

## اثر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بر آسم آلرژیک در مدل موش

### چکیده

دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۰۶ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۲/۲۰ آنلاین: ۱۳۹۴/۰۴/۱۵

رضا حبیبیان<sup>۱</sup>

نوروز دلیرزاده<sup>۱\*</sup>

امیر عباس فرشید<sup>۲</sup>

۱- گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۲- گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

**زمینه و هدف:** آسم آلرژیک یک بیماری التهابی سیستم تنفسی می‌باشد. تجویز گلوکوکورتیکوئیدها جهت کاهش علائم این بیماری رایج می‌باشد. هدف از این پژوهش ارزیابی اثر تجویز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بر روی مکانسیم‌های اصلی ایجاد التهاب در مدل آسم آلرژیک موش بود.

**روش بررسی:** این پژوهش مدل حیوانی، بر روی موش‌های سوری نژاد خالص خریداری شده از انستیتو پاستور ایران و در پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه از مرداد ۱۳۹۳ تا اسفند ۱۳۹۳ به انجام رسید. جهت ایجاد آسم آلرژیک، حساس‌سازی در موش‌ها توسط تجویز آلبومین سفیده تخم‌مرغ انجام شد. سلول‌های بنیادی از مغز استخوان موش‌ها جداسازی شد. برای برداشت نمونه موش‌ها کشته شده و نمونه خون، مایع شستشوی ریه و طحال دریافت گردید.

**یافته‌ها:** تجویز سلول‌های بنیادی مزانشیمی موجب کاهش تعداد کل سلول‌ها از  $176/6 \pm 22/7$  به  $44/2 \pm 3/6$  ( $P=0/019$ ) و ائوزینوفیل‌های مایع شستشوی ریه از  $132/2 \pm 18/3$  به  $43/9 \pm 4/2$  ( $P=0/033$ ) گردید و سبب کاهش IgE از  $374/4 \pm 4/6$  به  $130/2 \pm 21/5$  ( $P=0/002$ ) شد. با تجویز سلول‌های بنیادی مزانشیمی سایتوکین‌های سلول Th2 ( $IL-4$ ) از  $65/3 \pm 6/2$  به  $31/4 \pm 2/9$  ( $P=0/004$ ) و  $IL-5$  از  $129/6 \pm 21/8$  به  $48/6 \pm 4/7$  ( $P=0/005$ ) کاهش یافته، سایتوکین سلول Treg ( $TGF-\beta$ ) از  $30/8 \pm 3/5$  به  $80/4 \pm 7/9$  ( $P=0/008$ ) افزایش داشته و سایتوکین سلول Th1 ( $IFN-\gamma$ ) از  $384/9 \pm 33/6$  به  $539/2 \pm 54/3$  ( $P=0/039$ ) افزایش نشان داد.

**نتیجه‌گیری:** تجویز سلول‌های بنیادی مزانشیمی تاثیر مهارکنندگی بر التهاب ناشی از آسم آلرژیک در مدل موش داشته و می‌تواند به‌عنوان یک راهکار درمانی موثر در درمان آسم آلرژیک بررسی شود.

**کلمات کلیدی:** آسم، سایتوکین‌ها، فلوسایتومتری، سلول بنیادی مزانشیمی، موش، سلول T تنظیمی.

\* نویسنده مسئول: ارومیه، جاده سرو، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه میکروبی‌شناسی  
تلفن: ۰۴۴۳-۲۷۷۹۵۵۲  
E-mail: n.delirezah@urmia.ac.ir

### مقدمه

به افزایش بوده و این موضوع به یک چالش مهم سلامتی در جوامع بشری تبدیل شده است.<sup>۱</sup> تجویز شکل استنشاقی داروهای آگونیست  $\beta_2$  ( $\beta_2$ -agonists) و اشکال خوراکی و استنشاقی گلوکوکورتیکوئیدها جهت کاهش علائم این بیماری رایج می‌باشد، اما تاثیر این داروها موقت بوده و استفاده طولانی‌مدت از این داروها به‌خاطر عوارض جانبی شایع آنها مشکلاتی را به‌همراه دارد.<sup>۲</sup> مقبول‌ترین نظریه در مورد علت اصلی پاسخ التهابی در آسم آلرژیک، وجود عدم تعادل میان پاسخ‌های ایمنی سلول‌های 1 T helper (Th) و

آسم آلرژیک یک بیماری التهابی سیستم تنفسی می‌باشد که با افزایش نفوذ لوکوسیت‌ها، به‌خصوص ائوزینوفیل‌ها در بافت ریه و ایجاد اختلال در عملکرد دستگاه تنفسی همراه است. این التهاب موجب انسداد برونش‌ها، افزایش حساسیت مجاری تنفسی (Airway hyper responsiveness) به محرک‌ها و تولید بیش از حد موکوس در مجاری تنفسی می‌گردد.<sup>۱</sup> میزان شیوع آسم آلرژیک در سراسر دنیا رو

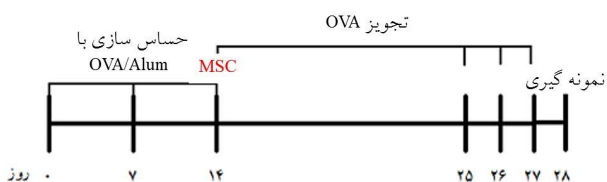
آلرژیک از جمله پاسخ‌های سلول‌های Th1، Th2 و Treg در مدل آسم آلرژیک موش می‌باشد.

