

Interleukin-34 Gene Expression in the Peripheral Blood Leukocytes of Guillain-Barre Patients

Sina Rezaee¹, Mehrdokht Mazdeh², Mahdi Behzad³, Alireza Zamani⁴, Mohammad Mahdi Eftekharian^{3,*} 

¹ MSc in Immunology, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

² Professor, Departement of Neurology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

³ Associate Professor, Departement of Immunology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

⁴ Professor, Departement of Immunology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

* **Corresponding Author:** Mohammad Mahdi Eftekharian, Departement of Immunology, School of Medicine, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran. Email: eftekharian@umsha.ac.ir

Abstract

Received: 30.05.2020

Accepted: 11.08.2020

How to Cite this Article:

Rezaee S, Mazdeh M, Behzad M, Zamani A, Eftekharian MM. Interleukin-34 Gene Expression in the Peripheral Blood Leukocytes of Guillain-Barre Patients. *Avicenna J Clin Med.* 2020; 27(2): 77-84. DOI: 10.29252/ajcm.27.2.77

Background and Objective: Immune-mediated polyneuropathy is divided into acute and chronic categories named as Guillain Barré syndrome (GBS) and chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy based on the course of the disease. Although the basic mechanism of these conditions has not been yet clarified, genes that regulate immune responses are putative contributors in their development. The aim of this study was to compare the blood expression level of *IL-34* gene between patients with GBS and healthy individuals.


Materials and Methods: In this case-control study, blood samples were collected from 53 patients with GBS (i.e., 33 chronic patients and 20 acute patients) and 40 healthy individuals. Gene expression levels in the studied groups were measured using the real-time polymerase chain reaction technique. Finally, statistical analysis was performed using SPSS software (version 16) at a significance level of < 0.05 was.

Results: The patient group consisted of 36 (67.93%) males and 17 (32.07%) females. In addition, the healthy control group included 27 (67.5%) males and 13 (32.5%) females. The results showed a significant increase in *IL-34* expression in the GBS patients, compared to that in the control group.

Conclusion: The findings of the present study revealed an increase in *IL-34* gene expression in patients with GBS. Accordingly, it seems that *IL-34* gene has an important role in the pathogenesis of this disease.

Keywords: Interleukin-34, Guillain-Barre Syndrome, Polyneuropathy

بیان ژن اینترلوکین ۳۴ در سلول‌های خون محیطی افراد مبتلابه سندرم گیلن باره

سینا رضایی^۱، مهرداد مزده^۲، مهدی بهزاد^۳، علیرضا زمانی^۴، محمد مهدی افتخاریان^{۲*} 

^۱ کارشناس ارشد ایمنی‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

^۲ استاد، گروه نورولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

^۳ دانشیار، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

^۴ استاد، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران

* نویسنده مسئول: محمد مهدی افتخاریان، گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران.

ایمیل: eftekharian@umsha.ac.ir

چکیده

سابقه و هدف: پلی‌نوروپاتی‌های باواسطه ایمنی، به دو دسته حاد و مزمن تقسیم می‌شوند که سندرم گیلن باره (GBS: Guillain-Barré Syndrome) و پلی‌نوروپاتی دمی‌لینیزاسیون التهابی مزمن (CIDP: Chronic Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy) نام دارند. اگرچه مکانیسم اصلی این بیماری‌ها هنوز به طور دقیق شناخته نشده است، ژن‌هایی که تنظیم‌کننده پاسخ‌های سیستم ایمنی هستند نقش اصلی را در گسترش این بیماری بر عهده دارند. هدف از این مطالعه بررسی میزان بیان مولکولی اینترلوکین ۳۴ در بیماران مبتلابه سندروم گیلن باره در مقایسه با گروه کنترل است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد-شاهدی از ۵۳ بیمار مبتلابه سندروم گیلن باره (۳۳ بیمار از نوع مزمن و ۲۰ بیمار از نوع حاد) و ۴۰ فرد سالم نمونه خون جمع‌آوری شد. میزان بیان ژن اینترلوکین ۳۴ در گروه‌ها با استفاده از روش Real-time PCR اندازه‌گیری شد. درانتها نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ تجزیه و تحلیل شدند و سطح معناداری، $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: گروه بیماران متشکل از ۳۶ مرد (۶۷/۹۳ درصد) و ۱۷ زن (۳۲/۰۷ درصد) و گروه کنترل نیز شامل ۲۷ مرد (۶۷/۵ درصد) و ۱۳ زن (۳۲/۵ درصد) بودند. نتایج مطالعه حاکی از افزایش معنادار بیان این سایتوکاین در بیماران مبتلابه سندروم گیلن باره نسبت به گروه کنترل بود.

نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر، افزایش بیان ژن اینترلوکین ۳۴ در بیماران مبتلابه سندروم گیلن باره مشاهده شد. به نظر می‌رسد اینترلوکین ۳۴ در پاتوژنز پلی‌نوروپاتی‌های باواسطه ایمنی اهمیت زیادی داشته باشد.

واژگان کلیدی: اینترلوکین ۳۴، پلی‌نوروپاتی، سندروم گیلن باره

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۳/۰۸

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۵/۲۳

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی همدان محفوظ است.

مقدمه

واکسن‌ها تأکید کرده‌اند. ابتلا به این بیماری با تروما و عمل جراحی نیز در ارتباط است [۲].

