

## تأثیر تعدیل‌کنندگی ایمنی سلول‌های بنیادی مزانشیمی اتولوگ مغز استخوان بر بیان TNF- $\alpha$ در آرتریت روماتوئید مقاوم به درمان

### چکیده

دریافت: ۱۴۰۳/۱۲/۰۵ ویرایش: ۱۴۰۳/۱۲/۰۹ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۱/۲۳ آنلاین: ۱۴۰۴/۰۲/۰۱

**زمینه و هدف:** آرتریت روماتوئید (Rheumatoid arthritis, RA) بیماری خودایمنی مزمن و التهابی است که موجب تخریب مفاصل شده و با ناتوانایی‌های حرکتی پیشرونده و عوارض سیستمیک همراه است. این مطالعه با هدف بررسی اثر سلول‌های بنیادی مزانشیمال اتولوگ استخراج شده از مغز استخوان (Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells, ABMSCs) بر بیان ژن فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا (Tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ ) و اینترلوکین ۱۷ (Interleukin 17, IL-17)، در بیماران RA مقاوم به درمان طراحی و اجرا گردید.

**روش بررسی:** این مطالعه در بازه زمانی آبان تا اسفند سال ۱۴۰۲ بر مبنای استفاده از RNA بایگانی شده از کارآزمایی بالینی قبلی تیم تحقیق در گروه ایمنی شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شد که در آن، ۱۳ بیمار مبتلا به RA مقاوم به درمان، یک دوز داخل وریدی شامل ۱ میلیون ABMSCs به ازای هر کیلوگرم وزن بدن دریافت کرده بودند. نمونه‌های RNA بیماران مذکور در فاصله‌های زمانی پیش از تزریق و یک، شش و ۱۲ ماه پس از تزریق مورد ارزیابی قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** بیان ژن TNF- $\alpha$ ، ۱ ماه پس از تزریق ABMSCs کاهش معناداری نشان داد ( $P=0/045$ ) اما بیان ژن IL-17A در طول دوره مطالعه تغییر معناداری پیدا نکرد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه می‌تواند نشان‌دهنده ویژگی‌های تعدیل‌کنندگی ABMSCs از طریق تأثیر بر TNF- $\alpha$  در بیماران RA مقاوم به درمان باشد، در حالی که این نتایج از فرضیه تأثیر این سلول‌ها بر IL-17A در بیماران RA مقاوم به درمان حمایت نمی‌کند.

**کلمات کلیدی:** اینترلوکین ۱۷، آرتریت روماتوئید، فاکتور نکروزدهنده تومور آلفا.

محسن قریانی<sup>۱</sup>، محسن احمدی<sup>۲</sup>، مهدی اتابکی<sup>۳</sup>، جلیل توکل افشاری<sup>۴</sup>، مژگان محمدی<sup>۵\*</sup>

- ۱- گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه، تربت حیدریه، ایران.
- ۲- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
- ۳- مرکز تحقیقات ایمونولوژی بالینی، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.
- ۴- مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
- ۵- مرکز تحقیقات فرماکولوژیک گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.

\* نویسنده مسئول: مشهد، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مرکز تحقیقات فرماکولوژیک گیاهان دارویی.

تلفن: ۰۵۱-۳۸۰۰۲۳۷۴

E-mail: MohammadiMZH@mums.ac.ir

### مقدمه

می‌شوند.<sup>۲</sup> علت اصلی RA بطور کامل شناخته نشده است اما شواهد نشانگر نقش مهم و پیچیده فاکتورهای محیطی و ژنتیکی در بروز این بیماری می‌باشند.<sup>۳</sup> تخریب مفاصل در RA متعاقب عفونت یا فرآیندهای خودایمنی، با تکثیر ماکروفاژهای سینوویال و فیبروبلاست‌ها همراه است. لنفوسیت‌ها در نواحی اطراف رگ‌ها ارتشاح می‌یابند و سلول‌های اندوتلیال در این ناحیه تکثیر می‌شوند. در ادامه، رگ‌زایی در محل اتفاق می‌افتد و رگ‌های خونی در مفاصل

آرتریت روماتوئید (Rheumatoid arthritis, RA) بیماری خودایمنی مزمن و التهابی است که موجب تخریب مفاصل شده و با ناتوانایی‌های حرکتی پیشرونده و عوارض سیستمیک همراه است.<sup>۱</sup> این بیماری، شایعترین آرتریت التهابی است که در ۱٪-۰/۵٪ بالغین گزارش شده و زنان در مقایسه با مردان، بیشتر به این بیماری مبتلا

استخوان (Autologous bone marrow-derived MSCs, ABMSCs) بر بیان ژن‌های TNF- $\alpha$  و IL-17 در بیماران RA مقاوم به درمان طراحی و اجرا گردید.

