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

نازنین شوشتری[1]، سید میثم ابطحی فروشانی[1*]

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

تاریخ دریافت: ۹٤/۱۰/۱۹ تاریخ پذیرش:۹۵/۳/۲۲

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 آنت آگونیست آدنوزین ،بر عملکرد های ماکروفاژ های 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 مزانشیمی با ماکروفاژ های جدا شده از رت ها به مدت ۱ روز مجاورسازی شدند . آن گاه میزان تولید نیتریک اکساید و انفجار تنفسی ماکروفاژ ها 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 ماکروفاژ های مجاور با آن ها نسبت به ماکروفاژ های 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 ماکروفاژ های 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 معنا 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 ایمونو 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@urmia.ac.ir

Copyright © 2017 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.12]

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 سلول‌های بافت های مختلف از قبیل استخوان، غضروف، تاندون، بافت چربی و سلول های عضله صاف را دارند (۱، ۲). در کنار این قابلیت، سلول‌های بنیادی مزانشیمال در تنظیم عملکردهای مختلف سیستم ایمنی نیز نقش مهمی را بازی می‌کنند. به طور مثال در گزارشات مختلف به مهار تکثیر و عملکرد لنفوسیت‌های T و B ، سلول‌های کشنده طبیعی (NK) و سلول های دندریتیک(DCs)، توسط سلولهای 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 بیماری‌ها از قبیل دیابت نوع۱، آرتریت روماتوئید و اسکلروز متعدد مورد توجه قرار گفته اند(۵).

ماکروفاژها ازجمله مهم ترین سلول ها در آغاز و گسترش پاسخ های ایمنی ذاتی و هم چنین شکل دهی به عملکرد سیستم ایمنی اکتسابی بازی می‌کنند (۶). برخلاف نوتروفیل ها، ماکروفاژها مراحل پایانی تمایزی را سپری نکرده و هم چنان می توانند در محل التهاب تقسیم سلولی انجام دهند. ماکروفاژها تقریبا با همان سرعتی که نوتروفیل ها به میکروب پاسخ می‌دهند، عمل می‌کنند، ولی طول عمر آن ها در جایگاه های التهاب بسیار بیشتر از نوتروفیل ها است. بنابرین ماکروفاژها سلول های اجرایی اصلی در مراحل انتهایی پاسخ ایمنی ذاتی (چند روز پس از شروع عفونت) محسوب می‌شوند(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(۱۰، ۹). به نظر می‌رسد که در این محیط سلول های بنیادی مزانشیمال منجر به مهار تولید سایتوکاین های TNF-α و IL-12 توسط سلول های ماکروفاژ شده و به طور هم زمان تولید IL-10 توسط ماکروفاژها را افزایش می‌دهد. به طور متقابل، سایتوکاین ها و مدیاتور های تولید شده توسط این ماکروفاژها موجب افزایش بقاء سلول های بنیادی مزانشیمال می‌شوند (۱۰، ۹). بنابرین 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 گزانتین‌ها است که در گیاهان مختلفی از جمله قهوه، کاکائو، کولا و چایی یافت می‌شود(۱۱، ۱۲). کافئین پرمصرف ترین ماده با قابلیت کاربرد دارویی در میان انسان‌ها به شمار می‌رود به طوری که تقریبا ۹۰٪ انسان ها به طور روزانه از آن استفاده می‌کنند(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 می‌تواند 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 درسطح 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 می‌باشد 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 سلول‌های مزانشیمال و سلول های ماکروفاژ در دسترس نمی‌باشد. 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:

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.12]

