ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۳، شماره۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۷(شماره پی در پی۱۲۶)

Archiv

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:22 +0430 on Monday June 25th 2018

تأثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با ۱۷ـ بتا استرادیول بر الگوی پاسخ‌های ایمنی ذاتی در آرتریت روماتوئید القاء شده با کلاژن در رت‌های ویستار

منیره جهان تیغ ، سید میثم ابطحی فروشانی*، ناهیده افضل آهنگران
گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

تاریخ وصول: ۱۳۹۶/۶/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۹/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: تا کنون اطلاعاتی در مورد نقش استرادیول در تغییر قابلیتهای ایمونومودولاتوریسلول‌هتب بنیادیمزانشیمال در شرایط درون تنی مدل آزمایشگاهی یافت نشده است، هدف از مطالعه حاضر ارزیابی اثرات تیمار با ۱۷ـ بتا استرادیول برقابلیت‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمال(MSC) در تعدیل پاسخ‌های ایمنی ذاتی در مدل حیوانی روماتوئید آرتریت(RA) می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی سلول‌های بنیادی مزانشیمال پس از جداسازی، به مدت ۲۴ ساعت با ۱۷ بتا استرادیول(E2) ۱۰۰ میکرو مولار مجاور شدند. بیماری آرتریت روماتوئید با استفاده از کلاژن و ادجوانت فروند کامل در رت‌های ویستار القاء شد. یک هفته بعد از ایمن‌سازی، رت‌ها در گروه‌های بدون درمان، گروه درمان شده با MSCs بدون تیمار (تزریق داخل صفاقی دو میلیون سلول)، گروه درمان شده با MSCs تیمار شده با E2 قرار گرفتند. تغییر قطر ناحیه مچ دست و پای هر رت تا روز ۳۳ پس از القاء، بیماری هر ۵ روز یک‌بار ثبت شد. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تست توکی تجزیه و تحلیل شدند .

یافته‌ها: میزان ادم و تورم کف دست و پا در روز آخر در گروه کنترل مثبت (۰/۶±۵/۹ میلی‌متر) بیشتر از گروه‌های درمانی بود. میزان تورم در گروه درمان شده با MSCs تیمار شده با E2 (۰/۴۵ ± ۱/۶۹ میلی‌متر) نسبت به گروه درمان شده با MSCs بدون تیمار (۰/۳±۲/۹۶میلی‌متر) به طور معنی‌داری کاهش بیشتری یافت. هم‌چنین قابلیت انفجار تنفسی(۰/۱۱± ۱/۵۷) ، میزان فاگوسیتوز نوترال رد(۰/۰۹ ± ۱/۱۱) و میزان تولید نیتریک اکساید(۷/۸۱±۲۱۹/۱۶،میکرومول) در جمعیت سلول‌های ایمنی ذاتی طحال در گروه کنترل مثبت بیشتر از گروه‌های درمانی بود. میزان شاخص‌های قابلیت انفجار تنفسی، فاگوسیتوز و تولید نیتریک اکساید در گروه درمان شده MSCsهای تیمار شده به ترتیب به میزان (۰/۰۹±۰/۷۹ ، ۰/۰۸± ۰/۶۱ و ۱۳/۲۹±۱۵۵/۹ میکرومول) و در گروه دریافت کننده MSCsهای بدون تیمار به ترتیب به میزان (۰/۰۸±۰/۹۹ ، ۰/۰۷± ۰/۸۸ و ۱۲/۱۸±۱۸۷/۹میکرومول) بود. در تمام بررسی‌ها $p<0/05$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتیجه‌گیری: تیمار MSCها با ۱۷ـ بتااسترادیول موجب افزایش عملکرد تنظیمیو تأثیر مهاری بر واسطه‌های التهابی آسیب‌رسان سلول‌های ایمنی ذاتی طحال در مدل RA نسبت به سلول‌های بنیادی مزانشیمال بدون تیمار می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: ۱۷ـ بتااسترادیول، سلول‌های بنیادی مزانشیمال، روماتوئید آرتریت، ایمنی ذاتی.

* **نویسنده مسئول: سید میثم ابطحی فروشانی،** ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه میکروب شناسی
Email: sm.abtahi@urmia.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:22 +0430 on Monday June 25th 2018

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:22 +0430 on Monday June 25th 2018

مقدمه

آرتریت روماتوئید(RA) یک بیماری سیستمیک با التهاب مزمن در بافت سینوویال مفصل، با شیوع حدود ۱ درصد در جمعیت می‌باشد، که منجر به تخریب چندین مفصل و در نهایت ناتوانی شدید می‌گردد(۱). متأسفانه پیشرفت بیماری به نواحی خارج از مفاصل به خصوص رگ‌های کرونر قلب و اختلالات قلبی ـ عروقی به عنوان یکی از علل مرگ در بیماران آرتریت روماتوئید مطرح می‌باشد.(۲) عامل آرتروژنیک هنوز ناشناخته است، احتمالاً میکروب‌ها یا برخی از آنتی‌ژن‌های خودی پاسخ‌های خودایمن لنفوسیت‌های $TCD4^+$ را آغاز می‌کنند(۳). سلول‌های ایمنی ذاتی از جمله مهمترین بازیگران ایجاد کننده پاتوژنز بیماری RA می‌باشند(۵ و۴). لنفوسیت‌های T از طریق تولید سایتوکاین‌های التهابی موجب فعال شدن سلول‌های ایمنی ذاتی می‌گردند. هم‌چنین اتوآنتی‌بادی تولید شده به وسیله سلول B از طریق تشکیل کمپلکس با آنتی‌ژن‌های خودی و به دنبال آن تثبیت کمپلمان باعث پیش‌برد واکنش‌های ازدیاد حساسیت نوع سوم با میانجی‌گری سلول‌های ایمنی ذاتی می‌شود(۵).

درمان‌های کنونی RA بر پایه استفاده از گلوکوکورتیکوئیدها و ضد التهاب‌های غیراستروئیدی می‌باشد که تأثیرات سوء بسیاری بر استخوان، معده، کلیه و دیگر اندام‌ها به خصوص در استفاده طولانی مدت، یا دوز بالا دارد، به‌طوری که مقوله درمان و جلوگیری از پیشرفت بیماری هم‌چنان به عنوان یک چالش پیش رو مطرح می‌باشد. بنابراین یافتن راهکارهای مفیدتر جهت تعدیل پاسخ‌های ایمنی و به تبع آن دست یابی به برنامه درمانی مؤثر در افراد مبتلا به RA ضروری می‌باشد(۶ و ۳). تحقیق‌های زیادی معطوف به یافتن درمان‌های جدید شده است. در این بین مدل حیوانی آرتریت روماتوئید که با ایمن‌سازی رت‌های ویستار با کلاژن نوع II و ادجوانت کامل فروند ایجاد می‌گردد، فرصت مناسبی جهت مطالعه رهیافت‌های دارویی جدید فراهم آورده است(۸ و۷). امروزه توجه بسیاری به کاربردهای بالقوه سلول‌های بنیادی در درمان بیماری‌های خود ایمن شده است. فرضیه استفاده از MSCs برای کنترل بیماری‌های خود ایمن از قبیل RA کاربردی به نظر می‌رسد، زیرا این احتمال وجود دارد MSCs نه‌تنها از طریق پتانسیل بازسازی کننده خود بلکه با جلوگیری از ادامه التهاب و سرکوب ایمنی کمک به ترمیم بافت مفصل و در نتیجه جلوگیری از آسیب بافتی می‌نماید(۹). مهم‌ترین فاکتورهای سرکوب کننده ایمنی این سلول‌ها شامل برخی از مولکول‌های مهاری بیان شده در سطح آنها از قبیل؛PDL1، TGF-ß، HLA-G وGalectins، برخی سایتوکای‌های ضد التهابی هم‌چون؛ IL-10 و TGF-ß، متابولیت‌هایی از قبیل؛ نیتریک‌اکساید،IDO وPAG E2 و برخی از آنزیم‌های مهارکننده(ماتریکس متالوپروتئینازها) می‌باشند که به صورت پاراکرین و یا تماس مستقیم سلول به سلول اثرات خود را ایجاد می‌کنند(۱۱ و ۱۰).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:22 +0430 on Monday June 25th 2018