## روش بررسی

این مطالعه بر مبنای استفاده از نمونه‌های بیولوژیک شامل RNA بایگانی شده از کارآزمایی بالینی قبلی و پایان یافته تیم تحقیق طراحی و اجرا شد.<sup>۱۶</sup> در این کارآزمایی بالینی، گروهی متشکل از ۱۳ بیمار مبتلا به RA که حداکثر دوز مجاز DMARDs را دریافت می‌کردند، مطابق با معیارهای ورود از پیش تعیین شده، انتخاب و به مطالعه وارد شدند. همه بیماران یک دوز داخل وریدی شامل ۱ میلیون ABMSCs به ازای هر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند و در فاصله‌های زمانی یک، شش و ۱۲ ماه پس از تزریق، از نظر شاخص‌های بالینی و کلینیکی مورد ارزیابی قرار گرفتند. مطالعه حاضر، مصوب کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مشهد با کد IR.MUMS.REC.1402.076 می‌باشد.

استخراج RNA و ساخت cDNA: نمونه RNA استخراج شده از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (Peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) بیماران پیش از تزریق ABMSCs و یک، شش و ۱۲ ماه پس از تزریق، به‌عنوان الگو برای ساخت cDNA با استفاده از کیت مربوطه (Favorgen, Taiwan) بکار گرفته شد.

بررسی بیان ژن به روش SYBR® Green Real-time PCR: برای ژن‌های TNF- $\alpha$  و IL-17A به‌عنوان ژن‌های هدف، و برای ژن گلیسرآلدئید ۳ فسفات دهیدروژناز (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) به‌عنوان ژن مرجع با استفاده از نرم‌افزار Beacon Designer 7.9 (Premier Biosoft International, USA) طراحی (جدول ۱) و اختصاصیت آنها با ابزار Primer-BLAST در وبسایت NCBI مورد بررسی و تایید قرار گرفت. Real-time PCR با استفاده از Ampliqon, Germany) در دستگاه LightCycler® 96 instrument (Roche, Germany) انجام شد. چرخه‌های واکنش Real-time PCR دمای ۹۵ °C به مدت ۱۵ دقیقه آغاز شد و به دنبال آن ۴۰ چرخه شامل ۹۵ °C به مدت ۱۰ ثانیه (واسرشت شدن)، ۶۰ °C به مدت ۳۰ ثانیه

درگیر، به‌واسطه لخته‌های کوچک یا سلول‌های التهابی مسدود می‌شوند. با گذشت زمان، بافت سینوویال ملتهب به‌طور نامنظم رشد کرده و غضروف و استخوان را تخریب می‌کند.<sup>۱۷</sup> سایتوکین‌های مختلف، پروتئینازها و فاکتورهای رشدی که طی این فرایندها ترشح می‌شوند، تخریب مفصل و عوارض سیستمیک را گسترش می‌دهند.<sup>۱۸</sup> سایتوکین‌های التهابی مثل فاکتور نکروزدهنده تومور آلفا (Tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ ) و اینترلوکین ۱۷ (Interleukin 17, IL-17)، نقشی اساسی در بروز التهاب و تخریب مفصل در RA دارند. TNF- $\alpha$  ترشح شده توسط ماکروفاژهای سینوویال موجب تقویت فرآیندهای التهابی، تحریک سلول‌های سینوویال شبه فیروبلاست (Fibroblast-like synoviocyte, FLS) و تحریک فعالیت استئوکلاست‌ها می‌شود. لئوسیت‌های TCD4+ با تولید IL-17 نقش مهمی در تحریک ماکروفاژهای سینوویال و FLSها، التهاب، فرسایش استخوان و تخریب غضروف ایفا می‌کنند.<sup>۱۹</sup> اگرچه تاکنون درمان قطعی برای RA معرفی نشده است اما داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی (Non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs)، گلوکوکورتیکوئیدها و داروهای ضدروماتیسمی تعدیل‌گر (Disease-modifying anti-rheumatic drugs, DMARDs) رایجترین داروهایی تجویز شده به بیماران RA می‌باشند. در مطالعات مختلف به عوارض جانبی و همچنین مقاومت بیماران به داروهای مذکور اشاره شده است.<sup>۹،۱۰</sup> در دهه‌های اخیر، سلول‌های بنیادی مزانشیمال (Mesenchymal stem cells, MSCs) به دلیل ویژگی‌های خودنوسازی، تنظیم‌کنندگی پاسخ‌های ایمنی و ترمیم بافت به‌عنوان گزینه درمانی برای بیماری‌های التهابی و خودایمنی مطرح شده‌اند.<sup>۱۱،۱۲</sup> مطالعات مختلف نشان داده‌اند تعداد MSCs در مفصل بیماران RA کاهش می‌یابد.<sup>۱۳</sup> ویژگی ترمیم‌گری و تعدیل‌گری پاسخ‌های ایمنی MSCs موجود در مایع مفصل تحت تاثیر فضای التهابی موجود، تضعیف شده و زمینه تشکیل پانوس در مفصل بیماران را مهیا می‌کند.<sup>۱۳،۱۴</sup> ویژگی‌های MSCs از قبیل تعدیل‌گری پاسخ‌های ایمنی و قابلیت تمایز به سلول‌های غضروفی و استخوانی موجب جلب توجه محققین به این سلول‌ها به‌منظور درمان RA شده است.<sup>۱۵،۱۶</sup> با توجه به نقش و اهمیت سایتوکین‌های التهابی از قبیل TNF- $\alpha$  و IL17 در ایمنونو پاتورژن RA، این پژوهش با هدف بررسی تاثیر تزریق داخل وریدی MSCs اتولوگ استخراج شده از مغز

