

## The Effect of Oncolytic Reovirus Infection on Nitric Oxide Secretion and Induction of Apoptosis in Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells

Razieh Sadat Banijamali<sup>1</sup>, Hoorieh Soleimanjahi<sup>1</sup>, Sara Soudi<sup>2</sup>, Hesam Karimi<sup>1</sup>

1. Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2. Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

### Article Information

#### Article history:

Received: 2018/05/27

Accepted: 2018/06/25

Available online: 2018/10/11

#### Article Subject:

Medical Virology

IJMM 2018; 12(3): 218-229

#### Corresponding author:

#### Hoorieh Soleimanjahi

Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

#### Email:

soleim\_h@modares.ac.ir

Use your device to scan  
and read the article online



### Abstract

**Background and Aims:** Oncolytic viruses (OVs) are a new approach in treatment of cancer. Antitumor efficacy of OV was limited due to insufficient and non-specific viral delivery to tumor sites. To overcome this issue, mesenchymal stem cells (MSCs) were used for their ability to specifically homing into tumors. The main aim of this study was to use MSCs as carriers and investigate the effect of oncolytic reovirus infection in MSCs, induction of apoptosis, nitric oxide (NO) secretion and their effects for selectively killing tumor cells, to use in future.

**Materials and Methods:** MSCs isolated from mice adipose tissue and confirmed. Then, the ability of the virus to infect MSCs and the effect of reovirus infection in induction of apoptosis and NO secretion in MSCs were evaluated.

**Results:** The results demonstrate that reovirus could replicate on MSCs. The finding indicated that the NO production significantly was higher at 72 h post infection with different MOI in comparison to the control cells. Also, reovirus induced high level of apoptosis in the MSCs at 48 h post infection compared with the control cells.

**Conclusions:** Based on observed results, reovirus increased the secretion of iNOS (inducible nitric oxide) in the infected MSCs at 48 h post infection; therefore, high amounts of NO and reovirus replication were found to trigger apoptosis at 48 h post infection. Therefore, by optimizing the replication time of virus in the MSCs, specific viral delivery to tumor sites are available and causes cancer cells' death.

**Keywords:** Oncolytic Reovirus T3D; Mesenchymal Stem Cell (MSC); Carrier Cell; Nitric Oxide (NO); Apoptosis; Cancer Therapy

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

### How to cite this article:

Banijamali R S, Soleimanjahi H, Soudi S, Karimi H. The Effect of Oncolytic Reovirus Infection on Nitric Oxide Secretion and Induction of Apoptosis in Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. Iran J Med Microbiol. 2018; 12 (3) :218-229



## اثر عفونت رئوویروس آنکولیتیک بر میزان ترشح نیتریک اکساید و القای آپوپتوز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی

راضیه سادات بنی‌جمالی<sup>۱</sup>، حوریه سلیمان جاهی<sup>۱</sup>، سارا صعودی<sup>۲</sup>، حسام کریمی<sup>۱</sup>

۱. گروه ویروس‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲. گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۰۶

پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۰۴

انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۰۷/۱۹

موضوع:

ویروس‌شناسی پزشکی

IJMM1397;12(3): 218-229

نویسنده مسئول:

حوریه سلیمان جاهی

گروه ویروس‌شناسی، دانشکده

علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس،

تهران، ایران

پست الکترونیک:

[soleim\\_h@modares.ac.ir](mailto:soleim_h@modares.ac.ir)

**زمینه و هدف:** به‌کارگیری ویروس‌های آنکولیتیک، از شیوه‌های جدید درمان سرطان است. اثربخشی ضدتوموری آنها به‌دلیل انتقال غیراختصاصی به محل تومور، ضعیف است. برای غلبه بر این مشکل از سلول‌های بنیادی برای انتقال و لانه‌گزینی ویروس در محل تومور استفاده می‌شود. هدف کلی مطالعه، استفاده از سلول‌های بنیادی به‌عنوان حامل و بررسی اثر عفونت رئوویروس روی این سلول‌ها، القای آپوپتوز، ترشح نیتریک اکساید، رابطه بین آپوپتوز القایی و ترشح نیتریک اکساید به‌منظور به‌کارگیری آنها در آینده برای کشتن انتخابی سلول‌های توموری است.

**مواد و روش کار:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌عنوان حامل از بافت چربی جداسازی، کشت و تأیید شدند. سپس توانایی ویروس در آلوده‌کردن سلول‌های بنیادی و اثر عفونت رئوویروس بر ترشح نیتریک اکساید و القای آپوپتوز در این سلول‌ها بررسی شد. **یافته‌ها:** نتایج نشان داد رئوویروس‌ها قابلیت تکثیر در سلول‌های بنیادی را دارند و موجب تولید زیاد نیتریک اکساید در ۷۲ ساعت بعد از عفونت با MOI های مختلف نسبت به سلول‌های شاهد می‌شوند. همچنین سبب افزایش آپوپتوز در ۴۸ ساعت پس از عفونت در سلول‌های بنیادی نسبت به سلول‌های شاهد می‌شوند.

**نتیجه‌گیری:** طبق نتایج حاصل، ۴۸ ساعت پس از آلودگی با رئوویروس، بیشترین میزان ترشح نیتریک اکساید القایی در سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوده مشاهده شد؛ بنابراین، مقادیر زیاد نیتریک اکساید و تکثیر رئوویروس منجر به القای آپوپتوز بیشینه در ۴۸ ساعت بعد از آلودگی در این سلول‌ها می‌شود. با تنظیم زمان تکثیر در سلول‌های بنیادی، می‌توان ویروس‌ها را در زمان مناسب به محل تومور هدایت کرد و باعث مرگ سلول‌های سرطانی شد.

**کلمات کلیدی:** آنکولیتیک رئوویروس سوش T3D، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سلول حامل، نیتریک اکساید، آپوپتوز، درمان

سرطان

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبیولوژی پزشکی ایران محفوظ است.

### مقدمه

سرطان یکی از اصلی‌ترین مشکلات سلامت جامعه بشری در سراسر جهان محسوب می‌شود؛ به‌طوری که به‌عنوان دومین عامل مرگ‌ومیر در سطح جهانی گزارش شده است (۱).

روش‌های رایج درمان سرطان شامل جراحی، شیمی‌درمانی و پرتودرمانی است که کارایی بالایی نداشته و اغلب با مشکلات جانبی شدیدی برای فرد همراه هستند. امروزه ابداع روش‌های درمانی جدید، به‌منظور هدف‌گیری اختصاصی سلول‌های توموری،

موردتوجه بسیاری از مطالعات آزمایشگاهی و پیش‌بالینی هستند (۲).

کاربرد ویروس‌های آنکولیتیک یک دیدگاه نوین در درمان بدخیمی‌های انسانی است که از جمله آن بهره‌گیری از ویروس‌های مهندسی‌شده یا ویروس‌هایی با گرایش بافتی به سلول‌های ترانسفورم‌شده خاص است که سبب افزایش تخریب بافت توموری یا سلول‌های آن شده و از آسیب به سلول‌های غیرسرطانی جلوگیری می‌شود (۳،۴). امروزه انواع مختلفی از آنکولیتیک

انکولیتیک ویروس‌ها به محل تومور و ترانسداکشن ضعیف سلول‌های سرطانی (۱۵، ۱۴)، از استراتژی‌های مختلفی برای غلبه بر این محدودیت‌ها استفاده می‌شود که از جمله آنها می‌توان به سیستم‌های تحویلی اشاره کرد که قابلیت هدف‌گیری سلول‌های سرطانی را به صورت ذاتی داشته و در شرایط درون تنی نقش چاپرونی در تحویل ویروس دارند. از جدیدترین و کاراترین حامل‌ها می‌توان به سلول‌های بنیادی مزانشیمی اشاره کرد (۱۶).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی براساس تعریف انجمن علمی بین‌المللی سلول درمانی International Society For Cellular Therapy (ISCT) دارای سه ویژگی هستند: ۱. در شرایط کشت معمولی قدرت چسبندگی به بستر ظروف کشت را دارند. ۲. شاخص‌های سطحی CD105، CD73 و CD90 را بیان کرده و نسبت به شاخص‌های هماتوپوئیتیک، به ویژه CD45 و CD34 و سایر شاخص‌ها از قبیل CD14، CD11b، CD79، CD19 و HLA-DR منفی هستند. ۳. توانایی تمایز به سلول‌های چربی، غضروف و استخوان را در شرایط آزمایشگاهی دارند (۱۸، ۱۷).

