Original Article

Evaluation of *Beclin-1* and *Atg5* genes expression levels in peripheral blood cells of patients with rheumatoid arthritis

Kardideh B[1], Sadeghalvad M[2], Samimi Z[1], Mohammadi-Motlagh HR[3], Taghadosi M[1]

1- Department of Immunology, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, I. R. Iran.
2- Department of Immunology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical sciences, Tehran, I. R. Iran.
3- Molecular Biologic Research Center, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, I. R. Iran.

Received: 2018/10/24 | Accepted: 2019/02/26

Abstract:

Background: Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory autoimmune disease, which primarily affects the joints. During RA development, T cells and other immune cells are recruited to the synovial tissue and promote RA. Autophagy is a process in which intracellular organelles and compounds are degraded. Autophagy as a regulator of cell homeostasis can affect immune cells activation and contribute in RA pathogenesis. The aim of this study was to evaluate the autophagy-related genes (Atgs) expression in two groups of RA patients and healthy subjects.

Materials and Methods: Peripheral blood was obtained from three groups of donors including 20 patients with early RA, 20 undertreatment RA patients (with methotrexate, hydroxychloroquine and prednisolone therapy) and 20 age- and sex-matched healthy subjects. The expression of two autophagy-related genes was investigated by the real-time PCR technique.

Results: The Beclin-1 expression showed a 3.41-fold increase in the patients with early RA compared to healthy subjects but in the under treatment patients it was 1.5 times higher than healthy persons ($P<0.05$). The Atg5 gene expression in the early RA patients increased by 2.4 times more than healthy subjects ($P<0.05$).

Conclusion: The findings of this study show that in early RA patients, the increased expression of Atgs can promote RA pathogenesis. Also, findings suggest that the decreased autophagy can reduce RA severity.

Keywords: Autophagy, Autophagy related genes, Rheumatoid arthritis, *Atg5*, *Beclin-1*

***Corresponding Author:**
Email: mtaghad@gmail.com
Tel: 0098 912 386 9556
Fax: 0098 214 274 6181

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, June, 2019; Vol. 23, No 2, Pages 135-142

Please cite this article as: Kardideh B, Sadeghalvad M, Samimi Z, Mohammadi-Motlagh HR, Taghadosi M. Evaluation of Beclin-1 and Atg5 genes expression levels in Peripheral Blood Cells of Rheumatoid Arthritis patients. ***Feyz*** 2019; 23(2): 135-42.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-12-17]

بررسی میزان بیان ژن‌های *Beclin-1* و *Atg5* در سلول‌های خون محیطی بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید

بهاره کاردیده [1]، مونا صادق الوعد [2]، زهرا صمیمی [1]، حمیدرضا محمّدی مطلق [3]، مهدی تقدسی [4*]

خلاصه:

سابقه و هدف: آرتریت روماتوئید یک بیماری خودایمنی التهابی مزمن است که به‌طور اوّلیه مفاصل را تحت تأثیر قرار می‌دهد. سلول‌های T و سایر سلول‌های ایمنی به بافت سینوویال فراخوانده شده، موجب پیشبرد این بیماری می‌شوند. اتوفاژی فرآیندی است که با تجزیه‌ی ارگانل‌های درون‌سلولی همراه است و به‌عنوان تنظیم‌کننده هموستاز سلول می‌تواند روی فعال‌شدن سلول‌های ایمنی تأثیر گذاشته، در پاتوژنز آرتریت روماتوئید مشارکت داشته باشد. هدف این مطالعه ارزیابی سطح بیان ژن‌های مرتبط با اتوفاژی در دو گروه از بیماران آرتریت روماتوئید و افراد سالم بوده است.

مواد و روش‌ها: خون محیطی از سه گروه از افراد، شامل ۲۰ بیمار درمان‌نشده‌ی آرتریت روماتوئید، ۲۰ بیمار آرتریت روماتوئید تحت درمان (با داروهای متوترکسات، هیدروکسی کلروکین و پردنیزولون) و ۲۰ فرد سالم تهیه شد. بیان دو ژن مرتبط با اتوفاژی Atg5 و Beclin-1 در سلول‌های خون محیطی با استفاده از روش Real time PCR ارزیابی شد.

نتایج: بیان ژن Beclin-1 به میزان ۳/۴۱ برابر در بیماران درمان‌نشده‌ی آرتریت روماتوئید نسبت به افراد سالم افزایش نشان داد اما بیان این ژن در بیماران تحت درمان نسبت به افراد سالم ۱/۵٤ برابر بود (P<۰/۰۵). بیان ژن Atg5 در بیماران درمان‌نشده‌ی آرتریت روماتوئید به میزان ۲/٤ برابر نسبت به افراد سالم افزایش داشت (P<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد در بیماران درمان‌نشده آرتریت روماتوئید، افزایش بیان ژن‌های اتوفاژی می‌تواند در پیشبرد پاتوژنز این بیماری دخیل باشد. به عبارت دیگر یافته‌ها نشان داد کاهش اتوفاژی می‌تواند شدت بیماری را در افراد مبتلا به آرتریت روماتوئید کم کند.

