

بررسی اثر سلول های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با کافئین بر فعالیت ماکروفاژهای صفاقی رت

نازنین شوشتری<sup>۱</sup>، سید میثم ابطحی فروشانی<sup>۱\*</sup>

(۱) گروه میکروب شناسی، دانشکده دام پزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۲۲

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۱۹

**چکیده**

**مقدمه:** مطالعات قبلی نشان داده است که آدنوزین و گیرنده های آن توسط سلول های بنیادی مزانشیمال (MSCs) تولید می شود. آدنوزین تولید شده نیز به صورت اتو کراین یا پارکراین بر عملکرد بیولوژیک این سلول ها اثر دارد. از طرفی سلول های بنیادی مزانشیمال موجود در بافت ها و یا مغز استخوان دارای ارتباط گسترده ای با سلول های ماکروفاژ است. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی اثرات سلول های بنیادی تیمار شده با کافئین، به عنوان یک آگونیست آدنوزین، بر عملکرد های ماکروفاژهای صفاقی جدا شده از رت ها می باشد.

**مواد و روش ها:** بعد از جداسازی سلول های بنیادی مزانشیمال از مغز استخوان رت ها، این سلول ها با غلظت های مختلف کافئین (۰، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی مولار) به مدت ۴۸ تیمار شد. سپس سلول های بنیادی مزانشیمال با ماکروفاژهای جدا شده از رت ها به مدت ۱ روز مجاورسازی شدند. آن گاه میزان تولید نیتریک اکساید و انفجار تنفسی ماکروفاژها پس از چالش با ان-فرمیل متیونین لوسیل-فنیل الانین (f-MLP) و یا مخمر اپسونیزه مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته های پژوهش:** به نظر می رسد که سلول های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با کافئین و یا بدون تیمار به طور معنی داری موجب کاهش شدت انفجار تنفسی و میزان نیتریک اکساید تولید شده توسط ماکروفاژهای مجاور با آن ها نسبت به ماکروفاژهای تنها پس از تحریک غیر اختصاصی با f-MLP شدند. البته تیمار قبلی سلول های بنیادی مزانشیمال با کافئین موجب کاهش بیشتری در شدت انفجار تنفسی و تولید نیتریک اکساید توسط ماکروفاژهای تحریک شده با f-MLP نسبت به سلول های بنیادی بدون تیمار شد. با این حال قابلیت تولید نیتریک اکساید و انفجار تنفسی در گروه های مختلف پس از مجاورت با مخمر اپسونیزه اختلاف معنی داری را نشان نداد.

**بحث و نتیجه گیری:** در مجموع این یافته ها ممکن است که افق جدیدی را در ارتباط با درک سازوکارهای ضد التهابی و ایمنو مدولاتوری منتسب به کافئین نشان دهد.

**واژه های کلیدی:** سلول بنیادی مزانشیمال، ماکروفاژ، کافئین

\* نویسنده مسئول: گروه میکروب شناسی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

Email: [sm.abtahi@urmi.ac.ir](mailto:sm.abtahi@urmi.ac.ir)

## مقدمه

سلول های بنیادی مزانشیمال (MSCs) گروهی از سلول های استرومای چند توان (Multipotent) هستند که در مغز استخوان و در بسیاری از بافت های دیگر یافت می شوند. این سلول ها قابلیت تمایز به انواع سلول های بافت های مختلف از قبیل استخوان، غضروف، تاندون، بافت چربی و سلول های عضله صاف را دارند (۱، ۲). در کنار این قابلیت، سلول های بنیادی مزانشیمال در تنظیم عملکردهای مختلف سیستم ایمنی نیز نقش مهمی را بازی می کنند. به طور مثال در گزارشات مختلف به مهار تکثیر و عملکرد لنفوسیت های T و B، سلول های کشنده طبیعی (NK) و سلول های دندریتیک (DCs)، توسط سلول های بنیادی مزانشیمال اشاره شده است (۳، ۴). سلول های بنیادی مزانشیمال به دلیل دارا بودن ویژگی های تعدیل کننده ایمنی به صوت بالقوه در جهت تخفیف بیماری های ناشی از پاسخ های التهابی سلول های ایمنی در برخی از بیماری ها از قبیل دیابت نوع ۱، آرتریت روماتوئید و اسکروز متعدد مورد توجه قرار گرفته اند (۵).

ماکروفاژها از جمله مهم ترین سلول ها در آغاز و گسترش پاسخ های ایمنی ذاتی و هم چنین شکل دهی به عملکرد سیستم ایمنی اکتسابی بازی می کنند (۶). برخلاف نوتروفیل ها، ماکروفاژها مراحل پایانی تمایزی را سپری نکرده و هم چنان می توانند در محل التهاب تقسیم سلولی انجام دهند. ماکروفاژها تقریباً با همان سرعتی که نوتروفیل ها به میکروب پاسخ می دهند، عمل می کنند، ولی طول عمر آن ها در جایگاه های التهاب بسیار بیشتر از نوتروفیل ها است. بنابراین ماکروفاژها سلول های اجرایی اصلی در مراحل انتهایی پاسخ ایمنی ذاتی (چند روز پس از شروع عفونت) محسوب می شوند (۷، ۶). ماکروفاژها نقش مهمی را در حفظ هموستاز و ترمیم بافتی از طریق برداشت بقایای سلولی و پاکسازی سلول های آپوپتوتیک بازی می کنند (۸). سلول های بنیادی مزانشیمال در محیط داخلی مغز استخوان و یا در بافت های محیطی در ارتباط نزدیک با سلول های مونوسیت/ماکروفاژ قرار می گیرند (۹، ۱۰). به نظر می رسد که در این محیط سلول

های بنیادی مزانشیمال منجر به مهار تولید سایتوکاین های  $TNF-\alpha$  و  $IL-12$  توسط سلول های ماکروفاژ شده و به طور هم زمان تولید  $IL-10$  توسط ماکروفاژها را افزایش می دهد. به طور متقابل، سایتوکاین ها و مدیاتور های تولید شده توسط این ماکروفاژها موجب افزایش بقاء سلول های بنیادی مزانشیمال می شوند (۹، ۱۰). بنابراین عواملی که عملکرد سلول های بنیادی مزانشیمال را تحت تاثیر قرار دهند ممکن است بر عملکرد متقابل این سلول ها با ماکروفاژها نیز مؤثر واقع شوند.