مطالعه: در این مطالعه، نمونه RNA مربوط به ۱۳ بیمار مونث مبتلا به RA مقاوم به درمان با میانگین سنی ۴۴ سال و انحراف معیار ۷/۵۰ سال و طول دوره بیماری ۱۲/۱۶ سال با انحراف معیار ۴/۰۸ سال، از نظر میزان بیان ژن‌های هدف مورد ارزیابی قرار گرفت.

اثر تزریق ABMSCs بر بیان ژن TNF- $\alpha$  و IL-17A: بیان ژن TNF- $\alpha$ ، یک ماه پس از تزریق ABMSCs کاهش معناداری نشان داد (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین،  $1/0 \pm 0/00$  قبل از تزریق،  $0/38 \pm 0/11$  در ماه ۱ با  $P=0/045$  در مقایسه با قبل از تزریق،  $1/21 \pm 0/38$  در ماه شش و  $0/61 \pm 0/18$  در ماه ۱۲) (نمودار ۱-الف).

بیان ژن IL17A در طول دوره مطالعه تغییرات غیرمعناداری یافت (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین،  $1/0 \pm 0/00$  قبل از تزریق،  $0/87 \pm 0/31$  در ماه ۱،  $1/19 \pm 0/42$  در ماه شش و  $1/79 \pm 0/92$  در ماه ۱۲) (نمودار ۱-ب).

(اتصال پرایمرها به توالی هدف) و  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۰ ثانیه (تکثیر توالی هدف) در نظر گرفته شد. میزان بیان ژن‌های هدف با استفاده از روش  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  و بر حسب میزان بیان نسبی (Relative expression) در مقایسه با قبل تزریق محاسبه گردید. پس از جمع‌آوری و پردازش اولیه داده‌ها، داده‌ها به نرم‌افزار IBM SPSS Statistics 21 (IBM Corp, USA) وارد و آنالیز شدند. به منظور مقایسه داده‌ها در چهار نقطه زمانی پیش از تزریق، یک، شش و ۱۲ ماه پس از تزریق ABMSCs، از آزمون آماری Generalized estimating equation (GEE) استفاده و آستانه معناداری،  $P < 0/05$  در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

توزیع فراوانی سن، جنس و طول دوره بیماری در بیماران این

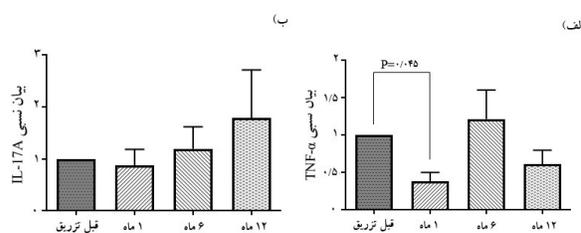
جدول ۱: توالی پرایمرهای طراحی شده برای Real-time PCR

شماره ژن	توالی (5'→3')	نام پرایمر
NM_000594.4	F: TAGCCCATGTTGTAGCAAACC R: GAGGTACAGGCCCTCTGATG	TNF- $\alpha$
NM_002190.3	F: CGGACTGTGATGGTCAACCTGA R: GCACCTTGCCCTCCCAGATCACA	IL-17A
NM_001289746.1	F: CACTAGGCGCTCACTGTTCTC R: CCAATACGACCAAATCCGTTGAC	GAPDH