اخیراً نشان داده شده است که تزریق داخل وریدی سلول‌های بنیادی مزانشیمال مشتق از بندناف به ۱۳۶ بیمار مبتلا به RA شدید، که به داروهای سنتی ضد آرتریت پاسخ مناسبی نمی‌دادند، بهبود بالینی مختصر، اما معنی‌داری نسبت به گروه کنترل (۳۶ بیمار مبتلا به RA مقاوم به دارو که داروهای معمول را همراه با محیط بدون MSCs دریافت می‌کردند) نشان داده‌اند. اثرات درمان، بین ۳ تا ۶ ماه ادامه داشت و همراه با افزایش درصد سلول‌های T تنظیمی در خون محیطی بود(۱۲).

استروژن(۱۷ـ بتا استرادیول) از جمله هرمون‌های جنسی استروئیدی است که نقش بسیار مهمی در تنظیم بیان ژن‌ها و عملکردهای ایمنی در هر دو جنس نر و ماده بازی می‌کند(۱۳). گیرنده‌های پاسخ گو به استروژن به طور گسترده‌ای در سطح سلول‌های مختلف بدن بالاخص سلول‌های ایمنی و سلول‌های بنیادی مزانشیمال یافت شده‌اند(۱۴ و ۱۳). در همین راستا اثرات ایمونومودولاتور استروژن به خوبی شناخته شده است. به عنوان مثال نشان داده شده است که افزودن استرادیول به محیط کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمال موجب افزایش سرعت تقسیم و تمایز آن به سایر بافت‌های مزانشیمی‌در شرایط آزمایشگاهی می‌شود(۱۶). استروژن موجب بهبود علایم بیماری آنسفالومیلیت خود ایمن در موش‌های آبستن و تحت تیمار با استرادیول شده، هم‌چنین موجب کاهش عوارض دیابت از جمله زخم‌های دیابتی گردیده است(۱۵ و۱۳). قابلیت انفجار تنفسی و تولید رادیکال‌های آزاد در موش‌های نر تحت تیمار با استرادیول نیز کاهش می‌یابد(۱۳). با این حال تا کنون اطلاعاتی در مورد نقش استرادیول در تغییر قابلیت‌های ایمونومودولاتوری سلول‌های بنیادی مزانشیمال در شرایط درون تنی مدل آزمایشگاهی آرتریت روماتوئید وجود ندارد. به همین دلیل در تحقیق حاضر بر آن شدیم که به مقایسه عملکرد درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با ۱۷ـ بتا استرادیول و بدون تیمار در مدل حیوانی روماتوئید آرتریت القاء شده با کلاژن بپردازیم.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی ۵۰ رت نر ویستار با محدوده وزنی ۷۰ تا ۱۱۰ گرم بود و از انستیتوپاستور ایران خریداری شد. این موش ها در شرایط استاندارد آب، غذا، دما و نور کافی بر اساس پروتکل‌های بین‌المللی استفاده از حیوانات آزمایشگاهی نگهداری شدند. کلیه مراحل تحقیق در کمیته اخلاق دانشکده دامپزشکی پذیرفته شد. پس از طی زمان مورد نظر برای تطابق رت‌ها (۲ هفته)، حیوانات به صورت تصادفی و به‌ترتیب زیر تقسیم شدند؛ گروه اول (گروه شاهد) شامل ده رت سالم، که تحت هیچ تیماری قرار نگرفت. این رت‌ها هم‌زمان با رت‌های گروه مبتلا پلاسبو (۰/۱ میلی‌لیتر فسفات بافر سالین PBS) دریافت نمودند. سایر رت‌ها پس از القاء بیماری R، به صورت تصادفی در سه گروه مجزا قرار گرفتند؛ گروه دوم(گروه شاهد RA بدون درمان)

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:22 +0430 on Monday June 25th 2018

رت‌های این گروه یک هفته بعد از ایمن‌سازی، یک بار تحت تزریق داخل صفاقی فسفات بافر سالین PBS (حجم ۰/۱ میلی‌لیتر) قرار گرفتند. گروه سوم (گروه RA، درمان با MSC بدون تیمار)شامل حداقل ده رت بود که یک هفته بعد از ایمن سازی یک بار تحت تزریق داخل صفاقی سلول‌های بنیادی مزانشیمال(به میزان دو میلیون سلول در حجم ۰/۱ میلی‌لیتر) قرار گرفتند. گروه چهارم(گروه RA درمان شده با MSC تیمار شده با ۱۷ بتا استرادیول) شامل حداقل ده رت بود که یک هفته بعد از ایمن‌سازی، یک بار تحت تزریق داخل صفاقی سلول‌های بنیادی مزانشیمال تیمار شده (به میزان دومیلیون سلول در حجم ۰/۱ میلی‌لیتر) قرار گرفتند.

بر اساس پروتکل استاندارد، سلول‌های بنیادی مزانشیمال جوندگان از طریق فلاشینگ مغز استخوان با محیط کشت از نواحی دیافیز استخوان ران و ساق (femur, Tibia) رت‌ها تحت شرایط آسپتیک جدا شد و به وسیله بافر ۲ بار شستشو گردید. سپس سلول‌های سانتریفیوژ شده، با تراکم $۰/٤\times۱۰^{٦}$ سلول به ازای هر سانتی‌متر مربع به فلاسک‌های کشت T25، در محیط کشت پایه DMEM[1] حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی FBS[2](Gibco ـ انگلستان) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و حضور ۵ درصد دی‌اکسیدکربن در گرمخانه گرماگذاری شدند. بعد از ٤۸ ساعت سلول‌های غیر چسبنده دور ریخته شد و محیط کشت به طور مرتب هر ۳ روز عوض شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی در کشت، مورفولوژی فیبروبلاستی داشته و به سطح ظرف کشت می‌چسبند. پس از اولین تراکم بیش از ۷۰ درصد، سلول‌های چسبنده با استفاده از تریپسین(Sigma Aldrich ـ آمریکا) حاوی ۲ درصد EDTA[3] از کف فلاسک جداسازی و جهت پاساژ به فلاسک‌های بعدی منتقل شدند(۱۸ و۱۷). پس از پاساژ سوم، سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان به مدت ۲٤ ساعت با ۱۷ بتا استرادیول(شرکت Sigma ـ آمریکا) به میزان (۱۰۰ میکرومولار) مجاور شدند. در نهایت پس از سه بار شستشو، سلول‌ها ترپسینه شده و برای تیمار گروه درمانی استفاده گردید(۱۹).

