Investigation of the plasma levels of CCL-17 and CCL-25 and their receptor gene expression in rheumatoid arthritis patients

Samimi Z[1], Kardideh B[2], Mohammadi-Farani A[3,4], Darabinejad M[5], Taghadosi M[6]

1. MSc of Immunology, Immunology Department, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. ORCID ID: 0000-0003-0333-8683
2. MSc of Immunology, Immunology Department, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.
3. Associate Professor of Pharmacology, Pharmaceutical Sciences Research Center, School of Pharmacy, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.
4. Associate Professor of Pharmacology, Department of Pharmacology, Toxicology and Medical Services, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.
5. Student of Pharmacy, School of Pharmacy, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.
6. Assistant Professor of Immunology, Department of Immunology, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran (Corresponding Author), Tel:+98-8334274623, Email:mtaghad@gmail.com, ORCID ID: 0000-0002-3516-0130

ABSTRACT

Background and Aim: Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune inflammatory disease of unknown etiology . The chemokines and their related receptors have a pivotal role in migration and homing of leukocyte involved in the pathogenesis of RA. The goal of this study was to measure the plasma levels of CCL-17 and CCL-25 and their receptors gene (CCR4 and CCR9) expression in rheumatoid arthritis patients.

Materials and Methods: 30 untreated newly diagnosed and 30 under treatment RA patients with disease modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) as well as 30 healthy subjects participated in this study. We assessed the gene expression of CCR4 and CCR9 by the real-time PCR method, and measured plasma levels of CCL25 and CCL17 by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Results: Comparison between control group and newly diagnosed rheumatoid arthritis patients showed significantly lower expression of CCR4 and CCR9 (P=0.047, P=0.049 respectively) in the latter group. In addition, the plasma level of CCL-25 was significantly lower in both newly diagnosed and under treatment RA patients compared to that in the healthy subjects (P=0.017, P=0.030 respectively).

Conclusion: The altered expression of chemokines and their related receptors, especially those involved in the leukocyte migration to the mucosa of the gastrointestinal tract may be associated with the pathogenesis of RA.

Keywords: Rheumatoid arthritis, Chemokines, Chemokine receptors, DMARD

Received: Feb 3,2019 **Accepted:** June 30, 2019

How to cite the article: Samimi Z, Kardideh B, Mohammadi-Farani A, Darabinejad M, Taghadosi M. Investigation of the plasma levels of CCL-17 and CCL-25 and their receptor gene expression in rheumatoid arthritis patients. SJKU 2019;24(3):121-133.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.3.121]

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و چهارم / مرداد و شهریور ۱۳۹۸/۱۳۳-۱۲۱

بررسی میزان سطح پلاسمایی کموکاین‌های CCL17 و CCL25 و میزان بیان ژن گیرنده‌های آنها در بیماران آرتریت روماتوئید

زهرا صمیمی[۱]، بهاره کاردیده[۲]، احمد محمدی فرانی[۳،۴]، مصطفی دارابی نژاد[۵]، مهدی تقدسی[۶]

۱. کارشناسی ارشد ایمونولوژی، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران. شناسه ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۰۳۳۳-۸۶۶۳

۲. کارشناسی ارشد ایمونولوژی، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

۳. دانشیار فارماکولوژی، مرکز علوم تحقیقات دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

۴. دانشیار فارماکولوژی، گروه فارماکولوژی، سم شناسی و خدمات پزشکی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

۵. دانشجوی دکتری عمومی داروسازی، گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

۶. استادیارایمونولوژی، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران (مولف مسئول)، تلفن ثابت : ۳۴۲۷۴۶۲۳-۰۸۳، پست الکترونیک: mtaghad@gmail.com ، شناسه ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۳۵۱۶-۰۱۳۰

چکیده

زمینه و هدف: آرتریت روماتوئید (RA) یک بیماری خود ایمن التهابی با علت ناشناخته است.کموکاین‌ها و گیرنده‌های آن‌ها نقش مهمی درمهاجرت یا لانه گزینی لکوسیت‌ها و سلول‌های دخیل در پاتوژنز این بیماری دارند. هدف از اجرای این طرح بررسی سطح کموکاین‌های CCL25 و CCL17 و گیرنده‌های آن‌ها (CCR9 و CCR4) در بیماران آرتریت روماتوئیداست.

روش بررسی: ۳۰ بیماردرمان نشده، ۳۰ بیمار تحت درمان با DMARD و ۳۰ فرد سالم در این مطالعه شرکت داشته‌اند. میزان بیان ژنی CCR9 و CCR4 با استفاده از تکنیک Real-time PCR ارزیابی شد. همچنین سطح پلاسمایی CCL25 و CCL17 با کمک روش الایزا بدست آمد.

یافته‌ها:بیان هر دو ژن CCR4 وCCR9 در گروه بیمار تازه تشخیص داده شده نسبت به گروه کنترل به صورت معناداری کمتر بود(به ترتیب۰/۰۴۷ =P و ۰/۰۴۹ =P). سطح پلاسمایی CCL-25 در هر دو گروه بیماران تازه تشخیص داده شده و تحت درمان به صورت معنادار کمتر از گروه کنترل بود (به ترتیب۰/۰۱۷ =Pو ۰/۰۳ =P)

نتیجه‌گیری:تغییر در بیان کموکاین‌ها و پذیرنده‌های آن، بخصوص کموکاین‌های دخیل در مهاجرت لوکوسیت‌ها به مخاط دستگاه گوارش ، احتمالا از عوامل دخیل در پاتوژنز آرتریت روماتوئید است.