واژگان کلیدی: اتوفاژی، ژن‌های مرتبط با اتوفاژی، آرتریت روماتوئید، *Atg5*، *Beclin-1*

دو ماهنامه علمی– پژوهشی فیض، دوره بیست و سوم، شماره ۲، خرداد-تیر ۹۸، صفحات ۱٤۲-۱۳۵

مقدمه

آرتریت روماتوئید (Rheumatoid Arthritis) یک بیماری شایع خودایمنی است که با ناتوانی پیش‌رونده، درگیری‌های سیستمیک و موضعی همراه است. آرتریت روماتوئید با التهاب سینوویال، تورم مفاصل و تولید اتوآنتی‌بادی‌ها، تخریب غضروف و استخوان و عوارض سیستمیک مثل: اختلالات قلبی، عروقی و ریوی همراه است [۳–۱].

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

۲. دکتری تخصصی، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳. استادیار، مرکز تحقیقات بیولوژیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

۴. استادیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران

*** نشانی نویسنده مسؤول:**

کرمانشاه، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی

تلفن: ۰۹۱۲۳۸۶۹۵۵۶ **دورنویس:** ۰۲۱ ۴۲۷۴۶۱۸

پست الکترونیک: mtaghad@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۸/۲ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۱۳۹۷/۷/۱۲

به‌هم خوردن تعادل سیستم ایمنی در ایجاد آرتریت روماتوئید نقش مهمّی دارد و بسیاری از مطالعات، هر دو بازوی سیستم ایمنی یعنی ایمنی هومورال و سلولی را در ایجاد آرتریت دخیل می‌دانند. علاوه بر این سلول‌هایی مثل: مونوسیت‌ها و سلول‌های T و سایتوکاین‌های مترشحه از آن‌ها مثل: (Tumor Necrosis Factor) TNF، IL-8 و IFN-γ همچنین در ایجاد آرتریت روماتوئید نقش مهمّی دارند [٥،٤]. در میان زیرگروه‌های سلول‌های T، سلول‌های Th1 و Th17 در پیشبرد RA بیشترین نقش را دارند. فعال شدن بیشتر از حدّ نرمال سلول‌های T و سایر سلول‌های ایمنی و به‌هم خوردن هموستاز داخلی این سلول‌ها بیشترین نقش را در پیشبرد آرتریت روماتوئید دارد. از طرف دیگر اتوفاژی (Autophagy) به‌عنوان یک فرآیند کاتابولیک سلولی، نقش مهمّی در حفظ تعادل سلول‌ها و بازگردش اجزای آسیب‌دیده سلولی دارد. اتوفاژی فرآیندی است که طی آن، اتوفاگوزوم‌ها که محتوی اجزای سیتوپلاسمی هستند، با لیزوزوم‌ها ادغام شده، محتویات داخلی آن‌ها به زیرواحدهای سازنده‌شان شکسته می‌شود و در نهایت مورد استفاده خود سلول قرار می‌گیرد [٧،٦]. اتوفاژی دارای مراحل مختلفی است که شامل: ۱- القای اتوفاژی ۲- هسته‌گذاری اتوفاگوزوم ۳- بلوغ اتوفاگوزوم ٤- ادغام اتوفاگوزوم با لیزوزوم و

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-12-17]

۵- تجزیه محتویات اتوفاگوزوم می‌باشد. در هر کدام از مراحل یک‌سری از ژن‌های خاص فعال می‌شوند که دوتا از این ژن‌ها که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته‌اند، *Beclin-1* و *Atg5* هستند. *Beclin-1* موجب اتصال سایر پروتئین‌های مرتبط به اتوفاژی در جایگاه تشکیل اتوفاگوزوم می‌شود و مرحله هسته‌گذاری اتوفاگوزوم را به پیش می‌برد. Atg5 به‌صورت کمپلکس با Atg12 و Atg16L در ایجاد انحنای غشا و بلوغ اتوفاگوزوم نقش دارد [۶]. اتوفاژی با تأثیر گذاشتن بر تکامل، بقا و تکثیر لنفوسیت‌ها می‌تواند پاسخ‌های ایمنی علیه آنتی‌ژن‌های مختلف را تنظیم کند. اتوفاژی کنترل‌نشده با تعدادی از بیماری‌های خودایمنی مثل: آرتریت روماتوئید و لوپوس اریتروماتوز سیستمیک (SLE) مرتبط است [۸]. اتوفاژی می‌تواند موجب القای تکثیر در سلول‌های فیبروبلاست سینوویال در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید شود و همچنین مقاومت به آپوپتوز را در این سلول‌ها تنظیم کند. اتوفاژی در تحویل پپتیدهای سیترولینه به سلول‌های T و فعال کردن آن‌ها نقش دارد [۷-۵]. علاوه بر این، مطالعات جدید نشان می‌دهند افزایش اتوفاژی به‌طور مشخصی با التهاب پیش‌برنده بیماری آرتریت روماتوئید مرتبط است و بسیاری از داروهایی که برای درمان این بیماری استفاده می‌شوند، ممکن است فرآیند اتوفاژی را کاهش دهند [۹]. برای مثال کلروکوئین (CQ) و هیدروکسی کلروکین (HCQ) که به‌عنوان داروهای دارای کارایی بالا در درمان RA مورد استفاده قرار می‌گیرند، قادر به تنظیم اتوفاژی هستند [۱۰]. با توجه به نقش سلول‌های ایمنی در پیشبرد بیماری آرتریت روماتوئید و اهمیت اتوفاژی در تنظیم هموستاز داخلی سلول‌ها، بر آن شدیم تا در این مطالعه میزان بیان دو ژن مرتبط با اتوفاژی (یعنی *Beclin-1* و *Atg5*) را در سلول‌های خون محیطی دو گروه از بیماران آرتریت روماتوئید یعنی بیماران اوّلیه و بیماران تحت درمان نسبت به افراد سالم مورد بررسی قرار دهیم. چرا که با مشخص شدن میزان تغییرات بیان این ژن‌ها در گروه بیماران آرتریت روماتوئید درمان‌نشده و گروه تحت درمان می‌توان به اثرات داروهای رایج مورد استفاده برای درمان RA روی بیان این ژن‌ها پی‌برد. در آینده می‌توان در کنار داروهای مورد استفاده برای درمان آرتریت روماتوئید، این ژن‌ها را به‌عنوان یک رویکرد درمانی جدید مورد هدف قرار داد و جهت بهبود روند درمان بیماران آرتریت روماتوئید از آن‌ها بهره گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها:

