

## میزان زنده‌مانی نوتروفیل خون محیطی به دنبال تیمار با سلول‌های بنیادی

## مزانشیمال رت

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

## چکیده

**سابقه و هدف:** سلول‌های بنیادی مزانشیمال (Mesenchymal stem cells یا MSCs) به دلیل سهولت خالص‌سازی، تکثیر و خاصیت تنظیم سیستم ایمنی، منبع مناسبی برای سلول درمانی می‌باشند. این مطالعه به منظور بررسی اثر MSCs بر زنده‌مانی نوتروفیل انجام گرفت.

**مواد و روش‌ها:** سلول مزانشیمال از مغز استخوان فمور و تیبا رت ۸-۶ هفته استحصال شد و در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) کشت داده شد. سلول مزانشیمال پس از بلوغ، با نوتروفیل جدا شده از خون محیطی رت به مدت ۱ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. زنده‌مانی نوتروفیل در انکوباسیون‌های ۶ و ۲۴ ساعته با MSCs به روش فلوسیتومتری و با استفاده از نرم‌افزار An/PI (Annexin/Propidium iodide) اندازه‌گیری شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های ANOVA و Tukey در سطح معنی‌داری  $P < 0.05$  مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** در انکوباسیون ۶ ساعته نوتروفیل با MSCs، درصد سلول سالم به طور معنی‌داری کاهش و میزان آپوپتوز نسبت به گروه شاهد افزایش یافت و افزایش نکروز سلولی نسبت به گروه شاهد معنی‌دار نبود. در انکوباسیون ۲۴ ساعته نوتروفیل با MSCs، درصد سلول سالم به طور معنی‌داری افزایش و میزان آپوپتوز نسبت به گروه شاهد کاهش داشت و کاهش نکروز سلولی در گروه‌های تیمار نسبت به گروه شاهد معنی‌دار نبود ( $P < 0.05$ ).

**استنتاج:** علاوه بر اهمیت بالینی MSCs، برخی جنبه‌های مهم بیولوژیک شامل خودنوزایی، تکثیر و اثرات تنظیمی ایمنی آن‌ها، پتانسیل مهمی برای درمان می‌باشد.

**واژه‌های کلیدی:** سلول بنیادی مزانشیمال، نوتروفیل، زنده‌مانی

## مقدمه

کبد، بافت چربی، پوست و روده وجود دارند (۳). ویژگی شاخص سلول‌های بنیادی مزانشیمال، سهولت جداسازی و رشد سریع آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد؛ در حالی که همچنان پتانسیل تمایز خود را حفظ می‌کنند و این خود امکان تکثیر آزمایشگاهی این سلول‌ها را در مقادیر زیاد و مناسب جهت اهداف درمانی فراهم می‌سازد (۴).

سلول‌های مزانشیمال دارای نقش تنظیمی در عملکرد سیستم ایمنی می‌باشند. مطالعات زیادی در زمینه نقش تنظیم عملکرد

سلول‌های بنیادی از لحاظ منشأ به دو دسته عمده، سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های بنیادی بالغ تقسیم می‌شوند (۱). سلول‌های بنیادی مزانشیمال (Mesenchymal stem cells یا MSCs) از مهم‌ترین سلول‌های بنیادی بالغ می‌باشند که اولین بار در سال ۱۹۶۶ و در مغز استخوان شناسایی شدند (۲). سلول‌های بنیادی بالغ در بسیاری از بافت‌ها و اندام‌ها شامل مغز استخوان، شبکه، قرنیه چشم، پالپ دندان، مغز، طناب عصبی،

E-mail: n.delirez@urmia.ac.ir

مؤلف مسئول: نوروز دلیرز - ارومیه: دانشکده دام‌پزشکی، گروه میکروبیولوژی

۱. دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده پرآدام‌پزشکی، دانشگاه بوعلی سینا همدان، همدان، ایران

۲. دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دام‌پزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

۳. استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده دام‌پزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۲/۱۲/۱۷ تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۱/۳۱

## جداسازی و کشت سلول بنیادی مزانشیم

مراحل کشت و تشخیص بر اساس مطالعه از قبل انجام شده و پروتکل انجام گرفت (۱۱).