## روش بررسی

این پژوهش که از نوع مطالعه مدل حیوانی بوده از مرداد ۱۳۹۳ تا اسفند ۱۳۹۳ به انجام رسید. در این پژوهش موش‌های Balb/c از هر دو جنس با سن هشت تا ۱۲ هفته مورد استفاده قرار گرفتند. موش‌ها از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند و پیش از شروع آزمایش جهت سازگاری با شرایط محیط، حداقل به مدت دو هفته در قفس‌های حیوان‌خانه پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه در دمای  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  با شرایط نور طبیعی نگهداری شده و آب و غذای کافی برای حیوانات به صورت آزاد در اختیار حیوانات قرار گرفت. شرایط نگهداری و نیز نحوه به دست‌گیری و کار کردن با موش‌ها بر اساس توصیه‌های قوانین حمایت از حیوانات آزمایشگاهی و معاهده هلسینکی انجام شد.

موش‌های ماده پس از دوره عادت‌پذیری به محیط، به صورت تصادفی به پنج گروه (هشت الی ۱۰ موش در هر گروه) تقسیم شدند. جهت ایجاد آسم آلرژیک، حساس‌سازی در موش‌های ماده توسط تجویز داخل صفاقی  $300 \mu\text{l}$  از امولسیون (OVA) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) با غلظت ( $100 \mu\text{g/ml}$ ) و آلومینیوم هیدروکساید (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) با غلظت ( $1 \text{ mg/ml}$ ) در روزهای صفر، هفت و ۱۴ مطالعه انجام شد و گروه کنترل به جای OVA به مقدار مشابه، PBS استریل به همراه آلومینیوم هیدروکساید دریافت کرد.

موش‌ها در روزهای ۱۴، ۲۵، ۲۶ و ۲۷ مورد تجویز داخل بینی  $30 \mu\text{l}$  از OVA ( $50 \mu\text{g/ml}$ ) یا PBS (گروه کنترل) قرار گرفتند (شکل ۱).



شکل ۱: طرح شماتیک برنامه زمانی مراحل مطالعه

Th2 می‌باشد. این عدم تعادل با سنگینی کفه ترازو به سمت پاسخ ایمنی Th2 همراه است. سایتوکین‌های مترشحه از سلول‌های Th2 ارتباط مستقیمی با واکنش‌های آلرژیک و ائوزینوفیلی دارا می‌باشند.<sup>۴</sup>

از طرف دیگر پژوهش‌ها نشان داده‌اند که یک سیستم تنظیم پاسخ‌های التهابی با عملکرد معیوب، می‌تواند یک فاکتور موثر در پیدایش آسم آلرژیک و به احتمال سایر اختلالات آلرژیک باشد.<sup>۵</sup> بررسی‌های انجام‌شده بر روی مکانیسم‌های تنظیم پاسخ ایمنی منتهی به کشف یک زیرمجموعه خاص از لنفوسیت‌های T شد، به نام Regulatory T cells (Treg) با فنوتیپ  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$  که در سرکوب پاسخ‌های التهابی و تحمل ایمنی نقش دارند.<sup>۶</sup> شواهد تایید شده‌ای وجود دارد که کاهش تعداد و عملکرد سلول‌های Treg در ریه، موجب افزایش حساسیت مجاری تنفسی به محرک‌ها می‌گردد که نشان‌دهنده نقش مهم سلول‌های Treg در فیزیولوژی سیستم تنفسی می‌باشد.<sup>۷</sup>

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal stem cells) یا به اختصار MSCs سلول‌های چندتوان بوده که به طور تقریبی در همه بافت‌های بدن یافت می‌شوند. این سلول‌ها به مقدار فراوان در مغز استخوان و بافت چربی موجود هستند.<sup>۸</sup> این سلول‌ها با توجه به توانایی آنها در تمایز به انواع مختلف سلول‌ها و دارا بودن پتانسیل کاربردی در ترمیم بافت‌های صدمه‌دیده، توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده‌اند.<sup>۹</sup> این سلول‌ها همچنین دارای توان بالقوه جهت استفاده از آنها به عنوان درمان سلولی سرکوب‌کننده پاسخ ایمنی در بیماری‌های التهابی مانند لوپوس اریتماتوز،<sup>۱۰،۹</sup> آرتریت روماتوئید،<sup>۱۱،۱۲</sup> بیماری‌های التهابی روده<sup>۱۳،۱۴</sup> و بیماری پیوند علیه میزبان<sup>۱۵،۱۶</sup> می‌باشند. نقش MSC ها در کاهش عوارض و بهبود آسیب‌های حاد ریوی نظیر فیروز ریوی<sup>۱۷</sup> و رنیت آلرژیک<sup>۱۸</sup> نیز منتشر شده است.

با وجود گسترش روزافزون داده‌ها در مورد تاثیر MSC ها بر روی پاسخ‌های ایمنی و توانایی آنها در درمان بیماری التهابی، مکانیسم دقیق عملکرد این سلول‌ها به طور کامل اثبات نشده است و استفاده از این سلول در درمان التهاب آلرژیک به مرحله کاربرد بالینی نرسیده است.<sup>۱۹،۲۰</sup>

هدف از پژوهش حاضر ارزیابی اثر تجویز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بر روی مکانیسم‌های اصلی ایجاد التهاب

گردید. ریه موش توسط ۱ ml مایع PBS استریل حاوی FBS ۱٪ سه بار شستشو داده شد و مایع حاصل با ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت پنج دقیقه با استفاده از Eppendorf 5804R Centrifuge (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) شستشو داده شد. مایع رویی نمونه سانتریفیوژ شده برداشته شد و پلیت سلولی ته لوله در ۱ ml محیط کشت RPMI 1640 معلق گردید. سپس سلول‌ها به روی لام شیشه‌ای منتقل شدند و با (Sigma, Germany) Giemsa-Wright (Sigma, Germany) رنگ‌آمیزی شده و مورد شمارش قرار گرفتند. پس از دریافت نمونه خون (Cardiopuncture)، سرم خون با سانتریفیوژ (۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه) جداسازی شد و در فریزر °C ۸۰- ذخیره شد تا مورد تست قرار گیرد. بدین‌منظور نمونه سرم به میزان یک به ۲۵ با بافر رقیق‌کننده (موجود در کیت) رقیق‌سازی شد و میزان IgE اختصاصی OVA به‌وسیله کیت Enzyme immunoassay (EIA, Cayman, MI, USA) بر اساس دستورکار شرکت تولیدکننده کیت با استفاده از ELISA reader (Falcon, Becton-Dickinson, USA) در ۴۵۰ nm مورد سنجش قرار گرفت. سایتوکین‌های IL-4، IL-5، IFN- $\gamma$  و TGF- $\beta$  در سرم موش‌های مورد مطالعه با استفاده از کیت‌های الایزای LEGEND MAX™ (BioLegend, London, UK) بر اساس دستورکار شرکت سازنده کیت‌ها با استفاده از دستگاه ELISA reader انجام شد.