این مطالعه به‌صورت تحلیلی- مقطعی است. جمع‌آوری نمونه‌ها به‌طور تصادفی از بین دو گروه از بیماران آرتریت روماتوئید (بیماران درمان‌نشده و بیماران تحت درمان با داروهای متوترکسات، هیدروکسی کلروکین و پردنیزولون) و گروه افراد سالم به‌عنوان گروه کنترل صورت گرفته است. نمونه‌های خون محیطی از بیماران مراجعه‌کننده به کلینیک هلال‌احمر علوم پزشکی کرمانشاه در بازه زمانی شش‌ماهه تابستان و پاییز ۹۵ جمع‌آوری شد. پس از تشخیص بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید توسط پزشک متخصص روماتولوژی مطابق با معیارهای EULAR/ACR و آزمایش‌های تأییدی اقدام به نمونه‌گیری از ۲۰ بیمار درمان‌نشده و ۲۰ بیمار تحت درمان (میانگین سنی ۵۰ سال) و ۲۰ فرد سالم (میانگین سنی ٤٦ سال) شد. گروه‌های تحت بررسی در این مطالعه از لحاظ سن و جنس همسان‌سازی شد. انتخاب تعداد بیماران مورد مطالعه بر اساس مطالعات قبلی در این زمینه انجام شد [۲]. بیمارانی که سابقه بیماری‌های اتوایمیون، مفصلی، عفونت شدید و سرطان داشتند و همچنین افرادی که دخانیات مصرف می‌کردند، از مطالعه خارج شدند. ابتدا توضیحات لازم در مورد طرح به افراد داده شد و هر شرکت‌کننده با اعلام رضایت شخصی و پر کردن فرم رضایت‌نامه در این مطالعه شرکت کرده است، کد اخلاق این پژوهش IR.KUMS.REC.1396.141 می‌باشد. شدت بیماری (DAS-28) بر اساس تعداد مفاصل متورم، تعداد مفاصل دردناک و ESR براساس فرمول زیر محاسبه گردید:

$$DAS\text{-}28 = 0.56(TJ)^{1/2} + 0.28\ (SJ)^{1/2} + 0.7\ \ln(ESR) + 0.14\ (GH)$$

(TJ: Number of Tender joints from 28 joints; SJ: Number of swollen joints from 28 joints; GH: Global Health)

استخراج RNA و سنتز cDNA:

استخراج RNA از سلول‌های خون محیطی بلافاصله پس از نمونه‌گیری با استفاده از پروتکل کیت RNX PLUS ساخت ایران انجام شد. کیفیت و کیت RNA استخراج شده به ترتیب توسط ژل الکتروفورز و دستگاه نانودراپ (NanoDrop Thermo Scientific) ارزیابی شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت تجاری تولید شرکت Roche (Transcriptor First Strand cDNA) و مطابق با دستورالعمل کیت انجام شد.

بررسی بیان ژن *Beclin-1* و *Atg5*:

با استفاده از تکنیک Real time PCR بیان نسبی Beclin-1 و Atg5 در سه گروه شامل: بیماران درمان‌نشده، بیماران تحت درمان و افراد سالم سنجیده شد. در این مطالعه از ژن *GAPDH* به‌عنوان ژن *Housekeeping* استفاده شد.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-12-17]

پرایمرهای این سه ژن با استفاده از سایت آنلاین Oligocalc و Outoanalyzer طراحی و برای بررسی ویژگی نیز با استفاده از سایت آنلاین NCBI بلاست شد. واکنش Real time PCR با استفاده از مسترمیکس Syber Green شرکت TAKARA و دستگاه Roche Life Science Lightcycler® 96 انجام شد. واکنش PCR در حجم ۲۰ µL مطابق پروتکل کیت و برای کنترل کار به‌صورت دوتایی بر روی هر نمونه صورت گرفت. برنامه‌ی زمانی دستگاه جهت تکثیر شامل سه مرحله به‌صورت ۱ سیکل preincubation با دمای ۹۵ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه، ٤٥ سیکل amplification به‌صورت ۹۵ درجه به‌مدت ۵ ثانیه، ٦٠ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت ۱ سیکل melting با دمای ۹۵ درجه به‌مدت ۵ ثانیه، ٦٠ درجه به‌مدت ٦٠ ثانیه و ۹۵ درجه به‌مدت ۱ ثانیه داده شد.

