

اثر مهارى سلول‌هاى بنيادى مشتق از خون قاعدگى بر توليد سلول‌هاى دندريتيك از منشأ مونوسيت‌هاى خون محيطى

محمود بزرگمهر^۱، امير حسن زرنانى^{۲،۳}، على شيخيان^۴، مژده صالح‌نيا^۵، على جبارى ارفعى^۶، سيد محمد مؤذنى^{۷*}

۱- دانشجوى دكتورى تخصصى، گروه ايمنى‌شناسى، دانشكده علوم پزشكى، دانشگاه تربيت مدرس، تهران، ايران

۲- دانشيار، مركز تحقيقات نانويو-تكنولوژى، پژوهشگاه ابن سينا، تهران، ايران

۳- دانشيار، مركز تحقيقات ايمنى‌شناسى، دانشكده علوم پزشكى تهران، تهران، ايران

۴- استاديار، گروه ايمنى‌شناسى، دانشكده علوم پزشكى، دانشگاه علوم پزشكى لرستان، خرم‌آباد، ايران

۵- استاد، گروه علوم تشریح، دانشكده علوم پزشكى، دانشگاه تربيت مدرس، تهران، ايران

۶- كارشناس ارشد، گروه پرتودرمانى، بیمارستان شهدا، تهران، ايران

۷- استاد، گروه ايمنى‌شناسى، دانشكده علوم پزشكى، دانشگاه تربيت مدرس، تهران، ايران

آدرس نويسنده مسئول: تهران، كدپستى: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربيت مدرس، دانشكده علوم پزشكى، گروه ايمنى‌شناسى

Email: moazzeni@modares.ac.ir

پذيرش مقاله: ۹۰/۱۲/۲۱

دريافت مقاله: ۹۰/۱۰/۱۸

چكیده

هدف: سلول‌هاى بنيادى خون قاعدگى از نظر عملکردى و فنوتىپى به سلول‌هاى بنيادى مزانشيمى شبیه هستند. سلول‌هاى بنيادى مزانشيمى فعاليت و توليد سلول‌هاى دندريتيك را مهار مى‌کنند؛ اما درباره تأثير سلول‌هاى بنيادى خون قاعدگى بر سلول‌هاى سيستم ايمنى اطلاعات كمى وجود دارد. در مطالعه حاضر، تأثير اين سلول‌ها بر تمايز سلول‌هاى دندريتيك از مونوسيت بررسى شد.

مواد و روش‌ها: خون قاعدگى از خانم‌هاى سالم در دوره قاعدگى تهيه شد. سلول‌هاى تك هسته‌اى چسبان جدا شده و پس از دو هفته كشت، سلول‌هاى بنيادى خون قاعدگى به‌دست آمدند. سلول‌هاى مونوسيت در حضور سايتوكين‌هاى اينترلوكين ۴ و فاكتر محرک كلونى گرانولوسيت-مونوسيت به سمت سلول‌هاى دندريتيك در حضور و عدم حضور سلول‌هاى بنيادى خون قاعدگى، تمايز داده شدند. پس از ۵ روز ميزان توليد نشانگرهاى سلول‌هاى دندريتيك و مونوسيت اندازه‌گيرى شد. ميزان توليد سايتوكين اينترلوكين ۶ نيز در مايع رويى كشت‌ها اندازه‌گيرى شد.

نتايج: در حضور سلول‌هاى بنيادى خون قاعدگى، درصد سلول‌هاى داراى نشانگرهاى سلول‌هاى دندريتيك (CD1a) و مونوسيت (CD14) به‌ترتيب کاهش و افزايش معنى‌دارى را نشان داد. ميزان توليد اينترلوكين ۶ در مايع رويى هم‌كشتى سلول‌هاى بنيادى خون قاعدگى با مونوسيت افزايش معنى‌دارى داشت.

نتيجه‌گيرى: مطالعه حاضر نشان داد سلول‌هاى بنيادى خون قاعدگى تمايز سلول‌هاى مونوسيت به دندريتيك را مهار مى‌کنند. اين اثر مى‌تواند به افزايش توليد سايتوكين اينترلوكين ۶ نسبت داده شود. با توجه به محاسنى كه براى سلول‌هاى بنيادى خون قاعدگى ذكر شده، اين سلول‌ها مى‌توانند جايگزين مناسبى براى سلول‌هاى بنيادى مزانشيمى در كارهاى بالينى آينده باشند.

كليدواژگان: سلول بنيادى خون قاعدگى، سلول دندريتيك، مونوسيت، بلوغ، نشانگر سطحى

مجله علوم پزشكى مدرس: آسيب‌شناسى زيستى، دوره ۱۴، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۰، صفحات: ۲۳-۳۶

مقدمه

استفاده از سلول‌های بنیادی افقی‌های جدیدی را در درمان بیماری‌های مهمی چون خودایمنی، بیماری‌های قلبی، رد پیوند و سرطان پدید آورده است. به علاوه چنانچه می‌دانیم این سلول‌ها به‌عنوان کاندیدهای ترمیم یا جایگزینی بافت‌های آسیب دیده یا از کارافتاده مطرح هستند. سلول‌های بنیادی به دو دسته اصلی سلول‌های بنیادی جنینی و افراد بالغ تقسیم‌بندی می‌شوند. سلول‌های بنیادی جنینی توانایی تکثیر بالایی دارند اما استفاده از این سلول‌ها همیشه خطر ایجاد سرطان را در فرد گیرنده به همراه داشته و این مورد تا حد زیادی فرایند استفاده از آنها را در کارهای بالینی دچار مشکل ساخته است [۱]. از سوی دیگر سلول‌های بنیادی بالغین از بافت‌های مختلفی چون مغزاستخوان [۲]، خون بند ناف [۳]، بافت چربی [۴] و مایع آمنیوتیک [۵] به‌دست آمده و پتانسیل نسبتاً خوبی را برای استفاده در کارهای بالینی نشان داده‌اند. اما استفاده از این سلول‌ها هم با محدودیت‌هایی چون دسترسی مشکل، روش‌های تهاجمی جداسازی از افراد و در بعضی موارد قدرت تکثیر یا تمایز کم همراه است.

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (Mesenchymal Stem Cell: MSC)، زیررده سلول‌های بنیادی بالغین هستند. اثر این سلول‌ها در تعدیل فعالیت سلول‌های مهم سیستم ایمنی همچون سلول‌های DC (Dendritic cell: DC) [۶-۸]، لنفوسیت‌های T [۹-۱۰]، لنفوسیت‌های B [۱۱] و سلول‌های NK (Natural Killer) [۱۲] نشان داده شده است. به همین دلیل این سلول‌ها به‌عنوان سلول‌های تعدیل کننده پاسخ‌های ایمنی در موارد درمانی مانند جلوگیری از رد پیوند فوق حاد سلول‌های بنیادی خون‌ساز مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۱۳]. با وجود نتایج مثبتی که استفاده از این سلول‌ها در کارهای بالینی به همراه داشته است، این سلول‌ها معایبی هم دارند که استفاده گسترده از آنها مستلزم برطرف شدن این معایب یا دسترسی به جایگزین‌های مناسب‌تر است.

