

## System biology analysis of Rheumatoid Arthritis and evaluation of the IL-6 and IL-6R genes expression in treated patients

Ezatollah Mosavi<sup>1</sup>, Effat Noori<sup>1</sup>, Mojgan Bandehpour<sup>1,2\*</sup>, Amrollah Mostafazadeh<sup>3</sup>, Behnaz YousefGhahari<sup>4</sup>, Fateme Majidi<sup>5</sup>, Elham Mehdizadeh<sup>1</sup>, Mina Saadat<sup>2</sup>, Hakimeh Zali<sup>6</sup>, Bahram Kazemi<sup>2</sup>

1. Department of Medical Biotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Cellular and Molecular Biology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Department of Immunology, School of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
4. Department of Internal Medicine, School of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
5. Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, Tehran, Iran
6. Department of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

### Abstract

**Aim and Background:** Rheumatoid arthritis(RA) is a complex and chronic disease of joint inflammation. Environmental factors that are important in genetically predisposed people are involved in the occurrence of the disease and its progress. This disease has a lot to related to genetics, including human class 2 antigens. In various studies, this relation is about 60%. This relationship is more positive in people with Anti-citrullinated protein antibodies (ACPA) than negative ones. The aim of this study is to investigate the relationship between cytokines and soluble proteins in the body of a patient with Rheumatoid arthritis before symptoms appear.

**Materials and Methods:** In this research, analysis with Enrichr, WebGestalt, and GeneMANIA was used to find genes related to the disease. In order to check the amount of cytokines predicted, ELISA and Real time RT-PCR methods were applied.

**Results:** By examining the System Biology methods, the candidate genes included IL-6R, IL-6 and IL-23A. The samples were taken from 46 RA patients referred to the rheumatology department of the Babol hospital, and a significant decrease ( $P=0.1255$ ) of IL-6 was observed in patients undergoing treatment and a significant increase ( $P=0.4414$ ) in the amount of this cytokine receptor in the serum compared to healthy individuals. While the expression of IL6 and IL6R genes increased in the patient group compared to the healthy group.

**Conclusion:** Cytokine IL-6 as an inflammatory cytokine in treated patients decreased in serum and showed a significant increase in RNA level.

**Keywords:** Rheumatoid arthritis, Enrichr , WebGestalt , GeneMania , IL-6R, IL-6 , Iau Science.

### Corresponding author:

1. Department of Medical Biotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2. Cellular and Molecular Biology Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

**Email:** Bandehpour@gmail.com

## آنالیز سیستم بیولوژی آرتریت روماتوئید و بررسی میزان بیان ژن IL-6 و گیرنده آن در سرم افراد تحت درمان

عزت الله موسوی کانی<sup>۱</sup>، عفت نوری<sup>۱</sup>، مژگان بنده پور<sup>۱،۲\*</sup>، امرالله مصطفی زاده<sup>۳</sup>، بهناز یوسف قهاری<sup>۴</sup>، فاطمه مجیدی<sup>۵</sup>،  
الهام مهدی زاده<sup>۱</sup>، مینا سعادت<sup>۲</sup>، حکیمه زالی<sup>۶</sup>، بهرام کاظمی<sup>۲</sup>

۱. گروه زیست فناوری پزشکی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲. مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳. گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
۴. گروه داخلی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
۵. گروه سلول‌های بنیادی و بیولوژی تکامل، مرکز تحقیقات علوم سلولی، بیولوژی و تکنولوژی سلول‌های بنیادی موسسه رویان، تهران، ایران
۶. گروه مهندسی بافت و علوم سلولی کاربردی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

### چکیده

**سابقه و هدف:** آرتریت روماتوئید (RA) یک بیماری کمپلکس و مزمن التهاب مفاصل است. فاکتورهای محیطی در افراد مستعد ژنتیکی در بروز بیماری و پیشرفت آن دخیل می‌باشند. این بیماری ارتباط زیادی با ژن‌هایی مانند آنتی‌ژن‌های کلاس ۲ انسانی دارد. در مطالعات مختلف این ارتباط حدود ۶۰٪ بدست آمده است. بخصوص این ارتباط در افراد دارای آنتی‌بادی‌های ضد پروتئین‌های سیترولینه (ACPA) بیش از افراد بدون این آنتی‌بادی‌ها گزارش شده است. هدف این مطالعه بررسی ارتباط سایتوکاین‌ها و پروتئین‌های محلول در بدن بیمار مبتلا به آرتریت روماتوئید پیش از بروز علائم می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این تحقیق به منظور دستیابی به ژن‌های مرتبط با بیماری از آنالیز با وب سایت‌های Enrichr، WebGestalt و GeneMania استفاده شد. به منظور بررسی میزان سایتوکاین‌ها در افراد بیمار تحت درمان از روش‌های ELISA و Real-time RT-PCR استفاده گردید.

**یافته‌ها:** با بررسی سیستم بیولوژی، ژنهای *IL6* و *IL6R* کاندید شدند. از ۴۶ بیمار RA مراجعه کننده به بخش روماتولوژی بیمارستان روحانی بابل و ۴۶ فرد سالم کنترل نمونه گیری شد و کاهش معنادار  $P=0.1255$  IL-6 در افراد بیمار در حال درمان و افزایش معنادار  $P=0.4414$  میزان گیرنده این سایتوکاین نسبت به افراد سالم در سرم مشاهده گردید. در حالی که بیان ژن‌های IL6 و IL6R در گروه بیمار نسبت به سالم افزایش نشان داد.

**نتیجه گیری:** سایتوکاین IL-6 به عنوان یک سایتوکاین التهابی در بیماران تحت درمان در سرم کاهش و در سطح RNA افزایش معناداری نشان داد. نتایج نشان دهنده افزایش بیان RNA ژن IL-6 و کاهش بیان پروتئین آن بدنبال درمان بیماری است.