به منظور ایمونوفنوتایپ از سلول‌های بنیادی مزانشیمال پاساژ سوم استفاده شد. سلول‌های پاساژ سوم با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال کنژوگه با فلورسنت[4] خریداری شده از شرکت Becton Dickinson علیه آنتی‌ژن‌های سطحی MSCs، CD29 (کنژوگه باPE)، CD90 (کنژوگه با PCY5) و مارکر سولول‌های خون‌ساز CD45 (کنژوگه با FITC) رنگ‌آمیزی گردید. به طور خلاصه سوسپانسیون سلولی حاوی ۵×۱۰^{۵} سلول در حجم ۱۰۰ میکرولیتر بافر فلوسیتومتری(PBS حاوی ۰/۵ درصد سرم آلبومین گاوی و EDTA(۰/۲ میلی‌مول بر لیتر) FACS تهیه شد و با ۱۰ میکرولیتر آنتی‌بادی‌های منوکلونال

1- Dullbecco's Modified Eagle's Medium
2-Fetal Bovine Serum
3-Ethylene diamine tetra acetic acid
4-Fluorescent-Conjugated Monoclonal Antibodies

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:22 +0430 on Monday June 25th 2018

علیه سه مارکر سطحی یاد شده مخلوط گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از دو بار شستشوی رنگ اضافی، سلول‌ها در حجم مناسبی از بافر به حالت معلق درآورده شدند و بلافاصله با دستگاه فلوسیتومتری (DAKO شرکت Partec، آلمان) مورد سنجش قرار گرفتند. نتایج حاصل نیز با نرم‌افزار Cyflogic نسخه ی ۱ ــ۲ ـ۱ مورد آنالیز قرار گرفت(۱۱).

به منظور القایRA در رت‌های نژاد ویستار، به ازای هر رت، ۲۰۰ میکروگرم کلاژن نوع ۲ CII) (Sigma Aldrich ــ آمریکا) در ۱۰۰ میکرولیتر محلول اسید استیک (۰/۰۵ M) حل شد. هم حجم محلول فوق (۱۰۰ میکرولیتر) به آن ادجوانت کامل فروند(Sigma Aldrich ــ آمریکا) اضافه شد و تا به دست آمدن یک امولسیون یک نواخت عمل مخلوط نمودن ادامه یافت. امولسیون یاد شده (حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر)به صورت زیر جلدی به ناحیه قائده دم رت‌ها تزریق شد. به رت‌های گروه شاهد هم حجم گروه‌های القاء PBS به قائده دم تزریق شد. تغییر قطر مچ دست و پای هر رت در روزهای ۵،۱۰،۱۵،۲۰،۲۵ و ۳۰ ثبت شد(۳۰).

آزمون احیایNBT به منظور ارزیابی قابلیت انفجار تنفسی(تولید واسطه‌های فعال اکسیژن) به وسیله سلول‌های ایمنی ذاتی موجود در جمعیت سلول‌های طحالی صورت گرفت. آنیون سوپراکسید تولید شده در طی انفجار تنفسی، ماده زرد رنگ NBT را احیا نموده و به فورمازان آبی نامحلول تبدیل می‌کند. میزان فورمازان تولید شده به عنوان شاخصی از عملکرد انفجار تنفسی فاگوسیت‌ها با روش فتومتری سنجیده شد(۲۱). پس از خون‌گیری از موش‌ها طحال آنها تحت شرایط استریل خارج شد. سپس بافت طحال در ۵ میلی لیتر محیط (RPMI-1640 ایالات متحده؛ Sigma) حاوی ۱۰ درصدFBS (آلمان؛ Gibco) قطعه قطعه و له شده و از توری سیمی به قطر ۰/۰۲ میلی‌متر عبور داده شد و سوسپانسیون سلولی حاصل، به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. روی رسوب سلولی حاصل ۵ میلی‌لیتر بافر لیز کننده RBC افزوده شد. پس از ۵ دقیقه، با افزودن ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت دوباره ۱۰ دقیقه در دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. سپس رسوب سلولی در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰ درصد FBS به حالت سوسپانسیون درآمد. پس از شمارش سلولی، سوسپانسیونی ،به تعداد ۲×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر تهیه گردید. سلول‌ها به مدت یک ساعت با مخمر اپسونیزه انکوبه شدند. میزان ۱۰۰ میکرولیتر محلول زایموزان و نیتروبلوتترازولیوم (NBT) به هر یک از خانه‌ها اضافه شد و یک ساعت دیگر انکوبه گردید. در نهایت ۴۰۰ میکرولیتر NN دی متیل فورماید به هر یک از خانه‌ها اضافه و با سرعت ۳۰۰۰ rpm، ۱۰ دقیقه در دمای ۴ سانتریفیوژ شد. ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی هر یک از خانه‌ها را در میکروپلیت ۹۶ خانه ریخته و نتیجه با الایزا نگار در طول موج ۵۴۰ قرائت گردید(۲۲).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:22 +0430 on Monday June 25th 2018

میزان تولید نیتریک اکسید به وسیله روش رنگ‌سنجی گریس (Griess) و استفاده از منحنی استاندارد نیتریت سدیم تعیین گردید. به طور خلاصه، پس از حذف گلوبول‌های قرمز، سوسپانسیونی ،به تعداد ۲×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر از سلول‌های طحالی تهیه شد و با LPS به میزان ۱۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. آنگاه ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی کشت سلولی به صورت دوتایی به داخل چاهک‌های پلت ۹۶ خانه‌ای ته تخت ریخته شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول۱ درصد سولفانیل آمید (شرکت Sigma ـ آمریکا) به چاهک‌ها اضافه شد. پلیت به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی و درجه حرارت اتاق نگاه داری شد. آنگاه به تمام حفره‌ها ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۱ درصد N–۱–۱ نفتیل اتیلن دی آمین‌دی‌هیدروکلراید(شرکتSigma) اضافه گردید و بار دیگر به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی و درجه حرارت اتاق نگاه داری شد. در نهایت جذب نوری نمونه در طول موج ۵۳۰ نانومتر به وسیله دستگاه الایزانگار قرائت گردید. هم‌زمان با استفاده از غلظت‌های مختلف نیتریت سدیم منحنی استاندارد ترسیم شده و از طریق رگرسیون و معادله خطی ،غلظت نیتریت موجود در نمونه‌ها تعیین گردید(۲۳).

رنگ نوترال رد یک رنگ کاتیونی بوده که به وسیله سلول‌های فاگوسیت کننده برداشته شده و در لیزوزم‌های آنها ذخیره می‌گردد(۲۴). میزان برداشت این رنگ به وسیله فاگوسیت‌ها به عنوان شاخصی از سطح فعالیت غشایی و لیزوزومی فاگوسیت‌ها در نظر گرفته می‌شود. به طور خلاصه در هر پلیت ۹۶ خانه به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلول‌های طحالی(۲×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر) به همراه ۲۰ میکرولیتر از محلول NR (۳/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به چاهک‌ها افزوده و به مدت ٤ ساعت در ۳۷ درجه در تاریکی انکوبه گردید. ۲۰۰ میکرولیتر محلول اسید استیک گلاسیال ــ اتانول (اسیداستیک ۱ درصد و اتانول ۵۰ درصد) به چاهک ها اضافه و شیک گردید. آنگاه پلیت‌ها در طول موج ۶۳۰ نانو متر به وسیله دستگاه الایزاریدر خوانده شدند(۱۷).

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS ،Excel و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه(آنوا) و تست توکی تجزیه و تحلیل شدند. از روش اندازه‌گیری تکراری به منظور ارزیابی تغییرات اندازه قطر دست و پا استفاده شد. در تمام بررسی‌ها $p<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

داده‌های فلوسیتومتریک نشان داد که در پاساژ سوم سلول‌های بنیادی مزانشیمال جدا شده شاخص CD45 به عنوان یک شاخص هماتوپویتیک بسیار پایین است، در حالی که شاخص‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمال رت یعنی CD29 و CD90 افزایش معنی‌داری یافت(جدول۱).

