌ها در سطح  $P \leq 0.05$  می‌باشد).

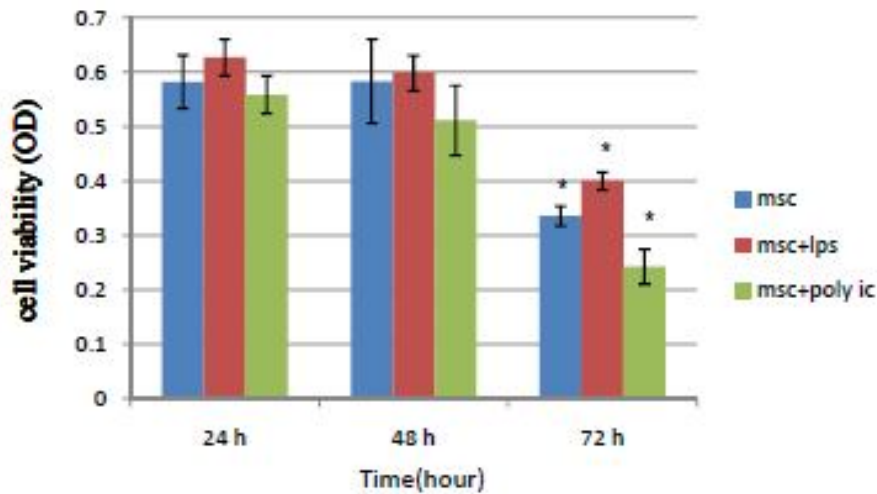
لنفوسیت‌های مجاور شده با MSCs پلاریزه نشده و مایع رویی آن‌ها می‌باشد.

بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مجاورت PBMC با MSCs پلاریزه شده با LPS باعث افزایش و MSCs پلاریزه شده با Poly I: C، باعث کاهش میزان تکثیر و زنده‌مانی PBMC نسبت به PBMC مجاور شده با MSCs پلاریزه نشده گردید. این کاهش تنها در مورد انکوباسیون ۷۲ ساعت معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ) (شکل-۵). نتایج مشابهی نیز در مورد افزودن مایع رویی حاصل از کشت MSCs

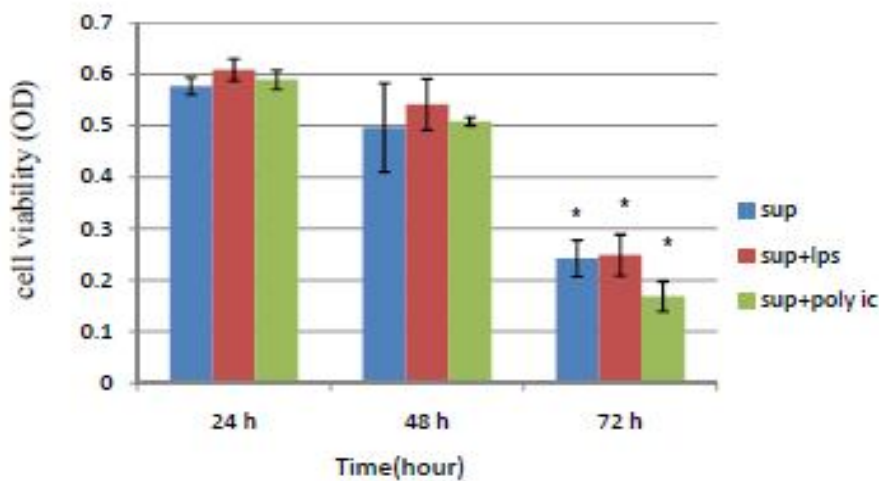
#### میزان تکثیر و زنده‌مانی تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs):

در این مطالعه اثر سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) پلاریزه شده و مایع رویی آن بر میزان تکثیر و زنده‌مانی سلول‌های PBMCs مورد بررسی قرار گرفت. گروه‌های تیمار شامل لنفوسیت‌های مجاور شده با MSCs پلاریزه شده با LPS و Poly I: C و مایع رویی آن‌ها می‌باشند. گروه‌های کنترل شامل

پلاریزه شده با LPS و Poly I: C به PBMC به دست آمد  
(شکل-۶) ( $P < 0.05$ ).



