مقاله اصلی

نفس، سال ۵، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۷، صفحات ۲۶ تا ۳۴

اثر نیکوتین بر بیان گیرنده‌های TLR2 و TLR4 در سطح سلول‌های بنیادی– پیش‌سازخونی نمونه خون بند ناف

لعیا تکبیری اسگویی[۱]، کاظم پریور[۲]، اسماعیل مرتاض[۳و۴*]، مرضیه ابراهیمی[۵]

۱) دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، تهران، ایران

۲) دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران

۳) دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۴) مرکز تحقیقات سل بالینی و اپیدمیولوژی، پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی، بیمارستان دکتر مسیح دانشوری، تهران، ایران

۵) دانشیار پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌پزشکی ترمیمی، تهران، ایران

چکیده:

سلول‌های بنیادی-پیش‌ساز خونی متعاقب مواجهه با استرس (از جمله میکروارگانیسم‌های عفونت‌زا) تحریک شده و در جهت رده میلوئیدی تمایز حاصل می‌نمایند. این امر بواسطه گیرنده‌های TLR موجود در سطح سلول‌های مورد نظر انجام می‌پذیرد. در پژوهش حاضر اثر نیکوتین (به عنوان یک عامل محیطی) بر میزان بیان گیرنده‌های TLR2 و TLR4 در سطح سلول‌های بنیادی-پیش‌ساز خونی مورد بررسی قرارگرفته است. برای این منظور پس از جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون بندناف، این سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت با سه دوز ۱۰ نانومول، ۱ میکرومول و ۱۰۰ میکرومول نیکوتین تیمار شدند. سپس با روش فلوسیتومتری میزان بیان TLR2 و TLR4 در سطح جمعیت سلولی CD34+ (که معرف سلول‌های بنیادی-پیش‌ساز خونی هستند) مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. هر ۳ دوز نیکوتین بطور معناداری باعث افزایش میزان بیان TLR2 گردیدند، در حالی که بر روی بیان TLR4 چنین اثری نشان ندادند. نتیجه آن که در محیط برون‌تنی (in vitro) نیکوتین می‌تواند باعث افزایش بیان TLR2 در سطح سلول‌های بنیادی-پیش‌ساز موجود درخون بند ناف گردد.

واژگان کلیدی: نیکوتین، خون بند ناف، سلول‌های بنیادی-پیش‌ساز خونی، گیرنده TLR2، گیرنده TLR4

* **نویسنده مسئول:**

دکتر اسماعیل مرتاض، مرکز تحقیقات سل بالینی و اپیدمیولوژی، پژوهشکده سل و بیماری‌های ریوی، بیمارستان دکتر مسیح دانشوری، تهران، ایران، کد پستی: ۴۴۴۱۳-۱۹۵۶۹، پست الکترونیک: e.mortaz@uu.nl

مقدمه:

اگرچه سیستم خونساز سیستمی پایدار است که طی روندی ثابت و تنظیم شده با تولید سلول‌های جدید و جایگزینی آنها با سلول‌های مرده باعث حفظ هموستاز در بدن می‌گردد، ولی این سیستم درعین حال کاملا انعطاف‌پذیر بوده و می‌تواند تحت تاثیر عوامل محیطی مختلف قرار گیرد [۱]. برای اولین بار در سال ۲۰۰۶، Nagi و همکاران بیان گیرنده‌های TLR[1] را درسطح سلول‌های بنیادی-پیش‌ساز خونی (HSPC[2]) به اثبات رساندند. این سلول‌ها که در راس هرم خونسازی قرارگرفته‌اند با بیان مارکرمولکولی CD34[3] مورد شناسایی قرار می‌گیرند [۲]. نتایج بدست آمده از مطالعات بعدی دال بر این موضوع بود که متعاقب مواجهه سلول‌های بنیادی-پیش‌ساز با میکروارگانیسم‌های مختلف تحریک گیرنده‌های TLR باعث بسیج سلول‌های فوق به محل التهاب و تغییر مسیر تمایز این سلول‌ها درجهت رده میلوئیدی می‌گردد [۳-۷]. از آنجایی که سلول‌های بنیادی خونساز بطور مستمر از مغز استخوان خارج شده و با جریان خون به بافت‌های مختلف دسترسی می‌یابند، طی عفونت‌های موضعی این امکان وجود دارد که در محل عفونت سلول‌های فوق عوامل عفونی را شناسایی نموده و تحریک شوند. بدین ترتیب عفونت می‌تواند زمان تولید، نحوه تولید و مسیر تمایز سلول‌های خونی را تحت تاثیر قرار دهد [۸-۱۲].

حال این سئوال مطرح می‌گردد که آیا به جز میکروارگانیسم‌های عفونت‌زا عوامل محیطی دیگری همانند دود سیگار و مواد سمی موجود درآن نیز می‌توانند با تحریک و یا تغییر الگوی بیان گیرنده‌های TLR درسطح سلول‌های بنیادی-پیش‌ساز خونی در روند خونسازی نقش داشته باشند. مطالعات محدود انجام گرفته در این زمینه نشان داده‌اند که دود سیگار قادر است باعث تغییر میزان بیان گیرنده‌های TLR در سطح سلول‌های تک‌هسته‌ای (MNC[4]) مغز استخوان و سلول‌های اپی‌تلیوم تنفسی گردد. اثری که منجر به تغییر الگوی ترشح سایتوکاینی این سلول‌ها می‌گردد [۱۴،۱۳]. ولی در مورد اثر نیکوتین، بعنوان اصلی‌ترین ماده سمی موجود در دود سیگار بر بیان گیرنده‌های TLR در سطح سلول‌های خونساز اطلاعات چندانی در دست نیست. برای روشنگری بیشتر در این زمینه مطالعه حاضر اثر نیکوتین را بر میزان بیان گیرنده‌های TLR4 و TLR2 درسطح سلول‌های بنیادی-پیش‌ساز خونی موجود در نمونه خون بند ناف (UCB[5]) مورد بررسی قرارداده است.