کلمات کلیدی: آرتریت روماتوئید، کموکاین‌ها،گیرنده‌های کموکاینی، DMARD

وصول مقاله: ۹۷/۱۱/۱۴ اصلاحیه نهایی: ۹۸/۴/۴ پذیرش: ۹۸/۴/۹

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.3.121]

مقدمه

آرتریت روماتوئید (RA) یک بیماری التهابی مزمن با درگیری مفاصل است که به شکل عمده مفاصل کوچک و قرینه دست و پا را درگیر می‌کند. این بیماری شایع‌ترین شکل آرتریت مزمن التهابی است و غالبا موجب صدمه مفصلی و ناتوانی بدنی می‌شود(۱). التهاب مشاهده شده در ناحیه‌ی مفاصل با تجمع سلول‌های B، T CD4+ ، ماکروفاژها و نوتروفیل ها و همچنین هایپرپلازی غشای سینوویال شناخته می‌شود.در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید چند نوع سلول مختلف در شروع و پیشرفت بیماری نقش دارند که از آن جمله می‌توان به ماکروفاژها، مونوسیت‌ها، سلول‌های دندرتیک و سلول‌های T اشاره نمود. سلول‌های TH1 با ترشح IFN-γ باعث راه‌اندازی فرآیندهای التهابی از طریق فعال شدن ماکروفاژها و فراخوانی دیگر سلول‌ها می‌شوند. همچنین سلول‌های TH17 تولید کننده‌ی IL-17 در پاتوژنز بسیاری از بیماری‌ها از جمله لوپوس و RA حائز اهمیت هستند(۳، ۲). IL-17 یک میانجی قوی التهاب است و سلول‌های TH17 در خون محیطی و مایع مفصلی بیماران RA یافت می‌شوند (۴). کموکاین‌ها پروتئین‌های کوچکی هستند که دارای ۶۰ تا ۱۳۰ آمینواسید بوده و در چهار گروه ساختاری CXC، C ، CC وCX3C قرار می‌گیرند. تمام کموکاین‌ها اثر خود را با اتصال به گیرنده کموکاینی که به شکل G پروتئین هفت بار گذرنده از غشا بوده اعمال می‌کنند. گیرنده‌های کموکاینی در شرایط پیش التهابی، التهابی، در زمان مهاجرت لکوسیت‌ها، لنفوسیت‌ها و همچنین لانه گزینی، بیان آن‌ها دستخوش تغییرات عمدتا افزایشی و در بعضی موارد کاهشی می‌شوند. در بیماری آرتریت روماتوئید قسمت عمده سلول‌های التهابی درون سینوویال و بافت سینوویوم تجمع پیدا می‌کنند و با بیان گیرنده کموکاینی شرایط التهابی را تشدید می‌کنند. در بافت سینوویوم بیماران سلول‌های T فعال شده همانند مونوسیت‌ها گیرنده‌های کموکاینی CCR1، CCR2، CCR4، CCR7، CXCR3 وCCR5 را بیان می‌کنند(۵). علاوه بر این سلول‌های TH17 با بیان پذیرنده های کموکاینی چون CCR6 و CCR4 که اهمیت خاصی در آرتریت های التهابی دارند شناسایی می‌شوند، بیان لیگاندهای این پذیرنده‌ها (کموکاین‌های CCL20 و CCL17) نیز به مقدار زیادی در مفاصل ملتهب بالا می‌رود که این تقابل تامین کننده‌ی جهت‌یابی سلول‌های TH17 به سمت مفاصل التهابی است(۶). از دیگر گیرنده‌های کموکاینی که در لانه گزینی لنفوسیت‌ها و لکوسیت‌ها حائز اهمیت می‌باشد می‌توان به گیرنده کموکاینی CCR9 اشاره کرد. گیرنده کموکاینی CCR9 برای اولین بار روی تیموسیت‌هایی که توانسته بازآرایی زنجیره β خود را با موفقیت طی کنند بیان می‌شود. گیرنده کموکاینی CCR9 برای لانه گزینی لنفوسیت‌ها در بافت‌های لنفاوی وابسته به مخاط روده ضروری می‌باشد (۷). سلول‌های TH17 در مسیر فیزیولوژیک بازگردش خود به روده تحت تاثیر ویتامین A به شکل رتینوئیک اسید قرار گرفته و این مولکول با القای گیرنده کموکاینی CCR9 و گیرنده اینتگرین α4β7 در بازگردش مجدد این لنفوسیت‌ها از خون به دستگاه گوارش نقش دارند (۸). این احتمال می‌رود، میزان بیان گیرنده‌های کموکاینی CCR9 و CCR4 و لیگاندهای آن‌ها CCL17 و CCL25 که در مهاجرت لکوسیت‌ها و لنفوسیت‌ها نقش دارند در بیماران مبتلا به ارتریت روماتوئید در سطح لکوسیت‌ها و لنفوسیت‌ها دستخوش تغییر شود و این تغییر در مهاجرت پاتولوژیک این سلول‌ها به خون محیطی یا ناحیه سینوویال نقش داشته باشد، از این رو، اهداف مطالعه حاضر تعیین و مقایسه میزان سطح پلاسمایی CCL17 و CCL25 و بیان ژن گیرنده‌های کموکاینی آن‌ها CCR9 و CCR4 در لکوسیت‌ها و لنفوسیت‌های خون محیطی بیماران تازه تشخیص داده شده و همچنین بیماران تحت درمان با داروهای ضد روماتوئید تغییر دهنده

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.3.121]

روند بیماری (DMARD) مبتلا به آرتریت روماتوئید می-باشد.