حیوانات از طریق قرار گرفتن در ظرف محتوی دی‌اتیل اتر روند بیهوشی را سپری نمودند. سلول مزانشیم از مغز استخوان فمور (Femur) و تیبیا (Tibia) موش صحرایی ۸-۶ هفته و با عمل فلاشینگ سرنگ حاوی محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified eagle medium-sigma) استحصال و پس از سانتریفوژ ۱۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه جمع‌آوری گردید و پس از شمارش سلولی به همراه ۱۵ درصد FBS (Fetal bovine serum) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن کشت داده شد. اولین تعویض کشت پس از ۷۲ ساعت و سپس هر ۳ روز یکبار انجام شد. مطالعه حاضر از نظر رعایت اخلاق در پژوهش با دستورالعمل انجمن حمایت از حیوانات مطابقت داشت.

## جداسازی نوتروفیل

جداسازی با کاربرد روش انجام گرفت (۱۲). به طور خلاصه، نمونه خون محیطی هپارینه (۱۰ واحد بین‌الملل بر میلی‌لیتر) به طور مستقیم از قلب موش صحرایی گرفته شد. خون را به نسبت ۱:۱ با سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد رقیق و سپس به آرامی بر مگلو مین (شرکت داروپخش) ۲۵ درصد اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. پلیت سلولی ته فالكون دو مرتبه توسط آب مقطر لیز شد و پس از اضافه نمودن سرم فیزیولوژی ۲/۵۵ درصد، به مدت ۵ دقیقه در ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و در نهایت با شستشوی پلیت سلولی با سرم دکستروز ۵ درصد (Sigma-USA) به میزان  $4 \times 10^6$  میلی‌لیتر همگن شد.

## مجاورسازی نوتروفیل با سلول مزانشیم رت

در فلاسک کشت، سلول مزانشیم پس از بلوغ و در روز ۱۴ به تعداد  $1 \times 10^6$  میلی‌لیتر با سوسپانسیون سلولی نوتروفیل حاوی  $4 \times 10^6$  میلی‌لیتر در دو زمان ۶ و ۲۴ ساعته داخل

سیستم ایمنی توسط سلول‌های مزانشیمال بر سیستم ایمنی اکتسابی انجام شده است که می‌توان به مکانیسم عمل مهاري MSCs بر سلول‌های T در تولید سیتوکین و سیتوتوکسیستی (۵)، بلوغ و تولید آنتی‌بادی برای سلول‌های B (۶)، تولید سیتوکین و سیتوتوکسیستی سلول‌های NK (Natural killer) (۷) و بلوغ، فعالیت و عرضه آنتی‌ژن سلول‌های DC (Dendritic cell) (۸) اشاره کرد، اما در ارتباط با ایمنی ذاتی اطلاعات کمی وجود دارد. به تازگی مطالعات بیشتری بر تأثیر سلول مزانشیم بر سیستم ایمنی ذاتی متمرکز شده‌اند. بررسی‌ها نشان می‌دهد که تکثیر و عرضه آنتی‌ژن توسط سلول‌های ماکروفاژ و دندریتیک، به دنبال تیمار با سلول مزانشیم مهار می‌شود و سلول مزانشیمال انسانی می‌تواند بر بقا و عملکرد نوتروفیل‌ها مؤثر باشد و حتی از آپوپتوز آن‌ها ممانعت کند (۹).