در انجام این پژوهش از ۳۰ راس رت‌های 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 تیبیا و فمور رت های نژاد ویستار به روش Zappia و همکاران جداسازی شد(۱۷). بدین منظور پس از بیهوش کردن رت ها (کتامین ۱۰۰mg/kgو زایلازین ۱۰mg/kg–شرکت Alfasan ،هلند)، با استفاده از قیچی و اسکالپل، استخوان های ران و ساق پا از استخوان لگن رت‌ها 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 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) منتقل شدند. سلول ها به مدت۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و حضور ۵٪ دی اکسیدکربن در گرمخانه گرماگذاری شدند، سپس سلول های غیرچسبنده حذف و کشت سلول های چسبنده ادامه یافت. تعویض محیط کشت هر ۲ روز یک‌بار انجام گرفت و پس از اولین تراکم بیش از ۷۰٪، سلول های چسبنده 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 می‌شوند. با توجه به ماهیت خود تکثیر شوندگی و پاساژ پذیری این سلول ها، در پاساژ سوم تقریبا همه سلول های باقیمانده سلول های بنیادی مزانشمال خواهند بود(۱۷). پس از پاساژ سوم، سلول های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان با غلظت های غلظت های متفاوتی از کافئین (۰/۰،۰/۱، ۰/۵ 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 لیترPBS استریل سرد به داخل حفره شکمی رت ها تزریق شد. پس از تزریق و ماساژ آهسته به منظور رهایش 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 $۱۰^{۶}$ در هر میلی لیتر در محیط کشت DMEM (تهیه و به چاهک های پلیت های۲۴خانه اضافه و به مدت دو ساعت در شرایط ۵٪ ،Co2 انکوبه شد. مایع رویی خارج و چاهک ها سه بار با PBS گرم (۳۷ درجه سانتی گراد) شسته شدند تا سلول های غیر چسبنده 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 گیرنده‌های خود قابلیت اتصال به فلاسک را دارند. بر اساس مطالعات انجام شده بیش از ۹۰ درصد سلول هایی که به کف فلاسک چسبیده باقی می‌مانند، 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 $۱۰^{۶}$ ماکروفاژ زنده در حجم ۵۰۰ میکرو لیتر و $۱۰^{۵}$ سلول های بنیادی مزانشیمال جدا شده در حجم

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.12]

۵۰۰ میکرولیتر 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:

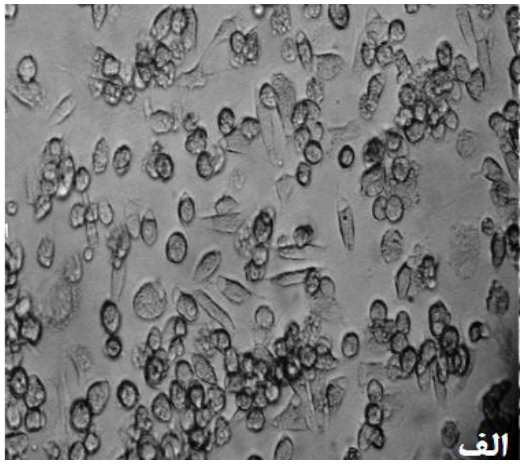
پس از چهار روز، ۵۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون مخمر اپسونیزه (۲×۱۰^{۷} سلول در هر میلی لیتر) به همراه ۵۰۰ میکرو لیتر از محلول یک دهم درصد NBT به داخل چاهک های پلیت ۲۴ خانه ریخته شد. در گروه دیگری از چاهک ها ، به هر چاهک۵۰۰ میکرولیتر از محلول یک دهم درصد NBT به همراه ان–فرمیل متیونین لوسیل–فنیل الانین (f-MLP، سیگما) در غلظت نهایی ۱ µM 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 میکلرولیتر 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).

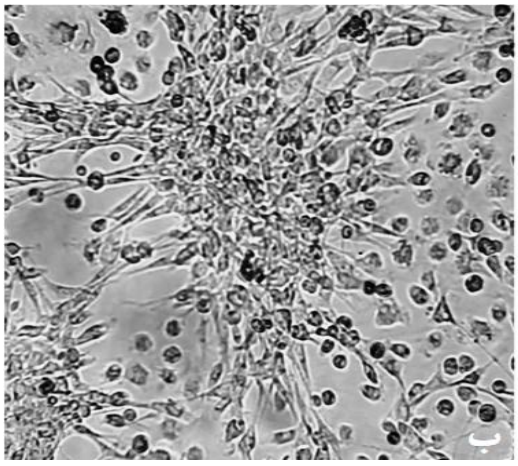
اندازه گیری میزان تولید نیتریک اکسید:

۵۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون مخمر اپسونیزه (۲×۱۰^{۷} 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 ۱ µM افزوده شد. این سلول ها به مدت۰ ۸ 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، ۱۰۰µL از مایع رویی کشت سلول‌های نوتروفیل به صورت دوتایی به داخل چاهک های پلت ۹۶ خانه‌ای ته تخت ریخته شد.سپس ۱۰۰ µL از محلول۱ 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 حفره‌ها ۱۰۰µL از محلول ۱ درصد N–۱–۱نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدرو کلراید(شرکت Sigma) اضافه شد و بار دیگر به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی و درجه حرارت اتاق نگه 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 نمونه‌ها 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 می‌گردند. در نهایت از پاساژ سوم سلول های کشت داده شده به عنوان سلول های بنیادی مزاشیمال استفاده شد (شکل۱).





