ایجاد چشم‌اندازهای جدید برای تحقیقات حوزه‌ی آرتریت روماتوئیدبا استفاده از روش‌های فلوسایتومتری عملکردی مبتنی بر خون کامل

معصومه کهندانی[1]

۱- کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران
پژوهشگر مرکز تحقیقات پزشکی شخصی آمیتیس ژن

چکیده

علیرغم معرفی داروهای ضد روماتیسمی اصلاح‌کننده بیولوژیکی بیماری (DMARDs) برای درمان آرتریت روماتوئید (RA)، استراتژی‌های درمانی همیشه منجر به کنترل بیماری و بهبودی نمی‌شود. از این رو، طبقه بندی و نظارت بر مارکرها و ابزارهای زیستی بیمار کارآمدتر برای فعال کردن پزشکی شخصی‌سازی شده‌تر مورد نیاز است. ما از یک روش فلوسایتومتری عملکردی مبتنی بر خون استفاده کردیم تا سلول‌های ایمنی بیماران RA (درمان شده یا نشده)، اهداکنندگان سالم و بیماران آرتریت پسوریاتیک (PsA) را با توجه به پاسخ‌های آنها به LPS و یا ضد TNFα (infliximab، IFX) مشخص کنیم. بیان مارکر فعال‌سازی با استفاده از یک پانل فلوسایتومتری ۱۰ رنگی به دنبال پروتکل بدون شستشو اندازه گیری شد. بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئیدی که درمان نشده بودند، پروفایل التهابی قوی تری در مقایسه با اهداکنندگان سالم در سطح پایه داشتند. بیان بالاتر مارکرهای فعال‌سازی (CD69 و یا CD11b) روی سلول‌های B، NK و گرانولوسیت‌ها و بیان کمتر مولکول چسبندگی CD62L روی مونوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها و سلول‌های B اندازه‌گیری شد. پس از LPS، سلول‌های بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید ساده توانایی کمتری در تنظیم CD16، CD11b، CD69 یا CD62L داشتند که اختلال درتوانایی‌های فعال‌سازی را نشان می‌دهند. پس از انکوباسیون مشترک LPS و IFX، آنالیز خوشه‌بندی سلسله مراتبی پروفایل‌های متفاوتی را بین گروه‌ها نشان داد. ما معتقدیم که این رویکرد مبتنی بر خون کامل باید بیشتر برای توصیف بیمار RAارزیابی شود زیرا دیدگاه‌های جدیدی برای طبقه‌بندی و یا نظارت ارائه می‌دهد.

مقدمه

آرتریت روماتوئید (RA) یک بیماری خود ایمنی است که باعث درد، سفتی و تخریب مفاصل می شود. طبق گزارش اتحادیه اروپا درمورد روماتیسم (EULAR)، این وضعیت بین ۰.۳ تا ۱.۰ درصد از جمعیت عمومی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. فاکتورهای روماتوئید یا ACPA ها (آنتی بادی‌های پروتئین ضد سیترولینه) امروزه معمولاً در تشخیص RA، به ویژه ACPA ها استفاده می‌شود، زیرا آنها خاص RA هستند و در ۷۰-۸۰٪ موارد وجود دارند.

واسطه‌های پیش التهابی مانند ایکوزانوئیدها یا سیتوکین‌ها به التهاب، شروع و تداوم RA کمک می‌کنند. فاکتور نکروز تومور(TNF-α) α- یکی از قوی‌ترین عوامل مزمن التهاب است و از طریق دو مسیر سیگنالینگ مختلف به نام‌های سیگنالینگ رو به جلو (FS) و سیگنالینگ معکوس (RS) عمل می‌کند. به طور خلاصه، FS دارای یک نتیجه پیش التهابی است که منجر به تکثیر، ضد آپوپتوز و التهاب می‌شود، در حالی که RS پاسخ‌های ضد التهابی و آپوپتوز را تحریک می‌کند.

گزینه‌های درمانی در دهه‌های گذشته برای ارائه چندین استراتژی ممکن برای درمان RA افزایش یافته‌اند. داروهای ضد روماتیسمی مرسوم اصلاح کننده بیماری (DMARDs) مانند متوترکسات در طول تاریخ به عنوان درمان اولیه استفاده شده است. در ادامه DMARDهای بیولوژیکی برای رسیدن به بهبودی بیماری اضافه شده است. از طریق مسدود کردن FS، محرک RS و یا سمیت سلولی وابسته به آنتی بادی (ADCC)، ضد TNFها یک نوآوری مهم در این زمینه هستند و معمولاً از زمان معرفی آنها استفاده می‌شود.

بیماران RA پس از تجویز درمان برای پیگیری تکامل بیماری و ارزیابی کارایی درمانی تحت نظر قرار می‌گیرند. معمولاً در نظر گرفته می‌شود که هر درمان باید حداقل ۳ ماه قبل از مشاهده بهبود احتمالی در بیماران و ۶ ماه برای دستیابی به هدف درمانی قبل از تعدیل استراتژی درمانی اجرا شود. متأسفانه، ناهمگونی بیماری، که باعث تفاوت در ویژگی‌های اهداکننده می شود، منجر به پاسخ‌های متنوع بیمار به درمان می‌شود، بنابراین، همه بیماران به کنترل بیماری دست نمی یابند. به طور کلی، این فرآیند تطبیق درمان و شناسایی استراتژی درمانی مناسب برای یک بیمار خاص طولانی است و ممکن است به طور قابل توجهی رسیدن به بهبودی بیماری را به تاخیر بیندازد. همچنین ممکن است منجر به عوارض پزشکی غیرقابل حل شود. از این رو، بیومارکرها و ابزارهایی که می‌توانند به پیش بینی پاسخ به درمان و بهبود رویکردهای درمانی فعلی کمک کنند، به شدت مورد نظر هستند.

در مطالعه قبلی، با استفاده از نمونه‌هایی از افراد سالم، استراتژی سنجش عملکردی مبتنی بر خون کامل را برای توصیف و ارزیابی مکانیسم‌های اثر ضد TNFs (MOAs) در مرجع اهداکننده ایجاد کردیم. همانطور که این هدف اولیه دنبال می‌شد، هدف نیز ارائه اطلاعات مربوط به مطالعه شرایط التهابی به طور کلی بود. در نتیجه، مارکرهایی که یا قادر به اطلاع رسانی در مورد MOA هستند یا شناخته شده به عنوان مورد علاقه و یا در شرایط RA بی‌نظم هستند، ترکیب شدند. بنابراین ما یک پانل فلوسایتومتری ۱۰ رنگی طراحی کردیم که در آن، به غیر از مارکرهای ۶ ، gating مارکر فعال‌سازی در نظر گرفته شد. CD69 برای ارزیابی وضعیت فعال‌سازی عمومی سلول‌ها استفاده شد و مولکول‌های چسبندگی مانند CD11b (ITGAM)، CD54 (ICAM-1) ، CD62L (L-selectin) ، یا CD66b (CEACAM8) برای مطالعه فرآیندهای مهاجرت و یاچسبندگی گنجانده شدند. یک آنتی بادی ضد TNF با فلوروکروم کونژوگه نیز برای مطالعه بیان TNF گذرنده در درمان آزمایشگاهی با داروهای ضد TNF مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت، CD16، که ممکن است به عنوان gating یا مارکر فعال سازی عمل کند، برای اطلاع رسانی در مورد درگیری بالقوه سلول‌های NK از طریق سمیت سلولی وابسته به آنتی بادی MOA (ADCC) استفاده شد .