مواد وروش‌ها:

مواد: جهت انجام این پژوهش نیکوتین از کمپانی سیگماآلدریچ[6] با کد N3876، آنتی‌بادی‌های کونژوگه شده با رنگ‌های فلورسانس اختصاصی از کمپانی eBioscienc[7] و محیط کشت RPMI[8] ازشرکت‌های داخلی تهیه گردید.

جمع‌آوری نمونه و جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای

پس ازکسب رضایت‌نامه کتبی از مادران شرکت کننده، در یک محدوده زمانی ۳ ماهه ۳ نمونه خون بند ناف استریل از ۳ مادر بستری در بیمارستان‌های طرف قرارداد با پژوهشکده رویان تهیه گردید. نمونه‌ها در اسرع وقت به آزمایشگاه منتقل گشت وبرای جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای موجود در نمونه از روش ذیل استفاده گردید. ابتدا پس از انتقال نمونه خون به لوله‌های فالکون[9] ۱۵ میلی‌لیتری، جهت سهولت در جدا سازی به نسبت ۱ به ۵ به آن هیدروکسی اتیل نشاسته (HEAS[10]) اضافه گردید و لوله‌ها به مدت ۴۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه[11] گردید. طی این مدت گلبول‌های قرمز در ته لوله رسوب نمودند. سپس مایع رویی[12] که حاوی سلول‌های تک‌هسته‌ای بود به لوله دیگری منتقل شده و در ۳۰۰[13]g مورد سانتریفوژ قرار گرفت. در مرحله بعدی پس از

[1] Toll like receptors
[2] Hematopoietic stem and progenitor cell
[3] Complementarity determinant 34
[4] Mononuclear Cells

[5] Umbilical Cord Blood
[6] Sigma aldrich company
[7] eBioscience company
[8] Roswell Park Memorial Institute Medium
[9] Falcon
[10] Hydroxyethyl starch
[11] Incubat
[12] Supernatant
[13] g or relative centrifugal force

افزودن ۵ میلی لیتر بافر PBS[1] به هر لوله رسوب سلولی سلولی دوباره به حالت معلق درآمده و با دقت تمام به لوله‌های حاوی ۲ میلی‌لیتر فایکول[2] منتقل گشت. نمونه مورد نظر به مدت ۲۰ دقیقه در ۸۰۰g سانتریفوژ گشت. در این مرحله سه لایه در لوله ایجاد گردید و لایه وسط (بافی کوت[3]) که حاوی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون بود به لوله دیگری منتقل شد. جهت اطمینان از خارج شدن کامل فایکول از محیط ۲ نوبت دیگر سلول‌ها با استفاده از بافر PBS مورد شستشو قرار گرفتند (سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه در ۳۵۰g). سرانجام پس از رنگ‌آمیزی سلول‌ها با تریپان‌بلو[4] و اطمینان از زنده بودن بیش از ۹۵ درصد سلول‌ها با استفاده از محیط کشت RPMI واجد ۱۰ درصد FBS[5] و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک (پنسیلین[6] و استرپتومایسین[7]) سوسپانسیونی با غلظت ۱ میلیون سلول در میلی‌لیترتهیه گردید.

مجاورسازی با نیکوتین

سلول‌های تک‌هسته‌ای جداسازی شده با ۳ غلظت ۱۰ نانومول (پایین)، ۱ میکرومول (متوسط) و ۱۰۰ میکرومول (بالا) از نیکوتین مجاور گشتند. جهت کنترل منفی از نمونه سلولی استفاده شد که با هیچ ماده‌ای مجاور نشده بود. پلیت[8] مورد نظر به مدت ۲۴ ساعت درانکوباتور[9] ۳۷°C انکوبه گردید.

ارزیابی میزان بیان مارکرهای TLR2 و TLR4 در سطح جمعیت سلولی CD34+ موجود در نمونه سلول‌های تک‌هسته ای خون بند ناف