یکی از ویژگی‌های این سلول‌ها نقش آنها در القای آپوپتوز است. طی مطالعه‌ای مشخص شد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی از طریق ترشح Monocyte chemotactic protein 1 که به اختصار MCP-1 نامیده می‌شود، باعث فراخوانی و فعال شدن سلول‌های T شده و از طریق لیگاند Fas (FasL) باعث القای آپوپتوز در این سلول‌ها می‌شوند که این عمل منجر به ایجاد تولرانس ایمنی می‌شود (۱۹). از جمله دلایل استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به عنوان حامل ویروسی مناسب، داشتن توانایی تنظیم پاسخ‌های ایمنی، حفاظت از پارتیکل‌های ویروسی در برابر آنتی‌بادی‌ها و هدایت هدفمندتر ویروس‌ها به سمت بافت توموری است (۲۰). مطالعات نشان داده که توانایی تنظیم پاسخ‌های ایمنی سلول‌های بنیادی مزانشیمی وابسته به ترشح فاکتورهای محلول  $TGF-\beta$ ، نیتریک اکساید، ایندولامین ۲-۳ دی اکسیژناز (IDO) و تماس سلول به سلول است (۲۱).

نیتریک اکساید (NO) رادیکال آزادی است که در حین متابولیسم L-arginine به نیتريت و نیترات تولید می‌شود که این واکنش را آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز کاتالیز می‌کند. نیتریک اکساید در بسیاری از فرآیندهای سلولی مثل تنظیم رشد و بقای سلول، آپوپتوز، تکثیر و تمایز سلول نقش دارد (۲۲).

مطالعات اخیر نشان داده که نیتریک اکساید باعث مهار تکثیر ویروس در ماکروفاژ و سلول‌های دیگر می‌شود. نیتریک اکساید عامل مهمی برای کنترل ویروس در سلول بوده و میانجی

ویروس‌ها مثل ویروس سرخک، هرپس سیمپلکس ویروس، انواع آدنوویروس‌های مهندسی‌شده و رئوویروس‌ها در حال طی کردن کارآزمایی‌های بالینی برای گرفتن تأییدیه مصرف در بیماران سرطانی هستند (۵). همان‌طور که اشاره شد رئوویروس‌ها در شمار ویروس‌های انکولیتیک هستند که کارایی آنها به منظور استفاده برای درمان سرطان به اثبات رسیده است.

رئوویروس از خانواده رئوویریده است که ژنوم RNA دورشته‌ای ۱۰ قطعه‌ای دارد و بدون انولوپ است. این ویروس چهار سوش Jones, Lang, Abney و Dearing دارد (۶). اگرچه رئوویروس در انسان یک عفونت ملایم در مجاری فوقانی تنفسی و دستگاه گوارشی ایجاد می‌کند، اما تاکنون به عنوان عامل خطر برای هیچ‌گونه بیماری مهمی در بزرگ‌سالی معرفی و گزارش نشده است (۷). مطالعات زیادی نشان داده‌اند که رئوویروس سوش 3 Dearing (T3D) خاصیت انکولیتیکی دارد (۸).

توانمندی‌های رئوویروس‌های انکولیتیک که عبارت‌اند از: قدرت آلوده‌کنندگی بالا و قابلیت بالای تکثیر، وجود کشت‌های سلولی کارآمد و گستره میزبانی مناسب، کارورزی آسان ویروس، توانایی القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی به ویژه سلول‌های بنیادی سرطان (Cancer Stem Cells)، امکان تلفیق با سایر درمان‌های رایج و ایجاد نکردن بیماری مهم در بزرگ‌سالان، رئوویروس را در ردیف یک درمان ضدسرطان برای آزمایش‌های بالینی قرار داده است (۹). ویژگی انکولیتیکی این ویروس به طور گسترده‌ای در بسیاری از محیط‌ها، چه آزمایشگاهی و چه بالینی به اثبات رسیده است (۱۳-۱۰).

مکانیسم اصلی انکولیتیکی رئوویروس القای آپوپتوز سلولی است که شامل هر دو مسیر اگزوزنوس و اندوزنوس است. در مرگ سلولی القا شده از طریق رئوویروس، رهاسازی فاکتور محلول TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) سبب آپوپتوز می‌شود؛ که در این فرایند Death-Receptor Signaling نقش ویژه‌ای دارد.

در مطالعات بالینی کارایی فرایند انتقال انکولیتیک ویروس‌ها به محل تومور، پایین است. با توجه به مشکلات کاربردی انکولیتیک ویروس‌ها از جمله: وجود آنتی‌بادی‌های خنثی‌کننده گردش (Circulating neutralizing antibodies (NABs) علیه ویروس انکولیتیک در خون، عفونت ناقص (Abortive infection) ویروس انکولیتیک، سرعت تکثیر بالای برخی بافت‌های سرطانی در مقایسه با سرعت تکثیر ویروس انکولیتیک، کاهش ضریب نفوذ ویروس انکولیتیک در بافت سرطانی، ناکافی بودن میزان تحویل

### تعیین تیتروبروس

به منظور تعیین تیتروبروس T3D به روش Cell Culture Infectious Dose 50 Percent (CCID<sub>50</sub>) تعداد  $10^3 \times 25$  سلول L929 در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد. بعد از ۲۴ ساعت و رسیدن به تراکم  $80\%$ ، سلول‌های کشت داده شده برای تیتراسیون ویروس استفاده شد. برای این منظور ابتدا رقت‌های ده برابری از ویروس با محیط کشت ( $10^{-1}$  -  $10^{-8}$ ) تهیه شد. به منظور تیتراسیون، سلول‌ها دو بار با بافر فسفات (PBS) شست‌وشو داده شدند و در ادامه به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه،  $100$  میکرولیتر از هر رقت ویروس افزوده شد. به منظور جذب ویروس به سلول، پلیت به مدت ۱ ساعت در انکوباتور  $37$  درجه سلسیوس قرار داده شد. بعد از گذشت زمان لازم، سلول‌ها با بافر فسفات شسته شده و  $100$  میکرولیتر محیط کشت بدون سرم به هر چاهک اضافه شد و پلیت در انکوباتور  $37$  درجه سلسیوس نگهداری شد.

### جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق

#### از بافت چربی

در این پژوهش از موش‌های C57BL/6 ماده ۶-۵ هفته‌ای (انستیتو پاستور ایران) استفاده شد. ابتدا موش‌ها به مدت یک هفته در حیوان‌خانه نگهداری شدند تا از نظر زیستی با محیط هماهنگ شوند. سپس با رعایت اصول کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه تربیت مدرس به شماره شناسه IR.TMU.REC.1395.415 مربوط به کمیته اخلاق پزشکی، به روش قطع نخاعی کشته شدند. در ادامه، بافت چربی ناحیه شکمی موش‌ها به منظور جداسازی سلول بنیادی مزانشیمی در شرایط استریل با پنس و قیچی جدا شده و پس از جداکردن بافت‌های زائد، نمونه‌ها با استفاده از تیغ جراحی تا حد امکان خرد شدند. قطعات بافت حاصل در محلول  $10\%$  آنزیم کلاژناز تیپ یک (Invitrogen, USA) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای  $37$  درجه سلسیوس قرار داده شد تا ماتریکس بین‌سلولی بافت کاملاً هضم شود. بعد از خنثی کردن آنزیم با محیط کشت کامل (حاوی FBS)، سوسپانسیون سلولی به مدت ۵ دقیقه در دور  $1800$  rpm سانتریفیوژ شد. سوسپانسیون سلولی به همراه محیط کشت DMEM حاوی  $10\%$  آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین ( $100$  U/ml) استرپتومایسین ( $100$  μg/ml) و  $20\%$  سرم، در فلاسک T75 کشت داده شد و در دمای  $37$  درجه سلسیوس، رطوبت  $95\%$  و  $5\%$  CO<sub>2</sub> انکوبه شد. فلاسک‌ها هر ۲ یا ۳ روز یک‌بار تا رسیدن به تراکم  $80\%$  تعویض محیط شدند.

گری این فعالیت ضدویروسی از طریق کاهش متابولیسم سلولی رخ می‌دهد (۲۲). از جمله عملکردهای نیتریک اکساید در سیستم ایمنی می‌توان به اثر ضدویروسی، تحریک و سرکوب سیستم ایمنی و آثار سایتوتوکسیک آن اشاره کرد (۲۳).

وقتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در تماس با عوامل بیماری‌زا قرار می‌گیرند، محصولات ترشحی، روند مهاجرت، تکثیر، تمایز و همچنین بقای آنها (آپوپتوز) دستخوش تغییر می‌شود. طی این تغییرات، سلول‌های بنیادی مزانشیمی ترشحات سایتوکاین‌ها، کموکاین‌ها و دیگر مولکول‌های سیگنالی‌نگ خود را افزایش می‌دهند. با توجه به مطالعات انجام‌شده، سلول‌های بنیادی مزانشیمی در پاسخ به سیگنال‌های کموتاکتیک رها شده از سوی عوامل پاتوژن و یا سلول‌های آلوده به این عوامل و نیز سلول‌های غیرنرمال، قادر به جهت‌گیری و مهاجرت به سمت آنها هستند (۲۴).

از آنجایی که هدف کلی این مطالعه بررسی استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به عنوان حامل رئوویروس انکولیتیک است، می‌بایست قبل از بررسی آنها در مدل آزمایشگاهی و حیوانی، با توجه به تعامل‌های ذکر شده پاتوژن‌ها با سلول‌های بنیادی مزانشیمی، اثر رئوویروس را بر بیولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، روند تکثیر ویروس در آن سلول‌ها و رابطه بین تکثیر ویروس و نیتریک اکساید ترشح شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی و همچنین توانایی القای آپوپتوز رئوویروس را در سلول‌های آلوده بررسی کرد.

### مواد و روش‌ها

#### سلول و ویروس

در این مطالعه از رده سلولی L929 برای تکثیر رئوویروس T3D استفاده شد. سلول L929، سلول فیروپلاست جدا شده از بافت پستان و چربی موش نر C3H/An صدروزه است که از مرکز تحقیقات فناوری بن یاخته تهیه شد. برای کشت سلول، محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) دارای  $10\%$  سرم جنین گاوی (FBS) و  $1\%$  آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین ( $100$  U/ml) استرپتومایسین ( $100$  μg/ml) به کار برده شد (همه مواد مصرفی محصول شرکت Gibco, USA است). رئوویروس T3D به صورت هدیه از جناب آقای دکتر شهرآبادی از دانشگاه علوم پزشکی ایران دریافت شد و به منظور تهیه استوک ویروسی در مقیاس انبوه، ویروس در محیط کشت حاوی سلول L929 کشت داده شد.

### اندازه‌گیری نیتریک اکساید با تست گریس

به‌منظور اندازه‌گیری نیتریک اکساید تعداد  $10^4 \times 5$  سلول بنیادی مزانشیمی در پلیت ۱۲ خانه کشت داده شد و رئوویروس T3D با MOI های (Multiplicity of Infection) مختلف (۱ و ۰/۱) به سلول‌ها تلقیح شد. ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تلقیح، سوپرناتانت سلول‌ها جمع‌آوری شد و به‌منظور حذف بقایای سلولی به‌مدت ۵ دقیقه در دور  $2000 \text{ rpm}$  سانترفیوژ شد. برای سنجش نیتريت (به‌طور غیرمستقیم نیتریک اکساید) در سوپرناتانت گروه‌های مورد بررسی، ۵۰ میکرولیتر از سوپرناتانت هر گروه با تکرار ۳ تایی در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ریخته شد و به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر معرف گریس (Sigma, Germany) اضافه شد. پس از افزودن معرف، نیتريت موجود در نمونه‌ها به‌صورت طیفی از رنگ‌های ارغوانی ظاهر می‌شود که میزان آن در طول موج ۵۴۰ نانومتر با دستگاه الیزا خوانده شد. منحنی استاندارد با سنجش طول موج غلظت‌های مختلف معرف نیتریک اکساید (۱ تا ۱۰۰۰ میکرومول نیتريت سدیم) رسم شد و با توجه به آن غلظت نیتريت نمونه‌ها برحسب میکرومول محاسبه شد.

### سنجش آپوپتوز به روش فلوسایتومتری

برای سنجش میزان آپوپتوز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی از کیت Annexin V/7AAD Apoptosis Detection Kit (Invitrogen, USA) استفاده شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی در پلیت ۶ خانه کشت داده شد. بعد از تشکیل تک‌لایه سلولی با تراکم  $8.0 \times 10^4$ ، سلول‌ها با MOI های ۱ و ۰/۱ از رئوویروس آلوده شدند. ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از آلودگی، سلول‌ها از بستر پلیت جمع‌آوری و به‌مدت ۵ دقیقه در دور  $1200 \text{ rpm}$  سانترفیوژ شدند. رسوب سلولی یک‌بار با بافر فسفات شست‌وشو داده شد و در ۵۰۰ میکرولیتر از بافر فسفات سوسپاند شد. در مرحله بعد، ۲/۵ میکرولیتر از Annexin V به هر نمونه اضافه شد و نمونه‌ها در دمای اتاق و در تاریکی به‌مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. سپس ۲/۵ میکرولیتر از 7AAD به هر نمونه اضافه شد و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، نمونه‌ها به لوله‌های فلوسایتومتری منتقل شده و بررسی‌های آپوپتوز با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری انجام گرفت و یافته‌ها با نرم‌افزار فکس دیوا آنالیز شدند.

### آنالیز آماری

همه آزمایش‌ها با سه بار تکرار صورت گرفت. با کمک نرم‌افزار prism 7.04 برای تمام داده‌ها میانگین و انحراف‌معیار

برای پاساژ سلولی، ابتدا سلول‌ها با استفاده از آنزیم تریپسین (Gibco, USA) ۰/۲۵٪ از بستر فلاسک جدا شد و پس از خنثی کردن اثر آنزیم با محیط کشت کامل، محلول سلولی در دور  $1800 \text{ rpm}$  سانترفیوژ شد. در ادامه رسوب سلولی با استفاده از محیط کشت کامل سوسپاند و در فلاسک T75 کشت داده شد.

### تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول استخوان

#### و چربی

برای بررسی توان تمایزی به سلول‌های استخوان و چربی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی در پلیت ۲۴ خانه کشت داده شد و پس از رسیدن به تراکم سلولی مناسب، محیط کشت رویی سلول‌ها خارج شد و با محیط کشت حاوی فاکتورهای اختصاصی تمایز به سلول استخوان و چربی (مرکز تحقیقات و فناوری بن یاخته) جایگزین شد. به چاهک‌هایی که به‌عنوان کنترل انتخاب شده بودند محیط کشت بدون فاکتورهای تمایزی اضافه شد. به مدت ۳ هفته، محیط تمایزی هر ۳ روز یک‌بار تعویض شد. بعد از این مدت به‌منظور بررسی تمایز سلول‌ها، ابتدا سلول‌ها با پارافمالدهید ۴٪ تثبیت شدند و در ادامه با رنگ‌آمیزی اختصاصی Alizarin Red-S وجود رسوب کلسیم فسفات و با رنگ‌آمیزی اختصاصی Oil Red-O وجود واکوئل‌های لیپیدی که به‌ترتیب از مشخصه‌های سلول‌های استخوانی و سلول‌های چربی تمایز یافته هستند، در زیر میکروسکوپ بررسی شد.

### تلقیح ویروس به سلول‌های بنیادی مزانشیمی

تیتراهای مختلف ( $10^{-10}$  تا  $10^{-8}$ ) رئوویروس T3D به سلول‌های بنیادی مزانشیمی تلقیح شده و برای جذب ویروس به سلول، پلیت به‌مدت ۱ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. بعد از گذشت زمان لازم، سلول‌ها با بافر فسفات شسته شده و ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت بدون سرم به هر چاهک اضافه شد و پلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد.

### تعیین تیترا رئوویروس در سلول‌های بنیادی مزانشیمی

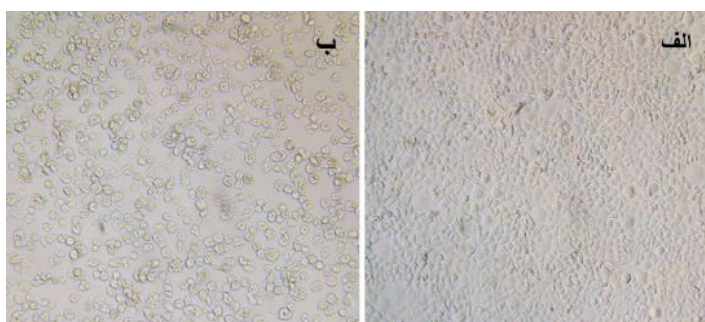
بدین منظور سلول‌های بنیادی مزانشیمی در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد. بعد از تشکیل تک‌لایه سلولی با تراکم  $8.0 \times 10^4$ ، رقت‌های سریالی ده‌برابری از رئوویروس T3D به سلول‌ها تلقیح شد. سلول‌ها به‌مدت ۱ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند و سپس دو بار با بافر فسفات شست‌وشو داده شده و ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت بدون سرم به هر چاهک اضافه شد و پلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. پس از گذشت ۷۲ ساعت تیترا ویروس و اثرات سایتوپاتیک آن (CPE) با تعیین  $CCID_{50}$  و با روش Read & Muench تعیین شد.

رئوویروس استفاده شد. آثار تخریب سلولی (CPE) در کمتر از ۱۸ ساعت شروع و ۷۲ ساعت بعد از آلودگی کامل شد (شکل ۱). همان‌گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، تیترا ویروس براساس روش Read & Muench محاسبه و تیترا  $CCID_{50}/ml$   $10^{7.31}$  حاصل شد.

محاسبه شد. معنی‌دار بودن نتایج حاصل با استفاده از آزمون ANOVA دوطرفه ارزیابی شد.

#### یافته‌ها

**نتایج حاصل از تعیین تیترا رئوویروس T3D**  
به‌منظور تعیین تیترا رئوویروس مورد استفاده در این مطالعه از سلول فیروپلاستی L929 به‌عنوان سلول میزبان طبیعی و اصلی



شکل ۱. نمایی از سلول‌های L929 سالم در مقایسه با سلول آلوده به رئوویروس T3D با بزرگ‌نمایی  $100\times$ ؛ الف) سلول سالم؛ ب) آثار تخریبی و سائیتوپاتیک رئوویروس پس از گذشت ۷۲ ساعت از تلقیح

جدول ۱. محاسبه  $CCID_{50}$  رئوویروس T3D بر سلول L929 به روش Read & Muench

درصد عفونت	میزان عفونت	مقادیر تجمعی منفی	مقادیر تجمعی مثبت	مقادیر مشاهده‌شده منفی	مقادیر مشاهده‌شده مثبت	عفونی‌شده / تلقیح‌شده	رقت ویروسی
۱۰۰	۳۵/۳۵	۰	۳۵	۰	۶	۶/۶	$10^{-1}$
۱۰۰	۲۹/۲۹	۰	۲۹	۰	۶	۶/۶	$10^{-2}$
۱۰۰	۲۳/۲۳	۰	۲۳	۰	۶	۶/۶	$10^{-3}$
۱۰۰	۱۷/۱۷	۰	۱۷	۰	۶	۶/۶	$10^{-4}$
۱۰۰	۱۱/۱۱	۰	۱۱	۰	۶	۶/۶	$10^{-5}$
۶۲/۵	۵/۸	۳	۵	۳	۳	۳/۶	$10^{-6}$
۲۲/۲	۲/۹	۷	۲	۴	۲	۲/۶	$10^{-7}$
۰	۰/۱۳	۱۳	۰	۶	۰	۰/۶	$10^{-8}$

میزان عفونت بیانگر مقادیر تجمعی مثبت به کل موارد تجمعی است. قبل از محاسبه  $CCID_{50}$  تمام این محاسبات انجام و درصد عفونت تعیین می‌شود و سپس وقتی که  $CCID_{50} 50\%$  را ایجاد می‌کند به‌عنوان یک  $CCID_{50}$  در نظر گرفته می‌شود.

$$Pd = \frac{50 - \text{درصد عفونت در بالای 50 درصد}}{\text{درصد عفونت در پایین 50 درصد} - \text{درصد عفونت در بالای 50 درصد}}$$

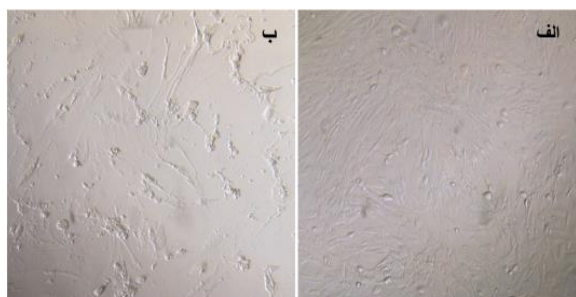
$$\text{لگاریتم رقت بالای } 50\% = (Pd \times \text{لگاریتم ضریب رقت}) + ID_{50}$$

Pd: proportionate distance

کردند. همان‌گونه که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، جمعیت نسبتاً همگونی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی، با مورفولوژی دوکی‌شکل مشابه سلول‌های فیروپلاستی در پاساژ سوم به دست آمد.

#### کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی

بعد از حدود ۲ هفته از هضم آنزیمی بافت چربی و کشت آن، تک‌لایه‌ای از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بستر فلاسک را پر



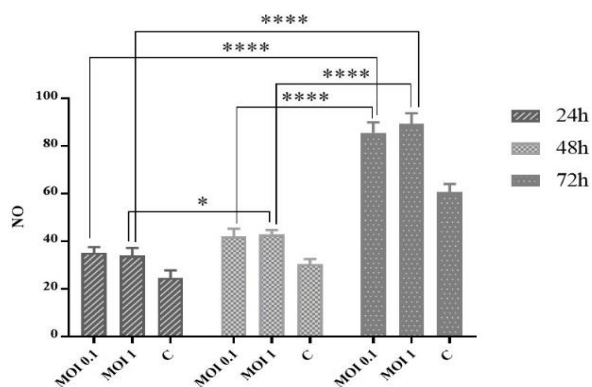
شکل ۴. نمایی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی سالم در مقایسه با سلول آلوده به رئوویروس T3D با بزرگ‌نمایی  $\times 100$ : الف) سلول سالم؛ ب) آثار تخریبی و سایتوپاتیک رئوویروس پس از ۷۲ ساعت از تلقیح

همچنین طبق جدول ۲، تیتراژ رئوویروس در سلول‌های بنیادی مزانشیمی براساس روش Read & Muench محاسبه و تیتراژ  $CCID_{50}/ml$   $10^{6.31}$  حاصل شد.