کافئین یک آلکالوئید از خانواده ی متیل گزانتین ها است که در گیاهان مختلفی از جمله قهوه، کاکائو، کولا و چایی یافت می شود (۱۱، ۱۲). کافئین پرمصرف ترین ماده با قابلیت کاربرد دارویی در میان انسان ها به شمار می رود به طوری که تقریباً ۹۰٪ انسان ها به طور روزانه از آن استفاده می کنند (۱۳). افزایش متابولیسم بدن، تحریک سیستم اعصاب مرکزی و افزایش میزان هوشیاری و آگاهی محیطی از مهم ترین آثار کافئین است (۱۳، ۱۴). کافئین که یکی از پر مصرف ترین مواد با خصلت دارویی است دارای ساختار مشابه با آدنوزین بوده و می تواند به عنوان یک آنتاگونیست رقابتی آدنوزین عمل نماید (۱۳). هم چنین کافئین همچنین به عنوان یک مهارکننده ی فسفودی استراز عمل می نماید (۱۵). گیرنده های آدنوزین در سطح بسیاری از سلول های بدن از قبیل سلول های عصبی، سلول های ایمنی و همچنین سلول های بنیادی مزانشیمال حضور دارند (۱۵، ۱۶). مطالعات قبلی حاکی از آن است که کافئین حتی در غلظت هایی که ناشی از مصرف عادی چای یا قهوه می باشد دارای اثرات ضد التهابی و تعدیل کننده ی ایمنی است (۱۵). با این حال تا کنون اطلاعات قابل توجهی در مورد نقش کافئین در شکل دهی به ارتباط سلول های مزانشیمال و سلول های ماکروفاژ در دسترس نمی باشد. با توجه به مطالب فوق و نظر به مصرف گسترده ی کافئین در پژوهش حاضر اقدام به ارزیابی عملکرد سلول های بنیادی مزانشیمال پس از مواجهه با کافئین بر قابلیت سلول های ماکروفاژ پرداخته خواهد شد.

## مواد و روش ها

در انجام این پژوهش از ۳۰ راس رت های نر نژاد ویستار در محدوده سنی ۶ تا ۸ هفته استفاده شد. تمامی مراحل این تحقیق در کمیته پژوهشی دانشگاه ارومیه مورد تأیید قرار گرفت.

## جدا سازی سلول های بنیادی مزانشیمال:

سلول های بنیادی مزانشیمال از مغز استخوان های تیپیا و فمور رت های نژاد ویستار به روش Zappia و همکاران جداسازی شد (۱۷). بدین منظور پس از بیهوش کردن رت ها (کتامین ۱۰۰ mg/kg و زایلازین ۱۰ mg/kg - شرکت Alfasan، هلند)، با استفاده از قیچی و اسکالپل، استخوان های ران و ساق پا از استخوان لگن رت ها جدا شده و با استفاده از تامپون استریل پوست و ماهیچه اضافی از استخوان ها جدا شد. سپس استخوان ها داخل پتری دیش حاوی محیط کشت استریل قرار داده شد و با تزریق محیط کشت DMEM ساخت (Gibco - انگلستان) به داخل کانال مرکزی استخوان ها سلول های مغز استخوان خارج شدند. سلول های حاصله پس از ۲ بار شستشو، با غلظت  $4 \times 10^5$  سلول به ازای هر سانتی متر مربع به فلاسک های کشت T25 حاوی محیط کشت DMEM و ۱۰ درصد FBS ساخت (Gibco) منتقل شدند. سلول ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و حضور ۵٪ دی اکسید کربن در گرمخانه گرماگذاری شدند، سپس سلول های غیرچسبیده حذف و کشت سلول های چسبیده ادامه یافت. تعویض محیط کشت هر ۲ روز یکبار انجام گرفت و پس از اولین تراکم بیش از ۷۰٪، سلول های چسبیده با استفاده از تریپسین (Sigma) حاوی ۲ درصد EDTA از کف فلاسک جداسازی و جهت پاساژ به فلاسک های بعدی منتقل شدند (۱۷). در این شیوه سلول های بنیادی مزانشیمال بر اساس قابلیت چسبیدن به فلاسک جدا می شوند. با توجه به ماهیت خود تکثیر شوندگی و پاساژ پذیری این سلول ها، در پاساژ سوم تقریباً همه سلول های باقیمانده سلول های بنیادی مزانشیمال خواهند بود (۱۷). پس از پاساژ سوم، سلول های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان با غلظت های غلظت های

متفاوتی از کافئین (۰/۰۱، ۰/۰۵ و ۱ میلی مولار) به مدت ۴۸ ساعت مجاور شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون، مایع رویی سلول ها جمع آوری شده و به دور ریخته شد. پس از شست و شوی سلول های به منظور حذف بقایای کافئین، به سلول ها محیط کشت تازه افزوده شده و به مدت ۲۴ ساعت دیگر انکوبه شدند. در نهایت این سلول ها ترپسینه شده و به منظور مجاورت با سلول های ماکروفاژ استفاده شدند.