تحلیل آماری

تحت فرض کمّی بودن و نرمالیتی از آزمون ANOVA و t-Test استفاده شد. کلیه‌ی تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS ویرایش ۱٦ صورت پذیرفت. داده‌ها به‌صورت Mean±SD گزارش شدند. سطح معنی‌داری آماری، P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

مشخصات بالینی و آزمایشگاهی افراد مورد مطالعه در جدول شماره ۱ مشخص شده است. با استفاده از پرایمرهای طراحی شده (جدول شماره ۲) مقدار بیان هر کدام از ژن‌های Beclin-1 و Atg5 به‌صورت تفاوت در مقدار سیکل آستانه (CT) نسبت به ژن GAPDH براساس فرمول لیواک $2^{-\Delta CT}$) (1000×محاسبه شد. سپس با استفاده از روش (Quantile Normalization) این داده‌ها نرمال شدند به این صورت که پس از محاسبه ΔCT (تفاوت CT ژن مرجع از ژن هدف) برای هر فرد، از فرمول $2^{-\Delta CT}$ برای به‌دست آوردن میزان بیان هرکدام از ژن‌های Beclin-1 و Atg5 استفاده شد، در نهایت میانگین بیان این ژن‌ها برای سه گروه مورد بررسی به‌دست آمد (جدول شماره ۱ و ۲). بیان ژن *Beclin-1:* بیان ژن *Beclin-1* در بیماران درمان‌نشده نسبت به افراد کنترل به‌طور معناداری افزایش نشان می‌دهد، همچنین میزان بیان این ژن در افراد تحت درمان نسبت به افراد درمان‌نشده به‌طور معناداری کاهش می‌یابد. میزان بیان این ژن در افراد درمان‌نشده و تحت درمان به‌ترتیب ۳/٤۱ و ۱/٥٤ برابر نسبت به حالت کنترل است (P<۰/۰۵) (نمودار شماره ۱).

بیان ژن *Atg5:* بیان ژن *Atg5* در بیماران درمان‌نشده نسبت به افراد کنترل افزایش نشان داد که از لحاظ آماری معنادار بود. میزان بیان این ژن در افراد تحت درمان نسبت به افراد درمان‌نشده کاهش یافته است؛ اما از لحاظ آماری معنادار نمی‌باشد. میزان بیان این ژن در افراد درمان‌نشده و تحت درمان به‌ترتیب ۲/٤ و ۱/۲ برابر نسبت به حالت کنترل است (P<۰/۰۵) (نمودار شماره ۲).

جدول شماره ۱- مشخصات بالینی و آزمایشگاهی گروه‌های مورد مطالعه (صفحه ۵)

متغیر	بیماران درمان‌نشده (۲۰ =n)	بیماران تحت درمان (۲۰ =n)	کنترل (۲۰ =n)
سن (سال)	۵۰/۰٦۷±۳/۲۱۱	۵۰/۸۱±۱۲/۱۹	٤٦/۳٤±۸/۸۸
ESR (mm/h)	۲۸/٦۳±۵/۲٦	۱۵/۱٦±۱/۷۹*	-
DAS28	۳/۹۳±۰/۱۷۵	۲/٤۳±۰/۱۳ **	-
مصرف دارو			
متوترکسات (درصد)	-	۱۰۰	-
پردنیزولون (درصد)	-	۱۰۰	-
هیدروکسی کلروکین (درصد)	-	۱۰۰	-

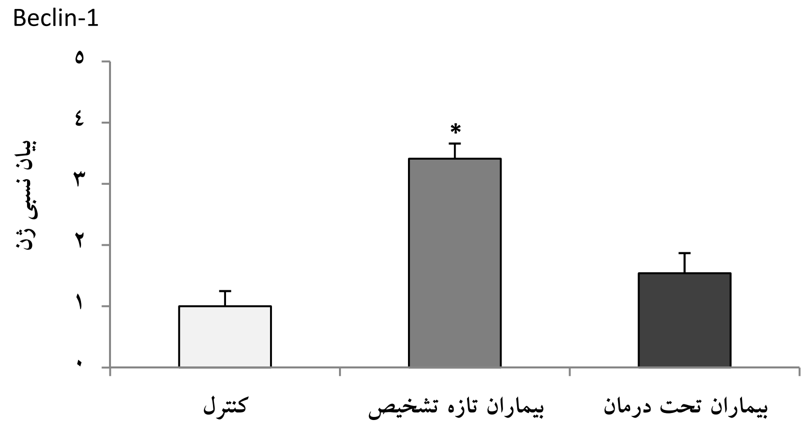
داده‌ها به‌صورت $\bar{X} \pm SD$ می‌باشد. میزان دوز مصرفی داروها به این صورت می‌باشد: متوترکسات: ۲۵-۷/۵ میلی‌گرم در هفته، هیدروکسی کلروکین ۲۰۰ میلی‌گرم روزانه، پردنیزولون ۱۰-۵ میلی‌گرم. DAS-28: Disease Activity Score-28، ESR: erythrocyte sedimentation rate.