### سنجش میزان ترشح نیتریک اکساید در سلول‌های

#### بنیادی مزانشیمی آلوده به رئوویروس

براساس نمودار ۱ نتایج به‌دست‌آمده از آزمون گریس حاکی از آن بود که در میزان ترشح نیتریک اکساید در سوپرناتانت سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوده‌شده با رئوویروس با MOI های ۱ و ۰/۱ در همهٔ ساعت‌ها، تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. در ساعت‌های اولیه میزان ترشح نیتریک اکساید در نمونه‌های آلوده کم بوده اما پس از ۷۲ ساعت بیشترین میزان ترشح نیتریک اکساید در سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوده‌شده با هر دو MOI از رئوویروس در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد.



نمودار ۱. میزان ترشح نیتریک اکساید در سوپرناتانت سلول‌های بنیادی مزانشیمی تلقیح‌شده با رئوویروس با MOI های ۱ و ۰/۱ در بازهٔ زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از آلودگی  
 \*\*\*\* نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار در سطح  $0.0001\%$  است.  
 \* نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار در سطح  $0.01\%$  است.

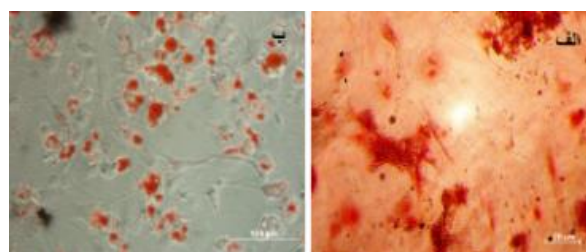


شکل ۲. مورفولوژی دوکی‌شکل سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی در پاساژ سوم در نمای میکروسکوپ فاز کنتراست با بزرگ‌نمایی  $\times 100$

### نتایج حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی

#### مشتق از بافت چربی به سلول استخوان و چربی

بعد از گذشت ۲۱ روز از القای تمایز، مورفولوژی سلول‌ها دچار تغییر شد. به‌طوری که در سلول‌های تمایز یافته به سلول استخوان، مناطق متراکم و ندول‌مانندی ایجاد و در سلول‌های تمایز یافته به چربی، واکوئول‌های لیپیدی تشکیل شد. در پایان ۲۱ روز از القا در راستای تأیید ماهیت سلول‌های تمایز یافته، رنگ‌آمیزی اختصاصی Alizarin Red-S حاکی از معدنی‌شدن ندول‌ها و رنگ‌آمیزی اختصاصی Oil Red-O حاکی از تشکیل قطرات چربی بود (شکل ۳-الف و ۳-ب).



شکل ۳. نمای میکروسکوپ نوری از تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی: الف) تمایز به سلول استخوان با رنگ‌آمیزی اختصاصی Alizarin Red-S با بزرگ‌نمایی  $\times 100$ ؛ ب) تمایز به سلول چربی با رنگ‌آمیزی اختصاصی Oil Red-O با بزرگ‌نمایی  $\times 100$

### تعیین تیتراژ رئوویروس T3D بر سلول‌های بنیادی

#### مزانشیمی به روش $CCID_{50}$

نتایج حاصل از تعیین تیتراژ ویروس بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی نشان می‌دهد که پس از گذشت ۲۴ ساعت از تلقیح، آثار تخریبی ویروس شروع شده و پس از ۷۲ ساعت به اوج خود رسید؛ به‌طوری که مورفولوژی سلول‌ها تغییر کرده و آثار تخریبی و سایتوپاتیک ویروس به‌وضوح مشخص بود (شکل ۴).

جدول ۲. محاسبه CCID<sub>50</sub> رئوویروس T3D بر سلول های بنیادی مزانشیمی به روش Read & Muench

درصد عفونت	میزان عفونت	مقادیر تجمعی منفی	مقادیر تجمعی مثبت	مقادیر مشاهده شده منفی	مقادیر مشاهده شده مثبت	عفونی شده / تلقیح شده	رقت ویروسی
۱۰۰	۲۴/۲۴	۰	۲۴	۰	۵	۵/۵	۱۰ <sup>-۱</sup>
۱۰۰	۱۹/۱۹	۰	۱۹	۰	۵	۵/۵	۱۰ <sup>-۲</sup>
۱۰۰	۱۴/۱۴	۰	۱۴	۰	۵	۵/۵	۱۰ <sup>-۳</sup>
۱۰۰	۹/۹	۰	۹	۰	۵	۵/۵	۱۰ <sup>-۴</sup>
۶۶/۷	۴/۶	۲	۴	۲	۳	۳/۵	۱۰ <sup>-۵</sup>
۱۴/۴	۱/۷	۶	۱	۴	۱	۱/۵	۱۰ <sup>-۶</sup>
۰	۰/۱۱	۱۱	۰	۵	۰	۰/۵	۱۰ <sup>-۷</sup>

میزان عفونت بیانگر مقادیر تجمعی مثبت به کل موارد تجمعی است. قبل از محاسبه CCID<sub>50</sub> تمام این محاسبات انجام و درصد عفونت تعیین می شود و سپس رقتی که ۵۰٪ CCID<sub>50</sub> را ایجاد می کند به عنوان یک CCID<sub>50</sub> در نظر گرفته می شود.

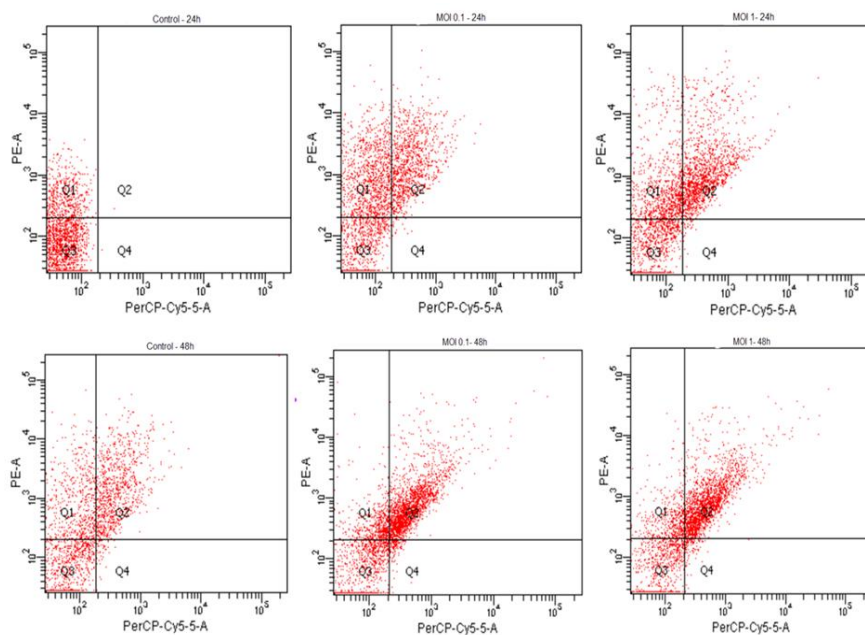
$$Pd = \frac{50 - \text{درصد عفونت در بالای 50 درصد}}{\text{درصد عفونت در پایین 50 درصد} - \text{درصد عفونت در بالای 50 درصد}}$$

لگاریتم رقت بالای ۵۰٪ + (Pd × لگاریتم ضریب رقت) = لگاریتم ID<sub>50</sub>

**Pd: proportionate distance**

طی آپوتوز اولیه فسفاتیدیل سرین موجود در سطح داخلی غشا به سطح خارجی غشای سلول منتقل شده و با Annexin V رنگ می شود؛ اما DNA قطعه قطعه سلول های نکروتیک شده با 7AAD رنگ می گیرد. این در حالی است که سلول هایی که با هر دو رنگ می شوند، دچار آپوتوز ثانویه شده اند (شکل ۵).

