



## زنده مانی نوتروفیل خون محیطی به دنبال تیمار با فاکتورهای محلول ناشی از سلول بنیادی مزانشیمال رت

سحر هامون نورد<sup>۱</sup>، نوروز دلیرز\*<sup>۲</sup>، ناهیده افضل آهنگران<sup>۳</sup>

۱- کارشناسی ارشد ایمنی شناسی، دانشگاه ارومیه، آذربایجان غربی، ایران

۲- دانشیار ایمنی شناسی، دانشگاه ارومیه، آذربایجان غربی، ایران

۳- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه ارومیه، آذربایجان غربی، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۳/۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۹/۲۷

### چکیده

مقدمه: سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs)، دارای خاصیت تنظیمی سیستم ایمنی و پتانسیل بالا تکثیر و تمایز به رده‌های مختلف سلولی می‌باشند. مطالعه حاضر با هدف تأثیر فاکتورهای محلول ناشی از سلول بنیادی مزانشیمال رت بر زنده‌مانی نوتروفیل انجام گرفته است.

روش بررسی: سلول مزانشیمال از مغز استخوان فمور و تیبیا رت ۸-۶ هفته استحصال و در محیط DMEM کشت داده شد. پس از بلوغ سلول مزانشیم، مایع رویی آن با نوتروفیل جدا شده از خون محیطی رت به مدت ۱ ساعت و در  $37^{\circ}\text{C}$  انکوبه شد. زنده‌مانی نوتروفیل در انکوباسیون‌های ۶ و ۲۴ ساعته با مایع رویی MSCs به روش فلوسیتومتریک و با استفاده از An/PI اندازه‌گیری شد. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون توکی تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج: انکوباسیون ۶ ساعته نوتروفیل با مایع رویی سلول، درصد سلول سالم را در سطح معنی‌داری افزایش و میزان نکروز را کاهش داد ( $p < 0/05$ ) اما کاهش آپوپتوز نسبت به گروه کنترل معنی‌دار نبود ( $p > 0/05$ ). در انکوباسیون ۲۴ ساعته نوتروفیل با مایع رویی سلول، درصد سلول سالم به طور معنی‌داری افزایش و میزان آپوپتوز نسبت به گروه کنترل کاهش داشت ( $p < 0/05$ ) کاهش نکروز سلولی در گروه تیمار نسبت به کنترل معنی‌دار نبود ( $p > 0/05$ ).

نتیجه‌گیری: علاوه بر نقش مهم کلینیکی MSCs، برخی جنبه‌های بیولوژیکی آن شامل: خودنوزایی، تکثیر و تنظیم ایمنی، پتانسیل مهمی برای سل تراپی است.

واژه‌های کلیدی: فاکتورهای محلول سلول مزانشیم، نوتروفیل، زنده مانی، سلول بنیادی مزانشیمال

## مقدمه

از نقش سلول مزانشیم بر سیستم ایمنی ذاتی، اطلاعات چندانی در دسترس نیست اما در مواردی گزارش شده است که در تجویز سیستماتیک سلول مزانشیم، این سلول‌ها قابلیت لانه‌گزینی در موضع التهاب را داشته و به دنبال پاسخ به ریز محیط موجود، قادر به تنظیم و کنترل پاسخ سیستم ایمنی ذاتی به طرق مختلف از جمله: اعمال پاسخ ضدالتهابی سلول دندریتیک به سلول T و سرکوب نمودن عملکرد سلول NK را دارند (۹). از طرفی MSCs نه تنها چند TLR را بر سطح خود بیان می‌دارد بلکه دارای توانایی مهاجرت، تهاجم و ترشح فاکتورهای تنظیم‌کننده پاسخ ایمنی، به دنبال عوامل تحریک‌کننده آگونیست‌های TLRs می‌باشد (۱۰). تحریک سلول مزانشیم با آگونیست TLR3 موجب پلاریزه شدن سلول مزانشیم به سمت MSC2، سرکوب سیستم ایمنی و پاسخ ضدالتهابی می‌شود و تحریک آن با آگونیست TLR4 همراه با LPS منجر به پلاریزه شدن به MSC1 و پیشبرد پاسخ به سمت پیش التهابی می‌شود (۱۱) که از این خاصیت سلول می‌توان در جهت کارآیی مورد انتظار در موارد درمانی بهره جست.

