Archive of SID

مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۱، شماره۶، شهریور۱۳۹۵(شماره پی در پی۱۱۳)

اثر سلول‌های بنیادی مزانشیمال تحریک شده با LPS و تحت تیمار با عصاره چای سبز بر تغییر عملکرد نوتروفیل‌ها

اردشیر عباسی[۱]، نسیم رحمانی کوکیا[۲]، سید میثم ابطحی فروشانی[۱*]

[۱]گروه میکروب شناسی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، [۲]گروه بیوشیمی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۵/۴/۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۵/۲۹

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:56 IRST on Monday December 19th 2016

چکیده

زمینه و هدف: اخیراً ارتباط سلول‌های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با لیپوپلی ساکارید(LPS) بر سلول‌های نوتروفیل ثابت شده است. هدف از مطالعه حاضر تعیین اثرات چای سبز به عنوان یک نوشیدنی پر مصرف بر روی عملکرد متقابل سلول‌های بنیادی مزانشیمال در وضعیت پیش التهابی بر روی نوتروفیل‌ها بود.

روش بررسی : در این مطالعه تجربی، بعد از جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمال از مغز استخوان رت، این سلول‌ها با۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر از LPS به مدت ۱ ساعت تیمار شد و سپس مایع رویی دور ریخته و جهت حذف LPS سلول‌ها شستشوداده شدند. سلول‌ها با غلظت‌های متفاوتی از چای سبز (۱۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت۲۴ ساعت انکوبه گردید. سپس سلول‌های مزانشیمال به مدت ۲۴ ساعت دیگر بدون تیمار انکوبه گردیدند و در ادامه سلول‌ها را به مدت ۴ ساعت با نوتروفیل‌ها انکوبه شدند. در پایان عملکرد نوتروفیل‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت مقایسه داده‌ها از آزمون آنالیز کروسیکال والیس استفاده شد. سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: سلول‌های بنیادی مزانشیمال پیش التهابی (تیمار شده با LPS) موجب کاهش قدرت حیاتی، برداشت نوترال رد و قابلیت انفجار تنفسی نوتروفیل‌های مجاور شده، گشت. تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمال التهابی با غلظت بالای عصاره چای سبز باعث کاهش بیشتر برداشت رنگ نوترال رد (NR) و شدت انفجار تنفسی به وسیله سلول‌های نوتروفیل مجاور شده، گشت. هم‌چنین زنده مانی نوتروفیل‌های مجاور شده با مزاشیمال التهابی با چای سبز به صورت غیر وابسته به دوز افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمال در شرایط پیش التهابی با چای سبز می‌تواند موجب تقویت عملکرد سلول‌های مزانشیمال در افزایش بقا و کاهش قابلیت فاگوسیتوز و انفجار تنفسی سلول‌های نوتروفیل گردد.

واژه‌های کلیدی: سلول بنیادی مزانشیمال، لیپوپلی ساکارید، نوتروفیل، چای سبز

* **نویسنده مسئول: سید میثم ابطحی فروشانی**، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه میکروب شناسی
E-mail: meysamabtahi@hotmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:56 IRST on Monday December 19th 2016

مقدمه

نوتروفیل‌ها فراوان‌ترین گلبول سفید در گردش خون با قابلیت بیگانه‌خواری و واسطه اولین پاسخ‌های التهابی در ایمنی ذاتی هستند. این سلول‌ها سطح بالایی از پروتئازها و رادیکال‌های آزاد اکسیژن را تولید می‌کنند که در صورت تولید لجام گسیخته منجر به آسیب به بافت‌های میزبان خواهد شد(۱). نوتروفیل‌ها سلول‌های کاملاً تمایز یافته بوده که پس از تولید در مغز استخوان قابل تقسیم نبوده و طول عمر آن‌ها از چند روز تجاوز نمی‌کند. در طی عفونت، نوتروفیل‌ها به وسیله فرآورده‌های دیواره سلول باکتریایی مثل؛ لیپو پلی ساکارید، LPS و مورامیل دی پپتید،MDP و واسطه‌های التهابی مثل اینترفرن‌گاما (IFNγ) فعال می‌شوند(۲).

از مهم‌ترین سلول‌های بنیادی بالغ که امروزه توجه اکثر محققین را به خود جلب کرده است، می‌توان به سلول‌های بنیادی مزانشیمی اشاره کرد. سلول‌های بنیادی مزانشیم در ترمیم بافت‌هایی با منشاء مزانشیمی مثل؛ استخوان، غضروف، ماهیچه، تاندون و چربی شرکت می‌کنند. این سلول‌ها هم‌چنین به عنوان سلول‌های حمایت کننده برای سلول‌های هماتوپویتیک در مغز استخوان نیز مطرح هستند(۳). با توجه به دسترسی آسان به سلول‌های بنیادی بالغ و قابلیت استفاده بالقوه در طب ترمیمی، این سلول‌ها امیدها را برای درمان بیماری‌های مختلف در آینده افزایش می‌دهند(۴). علاوه بر این نشان داده شده است که این سلول‌ها قابلیت تعدیل کننده ایمنی نسبتاً بالایی نیز برخوردار هستند(۵). سلول‌های بنیادی مزانشیمال در محیط داخلی مغز استخوان و یا در بافت‌های محیطی در ارتباط نزدیک با سلول‌های نوتروفیل قرار می‌گیرند(۱). به نظر می‌رسد که این سلول‌ها در حفاظت سلول‌های نوتروفیل از مرگ زودرس و مهار فعال‌سازی آنها در محیط داخلی مغز استخوان نقش دارند(۶).مطالعه‌های انجام شده نشان داده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمال مقیم در بافت در فراخوانی سلول‌های نوتروفیل و افزایش قابلیت‌های التهابی آنها به دنبال چالش میکروبی دارای نقش اساسی هستند(۷).

پس از عفونت و یا در طول آسیب، سلول‌های مزانشیمال با طیف گسترده‌ای از الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن(PAMP) و یا مولکول‌های مرتبط با آسیب، مواجه می‌شوند که منجر به تغییر در تکثیر، مهاجرت و تمایز آنها می‌شود. درک این آسیب‌ها و علایم عفونت عمدتاً بر عهده گیرنده Toll-Like Receptors (TLRs) و الگوهای مولکولی مرتبط با خطر(DAMPs) درونی است می‌باشد. به طور مثال شناخت لیپوپلی ساکارید باکتریایی(LPS) به عنوان الگوی مولکولی مرتبط با دسته باکتری‌های گرم منفی به وسیله Toll-like receptor 4 در این سلول‌ها صورت می‌گیرد(۸).