F: پرایمر مستقیم، R: پرایمر معکوس

## بحث

اثر تزریق داخل وریدی ABMSCs بر بیان ژن‌های مورد مطالعه: باتوجه به محدود بودن اطلاعات در خصوص تاثیر تزریق داخل وریدی ABMSCs بر میزان بیان ژن‌های TNF- $\alpha$  و IL-17A در بیماران RA مقاوم به درمان، در ادامه با هدف مقایسه نتیجه مطالعه حاضر با سایر مطالعات، به بررسی تاثیر MSCs بر بیان ژن این سایتوکین‌ها و سایر سایتوکین‌های التهابی در مطالعات انسانی و همچنین مدل‌های موشی بیماری RA پرداخته خواهد شد.



نمودار ۱: تغییرات میزان بیان ژن TNF- $\alpha$  (الف) و IL-17A (ب) بر حسب میانگین  $\pm$  خطای استاندارد میانگین در طول دوره مطالعه

اثر تزریق داخل وریدی ABMSCs بر بیان ژن IL-17A: لنفوسیت‌های T کمکی ۱۷ (Th-17, T helper-17)، سلول‌هایی با ویژگی‌های التهابی هستند که به میزان زیادی IL-17 ترشح می‌کنند.<sup>۲۴</sup> تعداد لنفوسیت‌های Th-17 در خون محیطی بیماران RA افزایش می‌یابد. همچنین میزان بالای IL-17 در سرم و مایع مفصلی این بیماران گزارش شده است.<sup>۲۵-۲۷</sup> در مبتلایان به RA، سلول‌های فیبروبلاست، کندروسیت‌ها و ماکروفاژها در اثر تحریک با IL-17، آنزیم‌های تجزیه‌کننده بافت را ترشح می‌کنند که این آنزیم‌ها، موجب تخریب پیشرونده غضروف می‌گردند. IL-17 می‌تواند تولید سایتوکین‌های پیش‌التهابی مثل TNF- $\alpha$  و آنزیم‌هایی مانند ماتریکس متالوپروتئینازها را تحریک نموده و فرایندهای التهابی را در مفصل تشدید کند.<sup>۲۷</sup> در مطالعه حاضر، به دنبال تزریق ABMSCs به بیماران RA مقاوم به درمان، بیان ژن IL17A در طول دوره مطالعه تغییرات معناداری نشان نداد. Wang و همکاران تاثیر MSCs آلوژن استخراج شده از بندناف را در ۳۰ بیمار مبتلا به لوپوس اریتماتوز سیستمیک فعال و مقاوم به درمان، به صورت تزریق داخل وریدی مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه، سطح سرمی IL-17A پس از تزریق MSCs، تغییر قابل‌توجهی نشان نداد.<sup>۲۸</sup> در مطالعه Vasilev و همکاران، کشت PBMCs مبتلایان به RA با MSCs آلوژن استخراج شده از بافت چربی موجب کاهش تولید IL-17 از PBMCs گردید.<sup>۲۰</sup> Liu و همکاران تاثیر تزریق داخل وریدی MSCs استخراج شده از بند ناف انسان را به موش‌های مدل CIA مورد بررسی قرار دادند. این تزریق، کاهش درصد لنفوسیت‌های Th-17 در طحال موش‌ها را به دنبال داشت.<sup>۲۹</sup> در پژوهش دیگری، Lee و همکاران نشان دادند که تجویز داخل پریوتون MSCs انسانی استخراج شده از مغز استخوان به موش‌های مدل آرتریت، می‌تواند موجب کاهش شدت بیماری و کاهش بیان ژن سایتوکین IL-17 شود.<sup>۳۰</sup>

کاهش میزان بیان ژن TNF- $\alpha$  به‌ویژه در ماه یک پس از تزریق ABMSCs، می‌تواند نشانگر اثرات ضدالتهابی این سلول‌ها از طریق کاهش بیان ژن این سایتوکین پیش‌التهابی باشد. کاهش میزان بیان ژن IL-17A در ماه یک، هر چند غیرمعنادار می‌تواند با آثار ضدالتهابی ABMSCs در ارتباط باشد. با توجه به اینکه به بیماران مطالعه حاضر، MSCs در یک دوز ( $1 \times 10^6$ ) سلول به ازای هر کیلوگرم وزن) تزریق شده است، ممکن است با بهینه‌سازی تجویز شامل افزایش تعداد

