

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

Samimi Z¹, Kardideh B², Mohammadi-Farani A^{3,4}, Darabinejad M⁵, Taghadosi M⁶

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.

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 اریکد: 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. استادیار ایمونولوژی، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران (مؤلف مسئول)، تلفن ثابت: ۰۸۳-۳۴۲۷۴۶۲۳، پست الکترونیک: mtaghad@gmail.com، شناسه اریکد: 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 در مهاجرت یا لانه گزینی لکوسیت‌ها و سلول‌های دخیل در پاتوژنز این بیماری دارند. هدف از اجرای این طرح بررسی سطح کموکاین‌های CCL17 و CCL25 و گیرنده‌های آنها (CCR4 و CCR9) در بیماران آرتریت روماتوئید است.

روش بررسی: ۳۰ بیمار درمان نشده، ۳۰ بیمار تحت درمان با DMARD و ۳۰ فرد سالم در این مطالعه شرکت داشته‌اند. میزان بیان ژنی CCR4 و CCR9 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 و CCR9 در گروه بیمار تازه تشخیص داده شده نسبت به گروه کنترل به صورت معناداری کمتر بود (به ترتیب $P=0/047$ و $P=0/049$). 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 ترتیب $P=0/017$ و $P=0/03$).

نتیجه گیری: تغییر در بیان کموکاین‌ها و پذیرنده‌های آن، بخصوص کموکاین‌های دخیل در مهاجرت لکوسیت‌ها به مخاط دستگاه گوارش، احتمالاً 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

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 غالباً موجب صدمه مفصلی و ناتوانی بدنی می‌شود (۱). التهاب مشاهده شده در ناحیه‌ی مفاصل با تجمع سلول‌های B، CD4+ T، ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها 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 دندریتیک 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 تولیدکننده‌ی 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 و CX3C 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 لانه‌گزینی، بیان آن‌ها دستخوش تغییرات عمدتاً افزایشی و در بعضی موارد کاهش 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 و CCR5 را بیان می‌کنند (۵). علاوه بر این سلول‌های TH17 با بیان پذیرنده‌های کموکاینی چون CCR6 و CCR4 که اهمیت خاصی در آرتریت‌های التهابی دارند شناسایی می‌شوند، بیان لیگندهای این پذیرنده‌ها (کموکاین‌های CCL20 و CCL17) نیز به مقدار زیادی در مفاصل ملتهب بالا می‌رود که این تقابل تامین‌کننده‌ی جهت‌یابی سلول‌های TH17 به سمت مفاصل التهابی است (۶). از دیگر گیرنده‌های کموکاینی که در لانه‌گزینی 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 لانه‌گزینی 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 $\alpha 4\beta 7$ در بازگردش مجدد این لنفوسیت‌ها از خون به دستگاه گوارش نقش دارند (۸). این احتمال می‌رود، میزان بیان گیرنده‌های کموکاینی CCR9 و CCR4 و لیگندهای آن‌ها CCL17 و CCL25 که در مهاجرت لکوسیت‌ها و لنفوسیت‌ها نقش دارند در بیماران مبتلا به آرتریت 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

بعدی سطح کموکاین‌ها در ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

روند بیماری (DMARD) مبتلا به آرتریت روماتوئید می‌باشد.

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 2010 EULAR/ACR توسط یک متخصص روماتولوژیست تشخیص داده شدند (۹) و نمونه‌گیری 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 میلی‌گرم/هفته)، هیدروکسی کلروکین (۲۰۰ میلی‌گرم/روز) و پردنیزولون (۱۰-۵ میلی‌گرم/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 اتوایمون، مفصلی، عفونت شدید، سرطان و همچنین زنان باردار از مطالعه حذف شدند.