به تازگی نوع جدیدی از سلول‌های بنیادی کشف شده‌اند که شاید بتوانند جایگزین مناسبی برای سلول‌های MSC باشند [۱۴-۱۹]. این سلول‌ها در مطالعات مختلف به اسم‌های متعددی نامگذاری شده‌اند و هنوز در مورد نامگذاری قطعی آنها اتفاق نظر وجود ندارد و در مطالعه حاضر سلول‌های بنیادی استرومایی خون قاعدگی (Menstrual Blood Stromal Stem Cell: MBSC) نامیده شده‌اند. نشان داده شده است که MBSC تا حد زیادی از نظر خصوصیات فنوتیپی و عملکردی با MSC شباهت دارند. این سلول‌ها به‌طور طبیعی در لایه اندومتر رحم قرار دارند [۱۴، ۲۰] و با سلول‌های MSC، نزدیک‌ترین رده سلولی به آنها، از جهات مختلف همانند خصوصیات فنوتیپی تا توانایی تولید مولکول‌های ترشحی مورد مقایسه قرار گرفته‌اند. سلول‌های MBSC بیشتر شاخص‌های سطحی سلول‌های MSC را بیان می‌کنند؛ اما این سلول‌ها خصوصیتی هم دارند که آنها را از سایر رده‌های سلولی مشابه مثل MSC متمایز می‌سازد. یکی از این خصوصیات توانایی تکثیری بالای این سلول‌ها است. این سلول‌ها مولکول OCT-4 را تولید می‌کنند که یکی از مولکول‌های مربوط به سلول‌های بنیادی جنینی است. سلول‌های MBSC می‌توانند به ۹ رده سلولی مختلف تمایز پیدا کنند اما بر خلاف سلول‌های MSC نشانگر STRO-1 را بیان نمی‌کنند. به علاوه؛ این سلول‌ها نسبت به سلول‌های MSC به میزان بیشتری آنزیم‌های ماتریکس متالوپروتئیناز (Metalloproteinase: MMP) را تولید می‌کنند. علاوه بر موارد ذکر شده، مواردی چون آسان بودن تهیه از افراد، کشت و جداسازی آسان، توانایی تکثیر سریع، عدم تغییرات کاربوتایی پس از ۶۸ بار تقسیم در محیط آزمایشگاه و تولید مقادیر زیادی فاکتورهای محرک رگ‌زایی، آنها را کاندید مناسبی برای استفاده در سلول درمانی قرار داده است [۱۴].

با وجود تمام مزایای ذکر شده، همانند سایر سلول‌های بنیادی، برای این‌که سلول‌های MBSC وارد مراحل بالینی شوند لازم است که مطالعاتی در مورد تأثیر آنها روی

سلول‌های بنیادی خون قاعدگی و تولید سلول‌های دندریتیک

MBSC بر سلول‌های DC تاکنون تحقیقی صورت نگرفته است. در مطالعه حاضر تأثیر سلول‌های بنیادی MBSC بر فرایند تولید سلول‌های DC از منشاء مونوسیت‌های خون محیطی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت سلول‌های MBSC

سلول‌های MBSC طبق روشی که در مقالات دیگر توضیح داده شده جداسازی شدند [۲۷، ۱۴]. به‌طور خلاصه، نمونه‌های خون قاعدگی به‌وسیله Urine Cup (Diva Cup, Sweden) از خانم‌های سالم در روز دوم دوره قاعدگی جمع‌آوری شدند. ۵ میلی‌لیتر از خون جمع‌آوری شده به سرعت به لوله‌های ۱۵ میلی‌لیتری دارای PBS (Phosphate Buffered Saline) محتوی آنتی‌بیوتیک‌های فونگیزون (Fungizone) (۲۵/۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر)، پنی‌سیلین (Penicilin) (۱۰۰ واحد بین‌المللی) و استرپتومایسین (Streptomycin) (۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) (همه از شرکت Sigma, USA) منتقل شد. سلول‌های تک هسته‌ای با استفاده از محیط گرادیان فایکول (Biosera, USA) جداسازی و در فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربع یا ۷۵ سانتی‌متر مربع (Greiner, Germany) به تعداد 1×10^6 سلول در میلی‌لیتر در محیط DMEM-F12 (Gibco, Germany) حاوی آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده در بالا و FBS (Fetal Bovine Serum) (۲۰ درصد) (Gibco, Germany) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2 کشت داده شدند. پس از گذشت یک شب سلول‌های غیرچسبان با شستشو و تعویض محیط رویی حذف و کشت سلول‌های چسبان ادامه یافت. به‌منظور حذف سلول‌های ناخواسته (مونوسیت و ماکروفاژ)، سلول‌های چسبان ۲ تا ۴ بار دیگر پاساژ داده شدند. پس از این مدت سلول‌های همگنی که به‌طور محکم به کف فلاسک چسبیده بودند به‌وسیله مخلوط Tripsin-EDTA (Gibco, Germany) (Ethylenediaminetetraacetic acid)

سلول‌های مختلف بدن و به‌ویژه سلول‌های سیستم ایمنی صورت گیرد. مطالعات انجام شده در این زمینه انگشت‌شمار است. در یکی از اولین مطالعاتی که در مورد تأثیر این سلول‌ها روی سلول‌های سیستم ایمنی انجام شد نشان داده شد که این سلول‌ها همانند سلول‌های MSC، در شرایط آزمایشگاهی واکنش لکوسیت‌های آلورژن (Mixed Leukocyte Reaction: MLR) را سرکوب می‌کنند [۲۱]. در عین حال شناخت تأثیر بالقوه MBSC روی انواع مختلف سلول‌های ایمنی تحقیقات بیشتری را می‌طلبد.

سلول‌های DC گروهی از سلول‌های سیستم ایمنی هستند که در بافت‌های مختلفی از جمله لایه اپیدرم پوست، طحال، فضاهای بین بافتی و بافت‌های لنفاوی حضور دارند [۲۲، ۲۳]. این سلول‌ها به دنبال مواجهه با عامل بیماری‌زا/آنتی‌ژن آن را برداشته و به نزدیک‌ترین غده لنفاوی مهاجرت می‌نمایند. سلول‌های DC در حین مهاجرت بالغ شده و بیان مولکول‌هایی چون CD80، CD83، CD86، CD40 و HLA-DR در سطح‌شان افزایش می‌یابد. به علاوه سلول‌های DC بالغ این توانایی را پیدا می‌کنند که آنتی‌ژن‌هایی را که در حین مهاجرت آماده‌سازی کرده‌اند عرضه نمایند. پس از رسیدن به گره لنفاوی، سلول‌های DC بالغ آنتی‌ژن را به سلول‌های T دست نخورده (Naïve T Cell) عرضه کرده و بسته به عواملی چون زیررده DC، ماهیت آنتی‌ژن، پذیرنده‌های شناسایی کننده آن و ریز محیط حاکم، در نهایت پاسخ‌های ایمنی را در جهات متفاوت هدایت می‌کنند [۲۴].