**واژگان کلیدی:** آرتریت روماتوئید، Enrichr، WebGestalt، GeneMania، IL6، IL6R، Iau Science

### مقدمه

آرتریت روماتوئید (RA) یک بیماری مزمن التهابی مفاصل است که مشخصه آن اتوآنتی‌بادی بر علیه IgG (RF) و پروتئین‌های سیترولینه (ACPAs) می‌باشد. درمان ناموفق یا

### نویسنده مسئول:

گروه زیست فناوری پزشکی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی و مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.  
پست الکترونیکی: Bandehpour@gmail.com  
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۰۲  
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۲۰

بدون ارتباط به وجود آنتی بادی در سرم مرتبط است. در حالی که ژن‌های AFF3, CD28, TNFAIP3 فقط در افراد سرم مثبت RA و ژن‌های NFIA, PRL فقط در افراد سرم منفی RA مرتبط می‌باشند (۱۰-۱۲). چندین ژن مرتبط با میزان شدت بیماری در آرتریت روماتوئید شامل HLA-DRB1, IL2RA, DKK1, GRZB, MMP9, SPAG16 می‌باشند. مدارکی وجود دارد دال بر ژن‌هایی مثل FOXO3 که فقط با شدت بیماری مرتبط هستند (۱۵-۱۳). بنابراین پیش بینی موفقیت در درمان یک پیشرفت بزرگ است اما به علت کوچک بودن جمعیت‌های مورد مطالعه و محدود بودن مطالعات هنوز بیومارکر ژنتیکی دقیقی شناسایی نشده است. یکی از چالش‌های اصلی در مطالعات انسانی، دستیابی به انواع واریانت‌های ژنتیکی در اختلالات ارثی می‌باشد که در تست‌های تشخیصی موثر بوده و مربوط به اساس مولکولی آن بیماری‌ها می‌شود. در دهه‌های گذشته استفاده از تکنیک‌های پیشرفته مثل Linkage analysis and association studies منجر به کشفیات اصلی در این حیطه شده است. این تکنولوژی‌ها قادرند یک بخش کروموزومی را با بیماری مرتبط نمایند. برای مثال می‌توان از array‌های بیان ژن‌ها، یک لیست از نسخه‌های بیان شده متمایز در یک نمونه بیماری در مقایسه با یک نمونه سالم رفرنس ارتباط برقرار نمود. یکی از خصوصیات این روش‌ها اندازه بزرگ مناطق کروموزومی است که حدود چند مگاباز می‌باشند. شناسایی اولیه در هر بیماری در میان لیست بزرگ ژن‌ها چالش اصلی و زمانبر است. یک بیولوژیست باید بتواند لیست این ژن‌های کاندید را بدست آورد و ارتباط آنها با بیماری را آنالیز نماید (۱۶). یکی از پرکاربردترین ابزار آنالیز داده‌ها enrichment است که به محقق کمک می‌کند تا به یافته‌های بیولوژیک ژنتیکی تحقیق خود برسد. بدنبال به روزرسانی در ۲۰۱۳ و ۲۰۱۷ این ابزار ۲۷۰۰۰ کاربر در سال دارد و در ۷۳۹ مقاله مورد استناد قرار گرفته است (۱۷). بنابراین در این تحقیق با در نظر گرفتن آنالیز کلی سیستم بیولوژی و دسترسی به ژن‌های مرتبط با آرتریت روماتوئید ژن‌های IL-6 و IL-6R جهت بررسی در سرم و میزان بیان آن‌ها در سطح RNA در سلول‌های خونی افراد مبتلا به آرتریت روماتوئید در حال درمان و افراد سالم مورد بررسی قرار گرفت.

ناقص این بیماران منجر به آسیب برگشت ناپذیر مفاصل و ناتوانی بیماران می‌شود. آرتریت روماتوئید یک بیماری هتروژن است با تظاهرات کلینیکی و مکانیسم‌های پاتوژنتیک متغیر که بین افراد با علائم یکسان دیده شده است (۱). البته شواهدی وجود دارد که تنها درصدی از افراد ACPA مثبت به آرتریت روماتوئید مبتلا می‌شوند (۲). اتوانتی بادی‌ها یک مشخصه مهم بیماری بشمار می‌آیند (seropositive RA) در حالی که بعضی از این بیماران RF منفی هستند. بنابراین بیماری RA کمپلکس بوده و فاکتورهای محیطی در بروز بیماری و پیشرفت آن در افراد مستعد ژنتیکی دخیل می‌باشند (۳). در دو دهه اخیر با مطالعه روی بیماران دارای اتوانتی بادی زودرس محققین شاهد نظرات ژنتیکی و پاتوژنتیکی جدید و یک معیار طبقه بندی بوده‌اند که منجر به تشخیص زودهنگام آنان گردید (۱). اگرچه آمار دقیق افراد مبتلا به آرتریت روماتوئید در همه جهان مشخص نیست ولی از گستردگی یکسانی در دنیا برخوردار است. بیشتر مطالعات اپیدمیولوژیک این بیماری در کشورهای غربی انجام شده و نشاندهنده شیوع ۱-۵٪ درصدی در جهان است (۵-۳). چندین ریسک فاکتور در پیشرفت آرتریت روماتوئید نقش دارند از جمله ژنتیک، جنس مونث و فاکتورهای محیطی. برخی از این فاکتورها شامل سیگار کشیدن، در معرض سیلیکا بودن، عوامل عفونی، کمبود ویتامین D، چاقی و تغییرات میکروبی روده (۶،۷) می‌باشند. در این بین آرتریت روماتوئید ارتباط زیادی با ژنتیک دارد. در مطالعات مختلف این ارتباط حدود ۶۰٪ گزارش شده است. این ارتباط در افراد دارای آنتی بادی ACPAs بیش از بدون آنتی بادی می‌باشد. آنتی ژن‌های کلاس ۲ انسانی (HLAII) ارتباط زیادی با RA دارند (۸،۹). این اپی توپ یک موتیف آمینواسیدی اختصاصی است که توسط بعضی اللهای HLA بخصوص HLA-DRB1\*01 و HLA-DRB1\*04 کد می‌شود. این ال‌ها به‌طور معنی داری با ریسک پیشرفت آرتریت روماتوئید ارتباط دارد. مطالعات Genome-Wide Association Studies (GWAS) ارتباط ژن‌های بسیاری را با تظاهرات مختلف بیماری در سنین و نژادهای مختلف نشان داده است. علاوه بر این اختلافات ژنتیکی بین ACPA-positive RA و ACPA-negative RA مشخص شده است. برای مثال تغییرات بیان HLA-DRB1, PTPN22, BLK, ANKRD55, IL6ST در افراد مبتلا به آرتریت روماتوئید

## مواد و روش‌ها

### آنالیز عملکردی با سیستم بیولوژی

تحلیل عملکردی با استفاده از پایگاه داده Enrichr (<http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr>) انجام شد. ابزارهای غنی‌سازی برای تجزیه و تحلیل هستی‌شناسی، بیماری و داروها انتخاب شدند. هستی‌شناسی ژن (GO) یک ابزار بیوانفورماتیک بزرگ برای یکسان کردن نمایش ژن و ویژگی‌های محصول ژن در همه گونه‌ها است. موارد مورد استفاده از بخش‌های مختلف این ابزار عبارتند از GO Cellular Component (اجزاء سلولی)، GO Biological Process (فرآیندهای زیستی)، GO Molecular (مولکول) (ها) و همچنین از سامانه OMIM به عنوان یک منبع جامع برای مجموعه‌های ژنی استفاده شد.