اثر تزریق داخل وریدی ABMSCs بر بیان ژن TNF- $\alpha$ : در مطالعات مختلف به نقش TNF- $\alpha$  در پاتوژنز RA اشاره شده است. این سایتوکین با القای تولید سایر سایتوکین‌های التهابی مانند اینترلوکین ۱ (Interleukin 1, IL-1) و اینترلوکین ۶ (Interleukin 6, IL-6)، با گسترش التهاب بافتی، لکوسیت‌ها را به محل التهاب جذب کرده و ایجاد محیطی التهابی در سینوویوم را تقویت می‌کند.<sup>۱۷،۶۱</sup> در مطالعه حاضر، یک ماه پس از تزریق ABMSCs به بیماران RA مقاوم به درمان، بیان ژن TNF- $\alpha$  کاهش معناداری نشان داد. Wang و همکاران نشان دادند متعاقب تزریق داخل وریدی MSCs آلوژن استخراج شده از بندناف به بیماران RA مقاوم به درمان، غلظت سایتوکین TNF- $\alpha$  در مایع رویی کشت PBMCs بیماران در مقایسه با قبل از تزریق، کاهش قابل‌توجهی یافت.<sup>۱۸</sup> در پژوهشی، Shalini و همکاران کشت همزمان MSCs آلوژن استخراج شده از بافت چربی با لنفوسیت‌های B و T بیماران RA را انجام دادند که موجب کاهش تولید TNF- $\alpha$  از لنفوسیت‌های بیماران گردید.<sup>۱۹</sup> در مطالعه‌ای که توسط Vasilev و همکاران انجام شد، کشت PBMCs مبتلایان به RA با MSCs آلوژن استخراج شده از بافت چربی موجب کاهش تولید TNF- $\alpha$  از PBMCs گردید.<sup>۲۰</sup> در مطالعه Shin و همکاران، تجویز داخل پریوتون MSCs انسانی استخراج شده از بند ناف به موش‌های مدل آرتریت القایی با کلاژن (Collagen-induced arthritis, CIA) موجب کاهش سطح پروتئین TNF- $\alpha$  در موش‌ها شد.<sup>۲۱</sup> Zhang و همکاران به بررسی اثر تزریق داخل وریدی MSCs استخراج شده از بافت چربی انسان در موش‌های مدل CIA پرداختند. نتایج نشان داد که این تزریق موجب کاهش سطح سرمی TNF- $\alpha$ ، IL-1 $\beta$  و IL-6 شده است. همچنین نشان دادند که کشت MSCs استخراج شده از بافت چربی انسان با سلول‌های ماکروفاژی تحریک شده با لیپوپلی‌ساکارید، موجب کاهش بیان ژن TNF- $\alpha$ ، IL-1 $\beta$  و IL-6 در ماکروفاژها می‌شود.<sup>۲۲</sup> در پژوهشی که توسط Lee و همکاران انجام شد، تجویز داخل پریوتون MSCs انسانی استخراج شده از مغز استخوان به موش‌های مدل آرتریت، موجب کاهش شدت بیماری و کاهش بیان ژن سایتوکین‌های TNF- $\alpha$ ، IL-1 $\beta$  و IL-6 گردید.<sup>۲۳</sup> نتایج مطالعات حاضر و مطالعات پیشگفت می‌تواند نشانگر تاثیر ضد التهابی MSCs از طریق تاثیر بر سایتوکین پیش‌التهابی TNF- $\alpha$  در بیماران RA و همچنین مدل موشی بیماری آرتریت باشد.

به عنوان نتیجه‌گیری، نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد تزریق یک دوز ABMSCs به تعداد  $1 \times 10^6$  سلول به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به بیماران مبتلا به RA مقاوم به درمان، موجب کاهش بیان  $TNF-\alpha$  به‌ویژه یک ماه بعد از تزریق می‌شود. این سایتوکین، به‌عنوان یکی از سایتوکین‌های پیش‌التهابی موثر در ایمونوپاتوزن بیماری RA مطرح است. نتایج به‌دست آمده در خصوص IL-17A در این مطالعه، فرضیه آثار ضدالتهابی تزریق ABMSCs از طریق تاثیر بر بیان  $TNF-\alpha$  در RA را در بیماران RA مقاوم به درمان تایید نمی‌کند. باتوجه به اینکه تاکنون درمان قطعی برای RA معرفی نشده و داروهای معمول که به بیماران تجویز می‌شوند ممکن است با عوارض جانبی و همچنین مقاومت دارویی همراه شوند، تحقیقات بیشتر در زمینه سلول‌درمانی با MSCs و مطالعه آثار این روش‌های درمانی بر فاکتورهای سیستم ایمنی می‌تواند با فراهم‌سازی درکی بهتر از مکانیسم‌های اثر این سلول‌ها، افق‌های جدیدی را در کنترل بیماری و درمان مبتلایان به RA مقاوم به درمان ارائه نماید که موجب بهبود کیفیت زندگی بیماران گردد.

