

## بررسی اثر بنزوات سدیم بر کاهش علائم التهابی در مدل حیوانی آرتریت روماتوئید

ناصر قلی جانی<sup>۱</sup>، عنایت انوری<sup>۲</sup>، نوش آفرین چناری<sup>۳</sup>، پیمان بمانی<sup>۴</sup>، کوروش کلانتر<sup>۳\*</sup>

(۱) مرکز تحقیقات بیماری های خود ایمنی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

(۲) گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام، ایلام، ایران

(۳) گروه ایمنی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۸/۲۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۱۱

### چکیده

**مقدمه:** آرتریت روماتوئید (Rheumatoid arthritis; RA) یا روماتیسم مفصلی، شایع ترین بیماری التهابی سیستمیک مفاصل بوده و جزء بیماری های خود ایمنی مزمن محسوب می شود. شیوع جهانی آن یک درصد گزارش شده است. بنزوات سدیم (Sodium benzoate; NaB) از متابولیت های دارچین بوده و به عنوان مواد نگهدارنده مواد غذایی استفاده می شود. هدف از این مطالعه، ارزیابی تغییر میزان CD52 در مدل حیوانی آرتریت روماتوئید درمان شده با NaB و هم چنین بررسی ارتباط بین مقدار سرمی CD52 و شدت بیماری RA می باشد.

**مواد و روش ها:** چهار گروه از رت های نر سالم، RA، RA درمان شده با NaB و RA درمان شده با پردنیزولون استفاده شد. RA با تزریق درون پوستی سوسپانسیون مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کشته شده با حرارت در ادجوانت ناقص فروند ایجاد شد. سپس طی دو هفته، از روز ۱۰ تا ۲۳ بعد از القاء RA، پیشرفت بیماری توسط معاینه های ماکروسکوپی از جمله توانایی راه رفتن، قرمزی پوست و تورم در محل مچ پا و مفاصل مچ دست و مفاصل کوچک انگشتان بررسی شد. علائم بالینی، رادیولوژیکی، بافت شناسی و نیز مقدار سرمی پروتئین CD52 نیز بررسی شد.

**یافته های پژوهش:** نتایج نشان داد که فعالیت کلی و راه رفتن موش های RA نسبت به کنترل نرمال کاهش یافت. شدت علائم بالینی RA در گروه دریافت کننده NaB و پردنیزولون نسبت به گروه RA درمان نشده به صورت معناداری کاهش یافت. تفاوت معنی داری بین سطح سرمی CD52 در حیوانات در گروه های مختلف دیده نشد.

**بحث و نتیجه گیری:** با توجه به نتایج مطالعه حاضر، تغییر سطح بیان CD52 در سرم گروه های مختلف از نظر آماری معنی دار نبود که نشان می دهد مکانیسم اثر بنزوات سدیم از طریق القاء CD52 نمی باشد.

**واژه های کلیدی:** بنزوات سدیم، آرتریت روماتوئید، موش صحرائی، CD52

\* نویسنده مسئول: گروه ایمنی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

Email: kalantark@sums.ac.ir

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

## مقدمه

آرتریت روماتوئید (Rheumatoid arthritis; RA) یک بیماری خودایمنی است و حدود یک درصد از جمعیت جهان به این بیماری مبتلا هستند. از مشخصات مهم این بیماری التهاب مزمن سینوویوم به ویژه در مفاصل کوچک می باشد که منجر به تخریب غضروف و مفصل می شود (۱) و در نهایت به درد، ناتوانی، مرگ و میر و هزینه های اجتماعی-اقتصادی زیادی ختم می گردد (۲). علت دقیق این بیماری هنوز مشخص نشده است اما طبق تحقیقات انجام شده عوامل ژنتیکی و محیطی و هم چنین اختلال در عملکرد سیستم ایمنی می توانند در ایجاد این بیماری نقش داشته باشند (۳). سلول های سیستم ایمنی مانند مونوسیت، ماکروفاژ، سلول های T (CD4+(T helper)، سلول های B و سایتوکاین های ترشح شده از آن ها نقش مهمی در آسیب های مفصلی بیماری آرتریت روماتوئید دارند (۴). یکی از عوامل اصلی ایجاد بیماری های خود ایمنی، نقص در عملکرد سلول های T تنظیم کننده (T-Regulatory; Tregs) می باشد. اگر چه عملکرد و نقش Tregs در تحمل ایمنی محیطی بیماران RA هنوز به اندازه کافی روشن نشده است، اما مطالعات نشان داده اند که در بیماران مبتلا به RA تعداد این سلول ها کاهش می یابد. از طرفی تعداد سلول های مذکور در مایع سینوویال بیماران مبتلا به RA بیشتر از خون محیطی آن ها گزارش شده است.

