بررسی اثر مهاری سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی بر روی تکثیر سلول‌های تک هسته‌ای طحالی موش دیابتی C57BL/6 در محیط آزمایشگاه

حسین رهاوی: گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.
سید محمود هاشمی: گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
مسعود سلیمانی: گروه خون شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
جمال محمدی: گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
* **نادر تاجیک**: گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران (*نویسنده مسئول).

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۴/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۲/۷

چکیده

زمینه و هدف: دیابت نوع یک، نوعی بیماری خودایمنی محدود به عضو با واسطه لنفوسیت‌های T می‌باشد که در آن تخریب ایمونولوژیک سلول‌های بتای پانکراس موجب کاهش انسولین و در نتیجه افزایش قند خون می‌گردد. یکی از راه‌های درمان علاوه بر تزریق روزانه انسولین، پیوند آلوژنیک جزایر پانکراس است که در صورت عدم استفاده از داروهای سرکوب کننده ایمنی با تخریب مجدد و رد پیوند مواجه خواهد شد. از آن جایی که مصرف مداوم این داروها توسط بیماران اثرات جانبی متعددی را به همراه دارد، ما برای حل این مشکل خاصیت موضعی مهار ایمنی توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی را پیشنهاد می‌کنیم. هدف از انجام این طرح بررسی اثر ایمونومدولاتوری سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی موش در مهار پاسخ سلول‌های تک‌هسته‌ای طحالی علیه جزایر پانکراس موش سینژنیک در محیط آزمایشگاه می‌باشد.

روش کار: در این مطالعه سلول‌های مزانشیمی از بافت چربی موش سالم استخراج، کشت، تکثیر و تعیین هویت شده و خاصیت تمایزی آن‌ها به دو رده استئوسیت، آدیپوسیت اثبات گردید. پس از تهیه مدل دیابتی موشهای C57BL/6 با تزریق دوزهای پایین و متوالی استرپتوزوتوسین و تایید آن با قند خون بالای ۳۰۰ mg/dl، هیستوپاتولوژی پانکراس و کاهش معنی دار انسولین، جزایر پانکراس از موش سالم و سلول‌های تک هسته ای طحالی از موش سالم و دیابتی استخراج گردید. برای اثبات خاصیت ضد تکثیری سلولهای مزانشیمی، پس از همکشتی آنها با سلولهای طحالی در حضور لایزیت جزایر پانکراس، سنجش تکثیر سلولهای تک هسته ای طحالی با تکنیک MTT ارزیابی شد. داده ها در هر آزمایش حاصل سه بار تکرار مستقل و به صورت Mean± SD گزارش شده است و با تست آماری One way Anova آنالیز گردیدند.

یافته‌ها: نتایج حاصله نشان داد که سلولهای مزانشیمی قادرند در حضور تحریک کننده اختصاصی (لایزیت جزایر پانکراس) باعث کاهش معنی دار تکثیر سلولهای طحالی شوند ($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: بررسی اثرات تنظیم ایمنی و تمایزی سلولهای مزانشیمی به سلولهای ترشح کننده انسولین، می تواند در آینده افقی جدید را برای درمان دیابت تیپ یک ایجاد نماید.

کلیدواژه‌ها: دیابت نوع یک، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، پیوند، جزایر پانکراس.

مقدمه

دیابت نوع یک، یک بیماری خودایمنی محدود به عضو با واسطه لنفوسیت‌های T می‌باشد. تخریب ایمونولوژیک سلول‌های بتای پانکراس موجب نقص در ترشح انسولین و درنتیجه افزایش قند خون در این بیماران می‌گردد. عموم بیماران ناچار به دریافت انسولین جهت حفاظت بدن از اثرات هایپرگلیسمی بر روی عروق هستند (۱). این اثرات شامل عوارض عروق بزرگ و عوارض عروق کوچک بوده که اختلالات فراوانی را در بیماران به همراه دارد. بررسی‌های کلینیکی انجام شده نشان می‌دهد که کنترل منظم قند خون همراه با رژیم انسولینی می تواند خطر پیشرفت عوارض دیابت را در بیماران کاهش دهد؛ اما با این وجود، بیشتر بیماران به‌واسطه انسولین درمانی قادر به حفظ گلوکز خون در رنج طبیعی نیستند، به‌علاوه کنترل قند خون با انسولین خطر بروز هایپوگلیسمی را هم به دنبال دارد (۲).

جنبه‌های درمانی دیابت تیپ یک عمدتاً شامل انسولین درمانی، درمان تلفیقی مهارکننده‌های

سیستم ایمنی و واکسن‌های تولروژنیک، درمان با ایمونومدولاتورها و ترکیبات افزایش‌دهنده توده سلول‌های بتا به‌صورت توأم، سایتوکاین درمانی، ژن‌درمانی و سلول درمانی یا پیوند جزایر لانگرهانس می‌باشد (۳). اگرچه پیوند بافت توپر پانکراس منجر به طبیعی شدن گلوکز خون و عدم وابستگی به انسولین شده، اما با مشکلات تکنیکی از جمله کمبود دهنده عضو، رد ایمونولوژیک، ترومبوز در بافت آلوگرافت و خطر فعال شدن آنزیمهای هاضم مواجه است. در حالیکه پیوند جزایر پانکراس تا حدودی بر برخی از این مشکلات فائق آمده، اما هنوز کنترل پاسخ‌های ایمنی (اتوراکتیو و آلوراکتیو) به عنوان یک مسئله حل نشده وجود دارد (۴). اخیرا در روش های درمانی دیابت تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های ترشح کننده انسولین در محیط آزمایشگاه در کنار خصوصیت تعدیل پاسخهای ایمنی مخرب توسط آنها مورد توجه محققین قرارگرفته است (۵).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs)، سلول‌های بنیادی بالغ غیر خون سازی هستند که از انواع بافتهای همبند به خصوص بافت مغز استخوان و بافت چربی جدا می شوند. وظیفه آنها در مغز استخوان حمایت از خون سازی است و در سایر بافتها در هنگام التهاب یا آسیب بافتی به سلول‌های عملکردی همان بافت تمایز می یابند که باعث ترمیم و کنترل التهاب می‌گردد. این سلولها از قدرت خود تجدید شوندگی برخوردار بوده و می‌توانند به انواع مختلفی از بافتها شامل استخوان، چربی، ماهیچه، غضروف و سلول‌های استرومایی بافتی متمایز گردند (۶). ایمونوژنیسیته پایین و عدم بیان MHC-II و مولکول‌های کمک تحریکی از یکسو و خاصیت ایمونومدولاتوری و آنژیوژنیک آنها از سوی دیگر منجر به کاربرد این سلولها در درمان بیماری‌های اتوایمیون یا واکنشهای آلوایمیون در سال‌های اخیر شده است (۷).