طحال موش‌های مورد بررسی پس از برداشت در شرایط استریل، در PBS استریل قرار داده شد و توسط پیستون سرنگ له شد. پس از برداشت کپسول طحال و بافت‌های اضافی، مایع باقیمانده از فیلتر Nylon mesh عبور داده شد تا جمعیت یک‌دست از سلول‌ها به دست آید. سلول‌ها پس از شستشو با RPMI 1640 یک‌بار نیز با بافر لیزکننده گلبول‌های قرمز جهت حذف گلبول‌های قرمز شستشو داده شدند. سپس سلول‌ها ابتدا به مدت ۳۰ دقیقه با آنتی‌بادی (FITC) ضد CD4 در دمای °C ۴ انکوبه شده و سپس پس از فیکس و نفوذپذیر شدن با مایع مخصوص این کار (eBioscience Inc., San Diego, CA, USA) با آنتی‌بادی داخل سلولی (PE) ضد Foxp3 رنگ‌آمیزی شدند. جهت حذف رنگ پس‌زمینه نیز از ایزوتیپ کنترل مربوطه استفاده شد.

سلول‌ها با استفاده از PAS III مورد ارزیابی قرار گرفتند. Flowing software جهت آنالیز داده‌های فلوسایتومتری مورد استفاده قرار گرفت. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شده‌اند. داده‌ها با استفاده از One-way ANOVA و Post Hoc Tukey test

در این پژوهش در گروه کنترل مثبت، از دگزامتازون (۲ mg/kg) به‌صورت داخل صفاقی یک ساعت پیش از تجویز OVA از بینی، استفاده شد. در روز ۲۸ برای برداشت نمونه موش‌ها با ترکیب دارویی کتامین و زایلازین (Alfasan International B.V., Netherlands) یوتانایز شده و نمونه خون، مایع شستشوی ریه (Bronchoalveolar lavage fluid) و طحال دریافت گردید. سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر اساس روش شرح داده شده<sup>۲۱</sup> از مغز استخوان‌های ران و درشت‌نی موش‌های Balb/c نر جداسازی شدند. به‌طور خلاصه، سلول‌های مغز استخوان با روش فلاشینگ (Flashing) با تزریق PBS استریل حاوی FBS ۲٪ (Fetal bovine (FBS) 2% (Gibco, Carlsbad, CA, USA)، استخراج شده و پس از سانتریفیوژ، به فلاسک T25 حاوی محیط کشت DMEM (Gibco, Carlsbad, CA, USA) با ۱۵٪ FBS، ۱۰۰ IU/mL پنی‌سیلین و ۱۰۰  $\mu$ g/mL استرپتومایسن (GIBCO, USA) منتقل شدند.

محیط کشت فلاسک هر سه روز یک بار تعویض شد تا به‌همراه حذف سلول‌های غیرچسبیده و فاقد توان تکثیر، جمعیت سلول‌های بنیادی مزانشیمی به حد مطلوب برسد. پس از پوشیده شدن کف فلاسک (confluency ۷۰ الی ۸۰٪) سلول‌ها با استفاده از Trypsin-EDTA ۰/۲۵٪ جدا شده و پاساژ داده شدند. سلول‌ها در مرحله پاساژ پنج جهت آنالیز خصوصیات مارکرهای سطحی مورد استفاده قرار گرفتند. این سلول‌ها از نظر مارکرهای CD29، CD44، CD90، Sca-1، CD34، CD45، CD14 و CD11b با استفاده از آنتی‌بادی‌های کنژوگه-شده با رنگ‌های PE یا FITC (BD Biosciences, USA) با استفاده از PAS III flow cytometer (Partec GmbH, Münster, Germany) مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای حذف رنگ پس‌زمینه نیز از آنتی‌بادی‌های کنژوگه مربوطه بدون سلول استفاده شد. جهت آنالیز داده‌های فلوسایتومتری از Flowing Software, version 2.5.1 (Turku Centre for Biotechnology, Finland) استفاده شد.

در روز ۱۴ بلافاصله پیش از تجویز آلرژن (OVA)، این سلول‌ها ( $2 \times 10^6$  در هر ml) در PBS استریل به‌میزان ۱۰۰  $\mu$ l از ورید دمی به موش‌ها تجویز شد و به گروه کنترل فقط PBS به‌روش و مقدار مشابه تزریق گردید.

برای استخراج سلول‌های BALF، ریه موش توسط کاتتر گیج ۲۰ از طریق نای کانول‌گذاری شد و کانول با نخ بخیه در محل تثبیت

معناداری در تعداد کل سلول‌ها ( $P=0/019$ ) و تعداد ائوزینوفیل‌ها ( $P=0/033$ ) در مقایسه با گروه OVA گردید. نتایج به‌دست‌آمده از تجویز MSC قابل مقایسه با نتایج حاصل از تجویز دکزامتازون بود ( $P=0/028$ ) (شکل ۳).

بر اساس یافته‌ها، حساس‌سازی و تجویز داخل بینی OVA موجب افزایش معنادار ( $P=0/004$ ) در غلظت IgE اختصاصی OVA گردید. تجویز MSC نیز موجب کاهش چشمگیر غلظت IgE اختصاصی OVA ( $P=0/002$ ) در مقایسه با گروه OVA گردید (شکل ۴).