بررسی آپوتوز القاشده از طریق رئوویروس انکولیتیک در سلول های بنیادی مزانشیمی برای تعیین نوع مرگ سلولی القاشده از طریق رئوویروس T3D در سلول های بنیادی مزانشیمی، از دستگاه فلوسایتومتری با رنگ آمیزی Annexin V/7AAD استفاده شد. به این ترتیب که



شکل ۵. نمودار نقطه ای حاصل از بررسی آپوتوز القاشده در سلول های بنیادی مزانشیمی توسط انکولیتیک رئوویروس. محور عمودی Annexin V و محور افقی 7AAD: Q1: آپوتوز اولیه، Q2: آپوتوز ثانویه، Q3: سلول های زنده و Q4: نکروز.



منجر به این فرضیه شده، از که سلول‌های حامل می‌توانند برای مخفی کردن ویروس از سیستم ایمنی میزبان و افزایش حجم آن در حین انتقال به سمت هدف، استفاده کنند (۲۷).

حاملین سلولی توانایی مخفی کردن و محافظت از وکتورهای ویروسی را در مقابل سیستم ایمنی سلولی و هومورال دارند همچنین در برخی موارد می‌توان آنها را به صورت هدفمند به بافت مدنظر هدایت کرد (۲۸-۳۰). از جدیدترین و کاراترین حامل‌ها می‌توان به سلول‌های بنیادی مزانشیمی اشاره کرد.

در مطالعه‌ای که از سوی Gao و همکاران (۲۰۱۰) انجام شد، پاسخ‌های ایمنی قوی به دنبال استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی تولیدکننده اینترلوکین ۱۲ در مدل توموری سلول‌های کلیه مشاهده شد و بر اهمیت این سلول‌ها به عنوان حاملین مناسب برای انتقال ژن تأکید بیشتر شد (۳۱).

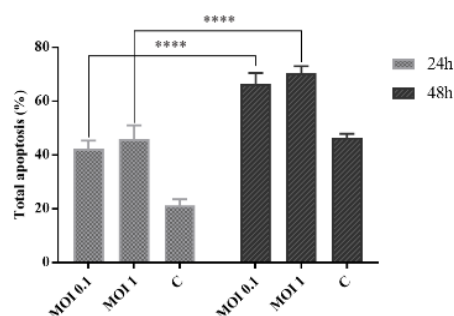
بر این اساس در این پروژه نیز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی موش C57BL/6، به عنوان حامل رئوویروس انکولیتیک استفاده شد و اثر عفونت ویروس بر میزان ترشح نیتریک اکساید از طریق سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی و القا، آپوپتوز در آن سلول‌ها بررسی شد.

مطالعات نشان می‌دهد که نیتریک اکساید یکی از مهم‌ترین مدیاتورهایی است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای تنظیم پاسخ‌های ایمنی، ترشح می‌کنند. نیتریک اکساید یکی از ترکیبات ترشحي و مهاری سلول‌های بنیادی مزانشیمی است که از طریق فعالیت آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز القایی تولید می‌شود (۳۲). فرآیندهای مختلفی از طریق نیتریک اکساید از جمله خودتجدیدپذیری، بقا (آپوپتوز)، مهاجرت، تکثیر و تمایز در سلول‌های بنیادی تنظیم می‌شود. تعدیل عملکردهای سلولی بستگی به غلظت آن دارد چراکه اثرات متضادی در هنگام مقایسه سطوح پایین و بالای نیتریک اکساید قابل مشاهده است (۳۳).

مطالعه Uboi و همکاران نشان داد که نیتریک اکساید سنتتاز القایی با اثر بر تکثیر ویروس، مانع القای مرگ در موش‌های آلوده به ویروس هاری شد (۳۴). این در حالی است که Dincel و همکاران نشان دادند افزایش تولید نیتریک اکساید به دنبال عفونت با Border Disease Virus (BDV) باعث القای آپوپتوز در سلول‌های نورونی آلوده به آن می‌شود (۳۵). پس نیتریک اکساید می‌تواند براساس شرایط یک عامل آپوپتوتیک و یا آنتی‌آپوپتوتیک باشد (۳۶).

مطالعه Darabi و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که دوز محرک سلول‌های بنیادی برای پلاریزه شدن به سمت فنوتیپ

با سنجش درصد آپوپتوز به کمک روش فلوسایتومتری، همان‌طور که در نمودار ۲ نشان داده شده است؛ افزایش معنی‌داری بین آپوپتوز القاشده از طریق رئوویروس پس از ۴۸ ساعت از تلقیح ویروس در مقایسه با القای آپوپتوز در ۲۴ ساعت اول و نیز کنترل وجود دارد. جالب‌توجه است که میزان آپوپتوز القاشده با دو MOI ۱ و ۰/۱ از رئوویروس تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند.



نمودار ۲. درصد کل آپوپتوز (آپوپتوز اولیه + آپوپتوز ثانویه) القاشده از طریق رئوویروس با MOI های ۱ و ۰/۱ در ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از آلودگی در مقایسه با گروه کنترل \*\*\*\*نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۰۰۱٪ است.

#### بحث

سرطان یکی از عمده‌ترین مشکلات بهداشت عمومی با نرخ بالای مرگ‌ومیر در سراسر جهان است (۲). امروزه بسیاری از ویروس‌های انکولیتیک توجه پژوهشگران را برای درمان سرطان، به خود جلب کرده و حتی یک ویروس محسوب می‌شود، برای درمان خاصی از یک هرپس ویروس محسوب می‌شود، برای درمان ملانوما، از سوی اداره غذا و داروی آمریکا (FDA) تأیید شده است (۲۵). تعدادی دیگر از ویروس‌های انکولیتیک از جمله رئوویروس به عنوان درمان‌های بالقوه برای سرطان در حال ارزیابی بالینی هستند؛ به طوری که برای درمان سرطان سر و گردن، استفاده از رئولایزین (رئوویروس T3D) همراه با شیمی‌درمانی در فاز ۳ کارآزمایی‌های بالینی است (۱۴).

با توجه به دلایل ذکر شده، در این پروژه از رئوویروس T3D به عنوان یک ویروس انکولیتیک استفاده شد. مکانیسم اصلی انکولیتیکی رئوویروس القای آپوپتوز آن است. طی مطالعه IL-RAE CHO و همکاران نشان داده شد که رئوویروس می‌تواند باعث القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان معده مقاوم به TRAIL شود (۲۶).