- پس از اتمام انکوباسیون محتویات حفره‌ها به داخل میکروتیوب‌هایی با حجم ۵۰۰ میکرولیتر منتقل شده و میکروتیوب‌ها بمدت ۳-۵ دقیقه در دور ۱۵۰۰ rpm سانتریفوژ شدند.
- مایع رویی بطور کامل جدا شد و سوسپانسیون سلولی موجود در ۴ میکروتیوب مربوط به نمونه کنترل و ۳ نمونه تیمار شده با استفاده از بافر FACS[10] مجددا معلق گشته و این بار هرکدام در ۳ لوله ویژه خوانش فلوسایتومتری[11] تقسیم گردید.
- به لوله اول که لوله بدون رنگ‌آمیزی بود هیچ ماده فلورسانسی اضافه نشد. به لوله دوم ۵ میکرولیتر آنتی‌بادی PE - anti human TLR2 و ۵ میکرولیتر آنتی‌بادی PE.CY7- anti human CD34 اضافه شد. به همین ترتیب به لوله سوم نیز ۵ میکرولیتر آنتی‌بادی PE- anti human TLR4 و ۵ میکرولیتر آنتی‌بادی PE.CY7-anti human CD34 اضافه گردید.
- ۱۲ لوله مورد نظر به مدت ۳۰ دقیقه در یخچال انکوبه گشتند وسپس با دستگاه فلوسایتومتری مورد خوانش قرار گرفتند.
- نتایج بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار flowjo مورد آنالیز قرار گرفت. به این ترتیب که ابتدا در دو محور پراکندگی جلویی[12] و پراکندگی جانبی[13] جمعیت سلول‌های تک‌هسته‌ای مورد محدوده‌بندی[14] قرار گرفت. سپس در همین جمعیت محدوده سلول‌های CD34+ که معرف سلوهای بنیادی-پیش‌ساز خونی هستند معین گردید و سرانجام در جمعیت مورد نظر درصد سلول‌های بیان کننده گیرنده‌های TLR2 و TLR4 تعیین شد.
- در مرحله بعدی تفاوت میزان بیان ۲ مارکر فوق میان کنترل منفی و ۳ گروه تیمار شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS (آزمون ANOVA یک‌طرفه و مقایسه میانگین Duncan) مورد آنالیز و مقایسه قرار گرفت.

یافته‌ها:

میزان بیان گیرنده TLR2 در سطح سلول‌های بنیادی-پیش‌ساز خونی در ۴ گروه مورد بررسی:

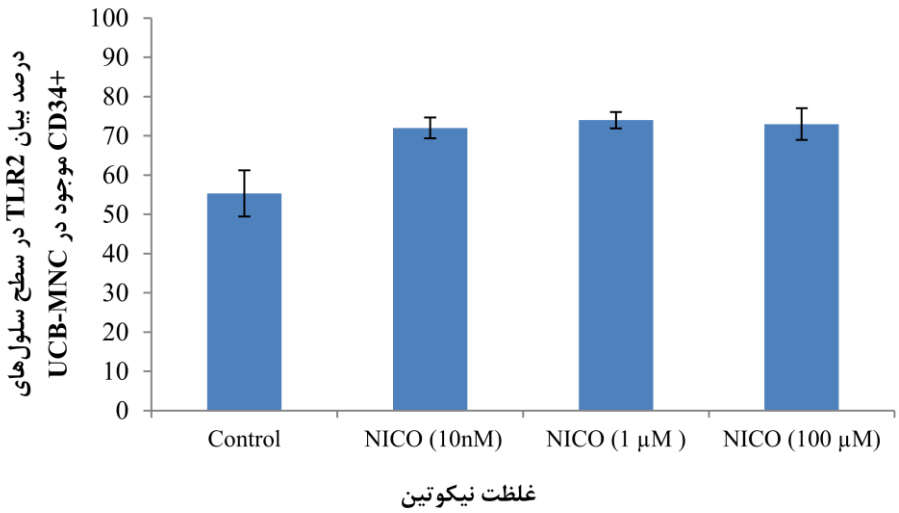
در مطالعه حاضر میزان بیان گیرنده TLR2 در سطح جمعیت سلول‌های بنیادی-پیش‌ساز خونی موجود در نمونه سلول‌های تک‌هسته‌ای خون بند ناف (UCB-MNC) در سه گروه تیمار شده با دوزهای ۱۰ نانومول، ۱ میکرومول و

[1] Phosphate-buffered saline
[2] Ficoll-Paque
[3] Buffy coat
[4] Trypan blue
[5] Fetal bovine serum
[6] Penicillin
[7] Streptomycin
[8] Plate
[9] Incubator

[10] Fluorescence-activated cell sorting,
[11] Flow cytometry
[12] Forward Scatter
[13] Side Scatter
[14] Gating

جدول ۱ - میزان بیان TLR2 در سطح سلول‌های تک‌هسته‌ای CD34+ موجود در خون بند ناف

TLR2 on CD34+ cells	Control	Nico (10 nM)	Nico (1 µM)	Nico (100 µM)
Series 1	۵۰	۶۸	۷۸	۷۳
Series 2	۴۹	۷۷	۷۱	۸۰
Series 3	۶۷	۷۱	۷۳	۶۶
Average	۵۵/۳ ±۲/۸۴	۷۲ ±۲/۶۴	۷۴ ±۲/۰۸	۷۳ ±۴/۰۴



نمودار ۱ – میزان بیان TLR2 در سطح جمعیت سلول‌های تک‌هسته‌ای CD34+ موجود در خون بند ناف

۱۰۰ میکرومول نیکوتین نسبت به گروه کنترل منفی با P≤۰/۰۵ افزایش معناداری نشان داد (جدول ۱ و نمودارهای ۱ و ۲).