بسیاری از دانسته‌های ما درباره گیلن باره از مدل حیوانی آن، یعنی نوریت آلرژیک به‌دست آمده است که ترکیبی از واکنش سلول‌های T و آنتی‌بادی به پروتئین‌ها و گلیکولیپیدهای میلین آن را واسطه‌گری می‌کنند. آنتی‌بادی‌هایی که علیه اعصاب محیطی در بیماران مبتلابه گیلن باره مشاهده می‌شود و کاهش تیترا آن حاکی از روند بهبودی بیمار است [۳]. سندروم گیلن باره به‌صورت ۰/۴ تا ۲ نفر در هر ۱۰۰ هزار نفر اتفاق می‌افتد. این بیماری عموماً به فصل وابسته نیست و به‌صورت اپیدمیک رخ نمی‌دهد. به نظر

سندروم گیلن باره شامل گروهی از بیماری‌های نوروپاتیکی است که با ضعف پیش‌رونده و رفلکس‌های کاهش‌یافته مشخص می‌شود. اتیولوژی سندروم گیلن باره (Guillain-Barré Syndrome) به‌طور دقیق شناخته نشده است؛ اما به نظر می‌رسد این بیماری ناشی از پاسخ ایمنی کنترل‌نشده و حمله سیستم ایمنی به بافت عصبی ایجاد می‌شود. این پاسخ ممکن است با جراحی، ایمن‌سازی یا عفونت ایجاد شود [۱]. ارتباط تزریق واکسن ضد‌هاری و واکسن آنفلوانزا با سندروم گیلن باره برای اولین بار در سال ۱۹۷۶ در ایالت متحده آمریکا بررسی شد. مطالعات اخیر بر ابتلا به گیلن باره بعد از واکسیناسیون با انواع

آنتی‌بادی علیه گانگلیوزید سبب فعال شدن بیشتر کمپلمان نسبت به زمانی می‌شود که آنتی‌بادی علیه گانگلیوزید منفرد ساخته می‌شود [۸].

پس از کشف اینترلوکین ۳۴ در سال ۲۰۰۸ مشخص شد این سایتوکاین گیرنده مولکول‌هایی نظیر CSF-1 (Cerebrospinal Fluid)، (Fluid) PTPRZ1 (Receptor-type tyrosine-protein)، (phosphatase zeta) و CD138 (syndecan-1) است [۹]. اینترلوکین ۳۴ می‌تواند نقش‌های متنوعی در محافظت سیستم عصبی، بیماری‌های خودایمن، عفونت، سرطان و بیماری‌های دژنراتیو استخوان داشته باشد [۱۰]. در انسان اینترلوکین ۳۴، M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) و GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) بقا و تمایز مونوسیت‌ها به ماکروفاژها را موجب می‌شوند. ماکروفاژهای القاشده با GM-CSF معمولاً به نام M1 نامیده می‌شوند. اینترلوکین ۳۴ و M-CSF تمایز ماکروفاژها با فنوتیپ مشابه را منجر می‌شوند. این ماکروفاژها اینترلوکین 10^{high} و اینترلوکین 12^{low} هستند که اینترلوکین ۲۳ تولید نمی‌کنند و سطح کمی از MHC-II، CD80 و CD86 را بیان می‌کنند. ماکروفاژهای القاشده با اینترلوکین ۳۴ و M-CSF میزان کمتری از تحریک‌کنندگی سلول‌های T را نشان و فعالیت سلول‌های T افکتور را کاهش می‌دهند [۱۱]. بر اساس مطالعات انجام شده، اینترلوکین ۳۴ در بیماری آلزایمر نقش مهمی دارد و توسط نورون‌ها ترشح می‌شود. همچنین سلول‌های میکروگلیال رسپتور این سایتوکاین را بیان می‌کنند که در نتیجه آن، ماکروفاژها تکثیر می‌شود و آمیلوئید بتا را از بین می‌برند و به نقص عملکرد سیستم عصبی و وقوع بیماری آلزایمر منجر می‌شود [۱۲].

با توجه به موارد یادشده، این مطالعه با هدف تعیین میزان بیان مولکولی اینترلوکین ۳۴ در بیماران مبتلا به سندروم گیلن باره در مقایسه با گروه کنترل انجام شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه مورد-شاهدی، روی دو گروه از افراد انجام شد که شامل گروه آزمون (بیمار) که به سندروم گیلن باره مبتلا بودند [چه در فاز مزمن بیماری (پلی‌نوروپاتی دمی‌لینزاسیون التهابی مزمن) و چه در فاز حاد (پلی‌نوروپاتی دمی‌لینزاسیون التهابی حاد)] و گروه کنترل (سالم) که به این بیماری مبتلا نبودند. معیار ورود به مطالعه عبارت بود از: افراد مبتلا به سندروم گیلن باره مراجعه‌کننده به بیمارستان سینا (بستری و سرپایی) و کلینیک تخصصی امام خمینی همدان که وجود این بیماری در آن‌ها قطعی شده است. معیار خروج عبارت بود از: سابقه ابتلا به سایر بیماری‌های زمینه‌ای و خودایمن. معیار ورود برای گروه کنترل نیز شامل افراد سالمی بود که از نظر میانگین سنی و جنسی با گروه بیمار همسان‌سازی شدند.

می‌رسد شیوع این بیماری در مردان بیشتر از زنان باشد. این بیماری سالانه ۱۰۰ هزار نفر را در سراسر جهان درگیر می‌کند [۴]. رده سنی ابتلا به این بیماری، از ۸ ماه تا ۸۱ سال است. فرم پلی‌نوروپاتی دمی‌لینزاسیون التهابی حاد (AIDP: Acute Inflammatory Demyelinating Polyneuropathy) این بیماری علت ۹۰ درصد سندروم گیلن باره در اروپا و آمریکای شمالی است. درحالی‌که فرم نوروپاتی آکسونی حرکتی حاد (AMAN: Acute Motor Axonal Neuropathy) و نوروپاتی آکسونی حسی-حرکتی حاد (AMSAN: Acute Motor-Sensory Axonal Neuropathy) فرم‌های شایع گیلن باره در آسیا، آمریکای جنوبی و مرکزی هستند [۵].