Sonabend و همکاران طی مطالعه‌ای نشان دادند که در شرایط درون تنی سلول‌های آلوده به ویروس، به جای ویروس برهنه می‌توانند فعالیت ضدتوموری را افزایش دهند. این یافته

در سلول‌های بنیادی مزانشیمی پایین بوده و به تدریج افزایش می‌یابد و در ۷۲ ساعت پس از آلودگی بیشترین میزان ترشح نیتریک اکساید مشاهده شد. همچنین بررسی آپوپتوز با فلوسایتومتری نشان داد که رتئوپروس توانایی القای آپوپتوز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی را دارد. نتایج حاکی از آن است که افزایش معنی‌داری در آپوپتوز القا شده از طریق رتئوپروس در ۴۸ ساعت پس از تلقیح ویروس در مقایسه با گروه کنترل وجود دارد؛ اما آپوپتوز القا شده با دو ۱ و ۱/۰ MOI از رتئوپروس تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

نتایج نشان می‌دهد که در همه گروه‌ها به تدریج از ۲۴ تا ۷۲ ساعت بعد از آلودگی میزان ترشح نیتریک اکساید نسبت به سلول سالم افزایش می‌یابد؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت هرچه تولید ویروس بیشتر می‌شود، سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای جلوگیری از تکثیر ویروس ترشح نیتریک اکساید خود را بالا می‌برند؛ اما در ۱: MOI تکثیر ویروس به اندازه‌ای هست که در رقابت با نیتریک اکساید کاهش نمی‌یابد. از طرفی می‌توان گفت دوز ویروس با ۱: MOI تا ۴۸ ساعت پس از آلودگی باعث لیز کامل سلول حامل نمی‌شود.

پس می‌توان چنین نتیجه گرفت که، سلول‌های بنیادی مزانشیمی پتانسیل آلوده شدن با رتئوپروس T3D را داشته و می‌توانند بستر مناسبی برای تکثیر ویروس باشند. ویروس با دوز عفونی مناسب (۱: MOI) در ۴۸ ساعت پس از آلودگی، به بیشترین میزان تکثیر خود رسیده و می‌تواند باعث القای آپوپتوز در سلول‌های بنیادی مزانشیمی در مقایسه با گروه کنترل شود. همچنین می‌توان گفت مقادیر زیاد نیتریک اکساید توام با تکثیر رتئوپروس منجر به القای آپوپتوز می‌شود.

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌توانند به‌عنوان یک میزبان و حامل کارآمد برای رتئوپروس انکولیتیک به‌منظور هدف قرار دادن سلول‌های سرطانی در آینده نزدیک استفاده شوند.

### سپاسگزاری

این مطالعه بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد با شماره پروپوزال ۵۲۵/۷۴۰۰ و با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

### تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

ضدالتهابی و مدت‌زمان تیمار سلول‌های بنیادی با آن، می‌تواند تأثیرات مختلفی در فعالیت آپوپتوز سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تولید نیتریک اکساید داشته باشد (۳۷).

در مطالعه‌ای که Komarova و همکاران انجام دادند، نشان داده شد که سلول‌های مزانشیمی پیش‌ساز می‌تواند بستر مناسبی برای تکثیر آدنووایروس باشد و سلول‌های مزانشیمی بارگذاری شده با آدنووایروس در هم‌کشتی با سلول‌های سرطانی می‌توانند باعث از بین رفتن آن سلول‌ها شوند. همچنین سلول‌های مزانشیمی آلوده به آدنووایروس در مقایسه با آدنووایروس بدون حامل، می‌توانند باعث افزایش بقای موش‌های توموری (مدل توموری سرطان تخمدان) شوند (۱۶).

بنابراین با توجه به مطالعات انجام‌شده در این پروژه سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌عنوان حامل رتئوپروس انکولیتیک در نظر گرفته شد؛ اما از آنجایی که تا به حال هیچ مطالعه‌ای در این زمینه انجام نگرفته، لازم است ابتدا توانایی رتئوپروس در آلوده کردن و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی، میان‌کنش بین ویروس و سلول، رابطه بین تکثیر ویروس و نیتریک اکساید ترشح‌شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی و همچنین توانایی القای آپوپتوز رتئوپروس در سلول‌های آلوده بررسی شود.

در پروژه حاضر پس از جدا کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی موش C57BL/6، فنوتیپ و ماهیت این سلول‌ها به روش بررسی توان تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول استخوان و چربی با رنگ‌آمیزی اختصاصی تأیید شد.

با توجه به هدف پروژه، دوز مناسب ویروسی باید به‌گونه‌ای انتخاب شود که قادر به آلوده‌سازی و تکثیر در سلول بنیادی مزانشیمی باشد، به‌طوری که قبل از رسیدن به محل تومور موجب از بین رفتن سلول حامل نشود؛ یعنی سلول بنیادی مزانشیمی به‌عنوان حامل مناسب رتئوپروس عمل کرده و بیشترین تیترا ویروس را در محل تومور آزاد کند. نتایج نشان داد که پس از ۴۸ ساعت آلودگی با ۱: MOI، تکثیر ویروس به حد مطلوبی رسیده، به‌طوری که، سلول‌های حامل از لحاظ زنده‌مانی در وضعیت مناسبی قرار دارند؛ در حالی که در ۷۲ ساعت پس از آلودگی، بیشتر سلول‌ها از بین رفته‌اند.

در گام بعدی سطح نیتریک اکساید ترشح‌شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی آلوده به رتئوپروس در مقایسه با گروه کنترل بررسی شد. نتایج نشان داد میزان ترشح نیتریک اکساید با طول دوره زمانی آلودگی به ویروس، رابطه مستقیم داشته است؛ به‌طوری که در ساعات اولیه آلودگی، میزان ترشح نیتریک اکساید

