

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

Maryam Ghahremani Piraghaj<sup>1</sup>, Seyed Mahmoud Hashemi<sup>1\*</sup>, Hossein Ghanbarian<sup>2</sup>, Sara Soudi<sup>3</sup>

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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 apoptosed 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 وار تون بر فعالیت ماکروفاژهای صفاقی موش C57BL/6

مریم قهرمانی<sup>۱</sup>، سید محمود هاشمی<sup>۱\*</sup>، سارا سعودی<sup>۲</sup>، حسین قنبریان<sup>۳</sup>

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

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۵/۳

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۱۱/۲۳

### چکیده:

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

**مواد و روش‌ها:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) حاصل از ژله وار تون جدا و با بررسی مارکرهای سطحی به روش فلوسایتومتری و همچنین تمایز به استخوان و چربی شناسایی شد. MSCs ها تکثیر شدند و در پاساژ دو برای القای آپوپتوز تحت تاثیر 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 نسبت ۴ به یک در مجاورت ماکروفاژ قرار گرفتند. بعد از ۴۸ ساعت تولید سایتوکاین‌های *TNFα* و *IL10* به روش الایزا و تولید نیتریک اکساید به روش گریس اندازه‌گیری شد. همچنین قدرت فاگوسیتوز ماکروفاژهای گروه‌های مختلف نیز از طریق فاگوسیتوز مخمر و تیموسیت‌های آپوپتوز شده اندازه‌گیری شد.

**یافته‌ها:** فاگوسیتوز سلول‌های بنیادی مزانشیمی آپوپتوز شده توسط ماکروفاژها موجب کاهش تولید سایتوکاین التهابی *TNFα*، افزایش تولید سایتوکاین مهارتی *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 ماکروفاژها کاهش و قدرت فاگوسیتوز تیموسیت آپوپتوز شده افزایش می‌یابد.

**نتیجه‌گیری:** فاگوسیتوز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وار تون آپوپتوز شده موجب القای فنوتایپ غیرالتهابی در ماکروفاژ 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.

**واژگان کلیدی:** ماکروفاژ، سلول بنیادی مزانشیمی ژله وار تون، افروسیتوز، فاگوسیتوز

### مقدمه:

افروسیتوز موجب گسترش بیماری‌های اتو ایمنی 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 آپوپتوز می‌شوند سیگنال‌های *find me* (مراپیاب) از خود رها می‌کنند و مانند فاکتورهای کموتاکسی برای فاگوسیت‌ها عمل

پاکسازی سلول‌های آپوپتوز شده توسط فاگوسیتوز کننده‌های حرفه‌ای و غیرحرفه‌ای مانند ماکروفاژها 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 هموستاز بافتی بازی می‌کند و نقص در

نویسنده مسئول: سیدمحمود هاشمی  
 پست الکترونیک: [smmhashemi@sbmu.ac.ir](mailto:smmhashemi@sbmu.ac.ir)

می‌کنند و ماکروفاژها را به محل فرا می‌خوانند (۲،۳). Axl, and Mer. ماکروفاژها بنابر محرک موجود در ریز محیطشان در گروه‌هایی قرار می‌گیرند که یکی از این گروه‌ها ماکروفاژهایی هستند که به صورت کلاسیک فعال می‌شوند و به آن‌ها ماکروفاژهای M1 گفته می‌شود که با شناسایی الگوهای مولکولی همراه با پاتوژن<sup>۱</sup> (PAMPs) و سایتوکاین‌های التهابی تولید شده توسط T<sup>H</sup>1 القا می‌شوند و فعالیت‌های ضد میکروبی گسترده‌ای از خود نشان می‌دهند و موجب التهاب می‌شوند. گروه دیگر ماکروفاژهایی هستند که به صورت آلترناتیو فعال می‌شوند یا ماکروفاژهای M2 که می‌توانند بسته به محرک‌شان به ساب تایپ‌های خاصی تبدیل شوند (۴) (collectively AXL, and MERTK named TAM. ماکروفاژهای M2 سایتوکاین‌های بازسازی‌کننده بافت و سایتوکاین‌های ضدالتهابی تولید می‌کنند و توسط سایتوکاین‌های سلول Th2<sup>۲</sup> تحریک می‌شوند. همین‌طور ماکروفاژهای تنظیمی که با کمپلکس‌های ایمنی، سایتوکاین‌های ضدالتهابی، لیپیدهای اکسیده شده و سلول‌های آپوپتوز شده القا می‌شوند (۵،۶).