### تحلیل شبکه توپولوژیکی

WebGestalt یک ابزار تجزیه و تحلیل غنی‌سازی است که به طور گسترده برای تفسیر داده‌ها استفاده می‌شود. مجموعه ژن‌های مورد نظر در پایگاه داده WebGestalt برای تجزیه و تحلیل ارتباط ژن‌های به دست آمده و یافتن زیرشبکه، ژن‌های به دست آمده و یافتن زیرشبکه، ژن‌های بذر و گره‌های متصل بسیار مهم استفاده شد.

### تحلیل عملکردی شبکه

با استفاده از ژن‌های به دست آمده از GO اطلاعات عملکردی استخراج شد. تجزیه و تحلیل عملکردی با استفاده از GeneMANIA (<http://genemania.org/>) انجام شد. ابزار GeneMANIA یک ابزار انعطاف‌پذیر است که برای پیش‌بینی عملکرد ژن استفاده می‌شود.

### جمعیت مورد مطالعه

این تحقیق مصوب مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی بوده و با اخذ کد اخلاق IR.SBMU.REC.1397.050 با کسب رضایت بیماران انجام گرفت. ۴۶ بیمار RA از میان بیماران مراجعه کننده به بخش روماتولوژی بیمارستان روحانی دانشگاه علوم پزشکی بابل (بابل، ایران) انتخاب گردیدند. معیارهای ورود بیماران بر اساس تشخیص روماتولوژیست با توجه به علائم بالینی و فاکتور روماتوئید

مثبت در آن‌ها، بر اساس معیارهای تشخیصی 2010 ACR/EULAR (کالج روماتولوژی آمریکایی / اروپایی روماتیسم ۲۰۱۰) بود. لازم به ذکر است این افراد در حال درمان با داروهایی چون پردنیزولون بوده‌اند. گروه کنترل شامل ۴۶ فرد سالم بالای ۳۵ سال سن و بدون سابقه اختلالات خودایمنی انتخاب شدند. پرسشنامه‌ای با اطلاعات گروه‌ها شامل سن، جنسیت، سال ابتلا، بیماری‌هایی مانند بیماری قلبی، عفونت ادراری، شغل و نوع داروی مورد استفاده بیماران تکمیل شد. از هر بیمار ۵ میلی لیتر خون گرفته شد. نمونه‌های خون با دور ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. سرم‌ها برای تست ELISA و رسوب خون برای استخراج RNA در منهای ۲۰ درجه سلسیوس قرار داده شد.

### اندازه گیری IL-6 و IL-6R با کیت الایزا

نمونه‌های سرم جدا شده از خون بیماران و گروه سالم بعد از سانتریفوژ با استفاده از کیت الایزا شرکت فرانسوی دیاکولون (IL-6R ELISA Kit Diaclone) و شرکت زلبیو (IL-6R ELISA Kit ZellBio GmbH and Stat Fax 2100) طبق روش کیت مورد ارزیابی قرار گرفتند.

### استخراج RNA و ارزیابی بیان ژن‌های IL-6 و IL-6R با Real time-RT PCR

استخراج RNA سلول‌های خون با استفاده از کیت خالص سازی All Hybrid-R RNA (سئول، کره جنوبی) و سنتز cDNA و Real-time RT-PCR طبق دستورالعمل سازنده انجام شد. پس از آن، PCR کمی با استفاده از پرایمرهای جدول ۱ در دستگاه (Applied Biosystems) Step One TM (Applied Biosystems) به مدت ۴۰ سیکل با پارامترهای زیر اجرا شد. از ژن *gapdh* به عنوان housekeeping gene (کنترل داخلی) استفاده شده است. برنامه Real-time RT-PCR به ترتیب زیر انجام شد: دناتوراسیون در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال پرایمردر دمای ۶۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۰ ثانیه، و گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱۵ ثانیه. جهت تایید در نهایت، تکثیر ژن‌ها با الکتروفورز ژل آگارز مشاهده شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از REST و Graphpad prism انجام گرفت.

Tm°C	توالی (5'-3')	پرایمر
55	TTTTCCCATGAGTCTCAATATT	FP6
59	GGGAGATAGAGCTTCTCTTTC	RP6
55	GTCATGTGCGAGTGGGA	FP6R
64	AGGCCCGGGGGCTCAG	RP6R
65	CCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAG	GAPDHF
65	AGGGTCTCTCTTCTTGTGCTCT	GAPDHR

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در Real-time RT-PCR

پاسخ‌های ایمنی، از جمله فعال‌سازی و تنظیم مسیره‌های ایمنی سازگار و ذاتی و تنظیم تمایز استئوکلاست‌ها شرکت می‌کنند (جدول ۳). جدول ۳، ۱۰ عملکرد مولکولی برتر را نشان می‌دهد که در آنها ژن‌های رایج از KEEG عمدتاً شامل مسیر سیگنالینگ با واسطه سیتوکین، تنظیم مثبت تکثیر سلول‌های عضله صاف، تنظیم تمایز استئوکلاست‌ها هستند. اجزای سلولی که ممکن است ژن‌های مشترک به طور بالقوه در آنها باشند عبارتند از لومن شبکه آندوپلاسمی، جزء جدایی ناپذیر غشای پلاسمایی، آندوزوم بازیافت غشایی. جداول ۳ و ۴ شامل تمام داده‌های انتولوژی مربوط به RA است.