نمودار۱ نشان می‌دهد که تزریق داخل قائده دم سوسپانسیون کلاژن و ادجوانت کامل فروند منجر

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:22 +0430 on Monday June 25th 2018

به افزایش قابل توجه و معنی‌دار در قطر ناحیه پنجه پای رت‌ها در روز ۵ و ۱۰ پس از ایمن‌سازی شده است. البته در گروه‌هایی که سلول‌های بنیادی را دریافت نموده بودند، قطر ناحیه مچ پا رو به کاهش گذاشت به طوری که از روز ۱۵ پس از ایمن‌سازی به بعد نسبت به گروه مبتلا و بدون درمان به طور معنی‌داری پایین تر بود(نمودار ۱). با این حال در روز ۲۵ و ۳۰ پس از القاء بیماری، در رابطه با میزان کاهش قطرناحیه مچ پای رت‌ها، برتری کامل مربوط به گروه درمان شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با استرادیول بود(نمودار ۱). به طوری که میانگین میزان ادم و تورم در روز آخر در گروه رت‌های مبتلا و درمان شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با استرادیول (۰/۴۵± ۱/۶۹ میلی‌متر) و هم‌چنین در گروه مبتلایان درمان شده سلول‌های بنیادی بدون تیمار(۰/۳± ۲/۹۶ میلی‌متر) نسبت به گروه رت‌های مبتلا و بدون درمان(۰/۶± ۵/۹ میلی‌متر) به طور معنی‌داری کاهش یافته بود. البته در این بین کاهش مشاهده شده در گروه مبتلایان درمان شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با استرادیول نسبت به مبتلایان درمان شده با سلول‌های بنیادی بدون تیمار به طور معنی‌داری بیشتر بود(نمودار ۱).

طبق نتایج تست نوترال رد، قابلیت برداشت این رنگ به وسیله سلول‌های فاگوسیت کننده طحالی در رت‌های مبتلا به RA افزایش معنی‌داری یافته است. دریافت سلول‌های بنیادی مزانشیمال منجر به کاهش، قابلیت فاگوسیتوز سلول‌های فاگوسیت کننده طحالی در رت‌های مبتلا به RA شد. با این حال این میزان کاهش به طور معنی‌داری در گروه مبتلایان دریافت کننده MSC های تیمار شده با استروژن نسبت به گروه مبتلا و دریافت کننده MSCs بدون تیمار بیشتر بود، به طوری که قابلیت برداشت نوترال رد به وسیله سلول‌های استحصالی از رت‌های مبتلا به RA و دریافت کننده MSCs های تیمار شده با استروژن از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با رت‌های سالم نداشت(نمودار ۲).

نتایج حاصل از تحریک سلول‌های ایمنی ذاتی با زیموزان نشان دهنده افزایش معنی‌دار قابلیت انفجارتنفسی در سلول‌های ایمنی ذاتی استحصالی از رت‌های دچار RA نسبت به رت‌های سالم بود. در این بین قابلیت انفجار تنفسی سلول‌های ایمنی ذاتی طحال در رت‌های مبتلا به RA و تحت درمان با سلول‌های بنیادی مزاشیمال کاهش معنی‌داری نسبت به رت‌های مبتلا نشان داد. البته این میزان کاهش به طور معنی‌داری در گروه مبتلایان دریافت کننده MSCs های تیمار شده با استروژن نسبت به گروه مبتلا و دریافت کننده MSCs های بدون تیمار بیشتر بود (نمودار۳).

تست گریس یک ارزیابی کلی از میزان تولید نیتریک اکساید(واسطه فعال نیتروژن) به وسیله سلول‌های ایمنی ذاتی طحال را ارائه می‌دهد(۲۱). نتایج حاصل شده نشان داد که سلول‌های طحالی که از رت‌های مبتلا به RA جدا شده‌اند سطوح بالاتری از نیتریک اکساید را نسبت به سلوهای طحالی

www.SID.ir

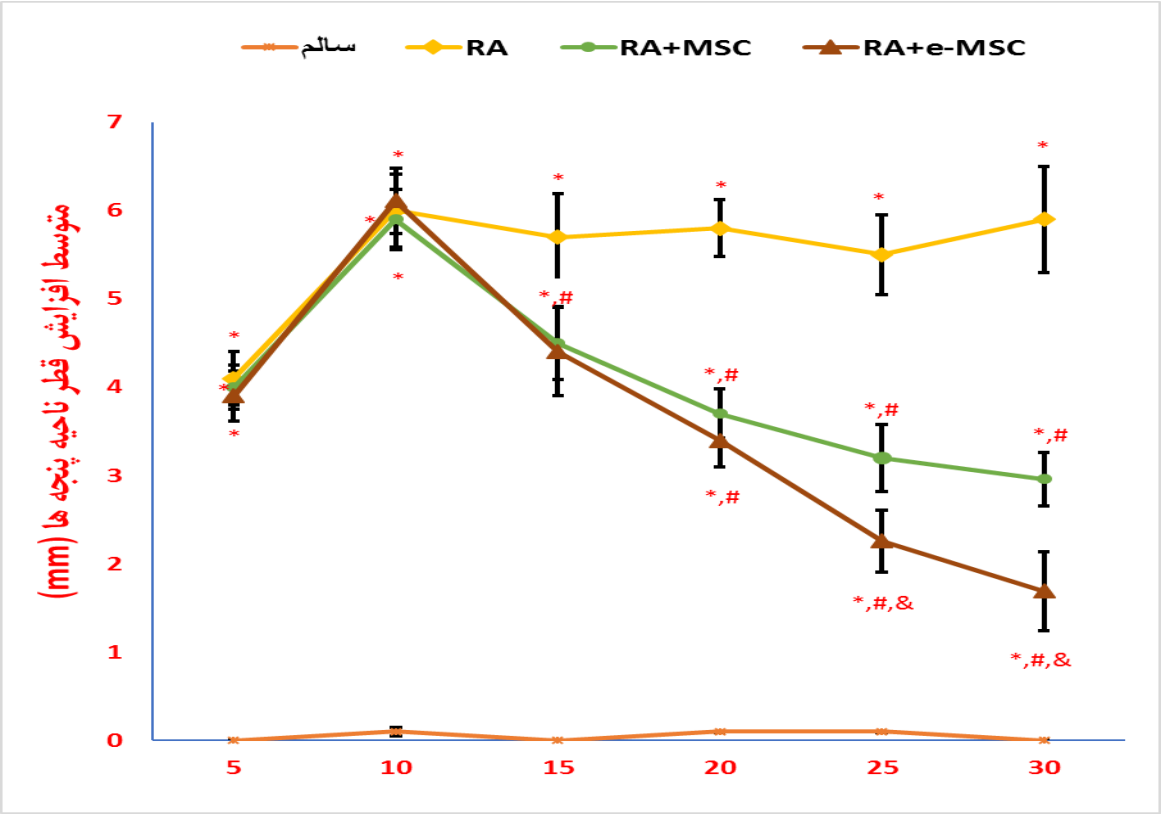
Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:22 +0430 on Monday June 25th 2018

استحصالی از رت‌های سالم به دنبال تحریک با LPS تولید می‌کنند (نمودار ۴). مشابه با نتایج انفجار تنفسی، این میزان کاهش به طور معنی داری در گروه مبتلایان دریافت کننده MSCs های تیمار شده با استروژن نسبت به گروه مبتلا و دریافت کننده MSCs های بدون تیمار بیشتر بود(نمودار۴).

