

Effects of Phagocytosis of Apoptotic Wharton Jelly Mesenchymal Stem Cells on the Activity of C57BL/6 Mice Peritoneal Macrophages

Maryam Ghahremani Piraghaj¹, Seyed Mahmoud Hashemi^{1*}, Hossein Ghanbarian², Sara Soudi³

1. Department of Immunology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Department of Biotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3. Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

(Received:2018/02/12

Accept: 2018/07/25)

Abstract

Background: Macrophages are one of the most important immune cells. They can be divided into two main subgroups of classical or inflammatory macrophages (M1) and alternative or non-inflammatory macrophages (M2), due to different stimuli. One of the factors that make the macrophage to orient towards M2 is the phagocytosis of apoptosis cells (efferocytosis). The phagocytosis of mesenchymal stem cells can be very important in cell therapy due to their immunomodulatory properties and the ability to modulate macrophage function.

Materials and Methods: Mesenchymal stem cells were isolated from Wharton's jelly and characterized using flow cytometry as well as differentiation to Osteoblasts and adipocytes. MSCs in passage two were exposed to UV light for induction of apoptosis for 30 minutes followed by incubation for two hours. The cells were then isolated and added to macrophages in a ratio of 4 to 1. Next, cells were incubated for 48 hours, and then the productions of TNF α and IL10 cytokines were measured using ELISA and nitric oxide production was measured using Griess method. Phagocytosis ability of the macrophages was also measured using yeast and apoptotic thymocytes phagocytosis in different groups.

Results: The phagocytosis of Wharton's jelly–Mesenchymal stem cells (WJ–MSCs) by macrophages reduces the production of inflammatory cytokine TNF α and increases the production of inhibitory cytokine IL-10. Nitric oxide production decreased in these macrophages. In addition, after phagocytosis of apoptotic WJ–MSCs, the ability of yeast phagocytosis in these macrophages was reduced and phagocytosis of apoptotic thymocyte was increased.

Conclusion: The phagocytosis of apoptotic WJ–MSCs induces non-inflammatory phenotype in macrophages. Therefore, injected WJ–MSCs maintain their immunomodulatory properties even if they get apotosed in the body.

Keywords: Macrophage; Wharton's jelly; Mesenchymal Stem Cell; Efferocytosis; Phagocytosis

* Corresponding Author: Seyed Mahmoud Hashemi
Email:smhashemi@sbmu.ac.ir

بررسی اثر فاگوسیتوز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون بر فعالیت ماکروفازهای صفاقی موش C57BL/6

مریم قهرمانی^۱، سید محمود هاشمی^{۱*}، سارا صعودی^۲، حسین قنبریان^۳

- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۵/۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۱۱/۲۳

چکیده:

سابقه و هدف: ماکروفازهای یکی از مهم‌ترین سلول‌های سیستم ایمنی هستند و بنابر محرك‌های متفاوت می‌توانند به دو زیر گروه اصلی ماکروفازهای کلاسیک یا التهابی (M1) و ماکروفازهای آلترا ناتیو یا غیرالتهابی (M2) تقسیم شوند. یکی از عواملی که باعث می‌شود ماکروفاز به سمت M2 جهت گیری کند، فاگوسیتوز سلول‌های آپوپتوز شده یا همان افروسیتوز است. فاگوسیتوز سلول‌های بنیادی مزانشیمی خاصیت ایمونومدولاتوری نیز دارند و اثر آن بر عملکرد ماکروفاز می‌تواند در سلول درمانی حائز اهمیت بالایی باشد.

مواد و روش‌ها: سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) حاصل از ژله وارتون جدا و با بررسی مارکرهای سطحی به روش فلوسیتمتری و همچنین تمایز به استخوان و چربی شناسایی شد. MSCs ها تکثیر شدند و در پاساژ دو برای القای آپوپتوز تحت تأثیر نور UV به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند و سپس از آن برای تکمیل روند آپوپتوز به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند. سپس این سلول‌ها جدا شده و به سبیت ۴ به یک در مجاورت ماکروفاز قرار گرفتند. بعد از ۴۸ ساعت تولید سایتوکاین‌های TNF α و IL10 به روش الایزا و تولید نیتریک اکساید به روش گریس اندازه گیری شد. همچنین قدرت فاگوسیتوز ماکروفازهای گروه‌های مختلف نیز از طریق فاگوسیتوز مخمر و تیموسیت‌های آپوپتوز شده اندازه گیری شد.

یافته‌ها: فاگوسیتوز سلول‌های بنیادی مزانشیمی آپوپتوز شده توسط ماکروفازها موجب کاهش تولید سایتوکاین التهابی TNF α ، افزایش تولید سایتوکاین مهاری IL10 و کاهش تولید نیتریک اکساید نسبت به گروه کنترل می‌شود. همچنین بعد از برداشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی آپوپتوز شده، قدرت فاگوسیتوز مخمر در این ماکروفازها کاهش و قدرت فاگوسیتوز تیموسیت آپوپتوز شده افزایش می‌یابد.

نتیجه‌گیری: فاگوسیتوز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون آپوپتوز شده موجب القای فوتایپ غیرالتهابی در ماکروفاز می‌شود. بنابراین در صورت تزریق سلول بنیادی مزانشیمی حتی اگر پس از تزریق در بدن دچار آپوپتوز نیز شود، باز هم خاصیت ایمونومدولاتوری خود را خواهد داشت.