در اینجا، هدف ما ارزیابی ارتباط سنجش عملکردی مبتنی بر خون کامل قبلاً توسعه‌یافته برای توصیف بیمار RA و طبقه‌بندی بیشتر بود. برای این منظور، نمونه‌های خون کامل از افراد سالم یا بیماران مبتلا

به آرتریت روماتوئید، چه در حال درمان و چه بهبود یافته، در نظر گرفته شد. نمونه‌هایی از بیماران آرتریت پسوریاتیک (PsA) نیز به عنوان مجموعه دیگری از بیماران مبتلا به بیماری التهابی برای آزمایش بیشتر ارتباط رویکرد پیشنهادی گنجانده شد. با تحریک سلول‌ها با LPS یا LPS در ترکیب با IFX، ما فرض کردیم که علاوه بر بیان مارکر سلول‌های ایمنی پایه، ظرفیت تحریک LPS و پاسخ بیشتر به IFX می‌تواند بینش‌های ارزشمندی ارائه دهد و به عنوان بیومارکر ممکن در آینده برای طبقه‌بندی بیماران و یا پیش‌بینی پاسخ به درمان استفاده کند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌ها

بر اساس اعلامیه هلسینکی، پس از کسب رضایت، خون از ۲۱ اهداکننده سالم از داوطلبانی که به بیمارستان سنت جوزف (مارسی، فرانسه) مراجعه کرده بودند، جمع‌آوری شد. نمونه‌هایی از ۳۳ بیمار (۱۶ RA بیمار، ۱۷ درمان‌شده) که معیارهای ACR/ EULAR ۲۰۱۰ را برآورده می‌کردند و ۱۳ بیمار آرتریت پسوریاتیک (PSA) که معیارهای CASPAR را داشتند در بیمارستان Sainte-Marguerite (AP-HM) (مارسیل، فرانسه) جمع‌آوری شدند.

سنجش عملکردی مبتنی بر خون کامل - فلوسایتومتری

رویکرد پیاده‌سازی شده در اینجا مشابه روشی بود که قبلاً در اولین مطالعه اثبات مفهومی ما توضیح داده شد که در آن سنجش ابتدا از دیدگاه‌های مختلف، از جمله ارتباط مکانیکی و تکرارپذیری، توسعه و مشخص شد. از خون کامل هپارینه شده برای جلوگیری از جداسازی یون‌های فلزی استفاده شد. به طور خلاصه، ۵۰ میکرولیتر خون کامل در هر شرایط، شامل یک کنترل منفی، یک کنترل LPS (۲۰۰ نانوگرم در میلی لیتر) (سیگما آلدریچ) و یک ترکیب ۱) IFX + LPS میکروگرم / ۵۰ میکرولیتر خون کامل) (Merck) انکوبه شد. پس از ۵ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، سلول ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق رنگ آمیزی شدند و از نور با مخلوط رنگ آمیزی زیر محافظت شدند: CD3-allophycocyanin (APC) Alexa Fluor® (AF) 750 (UCHT1)، CD11b-PE (Bear1)، CD14-Pacific Blue (RMO52)، CD16-ECD (3G8)، CD45-KrO (J33)، CD54-FITC (84H10)، CD56-PC5.5 (N901)، CD62L-APC (DREG56)، CD66b-APCAF750 (80H3)، CD69-PC7 (TP1.55.3)، و tmTNF-AF700 (HRS4) (همه از Beckman Coulter Life Sciences). سپس یک پروتکل بدون سانتریفیوژ برای ساده کردن گردش کار دنبال شد. گلبول‌های قرمز خون با استفاده از OptiLyse C مطابق دستورالعمل سازنده برای استفاده (Beckman Coulter Life Sciences) لیز شدند. در نهایت، بیان مارکر با فلوسیتومتر سیتوفلکس ۱۳ رنگی سه لیزری (Beckman Coulter Life Sciences) در مدت ۵ ساعت پس از رنگ‌آمیزی اندازه‌گیری شد.

تحلیل آماری

داده‌های فلوسایتومتری با نرم‌افزار آنالیز Kaluza نسخه ۲.۱ (Beckman Coulter) آنالیز شد. جمعیت‌های مورد بررسی به صورت دستی نمونه برداری شدند و JMP ۱۴.۲.۰ (موسسه SAS) برای آنالیز آماری تک و یاچند متغیره استفاده شد. مقادیر خام یا نرمال شده متوسط شدت فلورسنت (MFI) بسته به شرایط مورد مطالعه در نظر گرفته شد. MFI های خام برای مطالعه سطوح بیان مارکر پایه مورد استفاده قرار گرفتند در حالی که شرایط LPS یا LPS + IFX به ترتیب با شرایط منفی یا LPS نرمال شدند و در نتیجه Stim. Index به دست آمد. آنالیز بدون نظارت با استفاده از پلت فرم غربالگری پاسخ JMP برای شناسایی بیشتر پارامترهای متمایز بر اساس نتایج آزمون t-student یا ANOVA و نرخ کشف نادرست (p-value (FDRهای تصحیح شده استفاده شد. آنالیز مؤلفه‌های اصلی (PCA) با در نظر گرفتن بیشتر ویژگی‌های متمایز انجام شد. برای مطالعه بیشتر واگرایی بین گروه‌ها، نمایش‌های نمودار جعبه استفاده شد و خوشه‌بندی سلسله مراتبی انجام شد. تفاوت در شاخص‌های MFI و یا تحریک با استفاده از آزمون ویلکاکسون غیرپارامتری که برای آن مقادیر p*

کمتـر از ۰.۰۵ معنـی‌دار در نظر گرفته شـد، آنالیز شـد.