جدول ۱: ارزیابی فلوسیتومتریک سلول‌های جدا شده از پاساژ سوم

مارکر	نمونه ۱	نمونه ۲	نمونه ۳	میانگین ± انحراف معیار
CD۴۵	۱/۹۸	۱/۸۷	۲/۱	۱/۹۸ ۰±۰/۱۱
CD۲۹	۹۷/۲	۹۶/۹۵	۹۴/۶۵	۹۶/۱۲۶±/۴
CD۹۰	۹۴/۲۹	۹۳/۸۴	۹۲/۳۴	۹۳/۴۹ ۱±/۰۲

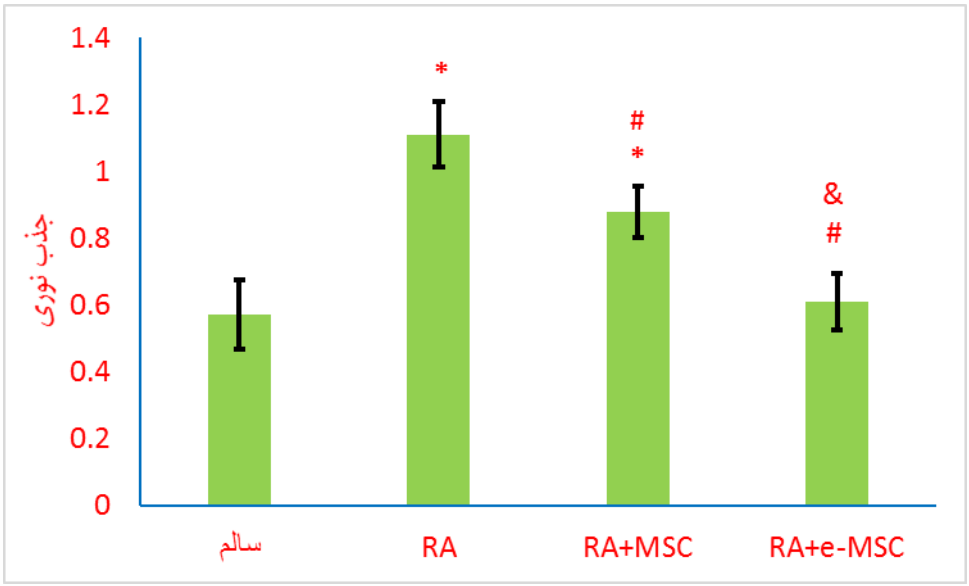


نمودار ۱: مقایسه میانگین تغییرات قطر کف و پا رت‌های مبتلا به RA در روزهای مختلف بین گروه های مختلف. سلول درمانی از روز ۷ بعد ایمن‌سازی آغاز شده است. (* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) بین گروه‌های مبتلا و رت‌های سالم می‌باشد، #نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) بین گروه‌های مبتلا و تحت سلول درمانی با رت‌های مبتلا و بدون درمان می‌باشد،& نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) بین گروه مبتلا و تحت درمان با سلول‌های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با استروژن نسبت به گروه مبتلا وتحت درمان با سلول‌های بنیادی مزانشیمال بدون تیمار می‌باشد).

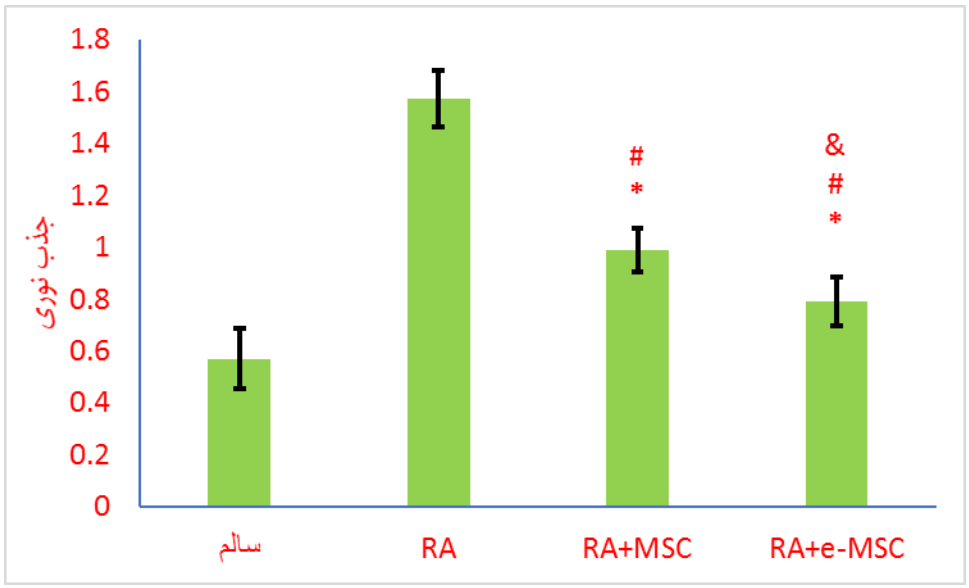
www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:22 +0430 on Monday June 25th 2018



نمودار ۲. مقایسه میزان برداشت نوترال رد به وسیله جمعیت سلول‌های فاگوسیتیک طحالی در رت‌های تحت مطالعه.(* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) بین گروه‌های مبتلا و رت‌های سالم می‌باشد، #نشان دهنده اختلاف معنی‌دار(p<۰/۰۵) بین گروه‌های مبتلا و تحت سلول درمانی با رت‌های مبتلا و بدون درمان می‌باشد،& نشان دهنده اختلاف معنی‌دار(p<۰/۰۵) بین گروه مبتلا و تحت درمان با سلول‌های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با استروژن نسبت به گروه مبتلا و تحت درمان با سلول‌های بنیادی مزانشیمال بدون تیمار می‌باشد).

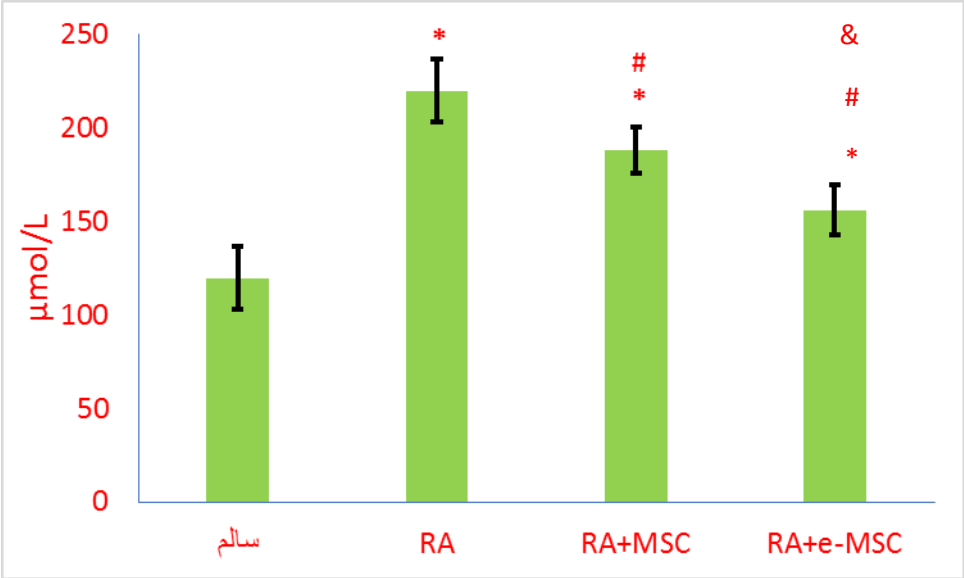


نمودار ۳. مقایسه شدت انفجار تنفسی در جمعیت سلول‌های فاگوسیتیک طحالی در رت‌های تحت مطالعه.(* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) بین گروه‌های مبتلا و رت‌های سالم می‌باشد، #نشان دهنده اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) بین گروه‌های مبتلا و تحت سلول درمانی با رت‌های مبتلا و بدون درمان می‌باشد،& نشان دهنده اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) بین گروه مبتلا و تحت درمان با سلول‌های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با استروژن نسبت به گروه مبتلا و تحت درمان با MS سلول‌های بنیادی مزانشیمال بدون تیمار می‌باشد).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:22 +0430 on Monday June 25th 2018



