

تأثیر نانوذرات سریم اکسید در مدل رتی آرتريت روماتوئید

الهام ناجی زواره، سید میثم ابطحي فروشانی*

گروه میکروبیشناسی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۸/۰۲/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: پژوهش‌های قبلی نشان داده که نانوذرات اکسید سریم (CeO₂-NPs) ظرفیت فارماکولوژیک بالایی به دلیل ماهیت آنتی‌اکسیدان و ضد التهابی دارد. آرتريت روماتوئید یک بیماری خودایمنی مزمن و سیستمیک با علت ناشناخته است. هدف از این مطالعه تعیین و تأثیر نانوذرات سریم اکسید در مدل رتی آرتريت روماتوئید بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، تعداد ۴۰ سرت ویستار در محدوده وزنی ۹۰ تا ۱۱۰ گرم از مرکز حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه گردید. رت‌ها به صورت تصادفی به چهار گروه مساوی؛ سالم، مبتلا به RA، مبتلا و تحت درمان با نانوذرات اکسید سریم (۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خوراکی، روزانه) و مبتلا و تحت درمان با متوترکسات (۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم خوراکی، هفتگی) تقسیم شدند. آرتريت روماتوئید به وسیله تزریق داخل کف پای (۰/۱ میلی‌لیتر) ادجوانت کامل فروند القا شد. درمان در زمانی که رت‌ها علائم التهاب در مفصل تارسوس را نشان دادند (روز ۸) شروع شد و تا زمان کشتار رت‌ها در روز ۲۸ ادامه یافت. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نانوذرات اکسید سریم دارای اثر ضدالتهاب مناسبی در جهت کاهش شدت التهاب کف پا در یک الگوی برابر با متوترکسات بود ($p=0/27$). سطح برداشت نوترال رد در جمعیت سلول‌های فاگوسیتیک خون محیطی و سطح خونی میلوپراکسیداز در گروه مبتلا و دریافت کننده اکسید سریم به ترتیب به میزان ($0/76 \pm 0/08$) و ($1/39 \pm 1/99$) میلی‌مول بر میلی‌لیتر بود که به طور معنی‌داری از همین سطوح در گروه دریافت کننده متوترکسات ($0/98 \pm 0/07$) و ($1/9 \pm 2/59$) میلی‌مول بر میلی‌لیتر کمتر بود ($p < 0/05$). به طور بلعکس سطح خونی نیتریک اکساید در گروه مبتلا و دریافت کننده متوترکسات ($127/81 \pm 12/18$ میکرومول) کاهش بیشتری را نسبت به گروه مبتلا و دریافت کننده نانوذرات اکسید سریم ($165/9 \pm 13/29$ میکرومول) نشان داد ($p < 0/05$). شدت کاهش انفجار تنفسی ($p=0/09$) و همچنین کاهش CRP ($p=0/13$) در هر دو گروه درمانی تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. مهم‌تر این که بر خلاف متوترکسات، شدت تکثیر لنفوسیتی در رت‌های مبتلا به آرتريت و درمان شده با اکسید سریم نسبت به رت‌های مبتلا و بدون درمان کاهش معنی‌داری نیافت ($p=0/12$).

نتیجه‌گیری: با توجه به بهبود سیمای بالینی و آزمایشگاهی رت‌های مبتلا به نظر می‌رسد که درمان با نانوذرات اکسید سریم می‌تواند به عنوان راهکاری سودمند در بهبود التهاب ناشی از آرتريت روماتوئید مطرح باشد.

واژه‌های کلیدی: آرتريت روماتوئید، نانوذرات سریم، متوترکسات، رت ویستار

* نویسنده مسئول: سید میثم ابطحي فروشانی، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه میکروبیشناسی

Email: sm.abtahi@urmia.ac.ir

مقدمه

طور گسترده جهت امکان سنجی استفاده از ترکیبات

دارویی جدید استفاده شده است(۸).

هیچ یک از ملاحظات درمانی کنونی علاج بخش قطعی نیستند (۹). علاوه بر داروهای ضدالتهاب استروئیدی و غیر استروئیدی، متوترکسات از مؤثرترین داروهایی است که به طور شایع برای درمان آرتریت روماتوئید تجویز می‌شود. این دارو یک داروی تضعیف کننده سیستم ایمنی است که به عنوان داروهای ضد روماتیسمی تغییر دهنده سیر بیماری شناخته می‌شود (۱۰). عمده اثرات مفید متوترکسات از طریق افزایش سطح آدنوزین و نه مهار چرخه اسیدفولیک صورت خواهد گرفت (۱۱). با وجودی که متوترکسات داروی نسبتاً مؤثری است، ولی عوارض خطرناکی نیز دارد (۱۱ و ۱۰). بنابراین یافتن راهکارهای مفیدتر جهت تعدیل پاسخ‌های ایمنی با حداقل اثرات جانبی در افراد مبتلا به RA ضروری می‌باشد. امروزه نانو تکنولوژی امکان ساخت و دست ورزی مواد را در مقیاس نانو پیشنهاد می‌کند. در همین راستا تلاش‌های زیادی جهت استفاده از نانو ذرات برای ایجاد تحمل در موارد خود ایمنی از قبیل دیابت در جریان می‌باشد (۱۲).

از بین نانوذرات سریم اکسید^(۱) به خاطر ویژگی‌های ضد التهابی، نیمه عمر مناسب، سمیت کم و

آرتریت روماتوئید (RA)^(۱) یا روماتیسم مفصلی یک بیماری خودایمنی و التهابی مزمن و سیستمیک با علت ناشناخته است (۱). گزارش شده است که بروز سالانه آرتریت روماتوئید حدود ۴۰ در ۱۰۰۰۰۰ نفر است. همانند بسیاری از بیماری‌های خودایمنی، RA در زنان بیشتر از مردان است (نسبت ۱:۳) که نقش هورمون جنسی را نشان می‌دهد (۴-۲).

در آرتریت روماتوئید تظاهرات مفصلی و سیستمیک به وسیله هایپرپلازی سلول‌های پوششی سینوویال و نفوذ گسترده ماکروفاژها، لنفوسیت‌ها، فیبروبلاست‌ها و لکوسیت‌ها در مفصل ایجاد می‌شود (۵). اگرچه علت دقیق روماتیسم مفصلی ناشناخته است، ولی در ایجاد این بیماری ایمنی سلولی و ایمنی هومورال هر دو نقش دارند (۶). لنفوسیت T نقش مهمی در روند بیماری دارد، سلول CD⁴⁺ فعال شده با آنتی ژن منجر به تحریک سلول‌های B در جهت تولید اتوآنتی‌بادی‌ها از جمله فاکتور روماتوئید (RF)^(۲)، آنتی‌بادی‌های ضد پپتیدهای حلقوی سیترولینه (Anti-CCP)^(۳)، آنتی‌بادی ضد هسته (ANA)^(۴) می‌شود که با تشکیل کمپلکس‌های ایمنی و التهاب همراه است. این التهاب مداوم باعث تخریب غضروف و استخوان می‌شود (۷).

آرتریت ایجاد شده در رت‌های ویستار پس از تزریق ادجوانت کامل فروند (CFA)^(۵)، شباهت بسیار زیاد به نمونه انسانی بیماری RA دارد. از این مدل به

- 1-Rheumatoid Arthritis
- 2- Rheumatoid Factor
- 3-Anti-Cyclic Citrullinated Peptide
- 4-Antinuclear Antibody
- 5-Complete Freund's Adjuvant
- 6- Cerium Oxide Nanoparticles

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، تعداد ۴۰ سر رت ویستار مذکر در محدوده وزنی ۱۱۰-۹۰ گرم از مرکز انستیتوپاستور ایران تهیه گردید و کلیه مراحل این تحقیق در کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه ارومیه با کد IR.URMI.REC 3/PD/1384 مورد ارزیابی و تأیید قرار گرفت.