در مورد تأثیر سلول‌های MSC بر تولید، عملکرد و خصوصیات مختلف سلول‌های DC، به عنوان یکی از مهم‌ترین سلول‌های عرضه کننده آنتی‌ژن (Antigen Presenting Cell: APC)، مطالعات متعددی انجام گرفته است. به‌طور کلی نشان داده شده است که سلول‌های MSC تولید سلول‌های DC عملکردی را از منشاء مونوسیت مهار می‌کنند [۶-۸]. این اثر به‌طور عمده به تولید مولکول‌هایی چون اینترلوکین ۶ (Interleukin 6: IL-6) و پروستوگلاندین E2-E2 (Prostaglandin-E2:PGE2) نسبت داده شده است [۸، ۲۵، ۲۶]. لیکن در مورد تأثیر سلول‌های

از کف فلاسک کنده شد و به منظور استفاده در آزمایش‌های بعدی در ازت مایع منجمد شدند. سلول‌های MBSC مورد استفاده در تمام آزمایش‌ها در پاساژهای بین ۴ تا ۶ استفاده شدند. جداسازی سلول‌های MBSC با کمک آزمایش‌های فلوسایتومتری تأیید شد.

تولید سلول‌های DC از سلول‌های مونوسیت

خون محیطی

سلول‌های DC طبق روش متداولی که در مقالات توضیح داده شده تولید شدند [۱۶]. به‌طور خلاصه نمونه‌های بافی کوت (Buffy Coat) افراد غیربیمار از سازمان انتقال خون ایران تهیه شدند. سلول‌های تک هسته‌ای (Mono-Nuclear Cell) به‌وسیله محیط گرایان غلظت فایکول جدا شدند. مونوسیت‌ها به روش انتخاب مثبت به کمک آنتی‌بادی‌های ضد CD14 متصل به ذرات فلز با استفاده از کیت جداسازی مونوسیت (Miltenyi Biotech, Germany) طبق روش توصیه شده به‌وسیله شرکت، جداسازی شدند. خلوص مونوسیت‌های به‌دست آمده با روش فلوسایتومتری (آنتی‌بادی ضد سلول‌های CD14⁺) تأیید شد. سلول‌ها در پلیت‌های کشت ۶ حفره (BD, USA) در محیط کشت RPMI-1640 (Gibco, Germany) حاوی FBS (۱۰ درصد)، ال-گلوتامین (L-Glutamine) (۲ میلی‌مولار)، آمینواسید غیرضروری (Non-Essential Amino Acid) (۱ درصد)، پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد بین‌المللی)، استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) و سدیم پیرووات (Sodium Pyroovate) (۱ درصد) (همه از شرکت USA Sigma) و در حضور سائتوکین‌های IL-4 و فاکتور محرک کلونی گرانولوسیت-مونوسیت (Granulocyte-Monocyte-Colony Stimulating Factor: GM-CSF) (هر دو از شرکت USA, Peprotech) با غلظت‌های به‌ترتیب ۲۰ نانوگرم در هر میلی‌لیتر و ۵۰ نانوگرم در هر میلی‌لیتر کشت داده شدند. پس از ۵ روز، سلول‌های

DC نابالغ تولید شده با شستشوی آرام جمع‌آوری شده و در آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند. به‌منظور تأیید تولید سلول‌های DC از روش فلوسایتومتری استفاده شد.

آزمایش‌های هم‌کشتی سلول‌های مونوسیت و

سلول‌های MBSC

سلول‌های MBSC در محیط کشت RPMI-1640 (Gibco, Germany) حاوی FBS (۱۰ درصد)، ال-گلوتامین (۲ میلی‌مولار)، آمینواسید غیرضروری (۱ درصد)، پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد بین‌المللی)، استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) و سدیم پیرووات (۱ درصد) (همه از شرکت USA, Sigma)، به تعداد 2×10^5 سلول در هر چاهک از پلیت ۶ خانه کشت داده شدند. پس از گذشت ۶ تا ۸ ساعت تعداد 1×10^6 سلول مونوسیت تازه جدا شده (با میانگین خلوص ۹۴ درصد) در حضور غلظت‌های مناسب از سائتوکین (چنان‌که در قسمت تولید سلول‌های DC از منشأ مونوسیت توضیح داده شد) در کنار سلول‌های MBSC به نسبت ۱ به ۲ (سلول MBSC به مونوسیت) کشت داده شدند. این هم‌کشتی در نسبت‌های ۱:۵، ۱:۱۰، ۱:۲۰ (MBSC به مونوسیت) نیز انجام شد. پس از گذشت ۵ روز سلول‌های مشتق از مونوسیت با شستشوی آرام برداشته شد و میزان بیان شاخص‌های سطحی سلول‌های DC نابالغ در سطح آن‌ها با روش فلوسایتومتری بررسی شد. به‌عنوان گروه کنترل، سلول‌های مونوسیت در عدم حضور سلول‌های MBSC در شرایط ذکر شده در بالا کشت داده شدند.

آزمایش‌های فلوسایتومتری

به‌منظور بررسی فوتیپ سلول‌های DC، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال متصل به FITC (Fluorescein Isothiocyanate) ضد CD1a، متصل به PE (Phycoerythrin) ضد CD40، متصل به PE ضد CD86، متصل به PE ضد HLA-DR و متصل به PE ضد CD14 (Human Leukocyte Antigen)

سلول‌های بنیادی خون قاعدگی و تولید سلول‌های دندریک

از محلول ساپونین (Saponin) ۰/۱ درصد (Merk, Germany) استفاده شد. بدین‌منظور سلول‌ها با محلول ساپونین به‌مدت ۷ دقیقه سانتریفوژ شدند؛ مایع رویی دور ریخته شد و به سلول‌ها ۱۰۰ میکرولیتر محلول ساپونین ۰/۱ درصد حاوی ۱ میکرولیتر آنتی‌بادی پلی‌کلونال ضد Oct-4A, Abcam, USA) اضافه شد. سلول‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از ۲ بار شستشو با محلول ساپونین ۰/۱ درصد، آنتی‌بادی لایه دوم (Goat-anti-rabbit-FITC, Sigma, USA) به نسبت ۱ به ۱۶۰ در محلول ساپونین اضافه و انکوباسیون به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از دو بار شستشو با محلول ساپونین، سلول‌ها در محلول رنگ‌آمیزی نگهداری و تجزیه و تحلیل شدند. در مورد لوله کنترل، تمام مراحل بالا به استثنای اضافه کردن آنتی‌بادی ضد Oct-4A انجام گرفت. همچنین به‌منظور بررسی وجود نشانگر سطح سلولی STRO-1، رنگ‌آمیزی دو لایه صورت گرفت. سلول‌های MBSC با آنتی‌بادی مونوکلونال ضد STRO-1 (Mouse-anti-human- STRO-1, R&D, USA) و سپس آنتی‌بادی متصل به FITC (پژوهشگاه ابن سینا، Sheep-anti-mouse) هرکدام به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد مجاور و سپس تجزیه و تحلیل شدند. رنگ‌آمیزی نشانگرهای مربوط به سلول‌های MBSC طبق مطالعه‌ای که به تازگی به‌وسیله همکاران مقاله حاضر انجام شده [۲۷] صورت گرفت و جداسازی سلول‌های MBSC را اثبات نمود (نمودارها نشان داده نشده است). به علاوه القای تمایز این سلول‌ها به رده مختلف به وسیله گروه حاضر انجام شده است [۲۸].