## یافته‌ها

### ارتباط ژنتیکی بیماری آرتریت روماتوئید با بیماری‌های دیگر

پایگاه داده Enrichr برای تجزیه و تحلیل عملکردی و پایگاه داده OMIM برای تشخیص هرگونه بیماری مرتبط با آرتریت روماتوئید (RA) انتخاب شدند. نتایج تجزیه و تحلیل Enrichr در پایگاه داده OMIM در مورد ۹ ژن مشترک RA نشان داد که RA با برخی بیماری‌های دیگر مانند فراموشی و میگرن مرتبط است (جدول ۲).

ارتباط ژنتیکی آرتریت در اجزاء اصلی سلول تجزیه و تحلیل Enrichr برای پایگاه داده Gene Ontology نشان داد که بیشتر ژن‌های مشترک در فرآیندهای بیولوژیکی و

جدول ۲: بیماری مرتبط با آرتریت روماتوئید در OMIM

Term	P-value	Adjusted P-value	Genes
Rheumatoid arthritis	1.40E-05	9.80E-05	IL6;STAT4
Dementia	0.0053881	0.012562112	TNF
Malaria	0.0062836	0.012562112	TNF
Migraine	0.0071783	0.012562112	TNF
Asthma	0.0103045	0.01442625	TNF
Systemic-lupus			
Erythematousus	0.012532	0.01462072	STAT4
Diabetes	0.0332545	0.03325451	IL6

جدول ۳: ده فرآیند بیولوژیکی برتر مرتبط با ژن های پیش فرض درگیر در آرتریت روماتوئید

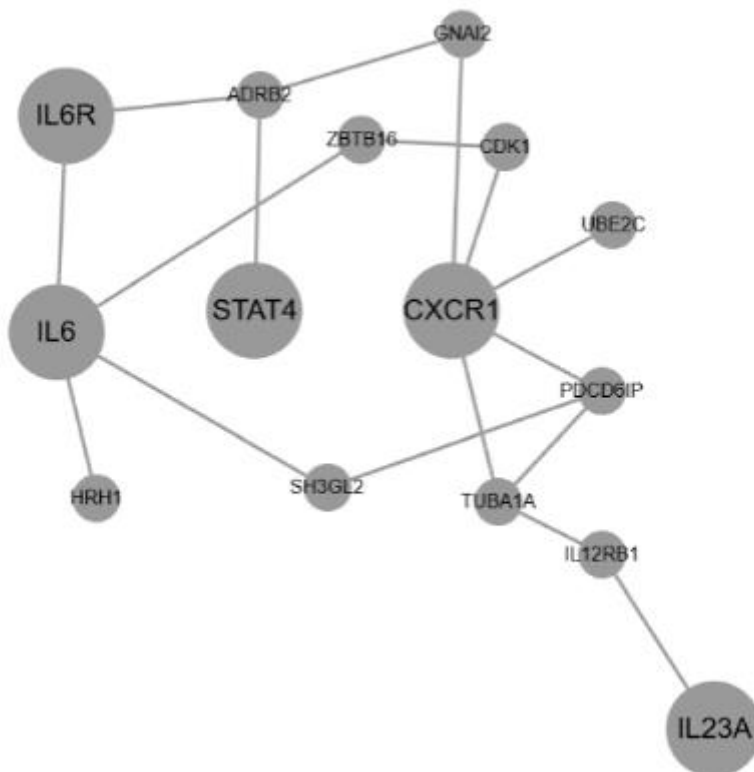
Term	P-value	Adjusted P-value	Genes
cellular response to cytokine stimulus (GO:0071345)	1.06E-10	3.87E-08	IL6;IL23A;MMP3;STAT4;TNF;IL6R;IL17A
cytokine-mediated signaling pathway (GO:0019221)	1.05E-09	1.91E-07	IL6;IL23A;MMP3;STAT4;TNF;IL6R;IL17A
positive regulation of cytokine production (GO:0001819)	1.87E-08	2.09E-06	IL6;IL23A;TNF;IL6R;IL17A
positive regulation of osteoclast differentiation (GO:0045672)	2.29E-08	2.09E-06	IL23A;TNF;IL17A
regulation of chemokine production (GO:0032642)	5.12E-08	3.74E-06	IL6;TNF;IL6R
positive regulation of myeloid leukocyte differentiation (GO:0002763)	3.10E-07	1.71E-05	IL23A;TNF;IL17A
positive regulation of chemokine production (GO:0032722)	3.74E-07	1.71E-05	IL6;TNF;IL6R
positive regulation of leukocyte migration (GO:0002687)	3.74E-07	1.71E-05	IL6;TNF;IL6R
positive regulation of smooth muscle cell proliferation (GO:0048661)	4.86E-07	1.77E-05	IL6;TNF;IL6R
regulation of osteoclast differentiation (GO:0045670)	4.86E-07	1.77E-05	IL23A;TNF;IL17A

جدول ۴: ده مورد برتر از عملکرد مولکولی و ژن های مشترک در پایگاه آنتولوژی با پارامترهای پیش فرض درگیر

Term	P-value	Adjusted P-value	Genes
cellular response to cytokine stimulus (GO:0071345)	1.06E-10	3.87E-08	IL6;IL23A;MMP3;STAT4;TNF;IL6R;IL17A
cytokine-mediated signaling pathway (GO:0019221)	1.05E-09	1.91E-07	IL6;IL23A;MMP3;STAT4;TNF;IL6R;IL17A
positive regulation of cytokine production (GO:0001819)	1.87E-08	2.09E-06	IL6;IL23A;TNF;IL6R;IL17A
positive regulation of osteoclast differentiation (GO:0045672)	2.29E-08	2.09E-06	IL23A;TNF;IL17A
regulation of chemokine production (GO:0032642)	5.12E-08	3.74E-06	IL6;TNF;IL6R
positive regulation of myeloid leukocyte differentiation (GO:0002763)	3.10E-07	1.71E-05	IL23A;TNF;IL17A
positive regulation of chemokine production (GO:0032722)	3.74E-07	1.71E-05	IL6;TNF;IL6R
positive regulation of leukocyte migration (GO:0002687)	3.74E-07	1.71E-05	IL6;TNF;IL6R
positive regulation of smooth muscle cell proliferation (GO:0048661)	4.86E-07	1.77E-05	IL6;TNF;IL6R
regulation of osteoclast differentiation (GO:0045670)	4.86E-07	1.77E-05	IL23A;TNF;IL17A

CXCR1 شناسایی شدند که برهمکنش قابل توجهی بین خود دارند. زیرشبکه‌های برهمکنش پروتئین-پروتئین ژن‌های اصلی در شکل ۱ نشان داده شده است.