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. اهمیت نوتروفیل در نوتروپنی حاصل از شیمی‌درمانی یا واکنش به داروهای سیتوتوکسیک و به دنبال نقایص شدید ایمنی نیز مشهود است (۱۰). با توجه به گسترش دانش سلول‌های بنیادی، واکنش سلول مزانشیم با سلول‌های ایمنی (سیستم ذاتی و اکتسابی) حایز اهمیت است و مستلزم مطالعات گسترده‌تر و دقیق‌تر می‌باشد. با توجه به اهمیت نوتروفیل به عنوان اولین خط دفاعی بدن در سیستم ذاتی، نقش آن در التهاب و کاربرد سلول‌های بنیادی در درمان و به دنبال بررسی‌های پیشین بر تأثیر سلول مزانشیم بر نوتروفیل واقع در مغز استخوان، برهم‌کنش سلول‌های بنیادی جدا شده از مغز استخوان رت و نوتروفیل خون محیطی به منظور سنجش زنده‌مانی سلول نوتروفیل خون محیطی در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

مطالعه تجربی حاضر در آزمایشگاه کشت سلول بخش ایمنی‌شناسی دانشکده دام‌پزشکی دانشگاه ارومیه، به طور جداگانه و با سه بار تکرار انجام شد.

## یافته‌ها

سنجش میزان زنده‌مانی نوتروفیل

الف: انکوباسیون ۶ ساعته نوتروفیل با MSCs

جدول شماره ۱ نشان می‌دهد که انکوباسیون ۶ ساعته نوتروفیل با MSCs میزان زنده‌مانی سلول را تحت تأثیر قرار داد؛ به طوری که میزان سلول سالم در مقایسه با گروه شاهد در سطح معنی‌داری کاهش یافت و در مقابل میزان آپوپتوز در گروه آزمایش نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری افزایش نشان داد ( $P < 0/05$ ). نکروز سلولی نیز در مقایسه با گروه شاهد افزایش پیدا نمود که این افزایش معنی‌دار نبود (نمودار شماره ۱) (تصویر شماره ۱).

ب: انکوباسیون ۲۴ ساعته نوتروفیل با MSCs

با توجه به داده‌های جدول شماره ۱، میزان سلول سالم در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافت و در مقابل میزان آپوپتوز در انکوباسیون ۲۴ ساعته نوتروفیل با MSCs کاهش معنی‌داری پیدا کرد ( $P < 0/05$ ). نکروز سلولی در این مدت نسبت به گروه شاهد کاهش داشت که این کاهش معنی‌دار نبود (نمودار شماره ۲) (تصویر شماره ۱).

ج: مقایسه زنده‌مانی نوتروفیل مجاور شده با MSCs در انکوباسیون‌های ۶ و ۲۴ ساعته

درصد نوتروفیل سالم در انکوباسیون ۶ ساعته نسبت به انکوباسیون ۲۴ ساعته کاهش و میزان آپوپتوز و نکروز در مقایسه با انکوباسیون ۲۴ ساعته افزایش یافت که این نسبت‌های اختلاف معنی‌دار نبود (نمودار شماره ۳).

انکوباتور دی‌اکسید کربن‌دار و با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. از طرف دیگر، سوسپانسیون نوتروفیل با محیط کشت به عنوان کنترل آزمایش مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش زنده‌مانی نوتروفیل در مواجهه با (مایع رویی) سلول مزانشیم (کیت Anxin PI (556570)-Cat NO: 51-6710AK)

سلول نوتروفیل انکوبه شده با سلول مزانشیم پس از دو بار شستشو، به مدت ۵ دقیقه (با ۲۰۰۰ دور در دقیقه) در ۱ میلی‌لیتر بایندینگ بافر (Binding Buffer) با تراکم  $3 \times 10^6$  میلی‌لیتر به صورت سوسپانسیون تهیه شد. میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون فوق با ۵ میکرولیتر Annexin و ۵ واحد بین‌الملل بر لیتر PI (Prpidium iodide) ترکیب و در محیط تاریک و دمای آزمایشگاه به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه گردید. پس از افزودن ۴۰۰ میکرولیتر از محلول بایندینگ بافر به میکروتیوب، ۵۰۰ میکرولیتر از محلول فوق با PBS (Phosphate buffered saline) رقیق شد و میزان زنده‌مانی (درصد سلول سالم، آپوپتوز و نکروز شده) توسط دستگاه فلوسیتومتری (DAKO, USA) مورد تحلیل قرار گرفت.