## جدا سازی سلول های ماکروفاژ از صفاق موش ها:

به این منظور در ابتدا رت ها به کمک اتر بیهوش شدند. سپس ۸ میلی لیتر PBS استریل سرد به داخل حفره شکمی رت ها تزریق شد. پس از تزریق و ماساژ آهسته به منظور رهايش سلول ها، مایع تزریق شده به کمک پیپت پلاستیکی از صفاق موش مکیده شد. مایع بدست آمده به داخل لوله آزمایش در شرایط روی یخ منتقل شد. سلول ها سه بار با PBS چهار درجه سانتی گراد شستشو داده شدند. پس از شمارش سلول ها (میزان زنده مانی ۹۴ درصد) سوسپانسیون سلولی به تعداد  $10^6$  در هر میلی لیتر در محیط کشت DMEM (تهیه و به چاهک های پلیت های ۲۴ خانه اضافه و به مدت دو ساعت در شرایط ۵٪  $CO_2$ ، انکوبه شد. مایع رویی خارج و چاهک ها سه بار با PBS گرم (۳۷ درجه سانتی گراد) شسته شدند تا سلول های غیر چسبیده حذف شوند. در جمعیت سلول های استحصال شده از شده صفاق در کنار سلول های ماکروفاژ سایر سلول ها از قبیل نوتروفیل ها و لنفوسیت ها نیز حضور دارند که در این تنها سلول های ماکروفاژ هستند که از طریق گیرنده های خود قابلیت اتصال به فلاسک را دارند. بر اساس مطالعات انجام شده بیش از ۹۰ درصد سلول هایی که به کف فلاسک چسبیده باقی می ماندند، ماکروفاژ خواهند بود (۱۹). به منظور جدا سازی سلول های ماکروفاژ از کف پلیت سلول ها با PBS حاوی EDTA (۱۰ mM) و لیدوکائین (۴ mg/ml) به مدت ۱۰ دقیقه مجاور شدند (۱۸).

### کشت همزمان سلول های ماکروفاژ و سلول های بنیادی مزانشیمال:

تعداد  $10^6$  ماکروفاژ زنده در حجم ۵۰۰ میکرو لیتر و  $10^5$  سلول های بنیادی مزانشیمال جدا شده در حجم ۵۰۰ میکرو لیتر در پلیتهای ۲۴ خانه به مدت ۱ روز انکوبه شدند. هم چنین در کلیه آزمایشات به عنوان کنترل از کشت منفرد سلول های ماکروفاژ و سلول های بنیادی مزانشیمال نیز استفاده شد.

### ارزیابی انفجار تنفسی:

پس از چهار روز، ۵۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون مخمر اپسونیزه ( $2 \times 10^7$  سلول در هر میلی لیتر) به همراه ۵۰۰ میکرو لیتر از محلول یک دهم درصد NBT به داخل چاهک های پلیت ۲۴ خانه ریخته شد. در گروه دیگری از چاهک ها، به هر چاهک ۵۰۰ میکرو لیتر از محلول یک دهم درصد NBT به همراه ان-فرمیل متیونین لوسیل-فنیل الانین (f-MLP، سیگما) در غلظت نهایی  $1 \mu\text{M}$  افزوده شد. پلیت های کشت ۲۴ خانه به مدت نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵٪ دی اکسید کربن انکوبه شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون سلول ها سه بار شسته شده و با متانول تثبیت شدند. آن گاه کریستال های فیکس شده فورمازون با افزودن ۱۴۰۰ میکرو لیتر DMSO و ۱۲۰۰ میکرو لیتر KOH دو مولار حل شد. ۲۰۰ میکرو لیتر از محلول برداشت شده و به پلیت ۹۶ خانه تحت تخت منتقل و در طول موج ۶۲۰nm توسط دستگاه الایزا خوان خوانده شدند (۱۹).

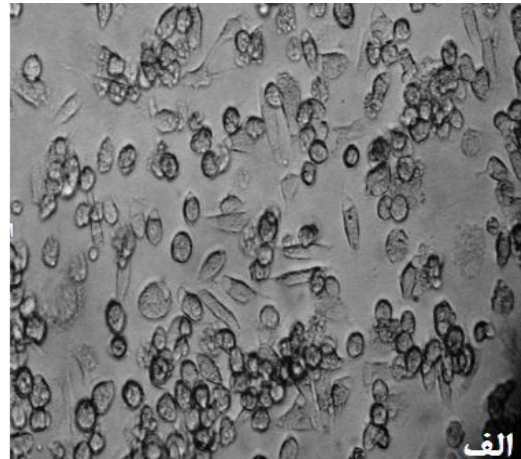
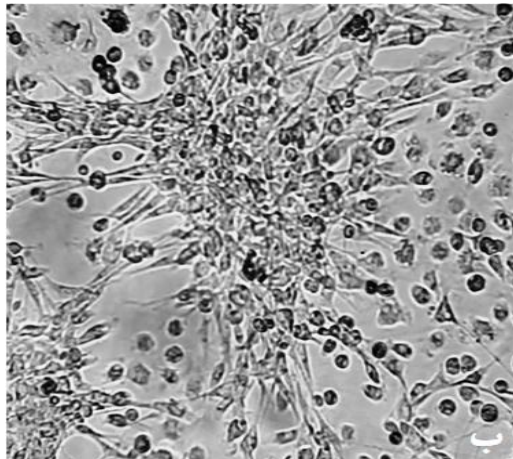
### اندازه گیری میزان تولید نیتریک اکسید:

۵۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون مخمر اپسونیزه ( $2 \times 10^7$  سلول در هر میلی لیتر) و یا به داخل چاهک های پلیت ۲۴ خانه ریخته شد. در گروه دیگری از