فعالیت ایمونومدولاتوری آنها از طریق مکانیسم‌های مختلف (تماس مستقیم سلولی و یا ترشح فرآورده های سلولی) صورت می‌پذیرد. این سلولها همچنین به‌واسطه بیان کموکاینها و اینتگرین های مختلف دارای توانایی عبور از سلول‌های اندوتلیال و مهاجرت انتخابی به محل التهاب بوده و به طور مستقیم پاسخ های ایمنی فعال را از طریق تولید سایتوکاینهای تحمل زا، مهار تکثیر لنفوسیتی، القای سیگنال های محافظتی و ترمیمی تعدیل می کنند (۸). ویژگی های مذکور به همراه سهولت استخراج و کشت آنها از بافتهای مختلف کاربرد این سلولها در درمان انواعی از بیماری های ایمونولوژیک که تعداد زیادی سلول مورد نیاز می‌باشد را فراهم کرده است. با این حال، استفاده از این سلولها مشکلاتی نظیر حفظ دائم خاصیت تکثیری و احتمال توموری شدن در موضع و مهاجرت به محل مورد نظر و تمایز ناخواسته در مواضع التهابی را ممکن است به دنبال داشته باشد (۹).

مطالعات متعددی در استفاده از سلول‌های مزانشیمی روی مدل موش دیابتی انجام گرفته که شامل تزریق این سلولها به موش و کمک به تجدید سلول‌های بتا در کنار تعدیل پاسخهای اتوراکتیو، انتقال ژن های مسئول ترشح انسولین به MSCs، پیوند همزمان جزایر پانکراس با سلول‌های مزانشیمی به منظور حفظ بقای سلول های انسولین ساز و سرکوب پاسخهای اتوراکتیو و در نهایت تمایز MSCs به سلول‌های ترشح کننده انسولین در محیط آزمایشگاه و سپس تزریق سلول‌های انسولین تراوا به موش می‌باشد (۱۰-۱۳).

یکی از اولین مطالعات in vivo نشان داده که تزریق سیستمیک سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان بقای پیوند آلوگرافت پوست را از ۷ تا ۱۱ روز در بابون (میمون دم کوتاه) افزایش می‌دهد. پیوند قلب همراه با تزریق سلول‌های بنیادی مزانشیمی دهنده در موش نیمه آلوژنیک از طریق افزایش تولید سلول های T $CD4^+CD25^+Foxp3^+$، بقای پیوند آلوگرافت را افزایش می‌دهد. پیوند همزمان سلول‌های بنیادی مزانشیمی با سلول های بنیادی خون ساز $CD34^+$ دارای HLA غیرمشابه باعث افزایش بازدهی پیوند مغزاستخوان می شود (۱۴).

مطالعات قبلی در in vivo نشان می‌دهد که در مدل دیابتی موش که مشکل اصلی نقص در القای تولرانس محیطی می‌باشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی می توانند برای ایجاد تعادل بین سلول‌های T تنظیمی و سلول‌های T اتوراکتیو مفید باشند (۱۵). از طرفی MSCs قادرند سبب تمایل پروفایل سایتوکاینی به سمت فنوتایپ های تنظیمی Th2 گردند و بدین ترتیب سبب کاهش تولید سایتوکاین های IFN-γ، IL-2 و TNF-α و افزایش ترشح IL-4 از سلول‌های T شوند (۱۶). اندول آمین دی اکسیژناز (IDO) یکی از مولکول های ترشحی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد که به دنبال تحریک با IFN-γ در آنها القا شده و با تجزیه تریپتوفان به متابولیت های سمی موجب غیر فعال کردن سلول های T موجود در محیط می‌گردد (۱۷). سلول‌های بنیادی مزانشیمی قادرند تمایز منوسیتها و پیش سازهای خونی CD34+ به سلول‌های دندریتیک را مهار کرده و بیان سطحی MHC-II، مولکولهای کمک تحریکی و همچنین تولید IL-12 و TNF-α را در سلول‌های دندریتیک کاهش دهند (۱۸). این سلولها همچنین باعث تحریک تولید سلول‌های CD4+CD25+ Treg و CD8+Treg می شوند. به‌علاوه سلول‌های بنیادی مزانشیمی با ترشح TGF-β، تکثیر و فعالیت سایتوتوکسیسیته سلول‌های NK و تولید IFN-γ توسط آنها را مهار می کنند. یکی دیگر از مکانیسم های مهاری سلول‌های بنیادی مزانشیمی ترشح فاکتورهای محلولی دیگری مانند HGF، PGE2 و HLA-G5 می‌باشد (۱۹). تعیین اثر سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر میزان تکثیر سلول‌های تک هسته ای طحالی موش دیابتی در حضور تحریک کننده اختصاصی (لایزیت جزایر پانکراس) در محیط آزمایشگاه از اهداف اصلی بوده و القای دیابت در موشهای C57BL/6 با تزریق دوز های پایین و متوالی استرپتوزوتوسین، جدا سازی، تعیین قابلیت تمایزی و تعیین هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی موش، از اهداف فرعی طرح می‌باشد.

روش کار

القای دیابت در موش C57BL/6: موشهای ماده از نژاد C57BL/6 (انستیتوپاستور) پس از شش ساعت ناشتایی، با روش تزریق داخل صفاقی چندین دوز پائین از استرپتوزوسین (50 mg/kg, Sigma) در ۵ روز متوالی، دیابتی شدند.

بعد از ۲ هفته از آخرین تزریق، موشها از نظر افزایش قند خون با گلوکومتر بررسی و سرم آنها از نظر میزان انسولین با تکنیک الایزا سنجش گردید. قند خون بالای ۳۰۰mg/dl دیابتی در نظر گرفته شد. برای تایید بیشتر، توده پانکراس از موش کشته شده برداشت و برای تهیه مقاطع بافتی به آزمایشگاه پاتولوژی تحویل داده شد. برش های رنگ آمیزی شده از نظر وضعیت جزایر پانکراس در بافت بررسی شدند.

جداسازی سلول‌های مزانشیمی بافت چربی، کشت و تکثیر: موشهای نژاد C57BL/6 (انستیتو پاستور) پس از قربانی کردن به روش Dislocation آماده جداسازی بافت چربی شدند. با بریدن کمی از پرده صفاقی بافت چربی قسمت انتهایی شکم جدا و با کلاژناز تیپ یک با غلظت ۰.۱ گرم درصد هضم گردید. در مرحله بعد پس از سانتریفوژ کردن رسوب محتوی سلول‌های مزانشیمی با محیط DMEM High Glucose (GIBCO) + ۱۰٪ FBS + L ۲mM گلوتامین، پنی سیلین و استرپتومایسین (Invitrogen) هموژن شده و داخل فلاسک ۷۵ cm^2 کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه و ۵٪ CO2 انکوبه گردید. سلول‌های MSCs کشت داده شده به این روش به فلاسک چسبیده و شکلی شبیه فیبروبلاست پیدا می کنند و در عرض ۲ تا ۳ روز تولید کلنی می نمایند. بعد از طی زمانی حدود ۲ هفته سلولها تقریبا ۸۰-۷۰ درصد کف فلاسک را پر می کنند و همگی به‌صورت تک لایه و دوکی شکل در می آیند. در ادامه به‌واسطه تریپسین ۰.۲۵٪ و EDTA ۰.۲٪ جدا شده و سلول‌های هر فلاسک ۷۵ cm^2 بسته به نیاز در ۲ تا ۳ فلاسک ۷۵ cm^2 دیگر پاساژ داده می شوند تا کاملا خالص گردند.

