

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

منیره جهان تیغ، سید میثم ابطی فروشانی^{*}، ناهیده افضل آهنگران

گروه میکروپشناسی، 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 ایمنومودولاتوری سلول‌هت‌ب بنیادیمزانشیمال در شرایط درون تنی مدل آزمایشگاهی یافت نشده است. هدف از مطالعه حاضر ارزیابی اثرات تیمار با ۱۷- بتا استرادیول بر قابلیت‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمال (MSC) در تعدیل پاسخ‌های ایمنی ذاتی در مدل حیوانی روماتوئید آرتريت (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 آرتريت 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 (۵/۹±۰/۶ 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 (۲/۹۶±۰/۳ میلی‌متر) به طور معنی‌داری کاهش بیشتری یافت. همچنین قابلیت انفجار تنفسی (۱/۵۷ ± ۰/۱۱)، میزان فاگوسیتوز نوترال (۱/۱۱ ± ۰/۰۹) و میزان تولید نیتریک اکساید (۲۱۹/۱۶±۷/۸۱ 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 با MSCs تیمار شده به ترتیب به میزان (۰/۷۹ ± ۰/۰۹، ۰/۶۱ ± ۰/۰۸ و ۱۵۵/۹±۱۳/۲۹ میکرومول) و در گروه دریافت کننده MSCs بدون تیمار به ترتیب به میزان (۰/۹۹ ± ۰/۰۸، ۰/۰۷ ± ۰/۰۸ و ۱۸۷/۹±۱۲/۱۸ میکرومول) بود. در تمام بررسی‌ها $p < ۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتیجه‌گیری: تیمار MSCها با ۱۷- بتا استرادیول موجب افزایش عملکرد تنظیمی و تأثیر مهارتی بر واسطه‌های التهابی آسیب‌رسان سلول‌های ایمنی ذاتی طحال در مدل RA نسبت به سلول‌های بنیادی مزانشیمال بدون تیمار می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: ۱۷- بتا استرادیول، سلول‌های بنیادی مزانشیمال، روماتوئید آرتريت، ایمنی ذاتی.

^{*} نویسنده مسئول: سید میثم ابطی فروشانی، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه میکروپشناسی

Email: sm.abtahi@urmia.ac.ir

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 - عروقی به عنوان یکی از علل مرگ در بیماران آرتریت روماتوئید مطرح می‌باشد. (۲) عامل آرترورژنیک هنوز ناشناخته است، احتمالاً میکروب‌ها یا برخی از آنتی‌ژن‌های خودی پاسخ‌های خودایمنی لنفوسیت‌های TCD4⁺ را آغاز می‌کنند (۳). سلول‌های ایمنی ذاتی از جمله مهمترین بازیگران ایجاد کننده پاتورژن بیماری RA می‌باشند (۴ و ۵). 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 از دیاد 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، به طوری 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 ۷). 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 و ۷). 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 نه تنها 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 مهارتی بیان شده در سطح آنها از قبیل: PDL1، TGF- β ، HLA-G و Galectins، برخی سایتوکاین‌های ضد التهابی همچون؛ IL-10 و TGF- β ، متابولیت‌هایی از قبیل؛ نیتریک‌اکساید، IDO و PAG E2 و برخی از آنزیم‌های مهارکننده (ماتریکس متالوپروتینازها) می‌باشند که به صورت پاراکرین و یا تماس مستقیم سلول به سلول اثرات خود را ایجاد می‌کنند (۱۱ و ۱۰).

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 آرتريت 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 (۱۷- بتا استرادیول) از جمله هورمون‌های 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 پاسخ‌گو به استروژن به طور گسترده‌ای در سطح سلول‌های مختلف بدن بالاحص 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 مزانشیمی در شرایط آزمایشگاهی می‌شود (۱۶). استروژن موجب بهبود علائم بیماری آنسفالومیلیت خود ایمن در موش‌های آستن و تحت تیمار با استرادیول شده، همچنین موجب کاهش عوارض دیابت از جمله زخم‌های دیابتی گردیده است (۱۵ و ۱۳). قابلیت انفجار

تنفسی و تولید رادیکال‌های آزاد در موش‌های نر تحت تیمار با استرادیول نیر کاهش می‌یابد (۱۲). با این حال تا کنون اطلاعاتی در مورد نقش استرادیول در تغییر قابلیت‌های ایمونومودولاتوری سلول‌های بنیادی مزانشیمال در شرایط درون تنی مدل آزمایشگاهی آرتريت روماتوئید وجود ندارد. به همین دلیل در تحقیق حاضر بر آن شدیم که به مقایسه عملکرد درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمال تیمار شده با ۱۷- بتا استرادیول و بدون تیمار در مدل حیوانی روماتوئید آرتريت 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 موش‌ها 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 به ترتیب 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)