آزمایش سنجش غلظت سائوکاين

به‌منظور بررسی میزان تولید IL-6، مایع رویی واکنش هم‌کشتی سلول‌های مونوسیت و سلول‌های MBSC و همچنین گروه کنترل (سلول‌های مونوسیت و سلول‌های MBSC کشت داده شده به تنهایی) پس از ۵ روز جمع‌آوری شد. میزان IL-6

و آنتی‌بادی‌های ایزوتیپ کنترل مناسب (همه از شرکت BD, USA) خریداری شده و رنگ‌آمیزی‌ها به‌صورت تک رنگ انجام شد. به‌طور خلاصه، سلول‌های مشتق از مونوسیت در هر گروه به‌مدت ۴۰ دقیقه در محلول رنگ‌آمیزی (PBS حاوی FBS ۲ درصد) با آنتی‌بادی‌های متصل به رنگ‌های فلورسانس مجاور شدند. سپس آنتی‌بادی‌های متصل نشده شسته شده و سلول‌ها با دستگاه فلوسایتومتر (Partec, Germany) تجزیه و تحلیل شدند. عین همین مراحل برای لوله‌های مربوط به آنتی‌بادی ایزوتیپ کنترل نیز انجام شد. به‌منظور مقایسه میزان بیان مولکول‌های کمک محرک (CD40, CD86) و مولکول HLA-DR در گروه‌های مختلف، از فاکتوری به نام نسبت میانگین شدت نور (Mean Ratio Fluorescence Intensity: MRFI) استفاده شد. این فاکتور حاصل تقسیم میانگین شدت نور (Mean Fluorescence Intensity: MFI) سلول‌های رنگ شده با آنتی‌بادی مورد نظر بر MFI سلول‌های رنگ شده با آنتی‌بادی ایزوتیپ کنترل است. در مورد نشانگرهای CD1a (اختصاصی سلول‌های DC نابالغ) و CD14 (اختصاصی سلول‌های مونوسیت خون محیطی) در صد سلول‌های مثبت مقایسه شد.

به‌منظور بررسی فنوتیپ سلول‌های MBSC جدا شده، آنتی‌بادی بر علیه نشانگرهای مختلف استفاده شد. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال متصل به FITC علیه نشانگرهای CD9, CD34, CD38 و CD133 و آنتی‌بادی‌های مونوکلونال متصل به PE ضد CD10, CD29, CD44, CD45 و CD73 (همه از شرکت BD, USA) استفاده شد. آنتی‌بادی متصل به PE ضد نشانگر CD105 از شرکت R&D (USA) استفاده شد. رنگ‌آمیزی با تمام این آنتی‌بادی‌ها به‌صورت تک رنگ و با روشی مشابه آنتی‌بادی‌های قسمت قبل صورت گرفت؛ اما به‌منظور بررسی نشانگر داخل سلولی Oct-4A، سلول‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه با محلول تثبیت (BD, USA) در دمای اتاق مجاور و دو بار با PBS شسته شدند. به‌منظور نفوذپذیر کردن سلول‌ها

نتایج

تأثیر سلول‌های MBSC بر تولید سلول‌های

DC از منشأ مونوسیت‌های خون محیطی

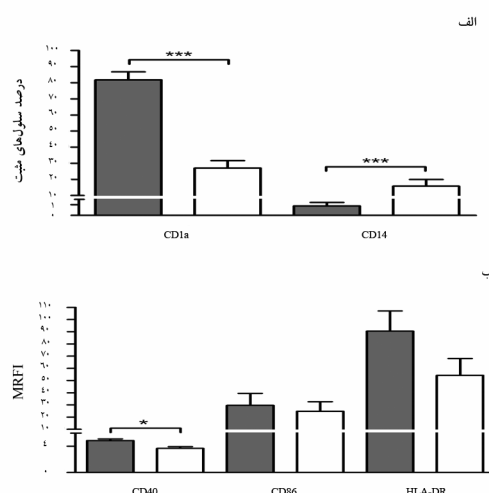
به منظور القای تولید سلول‌های DC، سلول‌های $CD14^+$ (مونوسیت) از خون محیطی افراد غیربیمار جدا شده و در محیط کشت حاوی سایتوکین‌های IL-4 و GM-CSF کشت داده شدند. کشت سلول‌های مونوسیت در حضور یا عدم حضور سلول‌های MBSC انجام گرفت. پس از گذشت ۵ روز، میزان تمایز به سلول‌های DC از طریق تجزیه و تحلیل درصد سلول‌های دارای نشانگرهای $CD14$ و $CD1a$ و همچنین میزان بیان نشانگرهای $CD40$ ، $CD86$ و HLA-DR بررسی شد.

سلول‌های $CD14^+$ (مونوسیت) که در عدم حضور سلول‌های MBSC کشت داده شده بودند به سلول‌های DC نابالغ تمایز پیدا کردند به طوری که میانگین درصد سلول‌های $CD14^+$ از $93/5 \pm 1/1$ درصد در روز شروع کشت به $0/4 \pm 1/5$ درصد در روز ۵ رسید و هم زمان فراوانی سلول‌های $CD1a^+$ به $4/9 \pm 8/1$ درصد افزایش پیدا کرد. همچنین میانگین MRFI برای مولکول‌های $CD40$ ، $CD86$ و HLA-DR به ترتیب $0/2 \pm 4/8$ ، $9/8 \pm 29/5$ و $16/7 \pm 90/4$ بود (شکل ۱ الف و ب). اما چنانچه بیان شد دسته‌ای از این سلول‌ها (مونوسیت) هم در کنار سلول‌های MBSC کشت داده شدند و بررسی‌های فنوتیپی نشان داد که درصد سلول‌های با فنوتیپ سلول‌های DC در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشت (میانگین در صد سلول‌های $CD14^+$ و $CD1a^+$ به ترتیب $4/1 \pm 15/7$ درصد و $4/5 \pm 27$ درصد بود) (شکل ۱ الف). از سوی دیگر؛ بررسی میزان بیان مولکول‌های کمک محرک و HLA-DR در سطح سلول‌های کشت داده شده در حضور MBSC اختلاف معنی‌داری را در مورد مولکول $CD40$ نشان داد در حالی که در مورد $CD86$ و HLA-DR با وجود این که اختلاف مشاهده شد ولی این

روش الایزای ساندویچ (Sandwich ELISA) بر طبق روش بیان شده در کیت (BD, USA) انجام گرفت. غلظت IL-6 در نمونه‌ها در مقایسه با غلظت استانداردهای همراه کیت محاسبه شد. کمترین میزان قابل تشخیص به وسیله کیت طبق استانداردها ۳ پیکوگرم در میلی‌لیتر بود. تمامی نمونه‌ها به صورت دوتایی اندازه‌گیری شدند.