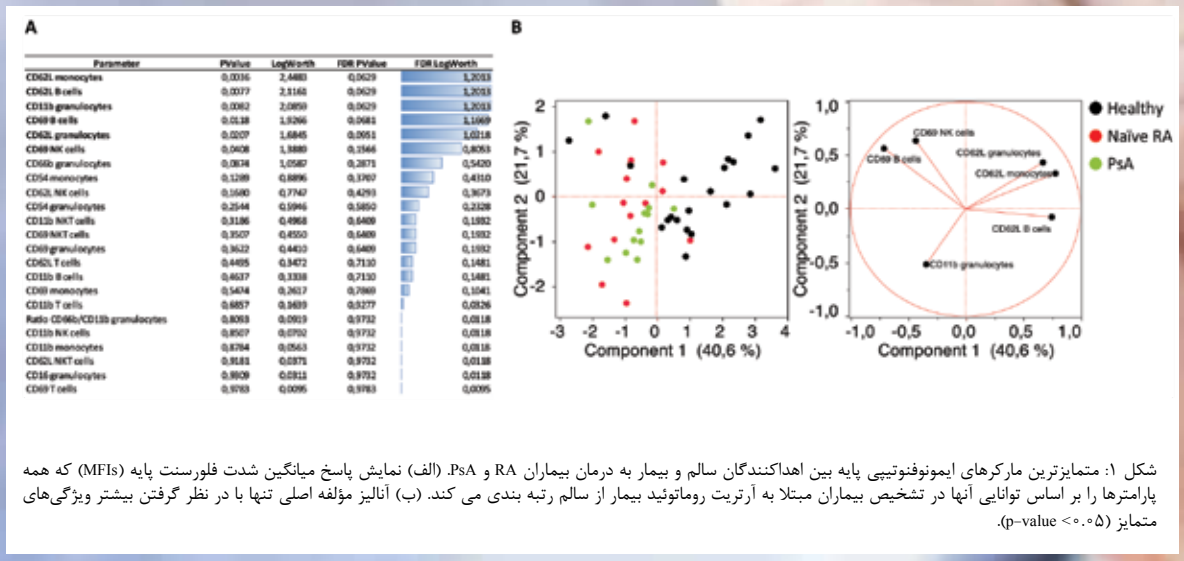
موارد اخلاقی

همـه بیمـاران ثبـت نـام شـده رضایـت آگاهانـه را ارائـه کردنـد و رویه‌هـای انجـام شـده مطابـق بـا اعلامیـه هلسـینکی بـود. مراقبـت از آزمودنی‌هـا اصـلاح نشـد و نتایـج مطالعـه تأثیـری بر مدیریـت آزمودنی‌ها نداشـت. نمونه‌هـای خـون سـالم از اهداکننـدگانـی بـود کـه در بیمارسـتان سـنت جـوزف (مارسـی، فرانسـه) تحـت معاینـه عمومـی قـرار گرفتنـد. طبـق قانـون فرانسـه، تأییـد کمیتـه اخـلاق و رضایـت اهداکننـده بـرای ایـن نـوع مطالعـه غیـر مداخلـه‌ای مـورد نیـاز نبود، مشـروط بـر اینکـه اهداکننـدگان اطلاعات دریافت کرده باشـند و حـق مخالفت با اسـتفاده از نمونه‌هـای اضافی و داده‌های پزشـکی ناشـناس را حفـظ کننـد (Loi n°۲۰۱۲- ۳۰۰ در ۵ مـارس، ۲۰۱۲). بـا توجـه بـه نمونه‌هـای بیمـار، از خـون کامـل ۱۶ بیمـار RA، ۱۷ بیمـار درمـان شـده و ۱۳ بیمـار PsA اسـتفاده شـد و همـه بیمـاران در نظر گرفتـه شـده رضایـت کتبـی آگاهانه بـرای ایـن مطالعه دادنـد. مجموعـه نمونـه بیمـار توسـط کمیتـه حفاظـت از افـراد Sud-Méditerrané II (CPP) (مرجـع کمیتـه: C10 ۲۰۸) و خدمـات Direction Générale de la Recherche et de l'Innovation du Ministère بـا شـماره شناسـایی DC-۲۰۰۸-۳۲۷ تأییـد شـد. آنالیـز سـلولی بـر روی نمونه‌هـای بـا نـام مسـتعار انجـام شـد و تمـام داده‌هـای جمع‌آوری‌شـده در مطالعـه از سـوابق موضـوع توسـط پزشـک بازیابـی شـد.

نتایج

بیـان پایـه CD11b، CD69 و CD62L در برخـی از زیـر مجموعه‌هـای سـلولی بیـن بیمـاران مبتـلا بـه RA و سـالم متفـاوت بود.

یـک آنالیـز بـدون نظـارت ابتـدا بـرای ارزیابـی اینکـه آیـا بیـان پایـه نشـانگرهای فعال‌سـازی در نظـر گرفتـه شـده می‌توانـد نشـان دهنـده ویژگی‌هـای تمایـز بیـن بیمـاران RA و سـالم باشـد انجـام شـد (شـکل ۱A). بیـان CD62L روی مونوسـیت‌ها و سـلول‌های B و همچنیـن CD11b روی گرانولوسـیت‌ها بـه عنـوان متمایزتریـن ویژگی‌هـا بـا مقادیـر p زیـر ۰.۰۱ ظاهـر شـد. CD69 روی سـلول‌های B و سـلول‌های NK همـراه بـا CD62L روی گرانولوسـیت‌ها نیـز مقادیـر p قابـل توجهـی داشـتند. سـپس یـک آنالیـز مؤلفـه اصلـی (PCA) بـا انتخـاب ۶ پارامتـر متمایزتریـن بـا مقادیـر p زیـر ۰.۰۵ انجـام شـد (شـکل ۱B). اهداکننـدگان بیمـار و سـالم بـه جـز ۳/۲۱ اهداکننـده سـالم و ۱/۱۶ بیمـار سـاده بـه طـور جداگانـه دسـته بنـدی شـدند. بیمـاران PsA کنتـرل عمدتـاً بـا بیماران RA همپوشـانی داشـتند.

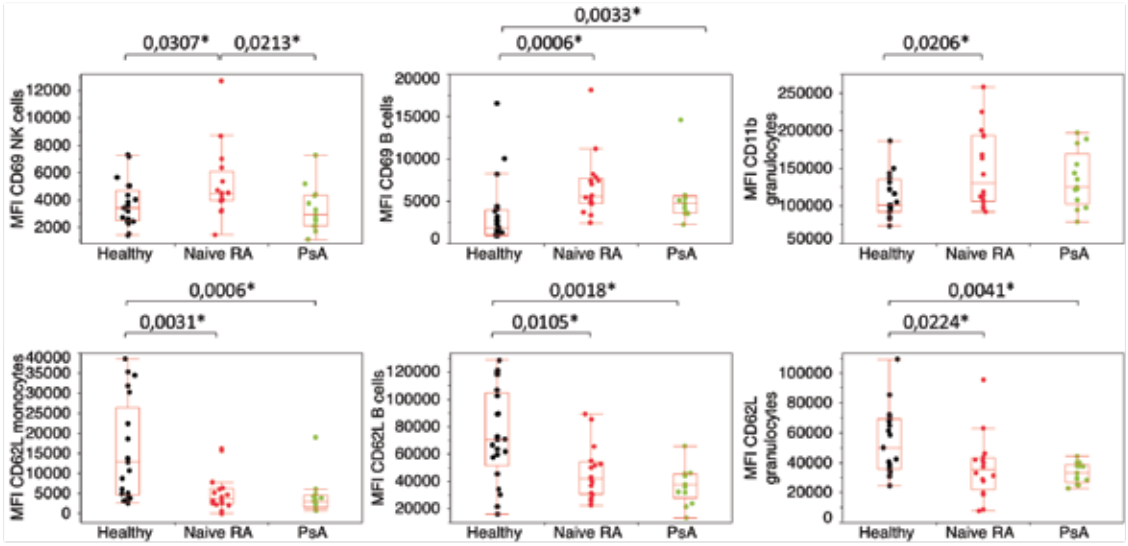


شکل ۱: متمایزترین مارکرهای ایمونوفنوتیپی پایه بین اهداکنندگان سالم و بیمار به درمان بیماران RA و PsA. (الف) نمایش پاسخ میانگین شدت فلورسنت پایه (MFIs) که همه پارامترها را بر اساس توانایی آنها در تشخیص بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید بیمار از سالم رتبه بندی می کند. (ب) آنالیز مؤلفه اصلی تنها با در نظر گرفتن بیشتر ویژگی‌های متمایز (p-value <۰.۰۵).