جداسازی نمونه پلازما

۵ میلی‌لیتر خون محیطی از هر شرکت کننده (بیمار و کنترل) به دست آمد. پلازما با سانتریفیوژ کردن به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰ g جداسازی شد. و برای اندازه‌گیری

سنجش سطح پلاسمایی CCL17 و CCL25 سطح پلاسمایی CCL17 و CCL25 با استفاده از تکنیک ELISA و کیت R & D به روش ساندویچ بر حسب pg/ml مطابق پروتکل و با استفاده از دستگاه ELISA reader STAT FAX 4200 تعیین 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 الکتروفورز 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- نگه‌داری 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 سایت‌های oligoanalyzer و primer blast اختلاف 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 رقیق‌سازی پرایمرها با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده برای هر پرایمر مقدار مشخصی آب Nuclease free که فاقد RNase و DNase می‌باشد به ویال‌ها افزوده شد و پرایمرها به نسبت ۱/۱۰ رقیق و در دمای ۲۰- برای انجام مراحل بعدی نگهداری شدند. واکنش Real-time

پزشک معالج و بررسی پرونده پزشکی بیمار جمع آوری گردید این مطالعه بر روی ۳۰ بیمار آرتريت روماتوئيد تازه تشخيص داده شده، ۳۰ بیمار آرتريت روماتوئيد 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-سازي شدند به طوري که اختلاف معنی داری 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 تشخيص داده شده و تحت درمان) و گروه کنترل با روش الیزا اندازه گیری و مقایسه شد. میانگین غلظت پلاسمایی CCL17 در گروه بیمار تازه تشخيص، 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 تشخيص و تحت درمان کمتر بود اما این تفاوت به لحاظ آماری معنی دار نبود (به ترتیب $P=0/491$ و $p=0/229$). همچنین تفاوت آماری معنی داری در دو گروه بیمار تازه تشخيص داده شده و تحت درمان مشاهده نشد ($p=0/867$) (شکل ۱).

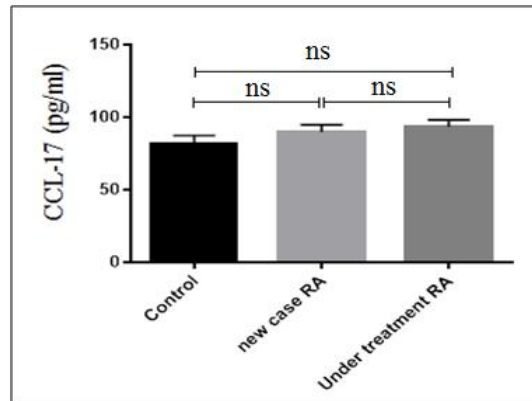
PCR در حجم کلی ۱۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر cDNA، ۰/۵ میکرولیتر از هر پرایمر، ۷/۵ میکرولیتر مستر میکس سایبرگرین شرکت TAKARA (SYBR Green Master Mix: RNase H Plus SYBR Premix Ex Taq II) و ۵/۵ میکرولیتر H_2O با استفاده از دستگاه Roche Life Science LightCycler® 96 طبق برنامه ذکر شده در جدول ۴ انجام شد.

تحليل آماری

تحليل آماری داده‌های بدست آمده و رسم نمودارها به ترتیب با استفاده از نرم افزارهای SPSS نسخه ۲۴ و graphpad 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 آزمون 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 تشخيص 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. تحليل همبستگی نیز برای داده‌های نرمال و غیر نرمال به ترتیب با استفاده از همبستگی رتبه‌ای پیرسون و اسپیرمن انجام شد. در کل تحليل سطح معنی داری آماری ۰/۰۵ و فاصله اطمینان ۹۵٪ در نظر گرفته شد. همچنین تمام داده‌ها به صورت $SEM \pm$ ذکر شده است.