رت‌ها پس از طی زمان یک هفته‌ای جهت تطابق به طور تصادفی به چهار گروه ۱۰ تایی به شرح زیر تقسیم شدند؛ گروه کنترل شامل ده رت سالم بود که تحت هیچ تیماری قرار نگرفتند و این رت‌ها همزمان با رت‌های گروه مبتلا دارونما (PBS) دریافت نمودند، گروه شاهد مبتلا، رت‌های این گروه از روز هشتم بعد از ایمن‌سازی (روز آغاز تورم در مفصل کف پا) به صورت روزانه و خوراکی با فر PBS دریافت نمودند، گروه مبتلا و تحت درمان با نانوذرات اکسید سریم، از روز هشتم بعد از ایمن‌سازی به صورت روزانه و خوراکی تحت درمان با نانوذرات اکسید سریم (۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) قرار گرفتند و گروه مبتلا و تحت درمان با متوتروکسات، از روز هشتم بعد از ایمن‌سازی به صورت هفتگی و خوراکی (۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) متوتروکسات دریافت نمودند. انتخاب دوز نانوذرات اکسید سریم و متوتروکسات بر اساس پژوهش‌های قبلی در مدل التهابی رت‌های ویستار بود (۲۰ و ۱۹). روند درمان رت‌ها از روز هشتم بعد از ایمن‌سازی شروع و تا روز ۳۰ ادامه یافت. کلیه

حفاظت عصبی امید بخش هستند (۱۳). نانوذرات سریم اکسید (نانوسریا) که به عنوان کاتالیزور شناخته می‌شوند، به علت ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانت خود پتانسیل دارویی شگفت‌انگیزی دارند که بخشی از یون‌های Ce^{3+} حاضر در این نانوذرات نشات می‌گیرد. واکنش‌های مربوط به چرخه‌های بازسازی بین وضعیت‌های اکسیداسیون Ce^{3+} و Ce^{4+} اجازه می‌دهد نانوذرات سریم اکسید واکنش کاتالیزوری با سوپراکسید و هیدروژن پراکسید انجام دهد (۱۵ و ۱۴). تعداد زیادی از التهابات مزمن، سرطان‌ها و اختلالات عصبی به دلیل عدم تعادل رادیکال‌های آزاد ایجاد شده، بنابراین نانوذره اکسید سریم با ویژگی آنتی‌اکسیدانت خود به عنوان تضمینی در درمان بیماری‌هایی که در ارتباط با اکسیداتیو استرس هستند به حساب می‌آید (۱۶). از آنجا که نانوذرات نسبت سطح به حجم بالایی دارند، در جلوگیری از تقویت‌کننده‌های التهاب مثل سایتوکاین‌ها و آنزیم‌هایی که در ارتباط با التهاب هستند، مؤثر هستند (۱۷). مشخص شده است نانوذره سریم اکسید دارای اثراتی مفیدی بر روند التهاب در بیماری اسکروز متعدد است (۱۸). با این حال به نظر نمی‌رسد تاکنون تحقیق جامعی بر روی اثرات احتمالی نانوذرات اکسید سریم در مبتلایان به RA و یا مدل تجربی آن از نظر ارزیابی تأثیرات آن بر تعدیل پاسخ‌های ایمنی صورت گرفته باشد، لذا هدف از این تحقیق تعیین و بررسی اثرات نانوذره اکسید سریم در کاهش احتمالی علایم در مدل رتی آرتريت روماتويد بود.

حیوانات در این مطالعه از ابتدا تا انتها در مطالعه شرکت داشتند.

نانو ذرات اکسید سربوم از شرکت سیگما-آلدریج تهیه شد (CAS Number 1306-38-3). نانوذرات تهیه شده اندازه‌ای در حد ۲۵ نانومتر و چگالی ۷/۱۳ گرم بر میلی‌لیتر بودند.

برای القای ارتريت روماتوئید از ادجوانت کامل فروند که محتوی ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پیکره کشته مایکوباکتریوم بود، استفاده شد. در ابتدا پس از سانتریفیوژ ادجوانت در دور بالا، رسوب حاصل در ۱ سی‌سی از مایع رویی حل شد و در نهایت ۰/۱ میلی‌لیتر ادجوانت کامل فروند به داخل بالشتک کف پای رت‌ها تزریق شد (۲۱).

از روز هشتم پس از ایمن‌سازی (تزریق ادجوانت کامل فروند)، تمامی رت‌ها علایم تورم، قرمزی و التهاب نشان دادند که نشان دهنده ابتلا به بیماری است. تغییرات قطر ناحیه تارسوس هر رت نسبت به پای سالم در روزهای ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ به صورت یک روز در میان ثبت شد.

به منظور بررسی میزان تکثیر سلول‌های ایمنی با روش MTT، ۲۸ روز پس از ایمن‌سازی و خون‌گیری رت‌ها، تحت شرایط استریل طحال رت‌ها خارج شد سپس بافت طحال در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت ساخت انستیتو روزول - پارک (RPMI-۱۶۴۰^(۱)) ایالات متحده، سیگما) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)^(۲)، (ژیپکو، آلمان) قطعه قطعه و له شده و از توری سیمی به قطر ۰/۰۲ میلی‌لیتر عبور داده شده، سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ

گردید. روی رسوب سلولی حاصل ۵ میلی‌لیتر بافر لیز کننده RBS اضافه شد، پس از ۵ دقیقه با افزودن ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت طراحی شده (RPMI)، مجدداً در دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب سلولی حاصل در محیط کشت حاوی ۱۰ درصد FBS به حالت سوسپانسیون درآمد. به دنبال شمارش سلول‌ها، سوسپانسیونی حاوی ۱×۱۰^۶ سلول در هر میلی‌لیتر تهیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر از آن در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ته تخت ریخته شد. در ادامه ۵۰ میکرولیتر محلول فیتوهمالگوتینین اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت تحت این شرایط کشت شدند (۲۲). برای هر نمونه سه تکرار در حضور محلول فیتوهمالگوتینین و سه تکرار بدون حضور این محلول در نظر گرفته شد. به سه چاهک محیط RPMI خالی به عنوان بلانک اضافه شد. بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون به هر چاهک ۲۵ میکرولیتر محلول (MTT)^(۳) اضافه شد. به مدت ۴ ساعت دیگر انکوبه گردید. در این مدت احیاء ماده MTT به وسیله سلول‌های زنده و در حال تکثیر سبب تشکیل کریستال‌های فورمازان گردید که با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به حالت محلول درآمد. در نهایت شدت جذب نوری در طول موج ۴۹۰ نانومتر تعیین و ایندکس تحریک به وسیله رابطه زیر محاسبه گردید (۲۳).

$$\text{ایندکس تحریک} = \frac{\text{بلانک OD - OD باحضور PHA}}{\text{بلانک OD - OD بدون حضور PHA}}$$

1-R oswell Park Memorial Institute (RPMI)
2-Fetal bovine serum (FBS)
3-3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide=MTT

میلی لیتر) به آن اضافه شد. هم‌چنین ۱۰۰ میکرولیتر محلول NBT به میکروتیوب اضافه شد. میکروتیوب به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. ۲۰۰ میکرولیتر N, N دی‌متیل فورمامید به میکروتیوب اضافه گردید. سپس میکروتیوب با سرعت ۳۰۰ گرم به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. دانسیته نوری ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی میکروتیوب در پلیت ۹۶ خانه ته تخت با دستگاه الیزا ریدر و در طول موج ۵۰۵ نانومتر تعیین گردید(۲۴).