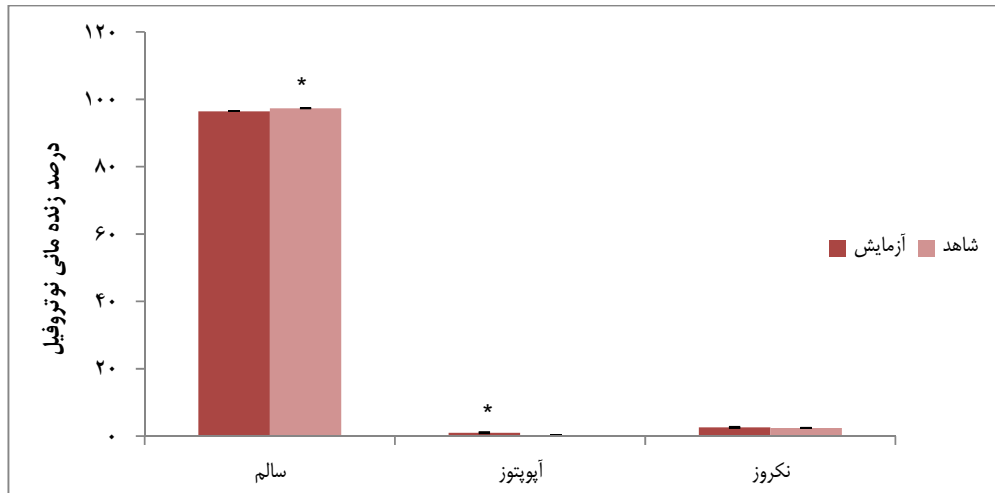
## تحلیل آماری

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ (version 17, SPSS Inc., Chicago, IL)، آزمون ANOVA و آزمون Tukey تحلیل شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۱۰ رسم و داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار در سطح معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) بیان شد. تحلیل نمودارهای فلوسیتومتری با استفاده از نرم‌افزار FloMax انجام گرفت.

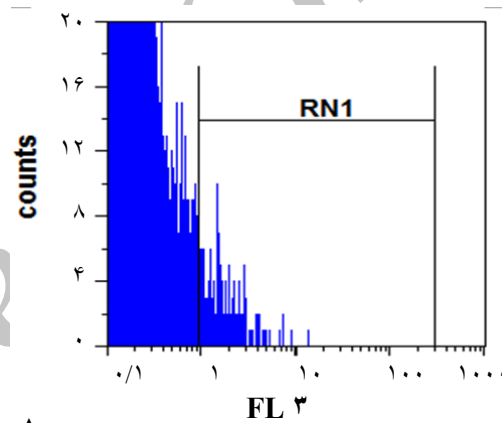
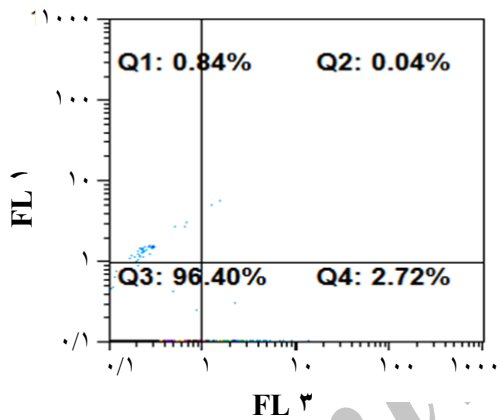
جدول شماره ۱: میزان زنده‌مانی سلول نوتروفیل مجاور شده با MSCs (Mesenchymal stem cells) در انکوباسیون ۶ و ۲۴ ساعته