مطالعه‌های زیادی در مورد انواع مختلف سلول‌های آپوپتوز شده و تأثیر فاگوسیتوز آن‌ها بر سیستم ایمنی انجام شده است (۷،۹). اما تا کنون در مورد سلول‌های بنیادی مزانشیمی آپوپتوز شده و تأثیر آن‌ها بر فوتوپپ و عملکرد ماکروفاژ 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 ماکروفاژها به سمت ماکروفاژهای تنظیمی می‌شوند. از این رو در درمان بر پایه سلول در بیماری‌های مختلف مورد توجه قرار گرفته‌اند. این سلول‌ها دارای دو ویژگی متضاد سرکوب و تحریک سیستم ایمنی 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 مطالعه‌ای انجام شده خود پدیده افروسیتوز به تنظیم سیستم ایمنی منجر می‌شود و همین‌طور سلول‌های بنیادی مزانشیمی خاصیت تنظیم ایمنی دارند، بنابراین مطالعه فاگوسیتوز سلول‌های بنیادی مزانشیمی آپوپتوز شده توسط ماکروفاژ می‌تواند حائز اهمیت باشد. به همین دلیل ما در مطالعه‌ای به بررسی این موضوع پرداختیم.

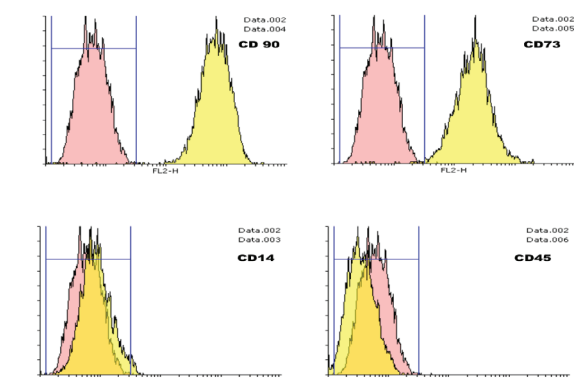
## مواد و روش‌ها: حیوانات:

در این مطالعه تجربی که به صورت *in vitro* انجام شد، موش‌های نر C57BL/6 (۶، ۷ هفته‌ای) از پژوهشگاه روبان 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 براساس مصوبه شورای نگه‌داری از حیوانات دانشگاه شهید بهشتی تهران انجام شده‌اند.

## جداسازی ماکروفاژهای صفاقی موش:

۴روز پس از تزریق دو میلی‌لیتر تایوگلیکولات ۳درصد، ماکروفاژهای صفاقی موش C57BL/6 توسط تزریق ۱۰ میلی‌لیتر محیط سرد RPMI (شرکت biosera) جداسازی و سانتریفیوژ و شمارش شده و در پلیت ۲۴ ول و پلیت‌های ۳ سانتی‌متری تقسیم‌بندی شدند و بعد از ۲ ساعت سلول‌های نجسیبیده و مرده توسط شست‌وشو با PBS<sup>۵</sup> حذف شدند (۱۱).

## جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتنون:



شکل ۱) سلول‌های بنیادی ژله وارتنون از نظر مارکرهای CD90, CD73 (مثبت) و مارکرهای CD14, CD45 (منفی) بودند.

## تمایز به چربی و استخوان در سلول‌های بنیادی ژله وارتنون:

پتانسیل تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتنون 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 دگزامتازون (۱۰<sup>-۷</sup> مولار)، ایزوبوتیل متیل گزانتین (۰.۵ mM)، انسولین (۶۶ mM)، و ایندومتاسین (۰.۵ mM) (به همراه محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ 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 پاساژ ۲ استفاده شد. برای تمایز

Dulbecco's Modified Eagle's Medium	6
Wharton jelly mesenchymal stem cells	7

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

### مزانشیمی ژله وارتون:

پس از کامل شدن پروسه آپوپتوزیس و بررسی مورفولوژیک سلول‌ها، این سلول‌ها توسط اسکرابر 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 اضافه شدند (به تعدادی از گروه‌ها تیموسیت آپوپتوز شده و به تعدادی دیگر سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون آپوپتوز شده است) (۱۴).