تجزیه و تحلیل‌های آماری

تجزیه و تحلیل نتایج به وسیله نرم‌افزار GraphPad Prism (نسخه ۵/۰۴) انجام گرفت. مقایسه بین گروه‌ها با استفاده از آزمون آماری من‌ویتنی (Mann-Whitney) انجام شد. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد (Mean $\pm$ SEM) نمایش داده شد و به منظور بررسی اختلاف بین گروه‌های مختلف، P value های کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

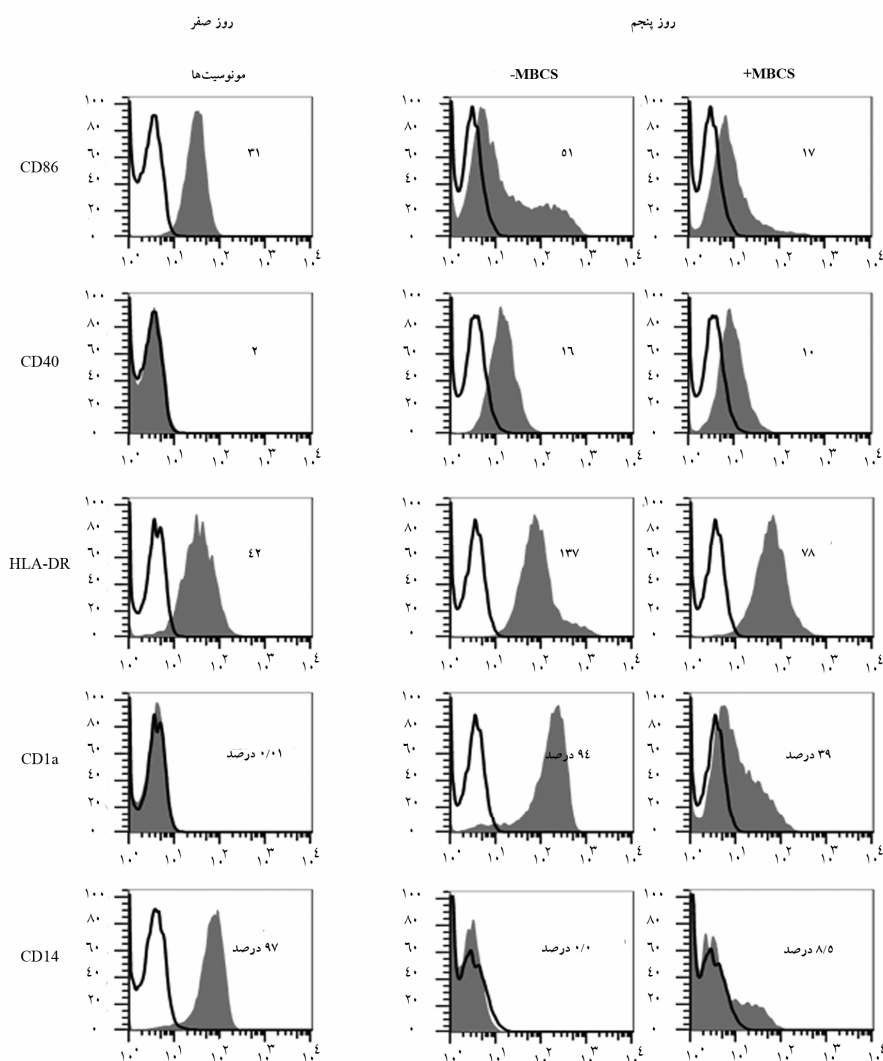


شکل ۱ مهار تمایز سلول‌های مونوسیت به سلول‌های DC نابالغ در حضور سلول‌های MBSC؛ سلول‌های مونوسیت تخلیص شده ($CD14^+$) در حضور سایتوکین‌های IL-4 و GM-CSF به مدت ۵ روز به سمت سلول‌های DC نابالغ تمایز داده شدند. کشت‌ها در حضور (□) و عدم حضور (■) سلول‌های MBSC انجام شد. الف) میانگین درصد سلول‌های مثبت بیان کننده $CD14$ و $CD1a$. ب) میانگین شدت بیان برای نشانگرهای $CD40$ ، $CD86$ و HLA-DR به صورت MRFI. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد (Mean $\pm$ SEM) نشان داده شده و حاصل انجام حداقل ۶ آزمایش مجزا است.

سلول‌های بنیادی خون قاعدگی و تولید سلول‌های دندریتیک

است. این نتایج در کل نشان می‌دهد که در حضور سلول‌های MBSC تمایز سلول‌های مونوسیت به سلول‌های DC نابالغ به‌طور ضعیفی صورت می‌گیرد. نتایج بالا در مورد نشانگرهای مختلف حاصل انجام حداقل ۶ آزمایش جداگانه است. شکل ۲، داده‌های مربوط به یک آزمایش را به عنوان نماینده نشان می‌دهد.

اختلاف معنی‌دار نبود (میانگین MRFI برای مولکول‌های CD40، CD86 و HLA-DR به ترتیب 0.2 ± 3.6 ، 7.8 ± 5.4 و 13.8 ± 5.4 بود) (شکل ۱ ب). اختلافات بالا در نتیجه کشت سلول‌های مونوسیت در حضور سلول‌های MBSC با نسبت ۱ به ۲ (MBSC به مونوسیت) به دست آمده



شکل ۲ سلول‌های MBSC تمایز سلول‌های مونوسیت به سلول‌های DC نابالغ را مهار می‌کنند. نتایج مربوط به یک آزمایش جداگانه به عنوان نمونه. در این شکل بیان نشانگرهای CD14، CD1a، CD40، CD86 و HLA-DR در سطح مونوسیت (روز صفر) و پس از القای تمایز به سلول‌های DC نابالغ (روز ۵) نشان داده شده است. به منظور تولید سلول‌های DC، سلول‌های مونوسیت در حضور (+MBSC) و عدم حضور سلول‌های MBSC (-MBSC) کشت داده شدند. اعداد نشان داده شده برای نشانگرهای CD14 و CD1a درصد سلول‌های مثبت بیان کننده و برای نشانگرهای CD40، CD86 و HLA-DR میانگین شدت بیان MFI را نشان می‌دهد. هیستوگرام‌های توخالی در هر گراف نمایانگر ایزوتیپ کنترل است.

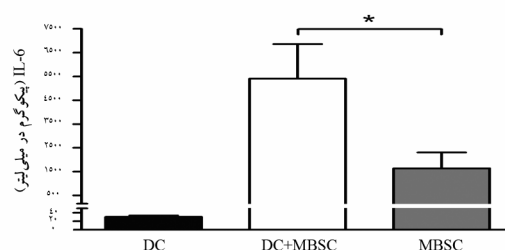
این میزان پس از هم‌کشتی با سلول‌های مونوسیت به‌طور معنی‌داری افزایش داشت (میانگین $\pm$ خطای استاندارد = 5413 ± 1449 پیکوگرم در میلی‌لیتر). میزان تولید IL-6 به وسیله سلول‌های مونوسیت وقتی که به تنهایی به سمت سلول‌های DC تمایز داده شدند قابل توجه نبود (میانگین $\pm$ خطای استاندارد = $30/2 \pm 3/5$ پیکوگرم در میلی‌لیتر). نتایج ارایه شده حاصل انجام ۵ آزمایش جداگانه است.

بحث

در مطالعه حاضر تأثیر سلول‌های MBSC بر تولید سلول‌های DC از منشأ مونوسیت‌های خون محیطی بررسی شد. براساس نتایج به‌دست آمده سلول‌های MBSC تمایز کامل سلول‌های مونوسیت به سلول‌های DC نابالغ را مهار می‌نمایند. براساس شواهدی که تاکنون به‌دست آمده است، سلول‌های MBSC از نظر خصوصیات فنوتیپی، عملکردی و تولید فاکتورهای محلول، بیشترین شباهت را به سلول‌های MSC دارند [۱۴]. در عین حال، محاسنی که در قسمت مقدمه ذکر شد، سلول‌های MBSC را به عنوان جایگزین بالقوه مناسبی برای سلول‌های MSC به‌منظور استفاده در بالین مطرح ساخته است؛ اما تاکنون مطالعات اندکی در مورد تأثیرات احتمالی سلول‌های MBSC بر سلول‌های مختلف سیستم ایمنی منتشر شده است.

