

نقش عوامل ترشح شده از سلول های بنیادی مزانشیمی در پیشگیری از بروز آرتریت القاء شده توسط کلاژن در موش های صحرایی

مریم نظافت فریزی^۱، محمود فرامرزی^۲، طاهره موسوی^{۳*}، کبری انتظامی^۴، علی محمد شریفی^۵

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد ایمنی شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

^۲ دانشجوی کارشناسی ارشد ایمنی شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

^۳ استاد ایمنی شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی و عضو مرکز تحقیقات مقاومت های میکروبی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

^۴ دانشیار ایمنی شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

^۵ استاد فارماکولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول: استاد گروه ایمنی شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

پست الکترونیک: Taherehtavakol@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: آرتریت روماتوئید (RA) با التهاب سینوویوم و تخریب مفصلی شناخته شده است. سلول های بنیادی مزانشیمی (MSC) در درمان و پیشگیری از بیماری های خودایمنی متعدد، موثر می باشند. در مطالعه حاضر اثر مولکول های ترشحی MSCs در پیشگیری از آرتریت القاء شده توسط کلاژن (CIA) در موش های صحرایی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار: در این مطالعه تجربی، به کمک امولسیون کلاژن تیپ II جوجه و ادجوان فروند در موش های صحرایی نژاد ویستار، مدل حیوانی آرتریت تهیه و به طور همزمان از مایع رویی کشت MSCs مشتق از مغزاستخوان برای پیشگیری از بروز CIA استفاده شد. در گروه کنترل بجای مایع رویی کشت MSCs از محیط کشت سلول استفاده شد. از روز ۷ تا ۳۵ پس از ایمونیزاسیون، میزان تورم پاها و شدت بالینی علایم و همچنین ویژگی های هیستوپاتولوژیکی استخوان ها و مفاصل مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: این مطالعه نشان داد مایع رویی کشت MSCs بصورت معناداری سبب تأخیر در شروع CIA، کاهش تورم پاها، تخریب استخوان، التهاب مفاصل و شدت علایم بالینی در گروه پیشگیری در مقایسه با موش های صحرایی گروه کنترل می شود.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که استفاده از فاکتورهای محلول موجود در مایع رویی کشت سلول های بنیادی مزانشیمی هر چند نمی تواند به طور کامل از بروز CIA جلوگیری کند، ولی علایم بالینی آرتریت را به طور قابل ملاحظه کاهش داده و موجب بهبودی آسیب های بافتی موضعی می شود. به نظر می رسد، این نتایج می تواند در برنامه های درمان و پیشگیری از آرتریت انسان مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: آرتریت روماتوئید، آرتریت القاء شده با کلاژن، سلول بنیادی مزانشیمی

وصول: ۹۲/۱۰/۱۷

اصلاح: ۹۳/۳/۲۷

پذیرش: ۹۳/۵/۱۱

مقدمه

آرتریت روماتوئید یکی از بیماری‌های التهابی خودایمنی مزمن می‌باشد که با تخریب استخوان و غضروف شناخته می‌شود. آسیب‌های مخرب نتیجه‌ای از پاسخ‌های ایمنی و فرایندهای التهابی غیراختصاصی برای آنتی‌ژن می‌باشند [۱]. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که شناسایی اتوانتی‌ژن‌ها بوسیله سلول‌های T برای بروز آسیب‌های ناشی از این بیماری خود ایمن ضروری می‌باشد. همچنین نقص در هموستاز سلول‌های T تنظیمی در بروز آرتریت نقش دارند [۲]. بسیاری از دستورات عمل‌های درمانی آرتریت روماتوئید در جهت کاهش شدت علائم بیماری می‌باشد. مهار مواد واسطه‌ای مختلف همچون TNF- و IL-1 و یا استفاده از ترکیبات کورتیکواستروئیدی بخشی از این دستورات عمل‌های درمانی می‌باشند. با این حال، تاکنون روش موثر و بادوامی برای پیشگیری و درمان آرتریت روماتوئید ارائه نشده است [۳].

در چند سال اخیر توجه زیادی به سلول‌های بنیادی مزانشیمی به عنوان ابزار موثر در سلول درمانی معطوف شده است. این سلول‌ها، سلول‌های بنیادی بالغ غیرهماتوپویتیک می‌باشند که از انواع بافت‌های همبند بالغ بخصوص بافت مغز استخوان و چربی جدا می‌شوند. این سلول‌ها از قدرت خود تجدیدشوندگی برخوردار می‌باشند و می‌توانند به انواع مختلفی از بافت‌ها مانند چربی، استخوان و تاندون متمایز گردند. این سلول‌ها علاوه بر ترمیم بافت، دارای خواص تعدیل‌کنندگی پاسخ‌های ایمنی نیز می‌باشند [۴]. دانشمندان با بررسی ویژگی‌های تعدیل پاسخ‌های ایمنی توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی به این نتیجه رسیدند که می‌توان از این سلول‌ها به عنوان یک گزینه جدی در درمان یا پیشگیری از بیماری‌های خودایمن استفاده نمود و بحث پیشگیری از بروز بیماری‌های خودایمن با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی یکی از مواردی است که در چند سال اخیر مورد توجه قرار گرفته است. هر چند واکنش‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی با سلول هدف در قالب تماس سلولی ممکن است در بروز فعالیت‌های مهاری سلول‌های بنیادی مزانشیمی مهم باشد، ولی فعالیت مهارکنندگی این سلول‌ها بطور عمده از طریق مولکول‌های محلول ترشحی

که بدن‌بال تماس با سلول‌های هدف القاء یا دچار افزایش بیان می‌گردند، صورت می‌گیرد. آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز القایی، آنزیم اندول‌آمین ۲،۳- دی اکسیژناز، HLA-G محلول، بخشی از این عوامل محلول ترشح شده توسط این سلول‌های بنیادی می‌باشند [۵،۶]. سلول‌های بنیادی مزانشیمی با تولید IL-6 سبب مهارتمایز منوسیت‌ها به سلول‌های دندریتیک و کاهش توانایی تحریک سلول‌های T توسط آنها می‌شوند. این سلول‌ها با تولید پروستاگلاندین E2 از فعال‌شدن سلول‌های B جلوگیری می‌کنند و از طرفی باعث القاء سلول‌های T تنظیمی، مهار تکثیر و تولید IL-2 توسط لنفوسیت‌های T و القاء پاسخ‌های Th2 می‌شوند. ترکیبات دیگری همچون TG-1، هم اکسیژناز ۱ و فاکتور مهاری لوسمی (LIF) نیز بدن‌بال فعال‌شدن سلول‌های بنیادی مزانشیمی تولید می‌شوند. تولید HLA-G5 توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی منجر به مهار تکثیر سلول‌های T، مهار سایتوتوکسیسیته سلول‌های NK و لنفوسیت‌های T سایتوتوکسیک شده و از سوی دیگر سبب افزایش تنظیمی می‌گردند. تماس سلولی بین سلول‌های بنیادی مزانشیمی و سلول‌های T فعال شده منجر به القاء تولید IL-10 و تحریک HLA-G5 محلول از آنها می‌گردد [۵،۷]. با توجه به نقش غیر قابل انکار پاسخ‌های ایمنی در بروز و پیشرفت بیماری آرتریت روماتوئید از یکسو و قابلیت ترشح مولکول‌هایی با خاصیت تعدیل‌کنندگی ایمنی توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی از سوی دیگر، در مطالعه حاضر برای اولین بار نقش این مولکول‌ها در پیشگیری از بروز آرتریت روماتوئید مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام این مطالعه از مدل حیوانی آرتریت القاء شده با کلاژن در موش‌های صحرایی استفاده شد. این مدل حیوانی از نظر مکانیسم بیماری‌زایی و الگوی بروز التهاب و تخریب غضروف و استخوان‌های مفاصل تشابه زیادی به آرتریت روماتوئید انسانی دارد [۸،۹]. بر این اساس می‌توان نتایج حاصل از این مطالعه را به نمونه‌های انسانی تعمیم داد.