به منظور ارزیابی میزان برداشت نوترال رد(NR)^(۲) در جمعیت سلول‌های فاگوسیتیک خون محیطی به سوسپانسیون سلول‌های فاگوسیتیک به میزان ۱۰ درصد محیط کشت، محلول نوترال رد (۳۳/۰ درصد) اضافه شده و به مدت دو ساعت در انکوباتور قرار گرفت. پس از طی مدت انکوباسیون، سلول‌ها دو بار با PBS در ۲۰۰۰ rpm به مدت ده دقیقه سانتریفیوژ شدند. هم حجم مقدار اولیه اسیداستیک ۱ درصد (یک گرم اسیداستیک در ۵۰ میلی‌لیتر اتانول و ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر) اضافه می‌شود. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر در هر چاهک از میکروپلیت ۹۶ خانه ته تخت ریخته شد و به وسیله دستگاه الیزانگار در طول موج ۴۹۲ نانومتر نتیجه کار قرائت می‌شود(۲۴).

جهت سنجش فعالیت میلوپراکسیداز(MPO)^(۳)، پس از جداسازی سلول‌های خونی از رت‌های مورد مطالعه، ۱۰ میکرولیتر از پلاسما با ۸۰ میکرولیتر از

به منظور جداسازی سلول‌های فاگوسیتیک از خون محیطی خون کامل هپارینه در ۲۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس پلاسما خون جدا شده در یخچال منفی ۷۰ نگهداری شد. سلول‌های باقی مانده را با محیط کشت RPMI به حجم خون اولیه رسانده و با تکان دادن آرام سلول‌ها دوباره در آن حل شد. هم حجم خون اولیه بافر ACK به منظور لیز گلبول‌های قرمز اضافه شد. پس از ده دقیقه هم حجم خون اولیه محیط کشت به منظور خنثی‌سازی اثر بافر اضافه شد و بلافاصله در ۲۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد. دو مرحله اخیر تا سفید شدن سلول‌های ته لوله تکرار شد. در ادامه به سلول‌های ته لوله هم حجم خون اولیه، محیط کشت اضافه شد و برای انجام تست‌های NBT و نوترال رد به دو قسمت تقسیم شدند(۲۳).

ارزیابی شدت انفجار تنفسی به شیوه‌ی NBT در جمعیت سلول‌های فاگوسیتیک خون محیطی جهت تعیین توانایی فاگوسیت‌هایی چون نوتروفیل و مونوسیت جهت تولید واسطه‌های فعال اکسیژن (به عنوان یکی از مراحل مهم در محدودسازی عامل پاتوژن) به کار می‌رود. نیتروبلوتترازولیوم (NBT)^(۱) ترکیب شفاف و زرد رنگی است که در مجاورت O₂ به فرم احیا شده فورمازان (رنگ آبی) تبدیل می‌شود. به طور خلاصه پس از طی مدت انکوباسیون، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی (۲×۱۰^۵ میلی‌لیتر) برداشته و به داخل میکروتیوب ریخته شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون مخمر اپسونیزه (۲×۱۰^۶)

1-Nitro Blue Tetrazolium (NBT)
2-Neutral Red (NR)
3-Myeloperoxidase (MPO)

H₂O₂ و ۰/۷۵ میلی-مولار از محلول تترامتیل بنزی‌دین (TMB)^(۱) (۲/۹ میلی-مولار TMB در ۱۴/۵ درصد DMSO و ۱۵۰ میلی-مولار بافر فسفات با PH=۵/۴) مخلوط شد. در ادامه پلیت به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شده و واکنش با افزودن ۵۰ میکرومول از محلول دو مولار اسید سولفوریک به هر چاهک متوقف شد، در نهایت نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر به وسیله الیزانگار خوانده شد (۲۵).

به منظور سنجش میزان تولید نیتریک اکسید در پلاسما میزان تولید نیتریک اکسید به وسیله روش رنگ‌سنجی گریس (Griess) و استفاده از منحنی استاندارد نیتريت سدیم تعیین گردید. طی مرحله اول واکنش گریس نیتريت با اسیدسولفانلیک واکنش داده و یون دی‌آزونیوم تولید می‌شود. در مرحله دوم واکنش، این یون با ترکیب ان-۱- نفتیل اتیلن دی‌آمین جفت شده و ترکیبی از مشتقات آزو به رنگ صورتی تولید می‌کند. به طور خلاصه نمونه‌ها با نسبت ۲:۱ با بافر کیت رقیق گشت و سپس ۱۰۰ میکرومول از پلاسمای رت‌های مورد مطالعه به صورت سه تکرار به داخل چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ته تخت ریخته شد. نمونه بلانک و استاندارد نیز که در کیت مربوطه وجود داشت به تعداد سه تکرار در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد. در نهایت جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ 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 (۲۶).

جهت سنجش سطح فاکتور التهابی CRP^(۲)، از کیت الیزا (abcam) طبق دستورالعمل مربوطه استفاده شد.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

کلیه رت‌ها از روز هشتم پس از تزریق ادجوانت کامل فروند علایم آرتریت روماتوئید از قبیل؛ تورم، قرمزی و محدودیت حرکتی را نشان دادند (شکل ۱). با توجه به نمودار هر دو گروه تیمار شده با نانوذرات اکسید سربوم و متوتروکسات کاهش تورم را نشان داد. به طوری که از روز سیزدهم پس از القا این روند کاهش در هر دو گروه درمانی متوتروکسات و نانوذرات اکسید سربوم نسبت به گروه‌های رت‌های مبتلا و بدون درمان معنی‌دار بود. با این حال تغییرات شدت علایم در روز آخر دو گروه دریافت کننده نانوذره اکسید سربوم و متوتروکسات اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (p=۰/۲۷).

ماده MTT به وسیله لئوسیت‌ها برداشت شده و بر اثر فعالیت میتوکندریایی لئوسیت‌ها به کریستال‌های آبی رنگ فورمازون تبدیل می‌گردد.

1-Tetramethylbenzidine (TMB)
2-C-Reactive Protein

بين اندكى نانوذرات اكسيد سريوم مؤثرتر عمل نمود. هر چند تغيير ياد شده نسبت به گروه متوتروكسات معني دار نبود ($p=0/09$, نمودار ۴-الف).

در اين مطالعه ميزان جذب نوترال رد به عنوان مقياسي از عملکرد سلول هاي فاگوسيتيك در نظر گرفته شد، بر اين اساس به نظر مي رسد كه ابتلا به آرتريت روماتويد موجب افزايش فعاليت فاگوسيتيك سلول هاي خون محيطي شده است ($p<0/05$, نمودار ۴-ب). با توجه به نمودار ۴-ب تجوييز متوتروكسات موجب کاهش سطح افزايش يافته جذب نوترال رد در رت هاي مبتلا شده است ($p<0/05$). در عين حال تجوييز نانوذرات اكسيد سريوم به صورت كاملاً معني دار و مشخص توانسته است سطح فعاليت سلول هاي فاگوسيتيك را به حد رت هاي سالم برساند ($p=0/09$). بنابر اين نانوذره اكسيد سريوم در اين زمينه به طور كاملاً مؤثر عمل نموده است (نمودار ۴-ب).