چای سبز از برگ گیاه Camellia Sinensis استخراج می‌شود و یکی از پرمصرف ترین و متداول‌ترین آشامیدنی‌ها پس ازآب محسوب می‌شود، به علاوه به عنوان یک گیاه دارویی به شمار می‌آید که

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:56 IRST on Monday December 19th 2016

خواص بسیار سودمندی هم‌چون آثار ضد سرطان و آنتی‌اکسیدانی دارد(۹). چای سبز دارای اثرهای ضد انعقاد خون، ضد سرطان و ضد HIV و هم‌چنین موجب افزایش ایمنی غیر اختصاصی بدن می‌شود(۱۰ و۹). به علاوه دارای ترکیب‌هایی از جمله؛ (EGCG,Caffein.polyphenol,Catechin,Vitamin B.C.E) می‌باشد که اثرات نوروپروتکتیو خود را از طریق مهار رادیکال‌های آزاد، مانع ترشح اینترفرون گاما، مهار TNFα و مهار کاسپاز ۳، کاهش پروکسیداسون چربی، پایین آوردن قند خون، کاهش آپوپتوز و نیز آثار ضدالتهابی اعمال می‌کند(۱۲ و ۱۱).

تاکنون مطالعه‌های قابل توجهی در مورد نقش عوامل محیطی در شرایط التهابی در شکل‌دهی ارتباط بین سلول‌های مزانشیمال و نوتروفیل در دسترس نبوده است. پس بدین منظور عصاره آبی چای سبز به عنوان عامل محیطی پرمصرف، بر عملکرد سلول‌های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با LPS (به منظور ایجاد شرایط التهابی) بر نوتروفیل‌ها ارزیابی گردید.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی کلیه موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی طبق قوانین مصوب کمیته اخلاق در پژوهش‌های پزشکی و مطابق معاهده هلسینکی رعایت شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمال از مغز استخوان‌های تیبیا و فمور و ستیغ ایلئاک رت‌های نژاد ویستار مطابق روش زاپیا و همکاران جداسازی شد(۱۳). رت‌های مزبور از حیوان‌خانه دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه گردید. تمامی مراحل این تحقیق در کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه ارومیه مورد تأیید قرار گرفت. بدین منظور پس از کشتار رت‌ها به شیوه انسانی، با استفاده از قیچی و اسکالپل، استخوان‌های ران و ساق پا از استخوان لگن رت‌ها جدا شد. با استفاده از تامپون استریل پوست و ماهیچه اضافی از استخوان‌ها جدا و سپس آن‌ها داخل پتری دیش حاوی محیط کشت استریل قرار داده شد. سپس اقدام به فلاشینگ مغز استخوان‌های مزبور به کمک محیط کشت DMEM ساخت(Gibco- انگلستان) شد. سلول‌های حاصله پس از ۲بار شستشو، با غلظت ۴×۱۰^{۵} سلول به ازای هر سانتی‌متر مربع به فلاسک‌های کشت T25 حاوی محیط کشت DMEM و ۱۰ درصد FBS ساخت(Gibco ــ انگلستان) منتقل شدند. سلول‌ها به مدت۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و حضور ۵ درصد دی‌اکسیدکربن در گرمخانه گرماگذاری شدند، سپس سلول‌های غیرچسبنده حذف و کشت سلول‌های چسبنده ادامه یافت زیرا سلول‌های چسبنده مزانشیمال می‌باشند. تعویض محیط کشت هر ۲ روز یک‌بار انجام گرفت و پس از اولین تراکم بیش از ۸۰ درصد، سلول‌های چسبنده با استفاده از تریپسین(Sigma-آمریکا) حاوی ۲ درصد EDTA از کف فلاسک جداسازی و جهت پاساژ به فلاسک‌های بعدی منتقل شدند. در نهایت، از پاساژ سوم سلول‌ها جهت انجام آزمایش‌های مجاورسازی با نوتروفیل‌ها استفاده گردید(۱۳).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:56 IRST on Monday December 19th 2016

جهت تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمال با LPS، پس از پاساژ سوم، سلول‌های بنیادی مزانشیمال با LPS به میزان ۱۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر به مدت ۴ ساعت تیمار شد (به منظور بازسازی شرایط التهابی) سپس به منظور حذف LPS محیط رویی را دور ریخته و سلول‌ها با PBS شستشو داده شد(۱۴).

پس از تهیه برگ چای سبز، جنس و گونه آن به وسیله کارشناس هرباریوم دانشگاه ارومیه تأیید شد. سپس برگ‌های خشک شده با آسیاب برقی پودر شد. آنگاه عصاره آبی برگ های چای سبز به روش زهیر و همکاران تهیه شد(۱۵).

پس از اتمام تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمال با LPS، این سلول‌ها با غلظت‌های متفاوتی از عصاره چای سبز(۱۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۴۸ساعت مجاور شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون، مایع رویی سلول‌ها جمع‌آوری شده و به دور ریخته شد. پس از شست و شوی سلول‌ها به منظور حذف بقایای عصاره چای سبز، به سلول‌ها محیط کشت تازه افزوده شده و به مدت ۲۴ ساعت دیگر انکوبه شدند. در نهایت سلول‌های بنیادی مزانشیمال برای انجام آزمایش استفاده شد.

سلول‌های نوتروفیل از خون محیطی رت‌ها به کمک مگلومین کامپاند ساخت شرکت (داروپخش تهران) جداسازی شد(۲۰). به طور خلاصه پس از بیهوشی حیوان ، ۵ میلی لیتر خون هپارینه(۱۰ میکرولیتر در میلی لیتر) رت استحصالی از قلب حیوان با حجم مساوی از سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد رقیق شد ، به طور جداگانه، ۱ میلی‌لیتر از مگلومین با ۳ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد ورتکس شد، ۲ میلی‌لیتر خون رقیق شده به آرامی به روی مگلومین منتقل شد و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۲۴۰۰ rpm در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی رسوب سلولی خارج و رسوب حاصل را با ۴۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد همگن شد . به منظور حذف گلوبول قرمز آب مقطر سرد استریل به مدت ۴۰ـ۳۰ ثانیه به فالکون اضافه و بلافاصله ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی ۲٪ درصد داخل فالکون ریخته و مخلوط گردید. فالکون به مدت ۵ دقیقه با دور ۲۴۰۰ rpm در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی تخلیه و رسوب با ۱ میلی‌لیتر محیط کشت همگن گردید در پایان زنده‌مانی و تعداد سلول با استفاده از روش تریپان بلو تعیین گردید.سپس تعداد ۲×۱۰^{۶} سلول نوتروفیل در حجم ۲۰۰۰ میکرولیتر به همراه ۲×۱۰^{۵} سلول بنیادی مزانشیمال داخل پلیت‌های ۶ خانه ریخته شد. سپس به مدت ۴ ساعت، تحت شرایط ۳۷ درجه با ۵ درصد CO_2 و رطوبت ۸۰ درصد انکوبه گردیدند. بعد از گذشت زمان انکوبه شدن سلول‌های نوتروفیل جمع‌آوری شد و جهت انجام تست‌های تکمیلی زیر استفاده شد.