زیرشبکه‌های برهمکنش پروتئین-پروتئین برای ۹ ژن از طریق WebGestalt برای شناسایی ژن‌های اصلی با همسایه‌های دارای رتبه برتر مورد مطالعه قرار گرفتند. از بین ۹ ژن، تنها ۵ ژن یعنی IL6, IL6R, IL23A, STAT4, و CXCR1

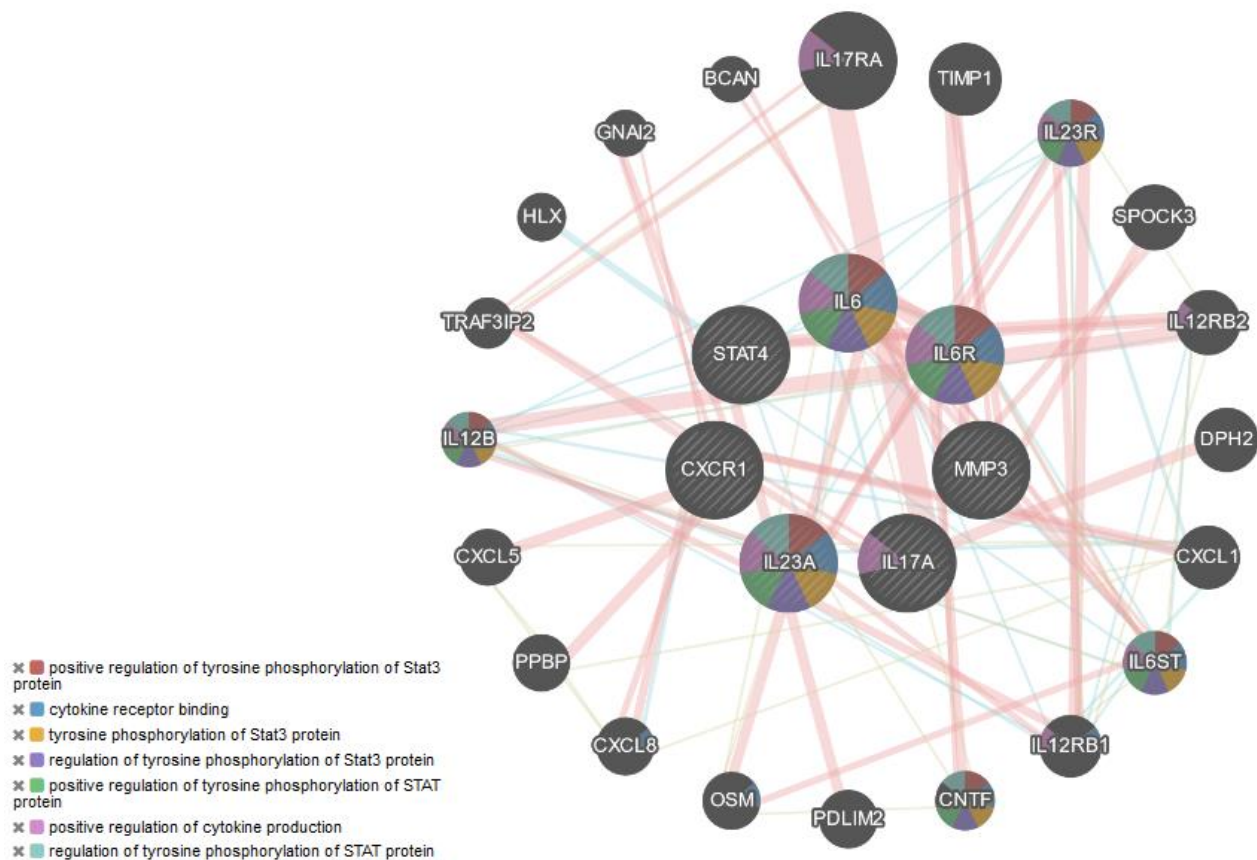


شکل ۱: برهمکنش پروتئین-پروتئین ۹ ژن در WebGestalt که شبکه فرعی ژن‌های اصلی (گره‌های بزرگ) متصل به همسایگان رتبه برتر (گره‌های کوچک) را تعیین می‌کند.

دارند. ژن‌های هاب با بیشترین تعداد رنگ، عملکردهای بیولوژیکی مهمی از جمله مسیر سیگنالینگ با واسطه سیتوکین، تنظیم مثبت تکثیر سلول‌های عضله صاف، تنظیم تمایز استئوکلاست‌ها که شامل IL6, IL6R, و IL23A بود را نشان می‌دادند.

### تجزیه و تحلیل عملکرد ژن‌ها توسط GeneMANIA

پایگاه داده GeneMANIA نیز برای تجزیه و تحلیل عملکرد استفاده شد. شکل ۲ ویژگی شبکه را با بحرانی ترین گره‌ها بر اساس تحلیل عملکردی نشان می‌دهد. برخی از گره‌ها برای نشان دادن عملکردهای مختلف بیولوژیکی رنگ متفاوتی

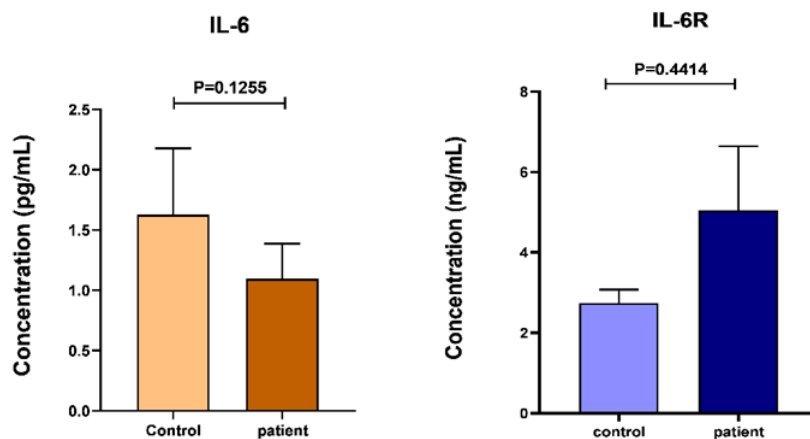


شکل ۲: تجزیه و تحلیل عملکردی شبکه تعامل ایجاد شده توسط ژن های به دست آمده از GeneMANIA.