روش بررسی

جمعیت مورد مطالعه

این پژوهش از نوع مورد-شاهدی است و مطابق با بیانیه‌ی هلسینکی و تصویب کمیته‌ی اخلاق (کد اخلاق IR.KUMS.REC.1396.34) دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه انجام شد. همه شرکت کنندگان رضایت آگاهانه را امضا کردند و در مورد اهداف و روش تحقیق مطلع شدند. بیماران بر اساس معیارهای طبقه‌بندی EULAR/ACR 2010 توسط یک متخصص روماتولوژیست تشخیص داده شدند (۹) و نمونه گیری در بازه زمانی تیرماه تا مهرماه سال ۱۳۹۶ از بیماران مراجعه کننده به کلینیک هلال احمر علوم پزشکی کرمانشاه صورت گرفت. افراد ورود یافته به این پژوهش ۶۰ بیمار مبتلا به آرتریت روماتوئید در دو گروه تازه تشخیص (بیمارانی که دارو دریافت نکردند) و تحت درمان (بیماران تحت درمان با متوتروکسات (۲۵- ۷/۵ میلی گرم/هفته)، هیدروکسی کلروکین (۲۰۰ میلی گرم/روز) و پردنیزولون (۱۰ – ۵ میلی-گرم/روز) همچنین ۳۰ فرد سالم (افراد فاقد هرگونه بیماری، مشکل التهابی، درد و تورم مفاصل) به عنوان گروه شاهد هستند. گروه شاهد پس از همسان‌سازی با گروه بیماران از لحاظ سن و جنس در همان بازه زمانی از بین افراد سالم در دسترس انتخاب شدند. اطلاعات دموگرافیک و خصوصیات بالینی بیماران و افراد سالم در جدول ۱ نشان داده شده است. لازم به ذکر است که بیماران با سابقه سایر بیماری‌های اتوایمیون، مفصلی، عفونت شدید، سرطان و همچنین زنان باردار از مطالعه حذف شدند.

جداسازی نمونه پلاسما

۵ میلی لیتر خون محیطی از هر شرکت کننده (بیمار و کنترل) به دست آمد. پلاسما با سانتریفیوژ کردن به مدت ۱۰ دقیقه در دور g ۳۰۰۰ جداسازی شد. و برای اندازه‌گیری بعدی سطح کموکاین‌ها در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

سنجش سطح پلاسمایی CCL17 و CCL25 سطح پلاسمایی CCL17 و CCL25 با استفاده از تکنیک ELISA وکیت R & D به روش ساندویچ بر حسب pg/ml مطابق پروتکل و با استفاده از دستگاه ELISA reader STAT FAX 4200تعیین شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA از سلول‌های خون محیطی طی ۱۲ ساعت پس از نمونه‌گیری با استفاده از کیت RNX PLUS و بر اساس پروتکل انجام شد. غلظت و خلوص RNA ی استخراج شده به وسیله دستگاه نانودراپ (NanoDrop 2000UV–Vis Spectrophotometer / Thermo Scientific, USA) و الکتروفروز ژل آگارز ۱٪ (RNA با کیفیت مناسب دو باند rRNA ی 28s و 18s با نسبت شدت حدود ۲ دارد) مورد بررسی قرار گرفت. برای سنتز cDNA از کیت Roche استفاده شد و نمونه‌ها برای انجام مراحل بعدی در دمای ۷۰- نگه داری شدند.

بررسی بیان ژن CCR4 و CCR9

به منظور طراحی پرایمر، توالی‌های mRNA ژن‌های هدف و ژن مرجع (GAPDH) از سایت NCBI گرفته شد. پرایمرها به صورت دستی طراحی شد و سپس با استفاده از سایت های oligoanalayzer و primer blastاختلاف دمای پرایمرها، عدم تشکیل پرایمر دایمر و اتصال غیر اختصاصی بررسی شد و در نهایت توالی پرایمرها جهت ساخت به شرکت تکاپوزیست سپرده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۳ ذکر شده است. برای رقیق سازی پرایمرها با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده برای هر پرایمر مقدار مشخصی آب Nuclease free که فاقد DNase و RNase می‌باشد به ویال‌ها افزوده شد و پرایمرها به نسبت ۱۰/۱ رقیق و در دمای ۲۰- برای انجام مراحل بعدی نگهداری شدند. واکنش Real-time

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.3.121]

PCRدر حجم کلی ۱۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر cDNA ، ۰/۵ ماکرولیتر از هر پرایمر، ۷/۵ ماکرولیتر مستر میکس سایبرگرین شرکت TAKARA(SYBR Green Master Mix: RNase H Plus SYBR Premix Ex Taq II) و ۵/۵ ماکرولیتر H_2O با استفاده از دستگاه Roche Life Science LightCycler® 96طبق برنامه ذکر شده در جدول ۴ انجام شد.