شکل (۵): مقایسه میزان تکثیر وزندهمانی PBMC مجاور شده با MSCs پلاریزه شده بعد از ۱۲، ۲۴ و ۷۲ ساعت انکوباسیون. (\* نشان‌دهنده معنی‌دار بودن داده‌ها در سطح  $P \leq 0.05$  می‌باشد).



شکل (۶): مقایسه میزان تکثیر وزندهمانی PBMC مجاور شده با مایع رویی MSCs پلاریزه شده بعد از ۱۲، ۲۴ و ۷۲ ساعت انکوباسیون. (\* نشان‌دهنده معنی‌دار بودن داده‌ها در سطح  $P \leq 0.05$  می‌باشد).

بیماری‌های خودایمن، GVHD و رد پیوند نقش مهمی ایفا می‌کنند. مطالعات قبلی به‌طور کاملاً واضح نشان دادند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی تکثیر، ترشح سایتوکاین و فعالیت سلول کشتی سلول‌های کشته طبیعی را مهار می‌کنند. (۱۸) همچنین مطالعات قبلی حاکی از آن است که تحریک TLRS در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر فعالیت سرکوب ایمنی آن‌ها تأثیر می‌گذارد (۱۸، ۲۲، ۲۳).

### بحث و نتیجه‌گیری

سلول‌های بنیادی مزانشیمی، به دلیل دارا بودن خاصیت خود نوزائی و توان تمایز به بافت‌ها، منبع مناسبی برای استفاده در برخی از استراتژی‌های سلول و ژن درمانی محسوب می‌شوند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی به علت خصوصیت مهار سیستم ایمنی و توانایی در تطبیق با شرایط التهاب در پیشگیری از بیماری‌هایی نظیر

امکان وجود دارد کاهش فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی در لیز سلول‌های سرطانی نیز به علت افزایش پیام‌های مهار و کاهش پیام‌های فعال کننده تحت تأثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی باشد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی در شرایط التهابی در حضور LPS و با تغییر در ترشح سایتوکاین و لیگاند‌های بیان شده در سطح خود باعث تقویت عملکرد مهار و خود بر علیه سلول‌های کشنده طبیعی می‌شوند (۳۱-۳۳).

مجاورت PBMC با MSCs پلاریزه شده با LPS باعث افزایش و MSCs پلاریزه شده با Poly I: C، باعث کاهش میزان تکثیر و زنده‌مانی PBMC نسبت به PBMC مجاور شده با MSCs پلاریزه نشده گردید. نتایج مشابهی نیز در مورد افزودن مایع رویی حاصل از کشت MSCs پلاریزه شده با LPS و Poly I: C به PBMC به دست آمد.

مقایسه تأثیرات سلول نسبت به مایع رویی نشان داد که تنها در انکوباسیون ۷۲ ساعت در هر دو گروه تیمار شده، اثرات مایع رویی نسبت به سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارای اختلاف معنی‌داری است. و نشان می‌دهد که عوامل اصلی القاء کننده آپوپتوز بیشتر مربوط به فاکتورهای محلول می‌باشد.

نتیجه بررسی واکنش متقابل بین سلول‌های بنیادی مزانشیمی و سلول‌های کشنده طبیعی در چندین مطالعه بیانگر این مطلب بوده است که تکثیر سلول‌های کشنده طبیعی بر اثر IL-2 یا IL-15، توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی مهار می‌شود (۳۴، ۳۵). اثر سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر روی سیتوتوکسیسیته وابسته به سلول‌های کشنده طبیعی جای بحث دارد که احتمالاً به دلیل اختلاف در روش‌های آزمایشگاهی است (۳۶).