سپاسگزاری: این مقاله نتایج حاصل از پایان‌نامه مقطع دکترای عمومی رشته پزشکی و مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد با کد ۴۰۱۲۱۱۱ می‌باشد.

دفعات و دوز بتوان به اثرات ضدالتهابی چشمگیر و قابل توجه‌تری از ABMSCs در بیماران RA مقاوم به درمان دست یافت. بیماران پژوهش حاضر در طول دوره مطالعه، داروهای معمول خود را مصرف می‌کرده‌اند. در مطالعات مختلف، به تاثیر رژیم‌های دارویی بر مکانیسم‌های سلولی از جمله بیان  $TNF-\alpha$  اشاره شده است.<sup>۳۰-۳۴</sup> بنابراین، ممکن است در مطالعه ما، بیان  $TNF-\alpha$  و IL-17A علاوه بر ABMSCs، تحت تاثیر داروهای مصرف شده توسط بیماران نیز قرار گرفته باشد. باتوجه به تاثیرپذیری فرایندهای سلولی از قبیل بیان  $TNF-\alpha$  و ترجمه از مکانیسم‌های تنظیمی که در هنگام رونویسی، بعد از رونویسی و نیز بعد از ترجمه رخ می‌دهند، سطح RNA در سلول ممکن است با سطح پروتئین مربوط به آن mRNA، همخوانی نداشته باشد.<sup>۳۵</sup> بنابراین ممکن است بیان  $TNF-\alpha$  و IL-17A در این مطالعه، از فرایندهای تنظیمی بیان  $TNF-\alpha$  نیز تاثیر گرفته باشد. باتوجه به اینکه در ایمونوپاتوزن بیماری RA، به نقش و حضور سلول‌ها و فاکتورهای سیستم ایمنی در بافت مفاصل بیماران اشاره شده است.<sup>۱۹</sup> می‌توان انتظار داشت که مطالعه سلول‌ها و فاکتورهای ایمنی در بافت مفاصل درگیر، اطلاعات دقیق‌تری در خصوص آثار ایمونومدلاتوری MSCs ارائه دهد، البته باید در نظر داشت که نمونه‌برداری از مفاصل درگیر می‌تواند با عوارض و تشدید آسیب به مفاصل بیماران همراه باشد.

## References

- Jahid M, Khan KU, Rehan UI H, Ahmed RS. Overview of Rheumatoid Arthritis and Scientific Understanding of the Disease. *Mediterr J Rheumatol*. 2023;34(3):284-91.
- Finckh A, Gilbert B, Hodkinson B, Bae SC, Thomas R, Deane KD, et al. Global epidemiology of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2022;18(10):591-602.
- Venetsanopoulou AI, Alamanos Y, Voulgari PV, Drosos AA. Epidemiology and Risk Factors for Rheumatoid Arthritis Development. *Mediterr J Rheumatol*. 2023;34(4):404-13.
- Deane KD, Holers VM. Rheumatoid Arthritis Pathogenesis, Prediction, and Prevention: An Emerging Paradigm Shift. *Arthritis Rheumatol*. 2021;73(2):181-93.
- Mariani FM, Martelli I, Pistone F, Chericoni E, Puxeddu I, Alunno A. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: one year in review 2023. *Clin Exp Rheumatol*. 2023;41(9):1725-34.
- Bedeković D, Bošnjak I, Šarić S, Kimer D, Novak S. Role of Inflammatory Cytokines in Rheumatoid Arthritis and Development of Atherosclerosis: A Review. *Medicina*. 2023; 26;59(9):1550
- Kondo N, Kuroda T, Kobayashi D. Cytokine Networks in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(20):10922.
- Gao Y, Zhang Y, Liu X. Rheumatoid arthritis: pathogenesis and therapeutic advances. *MedComm*. 2024;5(3):e509.
- Prasad P, Verma S, Surbhi, Ganguly NK, Chaturvedi V, Mittal SA. Rheumatoid arthritis: advances in treatment strategies. *Mol Cell Biochem*. 2023;478(1):69-88.
- Shandil RK, Dhup S, Narayanan S. Evaluation of the Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in Preclinical Models of Autoimmune Diseases. *Stem Cells Int*. 2022;2022(1):6379161.
- Zaripova LN, Midgley A, Christmas SE, Beresford MW, Pain C, Baildam EM, et al. Mesenchymal Stem Cells in the Pathogenesis and Therapy of Autoimmune and Autoinflammatory Diseases. *Int J Mol Sci*. 2023;24(22):16040
- Bačenkova D, Trebuňová M, Morochovič R, Dosedla E, Findrik Balogová A, Gašparová P, et al. Interaction between Mesenchymal Stem Cells and the Immune System in Rheumatoid Arthritis. *Pharmaceuticals*. 2022;15(8):941.
- Lee HJ, Lee WJ, Hwang SC, Choe Y, Kim S, Bok E, et al. Chronic inflammation-induced senescence impairs immunomodulatory properties of synovial fluid mesenchymal stem cells in rheumatoid arthritis. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):502.
- Bakinowska E, Bratborska AW, Kielbowski K, Čmil M, Biniek WJ, Pawlik A. The Role of Mesenchymal Stromal Cells in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Cells*. 2024;13(11):915.

