

مقاله پژوهشی

اثرات سلول‌های مزانشیمال تیمار شده با استروژن بر عملکرد نوتروفیل‌ها

ناهیده افضل آهنگران، زهرا نکویی، نوروز دلیرز، سید میثم ابطی فروشانی*

گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۶/۲۲

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۱۲/۰۷

چکیده

مقدمه و هدف: نقش تنظیم‌کنندگی سلول‌های بنیادی مزانشیمال در ارتباط با عملکرد سلول‌های سیستم ایمنی از قبیل نوتروفیل در مطالعات مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. از طرف دیگر هورمون استروژن نیز نوعی ایمونومودلاتور است، مطالعه حاضر باهدف بررسی تأثیر سلول‌های مزانشیمال تیمار شده با استروژن، بر عملکرد سلول‌های نوتروفیل طراحی شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه پس از جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمال از مغز استخوان رت‌ها، اقدام به تیمار سلول‌های مزبور با استروژن در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ نانومولار به مدت ۷۲ ساعت گردید. سپس سلول‌های مزبور با سلول‌های نوتروفیل به مدت یک ساعت مجاور شدند. در ادامه، قابلیت‌های عملکردی نوتروفیل‌ها ارزیابی شد ($P \leq 0.05$).

نتایج: نتایج مطالعه ما به‌خوبی نشان داد که درصد فاگوسیتوز و میزان انفجار تنفسی در نوتروفیل‌های مجاور شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با استروژن نسبت به گروه کنترل افزایش یافته بود. هم‌چنین میزان آپوپتوز در نوتروفیل‌های تیمار شده با استروژن به‌طور معنی‌داری در هر دو غلظت استروژن نسبت به گروه کنترل کاهش داشت ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد استروژن می‌تواند بر روی برهم‌کنش سلول‌های نوتروفیل با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مؤثر باشد.

کلمات کلیدی: سلول بنیادی مزانشیمال، استروژن، نوتروفیل

مقدمه

آن‌ها (از قبیل: PDL1، TGF- β ، HLA-G و Galectins)، برخی سایتوکاین‌های ضدالتهابی (از قبیل: IL-10 و TGF- β)، برخی متابولیت‌ها (از قبیل: نیتریک اکساید، IDO و PAG 2) و برخی از آنزیم‌های مهارکننده (از قبیل: ماتریکس متالوپروتئینازها) می‌باشند که به‌صورت پاراکرین و یا تماس مستقیم سلول به سلول اثرات خود را ایجاد می‌کنند (۳). نوتروفیل‌ها مهم‌ترین سلول‌های سیستم میلوئیدی هستند که از مغز استخوان منشأ می‌گیرند که به‌عنوان اولین و مهم‌ترین سلول‌های سیستم ایمنی ذاتی در مقابل عفونت می‌باشند. این سلول‌ها به‌عنوان بیشترین لکوسیت‌های چندهسته‌ای در سیستم ایمنی ذاتی شناخته می‌شوند و هم‌چنین ۷۰-۵۰٪ جمعیت لکوسیت‌ها و بیشترین فراوانی را در میان سلول‌های دخیل در فرآیند التهاب به خود اختصاص داده‌اند (۴). استروژن یک هورمون جنسی است که از طریق عمل بر لنفوسیت غیر متعهد یا میلوئید پروژنی‌تور در مغز استخوان، تمایز سلول بنیادی خون‌ساز را

نقش سلول‌های بنیادی مزانشیمی در تنظیم عملکرد سیستم ایمنی در زمینه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفته که می‌توان به مهار تکثیر و عملکرد لنفوسیت‌های T انسانی و مدل موشی با تداخل در چرخه سلولی، از طریق ممانعت از تقسیم سلولی در مرحله G0-G1 و مهار بیان سیکلین D2، مهار تکثیر لنفوسیت‌های B، سلول‌های کشنده طبیعی NK و سلول‌های دندریتیک (DCs) اشاره کرد (۱). سلول‌های بنیادی مزانشیمال به دلیل دارا بودن ویژگی‌های تعدیل‌کننده ایمنی به صوت بالقوه در جهت تخفیف بیماری‌های ناشی از پاسخ‌های التهابی سلول‌های ایمنی در برخی از بیماری‌ها از قبیل دیابت نوع ۱، آرتریت روماتوئید و اسکروز متعدد مورد توجه قرار گرفته‌اند (۲). مهم‌ترین فاکتورهای سرکوب‌کننده ایمنی این سلول‌ها شامل برخی از مولکول‌های مهاری بیان شده در سطح