گروه	سالم	آپوپتوز	نکروز
۶ ساعته	شاهد $97/37 \pm 0/05$	$0/20 \pm 0/00$	$2/42 \pm 0/05$
	آزمایش $96/41 \pm 0/01$	$1/00 \pm 0/20$	$2/59 \pm 0/19$
۲۴ ساعته	شاهد $92/86 \pm 0/39$	$6/74 \pm 0/24$	$3/18 \pm 1/05$
	آزمایش $96/85 \pm 1/12$	$0/64 \pm 0/10$	$2/50 \pm 1/22$

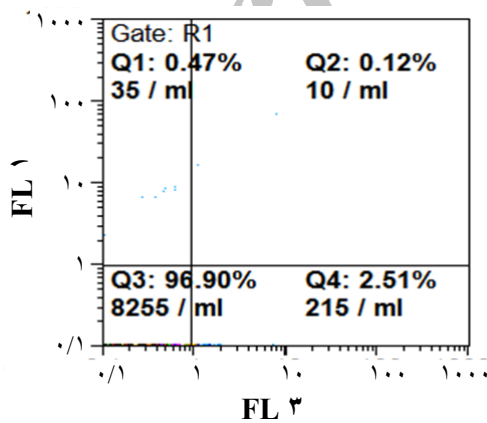
\* نشان دهنده معنی‌داری



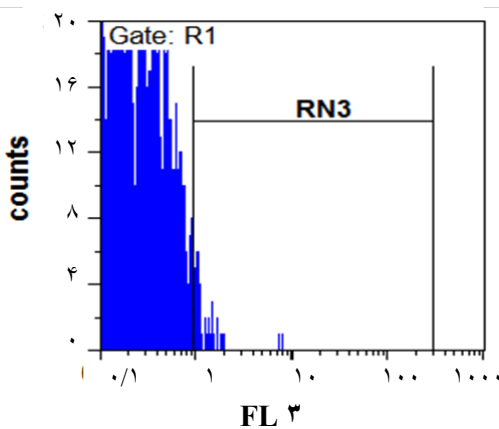
نمودار شماره ۱: میزان زنده‌مانی سلول نوتروفیل با MSCs (Mesenchymal stem cells) در انکوباسیون ۶ ساعته (آزمون ANOVA)