### بررسی ماکروفاژهای تحریک شده با سلول آپوپتوز شده از نظر تولید سایتوکاین:

برای فاگوسیتوز سلول‌های آپوپتوز شده توسط ماکروفاژ، یک ساعت و ۳۰ دقیقه زمان در نظر گرفته شد و پس از طی این زمان برای شست‌وشوی سلول‌های مرده و فاگوسیت نشده ماکروفاژها ۳ بار با PBS شسته شدند. سپس به نیمی از گروه‌ها به مقدار ۲۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر LPS<sup>+</sup> اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت برای بررسی تولید سایتوکاین و تست سنجش (Nitric oxid 9NO) در انکوباتور ۳۷ درجه با ۵ درصد CO<sub>2</sub> انکوبه شدند. پس از طی ۴۸ ساعت سوپ‌های سلولی جمع‌آوری و ذخیره شد.

### تست بررسی قدرت فاگوسیتوز:

برای بررسی قدرت فاگوسیتوز در ماکروفاژهای افروسیتوز کرده، از پلیت‌های ۳ سانتی‌متری حاوی ماکروفاژهای موشی استفاده شد. مراحل القای آپوپتوز در سلول بنیادی مزانشیمی ژله وارتون و افزودن سلول آپوپتوز شده و شست‌وشو مثل مراحل انجام شده برای اندازه‌گیری سایتوکاین انجام و ۴۸ ساعت زمان در نظر گرفته شد. مقدار ۰.۰۰۲ گرم مخمر اتوکلاو شده پس از شست‌وشو با PBS و سانتریفیوژ به ۱۰ میلی‌لیتر RPMI اضافه و به طور کامل با محیط مخلوط شد. در تیموسیت‌ها نیز مانند سلول‌های بنیادی مزانشیمی آپوپتوز القا شد. در پلیت‌های ۳ سانتی‌متری پس از شست‌وشو با PBS برای بررسی قدرت فاگوسیتوز به نیمی از گروه‌ها مخمر و به نیمی دیگر تیموسیت آپوپتوز شده به نسبت ۱۰ به یک اضافه شد. پس از یک ساعت و ۳۰ دقیقه این پلیت‌ها با PBS شست‌وشو و پس از فیکس شدن با متانول خالص توسط رنگ گیمسا به مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند.

### آنالیز آماری:

برای آنالیز یافته‌ها از داده‌ها میانگین گرفته شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون One Way ANOVA و Tukey, posthoc استفاده شده است. سطح معناداری نیز کمتر از ۰/۵ در نظر گرفته شده است. داده‌ها حاصل از ۳ بار تکرار است. از نرم‌افزارهای Microsoft Excell, Word XP ۲۰۱۰ برای رسم جدول‌ها و تایپ پایان‌نامه و از نرم‌افزار GraphPad Prism ۵ برای آنالیز آماری و رسم نمودارها استفاده شد.

### نتایج:

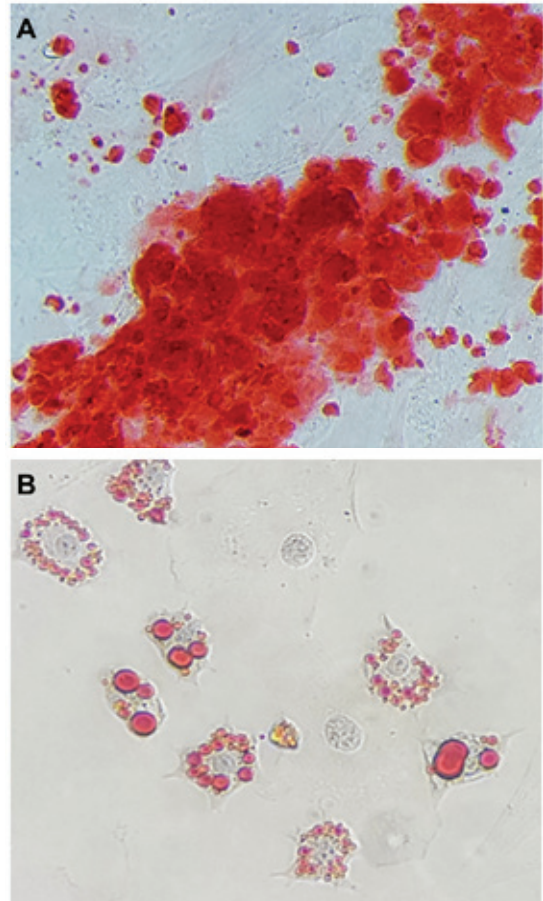
#### بررسی تولید سایتوکاین:

فاگوسیتوز سلول‌های بنیادی مزانشیمی آپوپتوز شده، تولید سایتوکاین‌های التهابی مانند TNF $\alpha$  را کاهش می‌دهد در حالی که موجب افزایش سایتوکاین‌های مهارکننده سیستم ایمنی مانند IL10 می‌شود. برای تعیین اینکه فاگوسیتوز 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 به یک به ماکروفاژها افزوده شد و پس از گذشت ۴۸ ساعت سوپ این سلول‌ها از نظر تولید سایتوکاین IL10 و TNF $\alpha$  توسط تست الایزا بررسی شد. بعد از ۴۸ ساعت میزان تولید سایتوکاین التهابی TNF $\alpha$  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 ۱ و ۲.

lipopolysaccharide 8

Nitric Oxide 9

سلول بنیادی مزانشیمی به رده استخوانی، محیط تمایزی شامل DMEM حاوی ۷-۱۰ مولار دکزامتازون (سیگما)، بتا گلیسرول فسفات (۱۰ mM) (مرک) و آسکوربیک اسید (۵۰  $\mu\text{g/ml}$ ) تهیه و به همراه ۱۰ درصد FBS به عنوان محیط تمایز استخوان استفاده شد و به مدت ۳ هفته و هر ۳ روز یک بار محیط تمایزی تعویض می‌شد. شکل ۲ (۱۳).



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

### القای آپوپتوز در سلول‌های بنیادی ژله وارتون:

پس از رسیدن به ازدهام مورد نظر سلولی در سلول‌های بنیادی ژله وارتون، این سلول‌ها از فلاسک‌های T ۷۵ 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 ۵ درصد CO<sub>2</sub> انکوبه شدند (۱۴).

### القای آپوپتوز در تیموسیت‌های جدا شده از بافت تیموس موش C57BL/6:

برای به دست آوردن تیموسیت‌های موش C57BL/6، بافت تیموس جدا و بین دو لام تحت فشار قرار داده شد و سلول‌ها جدا شدند، در محیط RPMI و در پلیت‌های ۱۵ سانتی‌متری قرار داده شدند و برای القای آپوپتوز، به مدت ۲۰ دقیقه به زیر نور UV (۲۵۴ نانومتر) انتقال داده شدند و برای کامل شدن پروسه آپوپتوزیس به مدت ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه با ۵ درصد CO<sub>2</sub> انکوبه شدند (۱۴).

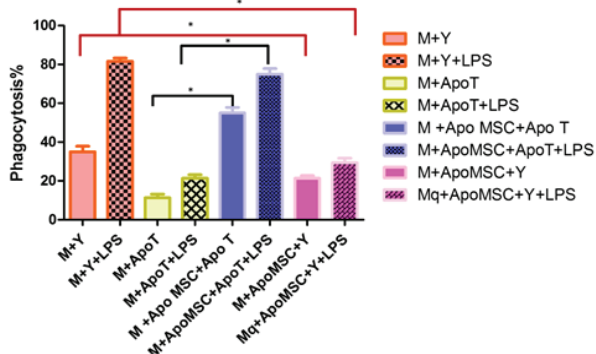
### هم‌کشتی ماکروفاژهای موش C57BL/6 با سلول‌های بنیادی