وازگان کلیدی: ماکروفاز، سلول بنیادی مزانشیمی ژله وارتون، افروسیتوز، فاگوسیتوز

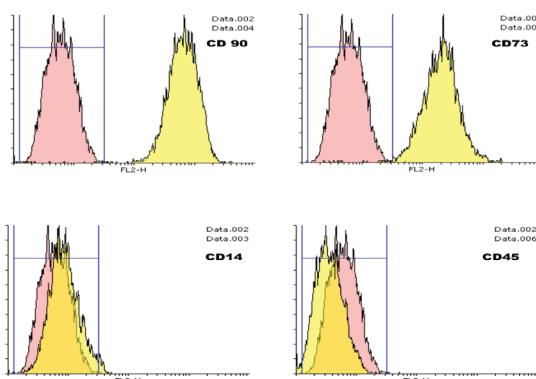
مقدمه:

افروسیتوز موجب گسترش بیماری‌های اتوایمیون و همچنین بیماری‌های التهابی مزمن می‌شود^(۱). مطالعه‌های زیادی در مورد مکانیسم شناسایی و فاگوسیت شدن سلول‌های آپوپتوز شده و رسپتورهای درگیر در آن انجام شده است؛ سلول‌هایی که دچار آپوپتوزیس می‌شوند سیگنال‌های find me (مرایاب) از خود رها می‌کنند و مانند فاکتورهای کموتاکسی برای فاگوسیت‌ها عمل پاکسازی سلول‌های آپوپتوز شده توسط فاگوسیتوز کننده‌های حرفاًی و غیرحرفاًی مانند ماکروفازها که به آن افروسیتوز نیز گفته می‌شود، نقش مهمی در جلوگیری از التهاب ناشی از آزادسازی سایتوکاین‌های التهابی از سلول‌های در حال مرگ و حفظ هموستان بافتی بازی می‌کند و نقص در

نویسنده مسئول: سید محمود هاشمی
پست الکترونیک: smmhashemi@sbmu.ac.ir

برای جداسازی سلول بنیادی مزانشیمی بافت ژله وارتون، بند ناف در شرایط به طور کامل استریل جدا شد و پس از شستشو با بافر PBS و خرد کردن بافت در اندازه‌های کوچک، قطعه‌های کوچک بافت در حضور کلارازنار نوع یک به مدت ۱۵ دقیقه در مای ۳۷°C قرار داده شد تا ماتریکس بین سلولی بافت به طور کامل هضم شده و سوسپانسیون یکنواختی از سلول‌ها به دست آید. سپس با استفاده از سانتریفیوز (۱۵۰۰ RPM) سلول‌های تک هسته‌ای جدا شدند. سلول‌ها به فلاسک کشت سلولی منتقل شده و با استفاده از محیط کشت DMEM[®] Biosera (درصد ۱۵)، پنی‌سیلین، استرپتومایسین و ال‌کلوتامین کشت داده شد. بعد از ۲۴ ساعت و بعد از آن هر ۲ یا ۳ روز یکبار تا پر شدن فلاسک محیط کشت داخل فلاسک با محیط تازه تعویض شد(۱۲).
تعیین هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از ژله وارتون
بند ناف انسان (WJ-MSCs):^۷

برای این منظور سلول‌های بنیادی حاصل از پاساز ۳-تریپسینه شد و به تعداد ۱۰ میلیون سلول در یک میلی‌لیتر در PBS حاوی ۰.۵٪ درصد Tween (TTBS)، ۰.۰۵٪ به صورت سوسپانسیون در آمد. سپس ۱۰۰ ماکروپلیر از این سوسپانسیون با آنتی‌بادی‌های شرکت eBioscience ضد مارکرهای مورد نظر رنگ‌آمیزی شد، سپس سلول‌ها با پارافرمالدهید یک درصد (Sigma-Aldrich) فیکس شدند و توسط FACSCalibur flowcytometer (BD Biosciences) و نرم افزار(CyFlo Ltd., Finland) آنالیز شد. تمامی سلول‌های WJ-MSC از بند ناف نوزاد نرمال و سالم در پاساز سوم بیش از ۱۰۰ درصد مثبت و سلول‌های بنیادی مزانشیمی CD44 و CD90 (CD44 و CD90) بیش از ۹۰٪ مثبت و از نظر مارکر CD45 و CD14 منفی و از نظر شکل کاملاً کشیده و شبیه فیربولاست بودند(شکل ۱).



شکل ۱) سلول‌های بنیادی ژله وارتون از نظر مارکرهای CD 90 ، CD73 (مثبت) و مارکرهای CD14 CD45 (منفی) بودند.

تمایز به چربی و استخوان در سلول‌های بنیادی ژله وارتون:
پتانسیل تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله‌وارتون به بافت چربی و استخوانی به ترتیب با استفاده از Oil Red O (ORO) و Alizarin Red (AR) ارزیابی شد. برای تمایز به چربی، WJ-MSCs در محیط تمایزی حاوی دگراماتازون (۱۰۰۰ مولار)، ایزوپوتیل متیل گرانتین (۰.۵ mM)، انسولین (mM ۶۶) و ایندوماتاسین (mM ۰.۵) به همراه محیط کشت DMEM حاوی ۱ درصد FBS به مدت ۳ هفته انکوبه شد و هر ۳ روز یک بار محیط تمایزی تعویض می‌شد.