در مدل موشی مستعد دیابت (Non-obese diabetic; NOD) مشاهده شده است که انتقال جمعیت لنفوسیتی فاقد سلول های  $CD52^{hi}$ ، که خاصیت تنظیمی دارند ابتلا به بیماری دیابت را تسریع می کند (۵). برخی شواهد نشان می دهند که سلول های T تنظیمی در افراد دیابت تیپ ۱ دچار مشکل هستند که باعث اختلال در تنظیم پاسخ های ایمنی و پیشرفت این بیماری می شوند. مهار سیستم ایمنی به وسیله  $CD52$  مکانیسم شناخته شده ای است که بدن برای تنظیم و تعادل سیستم ایمنی از آن استفاده می کند (۶). به نظر می رسد درمان هایی که بتواند باعث افزایش تعداد و عملکرد و یا افزایش سطح

سرمی این مولکول شود یک راه درمانی موثر در بیماری RA باشد. در حال حاضر درمان های غیر استروئیدی برای کاهش تورم و در نتیجه درمان این بیماران استفاده می شود ولی به نظر می رسد درمان های کنونی با عوارضی از قبیل کاهش ضخامت استخوان ها، افزایش وزن و دیابت همراه است (۷). بر اساس شواهد موجود، گیاهان دارویی و یا مشتقات آن می توانند گزینه مناسبی برای درمان این گونه بیماری ها باشند. مشتقات گیاهی که در این مطالعه نیز استفاده شده سدیم بنزوات می باشد که از متابولیت دارچین مشتق شده است و به عنوان یک مکمل غذایی استفاده می شود. سدیم بنزوات از طریق مهار التهاب، تغییر تمایز سلول های T helper و افزایش جمعیت سلول های T تنظیمی عمل می کند (۸). این تاثیرات در مطالعه ای توسط براماچاری و همکاران در سال ۲۰۰۷ بیان شده است (۹).

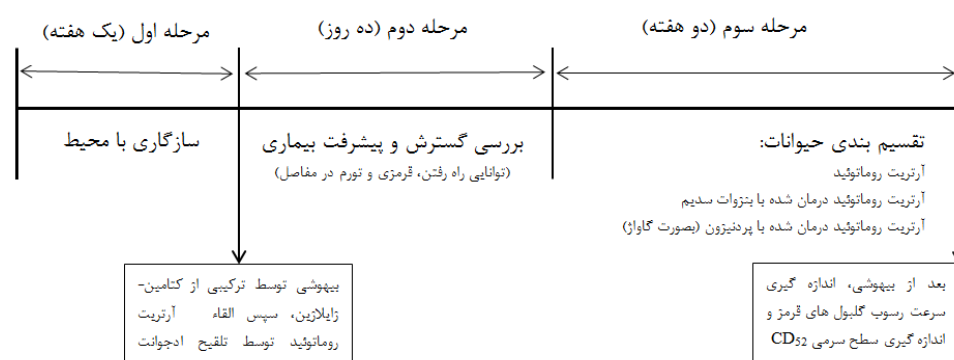
به منظور بررسی ایمنوپاتوژنز بیماری RA و نیز ارزیابی اثر ترکیبات دارویی بر روی آرتریت روماتوئید از مدل رتی Adjuvant-Induced Arthritis (AIA) ایجاد شده توسط ویتلی و همکاران در سال ۲۰۰۱ در مطالعات فراوانی استفاده شده است (۱۰). برای درمان RA از سلول های T تنظیم کننده (Treg) نیز استفاده شده است که در این روش سلول های T تنظیم کننده را از خون بیماران جدا می کردند و بعد از کشت و تکثیر در محیط آزمایشگاه دوباره به بیمار تزریق می کردند. این روش در بیماری های خود ایمنی در مدل های موشی از جمله مدل های آرتریت التهابی تا ۸۰ درصد موثر بوده است (۱۱). اگر چه در حال حاضر داروهای متعددی برای درمان آرتریت روماتوئید استفاده می شود اما در این بین بنزوات سدیم (NaB) توجه زیادی را به خود جلب کرده است. بنزوات سدیم، نمک سدیم اسید بنزوئیک و از متابولیت های دارچین بوده که به علت خاصیت ضد میکروبی به طور گسترده ای به عنوان مواد نگهدارنده غذا، نوشیدنی، داروها و ترکیبات آرایشی و نیز در اختلالات چرخه اوره و هیپرآمونمی در انسان استفاده می شود (۱۲). تا کنون هیچ اطلاعاتی در مورد خواص ضد التهابی و مهارکنندگی NaB در آرتریت روماتوئید منتشر نشده است. هدف از مطالعه حاضر،