*نویسنده مسئول: سید میثم ابطی فروشانی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
Email: sm.abtahi@urmia.ac.ir

تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمال با استروژن: درنهایت از پاساژ سوم سلول‌ها جهت انجام آزمایش‌های مجاورسازی با نوتروفیل‌ها استفاده شدند. ۷-۱۰ روز پس از پاساژ سوم، سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان با غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ نانومولار استروژن (Biomole-آلمان) به مدت ۷۲ ساعت تیمار شدند. از سلول‌های بنیادی مزانشیمال تیمار نشده به‌عنوان گروه کنترل استفاده گردید.

جداسازی سلول‌های نوتروفیل و مجاورسازی آن‌ها با سلول‌های بنیادی مزانشیمال

سلول‌های نوتروفیل از خون محیطی رت‌ها به کمک مگلو مین کامپاند (داروپخش-تهران) جداسازی شدند (۸ و ۹). سپس تعداد 5×10^6 سلول نوتروفیل به همراه ۵ سی‌سی محیط کشت DMEM و ۱۰ درصد FBS به داخل فلاسک حاوی سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان اضافه و به مدت یک ساعت انکوبه گردید. بعد از گذشت یک ساعت مایع رویی داخل فلاسک که حاوی سلول‌های نوتروفیل بود جمع‌آوری و به مدت ۵ دقیقه در ۱۲۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. سلول‌ها جهت انجام تست‌های تکمیلی با محیط کشت DMEM به‌صورت سوسپانسیون در آمد.

قابلیت انفجار تنفسی سلول‌های نوتروفیل

سوسپانسیون سلولی به تعداد 2×10^6 cell/ml از سلول‌های نوتروفیل تهیه شد. این سلول‌ها در پلیت‌های کشت ۹۶ خانه به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن در حضور مخمر اپسونیزه انکوبه گردید. آنگاه ۱۰۰ میکرولیتر محلول زی‌موزان و NBT (نیترو بلو تترازولیوم) به هریک از خانه‌ها اضافه و به مدت یک ساعت دیگر انکوبه گردید. درنهایت ۴۰۰ میکرولیتر N-N دی متیل فورماید به هر یک از خانه‌ها اضافه و با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در سانتریفیوژ یخچال‌دار سانتریفیوژ گردید. ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی از هر یک از خانه‌ها را در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته و نتیجه با الیزا نگار در طول موج ۵۴۰ nm قرائت گردید (۱۰ و ۱۱).

ارزیابی قابلیت فاگوسیتوز سلول‌های نوتروفیل

سوسپانسیون مخمر (کاندیدا آلبیکنس) با غلظت هر 2×10^6 در هر میلی‌لیتر PBS با سرم تازه رت نژاد ویستار اپسونیزه شد و سپس با 5×10^6 سلول نوتروفیل در یک سی‌سی محیط کشت RPMI به شیوه مرسوم انکوبه گردید. پس از

تنظیم می‌کند. استروژن همچنین موجب مهار فعالیت سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن را در *invivo* و *invitro* می‌شود (۵). بررسی اثر استروژن بر روی تولید سیتوکین به‌وسیله سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی محلول رویی کشت سلولی با یا بدون آن بررسی شد که تیمار با استروژن افزایش اینترلوکین ۱۰ را به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای به‌وسیله سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMC) نشان داد و نیز استروژن علاوه بر اینکه دارای نقش تحریکی بر روی سیستم ایمنی است، نقش سرکوب‌کننده هم دارد (۶). با توجه به موارد ذکرشده، مطالعات چندانی در ارتباط با نقش استروژن در شکل‌دهی عملکرد سلول‌های بنیادی مزانشیمال بر روی نوتروفیل‌ها صورت نگرفته است. در مطالعه حاضر ما به بررسی تأثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با استروژن بر عملکرد نوتروفیل‌ها پرداختیم.

