

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

Kardideh B¹, Sadeghalvad M², Samimi Z¹, Mohammadi-Motlagh HR³, Taghadosi M¹

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.

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

بهاره کاردریده^۱، مونا صادق الوعد^۲، زهرا صمیمی^۱، حمیدرضا محمدی مطلق^۳، مهدی تقدسی^{۴*}

خلاصه:

سابقه و هدف: آرتریت روماتوئید یک بیماری خودایمنی التهابی مزمن است که به طور اولیه مفاصل را تحت تأثیر قرار می‌دهد. سلول‌های T و سایر سلول‌های ایمنی به بافت سینوویال فراخوانده شده، موجب پیشبرد این بیماری می‌شوند. اتوفازی 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 اتوفازی 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 اتوفازی *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 ۱/۵۴ برابر بود ($P < ۰/۰۵$). بیان ژن *Atg5* در بیماران درمان‌نشده‌ی آرتریت روماتوئید به میزان ۲/۴ برابر نسبت به افراد سالم افزایش داشت ($P < ۰/۰۵$).

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

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

دو ماه‌نامه علمی-پژوهشی فیض، دوره بیست و سوم، شماره ۲، خرداد-تیر ۹۸، صفحات ۱۳۵-۱۴۲

مقدمه

به هم خوردن تعادل سیستم ایمنی در ایجاد آرتریت روماتوئید نقش مهمی 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 سائتوکاین‌های مترشحه از آن‌ها مثل: (Tumor Necrosis Factor) TNF، IL-8، IFN- γ همچنین در ایجاد آرتریت روماتوئید نقش مهمی دارند [۵، ۴]. در میان زیرگروه‌های سلول‌های T، سلول‌های Th1 و Th17 در پیشبرد RA بیشترین نقش را دارند. فعال شدن بیشتر از حد نرمال سلول‌های T و سایر سلول‌های ایمنی و به هم خوردن هموستاز داخلی این سلول‌ها بیشترین نقش را در پیشبرد آرتریت روماتوئید دارد. از طرف دیگر اتوفازی (Autophagy) به‌عنوان یک فرآیند کاتابولیک سلولی، نقش مهمی در حفظ تعادل سلول‌ها و بازگردش اجزای آسیب‌دیده سلولی دارد. اتوفازی فرآیندی است که طی آن، اتوفازوزوم‌ها 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 [۷، ۶]. اتوفازی دارای مراحل مختلفی است که شامل: ۱- القای اتوفازی ۲- هسته‌گذاری اتوفازوزوم ۳- بلوغ اتوفازوزوم ۴- ادغام اتوفازوزوم با لیزوزوم و

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 مسئول:

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

تلفن: ۰۹۱۳۳۸۶۹۵۵۶ | دورنویس: ۰۲۱ ۴۲۷۴۶۱۸

پست الکترونیک: mtaghad@gmail.com

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

روماتوئید (بیماران درمان نشده و بیماران تحت درمان با داروهای متوترکسات، هیدروکسی کلروکین و پردنیزولون) و گروه افراد سالم به عنوان گروه کنترل صورت گرفته است. نمونه‌های خون محیطی از بیماران مراجعه کننده به کلینیک هلال احمر پزشکی کرمانشاه در بازه زمانی شش ماهه تابستان و پاییز ۹۵ جمع آوری 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 درمان نشده و ۲۰ بیمار تحت درمان (میانگین سنی ۵۰ سال) و ۲۰ فرد سالم (میانگین سنی ۴۶ 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 شرکت کننده با اعلام رضایت شخصی و پر کردن فرم رضایت-نامه 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 بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید:

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

(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 *Atg5* و *Beclin-1*:

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

۵- تجزیه محتویات اتوفازوزوم می‌باشد. در هر کدام از مراحل یک سری از ژن‌های خاص فعال می‌شوند که دوتا از این ژن‌ها که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته‌اند، *Atg5* و *Beclin-1* هستند. *Beclin-1* موجب اتصال سایر پروتئین‌های مرتبط به اتوفازی در جایگاه تشکیل اتوفازوزوم می‌شود و مرحله هسته-گذاری اتوفازوزوم را به پیش می‌برد. *Atg5* به صورت کمپلکس با *Atg12* و *Atg16L* در ایجاد انحای غشا و بلوغ اتوفازوزوم نقش دارد [۶]. اتوفازی با تأثیر گذاشتن بر تکامل، بقا و تکثیر لنفوسیت‌ها می‌تواند پاسخ‌های ایمنی علیه آنتی‌ژن‌های مختلف را تنظیم کند. اتوفازی کنترل نشده با تعدادی از بیماری‌های خودایمنی مثل: آرتریت روماتوئید و لوپوس اریتماتوز سیستمیک (SLE) مرتبط است [۸]. اتوفازی 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. اتوفازی در تحویل پپتیدهای سیترولینه به سلول‌های T و فعال کردن آن‌ها نقش دارد [۷-۵]. علاوه بر این، مطالعات جدید نشان می‌دهند افزایش اتوفازی به طور مشخصی با التهاب پیش‌برنده بیماری آرتریت روماتوئید مرتبط است و بسیاری از داروهایی که برای درمان این بیماری استفاده می‌شوند، ممکن است فرآیند اتوفازی را کاهش دهند [۹]. برای مثال کلروکوئین (CQ) و هیدروکسی کلروکین (HCQ) که به عنوان داروهای دارای کارایی بالا در درمان RA مورد استفاده قرار می‌گیرند، قادر به تنظیم اتوفازی هستند [۱۰]. با توجه به نقش سلول‌های ایمنی در پیشبرد بیماری آرتریت روماتوئید و اهمیت اتوفازی در تنظیم هموستاز داخلی سلول‌ها، بر آن شدیم تا در این مطالعه میزان بیان دو ژن مرتبط با اتوفازی (یعنی *Atg5* و *Beclin-1*) را در سلول‌های خون محیطی دو گروه از بیماران آرتریت روماتوئید یعنی بیماران اولیه 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 درمان نشده 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 به عنوان 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 به صورت تحلیلی-مقطعی است. جمع‌آوری نمونه‌ها به طور تصادفی از بین دو گروه از بیماران آرتریت

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 به صورت تفاوت در مقدار سیکل آستانه (CT) نسبت به ژن GAPDH بر اساس فرمول $2^{-\Delta CT}$ (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 به دست آوردن میزان بیان هر کدام از ژن‌های Beclin-1 و Atg5 استفاده شد، در نهایت میانگین بیان این ژن‌ها برای سه گروه مورد بررسی به دست آمد (جدول شماره ۱ و ۲). بیان ژن Beclin-1: بیان ژن Beclin-1 در بیماران درمان نشده نسبت به افراد کنترل به طور معناداری افزایش نشان می‌دهد، همچنین میزان بیان این ژن در افراد تحت درمان نسبت به افراد درمان نشده به طور معناداری کاهش می‌یابد. میزان بیان این ژن در افراد درمان نشده و تحت درمان به ترتیب ۳/۴۱ و ۱/۵۴ برابر نسبت به حالت کنترل است ($P < 0.05$) (نمودار شماره ۱).

بیان ژن Atg5: بیان ژن Atg5 در بیماران درمان نشده نسبت به افراد کنترل افزایش نشان داد که از لحاظ آماری معنادار بود. میزان بیان این ژن در افراد تحت درمان نسبت به افراد درمان نشده کاهش یافته است؛ اما از لحاظ آماری معنادار نمی‌باشد. میزان بیان این ژن در افراد درمان نشده و تحت درمان به ترتیب ۲/۴ و ۱/۲ برابر نسبت به حالت کنترل است ($P < 0.05$) (نمودار شماره ۲).

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 به صورت دوتایی بر روی هر نمونه صورت گرفت. برنامه‌ی زمانی دستگاه جهت تکثیر شامل سه مرحله به صورت ۱ سیکل preincubation با دمای ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۵ سیکل amplification به صورت ۹۵ درجه به مدت ۵ ثانیه، ۶۰ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت ۱ سیکل melting با دمای ۹۵ درجه به مدت ۵ ثانیه، ۶۰ درجه به مدت ۶۰ ثانیه و ۹۵ درجه به مدت ۱ ثانیه داده شد.

تحلیل آماری

تحت فرض کمی بودن و نرمالیتی از آزمون ANOVA و t-Test استفاده شد. کلیه‌ی تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم-افزارهای SPSS و ویرایش ۱۶ صورت پذیرفت. داده‌ها به صورت Mean±SD گزارش شدند. سطح معنی‌داری آماری، $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