برای تمایز به سلول‌های استخوانی از سلول‌های پاساز ۲ استفاده شد. برای تمایز

می‌کنند و ماکروفازها را به محل فرا می‌خوانند^(۲۳). Axl, and Mer ماکروفازها بنابر محرك موجود در ريز محيطشان در گروههایي قرار می‌گيرند که يكی از اين گروهها ماکروفازهایi هستند که به صورت کلاسیک فعال می‌شوند و به آن‌ها ماکروفازهای M1 گفته می‌شود که با شناسایی الگوهای مولکولی همراه با پاتوژن^(PAMPs) و سایتوکاین‌های التهابی تولید شده توسط h^۲ القا می‌شوند و فعالیت‌های ضد میکروبی گسترده‌ای از خود نشان می‌دهند و موجب التهاب می‌شوند. گروه دیگر ماکروفازهایi هستند که به صورت آلتراستیو فعال می‌شوند یا ماکروفازهای M2 که می‌تواند بسته به محركشان به ساب تایپ‌های خاصی تبدیل شوند^(۴). ماکروفازهای M2 سایتوکاین‌های بازسازی‌کننده بافت و named TAM. ماکروفازهای M2 سایتوکاین‌های بازسازی‌کننده بافت و Th2^۲ سایتوکاین‌های خذالت‌هایی تولید می‌کنند و توسط سایتوکاین‌های سلول^۲ تحریک می‌شوند. همین طور ماکروفازهای تنظیمی که با کامپلکس‌های اینمی، سایتوکاین‌های خذالت‌هایی، لیپیدهای اکسیده شده و سلول‌های آپوپتوز شده القا می‌شوند^(۵).

مطالعه‌های زیادی در مورد انواع مختلف سلول‌های آپوپتوز شده و تأثیر فاگوسیتوز آن‌ها بر سیستم اینمی انجام شده است^(۶-۹). اما تا کنون در مورد سلول‌های بنیادی مزانشیمی آپوپتوز شده و تأثیر آن‌ها بر فنوتیپ و عملکرد ماکروفاز مطالعه‌ای انجام نشده است. سلول‌های بنیادی سلول‌های خود تجدید شونده‌ای هستند که توانایی تکثیر و تمایز به رده‌های مختلف سلولی را دارند و همچنین از دیگر عواملی هستند که موجب جهت‌گیری ماکروفازها به سمت ماکروفازهای تنظیمی می‌شوند. این روند در درمان بر پایه سلول در بیماری‌های مختلف مورد توجه قرار گرفته‌اند. این سلول‌ها دارای دو ویژگی متضاد سرکوب و تحریک سیستم اینمی هستند که هر کدام را بسته به شرایط و محیطی که در آن قرار دارند نشان می‌دهند^(۱۰). امروزه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در سلول درمانی استفاده می‌شود ولی درصدی از این سلول‌ها پس از تزریق به دلایل مختلف دچار آپوپتوز می‌شوند. هدف از این مطالعه در وهله اول این است که آیا این سلول‌های بنیادی پس از آپوپتوز شدن نیز قادر به ادامه روند تنظیمی خود خواهند بود یا نه! و همین‌طور با توجه به اینکه بنابر مطالعه‌های انجام شده خود پدیده افروسیتوز به تنظیم سیستم اینمی منجر می‌شود و همین‌طور سلول‌های بنیادی مزانشیمی خاصیت تنظیم اینمی دارند، بنابراین مطالعه فاگوسیتوز سلول‌های بنیادی مزانشیمی آپوپتوز شده توسط ماکروفاز می‌تواند حائز اهمیت باشد. به همین دلیل ما در مطالعه‌ای به بررسی این موضوع پرداختیم.

مواد و روش‌ها: حیوانات:

در این مطالعه تجربی که به صورت in vitro انجام شد، موش‌های نر C57BL/6 (۶-۷ هفته‌ای) از پژوهشگاه رویان تهران خریداری شدند. موش‌ها در شرایط استاندارد و استریل آزمایشگاهی به تعداد هر ۳ موش در یک قفس نگهداری شدند. دسترسی به آب و غذای کافی داشته‌اند و تمام آزمایش‌ها بر اساس مصوبه شورای نگهداری از حیوانات دانشگاه شهید بهشتی تهران انجام شدند.

جاداسازی ماکروفازهای صفاقی موش:

۴ روز پس از تزریق دو میلی‌لیتر تایپوگلیکولات ۳ درصد، ماکروفازهای صفاقی موش C57BL/6 توسط تزریق ۱۰ میلی‌لیتر محیط سرد RPMI[®] (Sharket biosera) جداسازی و سانتریفیوژ و شمارش شده و در پلیت ۲۴ ول و پلیت‌های ۳ سانتی‌متری تقسیم‌بندی شدند و بعد از ۲ ساعت سلول‌های نچسبیده و مرده توسط شستشو با PBS^۵ حذف شدند^(۱۱).

جاداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون:

Pathogen Associated Molecular Patterns	1
T Helper1	2
T Helper 2	3
Roswell Park Memorial Institute	4
phosphate-buffered saline	5

مزانشیمی ڙله وارتون:

پس از کامل شدن پروسه آپویتوزیس و بررسی مورفولوژیک سلول‌ها، این سلول‌ها توسط اسکرایپر و به آرامی از کف پلیت جدا شدند و پس از شمارش به تعداد ۴ به یک به ماکروفاژهای درون پلیت ۲۴ خانه و پلیت‌های ۳ سانتی‌متری اختلاف شدند (به تعدادی از گرهوهای تیموسیت آپویتوز شده و به تعدادی دیگر سلول‌های بنیادی مزانشیمی \pm وارتون آپویتوز شده است) (۱۴).