سندروم گیلن باره به دو فرم اصلی پلی‌نوروپاتی دمی‌لینزاسیون التهابی حاد و مزمن تقسیم می‌شود. فرم پلی‌نوروپاتی دمی‌لینزاسیون التهابی حاد به شدت ریشه‌های اعصاب محیطی را طی ۴ هفته از شروع بیماری درگیر می‌کند. درحالی‌که فرم پلی‌نوروپاتی دمی‌لینزاسیون التهابی مزمن ریشه‌های اعصاب محیطی را بعد از ۸ هفته از آغاز بیماری درگیر می‌کند. فرم پلی‌نوروپاتی دمی‌لینزاسیون التهابی حاد شامل انواع نوروپاتی آکسونی حرکتی حاد، نوروپاتی آکسونی حسی-حرکتی حاد و میلر فیشر است؛ فرمی است که در آن آکسون‌های عصب حسی و حرکتی به شدت تخریب می‌شوند. فرم پلی‌نوروپاتی دمی‌لینزاسیون التهابی مزمن که به صورت آیدیوپاتیک یا به صورت ثانویه در اختلالات سیستمیک رخ می‌دهد، به انواع (MADSAM: Multifocal Acquired Demyelinating Sensory And Motor neuropathy) و (DADS: Distal Acquired Demyelinating Sensory Neuropathy) تقسیم‌بندی شده و در اصطلاح به‌عنوان نوروپاتی حرکتی چندکانونه در نظر گرفته می‌شود.

پلی‌نوروپاتی دمی‌لینزاسیون التهابی حاد فرمی است که عمدتاً خودمحدودشونده است و به ندرت دچار عود می‌شود، درحالی‌که پلی‌نوروپاتی دمی‌لینزاسیون التهابی مزمن فرمی است که به ندرت تک‌فازی است و توانایی عود مجدد دارد [۶]. بر اساس مستندات موجود، نقش سیستم ایمنی در بروز بیماری گیلن باره، بسیار مهم و پررنگ است. با وجود تولید مقادیر زیاد IgG علیه پپتیدهای میلین، سلول‌های B خاطره نیز نقش کلیدی را در پاتوژنز گیلن باره بازی می‌کنند. در مطالعات پیشین نشان داده شده است که درصد سلول‌های B خاطره در بیماران مبتلا به گیلن باره نسبت به گروه کنترل بیشتر بوده است و با شدت بیماری ارتباط مستقیم دارد. اتوانتی‌بادی‌های IgG به‌طور کاملاً مؤثر به آنتی‌ژن‌های خودی متصل می‌شود و توانایی فعال کردن سیستم کمپلمان را دارند؛ بنابراین، سبب ارتقای دمی‌لین شدن و تخریب آکسونال می‌شوند [۷]. همچنین نشان داده شده است IgG، C3 و کمپلکس حمله به غشا در گره‌های ثانویه بیماران مبتلا به گیلن باره رسوب می‌کند. کمپلکس‌های

جدول ۱: دما و زمان‌های دستگاه ترمال سایکلر برای سنتز cDNA

دما (سانتی‌گراد)	زمان (دقیقه)
۲۵ ⁰	۵
۵۵ ⁰	۶۰
۸۵ ⁰	۵

ترمال سایکلر (Techne) ساخت آلمان استفاده شد. مشخصات دمایی و زمانی اعمال شده در جدول ۱ ذکر شده است.

طراحی پرایمر

طراحی پرایمر برای ژن اصلی و ژن مرجع، با کمک نرم‌افزار Allele ID نسخه ۷/۸۲ انجام شده است. طراحی پرایمرها به صورت Exon-Exon junction انجام شد تا پرایمرها توانایی اتصال به توالی‌های DNA را نداشته باشند و فقط به cDNA متصل شوند. در نتیجه وجود DNA درون نمونه cDNA موجب پدید آمدن خطا نمی‌شود. به منظور تأیید عملکرد اختصاصی، توالی پرایمرها در سایت NCBI با BLAST کردن ارزیابی شد. در جدول ۲ مشخصات پرایمرهای استفاده شده آمده است.

آزمایش Real-time PCR

در این بخش از روش سایبرگرین و دستگاه ریل تایم شرکت Roche (Light cycler-96) ساخت کشور آلمان استفاده شد. در جدول ۳ مشخصات سیکل‌های اعمال شده آمده است. Ct حاصل از واکنش Real-Time PCR با تعداد نسخه cDNA اولیه ارتباط دارد. به عبارتی دیگر، هرچه تعداد نسخه cDNA اولیه بیشتر باشد، تعداد چرخه‌های کمتری مورد نیاز است که تعداد محصول به حد قابل شناسایی برسد. همچنین برای بررسی آلودگی‌های احتمالی از کنترل منفی استفاده شد. در این مطالعه از فرمول لیواک برای نرمال‌سازی داده‌ها و مقایسه بیان ژن‌های مدنظر در گروه‌های بیمار و کنترل استفاده شد:

$$\Delta Ct (\text{test or control}) = Ct (\text{target}) - Ct (\text{reference})$$

برای مقایسه میزان بیان ژن‌های مدنظر در گروه بیمار و

معیار خروج نیز ابتدا به سندرم گیلن باره و سایر بیماری‌های خودایمن و عفونی و مطابق نبودن از لحاظ سنی و جنسی با گروه بیمار بود.

برای تعیین تعداد نمونه با توجه به اینکه مطالعه مشابهی در زمینه ژن‌های بررسی شده در این مطالعه انجام نشده است، لذا از اطلاعات مقاله Xu و همکاران (۲۰۱۶) استفاده شد که درباره ژن‌های دیگر انجام شده بود [۱۳]. با توجه به این اطلاعات و فرمول آماری و با در نظر گرفتن خطای نوع اول ۵ درصد و توان آزمون ۸۰ درصد، تعداد نمونه لازم در این مطالعه ۴۰ نفر به دست آمد.

تعداد افراد مطالعه شده و نمونه‌گیری از آن‌ها

از ۵۳ بیمار مبتلا به سندرم گیلن باره در استان همدان نمونه‌گیری انجام شد. بیماران پس از معاینه و تأیید پزشک فوق تخصص (بخش نورولوژی مرکز آموزشی درمانی سینا همدان)، بر اساس راهنمای موجود در کتاب Victors and Adams principles of neurology (ویرایش دهم) انتخاب و در صورت واجد شرایط بودن، ۱۰ میلی‌لیتر خون وریدی در لوله خلأ خون‌گیری حاوی ضد انعقاد EDTA جمع‌آوری شد. از ۴۰ داوطلب گروه کنترل نیز خون‌گیری انجام شد.