IL-6 که طبق آنالیز بیوانفورماتیک انجام شده از ژن های اصلی در بیومارکرهای آرتریت روماتوئید است، پس از مصرف داروهای ضدالتهابی متوترکسات و پردنیزولون کاهش معناداری را نشان می دهد.

### ارزیابی مقدار IL-6 و IL-6R سرم ها با کیت الایزا

میزان گیرنده IL-6R در سرم با اختلاف معناداری در افراد بیمار افزایش نشان داد. درحالی که مقدار سایتوکاین التهابی

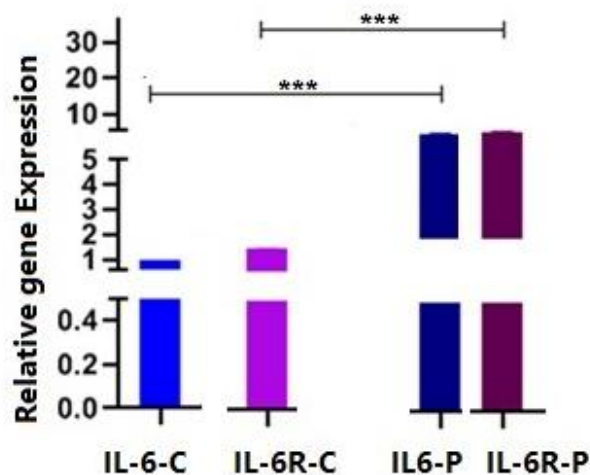


شکل ۳: مقایسه پروتئین‌های IL6 و IL6R در سرم بیماران آرتریت روماتوئید تحت درمان و کنترل سالم. کاهش معنادار ( $P=0.1255$ ) میزان IL-6 در افراد بیمار در حال درمان و افزایش معنادار ( $P=0.4414$ ) میزان گیرنده این سایتوکاین نسبت به افراد سالم در سرم مشاهده می‌شود.

### ارزیابی بیان ژن‌های IL6 و IL6R با Real-time RT-PCR

بیان ژن‌های IL6 و IL6R اختلاف معنی داری را در سطح RNA نشان داد.

با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) در دو گروه کنترل و بیماران در حال درمان با داروهای ضدالتهاب آنالیز



شکل ۴: بیان ژن‌های IL6 و IL6R. افزایش بیان ژن‌های IL6 و IL6R در گروه‌های بیمار و سالم اختلاف معنی داری دارد.

## بحث

در بیماری مزمن اتوایمیون آرتریت روماتوئید با توجه به علائم و نتایج تست‌های آزمایشگاهی سرولوژی مثل اتوانتی بادی‌ها در مراحل مختلف کلینیکی، روماتولوژیست قادر به تشخیص قطعی خواهد بود. بروز علائم سفتی صبحگاهی در مفاصل به همراه نرمی آن‌ها بعد از ورزش از علائم کلیدی آرتریت روماتوئید است (۱). مطالعات GWAS ارتباط ژن‌های بسیاری را با تظاهرات مختلف بیماری RA در سنین و نژادهای مختلف نشان داده است. علاوه بر این اختلافات ژنتیکی بین ACPA- positive RA و ACPA- negative RA بدست آمده است. برای مثال بدون در نظر گرفتن وجود آنتی‌بادی در سرم، ژن‌های *HLA-DRB1*, *PTPN22*, *BLK*, *ANKRD55*, *IL6ST* با RA مرتبط هستند (۲۱-۱۸). در حالی که *AFF3*, *CD28*, *TNFAIP3* فقط با افراد سرم مثبت RA و *PRL*, *NFIA* فقط با افراد سرم منفی RA مرتبط می‌باشد (۱۲-۱۰). بنابراین تنظیم پیچیده ژن‌ها در انواع سلول‌ها تعیین کننده ژن‌های مهم مرتبط با RA می‌باشند. بیشتر مطالعات بر تشخیص بیومارکر مناسب تشخیصی برای این بیماری متمرکز هستند. چندین ژن حساس در RA که به میزان حدت بیماری مرتبط است شامل *HLA-DRB1*, *IL2RA*, *DKK1*, *GRZB*, *MMP9*, *SPAG16* می‌باشند. مدارکی وجود دارد دال بر ژن‌هایی مثل *FOXO3* که فقط با شدت بیماری مرتبط هستند (۱۵-۱۳). چنانچه در این مطالعه تجزیه و تحلیل Enrich برای پایگاه داده Gene Ontology نشان داد که بیشتر ژن‌های مشترک در فرآیندهای بیولوژیکی و پاسخ‌های ایمنی، از جمله فعال‌سازی و تنظیم مسیرهای ایمنی سازگار و ذاتی و تنظیم تمایز استئوکلاست‌ها بطور شاخص *IL-6* و *IL-6R* را تایید نمود. همچنین زیرشبکه‌های برهمکنش پروتئین-پروتئین برای ۹ ژن از طریق WebGestalt و GeneMANIA برای شناسایی ژن‌های اصلی با همسایه‌های دارای رتبه برتر مورد مطالعه قرار گرفتند. از بین ۹ ژن، تنها ۵ ژن یعنی *IL6*, *JL6R*, *JL23A*, *STAT4*, *CXCR1* شناسایی شدند که برهمکنش قابل توجهی بین خود داشتند. سال‌ها قبل از تظاهرات بالینی آغاز شده است. اگر چه واکنش‌های ایمنی حاد نیز در بعضی دیده می‌شود. به نظر می‌رسد فاکتورهای استرس مثل دود سیگار قادر است سلول‌های مخاطی را فعال نماید و منجر به تغییرات