تولید طیف وسیعی از سایتوکاین‌ها (IL-12, IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF, ...) توسط MSCs در مراحل مختلف تمایزی به سلول‌های چربی، استخوان و اندوتلیال می‌تواند در اهداف درمانی بر پایه ایمونوتراپی حاصل از تولید سایتوکاین‌ها، علیه پاتوژن‌های مختلف با عوارض التهابی و غیرالتهابی حائز اهمیت باشد (۱۲). از دیگر خصوصیات بارز MSCs، بیان سطح متنوعی از گیرنده‌های سایتوکاینی و کموکاینی است که می‌تواند به سمت سایتوکاین‌ها و کموکاین‌های موضع التهاب مهاجرت نماید (۱۳).

به طور کلی، تزریق سیستماتیک MSCs دارای پتانسیل درمانی برای عوارض التهابی و واکنش مغایر با سیستم ایمنی مانند آلرژی، بیماری پیوند علیه بافت میزبان (GVHD) و بیماری‌های اتوایمیون بدون نیاز به بیان MHC می‌باشد (۱۴). در مواردی نیز، مطالعات پیشین حاکی از تأثیر سلول‌های

سلول بنیادی مزانشیمی واقع در مغز استخوان برای اولین بار توسط Friedenstein و همکارش در سال ۱۹۶۶ میلادی شناسایی شد. این محققان در مطالعه‌ای، سلول‌های پیش ساز استخوان را از مغز استخوان موش صحرایی استخراج و توصیف کردند (۱). ولی اولین شواهد قطعی توسط Friedenstein در اواسط سال ۱۹۷۰ میلادی ارائه شد (۲). علاوه بر مغز استخوان، سایر منابع حاوی سلول‌های بنیادی مزانشیمی شامل: بافت پیوست، استخوان تراپکولار، بافت چربی، پرده سینویال، عضله اسکلتی و دندان شیری است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی نیز دارای خاصیت انعطاف پذیری (Plasticity) می‌باشند (۳،۴).

دانشمندان در تلاش هستند تا بتوانند سلول‌های بنیادی بالغین را در سیستم کشت سلول به انواع سلول‌های اختصاصی تبدیل کنند تا از آنها برای درمان بیماری‌ها و صدمات بافتی استفاده کنند. با این تفاسیر که عملکرد سرکوب ایمنی توسط MSCs منجر به بهبود بقا پیوند و بیماری‌های خودایمن می‌شود (۵) و واکنش بین سلول‌های NK و سلول‌های مزانشیم انسان بر لاین سلولی K562 بیانگر این موضوع است که سلول مزانشیم فنوتیپ، تکثیر و عملکرد سایتوتوکسیتی سلول‌های NK را تضعیف می‌کند (۶).

به نظر می‌رسد که تقویت پتانسیل‌های تعدیل یا سرکوب ایمنی این سلول‌ها با مداخله در سنسورهای زودرس بیان شده در سطح این سلول‌ها در شرایط *In vitro*، می‌تواند در درمان بیماری‌های خودایمن یا واکنش‌های ازدیاد حساسیتی کاربرد داشته باشد (۷).

سیستم ایمنی ذاتی اولین خط دفاعی علیه عوامل عفونی است. نوتروفیل‌ها به عنوان یکی از اجزای این سیستم، اولین عامل جهت مقابله با عوامل باکتریایی و قارچی، قبل از سیستم ایمنی هومورال و سلولی هستند. نوتروفیل‌ها، لکوسیت‌های با هسته چند شکلی بوده و فراوان‌ترین گلبول سفید در گردش خون و واسطه اولین پاسخ‌های التهابی هستند (۸).

شستشوی پلیت سلولی با سرم دکستروز ۵٪ (Sigma-USA) به میزان  $4 \times 10^6 / \text{ml}$  همگن گردید. با توجه به بلوغ فنوتایپی سلول مزانشیم در روز ۱۴ و اینکه این سلول‌ها پس از یک دوره مشخص زمانی دارای توان عملکردی می‌باشند و همچنین با استناد به مراجع پیشین (۱۵، ۱۶، ۱۸) از مایع رویی سلولی ۴۸ ساعته سلول مزانشیم پس از بلوغ، در روز ۱۴، با سوسپانسیون سلولی نوتروفیل حاوی  $4 \times 10^6 / \text{ml}$  استفاده شد. از طرفی سوسپانسیون نوتروفیل با محیط کشت به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفت.