اگرچه مطالعات قبلی حاکی از این است که تحریک TLRs بر عملکرد ایمونوسپرسیو سلول‌های بنیادی مزانشیمی تأثیر می‌گذارد، اما تأثیر آگونیست‌های 4، 3، TLR بر عملکرد سلول کشی سلول‌های کشنده طبیعی و زنده‌مانی PBMC هنوز مبهم است (۳۷، ۳۸). مطالعه حاضر نشان می‌دهد که تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان موش سوری با LPS و Poly I: C و مایع رویی آن، بر عملکرد سلول کشی سلول‌های کشنده طبیعی و زنده‌مانی PBMC مؤثر می‌باشد. در نتیجه، سلول‌های بنیادی مزانشیمی در شرایط التهاب در حضور آگونیست‌های TLRs مشتق عوامل عفونی، خود را به شرایط موجود تطبیق داده و عملکرد متفاوتی نشان می‌دهند.

گذشته از نتیجه حاصل، برآورد واکنش متقابل فیزیولوژیک بین سلول‌های بنیادی مزانشیمی و سلول‌های کشنده طبیعی، آثار دو طرفه اعمال شده توسط هر دو نوع سلول، به‌خصوص توانایی سلول‌های کشنده طبیعی در از بین بردن سلول‌های بنیادی

نتایج این مطالعه نشان داد که تحریک سلول‌های بنیادی مزانشیمی با LPS و Poly I-C باعث مهار فعالیت سلول کشی سلول‌های کشنده طبیعی می‌شود. این یافته با نتایج مطالعه قبلی مطابقت دارد (۱۵) مجاور سازی لنفوسیت‌ها با MSCs تیمار شده با LPS در انکوباسیون ۱۲ ساعت به‌طور معنیداری موجب کاهش فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی برای لیز سلول Yac-1 نشد. در حالیکه انکوباسیون ۲۴ ساعته مجاور سازی لنفوسیت‌ها با MSCs تیمار شده با LPS به‌طور معنیداری موجب کاهش توانایی سلول‌های کشنده طبیعی برای لیز سلول Yac-1 شد. در انکوباسیون ۷۲ ساعت گروه‌های تیمار شده با MSCs پلاریزه شده با LPS الگوی مشابهی با انکوباسیون ۲۴ ساعته نشان دادند. با این تفاوت که تأثیرات گروه‌های کنترل و تیمار بر سلول‌های کشنده طبیعی وابسته به زمان بوده و با گذشت زمان تأثیر مهار سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی کاهش پیدا می‌کند. تیمار با Poly I-C نیز هر چند با شدت کمتری باعث کاهش فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی بر علیه سلول‌های توموری گردید. در مورد تحریک سلول‌های بنیادی مزانشیمی با LPS به نظر می‌رسد که به علت افزایش بیان لیگاند، گیرنده‌های مهار سلول‌های کشنده طبیعی (HLA-G) و کاهش در بیان لیگاند‌های فعال کننده MICA (۱۷) و تیزافزایش بیان مهارکننده‌ها PGE2 باعث تقویت اثر سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر مهار سلول‌های کشنده طبیعی می‌شوند (۲۶-۲۸).

مایع رویی حاصل از MSCs پلاریزه شده با LPS و Poly I-C نیز باعث مهار لیز سلول‌های سرطانی Yac-1 توسط سلول‌های کشنده طبیعی شد. که در مورد مایع رویی MSCs پلاریزه شده با Poly I-C نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود ( $P \leq 0.05$ ). از جمله عوامل محلول شناخته شده مؤثر در مهار فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی می‌توان به PGE2 اشاره کرد که مطالعات قبلی افزایش آن را توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی تحریک شده با LPS به‌طور کاملاً مشخص نشان می‌دهد. PGE2 از طریق کاهش بیان زنجیره ۷۰ در سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمی تولید سایتوکاین و سلول کشی توسط این سلول‌ها را در حضور IL-15 مهار می‌کند (۲۹، ۳۰). مطالعاتی که به منظور بررسی مکانیسم‌های مهار سلول‌های کشنده طبیعی برای لیز سلول‌های بنیادی مزانشیمی صورت گرفته است نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی از طریق کاهش بیان لیگاند‌های پذیرنده‌های فعال کننده نظیر PVR و Nectin-2 به‌عنوان لیگاند DNAM-1 ULBPs و MICA به‌عنوان لیگاند NKG2D و افزایش بیان لیگاند‌های پذیرنده‌های مهارکننده سلول‌های بنیادی مزانشیمی نظیر MHC-I باعث حمایت خود در مقابل سلول‌های کشنده طبیعی می‌شوند. این



### تشکر و قدردانی:

بدین‌وسیله از همکاری کلیه اساتید و کارشناسان بخش ایمنی‌شناسی دانشکده دامپزشکی و پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه تشکر و قدردانی می‌گردد.