روش کار

حیوانات: در این مطالعه تجربی موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار با سن ۸-۶ هفته و وزن ۱۸۰-۱۶۰ گرم از انستیتو

از ۹۰ درصد سطح پلیت کشت را پوشاندند، مایع‌روبی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی جمع‌آوری شد. این مایع در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش‌نگهداری شدند.

القاء آرتريت بواسطه کلاژن در موش‌های صحرایی و تعیین درصد ابتلاء: برای تهیه امولسیون کلاژن-ادجوانت، کلاژن (Sigma, USA) حل‌شده در اسیداستیک با غلظت ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و ادجوانت کامل فروند (Sigma, USA) با غلظت ۲ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر با حجم برابر مخلوط شدند. موش‌های صحرایی در ۳ گروه، گروه کنترل سالم، کنترل CIA و پیشگیری تقسیم‌بندی شدند. بر اساس مطالعه‌های قبلی تعداد موش‌های صحرایی موجود در هر گروه ۷ سر موش صحرایی تعیین گردید. در گروه کنترل CIA ۱۰۰ میکرولیتر امولسیون کلاژن-ادجوانت بصورت داخل پوستی به ناحیه پشت نزدیک پایه دم (به ۳-۴ ناحیه) تزریق شد. پس از گذشت ۷ روز از تزریق اول، دومین تزریق که شامل ۱۰۰ میکرولیتر امولسیون کلاژن-ادجوانت ناقص بود بصورت داخل پوستی به ناحیه پشت موش صحرایی نزدیک پایه دم تزریق شد. در گروه کنترل سالم هیچ تزریقی انجام نشد. پاهای عقبی موش صحرایی شامل؛ پنجه‌ها، مفاصل مچ پا و زانو بصورت کور و ماکروسکوپی (با چشم غیر مسلح) از نظر قرمزی و تورم مورد بررسی قرار گرفتند. اولین علائم بروز قرمزی و تورم در مفاصل پاهای عقبی موش صحرایی به عنوان روز آغاز ابتلا به آرتريت توسط کلاژن ثبت شد. درصد ابتلا به CIA طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$100 \times \frac{\text{تعداد رت‌های مبتلا به CIA در هر گروه}}{\text{تعداد کل رت‌های موجود در هر گروه}} = \text{درصد ابتلا به CIA}$$

پیشگیری از بروز آرتريت در موش‌های صحرایی توسط سوپ کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی: به گروه پیشگیری CIA ۱۰۰ میکرولیتر امولسیون کلاژن-ادجوانت به صورت داخل پوستی به ناحیه پشت موش‌های صحرایی نزدیک دم و ۱۰۰ میکرولیتر سوپ کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی از طریق داخل وریدی تزریق شد. در ایمونیزاسیون بوستر که ۷ روز بعد انجام شد ۱۰۰

پاستور تهران خریداری شدند. موش‌های صحرایی در شرایط مناسب از نظر دما (۲۲-۲۰ درجه سانتی‌گراد)، رطوبت (۷۰-۵۰ درصد) و روشنایی (سیکل ۱۲ ساعته تاریکی-روشنایی) نگهداری شدند.

جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی موش‌های صحرایی: موش‌های صحرایی به روش قطع نخاعی کشته و استخوان تیبا و فمور آنها جدا شد. اپی‌فیز دو سر استخوان جدا شده و با تزریق محیط DMEM (Invitrogen, USA) کل سلول‌های مغزاستخوان خارج شدند. سلول‌ها در محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS; Fetal bovine serum)، ۱۰۰ میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین سوسپانسیون شده و به فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربعی منتقل شدند. برای حذف سلول‌های غیرچسبان، پس از ۲۴ ساعت محیط کشت فلاسک تعویض شد. پس از پاساژ سلولی چهارم، سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای ارزیابی‌های فلوسایتومتري، کشت‌های تمایزی و تهیه مایع رویی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مورد استفاده قرار گرفتند.

تأیید سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تهیه سوپ کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی: برای اثبات مزانشیمی بودن سلول‌های تخلیص‌شده از مغزاستخوان از محیط کشت تمایزی استخوانی (محیط DMEM حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آسکوربیک ۲-فسفات، ۱۰ نانومولار دگزامتازون و ۱۰ میلی‌مولار بتا گلیسرول فسفات) و محیط کشت تمایزی چربی (محیط DMEM حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آسکوربیک ۲-فسفات، ۱۰۰ نانومولار دگزامتازون و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اندومتاسین) استفاده شد. برای بررسی شاخص‌های آنتی‌ژنی سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمی از آنتی‌بادی‌های منوکلونال متصل به فلوروکروم علیه مولکول‌های CD13, CD29, CD31, CD44, CD45 و CD106 (همه آنتی‌بادی‌ها از BD Biosciences خریداری شدند) استفاده شد.

پس از تأیید سلول‌های بنیادی مزانشیمی توسط فلوسایتومتري، این سلول‌ها در پلیت‌های کشت حاوی محیط کامل DMEM کشت داده شده و زمانی که بیش

۱۰ درصد فیکس شده و بدنبال دکلسیفیه کردن استخوان با اسید نیتریک ۱۰ درصد و قالب‌گیری پارافین، نمونه‌های مربوط به مفاصل توسط میکروتوم در چندین سطح برش داده شد. برش‌های بافتی مفاصل با هماتوکسیلین-ئوزین رنگ آمیزی شده و میزان تغییرات در مفاصل مورد ارزیابی قرار گرفت. تشخیص التهاب بافتی حاد یا مزمن بر اساس الگوی ارتشاح سلول‌ها در ناحیه سینوویال و بافت‌های نرم اطراف مفاصل تعیین گردید. بر این اساس التهاب همراه با حضور لنفوسیت‌ها، پلاسماسل‌ها، ماکروفاژها و گرانولوسیت‌ها و همچنین تشکیل آبه، گرانولوم، فیبروز بافتی، ریزش اپی‌تلیال و تخریب استخوان مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها

ارزیابی سلول‌های بنیادی مزانشیمی: در کشت اولیه سلول‌های مغز استخوان، کلنی‌های سلول‌های مزانشیمی به صورت دوکی شکل دیده شدند و هنگامی که ۸۰ درصد فلاسک کشت را پر کردند نمایی موج (مشخصه سلول‌های مزانشیمی) را نشان دادند (شکل ۱). علاوه بر خاصیت چسبندگی و مرفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، جهت اثبات مزانشیمی بودن آنها و قابلیت تمایز به سلول‌های چربی و استخوان، در معرض محیط آدیپوژنیک و استئوژنیک قرار گرفتند. این آزمایش نشان داد سلول‌هایی که به مدت ۲۱ روز در محیط استئوژنیک و یا به مدت ۱۴ روز در محیط آدیپوژنیک قرار گرفته بودند به سلول‌های استخوانی و چربی متمایز می‌گردند. رنگ‌آمیزی Oil-Red و Alizarin-Red تمایز آنها را تأیید نمود (شکل ۲). بررسی ایمونوفنوتایپی سلول‌های بنیادی مزانشیمی نشان داد که این سلول‌ها دارای شاخص‌های سلول‌های بنیادی مزانشیمی یعنی CD13، CD29 و CD44 بوده و از نظر شاخص‌های آنتی‌ژن‌های مختص سلول‌های خونساز یعنی CD31، CD45 و CD106 منفی بودند (نمودار ۱).