تحلیل آماری

تحلیل آماری داده‌های بدست آمده و رسم نمودارها به ترتیب با استفاده از نرم افزارهای SPSS نسخه ۲۴ وgraphpad prism نسخه ۷ صورت گرفت. برای مقایسه داده‌های نرمال (CCL-17، CCR-4 و CCR-9) در سه گروه از روش آماری ANOVA (و برای مقایسه میانگین بین گروه‌ها از ازمون Tukey استفاده شد) و از معادل ناپارامتری ANOVA ، KrusKal Wallis برای مقایسه داده‌های غیرنرمال (CCL-25) استفاده شد. محاسبات داده‌ها بین دو گروه تحت درمان و تازه تشخیص داده شده با روش T Test برای داده‌های نرمال (DAS-28) و Mann-Whitney U برای داده‌های غیر نرمال (ESR، تعداد مفاصل متورم و دردناک) انجام شد. تحلیل همبستگی نیز برای داده های نرمال و غیر نرمال به ترتیب با استفاده از همبستگی رتبه‌ای پیرسون و اسپیرمن انجام شد. در کل تحلیل سطح معنی داری آماری ۰/۰۵ و فاصله اطمینان ۹۵٪ در نظر گرفته شد. همچنین تمام داده‌ها به صورت ±SEM ذکر شده است.

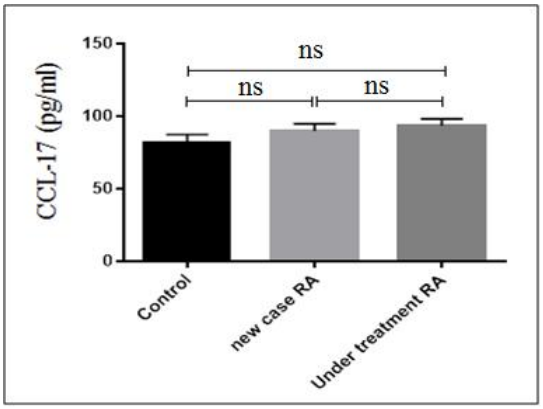
یافته‌ها

اطلاعات دموگرافیک هر بیمار به صورت جداگانه از طریق پرسشنامه جمع‌آوری گردید همچنین اطلاعات مربوط به علائم بیماری، داروها و دوز مصرف آن‌ها با همکاری پزشک معالج و بررسی پرونده پزشکی بیمار جمع‌آوری گردید این مطالعه بر روی ۳۰ بیمار آرتریت روماتوئید تازه تشخیص داده شده، ۳۰ بیمار آرتریت روماتوئید تحت درمان با داروهای DMARD (متوتروکسات، هیدروکسی کلروکین) و پردنیزولون و ۳۰ فرد سالم صورت گرفت. افراد بیمار و کنترل از نظر سن و جنس با یکدیگر همسان-سازی شدند به طوری که اختلاف معنی‌داری نداشتند. برخی از متغیرهای مورد مطالعه نظیر ESR از پرونده بیماران استخراج شد و یا از طریق پرسش از پزشک معالج به دست آمد. تعداد مفاصل متورم و دردناک توسط پزشک روماتولوژیست مورد بررسی قرار گرفت و بر اساس آن‌ها فعالیت بیماری (DAS-28) محاسبه گردید اطلاعات هر سه گروه در جدول ۱ نشان داده شده است.

سطح پلاسمایی CCL17 در گروه بیماران (تازه تشخیص داده شده و تحت درمان) و گروه کنترل با روش الایزا اندازه‌گیری و مقایسه شد. میانگین غلظت پلاسمایی CCL17 در گروه بیمار تازه تشخیص، گروه بیمار تحت درمان و گروه کنترل در جدول ۲ آورده شده است.نتایج نشان داد که میانگین سطح پلاسمایی CCL17 در گروه کنترل نسبت به هر دو گروه بیماران تازه تشخیص و تحت درمان کمتر بود اما این تفاوت به لحاظ آماری معنی‌دار نبود(به ترتیب P= ۰/۴۹۱ و p= ۰/۲۲۹). همچنین تفاوت آماری معنی داری در دو گروه بیمار تازه تشخیص داده شده و تحت درمان مشاهده نشد (p= ۰/۸۶۷) (شکل ۱).

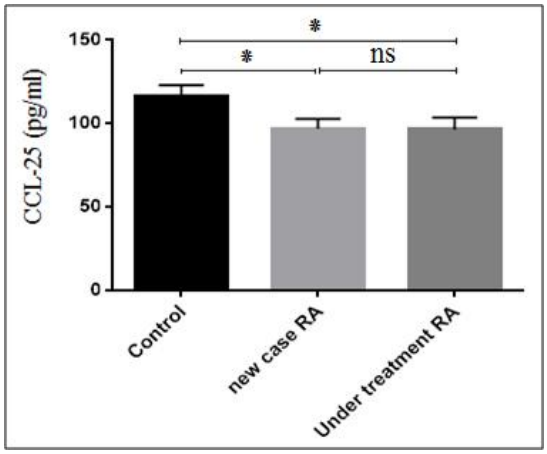
[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.3.121]



شکل ۱ : مقایسه میانگین سطح پلاسمایی CCL17 در گروه بیماران RA و گروه کنترل، ns: not significant

سطح پلاسمایی CCL25 در گروه بیماران (تازه تشخیص داده شده و تحت درمان) و گروه کنترل با روش الایزا اندازه‌گیری و مقایسه شد. میانگین غلظت پلاسمایی CCL25 در گروه بیمار تازه تشخیص، گروه بیمار تحت درمان و گروه کنترل در جدول ۲ آورده شده است. در این مطالعه سطح سطح پلاسمایی CCL25 در گروه کنترل به صورت معنی‌داری از هر دو گروه بیمار تازه تشخیص و تحت درمان بالاتر بود (به ترتیب$p= ۰/۰۱۷$ و $p= ۰/۰۳$) اما تفاوت آماری معنی داری در دو گروه بیمار تازه تشخیص و تحت درمان مشاهده نشد ($p= ۰/۸۲۰$) (شکل ۲).