جهت سنجش زنده مانی نوتروفیل در مواجهه با مایع رویی سلول مزانشیم (کیت Annexin-PI)، سوسپانسیون نوتروفیل با تراکم  $4 \times 10^6 / \text{ml}$  با مایع رویی سلول در دو زمان ۶ و ۲۴ ساعته در داخل انکوباتور حاوی  $\text{CO}_2$  با دمای  $37^\circ\text{C}$  انکوبه گردید. پس از دو مرتبه شستشو سلول نوتروفیل در  $300 \times \text{g}$  به مدت ۵ دقیقه، سلول‌ها در  $1 \text{ ml}$  بایندینگ بافر با تراکم  $3 \times 10^6 / \text{ml}$  به صورت سوسپانسیون تهیه شد. میزان  $100 \mu\text{l}$  از سوسپانسیون فوق را با  $5 \mu\text{l}$  annexin و  $5 \mu\text{l}$  PI ترکیب نموده و در محیط تاریک و دمای آزمایشگاه به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه گردید.

پس از افزودن  $400 \mu\text{l}$  از محلول بایندینگ بافر به میکروتیوپ،  $500 \mu\text{l}$  از محلول فوق را با PBS: Phosphate Buffer Saline (Sigma-آمریکا) رقیق نموده و میزان زنده‌مانی (درصد سلول سالم، آپوپتوز و نکروز شده) توسط دستگاه فلوسیتومتر (DAKO-USA) تجزیه و تحلیل گردید.

داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۷، آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون توکی تحلیل شد. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل نمودارهای دستگاه فلوسیتومتر با استفاده از نرم‌افزار FloMax انجام گرفت.

### نتایج

داده‌های جدول ۱ نشان می‌دهد که مایع رویی سلولی، تأثیر مثبت در زنده‌مانی سلول نوتروفیل تیمار شده با

مزانشیمال انسانی بر بقا و عملکرد نوتروفیل‌ها و ممانعت از آپوپتوز نوتروفیل‌ها بوده است (۱۵). از طرفی، مواجهه سلول مزانشیم با غلظت‌های مختلفی از (FBS: Fetal Bovine Serum)، دارای اثرات متفاوتی بر میزان آپوپتوز نوتروفیل در انکوباسیون‌های کوتاه و بلند مدت بوده است (۱۵).

در مطالعه حاضر، به منظور بررسی فاکتورهای محلول ناشی از سلول مزانشیمال رت بدون مواجهه با عوامل غنی کننده مانند FBS و قابلیت تکرارپذیری و ایجاد مدل در دسترس و مناسب برای مطالعات تکمیلی در این زمینه، تأثیر مایع رویی سلول‌های بنیادی مزانشیم مغز استخوان رت بر میزان زنده مانی (سلول زنده، آپوپتوز و نکروز) نوتروفیل خون محیطی مورد بررسی قرار گرفت.

### روش بررسی

این مطالعه تجربی در آزمایشگاه کشت سلول بخش ایمنی شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه انجام شده است. مراحل کشت و تشخیص بر اساس مطالعه از قبل انجام شده و طبق پروتکل انجام گرفت (۱۶).

سلول مزانشیم از مغز استخوان فمور (Femur) و تیبیا (Tibia) موش صحرایی ۸-۶ هفته، با عمل فلاشینگ سرنگ حاوی محیط کشت DMEM: Dulbecco's Modified Eagle (Medium- Sigma) استحصال و پس از سانتریفوژ  $100 \times \text{g}$  به مدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری و پس از شمارش سلولی به همراه ۱۵٪ FBS (شرکت Gibco Co-آمریکا) با دمای  $37^\circ\text{C}$  و ۵٪  $\text{CO}_2$  کشت داده شد. اولین تعویض کشت پس ۷۲ ساعت و سپس هر ۳ روز یکبار انجام گرفت.