ابتلاي رت ها به بيماري آرتريت روماتويد منجر به افزايش سطح توليد نيتريك اكساييد در پلاسمای خون مبتلايان به اين بيماري نسبت به رت هاي سالم شد ($p<0/05$, نمودار ۴-ج) هر دو تيمار نانوذره اكسيد سريوم و متوتروكسات منجر به کاهش سطح NO در خون حيوانات مبتلا به آرتريت روماتويد شد ($p<0/05$). البته در اين بين متوتروكسات به نحو معني داري نسبت به نانوذره اكسيد سريوم منجر به کاهش بيشتري در سطح NO شد ($p<0/05$, نمودار ۴-ج).

بنابراين ميزان احياي MTT به كريستال هاي فورمازون شاخصي از قابليت تكثير لنفوسيت ها را بيان مي كند. با توجه به نمودار ۲ قدرت تكثير لنفوسيت هاي طحالي در رت هاي مبتلا به آرتريت روماتويد نسبت به رت هاي سالم افزايش معني داري يافته است ($p<0/05$). در اين زمينه تيمار با متوتروكسات به طور قابل توجهي موجب کاهش قابليت تكثير لنفوسيت هاي طحالي نسبت به ساير گروه ها شده به طوري كه قدرت تكثير لنفوسيت ها حتى به زير قدرت تكثير لنفوسيت هاي رت هاي سالم رسيده است. در عين حال نتايج استفاده از نانوذرات اكسيد سريوم موجب تغيير معني داري در قدرت تكثير لنفوسيت هاي طحالي نسبت به رت هاي سالم نشده است ($p=0/13$, نمودار ۲).

ابتلاي رت ها به بيماري آرتريت روماتويد منجر به افزايش سطح فاكتور التهابي CRP در پلاسمای خون مبتلايان به اين بيماري نسبت به رت هاي سالم شد ($p<0/05$, نمودار ۳). هم راستا با علايم باليني استفاده از تركيبات درماني بدون هيچ گونه مزيتي منجر به کاهش سطح فاكتور التهابي CRP شد ($p=0/16$, نمودار ۳).

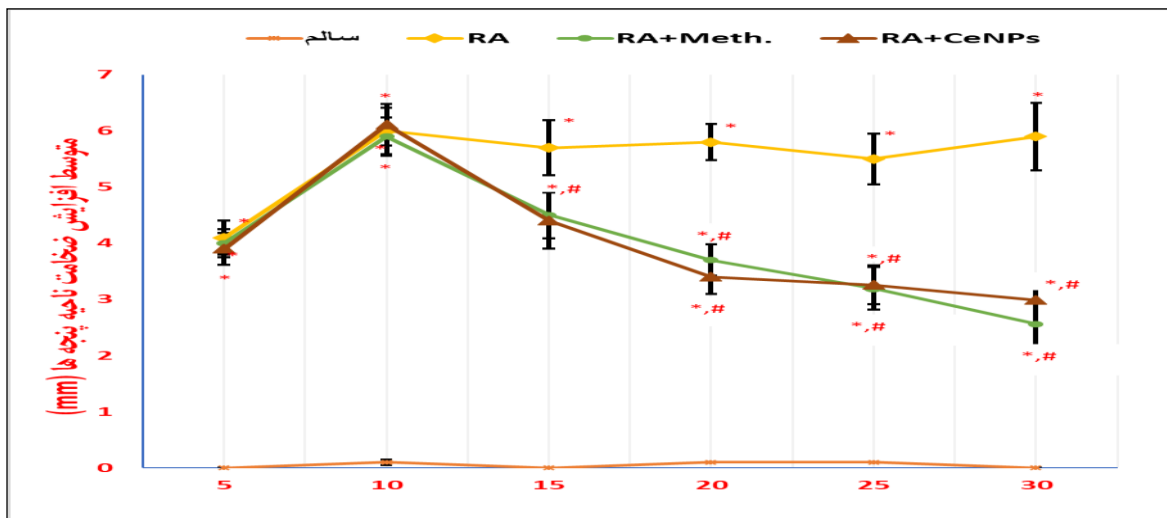
تست NBT قابليت توليد راديكال هاي آزاد اكسيژن بالقوه آسيب رسان به وسيله سلول هاي فاگوسيتيك را مشخص مي كند. با توجه به نمودار ۴-الف شدت انفجار تنفسي در رت هاي مبتلا به آرتريت روماتويد نسبت به رت هاي سالم افزايش معني داري را نشان داد ($p<0/05$). استفاده از تركيبات درماني منجر به کاهش شدت انفجار تنفسي شد، البته در اين

مبتلا و بدون درمان شد ($p < 0.05$). با این حال شدت میزان کاهش در گروه دریافت کننده نانوذرات اکسید سربوم نسبت به گروه دریافت کننده متوتروکسات بیشتر بوده است ($p < 0.05$) به طوری که سطح آنزیم میلوپراکسیداز در رت‌های مبتلا و دریافت کننده نانوذره اکسید سربوم به سطح رت‌های سالم رسیده بود ($p = 0.13$ نمودار ۴د).

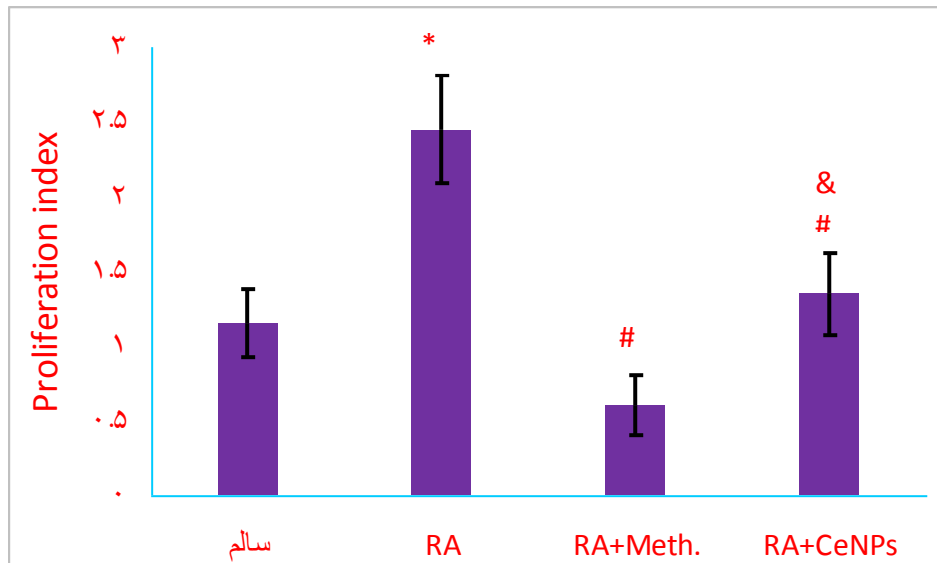
بر اساس نمودار ۴- د مشخص است که مبتلا رت‌ها به بیماری آرتریت روماتوئید موجب افزایش قابل توجه در سطح آنزیم میلوپراکسیداز خون نسبت به رت‌های سالم شده است ($p < 0.05$). خوشبختانه استفاده از هر دو ترکیب متوتروکسات و نانوذرات اکسید سربوم موجب کاهش سطح آنزیم میلوپراکسیداز در رت‌های مبتلا نسبت به رت‌های