چاهک ها، به هر ان-فرمیل متیونین لوسیل-فنیل الانین (fMLP) در غلظت نهایی  $1 \mu\text{M}$  افزوده شد. این سلول ها به مدت ۸۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵٪ دی اکسید کربن انکوبه شدند. میزان تولید نیتریک اکسید توسط روش رنگ سنجی گریس (Griess) و استفاده از منحنی استاندارد نیتریت سدیم تعیین گردید. به طور خلاصه،  $100 \mu\text{L}$  از مایع رویی کشت سلول های نوتروفیل به صورت دوتایی به داخل چاهک های پلت ۹۶ خانه ای ته تخت ریخته شد. سپس  $100 \mu\text{L}$  از محلول ۱ درصد سولفانیل آمید (شرکت Sigma-آمریکا) به چاهک ها اضافه شد. پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی و درجه حرارت اتاق نگاه داری شد. آن گاه به تمام حفره ها  $100 \mu\text{L}$  از محلول ۱ درصد N-۱-نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدرو کلراید (شرکت Sigma) اضافه شد و بار دیگر به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی و درجه حرارت اتاق نگاه داری شد. در نهایت جذب نوری نمونه در طول موج ۵۳۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا نگار قرائت گردید. هم زمان با استفاده از غلظت های مختلف نیتریت سدیم منحنی استاندارد ترسیم شده و از طریق رگرسیون و معادله خطی، غلظت نیتریت موجود در نمونه ها تعیین گردید (۲۰).

### یافته های پژوهش

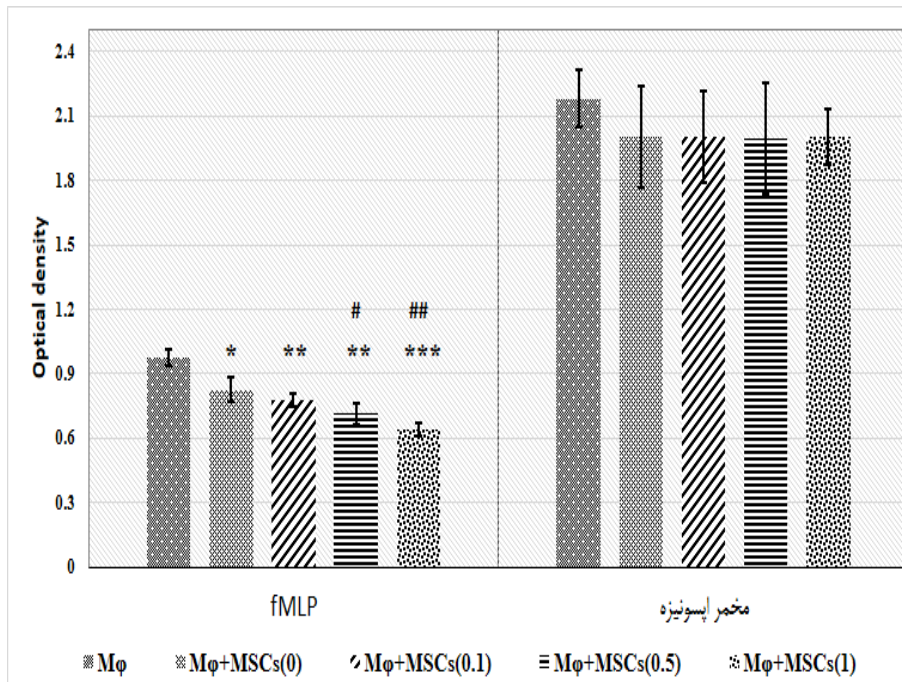
سلول های جدا شده از مغز استخوان پس از کشت دادن در محیط کشت به تدریج کشیده شده و مشابه سلول های فیبروبلاست می گردند. در نهایت از پاساژ سوم سلول های کشت داده شده به عنوان سلول های بنیادی مزانشیمال استفاده شد (شکل ۱).



شکل ۱ - پاساژ سلول های آسپیره شده از مغز استخوان. الف) کشت سلول های مغز استخوان در روز ۵. برخی سلول ها شروع به دوکی شدن کرده اند. ب) تغییر شکل این سلول ها و دوکی شدن سلول ها در روز ۲۱ پس از کشت (بزرگنمایی  $\times 40$ )

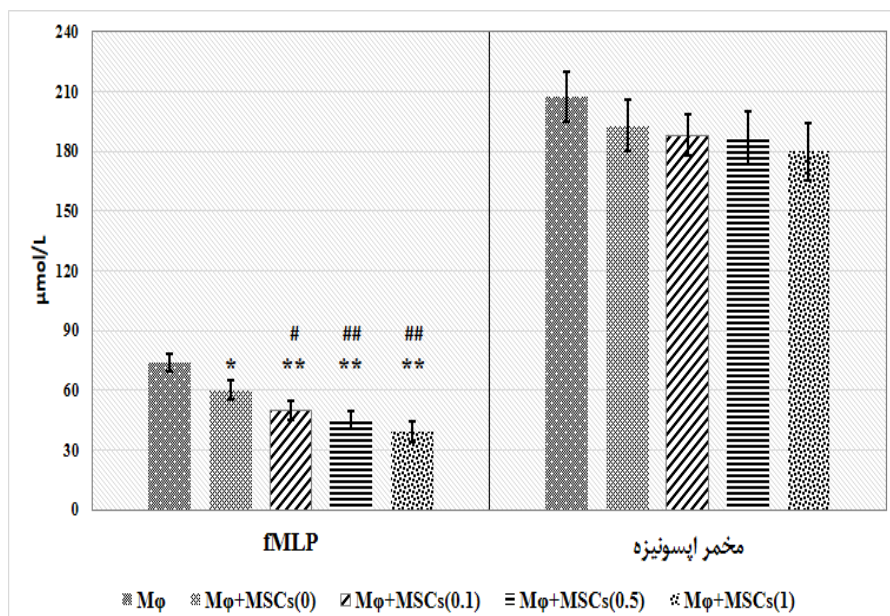
یا ماکروفاژهای مجاور شده با سلول های بنیادی مزانشیمال بدون تیمار نگرديد(نمودار ۱). تست گریس یک ارزیابی کلی از میزان تولید نیتريك اكساید ( واسطه فعال نیتروژن) توسط ماکروفاژها را ارائه می دهد. با توجه به حضور نیتريك اكساید به عنوان جزئی از عوامل مترشحه سلول های بنیادی مزانشیمال در هر تکرار آزمایش میزان نیتريك اكساید مایع رویی در کشت منفرد سلول های بنیادی مزانشیمال محاسبه و از میزان نیتريك اكساید محاسبه شده در کشت هم زمان ماکروفاژ ها و سلول های بنیادی مزانشیمال کسر گردید. نتایج حاصله نشان داد که تحریک سلول های ماکروفاژ با fMLP موجب کاهش معنی دار در قابلیت تولید نیتريك اكساید در ماکروفاژ های مجاور شده با سلول های بنیادی مزانشیمال بدون تیمار و یا تیمار شده با کافئین گردید (نمودار ۲). البته به نظر می رسد که مجاورت قبلی سلول های بنیادی مزانشیمال با کافئین به میزان ۰/۱ میلی مولار و بیشتر به طور معنی داری موجب کاهش بیشتری در تولید نیتريك اكساید توسط ماکروفاژ ها پس از تحریک با fMLP در قیاس با سلول های بنیادی مزانشیمال بدون تیمار می شود(نمودار ۲). در این جا نیز سلول های سلول های بنیادی مزانشیمال بدون تیمار و یا تیمار شده با کافئین اثر معنی داری بر قابلیت تولید نیتريك اكساید توسط ماکروفاژ های چالش شده با مخمر اپسونیزه را نداشتند(نمودار ۲).