[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.12]

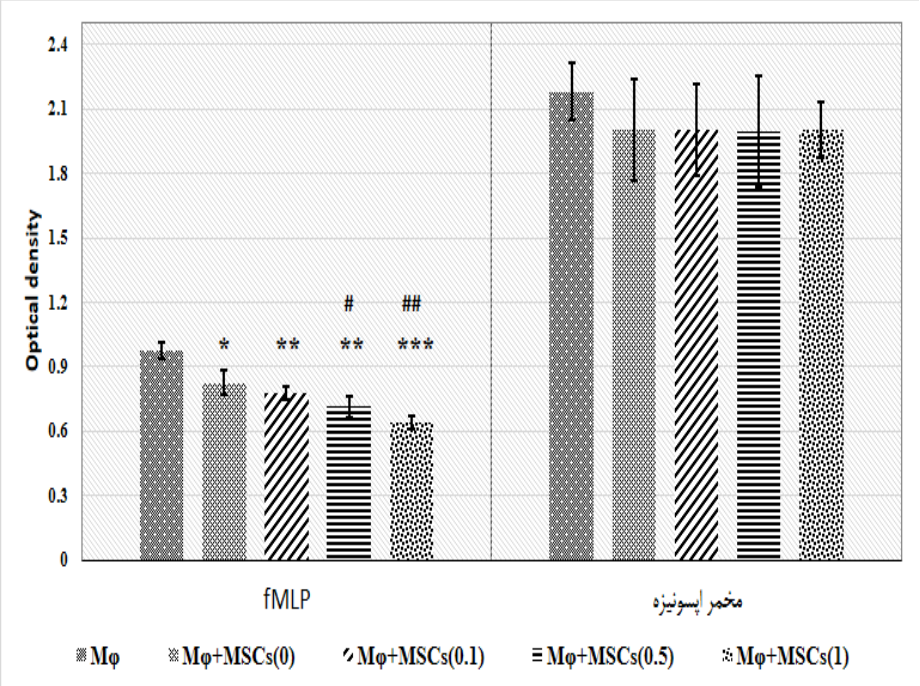
شکل ۱ - پاساژ سلول های آسپیره شده از مغز استخوان. الف) کشت سلول های مغز استخوان در روز ۵. برخی ا سلول ها شروع به دوکی شدن کرده‌اند. ب) تغییر شکل این سلول ها و دوکی شدن سلول ها در روز ۲۱ پس از کشت(بزرگنمایی×۴۰)

آزمون احیای NBT به منظور ارزیابی قابلیت انفجار تنفسی (تولید واسطه های فعال اکسیژن) 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 سلول‌های 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(نمودار۱). 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 یا ماکروفاژهای مجاور شده با سلول های بنیادی مزانشیمال بدون تیمار نگردید(نمودار۱).

تست گریس یک ارزیابی کلی از میزان تولید نیتریک اکساید (واسطه فعال نیتروژن) توسط ماکروفاژها را ارائه می‌دهد. با توجه به حضور نیتریک اکساید به عنوان جزئی از عوامل مترشحه سلول های بنیادی مزانشیمال در هر تکرار آزمایش میزان نیتریک اکساید مایع رویی در کشت منفرد سلول های بنیادی مزانشیمال محاسبه و از میزان نیتریک اکساید 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 نیتریک اکساید در ماکروفاژ های مجاور شده با سلول های بنیادی مزانشیمال بدون تیمار و یا تیمار شده با کافئین گردید (نمودار ۲). البته به نظر می‌رسد 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 نیتریک اکساید 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 نیتریک اکساید توسط ماکروفاژ های چالش شده با مخمر اپسونیزه را نداشتند(نمودار ۲).

