

بررسی میزان بیان ژن‌های سایتوکاین‌ها در PBMCs بیماران قلبی و عروقی

زهرا طاهری^۱، مهسا محمد آملی^{۲*}، میلاد ابوالحلاج^۱، جواد توکلی بزاز^۳، باقر لاریجانی^۴، مریم خجسته فرد^۳، پروین امیری^۲

چکیده

مقدمه: هر دو سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی در ایجاد بیماری‌های قلبی و عروقی درگیرند. هدف از این مطالعه بررسی میزان بیان سایتوکاین‌های مختلف در لئوسیت‌های خون محیطی (Fresh un-stimulated PBMCs) در افراد دارای بیماری‌های قلبی و عروقی بود.

روش‌ها: این مطالعه یک بررسی موردی-شاهدی بود و بر روی بیمارانی که آنژیوگرافی قلبی عروقی شده بودند، انجام شد. بیماران با بیش از ۵۰ درصد تنگی به عنوان گروه مورد (CAD⁺) و بیماران بدون تنگی عروق کرونر به عنوان گروه کنترل (CAD⁻)، دسته‌بندی شدند. در هر گروه ۲۵ بیمار که از نظر سن و جنس و نمایه توده بدن (BMI)، match شده بودند، برای آنالیز میزان بیان ژن‌های IL-4، IL-6، IL-10، IL-17، IL-23، TNF α ، INF γ ، TGF β در بیماران CAD⁺ در قیاس با بیماران CAD⁻ با استفاده از روش Real time PCR به طور کمی مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: ما مشاهده کردیم که بیان ژن‌های IL-4 و IL-10 در بیماران CAD⁺ کاهش یافته بود در حالی که بیان ژن‌های IL-6 و همچنین INF γ به عنوان نمونه‌ای از پاسخ‌های ایمنی مربوط به سلول‌های Th₁ در بیماران CAD⁺ در قیاس با بیماران CAD⁻ افزایش یافته بود، هر چند این اختلافات از نظر آماری معنی‌دار نبود. در این مطالعه یک کاهش معنی‌دار در بیان ژن IL-23 در PBMCs بیماران با CAD در قیاس با بیماران بدون CAD مشاهده شد (P<۰/۰۰۱، CI:۰/۲۹-۰/۸، ۰/۹۵٪).

نتیجه‌گیری: داده‌های آماری بر نقش قابل توجه IL-23 در بیماری‌زایی CAD دلالت می‌کند و همچنین بر این فرضیه تاکید می‌کند که می‌توان از IL-23 در جهت کاربردهای درمانی استفاده کرد. IL-23 یک سایتوکاین مهم در مسیر Th₁₇ می‌باشد. بنابراین مطالعات بیشتر در آینده در جهت نقش پاسخ ایمنی Th₁₇ در آترواسکلروزیس برای آشکارسازی سازوکارهای تنظیمی درگیر در پاتوژنیزیس CAD موثر خواهد بود.

واژگان کلیدی: بیماری عروق کرونر قلب، آترواسکلروزیس، Real time PCR

ترجمه انگلیسی این مقاله در سال ۲۰۱۲ در مجله Disease Markers به چاپ رسیده است

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات

۲- مرکز تحقیقات غدد/ پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳- دپارتمان ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

نشانی: تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم، تلفن: ۰۲۱-۸۸۲۲۰۰۳۷-۸

نمبر: ۰۲۱-۸۸۲۲۰۰۵۲، پست الکترونیک: amolimm@tums.ac.ir

مقدمه

نشان داده‌اند که $INF\gamma$ تکثیر سلول‌های ماهیچه‌ای صاف و ساخت کلاژن را کاهش می‌دهد و میزان بیان متالو-پروتئینازهای ماتریکسی را تعدیل می‌کند. $TNF\alpha$ سایتوکاین دیگری است که اساساً به وسیله سلول‌های Th_1 تولید می‌شود و همچون یک ریسک فاکتور بالقوه برای بیماری‌های قلبی و عروقی مطرح می‌باشد [۱،۲].

در حالی که سلول‌های Th_2 سایتوکاین‌هایی با ویژگی‌های ضد التهابی را تولید می‌کنند که در بیماری‌های آلرژیک نقش بالقوه‌ای را بر عهده می‌گیرند. به نظر می‌رسد که سایتوکاین‌های وابسته به Th_2 هر دو ویژگی پیش التهابی و ضد التهابی را دارا باشند. $IL-4$ یک سایتوکاین نمونه از این گروه می‌باشد که در تمایز سلول‌های Th_2 مشارکت می‌کند [۱۳،۱۴]. سلول‌های Th_{17} نوع دیگری از سلول‌های Thelper می‌باشد که $IL-17F$, $IL-17A$, $IL-21$, $IL-22$, $IL-23$ را ترشح می‌کند. سلول‌های Th_{17} به عنوان نمونه ای از سلول‌های تولید کننده سایتوکاین‌ها، Th_3 نیز نامیده می‌شود که پاسخ ایمنی اکتسابی و ذاتی را به هم مربوط ساخته و همچنین اثرات تنظیمی روی تولید و عملکرد سایتوکاین‌های سلول‌های Th_1 و Th_2 دارد. همچنین اطلاعات مستدلی از مشارکت سلول‌های B و Treg در ایجاد آترواسکلروزیس حمایت می‌کند [۹-۱۱].