جهت ارزیابی میزان برداشت رنگ نوترال رد(NR)، در هر پلیت ۹۶ خانه به مقدار ۲۵۵ میکرولیتر از سوسپانسیون نوتروفیل (۲×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر) مجاور شده با مزانشیمال، به همراه ۲۰

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:56 IRST on Monday December 19th 2016

میکرولیتر از محلول NR (۳/۳ میلی گرم بر میلی‌لیتر) به چاهک‌ها افزوده و به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه در تاریکی انکوبه گردید. ۲۰۰ میکرولیتر محلول اسید استیک گلاسیال ـ اتانول(اسیداستیک ۱ درصد و اتانول ۵۰ درصد) به چاهک‌ها اضافه و شیک گردید. آنگاه پلیت‌ها در طول موج ۶۳۰ نانومتر به وسیله دستگاه الایزا خوان خوانده شدند.

برای ارزیابی انفجار تنفسی، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مخمر کاندیدا اپسونیزه(۱×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر) و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون نوتروفیل مجاور شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمال (۲×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر) به همراه ۳۰ میکرولیتر از محلول NBT (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به داخل چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ریخته شد. این سلول‌ها در پلیت‌های کشت ۹۶ خانه به مدت نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسیدکربن انکوبه شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون سلول‌ها سه بار شسته شده و با متانول تثبیت شدند. آنگاه کریستال‌های فیکس شده فورمازون با افزودن ۱۴۰ میکرولیتر DMSO و ۱۲۰ میکرولیتر KOH دو مولارحل شد. پلیت‌ها در طول موج ۶۲۰ نانومتر به وسیله دستگاه الایزا خوان خوانده شدند. هم‌چنین برای سنجش میزان زنده مانی سلول‌های نوتروفیل، ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون نوتروفیل (۲×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر) مجاور شده با مزانشیمال، به همراه ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به چاهک‌ها افزوده و به مدت ۴ ساعت دیگر در ۳۷ درجه در تاریکی انکوبه گردید. ۲۰۰ میکرولیتر DMSO به چاهک ها اضافه و شیک گردید. آنگاه پلیت‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر به وسیله دستگاه الایزا خوان خوانده شدند.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری آنالیز کروسیکال والیس تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

سلول‌های جدا شده از مغز استخوان پس از کشت دادن در محیط کشت پس از چند روز به تدریج کشیده شده و مشابه سلول‌های فیبروبلاست می‌گردند. در نهایت از پاساژ سوم سلول‌های کشت داده شده به عنوان سلول‌های بنیادی مزانشیمال استفاده شد(شکل ۱).

مطابق نمودار زنده مانی نوتروفیل ها، سلول‌های مزانشیمال تیمار شده با LPS باعث کاهش بقای نوتروفیل‌ها شد. در همین راستا سلول‌های مزانشیمال تیمار شده با عصاه چای سبز در غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بیشترین تأثیر را در افزایش برگشت عملکرد بقای نوتروفیل‌ها به صورت غیر وابسته به دوز را دارد(نمودار ۱).

قابلیت برداشت NR یک ارزیابی کلی از عملکرد بخش لیزوزومی‌نوتروفیل‌ها ارایه می‌دهد، سلول‌های مزانشیمال تحریک شده با LPS باعث کاهش میزان برداشت NR نسبت به نوترفیل خالی شد. البته سلول‌های مزانشیمال تیمار شده با عصاره چای سبز

www.SID.ir

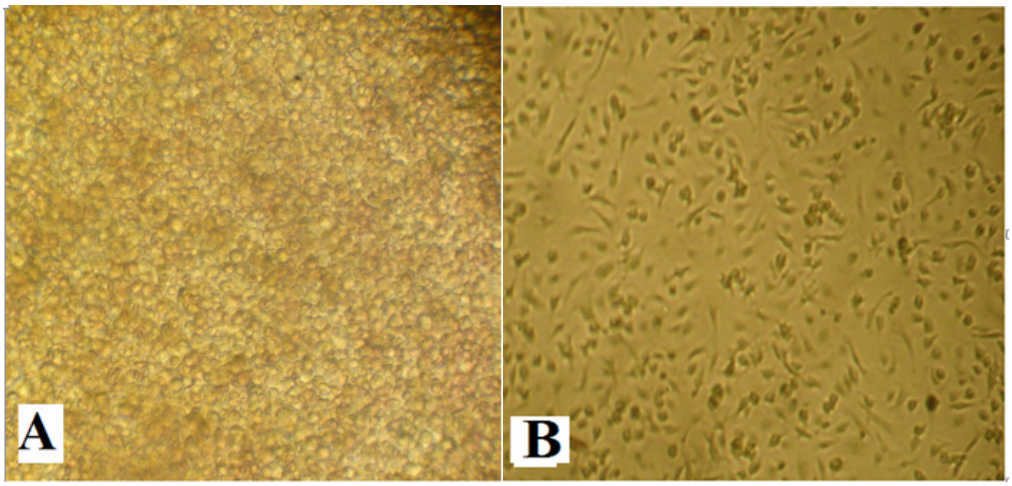
Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:56 IRST on Monday December 19th 2016