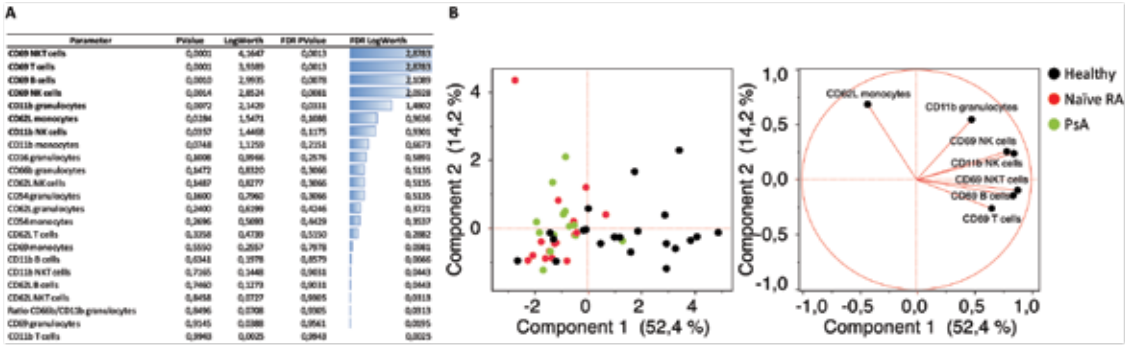
برای بررسی بیشتر این که آیا این پارامترها در بیماران RA تنظیم شده‌اند یا نه، نمودارهای جعبه نمایش داده شد (شکل ۲). مارکرهای فعال‌سازی مانند CD69 در چندین زیر مجموعه و CD11b بر روی گرانولوسیت‌ها در بیماران مبتلا به RA در مقایسه با افراد سالم به طور قابل توجهی افزایش یافت. برعکس، بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید، CD62L را روی مونوسیت‌ها، سلول‌های B و گرانولوسیت‌ها نشان دادند. در حالی که برخی از مارکرها بین بیماران RA و PsA مشابه به نظر می رسد، برخی دیگر مانند CD69 در سلول‌های B، CD62L و CD69 در سلول‌های NK یا CD11b بر روی گرانولوسیت ها به طور قابل توجهی بین دو زیر گروه بیماری التهابی متفاوت است.

با توجه به بیان چندین مارکر فعال‌سازی، قابلیت‌های تحریک سلولی در بیماران RA کمتر بود

پس از مقایسه سطوح بیان مارکرهای فعال‌سازی پایه، ما قابلیت‌های تحریک سلول‌های ایمنی افراد سالم و بیماران مبتلا به RA را به دنبال رویکردی که قبلاً توضیح داده شد، بررسی کردیم. در شکل ۳، نتایج یک تحلیل بدون نظارت که اکثر پارامترهای متمایز بین گروه ها را تشخیص می‌دهد نشان داده شده است. همانطور که در مطالعه قبلی ما نشان داد شد، نه تنها مونوسیت ها، بلکه تمام زیرمجموعه‌های اصلی سلول‌های ایمنی در درمان LPS در نتیجه واکنش آبشاری آغاز شده توسط اثر LPS بر روی مونوسی ها تحریک شدند. تحت



شکل ۲: متمایزترین بیان پایه مارکر ایمنی در بیماران RA و PsA. بیان CD69 میانگین شدت فلورسنت (MFI) در سلول‌های NK و B، CD11b MFI در گرانولوسیت‌ها، CD62L MFI در مونوسیت‌ها، سلول‌های B و گرانولوسیت‌ها. معنی‌داری آماری با استفاده از آزمون ناپارامتری Wilcoxon با p*۰۵/۰ تعیین شد.



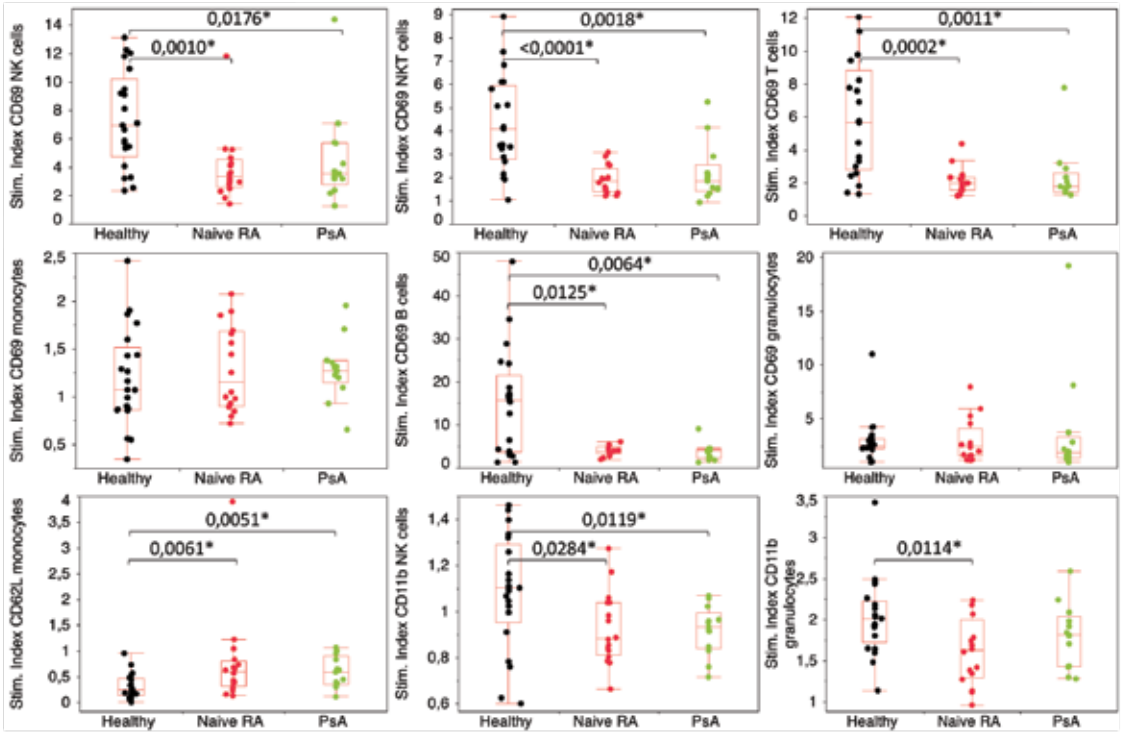
شکل ۳: آنالیز چند متغیره تمام پارامترهای در نظر گرفته شده برای وضعیت LPS از اهداکنندگان سالم، بیماران مبتلا به RA و PsA. (A) صفحه پاسخStim. Index. همه پارامترها را با توجه به قدرت تمایز آن برای تشخیص بیماران RA از سالم پس از تحریک LPS رتبه بندی می کند. (B) آنالیز مؤلفه اصلی تنها ویژگی‌های متمایزکننده‌ای بودند که دارای p-value <۰.۰۵ بودند در آنالیز گنجانده شدند.