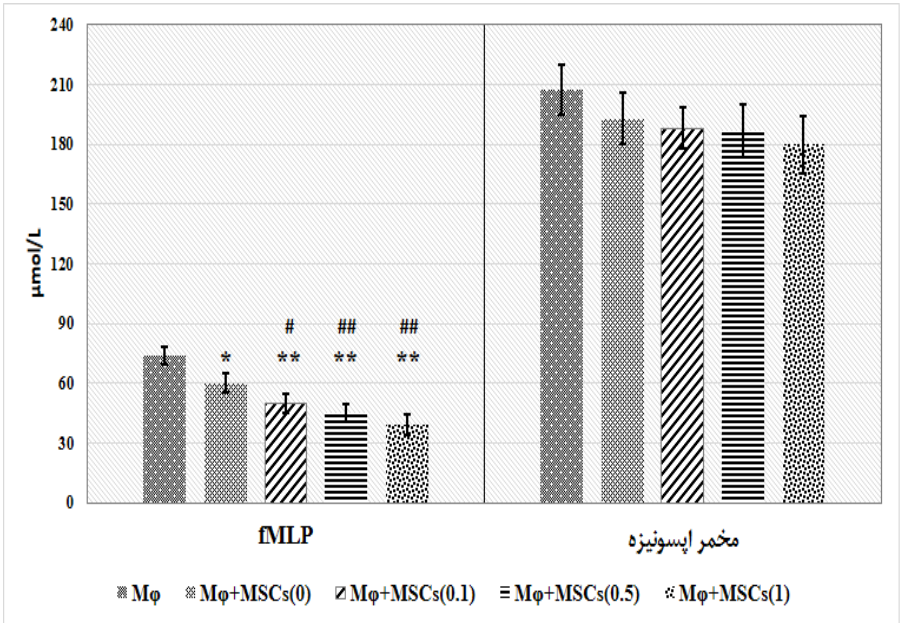
[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.12]



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<۰/۰۵ ، p<۰/۰۱ و p<۰/۰۰۱ نسبت به گروه N می‌باشد. # و ## نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح p<۰/۰۱ و p<۰/۰۰۱نسبت 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 سلول‌های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با غلظت های متفاوت کافئین (* ، ** و * به ترتیب نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح p<۰/۰۵ ، p<۰/۰۱ و p<۰/۰۰۱ نسبت به گروه N می‌باشد. # ، ## نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح p<۰/۰۵ و p<۰/۰۱نسبت به گروه (Mφ +MSCs(0 می-باشد). Mφ: ماکروفاژهای تنها، Mφ +MSCs: ماکروفاژ های مجاور شده با سلول های بنیادی مزانشیمال. اعداد داخل پرانتز نشان دهنده غلظت کافئین بر حسب میلی مولار است.**

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.12]

بحث و نتیجه‌گیری:

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 :PDL1، TGF-ß، HLA-G وGalectins)، برخی سایتوکاین های ضد التهابی (از قبیل :IL-10 و TGF-ß)، برخی متابولیت ها (از قبیل:نیتریک اکساید،IDO و پروستاگلاندین ها) و برخی از آنزیم های مهارکننده (از قبیل: ماتریکس متالو پروتئینازها) می باشند که به صورت پارا کرین و یا تماس مستقیم سلول به سلول اثرات خود را ایجاد می‌کنند(۲۱). به نظر می‌رسد که عملکرد سلول های بنیادی مزانشیمال توسط سیگنال های متعددی تنظیم می‌شود (۲۲، ۲۳). به طور جالب توجهی مطالعات قبلی نشان داده‌اند که هر چهار نوع گیرنده های آدنوزین(A1R، A2BR،A2AR وA3R) 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 می‌رسد که تولید اتوکراین آدنوزین اثر مهمی بر روند رشد و تمایز سلول های بنیادی مزانشیمال داشته باشد(۲۴، ۲۵). گیرنده A2B گیرنده غالب در سطح سلول های بنیادی مزانشیمال است که میزان بیان آن در مراحل اولیه تمایز این سلول ها به استخوان افزایش می‌یابد. در مراحل نهایی تمایز این سلول ها به استخوان سطح گیرنده A2A افزایش قابل توجهی را نشان می‌دهد(۲۵). از طرفی به نظر می‌رسد که افزایش بیان گیرنده‌های A1 و A2A نقش مهمی در تمایز این سلول ها به بافت چربی بازی می‌کند(۲۵). مطالعات قبلی نشان داده است که کافئین در غلظت های در محدوده‌ی ۰/۱میلی مولار از طریق مهار گیرنده های آدنوزینی منجر به افزایش تمایز سلول های مزانشیمال به بافت استخوانی می‌گردد، غلظت های بالاتر از ۰/۳میلی مولار به طور معکوس تمایز این سلول ها را از طریق افزایش سطح PMAC به بافت استخوانی کاهش می‌دهد(۱۳).