مقایسه ای و تجربی دانشگاه علوم پزشکی شیراز خریداری شدند. تمام پروتکل های تجربی مربوط به حیوانات و مراقبت از آن ها مطابق با کمیته اخلاقی و قانونی دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام شد. برای کاهش استرس رت ها در محدوده دمای  $1 \pm 23$  درجه سانتی گراد و رطوبت استاندارد نگهداری شدند و هم چنین سیگنال متناوب نور و ۱۲ ساعت تاریکی-روشنایی رعایت شد. در مدت زمان آزمایش، رت ها به صورت اختیاری دسترسی به غذا و آب داشتند.

ارزیابی بیان  $CD_{52}$  در مدل حیوانات آرتریت روماتوئید درمان شده با NaB و هم چنین بررسی ارتباط بین مقدار سرمی  $CD_{52}$  و شدت بیماری RA می باشد.

### مواد و روش ها

آماده سازی حیوانات آزمایشگاهی: مطالعه حیوانی در سه مرحله انجام شد که مراحل و پروتکل انجام کار به صورت دقیق در ذیل ترسیم شده اند (شکل شماره ۱). موش های صحرایی نر Sprague-Dawley (SD) چهار هفته ای با میانگین وزنی ( $10 \pm 100$  گرم) از مرکز



شکل شماره ۱. مراحل و پروتکل انجام کار

درمان با پردنیزولون (به عنوان داروی استاندارد) تقسیم شدند. آب، NaB در آب ( $1666$  میلی گرم در کیلوگرم) و پردنیزولون در آب ( $10$  میلی گرم در کیلوگرم) به ترتیب در گروه AIA درمان نشده، گروه تحت درمان با NaB و گروه پردنیزولون درمان شده از طریق گاواژ به صورت خوراکی به موش های صحرایی داده شد. گروه های مورد مطالعه از نظر شدت اولیه AIA همسان شدند و ارزیابی وضعیت رت ها تا روز ۲۳ ادامه داشت. هم چنین یک گروه از رت های سالم که از نظر جنس و وزن با سایر گروه ها هماهنگ بودند نیز به عنوان گروه کنترل مورد استفاده قرار گرفتند. علائم بالینی، رادیولوژیک، بافت شناسی و نیز مقدار سرمی پروتئین  $CD_{52}$  در گروه های مورد مطالعه بررسی شدند. با توجه به این که بیماری AIA از روز ۱۰ پس از تزریق سوسپانسیون Mycobacterium tuberculosis (Mtb) ایجاد می شود، پیشرفت بیماری از روزهای ۱۰ تا ۲۳ بعد از تزریق، بین انگشتان پاها بررسی شد. ضایعات در هر

القاء آرتریت روماتوئید: حیوانات در ابتدا با تزریق ترکیبی کتامین-زایلازین به صورت داخل صفاقی ( $70$  میلی گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن کتامین و  $6$  میلی گرم به ازای هر کیلوگرم از وزن بدن زایلازین) بی هوش شدند. سپس آرتریت روماتوئید با تلقیح ادجوانت فروند (CFA) ایجاد شد. بدین صورت که، با تزریق درون پوستی یک دهم میلی لیتر از سوسپانسیون مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کشته شده با حرارت در ادجوانت ناقص فروند (غلظت  $20$  میلی گرم/میلی لیتر) در قاعده دم موش صحرایی ایجاد شد. گسترش و پیشرفت بیماری طی دو هفته در روزهای ۱۰ تا ۲۳ بعد از تزریق، توسط معاینه های ماکروسکوپی از جمله توانایی راه رفتن، قرمزی پوست و تورم در محل مچ پا و مفاصل مچ دست و مفاصل کوچک انگشتان بررسی شد.

ارزیابی علائم RA در گروه های مختلف: پس از مشاهده اولین علائم، رت ها به گروه های AIA درمان نشده، AIA درمان شده با NaB و AIA تحت

در هر حیوان ۱۶ خواهد بود. سیستم ارزیابی جهت AIA به صورت استاندارد انجام شد (جدول شماره ۱).