بررسی ماقروفاژهای تحریک شده با سلول آپوپتوز شده از نظر تولید سایتوکاین:

برای فاگوسیتوز سلول‌های آپوپتوز شده توسط ماکروفاز، یک ساعت و ۳۰ دقیقه زمان در نظر گرفته شد و پس از طی این زمان برای شستشوی سلول‌های مرده و فاگوسیت نشده ماکروفازها ۳ بار با PBS شسته شدند. سپس به نیمی از گروه‌ها به مقدار ۲۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر^۱ LPS اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت برای بررسی تولید سایتوکاین و تست سنجش (Nitric oxid 9NO) در انکوباتور ۳۷ درجه با ۵درصد CO_۲ انکوبه شدند. پس از طی ۴۸ ساعت سوپ‌های سلولی جمع‌آوری و ذخیره شد.

تست بررسی قدرت فاگوسیتوز:

برای بررسی قدرت فاگوستیوز در ماکروفازهای افروسویتوز کرده، از پلیت‌های ۳ سانتی‌متری حاوی ماکروفازهای موشی استفاده شد، مراحل القای آپویتوز در سلول بنیادی مزانشیمی ژله وارتون و افروdon سلول آپویتوز شده و شستشو شو مثل مراحل انجام شده برای اندازه‌گیری سایتوکاین انجام ۴۸ ساعت زمان در نظر گرفته شد. مقدار ۰۰۰۲ گرم مخمر اتوکلاو شده پس از شستشو با PBS و سانتریفیوژ به ۱۰ میلی‌لیتر RPMI اضافه و به طور کامل با محیط مخلوط شد. در تیموسیت‌ها نیز مانند سلول‌های بنیادی مزانشیمی آپویتوز القا شد. در پلیت‌های ۳ سانتی‌متری پس از شستشو با PBS برای بررسی قدرت فاگوستیوز به نیمی از گروه‌ها مخمر و به نیمی دیگر تیموسیت آپویتوز شده به نسبت ۱۰ به یک اضافه شد. پس از یک ساعت و ۳۰ دقیقه این پلیت‌ها با PBS شستشو و پس از فیکس شدن با متابول خالص توسط رنگ گیمسا به مدت ۲۰ دقیقه رنگ آمیزی شدند.

آنالیز آماری:

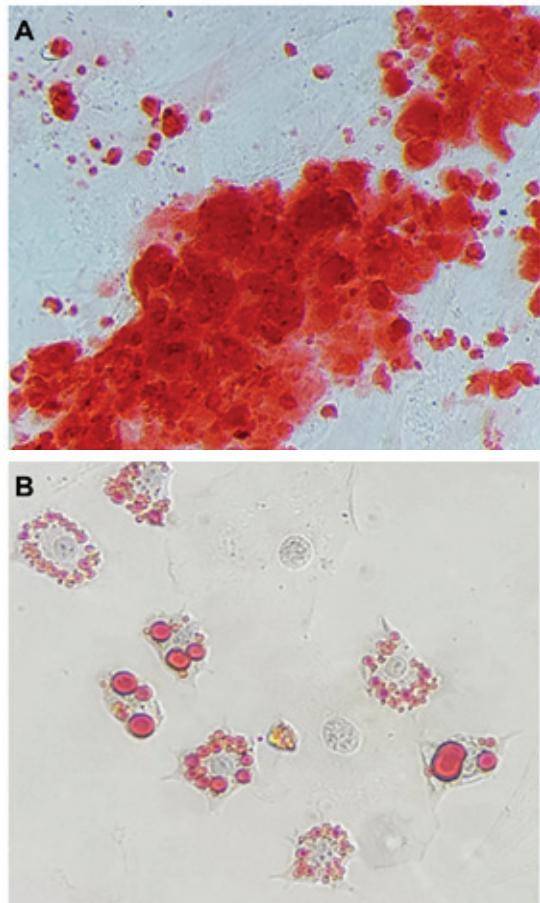
برای آنالیز یافته‌ها از داده‌ها میانگین گرفته شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون Tukey، posthoc One Way ANOVA و معناداری نیز کمتر از $p=0.05$ در نظر گرفته شده است. داده‌ها حاصل از ۳ تکرار است. از نرم‌افزارهای Microsoft Excell، Word XP و GraphPad Prism برای آنالیز آماری و رسم تابیق پایان‌نامه و از نرم‌افزار ۵ نمودارها استفاده شد.

بررسی تولید سایتوکاین:

فاگوکسیتوز سلول‌های بنیادی مزانشیمی آپوپتوز شده، تولید سایتوکاین‌های التهابی TNF α را کاهش می‌دهد در حالی که موجب افزایش سایتوکاین‌های مانند IL10 می‌شود. برای تعیین اینکه فاگوکسیتوز سلول‌های بنیادی آپوپتوز شده چه تاثیری بر عملکرد تولید سایتوکاین ماکروفاژ خواهد داشت و مقایسه آن با ماکروفاژ بدون تحریک، سلول‌های آپوپتوز شده به نسبت ۴ بیک به ماکروفاژها افزوده شد و پس از گذشت ۴۸ ساعت سوب این سلول‌ها از نظر تولید سایتوکاین IL10 و TNF α توسط تست الایزا بررسی شد. بعد از ۴۸ ساعت میزان تولید سایتوکاین التهابی TNF α توسط گروه تست نسبت به گروه کنترل به طور معناداری ($P \leq 0.05$) کاهش یافت. در حالی که تولید سایتوکاین ضدالتهابی IL10 توسط همین ماکروفاژها در مقایسه با گروه کنترل افزایش داشت. در گروهی که حاوی LPS بود این افزایش معنادار بود ($P \leq 0.05$). نمودار ۲۹)

lipopolysaccharide	8
Nitric Oxide	9

سلول بنیادی مزانشیمی به رده استخوانی، محیط تمایزی شامل DMEM حاوی ۷-۱۰ مولار دگرمتازون (سیگما)، بتا گلیسرول فسفات ($M\text{-mM}$) (مرک) و آسکوربیک اسید ($\mu\text{g/ml}^5$) تهییه و به همراه ۱۰ درصد FBS به عنوان محیط تمایزی استخوان استفاده شد و به مدت ۳ هفته و هر ۳ روز یک بار محیط تمایزی تعویض می شد. شکل ۲ (۱۳).