میزان بیان گیرنده TLR4 درسطح سلول‌های بنیادی–پیش‌سازخونی در ۴ گروه مورد بررسی:

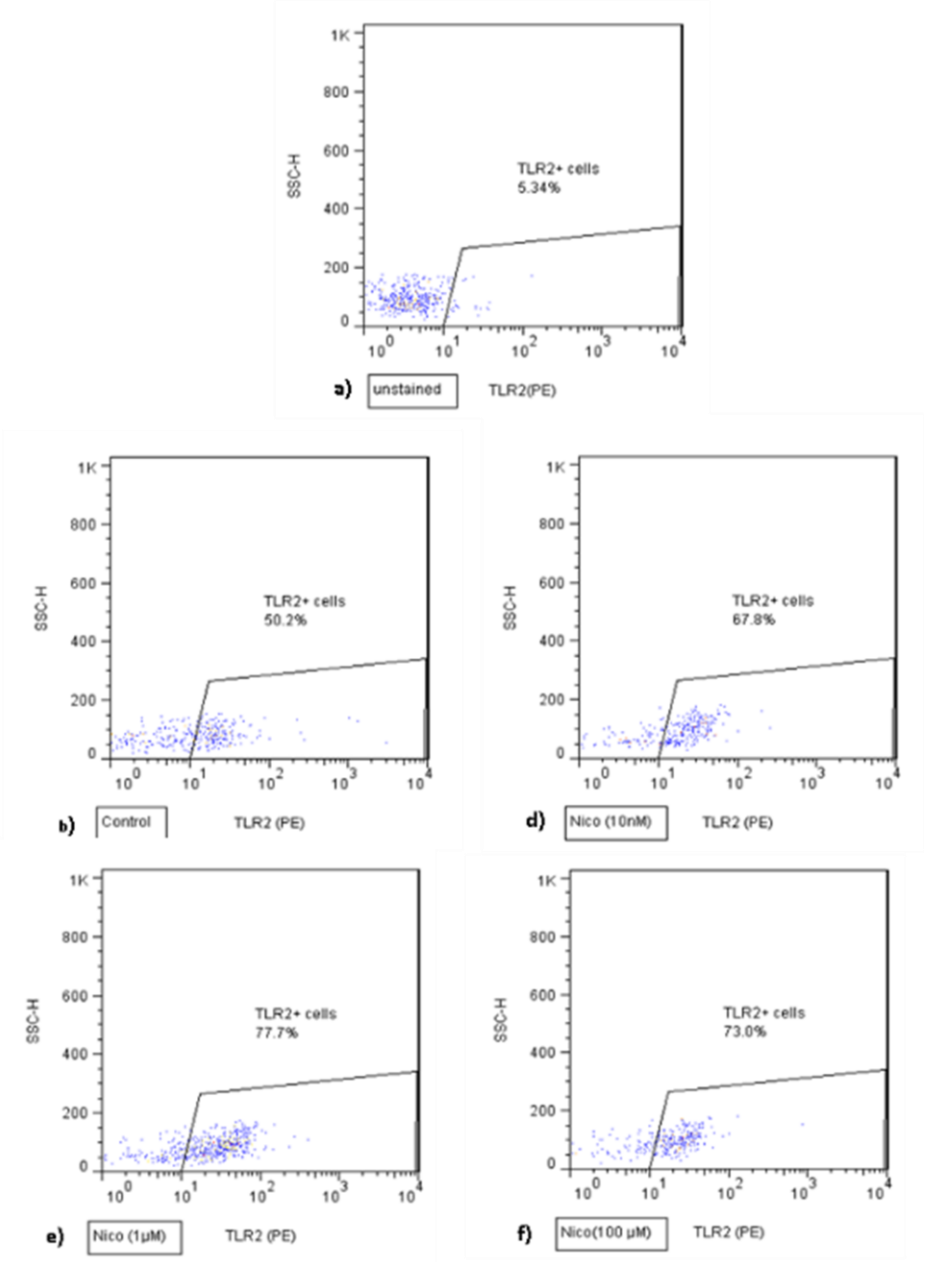
میزان بیان گیرنده TLR4 در گروه‌های مواجهه با دوزهای ۱۰ نانومول، ۱ میکرومول و ۱۰۰ میکرومول نیکوتین نسبت به گروه کنترل منفی تغییر معناداری نشان نداد (جدول ۲ و نمودارهای ۳ و ۴)

بحث:

گیرنده‌های TLR از گیرنده‌های کلیدی دخیل در پاسخ‌های ایمنی ذاتی بوده و درشناسایی پاتوژن‌ها توسط سیستم ایمنی نقش مهمی ایفا می‌نمایند. علاوه بر این طی پاسخ‌های التهابی با فراخوانی سلول‌های بنیادی خونساز باعث تسهیل تکثیر و جایگزینی سلول‌های خونی مرده می‌گردند [۱۵].

اگرچه مطالعات متعددی اثر دود سیگار و بطور اختصاصی نیکوتین را بر بیان و عملکرد گیرنده‌های TLR در رده‌های سلولی مختلف مورد بررسی قرارداده‌اند، ولی اثر نیکوتین بر میزان بیان این گیرنده‌ها در سطح سلول‌های بنیادی-پیش‌ساز خونی (سلول‌های CD34+) چندان مورد توجه قرار نگرفته است. جهت پرکردن خلا حاضر در این پژوهش ما اثر نیکوتین را بر بیان گیرنده‌های TLR4 و TLR2 در سطح سلول‌های فوق مورد مطالعه قراردادیم. نتایج نشان داد که نیکوتین در هر سه دوز پایین، متوسط و بالا باعث افزایش بیان TLR2 در سطح این سلول‌ها می‌گردد، در حالی که ظاهرا چنین اثری بر میزان بیان TLR4 ندارد.

در رابطه با اثر دود سیگار و همچنین نیکوتین بر بیان گیرنده‌های TLR در سال ۲۰۱۱ Zhou و همکاران نشان دادند که ترکیبات سمی دود سیگار می‌توانند باعث افزایش بیان TLR2، TLR3 و TLR4 در سطح سلول‌های تک‌هسته‌ای مغز استخوان گردند [۱۳].