چهار پا از هر رت توسط دو محقق جداگانه از ۰ تا ۴ با توجه به میزان ادم و اریتم در مفاصل درجه بندی شدند؛ بر همین اساس در هر رت درجه آرتریت حداکثر

جدول شماره ۱. نحوه درجه بندی شدت آرتریت روماتوئید

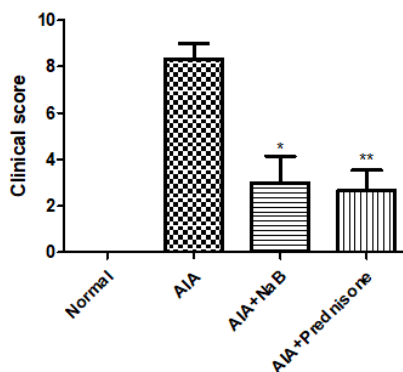
علامت	محل	شدت ضایعه	درجه بندی
تورم و قرمزی	مفاصل کوچک (و بزرگ)	صفر (صفر)	صفر
تورم و قرمزی	مفاصل کوچک (و بزرگ)	ضعیف (ضعیف)	۱
تورم و قرمزی	مفاصل کوچک (و بزرگ)	متوسط (متوسط)	۲
تورم و قرمزی	مفاصل کوچک (و بزرگ)	متوسط (شدید)	۳
تورم و قرمزی	مفاصل کوچک (و بزرگ)	شدید (خیلی شدید)	۴

### یافته های پژوهش

اثرات سدیم بنزوات بر آرتریت روماتوئید و مقایسه آن با اثرات پردنیزون: تاثیر NaB و پردنیزون بر روی درجه آرتریت در موش های AIA بررسی شد از نظر ظاهری پس از تلقیح، ضایعات التهابی و آرتریتی که همراه با ادم، اریتمی و گرما در مچ بود و بعد از حدود ۱۱ تا ۱۵ روز ظاهر شد. موش های AIA، حرکات آهسته ای ضعیفی را در پیاده روی نشان دادند و فعالیت کلی آن ها کاهش یافت. رت های AIA پیشرفت بیماری آرتریت را نشان دادند، که افزایش قابل توجهی در درجه آرتریت در مقایسه با موش های نمونه کنترل دیده شد. درجه آرتریت در رت های AIA  $8.1 \pm 3.3/15$  بود که در رت های درمان شده با NaB  $3.2 \pm 2$  به کاهش یافت ( $P=0.016$ ). درجه آرتریت در رت های AIA که با پردنیزون به عنوان داروی استاندارد درمان شده بودند  $2.66 \pm 1/5$  بود ( $P=0.007$ ، شکل شماره ۲).

تست الیزا: ۴۰ میکرولیتر از هر استاندارد یا نمونه، ۱۰ میکرولیتر از آنتی بادی و ۵۰ میکرولیتر horseradish peroxidase (HRP) به چاهک ها اضافه شدند و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. سپس پلیت ۵ بار با بافر مخصوص شستشو داده شد و بعد از اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر کروموژن A و B برای ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه قرار داده شد و بعد از اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر محلول stop solution جذب نوری نمونه ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

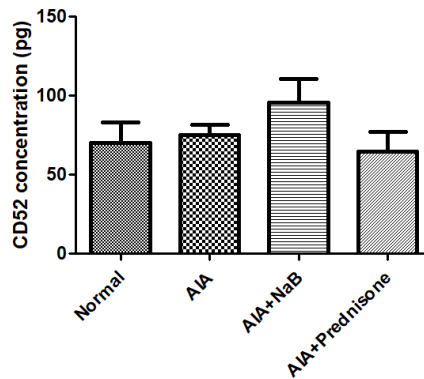
تحلیل آماری: تغییرات هر گروه به صورت  $mean \pm SEM$  محاسبه شد. نتایج با استفاده از روش آماری Kruskal-Wallis بررسی و مقایسه شده و مقادیر P کمتر از پنج درصد به عنوان تفاوت معنی دار تلقی گردید. نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS و ۱۶ آنالیز و نمودارها با استفاده از نرم افزار Graphpad prism رسم شدند.