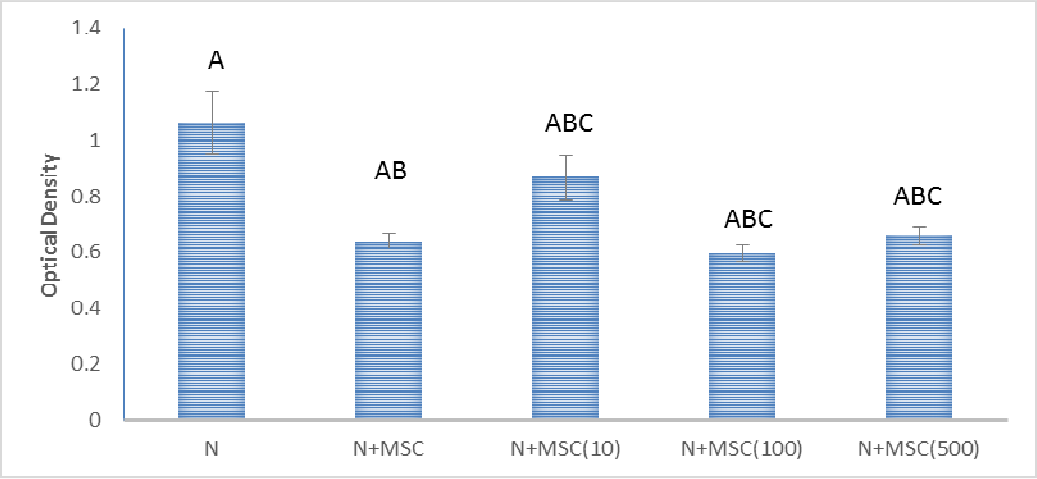
در غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر موجب کاهش معنی‌داری در برداشت NR به وسیله سلول‌های نوتروفیل نسبت به گروه کنترل شده است(نمودار ۲).

آزمون احیای NBT ارزیابی کلی از قابلیت انفجار تنفسی در مخمر اپسونیزه به وسیله نوتروفیل‌ها را ارایه می‌دهد.

طبق نتایج تست NBT سلول‌های مزانشیمال مجاور شده با LPS باعث کاهش انفجار تنفسی در نوتروفیل‌ها شدند. هم‌چنین تیمار سلول‌های مزانشیمال با عصاره چای سبز به صورت وابسته دوز باعث تشدید کاهش انفجار تنفسی نوتروفیل ها در مقایسه با نوتروفیل مجاور شده با مزانشیمال بدون تیمار و حتی نوتروفیل خود، به تنهایی شد(نمودار۳).



شکل ۱: پاساژ سلول‌های آسپیره شده از مغز استخوان. تصویر A) سلول‌های آسپیره شده مغز استخوان در روز ۱. تصویر B) تغییر شکل این سلول‌ها و دوکی شدن کامل آنها پس از پاساژ سوم کاملا مشهود می‌باشد (بزرگنمایی×۴۰).

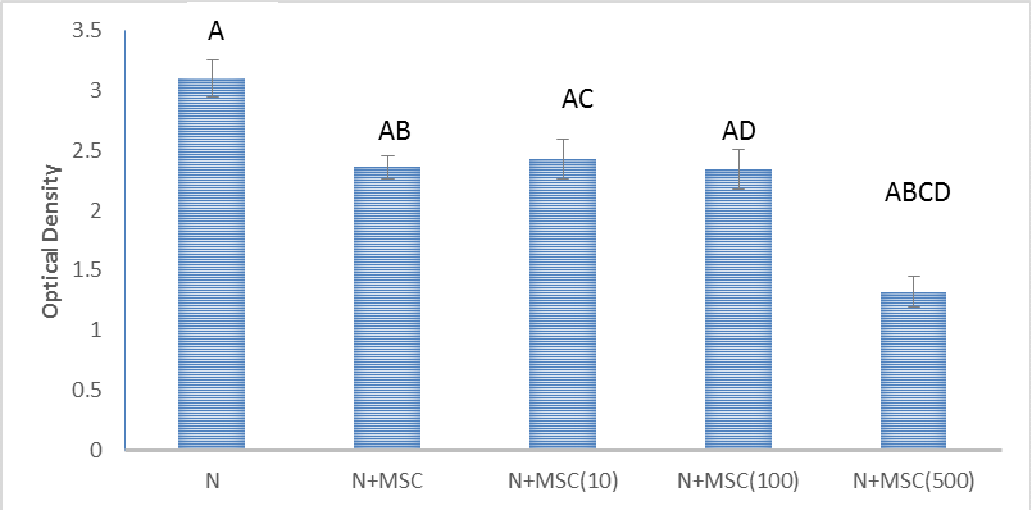


نمودار۱: ارزیابی میزان زنده مانی سلول‌های نوتروفیل مجاور شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمال پیش التهابی تیمار شده با غلظت های متفاوت چای سبز. حروف یکسان نشان دهنده برروی نمودارها اختلاف معنی دار در سطح $p<0/05$ نسبت به یکدیگر می‌باشد.

www.SID.ir

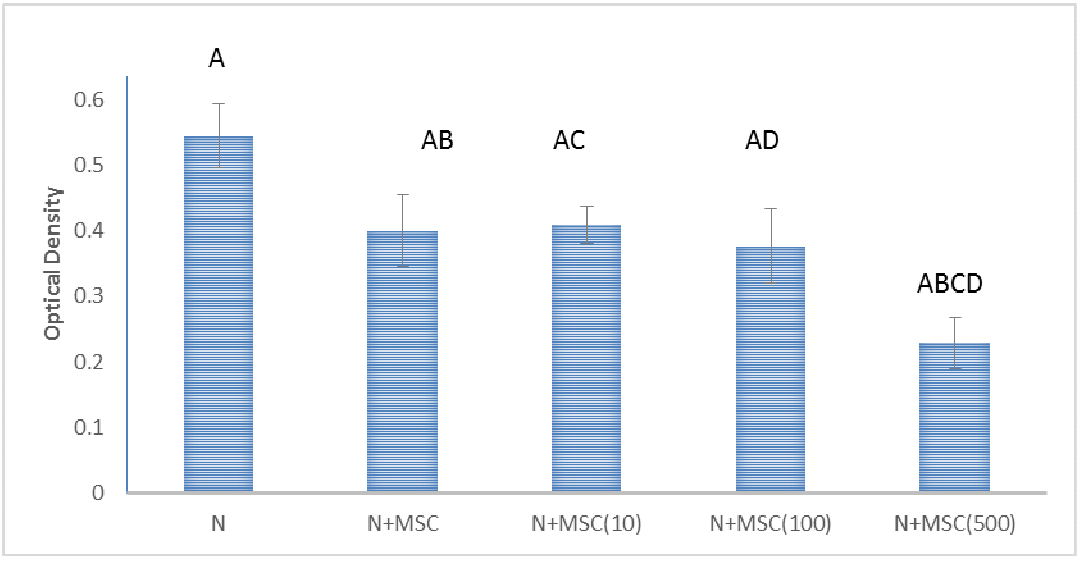
Archive of SID

N: نوتروفیلهای تنها، N+MSCs: نوتروفیلهای مجاور شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمال. اعداد داخل پرانتز نشان دهنده غلظت عصاره چای سبز برحسب میکرو گرم بر میلی لیتر است.