### بررسی تولید نیتریک اکساید:

در راستای این مطالعه برای بررسی تغییر فنوتیپ ماکروفاژ، تست گریس برای بررسی فعالیت آنزیم نیتریک اکساید سنتاز 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 آپوتوز شده:

در این مطالعه از مخمر کاندیدا آلبیکنس به عنوان سلول سالم و تیموسیت‌های آپوتوز شده به عنوان سلول دچار آپوتوز 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، ماکروفاژها در گروه کنترل نسبت به گروه تست تعداد بیشتری مخمر را فاگوسیت کرده‌اند 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 معیار گزارش شد (نمودار ۴). در صد فاگوسیتوز مخمر در گروه ماکروفاژهای برداشت‌کننده سلول‌های بنیادی آپوتوز 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. درصد فاگوسیتوز تیموسیت آپوتوز شده در گروه ماکروفاژهای برداشت‌کننده سلول‌های بنیادی آپوتوز شده نسبت به گروه کنترل افزایش معنادار ( $P \leq 0/05$ ) نشان داد (شکل آورده نشده است).

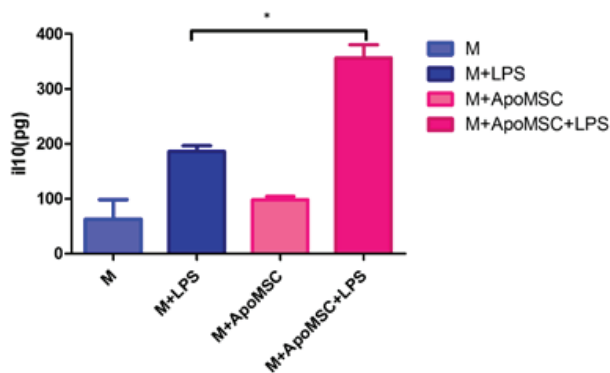


نمودار ۴) نمودار میانگین  $\pm$  انحراف معیار درصد فاگوسیتوز مخمر و تیموسیت آپوتوز شده. از نتایج حاصل از ۴ نمونه در هر گروه میانگین گرفته شد. نتایج توسط تست، One Way Anova, Tukey بررسی شد. علامت \* در بالای نمودارها، نشان‌دهنده اختلاف معنادار ( $P \leq 0/05$ ) بین دو گروه است.

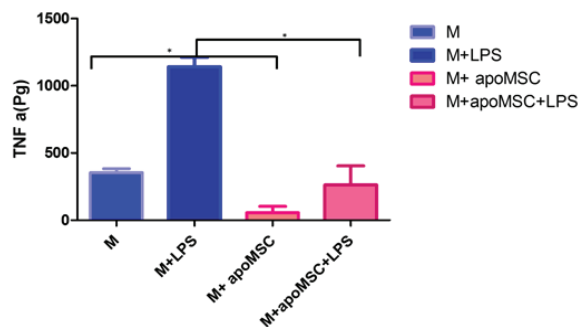
(ماکروفاژ M= سلول‌های بنیادی مزانشیمی=Apo MSC، مخمر Y= تیموسیت‌های آپوتوز شده (ApoT)).