تعیین زمان آغاز و درصد ابتلا به آرتریت: بررسی ما نشان داد اولین علائم ابتلا به آرتریت القاء شده توسط کلاژن در گروه کنترل CIA بین روزهای ۱۲-۱۰ پس از ایمونیزاسیون اولیه و بصورت متوسط روز ۱۱ و درصد ابتلا به آرتریت ۱۰۰ درصد بود.

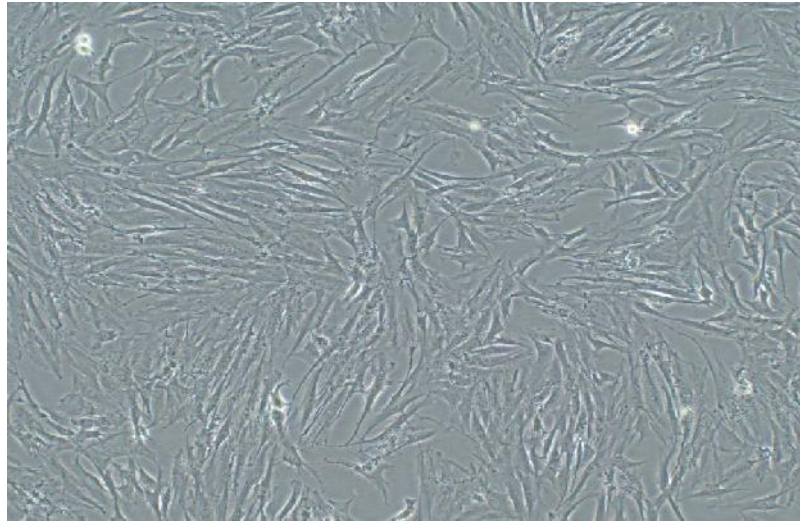
میکرولیتر امولسیون کلاژن-ادجوانت ناقص به صورت داخل پوستی به ناحیه پشت موش نزدیک دم و ۱۰۰ میکرولیتر سوپ کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی از طریق داخل وریدی تزریق شد.

تعیین میزان تورم پاهای موش صحرایی: میزان قطر هر دو پای عقبی موش صحرایی قبل از شروع مطالعه اندازه‌گیری شدند. پس از ایمونیزاسون (روز اول) بصورت هر دو روز یکبار با کولیس دیجیتال میزان تورم پاهای عقبی موش صحرایی اندازه‌گیری و میانگین آن ثبت شد. میزان صحت اندازه‌گیری کولیس ۰/۰۱ میلی متر بود.

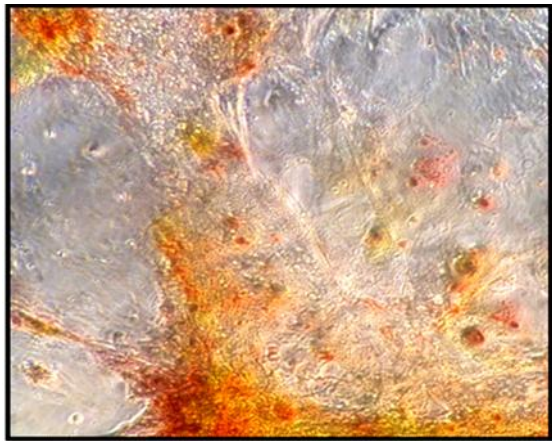
درجه بندی شدت بالینی: موش‌های صحرایی مربوط به گروه کنترل سالم، کنترل CIA و پیشگیری CIA از روز صفر (شروع ایمونیزاسیون) تا پایان دوره مطالعه هر دو روز یکبار از نظر؛ زمان آغاز آرتریت القاء شده توسط کلاژن، روند پیشرفت آرتریت القاء شده توسط کلاژن و حداکثر بروز علائم آرتریت القاء شده توسط کلاژن توسط مطالعه گر کور مورد بررسی قرار گرفتند. متوسط درجه بروز آرتریت القاء شده توسط کلاژن در دو پای عقبی موش صحرایی بر اساس میزان قرمزی و تورم، سطح گرفتاری و مشکلات حرکتی از ۰ تا ۵ درجه‌بندی شد. این درجه‌بندی بر اساس معیارهای ذیل بود: صفر: فاقد علامت خاص، ۱: تورم مختصر در مچ پا یا قرمزی مختصر در پا، ۲: التهاب مشخص همراه با تورم پیشرونده و بروز قرمزی در میانه پا علاوه بر مچ پا، ۳: قرمزی و تورم در کل پاها مشاهده می‌شود ولی نشانه‌ای از تورم در انگشت‌های پا دیده نمی‌شود، ۴: تورم مشخص در کل پای موش صحرایی که حتی انگشت‌ها نیز متورم شدند، ۵: علاوه بر قرمزی و تورم شدید پا، موش صحرایی دچار مشکل حرکتی نیز شده و پای خود را به سختی جابجا کند.

مطالعات رادیوگرافی: ۳۵ روز پس از ایمونیزاسیون اولیه، موش‌های صحرایی با کتامین + زایلوزین بیهوش شده و روی باکس رادیوگرافی قرار داده شدند. آنالیز رادیوگرافی پاهای عقبی موش‌های صحرایی گروه کنترل و پیشگیری توسط ماشین اشعه X انجام شد.

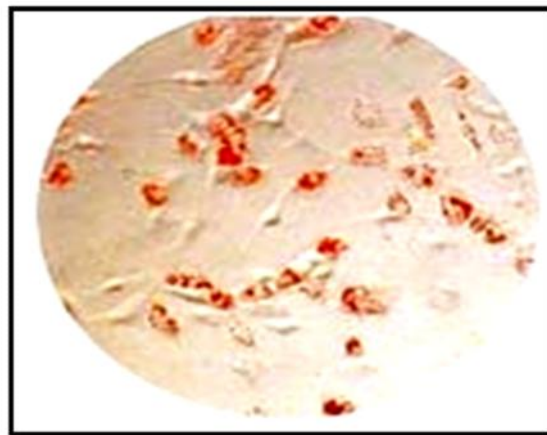
جمع‌آوری نمونه‌های بافت از موش‌های صحرایی و مطالعات بافت‌شناسی: موش‌های صحرایی سپس کشته شده و پاهای عقبی موش‌های صحرایی جدا و در فرمالین



شکل ۱: مرفولوژی سلولهای بنیادی مزانشیمی در پاساژ چهارم کشت. سلولهای دوکی شکل با نمای مشابه سلولهای فیبروبلاستی مشاهده می‌شوند. این سلولها دارای هسته بزرگ و گرد باهستک مشخص می باشند (میکروسکوپ معکوس، بزرگنمایی ۴۰۰ برابر).

