Research on Medicine Original Article

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences Vol.42; No.3; 2018

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

Maryam Ghahremani Piraghaj[1], Seyed Mahmoud Hashemi[1*], Hossein Ghanbarian[2], Sara Soudi[3]

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 immunomedulatory 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 TNFα 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 TNFα 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:smmhashemi@sbmu.ac.ir

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-21]

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دور ۴۲، شماره ۳، ۱۳۹۷، صفحات ۱۶۰ تا ۱۶۶

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

مریم قهرمانی [۱]، سید محمود هاشمی [۱*]، سارا صعودی [۲]، حسین قنبریان [۳]

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

چکیده:

سابقه وهدف: : 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 آلترناتیو 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 وارتون 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 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 ماکروفاژها کاهش و قدرت فاگوسیتوز تیموسیت آپوپتوز شده افزایش می‌یابد.

نتیجه‌گیری: فاگوسیتوز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون 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 وارتون، افروسیتوز، فاگوسیتوز

مقدمه:

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 افروستوز موجب گسترش بیماری‌های اتو ایمیون 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 (مرابیاب) از خود رها می‌کنند و مانند فاکتورهای کموتاکسی برای فاگوسیت‌ها عمل

نویسنده مسئول: سیدمحمود هاشمی
پست الکترونیک: *smmhashemi@sbmu.ac.ir*

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-21]

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[1](PAMPs) و سایتوکاین‌های التهابی تولید شده توسط T h1[2] القا می‌شوند و فعالیت‌های ضد میکروبی گسترده‌ای ازخود 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) AXL, and MERTK (collectively named TAM. ماکروفاژهای M2 سایتوکاین‌های بازسازی‌کننده بافت و سایتوکاین‌های ضدالتهابی تولید می‌کنند و توسط سایتوکاین‌های سلول Th2[3] تحریک می‌شوند. همین طور 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 تاثیر آن‌ها بر فنوتیپ 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 مطالعه‌های 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 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 براساس مصوبه شورای نگه‌داری از حیوانات دانشگاه شهید بهشتی تهران انجام شده‌اند.

جداسازی ماکروفاژهای صفاقی موش:

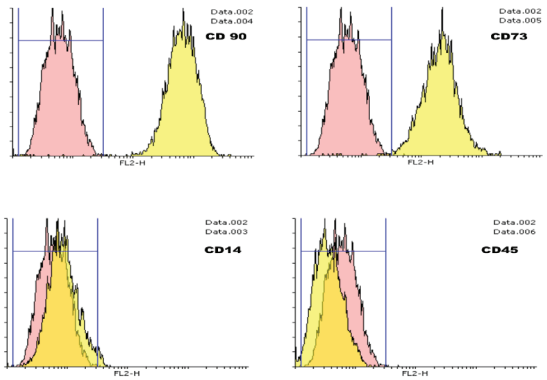
۴روز پس از تزریق دو میلی‌لیتر تایوگلیکولات۳درصد، ماکروفاژهای صفاقی موش C57BL/6 توسط تزریق ۱۰ میلی‌لیتر محیط سرد RPMI[4](شرکت biosera) جداسازی و سانتریفیوژ و شمارش شده و در پلیت ۲۴ ول و پلیت‌های ۳ سانتی‌متری تقسیم‌بندی شدند و بعد از ۲ ساعت سلول‌های نچسبیده و مرده توسط شست‌وشو با PBS[5] حذف شدند(۱۱) .

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون:

برای جداسازی سلول بنیادی مزانشیمی بافت ژله وارتون، بند ناف در شرایط به طورکامل استریل جدا شد و پس از شست‌وشو با بافر PBS و خرد کردن بافت در اندازه‌های کوچک، قطعه‌های کوچک بافت در حضور کلاژناز نوع یک به مدت۱۵ دقیقه در دمای۳۷ قرار داده شد تا ماتریکس بین سلولی بافت به طورکامل هضم شده و سوسپانسیون یکنواختی از سلول‌ها به دست آید. سپس با استفاده از سانتریفیوژ (۱۵ دقیقه و ۱۵۰۰ RPM) سلول‌های تک هسته‌ای جدا شدند. سلول‌ها به فلاسک کشت سلولی منتقل شده و با استفاده از محیط کشت DMEM[6] Biosera محتوی(۱۵درصد FBS)، پنی‌سیلین، استرپتومایسین و ال‌گلوتامین کشت داده شد. بعد از ۲۴ ساعت و بعد از آن هر۲ 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 ازژله وارتون بند ناف انسان (WJ- MSCs)[7]:

برای این منظور سلول‌های بنیادی حاصل از پاساژ ۳تریپسینه شد و به تعداد ۱۰ میلیون سلول در یک میلی‌لیتر در PBS حاوی ۰،۰۵درصد tween ۲۰،(TTBS) به صورت سوسپانسیون در آمد. سپس ۱۰۰ ماکرولیتر از این سوسپانسون با آنتی بادی‌های 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 پاساژ سوم بیش از ۸۰درصد از نظر مارکرهای سلول های بنیادی مزانشیمی (CD44 و CD90) بیش از ۹۰درصد مثبت و از نظر مارکر CD45 و CD14 منفی و از نظر شکل کاملا کشیده و شبه فیبروبلاست بودند(شکل ۱).



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

تمایز به چربی و استخوان در سلول‌های بنیادی ژله وارتون:

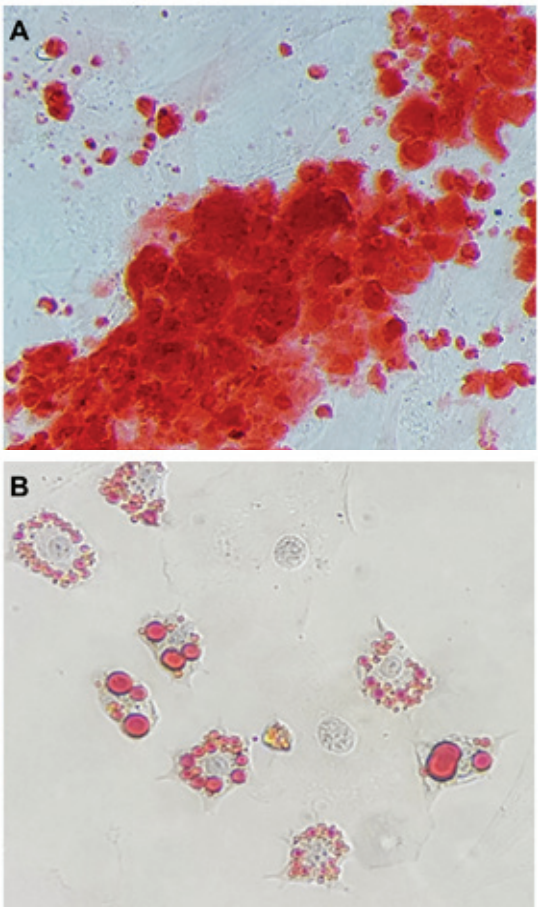
پتانسیل تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله‌وارتون به بافت چربی و استخوانی به ترتیب با استفاده از Oil Red O (ORO) و Alizarin Red (AR) ارزیابی شد. برای تمایز به چربی، WJ- MSCs در محیط تمایزی حاوی دگزامتازون(10^{-7}مولار)، ایزوبوتیل متیل گزانتین (۰.۵ mM، IBMX)، انسولین (۶۶ mM) و ایندومتاسین ۰.۵ mM (به همراه محیط کشت DMEM حاوی ۱۰درصد FBS به مدت ۳ هفته انکوبه شد و هر ۳ روز یک بار محیط تمایزی تعویض می‌شد.

برای تمایز به سلول‌های استخوانی از سلول‌های پاساژ۲ استفاده شد. برای تمایز

1 Pathogen Associated Molecular Patterns
2 T Helper1
3 T Helper 2
4 Roswell Park Memorial Institute
5 phosphate-buffered saline
6 Dulbecco's Modified Eagle's Medium
7 Wharton jelly mesenchymal stem cells

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-21]

سلول بنیادی مزانشیمی به رده استخوانی، محیط تمایزی شامل DMEM حاوی ۷- ۱۰مولار دگزامتازون (سیگما)، بتا گلیسرول فسفات (۱۰ mM) (مرک) و آسکوربیک اسید (۵۰µg/ml) تهیه و به همراه ۱۰درصد 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).