شکل ۲ : مقایسه میانگین سطح پلاسمایی CCL25 در گروه بیماران RA و گروه کنترل، $p<0.05=$ *, ns: not significant

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

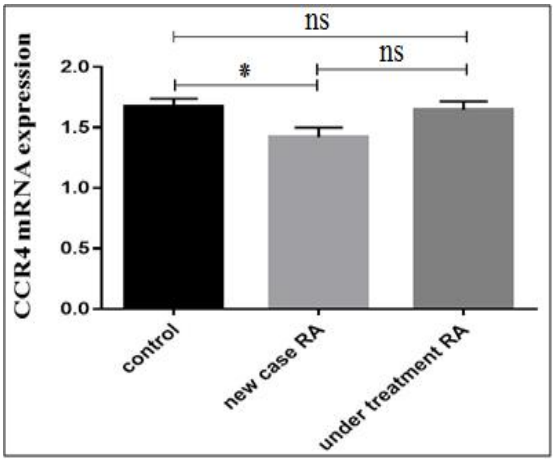
[DOI: 10.29252/sjku.24.3.121]

بیان نسبی هر کدام از ژن‌ها نسبت به ژن مرجع با استفاده از فرمول ریاضی Pffafl، محاسبه شد(۱۰).

R= [(Etarget) ΔCt target (control – sample)/(ERef) ΔCt Ref(control – sample)]

سطوح بیان ژن‌های CCR4 و CCR9 در نمونه‌های بیماران و افراد سالم مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت نتایج بدست آمده اختلاف معنی‌داری بین بیان mRNA ی ژن-های CCR4 و CCR9 در گروه‌های مورد مطالعه نشان داد(جدول ۲).

آنالیز داده‌ها نشان داد که بیان ژن CCR4 در گروه بیمار تازه تشخیص نسبت به گروه کنترل به صورت معنی‌داری کمتر بود (p= ۰/۰۴۷). بیان نسبی ژن CCR4 در گروه بیمار تازه تشخیص نسبت به گروه تحت درمان کمتر بود اما این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود (p= ۰/۰۷۸). همچنین میزان بیان ژن CCR4 در گروه تحت درمان نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (۰/۹۷۳ =p) (شکل ۳).

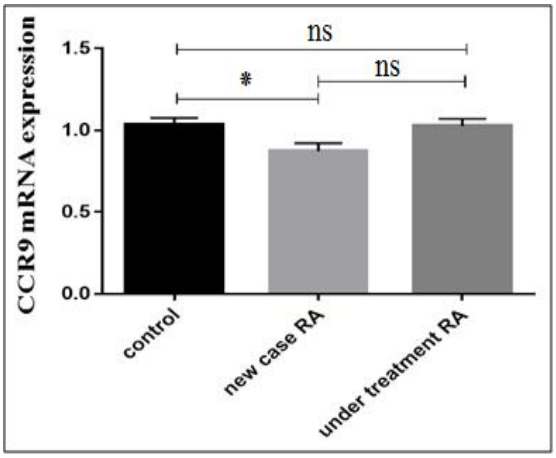


شکل ۳: مقایسه میانگین بیان ژنی CCR4 در گروه بیماران RA و گروه کنترل، *, ns: not significant p<0.05=

همچنین آنالیز داده‌ها نشان داد که بیان ژن CCR9 در گروه بیمار تازه تشخیص نسبت به گروه کنترل به صورت معناداری کمتر بود (p= ۰/۰۴۹). بیان نسبی ژن CCR9 در گروه بیمار تازه تشخیص نسبت به گروه تحت درمان کمتر بود اما این تفاوت از نظر آماری معنادار نبود (۰/۰۵۸ =p). همچنین میزان بیان ژن CCR9 در گروه تحت درمان نسبت به گروه کنترل اختلاف معناداری را نشان نداد (p= ۰/۹۹۷) (شکل ۴).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.3.121]



شکل ۴ : مقایسه میانگین بیان ژنی CCR9 در گروه بیماران RA و گروه کنترل، =0.05<p ns: not significant ,*

ارتباط بین سطح پلاسمایی CCL-17 و بیان ژن CCR-4 از طریق آزمون همبستگی پیرسون و ارتباط بین سطح پلاسمایی CCL-25 و بیان ژن CCR-9 از طریق آزمون همبستگی رتبه‌ای اسپیرمن مورد بررسی قرار گرفت. هیچ ارتباط معنی‌داری بین سطح پلاسمایی کموکین‌ها و بیان ژن‌های گیرنده‌های آن‌ها مشاهده نشد (p= ۰/۸۹۱، r= ۰/۰۱۹ و p= ۰/۴۴۳، r= ۰/۱۰۵).