جداسازی نوتروفیل با کاربرد روش انجام شد (۱۷). به طور خلاصه،  $5 \text{ ml}$  نمونه خون محیطی هیپارینه ( $50 \mu\text{l}$ ) مستقیماً از قلب موش صحرایی گرفته شد. خون هیپارینه به نسبت ۱:۱ با سرم فیزیولوژی ۰/۹٪ رقیق و سپس به آرامی بر مگنومین ۲۵٪ (داروپخش-ایران) لود شده و به مدت ۱۵ دقیقه در  $350 \times \text{g}$  سانتریفوژ گردید. پلیت سلولی ته فالكون دو مرتبه توسط آب مقطر لیز شده و پس از اضافه نمودن سرم فیزیولوژی ۲/۵۵٪ به مدت ۵ دقیقه در  $350 \times \text{g}$  سانتریفوژ شده و در نهایت با

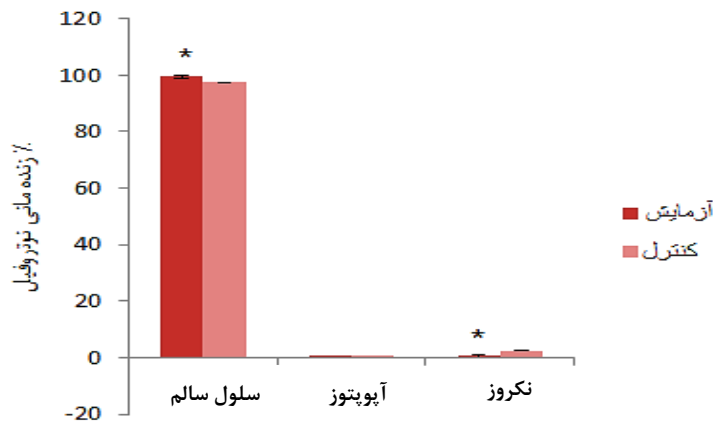
مطابق با داده‌های جدول ۱، سلول سالم گروه آزمایش به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل افزایش داشته و متعاقباً درصد آپوپتوزیس نیز به شکل معنی‌داری در گروه تیمار کاهش یافت ( $p < 0.05$ ). درصد نکروز سلولی در گروه آزمایش کمتر شده که این کاهش اختلاف معنی‌داری را نسبت به کنترل نشان نداد ( $p > 0.05$ ) (نمودار ۳ و ۲).

مایع‌رویی در انکوباسیون ۶ ساعته داشت. درصد سلول سالم نسبت به گروه کنترل در سطح معنی‌داری افزایش یافت ( $p < 0.05$ ). میزان آپوپتوزیس در مقایسه با گروه کنترل کاهش داشت که این اختلاف معنی‌دار نبود ( $p > 0.05$ ) اما درصد نکروز سلولی در مقابل گروه کنترل کاهش معنی‌دار پیدا کرد ( $p < 0.05$ ) (نمودار ۳ و ۱).

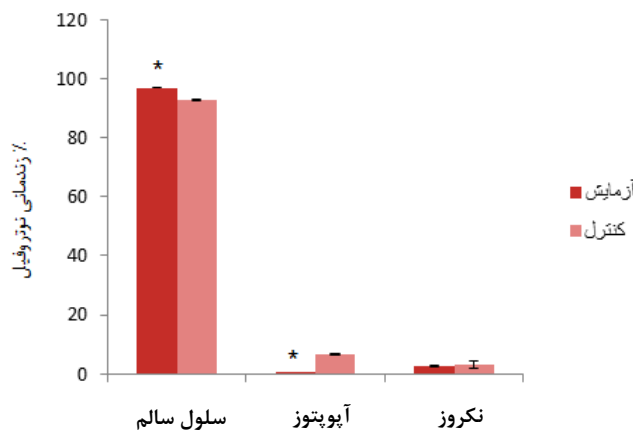
جدول ۱: میزان زنده‌ماننی سلول نوتروفیل مجاورشده با مایع رویی MSCs در انکوباسیون ۶ و ۲۴ ساعته

میانگین $\pm$ انحراف معیار	میانگین $\pm$ انحراف معیار	میانگین $\pm$ انحراف معیار		
۲/۴۲ $\pm$ ۰/۰۵	۰/۲ $\pm$ ۰/۰	۹۷/۳۷ $\pm$ ۰/۰۵	کنترل	۶ ساعته
* ۰/۳۹ $\pm$ ۰/۰۶۶	۰/۱۵ $\pm$ ۰/۰۶	* ۹۹/۴۵ $\pm$ ۰/۰۶۱	آزمایش	آزمایش
۳/۱۸ $\pm$ ۱/۰۵	۶/۷۴ $\pm$ ۰/۲۴	۹۲/۸۶ $\pm$ ۰/۳۹	کنترل	۲۴ ساعته
۲/۶۳ $\pm$ ۰/۱۲	* ۰/۳۷ $\pm$ ۰/۰۲	* ۹۶/۹۹ $\pm$ ۰/۱۵	آزمایش	آزمایش