مواد و روش‌ها

جداسازی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان

سلول‌های بنیادی مزانشیمال از مغز استخوان‌های تیبیا و فمور رت‌های نژاد ویستار مطابق روش Zappia و همکاران جداسازی شد (۷). رت‌های مزبور از حیوان خانه دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه گردید. کلیه مراحل این تحقیق در کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه ارومیه مورد تأیید قرار گرفته است. به‌طور خلاصه، اقدام به فلاشینگ مغز استخوان‌های مزبور به کمک محیط کشت (Gibco-انگلستان) DMEM شده، سپس سلول‌های استحصالی دو بار شستشو داده شده و با غلظت 4×10^5 سلول به ازای هر سانتی‌متر مربع به فلاسک‌های کشت T25 حاوی محیط کشت DMEM و ۱۰ درصد (Gibco-انگلستان) FBS منتقل شدند. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و حضور ۵ درصد CO_2 گرم‌خانه‌گذاری شدند و سپس سلول‌های غیر چسبنده حذف گردید و کشت سلول‌های چسبنده ادامه یافت. تعویض محیط کشت هر ۲ روز یک‌بار انجام گرفته و پس از اولین تراکم بیش از ۷۰ درصد، سلول‌های چسبنده با استفاده از تریپسین ۱۰ درصد (Sigma-Aldrich-American) حاوی ۲ درصد EDTA از کف فلاسک جداسازی گردیده و جهت پاساژ به فلاسک‌های بعدی منتقل گردیدند (۷).

گردید (۱۲ و ۱۳).

آنالیز آماری: جهت مقایسه داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و Tukey's test استفاده گردید. در تمام بررسی‌ها $p < 0.05$ به‌عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد. کلیه بررسی‌های آماری در محیط نرم‌افزاری SPSS ویراست ۲۱ انجام شد و برای ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Excel Microsoft استفاده گردید. داده‌ها به‌صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ گزارش شدند.

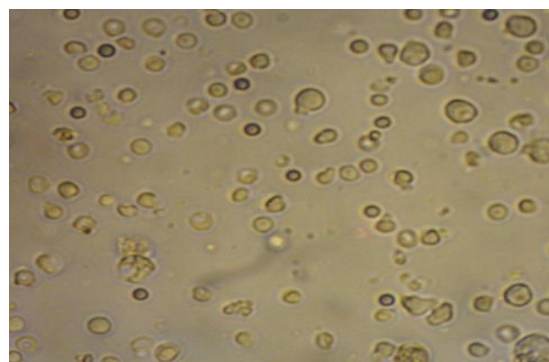
نتایج

پس از سه بار پاساژ سلول‌های آسپیره شده از مغز استخوان، سلول‌های مزبور شکلی کشیده پیدا نموده و به شکل تیپیک سلول‌های بنیادی مزانشیمال در آمدند (شکل ۱). فرآیند فاگوسیتوز شامل دو مرحله: ۱- به درون کشیدن