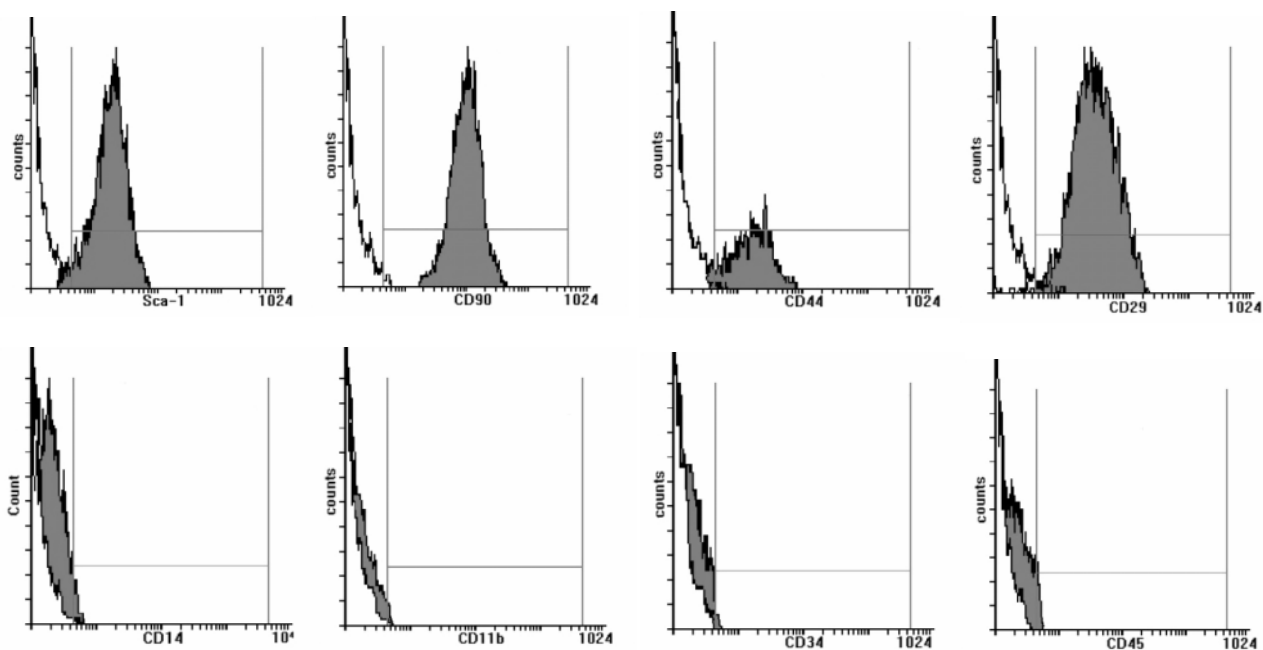
به‌دنبال حساس‌سازی و تجویز OVA، غلظت سایتوکین‌های IL-4 و IL-5 افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل منفی نشان دادند ( $P=0/002$ ,  $P=0/006$ ). در حالی‌که در غلظت سایتوکین‌های IFN- $\gamma$  کاهش و  $TGF-\beta$  افزایش اندکی داشتند ( $P=0/03$ ,  $P=0/02$ ). به‌دنبال تجویز MSC، غلظت سایتوکین‌های IL-4 و IL-5 کاهش معناداری نسبت به گروه OVA نشان دادند ( $P=0/003$ ,  $P=0/004$ ). همچنین تجویز MSC موجب افزایش آشکار غلظت  $TGF-\beta$  شد ( $P=0/008$ ) و غلظت IFN- $\gamma$  تا سطح گروه کنترل منفی افزایش یافت ( $P=0/055$ ).

توسط نرم‌افزار GraphPad Prism, version 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) مورد آنالیز قرار گرفتند. در این مطالعه  $P<0/05$  به‌عنوان سطح معنادار در نظر گرفته شد.

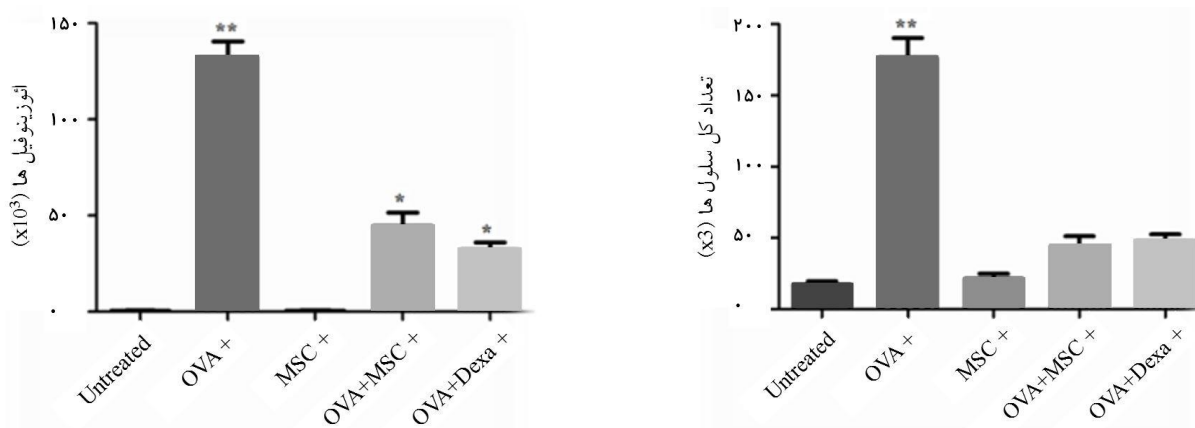
## یافته‌ها

سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج‌شده از مغز استخوان موش‌های Balb/c نر از نظر بیان مارکرهای سطحی مورد ارزیابی قرار گرفتند و نتایج نشان داد که این سلول‌ها از نظر بیان مارکرهای CD29، CD44، CD90 و Sca-1 مثبت بوده و از نظر بیان مارکرهای CD34، CD45، CD14، CD11b منفی بودند (شکل ۲).