نمودار ۴: مقایسه میزان تولید نیتریک اکساید در جمعیت سلول‌های فاگوسیتیک طحالی در رت‌های تحت مطالعه.(* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار($p<۰/۰۵$) بین گروه‌های مبتلا و رت‌های سالم می‌باشد، #نشان دهنده اختلاف معنی‌دار($p<۰/۰۵$) بین گروه‌های مبتلا و تحت سلول درمانی با رت‌های مبتلا و بدون درمان می‌باشد، & نشان دهنده اختلاف معنی‌دار($p<۰/۰۵$) بین گروه مبتلا و تحت درمان با سلول‌های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با استروژن نسبت به گروه مبتلا و تحت درمان با سلول‌های بنیادی مزانشیمال بدون تیمار می‌باشد).

بحث

علی‌رغم توانمندی بالای سلول‌های بنیادی جنینی، استفاده بالینی از این سلول‌ها به دلیل نگرانی‌های اخلاقی، و هم‌چنین پتانسیل تشکیل تراتوم محدود شده است. امروزه درمان با سلول‌های بنیادی، مانند سلول‌های پرتوان القایی و سلول‌های سهل‌الوصول بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان مورد توجه قرار گرفته است(۲۵) یکی از ویژگی‌های لازم و کلیدی MSCs، به منظور اعمال اثرات تعدیل کننده ایمنی و یا شرکت در بازسازی بافت، لانه گزینی و مهاجرت به سمت بافت آسیب دیده می‌باشد. از آنجایی که مطالعه‌های گذشته نشان داده است درصد اندکی از سلول‌های پیوند شده به بافت هدف می‌رسند(۲۶). بنابراین، افزایش تعداد MSC ها در محل آسیب می‌تواند تأثیر درمانی MSC پیوندی را به طور کلی افزایش دهد(۲۸ و ۲۷). در این راستا برخی سازوکارهای فارماکولوژیک جهت افزایش رسانش MSCs به بافت هدف استفاده شده است. در مطالعه حاضر نیز از سلول‌های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با ۱۷ـ بتااسترادیول به منظور بهبود علایم RA رت‌های مبتلا استفاده شد. تجربه‌های گذشته نشان داده است که تعداد سلول‌های بنیادی مزانشیمال در حال گردش در موش‌هایی که به مدت ۳ هفته در شرایط هیپوکسی قرار داشتند ۱۵ برابر بیشتر شده است و تجویز این سلول‌ها نیز موجب بهبود بیشتری نسبت به سلول‌های بنیادی مزانشیمال استحصال شده از موش‌های عادی در مدل تجربی آسیب ایسکمیک کلیه شدند. محققین استنتاج کردند که این سلول‌ها به دلیل مهاجرت بیشتر و زمان ماندگاری طولانی‌تر در مویرگ‌های گلومرولی کلیه ایسکمیک، باعث بهبود

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:22 +0430 on Monday June 25th 2018

آسیب حاد کلیه شده‌اند(۲۹). درسلول‌های بنیادی مزانشیمال- هیپوکسیک ،به طور قابل توجهی افزایش بیان ژن‌های HIF-1α و CXCR4 گزارش شده است(۳۰). در مطالعه‌های بعدی مشخص شد که بیان HIF علاوه بر شرایط هایپوکسی به وسیله برخی از عوامل هورمونی از قبیل۱۷- بتا استرادیول می‌تواندHIF نیز القاء می‌شود(۳۱). تجویز استرادیول به رت‌های دچار ایسکمی قلبی و هم‌چنین سلول‌های بنیادی مزانشیمی‌که در معرض استرادیول بوده اند، نیز موجب افزایش تجمع و رسانش سلول‌های پیش ساز اندوتلیال و تولید فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) در ناحیه دچار ایسکمی‌شده و به این ترتیب به بهبود سریع تر ضایعه کمک می‌کند(۳۳ و۳۲). میرزامحمدی و هکاران نیز نشان دادند که ۱۷- بتااسترادیول باعث افزایش لانه گزینی سلول‌های بنیادی تیمار شده به بافت پانکراس از طریق افزایش بیان HIF-1α و CXCR4 در بیماری دیابت شده‌است(۱٤). در این مطالعه نیز مشاهده شد که سلول‌های بنیادی مزانشیمال تحت تیمار با ۱۷ــ بتااسترادیول موجب بهبود بیشتری در علایم رت‌های مبتلا به RA نسبت به رت‌های تحت درمان با سلول‌های بنیادی مزانشیمال بدون تیمار شد که با توجه به توضیحات ارایه شده می‌تواند به دلیل بهبود رسانش این سلول‌ها، به وسیله تیمار استرادیولی بوده باشد.

نتایج این تحقیق نشان داد فعالیت‌های سلول‌های ایمنی ذاتی طحال از قبیل میزان برداشت نوترال رد و تولید رادیکال‌های آزاد نیتروژن و اکسیژن در رت‌های مبتلا به روماتوئید آرتریت، نسبت به رت‌های سالم به نحو قابل توجهی افزایش داشته است که درمان سلولی انجام شده در این مطالعه قسمتی از این افزایش فعالیت را توانست جبران کند. هم‌چنین سلول‌های بنیادی مزانشیمال تحت تیمار با ۱۷- بتااسترادیول موجب کاهش بیشتری در سطح برداشت نوترال به وسیله فاگوسیت‌ها نسبت به سلول‌های بنیادی مزانشیمال بدون تیمار شده‌اند.

مطالعه‌های قبلی نیز نشان دادند سطح فعالیت نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌های خون محیطی در افراد مبتلا به روماتوئید آرتریت نسبت به افراد سالم بیشتر می‌باشد که به دلیل سایتوکاین‌های التهابی و اتوآنتی‌بادی‌های سیترولینه‌ی کمپلکس شده با آنتی‌ژن‌های خودی از قبیل کلاژن در خون محیطی می‌باشد(۳۶ و ۳۴). مشخص شده است فعال شدن نوتروفیل‌ها در افراد مبتلا به RA قبل از مهاجرت آنها به ناحیه سینویال رخ می‌دهد(۳۷).