استخراج RNA/از خون تام

بدین منظور از کیت استخراج RNA محصول شرکت Gene ALL (Gene All Hybrid-RTM Blood RNA) ساخت کره جنوبی استفاده شد. برای بررسی کمیت RNA استخراج شده از دستگاه نانودراپ و خوانش جذب نوری در نسبت A260/A280 و A260/A230 و برای بررسی کیفیت RNA استخراج شده از الکتروفورز نمونه‌ها روی ژل آگاروز ۲ درصد استفاده شد. الگوی الکتروفورز نمونه‌ها روی ژل آگاروز ۲ درصد در مقایسه با Ladder نشان‌دهنده کیفیت RNA استخراج شده است.

سنتز cDNA

به منظور سنتز cDNA از کیت سنتز cDNA (Gene ALL-HyperScript™) ساخت کره جنوبی و دستگاه

جدول ۲: مشخصات پرایمرهای استفاده شده

ژن	توالی پرایمر	طول پرایمر	اندازه محصول
اینترلوکین ۳۴	F: CTGTACTGCTCCTGCTGTAAC	۲۱	۱۰۱
	R: CATACTGCAATGAGGGCTCTG	۲۲	

جدول ۳: مراحل واکنش Real-Time PCR

مرحله	دما (سانتی‌گراد)	زمان	تعداد سیکل‌ها
فعال‌سازی پلیمرز	۹۵	۱۰ (دقیقه)	۱
دناتوراسیون	۹۵	۱۰ (ثانیه)	۴۰
اتصال پرایمر / اکستنشن	۶۰	۱ (دقیقه)	

کنترل از محاسبه $2^{-\Delta Ct}$ استفاده شد.

به منظور تحلیل داده‌های Real-time PCR از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون‌های کولموگروف اسمیرنوف، تی مستقل و تحلیل واریانس یک طرفه و برای مقایسه‌های چندگانه از آزمون توکی استفاده شد. همچنین برای ترسیم نمودارها از GraphPad Prism نسخه ۶ استفاده شد. $P < 0.05$ به عنوان حد معنی دار بودن در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در این مطالعه از ۵۳ بیمار مبتلا به سندروم گیلن باره، ۳۳ بیمار به نوع پلی‌نوروپاتی دمیلینیزاسیون التهابی مزمن مبتلا بودند و تحت درمان قرار داشتند. ۲۰ بیمار دیگر به پلی‌نوروپاتی دمیلینیزاسیون التهابی حاد مبتلا بودند. همچنین بیماران از نظر سابقه ابتلا به عفونت نیز به دو گروه طبقه‌بندی شدند که ۲۴ نفر از آن‌ها سابقه ابتلا به عفونت (صرف نظر از نوع عفونت) داشتند و ۲۹ نفر بدون سابقه ابتلا به عفونت بودند. ۴۰ فرد نیز در گروه کنترل سالم قرار گرفتند که به هیچ‌گونه بیماری‌ای مبتلا نبودند. دو گروه بیمار و کنترل از لحاظ سنی و جنسی همسان‌سازی شده بودند و برای اطمینان از این موضوع، آزمون تی مستقل انجام و مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری بین این دو گروه وجود ندارد.

جدول ۴: مشخصات دموگرافیک گروه‌های مطالعه شده ($P=0.93$).
را نشان می‌دهد.

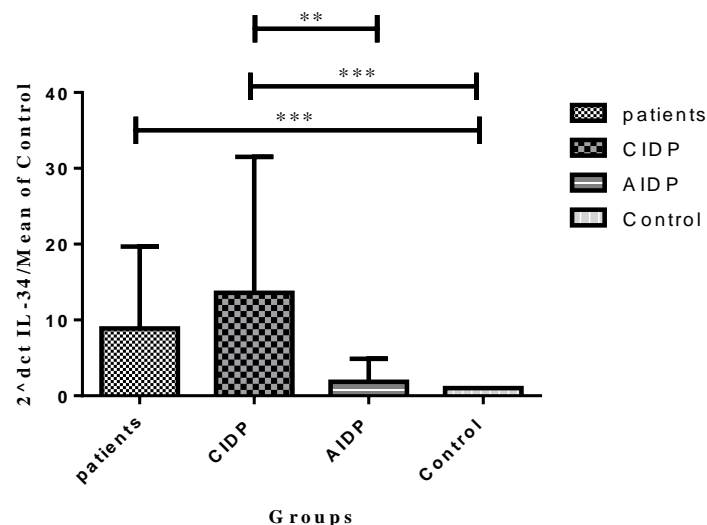
بررسی میزان بیان ژن اینترلوکین ۳۴ در بین گروه‌های مطالعه شده

به منظور بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنوف استفاده شد. برای مقایسه بیان ژن بین گروه بیمار و کنترل از آزمون تی مستقل استفاده شد. به منظور مقایسه بیان این ژن در بین گروه‌های بیمار (پلی‌نوروپاتی دمیلینیزاسیون التهابی مزمن و حاد) و کنترل (سه گروه) از آزمون پارامتریک تحلیل واریانس یک طرفه آنوا استفاده شد. همچنین از آزمون توکی برای مقایسه میانگین دوهو گروه‌ها استفاده شد. مقادیر P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان حد معنادار در نظر گرفته شد. نتایج این آزمون‌ها در شکل ۱ آمده است.