از خصوصیات بنیادین التهاب مجاری تنفسی افزایش تعداد سلول‌های التهابی به‌خصوص ائوزینوفیل‌ها می‌باشد. حساس‌سازی و تجویز OVA موجب افزایش معناداری در تعداد کل سلول‌ها ( $P=0/007$ ) و همچنین تعداد ائوزینوفیل‌ها ( $P=0/005$ ) در BALF در مقایسه با گروه کنترل منفی گردید. تجویز MSC موجب کاهش



شکل ۲: نتایج آنالیز بیان مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش. ایزوتیت کنترل با رنگ سفید نشان داده شده است. درصد بیان مارکرها: CD29 (۹۲/۳۸)، CD44 (۷۹/۶۶)، CD90 (۹۷/۲۷)، Stem cell antigen (Sca)-1 (۸۲/۱۲)، CD34 (۰/۸)، CD45 (۰/۵)، CD14 (۰/۶) و CD11b (۰/۵).



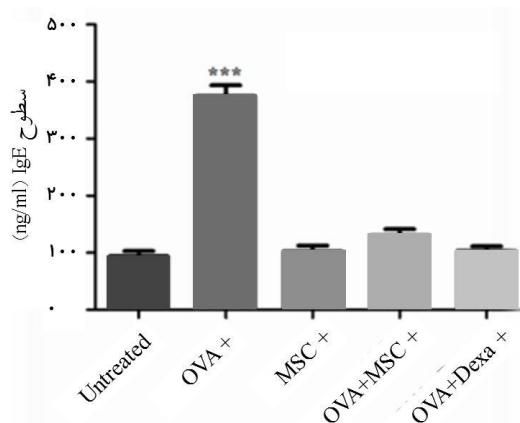
شکل ۳: نتایج اثر تجویز MSC بر روی تعداد کل سلول‌ها و ائوزینوفیل‌های BALF در موش‌های گروه‌های مختلف

Untreated: گروه کنترل منفی. OVA+: حساس شده با OVA و تحریک شده با OVA. MSC+: بدون حساس‌سازی، MSC تجویز شده است. OVA+MSC+: حساس شده با OVA و تحریک شده با OVA و MSC تجویز شده است. OVA+Dexa+: حساس شده با OVA و تحریک شده با OVA و MSC تجویز شده است. \* P<0/05 \*\* P<0/01

شده با OVA، فراوانی سلول‌های Treg افزایش معناداری نشان داد (P=0/001). دگرگام‌تازون تاثیر معناداری بر جمعیت سلول‌های Treg نشان نداد (P=0/09) (شکل ۶).

## بحث

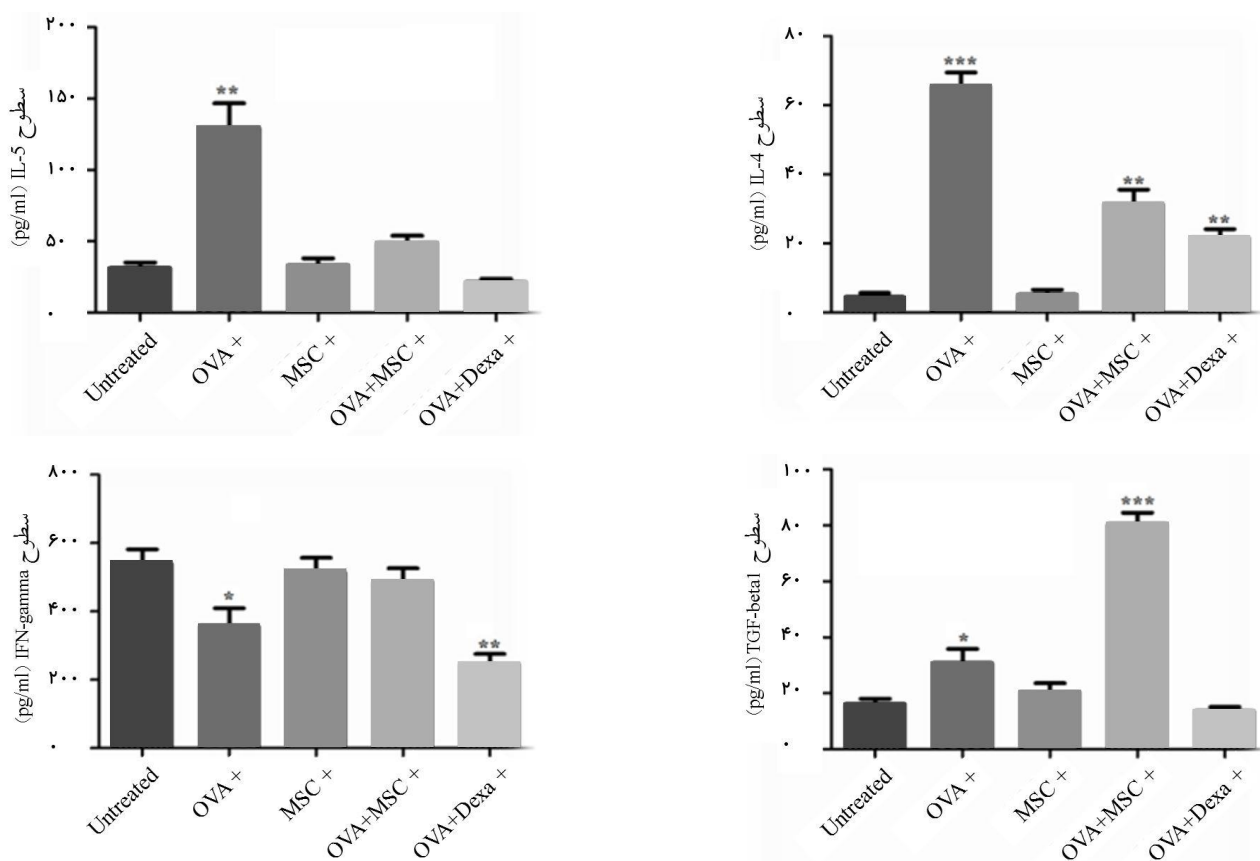
نتایج به‌دست‌آمده در پژوهش حاضر نشان داد که تجویز MSC تاثیر مهارکنندگی بر التهاب ناشی از آسم آلرژیک در مدل موش داشته که این نتایج در مقایسه با نتایج حاصل از تجویز دگرگام‌تازون مطلوب بوده است. بر این اساس تجویز MSC موجب کاهش تعداد کل سلول‌ها و ائوزینوفیل‌های BALF گردید. همچنین تجویز این سلول‌ها سبب کاهش IgE اختصاصی OVA شد. جهت ارزیابی تاثیر تجویز سلول‌های MSC بر پاسخ سلول‌های Th1، Th2 و Treg سایتوکین‌های این سلول‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت که بر این اساس، به‌دنبال القای آسم آلرژیک و تجویز سلول‌های MSC سایتوکین‌های سلول Th2 (IL-4 و IL-5) کاهش یافته، سایتوکین سلول Treg (TGF-β) افزایش آشکار داشته و سایتوکین سلول Th1 (IFN-γ) افزایش ملایمی را نشان داد. در حالی‌که تجویز دگرگام‌تازون موجب کاهش همه این سایتوکین‌ها (IL-4، IL-5 و TGF-β) و (IFN-γ) گردید. از طرف دیگر تجویز MSC موجب افزایش قابل توجه سلول‌های Treg در طحال موش‌های مورد مطالعه شد.