آزمون احیای NBT به منظور ارزیابی قابلیت انفجار تنفسی (تولید واسطه های فعال اكسیژن) توسط ماکروفاژها را صورت گرفت. همان طور که انتظار می رفت انفجار تنفسی به دنبال تحریک با fMLP از ویژگی های سلول های فاگوسیتیک از قبیل ماکروفاژها بوده و توسط سلول های MSC صورت نگرفت. نتایج حاصل از تحریک سلول های ماکروفاژ با fMLP نشان دهنده کاهش معنی دار قابلیت انفجار تنفسی در سلول های ماکروفاژ مجاور شده با سلول های بنیادی مزانشیمال بدون تیمار نسبت به سلول های ماکروفاژ تنها بود (نمودار ۱). تیمار سلول های بنیادی مزانشیمال با کافئین نیز به طور معنی داری منجر به کاهش قابلیت انفجار تنفسی سلول های ماکروفاژ مجاور شده با سلول های بنیادی مزانشیمال نسبت به سلول های ماکروفاژ شد. البته شدت کاهش انفجار تنفسی در سلول های ماکروفاژ مجاور شده با سلول های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با کافئین در میزان ۰/۵ میلی مولار و بیشتر نسبت به گروه سلول های ماکروفاژ مجاور شده با سلول های مزانشیمال بدون تیمار به طور معنی داری بیشتر بود(نمودار ۱). با این وجود زمانی که سلول های ماکروفاژ مجاور شده با سلول های بنیادی مزانشیمال با مخمر اپسونیزه چالش شدند، تغییر معنی داری در قابلیت انفجار تنفسی این سلول ها مشاهده نشد. تیمار قبلی سلول های بنیادی مزانشیمال با کافئین نیز موجب تغییر معنی داری در انفجار تنفسی ماکروفاژ های مجاور شده نسبت به ماکروفاژ های تنها



نمودار ۱- ارزیابی قابلیت انفجار تنفسی سلول های ماکروفاژ مجاور شده با سلول های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با غلظت های متفاوت کافئین (\*، \*\*، و ### به ترتیب نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح  $p < 0.05$ ،  $p < 0.01$  و  $p < 0.001$  نسبت به گروه N می باشد. # و ## نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح  $p < 0.01$  و  $p < 0.001$  نسبت به گروه Mφ + MSCs(0) می باشد).

Mφ: ماکروفاژهای تنها، Mφ + MSCs: ماکروفاژهای مجاور شده با سلول های بنیادی مزانشیمال. اعداد داخل پرانتز نشان دهنده غلظت کافئین بر حسب میلی مولار است.



نمودار ۲- ارزیابی تولید نیتریک اکساید سلول های ماکروفاژ مجاور شده با سلول های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با غلظت های متفاوت کافئین (\*، \*\*، و ### به ترتیب نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح  $p < 0.05$ ،  $p < 0.01$  و  $p < 0.001$  نسبت به گروه N می باشد. #، ## و ### نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح  $p < 0.05$ ،  $p < 0.01$  و  $p < 0.001$  نسبت به گروه Mφ + MSCs(0) می باشد. Mφ: ماکروفاژهای تنها، Mφ + MSCs: ماکروفاژهای مجاور شده با سلول های بنیادی مزانشیمال. اعداد داخل پرانتز نشان دهنده غلظت کافئین بر حسب میلی مولار است.