و به سطح ظرف کشت می‌چسبند. پس از اولین تراکم بیش از ۷۰ درصد، سلول‌های چسبنده با استفاده از تریپسین (Sigma Aldrich - آمریکا) حاوی ۲ درصد EDTA^(۳) از کف فلاسک جداسازی و جهت پاساژ به فلاسک‌های بعدی منتقل شدند (۱۸ و ۱۷). پس از پاساژ سوم، سلول‌های بنیادی مزانشیمال مغز استخوان به مدت ۲۴ ساعت با ۱۷ بتا استرادیول (شرکت Sigma - 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^(۴) خریداری شده از شرکت Becton Dickinson علیه آنتی‌ژن‌های سطحی MSCs، CD29 (کنژوگه با PE)، CD90 (کنژوگه با PCY5) و مارکر سلول‌های خون‌ساز CD45 (کنژوگه با FITC) رنگ‌آمیزی گردید. به طور خلاصه سوسپانسیون سلولی حاوی 5×10^5 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 مونوکلونال

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 ایمن‌سازی 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 دو میلیون سلول در حجم ۰/۱ میلی‌لیتر) قرار گرفتند.

بر اساس پروتکل استاندارد، سلول‌های بنیادی مزانشیمال جوندگان از طریق فلاشیگ 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 $10^6 \times 0/4$ سلول به ازای هر سانتی‌متر مربع به فلاسک‌های کشت T25، در محیط کشت پایه DMEM^(۱) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی FBS^(۲) (Gibco - انگلستان) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و حضور ۵ درصد دی‌اکسیدکربن در گرمخانه گرماگذاری شدند. بعد از ۴۸ ساعت سلول‌های غیر چسبنده دور ریخته شد و محیط کشت به طور مرتب هر ۳ روز عوض شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمالی در کشت، مورفولوژی فیروبلستی داشته

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

علیه سه مارکر سطحی یاد شده مخلوط گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ 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 ۱-۲-۱ مورد آنالیز قرار گرفت (۱۱).

به منظور القای RA در رت‌های نژاد ویستار، به ازای هر رت، ۲۰۰ میکروگرم کلاژن نوع ۲ (CII) (Sigma Aldrich - آمریکا) در ۱۰۰ میکرولیتر محلول اسید استیک (۰/۰۵ M) حل شد. هم حجم محلول فوق (۱۰۰ میکرولیتر) به آن ادجوانست کامل فروند (Sigma Aldrich - 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 قانده دم رت‌ها تزریق شد. به رت‌های گروه شاهد هم حجم گروه‌های القاء PBS به قانده دم تزریق شد. تغییر قطر مچ دست و پای هر رت در روزهای ۰،۵،۱۰،۱۵،۲۰،۲۵ و ۳۰ ثبت شد (۳۰).

آزمون احیای NBT 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 درصد FBS (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 2×10^6 سلول در هر میلی‌لیتر تهیه گردید. سلول‌ها به مدت یک ساعت با مخمر اپسونیزه انکوبه شدند. میزان ۱۰۰ میکرولیتر محلول زایموزان و نیتروبلوتترانزولیوم (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 الیزانگار در طول موج ۵۴۰ قرائت گردید (۲۲).

گرفته می‌شود. به طور خلاصه در هر پلیت ۹۶ خانه به مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلول‌های طحالی (2×10^6 سلول در هر میلی‌لیتر) به همراه ۲۰ میکرولیتر از محلول NR ($2/3$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به چاهک‌ها افزوده و به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه در تاریکی انکوبه گردید. ۲۰۰ میکرولیتر محلول اسید استیک گلاسیال - اتانول (اسیداستیک ۱ درصد و اتانول ۵۰ درصد) به چاهک‌ها اضافه و شیک گردید. آنگاه پلیت‌ها در طول موج ۶۳۰ نانومتر به وسیله دستگاه الیزاریدر خوانده شدند (۱۷).

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار Excel، SPSS 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 $p < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

داده‌های فلوسیتومتری نشان داد که در پاساژ سوم سلول‌های بنیادی مزانشیمال جدا شده شاخص CD45 به عنوان یک شاخص هماتوپوئیتیک بسیار پایین است، در حالی که شاخص‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمال رت یعنی CD29 و CD90 افزایش معنی‌داری یافت (جدول ۱).