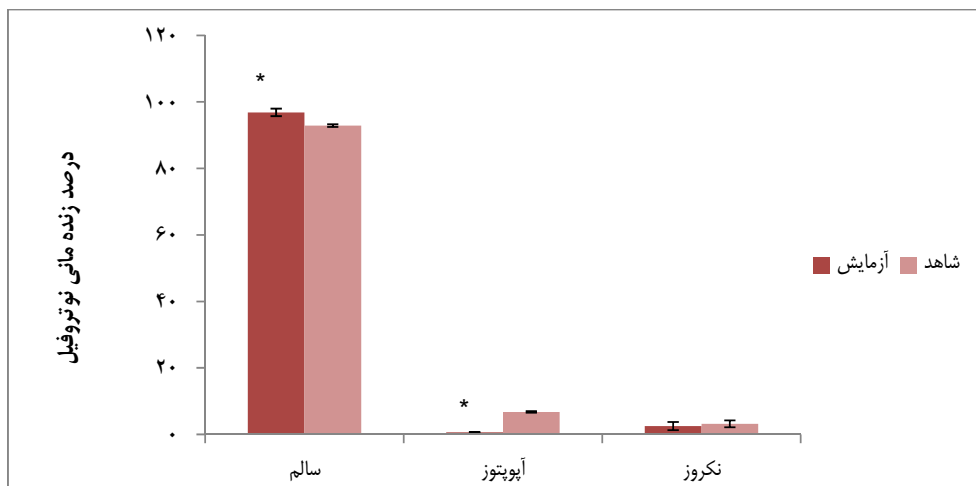
A



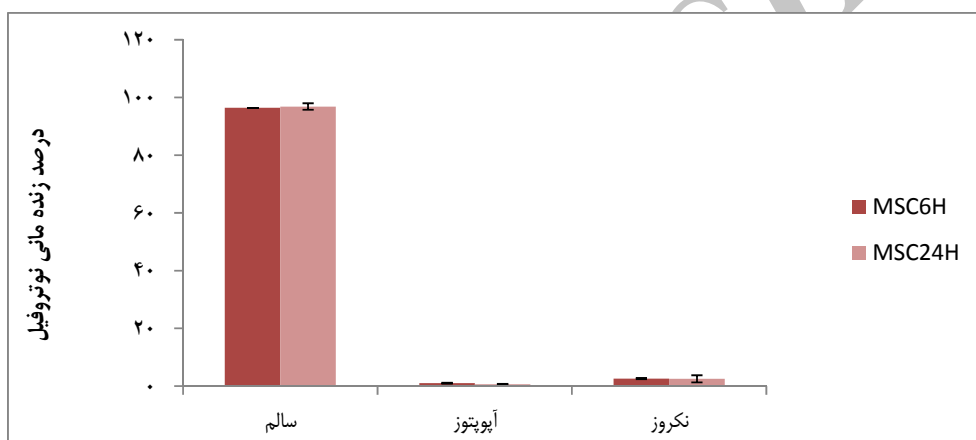
B



تصویر شماره ۱: نمونه‌ای از درصد زنده‌مانی نوتروفیل در انکوباسیون ۶ و ۲۴ ساعته با MSCs (Mesenchymal stem cells):  
آنالیز فلوسیتومتری، انکوباسیون ۶ ساعته (A) و انکوباسیون ۲۴ ساعته (B)



نمودار شماره ۲: سطح معنی‌داری زنده‌مانی اتکوباسیون ۲۴ ساعته سلول نوتروفیل با MSCs (Mesenchymal stem cells)



نمودار شماره ۳: مقایسه زنده‌مانی نوتروفیل در اتکوباسیون‌های ۶ و ۲۴ ساعته با MSCs (ANOVA (آزمون

MSCs بر تکثیر فعال سلولی و عرضه آنتی‌ژن ماکروفاژها و سلول‌های دندریتیک (۱۳) و خواص آنتی‌باکتریال MSCs از طریق ترشح پپتید کاتلیسیدین ۳۷-۱۸/LL-hCAP اشاره کرد (۱۴).

نتایج این بررسی نشان داد که میزان زنده‌مانی سلول نوتروفیل تحت تأثیر سلول مزانشیم در اتکوباسیون‌های ۶ و ۲۴ ساعته قرار گرفت؛ به طوری که در تیمار سلول نوتروفیل با MSCs به مدت ۶ ساعت، درصد سلول سالم نسبت به گروه شاهد مجاور شده با محیط کشت، به طور معنی‌داری کاهش یافت و در مقابل میزان آپوتوز در گروه تیمار، نسبت به گروه شاهد با اختلاف معنی‌داری افزایش پیدا کرد. نکروز سلولی

## بحث

سلول‌های مزانشیم دارای نقش تنظیمی عملکرد سیستم ایمنی هستند که در زمینه سیستم ایمنی اکتسابی می‌توان به مواردی مانند مکانیسم عمل مهاری MSCs برای سلول‌های T شامل تولید سیتوکین و سیتوتوکسیسیته (۹)، بلوغ و تولید آنتی‌بادی برای سلول‌های B (۱۰)، تولید سیتوکین و سیتوتوکسیسیته سلول‌های NK (۱۱) و بلوغ، فعالیت و عرضه آنتی‌ژن سلول‌های DC (۱۲) اشاره کرد. در ارتباط با تأثیر MSCs بر سیستم ایمنی ذاتی اطلاعات محدودی در دسترس است، اما به تازگی مطالعات بسیاری متوجه اثر MSCs بر ایمنی ذاتی شده است که از آن جمله می‌توان به نقش مهاری

MSCs قابل توجه است. برای این که سلول MSCs در مدت زمان کوتاه ۶ ساعته اثرگذار باشد؛ مقداری از سلول نوتروفیل از بین می‌رود، ولی بعد از ۲۴ ساعت به دلیل وجود عوامل رشد، میزان زنده‌مانی نوتروفیل بیشتر است.