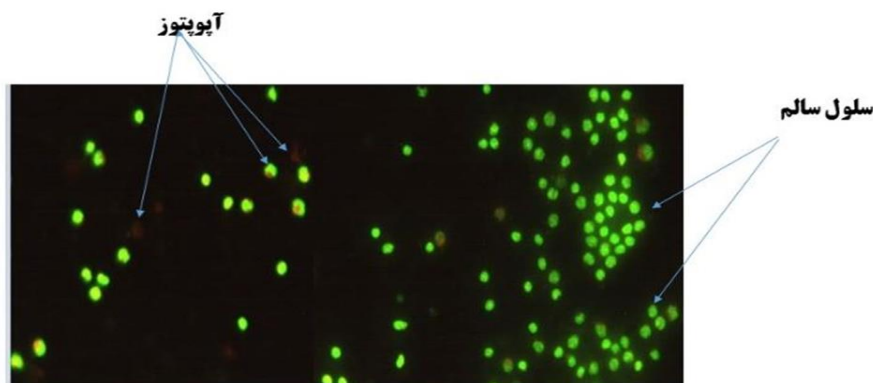
فیکس کردن سلول‌ها با فرمالین ۱۰ درصد و رنگ‌آمیزی آن‌ها با همتاکسیلین-اُئوزین اقدام به بررسی سلول‌های نوتروفیل رنگ‌آمیزی شده در زیر میکروسکوپ نوری با عدسی $40\times$ شد. تعداد ۵ شان به ازای هر لام بررسی شد (۱۰ و ۱۲). هر شان حدوداً حاوی ۷۰-۱۰۰ سلول نوتروفیل بود. بدین ترتیب تعداد کل نوتروفیل‌های که فاگوسیتوز انجام داده بودند مشخص گردید.

ارزیابی آپوپتوز سلول‌های نوتروفیل

پس از رنگ‌آمیزی سلول‌های نوتروفیل مجاور شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان تیمار شده با استروژن بارنگ‌های آکریدن اورنج و پروپیدیوم یدید (acridine orange/propidium iodide) (Sigma Aldrich)، به شیوه مرسوم، میزان زنده‌مانی نوتروفیل‌ها به کمک میکروسکوپ فلورسانس و عدسی $40\times$ در ۵ شان میکروسکوپی بررسی

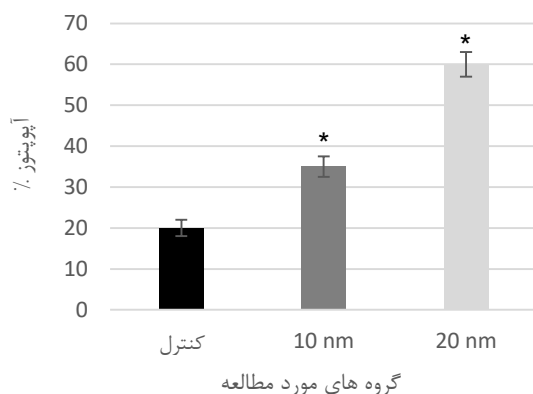


شکل ۱- پاساژ سلول‌های آسپیره شده از مغز استخوان. تغییر شکل این سلول‌ها پس از پاساژ سوم کاملاً مشهود است. الف) سلول‌های تازه آسپیره شده؛ ب) سلول‌ها پس از پاساژ سوم.



شکل ۲- سلول‌های نوتروفیل بعد از رنگ‌آمیزی دوگانه آکریدن اورنج و پروپیدیوم یدید

ها نفوذ کرده و موجب سبزرنگ شدن هسته آن‌ها می‌گردد. پروپیدیوم دید فقط وارد سلول‌هایی می‌شود که غشای آن‌ها سالم نباشد، همچنین باعث ایجاد رنگ قرمز در هسته آن‌ها می‌شود. سلول‌های به رنگ سبز، سالم؛ سلول‌های به رنگ سبز روشن همراه با کروماتین متراکم و قطعه‌قطعه، آپوپتوز اولیه؛ سلول‌های دارای رنگ قرمز با کروماتین متراکم و قطعه‌قطعه، آپوپتوز ثانویه و آن‌هایی که دارای هسته نرمال، متورم و قرمز رنگ هستند نکروز می‌باشند (شکل ۲). بررسی‌های انجام شده حاکی از آن است که استروژن در هر دو غلظت حداقل منجر به افزایش قابلیت سلول‌های بنیادی مزانشیمال در حفظ بقا سلول‌های نوتروفیل می‌گردد (نمودار ۳).