شکل شماره ۲. مقایسه درجه علائم بالینی در سه گروه رت مبتلا به آرتریت القا شده با ادجوانت بدون دریافت دارو، همراه با دریافت ترکیب NaB، به همراه گروه استاندارد (دریافت کننده پردنیزون). گروه های که با علامت مشخص شده اند نسبت به گروه AIA قیاس شده اند. \* نشان دهنده  $P<0.05$  بوده و \*\* نشان دهنده  $P<0.01$  می باشد.

CD<sub>52</sub> در سرم رت های درمان شده با NaB  $33 \pm 72$   
 گروه نرمال  $95/44$ ،  $70/09 \pm 41/62$  AIA،  $12 \pm 48$   
 و  $75/23$  گروه استاندارد AIA پردنیزون  $25/28 \pm$   
 بود (شکل شماره ۳).

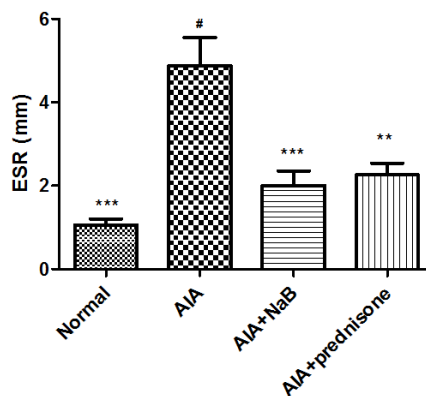
مقایسه سطح سرمی CD<sub>52</sub> در چهار گروه از حیوانات: در میزان بیان CD<sub>52</sub> بین گروه های AIA که با NaB و پردنیزون درمان شده بودند در مقایسه با گروه های نرمال و AIA تفاوت معناداری دیده نشد.



شکل شماره ۳. مقایسه سطح سرمی CD<sub>52</sub> در چهار گروه رت سالم، رت مبتلا به آرتریت القا شده با ادجوانت، رت بیمار دریافت کننده NaB و رت بیمار دریافت کننده پردنیزون به عنوان گروه استاندارد

سدیم بنزوات (AIA+NaB)  $(2 \pm 0/35)$  و پردنیزون (AIA+prednisone)  $(2/26 \pm 0/28)$  در مقایسه با گروه آرتریت روماتوئید (AIA) کاهش پیدا کرد و این تفاوت معنی دار بود. تفاوت معنی داری بین گروه نرمال (Normal) با آرتریت روماتوئید درمان شده با بنزوات سدیم (AIA+NaB) و پردنیزون (AIA+ prednisone) مشاهده نشد (شکل شماره ۴).

سرعت ته نشینی و رسوب گلبول های قرمز (Erythrocyte sedimentation rate; ESR) در گروه های تحت آزمایش: سرعت ته نشینی و رسوب گلبول های قرمز (ESR) در گروه آرتریت روماتوئید در قیاس با گروه نرمال، گروه درمان شده با پردنیزون (AIA+prednisone) و گروه درمان شده با سدیم بنزوات (AIA+NaB) افزایش یافت  $(4/88 \pm 0/67)$ . ESR در گروه های آرتریت روماتوئید درمان شده با



شکل شماره ۴. مقایسه سرعت رسوب و ته نشینی گلبول های قرمز در مدل موشی آرتریت روماتوئید القاء شده با ادجوانت فروند (AIA)، در مقایسه با آرتریت روماتوئید درمان شده با پردنیزون و آرتریت روماتوئید درمان شده با بنزوات سدیم به همراه گروه کنترل (نرمال). گروه های که با علامت مشخص شده اند نسبت به گروه AIA قیاس شده اند. \*\* نشان دهنده  $P < 0.01$  بوده و \*\*\* و # نشان دهنده  $P < 0.001$  می باشد.