این شـــرایط فعال‌سازی، CD69 در سلول‌های T، NKT، NK و B به‌عنـــوان متمایزکننده‌های اصلی بین بیماران مبتلا به RA و افراد ســـالم شناسایی شدند. مولکول‌های چســـبنده مانند CD11b روی گرانولوسیت‌ها و CD62L روی مونوسیت‌ها نیز دارای p-value کمتر از ۰.۰۵ بودند. علیرغم برخی تفکیـــک فضایی متمایز بین گروه‌ها، هیچ خوشـــه‌بندی آشـــکاری هنگام در نظر گرفتن ۷ بهترین تمایز برای آنالیز PCA بعدی مشاهده نشد (شکل 3B).

به عنـــوان یکـــی از متمایزترین مارکـــر در چندین زیر مجموعـــه، ما ســـپس بـــا جزئیـــات بیشـــتر مارکرهای فعال‌ســـازی عمومی CD69 را آنالیز کردیـــم. همانطور که در شـــکل ۴ نشان داده شده اســـت، مقادیر کمتری Stim. Index در بیماران RA و PsA در مقایســـه با افراد سالم مشاهده شـــد. این کاهش در چندین نوع سلول از جمله ســـلول‌های T، NKT، NK و B قابل مشاهده بود. در مقابل، هیچ تفاوتی برای مونوســـیت ها و گرانولوسیت ها یافت نشـــد. نه تنها CD69 بلکه شاخص‌های تحریک CD11b و CD62L نیز بین گروه‌ها متفاوت بود. در حالی که CD62L در بیماران RA و PsA رفتار مشابهی داشت، با کاهش کمتری در تحریک LPS نســـبت به داوطلبان ســـالم، بیمـــاران RA کاهش قابل توجهی بیشـــتری از CD11b را روی ســـلول‌های NK و گرانولوسیت‌ها نسبت به افراد سالم و نمونه‌های PSA ارائه کردند.

پاسخ In vitro به infliximab بین بیماران مبتلا به RA، افراد سالم و درمان شده متفاوت بود

از آنجایی که پاســـخ به درمان یکی از بزرگترین چالش‌ها در مدیریت RA است، در مرحله بعدی توانایی ex vivo برای پاسخ به یک ضد TNF شناخته شده (infliximab) بـــرای ارزیابی اینکه آیـــا طبقه‌بندی و نظـــارت بیماران می‌تواند به طور بالقوه از چنین رویکردی ســـود ببرد، ما را شـــگفت‌زده کرد. تجزیه و تحلیل بـــدون نظارت با در نظر گرفتن گروه‌های بیماران مبتلا به RA، افراد سالم و درمان انجام شد (شـــکل 5A). همانطور که قبلاً، ما یک رویکرد آنالیز بدون نظارت را اتخاذ کردیم و متعاقباً یک اسکرین پاسخ و یک آنالیز PCA انجام دادیم (شکل 5B). (شکل CD69 روی سلول‌های NK و CD62L، NKT روی ســـلول‌های NK، مونوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها، CD11b روی ســـلول‌های B و درصد مونوســـیت‌های tmTNF+



شکل ۴: نمودارهای جعبه‌ای برای بیان CD62L، CD69 و CD11b پس از تحریک LPS در بیماران RA و PsA و افراد سالم Stim. Index با نرمال کردن مقادیر MFI از شرایط LPS با شرایط منفی به دست آمد. معنی‌داری آماری با استفاده از آزمون ناپارامتری Wilcoxon با مقدار *p<۰.۰۵ تعیین شد.

ویژگی‌های متمایز (p-value <۰.۰۵) بودند و برای آنالیز PCA در نظر گرفته شدند. در حالی که اهداکنندگان سالم و بیماران روماتوئید RA در طرح PCA همپوشانی داشتند، بیماران RA تحت درمان، بدون توجه به درمان، به طور قابل توجهی از بقیه افراد جدا شدند و یک خوشه نسبتاً کاملاً تعریف شده را تشکیل دادند که تنها ۱ بیمار RA درمان شده از ۱۷ مورد در آن خوشه نبود.

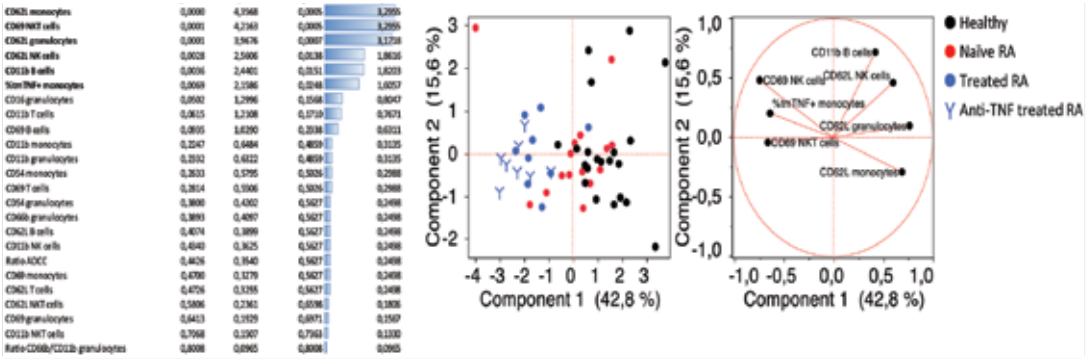
با تعمیق بیشتر در پاسخ in vitro به IFX، یک آنالیز خوشه‌بندی سلسله مراتبی برای بررسی جزئیات تفاوت‌های موجود بین گروه‌ها انجام شد (شکل ۶). شایان ذکر است، شاخص‌های تحریک CD62L در سلول‌های NK، مونوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها در بیماران تحت درمان با RA در مقایسه با اهداکنندگان ساده و سالم کمتر بود که نشان‌دهنده تأثیر کمتر IFX در این گروه است. جالب توجه است که CD11b روی سلول‌های B نمایه‌ای مشابه با CD62L نشان داد. برعکس، CD69 روی سلول‌های NK، NKT و B و همچنین نسبت مونوسیت‌های tmTNF+ در بیماران تحت درمان بیشتر بود. علاوه بر روندهای کلی، چنین آنالیزی به این ترتیب امکان ثبت ناهمگونی پاسخ بین افراد را فراهم می کند.