15. Sarsenova M, Issabekova A, Abisheva S, Rutskaya-Moroshan K, Ogay V, Saparov A. Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy for Rheumatoid Arthritis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(21):11592
16. Ghoryani M, Shariati-Sarabi Z, Tavakkol-Afshari J, Ghasemi A, Poursamimi J, Mohammadi M. Amelioration of clinical symptoms of patients with refractory rheumatoid arthritis following treatment with autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells: A successful clinical trial in Iran. *Biomed Pharmacother*. 2019;109:1834-40.
17. Jang DI, Lee AH, Shin HY, Song HR, Park JH, Kang TB, et al. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) in Autoimmune Disease and Current TNF- $\alpha$  Inhibitors in Therapeutics. *Int J Mol Sci*. 2021;22(5):2719.
18. 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 Dev*. 2013;22(24):3192-202.
19. Usha Shalini P, Vidyasagar JV, Kona LK, Ponnana M, Chelluri LK. In vitro allogeneic immune cell response to mesenchymal stromal cells derived from human adipose in patients with rheumatoid arthritis. *Cell Immunol*. 2017;314:18-25.
20. Vasilev G, Ivanova M, Ivanova-Todorova E, Tumangelova-Yuzeit K, Krasimirova E, Stoilov R, et al. Secretory factors produced by adipose mesenchymal stem cells downregulate Th17 and increase Treg cells in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Rheumatol Int*. 2019;39(5):819-26.
21. Shin TH, Kim HS, Kang TW, Lee BC, Lee HY, Kim YJ, et al. Human umbilical cord blood-stem cells direct macrophage polarization and block inflammasome activation to alleviate rheumatoid arthritis. *Cell Death Dis*. 2016;7(12):e2524.
22. Zhang L, Wang XY, Zhou PJ, He Z, Yan HZ, Xu DD, et al. Use of immune modulation by human adipose-derived mesenchymal stem cells to treat experimental arthritis in mice. *Am J Transl Res*. 2017;9(5):2595-607.
23. Lee K, Park N, Jung H, Rim YA, Nam Y, Lee J, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental arthritis via expression of interleukin-1 receptor antagonist. *PLoS One*. 2018;13(2):e0193086.
24. Sandquist I, Kolls J. Update on regulation and effector functions of Th17 cells. *F1000Res*. 2018;7:205.
25. Azizi G, Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A. Th17 Cells in Immunopathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis*. 2013;16(3):243-53.
26. Chen DY, Chen YM, Chen HH, Hsieh CW, Lin CC, Lan JL. Increasing levels of circulating Th17 cells and interleukin-17 in rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to anti-TNF- $\alpha$  therapy. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(4):R126.
27. Roelvelde DM, van Nieuwenhuijze AE, van den Berg WB, Koenders MI. The Th17 pathway as a therapeutic target in rheumatoid arthritis and other autoimmune and inflammatory disorders. *BioDrugs*. 2013;27(5):439-52.
28. Wang D, Huang S, Yuan X, Liang J, Xu R, Yao G, et al. The regulation of the Treg/Th17 balance by mesenchymal stem cells in human systemic lupus erythematosus. *Cell Mol Immunol*. 2017;14(5):423-31.
29. Liu R, Li X, Zhang Z, Zhou M, Sun Y, Su D, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells inhibited T follicular helper cell generation in rheumatoid arthritis. *Sci Rep*. 2015;5:12777.
30. Bodewes ILA, Gottenberg JE, van Helden-Meeuwse CG, Mariette X, Versnel MA. Hydroxychloroquine treatment downregulates systemic interferon activation in primary Sjögren's syndrome in the JOQUER randomized trial. *Rheumatology (Oxford)*. 2020;59(1):107-11.
31. Csoka AB, Szyf M. Epigenetic side-effects of common pharmaceuticals: a potential new field in medicine and pharmacology. *Med Hypotheses*. 2009;73(5):770-80.
32. Suzuki K, Yoshida K, Ucha T, Kaneshiro K, Nakai A, Hashimoto N, et al. Methotrexate upregulates circadian transcriptional factors PAR bZIP to induce apoptosis on rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther*. 2018;20(1):55.
33. Takiguchi H, Chen V, Obeidat M, Hollander Z, FitzGerald JM, McManus BM, et al. Effect of short-term oral prednisone therapy on blood gene expression: a randomised controlled clinical trial. *Respir Res*. 2019;20(1):176.
34. Wang X, Baek SJ, Eling T. COX inhibitors directly alter gene expression: role in cancer prevention? *Cancer Metastasis Rev*. 2011;30(3-4):641-57.
35. Istomine R, Pavay N, Piccirillo CA. Posttranscriptional and Translational Control of Gene Regulation in CD4+ T Cell Subsets. *J Immunol*. 2016;196(2):533-40.