*P<۰/۰۵، **P<۰/۰۱ ***P<۰/۰۰۱

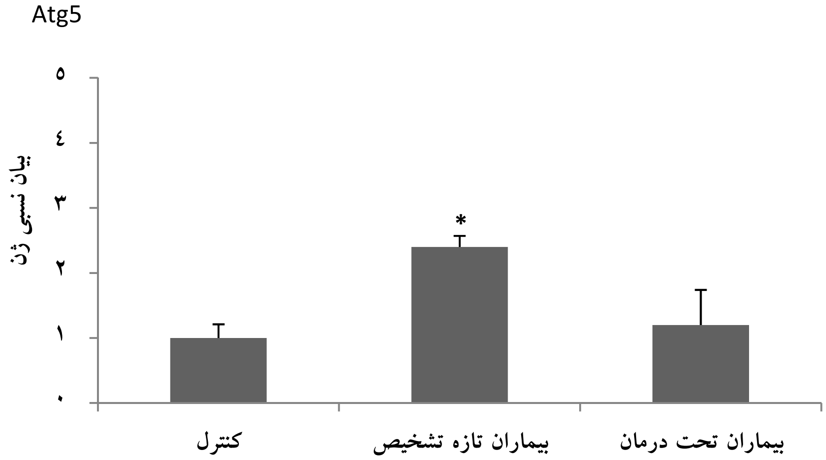
[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-12-17]

جدول شماره ۲- توالی پرایمرهای بررسی بیان ژن (صفحه ٦)

ژن	پرایمر	توالی	طول قطعه حاصل از تکثیر	دمای اتصال
GAPDH	Forward	AGGGGCtGCTTTTAACTCTGGT	۲۰۷ bp	٦۰°
	Reverse	CCCCACTTGATTTTGGAGGGA		
Beclin-1	Forward	AGCTGCCGTTATACTGTTCTG	۱۸۵ bp	٦۰°
	Reverse	ACTGCCTCCTGTGTCTTCAATCTT		
Atg5	Forward	TGGATTTCGTTATATCCCCTTTAG	۱۰۸ bp	٦۰°
	Reverse	CCTAGTGTGTGCAACTGTCCA		



شکل شماره ۱- مقایسه بیان ژن *Beclin-1* در گروه‌های بیماران درمان‌نشده، بیماران تحت درمان و افراد سالم: بیان ژن *Beclin-1* در بیماران درمان‌نشده نسبت به افراد کنترل به‌طور معناداری افزایش نشان می‌دهد، همچنین میزان بیان این ژن در افراد تحت درمان نسبت به افراد درمان‌نشده به‌طور معناداری کاهش می‌یابد. میزان بیان این ژن در افراد درمان‌نشده و تحت درمان به‌ترتیب ۳/٤۱ و ۱/۵٤ برابر نسبت به حالت کنترل است. میزان تغییر بیان ژن *Beclin-1* در مقایسه با نمونه‌های کنترل و به‌صورت میانگین±انحراف معیار گزارش شده است ($^{*}P<0/05$).



شکل شماره ۲- مقایسه بیان ژن *Atg5* در گروه‌های بیماران درمان‌نشده، بیماران تحت درمان و افراد سالم: بیان ژن *Atg5* در بیماران درمان‌نشده نسبت به افراد کنترل افزایش نشان داد که از لحاظ آماری معنادار بود. میزان بیان این ژن در افراد تحت درمان نسبت به افراد درمان‌نشده کاهش یافته است اما از لحاظ آماری معنادار نمی‌باشد. میزان بیان این ژن در افراد درمان‌نشده و تحت درمان به‌ترتیب ۲/٤ و ۱/۲ برابر نسبت به حالت کنترل است. میزان تغییر بیان ژن *Atg5* در مقایسه با نمونه‌های کنترل و به‌صورت میانگین±انحراف معیار گزارش شده است ($^{*}P<0/05$).

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-12-17]