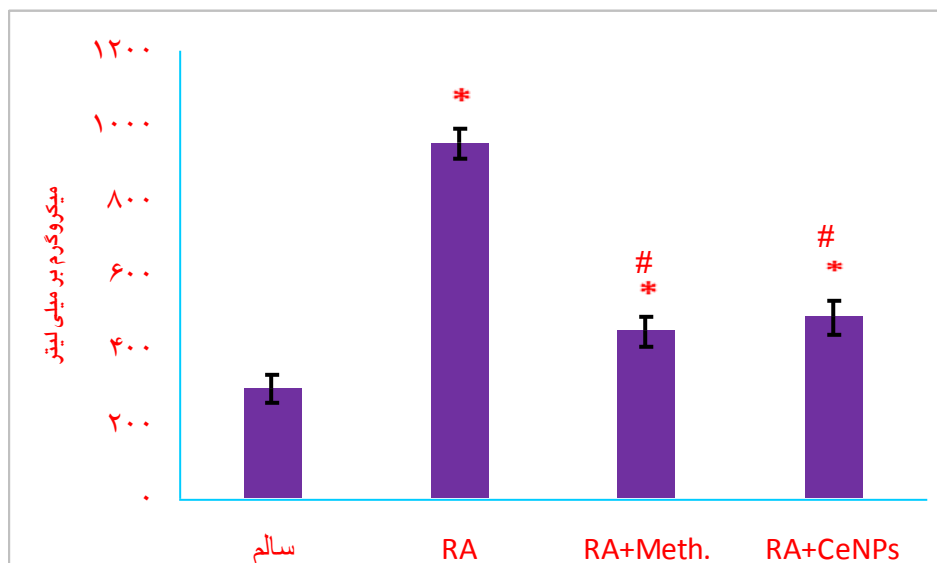
شکل ۱: تورم مفصل مشاهده شده در روز هشتم پس از القاء بیماری در گروه مبتلا و بدون درمان



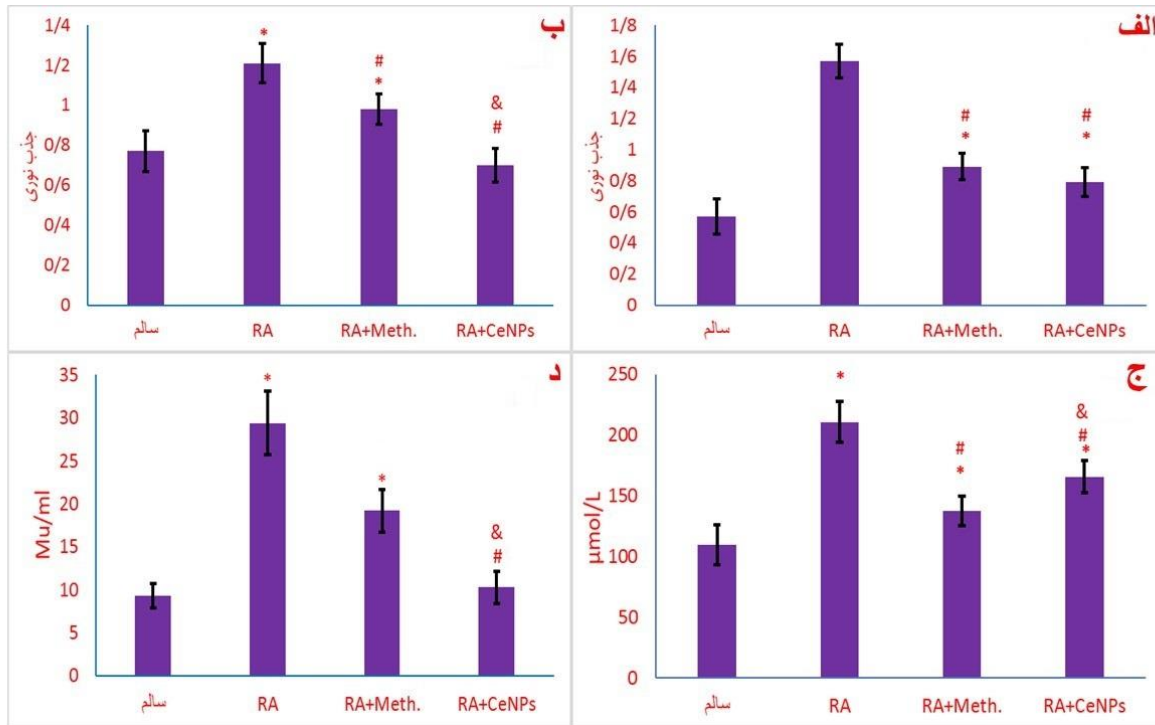
نمودار ۱: مقایسه شاخص آرتریت در رت‌های مبتلا به آرتریت روماتوئید. * نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ نسبت به گروه سالم می‌باشد، # نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ نسبت به گروه مبتلا و بدون تیمار می‌باشد. (RA: رت‌های مبتلا به روماتوئید آرتریت؛ CeO₂: نانو ذره اکسید سربوم؛ Meth: متوتروکسات)



نمودار ۲: مقایسه گروه‌های مختلف از نظر تکثیر لنفوسیت‌های طحالی در پاسخ به میتوز فیتوماگلوئینین. * نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ نسبت به گروه سالم می‌باشد، # نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ نسبت به گروه مبتلا و بدون تیمار می‌باشد، & نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ نسبت به گروه مبتلا و تحت درمان با متوترکسات می‌باشد. (نانوذره اکسید سریم = CeO₂، متوترکسات = Meth، روماتوئید آرتريت = RA).



نمودار ۳: ارزیابی تغییرات سطح فاکتور التهابی CRP. * نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ نسبت به گروه سالم می‌باشد، # نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ نسبت به گروه مبتلا و بدون تیمار می‌باشد. (نانوذره اکسید سریم = CeO₂، متوترکسات = Meth، روماتوئید آرتريت = RA).



نمودار ۴: ارزیابی تغییرات سلول های ایمنی ذاتی در رت های مبتلا به روماتوئید آرتریت. الف) سطح انفجار تنفسی در جمعیت فاگوسیت های خون محیطی، ب) سطح برداشت نوترال رد در جمعیت فاگوسیت های خون محیطی، ج) سطح خونی نیتریک اکساید، د) میزان فعالیت میلوپراکسیداز. * نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح $p < 0.05$ نسبت به گروه سالم می باشد، # نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح $p < 0.05$ نسبت به گروه مبتلا و بدون تیمار می باشد (نانوذره اکسید سربوم = CeO₂، متوترکسات = Meth، روماتوئید آرتریت = RA)

بحث

دست آمده در این مطالعه نیز به نظر می رسد گروه درمان با نانوذره سریم اکساید توانسته است که موجبات کاهش قابل توجه مهم ترین علایم بالینی در آرتریت روماتوئید القایی با ادجوانت که همان ادم و تورم ناحیه بالشتک کف پای است را به صورت هم پایه با متوترکسات فراهم آورد. CRP از جمله پروتئین های فاز حاد آسیب است که در کبد ساخته می شود. با توجه به تفاوت بسیار زیاد سطح این پروتئین در حالت سلامت و یا یک بیماری التهابی، سنجش این فاکتور به طور گسترده به عنوان آزمونی غیر اختصاصی جهت تشخیص و بالاخت پیگیری وضعیت در بیماری های روماتیسمی و

مشخص شده است نانوذرات سریم اکسید اثراتی مفیدی بر روند التهاب برخی از بیماری خود ایمن از قبیل اسکروز متعدد است (۱۸). لذا هدف از این تحقیق تعیین و بررسی اثرات نانوذره اکسید سریم در کاهش احتمالی علایم در مدل رتی آرتریت روماتوئید بود.