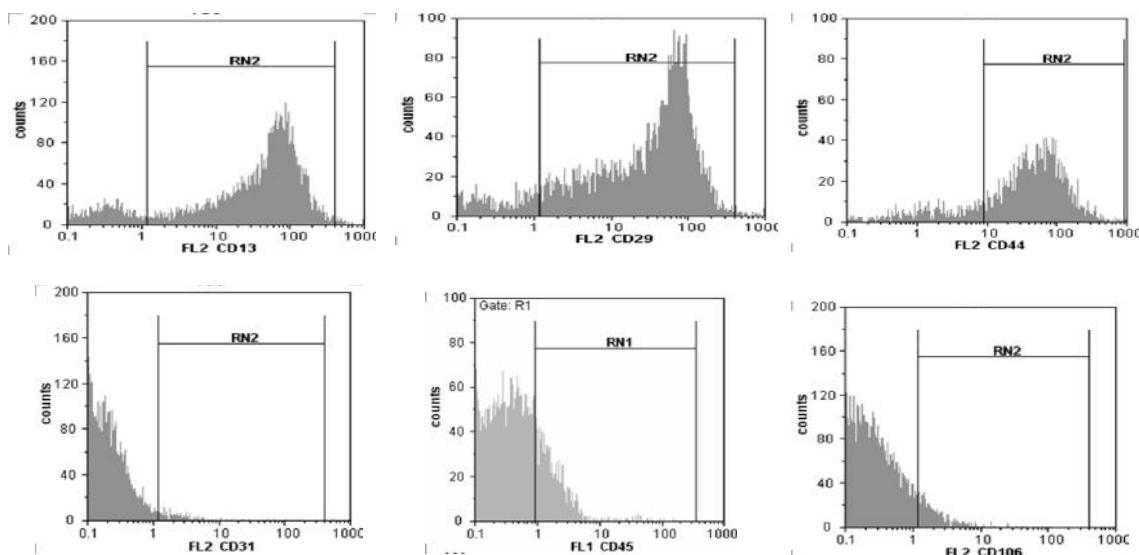


(ب)

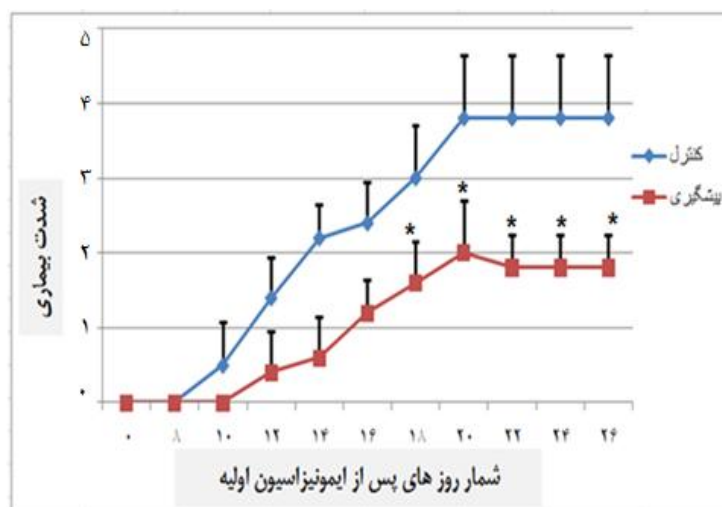


(الف)

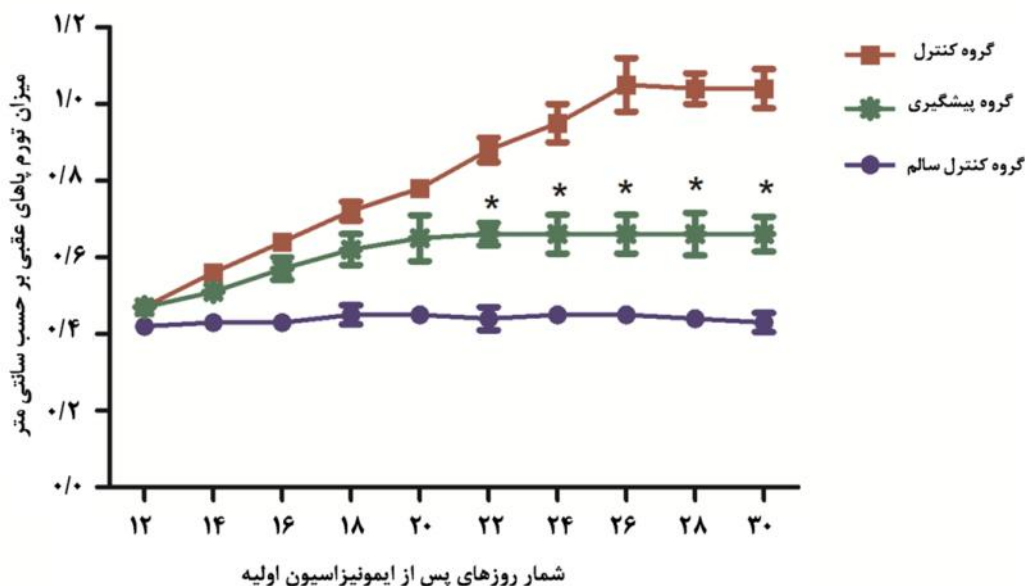
شکل ۲: ارزیابی توانایی تمایز سلولهای بنیادی مزانشیمی به چربی و استخوان. جهت تایید تمایز به چربی؛ سلولهای بنیادی مزانشیمی پس از کشت چهارم به مدت دو هفته در معرض محیط تمایز به چربی قرار گرفته اند و با Oil-Red رنگ آمیزی شده اند (میکروسکوپ معکوس ، بزرگنمایی ۴۰۰ برابر) (الف). جهت تایید تمایز به استخوان؛ سلولهای بنیادی مزانشیمی پس از کشت چهارم به مدت سه هفته در معرض محیط تمایز به استخوان قرار گرفته اند و با Alizarin-Red رنگ آمیزی شده اند (میکروسکوپ معکوس، بزرگنمایی ۴۰۰ برابر).



نمودار ۱: بررسی ایمونوفنوتایپی سلولهای بنیادی مزانشیمی. نتایج آنالیز فلوسایتومتری بر روی سلولهای بنیادی مزانشیمی پاساژ چهارم حاکی از بیان مولکولهای CD13، CD29، CD44 و عدم بیان مولکولهای CD31، CD45، CD106 و CD106 در سطح این سلولها بود.



نمودار ۲: متوسط شدت بیماری در گروه های مختلف موش های صحرائی طی روزهای مختلف پس از ایمونیزاسیون. تفاوت معنادار را در شدت بیماری بین گروه کنترل و گروه پیشگیری از روز ۲۰ پس از ایمونیزاسیون تا پایان دوره مطالعه مشاهده شد ($P=0.043$).



نمودار ۳: میزان تورم پاهای عقبی موش صحرایی در گروه های مختلف. میزان تورم پاهای موش طی روزهای مختلف پس از ایمونیزاسیون اولیه در سه گروه کنترل سالم (بدون هیچ تیمار اضافی)، گروه کنترل (ایمونیزاسیون با امولسیون کلاژن-ادجوانت) و گروه پیشگیری (ایمونیزاسیون با امولسیون کلاژن-ادجوانت و سوپ کشت سلول های بنیادی مزانشیمی) نشان داده شده است. سوپ کشت سلولهای بنیادی مزانشیمی سبب کاهش میزان تورم پاهای عقبی موش صحرایی در گروه پیشگیری در مقایسه با گروه کنترل از روز ۲۲ پس از ایمونیزاسیون اولیه گردید ($P = 0.035$).