ایمونو فنوتایپینگ و سنجش پتانسیل تمایزی

بـه دو رده اسـتخوان و چربـی جهـت آنـالیز فلوسایتومتری سلول‌هـای بنیـادی مزانشـیمی از سلول‌های پاساژ دوم استفاده گردیـد و بـا مقـدار لازم (۱µl) از هـر آنتـی بـادی؛ CD31، CD45، CD105، CD73، CD90، CD29، CD11b، CD34 (eBioscience) و یـا کنتـرل ایزوتایپی مناسـب آنهـا طبـق پیشـنهاد شـرکت سازنده رنگ آمیزی شـدند. بـرای تاییـد ماهیـت مزانشیمی، سلول‌های بنیـادی پـس از تکثیـر در محیط کشت در محیط های تمایزی به رده های استخوانی و چربی تمایز داده شدند. تمایز سلولها به بافت استخوانی و چربـی بـه ترتیـب بـا رنـگ آمیزی های اختصاصـی Alizarin red و Oil red ارزیابی گردید.

استخراج جزایر پانکراس و تهیه لایزیت سلولی: بعد از قربانی کردن موش و جداکردن پانکراس و تبدیل آن به قطعات کوچـک، بافـت خـرد شـده جهت عملیات هضم آنزیمی به لولـه فـالکون ۱۵ میلـی لیتـری حـاوی محلـول کلاژنـاز تیـپ XI (Sigma; 0.5 mg/ml) منتقل و حدود ۲۰ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه انکوبـه گردیـد. محتویـات هضم شده سانتریفوژ و از مش ۰٫۵ میلـی متـری عبور داده شد. جزایـر پـانکراس بـه دلیـل انـدازه بزرگتر از مش عبور نمـی کننـد. در ادامـه مـش به‌صورت وارونه در پتری دیش حاوی ۲ سی سی محیط قرار گرفت تا این سـلولها بـه محـیط وارد شوند. در مرحله نهایی جزایر پانکراس با اسـتفاده از سمپلر زیر لوپ جمع آوری شدند. بـرای تهیـه لایزیت تعداد ۱۰ عدد از جزایـر پـانکراس جمـع آوری شده داخل میکروتیوب ۱٫۵ ریخته شد و با فریز و دفریز کردن در ازت مایع و بـن مـاری ۳۷ درجه سلولها لیـز و از آن لایزیـت سـلولی تهیـه گردید.

استخراج سلول‌های تـک هسـته ای طحـالی و تایید سلامت رشد و تکثیری پس از خارج کردن طحال از بدن موش در شرایط استریل، با استفاده از سـرنگ حـاوی محـیط کشـت RPMI 1640، محتـوای سـلولی طحـال تخلیـه شـده و پـس از شستشو و لیز گلبول های قرمز توسـط بـافر لیـز سلول‌های تک هسته ای شمارش گردید. از آنجـا کـه سـلول‌هـای طحـالی در شـرایط مختلـف و همچنـین در نژادهـای مختلـف موشـی تکثیـر متفاوتی از خود نشان می دهند برای رسیدن بـه بهترین رقـت از ایـن سـلولها بـرای انجـام تسـت MTT، این سلولها در تعـداد یـک میلیـون، ۵۰۰ هزار، ۴۰۰ هزار، ۲۰۰ هزار، ۱۰۰ هزار، ۵۰ هـزار، ۱۰ هزار و ۵ هزار در چاهک های پلیت ۹۶ خانه در حجم ۱۰۰ میکرولیتر از محیط RPMI 1640 ریخته شـد. پـس از آزمـایش MTT تعـداد ۲۵۰ هزار عدد از سلول‌هـای طحـالی بعنـوان بهتـرین رقـت بـرای ادامـه پـروژه انتخـاب گردیـد. بـرای بررسی سلامت تکثیری، ایـن سـلولها در معـرض تحریک کننده غیر اختصاصی PHA قرار گرفتند و تست MTT بر روی آنهـا انجـام گردیـد. بـرای تایید زنده بـودن سـلول‌هـای تـک هسـته ای بـا تریپان بلو رنگ آمیزی شدند.

همکشتی سلول‌های مزانشیمی با سـلول‌هـای تک هسته ای طحالی و لایزیت جزایـر پـانکراس سلول‌های مزانشیمی پس از جداسازی به همـراه سـلول‌هـای تـک هسـته ای طحـالی در حضـور لایزیت جزایر پانکراس در گروههـای زیـر کشـت داده شدند:

۱- سلول‌هـای مزانشـیمی + سـلول‌هـای تـک هسته ای طحالی نرمال + لایزیت جزایر پانکراس

۲- سلول‌هـای مزانشـیمی + سـلول‌هـای تـک هسته ای طحالی دیابتی + لایزیت جزایر پانکراس

۳- سلول‌هـای مزانشـیمی + سـلول‌هـای تـک هسته ای طحالی نرمال

۴- سلول‌هـای مزانشـیمی + سـلول‌هـای تـک هسته ای طحالی دیابتی

۵- سلول‌های تک هسـته ای طحـالی نرمـال + لایزیت جزایر پانکراس

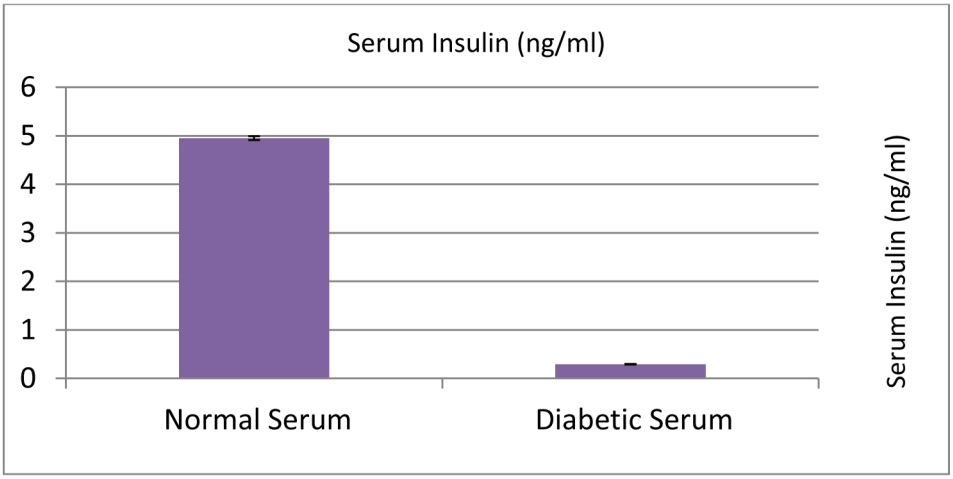
۶- سلول‌های تک هسته ای طحـالی دیـابتی + لایزیت جزایر پانکراس