شکل (۲) A: تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون به بافت استخوانی (۲۰۰×)
B: تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون به بافت چربی (۴۰۰×)

القای آپوپتوز در سلول‌های بنیادی ژله وارتون:

پس از رسیدن به ازدحام مورد نظر سلولی در سلول‌های بنیادی ژله وارتون، این سلول‌ها از فلاسک‌های ۷۵ T جدا شده و چون به تعداد بسیار زیادی از این سلول‌ها نیاز بود، در پلیت‌های کشت سلولی ۱۵ سانتی‌متری کشت داده شدند تا به تعداد کافی افزایش جمعیت پیدا کنند. سپس این پلیت‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در معرض اشعه UV قرار داده شد و به دنبال آن برای کامل شدن پروسه آپوپتوزیس به مدت ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵۰ مدرصد CO₂ انکوبه شدند(۱۴).

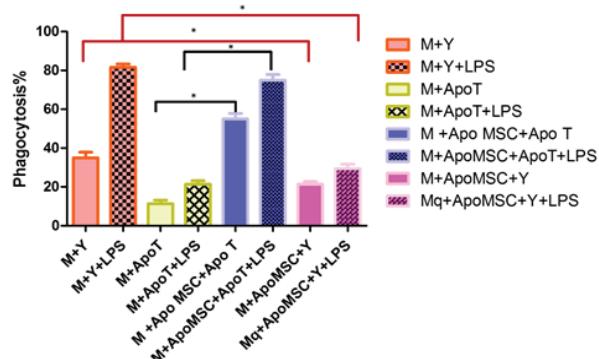
القای آپوپتوز در تیموسیت‌های جدا شده از بافت تیموس موش

C57BL/6

هم کشتی، ماکرو فاژهای موش C57BL/6 با سلول‌های بنیادی

بررسی تولید نیتریک اکساید:
در راستای این مطالعه برای بررسی تغییر فنوتیپ ماکروفاز، تست گریس برای بررسی فعالیت آنزیم نیتریک اکساید سنتز القایی و تولید نیتریک اکساید انجام شد و نتایجی در تایید نتایج سایتوکاینی به دست آمده با این مطالعه حاصل شد. به این صورت که تولید NO در گروه تست نسبت به گروه‌های کنترل کاهش داشت.

بررسی قدرت فاگوسیتوز مخمر و تیموسیت آپوپتوز شده:
در این مطالعه از مخمر کاندیدا الیکنیس به عنوان سلول سالم و تیموسیت‌های آپوپتوز شده به عنوان سلول چار آپوپتوز شده استفاده شد. ۴ نمونه در هر گروه بررسی و در هر نمونه تعداد ۲۰۰ سلول شمارش شد. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، ماکروفازها در گروه کنترل نسبت به گروه تست تعداد بیشتری مخمر را فاگوسیتوی کردند که این افزایش در گروه دارای LPS نسبت به گروه تست بسیار مشهود و معنادار است. از نتایج به دست آمده در هر گروه میانگین گرفته شد و به صورت میانگین \pm انحراف میار گزارش شد(نمودار۳). در صد فاگوسیتوز مخمر در گروه ماکروفازهای برداشت‌کننده سلول‌های بنیادی آپوپتوز شده(شکل ۳ ج و د) نسبت به گروه کنترل (شکل ۳ الف و ب) در هر دو گروه دارای LPS و بدون LPS کاهش معنادار ($P \leq 0.05$) نشان داد. در صد فاگوسیتوز تیموسیت آپوپتوز شده در گروه ماکروفازهای برداشت‌کننده سلول‌های بنیادی آپوپتوز شده نسبت به گروه کنترل افزایش معنادار ($P \leq 0.05$) نشان داد (شکل آورده نشده است).

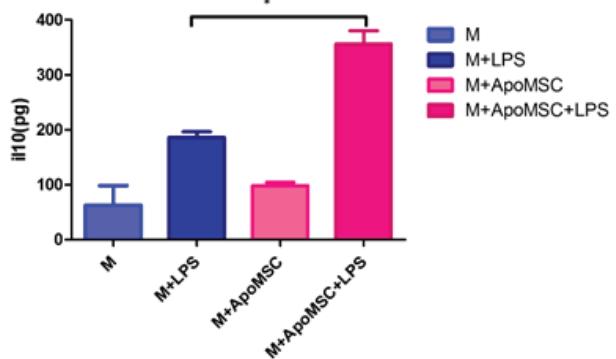


نمودار ۳) نمودار میانگین \pm انحراف میار درصد فاگوسیتوز مخمر و تیموسیت آپوپتوز شده. از نتایج حاصل از ۴ نمونه در هر گروه میانگین گرفته شد. نتایج توسط تست، One Way Anova , Tukey بررسی شد. علامت * در بالای نمودارها، نشان‌دهنده اختلاف معنادار (P≤0.05) بین دو گروه است. (ماکروفاز، M=سلول‌های بنیادی مژانشیمی آپوپتوز شده (Apo MSC=