## References

- Fitzmaurice C, Allen C, Barber RM, Barregard L, Bhutta ZA, Brenner H, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study. *JAMA oncology*. 2017;3(4):524-48. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.5688> PMID:[27918777](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27918777/)
- Li Z, Fan D, Xiong D. Mesenchymal stem cells as delivery vectors for anti-tumor therapy. *Stem Cell Investig*. 2015;2:6. <https://dx.doi.org/10.3978%2Fj.issn.2306-9759.2015.03.01> PMID:[27358874](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27358874/) PMCID:PMC4923660
- Melcher A, Parato K, Rooney CM, Bell JC. Thunder and lightning: immunotherapy and oncolytic viruses collide. *Mol Ther*. 2011;19(6):1008-16. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.65> PMID:[21505424](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21505424/) PMCID:PMC3129809
- Yang X, Chen E, Jiang H, Muszynski K, Harris RD, Giardina SL, et al. Evaluation of IRES-mediated, cell-type-specific cytotoxicity of poliovirus using a colorimetric cell proliferation assay. *J Virol Methods*. 2009;155(1):44-54. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.09.020> PMID:[18951922](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18951922/) PMCID:PMC2650828
- Kim J, Hall RR, Lesniak MS, Ahmed AU. Stem cell-based cell carrier for targeted oncolytic virotherapy: translational opportunity and open questions. *Viruses*. 2015;7(12):6200-17. <https://doi.org/10.3390/v7122921> PMID:[26633462](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26633462/) PMCID:PMC4690850
- Gong J, Sachdev E, Mita AC, Mita MM. Clinical development of reovirus for cancer therapy: an oncolytic virus with immune-mediated antitumor activity. *World J Methodol*. 2016;6(1):25-42. <https://doi.org/10.5662/wjm.v6.i1.25> PMID:[27019795](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27019795/) PMCID:PMC4804250
- Stanley N, Dorman D, Ponspord J. Studies on the pathogenesis of a hitherto undescribed virus (hepato-encephalomyelitis) producing unusual symptoms in suckling mice. *Aust J Exp Biol Med Sci*. 1953;31(2):147-60. <https://doi.org/10.1038/icb.1953.18>
- Yura Y, Hamada M. Development of oncolytic virotherapy for the treatment of oral cancer—At the waiting stage for clinical use. *Oral Science International*. 2017;14(1):1-12. [https://doi.org/10.1016/S1348-8643\(16\)30016-7](https://doi.org/10.1016/S1348-8643(16)30016-7)
- Thirukkumaran C, Morris DG. Oncolytic viral therapy using reovirus. *Methods Mol Biol*. 2009;542:607-34. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-561-9\\_31](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-561-9_31) PMID:[19565924](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19565924/)
- Alloussi S, Alkassar M, Urbschat S, Graf N, Gärtner B. All reovirus subtypes show oncolytic potential in primary cells of human high-grade glioma. *Oncol Rep*. 2011;26(3):645-9. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1331> PMID:[21637921](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21637921/)
- Kelly K, Nawrocki S, Mita A, Coffey M, Giles FJ, Mita M. Reovirus-based therapy for cancer. *Expert Opin Biol Ther*. 2009;9(7):817-30. <https://doi.org/10.1517/14712590903002039> PMID:[19527106](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19527106/)
- Vidal L, Yap T, White C, Twigger K, Hingorani M, Agrawal V, et al. Reovirus and other oncolytic viruses for the targeted treatment of cancer. *Target Oncol*. 2006;1(3):130-50. <https://doi.org/10.1007/s11523-006-0026-1>
- Norman KL, Lee PW. Reovirus as a novel oncolytic agent. *J Clin Invest*. 2000;105(8):1035-8. <https://doi.org/10.1172/JCI9871> PMID:[10772645](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10772645/) PMCID:PMC300841
- Marchini A, Scott EM, Rommelaere J. Overcoming barriers in oncolytic virotherapy with HDAC inhibitors and immune checkpoint blockade. *Viruses*. 2016;8(1):9. <https://doi.org/10.3390/v8010009> PMID:[26751469](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26751469/) PMCID:PMC4728569
- Ilett EJ, Bárcena M, Errington-Mais F, Griffin S, Harrington KJ, Pandha HS, et al. Internalization of oncolytic reovirus by human dendritic cell carriers protects the virus from neutralization. *Clin Cancer Res*. 2011;17(9):2767-76. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-3266> PMID:[21389099](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21389099/) PMCID:PMC3087679
- Komarova S, Kawakami Y, Stoff-Khalili MA, Curiel DT, Pereboeva L. Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses. *Mol Cancer Ther*. 2006;5(3):755-66. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0334> PMID:[16546991](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16546991/)
- Thanunchai M, Hongeng S, Thitithyanont A. Mesenchymal stromal cells and viral infection. *Stem Cells Int*. 2015;2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/860950>
- Wang S, Qu X, Zhao RC. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J Hematol Oncol*. 2012;5(1):19. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-5-19> PMID:[22546280](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22546280/) PMCID:PMC3416655
- Akiyama K, Chen C, Wang D, Xu X, Qu C, Yamaza T, et al. Mesenchymal - stem - cell - induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell Stem Cell*. 2012; 10(5): 544-55. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.03.007> PMID:[22542159](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22542159/) PMCID:PMC3348385
- Garcia-Castro J, Alemany R, Cascallo M, Martinez-Quintanilla J, del Mar Arriero M, Lassaletta A, et al. Treatment of metastatic neuroblastoma with systemic

- oncolytic virotherapy delivered by autologous mesenchymal stem cells: an exploratory study. *Cancer Gene Ther.* 2010;17(7):476-83. <https://doi.org/10.1038/cgt.2010.4> PMID:20168350
21. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 2005;105(4):1815-22. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1559> PMID:15494428
22. Pertile T, Karaca K, Sharma J, Walser M. An antiviral effect of nitric oxide: inhibition of reovirus replication. *Avian Dis.* 1996;40(2):342-8. <https://doi.org/10.2307/1592230> PMID:8790884
23. Cuzzocrea S, Mazzone E, Calabro G, Dugo L, De Sarro A, van de Loo FA, et al. Inducible nitric oxide synthase—knockout mice exhibit resistance to pleurisy and lung injury caused by carrageenan. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(5):1859-66. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.162.5.9912125> PMID:11069827
24. Mezey É, Nemeth K. Mesenchymal stem cells and infectious diseases: Smarter than drugs. *Immunol Lett.* 2015;168(2):208-14. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.05.020> PMID:26051681
25. Ferhat M. Oncolytic Viruses: The Next Major Breakthrough in Cancer Treatment. *J Hum Virol Retrovirol.* 2017;5(1):00141. <https://doi.org/10.15406/jhvr.2017.05.00141>
26. Cho I-R, Koh SS, Min H-J, Park E-H, Srisuttee R, Jhun BH, et al. Reovirus infection induces apoptosis of TRAIL-resistant gastric cancer cells by down-regulation of Akt activation. *Int J Oncol.* 2010;36(4):1023-30. <https://doi.org/10.3892/ijo.00000583> PMID:20198349
27. Sonabend AM, Ulasov IV, Tyler MA, Rivera AA, Mathis JM, Lesniak MS. Mesenchymal stem cells effectively deliver an oncolytic adenovirus to intracranial glioma. *Stem Cells.* 2008;26(3):831-41. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0758> PMID:18192232
28. Qiao J, Kottke T, Willmon C, Galivo F, Wongthida P, Diaz RM, et al. Purging metastases in lymphoid organs using a combination of antigen-nonspecific adoptive T cell therapy, oncolytic virotherapy and immunotherapy. *Nat Med.* 2008;14(1):37-44. <https://doi.org/10.1038/nm1681> PMID:18066076
29. Yong RL, Shinojima N, Fueyo J, Gumin J, Vecil GG, Marini FC, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells for intravascular delivery of oncolytic adenovirus  $\Delta 24$ -RGD to human gliomas. *Cancer Res.* 2009;69(23):8932-40. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3873> PMID:19920199 PMID:PMC2789204
30. Hakkarainen T, Särkioja M, Lehenkari P, Miettinen S, Ylikomi T, Suuronen R, et al. Human mesenchymal stem cells lack tumor tropism but enhance the antitumor activity of oncolytic adenoviruses in orthotopic lung and breast tumors. *Hum Gene Ther.* 2007;18(7):627-41. <https://doi.org/10.1089/hum.2007.034> PMID:17604566
31. Gao P, Ding Q, Wu Z, Jiang H, Fang Z. Therapeutic potential of human mesenchymal stem cells producing IL-12 in a mouse xenograft model of renal cell carcinoma. *Cancer Lett.* 2010;290(2):157-66. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.08.031> PMID:19786319
32. 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(1):228-34. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-002246> PMID:16985180
33. Bonafè F, Guarnieri C, Muscari C. Nitric oxide regulates multiple functions and fate of adult progenitor and stem cells. *J Physiol Biochem.* 2015;71(1):141-53. <https://doi.org/10.1007/s13105-014-0373-9> PMID:25526859
34. Ubol S, Sukwattanapan C, Maneerat Y. Inducible nitric oxide synthase inhibition delays death of rabies virus-infected mice. *J Med Microbiol.* 2001;50(3):238-42. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-50-3-238> PMID:11232769
35. Dincel GC, Kul O. eNOS and iNOS trigger apoptosis in the brains of sheep and goats naturally infected with the border disease virus. *Histol Histopathol.* 2015;30(10):1233-42. PMID:25882134
36. Mirzaei F, Khazaei M. Role of Nitric Oxide in Biological Systems: A Systematic Review. *J Mazandaran Univ Med Sc.* 2017;27(150):192-222. <http://jnumms.mazums.ac.ir/article-1-9214-en.html>
37. Darabi E, Morshedi A, Delirez N, Tokmechi A, Mokarizade A. Effect of peptidoglycan-lipopolysaccharide on nitric oxide production by rat mesenchymal stem cell (MSC) and induction of apoptosis in activated T cell with MSC. *J Urmia Univ Med Sci.* 2014; 24(12): 996-1004. <http://umj.umsu.ac.ir/article-1-2063-en.html>