۷- سلول‌های تک هسته ای طحالی نرمال

۸- سلول‌های تک هسته ای طحالی دیابتی

۹- سلول‌های مزانشیمی

سـلول‌هـای مزانشـیمی در رقتهـای ۱:۵۰، ۱:۲۵۰، ۱:۱۲۵۰ نسـبت بـه سـلول‌هـای تـک هسته‌ای طحالی در پلیـت ۹۶ خانـه کشـت داده



نمودار ۱- میزان انسولین سرم در موش نرمال و دیابتی (نتایج حاصل از سه بار تکرار مستقل می باشد)

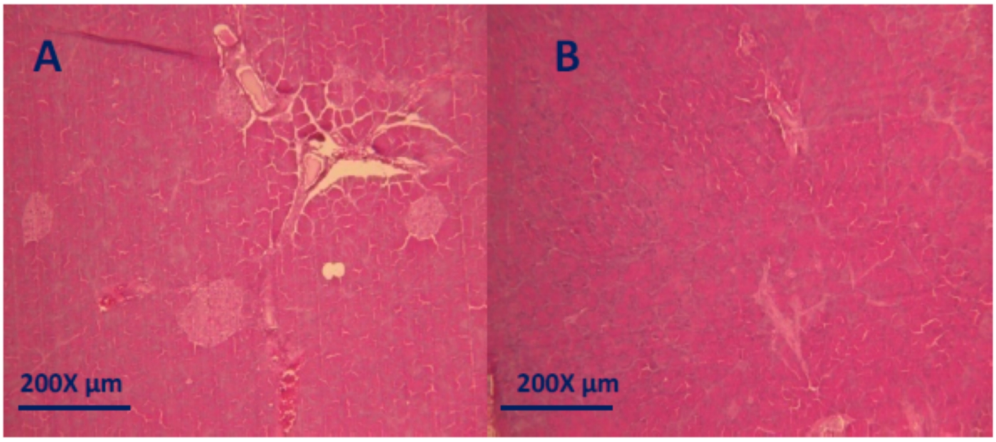
شدند و بعد از گذشت ۲۴ ساعت و رسیدن سلولها به شرایط دلخواه و ۲ الی ۳ مرتبه شستشو با PBS، به مدت ۱ ساعت با میتومایسین (1μg/μl) مجاور گشتند. در ادامه تعداد ۲۵۰ هزار از سلول‌های تک هسته ای طحالی به همه چاهکها افزوده و متعاقبا ۱۰ میکرولیتر از لایزیت تهیه شده جزایر پانکراس نیز اضافه شد. سپس محیط کشت تازه سلول های طحالی (RPMI 1640) به نسبت ۵۰٪ با محیط کشت سلول های بنیادی مزانشیمی بافت چربی (DMEM High Glucose) مخلوط گردید. بعد از گذشت ۴۸ ساعت انکوباسیون در انکوباتور با دمای ۳۷°C دارای ۹۵٪ رطوبت و ۵٪ CO_2 به هر کدام از چاهک‌ها ۲۰ میکرولیتر (5mg/ml) MTT اضافه گردید و بعد از ۴ الی ۶ ساعت انکوباسیون، محیط رویی حذف و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO جایگزین شد. در نهایت جذب نوری چاهکها در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانش گردید. در نهایت جذب نوری گروه‌های تحریک شده به جذب نوری گروه کنترل منفی (گروهی که فقط سلول طحال در چاهک ریخته شده بود) تقسیم و اندکس تکثیری گزارش گردید. (در گروه‌هایی که سلول‌های مزانشیمی حضور داشتند OD این سلولها از گروهها حذف شد).

نتایج قند خون و انسولین سرم و هیستوپاتولوژی پانکراس: قند خون موشهای سالم و دیابتی با گلوکومتر بررسی و قند بالای mg/dl ۲۰ ± ۳۰۰ دیابتی در نظر گرفته شد. سرم آنها نیز از نظر میزان انسولین با تکنیک الایزا سنجش گردید که در مدل دیابتی مقدار آن بصورت معنی داری کاهش یافته بود (4.9 ± 0.5 *vs*. 0.3 ± 0.1) ($p<۰/۰۵$) (نمودار ۱).

نمونه های بافت پانکراس جدا شده از موش سالم و دیابتی پس از تهیه مقطع و رنگ آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین از نظر تعداد جزایر پانکراس در بافت بررسی شدند. هیستوپاتولوژی پانکراس در موش دیابتی در مقایسه با موش سالم در شکل ۱ نشان داده شده است.

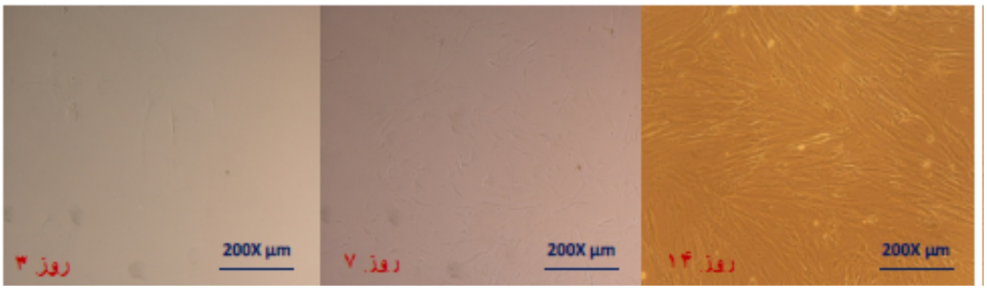
نتایج حاصل از استخراج و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی بعد از استخراج و کشت به مدت ۱۴ روز به تعداد لازم در کف فلاسک رسیدند. شکل ۲ سلول‌های مزانشیمی را در روزهای مختلف کشت نشان می‌دهد.