نمودار ۱ نشان می‌دهد که تزریق داخل قانده دم سوسپانسیون کلاژن و ادجوانت کامل فروند منجر

میزان تولید نیتریک اکسید به وسیله روش رنگ‌سنجی گریس (Griess) و استفاده از منحنی استاندارد نیتريت سدیم تعیین گردید. به طور خلاصه، پس از حذف گلوبول‌های قرمز، سوسپانسیونی، به تعداد 2×10^6 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 محلول ۱ درصد سولفانیل آمید (شرکت Sigma - 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 (شرکت Sigma) 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 الیزانگار قرائت گردید. هم‌زمان با استفاده از غلظت‌های مختلف نیتريت سدیم منحنی استاندارد ترسیم شده و از طریق رگرسیون و معادله خطی، غلظت نیتريت 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

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 قطر ناحیه 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 (0.45 ± 0.169 میلی‌متر) و همچنین در گروه مبتلایان درمان شده با سلول‌های بنیادی بدون تیمار (0.3 ± 0.296 میلی‌متر) نسبت به گروه رت‌های مبتلا و بدون درمان (0.6 ± 0.5 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 فاگوسیت‌کننده طحالی در رت‌های مبتلا به RA افزایش معنی‌داری یافته است. دریافت سلول‌های بنیادی مزانشیمال منجر به کاهش،

قابلیت فاگوسیتوز سلول‌های فاگوسیت‌کننده طحالی در رت‌های مبتلا به RA شد. با این حال این میزان کاهش به طور معنی‌داری در گروه مبتلایان دریافت‌کننده MSC های تیمار شده با استروژن نسبت به گروه مبتلا و دریافت‌کننده MSCs بدون تیمار بیشتر بود، به طوری که قابلیت برداشت نوترال رد به وسیله سلول‌های استحصالی از رت‌های مبتلا به RA و دریافت‌کننده 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 زیموژان نشان دهنده افزایش معنی‌دار قابلیت انفجار تنفسی 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 مزانشیمال کاهش معنی‌داری نسبت به رت‌های مبتلا نشان داد. البته این میزان کاهش به طور معنی‌داری در گروه مبتلایان دریافت‌کننده MSCs های تیمار شده با استروژن نسبت به گروه مبتلا و دریافت‌کننده MSCs های بدون تیمار بیشتر بود (نمودار ۳).

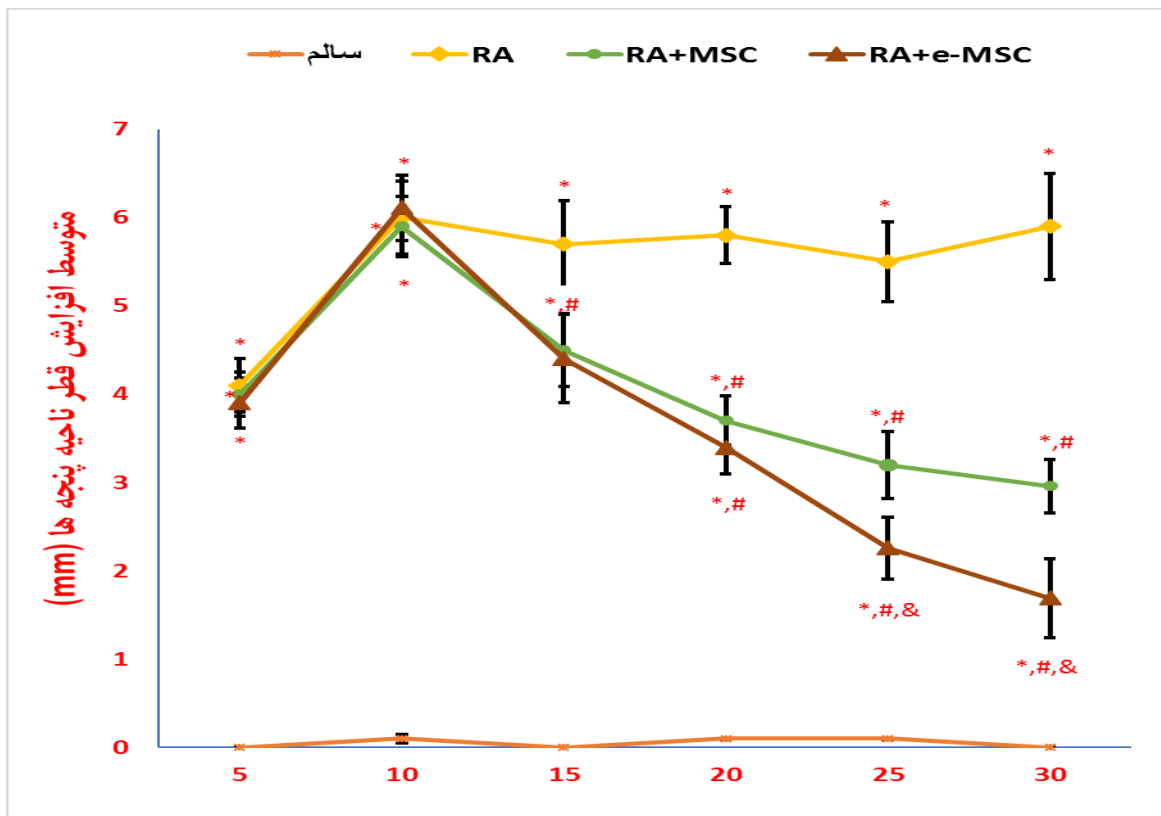
تست گریس یک ارزیابی کلی از میزان تولید نیتریک اکساید (واسطه فعال نیتروژن) به وسیله سلول‌های ایمنی ذاتی طحال را ارائه می‌دهد (۲۱). نتایج حاصل شده نشان داد که سلول‌های طحالی که از رت‌های مبتلا به RA جدا شده‌اند سطوح بالاتری از نیتریک اکساید را نسبت به سلول‌های طحالی