ارزیابی میزان تورم پاهای موش صحرایی ویستار: در بررسی سه گروه مورد مطالعه مشخص شد؛ هر چند شروع تورم در پاهای موش صحرایی گروه های کنترل CIA و گروه پیشگیری، ۱۴ روز پس از ایمونیزاسیون بود، ولی شیب افزایش میزان تورم در گروه کنترل CIA شدیدتر از گروه پیشگیری بود. از روز ۲۲ به بعد تفاوت معناداری بین دو گروه کنترل CIA و پیشگیری مشاهده شد ($P = 0.035$)، تفاوتی که تا پایان زمان مطالعه باقی ماند. در گروه پیشگیری در مقایسه با گروه کنترل CIA حداکثر میزان تورم پاهای موش صحرایی کمتر بود و از روز ۲۲ به بعد یک روند ثابتی را نشان داد (نمودار ۳).

تعیین درجه بالینی بیماری: در این مطالعه روند تغییر شدت التهاب و تورم همراه با سطح درگیری در گروه کنترل CIA سریعتر از گروه پیشگیری بود. آنالیزهای آماری حاکی از تفاوت معنادار ($P = 0.043$) شدت علائم بالینی بیماری بین گروه پیشگیری CIA و گروه کنترل CIA از روز ۱۸ تا پایان دوره مطالعه (روز ۳۵) بود. در هر دو گروه پیشگیری و کنترل در روز ۲۰ شدت علائم بالینی بیماری به وضعیت ثابتی رسید اما تفاوت معناداری بین دو گروه وجود داشت (نمودار ۲). حداکثر درجه بیماری مشاهده شده در گروه کنترل ۵ و در گروه پیشگیری ۳ بود.

و بافت‌های نرم اطراف گردیده بودند. در همه موارد بجز یک مورد تخریب استخوان نیز گزارش شد. این در حالی بود که مطالعه‌های هیستوپاتولوژی در موش‌های صحرایی گروه پیشگیری CIA وضعیت کاملاً متفاوتی را نشان داد. هر چند ارتشاح مختلط سلولی در سینوویال و بافت‌های نرم اطراف مفاصل (از جمله فاسیکا) مشاهده شد ولی فراوانی این ارتشاح کمتر بود. گشادی عروق خونی، ریزش سلول‌های اپی‌تلیالی، گرانولوما و فیبروز بافتی نیز تنها در دو سر موش صحرایی از پنج سر مشاهده شد. در هیچ یک از موش‌های صحرایی موجود در گروه پیشگیری نشانه‌ای از تخریب استخوان مشاهده نشد. بررسی ما در گروه کنترل سالم نشان داد، که در این گروه هیچ نوع تورم ماکروسکوپی و ارتشاح سلولی در مفاصل این حیوانات مشاهده نمی‌شود.

بحث

از آنجا که علت آرتريت روماتوئید و همچنین پاتوژن آن کاملاً مشخص نشده است و مکانیسم عمل بسیاری از عوامل درمانی مورد استفاده نیز قطعی نیست، به طبع آن هیچ یک از ملاحظات درمانی علاج بخش نیستند. اغلب درمان‌های مختلف، به سمت سرکوب غیراختصاصی فرآیند التهابی یا ایمنولوژیک معطوف شده‌اند. سابقه خانوادگی و زمینه ژنتیکی از معیارهای پیش‌گویی شانس ابتلا فرد به آرتريت روماتوئید می‌باشد [۳۰۱]. بر اساس وضعیت موجود یافتن رژیم‌های درمانی پیشگیری‌کننده از موضوعات مورد علاقه متخصصین روماتولوژی می‌باشد.

در مطالعه حاضر ما برای اولین بار نقش پیشگیری‌کننده مایع روئی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در جلوگیری از بروز آرتريت را مورد بررسی قرار دادیم. برای نیل به این هدف قدم اول انتخاب مدل حیوانی مناسب بود. با توجه به اینکه مدل‌های حیوانی آرتريت دارای تشابهات مرفولوژیک با بیماری‌های انسانی بوده و ظرفیت مدل حیوانی برای پیش‌بینی کارایی دستورالعمل‌های درمانی در انسان معیار مهمی در انتخاب مدل‌های حیوانی می‌باشد، مدل‌های مختلف القاء آرتريت مورد مطالعه قرار گرفت و از میان آنها مدل CIA انتخاب شد. با توجه به اینکه در مدل آرتريت القاء شده توسط کلاژن از کلاژن تیپ دو به عنوان پروتئین تشکیل‌دهنده اصلی غضروف

نتایج مطالعات رادیوگرافی: مطالعات رادیوگرافی بر روی پاهای عقبی موش صحرایی ۳۵ روز پس از ایمونیزاسیون اولیه، عدم وجود تورم و تغییرات استخوانی در گروه کنترل سالم و وجود تورم و ادم شدید بافت نرم، جذب ماتریکس استخوان و ساییدگی آن، شکل‌گیری استئوفیتی در حواشی مفاصل در گروه کنترل CIA بود. این در حالی بود که مایع‌رویی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی بطور قابل توجه‌ای میزان جذب استخوان و شکل‌گیری استئوفیتی را کاهش داده بود.

ویژگی‌های بافت‌شناسی آرتريت در گروه‌های کنترل و پیشگیری: در روز ۳۵، ارزیابی بافت‌شناسی پاهای عقب موش‌های صحرایی مربوط به گروه کنترل سالم، کنترل CIA و پیشگیری صورت گرفت. مطالعه‌های ماکروسکوپی بر روی پاهای عقبی موش صحرایی که در فرمالین فیکس شده بود حاکی از بروز قرمزی و تورم شدید در پاهای عقبی موش صحرایی در گروه کنترل CIA بود. یکی از موش‌های صحرایی موجود در این گروه نیز دچار ناهنجاری شکلی پا شده بود. در موش‌های صحرایی گروه پیشگیری که همزمان با القاء آرتريت تحت تجویز مایع روئی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی قرار گرفته بودند، مطالعه‌های ماکروسکوپی حاکی از قرمزی و تورم مختصر در پاهای عقبی آنها بود و هیچ موردی از ناهنجاری شکلی پا در آنها مشاهده نشد. مطالعه‌های میکروسکوپی و به طبع آن نتایج هیستوپاتولوژی نیز مشاهده‌های ماکروسکوپی را تأیید نمودند (شکل ۲). مطالعه‌های میکروسکوپی بر روی تغییرات سلولی سینوویال، تغییرات بافت‌های نرم اطراف مفاصل و میزان تخریب استخوان‌ها متمرکز شده بود. در گروه کنترل هایپرلازی سینوویال همراه با ادم وسیع محدود شدن فضای مفصلی را موجب گردیده بود، مشاهده شد. گشادی عروق خونی همراه با تجمع خون در عروق مفاصل، ریزش سلول‌های اپی‌تلیال و ارتشاح مختلط از سلول‌های نوتروفیل، ماکروفاژ، لنفوسیت‌ها و پلاسماسل‌ها در سینوویال و بافت‌های نرم اطراف مفاصل گزارش شد. همچنین یک تجمع گرانولوماتوزی سلول‌های التهابی مزمن مانند ماکروفاژها، پلاسماسل‌ها، لنفوسیت‌ها و سلول‌های چند هسته‌ای بزرگ سبب شکل‌گیری پانوس در نقاط مختلف سینوویال