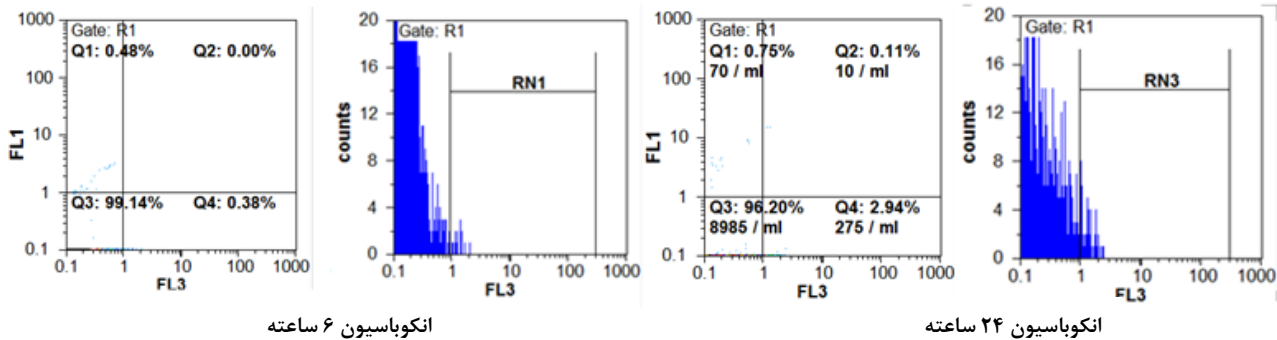
\* معنی‌داری در سطح ( $p < 0.05$ )



نمودار ۱: سطح معنی‌داری میزان زنده‌ماننی سلول نوتروفیل با مایع رویی MSCs در انکوباسیون ۶ ساعته



نمودار ۲: سطح معنی‌داری میزان زنده‌ماننی سلول نوتروفیل با مایع رویی MSCs در انکوباسیون ۲۴ ساعته



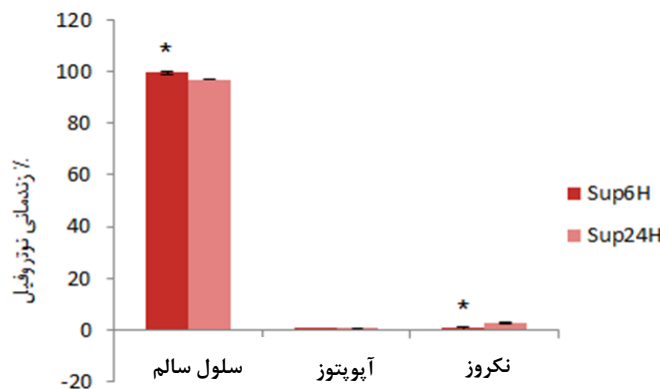
انکوباسیون ۶ ساعته

انکوباسیون ۲۴ ساعته

نمودار ۳: نمونه‌ای از درصد زنده‌مانی نوتروفیل در انکوباسیون ۶ ساعته و ۲۴ ساعته با مایع رویی MSCs. آنالیز فلوسیتومتری: درصد سلول سالم (Q3)، درصد آپوپتوز اولیه (Q1)، درصد آپوپتوز ثانویه (Q2)، درصد نکروز (Q4)

معنی‌دار نبود ( $p > 0.05$ ). درصد نکروز سلولی نیز در مقایسه با انکوباسیون ۲۴ ساعته کاهش معنی‌دار نشان داد ( $p < 0.05$ ) (نمودار ۴).