نتایج حاصل از ایمونو فنوتایپینگ سلول‌های مزانشیمی با فلوسایتومتری: نتایج فلوسایتومتری نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی بیش از ۲۳٪ شاخص CD105، بیش از ۶۳٪ شاخص CD29، بیش از ۲۱٪ شاخص CD73، بیش از ۴۲٪ شاخص CD90 را در سطح خود بارز می‌کنند؛ اما برای شاخص CD34، CD45، CD31 و CD11b این مقدار به ترتیب ۱، ۲، ۴ و



شکل ۱- هیستوپاتولوژی پانکراس در موش سالم و دیابتی

A- هیستوپاتولوژی پانکراس در موش سالم، B -هیستوپاتولوژی پانکراس در موش دیابتی بعد از تزریق STZ



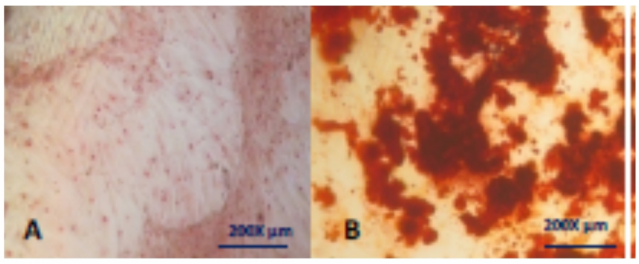
شکل ۲- سلولهای مزانشیمی بافت چربی در روزهای مختلف کشت

۳ درصد بود. این نتایج با ویژگی ایمونوفنوتایپ MSCs تطابق داشت (۲۰).

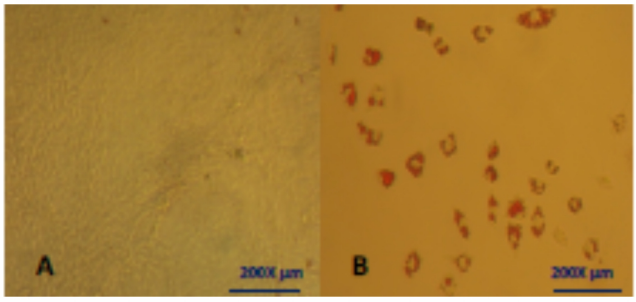
نتایج حاصل از کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی در محیط های تمایزی: با توجه به اینکه سلول‌های بنیادی مزانشیمی شاخص ابتدائی و ثابتی را برای اثبات رده خود ندارند بنابراین در کنار فلوسایتومتری، نیاز است تا این سلولها در محیط های تمایزی به رده‌های اختصاصی تمایز داده شوند تا ماهیت مزانشیمی بودن آنها تایید گردد. بدین منظور این سلولها پس از تکثیر در محیط کشت در محیط های تمایزی به رده های استخوانی (استئوسیت) وچربی (آدیپوسیت) تمایز داده شدند. شکل ۳ تمایز به رده استخوانی را نشان می‌دهد و سلول‌های تمایز یافته رنگ Alizarin Red را به خود گرفته اند (A) در حالی که سلول‌های تمایز نیافته این ویژگی را از خود نشان نمی دهند (B).

همانطوری که در شکل ۴ مشاهده می‌گردد از رنگ آمیزی Oil Red برای شناسایی تمایز سلولها به رده چربی استفاده شده است. سلول‌های آدیپوسیت به رنگ قرمز در آمده اند (A) در حالی که سلول‌های تمایز نیافته چنین نیستند (B).

نتایج حاصل از اعتبار سنجی کشت های همزمان در گروههای اصلی نرمال و دیابتی با استفاده از تکنیک MTT: کشت های همزمان در ۶ گروه اصلی نرمال و دیابتی انجام شد و با استفاده از تکنیک MTT اعتبار سنجی شد. در گروههای ۱ و ۲، اثر مهاری سلول‌های مزانشیمی بر میزان تکثیر سلول‌های تک هسته ای طحالی نرمال و دیابتی در حضور تحریک کننده اختصاصی (لایزیت جزایر پانکراس) آزمایش گردید. همچنین در گروه ۵ و ۶ سلامت و رشد تکثیری سلول‌های تک هسته ای طحالی نرمال و دیابتی با حضور لایزیت جزایر پانکراس مقایسه شد. گروههای ۷ و ۸ نیز به ترتیب برای OD تعداد اولیه سلول‌های طحالی نرمال و دیابتی و گروه ۹ نیز برای حذف OD حضور سلول‌های



شکل ۳- تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی بافت چربی به استئوسیت
A- سلولهای مزانشیمی تمایز یافته به استئوسیت، B- سلولهای مزانشیمی بدون تمایز (گروه کنترل)



شکل ۴- تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی بافت چربی به آدیپوسیت
A- سلولهای مزانشیمی تمایز یافته به آدیپوسیت، B- سلولهای مزانشیمی بدون تمایز (گروه کنترل)

مزانشیمی در آزمایش MTT منظور گردیدند.

مقایسه اندکس تکثیری در گروههای کشت همزمان: A) سلول‌های تک هسته ای طحالی نرمال چه زمانی که با لایزیت جزایر پانکراس تحریک می شوند و چه زمانی که بدون تحریک می مانند (- lysate) تکثیر پیدا نمی کنند (abars; $p^a>0.05$)، اگرچه تعدادی از سلول‌های طحالی در مجاورت سلول‌های مزانشیمی در مقایسه با گروه (- MSC) دچار مرگ سلولی می‌گردند (b bars in +/- lysate groups; $p^b<0.05$) (اندکس تکثیری کمتر از یک). شدت القای آپوپتوز در سلول های طحالی به تعداد سلول‌های مزانشیمی وابسته بود.

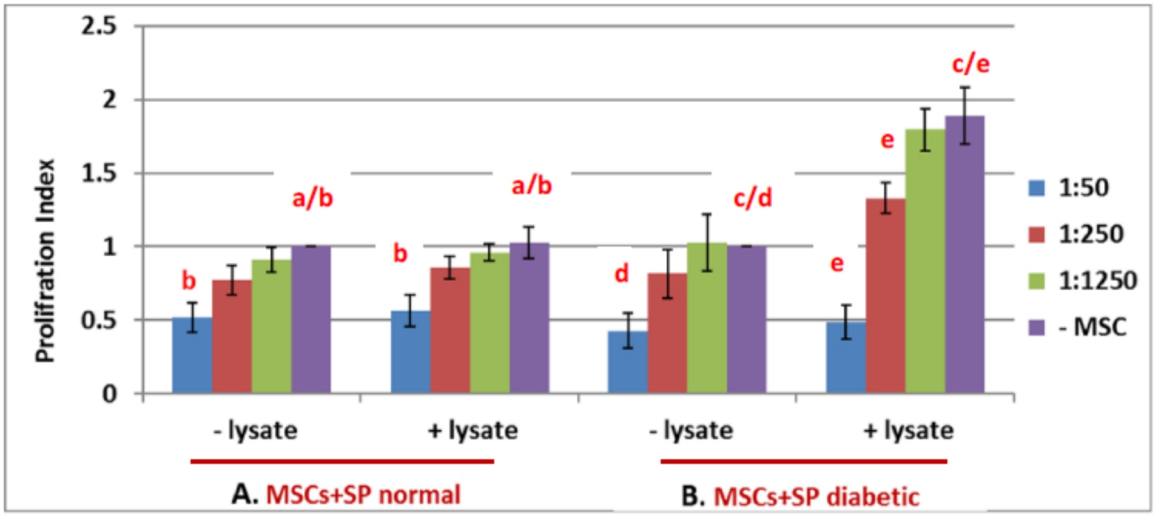
B) تکثیر سلول‌های تک هسته ای طحالی دیابتی در حضور تحریک کننده اختصاصی (لایزیت جزایر پانکراس) در مقایسه با گروه (- lysate) به طور چشمگیری افزایش می‌یابد (cbars; $P^c<0.05$)

- سلول‌های تک هسته ای طحالی دیابتی بدون حضور محرک اختصاصی تکثیر نمی شوند. اگرچه تعدادی از سلول های طحالی در مجاورت سلول‌های مزانشیمی در مقایسه با گروه (- MSC) دچار مرگ سلولی می گردند (d bars; $P^d<0.05$)، اندکس تکثیری کمتر از یک شدت القای آپوپتوز در سلول‌های طحالی به تعداد سلول‌های مزانشیمی وابسته بود.