برای اولین بار مورفی (Murphy) و همکاران، تأثیر سلول‌های MBSC را بر واکنش MLR به‌صورت آزمایشگاهی (In vitro) بررسی کردند [۲۱]. نتایج نشان داد که این سلول‌ها واکنش فوق را سرکوب کرده و جهت‌گیری سائتوکینی را به سمت Th2 سوق می‌دهند. در تأیید این مورد، در مطالعه‌ای که به تازگی به‌وسیله نیکو و همکاران انجام شد، مشاهده شد که این سلول‌ها در نسبت‌های بالا (تعداد زیاد سلول‌های بنیادی در مقابل سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی) قادر هستند که واکنش MLR را مهار کنند در حالی که در نسبت‌های پایین اثر عکس داشته و واکنش مذکور را تشدید می‌نمایند [۲۷] که این

چنانچه در قسمت مواد و روش‌ها ذکر شد به‌منظور رسیدن به نسبت بهینه، طی یک سری آزمایش‌های اولیه تیتراسیون نسبت سلول‌های مونوسیت و MBSC انجام گرفت (نسبت‌های ۱:۲، ۱:۵، ۱:۲۰، ۱:۱۰۰، MBSC به مونوسیت). بر طبق نتایج بررسی نشانگرهای سطحی، بیشترین سرکوب در نسبت ۱:۲ (MBSC به مونوسیت) به‌دست آمد. این سرکوب در مورد نشانگر CD1a حتی تا نسبت ۱:۱۰ و در مورد CD14 تا نسبت ۱:۵ قابل مشاهده بود. در مورد مولکول CD40 فقط در نسبت ۱:۲ و در مورد CD86 و HLA-DR در هیچ‌کدام از نسبت‌ها اختلاف معنی‌دار دیده نشد (نتایج نشان داده نشده‌اند).



شکل ۳ تولید سائتوکین IL-6 در شرایط کشت مختلف؛ سلول‌های مونوسیت در حضور سائتوکین‌های IL-4 و GM-CSF به‌مدت ۵ روز به سمت سلول‌های DC نابالغ تمایز داده شدند. کشت‌ها در حضور □ و عدم حضور ■ سلول‌های MBSC انجام شدند. همچنین سلول‌های MBSC به‌صورت جداگانه هم کشت داده شدند ■ میزان سائتوکین IL-6 در محیط رویی کشت تمام گروه‌ها اندازه‌گیری شد. داده‌ها به‌صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد نمایش داده شده و حاصل انجام ۵ آزمایش مجزا است.

بررسی میزان ترشح سائتوکین IL-6

به‌منظور بررسی مکانیسم احتمالی مهار تمایز مونوسیت‌های خون محیطی به سلول‌های DC میزان سائتوکین IL-6 در مایع رویی هم‌کشتی سلول‌های مونوسیت با سلول‌های MBSC با روش الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) اندازه‌گیری و با گروه‌های کنترل مقایسه شد. چنانچه در شکل ۳ مشاهده می‌شود سلول‌های MBSC وقتی به تنهایی کشت داده شدند مقادیر قابل توجهی IL-6 (میانگین $\pm$ خطای استاندارد = 1637 ± 667 پیکوگرم در میلی‌لیتر) تولید نمودند که

سلول‌های بنیادی خون قاعدگی و تولید سلول‌های دندریتیک

افزایش یا کاهش در میزان بیان این مولکول‌ها به عنوان معیاری در قدرت تحریک کنندگی سلول‌های DC به‌شمار می‌رود. براساس نتایج مطالعه حاضر میزان بیان مولکول‌های کمک محرک CD40 و CD86 در سطح سلول‌های تولید شده در حضور سلول‌های MBSC تغییر کرد اما این تغییر فقط در مورد مولکول CD40 معنی‌دار بود. همچنین بیان مولکول HLA-DR که نقش حامل را برای عرضه آنتی‌ژن به لنفوسیت T بازی می‌کند، نیز در این مطالعه بررسی شد. بر طبق نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر، بیان این مولکول در سطح سلول‌های تمایز یافته از مونوسیت در حضور MBSC در مقایسه با گروه کنترل تغییر معنی‌داری نداشت. چنانچه در بحث مربوط به CD14 و CD1a ذکر شد مطالعاتی از این دست تاکنون در مورد سلول‌های MBSC انجام نشده ولی در مورد مولکول‌های کمک محرک و تأثیر سلول‌های MSC بر بیان آن‌ها مطالعات فراوانی وجود دارد. به‌طور کلی نشان داده شده است که MSC‌ها میزان بیان کمک محرک‌ها را در سطح سلول‌های تمایز یافته از مونوسیت کاهش می‌دهند که در نهایت منجر به نقص در قدرت سلول‌های DC بالغ در تحریک لنفوسیت‌های T و حتی باعث القای تولید سلول‌های T تنظیم‌گر (Treg) به‌وسیله این DC ها می‌شود [۳۰]. در مطالعه حاضر اگر به میزان بیان مولکول‌های کمک محرک CD40 و CD86 در سطح سلول‌های مونوسیت توجه شود، به خوبی در می‌یابیم که این سلول‌ها مولکول CD40 را اصلاً بیان نمی‌کنند در حالی که بیان قابل توجهی از مولکول CD86 را از خود نشان می‌دهند و به‌نظر بدیهی می‌رسد که حتی در صورت مهار تبدیل مونوسیت به DC نابالغ میزان اختلاف در مورد CD86 معنی‌دار نباشد؛ اما چنانچه مطرح شد اختلاف معنی‌داری در مورد CD40 (مولکولی که مونوسیت بیان نمی‌کند) مشاهده شد. در مورد HLA-DR هم وضع به همین ترتیب است و این مولکول در روز صفر هم به میزان زیادی به‌وسیله مونوسیت تولید می‌شود و از سوی دیگر در مطالعات از همین دست که در مورد MSC انجام شده تفاوت معنی‌داری در مورد HLA-