از آن جایی که درمان بیماری های خود ایمن پس از استقرار بیماری و نشان دادن علایم درمانگاهی در فرد مبتلا صورت می گیرد در این مطالعه نیز پس از القا بیماری و تورم مفاصل تارسوس اقدام به درمان رت های مبتلا نمودیم. بر اساس یافته های به

هستند(۱۷). در کنار اثرات آنتی‌اکسیدانتي منتسب به نانو ذرات، در پژوهش‌های اخير نشان داده شده است که نانو ذرات اکسید سریم بر روی بیان برخی از ژن‌ها به طور مستقیم اثر دارند. به طور مثال نشان داده شده است که نانو ذرات اکسید سریم در شرایط آزمایشگاهی، بیان ژن‌های *Adipoq* و *Il10* را در سلول‌های بافت چربی افزایش می‌دهند. در سلول‌های عضلانی همین نانو ذرات موجب افزایش بیان ژن‌های *Adipoq* و *Il1b* می‌گردند(۳۰). به طور جالب توجهی در مدل حیوانی هیپاتیت نشان داده شده است که نانو ذرات اکسید سریم از طریق کاهش بیان ژن *COX2* (از جمله ژن‌های اصلی دخیل در فرآیند التهاب) در کنار اعمال تغییرات بر سیستم آنتی‌اکسیدانتي عمل می‌کنند(۳۱). کاهش مستقیم تولید مارکرهای التهابی مانند: $TNF-\alpha$ ، *MCP-1* و *IL-6* به وسیله نانو ذرات اکسید سریم نشان داده شده است(۳۲). در یک مطالعه جدید و بسیار جالب نشان داده شده است که نانو ذرات اکسید سریم موجب تشدید پلاریزه شده پاسخ‌های ایمنی به سمت پاسخ‌های $Th2$ و تشدید پاسخ‌های آلرژیک می‌گردند(۳۳). این نکته زمانی جالب به نظر می‌رسد که توجه به این امر شود که پاتوژنز اصلی بیماری روماتويد آرتريت بر مبنای پاسخ‌های $Th1$ و $Th17$ می‌باشد(۳۴). بنابراین ممکن است که نانوذرات اکسید سریم از طریق تعدیل و پلاریزه نمودن پاسخ‌های $Th1$ و $Th17$ به سمت $Th2$ در کاهش علائم مشاهده شده در پژوهش حاضر مؤثر باشند. در مجموع احتمال دارد که اثرات مفید مشاهده در این

التهاب‌های مفصلی استفاده می‌شود(۲۸ و ۲۷). در همین راستا، تحقیق حاضر نیز حاکی از افزایش قابل توجه سطح *CRP* در رت‌های مبتلا نسبت به رت‌های سالم بود. امروزه به طور گسترده‌ای از سنجش این فاکتور جهت تعیین موفقیت برنامه درمانی استفاده می‌شود(۲۷). بر اساس نتایج این پژوهش، هم‌راستا با کاهش علائم بیماری در هر دو گروه درمانی، سطح این فاکتور نیز بدون هیچ مزیت انتخابی در دو گروه دریافت کننده متوترکسات و نانوذره اکسید سریم کاهش یافت.

در گذشته نشان داده شده است که تجویز سیستمیک نانو ذرات منجر به تجمع آنها در بافت‌ها و اندام‌هایی از قبیل؛ مفاصل، طحال، غدد لنفاوی، مغز استخوان، کبد، ریه و کلیه می‌شود(۲۹ و ۱۲). البته این تجمع به اندازه ذرات نیز وابسته است. در صورت بزرگتر بودن ذرات از میزان ۱۰۰ نانومولار عمدتاً به وسیله ماکروفاژهای سیستم رتیکواندوتلیال برداشت خواهند شد و بدین ترتیب عملکرد مؤثری نخواهند داشت. ذرات کوچکتر از ۵/۵ نانومتر نیز به دلیل پاک‌سازی بالای کلیوی اثر چندانی نخواهند داشت(۱۲). نانو ذرات اکسید سریم استفاده شده در تحقیق حاضر با داشتن اندازه در محدوده ۲۵ نانومتر از این منظر مناسب به نظر می‌رسند. همچنین ارزیابی‌های گذشته خاطر نشان کرده است که نانو ذرات به دلیل نسبت سطح به حجم بالایی دارند، در جلوگیری از تقویت کننده‌های التهاب مثل سایتوکاین‌ها و آنزیم‌هایی که در ارتباط با التهاب هستند، مؤثر

تحقیق ناشی از مجموع اثرات مفید نانو ذرات اکسیدسریوم در مدل رتی روماتوئید آرتریت ناشی از مجموع اثرات آنتی‌اکسیدانتهی، همراه با تغییرات بیلان ژن‌های دخیل در التهاب و تغییر در مسیر پلازیزه کردن پاسخ‌های ایمنی باشد. مسلماً این مساله باید در تحقیقات آینده مورد توجه قرار گیرد.

مشخص شده است که در افراد مبتلا به روماتوئید آرتریت، سطح فعالیت و قدرت تخریبی سلول‌های فاگوسیت‌کننده خون محیطی اعم از نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها حتی قبل از مهاجرت آنها به ناحیه کیسه مفصلی نسبت به افراد سالم به مراتب بیشتر می‌باشد. این مساله عمدتاً به دلیل تولید سایتوکاین‌های التهابی و حضور کمپلکس‌های ایمنی در خون محیطی رخ می‌دهد (۳۶ و ۳۵). آزمون نوترال رد که در این تحقیق استفاده شد، به عنوان مقیاسی از عملکرد سلول‌های فاگوسیت‌کننده خون محیطی مورد استفاده قرار گرفت. سلول‌هایی که قابلیت برداشت نوترال رد در آنها افزایش یافته است، عملکرد التهابی بیشتری را در مفاصل نشان خواهند داد (۳۵). طبق نتایج این تحقیق قابلیت برداشت نوترال رد به وسیله سلول‌های فاگوسیت‌کننده طحالی در رت‌های مبتلا به RA افزایش معنی‌داری یافته بود. در این زمینه نانوذرات سریوم به طور مؤثرتری عمل نموده و موجب کاهش بیشتری در سطح فعالیت سلول‌های فاگوسیت‌کننده خون محیطی شدند.

قابلیت انفجار تنفسی سلول‌های فاگوسیت‌کننده خون محیطی از جمله فاکتورهایی است که جهت

ارزیابی فعالیت این سلول‌ها به کار می‌رود (۳۵). همان‌طور که انتظار می‌رفت قابلیت انفجار تنفسی سلول‌های فاگوسیت‌کننده خون محیطی در رت‌های مبتلا به RA نسبت به رت‌های سالم افزایش معنی‌داری یافته بود. هر دو ترکیبات متوترکسات و نانوذره اکسید سریوم در کاهش سطح این فعالیت موفق عمل کردند، هر چند رجحان خاصی بر یک دیگر نداشتند.

آنزیم میلوپروکسیداز (MPO) یک پروتئین لیزوزومی با قابلیت پراکسیدازی است که در گرانول‌های اولیه نوتروفیل‌ها ذخیره شده و در صورت تحریک آنها تخلیه می‌شود. این آنزیم از جمله آنزیم‌های کلیدی در تولید واسطه‌های فعال اکسیژن می‌باشد. پژوهش‌های متعددی در گذشته نشان داده‌اند که بین شدت بیماری در مبتلایان به RA و سطح فعالیت سرمی آنزیم میلوپراکسیداز ارتباط منطقی و مثبتی وجود دارد (۳۷). طبق نتایج این پژوهش قابلیت سطح خونی MPO در رت‌های مبتلا به RA افزایش معنی‌داری یافته بود. در عین حال نانوذرات سریوم به طور مؤثرتری عمل نموده و موجب کاهش بیشتری در سطح فعالیت MPO خون محیطی شدند، به طوری که سطح این آنزیم به سطح رت‌های سالم رسید. این مساله با در نظر گرفتن خصلت آنتی‌اکسیدانتهی نانوذرات سریم چندان دور از ذهن نمی‌باشد.