محققان دیگر نیز عنوان کردند که MSCs جداشده از مغز استخوان انسان، آپوپتوز نوتروفیل‌های در حال استراحت و یا فعال شده توسط IL-۸ در کشت همراه با سرم طبیعی را کاهش می‌دهد. همچنین بیان داشتند که MSCs از طریق پیام‌رسانی IL-۶ (به عنوان مولکول کلیدی در حفظ نوتروفیل از فرایند آپوپتوز) پروتئین‌های پروآپوپتوتیک میتوکندریایی و Bax را کاهش و در مقابل پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوتیک MCL-۱ را افزایش می‌دهد (۹).

اگرچه ارتباط بین MSCs و نوتروفیل بالغ به خوبی در مغز استخوان مشخص نیست، اما مطالعات اخیر نشان می‌دهد که MSCs ساکن در بافت و متمرکز شده در نواحی پیش‌رگی و پیش‌اندوتلیالی موقعیتی را برای واکنش بین این دو سلول ایجاد می‌کند (۱۶). واکنش بین نوتروفیل محیطی و MSCs مستقر در بافت می‌تواند بر زنده‌مانی و به دنبال آن عملکرد نوتروفیل تأثیر داشته باشد و با توجه به این که نوتروفیل اولین عامل سیستم ایمنی در دفاع اولیه است، این برهم‌کنش به لحاظ نقش تنظیمی سلول مزانشیمال مورد توجه و حایز اهمیت است. دانشمندان تلاش می‌کنند 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 نمایند؛ با این وجود، گسترش استفاده از کاربردهای بالینی MSCs به طور معمول در نمونه‌های انسانی، منوط به انجام تحقیقات بیشتر بر مدل‌های فیزیولوژیک و پاتولوژیک محیط بدن انسان و پیگیری نتایج آن در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

هم مانند آپوپتوز افزایش داشت، اما این افزایش نسبت به گروه شاهد معنی‌دار نبود. 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 (۱۳)، اما نتایج مطالعه حاضر نشان داد که MSCs تا حدی موجب تضعیف زنده‌مانی در مدت تیمار ۶ ساعته می‌شود که می‌توان آن را به دلیل تضعیف سلول نوتروفیل از طریق ارتباط فیزیکی سلول-سلول با سلول مزانشیمال دانست.

انکوباسیون ۲۴ ساعته نوتروفیل با MSCs نتایج متفاوتی را نسبت به انکوباسیون ۶ ساعته نشان داد؛ به طوری که درصد سلول سالم در گروه تیمار نسبت به گروه شاهد با اختلاف معنی‌داری افزایش یافت و به دنبال آن میزان آپوپتوز به طور معنی‌داری کاهش داشت، اما کاهش درصد نکروز سلولی در گروه تیمار در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان نداد.

نوتروفیل‌ها دارای عمر محدودی در محیط آزمایشگاهی هستند که در محیط کشت بیشتر از ۴۸ ساعت دچار ۵۰ درصد مرگ سلولی می‌شوند. Maqbool و همکاران بیان داشتند که سلول مزانشیم به همراه غلظت‌های ۰، ۱، ۵ و ۱۰ درصد FBS دارای اثر آنتی‌آپوپتوتیک در انکوباسیون ۲۴ ساعته بر نوتروفیل می‌باشد (۱۳).