مورد نشانگر آثار متفاوت این سلول‌ها در شرایط مختلف است. در مطالعه حاضر، سلول‌های مونوسیت در حضور سلول‌های MBSC به سمت سلول‌های DC نابالغ تمایز داده شدند. میزان تمایز به سلول‌های DC از طریق بررسی نشانگرهای سطحی متعارف برای مونوسیت‌ها و سلول‌های DC بررسی شد. براساس نتایج، در صد سلول‌های مثبت از نظر نشانگرهای CD14 و CD1a در سطح سلول‌های تولید شده در حضور سلول‌های MBSC به‌ترتیب کاهش و افزایش معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل (سلول‌های DC تولید شده در غیاب سلول‌های MBSC) نشان داد. با توجه به این‌که CD14 به‌ترتیب شاخص‌های اختصاصی سلول‌های DC نابالغ و مونوسیت است نتایج ما نشان دهنده مهار تبدیل مونوسیت به سلول‌های DC در حضور MBSC است. این مطالعه برای اولین بار در مورد سلول‌های MBSC انجام شده است؛ اما موارد متعددی از مطالعات مشابه در مورد سلول‌های MSC و تأثیر آن‌ها بر تولید، بلوغ و عملکرد سلول‌های DC انجام گرفته است. نشان داده شده که سلول‌های MSC تولید سلول‌های DC نابالغ را از سلول‌های مونوسیت مهار می‌کنند [۶-۸] که اثری مشابه آنچه در مطالعه حاضر با سلول‌های MBSC به‌دست آمد را نشان می‌دهد. اما تفاوتی که وجود دارد مربوط به قدرت مهار تمایز سلول‌های مونوسیت است. چنانچه در اکثر مطالعات انجام شده در مورد MSC، درصد سلول‌های حاوی CD14 (شاخص مونوسیت) در مقایسه با مطالعه حاضر خیلی بیشتر حفظ شده است اما درعین حال، درصد سلول‌های تولید کننده CD1a در مقایسه با مطالعه حاضر چنین اختلافی را نشان نمی‌دهد [۶-۸]. این مورد نشان می‌دهد که اگرچه سلول‌های MBSC مانند سلول‌های MSC تمایز مونوسیت به DC را مهار می‌نمایند اما این مهار به قدرت سلول‌های MSC نیست.

مولکول‌های کمک محرک در سطح سلول‌های APC، نقش مهمی را در فعال شدن مؤثر لنفوسیت‌های T به‌وسیله APC ها و به‌ویژه سلول‌های DC ایفا می‌نمایند [۲۴، ۲۹] و در واقع

DR مشاهده نشده است [۶].

مطالعات نشان داده‌اند که تأثیر سلول‌های MSC بر مهار تولید سلول‌های DC از منشأ مونوسیت، مربوط به تولید مولکول‌هایی متعددی در اثر برهم کنش است که از این میان بیشترین تأکید بر اثر سایتوکین IL-6 و پروستوگاندین PGE2 است [۸، ۲۵، ۲۶]. در مورد IL-6 این طور بیان شده که در واقع وجود آن در محیط کشت باعث افزایش بیان پذیرنده فاکتور محرک کلونی ماکروفاژ (Macrophage Colony Stimulating Factor: M-CSF) می‌شود. وجود این پذیرنده روی مونوسیت‌ها باعث تأثیر M-CSF تولید شده به وسیله مونوسیت‌ها روی خودشان می‌شود و این سلول‌ها در نهایت به جای تمایز به DC ترجیحاً به سمت ماکروفاژ تمایز می‌یابند [۳۱]. در مطالعه حاضر میزان IL-6 در مایع رویی کشت سلول‌های MBSC در کنار مونوسیت‌های در حال تمایز به DC بررسی شد. نتایج بیانگر آن بود که هرچند سلول‌های MBSC به تنهایی میزان بالایی از IL-6 را تولید می‌نمایند اما این میزان به طور معنی‌داری در اثر هم کشتی با سلول‌های مونوسیت افزایش می‌یابد. این مورد IL-6 را به عنوان کاندید مهمی در مهار تمایز مونوسیت به DC در حضور MBSC مطرح می‌نماید؛ اما در عین حال نباید از نقش احتمالی PGE2 غافل ماند چرا که در یکی از جدیدترین مطالعاتی که در زمینه مهار تولید DC به وسیله MSC انجام شده نشان داده است که PGE2 در مقایسه با IL-6 نقش بسیار مؤثرتری را در این مهار ایفا می‌کند [۸]. در حالی که در مطالعه حاضر میزان تولید این مولکول در مایع رویی کشت اندازه‌گیری نشده و نیاز به بررسی دارد.

لازم به ذکر است که در اغلب مطالعات مربوط به اثر سلول‌های MSC بر تولید DC از منشأ مونوسیت، تولید سلول‌های DC بالغ نیز مورد توجه قرار گرفته است. مطالعه حاضر فاقد این نوع بررسی بوده و طبعاً با توجه به نقش مهمی که سلول‌های دندریتیک بالغ در القای پاسخ‌های ایمنی ایجاد می‌کنند، انجام چنین مطالعه‌ای ضرورت دارد. در عین حال در

یکی از مطالعات مهمی که در زمینه تأثیر سلول‌های MSC بر تولید DC انجام شده، نشان داده شده است که اگرچه تولید سلول‌های DC بالغ به وسیله این سلول‌ها مهار می‌شود، اما این مهار در مرحله اول، یعنی تبدیل مونوسیت به DC نابالغ صورت می‌گیرد و نه در مرحله تبدیل DC نابالغ به DC بالغ [۸]؛ به همین دلیل محققان حاضر برای شروع کار، تأثیر سلول‌های MBSC را روی تولید سلول‌های DC نابالغ بررسی کردند.

در زمینه کاربرد بالینی سلول‌های MBSC مطالعاتی در مدل‌های حیوانی انجام شده است. نشان داده شده که تزریق این سلول‌ها در یک مدل موشی ایسکمی (Ischemia) پا توانسته به طور قابل توجهی باعث بهبودی شود. این اثر به توانایی MBSC در تولید فاکتورهای تحریک کننده رگ‌زایی نسبت داده شده است [۲۱]. در مطالعه‌ای دیگر، تزریق MBSC در مدل موشی گلیوما (Glioma) باعث بهبود در مقایسه با گروه کنترل شده است [۳۲]. این نتایج نیاز به بررسی بیشتر در زمینه شناخت مکانیسم‌های عملکرد این سلول‌ها در شرایط مختلف را نشان می‌دهد. در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شده که تزریق سلول‌های MBSC در مدل حیوانی سکتی باعث بهبود معنی‌داری در علائم بیماری و رفتار رت‌ها در مقایسه با گروه کنترل می‌شود [۳۳]. ضمن این‌که در مطالعه دیگر، سلول‌های MBSC به ۴ بیمار مبتلا به MS (Multiple Sclerosis) تزریق شده‌اند. این مطالعه فقط با هدف بررسی کاربردی بودن این سلول‌ها در کارهای انسانی انجام شده و نویسندگان بیان نموده‌اند که بررسی این افراد به مدت یک سال نشان داده است که هیچ‌گونه واکنش ایمنولوژیک یا عوارض جانبی نامطلوبی ایجاد نشده و این مورد نشانگر کاربردی بودن این سلول‌ها در مطالعات انسانی است. در عین حال نویسندگان در مورد اثر درمانی این سلول‌ها اظهار نظر نکرده و بیان نموده‌اند که در آینده نتایج کار خود را در مورد آثار احتمالی این سلول‌ها در بهبود این بیماران به چاپ خواهند رساند [۳۴].

در هر حال شواهد بیانگر آنست که توجه به سلول‌های MBSC به عنوان سلول‌های جایگزین سلول‌های بنیادی مورد

جمله تأثیر احتمالی سلول‌های MBSC بر تولید و عملکرد سلول‌های DC بالغ و نقش فاکتورهای مهاری دیگری از جمله PGE2 از جمله سؤالاتی است که نیاز است به آن‌ها پاسخ داده شود و توسط محققان حاضر در حال بررسی است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس بابت تأمین امکانات و هزینه‌های این تحقیق کمال تشکر و قدردانی می‌نمایند.