## بحث و نتیجه گیری

مهم ترین فاکتور های سرکوب کننده ایمنی سلول های بنیادی مزانشیمال شامل برخی از مولکول های مهاری بیان شده در سطح آن ها ( از قبیل: TGF- $\beta$ ، PDL1، HLA-G،  $\beta$  و Galectins )، برخی سایتوکاین های ضد التهابی (از قبیل: IL-10 و TGF- $\beta$ )، برخی متابولیت ها (از قبیل: نیتریک اکساید، IDO و پروستاگلاندین ها) و برخی از آنزیم های مهارکننده (از قبیل: ماتریکس متالو پروتینازها) می باشند که به صورت پارا کرین و یا تماس مستقیم سلول به سلول اثرات خود را ایجاد می کنند (۲۱). به نظر می رسد که عملکرد سلول های بنیادی مزانشیمال توسط سیگنال های متعددی تنظیم می شود (۲۲، ۲۳). به طور جالب توجهی مطالعات قبلی نشان داده اند که هر چهار نوع گیرنده های آدنوزین (A1R، A2AR، A2BR و A3R) در سطح سلول های مزانشیمال حضور دارند. از طرفی خود سلول های بنیادی مزانشیمال قادر به ساخت و آزاد سازی آدنوزین می باشند. بنابراین به نظر می رسد که تولید اتوکراین آدنوزین اثر مهمی بر روند رشد و تمایز سلول های بنیادی مزانشیمال داشته باشد (۲۴، ۲۵). گیرنده A2B غالب در سطح سلول های بنیادی مزانشیمال است که میزان بیان آن در مراحل اولیه تمایز این سلول ها به استخوان افزایش می یابد. در مراحل نهایی تمایز این سلول ها به استخوان سطح گیرنده A2A افزایش قابل توجهی را نشان می دهد (۲۵). از طرفی به نظر می رسد که افزایش بیان گیرنده های A1 و A2A نقش مهمی در تمایز این سلول ها به بافت چربی بازی می کند (۲۵). مطالعات قبلی نشان داده است که کافئین در غلظت های در محدوده ۰/۱ میلی مولار از طریق مهار گیرنده های آدنوزینی منجر به افزایش تمایز سلول های مزانشیمال به بافت استخوانی می گردد، غلظت های بالاتر از ۰/۳ میلی مولار به طور معکوس تمایز این سلول ها را از طریق افزایش سطح PMAC به بافت استخوانی کاهش می دهد (۱۳).

سلول های ماکروفاژ جمعیت یکنواخت و یک دستی نبوده و به طور قابل توجهی متنوع می باشند (۲۶، ۱۰، ۹). این سلول ها بر اساس عوامل موجود در محیط اطرافی خود قادر به برنامه ریزی و تبدیل به سلول -

هایی با عملکرد متفاوت می باشند. به طور ساده سلول های ماکروفاژ فعال شده از طریق کلاسیک یا ماکروفاژهای M1 دارای خاصیت التهابی قوی بوده و در حذف عفونت های داخل سلولی نقش مهمی را بازی می کنند. از طرفی به دلیل قابلیت های التهابی قادر به مشارکت در ایجاد آسیب های بافتی میباشند به طوری که ماکروفاژ های M1 به عنوان سلول های اجرایی اصلی در بیماری های خود ایمن اختصاصی بافت عمل می کنند. ماکروفاژ های M2 یا ماکروفاژهای فعال شده به روش جایگزین به میزان کمتری سایتوکین های التهابی تولید کرده و عمدتاً نقش مهمی را در اختتام التهاب و ترمیم بافتی از طریق تولید فاکتور های تروفیک بازی میکنند (۲۶، ۱۰). به نظر می رسد که سلول های مزانشیمال نقش بسیار مهمی در پلاریزه کردن عملکرد سلول های ماکروفاژ برعهده دارند. مطالعات قبلی نشان داده اند که کشت هم زمان سلول های ماکروفاژ با سلول های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان موش موجب افزایش درصد ماکروفاژهای M2 در مقایسه با ماکروفاژ های M1 می گردد (۱۵). سلول های ماکروفاژ مجاور شده با سلول های بنیادی مزانشیمال در پاسخ به تحریک با لپو پلی ساکراید سطح بالاتری از سایتوکاین های ضد التهابی اینترلوکین های ۱۰ و ۴ را بیان کرده و در عوض میزان کمتری از اینترلوکین ۱۲ را تولید می کنند (۱۰).

سلول های ماکروفاژ سطح بالایی از پروتئازها و رادیکال های آزاد اکسیژن و نیتروژن را تولید می کنند. این واسطه ها نقش مهمی را در حذف عوامل بیماری زا بازی می کنند (۱۰). با این حال زمانی که میزان تولید این رادیکال ها بیش از حد باشد و یا تولید آن ها در شرایط نامناسب صورت گیرد، این رادیکال های آزاد منجر به ایجاد و گسترش آسیب های بافتی خواهند شد (۲۷). تولید رادیکال های آزاد توسط سلول های ماکروفاژ در اثر تحریکات مختلفی از قبیل فاگوسیتوز مؤثر عوامل میکروبی اپسونیزه شده و یا برخی از سایتوکاین ها و مدیاتورهای آزاد شده به دنبال آسیب بافتی یا تنظیم نامناسب ایمنی صورت می پذیرد (۲۸).

در مطالعه ی حاضر، به منظور ارزیابی میزان تولید غیر اختصاصی ( در شرایط عدم حضور عامل عفونی)

رادیکال های آزاد اکسیژن و نیتروژن و بازسازی شرایط ایمنو پاتولوژیک توسط سلول های ماکروفاژ از ترکیب ان-فورمیل متیونین لوسین فنیل آلانین استفاده شد. نتایج ما نشان دادند که سلول های مزانشیمال قادر به کاهش معنی دار تولید رادیکال های آزاد اکسیژن توسط سلول های ماکروفاژ می باشند. به نحو قابل توجهی تیمار سلول های مزانشیمال با کافئین منجر به کاهش بیشتر در تولید این رادیکال های آزاد توسط سلول های ماکروفاژ می شود.