مبتلایان دریافت‌کننده MSCs های تیمار شده با استروژن نسبت به گروه مبتلا و دریافت‌کننده MSCs های بدون تیمار بیشتر بود (نمودار ۴).

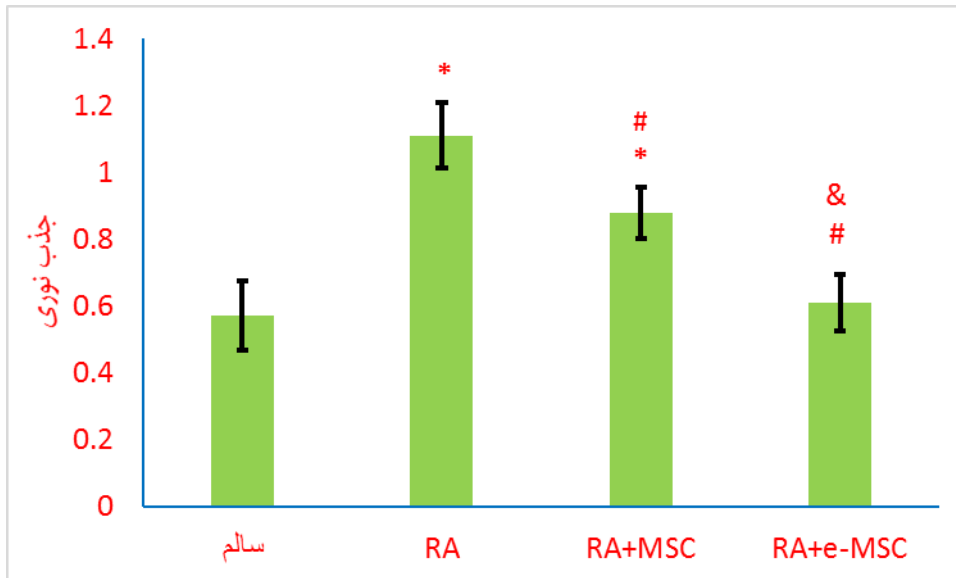
استحصالی از رت‌های سالم به دنبال تحریک با LPS تولید می‌کنند (نمودار ۴). مشابه با نتایج انفجار تنفسی، این میزان کاهش به طور معنی‌داری در گروه