جالب توجه است، مشخص شد که نمایه خوشه بندی به شدت به شرایط فعال سازی بستگی دارد (شکل ۷). با استفاده از نمودارها، هیچ خوشه آشکاری در شرایط منفی (شکل ۷A) و LPS (شکل ۷B) یافت نشد، در حالی که گروه بیماران تحت درمان عموماً هنگامی که اینفلیکسیماب به ترکیب اضافه شد، به طور جداگانه دسته بندی شدند (شکل ۷C).

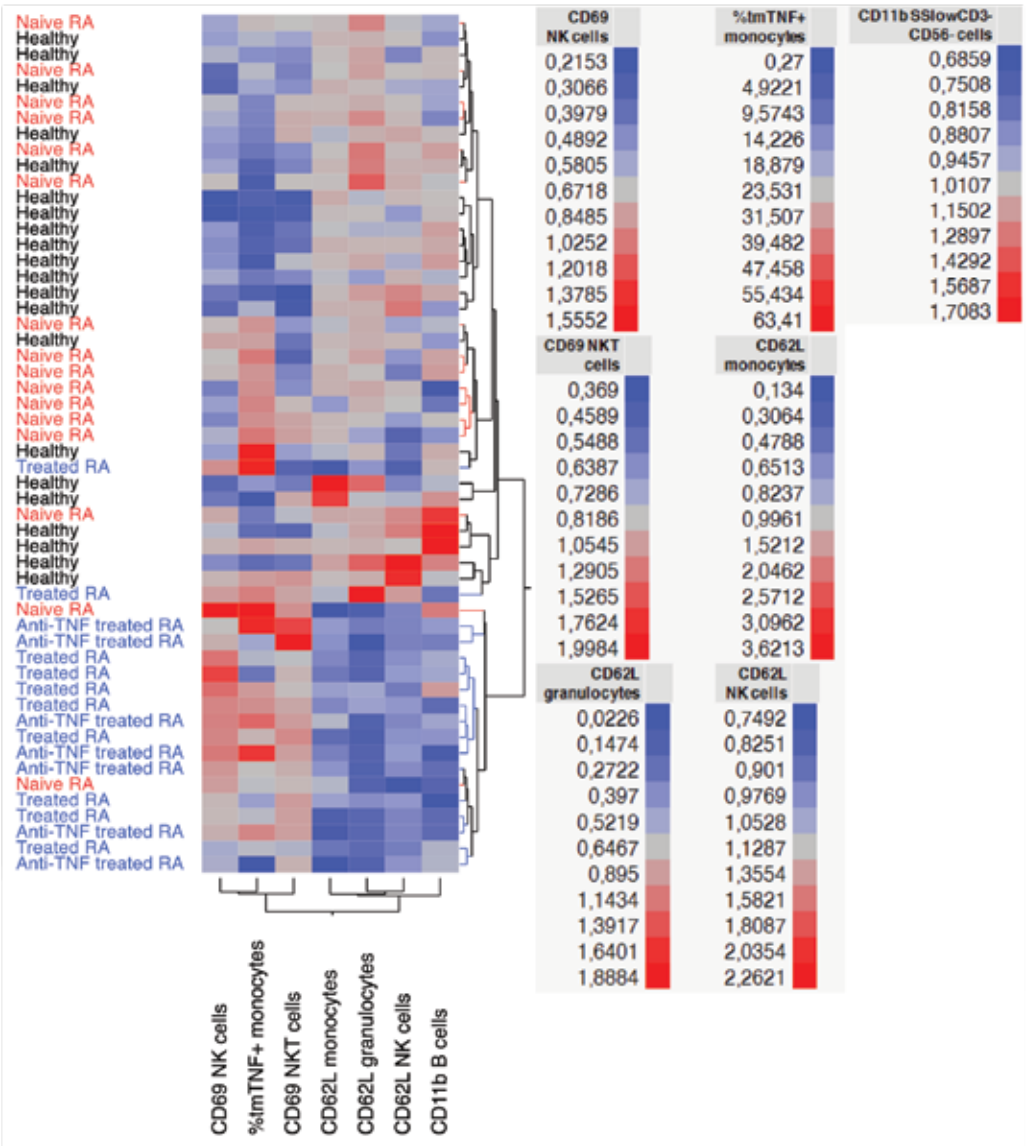
بحث

آرتریت روماتوئید یک بیماری با ویژگی‌های ناهمگن بیماران است که چشم انداز درمان آن به طور قابل توجهی در دهه‌های گذشته تکامل یافته است. علاوه بر متوترکسات که از لحاظ تاریخی مورد استفاده قرار می‌گرفت، بسیاری از درمان‌های بیولوژیکی توسعه یافته‌اند، و از زمانی که EULAR 2013 توصیه‌های به‌روز شده برای درمان RA را به‌روزرسانی کرد، درمان‌های ترکیبی نیز در آن گنجانده شده‌اند. با این حال، درمان بیماران دشوار به عنوان یک چالش حل نشده باقی مانده است که مدیریت این بیماری را در سطح جهانی مختل می‌کند. برخی گزارش‌ها پیشنهاد می‌کنند که نرخ عدم پاسخ‌دهی برای درمان‌های ضد TNF می‌تواند تا ٪۴۰-۳۰ باشد. با چنین نرخ بالای بیمارانی که به درمان پاسخ نمی‌دهند، نیاز به درک بهتر ویژگی‌های ایمنی، از جمله بیومارکرهایی که می‌توانند به بهبود استراتژی‌های درمانی کمک کنند، وجود دارد.

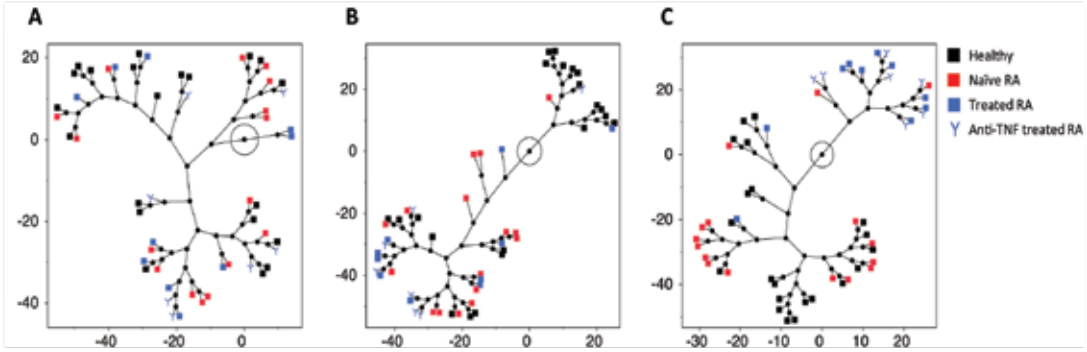
RA به طور گسترده با استفاده از انواع مدل‌های پیش بالینی in vivo و in vitro مورد بررسی قرار گرفته است. معمولاً از موش‌ها برای انجام مطالعات بنیادی استفاده می شود. سیستم‌های دیگری مانند رده‌های سلولی، سلول‌های مشتق شده از انسان مانند سلول‌های جدا شده یا سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) نیز برای انعکاس بهتر وضعیت انسان در داخل بدن مورد بررسی قرار گرفته‌اند. موش‌های انسانی نیز امروزه بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرند، با این حال بسیار گران هستند و محدودیت‌های متعددی دارند. در