اما نتایج حاصل از تست تولید رادیکال های آزاد اکسیژن و نیتروژن توسط ماکروفاژها پس از چالش با یک عامل میکروبی همانند مخمر اپسونیزه نشان داد که هیچ گونه تفاوت معنی داری در تولید رادیکال های آزاد اکسیژن و نیتروژن بین سلول های ماکروفاژ بدون تیمار با سلول های ماکروفاژ مجاور با سلول های بنیادی مزانشیمال و یا ماکروفاژهای مجاور با سلول های مزانشیمال تیمار شده با کافئین وجود ندارد. بنابراین به نظر می رسد که سلول های بنیادی مزانشیمال قادر به مهار تولید رادیکال های آزاد اکسیژن بالقوه آسیب رسان بوده در حالی که بر قابلیت سلول های ماکروفاژ در چالش با یک عفونت واقعی، اختلالی ایجاد نمی کند. هم چنین بنظر می رسد که کافئین موجب افزایش قابلیت مهاری سلول های مزانشیمال روی تولید رادیکال های آزاد اکسیژن و نیتروژن در شرایط تحریک غیر اختصاصی می گردد. به هر حال در مطالعات ما کافئین با دوزهایی که استفاده شد منجر به کاهش قابلیت ماکروفاژها در دفاع مؤثر علیه یک عفونت واقعی نگردید. یک عامل عفونی حاوی تعداد زیادی از الگو های ملکولی متفاوت با میزبان از قبیل اجزای دیواره سلولی می باشد (۲۹). سلولهای فاگوسیتیک از قبیل ماکروفاژها، جهت برداشت و نابود سازی میکروارگانیسمهای از گیرنده های شناسایی گر الگو (مثل گیرنده های شبه Toll) و گیرنده های اپسونیک (مثل گیرنده های مربوط به بخش FC ایمنو گلوبولین و گیرنده های کمپلمان) استفاده می کنند (۲۹). براساس نتایج این تحقیق به نظر می رسد که با وجودی که سلول های بنیادی مزانشیمال دارای اثرات کاهنده در تولید رادیکال های

اکسیژن و نیتروژن توسط ماکروفاژها پس از یک تحریک غیر اختصاصی (مواجه با fMLP) می باشند، ولی در صورت مواجه ماکروفاژ با یک میکروارگانیسم اپسونیزه به دلیل ارسال پیامهای قوی از طریق از گیرنده های شناسایی گر الگو و گیرنده های اپسونیک بر ساز و کارهای مهاری القا شده توسط سلول های بنیادی مزانشیمال فائق خواهد شد. در شرایط واقعی هم تا کنون گزارشاتی دال بر افزایش میزان عفونت در افراد تحت درمان با سلول های بنیادی مزانشیمال در دسترس نیست. از طرفی نتایج این تحقیق نشان داد که با وجودی که کافئین ممکن است ایجاد یک فنوتیپ ضد التهابی در ماکروفاژهای مجاور شده با MSCsها در شرایط تحریک غیر اختصاصی تشویق کند، قادر به کاهش قابلیت ماکروفاژها را در دفاع علیه عوامل عفونی از قبیل مخمر اپسونیزه، نیست. در این جا نیز به نظر می رسد که پس از شناسایی عامل عفونی توسط ماکروفاژها، به دلیل ارسال پیام های قوی از طریق از گیرنده های شناسایی گر الگو و گیرنده های اپسونیک ماکروفاژها، پیامهای ضد التهابی القا شده توسط سلول های بنیادی مزانشیمال تحت تیمار با کافئین مهار خواهد شد. به نحو قابل توجهی در شرایط واقعی هم گزارشات قابل اعتمادی از افزایش حساسیت به عفونت ها در افرادی که میزان زیادتری از نوشیدنی های کافئینی را مصرف می کنند، وجود ندارد. به هر حال یافتن سازو کارهای دقیق این یافته ها نیازمند تحقیقات بیشتر است.

مطالعات قبلی حاکی از آن است که کافئین حتی در غلظت هایی که ناشی از مصرف عادی چای یا قهوه می باشد دارای اثرات ضد التهابی و تعدیل کننده ایمنی است (۱۵). تاکنون عمدتاً اثرات تعدیل کننده ایمنی کافئین بر اساس اثر مستقیم کافئین بر روی گیرنده های آدنوزینی موجود در سطح سلول های ایمنی و یا سلول های آندوتلیال توجیه شده است (۳۰). یافته های ما ممکن است که ساز و کار جدیدی در رابطه با اثرات ضد التهابی کافئین نشان دهد. بر این اساس به نظر می رسد که کافئین موجب تقویت عملکرد سلول های مزانشیمال در ایجاد ماکروفاژهای ضد التهابی به دنبال محرک های غیر اختصاصی می



گردد، بدون آن که قابلیت این سلول ها را در دفاع علیه عفونت های واقعی کاهش دهد. با این حال این مطالعه تنها یک مطالعه ی مقدماتی بوده و لازم است مطالعات بیشتری بر روی تأثیر کافئین بر عملکرد متقابل سلول های بنیادی مزانشیمال و سایر سلول های ایمنی و سلول های آندوتلیال در شرایط *in vivo* و *in vitro* صورت گیرد.

### سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه نازنین شوشتری جهت دریافت مدرک دکتری عمومی دامپزشکی به شماره شماره ۱۳۹۵ می باشد.