شکل۲) :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 ازدحام مورد نظر سلولی در سلول‌های بنیادی ژله وارتون، این سلول‌ها از فلاسک‌های ۷۵ Tجدا 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 ۵درصد CO2 انکوبه شدند(۱۴).

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

برای به دست آوردن تیموست‌های موشC57BL/6، بافت تیموس جدا و بین دو لام تحت فشار قرار داده شد و سلول ها 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 مدت۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه با ۵درصد CO^2 انکوبه شدند(۱۴).

هم‌کشتی ماکروفاژهای موش C57BL/6 با سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون:

پس از کامل شدن پروسه آپوپتوزیس و بررسی مورفولوژیک سلول‌ها، این سلول‌ها توسط اسکراپر 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 آپوپتوزشده است(۱۴).

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

برای فاگوسیتوز سلول‌های آپوپتوز شده توسط ماکروفاژ، یک ساعت و ۳۰دقیقه 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[8] LPS اضافه شد و به مدت۴۸ ساعت برای بررسی تولید سایتوکاین و تست سنجش (Nitric oxid 9NO) در انکوباتور ۳۷ درجه با ۵درصدCO 2 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 تیموست آپوپتوز شده به نسبت ۱۰ به یک اضافه شد. پس ازیک 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 از۰/۵ در نظر گرفته شده است. داده ها 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:

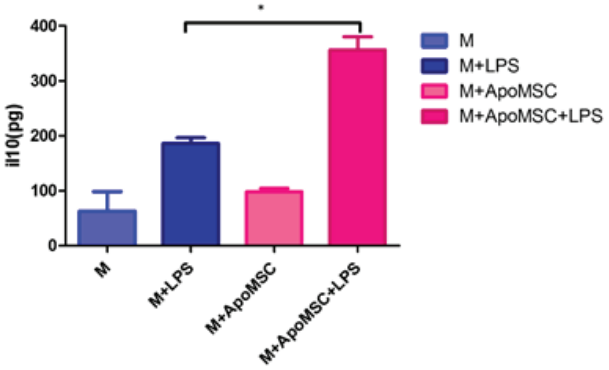
بررسی تولید سایتوکاین:

فاگوسیتوز سلول‌های بنیادی مزانشیمی آپوپتوز شده، تولید سایتوکاین‌های التهابی مانند TNFα 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 TNFα توسط تست الایزا بررسی شد. بعد از ۴۸ ساعت میزان تولید سایتوکاین التهابی TNFα توسط گروه تست نسبت به گروه کنترل به طور معناداری (P≤ 0/05)کاهش یافت. در حالی که تولیدسایتوکاین ضدالتهابی IL10 توسط همین ماکروفاژها در مقایسه با گروه کنترل افزایش داشت. در گروهی که حاوی LPS بود این افزایش معنادار بود(P≤ 0/05) نمودار ۱و۲.

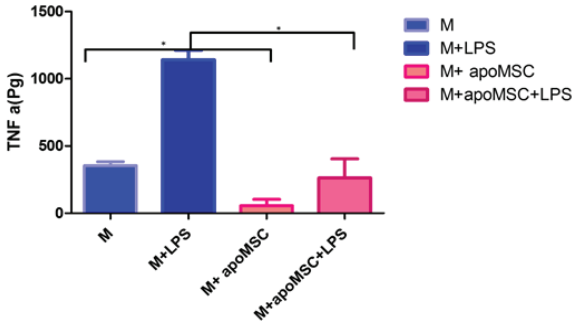
8 lipopolysaccharide

9 Nitric Oxide

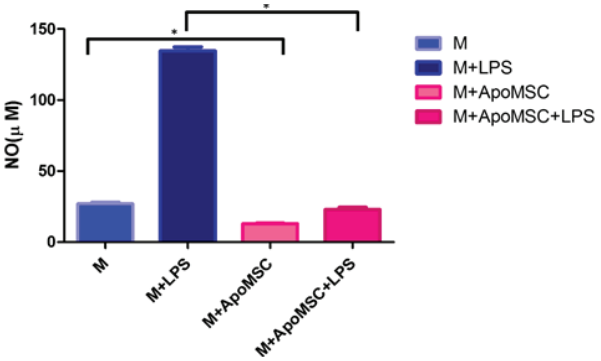
[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-21]