جدول ۱ : مقایسه اطلاعات دموگرافیک، داروها و دوز مصرف آن‌ها، و متغیرهای بالینی بین گروه‌های مورد مطالعه

متغیرها		بیماران آرتریت روماتوئید		
		کنترل	تازه تشخیص	تحت درمان
تعداد		۳۰	۳۰	۳۰
میانگین سن		۴۷/۶۳ ± ۱/۹۱	۴۶/۹۷ ± ۲/۰۴	۴۷/۹۰ ± ۱/۸۵
جنسیت		۶ مرد/۲۴ زن	۶ مرد/۲۴ زن	۶ مرد/۲۴ زن
داروها (٪)	MTX	۰	۰	۱۰۰
	HCQ	۰	۰	۱۰۰
	PSL	۰	۰	۱۰۰
	Other DMARDs	۰	۰	۰
ESR (mm/h)		–	۳۰/۷۷±۴/۵	۱۵/۱۷±۱/۷۹**
تعداد مفاصلدردناک		–	۶/۳۷±۰/۶۵	۱/۲۷±۰/۲۴***
تعداد مفاصل متورم		–	۳/۱۷±۰/۴	۰/۷۳±۰/۱۴***
DAS-28		–	۳/۹۵±۰/۱۷	۲/۴۳±۰/۱۳***

MTX: متوتروکسات (۲۵– ۷/۵ میلی‌گرم/هفته) ، HCQ: هیدروکسی کلروکین (۲۰۰ میلی‌گرم/روز) ، PSL: پردنیزولون (۱۰ – ۵ میلی‌گرم/روز) Data are Mean±SEM ; *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 (محاسبات با روش T Test و Mann-Whitney U انجام شد)

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.3.121]

جدول ۲ : مقایسه میانگین داده‌های اصلی در سه گروه مورد مطالعه

متغیرها		بیماران آرتریت روماتوئید		*P* value
	کنترل	تازه تشخیص	تحت درمان	
CCL17(a)	۸۲/۱۰± ۵/۴۵	۹۰/۱۷± ۴/۷۷	۹۳/۷۷± ۴/۷۱	۰/۲۴۴
CCL25(b)	۱۱۶/۳۸± ۶/۴۶	۹۶/۸۷± ۵/۸۲	۹۶/۲۰± ۷/۲۲	*۰/۰۳۱
CCR4(a)	۱/۶۷± ۰/۰۶۷	۱/۴۲± ۰/۰۷۹	۱/۶۴± ۰/۰۷	*۰/۰۳۵
CCR9(a)	۱/۰۳± ۰/۰۴۵	۰/۸۷۲± ۰/۰۴۹	۱/۰۲± ۰/۰۴۴	*۰/۰۳۱

(a) آزمون ANOVA، (b) آزمون KrusKal Wallis

جدول ۳ : پرایمرهای اختصاصی جهت واکنش Real-time PCR

ژن	پرایمر رفت	پرایمر برگشت	اندازه
GAPDH	GAAACCTGCCAAGTATGATG	AGGAAATGAGCTTGACAAAG	188
CCR-4	CTGCCCCCACTGTATTCCTTG	GAGCCGCTTGTATTTGAACAGG	87
CCR-9	GGTCATGGCTTGCTGCTATAC	CGGTCAGGACAGTGATGGT	101

جدول ۴ : برنامه‌ی زمانبندی دستگاه Real-time PCR

نوع برنامه	زمان	دما	تعداد سیکل
Preincubation	۳۰ ثانیه	۹۵ درجه	۱
2 Step Amplfication	۵ ثانیه	۹۵ درجه	۴۰
	۳۰ ثانیه	۶۰درجه	
Melting	۵ ثانیه	۹۵ درجه	۱
	۶۰ ثانیه	۶۰ درجه	
	۱ ثانیه	۹۵ درجه	
Cooling	۳۰ ثانیه	۵۰ درجه	۱

بحث

بررسی ما نشان داد که سطح پلاسمایی کموکاین‌ها و بیان ژن گیرنده‌های آن‌ها در بیماران آرتریت روماتوئید دچار تغییر شده است. در واقع مهاجرت و لانه‌گزینی لکوسیت‌ها هم در افراد سالم و هم بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید وابسته به فرایندهای میانجی‌گری شده توسط کموکاین-هاست. نتایج این مطالعه نشان داد که بیان ژن CCR4 در گروه بیماران تازه تشخیص داده شده نسبت به گروه کنترل

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.3.121]