سلول های ماکروفاژ جمعیت یکنواخت و یک دستی نبوده و به طور قابل توجهی متنوع می‌باشند(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 می‌باشند. 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 می‌کنند. 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 می‌کنند. ماکروفاژ های M2 یا ماکروفاژهای فعال شده به روش جایگزین به میزان کمتری سایتوکین های التهابی تولید کرده و عمدتا نقش مهمی را در اختتام التهاب و ترمیم بافتی از طریق تولید فاکتور های تروفیک بازی میکنند(۲۶، ۱۰).به نظر می‌رسد که سلول های مزانشیمال نقش بسیار مهمی در پلاریزه کردن عملکرد سلول های ماکروفاژ برعهده دارند. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که کشت هم زمان سلول های ماکروفاژ با سلول های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان موش موجب افزایش درصد ماکروفاژهای M2در مقایسه با ماکروفاژ های M1 می گردد(۱۵). سلول- های ماکروفاژ مجاور شده با سلول های بنیادی مزانشیمال در پاسخ به تحریک با لیپو پلی ساکارید 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 می‌کنند(۱۰).

سلول های ماکروفاژ سطح بالایی از پروتئازها و رادیکال های آزاد اکسیژن و نیتروژن را تولید می‌کنند . این واسطه ها نقش مهمی را در حذف عوامل بیماری زا بازی می‌کنند (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 نا مناسب ایمنی صورت می‌پذیرد(۲۸).

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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.12]

رادیکال های آزاد اکسیژن و نیتروژن و بازسازی شرایط ایمونو 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 سلول‌های 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 رادیکال‌های 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 نمی‌کند. 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 می‌گردد. 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 می‌باشد(۲۹). سلولهای فاگوسیتک 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 گیرنده‌های مربوط به بخش Fc ایمونو 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 میکروارگانیزم اپسونیزه به دلیل ارسال پیامهای قوی از طریق از گیرنده های شناسایی گر الگو و گیرنده های اپسونیک بر ساز وکارهای 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 می‌رسد 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 می‌باشد دارای اثرات ضد التهابی و تعدیل کننده ی ایمنی است(۱۵). تاکنون عمدتا اثرات تعدیل کننده ی 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 می‌رسد که کافئین موجب تقویت عملکرد سلول های مزانشیمال در ایجاد ماکروفاژهای ضد التهابی به دنبال محرک های غیر اختصاصی می

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.12]

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 برعملکرد متقابل سلول های بنیادی مزانشیمال و سایر سلول های ایمنی و سلول های آندوتلیال در شرایط in vitro وin vivo 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 Immunol2015; 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 Transplant2015;24:133-49.

6.Porta C, Riboldi E, Ippolito A, Sica A. Molecular and epigenetic basis of macrophage polarized activation. Sem Immunol2015;27:237-48.

7.Sang Y, Miller LC, Blecha F. Macrophage polarization in virus host interactions. J Clin Cell Immunol2015;6:236-247.

8.Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation time for reassessment. Prime Rep2014;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 celleducated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. Exp Hematol2009;37:1445-53.

11.Matissek R. Evaluation of xanthine derivatives in chocolate – nutritional and chemical aspects. Z Lebensm Unters Forsch1997;205:175-84.

12.Fredholm BB, Battig K, Holmen J, Nehlig A, Zvartau 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 Ther2006;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 Immunopharml2004;4:1409-17.

17.Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.12]

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 Biol2007;45:755-63.

20.Sodhi A, Biswas SK. FMLP-induced in vitro nitric oxide production and its regulation in murine peritoneal macrophages. J Leuk Biol2002;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 Med2015;10:401-6.

22.Esmailigouvarchingaleh H, Delirezh N, Abtahifroushani SM, Afzaleahangaran N. Calcitriol modulates the effects of the supernatants of bone marrow derived mesenchymal stem cells on neutrophil functions. Turk J Biol2014;38:365-70.

23.Hoogduijn MJ, Cheng A, Genever PG. Functional nicotinic and muscarinic receptors on mesenchymal stem cells. Stem Cells Dev2009;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 Immunol2014;5:514.

27.Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. Am J Med2000;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 ephedrineand their congeners. Exe Immunol Rev 2014;20:68-93.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.12]

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

Shushtari N[1], Abtahi Froushani M[1]*

(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*

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2026-11-11]

[DOI: 10.29252/sjimu.25.3.12]