در بیماری‌های التهابی مانند آرتریت روماتوئید (RA) تولید نیتریک اکساید به علت فعال شدن مسیر قابل القای نیتریک اکسید سنتاز (iNOS) افزایش می‌یابد. نیتریک اکسید، ارتباط تنگاتنگی با

خونی آنزیم میلوپراکسیداز و مهار فعالیت براشت
نوترال رد نسبت به متوترکسات رجحان داشتند.

از لحاظ محدودیت‌های این پژوهش، ذکر این
نکته لازم است که مطالعه مذکور، یک مطالعه مقدماتی
آن هم تنها در یک مدل حیوانی بوده و لازم است در
آینده پژوهش‌های بیشتری در این زمینه صورت
بگیرد. به طور طبیعی با توجه به انتخاب تنها یک دوز
در این مطالعه لازم است که اثرات دوزهای مختلف
نانو ذره اکسید سریم در این مدل بیماری در
پژوهش‌های آینده مد نظر قرار گیرد. هم‌چنین به
منظور قیاس دقیق‌تر از اثربخشی نانو ذره اکسید
سریم لازم است که با ارزیابی‌های هیستوپاتولوژیک
و رادیولوژیک و ارزیابی میزان ترمیم بافتی در مفصل
رت‌های مبتلا انجام شود.

نتیجه‌گیری

در نهایت با توجه به نتایجی که در این
مطالعه به دست آمد، ممکن است که نانوذرات اکسید
سریم به عنوان یک رهیافت سودمند در امر کنترل
بیماری RA در نظر گرفته شود.

تقدیر و تشکر

مقاله حاصل بخشی از پایان نامه دانشجویی
مقطع کارشناسی ارشد ایمونولوژی دانشگاه ارومیه
می‌باشد، که با حمایت مالی این دانشگاه انجام شد.
نویسندگان از زحمات تمامی افرادی که در پیشبرد
پژوهش حاضر همکاری نمودند نهایت تشکر را دارند.

وضعیت التهابی دارد. در همین راستا نشان داده شده
است که بین میزان سطح سرمی نیتریک اکساید و
شدت بیماری در مبتلایان به RA ارتباط مستقیمی
وجود دارد (۳۷ و ۳۵). نتایج حاضر نیز حاکی از
افزایش سطح خونی نیتریک اکساید در رت‌های مبتلا
بود. البته در این مورد به نظر می‌رسد که کاهش سطح
نیتریک اکساید در گروه درمانی با متوترکسات نسبت
به گروه درمانی با نانوذره اکسید سریم بیشتر بوده
است.

شواهد قانع‌کننده‌ای وجود دارد که فعال‌سازی
سلول‌های T در پیشرفت التهاب نقش مهمی دارد (۳۸).
بر اساس یافته‌های حاصل از تست MTT پس از
تحریک لنفوسیت‌ها با PHA نشان داده شد که نانوذره
اکسید سریم اثرات ضد تکثیری و مهارکننده کمتری
بر روی لنفوسیت‌ها داشته است، به طوری که بر
خلاف متوترکسات سطح تکثیر لنفوسیت‌ها به زیر
حد رت‌های سالم نرسیده است. بنابراین نانوذرات
سریم با وجود حصول نتایج شایان و برابر با
متوترکسات در کاهش شدت علایم، منجر به اثرات
ایمونوساپرسیو کمتری شده است که این خود یک
مزیت عالی می‌باشد.

در کل به نظر می‌رسد که با وجود کاهش هم
پای شدت علایم بالینی در هر دو گروه تحت تیمار،
نانوذرات اکسید سریم به دلیل عدم بروز اثرات
ایمونوساپرسیو نسبت به متوترکسات در امر کنترل
مدل حیوانی روماتوئید آرتريت بهتر عمل می‌نماید.
هم‌چنین نانوذرات اکسید سریم در کاهش سطح

REFERENCES

1. Arvikar SL, Crowley JT, Sulka KB, Steere ACJA. Autoimmune arthritides, rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, or peripheral spondyloarthritis following Lyme disease. *Arthritis Rheumatology* 2017; 69(1): 194-202.
2. Zeng P, Chen Z, Klareskog L, Alfredsson L, Bengtsson C, Jiang XJA. Amount of smoking, duration of smoking cessation and their interaction with silica exposure in the risk of rheumatoid arthritis among males: results from the Swedish. *Epidemiological Investigation of Rheumatoid Arthritis (EIRA)* 2018; 77(8): 1238-41.
3. Okada Y, Eyre S, Suzuki A, Kochi Y, Yamamoto KJ. Genetics of rheumatoid arthritis. *Nature* 2019; 78(4): 446-53.
4. Orr C, Najm A, Binięcka M, McGarry T, Ng CT, Young F, et al. Synovial immunophenotype and anti-citrullinated peptide antibodies in rheumatoid arthritis. *Patients: Relationship to Treatment Response and Radiologic Prognosis* 2017; 69(11): 2114-23.
5. Calabresi E, Petrelli F, Bonifacio A, Puxeddu I, Alunno AJCER. One year in review 2018. *pathogenesis of Rheumatoid Arthritis* 2018; 36(2): 175-84.
6. de Brito Rocha S, Baldo DC, Andrade LEC. Clinical and pathophysiologic relevance of autoantibodies in rheumatoid arthritis. *Advances in Rheumatology* 2019; 59(1): 2.
7. Alpizar-Rodriguez D, Finckh A. Menopause and possible effect on association between age and anticyclic citrullinated peptide antibodies in women at a risk of rheumatoid Arthritis. *Journal Rheumatology* 2019; 4(1): 521-30.
8. Alabarse PV, Lora PS, Silva JM, Santo RC, Freitas EC, de Oliveira MS, et al. Collagen-induced arthritis as an animal model of rheumatoid cachexia. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 2018; 9(3): 603-12.
9. Burmester GR, Pope JEJTL. Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis. *Lancet* 2017; 389(10086): 2338-48.
10. Herrinton LJ, Woodworth TS, Eworuke E, Amsden LB, Liu L, Wyeth J, et al. Development of an algorithm to detect methotrexate wrong frequency error using computerized health care data. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety* 2019; 4(4): 1401-20.
11. Cipriani P, Ruscitti P, Carubbi F, Liakouli V, Giacomelli R. Methotrexate: an old new drug in autoimmune disease. *Expert review of Clinical Immunology* 2014; 10(11): 1519-30.
12. Neef T, Miller SD. Tolerogenic Nanoparticles to Treat Islet Autoimmunity. *Current Diabetes Reports* 2017; 17(10): 84.
13. Celardo I, Pedersen JZ, Traversa E, Ghibelli L. Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles. *Nanoscale* 2011; 3(4): 1411-20.
14. Rajan A, Vilas V, Philip DJJoML. Catalytic and antioxidant properties of biogenic silver nanoparticles synthesized using Areca catechu nut. *Journal of Molecular Liquids* 2015; 207: 231-6.
15. Bawarski WE, Chidlowsky E, Bharali DJ, Mousa SAJNN. *Biology, Medicine. Emerging Nanopharmaceuticals* 2008; 4(4): 273-82.
16. Korsvik C, Patil S, Seal S, Self WTJC. Superoxide dismutase mimetic properties exhibited by vacancy engineered ceria nanoparticles. *Chemical Communications* 2007; 10: 1056-8.
17. Del Turco S, Ciofani G, Cappello V, Navarra T, Caselli C, Gemmi M, et al. Anti-inflammatory and antioxidant effects of cerium oxide nanoparticles in human endothelial cells. *Plos One* 2013; 34(1): 16.
18. Casals E, Gusta MF, Piella J, Casals G, Jiménez W, Puntos VJF. Intrinsic and extrinsic Properties Affecting innate immune Responses to nanoparticles: The Case of Cerium Oxide 2017; 8: 970.
19. Kim EY, Durai M, Mia Y, Kim HR, Moudgil KD. Modulation of adjuvant arthritis by cellular and humoral immunity to Hsp65. *Frontiers in Immunology* 2016; 7: 203.
20. Ranjbar A, Ghasemi H, Abedian A, Kheiripour N. Cerium oxide nanoparticle modulates hepatic damage, inflammatory and oxidative stress biomarkers in a dose-dependent manner: an in vivo study of rat liver. *Nanomedicine Journal* 2018; 5(4): 245-50.
21. Wang X, He X, Zhang C-F, Guo C-R, Wang C-Z, Yuan CSJB, et al. Anti-arthritis effect of berberine on adjuvant-induced rheumatoid arthritis in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2017; 89: 887-93.
22. Abtahi Froushani SM, Delirezh N, Hobbenaghi R, Mosayebi GJ. Synergistic effects of atorvastatin and all-trans retinoic acid in ameliorating animal model of multiple sclerosis. *Immunological Investigation* 2014; 3(1): 54-68.