در شکل ۲، میزان بیان ژن اینترلوکین ۳۴ در گروه بیمار در مقایسه با گروه کنترل سنجیده شده که بیانگر افزایش معنادار است ($P=0.000$). یافته‌های آزمون آماری در بین گروه‌های پلی‌نوروپاتی دمیلینیزاسیون التهابی مزمن و کنترل نشان‌دهنده افزایش معنادار بیان این ژن در گروه پلی‌نوروپاتی دمیلینیزاسیون التهابی مزمن است ($P=0.000$). بیان ژن در گروه پلی‌نوروپاتی

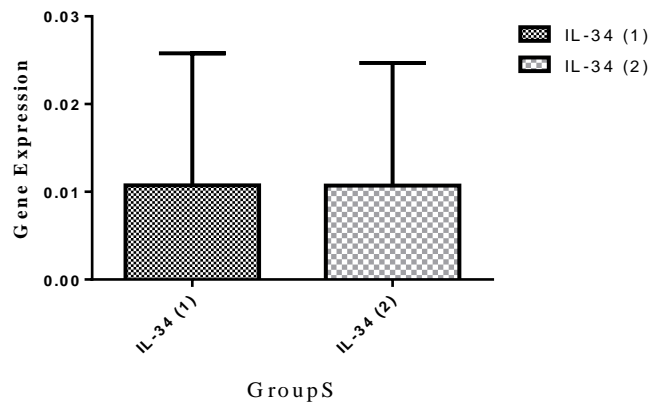
جدول ۴: مشخصات دموگرافیک، توزیع جنسیتی و توزیع سنی افراد مطالعه شده

گروه	تعداد	زنان تعداد (درصد)	مردان تعداد (درصد)	سن انحراف معیار \pm میانگین
پلی‌نوروپاتی دمیلینیزاسیون التهابی مزمن	۳۳	۱۰ (۳۰/۳)	۲۳ (۶۹/۷)	50.30 ± 3.02
پلی‌نوروپاتی دمیلینیزاسیون التهابی حاد	۲۰	۶ (۳۰)	۱۴ (۷۰)	52.95 ± 3.89
بیماران با سابقه ابتلا به عفونت	۲۴	۶ (۳۳/۴)	۱۶ (۶۶/۶)	48.79 ± 3.66
بیماران بدون سابقه ابتلا به عفونت	۲۹	۱۰ (۳۴/۵)	۱۹ (۶۵/۵)	53 ± 3.33
گروه کنترل	۴۰	۱۳ (۳۲/۵)	۲۷ (۶۷/۵)	51.63 ± 2.54



شکل ۱: مقایسه بیان ژن اینترلوکین ۳۴ در گروه‌های بیمار در مقایسه با گروه کنترل

** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترل



شکل ۲: مقایسه سابقه ابتلا به عفونت و میزان بیان ژن اینترلوکین ۳۴ در گروه بیمار

(۱) بیماران با سابقه ابتلا به عفونت؛ (۲) بیماران بدون سابقه ابتلا به عفونت

با CSF-1R سبب آپوپتوز *thiocyte*ها و در نتیجه تخریب آنها می‌شود [۱۵].

اینترلوکین ۳۴ سایتوکاینی است که از نظر عملکرد مشابه (Macrophage Colony Stimulating Factor) M-CSF است. در مطالعه Bostrom و همکارانش در سال ۲۰۱۳ نشان داده شد بیان اینترلوکین ۳۴ با $TNF-\alpha$ و اینترلوکین 1β افزایش می‌یابد؛ بنابراین، اینترلوکین ۳۴ ممکن است به التهاب و پوکی استخوان در بیماری‌های تخریب‌کننده استخوان مانند پریودنتیت منجر شود [۱۶]. در مطالعه Yang و همکاران در سال ۲۰۱۶ نشان داده شد سطح اینترلوکین ۳۴ در مایع سینوویال افراد مبتلا به RA به‌طور معناداری افزایش یافته است. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد اینترلوکین ۳۴ سبب تحریک فعالیت P-STAT3 و در نهایت بیان miR-21 شده است که در بقای سلول و مقاومت در برابر آپوپتوز نقش دارد؛ بنابراین، مسیر پیام‌رسانی اینترلوکین ۳۴/STAT-3/miR-21 مسیری حیاتی برای بقای فیبروبلاست‌های سینوویال در بیماران مبتلا به RA است که از این مسیر می‌توان به‌عنوان اهداف درمانی استفاده کرد [۱۷].

نتایج مطالعه Tian و همکارانش در سال ۲۰۱۲ نشان داد سطح سرمی اینترلوکین ۳۴ به‌طور معناداری در بیماران مبتلا به RA بالا و با شدت فعالیت بیماری در ارتباط است. همچنین سطح این سایتوکاین در مایع سینوویال این بیماران نسبت به سطح سرمی آن بیشتر است. در این مطالعه نشان داده شد در سطح سرمی اینترلوکین ۳۴ بعد از درمان با anti-TNF دچار کاهش می‌شود. همچنین در حضور اینترلوکین ۳۴، اینترلوکین ۱۷ دچار افزایش می‌شود. نتایج این مطالعه بیان می‌کند اینترلوکین ۳۴ ممکن است در پاتوژنز RA ایفای نقش کند [۱۸]. همسو با نتایج این مطالعه، نتایج مطالعه Cheng و همکاران در سال ۲۰۱۹ نشان می‌دهد سطح سرمی اینترلوکین ۳۴ و اینترلوکین ۱۷ به‌عنوان دو فاکتور التهابی در بیماران نفریت لوپوسی (LN: Lupus nephritis)

دمیلیتیزاسیون التهابی مزمن نسبت به گروه حاد افزایش معنادار داشته است ($P=0/001$). با وجود اینکه میزان بیان این ژن در گروه پلی‌نورپاتی دمیلیتیزاسیون التهابی حاد نسبت به کنترل افزایش داشته، اما این اختلاف معنادار نبوده است ($P=0/93$).

مقایسه میزان بیان ژن اینترلوکین ۳۴ در گروه‌های با سابقه ابتلا به عفونت و بدون سابقه ابتلا

در این مطالعه به‌منظور بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف اسمیرنوف استفاده شد. برای مقایسه سابقه ابتلا به عفونت و میزان بیان ژن اینترلوکین ۳۴ از آزمون تی مستقل استفاده شد. نتایج مندرج در نمودار ۲ اختلاف معناداری را در بین گروه‌های مطالعه نشان نداد ($P=0/98$).