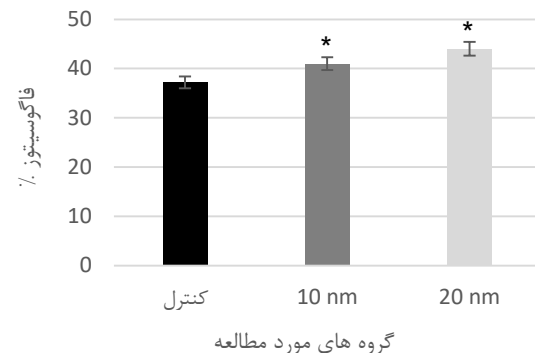


نمودار ۳- میزان آپوپتوز سلولی در سلول‌های مزانشیمال ۷۲ ساعت بعد از تیمار با دوزهای مختلف استروژن در مقایسه با گروه کنترل. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شده است.

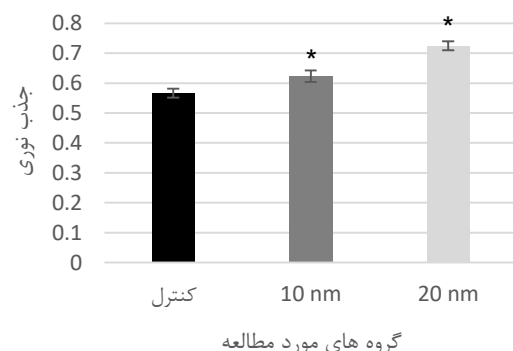
بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به افزایش دانش سلول‌های بنیادی، واکنش سلول‌های بنیادی با سلول‌های ایمنی امروز قابل‌توجه است که در زمینه‌ی ایمنی اکتسابی و تا حدی ایمنی ذاتی مطالعاتی صورت گرفته است. استروژن هم به‌عنوان یک مدیاتور مهم در سیستم ایمنی شناخته شده و نیز با توجه به اینکه نوتروفیل به‌عنوان اولین خط دفاعی بدن مطرح است و نیز نقش سلول‌های بنیادی در درمان بیماری‌ها، واکنش متقابل این دو گروه از سلول‌های مغز استخوان رت در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته است تا بتوان از نتایج به‌دست‌آمده این مطالعه در درمان بیماری‌های مرتبط با استفاده از تکنیک سلول درمانی استفاده کرد. باوجوداینکه سلول‌های نوتروفیل در محیط داخلی مغز

عامل مهاجم؛ ۲- کشتن عامل به درون کشیده با استفاده از روش‌های وابسته به اکسیژن و غیر وابسته به اکسیژن است. تست ارزیابی فاگوسیتوز که در این مطالعه استفاده شد، ارزیابی کلی از قابلیت برداشت به‌وسیله سلول‌های نوتروفیل را ارائه می‌دهد. آزمون احیای NBT ارزیابی کلی از قابلیت انفجار تنفسی نوتروفیل‌ها را ارائه می‌دهد. بر این اساس به نظر می‌رسد که سلول‌های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با استروژن در هر دو غلظت ۱۰ و ۲۰ نانومولار موجب افزایش قابلیت فاگوسیتوز، انفجار تنفسی سلول‌های نوتروفیل مجاور شده با آن‌ها می‌گردد (نمودار ۱ و ۲).



نمودار ۱- درصد فاگوسیتوز در سلول‌های مزانشیمال ۷۲ ساعت بعد از تیمار با دوزهای مختلف استروژن در مقایسه با گروه کنترل. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شده است.



نمودار ۲- میزان انفجار تنفسی در نوتروفیل مجاور شده در سلول‌های مزانشیمال ۷۲ ساعت بعد از تیمار با دوزهای مختلف استروژن در مقایسه با گروه کنترل. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شده است.