بعد از ترجمه هیستون‌ها و پروتئین‌های ماتریکس (فیبرونکتین، کلاژن، فیبرینوزن، انولاز و ویمنتین) شود. از طریق القاء پپتیدیل آرژنین دایمینیازها در پروسه‌ای بنام سیترولینیشن یا دایمینیشن (۲۲) اتفاق می‌افتد. سیترولینیشن همچنین توسط میکروبیوتا القا می‌شود. مانند پورفیروموناس ژنژیوالیس که در بیماری‌های دهان وجود دارد. این باکتری آنزیم بالا را تولید می‌کند. سیترولینیشن را القا می‌نماید و ACPA بوجود می‌آورد. همچنین اکتینومیسستم کومیتانس که تولید کننده توکسین است می‌تواند ورود کلسیم به نوتروفیل‌ها را افزایش داده و باعث سیترولینیشن پپتیدها شود (۲۳). بدنبال سیترولینیشن و دیگر تغییرات بعد از ترجمه مثل استیلاسیون یا کاربامیلاسیون، پپتیدهای تغییر یافته به MHC باند میشوند و به T-cell عرضه شده و منجر به سنتز آنتی بادی بر علیه پروتئین‌های خودی می‌گردد (RF) (۲۴). وجود ACPAs به تنهایی برای ایجاد سینوویتیس کافی نیست، یک فاکتور دیگر مثل تشکیل کمپلکس ایمنی، فعالیت کمپلمان یا خونریزی عروق کوچک برای شروع سینوویتیس لازم است. با افزایش نفوذپذیری و ورود سلول‌های التهابی به سینوویوم کاملاً مشخص می‌شود. شبکه‌های سایتوکایینی که باعث التهاب و آسیب بافتی می‌شوند در سینوویتیس نقش دارند. نقش سایتوکاین‌ها در پاتوژنز بیماری برای  $TNF-\alpha$  که نقش فعال کردن لوکوسیت-ها، تولید MMP، آنژیوژنز و ایجاد درد را دارد ثابت شده است. مطالعه روی سایتوکاین‌های دیگر بخصوص *IL-6* نشان داد که الگوی تولید سایتوکاین‌ها در بیماران بسیار متغیر است (۲۵-۲۹). سلول‌های سینوویال با ترشح سایتوکاین‌ها بصورت پاراکراین و اتوکرین باعث افزایش التهاب در RA می‌شوند. *IL-8* تولید شده از اوستوکلاست‌ها که منجر به ایجاد آنتی بادی ACPA می‌شود نقش مهمی در مراحل اولیه بیماری دارد و با بکارگیری نوتروفیلها در مایع سینوویال باعث آغاز فعال سازی پاسخ‌ها می‌شود (۳۰). در این تحقیق با توجه به نتایج مطالعه بیوانفورماتیک و دستیابی به ارتباط قوی سایتوکاین *IL-6* و گیرنده آن بدنبال آغاز علائم بیماری التهابی آرتریت روماتوئید، بررسی میزان سایتوکاین *IL-6* و گیرنده آن در سرم افراد مبتلا به آرتریت روماتوئید در حال درمان در مقایسه با افراد سالم نشان داد که علی‌رغم افزایش این سایتوکاین در این بیماری التهابی سیستماتیک، پس از مصرف داروهای ضد التهاب پردنیزولون و متوترکسات با

آمیلوئیدوز ثانویه، لنفوما و فیرومیالژیا نیز مشاهده شود (۳۳،۳۴).

### نتیجه‌گیری

علی‌رغم افزایش سایتوکاین IL-6 در سرم افراد مبتلا به آرتریت روماتوئید، پس از مصرف داروهای ضدالتهاب پرنیزولون و متوترکسات با کاهش درد و التهاب کاهش یافته است در حالی‌که در سطح RNA افزایش بیان معناداری نسبت به افراد سالم مشاهده می‌شود. در مقابل افزایش معنادار گیرنده IL-6R هم در سرم و هم در سطح RNA سلول‌های خون بیماران در حال درمان نشان می‌دهد این سایتوکاین از پروتئین‌های کلیدی این بیماری است و از نظر بررسی‌های سیستم بیولوژی ارتباط مستقیم با شروع بیماری دارد.

### سپاسگزاری

این تحقیق بخشی از پایان نامه آقای عزت الله موسوی کانی می‌باشد. حمایت مالی آن به عهده مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی طی طرح ۱۵۴۰۹ بوده است.

کاهش معنادار IL-6 علائم درد و التهاب آنها کاهش یافته است. در حالی‌که در سطح RNA افزایش بیان معناداری نسبت به افراد سالم مشاهده می‌شود. بنابراین، این سایتوکاین از پروتئین‌های کلیدی این بیماری است. در مقابل افزایش معنادار گیرنده IL-6R هم در سرم و هم در سطح RNA سلول‌های خون بیماران در حال درمان نشان دهنده بهم خوردن تعادل آبشار سایتوکاینی و کاهش موقت IL-6 و تعدیل درد التهاب بدنال درمان است. تحقیقات زیادی در این خصوص در ایران و سایر کشورها انجام شده است. از جمله Sanchooli در سال ۲۰۱۱ در جمعیت بیماران مزمن لته در شهر زاهدان ارتباط بین پلی مورفیسم ژن IL-6 در ناحیه - C/G 674 را گزارش کردند و هیچ نوع اختلافی بین فراوانی آن‌ها در بیماران و کنترل مشاهده نشد (۳۱). همچنین Gaber و همکاران در سال ۲۰۱۳ در پروموتور ژن IL6 در ناحیه - C/G 174 موتاسیون گزارش کردند و مقدار IL6 در بیماران آرتریت روماتوئید بیشتر بدست آمد (۳۲). دیده شده RA منحصرأ مفاصل را تحت تاثیر قرار نمی‌دهد بلکه به‌عنوان یک بیماری سیستمیک با افزایش پاسخ فاز حاد با تظاهراتی در چشم، ریه‌ها، قلب و ارگان‌های دیگر بصورت ندول‌ها و واسکولستیس همراه می‌باشد. RA ممکن است همراه با سندرم Sjogren ، التهاب مزمن بیماری کاردیوواسکولار و