نمودار ۲ - میزان بیان TLR2 در سطح سلول‌های تک‌هسته‌ای +CD34 موجود در خون بند ناف

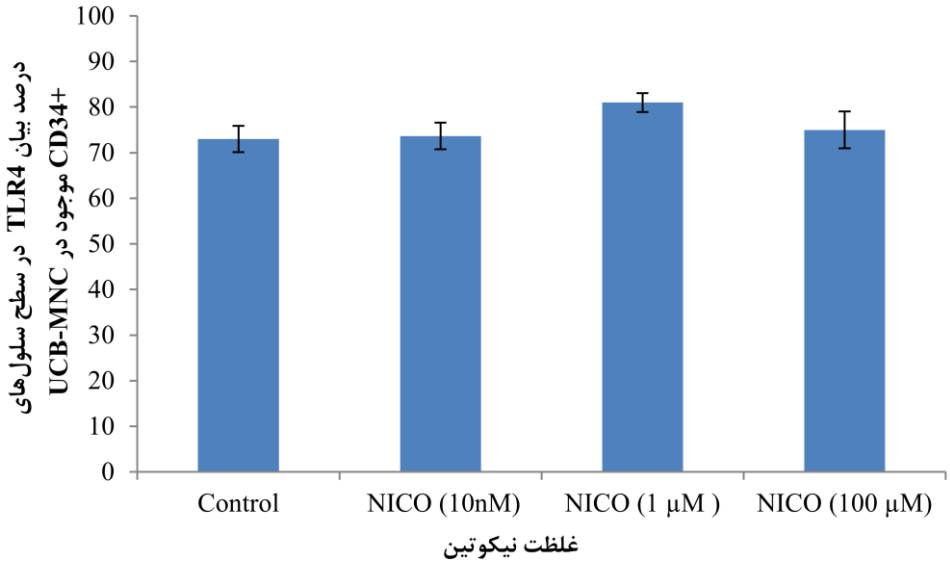
همچنین در پژوهشی که توسط Pace و همکاران بر روی رده سلولی مربوط به اپیتلیوم تنفسی انجام گرفت، نشان داده شد که مجاورت با عصاره دود سیگار باعث افزایش بیان TLR4 و افزایش فعالیت مسیر سیگنال‌دهی NF-KB گشته است. مسیری که در نهایت افزایش تولید IL-8 و نوتروفیلی را در پی داشته است [۱۴]. Semlali و همکاران نیز اثر تحریکی دود سیگار را بر بیان گیرنده‌های TLR2، TLR4 و TLR6 در سطح سلول‌های اپی‌تلیال دندانی گزارش نمودند [۱۶].

مطالعات انجام گرفته روی اثر نیکوتین بر بیان گیرنده‌های TLR عمدتا روی TLR4 متمرکز بوده و نتایج کاملا متفاوت و گاها متناقضی را ارائه داده‌اند.

بعنوان نمونه Hamano و همکاران متعاقب مجاورسازی منوسیت‌های انسانی با دوز ۱۰۰ میکرومول نیکوتین

جدول ۲ - میزان بیان TLR4 در سطح سلول‌های تک‌هسته‌ای +CD34 موجود در خون بند ناف

TLR4 on CD34+ cells	Control	Nico (10 nM)	Nico (1 µM)	Nico (100 µM)
Series 1	۷۳	۷۳	۸۰	۷۵
Series 2	۷۸	۷۹	۷۸	۸۲
Series 3	۶۸	۶۹	۸۵	۶۸
Average	۷۳ ±۲/۸۸	۷۳/۶ ±۲/۹	۸۱ ±۲/۰۸	۷۵ ±۴/۰۴