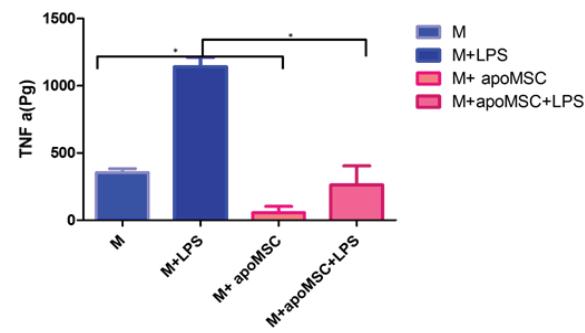
ماکروفاز)=M سلول‌های بنیادی مژانشیمی Apo MSC=Mخمر، Y=تیموسیت‌های آپوپتوز شده (ApoT=).

بحث:

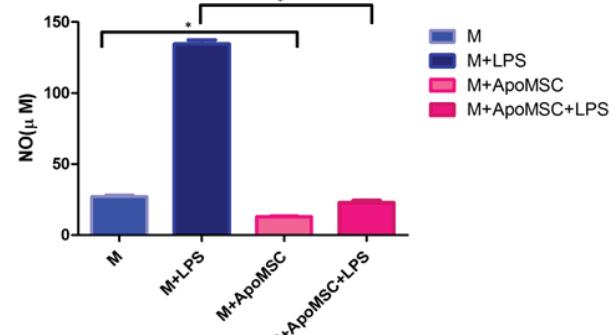
برداشت سریع و به موقع سلول‌های آپوپتوز شده توسط ماکروفازها (افروسیتوز) یک پدیده ضروری برای جلوگیری از انتشار محتواهای التهابی است که پس از آپوپتوز فیزیولوژیکی برای جلوگیری از التهاب در بافت رخ می‌دهد(۱۵). پس از فاگوسیتوز سلول‌های آپوپتوز شده، پروفایل سایتوکاینی ماکروفاز به سایتوکاین‌های ضدالتهابی مانند β -TGF تغییر می‌کند که می‌تواند پاسخ‌های التهابی را در بیماری‌های خودآمنی و بیماری‌های التهابی مزمن مهار کند(۹). MSCs دارای خواص اینномدولاتوری و ایمونورگولاטורی هستند و نقش مهمی در تنظیم سیستم ایمنی بدن و فعالیت سلول‌های ایمنی بدن، از جمله ماکروفازها ایفا می‌کنند(۱۶,۱۹). مطالعه‌های زیادی در مورد تاثیر سلول‌های بنیادی مژانشیمی روی فنوتیپ ماکروفاز انجام شده است. طبق این مطالعه‌ها، میانکنش ماکروفاز با MSCs به تغییر فنوتیپ ماکروفاز به سمت فنوتیپ تنظیمی منجر می‌شود(۲۰,۲۱). با وجودی که جنبه‌های مختلف آثار MSCs‌ها بر القای



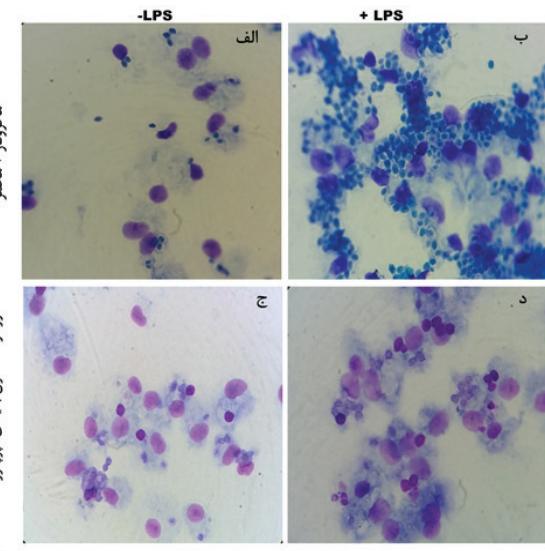
نمودار ۱) نمودار میانگین \pm انحراف میار تولید سایتوکاین TNF-a بر حسب پیکوگرم در میلی لیتر. ۴۸ ساعت پس از مجاورت، سوپرناکانت‌ها از گروه‌های مختلف جمع‌آوری و میزان تولید TNF به روش الایزادر آن‌ها اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از ۴ نمونه در هر گروه میانگین گرفته شد. نتایج توسط تست One Way analysis of variance (ANOVA) Tukey بررسی شد. علامت * در بالای نمودارها، نشان‌دهنده اختلاف معنادار (P≤0.05) بین دو گروه است. (ماکروفاز، M=سلول‌های بنیادی مژانشیمی آپوپتوز شده (Apo MSC=



نمودار ۲) میانگین \pm انحراف میار تولید سایتوکاین IL-10 بر حسب پیکوگرم در میلی لیتر، در گروه‌های مختلف. ۴۸ ساعت پس از مجاورت، سوپرناکانت‌ها از گروه‌های مختلف جمع‌آوری و میزان تولید IL-10 به روش الایزادر آن‌ها اندازه‌گیری شد. از نتایج حاصل از ۴ نمونه در هر گروه میانگین گرفته شد. نتایج توسط تست One Way analysis of variance (ANOVA), Tukey بررسی شد. علامت * در بالای نمودارها، نشان‌دهنده اختلاف معنادار (P≤0.05) بین دو گروه است. (ماکروفاز، M=سلول‌های بنیادی مژانشیمی آپوپتوز شده (Apo MSC=