لازم به ذکر است که در روش رنگ‌آمیزی دوگانه آکریدین اورنج و پروپیدیوم دید؛ آکریدین اورنج به داخل تمامی سلول-

سلول‌های نوتروفیل شده درحالی‌که مایع رویی حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با کلسی تریول موجب مهار فعالیت سلول‌های نوتروفیل شده است (۲۳). حضور سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان از افراد سالم در کنار سلول‌های نوتروفیل به نسبت ۱ به ۵۰۰ به صورت معنی‌داری موجب کاهش آپوپتوز در سلول‌های نوتروفیل در حال استراحت، نوتروفیل‌های فعال شده با IL-8 و نوتروفیل‌های فعال شده با تری‌پتید N-formyl-L-methionin-L-leucyl-L-phenylalanine شده است (۱ و ۱۸). تحقیقات بیشتر مشخص نموده است که IL-6 تولید شده توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمال موجب افزایش بقا و مهار آپوپتوز در سلول‌های نوتروفیل می‌گردد. IL-6 موجب کاهش سطح پروتئین پیش آپوپتوزی Bax و افزایش پروتئین ضد آپوپتوزی mcl-1 در سلول‌های نوتروفیل می‌گردد (۱۹-۲۴). در بررسی ما کاهش آپوپتوز در نوتروفیل مجاور شده با سلول مزانشیمال که با استروژن تیمار شده مشاهده گردید که می‌توان گفت ممکن است به همین علت باشد. در منابع دیگری بیان شده که تولید اینترلوکین ۶ سبب ایجاد اثرات آنتی آپوپتوتیک می‌گردد که در حفظ و تقویت عملکرد نوتروفیل اثر می‌گذارد (۱۳). در مطالعه ما هم مشاهده شده است که تیمار سلول مزانشیمال با استروژن سبب افزایش فاگوسیتوز در نوتروفیل گردیده است. با توجه به نتایج مطالعات قبلی انجام شده به نظر می‌رسد در این مطالعه نیز IL-6 در ایجاد چنین نتیجه‌ای دخیل بوده که نیاز به بررسی و انجام آزمایش دارد. سلول‌های مزانشیمال با فعال‌سازی فاکتور نسخه‌برداری STAT-3 سبب تولید اینترلوکین ۶ می‌گردند و به دنبال آن تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن به صورت لجام‌گسیخته در نوتروفیل‌ها افزایش پیدا کرده و موجب تشدید ضایعات ایمونوپاتولوژیک ایجاد شده توسط سلول‌های نوتروفیل می‌شود (۱۳). به طور جالب توجهی نتایج این مطالعه نشان داد که تیمار MSC‌های مغز استخوان با استروژن موجب افزایش معنی‌داری قابلیت فاگوسیتوز و انفجار تنفسی سلول‌های نوتروفیل شده است. لازم است که در این زمینه در مطالعات آینده تحقیقات بیشتری صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه شماره ۱۶۲۷ زهرا نکویی دانشجوی کارشناسی ارشد ایمنی‌شناسی است. نگارندگان از