در این مطالعه به منظور بررسی بیشتر نقش مارکرهای التهابی در پاتوفیزیولوژی CAD، ما شکل بیان ژن‌های $TGF\beta$, $TNF\alpha$, $INF\gamma$, $IL-23$, $IL-17$, $IL-10$, $IL-6$, $IL-4$ در سلول‌های لئوسیت خون محیطی در بیماران CAD^+ و CAD^- مورد بررسی قرار دادیم.

روش‌ها

این مطالعه بر روی بیمارانی که علت اصلی مراجعه آنها درد قفسه سینه بود و در همگی آنها آنژیوگرافی قلبی و عروقی در مرکز Cath lab بیمارستان شریعتی تهران انجام شده بود، اجرا شد. پس از گرفتن رضایت‌نامه کتبی، پرسشنامه اختصاصی برای همه بیماران که شامل سابقه درمانی برای بیماری‌های التهابی و بدخیمی‌ها بودند، تکمیل گردید.

آترواسکلروزیس یک بیماری التهابی مزمن در دیواره رگ‌ها می‌باشد که هر دو سیستم ایمنی ذاتی و اکتسابی در آن درگیرند [۱]. هر چند اطلاعات حاضر در مورد سازوکارهای اصلی بیماری مورد بحث می‌باشد، نتایج جداگانه‌ای از شواهد مطالعاتی بر روی حیوانات و جمعیت‌های انسانی پیشنهاد کننده این موضوع‌اند که سلول‌های ایمنی مستقیماً در توسعه پلاک‌های آترواسکلروتیک سهم می‌باشند [۱،۲]. شواهد قابل توجهی از نقش سیستم ایمنی اکتسابی در توسعه و پیشرفت بیماری‌های قلبی و عروقی حمایت می‌کند [۳]. سایتوکاین‌های Th_1 به ویژه $INF\gamma$ به عنوان مثالی از این گروه به طور قابل توجهی همچون یک عامل تنظیمی سازوکارهای ایمنی در آترواسکلروزیس قابل قبول می‌باشد [۱]. سلول‌های Th_1 ، Tcell، هاستند که به فراوانی در پلاک‌های آترواسکلروتیک مشاهده می‌شوند [۴]. مشاهده شده است که در موش‌هایی با فقدان apoE یا $LDLR^{-/-}$ و $apoE^{-/-}LDLR$ ، کاهش قابل توجهی در توسعه اولیه آسیب آترواسکلروتیک به وجود می‌آید [۵،۶]. علاوه بر این سایتوکاین‌های Th_2 از جمله $IL-4$ ، $IL-10$ ، $IL-5$ به ندرت در پلاک‌ها یافت می‌شود [۷]. نقش مسیر Th_2 در فرایندهای آترواسکلروزیس هنوز مورد بحث می‌باشد و به مدل‌های آزمایشی مورد مطالعه و یا جایگاه آسیب وابسته می‌باشد. مطالعات اخیر بر عدم تعادل بین سایتوکاین‌های Th_1 ، Th_2 و نقش Microenvironment در آغاز و توسعه آترواسکلروزیس در رگ‌های قلبی متمرکز شده است [۸].

اخیراً Th_{17} و سلول‌های Treg همچون تنظیم کننده‌های مهم واکنش‌های التهابی در CAD ظاهر شده‌اند. مشارکت این نوع سلول‌ها همچون شرکت‌کنندگان احتمالی در توسعه آسیب آترواسکلروتیک، نشان دهنده سازوکارهای پیچیده و تنوع تیپ‌های سلولی درگیر در فرایندهای بیماری می‌باشد [۹-۱۱].

از این میان سلول‌های Th_1 همچون تولید کنندگان سایتوکاین‌های پیش التهابی شناخته شده‌اند که به طور بالقوه در شرایط التهابی و خود ایمنی درگیرند. مطالعات

استخراج RNA و سنتز cDNA

آنالیز بیان سایتوکاین‌ها بر روی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (Fresh un-stimulated PBMCs) انجام شد. از ۵cc نمونه خون هر بیمار که در محیط دارای هپارین جمع‌آوری شده بود، با استفاده از شیب غلظت فایکول (۱/۰۶۶) جداسازی لنفوسیت‌ها انجام شد.

Total RNA با استفاده از محلول جداسازی Tripure (Roche) براساس پروتکل سازنده استخراج گردید. RNA در ۳۰µl آب DEPC حل شد و در دمای ۷۰- سانتی‌گراد نگهداری شد. برای ارزیابی کیفیت و غلظت RNA استخراج شده از OD یا همان دانسیته نوری استفاده شد. یعنی میزان جذب نوری محلول در طول موج ۲۶۰ نانومتر مورد اندازه‌گیری واقع شد که این عمل به کمک دستگاه 2000 Thermo Scientific NANODROP انجام شد. در این روش همچنین میزان OD محلول در طول موج‌های ۲۳۰ و ۲۸۰ نانومتر نیز اندازه‌گیری شد که برای تأیید صحت کار باید نسبت OD260 به OD280 و همین‌طور نسبت OD260 به OD230 بیش از ۱/۸ باشد. نمونه‌هایی که پس از این تخمین چنین اعدادی مشاهده نشد، این نمونه‌ها مجدداً تخلیص شد. یک میلی‌گرم از RNA جدا شده از هر نمونه با استفاده از پرایمرهای راندوم هگزا نوکلئوتید (hexanucleotides random)، تحت واکنش رونویسی معکوس (reverse transcription) به cDNA تبدیل شد.