نمودار ۳) نمودار میانگین \pm انحراف میار تولید نیتریک اکساید بر حسب میکرومول در میلی لیتر در گروه‌های مختلف. ۴۸ ساعت پس از مجاورت، سوپرناکانت‌ها از گروه‌های مختلف جمع‌آوری و میزان تولید نیتریک اکساید به روش گریس در آن‌ها اندازه‌گیری شد. از نتایج حاصل از ۴ نمونه در هر گروه میانگین گرفته شد. نتایج توسط تست One Way analysis of variance (ANOVA) بررسی شد. علامت * در بالای نمودارها، نشان‌دهنده اختلاف معنادار (P≤0.05) بین دو گروه است. (ماکروفاز، M=سلول‌های بنیادی مژانشیمی آپوپتوز شده (Apo MSC=



شکل (۳) (الف) ماکروفاز + مخمر ، (ب) ماکروفاز + مخمر + LPS ، (ج) ماکروفاز + سلول بنیادی مژانشیمی آپوپتوز شده + مخمر ، (د) ماکروفاز + سلول بنیادی مژانشیمی آپوپتوز شده + مخمر + LPS

فتوتیپ ضدالتهابی شناسایی شده است، این مطالعه، اولین مطالعه‌ای است که روی تعامل بین MSCs آپوپتوز شده و ماکروفازها انجام می‌شود. برای این منظور، ماکروفازهای صفاقی 6 / C57BL با ژله وارتون آپوپتوز شده مجاور شده و پاسخ‌های ایمونولوژیک آن‌ها تجزیه و تحلیل شدند.

داده‌های ارائه شده در این تحقیق نشان داد که افروسیتوز های ژله وارتون آپوپتوز شده موجب افزایش تولید IL-10 و کاهش تولید TNF-a است. این نتیجه با گروه تست در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. برای این مطالعه، ماکروفازهای گروه تست در شرایط آپوپتوز شده مشابه MSC‌های زنده دارای اثر ضدالتهابی روی ماکروفازها هستند که تأثیر MSC‌های زنده بر ماکروفازها پیشتر با مطالعه‌ای مختلف نشان داده شده است (۲۲). علاوه بر این، سایر مطالعه‌های انجام شده نشان داده‌اند که تولید سایتوکاین ضدالتهابی در ماکروفازها نه تنها در پاسخ به MSC‌های آپوپتوز شده (مطالعه ما)، بلکه در پاسخ به انواع دیگر سلول‌های آپوپتوز شده مانند نوتروفیل‌ها و لغوسیت‌های ضدالتهابی می‌شود (۹). اگرچه افروسیتوز باعث افزایش تولید سایتوکاین‌های ضدالتهابی می‌شود، اما تفاوت‌هایی در شدت این افزایش و نسبت سایتوکاین‌های ضدالتهابی یا ضدالتهابی وجود دارد. در تایید این موضوع، فیلاردی و همکاران گزارش کردند که افروسیتوز التهابی نوتروفیل باعث القای ماکروفازهای تنظیمی می‌شود که سطوح بالایی از پاسخ‌های ضدالتهابی IL-10 و پاسخ‌های التهابی (NO و TNF α) را تولید می‌کنند (۷). مطالعه دیگری که توسط فادوک و همکاران شان انجام شد کاهش تولید هر دو IL-10 و TNF α توسط ماکروفازها پس از افروسیتوز Jurkat آپوپتوز شده و نوتروفیل‌ها را نشان داد (۹).

مولکول‌های نیتریک اکساید که توسط ماکروفازهای M1 تولید می‌شوند، نقش مهمی در تنظیم سیستم ایمنی دارند (۲۳). ادوارد و همکاران نشان دادند که افروسیتوز تولید آرژیناز را افزایش می‌دهد و تولید NO را کاهش می‌دهد (۲۴). این یافته‌ها در راستای نتایج ماست که نشان می‌دهد فاگوسیتوز MSC‌های آپوپتوز شده به طور قابل توجهی تولید NO در ماکروفازها را کاهش می‌دهد این

نتیجه:

در این مطالعه نشان دادیم که فاگوسیتوز MSCs آپوپتوز شده موجب ایجاد فتوتیپ تنظیمی در ماکروفازها می‌شود. این موضوع با توجه به اینکه درصد قابل توجهی از این سلول‌ها به دلایل مختلف در بدن بیمار در حین یا پس از ورود چهار آپوپتوز می‌شوند، می‌تواند در درمان سلولی مفید باشد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که MSC‌ها می‌توانند حتی در صورت آپوپتوز شدن نیز سیستم ایمنی را تنظیم کنند.

در این مطالعه نشان دادیم که فاگوسیتوز MSCs آپوپتوز شده موجب ایجاد فتوتیپ تنظیمی در ماکروفازها می‌شود. این موضوع با توجه به اینکه درصد قابل توجهی از این سلول‌ها به دلایل مختلف در بدن بیمار در حین یا پس از ورود چهار آپوپتوز می‌شوند، می‌توانند در درمان سلولی مفید باشد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که MSC‌ها می‌توانند حتی در صورت آپوپتوز شدن نیز سیستم ایمنی را تنظیم کنند.