یافته‌ها

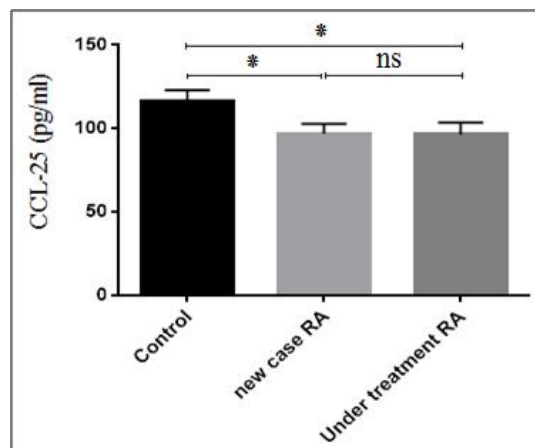
اطلاعات دموگرافیک هر بیمار به صورت جداگانه از طریق پرسشنامه جمع آوری گردید همچنین اطلاعات مربوط به علائم بیماری، داروها و دوز مصرف آنها با همکاری



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

تحت درمان بالاتر بود (به ترتیب $p=0/017$ و $p=0/03$) اما تفاوت آماری معنی داری در دو گروه بیمار تازه تشخیص و تحت درمان مشاهده نشد ($p=0/820$) (شکل ۲).

سطح پلاسمایی CCL25 در گروه بیماران (تازه تشخیص داده شده و تحت درمان) و گروه کنترل با روش الایزا اندازه گیری 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 پلاسمایی CCL25 در گروه کنترل به صورت معنی داری از هر دو گروه بیمار تازه تشخیص و



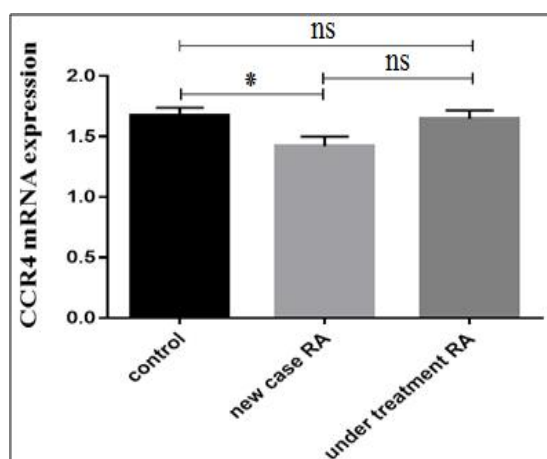
شکل ۲: مقایسه میانگین سطح پلاسمایی CCL25 در گروه بیماران RA و گروه کنترل، $p<0.05$ = *, ns: not significant

آنالیز داده‌ها نشان داد که بیان ژن CCR4 در گروه بیمار تازه تشخیص نسبت به گروه کنترل به صورت معنی‌داری کمتر بود ($p=0/047$). بیان نسبی ژن CCR4 در گروه بیمار تازه تشخیص نسبت به گروه تحت درمان کمتر بود اما این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p=0/078$). همچنین میزان بیان ژن CCR4 در گروه تحت درمان نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($0/973$) ($p=$ شکل ۳).

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

$$R = [(E_{target}) \Delta Ct_{target} (control - sample)] / (E_{Ref} \Delta Ct_{Ref}(control - sample))$$

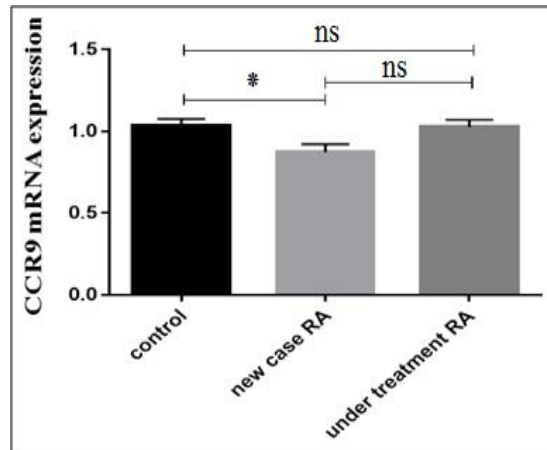
سطوح بیان ژن‌های CCR4 و CCR9 در نمونه‌های بیماران و افراد سالم مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت نتایج بدست آمده اختلاف معنی‌داری بین بیان mRNA ی ژن-های CCR4 و CCR9 در گروه‌های مورد مطالعه نشان داد (جدول ۲).



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

کمتر بود اما این تفاوت از نظر آماری معنادار نبود ($0/058$) ($p=$). همچنین میزان بیان ژن CCR9 در گروه تحت درمان نسبت به گروه کنترل اختلاف معناداری را نشان نداد ($0/997$) ($p=$ شکل ۴).