### بحث:

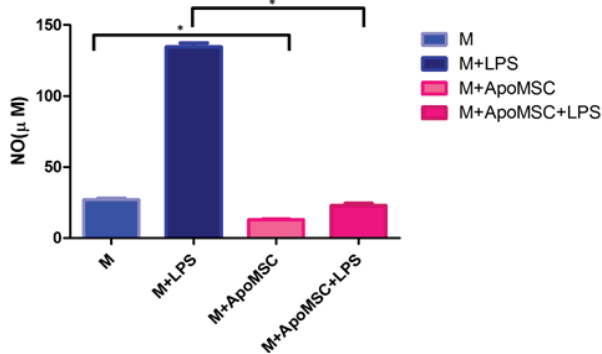
برداشت سریع و به موقع سلول‌های آپوتوز شده توسط ماکروفاژها (افروسیتوز) یک پدیده ضروری برای جلوگیری از انتشار محتوای التهابی است که پس از آپوتوز فیزیولوژیکی برای جلوگیری از التهاب در بافت رخ می‌دهد (۱۵). پس از فاگوسیتوز سلول‌های آپوتوز شده، پروفایل سایتوکاینی ماکروفاژ به سایتوکاین‌های ضدالتهابی مانند  $TGF-\beta$  تغییر می‌کند که می‌تواند پاسخ‌های التهابی را در بیماری‌های خودایمنی و بیماری‌های التهابی مزمن مهار کند (۹). MSCs دارای خواص ایمنومدولاتوری و ایمنوگولاتوری هستند و نقش مهمی در تنظیم سیستم ایمنی بدن و فعالیت سلول‌های ایمنی بدن، از جمله ماکروفاژها ایفا می‌کنند (۱۶، ۱۹). مطالعه‌های زیادی در مورد تاثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی روی فنوتیپ ماکروفاژ انجام شده است. طبق این مطالعه‌ها، میانگین ماکروفاژ با MSCs به تغییر فنوتیپ ماکروفاژ به سمت فنوتیپ تنظیمی منجر می‌شود (۲۰، ۲۱). با وجودی که جنبه‌های مختلف آثار MSCها بر القای



نمودار ۱) نمودار میانگین  $\pm$  انحراف معیار تولید سایتوکاین TNF-a بر حسب پیکوگرم در میلی لیتر. ۴۸ ساعت پس از مجاورت، سوپرناتانت‌ها از گروه‌های مختلف جمع‌آوری و میزان تولید TNF به روش الایزا 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) Tukey بررسی شد. علامت \* در بالای نمودارها، نشان‌دهنده اختلاف معنادار ( $P \leq 0/05$ ) بین دو گروه است. (ماکروفاژ، M= سلول‌های بنیادی مزانشیمی آپوتوز شده (Apo MSC))



نمودار ۲) میانگین  $\pm$  انحراف معیار تولید سایتوکاین IL-10 بر حسب پیکوگرم در میلی لیتر، در گروه‌های مختلف. ۴۸ ساعت پس از مجاورت، سوپرناتانت‌ها از گروه‌های مختلف جمع‌آوری و میزان تولید IL-10 به روش الایزا در آن‌ها اندازه‌گیری شد. 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 ( $P \leq 0/05$ ) بین دو گروه است. (ماکروفاژ، M= سلول‌های بنیادی مزانشیمی آپوتوز شده (Apo MSC))



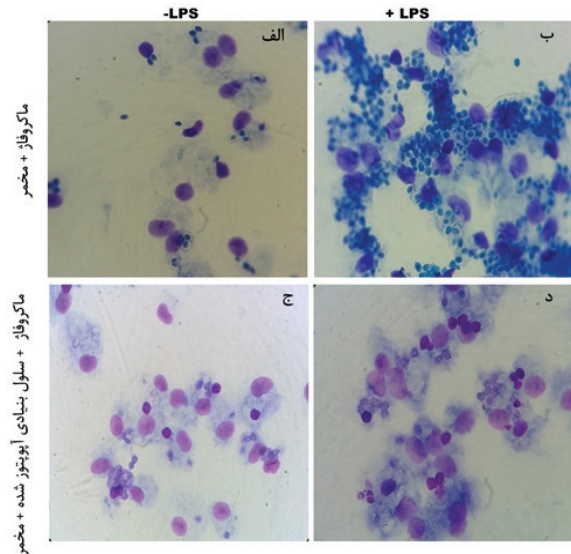
نمودار ۳) نمودار میانگین  $\pm$  انحراف معیار تولید نیتریک اکساید بر حسب میکرومول در میلی لیتر در گروه‌های مختلف. ۴۸ ساعت پس از مجاورت، سوپرناتانت‌ها از گروه‌های مختلف جمع‌آوری و میزان تولید نیتریک اکساید به روش گریس در آن‌ها اندازه‌گیری شد. از نتایج حاصل از ۴ نمونه در هر گروه میانگین گرفته شد. نتایج توسط تست One Way Anova بررسی شد. علامت \* در بالای نمودارها، نشان‌دهنده اختلاف معنادار ( $P \leq 0/05$ ) بین دو گروه است. (ماکروفاژ، M= سلول‌های بنیادی مزانشیمی آپوتوز شده (Apo MSC))

نتیجه به طور تقریبی با اکثریت نتایج حاصل از مطالعه‌های دیگر همخوانی دارد. در مطالعه‌های متعدد نشان داده شده است که فاگوسیتوز سلول‌های آپوپتوز شده می‌تواند فعالیت آنزیم iNOS و تولید NO را مهار کند (۲۶، ۲۳).