نظر می‌رسد طراحی و پیشنهاد رژیم‌های پیشگیری یا درمانی متعددی بر پایه اصلاح پاسخ‌های ایمنی مضر سبب بهبود علائم کلینیکی بیماری می‌گردند. مهار IL-1 و TNF- α [۱۸]، مهار لنفوسیت‌های T با استفاده از CTLA-4-آنتی‌بادی [۱۹] مهار آنزیم‌های تجزیه‌کننده ماتریکس بافتی [۲۰] و کاهش پاسخ‌های ایمنی هومورال از طریق تجویز کلاژن از مسیرهای وریدی یا خوراکی [۲۱] بخشی از مطالعه‌های قبلی در زمینه پیشگیری از آرتروز است. آرتروز توسط کلاژن می‌باشد. بخش زیادی از این دست‌ورال‌های پیشگیری‌کننده تنها معطوف به اصلاح یا کنترل بخش محدودی از ناهنجاری ایمنولوژیک می‌باشد. بی‌شک یافتن رژیم‌هایی که بتوانند با کمترین عوارض سبب بهبود بخش زیادی از پاسخ‌های ایمنی مضر (با تاکید بر جنبه‌های مختلف ایمنی تطبیقی و ایمنی ذاتی) در آرتروز روماتوئید گردد، می‌تواند به عنوان هدف نهایی محققین فعال در زمینه روماتولوژی مورد توجه باشد.

در دهه اخیر توجه زیادی به شناخت و استفاده از ویژگی‌های ایمنومدولاتوری سلول‌های بنیادی مزانشیمی در کلینیک شده است. سلول‌های بنیادی مزانشیمی بواسطه تماس سلولی یا ترشح مواد واسطه‌ای جنبه‌های مختلف سیستم ایمنی ذاتی و تطبیقی را تحت تأثیر قرار می‌دهند [۵]. با شناخت بهتر این ویژگی‌های ایمنومدولاتوری بحث استفاده از این سلول‌ها در بیماری‌های خودایمن مختلف همچون؛ مولتیپل اسکلروزیس، دیابت تیپ I و آرتروز روماتوئید مطرح شد [۲۲].

در بیماری‌های خودایمنی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی علاوه بر توانایی تعدیل فعالیت و تکثیر سلول‌های T دارای اثر درمانی نیز هستند. در بیماری آرتروز روماتوئید استفاده از این سلول‌ها باعث کاهش التهاب موضعی در مفاصل و کاهش سایتوکاین‌های پیش التهابی موجود در سرم می‌گردد. اثرات درمانی این سلول‌ها با کاهش سلول‌های Th1/Th17، افزایش ترشح IL-10 و تولید بیشتر سلول‌های T تنظیمی همراه است [۲۳]. با وجود نقش مؤثر این سلول‌ها در درمان آرتروز روماتوئید مکانیسم‌های توجیه‌کننده این دستورالعمل درمانی مشخص نشده است. هرچند در مواردی بحث عوامل

مفاصل متحرک درگیر در آرتروز روماتوئید استفاده می‌شود و همچنین این مدل براحتهای در موش صحرایی به عنوان یک گونه در دسترس و ارزان قابل‌القاء است [۹-۱۰]. در این مطالعه نیز از این مدل استفاده شد.

در بروز آرتروز القاء شده توسط کلاژن هر دو پاسخ‌های ایمنی سیستمیک و موضعی درگیر می‌باشند. بررسی‌های قبلی تولید آنتی‌بادی اختصاصی کلاژن نوع دو و غلیه پاسخ‌های Th1 بر پاسخ‌های Th2 را در سطح سیستمیک گزارش کردند، اما پاسخ‌های ایمنی موضعی در بافت‌های مفاصل نقش مؤثرتری در عوارض حاصل از آرتروز القاء شده توسط کلاژن دارند [۱۱-۱۲]. ارتشاح نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها همراه با تولید سایتوکاین‌های التهابی TNF- α ، IL-1 و IL-6 و آنزیم‌های تجزیه‌کننده ماتریکس بافتی [۱۳]، حضور لنفوسیت‌های TCD4+ و تمایز آنها به لنفوسیت‌های Th1 و Th17 [۱۴]، پاسخ‌های ایمنی هومورال با تولید آنتی‌بادی علیه کلاژن نوع دو و تشکیل و رسوب کمپلکس ایمنی در مفاصل [۱۵]، فعال شدن استئوکلاست‌ها تحت تأثیر سایتوکاین‌های التهابی بخشی از پاسخ‌های التهابی موضعی می‌باشند [۱۶]. در مدل CIA پاسخ‌های ایمنی منجر به تولید سایتوکاین‌های التهابی و بروز پاسخ‌های ایمنی هومورال علیه کلاژن القاء می‌شوند. تظاهرات بیماری که ناشی از وجود پاسخ‌های ایمنی کنترل نشده و ناخواسته می‌باشد بصورت التهاب، تخریب استخوانی، تغییرات عروقی بروز می‌یابند و شامل مراحل بالینی حاد (اولیه) و مزمن (ثانویه) می‌باشند. ضایعات حاد بوسیله ادم بافت‌های نرم، هجوم وسیع نوتروفیلی با تعداد کم از لکوسیت‌های منونوکلئار (لنفوسیت و ماکروفاژ، ترشح فیبرین و هایپرپلازی سینوویال و تخریب استخوانی مشخص می‌شود. پیشرفت بیماری با گذشت زمان بیشتر منجر به ضایعات مزمن که به صورت هایپرپلازی فراوان سینوویال، تخریب ماتریکس در غضروف استخوانی و ارتشاح در عروق بافت‌های نرم با مخلوطی از سلول‌های التهابی شامل لنفوسیت، ماکروفاژ و بیشتر پلاسماسل، نوتروفیل، فیبرین و ادم بافتی نرم در نهایت تخریب استخوان مشخص می‌شود [۸، ۱۷].

با توجه به نقش اساسی و غیر قابل انکار پاسخ‌های ایمنی در بروز عوارض ناشی از آرتروز القاء شده توسط کلاژن، به