شکل ۴: نتایج اثر تجویز MSC بر غلظت IgE اختصاصی OVA سرم موش‌های گروه‌های مطالعه  
Untreated: گروه کنترل منفی. OVA+: حساس شده با OVA و تحریک شده با OVA. MSC+: بدون حساس‌سازی، MSC تجویز شده است. OVA+MSC+: حساس شده با OVA و تحریک شده با OVA و MSC تجویز شده است. OVA+Dexa+: حساس شده با OVA و تحریک شده با OVA و MSC تجویز شده است. \*\*\* P<0/001

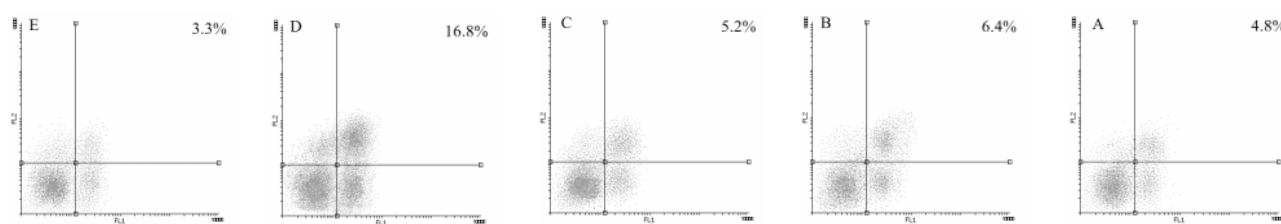
دگرگام‌تازون موجب کاهش معناداری در غلظت IFN-γ (P=0/0062) شد. اما تاثیری بر TGF-β نداشت (P=0/085) (شکل ۵).

به‌دنبال حساس‌سازی و تجویز OVA، فراوانی سلول‌های Treg افزایش اندک اما غیرمعناداری نسبت به گروه کنترل منفی نشان دادند (P=0/07). در حالی‌که به‌دنبال تجویز MSC در موش‌های حساس-



شکل ۵: نتایج اثر تجویز MSC بر غلظت سایتوکین های IL-5، IL-4، IFN- $\gamma$  و TGF- $\beta$  در سرم موش های گروه های مورد مطالعه

Untreated: گروه کنترل منفی. OVA+: حساس شده با OVA و تحریک شده با OVA. MSC+: بدون حساس سازی، MSC تجویز شده است. OVA+MSC+: حساس شده با OVA و تحریک شده با OVA و MSC تجویز شده است. OVA+Dexa+: حساس شده با OVA و تحریک شده با OVA و MSC تجویز شده است. P<۰/۰۰۱ \*\*\* P<۰/۰۱ \*\* P<۰/۰۵ \*



شکل ۶: نتایج اثر تجویز MSC بر فراوانی سلول های Treg طحال در موش های گروه های مطالعه

فراوانی سلول های CD4+Foxp3+: A (Untreat): ۴/۸، B (OVA): ۶/۴، C (MSC): ۵/۲، D (OVA+MSC): ۱۶/۸، E (Dexa): ۳/۳. FL1: CD4+FITC، FL2: Foxp3+PE

استروئیدها را نشان می دهد. امروزه به طور روزافزون اثرات ضد التهابی MSC ها در بررسی های مختلف بر روی بیماری های التهابی و ناشی

تجویز دگرآمتازون تاثیر معناداری بر جمعیت سلول های Treg نداشت. این نتایج مهمترین تفاوت های تجویز MSC در مقایسه با کورتیکو-

را دارا می‌باشد. از طرف دیگر این سایتوکین تمایز Th0 به Th1 را سرکوب می‌کند.<sup>۱</sup>

در این پژوهش افزایش سایتوکین IFN- $\gamma$  به دنبال تجویز MSC می‌تواند ناشی از کاهش IL-4 و در نتیجه افزایش میزان تمایز Th0 به Th1 بوده باشد. سایتوکین IL-5 نقش مهمی در ائوزینوفیلی مجاری تنفسی دارد. این سایتوکین ابعاد مختلف فعالیت ائوزینوفیل‌ها از جمله رشد، تمایز، بلوغ، اتصال، تولید محصولات ترشحی و آپوپتوز این سلول‌ها را تنظیم می‌کند.<sup>۲۴</sup>