همچنین آنالیز داده‌ها نشان داد که بیان ژن CCR9 در گروه بیمار تازه تشخیص نسبت به گروه کنترل به صورت معناداری کمتر بود ($p=0/049$). بیان نسبی ژن CCR9 در گروه بیمار تازه تشخیص نسبت به گروه تحت درمان



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

ارتباط معنی‌داری بین سطح پلاسمایی کموکین‌ها و بیان ژن‌های گیرنده‌های آن‌ها مشاهده نشد ($p = 0/891$ ، $r = 0/105$ ، $p = 0/443$ و $r = 0/119$).

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

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

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

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

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

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

Kruskal Wallis (b)، ANOVA آزمون (a)

جدول ۳: پرایمرهای اختصاصی جهت واکنش Real-time PCR

ژن	پرایمر رفت	پرایمر برگشت	اندازه
GAPDH	GAAACCTGCCAAGTATGATG	AGGAAATGAGCTTGACAAAG	188
CCR-4	CTGCCCCACTGTATTCCTTG	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	۵ ثانیه	۹۵ درجه	
Amplification	۳۰ ثانیه	۶۰ درجه	۴۰
	۵ ثانیه	۹۵ درجه	۱
Melting	۶۰ ثانیه	۶۰ درجه	
	۱ ثانیه	۹۵ درجه	
Cooling	۳۰ ثانیه	۵۰ درجه	۱

بحث

هم در افراد سالم و هم بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید وابسته به فرایندهای میانجی‌گری شده توسط کموکاین-۱ هاست. نتایج این مطالعه نشان داد که بیان ژن CCR4 در گروه بیماران تازه تشخیص داده شده نسبت به گروه کنترل

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

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 معنی داری 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 (۹-۱۵). 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 معنی داری در سطح سرمی این لیگاند در گروه کنترل با بیمار مشاهده نشده است (۱۱-۱۷). دلیل این مغایرت‌ها با مطالعه حاضر را می‌توان 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 جمعیت‌های 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 سینیوم صورت پذیرفته، بیماران مبتلا به RA را به گروه‌های 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 داد سطح پلاسمایی CCL17 در بیماران بیشتر از گروه کنترل است ولی این اختلاف معنی دار نبود که این نتیجه همسو با یافته‌های ما می‌باشد (۱۸) همچنین در یک مطالعه، جمعیت سلول‌های CCR4⁺ در خون محیطی در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید کاهش معنی داری 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 سلول‌های 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 می‌رسد 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 مهمی 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 در این 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 مولکول 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 معنی داری کمتر از گروه کنترل بود و در گروه بیماران تحت درمان اختلاف معنی داری 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 مونسیت‌های خون محیطی بیماران RA و احتمال نقش CCL25 در تمایز مونسیت‌ها به ماکروفاژها در بافت سینیوال اشاره شده (۲۲). با این حال یافته‌های ما می‌تواند مطرح کننده این فرضیه باشد که در آغاز آرتریت روماتوئید کاهش بیان

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 لکوسیت‌ها به مخاط روده و همچنین اهمیت سیستم ایمنی این ناحیه از دستگاه گوارش در شروع پاتوژن آرتریت روماتوئید (۲۱)، یافته ما در این مطالعه اهمیت ایمنی مخاطی دستگاه گوارش و اختلال در مولکول‌های دخیل در مهاجرت لکوسیت‌ها به این ناحیه را بیشتر در پاتوژن آرتریت روماتوئید مطرح می‌کند. 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 مستند شدن دارد.

نتیجه گیری

تغییر در بیان کموکاین‌ها و پذیرنده‌های آن، بخصوص کموکاین‌های دخیل در مهاجرت لکوسیت‌ها به مخاط دستگاه گوارش، احتمالاً از عوامل دخیل در پاتوژن 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.

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, Willmann 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 lupus erythematosus. *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. Li N, 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 Jager W, 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 by Fc 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.

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.