شکل ۵: آنالیز چند متغیره تمام پارامترهای در نظر گرفته شده برای شرایط LPS+IFX: اهداکنندگان سالم، بیماران RA و درمان شده در شرایط LPS+IFX (A) اسکرین پاسخ Stim. Index مارکرهای سلول ایمنی. Stim. Index با عادی سازی مقادیر LPS+IFX MFI توسط LPS MFIs به دست آمد. (B) آنالیز مؤلفه اصلی تنها بیشتر ویژگی‌های متمایز با داشتن p <۰.۰۵ در آنالیز گنجانده شد.



شکل ۶: دندوگرام بر اساس آنالیز خوشه بندی دو طرفه با توجه به اکثر پارامترهای متمایز بین بیماران ، اغراد سالم و درمان شده RA. خوشه‌بندی سلسله مراتبی بدون نظارت با در نظر گرفتن افراد سالم (سیاه) مبتلا (قرمز) و درمان شده یا تحت درمان با anti-TNF (آبی) انجام شد که در آن هر ردیف نشان دهنده یک اهداکننده است.



شکل ۷: خوشه‌بندی نمونه با در نظر گرفتن اهداکنندگان سالم، بیماران RA و درمان‌شده. کنترل منفی غیر نرمال شده (A)، شرایط نرمال شده LPS توسط کنترل منفی (B)، LPS+IFX نرمال شده توسط شرایط LPS (C) رنگ‌ها نشان دهنده افراد سالم (سیاه) بیمار (قرمز) یا تحت درمان هستند. هر سطر با یک نقطه پایانی نمایش داده می شود و هر پیوند خوشه با یک نقطه جدید نشان داده می شود. خطوط نشان دهنده فاصله بین خوشه ها و نسبت به یکدیگر هستند.

تلاش برای توسعه مدل‌های جدید که در آن فیزیولوژی انسان حتی بهتر ارائه می‌شود، رویکردهای جدیدی ظهور کرده و در دهه گذشته بهبود یافته‌اند، به ویژه در مورد مفاهیم ارگانوئیدها و/یا ارگان روی تراشه. به عنوان مثال، رویکردهای مهندسی بافت سه بعدی که ویژگی‌های ساختاری مفصل یا رویکردهای میکروسیال را تقلید می‌کنند، اخیراً مورد بحث قرار گرفته‌اند. علاوه بر این که به راحتی در دسترس است، خون کامل دارای مزایای زیادی است. اگر تازه (۲۴ ساعت) کشیده شود، نه تنها حاوی سلول‌های ایمنی زنده است که عملکرد آنها قابل بررسی است، بلکه دارای بخش‌های خونی اضافی است که شامل گلبول‌های قرمز، پلاکت‌ها، متابولیت‌ها، لیپیدها، پروتئین‌ها، آنتی‌بادی‌ها می‌شود. مسیرها و یا فعل و انفعالاتی که باید اتفاق بیفتند. در اینجا ما فرض کردیم که سنجش‌های عملکردی مبتنی بر خون کامل می‌تواند به طور قابل‌توجهی شبیه فیزیولوژی انسان در داخل بدن باشد و دیدگاه‌های ارزشمند تحقیق ترجمه را باز کند. علاوه بر این، با استفاده از پروتکلی که در آن دستکاری نمونه به حداقل کاهش می‌یابد، هدف ما ارائه یک گردش کار ساده و کاربردی با حذف بسیاری از منابع تنوع است. ما ابتدا بیان مارکرهای پایه را بررسی کردیم تا تفاوت‌ها را در سطوح مارکرهای فعال‌سازی بین اهداکنندگان سالم و بیماران مبتلا به RA همانطور که در شکل تکمیلی خلاصه شده است، برجسته کنیم. همانطور که در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است، تفاوت‌های قابل‌توجهی با CD69 مشاهده شد که روی سلول‌های NK، سلول‌های B و گرانولوسیت‌های بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئیدی ساده تنظیم شده است، که آخرین مورد مطابق با Capsoni و همکارانش است. بیان CD69 بالاتر در هر دو بخش NK و گرانولوسیت بیشتر تایید می‌کند که ایمنی ذاتی نقش مرکزی در پاتوژنز RA ایفا می کند. به عنوان مثال، نسبت ها و وضعیت فعال‌سازی سلول‌های NK مایع سینوویال در بیماران مبتلا به RA پیشرفته و فعال بیشتر است که نشان دهنده نقش مهمی در فعالیت بیماری است. مکانیسم‌های فعال‌سازی نوتروفیل‌ها مانند NETosis، استرس اکسیداتیو و یا قابلیت‌های مهاجرت نیز گزارش شده است که در RA تنظیم نشده است و می‌تواند به طور قابل‌توجهی به بیماری کمک کند. این واقعیت که بیماران RA بیشتر CD69 را روی سلول‌های B بیان می‌کنند، می‌تواند مربوط به فعال‌سازی پایه سلول‌های B و تولید ایمونوگلوبولین و آنتی‌بادی بالاتر باشد.

در تنظیمات ما، بیماران RA در مقایسه با اهداکنندگان سالم، بیان تغییر یافته CD11b بر روی گرانولوسیت‌ها و CD62L در مونوسیت ها، سلول‌های B و گرانولوسیت ها را نشان دادند. این در توافق با مطالعات قبلی است که همچنین چنین تغییراتی را در نمونه‌های بیماران RA گزارش کرده بودند. CD11b و CD62L که با نام‌های ITGAM و L-selectin نیز شناخته می‌شوند، مولکول‌های چسبنده هستند و نقش کلیدی در مهاجرت سلولی و فرآیندهای کموتاکسی دارند. نقش CD62L در التهاب قبلاً به عنوان نقش مهمی برای انتقال سلول به بافت‌ها مشخص شده است. CD11b برای چرخش لکوسیت، چسبندگی، خزیدن و انتقال از طریق عروق خونی مهم است. می‌توان فرض کرد که تغییر بیان این مولکول ها ممکن است به نرخ نفوذ سلولی بالاتر به غشای سینوویال کمک کند.