در توجیه نقش مایع‌رویی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در جلوگیری از تشدید علائم بالینی باید عنوان کرد؛ مایع‌رویی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاوی عوامل محلول ترشح شده توسط این سلول‌ها می‌باشد. مطالعه‌های قبلی نشان دادند این عوامل شامل؛ PGE-2، IL-10، HLA-G، TGF- β ، آنزیم اندول‌آمین ۲،۳ دی‌اکسیژناز و همواکسیژناز ۱ می‌باشند [۲۶-۲۷]. در این مطالعه همزمان با تجویز ترکیب کلاژن-ادجوانت از طریق داخل جلدی، مایع‌رویی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی از طریق مسیر وریدی به موش‌های صحرایی تجویز شد. به نظر می‌رسد همزمان با حضور ترکیب کلاژن-ادجوانت در اعضای لنفاوی، عوامل محلول ترشح شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی نیز از طریق گردش خون در اعضای لنفاوی حضور پیدا می‌کنند و بصورت مستقیم یا غیر مستقیم مراحل فعال‌شدن، تکثیر و تمایز لنفوسیت‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهند. سلول‌های دندریتیک به عنوان سلول‌های حرفه‌ای عرضه‌کننده آنتی‌ژن نیز که می‌تواند تحت تأثیر مایع‌رویی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی قرار بگیرد. مطالعه‌های قبلی نشان داده ترکیباتی همچون؛ PGE-2، IL-10، TGF- β ، HLA-G محلول، آنزیم اندول‌آمین ۲، ۳ دی‌اکسیژناز و همواکسیژناز ۱ سبب القاء فنوتایپ تحمل‌زا در سلول‌های دندریتیک می‌گردند. این سلول‌های تحمل‌زا در مواجهه با لنفوسیت‌های T اختصاصی آنتی‌ژن سبب تمایز آنها به لنفوسیت‌های T تنظیمی یا جهت‌گیری تمایز آنها به سمت پاسخ‌های Th2 می‌گردند [۲۸-۲۹]. از طرف دیگر مایع‌رویی حاصل از کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در تحریک مهاجرت معکوس سلول‌های التهابی از نواحی ملتهب به جریان خون نقش دارد. بررسی پارکادان^۱ و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان داد که مایع‌رویی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارای میزان بالایی کموکاین است که با تزریق داخل وریدی منجر به مهاجرت معکوس سلول‌های التهابی در موش‌های صحرایی دچار بدخیمی شدید کبدی و در نتیجه بهبود علائم بیماری می‌شوند [۳۰].

ترشحات سلول‌های بنیادی مزانشیمی مطرح شده است. علاوه بر کاهش التهاب موضعی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی دارای اثرات سیستمیک بوده و سبب جهت‌گیری پاسخ‌های ایمنی میزبان به سمت پاسخ‌های Th2 گردند [۲۳-۲۴]. در توجیه نقش قابل توجه عوامل ترشحی در بهبود علائم آرتریت روماتوئید، چوای و همکاران نشان دادند تجویز سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاوی ناقل بیان کننده IL-10 در مقایسه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی معمولی از توانایی بالاتری برای تخفیف شدت علائم کلینیکی در موش‌های مبتلا به آرتریت القاء شده توسط کلاژن بودند [۲۵].

اکثر مطالعه‌ها در زمینه سلول‌های بنیادی مزانشیمی و آرتریت روماتوئید بر روی استفاده از این سلول‌ها در درمان آرتریت متمرکز شده است. اما ما برای اولین بار بحث استفاده از عوامل محلول ترشح شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در پیشگیری از آرتریت القاء شده توسط کلاژن را مورد بررسی قرار دادیم. نتایج این بررسی نشان داد عوامل محلول ترشح شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی نقش اساسی در کنترل بیماری آرتریت روماتوئید بر عهده دارند، بطوریکه بسیاری از اثرات سودمند حاصل از سلول درمانی در استفاده از عوامل محلول ترشح شده نیز مشاهده گردید. همچنین مشخص شد علاوه بر نقش درمانی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی و بخصوص عوامل محلول ترشح شده از آنها می‌توانند دارای نقش پیشگیری‌کننده نیز باشند. در این مطالعه بررسی پاهای عقبی موش صحرایی در گروه کنترل در روز ۳۵ پس از ایمونیزاسیون اولیه با امولسیون کلاژن-ادجوانت حاکی از تورم و ادم شدید بافت نرم، جذب ماتریکس استخوان و ساییدگی، شکل‌گیری استئوفیتی در حواشی مفاصل و تهاجم سلول‌های مختلف ایمنی مثل؛ پلاسماسل‌ها، ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها به سینوویال مفاصل بود. این در حالی بود که در گروه پیشگیری تجویز همزمان مایع‌رویی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی با امولسیون کلاژن-ادجوانت به موش‌های صحرایی بطور قابل توجه‌ای میزان جذب استخوان، شکل‌گیری استئوفیتی و تهاجم سلول‌های ایمنی به سینوویال مفاصل آنها را کاهش داده بود ولی تورم و ادم در این گروه مشاهده شد.

سلول‌های التهابی به سینوویوم مفاصل و بافت‌های اطراف، تخریب غضروف و استخوان و ایجاد فیبروزهای بافتی را کاهش می‌دهد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق بخشی از پایان نامه دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی ایران بوده و بدین وسیله نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خویش را نسبت به معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایران به دلیل تأمین قسمتی از هزینه‌های پژوهش اعلام می‌دارند. همچنین کمال تشکر را از همکاران خویش در گروه ایمنی شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران بواسطه کمک‌ها و راهنمایی‌های ارزشمند ابراز می‌نماییم.

در مجموع ما پیشنهاد می‌کنیم؛ عوامل تعدیل‌کننده ایمنی موجود در مایع‌روبی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌توانند مراحل فعال‌سازی و تمایز لنفوسیت‌های T توسط سلول‌های دندریتیک را تحت تأثیر قرار دهند و از این طریق الگوی پاسخ‌های ایمنی موضعی و سیستمیک و در نهایت شدت علائم کلینیکی بیماری آرتریت القاء شده توسط کلاژن در موش‌های صحرایی را تغییر دهند. البته باید به این نکته نیز اشاره کرد که بسیاری از این ترکیبات دارای نیمه عمر محدودی می‌باشند و بعد از مدت کوتاهی خاصیت بیولوژیکی خود را از دست می‌دهند. اما همراهی آنتی‌ژن کلاژن با ادجوانت فروند منجر به پایداری و آزاد شدن تدریجی آنتی‌ژن در یک مدت نسبتاً طولانی می‌شود. به همین خاطر انتظار می‌رود نقش مایع‌روبی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در پیشگیری از آرتریت روماتوئید در موش‌های صحرایی یک نقش محدودکننده باشد.

بی‌شک بررسی مواردی در مطالعه‌های آینده می‌تواند در شناخت بهتر مکانیسم‌های عملکردی عوامل مترشحه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در پیشگیری از آرتریت القاء شده توسط کلاژن مثمرتر باشد. بررسی همزمان و مقایسه‌ای فاکتورهای مترشحه از سلول‌های بنیادی مزانشیمی با سلول‌های بنیادی مزانشیمی در پیشگیری از آرتریت القاء شده توسط کلاژن، بررسی میزان القاء لنفوسیت‌های T تنظیمی در جمعیت لنفوسیت‌های تحریک‌شده با کلاژن، بررسی میزان القاء لنفوسیت‌های Th17 در جمعیت لنفوسیت‌های تحریک‌شده با کلاژن و بررسی سرمی سایتوکاین IL-1 و سایتوکاین IL-17 و IL-10 در مایع‌روبی کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی بخشی از این مطالعه‌ها می‌باشد که می‌تواند در آینده مورد توجه قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

بطور کلی ما در مطالعه حاضر نشان دادیم تجویز عوامل ترشح‌شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی همزمان با بروز آرتریت القاء شده توسط کلاژن هر چند قادر به ممانعت کامل از بروز آرتریت القاء شده توسط کلاژن نمی‌باشد، ولی شروع بیماری را با تأخیر مواجه می‌سازد و عوارض موضعی بیماری همچون؛ قرمزی و تورم پاها، ارتشاح