23. Froushani SMA, Zarei L, Ghaleh HEG, Motlagh BMJA. Estragole and methyl-eugenol-free extract of *Artemisia dracunculus* possesses immunomodulatory effects. *Avicenna Journal Phytomedicine* 2016; 6(5): 526.
24. Shushtari N, Froushani SMAJCJ. Caffeine augments The instruction of anti-inflammatory macrophages by the conditioned medium of mesenchymal stem cells. *Cell Journal*. 2017; 19(3): 415.
25. Pulli B, Ali M, Forghani R, Schob S, Hsieh KL, Wojtkiewicz G, et al. Measuring myeloperoxidase activity in biological samples. *PLoS One* 2013; 8(7): e67976.
26. Bryan NS, Grisham MBJFRB. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radical Biology & Medicine* 2007; 43(5): 645-57.
27. Ammitzboll CG, Steffensen R, Bogsted M, Horslev-Petersen K, Hetland ML, Junker P, et al. CRP genotype and haplotype associations with serum C-reactive protein level and DAS28 in untreated early rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Research & Therapy* 2014; 16(5): 475.
28. Toubi E, Vadasz Z. Innate immune-responses and their role in driving autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 2019; 18(3): 306-11.
29. Serra P, Santamaria P. Nanoparticle-based autoimmune disease therapy. *Clinical Immunology (Orlando, Fla)* 2015; 160(1): 3-13.
30. Lopez-Pascual A, Urrutia-Sarratea A, Lorente-Cebrian S, Martinez JA, Gonzalez-Muniesa P. Cerium oxide nanoparticles regulate insulin sensitivity and oxidative markers in 3t3-L1 adipocytes and C2C12 myotubes. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019; 2695289.
31. Adebayo OA, Akinloye O, Adaramoye OA. Cerium oxide nanoparticles attenuate oxidative stress and inflammation in the liver of diethylnitrosamine-treated mice. *Biological Trace Element Research* 2019; 23(1): 1-3.
32. O'Brien N, Cummins EJJoES, A HP. Ranking initial environmental and human health risk resulting from environmentally relevant nanomaterials. *Journal of Environmental Science and Health* 2010; 45(8): 992-1007.
33. Meldrum K, Robertson SB, Römer I, Marczylo T, Dean LSN, Rogers A, et al. Cerium dioxide nanoparticles exacerbate house dust mite induced type II airway inflammation. *Part Fibre Toxicol* 2018; 15(1): 24.
34. Chemin K, Gerstner C, Malmstrom V. Effector functions of CD4+ T cells at the site of local autoimmune inflammation-lessons from rheumatoid arthritis. *Frontiers in Immunology* 2019; 10: 353.
35. Jahan Tigh M, Abtahi Froushani S, 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.
36. Fairhurst AM, Wallace PK, Jawad ASM, 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): 29-33.
37. golbahari K, Abtahi Froushani M. Investigating the effects of Thymol on animal model of Rheumatoid Arthritis. *Journal of Fasa University of Medical Sciences* 2018; 8(3): 890-900.
38. Ren J, Feng Z, Lv Z, Chen X, Li JJT. Natural killer-22 cells in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis are an innate source of interleukin 22 and tumor necrosis factor- α . *Journal of Rheumatology* 2011; 38(10): 2112-8.

The Effects of Cerium Oxide Nanoparticles on the Rat Model of Rheumatoid Arthritis

Naji Zavareh E, Abtahi Froushani SM*

Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Received: 27 May 2019 Accepted: 16 Aug 2019

Abstract

Background & aim: Previous studies have shown that cerium oxide nanoparticles (CeO₂-NPs) have high pharmacological capacity due to their antioxidant and anti-inflammatory properties. Rheumatoid arthritis is a chronic and systemic autoimmune disease of unknown etiology. The aim of this study was to determine and effect of cerium oxide nanoparticles in rheumatoid arthritis model.

Methods: In the present experimental study, 40 Wistar rats weighing 90 to 110 g were collected from the laboratory animal center of the Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University. Rats were randomly divided into four equal groups of healthy, RA affected and treated with Cerium Oxide Nanoparticles (30 mg/kg oral, daily) and treated with Methotrexate (1 mg/kg oral, weekly). Rheumatoid arthritis was induced by Freund's complete adjuvant injection (0.1ml). Treatment was started when the rats exposed inflammatory symptoms in the tharsus joint (day 8) and continued until day 28 of the rats' slaughter. Data were analyzed using one-way ANOVA and Tukey tests.

Results: Cerium oxide nanoparticles had a good anti-inflammatory effect to reduce the severity of foot-pad inflammation in a pattern similar to methotrexate ($p=0.27$). The level of neutral red uptake in the peripheral blood phagocytic cell population and the blood level of myeloperoxidase in the treated and cerium oxide groups were 0.76 ± 0.08 and 10.39 ± 1.99 mmol / ml, respectively. Significantly lower levels were observed in the methotrexate group (0.98 ± 0.07 and 19.2 ± 2.59 mmol / ml) ($p<0.05$). Conversely, blood levels of nitric oxide in the methotrexate treated and recipient group (137.81 ± 12.18 μ M) exhibited a greater decrease than that of the cerium oxide nanoparticles (165.9 ± 13.29 mmol). / $p>$ p). There was no significant difference in severity of respiratory burst ($p = 0.09$) and CRP ($p=0.13$) in both treatment groups. Most importantly, unlike methotrexate, the intensity of lymphocyte proliferation in rats with arthritis treated with cerium oxide did not decrease significantly ($p=0.13$).

Conclusion: Due to the improved clinical and experimental appearance of affected rats, it seemed that, treatment with CeO₂-NPs is a promising strategy to improve the inflammation in a rat model of RA.

Keywords: Rheumatoid arthritis, Cerium nanoparticles, Methotrexate, Wistar rat

*Corresponding author: Abtahi Froushani SM, Department of Microbiology, Urmia University, Urmia, Iran
Email: sm.abtahi@urmia.ac.ir

Please cite this article as follows:

Naji Zavareh E, Abtahi Froushani SM. The Effects of Cerium Oxide Nanoparticles on the Rat Model of Rheumatoid Arthritis. Armaghane-danesh 2020; 24(5): 718--729