ماکروفاژهای تنظیم‌کننده در فرآیند سرکوب التهاب نه تنها با انتشار سایتوکاین‌های مهارکننده بلکه همچنین با افزایش پاکسازی سلول‌های آپوپتوز شده، می‌توانند کمک کنند (۲۵، ۲۴). نشان داده شده است که برداشت سلول‌های آپوپتوز شده گیرنده‌های فاگوسیتیک را درگیر می‌کند. عملکرد آن‌ها به گونه‌ای است که برداشت‌های بعدی را تسهیل می‌کند و ماکروفاژهایی که سلول‌های آپوپتوتیک را می‌بلعد رتینوئیدها غیرکلاسیکی را برای افزایش ظرفیت فاگوسیتی خود تولید می‌کنند (۲۸، ۲۷، ۲۷). یکی از شاخص‌های عملکردی ماکروفاژهای التهابی، فاگوسیتوز افزایش یافته ذرات مخمر در مقایسه با پتانسیل کاهش یافته فاگوسیتوز سلول آپوپتوز شده است. ماکروفاژهای غیرالتهابی در این مورد رفتار متفاوتی نشان می‌دهند. به همین دلیل توانایی فاگوسیتوز سلول‌های آپوپتوز شده یا ذرات مخمر در آزمایش فعلی برای تعیین ویژگی التهابی ماکروفاژهای مورد مطالعه پس از افروسیتوز MSCs بررسی شد. نتایج ما نشان می‌دهد که درصد فاگوسیتوز سلول‌های آپوپتوز شده (تیموسیت‌ها) در ماکروفاژهای فاگوسیت‌کننده MSCهای آپوپتوز شده در مقایسه با گروه‌های کنترل افزایش می‌یابد، در حالی که توانایی فاگوسیتوز سلول‌های سالم (مخمر) در این ماکروفاژها در مقایسه با گروه‌های کنترل کاهش می‌یابد. فاگوسیتوز افزایش یافته سلول‌های مرده یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های تنظیم‌کننده ماکروفاژهاست. با توجه به مطالعه ما و مطالعه‌های انجام شده توسط دیگران، تفاوت در نتایج سایتوکاین‌ها و NO می‌تواند ناشی از تفاوت در ماهیت سلول‌های آپوپتوز شده و وضعیت سلول‌ها باشد. لازم به ذکر است که تعامل با سلول‌های آپوپتوز شده همیشه به مهار سیستم ایمنی منجر نمی‌شود، بلکه فاگوسیتوز سلول‌های آلوده یا سلول‌های توموری باعث فعال شدن ماکروفاژها می‌شود و سلول‌های استرس دیده آپوپتوز شده به تحریک پاسخ ایمنی و بلوغ سلول دندرتی منجر می‌شوند. علاوه بر مشخصات داخلی سلول‌های آپوپتوز، عوامل دیگری نیز وجود دارند که تاثیر سلول‌های آپوپتوز شده بر فاگوسیتوز کننده‌های حرفه‌ای را تحت تاثیر قرار می‌دهند؛ اینها شامل میزان جذب سلول‌های آپوپتوزی، محیطی که در آن آپوپتوز رخ می‌دهد و همچنین opsonin‌ها که بر سلول‌های آپوپتوز شده تاثیر می‌گذارد. این عوامل همچنین نشان می‌دهد که فاگوسیت‌کننده‌های حرفه‌ای می‌توانند سیستم ایمنی را تحریک یا مهار کنند (۲۹). ماکروفاژهای M2 با توجه به تاثیر مدياتورها و محیط (قرار گرفتن در معرض کمپلکس‌های ایمنی، سیتوکین‌های Th2 یا گلوکوکورتیکوئیدها و...) به انواع M2a، M2b و M2c طبقه‌بندی می‌شوند. قرار گرفتن در معرض سلول‌های آپوپتوز شده فنوتیپ خاصی را ایجاد می‌کند که پاسخی مشابه Th2 را تولید می‌کند و به بیان آرژنیناز یک منجر می‌شود (۳۰). یافته‌های ما نشان داد که فاگوسیتوز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتنون آپوپتوز شده ممکن است فنوتیپ‌های تنظیمی M2 را در یک ماکروفاژ ایجاد کند.