به طور معنی دار کاهش پیدا کرده است ولی میزان بیان این گیرنده کموکاینی بین دو گروه بیمار تحت درمان و افراد سالم تفاوت معنی داری از خود نشان نداد. همچنین سطح پلاسمایی CCL17 در هر دو گروه بیماران تازه تشخیص و تحت درمان از گروه کنترل بالاتر بود اما تفاوت آماری معنی‌داری نداشت. مطالعات مشابه در این زمینه به نتایج مختلفی دست یافته‌اند. تعدادی از این مطالعات، افزایش بیان CCR4 را در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید نسبت به گروه کنترل گزارش کرده‌اند در حالی که در برخی دیگر برای این گیرنده‌ی کموکاینی تفاوت معناداری بین این دو گروه مشاهده نشده است (۱۵-۹). در مورد سطح پلاسمایی CCL17 نیز نتایج متفاوتی به دست آمده است که برخی از مطالعات به نقش این کموکاین در شروع التهاب در بیماری آرتریت و سایر بیماری‌های اتوایمیون اشاره می‌کنند در حالی که در برخی دیگر تفاوت معنی‌داری در سطح سرمی این لیگاند در گروه کنترل با بیمارمشاهده نشده است(۱۷-۱۱). دلیل این مغایرت‌ها با مطالعه حاضر را می توان ناشی از ناهمگون بودن ماهیت بیماری آرتریت روماتوئید از لحاظ ایمونوپاتولوژی و روش سنجش این فاکتورها در زیرگروه‌های مختلف سلولی در سیستم ایمنی و با تکنیک‌های متفاوت دانست. در این مطالعات از جمعیت های مختلف بیماران RA در دوره‌های مختلفی از بیماری به عنوان نمونه استفاده شده است همچنین مطالعاتی که در گذشته درباره سطوح کموکاین‌ها در گردش خون و یا سینویوم صورت پذیرفته، بیماران مبتلا به RA را به گروه-های تازه تشخیص و یا درمان شده تقسیم نکرده‌اند ولی در بررسی حاضر بیماران در دو گروه جداگانه new case و تحت درمان در مطالعه شرکت داشته‌اند. علاوه بر آن مطالعه Pandya و همکارانش نشان دادسطح پلاسمایی CCL17 در بیماران بیشتر از گروه کنترل است ولی این اختلاف معنی‌دار نبودکه این نتیجه همسو با یافته‌های ما می‌باشد (۱۸) همچنین در یک مطالعه، جمعیت سلول های $CCR4^+$ در خون محیطی در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان داد. اگرچه مکانیسم دقیقی برای کاهش سلول‌های $CCR4^+$ T در خون محیطی در مطالعه مذکور و همچنین کاهش بیان ژنی CCR4 در خون محیطی در مطالعه ما مشخص نشده است با این حال کاهش این سلول‌ها در خون محیطی یا کاهش این پذیرنده کموکاینی می‌تواند ناشی از فراخوان سلول های $CCR4^+$ خون محیطی به مفاصل تحت تاثیر لیگاند CCL17 ترشح شده در مفاصل باشد (۱۹). از آنجا که گیرنده CCR4 در سطح سلول‌های Th2 و Treg نیز بیان می‌شود به نظر می-رسد کاهش سلول‌های $CCR4^+$ در خون محیطی بیماران RA به دلیل تمایل ورود این سلول‌ها به ناحیه التهاب و اعمال اثرات ضد التهابی از طریق ترشح سایتوکاین‌های مهاری به منظور تعدیل التهاب در ناحیه مورد نظر باشد (۱۵، ۲۰). با توجه به اینکه مطالعات موجود نشان می‌دهد که سطوح مخاطی، من جمله مخاط دستگاه گوارش نقش مهمی در آغاز بیماری RA دارند (۲۲، ۲۱)، در ادامه دراین مطالعه بیان ژنی مولکول CCR9 بر سطح لکوسیت‌های خون محیطی افرادی که بیماری آرتریت روماتوئید در آن‌ها به تازگی تشخیص داده شد است و همچنین بیماران تحت درمان، مورد بررسی قرار گرفت تا تغییرات بیان ژنی ملکول CCR9 و سطح پلاسمایی CCL25 که نقش مهمی در بازگردش لکوسیت‌ها به مخاط دستگاه گوارش و بالخص روده دارند بررسی شود. طبق یافته‌های این طرح میزان بیان ژن CCR9 در گروه بیماران RA تازه تشخیص به صورت معنی‌داری کمتر از گروه کنترل بود و در گروه بیماران تحت درمان اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل وجود نداشت. همچنین سطح پلاسمایی CCL25 در هر دو گروه بیمار تازه تشخیص و تحت درمان با اختلاف معناداری از گروه کنترل کمتر بود. مطالعات زیادی درباره نقش CCR9 و CCL25 در پاتوژنز بیماری RA انجام نشده است. در مطالعه‌ای به افزایش بیان CCR9 در مونوسیت-های خون محیطی بیماران RA و احتمال نقش CCL25 در تمایز مونوسیت‌ها به ماکروفاژها در بافت سینویال اشاره شده (۲۲). با این حال یافته‌های ما می‌تواند مطرح کننده این فرضیه باشد که درآغاز آرتریت روماتوئید کاهش بیان

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.3.121]

CCR9 در لکوسیت‌های خون محیطی و کاهش سطح CCL25 بازگردش لکوسیت‌ها را به مخاط روده دچار اختلال می‌کند . با توجه به نقش ثابت شده پذیرنده CCR9 و لیگاند آن CCL25 در بازگردش لوکوسیت ها به مخاط روده و همچنین اهمیت سیستم ایمنی این ناحیه از دستگاه گوارش در شروع پاتژنز آرتریت روماتوئید (۲۱)، یافته ما در این مطالعه اهمیت ایمنی مخاطی دستگاه گوارش و اختلال در مولکول‌های دخیل در مهاجرت لوکوسیت‌ها به این ناحیه را بیشتر در پاتوژنز آرتریت روماتوئید مطرح می-کند. همچنین از آنجا که میانگین سطح فاکتورهای مورد مطالعه (CCR4، CCR9 و CCL17) در گروه تحت درمان در مقایسه با گروه افراد سالم اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهند به نظر می‌رسد یکی از اثرات داروهای DMARD غیر بیولوژیک در درمان RA از طریق تاثیر بر روی بیان برخی کموکاین‌ها و پذیرنده‌های آن‌ها باشد که این فرضیه نیاز به بررسی بیشتر برای مستندشدن دارد.