- سلول‌های مزانشیمی تکثیر سلول‌های تک هسته ای طحالی دیابتی تحریک شده با لایزیت جزایر پانکراس را به صورت وابسته به دوز مهار می کنند. (e bars; $P^e<0.05$) البته سلول‌های مزانشیمی در کمترین رقت خود (۱:۵۰) میزانی از آپوپتوز را نیز در سلول‌های طحالی القا می‌کنند (اندکس تکثیری کمتر از یک).

بحث و نتیجه گیری

ویژگی مهم سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) ایمونوژنیسیته پایین و قدرت مهار کنندگی از طریق تماس مستقیم سلولی و یا ترشح فرآورده های سلولی آنهاست که به عنوان ابزاری جدید برای سلول درمانی در اختلالات دژنرایتو ، التهاب مزمن، پیوند (اعضا و مغز استخوان) و بیماریهای خود ایمنی مطرح گردیده است. پیوند جزایر پانکراس می‌تواند بیماران را از مصرف انسولین بی نیاز سازد و جایگزینی برای



نمودار ۲- نتایج حاصل از آزمایش MTT در حضور لایزیت جزایر پانکراس در گروههای اصلی نرمال و دیابتی (نتایج حاصل از سه بار تکرار مستقل می باشد)

سلول‌های ترشح کننده انسولین باشد، اما بدلیل کمبود اهداکنندگان پانکراس و نیز احتمال بروز پاسخهای ایمنی (اتوراکتیو و آلوژنیک)، نیازمند تعدیل ایمنی می‌باشد (۷). در سالهای اخیر توجه زیادی به کاربرد درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در دیابت تیپ یک معطوف شده است که هدف آن استفاده از عملکرد ایمونومدولاتوری آنها و ترمیم سلول‌های ترشح کننده انسولین می‌باشد (۲۱). شناخت دقیق مکانیسم تنظیم ایمنی سلول‌های بنیادی مزانشیمی و فاکتورهای موثر بر آنها می‌تواند ما را در جهت استفاده صحیح و بهینه از این روش کمک نماید.

هدف از انجام این طرح بررسی اثر ایمونومدولاتوری سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی موش در مهار پاسخ سلول‌های تک هسته ای طحالی موش دیابتی علیه جزایر پانکراس در محیط آزمایشگاه بود.

در این مطالعه ابتدا موشهای C57BL/6 با استرپتوزوتوسین دیابتی شدند. قند خون موشها تقریبا بعد از دو هفته از آخرین تزریق با گلوکومتر چک گردید که قند خون بالای mg/dl ۳۰۰ ثبت گردید. انسولین سرم موشها نیز به طور معنی داری کاهش یافته بود. برای تایید بیشتر شرایط دیابتی، پانکراس موش سالم و دیابتی نیز جدا گردید و پس از تهیه مقطع بافتی و رنگ آمیزی H&E به وضوح تخریب جزایر پانکراس در موش دیابتی در مقایسه با موش سالم مشاهده گردید. در ادامه سلول‌های مزانشیمی بافت چربی موش سالم پس از استخراج در محیط آزمایشگاه، کشت و تکثیر داده شدند.

در مطالعه ای که Ekaterina ivanova و همکاران وی انجام دادند مشخص شد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی انسانی در مقایسه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان به دلیل ظرفیت بالاتر و متنوع تر ترشح فاکتورهای محلول اثر مهاری بهتری روی سلول‌های دندریتیک انسانی دارند(۲۲). سلول‌های بنیادی بافت چربی بدون اینکه در میزان تکثیر آنها خدشه ای وارد شود به مدت طولانی در محیط کشت قابلیت رشد دارند، از طرفی مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی و همچنین فاکتورهای نسخه برداری حیاتی برای عملکرد سلول‌های بنیادی (Rex1، Oct4 وSox) را به میزان بالایی بیان می‌کنند (۲۳). Puissant و همکاران وی در سال ۲۰۰۵ ثابت کردند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی اثر مهاری بهتری نسبت به سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان روی تکثیر لنفوسیت‌های تحریک شده با میتوژن PWM دارند (۱۷). در نهایت سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی به دلیل استحصال آسان و کشت و تکثیر ساده تر در محیط

آزمایشگاه و خواص ایمونومدولاتوری بهتر، جایگزین ایده آلی برای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغزاستخوان می باشند (۲۴). بنابراین از این سلولها برای تحقیق استفاده گردید.

در ادامه برای تعیین هویت، سلول‌های مزانشیمی با تکنیک فلوسایتومتری آنالیز شدند که نتایج مشابهی از نظر بیان مارکرها با مطالعات گذشته گرفته شد (۲۰). برای تایید نیز خاصیت تمایزی این سلولها به دو رده چربی و استخوان بررسی شد که این سلولها به میزان قابل قبولی تمایز به استئوسیت و آدیپوسیت را از خود نشان دادند.

برای بررسی خواص ایمونومدولاتوری سلول‌های مزانشیمی پس از همکشتی آنها با سلول‌های طحالی نرمال و دیابتی تست MTT انجام گردید. آزمایش MTT روی رقتهای مختلف سلول‌های طحالی اجرا شد. بعد از بهینه سازی رقت های مختلف سلول‌های تک هسته ای طحالی تعداد ۲۵۰ هزار از این سلولها برای ادامه تحقیق انتخاب گردید.

برای تایید سلامت تکثیری سلول‌های تک هسته ای طحالی، این سلولها در معرض تحریک کننده غیر اختصاصی PHA قرار گرفتند و آزمایش MTT روی رقتهای مختلف سلول‌های طحالی اجرا شد. با توجه به اندکس های تکثیری سه رقت از سلول‌های طحالی و همچنین مقایسه این اندکس ها در زمانهای مختلف، در این مرحله هم همان تعداد از سلول‌های طحالی مرحله قبل تکثیر بهتری از خود در ۴۸ ساعت نشان دادند.