### نتیجه:

در این مطالعه نشان دادیم که فاگوسیتوز MSCs آپوپتوز شده موجب ایجاد فنوتیپ تنظیمی در ماکروفاژها 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 دچار 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.



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

فنوتیپ ضدالتهابی شناسایی شده است، این مطالعه، اولین مطالعه‌ای است که روی تعامل بین MSCs آپوپتوز شده و ماکروفاژها انجام می‌شود. برای این منظور، ماکروفاژهای صفاقی C57BL/6 با MSCs ژله وارتنون آپوپتوز شده مجاور شده و پاسخ‌های ایمنولوژیک آن‌ها تجزیه و تحلیل شدند.

داده‌های ارائه شده در این تحقیق نشان داد که افروسیتوز MSCهای ژله وارتنون آپوپتوز شده موجب افزایش تولید IL-10 و کاهش تولید TNF-a توسط ماکروفاژهای گروه تست در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. این نتیجه تاییدی بود بر اینکه MSCها در شرایط آپوپتوز شده مشابه MSCهای زنده دارای اثر ضدالتهابی روی ماکروفاژها هستند که تاثیر MSCهای زنده بر ماکروفاژها بیشتر با مطالعه‌های مختلف نشان داده شده است (۲۲). علاوه بر این، سایر مطالعه‌های انجام شده نشان داده‌اند که تولید سایتوکاین ضدالتهابی در ماکروفاژها نه تنها در پاسخ به MSCهای آپوپتوز شده (مطالعه ما)، بلکه در پاسخ به انواع دیگر سلول‌های آپوپتوز شده مانند نوتروفیل‌ها و لنفوسیت‌های T نیز القا می‌شود (۹). اگرچه افروسیتوز باعث افزایش تولید سایتوکاین‌های ضدالتهابی می‌شود، اما تفاوت‌هایی در شدت این افزایش و نسبت سایتوکاین‌های التهابی یا ضد التهابی وجود دارد. در تایید این موضوع، فیلاردی و همکاران گزارش کردند که افروسیتوز التهابی نوتروفیل باعث القای ماکروفاژهای تنظیمی می‌شود که سطوح بالایی از پاسخ‌های ضدالتهابی IL-10 و پاسخ‌های التهابی (TNFα و NO) را تولید می‌کند (۷). مطالعه دیگری که توسط فادوک و همکاران نشان انجام شد کاهش تولید هر دو IL-10 و TNFα توسط ماکروفاژها پس از افروسیتوز Jurkat T آپوپتوز شده و نوتروفیل‌ها را نشان داد (۹).

مولکول‌های نیتریک اکساید که توسط ماکروفاژهای M1 تولید می‌شوند، نقش مهمی در تنظیم سیستم ایمنی دارند (۲۳). ادوارد و همکاران نشان دادند که افروسیتوز تولید آرژنیناز 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 ماکروفاژها را کاهش می‌دهد این

## منابع:

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 Segawaa, Ryota Maedab, Yo-ichi Nabeshimab, and Shigekazu Nagataa I. 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. Doran<sup>1</sup>, Bishuang Cai<sup>1</sup>, GF, and Ira A. Tabas<sup>1</sup>. Mechanisms and Consequences of Defective efferocytosis in Atherosclerosis. *Frontiers in cardiovascular Medicine*. [Online] 2018; Available from: doi:doi: 10.3389
4. Delphine Lombroso, Soaad Soboh<sup>1</sup>, Avi Maimon<sup>1</sup>, Sagie Schif-Zuck<sup>1</sup> 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- $\beta$ , 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. Madera 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 [2017]
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.