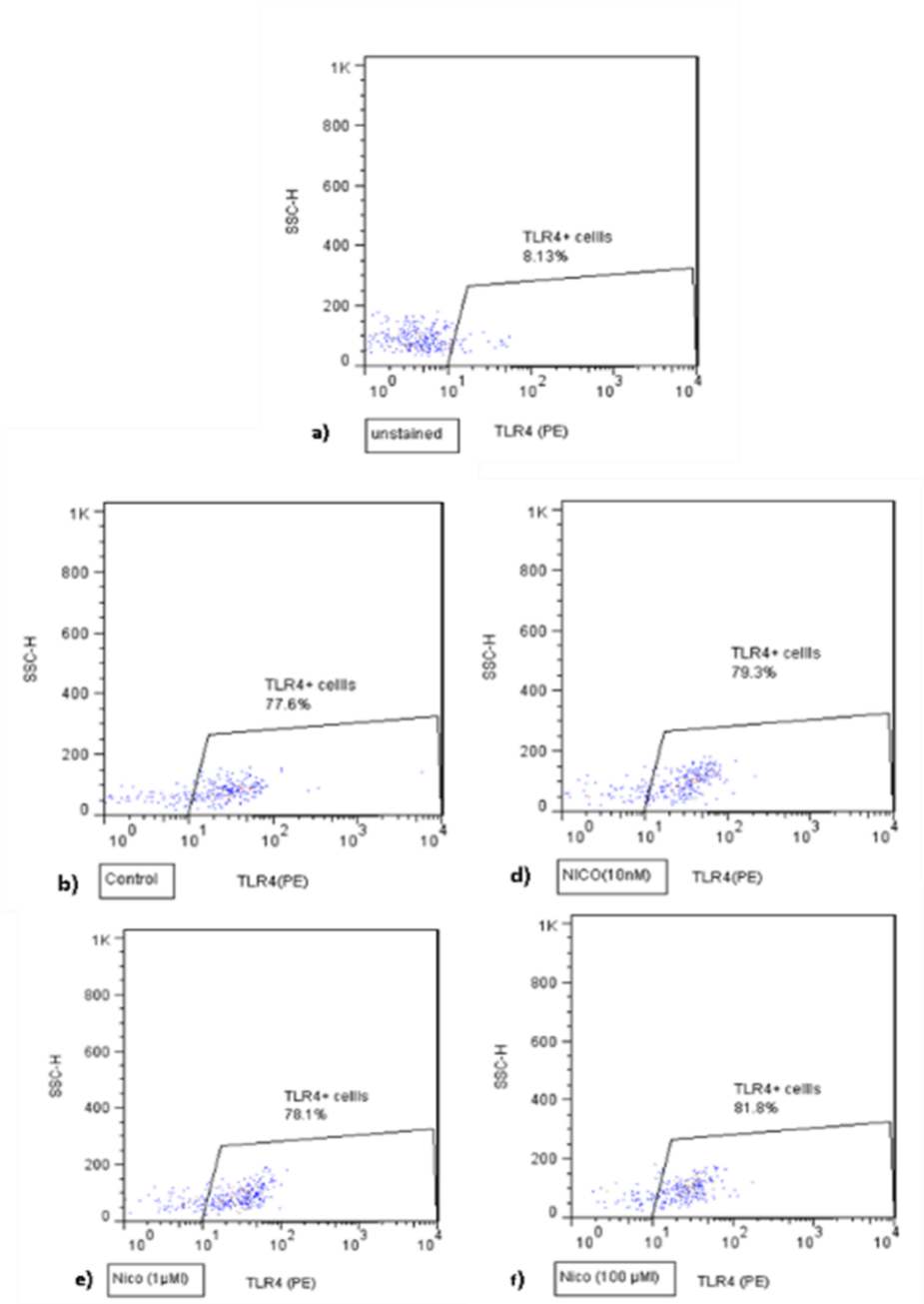
نمودار ۳ - میزان بیان TLR4 در سطح جمعیت سلول‌های تک‌هسته‌ای +CD34 موجود در خون بند ناف

شاهد کاهش قابل توجهی در میزان بیان کمپلکس CD14-TLR4 بودند [۱۷].

در مطالعه دیگری که توسط Kim و همکاران روی مدل موشی انجام گرفت نیکوتین توانست بطور معناداری میزان بیان TLR4 را در سطح سلول‌های کبدی موش‌های مورد آزمایش کاهش دهد [۱۸]. همچنین Wang و همکاران نیز در پژوهشی جالب توجه، نقشی برای نیکوتین در افزایش بیان TLR4 درسلول‌های دندریتیک و عرضه متقاطع آنتی‌ژن[1] قائل شده‌اند [۱۹]. Café-Mendes و همکاران نیز متعاقب تزریق ۱۴ روزه نیکوتین به موش شاهد کاهش بیان ژن TLR4 در سلول‌های هیپوکامپ[2] بودند [۲۰]. جالب اینکه مغایر با یافته‌های فوق Xu y و همکاران درسال ۲۰۱۴ گزارش نمودند نیکوتین باعث افزایش بیان TLR4 و TLR6 درسطح سلول‌های اپی‌تلیوم تنفسی موشی می‌گردد [۲۱].

با توجه به یافته‌های فوق بخش اعظم مطالعات انجام گرفته در زمینه مورد نظر عمدتا روی بیان TLR4 و همچنین عملکرد آن متمرکز گشته است و دیگر گیرنده‌های TLR چندان مورد توجه نبوده‌اند. در یک جمع‌بندی کلی می‌توان اظهار نمود اگرچه دود سیگار باعث افزایش بیان TLR4 در سطح سلول‌های مختلف به ویژه خونی گشته و از این طریق باعث بروز واکنش‌های التهابی می‌گردد، نیکوتین در اکثر مواقع با مکانیسمی کاملا متفاوت بیان این گیرنده را مهار نموده و منجر به بروز اثرات ضد التهابی می‌گردد. از آنجایی که دود سیگار

[1] Cross-presentation
[2] Hippocampus



نمودار ۴ - میزان بیان TLR4 در سطح سلول‌های تک‌هسته‌ای +CD34 موجود در خون بند ناف

دارای ترکیب فوق‌العاده متنوعی می‌باشد اثر نهایی آن بر سلول برآیند اثر مواد مختلف موجود در آن خواهد بود و دلیلی وجود ندارد این اثر با اثر نیکوتین بعنوان یکی از این ترکیبات یکسان باشد. بنابراین مقایسه نتایج پژوهش‌های مربوط به دود سیگار و نیکوتین با همدیگر بی‌مورد است. در مورد نیکوتین باید اظهار داشت برخلاف گزارشاتی که در بالا اشاره شد، در مطالعه حاضر نیکوتین تاثیر چندانی روی بیان TLR4 نشان نداد. علت این امر شاید مربوط به نوع سلول و یا گیرنده‌های نیکوتینی دخیل در این واکنش‌ها بوده باشد. بعنوان مثال این احتمال وجود دارد که سلول‌های بنیادی در مقایسه با سلول‌های تمایز یافته گیرنده‌ها و مسیرهای پیام‌رسانی متفاوتی را بکار گیرند و برای اظهار نظر دقیق در این مورد نیاز به مطالعات برون‌تنی و درون‌تنی گسترده‌تری وجود دارد.