بنابراین کاهش این سایتوکین تاثیر مستقیمی بر عملکرد ائوزینوفیل‌ها دارد که نتایج این پژوهش شاهدهی بر این موضوع است. سلول‌های Treg در تنظیم پاسخ ایمنی سلول‌های Th2 و تولید Ige نقش اساسی دارند.<sup>۲۵</sup> با توجه به توانایی سلول Treg در مهار تکثیر و عملکرد سایر لنفوسیت‌های T، این سلول توجه پژوهشگران را در زمینه درمان آسم آلرژیک به خود جلب کرده است.<sup>۲۶</sup> پژوهش‌ها نشان داده است که نقص در عملکرد سلول‌های Treg در ریه افراد مبتلا به آسم آلرژیک، موجب برهم خوردن تعادل پاسخ سلول‌های Th1/Th2 می‌گردد.<sup>۲۷</sup>

در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که تجویز سلول‌های بنیادی مزانشیمی از طریق تقویت پاسخ‌های تنظیم‌کننده ایمنی، تعدیل پاسخ‌های التهابی و اصلاح پاسخ نامتعادل سلول‌های Th1/Th2 می‌تواند به‌عنوان یک راهکار درمانی موثر در درمان آسم آلرژیک و جایگزینی مناسب برای کورتیکواستروئیدها باشد. هر چند که جهت بررسی اثرات بلندمدت این روش از سلول درمانی به پژوهش‌های بیشتر نیاز می‌باشد. **سپاسگزاری:** این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی تحت عنوان "مطالعه اثر تعدیل ایمنی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان بر التهاب تنفسی آلرژیک تجربی در موش BALB/c" مصوب دانشگاه ارومیه در سال ۱۳۹۲ و کد ۰۰۸/د/۹۲ می‌باشد که با حمایت دانشگاه ارومیه اجرا شده است.

از پاسخ‌های ایمنی نشان داده می‌شود.<sup>۲۳</sup> Nemeth و همکاران نشان دادند که تجویز MSC از حیوان خالص هم‌نژاد و آلورژیک حاصل از مغز استخوان در مدل آلرژیک ناشی از ragweed، موجب کاهش التهاب به همراه کاهش آنتی‌بادی‌ها و سایتوکین‌های التهابی گشته است.<sup>۲۲</sup> یکی از مکانیسم‌های اثرگذاری MSC ترشح سایتوکین‌های ضد التهابی از جمله TGF- $\beta$  می‌باشد که این سایتوکین می‌تواند با جهت دادن به سلول‌های Th0 موجب تمایز آنها به Treg گردد.<sup>۲۲</sup> با توجه به اینکه MSC ها به دنبال تجویز داخل وریدی به دلیل دارا بودن گیرنده‌های کمکینی، در محل التهاب تجمع می‌یابند،<sup>۲۶</sup> بنابراین در موارد آسم آلرژیک این سلول‌ها در ریه تجمع یافته و اثر خود را اعمال می‌کنند و می‌توانند سبب افزایش جمعیت سلول‌های Treg در ریه مبتلا به التهاب آلرژیک گردند.

نکته جالب توجه این است که MSC ها خصوصیات ضدالتهابی خود را فقط در محیط التهابی نشان می‌دهند که این موضوع مربوط به وجود گیرنده‌های مختلف سایتوکینی بر روی MSC می‌باشد که فعالیت ضدالتهابی این سلول‌ها منوط به فعال شدن از طریق این گیرنده‌ها می‌باشد.<sup>۱۹</sup>

این موضوع نشان می‌دهد که MSC ها توانایی ارزیابی محیط اطراف خود را داشته و واکنشی متناسب با محیط اطراف خود می‌دهند. این موضوع تاییدکننده نتایج حاصل از گروه MSC در پژوهش حاضر می‌باشد که تجویز این سلول‌ها در موش‌های فاقد التهاب آلرژیک موجب تفاوت معناداری در نتایج در مقایسه با گروه کنترل نگردید. پاسخ سلول‌های Th2 یکی از مهمترین عوامل ایجادکننده آسم آلرژیک می‌باشد که ترشح سایتوکین‌های IL-4 و IL-5 بخشی از آن است. سایتوکین IL-4 نقش مهمی در تمایز سلول Th0 به Th2 و ایجاد حساسیت نسبت به آلرژن خاص دارد. این سایتوکین در تغییر کلاس ایمونوگلوبولین (IgG به IgE) تولیدشده از لنفوسیت B نیز نقش اصلی

## References

- Bochner BS, Rothenberg ME, Boyce JA, Finkelman F. Advances in mechanisms of allergy and clinical immunology in 2012. *J Allergy Clin Immunol* 2013;131(3):661-7.
- Braman SS. The global burden of asthma. *Chest* 2006;130(1 Suppl):4S-12S.
- Choi MS, Park S, Choi T, Lee G, Haam KK, Hong MC. Bee venom ameliorates ovalbumin induced allergic asthma via modulating CD4+CD25+ regulatory T cells in mice. *Cytokine* 2013;61(1):256-65.
- Nakagome K, Nagata M. Pathogenesis of airway inflammation in bronchial asthma. *Auris Nasus Larynx* 2011;38(5):555-63.