## بحث و نتیجه گیری

در پیشرفت بیماری های خود ایمنی مثل RA تعادل بین سلول های T التهابی مانند Th1، Th17 و سلول مهارکننده ایمنی که T-reg می باشد دارای اهمیت ویژه ای است (۱۳). نقش مضر زیر مجموعه های سلولی Th1 و Th17 با افزایش سطح این دو زیر رده و سایتوکاین های مترشحه از آن ها در بیماران مبتلا به RA اثبات شده است. هم چنین نقش تعدادی از آن ها در ارتباط با ایجاد یا پیشرفت این بیماری در تحقیقات اخیر مشخص شده است (۱۴). ناحیه مفصل بیماران به دلیل وجود سایتوکاین هایی مانند IL-2 و IL-7 دچار اختلال می شود، بنا براین این سلول ها در محیط مفصل مهار می گردند. دلیل دیگر آن است که سلول های T اجرایی در محیط مفصل احتمالاً حساسیت کمتری نسبت به عملکرد مهارت سلول های T تنظیمی سینیویال نشان می دهند. شواهد نشان دهنده آن است که سایتوکاین IL-6 باعث ایجاد این مقاومت در برابر عملکرد مهارت سلول های T تنظیمی سینیویال می شود (۱۵). مطالعاتی در انسان و حیوان بر روی تغییر پروفایل سایتوکاین های سلول T از Th1 یا Th17 به Th2 یا Tregs در RA و نیز سایر بیماری های خود ایمنی با مکانیزم ایمنوپاتولوژیک مشابه RA، به عنوان شاخص پاسخ به درمان انجام شده است (۱۶). اخیراً سلول های تنظیم کننده جدیدی با بیان مولکول CD52 شناخته شده اند. این سلول ها تکثیر سلول های CD4+ و TCD8+ را متوقف می کنند (۱۷).

در مطالعه ای نشان داده شد که بنزوات سدیم، پاسخ های التهابی میکروگلیالی و آستروگلیالی را از طریق فعال سازی NFκB در سلول های گلیال و بیان iNOS و سایتوکاین ها را با تعدیل مسیر موالونات (mevalonate) و فعال سازی Ras کاهش می دهد (۱۸).

همان طور که در بخش نتایج ذکر شده، رت های دریافت کننده NaB درجه آرتریت کمتری را نشان داده بودند به طوری که سدیم بنزوات عملکرد ضد التهابی خود را با تخفیف علائم بالینی AIA و کاهش سرعت رسوب گلبول های قرمز (ESR) نشان داد و این کاهش

التهاب می تواند هم راستا با مطالعات پیشین باشد. به طور مثال در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۹ انجام شده است نشان داده اند که این ماده قادر به کاهش واسطه های التهابی در سلول های میکروگلیالی تحریک شده می باشد (۱۸). در مطالعه ای دیگر مشخص شد که اثرات محافظتی سدیم بنزوات در سلول های عصبی از طریق کاهش عوامل التهابی می باشد (۱۹).

هدف بعدی این مطالعه بررسی اثر این ترکیب بر روی سطح سرمی CD52 به عنوان یک ملکول مهارکننده التهاب بود. زیر رده هایی از سلول های T مهارگر که متفاوت از سلول های T تنظیمی (CD4+CD25+Foxp3+) می باشند شناسائی شده اند که مارکر CD52 را به میزان بالایی بیان می کنند (CD52<sup>hi</sup>CD4+). این سلول ها قادرند شکل محلول CD52 را تحت تاثیر فسفولیپاز C ترشح کنند. CD52 محلول با اتصال به پذیرنده مهارت siglec-10 از فعال شدن سلول های T جلوگیری می کند. در موش های مدل نوع یک دیابت تعداد و عملکرد این سلول ها مختل می شود. مطالعات متعددی نقش کلیدی CD52 در هموستاز ایمنی را تایید می کنند (۲۰). با توجه به اثرات موثر CD52، می توان از آن به عنوان داروی موثری در بیماری های خود ایمنی مثل آرتریت روماتوئید و مولتیپل اسکلرزیس استفاده کرد (۲۱). در مطالعه ای نشان داده شد که بر روی سلول های T تنظیمی CD4+ اختصاصی در جزایر پانکراس، آنتی ژن خودی جدیدی وجود دارد که مارکر سطحی CD52 را به میزان زیادی بیان می کند. CD52 محلول هم چنین به عنوان یک مولکول اجرایی مهارکننده توسط این سلول ها استفاده می شود. در نتیجه مولکول CD52 هم به عنوان مارکر سطحی و هم مولکول اجرایی برای این سلول ها محسوب می شود (۲۲). در مطالعه ما بعد از تزریق سدیم بنزوات سطح بیان CD52 در سرم گروه های مختلف بررسی گردید. اگر چه تجویز سدیم بنزوات باعث افزایش تقریباً ۲۷ درصدی در سطح سرمی CD52 نسبت به رت های درمان نشده گردید، اما نتایج از نظر آماری معنادار نبود که این عدم معناداری می تواند به علت کوتاه بودن

در نهایت به نظر می رسد سدیم بنزوات در کاهش علائم آرتریت روماتید موثر باشد ولی تایید مکانیسم اثر آن از طریق القاء CD52 نبوده و نیاز به بررسی های بیشتر داشته و به نظر می رسد در مطالعات آتی تمرکز بایستی بر روی سایر مکانیسم های احتمالی مهارکننده ایمنی بنزوات سدیم متمرکز باشد.

### سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از حمایت مالی معاونت تحقیقاتی دانشگاه علوم پزشکی شیراز صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایند.

کد اخلاق: IR.sums.med.rec.1398.353

### References

- Ogrendik M. Rheumatoid arthritis is an autoimmune disease caused by periodontal pathogens. *Int J Gen Med* 2013; 6: 383-6. doi: 10.2147/IJGM.S45929
- Littlejohn EA, Monrad SU. Early Diagnosis and treatment of rheumatoid arthritis. *Prim Care* 2018; 45: 237-55. doi: 10.1016/j.pop.2018.02.010
- Roberts CA, Dickinson AK, Taams LS. The Interplay between monocytes/macrophages and CD4<sup>+</sup> T cell subsets in rheumatoid arthritis. *Front Immunol* 2015; 6: 1-19. doi: 10.3389/fimmu.2015.00571
- McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 429-42. doi: 10.1038/nri2094
- Bandala E, Zhang Y, Reinwald S, Dromey JA, Lee BH, Qian J, et al. Tcell regulation mediated by interaction of soluble CD52 with the inhibitory receptor siglec10. *Nat Immunol* 2013;14: 741-8. doi: 10.1038/ni.2610
- Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J, et al. Relation of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory Tcell suppression of allergen driven Tcell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 2004; 363: 608-15. doi: 10.1016/S0140-6736(04)15592-X
- Crofford LJ. Use of NSAIDs in treating patients with arthritis. *Arth Res Ther* 2013; 15: 1-10. doi: 10.1186/ar4174
- Pahan K. Immunomodulation of experimental allergic encephalomyelitis by cinnamon metabolite sodium benzoate.

دوره زمانی مواجهه رت ها با NaB، یا به علت حجم نمونه پایین، متغیر بودن شدت بیماری در رت ها و پایین بودن حساسیت کیت الیزا استفاده شده باشد. از آن جا که فرم سطح سلولی CD52 (با ایجاد سیگنال های کمک تحریکی باعث تکثیر و فعالیت سلول های T می شود) و فرم ترشچی آن (با اتصال به مولکول مهاری Siglec10 سبب مهار تکثیر و فعالیت سلول های T می شود) عملکرد متفاوتی دارند (۲۳). لذا بررسی بیان سطحی مولکول CD52 با تکنیک فلوسیتومتری و ارزیابی اثر سدیم بنزوات بر نسبت CD52 ترشچی و سطح سلولی می تواند به فهم مکانیسم اثر ضد التهابی این مشتق گیاهی کمک کند.

- Immunopharmacol Immunotoxicol 2011; 33: 586-93. doi: 10.3109/08923973.2011.561861
- Brahmachari S, Pahan K. Sodium benzoate, a food additive and a metabolite of cinnamon, modifies Tcells at multiple steps and inhibits adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 2007; 179: 275-83. doi: 10.4049/jimmunol.179.1.275
- Whiteley PE, Dalrymple SA. Models of inflammation: adjuvant induced arthritis in the Rat. *Curr Protoc Pharmacol* 2001; 5: 1-5. doi: 10.1002/0471141755.ph0505s13
- Gerlag DM, Safy M, Maijer KI, Tang MW, Tas SW, Starmans MJF, et al. Effects of Bcell directed therapy on the preclinical stage of rheumatoid arthritis the Prairi study. *Ann Rheum Dis* 2019; 78: 179-185. doi: 10.1136/annrheumdis-2017-212763
- Khasnavis S, Pahan K. Sodium benzoate a metabolite of cinnamon and a food additive, upregulates neuroprotective Parkinson disease protein DJ1 in astrocytes and neurons. *J Neuroimmune Pharmacol* 2012; 7: 424-35. doi: 10.1007/s11481-011-9286-3
- Damsker JM, Hansen AM, Caspi RR. Th1 and Th17 cells adversaries and collaborators. *Ann Acad Sci* 2010; 1183: 211-21. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.05133.x
- Bazzazi H, Aghaei M, Memarian A, Asgarianomran H, Behnampour N, Yazdani Y. Th1 Th17 ratio as a new insight in