نتیجه گیری

تغییر در بیان کموکاین‌ها و پذیرنده‌های آن، بخصوص کموکاین‌های دخیل در مهاجرت لوکوسیت‌ها به مخاط دستگاه گوارش ، احتمالا از عوامل دخیل در پاتوژنز آرتریت روماتوئید است.

تشکر و قدردانی

نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه به دلیل حمایت‌های مالی این طرح تشکر نمایند (شماره طرح: ۹۶۲۷۴). مقاله حاضر کار پایان نامه دانشجویی مصطفی دارابی نژاد می‌باشد که در دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه انجام شده است.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.3.121]

References

1. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. Nature 2003;423:356.
2. Nalbandian A, Crispin J, Tsokos G. Interleukin-17 and systemic lupus erythematosus: current concepts. Clin Exp Immunol 2009;157:209-15.
3. Miossec P. Interleukin-17 in rheumatoid arthritis: if T cells were to contribute to inflammation and destruction through synergy. Arthritis Rheum 2003;48:594-601.
4. Shahrara S, Huang Q, Mandelin AM, Pope RM. TH-17 cells in rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther 2008;10:R93.
5. Moser B, Willimann K. Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. Ann Rheum Dis 2004;63:ii84-ii9.
6. Mellado M, Martínez-Muñoz L, Cascio G, Lucas P, Pablos JL, Rodríguez-Frade JM. T cell migration in rheumatoid arthritis. Front Immunol 2015;6:384.
7. Campbell JJ, Butcher EC. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. Curr Opin Immunol 2000;12:336-41.
8.Wang C, Kang SG, HogenEsch H, Love PE, Kim CH. Retinoic acid determines the precise tissue tropism of inflammatory Th17 cells in the intestine. J Immunol 2010;184:5519-26.
9. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham III CO, et al. 2010 rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative.Arthritis Rheum 2010;62:2569-81.
10. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. Nucleic Acids Res 2001;29:e45-e.
11. Yang P, Kasai H, Zhao L, Xiao W, Tanabe F, Ito M. Increased CCR4 expression on circulating CD4+ T cells in ankylosing spondylitis, rheumatoid arthritis and systemic lupuserythematosus. Clin Exp Immunol 2004;138:342-7.
12. Yamada M, Yagita H, Inoue H, Takanashi T, Matsuda H, Munechika E, et al. Selective accumulation of CCR4+ T lymphocytes into renal tissue of patients with lupus nephritis. Arthritis Rheum 2002;46:735-40.
13. Ruth JH, Rottman JB, Katschke Jr KJ, Qin S, Wu L, LaRosa G, et al. Selective lymphocyte chemokine receptor expression in the rheumatoid joint. Arthritis Rheum 2001;44:2750-60.
14. Norii M, Yamamura M, Iwahashi M, Ueno A, Yamana J, Makino H. Selective recruitment of CXCR3^+ and CCR5^+ CD4^+ T cells into synovial tissue in patients with rheumatoid arthritis. Acta Med Okayama 2006;60:149-57.
15. LiN, Wei W, Yin F, Chen M, Ma TR, Wu Q, et al. The abnormal expression of CCR4 and CCR6 on Tregs in rheumatoid arthritis. Int J Clin Exp Med 2015;8:15043-53.
16. Moret FM, Hack CE, van der Wurff-Jacobs KM, de JagerW, Radstake TR, Lafeber FP, et al. Intra-articular CD1c-expressing myeloid dendritic cells from rheumatoid arthritis patients express a unique set of T cell-attracting chemokines and spontaneously induce Th1, Th17 and Th2 cell activity. Arthritis Res Ther 2013;15:R155.
17. Radstake TR, van der Voort R, ten Brummelhuis M, de Waal Malefijt M, Looman M, Figdor C, et al. Increased expression of CCL18, CCL19, and CCL17 by dendritic cells from patients with rheumatoid arthritis, and regulation byFc gamma receptors. Ann Rheum Dis 2005;64:359-67.
18. Pandya JM, Lundell A-C, Andersson K, Nordström I, Theander E, Rudin A. Blood chemokine profile in untreated early rheumatoid arthritis: CXCL10 as a disease activity marker. Arthritis Res Ther 2017;19:20.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.3.121]

19. Suzuki N, Nakajima A, Yoshino S, Matsushima K, Yagita H, Okumura K. Selective accumulation of CCR5+ T lymphocytes into inflamed joints of rheumatoid arthritis.Int Immunol 1999;11:553-9.
20. Thompson SD, Luyrink LK, Graham TB, Tsoras M, Ryan M, Passo MH, et al. Chemokine receptor CCR4 on CD4+ T cells in juvenile rheumatoid arthritis synovial fluid defines a subset of cells with increased IL-4: IFN-γ mRNA ratios. J Immunol 2001;161:6899-906.
21. Demoruelle MK, Deane KD, Holers VM. When and where does inflammation begin in rheumatoid arthritis. Curr Opin Rheumatol 2014;26:64-71.
22. Schmutz C, Cartwright A, Williams H, Haworth O, Williams JH, Filer A, et al. Monocytes/macrophages express chemokine receptor CCR9 in rheumatoid arthritis and CCL25 stimulates their differentiation. Arthritis Res Ther 2010;12:R161.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-13]

[DOI: 10.29252/sjku.24.3.121]