### حمایت مالی تحقیق:

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه به انجام رسیده است.

### تضاد منافع:

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ تضاد منافی مرتبط با نگارش و انتشار این مقاله ندارند.

### ملاحظات اخلاقی:

این مطالعه تحت نظارت کمیته اخلاق دانشکده دامپزشکی و با کد اخلاق شماره IR-UU-AEC-3/40 انجام گرفته است.

مزانشیمی و همچنین واکنش سلول‌های بنیادی مزانشیمی در شرایط التهاب باید به دقت در شیوه‌های جدید ایمونوتراپی اکتسابی همراه با پیوند مغز استخوان در نظر گرفته شوند. در این مطالعه تأثیر پولاریزاسیون سلول‌های بنیادی و مایع رویی مشتق از آن‌ها بر عملکرد سلول کشی سلول‌های NK در مدل آزمایشگاهی بیماری لنفوم مورد مطالعه قرار گرفت. از آنجائی که این تأثیرات دوجانبه بوده و سیستم ایمنی را هم در جهت پیش التهابی و هم در جهت ضدالتهابی تعدیل می‌کند بنابراین پیشنهاد می‌شود مشابه این مطالعه نه تنها در مورد سایر سرطان‌ها بلکه در مورد بیماری‌های خود ایمن و پیوند نیز با جزئیات بیشتری مورد بررسی قرار گرفته زمینه برای استفاده بالینی از ظرفیت‌های سلول‌های بنیادی و مایع رویی مشتق از آن‌ها که دسترسی و کاربرد آن نسبت به خود سلول‌ها آسان‌تر است فراهم گردد.

### References:

1. Lewis WD, Lilly S, Jones KL. Lymphoma: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician* 2020;101(1):34-41.
2. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004;116(5):639-48. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00208-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00208-9)
3. Mj S. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(23):13726-31. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.23.13726>
4. Shi Y, Inoue H, Wu JC, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat Rev Drug Discov* 2017;16(2):115-30. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.245>
5. Javanmardi Z, Rezaei FS, Delirez N, Habbenaghi R. Evaluation of the effect of bone marrow derived stem cells on the initial stages of repair of the deep flexor joints of the fingers in rabbits: a biomechanical and immunohistochemical study. *Urmia Med J* 2011;22(6):521-9.
6. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 2004;8(3):301-16. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2004.tb00320.x>
7. Guo S, Huang C, Han F, Chen B, Ding Y, Zhao Y, et al. Gastric cancer mesenchymal stem cells inhibit NK cell function through mTOR signalling to promote tumour growth. *Stem Cells Int* 2021;2021(1):9989790. <https://doi.org/10.1155/2021/9989790>
8. Mokarizadeh A, Delirez N, Morshedi A, Farshid AA, Moseibi Q. The effect of exosomes derived from mesenchymal stem cells on the polarization of the immune response of helper T lymphocytes and the clinical picture of autoimmune experimental allergic encephalitis. *Urmia Med J* 2013;23(2):191-201.
9. Liu Z, Guo Y, Huang L, Jia Y, Liu H, Peng F, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells regulate the dysfunction of NK cells via the T cell immunoglobulin and ITIM domain in patients with myelodysplastic syndromes. *Cell Commun Signal* 2022;20(1):169. <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00985-2>
10. Waterman B, Walker JJ, Swaims C, Shortt M, Todd MS, Machen SM, et al. The efficacy of combined cryotherapy and compression compared with cryotherapy alone following anterior cruciate