- rheumatoid arthritis disease. *Iran J Allerg Asth Immunol* 2018; 17: 68-77.
15. Leipe J, Skapenko A, Lipsky PE, Schulze H. Regulatory T cells in rheumatoid Arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: 93-09. doi: 10.1186/ar1718
16. Malemud CJ. Defective T cell apoptosis and T regulatory cell dysfunction in rheumatoid arthritis. *Cells* 2018; 7: 1-10. doi: 10.3390/cells7120223
17. Watanabe T, Masuyama J, Sohma Y, Inazawa H, Horie K, Kojima K, et al. CD52 is a novel costimulatory molecule for induction of CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *Clin Immunol* 2006; 120: 247-59. doi: 10.1016/j.clim.2006.05.006
18. Brahmachari S, Jana A, Pahan K. Sodium benzoate a metabolite of cinnamon and a food additive reduces microglial and astroglial inflammatory responses. *J Immunol* 2009; 183: 5917-27. doi: 10.4049/jimmunol.0803336
19. Khasnavis S, Pahan K. Sodium benzoate a metabolite of cinnamon and a food additive, upregulates neuroprotective Parkinson disease protein DJ1 in astrocytes and neurons. *J Neuroimmune Pharmacol* 2012; 7: 424-35. doi: 10.1007/s11481-011-9286-3
20. Bandalasanchez E, Goddard ED, Ngui K, Naselli G, Stone NL, et al. CD52 glycan binds the proinflammatory B box of HMGB1 to engage the siglec10 receptor and suppress human T cell function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018; 115: 7783-88. doi: 10.1073/pnas.1722056115
21. Holgate RG, Weldon R, Jones TD, Baker MP. Characterisation of a Novel Anti-CD52 Antibody with improved efficacy and reduced immunogenicity. *PLoS One* 2015; 10: 1-19. doi: 10.1371/journal.pone.0138123
22. Samten B. CD52 as both a marker and an effector molecule of T cells with regulatory action identification of novel regulatory T cells. *Cell Mol Immunol* 2013; 10: 456-8. doi: 10.1038/cmi.2013.38
23. Zhao Y, Su H, Shen X, Du J, Zhang X, Zhao Y. The immunological function of CD52 and its targeting in organ transplantation. *Inflam Res* 2017; 66: 571-8. doi: 10.1007/s00011-017-1032-8



## Effect of Sodium Benzoate on Reducing Inflammatory Symptoms in Animal Models of Rheumatoid Arthritis

Gholijani N<sup>1</sup>, Anvari A<sup>2</sup>, Chenari<sup>3</sup>, Bemani P<sup>3</sup>, Kalantar K<sup>3\*</sup>

(Received: July 2, 2019)

Accepted: November 16, 2019)

### Abstract

**Introduction:** Rheumatoid arthritis (RA) or arthritis is the most common systemic inflammatory disease of the joints and one of the chronic autoimmune diseases. The global prevalence of rheumatoid arthritis has been reported at 1%. Sodium benzoate (NaB) is a cinnamon metabolite used as a food preservative. This study aimed to evaluate the changes of CD<sub>52</sub> in the animal model of rheumatoid arthritis treated with NaB. Moreover, it was attempted to investigate the relationship between serum CD<sub>52</sub> and RA severity.

**Materials & Methods:** The male rats were divided into four groups of healthy, RA, RA treated with NaB, and RA treated with prednisolone. The RA was induced by intradermal injection of heat-killed Mycobacterium tuberculosis suspended in the Freund's incomplete adjuvant. During two weeks, from the 10th to 23rd days after RA induction, the disease progression was assessed through macroscopic examinations, including walking ability, redness of the skin, as well as swelling at the ankle, wrist, and small joints of the

fingers. Clinical, radiological, and histological symptoms, as well as the serum protein levels of CD<sub>52</sub>, were also investigated in this study. *Ethics code:* IR.sums.med.rec.1398.353

**Findings:** According to the results, the overall activity and walking ability of the RA rats decreased, compared to the healthy control group. Moreover, the severity of RA clinical symptoms was significantly reduced in the group treated with NaB and prednisolone, compared to the control group. There were no significant differences among the groups regarding the serum levels of CD<sub>52</sub>.

**Discussion & Conclusions:** There were no significant differences among the groups regarding the serum change of CD<sub>52</sub> expression level indicating that the mechanism of the effect of NaB was not induced by CD<sub>52</sub>.

**Keywords:** CD<sub>52</sub>, Rat, Rheumatoid arthritis, Sodium benzoate

1. Autoimmune Disease Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

2. Dept of Physiology, Faculty of Medicine, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

3. Dept of Immunology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

\* Corresponding author Email: kalantark@sums.ac.ir