5. Braga M, Quecchia C, Cavallucci E, Di Giampaolo L, Schiavone C, Petrarca C, et al. T regulatory cells in allergy. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2011;24(1 Suppl):55S-64S.
6. Rasmussen I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 2006;312(12):2169-79.
7. Larche M. Regulatory T cells in allergy and asthma. *Chest* 2007;132(3):1007-14.
8. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2008;8(9):726-36.
9. Collins E, Gilkeson G. Hematopoietic and mesenchymal stem cell transplantation in the treatment of refractory systemic lupus erythematosus: where are we now? *Clin Immunol* 2013;148(3):328-34.
10. Liang J, Gu F, Wang H, Hua B, Hou Y, Shi S, et al. Mesenchymal stem cell transplantation for diffuse alveolar hemorrhage in SLE. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6(8):486-9.
11. El-Jawhari JJ, El-Sherbiny YM, Jones EA, McGonagle D. Mesenchymal stem cells, autoimmunity and rheumatoid arthritis. *Qjm* 2014;107(7):505-14.
12. Gonzalez-Rey E, Gonzalez MA, Varela N, O'Valle F, Hernandez-Cortes P, Rico L, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010;69(1):241-8.
13. del Pilar Martinez-Montiel M, Gomez-Gomez GJ, Flores AI. Therapy with stem cells in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(5):1211-27.
14. van Deen WK, Oikonomopoulos A, Hommes DW. Stem cell therapy in inflammatory bowel disease: which, when and how? *Curr Opin Gastroenterol* 2013;29(4):384-90.
15. Amorin B, Alegretti A, Valim V, Pezzi A, Laureano A, da Silva M, et al. Mesenchymal stem cell therapy and acute graft-versus-host disease: a review. *Human Cell* 2014;27(4):137-50.
16. Ringden O, Uzunel M, Rasmussen I, Remberger M, Sundberg B, Lonnie H, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplant* 2006;81(10):1390-7.
17. Toonkel RL, Hare JM, Matthay MA, Glassberg MK. Mesenchymal stem cells and idiopathic pulmonary fibrosis. Potential for clinical testing. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188(2):133-40.
18. Sun YQ, Deng MX, He J, Zeng QX, Wen W, Wong DS, et al. Human pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells prevent allergic airway inflammation in mice. *Stem Cells* 2012;30(12):2692-9.
19. Helmy KY, Patel SA, Silverio K, Pliner L, Rameshwar P. Stem cells and regenerative medicine: accomplishments to date and future promise. *Ther Deliv* 2010;1(5):693-705.
20. Palomares O, Yaman G, Azkur AK, Akkoc T, Akdis M, Akdis CA. Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *Eur J Immunol* 2010;40(5):1232-40.
21. Ci X, Chu X, Wei M, Yang X, Cai Q, Deng X. Different effects of farrerol on an OVA-induced allergic asthma and LPS-induced acute lung injury. *PLoS One* 2012;7(4):e34634.
22. Nembrini C, Marsland BJ, Kopf M. IL-17-producing T cells in lung immunity and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123(5):986-94.
23. Ting Xu, Ling-Ling Xian, Yufeng Zhou, Beverly Plunkett, Xu Cao, Mei Wan et al. TGF-beta1 Mobilizes Mesenchymal Stem Cells In Allergic Asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2014;133:53-60.
24. Corren J. Anti-interleukin-5 antibody therapy in asthma and allergies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2011;11(6):565-70.
25. Robinson DS. Regulatory T cells and asthma. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(9):1314-23.
26. Shalaby KH, Martin JG. Overview of asthma; the place of the T cell. *Curr Opin Pharmacol* 2010;10(3):218-25.
27. Shi YH, Shi GC, Wan HY, Jiang LH, Ai XY, Zhu HX, et al. Coexistence of Th1/Th2 and Th17/Treg imbalances in patients with allergic asthma. *Chin Med J* 2011;124(13):1951-6.



## Effect of mesenchymal stem cells on allergic asthma in mouse model

Reza Habibian Ph.D. Student<sup>1</sup>  
Nowruz Delirezah Ph.D.<sup>1\*</sup>  
Amir Abbas Farshid Ph.D.<sup>2</sup>

1- Department of Microbiology,  
Faculty of Veterinary Medicine,  
Urmia University, Urmia, Iran.

2- Department of Pathobiology,  
Faculty of Veterinary Medicine,  
Urmia University, Urmia, Iran.

\* Corresponding author: Department of  
Microbiology, Urmia University, Sero  
Road, Urmia, Iran.  
Tel: +98-443-2779552  
E-mail: n.delirezah@urmia.ac.ir

### Abstract

Received: 25 Feb. 2015 Accepted: 10 May 2015 Available online: 06 Jul 2015

**Background:** Allergic Asthma is an inflammatory disease of the respiratory system that is well known by increased inflammatory cells in the airways and causes difficulty in respiration. The prevalence of allergic asthma is increasing worldwide, and it has become a significant cause of health challenge especially in developed countries. Inhaled  $\beta_2$ -agonists and Inhaled or oral corticosteroids are common medications for treating the disease, but they cannot be used for long periods of time because of frequently occurring side effects and they can't change the main pathogenesis of the problem. Deficiency in regulatory system against inflammation could be an important factor in allergic asthma. Mesenchymal stem cells (MSCs) have potential of cellular immunosuppressive therapy of inflammatory disorders. The aim of present study was to evaluate the effects of MSC therapy on mechanisms of allergic asthma in mice model.

**Methods:** This experimental study was conducted from August 2014 to March 2015. The animals were housed and maintained in Biotechnology Center of Urmia University, Iran. Mice were sensitized by intra-peritoneal injection of ovalbumin (OVA) and aluminum hydroxide emulsion and then were challenged intra-nasally with OVA. Before allergen challenge on day 14, experimental mice received tail vein injection of MSCs in PBS. Regulatory T cells of spleen, cytokines and IgE analysis were carried out using lungs wash as well as serum samples.

**Results:** Our results showed that MSCs significantly reduced total cells and eosinophilia, serum OVA-specific IgE concentration in OVA-sensitized and challenged mice. Also results showed that MSCs markedly inhibited expressions of Th2 cytokines and elevated levels of Treg cells and Treg cytokines.

**Conclusion:** In the present study, we demonstrated the inhibitory effect of MSCs on airway inflammation using mice model of allergic asthma. The mice were sensitized with OVA and compared to the results of dexamethasone administration. Our results demonstrated that administration of MSCs could be used as a potential therapeutic approach for the allergic asthma.

**Keywords:** asthma, cytokines, flow cytometry, mesenchymal stem cells, mice, regulatory T cells.