Real time PCR

برای بررسی سطوح بیان mRNA سایتوکاین‌ها از Real time PCR کمی استفاده شد که با استفاده از کیت تجاری SYBR Premix Ex Taq II (Takara, Japan) و دستگاه ABI stepOne™ Sequence انجام شد. بررسی کمی Real time PCR با استفاده از کنترل داخلی HPRT و با زوج پرایمرهایی به شرح جدول ۱ انجام گرفت. مخلوط واکنش در پلیت‌های ۴۸ خانه‌ای در حجم نهایی ۲۰µl ترکیب واکنشی که شامل مواد ذیل بود انجام شد: (هر واکنش به صورت duplicate انجام گرفت).

تشخیص اولیه به وسیله پزشک کاردیولوژیست صورت گرفته بود و همچنین آنژیوگرافی کرونری بر روی تمام بیماران انجام شده بود.

ضایعات قابل توجه (Significant)، در بیمارانی که در هر ۳ سیستم عروق کرونری با انسداد بیش از ۵۰ درصد روبه رو بودند، آترواسکلروزیس شدید تعریف شد و بیمارانی که دارای بیش از ۵۰ درصد تنگی مجرا، اما فقط در یک و یا دو عروق کرونری اصلی بودند، از این مطالعه خارج شدند. بیمارانی که بر اساس نتایج آنژیوگرافی دارای رگ‌های طبیعی بدون تنگی بودند، به عنوان گروه کنترل (CAD-) طبقه‌بندی شدند.

افراد با سابقه استفاده دارو برای فشار خون (هیپرتانسیون) و یا افراد دارای فشار خون متوسط شامل mm/Hg $\geq 140/90$ به عنوان افراد دارای هیپرتانسیون گروه‌بندی شدند. دیابت ملیتوس و هیپرلیپیدما به ترتیب براساس معیارهای انجمن دیابت آمریکا (ADA) و (NCEP ATP III) تشخیص داده شد [۱۴].

همچنین اطلاعاتی از قبیل وضعیت مصرف سیگار، پیشینه برخی از اختلالات مانند آنفکتوس میوکاردیال (MI) و یا بیماری قلبی عروقی زودرس (CHD) ثبت و جمع‌آوری شد.

آنفکتوس میوکاردیال (MI)، براساس تاریخچه درمانی و بر پایه معیارهای تعیین شده در سازمان بهداشت جهانی (WHO) به عنوان مثال نشانه‌های خاص بیماری، به همراه تغییرات الکتروکاردیوگرافی ویژه و یا افزایش آنزیم‌های قلبی با سابقه جراحی by past تأیید شد. CHD زودرس بر پایه معیارهای (NCEP ATP III) تعیین شد.

سطوح BS و پروفایل لیپیدی برای همه بیماران با استفاده از دستگاه خود آنالیزور هیتاچی ۹۰۲ و کیت (پارس آزمون- ایران) تست شد.

در هر گروه ۲۵ بیمار که از نظر سن و جنس و نمایه توده بدن (BMI)، match شده بودند، برای آنالیز میزان بیان ژن سایتوکاین‌ها به طور تصادفی انتخاب شدند. این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تهران به تصویب رسید.

استفاده از میانگین \pm انحراف معیار بیان شد و $P \leq 0.05$ معنی‌دار محسوب گردید.

یافته‌ها

از میان همه بیماران مورد مطالعه $N=25$ مورد به عنوان CAD^+ و $N=25$ مورد به عنوان CAD^- در نظر گرفته شدند. میانگین \pm انحراف معیار از سن افراد شرکت کننده در این مطالعه $63 \pm 8/5$ سال در گروه CAD^+ و در افراد CAD^- 55 ± 11 سال تعیین گردید. مشخصات بالینی بیماران در هر دو گروه در جدول ۲ نشان داده شده است.

بیان ژن سایتوکاین‌های مختلف در بیماران CAD^+ در قیاس با بیماران CAD^- با کمک آنالیز Real time PCR نشان داد که بیان IL-23, IL-17, IL-10, IL-4 در بیماران CAD^+ در قیاس با بیماران CAD^- کاهش یافته بود در حالی که بیان $INF\gamma$ و IL-6 در این بیماران افزایش پیدا کرده بود (شکل ۱).

همچنین کاهش معنی‌داری در بیان ژن IL-23 در بیماران CAD^+ در قیاس با بیماران CAD^- مشاهده شد (0.08 - تفاوت معنی‌داری برای بیان سایر سایتوکاین‌های ذکر شده در بیماران CAD^+ در قیاس با بیماران CAD^- یافت نشد).

۱۰ μ l (2 \times SYBR Premix Ex Taq)

پرایمر forward و reverse ۱ μ l

(آب nuclease-free) ۷/۲ μ l

۰/۲ μ l ROX

۱/۵ μ l cDNA

شرایط سیکل دمایی به قرار ذیل بود: یک مرحله ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ ثانیه برای فعال‌سازی آغازی پلیمرز، در ادامه ۴۰ سیکل که شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۴۰ ثانیه می‌باشد. سپس منحنی ذوب (melting curve) ایجاد می‌گردد که تأیید کننده تکثیر اختصاصی ژن می‌باشد.