بحث

در مطالعه حاضر سطح بیان ژن اینترلوکین ۳۴ در سه گروه بیمار، پلی‌نورپاتی دمیلیتیزاسیون التهابی مزمن و حاد نسبت به گروه کنترل افزایش معنادار داشته است. در تحقیقات مختلف نشان داده شده است اینترلوکین ۳۴ در پاتوژنز چندین بیماری خودایمن نقش دارد. مطالعه Xie و همکارانش در سال ۲۰۱۸ نشان داد سطح سرمی اینترلوکین ۳۴ در بیماران مبتلا به SLE به‌طور معناداری بیشتر از گروه کنترل است که با شدت فعالیت بیماری در ارتباط است؛ بنابراین، این سایتوکاین به‌عنوان مارکر فعالیت بیماری در نظر گرفته می‌شود [۱۴]. در مطالعه Wang و همکارانش در سال ۲۰۱۸ نشان داده شد بیان ژن اینترلوکین ۳۴ در بافت تیروئید بیماران مبتلا به تیروئید هاشیموتو (HT: Hashimoto's thyroiditis) به‌طور معناداری کاهش یافته است. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد سطح سرمی اینترلوکین ۳۴ نیز در این بیماران به‌طور معناداری کاهش یافته است. به‌علاوه نشان داده شد اینترلوکین ۳۴ با اتوانتی‌بادی‌های تیروئیدی در هر دو بافت تیروئید و سرم در ارتباط است. از طرفی دیگر، نتایج مطالعه نشان می‌دهد اینترلوکین ۳۴ القاشده

همسو با مطالب ذکر شده، نتایج مطالعه Liu و همکارانش در سال ۲۰۱۹ نشان داد اینترلوکین ۳۴ احتمالاً با دخالت در تمایز ماکروفاژها به سمت فنوتیپ M2 نقش حفاظتی در کبد و سرکوبکننده التهاب در هیپاتیت دارد [۳۰]. همچنین در مطالعه Bezie و همکارانش در سال ۲۰۱۵ مشخص شد اینترلوکین ۳۴ به عنوان سرکوبگر اختصاصی سلولهای Treg و به عنوان سایتوکاین تورلوژنیک مهارکننده پاسخهای ردکننده پیوند عمل می کند و موجب تحمل پیوند می شود [۳۱].

نتیجه گیری

در این مطالعه افزایش بیان اینترلوکین ۳۴ در بیماران مبتلا به سندرم گیلن باره مشاهده شد. نتایج بر نقش احتمالی این سایتوکاین در پاتوژنز این بیماری تأکید دارند. با این وجود بررسی های بیشتری در خصوص مکانیسم های مولکولی و فرایندهای ایمونوپاتوژنز این سایتوکاین در جامعه آماری بزرگ تر لازم به نظر می رسد.

تشکر و قدردانی

این مقاله از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد ایمنی شناسی مصوب دانشگاه علوم پزشکی همدان به شماره ۹۸۰۱۲۷۳۲۲ گرفته شده است. بدین وسیله نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه و تمام عزیزانی اعلام می دارند که در تکمیل این پروژه همکاری داشتند.

تضاد منافع

در این مطالعه هیچ گونه تضاد منافی گزارش نشده است.

ملاحظات اخلاقی

پژوهشگران در تمامی مراحل انجام این مطالعه به مفاد بیانیه هلسینکی مقید بودند. تمام اطلاعات مربوط به بیماران محرمانه خواهد ماند. پیش از آغاز مطالعه، از کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی همدان با کد IR.UMSHA.REC. 1397.807 مجوز دریافت شد. از بیماران و گروه کنترل در ابتدای پژوهش رضایت کتبی و آگاهانه گرفته شد. ورود به مطالعه داوطلبانه بود و تمایل نداشتن بیماران نسبت به شرکت در مطالعه مانعی برای اقدام درمانی برای آنها ایجاد نمی کرد. از افراد شرکت کننده در مطالعه هیچ گونه هزینه ای دریافت نشد.

سهم نویسندگان

نویسنده اول (پژوهشگر اصلی) تهیه پروپوزال، انجام امور آزمایشگاهی ۱۵ درصد؛ نویسنده دوم (پژوهشگر اصلی) مشاور علمی و معرفی بیماران ۱۰ درصد؛ نویسنده سوم (پژوهشگر همکار) مشاوره علمی طرح، ویرایش علمی مقاله ۱۰ درصد؛ نویسنده چهارم (پژوهشگر همکار) مشاور آماری طرح،

به طور معناداری افزایش یافته است که به عنوان مارکرهای تشخیص بالینی، درمان و پیشرفت بیماری در نظر گرفته می شوند [۱۹]. همچنین نشان داده شده است سلولهای Th17 نقش مهمی در پاتوژنز سندرم گیلن باره دارند [۲۰]؛ بنابراین، احتمالاً اینترلوکین ۳۴ در سندرم گیلن باره نقش پاتوژنیک داشته باشد.