درصد نوتروفیل سالم در انکوباسیون ۶ ساعته نسبت به ۲۴ ساعته دارای افزایش معنی‌دار بود. میزان آپوپتوز انکوباسیون ۶ ساعته نسبت به ۲۴ ساعته کاهش داشت که این اختلاف



نمودار ۴: مقایسه زنده‌مانی نوتروفیل در انکوباسیون‌های ۶ و ۲۴ ساعته با مایع رویی MSCs

## بحث

آنتی‌باکتریال MSCs از طریق ترشح پپتید کاتلسیدین hCAP-18/ LL-37 (Cathelicidin) به اثبات رسیده است (۲۳). مشخص شده است که عملکردهای مدیاتوری سیستم ایمنی سلول‌های مزانشیم توسط ارتباط سلول - سلول و یا فاکتورهای محلول تنظیم می‌شود (۲۴). با توجه به بررسی مطالعاتی که حاکی از نقش تنظیمی سیستم ایمنی توسط سلول مزانشیم است، این واکنش‌ها بیشتر مرتبط با ارتباط سلول - سلول می‌باشد و در مورد مایع رویی سلول اطلاعات کمی در دسترس

سلول مزانشیم دارای نقش تنظیمی سیستم ایمنی از جمله: مهار تکثیر و عملکرد لنفوسیت‌های T انسان و مدل موشی با تداخل در چرخه سلولی از طریق ممانعت از تقسیم سلولی در مرحله G0-G1 و مهار بیان سیکلین D<sub>2</sub> (۱۹)، مهار تکثیر لنفوسیت B (۲۰)، سلول‌های کشنده طبیعی NK (۲۱) و سلول‌های دندریتیک (۲۲) می‌باشد.

در مورد تأثیر سلول‌های مزانشیم بر عملکرد سیستم ایمنی ذاتی اطلاعات کمی در دسترس است اما در مواردی خواص

استراحت و یا فعال شده توسط IL-8 در کشت همراه با سرم نرمال را کاهش می‌دهد (۱۵).

در مورد مایع رویی سلولی تفاوت شایانی در دو مدت ۶ و ۲۴ ساعته در زنده‌مانی نوتروفیل مشاهده نشد و حتی در مواردی میزان زنده‌مانی در مدت زمان ۶ ساعته بیشتر بود که با توجه به وجود فاکتورهای محلول و شرایط یکسان در دو مدت، روند معمول تقلیل زنده‌مانی قابل توجیه می‌باشد. از طرفی مایع رویی در مدت ۶ ساعت به دلیل داشتن عوامل رشد، تأثیر مثبت بر زنده‌مانی نوتروفیل دارد که به مراتب در مدت ۲۴ ساعت میزان عوامل رشد کم می‌شود.

Maqbool و همکاران به دنبال مطالعه خود در تأثیر MSCs بر زنده‌مانی نوتروفیل، بیان داشتند که اثر آنتی‌آپوپتوتیک MSCs بر نوتروفیل با انکوباسیون به طور غیرمستقیم بیانگر ایجاد ارتباط بین MSCs با نوتروفیل توسط مسیرهای پیام رسانی و فاکتورهای محلول می‌باشد (۱۸).

#### نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر نشان می‌دهد که مایع رویی حاصل از کشت سلول بنیادی مزانشیمی رت، بر میزان زنده مانی (درصد سلول سالم، آپوپتوز و نکروز) مؤثر بوده که این تأثیر را می‌توان به دلیل تولید فاکتورهای محلول تولیدی توسط این سلول‌ها دانست. به دلیل اینکه سلول پس از ۴۸ ساعت سایتوکاین‌های مختلفی را تولید نموده که می‌تواند بر عملکرد سلول نوتروفیل مؤثر واقع شود.

مطالعه در زمینه سلول‌های مزانشیمال به لحاظ تحقیقات بنیادی در زمینه درمان بیماری‌های مرتبط با سیستم ایمنی به خصوص در مطالعه حاضر، با تمرکز بر عوارض ناشی از بیمارهای مرتبط با سیستم ایمنی ذاتی و واکنش‌های التهابی و در نهایت، سل تراپی با استفاده از این سلول‌ها مهم و ارزشمند می‌باشد.

#### سپاسگزاری

بدینوسیله از زحمات و همکاری کلیه مسئولان و کارکنان ذیربط بخش ایمنی شناسی و مرکز کشت سلول دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تشکر و قدرانی می‌شود.