مطالعه دیگری نشان داد که سلول مزانشیم جدا شده از مغز استخوان، میزان آپوپتوز در رده سلولی BV۱۷۳ با ۱ و ۵ درصد سرم را کاهش می‌دهد (۱۵) که با یافته‌های مطالعه حاضر مطابقت دارد. در مقایسه انکوباسیون نوتروفیل با MSCs در دو زمان ۶ و ۲۴ ساعته، سلول مزانشیم در مدت ۶ ساعته باعث تضعیف زنده‌مانی نوتروفیل نسبت به مدت ۲۴ ساعته شد. با توجه به تولید عوامل محلول MSCs پس از ۲۴ ساعت، نتیجه عکس در مقایسه با انکوباسیون ۶ ساعته با

## References

1. Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM, Hu WS. Culture systems for pluripotent stem cells. *J Biosci Bioeng* 2005; 100(1): 12-27.
2. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966; 16(3): 381-90.
3. Musina RA, Egorov EE, Beliaevskii AV. [Stem

- cells: properties and perspectives of therapeutic use]. *Mol Biol (Mosk)* 2004; 38(4): 563-77.
4. Porada CD, Almeida-Porada G. Mesenchymal stem cells as therapeutics and vehicles for gene and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2010; 62(12): 1156-66.
5. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal

- stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105(4): 1815-22.
6. 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.
  7. 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.
  8. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, et al. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2005; 105(10): 4120-6.
  9. 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.
  10. Quinn MT, Deleo F, Bokoch GM. Neutrophil methods and protocols. New York, NY: Humana Press; 2007.
  11. Bittencourt RAC, Pereira HR, Felisbino SL, Murador P, Oliveira APA, Deffune E. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Acta Ortop Bras* 2006; 14(1): 22-4.
  12. Rezapour A, Majidi J. An Improved Method of Neutrophil Isolation in Peripheral Blood of Sheep. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 2009; 8(1): 11-5.
  13. Maqbool M, Vidyadaran S, George E, Ramasamy R. Human mesenchymal stem cells protect neutrophils from serum-deprived cell death. *Cell Biol Int* 2011; 35(12): 1247-51.
  14. Krasnodembskaya A, Song Y, Fang X, Gupta N, Serikov V, Lee JW, et al. 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.
  15. Ramasamy R, Lam EW, Soeiro I, Tisato V, Bonnet D, Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth. *Leukemia* 2007; 21(2): 304-10.
  16. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 2008; 3(3): 301-13.

Archive of SID

## *Evaluation of peripheral blood neutrophil survival following treatment with Mesenchymal stem cells in rats*

Sahar Hamounnavard<sup>1</sup>,  
Nowruz Delirezh<sup>2</sup>,  
Nahideh Afzal Ahangaran<sup>3</sup>,

<sup>1</sup> Ph.D Student of Immunology, Department of Microbiology, Faculty of Praverinary Medicine, Bu alisina Hamedan University, Hamedan, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Department microbiology, Immunology, Urmia University, Urmia, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Faculty of Veterinary Medicine, Department microbiology, Immunology, Urmia University, Urmia, Iran

(Received December 22, 2013; Accepted April 20, 2014)

### **Abstract**

**Background and purpose:** Because of their multipotency and ease of purification, amplification and immunomodulatory properties Mesenchymal stem cells (MSC), are an ideal stem cell source for cell therapies. This study was done to investigate the effect of Rat MSCs on the survival neutrophils.

**Materials and methods:** MSCs were isolated from rat (6-8 weeks) femoral and tibial bone marrow and cultured in DMEM. Then maturation MSCs were 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 MSCs by flow cytometric analysis using An/PI. Data were analyzed by SPSS software, followed by Tukey test at a significance level of ( $P < 0.05$ ).

**Results:** The 6-hour incubation of neutrophils with MSCs, significantly reduced the percentage of normal cells and increased apoptosis compared to controls and increased cell necrosis was not significant in the treated group than in control. The 24-hour incubation of neutrophils with MSCs, significantly increased the percentage of healthy cells and apoptosis was reduced compared to the control group, and reduced cell necrosis was not significant in the treated groups than in control ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** In spite of the clinical importance of MSCs, some biological aspects of them including their self-renewal, proliferation and immune modulatory effects are of great therapeutic potential for cell therapy.

**Keywords:** Mesenchymal stem cells, Neutrophil, Survival

J Mazand Univ Med Sci 2014; 24(112): ??-?? (Persian).