هدف ما در این پژوهش بطور ویژه بر روی بیان گیرنده‌های TLR در سطح سلول‌های بنیادی-پیش‌ساز خونی متمرکز گشته بود. در مورد اهمیت گیرنده‌های TLR در سلول‌های بنیادی-پیش‌ساز خونی در سال‌های اخیر مطالعات نسبتا گسترده‌ای انجام شده و اطلاعات فزاینده‌ای در مورد نقش ویژه این گیرنده‌ها در سلول‌های مورد نظر در دسترس قرار گرفته است [۸-۱۲]. پس از گزارش اولیه Nagi و همکاران در مورد بیان گیرنده‌های TLR در سطح سلول‌های بنیادی خونساز [۲] مطالعات روی نحوه عملکرد آنها متمرکز گردید. امروزه می‌دانیم این گیرنده‌ها با شناسایی عوامل بیماری‌زا باعث تحریک سلول‌های بنیادی خونساز و همچنین بسیج هرچه بیشتر این سلول‌ها به محل عفونت و التهاب گشته و نقش مهمی در تعیین مسیر آتی خونسازی ایفا می‌نمایند. اگرچه سلول‌های پیش‌ساز موجود در سطوح پایین‌تر هرم خونسازی نیز قادر به بیان گیرنده‌های TLR می‌باشند، ولی بنظر می‌رسد شناسایی عوامل بیماری‌زا توسط سلول‌های بنیادی اولیه نقش اصلی را در این میان ایفا نموده و مسیری هرچه موثرتر برای مقابله با عفونت را در اختیار میزبان قرار می‌دهند [۸،۲۲]. طبق شواهد، تحریک گیرنده‌های TLR سلول‌های بنیادی توسط میکروارگانیسم‌های مختلف موجب سوق تمایز این سلول‌ها به سمت رده میلوئیدی می‌گردد. بدین ترتیب عفونت می‌تواند بواسطه گیرنده‌های TLR نقش موثری در نحوه تولید و مسیر تمایز سلول‌های خونی داشته باشد [۸-۱۲]. در همین راستا پژوهش حاضر نقش یک عامل محیطی حائز اهمیت همانند نیکوتین را روی بیان ۲ گیرنده اصلی TLR هدف خود قرارداده و برای اولین بار افزایش TLR2 را تحت تاثیر نیکوتین گزارش نمود. این که مکانیسم‌های دخیل در بروز چنین اثری کدام هستند و این یافته از نظر بالینی چه اهمیتی می‌تواند داشته باشد خارج از اهداف این مطالعه می‌باشد.

نتیجه‌گیری و مطالعات آتی:

مطالعه ما بعنوان اولین قدم در رابطه با اثر نیکوتین بر بیان و عملکرد گیرنده‌های TLR در سطح سلول‌های بنیادی-پیش‌ساز خونی نشان داد که دوزهای مختلف نیکوتین در محیط برون‌تنی باعث افزایش بیان گیرنده TLR2 در سطح این سلول‌ها می‌گردند. اینکه تغییر میزان بیان این گیرنده بر چه مکانیسمی استوار بوده و اثرات احتمالی آن بر روند خونسازی چه می‌تواند باشد موضوع مطالعات آتی خواهد بود. با توجه به اینکه در مورد اثرات درون‌تنی نیکوتین بر روند خونسازی در افراد سیگاری و همچنین افراد دریافت کننده درمان جایگزین نیکوتینی اطلاعات چندانی در دست نیست، نقش نیکوتین علاوه بر میزان بیان در نحوه عملکرد گیرنده‌های TLR و تاثیر احتمالی آن در تغییر الگوی تمایزی سلول‌های بنیادی-پیش‌ساز خونی نیز می‌توانند موضوع‌های قابل توجه‌ای برای پژوهش‌های آتی باشند.

منابع:

1) Burberry A, Zeng MY, Ding L, et al. Infection mobilizes hematopoietic Stem cells through cooperative NOD-like receptor and Toll-Like Receptor signaling. Cell Host & Microbe. 2014; 15(6):779–791.
2) Nagai Y, Garrett KP, Ohta S, et al. Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. Immunity. 2006; 24(6):801–812.
3) De Luca K, Frances-Duvert V, Asensio MJ, et al. The TLR1/2 agonist PAM 3 CSK 4 instructs commitment of human hematopoietic stem cells to a myeloid cell fate. Leukemia. 2009; 23(11):2063–2074.
4) Sioud M and Fløisand Y. TLR agonists induce the differentiation of human bone marrow CD34 progenitors into CD11c CD80/86 DC capable of inducing a Th1-type response. European Journal of Immunology. 2007; 37(10):2834–2846.
5) Sioud M, Fløisand Y, Forfang L, Lund-Johansen F. Signaling through toll-like receptor 7/8 induces the differentiation of human bone marrow CD34+ progenitor cells along the myeloid lineage. Journal of Molecular Biology. 2006; 364(5): 945–954.
6) Herman A, Romine M, Monlish D, Schuettpelz L G. Toll like receptor 2 signaling regulates hematopoietic stem cell function and promotes G-CSF mediated HSC mobilization. Blood. 2014; 124 (21):4334.
7) Yáñez A, Megías J, O'Connor JE, Gozalbo D, Gil ML. Candida albicans induces selective development of macrophages and monocyte derived dendritic cells by a TLR2 dependent signalling. PLOS One. 2011; 6 (9): e24761.
8) Boiko J.R, Borghesi L. Hematopoiesis sculpted by pathogens: toll-like receptors and inflammatory mediators directly activate stem cells. Cytokine. 2012; 57(1):1–8.
9) King K Y and Goodell M A. Inflammatory modulation of hematopoietic stem cells: viewing the hematopoietic stem cell as a foundation for