است. در این مطالعه مایع رویی سلول مزانشیمال رت به عنوان عامل اثرگذار بر سلول نوتروفیل مورد بررسی قرار گرفته است. میزان زنده‌مانی سلول نوتروفیل نیز تحت تأثیر مایع رویی آن در انکوباسیون‌های ۶ و ۲۴ ساعته قرار گرفت. مایع رویی در انکوباسیون ۶ ساعته تأثیر مثبت بر زنده‌مانی نوتروفیل داشت. یافته‌ها نشان می‌دهد که درصد سلول سالم نسبت به کنترل افزایش معنی‌داری پیدا کرد و میزان آپوپتوزیس و نکروز در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل کاهش داشت که این اختلاف در مورد آپوپتوزیس معنی‌دار نبوده اما درصد نکروز معنی‌دار بود. با توجه به تأثیر مثبت مایع رویی در مدت کوتاه، این تأثیر می‌تواند مربوط به تولید فاکتورهای محلول باشد.

محققان نشان دادند که انکوباسیون کوتاه مدت ۴ و ۸ ساعته نوتروفیل با سلول مزانشیمال انسانی به همراه ۰، ۱، ۵ و ۱۰ درصد FBS تأثیری بر زنده‌مانی و آپوپتوز آن ندارد (۱۸). اما نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مایع رویی سلولی تا حدی موجب تقویت زنده‌مانی سلول نوتروفیل در مدت تیمار ۶ ساعته می‌شود.

در انکوباسیون ۲۴ ساعته، تأثیر مثبت مایع رویی سلول در زنده‌مانی نوتروفیل موجب افزایش معنی‌دار درصد سلول سالم گروه تیمار نسبت به گروه کنترل و کاهش معنی‌دار آپوپتوزیس گروه تیمار نسبت به گروه کنترل شد. از طرفی درصد نکروز نسبت به گروه کنترل کاهش یافت اما این کاهش معنی‌دار نبود.

Brandau و همکاران نشان دادند که انکوباسیون ۲۴ ساعته مایع رویی سلولی MSCs میزان آپوپتوزیس در نوتروفیل تحریک شده توسط LPS را از طریق ترشح (IL-8/MIF: Interleukin8/ Macrophage Inhibitory Factor) کاهش می‌دهد (۲۵)؛ که نه تنها میزان زنده‌مانی نوتروفیل افزایش پیدا کرده، بلکه عملکرد نوتروفیل همانند بیان سایتوکاین‌های التهابی افزایش و شیموتاکسی را بهبود بخشیده است. دیگر محققان نیز عنوان داشتند که MSCs جداسده از مغز استخوان انسان، آپوپتوزیس نوتروفیل‌های در حال

**References:**

- 1- Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. *Osteogenesis in transplants of bone marrow cells*. J Embryo Exp Morph 1966; 16(3): 381-90.
- 2- Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. *The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells*. Cell Tissue Kinet 1970; 3(4): 393-403.
- 3- Zech NH. *Adult stem cell Manipulation and possible clinical perspectives*. Reproduc Med Endocrinol 2004; 2: 91-99.
- 4- Orlic D, Hill JM, Arai AE. *Stem cells for myocardial regeneration*. Circulation Res 2002; 91: 1092-102.
- 5- Zhao RC, Liao L, Han Q. *Mechanisms of and perspectives on the mesenchymal stem cell in immunotherapy*. J Lab Clin Med 2004; 143(5): 284-91.
- 6- 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.
- 7- Dela Rosa O, Lombardo E. *Modulation of adult mesenchymal stem cells activity by toll-like receptors: implications on therapeutic potential*. Mediators of Inflammation 2010; 1-9.
- 8- Quinn MT, DeLeo FR, Bokoch GM. *Neutrophil methods and protocols*. Totowa New Jersey: Humana Press Inc 2007.p.7512-7.
- 9- Aggarwal S, Pittenger MF. *Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses*. Blood 2005; 105(4):1815-22.
- 10- Tomchuck SL, Zwezdaryk KJ, Coffelt SB, Waterman RS, Danka ES, Scandurro AB, et al. *Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses*. Stem Cells 2008; 26(1): 99-107.
- 11- 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*. PLo S ONE 2010; 5(4): e10088
- 12- Kim DH, Yoo KH, Choi KS, Choi J, Choi SY, Yang SE, et al. *Gene expression profile of cytokine and growth factor during differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell*. Cytokine 2005; 31(2): 119-126.
- 13- Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek AM, Silberstein LE. *Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors*. Stem Cells 2006; 24(4): 1030-41.
- 14- Newman RE, Yoo D, LeRoux MA, Danilkovitch-Miagkova A. *Treatment of inflammatory diseases with mesenchymal stem cells*. Inflamm Allergy Drug Targets 2009; 8(2): 110-23.
- 15- Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F, et al. *Human mesenchymal*

- stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche.* Stem Cells 2008; 26(1): 151-62.
- 16- Bittencourt RAC, Pereira HR, Felisbino SL, Murador P, Olivera APE, Deffune E. *Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells.* Acta Ortop Bras 2006; 14(1): 22-24.
- 17- Rezapour A, Majidi J. *An Improved Method of Neutrophil Isolation in Peipheral Blood of Sheep.* Animal and Veterinary Advances 2009; 8(1): 11-15.
- 18- Maqbool M, Vidyadaran SH, George E, Ramasamy R. *Human mesenchymal stem cells protect neutrophils from serum-deprived cell death.* Cell Biol Int 2011; 35(12): 1247-51.
- 19- Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. *Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells.* Blood 2005;105(7): 2821-27.
- 20- Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, et al. *Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions.* Blood 2006; 107(1): 367-72.
- 21- 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.
- 22- Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EWF, Soeiro I, Lombardi G, Dazzi F. *Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle.* Transplantation 2007; 83(1): 71-76.
- 23- Karsnooembskaya A, Song Y, Fang X, Gupta N, Serikov V, Lee JW, Matthay MA. *Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37.* Stem Cells 2010; 28(12): 2229-38.
- 24- Liotta F, Angeli R, Cosmi L, Fili L, Manuelli C, Frosali F, Mazzinghi B, et al. *Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T cell modulatory activity by impairing Notch signaling.* Stem Cells 2008; 26(1): 279-89
- 25- Brandau S, Jakob M, Hemeda H, Bruderek K, Janeschik S, Bootz F, et al. *Tissue-resident mesenchymal stem cells attract peripheral blood neutrophils and enhance their inflammatory activity in response to microbial challenge.* J Leukoc Biol 2010; 88(5): 1005-15.



## ***Survival of Peripheral Blood Neutrophil Following Treatment with Soluble Factors from Rat Mesenchymal Stem Cells***

***Hamounnavard S(MSc)<sup>1</sup>, Delirez N(PhD)\*<sup>2</sup>, Afzal Ahangaran N(PhD)<sup>3</sup>***

<sup>1,2</sup>*Department of Immunology, Urmia University, Urmia, Iran*

<sup>3</sup>*Department of Microbiology, Urmia University, Urmia, Iran*

***Received:*** 18 Dec 2013

***Accepted:*** 29 May 2014

### ***Abstract***

***Introduction:*** Mesenchymal stem cells have immunomodulatory properties and own extensive potentials to proliferate and differentiate into different cell lineages. Thus, this study was conducted to investigate the effect of supernatant of rat MSCs on the neutrophils viability.

***Methods:*** MSCs was isolated from femoral and tibial bone marrow of rat (6-8 weeks) and was cultured in DMEM. After maturation of MSCs, its supernatant was incubated with neutrophils isolated from peripheral blood of rat at 37 ° C for 1 h. Neutrophil survival was measured at 6 and 24 h incubation with supernatant of MSCs by flow cytometric analysis using An/PI. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey test (P<0.05).

***Results:*** 6-hour incubation of neutrophils with supernatant of MSCs significantly increased the healthy cells percentage and significantly decreased the amount of necrosis (P<0.05), but no significant decrease was observed in regard with apoptosis compared to the controls (P>0.05). The 24-hour incubation of neutrophils with cell supernatant significantly increased the percentage of healthy cells and apoptosis was significantly reduced compared to the control group (P<0.05). Moreover, a reduction in cell necrosis was not significant in the treated groups compared to the control (P>0.05).

***Conclusions:*** In addition to the clinical importance of MSCs, their biological aspects are of great potential for cell therapy, such as self-renewal, proliferation and immune modulatory effects.

***Keywords:*** Mesenchymal Stem Cells; Neutrophil; Soluble Factors of MSCs; Survival

#### ***This paper should be cited as:***

Hamounnavard S, Delirez N, Afzal Ahangaran N. *Survival of peripheral blood neutrophil following treatment with soluble factors from rat mesenchymal stem cells.* J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2014; 22(4): 1341-49.

***\*Corresponding author: Tel: +98 9144432650, Email: n.delirez@urmia.ac.ir***