منابع:

- [2017]
1. D.Korns, S.C.Frasch, R. Fernandez-Boyanapalli PMH, and D. L. Bratton. Modulation of macrophage efferocytosis in inflammation. *Frontiers in Immunology*. 2011;2.
 2. Yuichi Yanagihashia, Katsumori Segawa, Ryota Maedab, Yo-ichi Nabeshimab, and Shigekazu Nagataa 1. Mouse macrophages show different requirements for phosphatidylserine receptor Tim4 in efferocytosis. *cell biology*. [Online] 2017; Available from: doi:10.1073
 3. Arif Yurdagul Jr., Amanda C. Doran1, Bishuang Cai1, GF, and Ira A. Tabas1,. Mechanisms and Consequences of Defective efferocytosis in Atherosclerosis. *Frontiers in cardiovascular Medicine*. [Online] 2018; Available from: doi:doi: 10.3389
 4. Delphine Lumbroso, Soaad Soboh1, Avi Maimon, Sagie Schif-Zuck1 AA, Burstyn-Cohen and T. Macrophage-Derived Protein s Facilitates apoptotic Polymorphonuclear cell clearance by resolution Phase Macrophages and supports Their reprogramming. *Frontiers in Immunology*. [Online] 2018; Available from: doi:10.3389
 5. SD Ricardo, H van Goor AE. Macrophage diversity in renal injury and repair. *J Clin Invest*. 2008;118:3522.
 6. D.M.Mosserand J. P. Edwards. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*. 2008;8: 958–969.
 7. Filardy A a, Pires DR, Nunes MP, Takiya CM, Freire-de-Lima CG, Ribeiro-Gomes FL, et al. Proinflammatory clearance of apoptotic neutrophils induces an IL-12(low)IL-10(high) regulatory phenotype in macrophages. *Journal of immunology* (Baltimore, Md.: 1950). doi:10.4049/jimmunol.1000017
 8. Ferracini M, Rios FJO, Pecenin M, Jancar S. Clearance of apoptotic cells by macrophages induces regulatory phenotype and involves stimulation of CD36 and platelet-activating factor receptor. *Mediators of Inflammation*. 2013. Available from: doi:10.1155/2013/950273
 9. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE2, and PAF. *Journal of Clinical Investigation*. 890–898. doi:10.1172/JCI1112
 10. Castillo M, Liu K, Bonilla L, Rameshwar P. The Immune Properties of Mesenchymal Stem Cells. 2007;3(2): 76–80.
 11. Erwig KAM and L-P. Assessment of Apoptotic Cell Phagocytosis by Macrophages.
 12. Soleimani M NS. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Nat Protoc*. 2009;4(1): 102–106.
 13. Cells ES. Current Protocols in Stem Cell Biology [Internet]. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780470151808>. p. 1–11.
 14. Kathleen A. McPhillips and Lars-Peter Erwig. Assessment of Apoptotic Cell Phagocytosis by Macrophages.
 15. Maderna P GC. Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1639: 141–151.
 16. Khosrowpour Z, Hashemi SM, Mohammadi-Yeganeh S, Soudi S. Pretreatment of Mesenchymal Stem Cells With Leishmania major Soluble Antigens Induce Anti-Inflammatory Properties in Mouse Peritoneal Macrophages. *Journal of Cellular Biochemistry*. doi:10.1002/jcb.25926
 17. Hashemi SM, Hassan ZM, Pourfathollah AA, Soudi S, Shafiee A, Soleimani M. Comparative immunomodulatory properties of adipose-derived mesenchymal stem cells conditioned media from BALB/c, C57BL/6, and DBA mouse strains. *Journal of Cellular Biochemistry*. [Online] 2013;114(4): 955–965. Available from: doi:10.1002/jcb.24437
 18. Luo B, Gan W, Liu Z, Jiang M, Luo B, Gan W, et al. Crosstalk between mesenchymal stem cells and macrophages in tissue repair. *Stem Cells*. [Online] Elsevier B.V.; 2014;11(5): 52–59. doi:10.1128/MCB.01394-13
 19. Nauta AJ, Fibbe WE. Review in translational hematology Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Library*. 2008;110(10): 3499–3506. doi:10.1182/blood-2007-02-069716.
 20. K Nemeth, A Leelahavanichkul, PS Yuen et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med*. 2009;15,42: 2009.
 21. Kim J, Hematti P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: A novel type of alternatively activated macrophages. *Experimental Hematology*. [Online] ISEH - Society for Hematology and Stem Cells; 2009;37(12): 1445–1453. doi:10.1016/j.exphem.2009.09.004
 22. Maggini J, Mirkin G, Bognanni I, Holmberg J, Piazzón IM, Nepomnaschy I, et al. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *PLoS ONE*. 2010;5(2). doi:10.1371/journal.pone.0009252
 23. Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nature Reviews Immunology*. 2012;12(5): 383–396. doi:10.1038/nri3209
 24. Edwards, J. P., X. Zhang, K. A. Frauwirth and DMM. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *Leukoc. Biol.* 2006;80: 1298–1307.
 25. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003;3: 23–35.
 26. Johann, A. M., V. Barra, A. M. Kuhn, A. Weigert, A. von Knethen and BB. Apoptotic cells induce arginase II in macrophages, thereby attenuating NO production. *FASEB*. 2007;21: 2704–2712.
 27. Savill J, Dransfield I GC et al. A blast from the past: Clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2002;2: 965–975.
 28. Freire-de-Lima, C. G., Xiao, Y. Q., Gardai, S. J., Bratton, D. L. S, W. P. and Henson PM. Apoptotic cells, through transforming growth factor-beta coordinately induce anti-inflammatory and suppress proinflammatory eicosanoid and NO synthesis in murine macrophages. *Biol. Chem*. 2006;281: 38376–38384.
 29. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*. 2004;25(12): 677–686. Available from: doi:10.1016/j.it.2004.09.015
 30. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *Journal of immunology* 1992;148(7): 2207–2216.