نمودار ۲: ارزیابی میزان برداشت رنگ نوترال رد به وسیله نوتروفیل های مجاور شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمال پیش التهابی تیمار شده با غلظت‌های متفاوت چای سبز. حروف یکسان نشان دهنده برروی نمودارها اختلاف معنی‌دار در سطح p<۰/۰۵ نسبت به یکدیگر می‌باشد.

N: نوتروفیلهای تنها، N+MSCs: نوتروفیلهای مجاور شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمال. اعداد داخل پرانتز نشان دهنده غلظت عصاره چای سبز برحسب میکرو گرم بر میلی لیتر است.



نمودار ۳ : ارزیابی قابلیت انفجار تنفسی سلول‌های نوتروفیل مجاور شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با غلظت‌های متفاوت چای سبز می‌باشد. حروف یکسان نشان دهنده برروی نمودارها اختلاف معنی دار در سطح p<۰/۰۵ نسبت به یکدیگر می‌باشد.

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:56 IRST on Monday December 19th 2016

www.SID.ir

Archive of SID

N: نوتروفیل‌های تنها، N+MSCs: نوتروفیل‌های مجاور شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمال. اعداد داخل پرانتز نشان دهنده غلظت عصاره چای سبز برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر است.

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:56 IRST on Monday December 19th 2016

بحث

تحقیق‌های آزمایشگاهی نشان داده‌اند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی توانایی بازسازی بافت، گریز از سیستم ایمنی، خاصیت تنظیم کننده یا مهار کننده بروی پاسخ‌های سیستم ایمنی را دارند. سلول‌های بنیادی مزانشیمال تکثیر و عملکرد سلول‌های کشنده طبیعی(NK Cell) و تشکیل سلول‌های ماکروفاژ و دندریتیک از مونوسیت‌ها را مهار می‌کنند این سلول‌ها در شدت ایجاد پاسخ‌های التهابی و پاسخ های ایمنی نوع ۱ و تمایز سلول‌های تنظیم کننده سیستم ایمنی تأثیر زیادی دارند(۵ و ۱۶). مهم‌ترین فاکتورهای سرکوب‌کننده ایمنی این سلول‌ها شامل برخی از مولکول‌های مهاری بیان شده در سطح آنها از قبیل؛ PDL1، TGF-ß ، HLA-G ، Galectins)، برخی سایتوکاین‌های ضدالتهابی مانند(IL-10، TGF-ß)، برخی متابولیت‌ها از قبیل؛ نیتریک اکساید ،IDO و پروستاگلاندین‌ها)، فاکتور تعدیل کننده التهاب (هم اکسیژناز۱) و برخی از آنزیم‌های مهارکننده مانند (ماتریکس متالوپروتئینازها) می‌باشند که به صورت پاراکرین و یا درتماس مستقیم سلول به سلول اثرات خود را بروز می‌دهند(۱۸ و۱۷). به نظر می‌رسد که عملکردهای سلول‌های بنیادی مزانشیمال تحت کنترل سیستم‌های متعدد انتقال دهنده پیام می‌باشد(۱۹). به نحو جالب توجهی سلول‌های بنیادی موجود در مغز استخوان و بافت‌های محیطی دارای فنوتیپ مشابهی می‌باشند(۲۰ و ۲۱).

سلول‌های بنیادی مزانشیمال در بافت‌های محیطی در ارتباط نزدیک با سلول‌های نوتروفیل قرار می‌گیرند(۵). سلول‌های بنیادی مزانشیمال در هنگام مواجهه با LPS، گیرنده های شبه تول(TLRs) روی سلول‌های مزانشیمال بارز شده و آنها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. TLR ها جزو گیرنده‌های ایمنی ذاتی، شناسایی کننده طیف وسیعی از PAMPهای باکتریایی، ویروسی، قارچی و برخی از مولکول‌های میزبان می‌باشند(۲۲). TLRها بر روی پیش‌ساز بافت‌های گوناگونی همچون HSC، EPS، MSC ، پیش‌ساز رتینال و پیش‌ساز سلول عصبی(NPS) بیان می‌شوند(۲۳). از آنجایی که سیگنال‌های خطر باعث فراخواندن سلول‌های ایمنی به محل آسیب می‌شوند می‌توان انتظار همچنین عملکردی را در سلول‌های مزانشیمال نیز داشت. تحقیق‌ها نشان داده است که لیگاند TLR های ۸ـ۱ بر روی MSC بیان می‌شود، اما TLR9 بیان نمی‌شود. مشخص شده است هنگامی که MSC با LPS به چالش کشیده می‌شود موجب افزایش بیان و عرضه بیشتر TLR2 وTLR4 روی MSC می‌شود، در این راستا فعال شدن TLR_4 باعث افزایش بیان NFKβ، MAPK، PI_3K، افزایش بیان چندین سایتوکاین ازجمله CXCL10، IL6، IL1β، IL8، ترشح IRF3، تولید RANTES، INFβ(۲۵ و ۲۴)، همچنین ظاهر شدن بیشتر گیرنده‌های

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:56 IRST on Monday December 19th 2016