آنالیز آماری

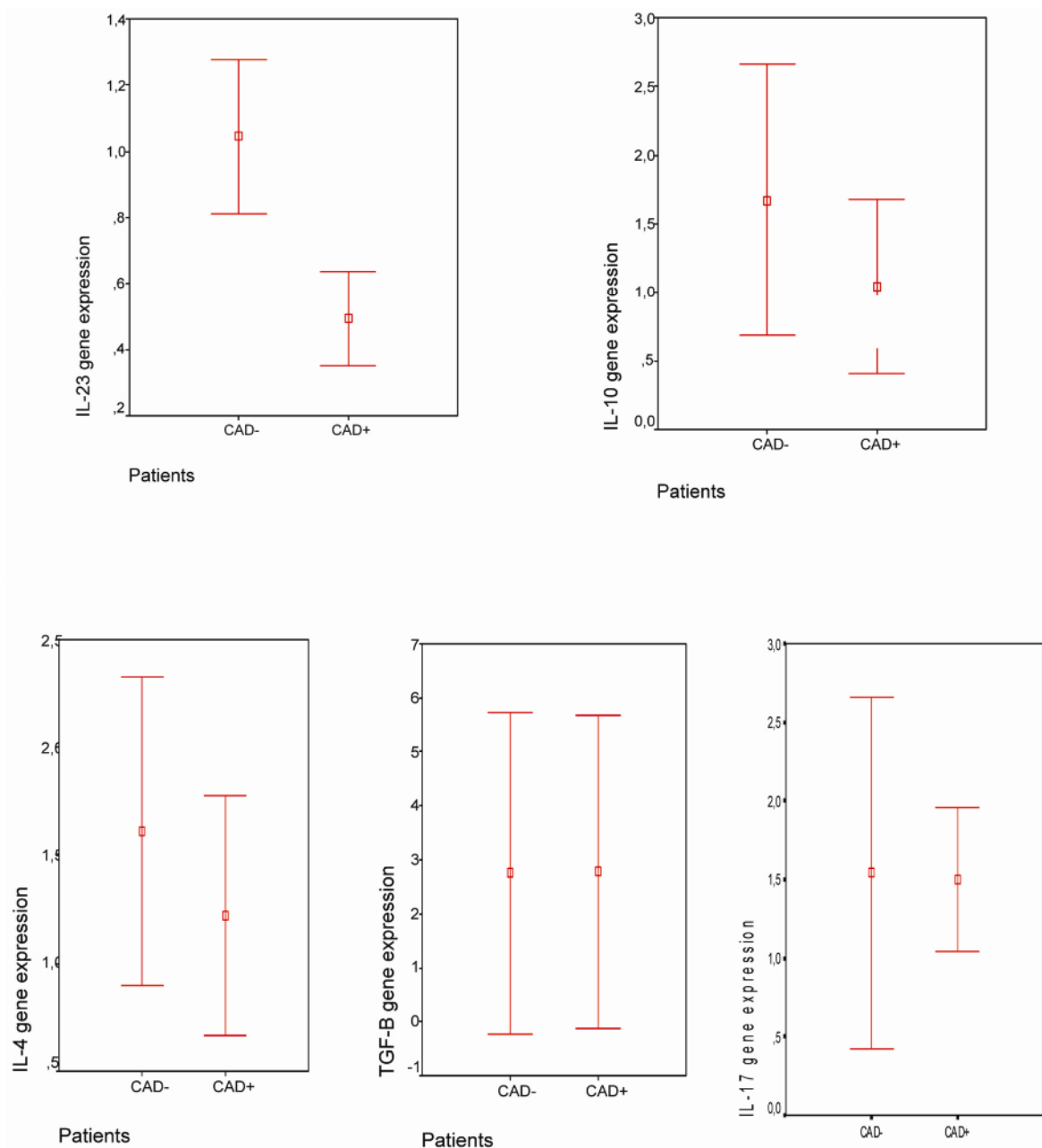
تمام یافته‌های آماری با کمک نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۵ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای آنالیز نتایج مربوط به بررسی کمی بیان ژن، اطلاعات به دست آمده از بیان ژن سایتوکاین‌ها با نتایج حاصل از HPRT به عنوان ژن مرجع نرمال گردید. آنالیز داده‌ها با استفاده از متد $2^{-\Delta\Delta CT}$ انجام شد و معناداری اختلافات برای بیان ژن بین گروه کنترل و گروه مورد به وسیله آزمون آماری T تخمین زده شد. نرمال بودن داده‌ها برای توزیع متغیرها به وسیله تست kolmogorov-smirnov تعیین شد و متوسط متغیرها با