### Reference

1. Bang OY. Comparing the immunomodulatory properties of bone marrow, adipose tissue, and birth-associated tissue mesenchymal stromal cells. *Front Immunol* 2015; 6:560.
2. Konala VB, Mamidi MK, Bhonde R, Das AK, Pochampally R, Pal R. The current landscape of mesenchymal stromal cell secretome a new paradigm for cell-free regeneration. *Cytotherapy* 2015; 15: 1101-1109.
3. Cortinovis M, Casiraghi F, Remuzzi G, Perico N. Mesenchymal stromal cells to control donor-specific memory T cells in solid organ transplantation. *Curr Opin Org Transplant* 2015; 20:79-85.
4. Ho MS, Mei SH, Stewart DJ. The immunomodulatory and therapeutic effects of mesenchymal stromal cells for acute lung injury and sepsis. *J Cell Physiol* 2015; 230:2606-17.
5. Fierabracci A, Del Fattore A, Luciano R, Muraca M, Teti A, Muraca M. Recent advances in mesenchymal stem cell immunomodulation: the role of microvesicles. *Cell Transplant* 2015; 24:133-49.
6. Porta C, Riboldi E, Ippolito A, Sica A. Molecular and epigenetic basis of macrophage polarized activation. *Sem Immunol* 2015; 27:237-48.
7. Sang Y, Miller LC, Blecha F. Macrophage polarization in virus host interactions. *J Clin Cell Immunol* 2015; 6:236-247.
8. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation time for reassessment. *Prime Rep* 2014; 6:13-8.
9. Cho DI, Kim MR, Jeong HY, Jeong HC, Jeong MH, Yoon SH, et al. Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. *Exp Mol Med* 2014; 46:e70.
10. Kim J, Hematti P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp Hematol* 2009; 37:1445-53.
11. Matissek R. Evaluation of xanthine derivatives in chocolate – nutritional and chemical aspects. *Z Lebensm Unters Forsch* 1997; 205:175-84.
12. Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehlig A, Zwartau EE. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacol Rev* 1999; 51:83-133.
13. Su SJ, Chang KL, Su SH, Yeh YT, Shyu HW, Chen KM. Caffeine regulates osteogenic differentiation and mineralization of primary adipose derived stem cells and a bone marrow stromal cell line. *Int J Food Sci Nutr* 2013; 64:429-36.
14. Schubert MM, Hall S, Leveritt M, Grant G, Sabapathy S, Desbrow B. Caffeine consumption around an exercise bout: effects on energy expenditure, energy intake, and exercise enjoyment. *J Appl Physiol* 2014; 117:745-54.
15. Horrigan LA, Kelly JP, Connor TJ. Immunomodulatory effects of caffeine: friend or foe? *Pharmacol Ther* 2006; 111:877-92.

16. Horrigan LA, Kelly JP, Connor TJ. Caffeine suppresses TNF-alpha production via activation of the cyclic AMP/protein kinase A pathway. *Int Immunopharm* 2004;4:1409-17.
17. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Geroni E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 2005;106:1755-61.
18. Peiser L, Gordon S, Haworth R. Isolation of and measuring the function of professional phagocytes Murine macrophages. Academic Publication. 2002;P. 331-58.
19. Shrivastava A. Activation of macrophages with N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine: involvement of protein kinase C and tyrosine kinase. *Indian J Exp Biol* 2007;45:755-63.
20. Sodhi A, Biswas SK. FMLP-induced in vitro nitric oxide production and its regulation in murine peritoneal macrophages. *J Leuk Biol* 2002;71:262-70.
21. Sun Z, Li T, Wen H, Wang H, Ji W, Ma Y. Immunological effect induced by mesenchymal stem cells in a rat liver transplantation model. *Exp Ther Med* 2015;10:401-6.
22. Esmailigouvarchingaleh H, Delirez N, Abtahifroushani SM, Afzalehangaran N. Calcitriol modulates the effects of the supernatants of bone marrow derived mesenchymal stem cells on neutrophil functions. *Turk J Biol* 2014;38:365-70.
23. Hoogduijn MJ, Cheng A, Genever PG. Functional nicotinic and muscarinic receptors on mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 2009;18:103-12.
24. Katebi M, Soleimani M, Cronstein BN. Adenosine A2A receptors play an active role in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cell development. *J Leuk Biol* 2009;85:438-44.
25. Gharibi B, Abraham AA, Ham J, Evans BA. Adenosine receptor subtype expression and activation influence the differentiation of mesenchymal stem cells to osteoblasts and adipocytes. *J Bone Min Res* 2011;26:2112-24.
26. Italiani P, Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages phenotypical vs functional differentiation. *Front Immunol* 2014;5:514.
27. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 2000;109:33-44.
28. 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;26:151-62.
29. Tolle LB, Standiford TJ. Danger associated molecular patterns in acute lung injury. *J Pathol* 2013;229:145-56.
30. Senchina DS, Hallam JE, Kohut ML, Nguyen NA, Perera MA. Alkaloids and athlete immune function caffeine theophylline gingerol ephedrine and their congeners. *Exe Immunol Rev* 2014;20:68-93.

## Evaluation of the Effect of Mesenchymal Stem Cells pulsed with Caffeine on the Function of the Peritoneal Macrophages of Rat

Shushtari N<sup>1</sup>, Abtahi Froushani M<sup>1\*</sup>

(Received: January 9, 2016 Accepted: June 11, 2016)

### Abstract

**Introduction:** Pervious studies indicated that the mesenchymal stem cells (MSCs) produce adenosine and express adenosine receptors. Moreover, produced adenosine has biological effect on these cells. On the other hand, MSCs have a wide relationship with macrophages in tissues and bone marrow. The aim of the present study was to determine the effects of the MSCs treated with caffeine, as an adenosine antagonist, on the peritoneal macrophages isolated from rats.

**Materials & methods:** After isolation of mesenchymal stem cells from bone marrow of rats, these cells pulsed with different concentration of caffeine (0, 0.1, 0.5 and 1 mM) for 48h. Then, MSCs were co-cultured with macrophages for 1 day. Then, the level of nitric oxide production and respiratory burst of macrophages after challenge with N-formylmethionine-leucyl-phenylalanine (f-MLP) or opsonized yeast were evaluated.

**Findings:** It seems that MSCs pulsed with caffeine or without it could significantly decrease the respiratory burst and nitric oxide production of co-cultured macrophages more prominent than macrophages alone after unspecific challenged with fMLP. Although, pervious treatment of MSCs with caffeine could decrease the respiratory burst and nitric oxide production of macrophages challenged with f-MLP more prominent than MSCs without treatment. However, the potential of nitric oxide production and respiratory burst of various group after challenge with opsonized yeast didn't show any significant differences.

**Discussion & conclusions:** Collectively, these data may offer new insight into the potential mechanisms underlying the immunomodulatory and anti-inflammatory effects of caffeine.

**Keywords:** Mesenchymal Stem Cell, Macrophage, Caffeine

1. Dept of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

\*Corresponding author E-mail: sm.abtahi@urmia.ac.ir