ما در این پروژه به دنبال اثبات خاصیت ضد تکثیری سلول‌های مزانشیمی بر روی سلول‌های تک هسته ای طحالی در حضور تحریک کننده اختصاصی (لایزیت جزایر پانکراس) در محیط آزمایشگاه بودیم که بر این اساس گروههای مختلفی طراحی شد. نتایج حاصل نشان داد که سلول‌های طحالی نرمال چه در حضور تحریک کننده اختصاصی (لایزیت پانکراس) و چه بدون تحریک کننده تکثیر نمی شوند و زمانی که سلول های مزانشیمی اضافه شدند تعدادی از سلول های طحالی نرمال به دلیل اینکه در حالت غیر فعال قرار داشتند و همچنین دراثر مدیاتورهای مترشحه از سلول های مزانشیمی (احتمالا NO)، دچار آپوپتوز شدند و اندکس تکثیری آنها به زیر یک نزول کرد. اندکس تکثیری سلول‌های طحالی نرمال بدون تحریک، یک می‌باشد (۲۵-۲۷).

تکثیر سلول‌های طحالی دیابتی در حضور تحریک کننده اختصاصی (لایزیت جزایر پانکراس) به طور معنی داری افزایش داشت. سلول های مزانشیمی به صورت وابسته به دوز (در رقتهای ۱:۵۰، ۱:۲۵۰، ۱:۱۲۵۰) توانستند تکثیر سلول های طحالی دیابتی را در حضور تحریک کننده اختصاصی (لایزیت جزایر پانکراس) به طور معنی داری کاهش دهند. به طوری که بیشترین اثر مهاری در کمترین رقت از سلول‌های مزانشیمی (۱:۵۰) دیده شد. البته سلول‌های مزانشیمی در کمترین رقت خود میزانی از آپوپتوز را نیز در سلول‌های طحالی القا می کردند (۲۶).

تعدادی از سلول‌های طحالی دیابتی مانند سلول‌های طحالی نرمال در حضور سلول‌های مزانشیمی و بدون حضور هرگونه تحریکی دچار آپوپتوز می شوند و اندکس تکثیری آنها به زیر یک می رسد (اندکس تکثیری سلول‌های طحالی دیابتی بدون تحریک، یک می‌باشد).

P. Renner و همکاران در سال ۲۰۰۹ مطالعه‌ای برای ارتباط دادن توانایی مهاری سلول‌های بنیادی مزانشیمی به ماهیت محیط التهابی و ایمونولوژیک محرکها انجام دادند. آنها ابتدا دوز بالایی از میتوژن Concavalin (Con A) A را به محیط کشت حاوی سلول‌های T اضافه کردند و در ادامه مشاهده شد که تکثیر سلول‌های T CD3+ به طور واضحی با اضافه کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوژن مهار می شود. در مرحله بعدی دوز متوسطی از Concavalin A استفاده گردید که در این مرحله اضافه کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی پاسخ دهندگی سلول‌های T را تقویت کرد. در آخر به‌واسطه دوزهای خیلی پایین از Con A مجددا سلول‌های بنیادی مزانشیمی اثر مهاری خود را بدست می آورند (۲۸).

Tyndall و همکاران در سال ۲۰۰۷ مشاهده کردند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان که از دو دسته از افراد سالم و بیماران مبتلا به خود ایمنی استخراج شده بودند در مجاورت سلول های تک هسته ای خون محیطی (PBMC) آلوژنیک و اتولوگوس که توسط AntiCD3 Mab به تنهایی یا همراه با Anti CD28 Mab تحریک شده بودند تا ۹۰٪ قابلیت مهار تکثیر سلول‌های تک هسته ای خون محیطی را دارند (۲۹).

Paolo Fiorina و همکاران وی برای بررسی نقش مهاری سلول‌های بنیادی مزانشیمی در دو الگوی آلو ایمیون و اتو ایمیون در شرایط in vitro مطالعه ای انجام دادند. در مرحله اول برای طراحی Full Mismatch MLR سلول‌های T CD4+ موش BALB/C به عنوان پاسخ دهنده و سلول‌های دندریتیک از موش C57Bl/6 به عنوان سلول تحریک کننده به مدت ۸ روز با هم کشت داده شدند. در ادامه سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش NOD و BALB/C در دو مرحله جدا گانه به محیط اضافه می شوند، بعد از چند ساعت انکوباسیون با H 3 Thymidin مشاهده گردید که هر دو گونه سلول‌های بنیادی مزانشیمی توانایی مهار پاسخهای MLR را از خود نشان می دهند، اگرچه سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش BALB/C اثر مهاری بهتری در مقایسه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش NOD از خود نشان می دادند. در مرحله بعدی برای بررسی نقش مهاری سلول‌های بنیادی مزانشیمی در الگوی اتوایمیون، سلول‌های T CD4+ اتوراکتیو از موش Transgenic TCR BDC 2.5 استخراج و با CSFE نشان دار گردیدند. سپس به مدت ۳ روز در حضور سلول‌های دندریتیک موش NOD و سلول‌های بنیادی مزانشیمی BALB/C یا NOD و همچنین پپتید سلول‌های بتای پانکراس کشت داده شدند، در نهایت مشاهده گردید که هر دو گونه سلول‌های بنیادی مزانشیمی می توانند تکثیر سلول‌های T اتوراکتیو را در invitro به یک میزان کاهش دهند (۳۰).

شناخت دقیق مکانیسم ایمونومدولاتوری سلول‌های بنیادی مزانشیمی و فاکتورهای موثر بر آنها می‌تواند ما را در جهت استفاده صحیح و بهینه از این روش درمانی کمک نماید. لذا اجرای این طرح در مدل موش دیابتی و بررسی نقش ایمونومدولاتوری سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی موش در محیط آزمایشگاه به عنوان یک مدل مناسب نه تنها برای تعیین اثرتنظیم ایمنی این سلولها در پاسخهای اتوراکتیو دیابت بلکه استفاده از این ویژگی در همراهی با توانایی تمایزی این سلولها به سلول‌های ترشح کننده انسولین، در آینده برای درمان دیابت حائز اهمیت خواهند بود.

تقدیر و تشکر

این تحقیق تحت حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام شده است. بدین وسیله نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین محترم آن معاونت محترم ابراز می دارند. لازم به ذکر است که این تحقیق با همکاری صمیمانه مرکز تحقیقات فناوری بن یاخته تهران و با حمایت های این مرکز انجام شده است.

منابع

1. Todd JA. Etiology of type 1 diabetes. Immunity. 2010; 32:457-67.
2. Bernardi S, Severini GM, Zauli G, Secchiero P. Cell-based therapies for diabetic complications. Exp Diabetes Re. 2012;8:72504.
3. Van Belle TL, Coppieters KT, Von Herrath MG. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. Physiol Rev. 2011;91:79-118.
4. Balamurugan AN, Bottino R, Giannoukakis N, Smetanka C. Prospective and challenges of islet transplantation for the therapy of autoimmune diabetes. Pancreas. 2006;32:231-43.
5. Agarwal A, Brayman KL. Update on islet cell transplantation for type 1 diabetes. Semin Intervent Radiol. 2012;29:90-8.
6. Ozawa K, Sato K, Oh I, Ozaki K, Uchibori R, Obara A, et al. Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs). J Autoimmun. 2008;30:121-7.
7. Aguayo-Mazzucato C, Bonner-Weir S. Stem

cell therapy for type 1 diabetes mellitus. Nat Rev Endocrinol. 2010;6:139-48.

8. Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, Jorgensen C, Noel D. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. Stem Cell Res Ther. 2010;1:2.

9. Zhou H, Jin Z, Liu J, Yu S, Cui Q, Yi D. Mesenchymal stem cells might be used to induce tolerance in heart transplantation. Med Hypotheses. 2008.;70:785-7.

10. Pokrywczynska M, Krzyzanowska S, Jundzill A, Adamowicz J, Drewa T. Differentiation of stem cells into insulin-producing cells: current status and challenges. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2013;61:149-58.

11. Kabelitz D, Geissler EK, Soria B, Schroeder IS, Fandrich F, Chatenoud L. Toward cell-based therapy of type I diabetes. Trends Immunol. 2008.;29: 68-74.

12. Abdi R, Fiorina P, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH. Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. Diabetes. 2008;57:1759-67.

13. Stanekzai J, Isenovic ER, Mousa SA. Treatment options for diabetes: potential role of stem cells. Diabetes Res Clin Pract. 2012;98:361-8.

14. English K, Wood KJ. Mesenchymal stromal cells in transplantation rejection and tolerance. Cold Spring Harb Perspect Med. 2013;3:a015560.

15. Sui W, Hou X, Che W, Chen J, Ou M, Xue W, et al. Hematopoietic and mesenchymal stem cell transplantation for severe and refractory systemic lupus erythematosus. Clin Immunol. 2013;148:186-197.

16. Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B, Kitagawa Y, Tompkins RG, Kobayashi E, et al. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. Cell Transplant. 2010;19:667-79.

17. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. Stem Cells. 2006;24: 1294-301.

18. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. Bloo. 2009; 113: 6576-83.

19. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, et al. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25 high FOXP3+ regulatory T cells. Stem Cells. 2008;26: 212-22.

20. Hashemi SM, Hassan ZM, Pourfathollah AA, Soudi S, Shafiee A, Soleimani M. Comparative immunomodulatory properties of adipose-derived mesenchymal stem cells conditioned media from BALB/c, C57BL/6, and DBA mouse strains. J Cell Biochem. 2013;114: 955-65.

21. Hoogduijn MJ, Popp F, Verbeek R, Masoodi M, Nicolaou A, Baan C, et al. The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their use for immunotherapy. Int Immunopharmacol. 2010;10:1496-500.

22. Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Dimitrov R, Bukarev D, Kyurkchiev S, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Immunol Lett. 2009;126: 37-42.

23. Zhu Y, Liu T, Song K, Fan X, Ma X, Cui Z. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. Cell Biochem Funct. 2008;26:664-75.

24. Bochev I, Elmadjian G, Kyurkchiev D, Tzvetanov L, Altankova I, Tivchev G, et al. Mesenchymal stem cells from human bone marrow or adipose tissue differently modulate mitogen-stimulated B-cell immunoglobulin production in vitro. Cell Biol Int. 2008;32:384-93.

25. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. Cell Stem Cell. 2008;2:141-50.

26. Yang SH, Park MJ, Yoon IH, Kim SY, Hong SH, Shin JY, et al. Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. Exp Mol Med. 2009;41:315-24.

27. Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, et al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. Blood. 2007;109:228-34.

28. Renner P, Eggenhofer E, Rosenauer A, Popp FC, Steinmann JF. Mesenchymal stem cells require a sufficient, ongoing immune response to exert their immunosuppressive function. Transplant Proc. 2009;41:2607-11.

29. Bocelli-Tyndall C, Bracci L, Spagnoli G, Braccini A, Bouchenaki M, Ceredig R, et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells (BM-MSCs) from healthy donors and auto-immune disease patients reduce the proliferation of autologous- and allogeneic-stimulated lymphocytes in vitro. Rheumatology (Oxford). 2007;46:403-8.

30. Fiorina P, Jurewicz M, Augello A, Vergani A, Dada S, La Rosa S, et al. Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes. J Immunol. 2009;183:993-1004.

Assessing in vitro inhibitory effect of adipose-derived mesenchymal stem cells on C57BL/6 diabetic mouse splenocytes proliferation

Hossein Rahavi, Division of Transplant Immunology and Immunogenetics, Department of Immunology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Seyed Mahmoud Hashemi, Department of Immunology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
Masoud Soleimani, Department of Hematology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
Jamal Mohammadi, Department of Immunology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
***Nader Tajik**, Division of Transplant Immunology and Immunogenetics, Department of Immunology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (*Corresponding author).

Abstract

Background: Type 1 diabetes (T1D) is a T-cell mediated autoimmune disorder in which pancreas beta-cell destruction causes insulin deficiency and hyperglycemia. In addition to daily insulin treatment, allogeneic islet transplant inT1D is another therapeutic way that needs immunosuppressive drugs to control autoimmune damage and graft rejection. Since life-long application of these drugs is associated with serious side-effects, we proposed local immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells (MSCs). The aim of this study was to investigate in vitro inhibitory influence of adipose-derived MSCs on C57BL/6 diabetic mouse splenocytes proliferation against syngeneic islet cells lysate.

Methods: MSCs were extracted from abdominal fat tissue of healthy C57BL/6 mouse and cultured to prolipherate. Then, they were immunophynotyped and their differentiation to osteo- and adipocyte was approved. Diabetic C57BL/6 mouse model was prepared by administration of consecutive low-doses of sterptozotocin and diabetic state was confirmed by serum glucose (>300 mg/dL) and insulin levels, and pancreas histopathology. Pancreas islets were isolated from healthy mouse and splenocytes prepared from healthy and diabetic mice. To evaluate anti-proliferative effect of MSCs, they were co-cultured with splenocytes in the presence of islet lysate and proliferation was assayed by MTT technique. The presented data are mean SD and statistically analyzed with one way ANOVA.

Results: Extraction and identification (Immunolphenotyping and differentiation) of MSCs had acceptable outcome.Diabetic state was confirmedin our model (blood glucose: 300±20 vs. 95±10; Insulin level: 4.9±0.5 vs 0.3±0.1; and lack of Langerhans islets in tissue sections). The co-culture experiments demonstrated that MSCs significantly decreased diabetic splenocytes proliferation in the presence of islet cells lysate ($p<0.05$).

Conclusion: MSCs can effectively inhibit autoimmune response of diabetic splenocytes against islet cells lysate. Assessing MSCs immunomodulatory effects and differentiation property to insulin-producing cells may provide a new horizon for T1D treatment in the future.

Keywords: Islets of pancreas, Mesenchymal stem cells, Type 1 diabetes, Transplantation.