مشخصات بالینی و آزمایشگاهی افراد مورد مطالعه در

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

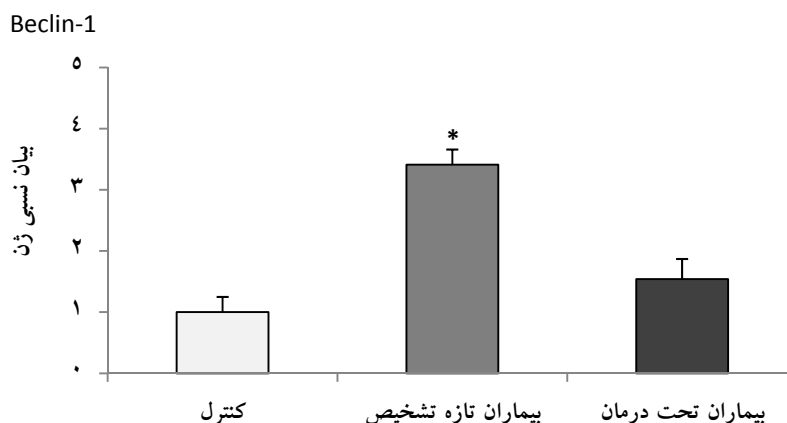
متغیر	بیماران درمان نشده (n= ۲۰)	بیماران تحت درمان (n= ۲۰)	کنترل (n= ۲۰)
سن (سال)	۵۰/۰۶۷±۳/۲۱۱	۵۰/۸۱±۱۲/۱۹	۴۶/۳۴±۸/۸۸
ESR (mm/h)	۲۸/۶۳±۵/۲۶	۱۵/۱۶±۱/۷۹*	-
DAS28	۳/۹۳±۰/۱۷۵	۲/۴۳±۰/۱۳**	-
مصرف دارو		۱۰۰	-
متوترکسات (درصد)	-	۱۰۰	-
پردنیزولون (درصد)	-	۱۰۰	-
هیدروکسی کلروکین (درصد)	-	۱۰۰	-

داده‌ها به صورت $\bar{X} \pm SD$ 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. ESR: erythrocyte sedimentation rate. DAS-28: Disease Activity Score-28.

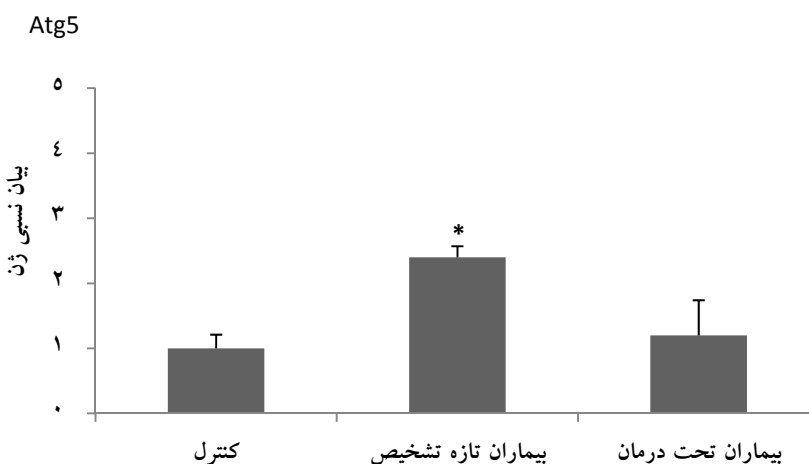
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

جدول شماره ۲- توالی پرایمرهای بررسی بیان ژن (صفحه ۶)

ژن	پرایمر	توالی	طول قطعه حاصل از تکثیر	دمای اتصال
GAPDH	Forward	AGGGGcGCTTTAACTCTGGT	۲۰۷ bp	۶۰°
	Reverse	CCCCACTTGATTTGGAGGGA		
Beclin-1	Forward	AGCTGCCGTTATACTGTCTG	۱۸۵ bp	۶۰°
	Reverse	ACTGCCTCCTGTGTCTTCAATCTT		
Atg5	Forward	TGGATTTTCGTTATATCCCCTTTAG	۱۰۸ bp	۶۰°
	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 به ترتیب ۳/۴۱ و ۱/۵۴ برابر نسبت به حالت کنترل است. میزان تغییر بیان ژن *Beclin-1* در مقایسه با نمونه‌های کنترل و به‌صورت میانگین \pm 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 به ترتیب ۲/۴ و ۱/۲ برابر نسبت به حالت کنترل است. میزان تغییر بیان ژن *Atg5* در مقایسه با نمونه‌های کنترل و به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده است ($P < 0.05$).