- ligament reconstruction. *J Knee Surg* 2012;25(02):155-60. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1299650>
11. Darabi E, Morshedi A, Delirez N, Tokmechi A, Mokarizadeh A. The effect of peptidoglycan-lipopolysaccharide on the production of nitric oxide by mouse mesenchymal stem cells (MSC) and the induction of apoptosis in activated T cells. *Urmia Med J* 2012;24(12):996-1004.
  12. Rasmusson I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 2006;312(12):2169-79. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.03.019>
  13. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, et al. Role for interferon- $\gamma$  in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006;24(2):386-98. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0008>
  14. Waterman RS, Henkle SL, Betancourt AM. Mesenchymal stem cell 1 (MSC1)-based therapy attenuates tumor growth whereas MSC2-treatment promotes tumor growth and metastasis. 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045590>
  15. Yigitbilek F, Ozdogan E, Abrol N, Park WD, Hansen MJ, Dasari S, et al. Liver mesenchymal stem cells are superior inhibitors of NK cell functions through differences in their secretome compared to other mesenchymal stem cells. *Front Immunol* 2022;13:952262. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.952262>
  16. Gonzalez VD, Huang Y-W, Delgado-Gonzalez A, Chen S-Y, Donoso K, Sachs K, et al. High-grade serous ovarian tumor cells modulate NK cell function to create an immune-tolerant microenvironment. *Cell Rep* 2021;36(9). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109632>
  17. Bittencourt RAdC, Pereira HR, Felisbino SL, Murador P, Oliveira APed, Deffune E. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Acta Ortopédica Brasileira* 2006;14:22-4. <https://doi.org/10.1590/S1413-78522006000100004>
  18. Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Stem Cells* 2006;249-82. [https://doi.org/10.1007/3-540-31265-X\\_11](https://doi.org/10.1007/3-540-31265-X_11)
  19. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 2005;106(5):1755-61. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1496>
  20. Soleimani M, Nadri S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Nat Protoc* 2009;4(1):102-6. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.221>
  21. Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One* 2010;5(4):e10088. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010088>
  22. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1968;21:77-89.
  23. Piontek GE, Taniguchi K, Ljunggren H, Grönberg A, Kiessling R, Klein G, et al. YAC-1 MHC class I variants reveal an association between decreased NK sensitivity and increased H-2 expression after interferon treatment or in vivo passage. *J Immunol* 1985;135(6):4281-8. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.135.6.4281>
  24. Giuliani M, Bennaceur-Griscelli A, Nanbakhsh A, Oudrhiri N, Chouaib S, Azzarone B, et al. TLR ligands stimulation protects MSC from NK killing. *Stem Cells* 2014;32(1):290-300. <https://doi.org/10.1002/stem.1563>
  25. Gieseke F, Böhringer J, Bussolari R, Dominici M, Handgretinger R, Müller I. Human multipotent

- mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells. *Blood* 2010;116(19):3770-9. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-270777>
26. Bunnell BA, Betancourt AM, Sullivan DE. New concepts on the immune modulation mediated by mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2010;1:1-6. <https://doi.org/10.1186/scrt34>
27. Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell* 2012;10(6):709-16. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.015>
28. Chen K, Wang D, Du WT, Han Z-B, Ren H, Chi Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells hUC-MSCs exert immunosuppressive activities through a PGE2-dependent mechanism. *Clin Immunol* 2010;135(3):448-58. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2010.01.015>
29. Bouffi C, Bony C, Courties G, Jorgensen C, Noel D. IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PLoS One* 2010;5(12):e14247. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014247>
30. Zhao X, Liu D, Gong W, Zhao G, Liu L, Yang L, et al. The toll-like receptor 3 ligand, poly (I: C), improves immunosuppressive function and therapeutic effect of mesenchymal stem cells on sepsis via inhibiting MiR-143. *Stem Cells* 2014;32(2):521-33. <https://doi.org/10.1002/stem.1543>
31. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells* 2006;24(1):74-85. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0359>
32. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood* 2006;107(4):1484-90. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2775>
33. Darlan DM, Munir D, Putra A, Alif I, Amalina ND, Jusuf NK, et al. Revealing the decrease of indoleamine 2, 3-dioxygenase as a major constituent for B cells survival post-mesenchymal stem cells co-cultured with peripheral blood mononuclear cell (PBMC) of systemic lupus erythematosus (SLE) patients. *Med Glasnik* 2022;19(1).
34. Tobin LM, Healy M, English K, Mahon BP. Human mesenchymal stem cells suppress donor CD4+ T cell proliferation and reduce pathology in a humanized mouse model of acute graft-versus-host disease. *Clin Exp Immunol* 2013;172(2):333-48. <https://doi.org/10.1111/cei.12056>
35. Rozenberg A, Rezk A, Boivin M-N, Darlington PJ, Nyirenda M, Li R, et al. Human mesenchymal stem cells impact Th17 and Th1 responses through a prostaglandin E2 and myeloid-dependent mechanism. *Stem Cells Transl Med* 2016;5(11):1506-14. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0243>
36. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol* 2006;36(10):2566-73. <https://doi.org/10.1002/eji.200636416>
37. Blanco B, Herrero-Sánchez MdC, Rodríguez-Serrano C, García-Martínez ML, Blanco JF, Muntión S, et al. Immunomodulatory effects of bone marrow versus adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells on NK cells: Implications in the transplantation setting. *Eur J Haematol* 2016;97(6):528-37. <https://doi.org/10.1111/ejh.12765>
38. McCartney S, Vermi W, Gilfillan S, Cella M, Murphy TL, Schreiber RD, et al. Distinct and complementary functions of MDA5 and TLR3 in poly (I: C)-mediated activation of mouse NK cells. *J Exp Med* 2009;206(13):2967-76. <https://doi.org/10.1084/jem.20091181>

## EVALUATION OF TOLL-LIKE RECEPTORS (TLRS) AGONISTS-TREATED MOUSE BONE MARROW-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS AND THEIR CULTURE SUPERNATANT ON NK CELLS' ACTIVITY AGAINST YAC-1 CELLS

Mohammad Babadi Akasheh<sup>1</sup>, Nowruz Delirazh<sup>2\*</sup>, Shahram Seyyedi<sup>3</sup>

Received: 16 April, 2024; Accepted: 02 July, 2024

### Abstract

**Background & Aims:** Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent, non-hematopoietic precursor cells that can be found in many adult tissues. The multipotency and immunomodulatory potential of MSCs make these cells a remarkable tool for the treatment of some diseases. It seems that stimulation of toll-like receptors expressed on the surface of mesenchymal stem cells may potentiate the immunomodulatory potential of these cells. This study was conducted to investigate the effects of polarized bone marrow-derived mesenchymal stem cells from mice on the cytotoxic activity of natural killer (NK) cells.

**Materials & Methods:** MSCs were isolated from the bone marrow of the femur and tibia of NMRI mice. The third passage of cells was treated with LPS and Poly I-C, then the effects of polarized MSCs, as well as their culture supernatant, on the cytotoxic activity of NK cells against lymphoid cancer cells Yac-1 (as target cells), were evaluated using flow cytometry after 12, 24, and 72 hours.

**Results:** MSCs treated with LPS and Poly I-C, and their respective culture supernatants, decreased the percentage of dead cells (necrosis and apoptosis) (38% and 35% respectively) compared to untreated MSCs (44%). In the case of cell viability, this effect was the opposite; that is, the untreated cells showed higher viability.

**Conclusions:** Previous studies indicated that MSCs inhibit the expansion and cytotoxicity of NK cells on tumor cells; however, our results revealed that MSCs treated with LPS potentiated the inhibitory effects of MSCs on NK cell activity.

**Keywords:** Mesenchymal Stem Cells (MSCs), Natural Killer (NK) Cells, LPS, YAC-1

**Address:** Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Eleven kilometers of Sero road, Urmia, Iran

**Tel:** +989144432650

**Email:** n.delirez@urmia.ac.ir, delirez@urmi.ac.ir

SOURCE: STUD MED SCI 2024; 35(3): 203 ISSN: 2717-008X

This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, as long as the original work is properly cited.

<sup>1</sup> Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

<sup>2</sup> Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding Author)

<sup>3</sup> Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Tehran Medical Science, Islamic Azad University, Tehran, Iran