جدول ۱: ارزیابی فلوسیتومتری سلول‌های جدا شده از پاساژ سوم

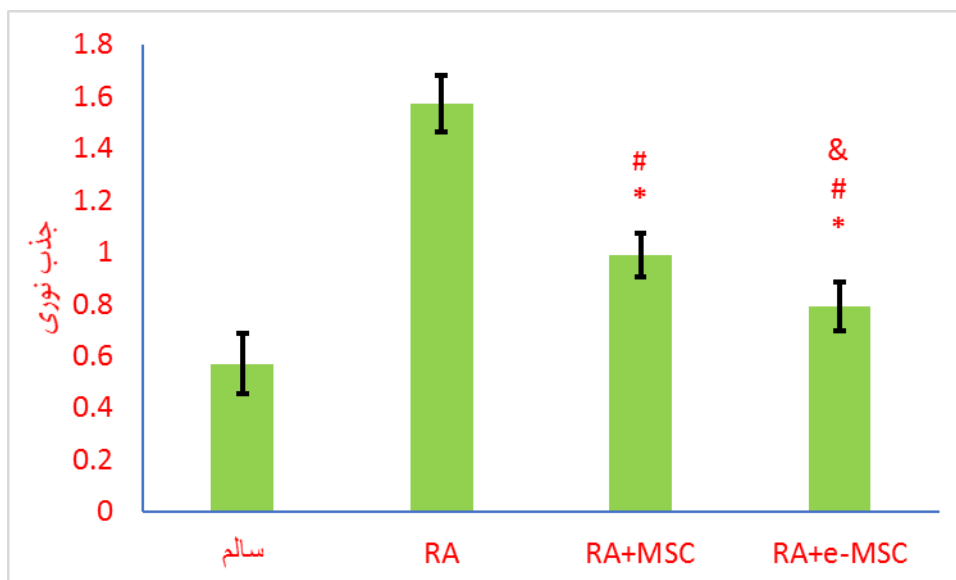
مارکر	نمونه ۱	نمونه ۲	نمونه ۳	میانگین ± انحراف معیار
CD۴۵	۱/۹۸	۱/۸۷	۲/۱	۱/۹۸ ± ۰/۱۱
CD۲۹	۹۷/۲	۹۶/۹۵	۹۴/۶۵	۹۶/۱۲۶ ± ۴
CD۱۰	۹۴/۲۹	۹۳/۸۴	۹۲/۳۴	۹۳/۴۹ ± ۰/۰۲



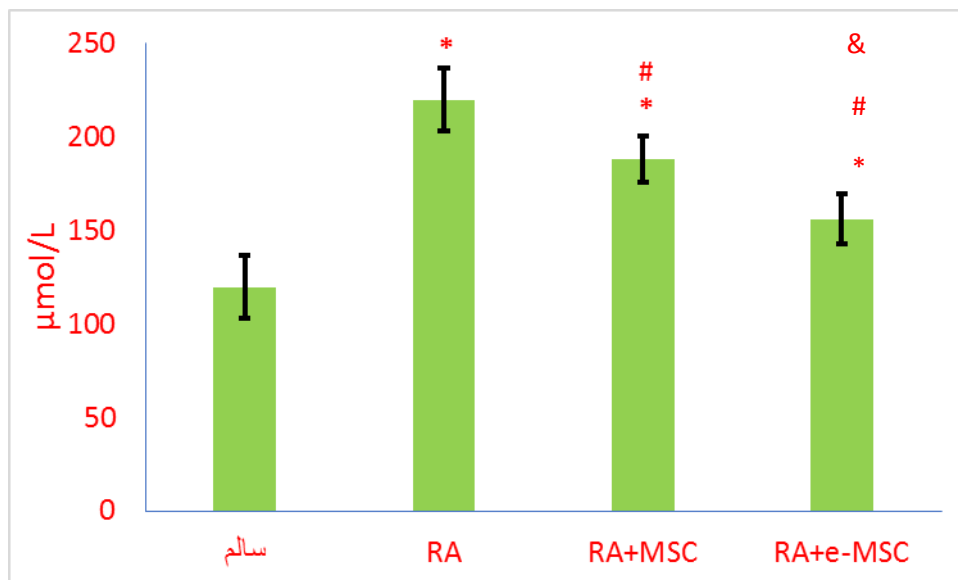
نمودار ۱: مقایسه میانگین تغییرات قطر کف و پا رت‌های مبتلا به RA در روزهای مختلف بین گروه‌های مختلف. سلول درمانی از روز ۷ بعد ایمن‌سازی آغاز شده است. (* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$) بین گروه‌های مبتلا و رت‌های سالم می‌باشد، # نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$) بین گروه‌های مبتلا و تحت سلول درمانی با رت‌های مبتلا و بدون درمان می‌باشد، & نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$) 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 ۲. مقایسه میزان برداشت نوترال رد به وسیله جمعیت سلول‌های فاگوسیتیک طحالی در رت‌های تحت مطالعه. (* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$) بین گروه‌های مبتلا و رت‌های سالم می‌باشد، # نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$) بین گروه‌های مبتلا و تحت سلول درمانی با رت‌های مبتلا و بدون درمان می‌باشد، & نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$) 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 ($p < 0.05$) بین گروه‌های مبتلا و رت‌های سالم می‌باشد، # نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$) بین گروه‌های مبتلا و تحت سلول درمانی با رت‌های مبتلا و بدون درمان می‌باشد، & نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$) 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).