## منابع

1. Smolen JS, Aletaha D, Barton A, Burmester GR, Emery P, Firestein GS, et al. Rheumatoid arthritis. *Nat Rev Dis Primers*, 2018;4: 18001.
2. Scherer HU, Huizinga TWJ, Krönke G, Schett G, Toes REM. The B cell response to citrullinated antigens in the development of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 2018; 14(3):157-69.
3. Malmstrom V, Catrina AI, Klareskog L. The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting. *Nat Rev Immunol*, 2017; 17(1): 60-75.
4. Tobon GJ, Youinou P, Saraux A. The environment, geo-epidemiology, and autoimmune disease: rheumatoid arthritis. *J Autoimmun*, 2010; 35(1): 10-4.
5. Malemba JJ, Mbuyi-Muamba JM, Mukaya J, Bossuyt X, Verschueren P, Westhovens R. The epidemiology of rheumatoid arthritis in Kinshasa, Democratic Republic of Congo—a population-based study. *Rheumatol*, 2012; 51(9): 1644-7.
6. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol*, 2015;15(1): 30-44.
7. Konig MF, Abusleme L, Reinholdt J, Palmer RJ, Teles RP, Sampson K, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-induced hypercitrullination links periodontal infection to autoimmunity in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*, 2016;8(369):369ra176.
8. Stahl EA, Wegmann D, Trynka G, Gutierrez-Achury J, Do R, Voight BF, et al. Bayesian inference analyses of the polygenic architecture of rheumatoid arthritis. *Nat Genet*, 2012; 44(5), 483-9.
9. Padyukov L, Seielstad M, Ong RT, Ding B, Rönnelid J, Seddighzadeh M, Alfredsson L, et al. A genome-wide association study suggests contrasting associations in ACPA-positive versus ACPA-negative rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2011;70(2), 259-65.
10. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis: an approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 1987; 30(11): 1205-13.
11. Weyand CM, Hicok KC, Conn DL, Goronzy JJ. The influence of HLA-DRB1 genes on disease severity in rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med*, 1992;117(10), 801-6.
12. Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, et al. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature*, 2014; 506(7488): 376-81.
13. Viatte S, Lee JC, Fu B, Espéli M, Lunt M, De Wolf JN, et al. Association between genetic variation in FOXO3 and reductions in inflammation and disease activity in inflammatory polyarthritis. *Arthritis Rheumatol*, 2016; 68(11): 2629-36.
14. Krabben A, Huizinga TW, Mil AH. Biomarkers for radiographic progression in rheumatoid arthritis. *Curr Pharm Des*, 2015;21(2):147-69.
15. Lee JC, Espéli M, Anderson CA, Linterman MA, Pocock JM, Williams NJ, et al. Human SNP links differential outcomes in inflammatory and infectious disease to a FOXO3-regulated pathway. *Cell*, 2013;155(1): 57-69.
16. Tranchevent LC, Capdevila FB, Nitsch D, De Moor B, De Causmaecker P, Moreau Y. A guide to web tools to prioritize candidate genes. *Brief Bioinform*, 2011;12(1):22-32.
17. Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, Fernandez NF, Duan Q, Wang Z, et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res*, 2016 ;44(W1):W90-7.

18. Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC, et al. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet*, 2004;75(2):330-7.
19. Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW, et al. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med*, 2007;357(10):977-86.
20. Thomson W, Barton A, Ke X, Eyre S, Hinks A, Bowes J, et al. Rheumatoid arthritis association at 6q23. *Nat Genet*, 2007;39(12):1431-3.
21. Barton A, Thomson W, Ke X, Eyre S, Hinks A, Bowes J, et al. Rheumatoid arthritis susceptibility loci at chromosomes 10p15, 12q13 and 22q13. *Nat Genet*, 2008;40(10):1156-9.
22. Masi AT. Articular patterns in the early course of rheumatoid arthritis. *Am J Med*, 1983;75(6A):16-26.
23. Makrygiannakis D, Hermansson M, Ulfgren AK, Nicholas AP, Zendman AJ, Eklund A, et al. Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. *Ann Rheum Dis*, 2008;67(10):1488-92.
24. Dissick A, Redman RS, Jones M, Rangan BV, Reimold A, Griffiths GR, et al. Association of periodontitis with rheumatoid arthritis: a pilot study. *J Periodontol*, 2010;81(2):223-30.
25. 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. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2010;69:1580-88.
26. Nielen MM, Van Schaardenburg D, Reesink HW, Van De Stadt RJ, Van Der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum*, 2004;50(2):380-6.
27. Aletaha D, Alasti F, Smolen JS. Rheumatoid factor determines structural progression of rheumatoid arthritis dependent and independent of disease activity. *Ann Rheum Dis*, 2013;72(6):875-80.
28. Laurent L, Anquetil F, Clavel C, Ndong-Thiam N, Offer G, Miossec P, et al. IgM rheumatoid factor amplifies the inflammatory response of macrophages induced by the rheumatoid arthritis-specific immune complexes containing anticitrullinated protein antibodies. *Ann Rheum Dis*, 2015;74(7):1425-31.
29. Sokolove J, Johnson DS, Lahey LJ, Wagner CA, Cheng D, Thiele GM, et al. Rheumatoid factor as a potentiator of anti-citrullinated protein antibody-mediated inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol*, 2014;66(4):813-21.
30. Arend WP, Firestein GS. Pre-rheumatoid arthritis: predisposition and transition to clinical synovitis. *Nat Rev Rheumatol*, 2012;8(10):573-86.
31. Sanchooli T, Mahmoudzadeh-Sagheb H, Mahmoudzadeh-Sagheb H, Hashemi M, Rigi-Ladiz M A. The Relationship between Interleukin-6 -174 G/C Gene Polymorphism and Chronic Periodontitis. *Zahedan J Res Med Sci*, 2012;14(3): e93544.
32. Gaber W, Azkalany GS, Gheita TA, Mohey A, Sabry R. Clinical Significance of Serum Interleukin-6 and -174 G/C Promoter Polymorphism in Rheumatoid Arthritis Patients. *Egypt Rheumatol*, 2013; 35(2):107-13.
33. Minichiello E, Semerano L, Boissier MC. Time trends in the incidence, prevalence, and severity of rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Jt Bone Spine*, 2016;83(6):625-30.
34. Theander L, Nyhäll-Wåhlin BM, Nilsson JÅ, Willim M, Jacobsson LTH, Petersson IF, et al. Severe Extra articular Manifestations in a Community-based Cohort of Patients with Rheumatoid Arthritis: Risk

فصلنامه تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی، دوره ۱۳، شماره ۵۲، پائیز ۱۴۰۲-۲۰۲۳، NCMBJ, volume & issue, 13/52, December 2023  
مقاله پژوهشی

Factors and Incidence in Relation to Treatment with Tumor Necrosis Factor Inhibitors. J Rheumatol, 2017;44(7):9