استخوان بالغ می‌شوند با این وجود یک ارتباط مستقیم بین سلول‌های بنیادی مزانشیمال و نوتروفیل‌های بالغ در محیط داخلی مغز استخوان به طور دقیق شرح داده نشده است. به نظر می‌رسد که این سلول‌ها در حفاظت سلول‌های نوتروفیل از مرگ زودرس و مهار فعال‌سازی آن‌ها در محیط داخلی مغز استخوان نقش دارند (۱ و ۱۴). سلول‌های بنیادی مزانشیمال نقش ایمنومودلاتوری در مکانیسم‌های دفاعی اصلی در برابر واکنش‌های مضر سیستم ایمنی را از خود نشان می‌دهند و بدین ترتیب به عنوان رابط بین محیط داخلی مغز استخوان و خون در موجود زنده عمل می‌کنند (۱۵). اثرات ایمنومودلاتوری سلول‌های بنیادی مزانشیمال نیازمند فعال‌سازی اولیه آن‌ها با سلول‌های سیستم ایمنی از قبیل نوتروفیل‌ها و تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی این سلول‌ها مانند TNF α و IL-1 است. بعد از فعال‌سازی، سلول‌های بنیادی مزانشیمال به واسطه تولید فاکتورهای محلول از قبیل نیتریک اکساید، پروستاگلاندین E₂، اندولامین ۲،۳، داکسیژناز و IL-6 و مولکول‌های تنظیم‌کننده شامل گالکتین‌ها، PDL1، TGF β و HLA-G، نقش سرکوب‌کننده‌ای را روی سیستم ایمنی بازی می‌کنند (۱ و ۱۸-۱۶). تحقیقات نشان می‌دهد که استروژن بر روی عملکرد سیستم ایمنی مؤثر است. این هورمون یکی از اعضای خانواده هورمون‌های استروئیدی است. همه اعضای این خانواده در تنظیم بیان ژن‌ها نقش دارند. مشخص شده که عملکردهای مدیاتوری سیستم ایمنی بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمال، توسط ارتباط سلول-سلول و یا فاکتورهای محلول تنظیم می‌شود. استرادیول همراه با پروژسترون سبب افزایش بقای نوتروفیل می‌شود که این عمل از طریق تأخیر در آپوپتوز با کاهش فعالیت کاسپاز ۳ و ۹ صورت می‌گیرد (۱۹-۱۷). در مطالعات مختلف حضور گیرنده‌های هورمون‌های جنسی و هم‌چنین تأثیر خود این هورمون‌ها بر افزایش بیان گیرنده‌های خود ثابت شده است (۲۰). این هورمون‌ها علاوه بر افزایش فعالیت سلول‌های سیستم ایمنی باعث افزایش بازگردش این سلول‌ها نیز می‌شوند (۲۱). هم‌وئستاز سلول‌های نوتروفیل در بدن توسط آپوپتوز تنظیم می‌گردد. ER- α و ER- β دو گیرنده هورمون استروژن بر سطح سلول‌های نوتروفیل هستند که تحت تأثیر خود استروژن میزان بیان آن‌ها افزایش می‌یابد (۲۲). در مطالعه اسمعیلی و همکاران مشاهده است که تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمال با کلسی تریول موجب افزایش فعالیت

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را اعلام نکرده‌اند.

زحمات جناب آقای هادی اسمعیلی گورچین قلعه، دانشجوی دکتری تخصص ایمونولوژی به خاطر همکاری صمیمانه در پیشبرد پایان نامه کمال تقدیر و تشکر را دارند.