## Immunomodulatory effect of autologous bone marrow MSCs on TNF- $\alpha$ expression in refractory rheumatoid arthritis

### Abstract

Received: 23 Feb. 2025 Revised: 27 Feb. 2025 Accepted: 12 Apr. 2025 Available online: 21 Apr. 2025

Mohsen Ghoryani Ph.D.<sup>1</sup>  
Mohsen Ahmadi M.D.<sup>2</sup>  
Mahdi Atabaki Ph.D.<sup>3</sup>  
Jalil Tavakkol-Afshari Ph.D.<sup>4</sup>  
Mojgan Mohammadi Ph.D.<sup>5\*</sup>

1- Department of Laboratory Sciences, School of Paramedical Sciences, Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences, Torbat Heydariyeh, Iran.

2- Department of Immunology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

3- Clinical Immunology Research Center, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran.

4- Immunology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

5- Pharmacological Research Center of Medicinal Plants, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

\* Corresponding author: Pharmacological Research Center of Medicinal Plants, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.  
Tel: +98-51-38002374  
E-mail: MohammadiMZH@mums.ac.ir

**Background:** Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disorder marked by persistent inflammation, progressive joint destruction, functional disability, and systemic complications. Key inflammatory mediators, such as tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-17 (IL-17), play critical roles in disease progression and tissue damage. Mesenchymal stem cells (MSCs) have recently gained attention as a therapeutic approach for autoimmune diseases because of their abilities in self-renewal, immune modulation, and tissue repair. Considering the role of pro-inflammatory cytokines in the pathogenesis of RA, this study investigated the effect of autologous bone marrow-derived MSCs (ABMSCs) on the gene expression of TNF- $\alpha$  and IL-17A in patients with refractory RA.

**Methods:** The study utilized archived RNA from the research team's previous clinical trial. In this study, 13 patients with refractory RA who underwent MSC transplantation (MSCT) at an intravenous dose of  $1 \times 10^6$  ABMSCs per kilogram of body weight were evaluated at baseline and at 1, 6, and 12 months post-injection. Between November 2023 and March 2024, archived RNA samples were converted into cDNA at the Department of Immunology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. Then, the expression levels of TNF and IL-17A were analyzed using SYBR Green-based real-time PCR.

**Results:** TNF- $\alpha$  gene expression declined significantly 1 month after MSCT (mean $\pm$ SEM:  $1.00 \pm 0.00$  at baseline vs.  $0.38 \pm 0.11$  at 1 month,  $P=0.045$ ). However, no significant differences were observed at 6 months ( $1.21 \pm 0.38$ ) or 12 months ( $0.61 \pm 0.18$ ) compared to baseline ( $P>0.05$ ). IL-17A gene expression remained statistically unchanged across all time points (baseline:  $1.00 \pm 0.00$ ; 1 month:  $0.87 \pm 0.31$ ; 6 months:  $1.19 \pm 0.42$ ; 12 months:  $1.79 \pm 0.92$ ;  $P>0.05$ ).

**Conclusion:** The results of this study suggest that ABMSCs may exert an anti-inflammatory effect by modulating TNF- $\alpha$  in patients with refractory RA. However, the findings related to IL-17A do not support the hypothesis that ABMSC injection exerts anti-inflammatory effects through modulation of IL-17A gene expression in these patients.

**Keywords:** IL-17A, rheumatoid arthritis, TNF- $\alpha$ .

Copyright © 2025 Ghoryani et al. Published by Tehran University of Medical Sciences.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 International license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Tehran Univ Med J (TUMJ) 2025 May;83(2):99-105

<http://tumj.tums.ac.ir>