the immune response. Nature Reviews Immunology. 2011; 11(10):685–692.
10) Shi X, Siggins RW, Stanford WL, Melvan JN, Basson MD, Zhang P. Toll-like receptor 4/stem cell to granulocyte development during the granulopoietic response to Escherichia coli bacteremia. Infection & Immunity. 2013; 81(6):2197–2205.
11) VanHook AM. Mobilizing hematopoietic stem cells. Science Signaling. 2014; 7(331):ec168.
12) Welner RS, Pelayo R, Nagai Y, et al. Lymphoid precursors are directed to produce dendritic cells as a result of TLR9 ligation during herpes infection. Blood. 2008; 112(9):3753-3761.
13) Zhou J, Eksioglu EA, Fortenbery NR, et al. Bone marrow mononuclear cells up-regulate toll-like receptor expression and produce inflammatory mediators in response to cigarette smoke extract. PLOS One. 2011; 6(6):e21173.
14) Pace E, Ferraro M, Siena L, et al. Cigarette smoke increases toll-like receptor 4 and modifies lipopolysaccharide-mediated responses in airway epithelial cells .Blackwell Publishing. Immunology. 2008; 124 (3):401–411.
15) Szatmary Z. Molecular biology of toll-like receptor. General Physiology and Biophysics. 2012; 31(4):357-366.
16) Semlali A, Witoled C, Alanazi M, Rouabhia M. Whole cigarette smoke increased the expression of tlrs, hbds, and proinflammory cytokines by human gingival epithelial cells through different signaling pathways. PLOS One. 2012; 7(12):e52614.
17) Hamano R, Takahashi HK, Iwagaki H, Yoshino T, Nishibori M, Tanaka N. Stimulation of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor inhibits CD14 and the toll-like receptor 4 expression in human monocytes .Shock. 2006; 26(4):358-364.
18) Kim TH, Kim SJ, Lee SM. Stimulation of the α7 nicotinic acetylcholine receptor protects against sepsis by inhibiting toll-like receptor via phosphoinositide 3-Kinase activation. The Journal of Infectious Diseases 2014; 209(10):1668-1677.
19) Wang YY, Hu ChF, Li J, You X, Gao FG. Increased translocation of antigens to endosomes and TLR4 mediated endosomal recruitment of TAP contribute to nicotine augmented cross presentation. Oncotarget. 2016; 7(25):38451-38466.
20) Café-Mendes CC, Garay-Malpartida HM, Malta MB, et al. Chronic nicotine treatment decreases LPS signaling through NF-κB and TLR-4 modulation in the hippocampus. Neuroscience Letters. 2017; 636:218-224.
21) Xu Y, Zhang Y, Cardell LO. Nicotine exaggerates LPS-induced airway hyperreactivity via JNK-mediated up-regulation of toll-like receptor 4. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 2014; 51(3):370-379.
22) Megías J,Yáñez A, Moriano S, et al. Direct toll-like receptor-mediated stimulation of hematopoietic stem and progenitor cells occurs in vivo and promotes differentiation toward macrophages. Stem Cells. 2012; 30(7):1486–1495.

Nafas, Vol. 5, No. 2, Summer 2018, Pages: 26-34

Original Article

The Effect of Nicotine on TLR2 and TLR4 Expression on Surface of the Umbilical Hematopoietic Stem and Progenitor Cells

Laya takbiri Osgoei[1], Kazem Parivar[2], Esmaeil Mortaz [3,4*], Marzieh Ebrahimi[5]

1) Department of Microbiology, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2) Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3) Department of Immunology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4) Clinical Tuberculosis and Epidemiology Research Center, National Research Institute of Tuberculosis and Lung Diseases (NRITLD), Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5) Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, Academic Center for Education Culture and Research, Tehran, Iran

Abstract:
The stimulation of hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) by stresses such as infectious microorganisms motivate them to differentiate toward myeloid linage. This is done through the toll like receptors (TLRs) on their membrane surface. The present study tried to evaluate the effect of nicotine (as an environmental factor) on expression of TLR4 and TLR2 on HSPCs.
For this purpose, the mononuclear cells of umbilical cord blood (UCB) were isolated, cultured and treated with three doses of nicotine (10nM, 1µM and 100µM) for 24 hours. Then, the expression of TLR4 and TLR2 on HSPCs (CD34+ cells) was determined by flow cytometry method. All doses of nicotine resulted in significant increment of TLR2 expression but had no effect on the expression of TLR4.
Accordingly, this finding indicates that nicotine can stimulate the expression of TLR2 on UCB-HSPCs, in vitro.
Keywords: Nicotine, Umbilical cord blood, Hematopoietic stem and progenitor cells. TLR4, TLR2

* **Corresponding Author:**
Esmaeil Mortaz, Clinical Tuberculosis and Epidemiology Research Center, Daar-Abad, Niavaran, Tehran, Iran. Email: e.mortaz@uu.nl