جدول ۱- توالی پرایمر برای انجام Real-time PCR

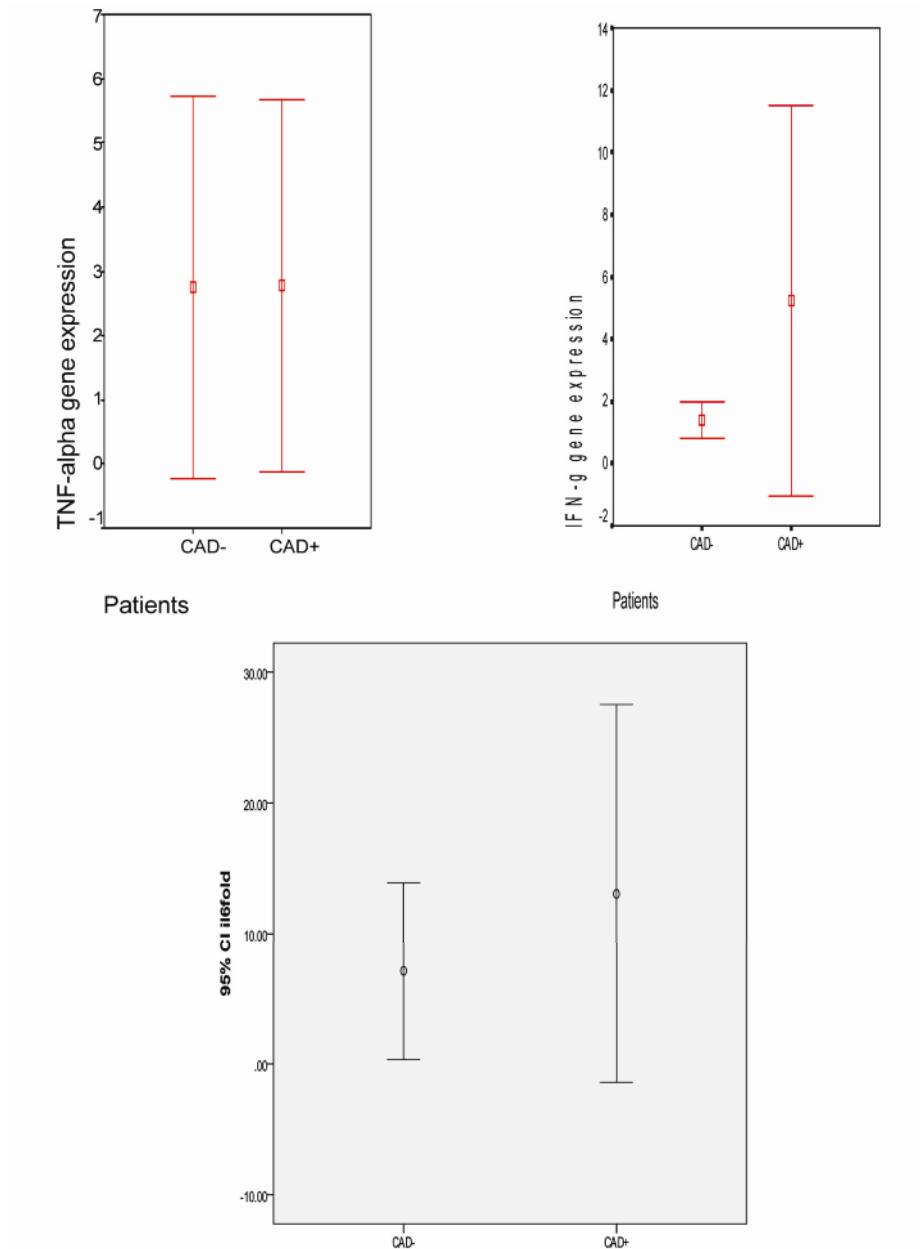
ژن	توالی‌های زوج پرایمر	طول تکثیر
HPRT F	5'-CCTGGCGTCGTGATTAGTGAT-3'	۱۳۱ bp
HPRT R	5'-AGACGTTTCAGTCTGTCCATAA-3'	
TGF- β 1 F	5'-CGACTACTACGCCAAGGA-3'	۱۵۰ bp
TGF- β 1 R	5'-GAGAGCAACACGGGTTCA-3'	
TNF- α F	5'-CCCAGGCAGTCAGATCATCTTC-3'	۸۵ bp
TNF- α R	5'-AGCTGCCCTCAGCTTGA-3'	
INF- γ F	5'-AGCGGATAATGGAACCTTTTCTTAG-3'	۱۰۳ bp
INF- γ R	5'-AAGTTTGAAGTAAAAGGAGACAATTGG-3'	
IL-4 F	5'-ACAGCCTCACAGAGCAGAAGACT-3'	۷۲ bp
IL-4 R	5'-TGTTCTGGAGGCAGCAAAGA-3'	
IL-6 F	5'-GGTACATCCTCGACGGCATCT-3'	۸۱ bp
IL-6 R	5'-GTGCCTCTTTGCTGCTTTTAC-3'	
IL-10 F	5'-GCCTAACATGCTTCGAGATC-3'	۲۰۶ bp
IL-10 R	5'-TGATGTCTGGGTCTTGGTTC-3'	
IL-23 F	5'-GGACAACAGTCAGTTCTGCTT-3'	۱۱۵ bp
IL-23 R	5'-CACAGGGCTATCAGGGAGC-3'	
IL-17 F	5'-CATAACCGGAATACCAATACCAAT-3'	
IL-17 R	5'-GGATATCTCTCAGGTCCTCATT-3'	

جدول ۲- مشخصات بالینی بیماران دارای CAD⁺ و بدون CAD⁻

متغیرهای کیفی (n=/.)	دارای بیماری کرونر قلبی (CAD ⁺)	بدون بیماری کرونر قلبی (CAD ⁻)	مقدار P
جنس (مرد)	٪۶۰/۴	٪۶۸/۵	NS
سابقه مصرف سیگار	٪۳۲/۲	٪۲۴/۶	۰/۰۶
فشار خون بالا	٪۵۶	٪۴۶/۵	NS
دیابت ملیتوس	٪۴۱/۶	٪۱۶/۵	*۰/۰۰۱
هیپرلیپیدمیا	٪۵۳/۴	٪۶۸	۰/۰۰۸
آنفاکتوس میوکاردیال	٪۵۴/۷	٪۰	*۰/۰۰۱
سابقه خانوادگی بیماری‌های قلبی و عروقی	٪۳۰/۶	٪۳۵/۸	NS



شکل ۱- بیان ژن‌های سایتوکاین‌ها در بیماران با CAD⁺ و بدون CAD⁻



نمودار نشانگر، میانگین \pm انحراف بیان mRNA ژن سایتوکاین‌ها در بیماران با CAD در مقایسه با بیماران بدون CAD می‌باشد. یک افزایش معنی‌دار در بیان ژن IL-23 در بیماران با CAD در مقایسه با بیماران بدون CAD مشاهده می‌شود ($P < 0.001$).