استفاده در حال حاضر، با توجه به مزایایی که در مقدمه برای آن‌ها ذکر شد، روز به روز در حال افزایش است؛ اما هنوز سوالات متعددی در مورد این سلول‌ها مطرح است که باید پاسخ داده شود. عوارض طولانی مدت استفاده از سلول‌های MBSC در بالین، مکانیسم اثر آن‌ها بر تک تک سلول‌های سیستم ایمنی و همین‌طور مولکول‌های تولید شده به‌وسیله آن‌ها باید مورد بررسی قرار گرفته و بهتر شناخته شود. اختلال در تمایز مونوسیت به DC نابالغ، در سطح فنوتیپی، به‌وسیله سلول‌های MBSC موردی است که برای اولین بار در این مطالعه نشان داده شده است؛ اما به‌طور حتم مطالب متعددی از

منابع

- [1] Lees JG, Lim SA, Croll T, Williams G, Lui S, Cooper-White J, McQuade LR, Mathiyalagan B, Tuch BE. Transplantation of 3D scaffolds seeded with human embryonic stem cells: biological features of surrogate tissue and teratoma-forming potential. *Regen Med* 2007; 2(3): 289-300.
- [2] Edwards RG. Stem cells today: B1. Bone marrow stem cells. *Reprod Biomed Online* 2004; 9(5): 541-83.
- [3] Harris DT, Badowski M, Ahmad N, Gaballa MA. The potential of cord blood stem cells for use in regenerative medicine. *Expert Opin Biol Ther* 2007; 7(9): 1311-22.
- [4] Parker AM, Katz AJ. Adipose-derived stem cells for the regeneration of damaged tissues. *Expert Opin Biol Ther* 2006; 6(6): 567-78.
- [5] De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, Mostoslavsky G, Serre AC, Snyder EY, Yoo JJ, Furth ME, Soker S, Atala A. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol* 2007; 25(1): 100-6.
- [6] Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Dimitrov R, Bukarev D, Kyurkchiev S, Tivchev P, Altunkova I, Kyurkchiev DS. 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(1-2): 37-42.
- [7] Magatti M, De Munari S, Vertua E, Nassauto C, Albertini A, Wengler GS, Parolini O. Amniotic mesenchymal tissue cells inhibit dendritic cell differentiation of peripheral blood and amnion resident monocytes. *Cell Transplant* 2009; 18(8): 899-914.
- [8] 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. *Blood* 2009; 113(26): 6576-83.
- [9] Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi

- F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 2005; 105(7): 2821-7.
- [10] Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 2003; 101(9): 3722-9.
- [11] Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 2006; 107(1): 367-72.
- [12] Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 2008; 111(3): 1327-33.
- [13] Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, Ringdén O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004; 363(9419): 1439-41.
- [14] Meng X, Ichim TE, Zhong J, Rogers A, Yin Z, Jackson J, Wang H, Ge W, Bogin V, Chan KW, Thébaud B, Riordan NH. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *J Transl Med* 2007; 5:57.
- [15] Wolff EF, Wolff AB, Hongling Du, Taylor HS. Demonstration of multipotent stem cells in the adult human endometrium by in vitro chondrogenesis. *Reprod Sci* 2007; 14(6): 524-33.
- [16] Patel AN, Park E, Kuzman M, Benetti F, Silva FJ, Allickson JG. Multipotent menstrual blood stromal stem cells: isolation, characterization, and differentiation. *Cell Transplant* 2008; 17(3): 303-11.
- [17] Patel AN, Silva F. Menstrual blood stromal cells: the potential for regenerative medicine. *Regen Med* 2008; 3(4): 443-4.
- [18] Lin J, Xiang D, Zhang JL, Allickson J, Xiang C. Plasticity of human menstrual blood stem cells derived from the endometrium. *J Zhejiang Univ Sci B* 2011; 12(5): 372-80.
- [19] Allickson JG, Sanchez A, Yefimenko N, Borlongan CV, Sanberg PR. Recent Studies Assessing the Proliferative Capability of a Novel Adult Stem Cell Identified in Menstrual Blood. *Open Stem Cell J* 2011; 3(2011): 4-10.
- [20] Schwab KE, Gargett CE. Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. *Hum Reprod* 2007; 22(11): 2903-11.
- [21] Murphy MP, Wang H, Patel AN, Kambhampati S, Angle N, Chan K, Marleau AM, Pysznik A, Carrier E, Ichim TE, Riordan NH. Allogeneic endometrial regenerative cells: an "Off the shelf solution" for critical limb ischemia? *J Transl Med* 2008; 6:45.
- [22] Wright-Browne V, McClain KL, Talpaz M, Ordonez N, Estrov Z. Physiology and pathophysiology of dendritic cells. *Hum Pathol* 1997; 28(5): 563-79.
- [23] Teunissen MB, Haniffa M, Collin MP. Insight into the immunobiology of human skin and functional specialization of skin dendritic cell subsets to innovate intradermal vaccination design. *Curr Top Microbiol Immunol* 2012; 351:25-76.

- [24] Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002; 2(3): 151-61.
- [25] Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, Mao N. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2005; 105(10): 4120-6.
- [26] Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34⁺-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2006; 177(4): 2080-7.
- [27] Nikoo S, Ebtekar M, Jeddi-Tehrani M, Shervin A, Bozorgmehr M, Kazemnejad S, Zarnani AH. Effect of menstrual blood-derived stromal stem cells on proliferative capacity of peripheral blood mononuclear cells in allogeneic mixed lymphocyte reaction. *J Obstet Gynaecol Res* 2012; 38(5): 804-9.
- [28] Kazemnejad S, Akhondi MM, Soleimani M, Zarnani AH, Khanmohammadi M, Darzi S, Alimoghadam K. Characterization and chondrogenic differentiation of menstrual blood-derived stem cells on a nanofibrous scaffold. *Int J Artif Organs* 2012; 35(1): 55-66.
- [29] Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392(6673): 245-52.
- [30] Ge W, Jiang J, Arp J, Liu W, Garcia B, Wang H. Regulatory T-cell generation and kidney allograft tolerance induced by mesenchymal stem cells associated with indoleamine 2,3-dioxygenase expression. *Transplantation* 2010; 90(12): 1312-20.
- [31] Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Palucka AK. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol* 2000; 1(6): 510-4.
- [32] Han X, Meng X, Yin Z, Rogers A, Zhong J, Rillema P, Jackson JA, Ichim TE, Minev B, Carrier E, Patel AN, Murphy MP, Min WP, Riordan NH. Inhibition of intracranial glioma growth by endometrial regenerative cells. *Cell Cycle* 2009; 8(4): 606-10.
- [33] Borlongan CV, Kaneko Y, Maki M, Yu SJ, Ali M, Allickson JG, Sanberg CD, Kuzmin-Nichols N, Sanberg PR. Menstrual blood cells display stem cell-like phenotypic markers and exert neuroprotection following transplantation in experimental stroke. *Stem Cells Dev* 2010; 19(4): 439-52.
- [34] Zhong Z, Patel AN, Ichim TE, Riordan NH, Wang H, Min WP, Woods EJ, Reid M, Mansilla E, Marin GH, Drago H, Murphy MP, Minev B. Feasibility investigation of allogeneic endometrial regenerative cells. *J Transl Med* 2009; 7:15.