بحث

در مطالعه حاضر، میزان بیان دو ژن مرتبط با اتوفاژی یعنی *Beclin-1* و *Atg5*، در سلول‌های خون محیطی در گروه بیماران درمان‌نشده‌ی مبتلا به آرتریت روماتوئید، بالاتر از گروه کنترل بود که این نتایج برای هر دوی این ژن‌ها از لحاظ آماری معنادار می‌باشد. در مراحل اوّلیه بیماری آرتریت روماتوئید، سلول‌های ایمنی از جمله سلول‌های T و مونوسیت‌ها فعال شده، در نواحی مفصلی تجمع می‌یابند [۱۱]. این سلول‌ها سایتوکاین‌های پیش‌التهابی را تولید می‌کنند که روی فیبروبلاست‌های سینوویال تأثیر گذاشته، در پاتوژنز آرتریت روماتوئید دخیل هستند [۱۲]، بدیهی است عواملی که در فعال شدن این سلول‌ها نقش دارند در پیشبرد بیماری آرتریت روماتوئید تأثیرگذار هستند. همان‌طوری که اشاره شد یکی از مکانیسم‌های مهم در حفظ هموستاز داخلی سلول‌ها، فرآیند اتوفاژی است. در این مطالعه دو ژن کلیدی در فرآیند اتوفاژی جهت بررسی انتخاب شد. Beclin-1 یکی از ژن‌های مهم در القای فرآیند اتوفاژی است و در هسته‌گذاری اتوفاگوزوم‌ها در غشا و فعال‌سازی سایر فاکتورهای شروع‌کننده اتوفاژی دخیل است، از طرف دیگر Atg5 به‌صورت کمپلکس با Atg7 در لیپیدی‌شدن microtubule-associated Light Chain 3) LC3) و تکامل‌یافتن غشای اتوفاگوزوم نقش دارد [۱۳]. افزایش بیان این ژن‌ها می‌تواند نشان‌دهنده افزایش فرآیند اتوفاژی در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید باشد، افزایش اتوفاژی در این شرایط می‌تواند زیرواحدهای مواد مغذی مورد نیاز برای سلول‌ها را فراهم کرده، موجب حفظ فعالیت سلول‌های ایمنی دخیل در آرتریت روماتوئید شود. در رابطه با نقش اتوفاژی در آرتریت روماتوئید اطلاعات زیادی در دست نیست؛ اما مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۶ انجام گرفته است، نشان می‌دهد فعال‌شدن بیش از حدّ سلول‌های T در بیماری آرتریت روماتوئید و مقاومت آن‌ها به آپوپتوز، ممکن است در نتیجه افزایش جریان اتوفاژی باشد [۱۴]. نتایجی که در مطالعه ما در رابطه با ژن‌های Beclin-1 و Atg5 به‌دست آمد با این مطالعه هم‌خوانی داشت. همچنین اتوفاژی علاوه بر در دسترس قرار دادن مواد مغذی برای سلول‌ها، در تحویل پپتیدهای سیترولینه به سلول‌های T از طریق مسیر عرضه MHCII هم نقش دارد و به این ترتیب محرک فعال‌شدن سلول‌های T است [۱۵]. از آن‌جایی که تعداد زیادی از سلول‌های خون محیطی را سلول‌های T تشکیل می‌دهند افزایش این ژن‌ها را می‌توان تا حدّ زیادی به سلول‌های T مرتبط دانست. در افراد تحت درمان، میزان بیان ژن‌های Beclin-1 و Atg5 در سلول‌های خون محیطی پایین‌تر از بیماران درمان‌نشده بود. هرچند به خاطر محدودیتی که در جمع‌آوری نمونه‌ها وجود داشت، امکان نمونه‌گیری از بیماران بیشتری وجود نداشت، اما به‌نظر می‌رسد به‌طور کلی داروهایی که برای درمان آرتریت روماتوئید استفاده می‌شوند، قادر به کاهش سطح اتوفاژی در بیماران هستند. این گروه از بیماران یک درمان مرکب متشکل از متوترکسات (Methotrexate)، پردنیزولون (Prednisolone) و هیدروکسی کلروکین (Hydroxychloroquine) دریافت کرده‌اند. متوترکسات که به‌طور گسترده در درمان سرطان استفاده می‌شود، همچنین در درمان آرتریت روماتوئید به‌کار می‌رود که قادر است با کاهش میزان سایتوکاین‌های پیش‌التهابی مثل: TNF وIL-6، واکنش‌های التهابی را در بیماران آرتریت روماتوئید کاهش دهد [۱۶]. از طرف دیگر مطالعه‌ای که بر روی رت انجام گرفته است، نشان می‌دهد تجویز متوترکسات می‌تواند مسیرهای آپوپتوز و اتوفاژی را با تأثیر بر فاکتورهای مرتبط با این مسیرها فعال کند. برای مثال متوترکسات می‌تواند AMPK را در بیماران آرتریت روماتوئید بالا ببرد [۱۸،۱۷]. AMPK یک حس‌گر انرژی داخل سلول است که می‌تواند تحت شرایط مختلف مسیرهای اتوفاژی را با تأثیر بر فاکتورهایی مثل: mTORC1 و FOXO3، تنظیم کند [۲۰،۱۹]. همچنین پژوهشگران در یک مطالعه نشان دادند استفاده از درمان‌های ترکیبی متشکل از متوترکسات و یک مهارکننده اتوفاژی نتایج مؤثرتری بر روند بهبود بیماران آرتریت روماتوئید دارد [۲۱]. با این حال مکانیسم دقیق اثر متوترکسات بر روی فرآیند اتوفاژی در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید نیازمند انجام مطالعات بیشتری است. پردنیزولون یک داروی گلوکوکورتیکوئید است که به‌طور رایجی برای درمان آرتریت روماتوئید به کار می‌رود که می‌تواند روند پیشرفت این بیماری را کاهش دهد [۲۲]. همچنین مطالعات نشان می‌دهد پردنیزولون می‌تواند با افزایش بیان پروتئین‌های پیش آپوپتوزی، سطح آپوپتوز را در سلول‌های ایمنی از جمله: سلول‌های T بالا ببرد [۲۳]. در رابطه با داروی هیدروکسی کلروکین بایستی اشاره کرد که این ترکیب به‌عنوان داروی ضدّ مالاریا کاربرد دارد اما در سال‌های اخیر در درمان بیماری‌های خودایمنی مثل آرتریت روماتوئید به کار می‌رود. هیدروکسی کلروکین می‌تواند ادغام اتوفاگوزوم‌ها را با لیزوزوم به‌طور مستقیم مهار کرده، به این ترتیب به‌عنوان یک سرکوب‌کننده قوی فرآیند اتوفاژی شناخته می‌شود [۲۴]. از طرفی مطالعات نشان می‌دهند اتوفاژی وابسته به TNF ممکن است در مقاومت به آپوپتوز در این بیماری نقش داشته باشد؛ چرا که به خوبی معلوم شده است مهار اتوفاژی به‌وسیله‌ی داروهای anti-TNF ممکن است آپوپتوز را فعال سازد [۲۵]. با توجه به اطلاعاتی که در رابطه