آترواسکروزیس مورد بحث بوده است و همچنان نیاز به توضیح و تفسیر بیشتری دارد [۱۵-۱۸]. در این مطالعه ما کاهش قابل توجهی از بیان ژن IL-23 در PBMC های un-stimulate در بیماران CAD⁺ را مشاهده کردیم که تأیید کننده نقش حفاظتی IL-23 در آترواسکروزیس می‌باشد. همین طور باید اشاره شود که IL-23 به طور فعالی در افزایش سلول‌های Th₁₇ نیز درگیر می‌باشد [۱۹].

بحث

شواهد مستدل از مطالعات ژنومیک عملکردی متعدد از نقش بالقوه و اساسی سلول‌های T در توسعه آسیب آترواسکروتیک حمایت می‌کند [۱۵]. اخیراً محور IL-23-IL-17 به پاتوژنیز آترواسکروزیس مرتبط شده است [۱۵]. با این حال اطلاعات اخیر درباره نقش دقیق سلول‌های Th₁₇ در مراحل گوناگون ایجاد

دادیم. در این مطالعه گرچه بیان ژن $INF\gamma$ به طور اندکی در PBMC بیماران CAD^+ افزایش یافته بود، ولی تفاوت معنی‌داری در قیاس با بیماران CAD^- یافت نشد.

تفاوت معنی‌داری بین بیان $TNF\alpha$, mRNA در لنفوسیت‌های محیطی افراد CAD^+ در قیاس با افراد CAD^- نیز یافت نشد که این امر ممکن است به علت وجود فنوتیپ‌های دیگری باشد که به بیان سایتوکاین‌های تولید شده به وسیله Th_2 که اساساً ویژگی‌های ضد التهابی دارند وابسته باشد. $IL-4$ یکی از بارزترین نمونه‌های سایتوکاین‌های این دسته می‌باشد. جرح و همکارانش کاهش قابل توجهی در شکل‌گیری رگ‌های چربی و پلاکت‌ها در موش‌های $IL-4^{-/-}$ در مقایسه با موش‌های نوع وحشی تیپ $C57/BL_6$ را نشان دادند [۲۵].

هرچند مطالعات دیگری وجود دارد که از ویژگی‌های پیش التهابی $IL-4$ نیز حمایت می‌کند. علاوه بر این گزارش شده است که تحت شرایط هیپرکلسترولمیا کنترل این سایتوکاین در ارتباط با کاهش اندازه آسیب آترواسکروتیک می‌باشد [۲۶]. هرچند اطلاعات قبلی نشان داده‌اند که $IL-4$ یکی از سایتوکاین‌های ضد التهابی مهم می‌باشد که در پاتوژنیز CAD درگیر می‌باشد. در مطالعه حاضر میزان بیان ژن $IL-4$ در بیماران CAD^+ در مقایسه با بیماران CAD^- کاهش یافته بود، هرچند این نتایج از نظر آماری معنادار نبود.

$IL-6$ همچون یک ریسک فاکتور مستقل از CAD مورد بررسی قرار گرفته است. $IL-6$ یک سایتوکاین مولتی فاکتوریال با اثرات تنظیمی مهم روی چندین وجه مختلف پاسخ‌های ایمنی می‌باشد [۲۹-۲۷]. اطلاعات مختلف درباره نقش $IL-6$ در آترواسکروزیس هنوز مورد بحث و بررسی است. به طوری که برخی از مطالعات از نقش قطعی $IL-6$ و برخی دیگر اثر منفی و یا حتی خنثی این سایتوکاین را در ایجاد آترواسکروزیس مورد حمایت قرار داده‌اند [۳۰-۳۳]. در مطالعه حاضر آنالیز بیان $IL-6$ در لنفوسیت‌های خون محیطی در بیماران CAD^+ اختلاف معنی‌داری در قیاس با گروه کنترل را نشان نداد. نتایج متفاوت به دست آمده در مطالعات درباره نقش سایتوکاین‌های التهابی در CAD ممکن است به علت وجود مواردی مثل اختلاف در معیارهای تشخیصی، جنس،

پاسخ‌های مشتق از Th_1 به طور تنگاتنگی در خود ایمنی و پاتوژنیز در چندین اختلال التهابی مزمن درگیر است [۲۰]. Th_{17} نیز در فعال‌سازی و استخراج پاسخ‌های Th_1 درگیر می‌باشد. بنابراین ممکن است این طور تصور شود که سلول‌های Th_{17} عملکرد پروآتروژنیک داشته باشند. برخلاف گزارشات قبلی یک نقش حفاظتی از IL_{17} در آتروژنیز یافت شده است که مشخص کننده عملکرد تنظیمی پیچیده از سلول‌های Th_{17} در شرایط التهابی گوناگون می‌باشد [۱۵، ۱۶].