نمودار ۱) نمودار میانگین ± انحراف معیار تولید سایتوکاین TNF-a بر حسب پیکوگرم در میلی لیتر. ۴۸ ساعت پس از مجاورت، سوپرناتانت‌ها از گروه‌های مختلف جمع‌آوری و میزان تولیدTNF-a 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 Tukey (ANOVA)،بررسی شد. علامت *در بالای نمودارها، نشان‌دهنده اختلاف معنادار (P≤ 0/05) بین دوگروه است. (ماکروفاژ، M= سلول‌های بنیادی مزانشیمی آپوپتوز شده =Apo MSC)



نمودار ۲) میانگین ± انحراف معیار تولید سایتوکاین IL-10 بر حسب پیکوگرم در میلی‌لیتر، در گروه‌های مختلف. ۴۸ ساعت پس از مجاورت، سوپرناتانت‌ها از گروه های 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≤ 0/05) بین دوگروه است. (ماکروفاژ، M= سلول‌های بنیادی مزانشیمی آپوپتوز شده =Apo MSC)



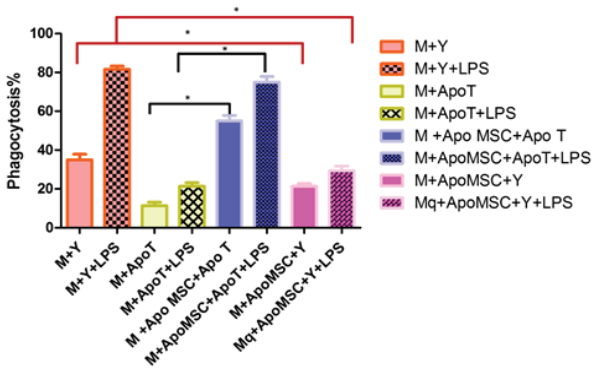
نمودار۳) نمودار میانگین ± انحراف معیار تولید نیتریک اکساید بر حسب میکرومول در میلی‌لیتر در گروه‌های مختلف. ۴۸ ساعت پس از مجاورت، سوپرناتانت‌ها از گروه‌های مختلف جمع‌آوری و میزان تولید نیتریک اکساید به روش گریس در آن‌ها اندازه‌گیری شد. از نتایج حاصل از ۴ نمونه در هر گروه میانگین گرفته شد. نتایج توسط تست One Way Anova بررسی شد. علامت *در بالای نمودارها، نشان‌دهنده اختلاف معنادار(P≤ 0/05) بین دو گروه است. (ماکروفاژ، M= سلول‌های بنیادی مزانشیمی آپوپتوز شده=Apo MSC)

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 آپوپتوز شده:

در این مطالعه از مخمر کاندیدا آلبیکنس به عنوان سلول سالم و تیموسیت‌های آپوپتوز شده به عنوان سلول دچار 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. ماکروفاژها در گروه کنترل نسبت به گروه تست تعداد بیشتری مخمر را فاگوسیت کرده‌اند که این افزایش در گروه دارایLPS نسبت به گروه تست بسیار مشهود و معنادار است. از نتایج به دست آمده در هر گروه میانگین گرفته شد و به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد(نمودار۴). در صد فاگوسیتوز مخمر در گروه ماکروفاژهای 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≤ 0/05) نشان داد. درصد فاگوسیتوز تیموسیت آپوپتوز شده در گروه ماکروفاژهای برداشت‌کننده سلول‌های بنیادی آپوپتوز شده نسبت به گروه کنترل افزایش معنادار (P≤ 0/05) نشان داد (شکل آورده نشده است).