HLAI، HLAII و مولکول‌های کمک تحریکی (CD40,CD80 ,CD86) می‌شود(۲۶). جالب توجه است که از بین TLRها، TLR_2 و TLR_4 بیشترین اثر ایمونومدولاتوری را بر روی MSC اعمال می‌کند(۲۷). به همین دلیل در مطالعه حاضر از LPS به عنوان لیگاند TLR4 جهت ارزیابی اثرات سلول‌های بنیادی مزانشیمال بر نوتروفیل‌ها در یک عفونت شبیه‌سازی شده استفاده شد. در مطالعه‌ای مشخص شده است که اثرات ایمونومدولاتوری مزانشیمال نه تنها برروی خود مزانشیمال اثرگذار است، بلکه بر روی سلول‌های ایمنی که در ارتباط و تماس با مزانشیمال می‌باشد نیز مؤثر است(۲۸). به طور جالب توجهی نشان داده شده است که تحریک TLRs خاص بر پاسخ های ایمنو مدولاتوری سلول های استرومایی مزانشیمی تأثیر می‌گذارد. سلول‌های مزانشیمال به دنبال تحریک TLR 4 با LPS به سمت فنوتیپ MSC1 و به دنبال تحریک TLR3 با Poly-IC به سمت فنوتیپ MSC2 پلاریزه می‌شوند.MSC1 سایتوکاین‌های پیش التهابی و MSC2 سایتوکاین‌های ایمنو ساپرسیو را ترشح می‌کنند(۳۰ و۲۹). تحریک MSC به وسیله TLR4 باعث ایجاد شرایط پیش التهابی می‌شود که احتمالاً اثرات ایمونومدولاتوری خود را بر روی سلول‌های ایمنی از طریق TGFβ اعمال می‌کند، در نتیجه از طریق سیگنالینگ TGFβ وSMAD3 باعث سرکوب التهاب می‌شود(۳۱).

در تحقیق‌های گذشته نشان داده شده است که چای سبز در شرایط التهابی اثرات خود را بر روی سیستم ایمنی از طریق مهار رادیکال‌های آزاد، مهار ترشح اینترفرون گاما، مهار TNFα، مهار کاسپاز۳، هم‌چنین کاهش بیان مسیر TLR4/NFKβP65، کاهش آزادسازی سایتوکاین‌های التهابی (IL6,IL1β,TNFα)، کاهش ظرفیت مهاجرت نوتروفیل، کاهش فعالیت تولیدی MPO و HOCL، کاهش کموکاین‌های CXCL، GROα (تحریک کموتاکسی نوتروفیل)، MCP-1 (تحریک کموتاکسی منوسیت)، G- CSF (فاکتور تولید کننده گرانولوسیت) اعمال می‌کند(۳۲). در حالی که باعث افزایش فعالیت آنتی اکسیدانتی، افزایش ظرفیت فاگوسیتی، افزایش القای ترشح β دیفنسین نیز می‌شود(۳۳). شایان ذکر است که چای سبز حاوی ترکیب‌هایی مثل؛ EGCG, Caffeine ,polyphenol می‌باشد(۱۱) به طور جالب توجهی مشخص شده است که مصرف عادی کافئین در فراورده‌هایی از قبیل قهوه و چای سبز منجر به اثرات تعدیل‌کننده ایمنی و ضدالتهابی در افراد مصرف کننده این ترکیب‌ها می‌گردد(۳۴).

در بسیاری از مطالعه‌ها گزارش کردند که چای سبز باعث کاهش مسیرهای کاسپاز ۳، NFKβ، ERK، ERAP می‌شود که باعث به تأخیر انداختن آپوپتوز در نوتروفیل‌ها خواهد شد(۳۶ و۳۵). در مطالعه حاضر سلول‌های مزانشیمال تیمار شده با چای سبز در غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر باعث افزایش زنده مانی نوتروفیل‌ها گردید ، بنابر این یافته‌ها ممکن است سازوکار جدیدی در این زمینه از

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:56 IRST on Monday December 19th 2016

طریق اثرگذاری بر عملکرد MSCs بر نوتروفیل‌ها داشته باشد.

تحریک سلول‌های مزانشیمال بافتی با اندوتوکسین باکتریایی از طریق گیرنده‌های شبه تول (Toll-like Receptor) TLR موجب افزایش آزادسازی مقدار زیادی از سایتوکاین های التهابی از قبیل IL-8 ، MIF و در پی آن موجب فراخوانی، افزایش قابلیت فاگوسیتوز و انفجار تنفسی نوتروفیل‌ها می‌شود و تحقیق‌ها نشان داده است که IL-6 تولید شده از MSCs موجب افزایش بقا و مهار آپوپتوز در سلول‌های نوتروفیل می‌گردد(۱) احتمالاً تیمار چای سبز بر آزاد سازی IL-6 از سلول‌های MSC اثر داشته است. رنگ نوترال رد(NR) یک رنگ کاتیونی بوده که نوتروفیل‌ها بر اساس میزان فعالیت خود قادر به برداشت و ذخیره سازی آن در اندامک‌های خود (لیزوزم‌هایشان) می‌شود. برداشت یا میزان فاگوسیتوز NR (فاگوسیتوز پایه) به وسیله سلول‌های نوتروفیل بسته به فاکتورهایی از قبیل میزان زنده‌مانی و خصوصیات غشای آنها دارد(۳۷). در این مطالعه تیمار سلول‌های مزانشیمال با چای سبز باعث کاهش برداشت NR به وسیله نوتروفیل‌های مجاور شده با مزانشیمال گردید.

در مجموع به نظر می‌رسدکه افزایش بیان TLRها و یا تحریک آنها بر روی MSC باعث تشدید اثر ایمونومدولاتوری MSC می‌شود که در کاهش شدت بیماری‌های التهابی مزمن و بیماری‌های اتوایمیون همچون کرون، روماتوئید آرتریت مفید خواهد بود(۳۸ و۳۲). گزارش‌ها دال بر افزایش اثرات ایمونوساپروسری MSC بر روی سلول‌های ایمنی به وسیله فعال شدن TLR4 شامل؛ مهار فاکتور رونویسی Noth و کاهش تکثیر لنفوسیتT(۲۳) ممانعت از تمایز و بلوغ دندرتیک سل به وسیله IL6 تولید شده از MSC(۳۹) ممانعت از فعالیت کشندگیNK می‌باشد(۴۰)، نشان داده شده است که نتیجه تحریک سلول‌های مزانشیمال، باعث جذب و کموتاکسی سلول ایمنی ذاتی نوتروفیل می‌شود. به علاوه مشاهدات نشان داد است که فعال شدن MSC با LPS باعث از سرباز گیری دوباره سلول‌های سیستم ایمنی ذاتی شود.