Th_1 تولید می‌شوند و $INF\gamma$, $IL-18$, $IL-12$ و $TNF\alpha$ همگی به وسیله سلول‌های بررسی شده است. درگیری این سایتوکاین به وسیله حضورش در پلاک‌های آترواسکروتیک انسانی تایید شده است. علاوه بر این سطوح سرمی افزایش یافته‌ای از $TNF\alpha$ ، ارتباط بین خطر افزایش یافته‌ای از آنفاکتوس قلبی و سن وابسته به آترواسکروزیس را پیشنهاد می‌کند [۲۱]. این اطلاعات بر نقش $INF\gamma$ و $TNF\alpha$ همچون سایتوکاین‌های پروآتروژنیک دلالت کرده و بر این فرضیه تاکید می‌کنند که این سایتوکاین‌ها می‌توانند به عنوان اهداف موثری در درمان آترواسکروزیس به شمار روند [۷]. $INF\gamma$ یک سایتوکاین پلئوتروپیک است که بیان افزایش یافته‌اش به وسیله انواع سلول‌ها شامل ماکروفاژها و سلول‌های Th_1 در درون پلاک‌های آترواسکروتیک گزارش شده است. این طور مطرح شده است که $INF\gamma$ به طور مستقیم یا غیرمستقیم در شکل‌گیری آترواسکروزیس ایفای نقش می‌کند. با انجام آزمایشات متعدد بر روی حیوانات با استفاده از موش‌های $apoE^{-/-}$ برای مدل‌سازی روند آترواسکروزیس این طور پیشنهاد شده است که تزریق روزانه $INF\gamma$ در موش‌های $apoE^{-/-}$ با افزایش قابل توجهی از تعداد Tcell ها و افزایش اندازه آسیب آترواسکروتیک در ارتباط می‌باشد. همین طور مشخص شده است که توسعه آسیب آترواسکروتیک و شدت فنوتیپ در موش‌های نر و ماده $LDLR^{-/-}$ با فقدان $INF\gamma$ به طور معنی‌داری کاهش پیدا کرده است [۲۲-۲۴]. از میان سایتوکاین‌های پیش التهابی، $INF\gamma$ و $TNF\alpha$ را همچون دو فاکتور بالقوه پیش آترواسکروتیک مورد بررسی قرار

سایر سایتوکاین‌های Th_1 و Th_2 و سلول‌های Th_{17} را تنظیم می‌کند. برخی مطالعات پیشنهاد می‌کند که ممانعت از الگوی سیگنالینگ $TGF\beta$ با افزایش تمایز Tcellها به طرف فنوتیپ Th_1 و Th_2 در ارتباط بوده و همچنین تسریع کننده فرایندهای منجر به آترواسکلروزیس می‌باشد [۳۸-۴۰]. در مطالعه حاضر هیچ تفاوت معنی‌داری در بیان $TGF\beta$ و IL-10 در بیماران CAD^+ و قیاس آن با بیماران CAD^- یافت نشد که ممکن است به علت نقش فاکتورهای مختل کننده دیگری باشد که نیاز به توضیح و شفاف‌سازی بیشتر دارد. نتایج به دست آمده در این مطالعه تایید کننده نقش مهم IL-23 همچون یکی از سایتوکاین‌های مهم مسیر Th_{17} در پاتوژنزیس CAD می‌باشد که ممکن است اهمیت درمانی نیز داشته باشد. مطالعات گسترده‌تر در تعداد بیشتری از نمونه‌ها برای شفاف‌سازی نقش سایتوکاین‌های التهابی در پاتوژنزیس CAD مورد نیاز است.

سپاسگزاری

نگارندگان مراتب سپاسگزاری خود را از پژوهشکده علوم غدد و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران که با حمایت مالی و امکانات آزمایشگاهی انجام این پژوهش را میسر نمودند، ابراز می‌دارند.

سن، رژیم غذایی و همچنین به طور با اهمیت‌تری حضور دیگر فنوتیپ‌های بالینی مثل دیابت و چاقی در امر تشخیص باشد. همه سایتوکاین‌های درگیر در فرایندهای التهابی در شرایط گوناگون ماهیت پیش التهابی یا ضد التهابی از خود نشان می‌دهند. همچنین برخی از سایتوکاین‌ها به خانواده سایتوکاین‌های با رسپتورهای سیگنالینگ یکسان تعلق داشته که این امر می‌تواند به طور بالقوه‌ای نتایج مطالعات در مدل‌های آزمایشی را دچار تغییر کند. IL-10 و $TGF\beta$ هر دو جزء سایتوکاین‌های ضد التهابی احتمالی می‌باشند که در پاتوژنزیس CAD مشارکت دارند. IL-10 یک سایتوکاین پلی‌تروپیک است که به وسیله سلول‌های Th_2 و ماکروفاژهای فعال شده تولید شده و به عنوان نمونه‌ای از سایتوکاین‌های سلول‌های Treg مورد بررسی قرار گرفته است. IL-10 یک سایتوکاین ضد التهابی است که می‌تواند نظم به هم پیوسته‌ای از پاسخ‌های ایمنی را ممانعت کرده و به طور بالقوه‌ای حفاظت کننده از آترواسکلروزیس باشد. برخی از مطالعات شامل آزمایشات روی انسان و مدل‌های موشی تایید کننده نقش حفاظتی IL-10 در CAD می‌باشند. $TGF\beta$ نیز سایتوکاین دیگری است که به وسیله انواع سلول‌های مختلف شامل سلول‌های Treg تولید می‌شود [۳۷-۳۴] و از تکثیر و فعال‌سازی و تمایز Tcell به طرف Th_1 و Th_2 ممانعت می‌کند و بیان