رادیکال‌های آزاد اکسیژن نقش بسیار مهمی در حذف پاتوژن‌ها دارا هستند. با این حال، زمانی که میزان تولید این رادیکال‌ها بیش از حد باشد (یا به صورت نابجا تولید گردند) موجب ایجاد آسیب بافتی می‌گردد(۱۶). در واکنش‌های ازدیاد حساسیت نوع سوم از قبیل روماتوئید آرتریت، کمپلکس‌های ایمنی تشکیل شده ناشی از خود پادتن‌ها و تثبیت کمپلمان موجب فراخوانی سلول‌های فاگوسیتیک و تولید کننده رادیکال‌های آزاد بالقوه آسیب‌رسان به بافت می‌گردند. این رادیکال‌های آزاد آسیب بافتی را

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:22 +0430 on Monday June 25th 2018

گسترش داده و موجب گسترش اپیتوپ‌های خودی و حمله‌های خود ایمنی می‌گردند. بنابراین مهار چرخه تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن امری ضروری است(۳۶). بر اساس دانسته‌های کنونی به نظر می‌رسد که سلول‌های ایمنی ذاتی از قبیل مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها پس از مهاجرت به بافت، بر اساس ریز محیط اطرافی چندین فنوتیپ مختلف را پیدا می‌کنند(۳۸ و ۳۱). این فنوتیپ‌ها از لحاظ سایتوکاین‌ها، کموکاین‌ها، گیرنده‌های لیگاند و عملکرد با یکدیگر متفاوت هستند. مونوسیت/ماکروفاژهای کلاسیک یا M1 گروهی از این ماکروفاژها با خاصیت ضد میکروبی و التهابی قوی بوده که در پاتوژنز بیماری‌های التهابی وخود ایمن بسیار تأثیرگذار می‌باشند(۳۸). مونوسیت/ماکروفاژهای M2 یا ماکروفاژهای فعال شده از مسیر آلترناتیو(جایگزین) سایتوکاین‌های التهابی و قابلیت میکروب‌کشی کمتری نسبت به ماکروفاژهایM1 داشته و نقش مهمی را در بازسازی وترمیم آسیب های بافتی دارند(۱۵). در مورد نوتروفیل‌ها نیز دوفنوتیپ تعریف شده است. فنوتیپ N1 نوتروفیل، دارای عملکرد التهابی، ضد تولید عروق خونی و محرک سلول‌های T است. درحالی که فنوتیپ N2 پیش برنده رشد سرطان، مشوق تولید عروق خونی و مهارکننده سیستم ایمنی است(۳۸). پلاریزه شدن نوتروفیل‌ها و مونوسیت بر ماکروفاژها به سمت ضد التهابی(N2 و M2) به وسیله سلول‌های بنیادی مزانشیمال در مطالعه‌های گذشته به خوبی اشاره شده است(۳۸ و ۱۸، ۱۷). بر اساس نتایج تحقیق حاضر به نظر می‌رسد که سلول‌های بنیادی مزانشیمال تحت تیمار با ۱۷ــ بتااسترادیول به دلیل کاهش میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن، سلول‌های ایمنی ذاتی را به میزان بیشتری در مقایسه با سلول‌های بنیادی مزانشیمال به سمت فنوتیپ ضد التهابی به دلیل فاگوسیتوز بیشتر در همراهی با تولید سطح پایین‌تری از رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتروژن هدایت می‌کند.

در مجموع به نظر می‌رسد که تیمار سلول‌های بنیادی مزانشیمال با ۱۷ــ بتااسترادیول از طریق افزایش رسانش این سلول‌ها به بافت موجب مهار بیشتری در پاسخ‌های آسیب رسان ایمنی ذاتی در مدل RA شده و به این ترتیب پاسخ بهتری را نسبت به سلول‌های بنیادی مزانشیمال بدون تیمار ایجاد می‌کنند. مطالعه حاضر یک مطالعه مقدماتی بوده و لازم است که در آینده مطالعه‌های بیشتری بالاخص از نظر هیستوشیمیایی و هم‌چنین پاسخ‌های ایمنی اکتسابی صورت گیرد.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه دانشجویی مقطع دکتری تخصصی ایمونولوژی، مصوب دانشگاه ارومیه می‌باشد که با حمایت مالی دانشگاه ارومیه در بخش ایمونولوژی دانشکده دامپزشکی اجرا شده است . نویسندگان از زحمات تمامی افرادی که در پیشبرد پژوهش حاضر همکاری نمودند کمال تشکر را دارند.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:22 +0430 on Monday June 25th 2018

REFERENCES

1. Bartlett SJ, Barbic SP, Bykerk VP, Choy EH, Alten R, Christensen R, et al. Content and Construct validity, reliability, and responsiveness of the rheumatoid arthritis flare Questionnaire: Omeract 2016 workshop report. The Journal of rheumatology 2017; 44:1536-1543.
2.Tvedt THA, Ersvaer E, Tveita AA, Bruserud O. Interleukin-6 in allogeneic stem cell transplantation: its possible importance for immunoregulation and as a therapeutic target. Frontiers in immunology 2017; 8: 667.
3. Tanaka Y. Current concepts in the management of rheumatoid arthritis .The Korean Journal of Internal Medicine 2016; 31(2): 210-8.
4. Alam J, Jantan I, Bukhari SNA. Rheumatoid arthritis: Recent advances on its etiology, role of cytokines and pharmacotherapy. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie 2017; 92: 615-33.
5. Angelotti F, Parma A, Cafaro G, Capecchi R, Alunno A, Puxeddu I. One year in review 2017: pathogenesis of rheumatoid arthritis. Clinical and experimental rheumatology 2017; 35(3): 368-78.
6.Dinh TN, Onea AS, Jazirehi AR. Combination of celecoxib (Celebrex(R)) and CD19 CAR-redirected CTL immunotherapy for the treatment of B-cell non-Hodgkin's lymphomas. American Journal of Clinical and Experimental Immunology 2017; 6(3): 27-42.
7.Bessis N, Decker P, Assier E, Semerano L, Boissier MC. Arthritis models: usefulness and interpretation. Seminars in Immunopathology 2017; 39(4): 469-86.
8. Yau AC, Holmdahl R. Rheumatoid arthritis: identifying and characterising Polymorphisms Using Rat Models 2016; 9(10): 1111-23.
9. De Bari C. Are mesenchymal stem cells in rheumatoid arthritis the good or bad guys? Arthritis Research & Therapy 2015; 17: 113.
10. Galeh HEG, Delirezh N, Abtahi Froushani SM, Ahangaran NA. Calcitriol modulates the effects of the supernatants of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells on neutrophil functions. Turkish Journal of Biology 2014; 38(3): 365-70.
11. Pourtayeb S, Abtahi Froushani SM. Nicotine can modulate the effects of the mesenchymal stem cells on neutrophils. Advances in Medical Sciences 2017; 62(1): 165-70.
12. Wang L, Wang L, Cong X, Liu G, Zhou J, Bai B, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell therapy for patients with active rheumatoid arthritis: safety and efficacy. Stem Cells and Development 2013; 22: 3192-202.
13.Abtahi Froushani M, Esmaili Gouvarchingaleh H, Mansori Mothlag B, Babaei M. Immunomodulatory Effects of 17 beta-Estradiolin NMRI Mice Immunized by SRBC. Quarterly of Horizon of Medical Sciences 2014; 20(3): 70-165.
14. Mirzamohammadi S, Aali E, Najafi R, Kamarul T, Mehrabani M, Aminzadeh A,et al. Effect of 17beta-estradiol on mediators involved in mesenchymal stromal cell trafficking in cell therapy of diabetes. Cytotherapy 2015; 17(1): 46-57.
15.Nadkarni S, McArthur S. Oestrogen and immunomodulation: new mechanisms that impact on peripheral and central immunity. Current Opinion in Pharmacology 2013; 13(4): 576-81.
16.Hong L, Zhang G, Sultana H, Yu Y, Wei Z. The effects of 17-β estradiol on enhancing proliferation of human bone marrow mesenchymal stromal cells in vitro. Stem Cells and Development 2011; 20(5): 925-31.
17.Motlagh BM, Ahangaran NA, Froushani SMA. Calcitriol modulates the effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on macrophage functions. Iranian Journal of Basic Medical Sciences 2015; 18(7): 672.
18.Pourtayeb S, Froushani SMA. Nicotine can modulate the effects of the mesenchymal stem cells on neutrophils. Advances in Medical Sciences 2017; 62(1): 165-70.
19. Zamani Mazdeh D, Mirshokraei P, Emami M, Mirshahi A, Karimi I. 17β-estradiol improves the efficacy of exploited autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells in non-union radial defect healing: A rabbit model. Research in Veterinary Science 2017; 28; 118:11-18.
20.Griffiths MM, Cannon GW, Corsi T, Reese V, Kunzler K. Collagen-Induced Arthristis in Rats. In: Cope AP, ed. ArthritisResearch: Methods and Protocols Volume 2. Totowa, NJ: Humana Press; 2007; 201-14.
21.Ghasemi S, Abtahi Froushani S, Ownagh A. The effects of hydro-alcoholic extract of Hypericum perforatum on cell migration and inflammatory mediators production in acute peritonitis induced by Zymosan in NMRI mice. Armaghane Danesh 2017; 21(11): 1041-55.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:22 +0430 on Monday June 25th 2018