برخی از این ویژگی‌های مشخصه در گروه PsA نیز قابل مشاهده بود. CD69 روی سلول‌های NK یا CD11b و CD62L روی گرانولوسیت‌ها به نظر می‌رسد که فقط گروه RA را متمایز می‌کنند، و دوباره به نقش احتمالاً اصلی ایمنی ذاتی در RA اشاره می‌کنند. نقش ویژه CD69 در پاتوژنز RA قبلاً در مدل‌های تجربی مختلف برای پاسخ سلول‌های التهابی برجسته شده است. هنگام مقایسه بیان پایه مارکرها بین گروه‌های RA و PsA، تضاد قابل‌توجهی توسط آنالیز PCA با CD69 روی سلول‌های NK و NKT و همچنین CD62L روی سلول‌های T به عنوان تمایزکننده‌های قوی‌تر مشخص شد.

ما در مرحله بعد قابلیت‌های فعال‌سازی سلولی را با استفاده از تحریک LPS در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردیم. از طریق تعامل TLR4، مونوسیت‌ها در ابتدا فعال می‌شوند و انواع واسطه‌های التهابی، از جمله TNF را تولید می‌کنند که باعث ایجاد یک آبشار فعال‌سازی پایین‌دستی می‌شود که باعث فعال‌سازی کلی سلول‌های ایمنی می‌شود و در نتیجه یک محیط التهابی را دوباره ایجاد می‌کند. علیرغم تفکیک ناقص PCA بین گروه‌ها، شاخص‌های تحریک نمونه RA پس از تحریک LPS در زیر مجموعه‌های مختلف با توجه به بیان CD11b، CD69

یا CD62L به طـــور قابل‌توجهی پایین‌تر بود. با توجه به این نتایج، ما دو فرضیه ممکن را در نظر می‌گیریم. از یک طرف، ما تأیید کردیم که وضعیت فعال‌سازی پایه بیماران RA بالاتر از اهداکنندگان گرم اســت، که ممکن اســت توضیح دهد که چرا قابلیت‌های تحریک ســلولی در این بیماران کمتر اســت. از سوی دیگر، سلول‌ها ممکن است در نتیجه وضعیت التهاب مزمن موجود در RA خســته شــوند. در حمایت از این فرضیه، برخی از نشــانگرهای خســتگی در بیماران RA بالاتر هستند. به عنوان مثال، PD-1، چه به صورت محلول و چه بر روی سلول‌های T، Tim-3 در NKT محیطی، سلول‌های T و مونوسیت‌ها و همچنین CTLA-4 در سلول‌های T سینوویال و Tregs دچار اختلال در تنظیم شدند.

در نهایت، ما پاســخ آزمایشگاهی به LPS و infliximab IFX را بــرای ارزیابــی توانایی هر فرد و یــا گروه برای پاســخ به این ضــد TNF، از جمله بیمــاران RA تحت درمان، مورد مطالعه قرار دادیم. الگوهای خوشــه بندی متفاوتی پیدا شــد که نشان دهنده قابلیت متفاوتی برای پاسخ به IFX است. شــاخص‌های تحریک CD69 روی ســلول‌های B، NKT، NK و ســلول‌های T و همچنین CD11b روی گرانولوســیت‌ها، در بیمــاران RA تحــت درمان پایین‌تر بود، که همگی در مورد مکانیســم عمل خنثی‌سازی ســیگنالینگ به جلو (MOA) اطلاع‌رسانی می‌کردند. بــا توجه به MOA ســیگنال دهی معکوس، تفاوت معنی داری بین گروه ها مشــاهده نشــد زیرا هر دو بیان tmTNF و CD54 توســط مونوســیت ها قابل مقایســه بودنــد. ناهمگونی در ســطح فــردی نیز قابل مشاهده بود. با ترکیب پانل ۱۰ امکان پذیر شد، درگیری ســلول‌های NK از طریــق ADCC MOA نیز از طریق نظارت همزمان CD16 و CD69 بر روی آن زیر مجموعه ســلولی خاص مورد مطالعه قرار گرفت. حدود ۷۰ درصد از بیماران مبتلا به آرتریت روماتوئید ساده نسبت سمیت سلولی وابســته به آنتی بادی (ADCC) کمتری نسبت به گروه کنترل ســالم نشان دادند، در نتیجه قابلیت‌های ADCC بالاتری را نشــان می‌دهنــد. با این حال، تفاوت آمــاری معنی داری بین گروه‌ها مشــاهده نشــد. جالب توجه اســت، بیماران PsA نســبت به طور قابل توجهی پایین تر در مقایســه با اهداکنندگان ســالم نیز هستند. در مقابل، بیماران RA تحت درمان با مکانیسم ADCC هیچ پاســخی نشــان ندادند. از آنجایی که ۱۶ نفر از ۱۷ بیمار تحت درمان حداقل یک درمان بیولوژیکی را انجام داده‌اند یا در حال حاضر هســتند، می‌توان این فرض را داشــت که اهداکنندگان تحت درمــان با RA در نتیجه مکانیســم‌های مقاومت درمانی نصب شده قبلی کمتر به IFX پاســخ می‌دهند. با این حال، هیچ ارتباط و تمایزی در هنگام بررسی اهداکنندگانی که قبلاً درمان ضد TNF داشــته‌اند، یافت نشــد، از این رو این فرضیه باید بیشتر مــورد مطالعه قرار گیرد. اگرچه، ایــن نتایج با مطالعات قبلی مطابقت دارد، که کاهش تولید TNF را در بیماران مبتلا به RA قبلاً تحت درمان (چه در مورد متوترکسات یا درمان‌های ضد TNFs) قرار داده‌اند.

نتیجه

ســنجش عملکردی مبتنی بر خون کامل پیشــنهادی می‌تواند یک ابزار ارزشمند برای توصیف بیمار RA باشد. علاوه بر نشــان دادن تفاوت‌های پایه بین اهداکنندگان بیمار و ســالم برای بیان برخی از مارکرهای فعال‌سازی، قابلیت‌های فعال‌ســازی نامنظم بر تحریک LPS گزارش شــده است. نشــان داده شــده اســت که پروفایل‌های خوشه‌بندی نمونه به شدت به شرایط فعال‌سازی بستگی دارد، نــه تنها زمانی که شــرایط پایه و LPS مقایســه شــدند، بلکه زمانی که درمان in vitro ضد TNF انجام شد. علاوه بر این، پروفایل‌های متفاوتی در گروه بیماران مبتلا بــه آرتریت روماتوئید RA یافت شــد که اهمیت مطالعه عملکرد ســلولی را برای آشکار کردن ویژگی‌های طبقه‌بنــدی بیمــار برجســته می‌کند. با ایــن مطالعه اثبات مفهوم، هدف ما نشــان دادن ارتباط سنجش‌های عملکردی مبتنی بر خون کامل در مطالعات انتقال دانش به بالین بــود. برای ادامه ارزیابی اســتفاده بالقوه از این رویکرد در زمینه پیش‌بینی پاســخ، گروه‌های بزرگ‌تر و همچنین مارکرهای فرســودگی و فعال‌سازی بیشتر باید در نظر گرفته شــوند. علاوه بر این، بیماران به درمان در نظر گرفته شــده در اینجا پس از تجویز درمان به صورت طولی تحت نظارت قرار خواهند گرفت.

منبع:

https://www.nature.com/articles/s41598-022-16622-4