بحث

در مطالعه حاضر، میزان بیان دو ژن مرتبط با اتوفازی یعنی *Atg5* و *Beclin-1* در سلول‌های خون محیطی در گروه بیماران درمان‌نشده مبتلا به آرتریت روماتوئید، بالاتر از گروه کنترل بود که این نتایج برای هر دوی این ژن‌ها از لحاظ آماری معنادار می‌باشد. در مراحل اولیه 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 اتوفازی است. در این مطالعه دو ژن کلیدی در فرآیند اتوفازی جهت بررسی انتخاب شد. *Beclin-1* یکی از ژن‌های مهم در القای فرآیند اتوفازی است و در هسته‌گذاری اتوفازوزوم‌ها در غشا و فعال‌سازی سایر فاکتورهای شروع‌کننده اتوفازی دخیل است، از طرف دیگر *Atg5* به صورت کمپلکس با *Atg7* در لیبیدی شدن *microtubule-associated Light* (Chain 3) و *LC3* و تکامل یافتن غشای اتوفازوزوم نقش دارد [۱۳]. افزایش بیان این ژن‌ها می‌تواند نشان‌دهنده افزایش فرآیند اتوفازی در بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید باشد، افزایش اتوفازی 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 اتوفازی در آرتریت روماتوئید اطلاعات زیادی در دست نیست؛ اما مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۶ انجام گرفته است، نشان می‌دهد فعال شدن بیش از حد سلول‌های T در بیماری آرتریت روماتوئید و مقاومت آن‌ها به آپوپتوز، ممکن است در نتیجه افزایش جریان اتوفازی باشد [۱۴]. نتایجی که در مطالعه ما در رابطه با ژن‌های *Beclin-1* و *Atg5* به دست آمد با این مطالعه هم‌خوانی داشت. همچنین اتوفازی 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 فعال شدن سلول‌های T است [۱۵]. از آنجایی که تعداد زیادی از سلول‌های خون محیطی را سلول‌های T تشکیل می‌دهند افزایش این ژن‌ها را می‌توان تا حد 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 به نظر می‌رسد به‌طور کلی داروهایی که برای درمان آرتریت روماتوئید استفاده می‌شوند، قادر به کاهش سطح اتوفازی 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 و IL-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 اتوفازی 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 اتوفازی 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 اتوفازی نتایج مؤثرتری بر روند بهبود بیماران آرتریت روماتوئید دارد [۲۱]. با این حال مکانیسم دقیق اثر متوترکسات بر روی فرآیند اتوفازی 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 پیش‌آپوپتوزی، 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 ضد مالاریا کاربرد دارد اما در سال‌های اخیر در درمان بیماری‌های خودایمنی مثل آرتریت روماتوئید به کار می‌رود. هیدروکسی کلروکین می‌تواند ادغام اتوفازوزوم‌ها را با لیزوزوم به‌طور مستقیم مهار کرده، به این ترتیب به‌عنوان یک سرکوب‌کننده قوی فرآیند اتوفازی شناخته می‌شود [۲۴]. از طرفی مطالعات نشان می‌دهند اتوفازی وابسته به TNF ممکن است در مقاومت به آپوپتوز در این بیماری نقش داشته باشد؛ چرا که به خوبی معلوم شده است مهار اتوفازی به‌وسیله داروهای anti-TNF ممکن است آپوپتوز را فعال سازد [۲۵]. با توجه به اطلاعاتی که در رابطه

یافته‌ای از ژن‌های مرتبط با اتوفازی را نشان می‌دهند. به این ترتیب اهمیت اتوفازی در پیشرفت بیماری آرتریت روماتوئید مطرح شد. کاهش سطح ژن‌های مرتبط با اتوفازی 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 اتوفازی در روند درمان بیماران آرتریت روماتوئید بیشتر مورد توجه قرار گیرد. جهت روشن شدن مکانیسم دقیق اتوفازی 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 به دلیل 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

با مکانیسم‌های تأثیر این داروها مطرح است، می‌توان گفت برابند اثرات این داروها احتمالاً در جهت کاهش سطح اتوفازی 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 اتوفازی 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 حد 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 اتوفازی) می‌تواند سلول‌ها را به سمت کاهش اتوفازی سوق دهد. کاهش اتوفازی 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 اتوفازی در سلول‌های خون محیطی بیماران آرتریت روماتوئید افزایش می‌یابد و همچنین مشخص شد که بیماران تحت درمان، سطوح کاهش

- 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, Rodnuez-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*

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. *PLoS 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 inflammation. *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-TNF α drugs on fibroblast-like synoviocyte apoptosis. *Rheumatology* 2010; 49(3): 480–9.

[26] Nikolettou V, Palikaras K TN. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833(12): 3448–59.