References

1. 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):151-162.
2. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature reviews Immunology*. 2008; 8(9):726-736.
3. Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & growth factor reviews*. 2009; 20(5-6):419-427.
4. Maqbool M, Vidyadaran S, George E, Ramasamy R. Human mesenchymal stem cells protect neutrophils from serum-deprived cell death. *Cell biology international*. 2011; 35(12):1247-1251.
5. Gaillard RC, Spinedi E. Sex-and stress-steroids interactions and the immune system: Evidence for a neuroendocrine-immunological sexual dimorphism. *Domest Anim Endocrinol*. 1998;15(5):345-52.
6. Hashemi M, Krocak TJ. Apoptosis in autoimmune diseases. *Curr Med Chem*. 2005;4(4):42937.
7. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*. 2005;106(5):1755-1761.
8. Rezapour A, Majidi J. An improved method of neutrophil isolation in peripheral blood of sheep. *Animal and Veterinary Advances*. 2009;8(1):5-11.
9. Schilling T, Ebert R, Raaijmakers N, Schütze N, Jakob F. Effects of phytoestrogens and other plant-derived compounds on mesenchymal stem cells, bone maintenance and regeneration. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014;139:252-61.
10. Nagelkerke LAJ, Pannevis MC, Hoalihan DF. Oxygen uptake of rainbow trout on corhynchus mykiss phagocytes following stimulation of the respirator burst. *DexpBio*. 1990;1:339-353.
11. Haq A, Lobo PI, Al-Tufail M, Rama NR, Al-Sedairy ST. Immunomodulatory effect of Nigella sativa proteins fractionated by ion exchange chromatography. *International journal of immunopharmacology*. 1999; 21(4):283-295.
12. Ansar Ahmed S, Dauphinée MJ, Montoya AI, Talal N. Estrogen induces normal murine CD5+B cells to produce autoantibodies. *J Immunol*. 1989;142(8):2647-53.
13. Turina M, Miller FN, McHugh PP, Cheadle WG, Polk HC, Jr. Endotoxin inhibits apoptosis but induces primary necrosis in neutrophils. *Inflammation*. 2005;29(1):55-63.
14. Ghoseiri R, Alizadeh S, Mojtahedzadeh F, Najafi Poor H. Survey of the effect of powder nigella sativa (black seed) in increscent of monocyte phagocytosis in quineapig. *Horizon Med Sci*. 2010;16(3):55-64. [in Persian]
15. 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.
16. Cantorna MT. Mechanisms underlying the effect of vitamin D on the immune system. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2010;69(3):286-289.
17. Hamaliaka A, Novikova I. Nitric oxide production disorders in leukocytes of patients with recurrent furunculosis. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2010;154(2):367-72.
18. Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, Jorgensen C, Noël D. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther*. 2010;1(1):2.
19. Blesson CB. Estrogen receptors in leukocytes possible impact on inflammatory processes in the female reproductive system. In: Aimaretti G, Marzullo P, Prodham F, (editors). *Endocrinology and metabolism update on mechanisms of hormone action: Focus on metabolism, growth and reproduction*. Rijeka, Croatia: InTECH; 2011.
20. Krasnodembskaya A, Song Y, Fang X, Gupta N, Serikov V, Lee JW. Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37. *Stem Cells*. 2010;28(12):2229-3.
21. Maby El, Hajjami H, Amé Thomas P, Pangault C, Tribut O, De Vos J, Jean R, et al. Functional alteration of the lymphoma stromal cell niche by the cytokine context: Role of indoleamine-2,3 dioxygenase. *Cancer Res*. 2009;69(7):3228-37.
22. Risbud MV, Shapiro IM. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content. *Nature Reviews Rheumatology*. 2014;10(1): 44-56.
23. Esmaili Gouvarchin Galeh H, Delirez N, Abtahi Froushani SM, Afzale Ahangaran N. Calcitriol modulates the effects of the supernatants of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells on neutrophil functions. 2014;38(8):1310-40.
24. Aruna B, Harmandeep KS, and Gurpreet K. Sex Hormones and Immune Dimorphism. *The Scientific World Journal*. 2014;8(21):68-95.



Original Article

The Effects of Mesenchymal Stem Cells Treated With Estrogen on Neutrophil Cells Functions

Afzal Ahangaran N, Nekoei Z, Delirezh N, Abtahi Froushani SM*

Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Sciences, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 12 Sep 2016

Accepted: 25 Feb 2017

Abstract

Background & Objectives: The regulatory role of the mesenchymal stem cells on the cells of immune system such as neutrophil has been investigated in several studies. On the other hand, estrogen hormone is one kind of immunomodulatory agents. This study was designed to investigate the effect of mesenchymal cells treated with estrogen on the neutrophil function.

Materials & Methods: Having isolated the mesenchymal stem cells from bone marrow of rats, the researchers treated the cells with 10 or 20 nM concentrations of estrogen for 72 hours. In the next stage, the MSC cells were co-cultured with neutrophil cells and incubated for one hour. Then, the neutrophil functions were assessed ($P<0/05$).

Results: The results of the study clearly showed that the percentage of phagocytosis and the respiratory burst in co-cultured neutrophil with mesenchymal stem cells treated with estrogen had increased compared to that of the control group. Moreover, the rate of apoptosis in neutrophils treated with estrogen significantly decreased in both estrogen concentrations compared to that of the control group ($P<0/05$).

Conclusion: It seems that estrogen can modify the interaction of the mesenchymal stem cells and neutrophil.

Keywords: Mesenchymal stem cells, Estrogen, Neutrophil

*Corresponding Author: Seyed Meysam Abtahi Froushan, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Sciences, Urmia University, Urmia, Iran.
Email: meysamabtahi@hotmail.com