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-12-17]

با مکانیسم‌های تأثیر این داروها مطرح است، می‌توان گفت برایند اثرات این داروها احتمالاً در جهت کاهش سطح اتوفاژی و کاهش مقاومت به آپوپتوز (افزایش آپوپتوز) در سلول‌های خون محیطی بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید پیش می‌رود. هرچند شواهد موجود نشان می‌دهند متوترکسات می‌تواند اتوفاژی را بالا ببرد، اما باید به این نکته توجه کرد که این دارو همچنین قادر به فعال کردن آپوپتوز هم هست. این دو مسیر، ارتباط بسیار تنگاتنگی با هم دارند و در اکثر موقعیت‌های سلولی در جهت مخالف همدیگر عمل می‌کنند. این‌که کدام‌یک از این دو مکانیسم در سلول‌ها غالب‌تر باشد تا حدّ زیادی به سیگنال‌های محیطی این سلول‌ها بستگی دارد [۲۶]. از طرف دیگر همراه شدن متوترکسات با داروهایی مثل: پردنیزولون (افزایش‌دهنده آپوپتوز) و هیدروکسی کلروکین (مهارکننده اتوفاژی) می‌تواند سلول‌ها را به سمت کاهش اتوفاژی سوق دهد. کاهش اتوفاژی می‌تواند فعالیت سلول‌های ایمنی را کم کرده، مقاومت به آپوپتوز را در این سلول‌ها کاهش داده، به‌طور کلی روند بهبودی بیماران را تسهیل کند.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد بیان ژن‌های اتوفاژی در سلول-های خون محیطی بیماران آرتریت روماتوئید افزایش می‌یابد و همچنین مشخص شد که بیماران تحت درمان، سطوح کاهش یافته‌ای از ژن‌های مرتبط با اتوفاژی را نشان می‌دهند. به این ترتیب اهمیت اتوفاژی در پیشرفت بیماری آرتریت روماتوئید مطرح شد. کاهش سطح ژن‌های مرتبط با اتوفاژی بعد از درمان بیماران آرتریت روماتوئید می‌تواند نشان‌دهنده ارتباط تنگاتنگ مسیرهای تأثیرگذار داروهای مورد استفاده در بیماران آرتریت روماتوئید با این فرآیند باشد. بنابراین نیاز است که فرآیند اتوفاژی در روند درمان بیماران آرتریت روماتوئید بیشتر مورد توجه قرار گیرد. جهت روشن شدن مکانیسم دقیق اتوفاژی در بیماری آرتریت روماتوئید پیشنهاد می‌شود سایر ژن‌ها و فاکتورهای مؤثر در این مسیر ارزیابی شوند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه به‌دلیل حمایت‌های مالی این طرح تشکر نمایند (شماره طرح: ۹۶۱۵۰ و کد اخلاق: IR.KUMS.REC.1396.141). مقاله حاضر، بخشی از کار مرتبط با این طرح تحقیقاتی می‌باشد که در دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه انجام گرفته است. همچنین از تمام کسانی که در انجام این مطالعه همکاری داشتند، تشکر و قدردانی می‌شود.

References:

[1] Mcinnes IB, Schett G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. ***N Engl J Med*** 2011; 365(23): 2205-19.

[2] Zafari P, Sh M, Iranshahi N, Jalili C, Taghadosi M. Relationship between vitamin D plasma level and Foxp3 gene expression among rheumatoid arthritis patients Foxp3. ***Sci J Kurdistan Univ Med Sci*** 2018; (92): 40-8. [in Persian]

[3] Mcinnes IB, Schett G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis. ***Lancet*** 2017; 389(10086): 2328–37.

[4] Smolen JS, Aletaha D, Mcinnes IB. Rheumatoid arthritis. ***Lancet*** 2016; 388(10055): 2023–38.

[5] Cope AP. Review T cells in rheumatoid arthritis. ***Arthritis Res Ther*** 2008; 10 Suppl 1: S1.