اینترلوکین ۳۴ سایتوکینی است که سبب تمایز و تولید ماکروفاژهای M1 و M2 و در نهایت افزایش تولید اینترلوکین ۱۰ و CCL-17 می شود [۲۱]. از طرفی، Chen و همکارانش در سال ۲۰۱۲ در مطالعه ای نشان دادند اینترلوکین ۱۰ در افراد مبتلا به نوع پلی نوروپاتی دمیالینیزاسیون التهابی مزمن افزایش یافته است. همچنین ماکروفاژهای القاشده با اینترلوکین ۳۴ قادر به القای تمایز سلولهای T مبتدی به سمت فنوتیپ Th1 هستند [۲۲، ۲۳]. Chi و همکارانش در سال ۲۰۱۰ در مطالعه ای نشان دادند نسبت سلولهای Th17 در PBMC و مایع مغزی نخاعی بیماران مبتلا به نوع پلی نوروپاتی دمیالینیزاسیون التهابی مزمن که در فاز فعال بیماری قرار دارند، نسبت به افراد با نوع پلی نوروپاتی دمیالینیزاسیون التهابی مزمن که در فاز غیرفعال بیماری قرار دارند افزایش داشته است؛ اما هر دو نوع افراد مبتلا به نوع پلی نوروپاتی دمیالینیزاسیون التهابی مزمن که در فاز فعال و غیرفعال بیماری قرار دارند، افزایش در سلولهای Th1 را در مایع مغزی نخاعی نشان دادند [۲۴]؛ اینترلوکین ۳۴ ممکن است به واسطه تحریک تمایز سلولهای Th1 یا القای بیان سایتوکاین های پیش التهابی در پاتوژنز سندرم گیلن باره نقش داشته باشد [۲۵]. همسو با نتایج مطالعات ذکر شده، نتایج مطالعه حاضر نیز حاکی از افزایش بیان اینترلوکین ۳۴ در بیماران مبتلا به سندرم گیلن باره است که شواهدی را بر نقش این سایتوکاین در پاتوژنز این بیماری فراهم می کند؛ بنابراین، بررسی های بیشتر در زمینه مکانیسم های مولکولی و فرایندهای ایمونوپاتوژنز این سایتوکاین لازم است.

نتایج مطالعه حاضر بیان می کند بین گروه بیماران با سابقه ابتلا به عفونت در مقایسه با گروه بیماران بدون سابقه ابتلا به عفونت از نظر بیان ژن اینترلوکین ۳۴ اختلاف معناداری وجود ندارد. سایتوکاین ها پاسخ ایمنی میزبان را هنگام عفونت تنظیم می کنند. سایتوکاین های ضد التهابی و PAMP ها بیان اینترلوکین ۳۴ را القا می کنند که در نتیجه آن، پاسخ ایمنی ذاتی علیه عفونت ها تعدیل می شود. اینترلوکین ۳۴ با ایفای نقش خود در تحمل ایمنی به ماندگاری ویروس ها کمک می کند [۲۶، ۲۷]. بیماران مبتلا به عفونت هیپاتیت C افزایش سطح اینترلوکین ۳۴ را نشان می دهند. همین مورد در بیماران مبتلا به عفونت آنفلوانزا A نیز مشاهده شده است که در آنها تولید اینترلوکین ۳۴ به شدت به پاسخ التهابی واسطه اینترلوکین ۲۲ بستگی دارد [۲۸، ۲۹].

حمایت مالی

این مطالعه از سوی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان پشتیبانی مالی شده است.

روش‌شناسی ۱۰ درصد؛ نویسنده پنجم (پژوهشگر اصلی) مسئول مکاتبات، طراحی پروژه، تدوین بخش‌های مختلف طرح، نگارش و ویرایش مقاله ۵۵ درصد.