References

1. Firestein GS, Panayi GS, Wollheim FA, Rheumatoid arthritis: Oxford University Press Oxford; New York; 2006.
2. Firestein GS, Rheumatoid arthritis in a mouse? *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2009 Jan;5(1):1.
3. Meier FM, Frerix M, Hermann W, Muller-Ladner U, Current immunotherapy in rheumatoid arthritis, *Immunotherapy*, 2013 Sep;5(9):955-74.
4. Garcia-Gomez I, Elvira G, Zapata AG, Lamana ML, Ramirez M, Castro JG, "et al", Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications, *Expert Opin Biol Ther*, 2010 Oct;10(10):1453-68.
5. Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, Jorgensen C, Noel D, Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications, *Stem Cell Res Ther*, 2010;1(1):2.
6. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, "et al", Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide, *Cell Stem Cell*, 2008 Feb 7;2(2):141-50.
7. Bassi ÉJ, de Almeida DC, Moraes-Vieira PMM, Câmara NOS, Exploring the role of soluble factors associated with immune regulatory properties of mesenchymal stem cells, *Stem Cell Reviews and Reports*, 2012;8(2):329-42.
8. Trentham DE, Townes AS, Kang AH, Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis, *The Journal of experimental medicine*, 1977;146(3):857-68.
9. Trentham DE, Dynesius RA, David JR, Passive transfer by cells of type II collagen-induced arthritis in rats, *Journal of Clinical Investigation*, 1978;62(2):359.
10. Bendele AM, Animal models of rheumatoid arthritis, *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2001;1(4):377-85.
11. Schulze-Koops H, Kalden JR, The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis, *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2001 Dec;15(5):677-91.
12. Gerli R, Lunardi C, Pitzalis C, Unmasking the anti-inflammatory cytokine response in rheumatoid synovitis, *Rheumatology*, 2002;41(12):1341-5.
13. Williams RO, Collagen-induced arthritis as a model for rheumatoid arthritis, *Tumor Necrosis Factor: Springer*; 2004, p. 207-16.
14. Notley CA, Inglis JJ, Alzabin S, McCann FE, McNamee KE, Williams RO, Blockade of tumor necrosis factor in collagen-induced arthritis reveals a novel immunoregulatory pathway for Th1 and Th17 cells, *The Journal of experimental medicine*, 2008;205(11):2491-7.
15. Burkhardt H, Sehnert B, Bockermann R, Engström Å, Kalden JR, Holmdahl R, Humoral immune response to citrullinated collagen type II determinants in early rheumatoid arthritis, *European journal of immunology*, 2005;35(5):1643-52.
16. Hirayama T, Danks L, Sabokbar A, Athanasou N, Osteoclast formation and activity in the pathogenesis of osteoporosis in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 2002;41(11):1232-9.
17. Griffiths MM, Cannon GW, Corsi T, Reese V, Kunzler K, Collagen-induced arthritis in rats, *Methods Mol Med*. 2007;136:201-14.
18. Williams RO, Marinova-Mutafchieva L, Feldmann M, Maini RN, Evaluation of TNF-alpha and IL-1 blockade in collagen-induced arthritis and comparison with combined anti-TNF-alpha/anti-CD4 therapy, *J Immunol*, 2000 Dec 15;165(12):7240-5.
19. Knoerzer DB, Karr RW, Schwartz BD, Mengle-Gaw LJ, Collagen-induced arthritis in the BB rat, Prevention of disease by treatment with CTLA-4-Ig, *Journal of Clinical Investigation*, 1995;96(2):987.
20. Ishikawa T, Nishigaki F, Miyata S, Hirayama Y, Minoura K, Imanishi J, "et al", Prevention of progressive joint destruction in collagen-induced arthritis in rats by a novel matrix metalloproteinase inhibitor, FR255031, *British journal of pharmacology*, 2005;144(1):133-43.
21. Thompson H, Harper N, Bevan D, Staines N, Suppression of collagen induced arthritis by oral administration of type II collagen: changes in immune and arthritic responses mediated by active peripheral suppression, *Autoimmunity*, 1993;16(3):189-99.

22. Figuroa FE, Carrión F, Villanueva S, Khoury M, Mesenchymal Stem Cell treatment for autoimmune diseases: a critical review, *Biol Res*. 2012;45:269-77.
23. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Cancedda R, Pennesi G, Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis, *Arthritis Rheum*, 2007 Apr;56(4):1175-86.
24. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, "et al", Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells, *Blood*, 2005 May 15;105(10):4120-6.
25. Choi JJ, Yoo SA, Park SJ, Kang YJ, Kim WU, Oh IH, "et al", Mesenchymal stem cells overexpressing interleukin-10 attenuate collagen-induced arthritis in mice, *Clin Exp Immunol*, 2008 Aug;153(2):269-76.
26. Ben-Ami E, Berrih-Aknin S, Miller A, Mesenchymal stem cells as an immunomodulatory therapeutic strategy for autoimmune diseases, *Autoimmunity reviews*, 2011;10(7):410-5.
27. Shi M, Liu ZW, Wang FS, Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells, *Clinical & Experimental Immunology*, 2011;164(1):1-8.
28. Saei A, Hadjati J, Tolerogenic Dendritic Cells: Key Regulators of Peripheral Tolerance in Health and Disease, *International archives of allergy and immunology*, 2013;161(4):293-303.
29. Maldonado RA, von Andrian UH, How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells, *Adv Immunol*, 2010;108:111-65.
30. Parekkadan, B., "et al", (2007), "Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure," *PLoS One*2(9): e941.

Role of mesenchymal stem cells-secreted factors in prevention of collagen-induced arthritis in rats

Nezafat Firizi M¹, Faramarzi M², Mousavi T^{3*}, Entezami K⁴, Sharifi AM⁵

¹MSc, Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Iran Medical University, Tehran, Iran.

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

³Professor of Immunology, Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Iran Medical University, Tehran, Iran.

⁴Assistant professor of Immunology, Department of Immunology, Faculty of Medical Sciences, Iran Medical University, Tehran, Iran.

⁵Professor of Pharmacology, Department of Pharmacology, Faculty of Medical Sciences, Iran Medical University, Tehran, Iran.

* **Corresponding Author:** Iran Medical University, Tehran, Iran.
Email:Taherehtavakol@gmail.com

Abstract

Background & Objective: Rheumatoid arthritis (RA) is characterized by synovium inflammation and articular destruction. mesenchymal stem cells (MSCs) could be effective in the treatment and prevention of several autoimmune diseases. The present study aimed to investigate the effect of molecules secreted by mesenchymal stem cells (MSCs) for the prevention of collagen-induced arthritis (CIA) in rats.

Method & Materials: Supernatant of MSCs obtained from rat bone marrow derived MSCs culture. In prevention group, rats treated with collagen-adjuvant emulsion and MSC supernatant on days 0 and 7. In control group, we used from clutter medium instead of MSC supernatant for rats treatment and other cases were similar with prevention group. We also used from rats without any treatment as health control group. From day 7 through day 35 after immunization, we investigated onset of CIA, paw swelling and clinical score in rats. We also determined histopathological features of joints and bones.

Results: We have found that supernatant of MSCs significantly delayed the onset of CIA and decreased paw swelling, bone destruction, inflammation of synovial and clinical score in prevention group compared with rats treated with culture medium in control group.

Conclusion: Taken together, we conclude that molecules secreted by MSCs cells aren't able to prevent CIA in rats, but they can delay time of CIA induction and also decrease severity of arthritis and local and systemic tissue lesions.

Keywords: Rheumatoid arthritis, Collagen-induced arthritis, Mesenchymal stem cell