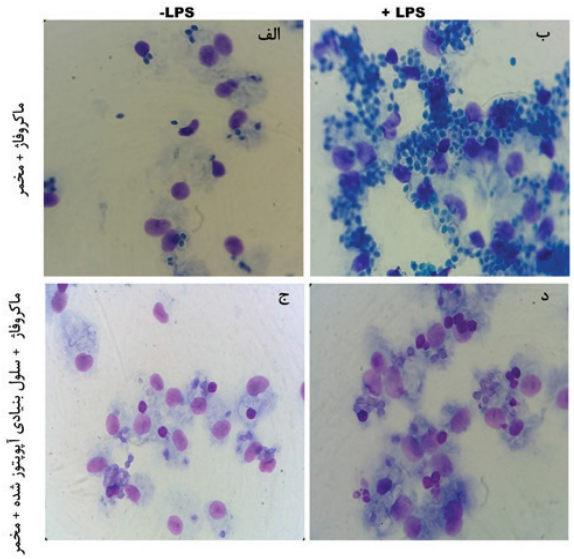
نمودار ۴) نمودار میانگین ± انحراف معیار درصد فاگوسیتوز مخمر و تیموسیت آپوپتوز شده. از نتایج حاصل از ۴ نمونه در هر گروه میانگین گرفته شد. نتایج توسط تست، One Way Anova Tukey،بررسی شد. علامت *در بالای نمودارها، نشان‌دهنده اختلاف معنادار (P≤ 0/05) بین دو گروه است.

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

بحث:

برداشت سریع و به موقع سلول‌های آپوپتوز شده توسط ماکروفاژها (افروسیتوز) یک پدیده ضروری برای جلوگیری از انتشار محتوای التهابی است که پس از آپوپتوز فیزیولوژیکی برای جلوگیری از التهاب در بافت رخ می‌دهد(۱۵). پس از فاگوسیتوز سلول‌های آپوپتوز شده، پروفایل سایتوکاینی ماکروفاژ به سایتوکاین‌های ضدالتهابی مانند TGF-β تغییر می‌کند که می‌تواند پاسخ‌های التهابی را در بیماری‌های خودایمنی و بیماری‌های التهابی مزمن مهار کند(۹). MSCs دارای خواص ایمنومدولاتوری و ایمونورگولاتوری 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، میانکنش ماکروفاژ با MSCs به تغییر فنوتیپ ماکروفاژ به سمت فنوتیپ تنظیمی منجر می‌شود(۲۰،۲۱). با وجودی که جنبه‌های مختلف آثار MSCها بر القای

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-21]



شکل۳) 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 آپوپتوزشده و ماکروفاژها انجام می‌شود. برای این منظور، ماکروفاژهای صفاقی C57BL/6 با MSCs ژله وارتون آپوپتوزشده مجاور شده و پاسخ های ایمونولوژیک آن‌ها تجزیه و تحلیل شدند.

داده‌های ارائه شده در این تحقیق نشان داد که افروسیتوز MSCهای ژله وارتون آپوپتوزشده 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 تاثیرMSCهای زنده بر ماکروفاژها پیشتر 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 همکاران‌شان 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 آرژینیاز 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 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 تولیدNO را مهار کند(۲۳،۲۶).

ماکروفاژهای تنظیم‌کننده در فرآیند سرکوب التهاب نه تنها با انتشار سایتوکاین‌های مهارکننده بلکه همچنین باافزایش پاکسازی سلول‌های آپوپتوشده، می‌توانند کمک کنند(۲۴،۲۵). 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 می‌بلعند رتینوئیدها غیرکلاسیکی را برای افزایش ظرفیت فاگوسیتی خود تولید می‌کنند (۷،۲۷،۲۸). یکی از شاخص‌های عملکردی ماکروفاژهای التهابی، فاگوسیتوز افزایش یافته ذرات مخمر در مقایسه با پتانسیل کاهش یافته فاگوسیتوز سلول آپوپتوزشده 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 (تیموسیت ها) در ماکروفاژهای فاگوسیت کننده 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 مطاله 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 دندریتی 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 آپوپتز 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 مدیاتورها و محیط (قرار گرفتن در معرض کمپلکس‌های ایمنی، سیتوکین های 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 پاسخ‌هایی مشابه Th2 را تولید می‌کند و به بیان آرژنیناز یک منجر می‌شود(۳۰). یافته‌های ما نشان داد که فاگوسیتوز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ژله وارتون آپوپتوزشده ممکن است فنوتیپ‌های تنظیمی M2را در یک ماکروفاژ ایجاد کند.

نتیجه:

در این مطالعه نشان دادیم که فاگوسیتوز MSCs آپوپتوزشده 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 MSC ها می‌توانند حتی در صورت آپوپتوز شدن نیز سیستم ایمنی را تنظیم کنند.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-21]

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 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 [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.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-21]