REFERENCES

- Walling AD, Dickson G. Guillain-Barre syndrome. *Am Fam Physician*. 2013;**87**(3):191-7. PMID: 23418763
- Willison HJ, Jacobs BC, van Doorn PA. Guillain-Barre syndrome. *Lancet*. 2016;**388**(10045):717-27. PMID: 26948435 DOI: 10.1016/S0140-6736(16)00339-1
- Dimachkie MM, Barohn RJ. Guillain-Barré syndrome and variants. *Neurol Clin*. 2013;**31**(2):491-510. PMID: 23642721 DOI: 10.1016/j.ncl.2013.01.005
- Lambracht-Washington D, Wolfe GI. Cytokines in Guillain-Barre syndrome: a lesson in time. *Arch Neurol*. 2011;**68**(4):427-8. PMID: 21482922 DOI: 10.1001/archneurol.2011.47
- Zhang HL, Zheng XY, Zhu J. Th1/Th2/Th17/Treg cytokines in Guillain-Barré syndrome and experimental autoimmune neuritis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013;**24**(5):443-53. PMID: 23791985 DOI: 10.1016/j.cytogfr.2013.05.005
- Mathey EK, Park SB, Hughes RA, Pollard JD, Armati PJ, Barnett MH, et al. Chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: from pathology to phenotype. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2015;**86**(9):973-85. PMID: 25677463 DOI: 10.1136/jnnp-2014-309697
- Yuki N. Ganglioside mimicry and peripheral nerve disease. *Muscle Nerve*. 2007;**35**(6):691-711. PMID: 17373701 DOI: 10.1002/mus.20762
- Rodriguez Y, Rojas M, Pacheco Y, Acosta-Ampudia Y, Ramirez-Santana C, Monsalve DM, et al. Guillain-Barre syndrome, transverse myelitis and infectious diseases. *Cell Mol Immunol*. 2018;**15**(6):547-62. PMID: 29375121 DOI: 10.1038/emi.2017.142
- Segaliny AI, Brion R, Mortier E, Maillason M, Chérel M, Jacques Y, et al. Syndecan-1 regulates the biological activities of interleukin-34. *Biochim Biophys Acta*. 2015;**1853**(5):1010-21. PMID: 25662098 DOI: 10.1016/j.bbamer.2015.01.023
- Guillonnet C, Bezie S, Anegón I. Immunoregulatory properties of the cytokine IL-34. *Cell Mol Life Sci*. 2017;**74**(14):2569-86. PMID: 28258292 DOI: 10.1007/s00018-017-2482-4
- Foucher ED, Blanchard S, Preisser L, Descamps P, Ifrah N, Delneste Y, et al. IL-34- and M-CSF-induced macrophages switch memory T cells into Th17 cells via membrane IL-1 α . *Eur J Immunol*. 2015;**45**(4):1092-102. PMID: 25545357 DOI: 10.1002/eji.201444606
- Segaliny AI, Mohamadi A, Dizier B, Lokajczyk A, Brion R, Lanel R, et al. Interleukin-34 promotes tumor progression and metastatic process in osteosarcoma through induction of angiogenesis and macrophage recruitment. *Int J Cancer*. 2015;**137**(1):73-85. PMID: 25471534 DOI: 10.1002/ijc.29376
- Xu J, Gao C, Zhang F, Ma X, Peng X, Zhang R, et al. Differentially expressed lncRNAs and mRNAs identified by microarray analysis in GBS patients vs healthy controls. *Sci Rep*. 2016;**6**:21819. PMID: 26898505 DOI: 10.1038/srep21819
- Xie HH, Shen H, Zhang L, Cui MY, Xia LP, Lu J. Elevated serum interleukin-34 level in patients with systemic lupus erythematosus is associated with disease activity. *Sci Rep*. 2018;**8**(1):3462. PMID: 29472590 DOI: 10.1038/s41598-018-21859-z
- Wang S, Liu Y, Zhao N, Cui X, Huang M, Li Y, et al. IL-34 expression is reduced in hashimoto's thyroiditis and associated with thyrocyte apoptosis. *Front Endocrinol*. 2018;**9**:629. PMID: 30405534 DOI: 10.3389/fendo.2018.00629
- Boström EA, Lundberg P. The newly discovered cytokine IL-34 is expressed in gingival fibroblasts, shows enhanced expression by pro-inflammatory cytokines, and stimulates osteoclast differentiation. *PLoS One*. 2013;**8**(12):e81665. PMID: 24339952 DOI: 10.1371/journal.pone.0081665
- Yang S, Jiang S, Wang Y, Tu S, Wang Z, Chen Z. Interleukin 34 upregulation contributes to the increment of MicroRNA 21 expression through STAT3 activation associated with disease activity in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 2016;**43**(7):1312-9. PMID: 27084907 DOI: 10.3899/jrheum.151253
- Tian Y, Shen H, Xia L, Lu J. Elevated serum and synovial fluid levels of interleukin-34 in rheumatoid arthritis: possible association with disease progression via interleukin-17 production. *J Interferon Cytokine Res*. 2013;**33**(7):398-401. PMID: 23421370 DOI: 10.1089/jir.2012.0122
- Cheng Y, Yang X, Zhang X, An Z. Analysis of expression levels of IL-17 and IL-34 and influencing factors for prognosis in patients with lupus nephritis. *Exp Ther Med*. 2019;**17**(3):2279-83. PMID: 30783486 DOI: 10.3892/etm.2019.7168
- Debnath M, Nagappa M, Subbanna M, Sundaravadivel P, Talukdar PM, Shivakumar V, et al. Th17 pathway signatures in a large Indian cohort of Guillain Barré syndrome. *J Neuroimmunol*. 2018;**323**:125-30. PMID: 30196825 DOI: 10.1016/j.jneuroim.2018.08.001
- Boulakirba S, Pfeifer A, Mhaidly R, Obba S, Goulard M, Schmitt T, et al. IL-34 and CSF-1 display an equivalent macrophage differentiation ability but a different polarization potential. *Sci Rep*. 2018;**8**(1):256. PMID: 29321503 DOI: 10.1038/s41598-017-18433-4
- Chen H, Ende N, Souayah N. The cytokine profile of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (P06.134). *Neurology*. 2012;**78**(1 Suppl):P06.134.
- Lindau R, Mehta RB, Lash GE, Papapavlou G, Boij R, Berg G, et al. Interleukin-34 is present at the fetal-maternal interface and induces immunoregulatory macrophages of a decidual phenotype in vitro. *Hum Reprod*. 2018;**33**(4):588-99. PMID: 29579271 DOI: 10.1093/humrep/dex037
- Chi LJ, Xu WH, Zhang ZW, Huang HT, Zhang LM, Zhou J. Distribution of Th17 cells and Th1 cells in peripheral blood and cerebrospinal fluid in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Peripher Nerv Syst*. 2010;**15**(4):345-56. PMID: 21199106 DOI: 10.1111/j.1529-8027.2010.00294.x
- Sivieri S, Ferrarini AM, Lolli F, Matà S, Pinto F, Tavolato B, et al. Cytokine pattern in the cerebrospinal fluid from patients with GBS and CIDP. *J Neurol Sci*. 1997;**147**(1):93-5. PMID: 9094066 DOI: 10.1016/s0022-510x(96)00319-x
- Baghdadi M, Endo H, Tanaka Y, Wada H, Seino KI. Interleukin 34, from pathogenesis to clinical applications. *Cytokine*. 2017;**99**:139-47. PMID: 28886491 DOI: 10.1016/j.cyto.2017.08.020
- Zelante T, Ricciardi-Castagnoli P. The yin-yang nature of CSF1R-binding cytokines. *Nat Immunol*. 2012;**13**(8):717-9. PMID: 22814343 DOI: 10.1038/ni.2375
- Ge Y, Huang M, Yao YM. Immunomodulation of interleukin-34 and its potential significance as a disease biomarker and therapeutic target. *Int J Biol Sci*. 2019;**15**(9):1835-45. PMID: 31523186 DOI: 10.7150/ijbs.35070
- Preisser L, Miot C, Le Guillou-Guillemette H, Beaumont E, Foucher ED, Garo E, et al. IL-34 and macrophage colony-stimulating factor are overexpressed in hepatitis C virus fibrosis and induce profibrotic macrophages that promote collagen synthesis by hepatic stellate cells. *Hepatology*. 2014;**60**(6):1879-90. PMID: 25066464 DOI: 10.1002/hep.27328
- Liu Y, Liu H, Zhu J, Bian Z. Interleukin-34 drives macrophage polarization to the M2 phenotype in autoimmune hepatitis. *Pathol Res Pract*. 2019;**215**(8):152493. PMID: 31201067 DOI: 10.1016/j.prp.2019.152493
- Bézie S, Picarda E, Ossart J, Tesson L, Usal C, Renaudin K, et al. IL-34 is a Treg-specific cytokine and mediates transplant tolerance. *J Clin Invest*. 2015;**125**(10):3952-64. PMID: 26389674 DOI: 10.1172/JCI81227