نمودار ۴: مقایسه میزان تولید نیتریک اکساید در جمعیت سلول‌های فاگوسیتیک طحالی در رت‌های تحت مطالعه (* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$) بین گروه‌های مبتلا و رت‌های سالم می‌باشد، # نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$) بین گروه‌های مبتلا و تحت سلول درمانی با رت‌های مبتلا و بدون درمان می‌باشد، & نشان دهنده اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$) 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

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 ۱۷-بتا استرادیول — 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

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 تعدیل‌کننده ایمنی و یا شرکت در بازسازی بافت، لانه‌گزینی 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

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-بتاسترادیول 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 ساینویال 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

آسیب حاد کلیه شده‌اند (۲۹). در سلول‌های بنیادی مزانشیمال-هیپوکسیک، به طور قابل توجهی افزایش بیان ژن‌های HIF-1 α 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 قبیل ۱۷-بتا استرادیول می‌تواند HIF نیز القاء می‌شود (۳۱). تجویز استرادیول به رت‌های دچار ایسکمی قلبی و همچنین سلول‌های بنیادی مزانشیمی که در معرض استرادیول بوده‌اند، نیز موجب افزایش تجمع و رسانش سلول‌های پیش ساز اندوتلیال و تولید فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF) در ناحیه دچار ایسکمی شده و به این ترتیب به بهبود سریع تر ضایعه کمک می‌کند (۳۳ و ۳۲). میرزامحمدی و همکاران نیز نشان دادند که ۱۷-بتاسترادیول باعث افزایش لانه‌گزینی سلول‌های بنیادی تیمار شده به بافت پانکراس از طریق افزایش بیان HIF-1 α و CXCR4 در بیماری دیابت شده‌است (۱۴). در این مطالعه نیز مشاهده شد که سلول‌های بنیادی مزانشیمال تحت تیمار با ۱۷-بتاسترادیول موجب بهبود بیشتری در علائم رت‌های مبتلا به RA نسبت به رت‌های تحت درمان با سلول‌های بنیادی مزانشیمال بدون تیمار شد که با توجه به توضیحات ارائه 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

حاضر به نظر می‌رسد که سلول‌های بنیادی مزانشیمال تحت تیمار با ۱۷-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 ۱۷-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.

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 (۲۸ 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 پاتوژن بیماری‌های التهابی و خود ایمن بسیار تأثیرگذار می‌باشند (۲۸). مونوسیت/ماکروفاژهای M2 یا ماکروفاژهای فعال شده از مسیر آلترناتیو (جایگزین) سایتوکاین‌های التهابی و قابلیت میکروب‌کشی کمتری نسبت به ماکروفاژهای M1 داشته و نقش مهمی را در بازسازی و ترمیم آسیب‌های بافتی دارند (۱۵). در مورد نوتروفیل‌ها نیز دو فنوتیپ تعریف شده است. فنوتیپ N1 نوتروفیل، دارای عملکرد التهابی، ضد تولید عروق خونی و محرک سلول‌های T است. در حالی 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

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-redirceted 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, Delirez 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.

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 for diabetes 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 cells in 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 myocardial recovery after ischemia. *The Journal of Surgical Research* 2009; 152(2): 319-24.
34. de Siqueira MB, da Mota LM, 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 oxygen species. *Arthritis Research & Therapy* 2007; 9(2): R29.
38. Notaj A, Abtahi Froushani S, Khezri S. The effect of quercetin on the physiological functions of rats peripheral blood neutrophils in vitro condition. *Armaghane Danesh* 2016; 21(8): 772-86.

Effect of Mesenchymal Stem Cells treated with 17 β -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 μ M) 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 μ mol / 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 μ M), respectively, and in The group receiving untreated MSCs was 0.99 ± 0.08 , 0.88 ± 0.07 and 18.79 ± 12.18 μ M 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

Email: 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 17 β -estradiol on the Pattern of Intrinsic Immunity Responses in Collagen-Induced Rheumatoid Arthritis in Wistar Rats. Armaghane-danesh 2018; 23 (1): 42-56.