[6] Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-arencibia M, Green-thompson ZW, et al. Regulation of Mammalian Autophagy in Physiology and Pathophysiology. ***Physiol Rev*** 2010; 90(40): 1383–435.

[7] Naito T, Tanaka H, Naoe Y, Taniuchi I. Transcriptional control of T-cell development. ***Int Immunol*** 2018; 23(11): 661–8.

[8] Vomero M, Barbati C, Colasanti T, Perricone C, Novelli L, Ceccarelli F, et al. Autophagy and Rheumatoid Arthritis: Current Knowledges and Future Perspectives. ***Front Immunol*** 2018; 9(July).

[9] Chen Y, Chang C, Chen H, Hsieh C, Tang K, Yang M, et al. Association between autophagy and inflammation in patients with rheumatoid arthritis receiving biologic therapy. ***Arthritis Res Ther*** 2018; 20(268): 1–11.

[10] Ramiro S, Sepriano A, Chatzidionysiou K, Nam JL, Smolen JS van der HD, Al. E. Safety of synthetic and biological DMARDs: a systematic literature review informing the 2013 update of the EULAR recommendations for management of rheumatoid arthritis. ***Ann Rheum Dis*** 2014; 73(3): 529–35.

[11] Li S, Liao W, Chen M, Shan S, Song Y, Zhang S, et al. Expression of Programmed Death-1 (PD-1) on CD4 + and CD8 + T cells in Rheumatoid Arthritis. ***Inflammation*** 2014; 37(1): 116–21.

[12] Mellado M, Laura Martinez-Munoz, Graciela Cascio, Pilar Lucas JP, Rodnguez-Frade and JM. T cell migration in rheumatoid. ***Front Immunol*** 2015; 6(July).

[13] Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. Cell Death Differ. ***Nature Publishing***

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-12-17]

Group 2011; 18(4): 571–80.
[14] Olmer M, Williams GW, Venkatanarayanan HB. Increased autophagy in CD4+T cells of rheumatoid arthritis patients results in T-cell hyperactivation and apoptosis resistance Jorg. ***Eur J Immunol*** 2016; 1–32.
[15] Dai Y, Hu S. Recent insights into the role of autophagy in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. ***Rheumatology (Oxford)*** 2016; 55(3): 403-10.
[16] Guma M, Wang Y, Viollet B, Liu-bryan R. AMPK Activation by A-769662 Controls IL-6 Expression in Inflammatory Arthritis. ***Plose One*** 10(10) 2015; 1–13.
[17] Thornton CC, Calay D, Birdsey GM, Bauer A, Mylroie H, Morley BJ, et al. Methotrexate-mediated activation of an AMPK- CREB-dependent pathway: a novel mechanism for vascular protection in chronic systemic in fl ammation. ***Basic Transl Res*** 2015; 1–10.
[18] Kandemir FM, Kucukler S, Caglayan C, Gur C, Batil AA GI. Therapeutic effects of silymarin and naringin on methotrexate- induced nephrotoxicity in rats: Biochemical evaluation of anti-inflammatory, antiapoptotic, and antiautophagic properties. ***J Food Biochem*** 2017; 41(5).
[19] Sanchez AM, Csibi A, Raibon A, Cornille K, Bernardi H, Candau R. AMPK Promotes Skeletal Muscle Autophagy Through Activation of Forkhead FoxO3a and Interaction With Ulk1. ***J Cell BioChem*** 2012; 113(2): 695-710.
[20] Zheng F, Wu J, Zhao S, Luo Q, Tang Q, Yang L, et al. Baicalein increases the expression and reciprocal interplay of RUNX3 and FOXO3a through crosstalk of AMPK α and MEK / ERK1 / 2 signaling pathways in human non-small cell lung cancer cells. ***J Exp Clin Cancer Res*** 2015; 34: 41.
[21] Xu K, Cai YS, Lu SM, Li XL, Liu L, Li Z et al. Autophagy induction contributes to the resistance to methotrexate treatment in rheumatoid arthritis fibroblast-like synovial cells through high mobility group box chromosomal protein 1. ***Arthritis Res Ther*** 2015; 17(374).
[22] Beltrametti SP, Ianniello A, Ricci C. Chronotherapy with low-dose modified-release prednisone for the management of rheumatoid arthritis: a review. ***Ther Clin Risk Manag*** 2016; 12: 1763–76.
[23] Smith LK, Cidlowski JA, Group ME. Glucocorticoid-induced apoptosis of healthy and malignant lymphocytes. ***Prog Brain Res*** 2016; 6123(10): 1–30.
[24] Rockel JS, Kapoor M. Autophagy: controlling cell fate in rheumatic diseases. ***Nat Rev Rheumatol*** 2016; 12(9): 517–32.
[25] Pattacini L, Boiardi L, Casali B SC. Differential effects of anti-TNFalpha drugs on fibroblast-like synoviocyte apoptosis. ***Rheumatology*** 2010; 49(3): 480–9.
[26] Nikoletopoulou V, Palikaras K TN. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. ***Biochim Biophys Acta*** 2013; 1833(12): 3448–59.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2025-12-17]