رادیکال‌های آزاد اکسیژن نیز از جمله مهم‌ترین عوامل درگیر در حذف عوامل محیطی مهاجم به وسیله نوتروفیل‌ها می‌باشد(۴۱). با وجود این زمانی که میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن بیش از حد بوده و یا در شرایط نامناسبی تولید کردند، این رادیکال‌های آزاد اکسیژن در ایجاد آسیب بافتی و شرایط ایمونوپاتولوژیک دخالت می‌نماید(۴۲). نقش فعالیت نامناسب نوتروفیل‌ها در پاتوژنز بسیاری از بیماری‌های خود ایمن و خود التهابی نشان داده شده است(۶). یک مطالعه جدید نیز حاکی از آن بوده است که مصرف کافئین به خودی خود می‌تواند منجر به کاهش قابلیت تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن به وسیله نوتروفیل‌ها گردد(۴۱). نتایج مطالعه حاضر نیز حاکی از آن بود که تیمار سلول‌های مزانشیمال باعث کاهش انفجار تنفسی نوتروفیل ها گردید .با توجه به خاصیت بالقوه مضر رادیکال‌های اکسیژن در آسیب بافتی کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن باعث کاهش

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:56 IRST on Monday December 19th 2016

آسیب‌های بافتی و پاتولوژیکی نوتروفیل‌ها در شرایط خود التهابی می‌شود. این مسئله احتمالاً به دلیل کاهش سایتوکاین‌های التهابی IL-8 و IL-6 به وسیله سلول‌های مزانشیمال می‌باشد. همان‌طور که ذکر شد در گذشته نیز به اثرات مستقیم ضد التهابی چای سبز اشاره شده است. بر اساس نتایج حاضر به نظر می‌رسد که لا اقل بخشی از اثرات مفید ضد التهابی چای سبز به دلیل تغییر در عملکرد سلول‌های بنیادی مزانشیمال بر سلول‌های نوتروفیل باشد.

نتیجه‌گیری

در مجموع، به نظر می‌رسد تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمال در شرایط پیش التهابی با چای سبز می‌تواند موجب تقویت عملکرد سلول‌های مزانشیمال در افزایش بقا و کاهش قابلیت فاگوسیتوز و انفجار تنفسی سلول‌های نوتروفیل گردد.

تقدیر و تشکر

مقاله حاضر حاصل یک طرح پژوهشی در دانشگاه ارومیه می‌باشد که با حمایت مالی معاونت پژوهشی این دانشگاه انجام گردید

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:56 IRST on Monday December 19th 2016

REFERENCE

1.Farmakis D, Giakoumis A, Polymeropoulos E, Aessopos A. Pathogenetic aspects of immune deficiency associated with beta-thalassemia. Medical science monitor. International Medical Journal of Experimental and Clinical Research 2003; 9(1): RA19-22.

2.Turina M, Miller FN, McHugh PP, Cheadle WG, Polk HC. Endotoxin inhibits apoptosis but induces primary necrosis in neutrophils. Inflammation 2005; 29(1): 55-63.

3.Payne N, Siatskas C, Bernard CC. The promise of stem cell and regenerative therapies for multiple sclerosis. Journal of Autoimmunity 2008; 31(3): 288-94.

4.Porada CD, Almeida-Porada G. Mesenchymal stem cells as therapeutics and vehicles for gene and drug delivery. Advanced Drug Delivery Reviews 2010; 62(12): 1156-66.

5.Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. Nature Reviews Immunology 2012; 12(5): 383-96.

6.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.

7.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. Journal of leukocyte Biology 2010; 88(5):1005-15.

8.Koh SH, Lee SM, Kim HY, Lee KY, Lee YJ, Kim HT, et al. The effect of epigallocatechin gallate on suppressing disease progression of ALS model mice. Neuroscience letters 2006; 395(2): 103-7.

9.Kakuda T. Neuroprotective effects of the green tea components theanine and catechins. Biological & Pharmaceutical Bulletin 2002; 25(12): 1513-8.

10.Khan N, Mukhtar H. Tea polyphenols for health promotion. Life Sciences 2007; 81(7): 519-33.

11.Ivanov V, Roomi MW, Kalinovsky T, Niedzwiecki A, Rath M. Anti-atherogenic effects of a mixture of ascorbic acid, lysine, proline, arginine, cysteine, and green tea phenolics in human aortic smooth muscle cells Journal of Cardiovascular Pharmacology 2007; 49(3): 140-5.

12.Sutherland BA, Rahman RM, Appleton I. Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration. The Journal of Nutritional Biochemistry 2006; 17(5): 291-3.

13.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): 1755-61.

14.Romieu-Mourez R, Francois M, Boivin MN, Bouchentouf M, Spaner DE, Galipeau J. Cytokine modulation of TLR expression and activation in mesenchymal stromal cells leads to a proinflammatory phenotype. Journal of Immunology 2009; 182(12): 7963-73.

15.Raihan SZ, Chowdhury AK, Rabbani GH, Marni F, Ali MS, Nahar L, et al. Effect of aqueous extracts of black and green teas in arsenic-induced toxicity in rabbits. Phytotherapy Research PTR 2009; 23(11): 1603-8.

16.Kammer GM. The adenylate cyclase-cAMP-protein kinase A pathway and regulation of the immune response. Immunology Today 1988; 9(7-8): 222-9.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:56 IRST on Monday December 19th 2016

17.Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. Nature reviews Immunology 2008; 8(9): 726-36.

18.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): 419-27.

19.Motlagh BM, Ahangaran NA, Froushani SM. Calcitriol modulates the effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on macrophage functions .Iranian Journal of Basic Medical Sciences 2015;18(7): 672-6.

20.Hoogduijn MJ, Cheng A, Genever PG. Functional nicotinic and muscarinic receptors on mesenchymal stem cells. Stem Cells and Development 2009; 18(1): 103-12.

21.Zhou Y, Guan XX, Zhu ZL, Guo J, Huang YC, Hou WW, et al. Caffeine inhibits the viability and osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. British Journal of Pharmacology 2010; 161(7): 1542-52.

22.Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. Nature 2004; 430(6996): 257-63.

23.Opitz CA, Litzenburger UM, Lutz C, Lanz TV, Tritschler I, Koppel A, et al. Toll-like receptor engagement enhances the immunosuppressive properties of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by inducing indoleamine-2,3-dioxygenase-1 via interferon-beta and protein kinase R. Stem Cells 2009; 27(4): 909-19.

24.Raicevic G, Najar M, Pieters K, De Bruyn C, Meuleman N, Bron D, et al. Inflammation and Toll-like receptor ligation differentially affect the osteogenic potential of human mesenchymal stromal cells depending on their tissue origin. Tissue Engineering Part A 2012; 18(13-14): 1410-8.

25.Chen X, Zhang ZY, Zhou H, Zhou GW. Characterization of mesenchymal stem cells under the stimulation of Toll-like receptor agonists. Development Growth & Differentiation 2014; 56(3): 233-44.