22.Mansouri Motlagh B, Afzale Ahangaran N, Abtahi Froushani S. Calcitriol modulates the effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on macrophage functions. IranJ Basic Med Sci 2015; 17(7): 672-6.
23.Bryan NS, Grisham MB. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. Free Radical Biology & Medicine 2007; 43(5): 645-57.
24. Antal P, Sipka S, Surányi P, Csipo I, Seres T, Maródi L,et al. Flow cytometric assay of phagocytic activity of human neutrophils and monocytes in whole blood by neutral red uptake. Ann Hematol 1995; 70(5): 259-65.
25.Calne RY, Gan SU, Lee KO. Stem cell and gene therapies fordiabetes mellitus. Nature Reviews Endocrinology 2010; 6(3): 173-7.
26.Yamada Y, Ueda M, Hibi H, Nagasaka T. Translational research for injectable tissue-engineered bone regeneration using mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: from basic research to clinical case study. Cell Transplantation 2004; 13(4): 343-55.
27.Abdi R, Fiorina P, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH. Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. Diabetes 2008; 57(7): 1759-67.
28.Chhabra P, Brayman KL. Stem cell therapy to cure type 1 diabetes: from hype to hope. Stem Cells Translational Medicine 2013; 2(5): 328-36.
29. Li H, Liu J, Ye X, Zhang X, Wang Z, Chen A,et al. 17beta-Estradiol enhances the recruitment of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into infarcted myocardium by inducing CXCR4 expression. International journal of cardiology 2013; 162(2): 100-6.
30.Rochefort GY, Delorme B, Lopez A, et al. Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia .Stem cells (Dayton, Ohio) 2006; 24(10): 2202-8.
31.Molitoris KH, Kazi AA, Koos RD. Inhibition of oxygen-induced hypoxia-inducible factor-1alpha degradation unmasks estradiol induction of vascular endothelial growth factor expression in ECC-1 cancer cellsin vitro. Endocrinology 2009; 150(12): 5405-14.
32. Iwakura A, Shastry S, Luedemann C, Hamada H, Kawamoto A, Kishore R,,et al. Estradiol enhances recovery after myocardial infarction by augmenting incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into sites of ischemia-induced neovascularization via endothelial nitric oxide synthase-mediated activation of matrix metalloproteinase-9. Circulation 2006; 113(12): 1605-14.
33. Erwin GS, Crisostomo PR, Wang Y, Wang M, Markel TA, Guzman M,et al. Estradiol-treated mesenchymal stem cells improve myocardialrecovery after ischemia. The Journal of Surgical Research 2009; 152(2): 319-24.
34.de Siqueira MB, da MotaLM, Couto SC, Muniz-Junqueira MI. Enhanced neutrophil phagocytic capacity in rheumatoid arthritis related to the autoantibodies rheumatoid factor and anti-cyclic citrullinated peptides. BMC Musculoskeletal Disorders 2015; 16: 159.
35.Thieblemont N, Wright HL, Edwards SW, Witko-Sarsat V. Human neutrophils in auto-immunity. Seminars in Immunology 2016; 28(2): 159-73.
36.Epp Boschmann S, Goeldner I, Tuon FF, Schiel W, Aoyama F, de Messias-Reason IJ. Mannose-binding lectin polymorphisms and rheumatoid arthritis: A short review and meta-analysis. Molecular Immunology 2016; 69: 77-85.
37.Fairhurst AM, Wallace PK, Jawad AS, Goulding NJ. Rheumatoid peripheral blood phagocytes are primed for activation but have impaired Fc-mediated generation of reactive oxygenspecies. Arthritis Research & Therapy 2007; 9(2): R29.
38.Notaj A, Abtahi Froushani S, Khezri S. The effect of quercetin on the physiological funtions of rats peripheral plood neutrophils in vitro condition. Armaghane Danesh 2016; 21(8): 772-86.

www.SID.ir

Arc

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Effect of Mesenchymal Stem Cells treated with 17β-estradiol on the Pattern of Intrinsic Immunity Responses in Collagen-Induced Rheumatoid Arthritis in Wistar Rats

Jahan Tigh M, Abtahi Salesani SM*, Afzal Ahangaran N

,Department of Microbiology, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 4 Sep 2017 Accepted: 21 Dec 2017

Abstract

Background and Aim: So far, no information has been found on the role of estradiol in altering the immunosuppression of immune system in the in vitro model. The aim of the present study was to evaluate the effects of treatment with 17-beta estradiol MSCs in the regulation of intrinsic immune responses in rheumatoid arthritis (RA) animal models.

Methods: In this experimental study, mesenchymal stem cells were admixed with 17 β-estradiol (E2 100 μM) for 24 hours, and rheumatoid arthritis was induced by collagen and complete perfusion adjuvant in Wistar rats. One week After immunization, rats in untreated groups treated with MSCs without treatment (intraperitoneal injection of two million cells), treated with MSCs treated with E2, changing the diameter of the wrists and the foot of each rat until day 33 After induction, the disease was recorded every 5 days. Data were analyzed by one-way ANOVA and one-way ANOVA. Which were analyzed.

Results: The amount of edema and swelling of the palms of the hands and feet on the last day was positive in the control group (5.9 ± 0.6 mm) more than the treatment groups. Inflation rate in the treated group with E2 treated MSCs (1.69 ± 0.45 mm) was significantly lower than that treated with MSCs without treatment (2.96 ± 0.3 mm). Also, the respiratory burst ability (1. 57 ± 0.11), the amount of phagocytosis (0.11 ± 0.90) and the nitric oxide production (219.66 ± 8.18 μmol / L) in the intrinsic immune cells of the spleen in The positive control group was more than the control group. The rate of respiratory burst, phagocytosis and nitric oxide production in treated MSCs were (0.79 ± 0.99, 0.61 ± 0.08, 155.9 ± 13.29 μM), respectively, and in The group receiving untreated MSCs was 0.99 ± 0.08, 0.88 ± 0.07 and 18.79 ± 12.18 μM respectively.

Conclusion: Treatment of MSCs with 17 beta-estradiol increases regulatory function and inhibitory effect on inflammatory mediators of spleen inherent immune cells in the RA model compared to non-treated mesenchymal stem cells.

Key words: 17 beta-estradiol, mesenchymal stem cells, rheumatoid arthritis, inherent immunity

***Corresponding author:** Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
Emal: sm.abtahi@urmia.ac.ir

Please cite this article as follows:
Jahan Tigh M, Abtahi Salesani SM, Afzal Ahangaran N. Effect of Mesenchymal Stem Cells treated with 17β-estradiol on the Pattern of Intrinsic Immunity Responses in Collagen-Induced Rheumatoid Arthritis in Wistar Rats. Armaghane-danesh 2018; 23 (1): 42-56.

Downloaded from armaghanj.yums.ac.ir at 10:22 +0430 on Monday June 25th 2018

www.SID.ir