مأخذ

1. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 2006; 86: 515-581.
2. Weber C, Zernecke A, Libby P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:802-815.
3. Hansson G, Nilsson J. Vaccination against atherosclerosis? Induction of atheroprotective immunity. *Semin Immunopathol* 2009; 31: 95-101.
4. Erbel C, Sato K, Meyer FB. Functional profile of activated dendritic cells in unstable atherosclerotic plaque. *Basic Res Cardiol* 2007; 102:123-32.
5. Sun J. Deficiency of antigen-presenting cell invariant chain reduces atherosclerosis in mice. *Circulation* 2010; 122: 808-820.
6. Lutgens E, Lievens D, Beckers L, Donners M. CD40 and its ligand in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 2007; 17: 118-123.
7. Lahoute C, Herbin O, Mallat Z, Tedgui A. Adaptive immunity in atherosclerosis: mechanisms and future therapeutic targets. *Nat Rev Cardiol* 2011; 8:348-58.
8. Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovascular Research* 2008; 79: 360-376.
9. O'Connor W Jr, Kamanaka M, Booth CJ, Town T, Nakae S, Iwakura Y, Kolls JK, Flavell RA. A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nat Immunol* 2009; 10: 603-609.
10. Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004; 21: 467-476.
11. Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14: 155-174.
12. Belkaid Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 875-88.

13. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 508-19.
14. Antonopoulos S. Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002; 106: 3143-421.
15. Chen S, Crother TR, Arditi M. Emerging role of IL-17 in atherosclerosis. *J Innate Immunol* 2010; 2: 325-33.
16. Taleb S, Romain M, Ramkhalawon B, Uyttenhove C, Pasterkamp G, Herbin O, et al. Loss of SOCS3 expression in T cells reveals a regulatory role for interleukin-17 in atherosclerosis. *J Exp Med* 2009; 206:2067-77.
17. van Es T, van Puijvelde GH, Ramos OH, Segers FM, Joosten LA, van den Berg WB, et al. Attenuated atherosclerosis upon IL-17R signaling disruption in LDLr deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 388:261-5.
18. Erbel C, Chen L, Bea F, Wangler S, Celik S, Lasitschka F, et al. Inhibition of IL-17A attenuates atherosclerotic lesion development in apoE-deficient mice. *J Immunol* 2009; 183:8167-75.
19. Costa VS, Mattana TC, da Silva ME. Unregulated IL-23/IL-17 immune response in autoimmune diseases. *Diabetes Res Clin Pract* 2010; 88:222-6.
20. Coffman RL. Origins of the T(H)1-T(H)2 model: a personal perspective. *Nat Immunol* 2006; 7:539-41.
21. Bruunsgaard H, Skinhj P, Pedersen AN, Schroll M, Pedersen BK. Ageing, tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) and atherosclerosis. *Clin Exp Immunol* 2000; 121:255-260.
22. Whitman SC, Ravisankar P, Elam H, Daugherty A. Exogenous interferon-gamma enhances atherosclerosis in apolipoprotein E $-/-$ mice. *Am J Pathol* 2000; 157: 1819-1824.
23. Gupta S, Pablo AM, Jiang X, Wang N, Tall AR, Schindler C. IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J Clin Invest* 1997; 99: 2752-2761.
24. Buono C, Come CE, Stavrakis G, Maguire GF, Connelly PW, Lichtman AH. Influence of interferon-gamma on the extent and phenotype of diet-induced atherosclerosis in the LDLr-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 454-460.
25. George J, Mulkins M, Shaish A, Casey S, Schatzman R, Sigal E et al. Interleukin (IL-4) deficiency does not influence fatty streak formation in C57BL/6 mice. *Atherosclerosis* 2000; 153:403-411.
26. Huber SA, Sakkinen P, Conze D, Hardin N, Tracy R. Interleukin-6 exacerbates early atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:2364-2367.
27. Yasukawa H, Ohishi M, Mori H, Murakami M, Chinen T, Aki D, et al. IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nat Immunol* 2003; 4:551-55.
28. Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:454-465.
29. Liao HS, Matsumoto A, Itakura H, Doi T, Honda M, Kodama T, et al. Transcriptional inhibition by interleukin-6 of the class A macrophage scavenger receptor in macrophages derived from human peripheral monocytes and the THP-1 monocytic cell line. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:1872-1880.
30. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 1998; 101: 311-320.
31. Elhage R, Clamens S, Besnard S, Mallat Z, Tedgui A, Arnal J, et al. Involvement of interleukin-6 in atherosclerosis but not in the prevention of fatty streak formation by 17-estradiol in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 2001; 156:315-320.
32. Schieffer B, Selle T, Hilfiker-Kleiner D, Grote K, Tietge UJ, et al. Impact of interleukin-6 on plaque development and morphology in experimental atherosclerosis. *Circulation* 2004; 110: 3493-3500.
33. Huber SA, Sakkinen P, David C, Newell MK, Tracy RP. T helper-cell phenotype regulates atherosclerosis in mice under conditions of mild hypercholesterolemia. *Circulation* 2001; 103:2610-2616.
34. Davidson NJ, Leach MW, Fort MM. T helper cell 1-type CD4+ T cells, but not B cells, mediate colitis in interleukin 10-deficient mice. *J Exp Med* 1996; 184: 241-51.
35. Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 1999; 190: 995-1004.
36. Mallat Z, Besnard S, Duriez M. Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ Res* 1999; 85: 17-24.
37. Pinderski Oslund LJ, Hedrick CC, Olvera T. Interleukin-10 blocks atherosclerotic events in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2847-53.
38. Kulkarni AB, Karlsson S. Transforming growth factor-beta-1 knockout mice – a mutation in one cytokine gene causes a dramatic inflammatory disease. *Am J Pathol* 1993; 143: 3-9.
39. Shull MM, Ormsby I, Kier AB. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992; 359: 693-9.
40. Li MO, Sanjabi S, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* 2006; 25: 455-71.