26.Mo IF, Yip KH, Chan WK, Law HK, Lau YL, Chan GC. Prolonged exposure to bacterial toxins downregulated expression of toll-like receptors in mesenchymal stromal cell-derived osteoprogenitors. BMC Cell Biology 2008; 9: 52.

27.Lei J, Wang Z, Hui D, Yu W, Zhou D, Xia W, et al. Ligation of TLR2 and TLR4 on murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells triggers differential effects on their immunosuppressive activity. Cellular Immunology 2011; 271(1): 147-56.

28.Gur-Wahnon D, Borovsky Z, Beyth S, Liebergall M, Rachmilewitz J. Contact-dependent induction of regulatory antigen-presenting cells by human mesenchymal stem cells is mediated via STAT3 signaling. Experimental Hematology 2007; 35(3): 426-33.

29.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. PloS One 2010; 5(4): e10088.

30.Waterman RS, Henkle SL, Betancourt AM. Mesenchymal stem cell 1 (MSC1)-based therapy attenuates tumor growth whereas MSC2-treatment promotes tumor growth and metastasis. PloS One 2012; 7(9): e45590.

31.Nemeth K, Mayer B, Mezey E. Modulation of bone marrow stromal cell functions in infectious diseases by toll-like receptor ligands. Journal of Molecular Medicine 2010; 88(1): 5-10.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:56 IRST on Monday December 19th 2016

32.Yamamoto-Furusho JK, Podolsky DK. Innate immunity in inflammatory bowel disease. World Journal of Gastroenterology 2007; 13(42): 5577- 80.

33.Ishihara S, Rumi MA, Ortega-Cava CF, Kazumori H, Kadowaki Y, Ishimura N, et al. Therapeutic targeting of toll-like receptors in gastrointestinal inflammation. Current Pharmaceutical Design 2006; 12(32): 4215-28.

34.Djouad F, Charbonnier LM ,Bouffi C, Louis-Plence P, Bony C, Apparailly F, et al. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. Stem Cells 2007; 25(8): 2025-32.

35.Giuliani M, Bennaceur-Griscelli A, Nanbakhsh A, Oudrhiri N, Chouaib S, Azzarone B, et al. TLR ligands stimulation protects MSC from NK killing. Stem Cells 2014; 32(1): 290-300.

36.Lombardo Bedran TB, Feghali K, Zhao L, Palomari Spolidorio DM, Grenier D. Green tea extract and its major constituent, epigallocatechin-3-gallate, induce epithelial beta-defensin secretion and prevent beta-defensin degradation by Porphyromonas gingivalis. Journal of Periodontal Research 2014; 49(5): 615-23.

37.Horrigan LA, Kelly JP, Connor TJ. Immunomodulatory effects of caffeine: friend or foe?. Pharmacology & Therapeutics 2006; 111(3): 877-92.

38.Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. Annual Review of Nutrition 2001; 21: 381-406.

39.Gardai SJ, Whitlock BB, Xiao YQ, Bratton DB, Henson PM. Oxidants inhibit ERK/MAPK and prevent its ability to delay neutrophil apoptosis downstream of mitochondrial changes and at the level of XIAP. The Journal of Biological Chemistry 2004; 279(43): 44695-703.

40.Antal P, Sipka S ,Suranyi P, Csipo I, Seres T, Marodi L, et al. Flow cytometric assay of phagocytic activity of human neutrophils and monocytes in whole blood by neutral red uptake. Annals of Hematology 1995; 70(5): 259-65.

41.Hamaliaka A, Novikova I. Nitric oxide production disorders in leukocytes of patients with recurrent furunculosis. Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc. Czechoslovakia 2010; 154(2): 163-7.

42.Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. The American Journal of Medicine 2000; 109(1): 33-44.

www.SID.ir

Archive of SID

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

The Change in the Functions of Neutrophils after Being Stimulated with LPS-primed Mesenchymal Stem and Treated with Green Tea

Abbasi A[1], Rahmani Kukia N[2], Abtahi Froushani SM [1*]

[1]Department of Microbiology, Urmia University, Urmia, Iran, [2]Department of Biochemistry, Ardabil University of Medical Sciences, Ardabil, Iran

Received: 27 Jun 2016 Accepted: 19 Aug 2016

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:56 IRST on Monday December 19th 2016

Abstract

Background & aim: Recently, the interaction of lipopolysaccharide activated by mesenchymal stem cells and neutrophils has been proven. The aim of the present study was to evaluate the effect(s) of the Green tea extract, as a widely consumed beverage on the interaction of lipopolysaccharide activated MSCs on neutrophils.

Methods: In the present experimental study, after the isolation of mesenchymal stem cells from bone marrow of rats was conducted, these cells were stimulated with 10 ng/mL LPS for 1. Then, the supernatant was discarded and washed out to remove LPS cells. Afterwards, the cells were incubated with different concentrations of green tea (10, 100 and 500 micrograms per ml) for 24 hours. Subsequently, the mesenchymal stem cells were co-cultured with neutrophils and incubated for other 4 h. Finally, the neutrophil function was evaluated. The data were analyzed by Kruskal wallis test. P values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results: Pro-inflammatory mesenchymal stem cells (Challenged with LPS) caused a decrease in vitality, Neutral Red-uptake and respiratory burst of activated neutrophils. Treatment of pro-inflammatory mesenchymal stem cells with higher concentration of green tea extract potentiated the decrease rate of Neutral Red-uptake and respiratory burst of activated neutrophils. Moreover, the vitality of neutrophils increased in a dose-independent manner by green tea extract.

Conclusion:It seemed that the treatment of mesenchymal stem cells in inflammatory condition with Green tea extract may potentiate the role of mesenchymal stem cells to increase phagocytosis and the respiratory burst of neutrophils cells.

Keywords: Mesenchymal Stem Cell, Lipopolysaccharide, Neutrophil, Green tea extract

[*]**Corresponding author: Abtahi Froushani SM,** Department of Microbiology, Urmia University, Urmia, Iran.
Email: meysamabtahi@hotmail.com

Please cite this article as follows:
Abbasi A, Rahmani Kukia N, Abtahi Froushani SM. The Change in the Functions of Neutrophils after Being Stimulated with LPS-primed Mesenchymal Stem and Treated with Green Tea. Armaghane-danesh 2016; 21 (6): 521-535.

www.SID.ir