

The Role of Different Monocyte Subsets in Progression of Coronary Atherosclerotic Lesion

Hamideh Rahimi¹,
Seyed Mohammad Mehdi Peyghambari²,
Saeid Taghiloo^{3,4},
Hossein Asgarian-Omran^{5,6},
Reza Alizadeh-Navaei⁷,
Ali Heydari⁸,
Fatemeh Gabeleh⁹,
Abolghasem Ajami^{10,11}

¹ MSc in Immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Associate Professor, Department of Cardiology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ PhD Student in Immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Associate Professor, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁶ Immunogenetics Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁷ Assistant Professor, Gastrointestinal Cancer Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁸ MSc in Immunology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁹ MSc in Virology, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran

¹⁰ Professor, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

¹¹ Molecular and Cell-Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received February 21, 2018 Accepted October 1, 2018)

Abstract

Background and purpose: Circulating monocytes are divided into different subpopulations according to the expression of CD14 and CD16. In this study, we investigated the correlation between the severity of coronary artery disease (CAD) and the frequency of two monocyte subsets and also expression level of CCR1 receptor on these monocytes.

Materials and methods: The study was conducted in 88 patients who underwent diagnostic coronary angiography (CAG) in Tehran Shahid Rajaei Heart Center, 2014-2015. The participants were selected using convenience sampling. They were divided into four groups: 50% stenosis in one vessel (MVD), single vessel stenosis (1VD), 2 or 3 vessels stenosis (2+3 VD), and no CAD as the control group. The severity of CAD was evaluated by Gensini score. Frequency of the two monocyte subsets, including classical (CD14+CD16-) and non-classical (CD14+CD16+) were measured by flow cytometry. Mean fluorescence intensity (MFI) of CCR1 receptor on monocytes was also measured in two subsets and all groups of patients.

Results: Circulating non-classical monocytes were observed more frequently in patients with 2+3 VD than in controls, MVD, and 1VD groups, but the differences were not statistically significant ($P > 0.05$). Both classical and non-classical monocytes expressed CCR1, but it was expressed on higher number of classical monocytes than in non-classical ones. Also, no significant differences were seen in MFI of CCR1 in different groups.

Conclusion: This study showed that higher frequency of non-classical monocytes was correlated with severity of CAD.

Keywords: monocyte, CCR1, coronary artery disease

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28 (166): 30-39 (Persian).

Corresponding Author: Abolghasem Ajami - Department of Immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: ajami36@gmail.com)

نقش زیر مجموعه های مونوسیت های خون محیطی در پیشرفت ضایعه آترواسکلروز عروق کرونر

حمیده رحیمی^۱
سید محمد مهدی پیغمبری^۲
سعید تقی لو^{۳،۴}
حسین عسگریان عمران^{۵،۶}
رضا علیزاده نوایی^۷
علی حیدری^۸
فاطمه گابله^۹
ابوالقاسم عجمی^{۱۰،۱۱}

چکیده

سابقه و هدف: مونوسیت های خون محیطی براساس بیان مولکول های CD14 و CD16 به زیر جمعیت های مختلف تقسیم می شوند. این مطالعه با هدف بررسی ارتباط بین دو زیر جمعیت مونوسیتی و گیرنده CCR1 با شدت بیماری عروق کرونر (CAD) انجام پذیرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه، تعداد ۸۸ بیمار مراجعه کننده به درمانگاه قلب شهید رجایی تهران طی سال ۱۳۹۴ - ۱۳۹۳ که دارای علائم آئزین صدری پایدار بودند، به صورت نمونه گیری در دسترس انتخاب شدند. بیماران به چهار گروه نرمال (بدون گرفتگی عروق کرونری)، گروه مینیمال، گروه IVD و گروه 2+3 VD تقسیم شدند. سیستم جنسینی اسکور برای ارزیابی شدت CAD استفاده شد و در نمونه های خون با آنتی بادی های مونوکلونال علیه CCR1، CD16 و CD14 رنگ آمیزی، و با فلوسیتومتری آنالیز شدند. همچنین MFI برای مارکر CCR1 در گروه ها، مورد مقایسه قرار گرفت.

یافته ها: مونوسیت های غیر کلاسیک با افزایش گرفتگی رگ افزایش یافت به طوری که در بیماران 2+3 VD درصد بیش تری مونوسیت غیر کلاسیک نسبت به بیماران نرمال، مینیمال و IVD وجود داشت، اما این افزایش معنی دار نبوده است ($p > 0.05$). نتایج نشان داد که مولکول CCR1 در سطح هر دو جمعیت مونوسیت های کلاسیک و غیر کلاسیک بروز می یابد، ولی جمعیت بیش تری از سلول های کلاسیک این مولکول را بیان می کنند. بررسی MFI مارکر CCR1 در بین گروه های مختلف اختلاف معنی داری را نشان نداد.

استنتاج: این مطالعه نشان داد که مونوسیت های غیر کلاسیک با افزایش گرفتگی رگ افزایش می یابند.

واژه های کلیدی: مونوسیت، CCR1، آئزین صدری پایدار

مقدمه

یکی از علل مرگ و میر در اکثر کشورها، آترواسکلروز می باشد که یک نوع بیماری سرخرگ های بزرگ و متوسط است. واژه آترواسکلروز، برای ضخیم شدن و سفت شدن دیواره عروق به کار گرفته می شود (۱، ۲). این

مؤلف مسئول: ابوالقاسم عجمی - ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی E-mail: ajami36@gmail.com

۱. کارشناسی ارشد ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. دانشیار، گروه قلب، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳. دانشجوی دکتری تخصصی ایمونولوژی، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. دانشیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۶. مرکز تحقیقات ایمونونژنیک، دانشکده علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۷. مرکز تحقیقات دستگاه گوارش، دانشکده علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۸. کارشناسی ارشد ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۹. کارشناسی ارشد ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران
۱۰. استاد، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۱۱. مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی مولکولی، دانشکده علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۶/۱۲/۸ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۷/۹

بیماری از دوران کودکی شروع شده ولی تظاهرات بالینی آن در اواخر زندگی ظاهر می شود. عوامل مختلف ژنتیکی و محیطی در ایجاد و پیشرفت این بیماری دخالت دارند که در بین این عوامل غلظت بالای کلسترول یک فاکتور مهم محسوب می شود (۳،۲). آترواسکلروز پدید آمده است پیچیده، که شامل تجمع چربی ها در فرم کلسترول آزاد و کلسترول استریفیه و سلول های مختلف سیستم ایمنی خصوصا ماکروفاژهای کف آلوده (ماکروفاژهای حاوی لیپو پروتئین اکسید شده با دانسیته پایین) در دیواره رگ ها می باشد (۴).

التهاب منجر به ایجاد آترواسکلروز، به طور شدیدی با فعالیت های مونوسیتی در ارتباط بوده و فرایندهای اساسی ایجاد آترواسکلروز به طور عمده با تجمع و فعالیت مونوسیت ها و ماکروفاژهای مشتق از مونوسیت ها در دیواره عروق مرتبط است (۵). از طرف دیگر، یکی از عوامل اساسی ایجاد آترواسکلروز فعالیت سلول های اندوتلیال است که به وسیله فشارخون، قند خون بالا و سیگار کشیدن شروع گردیده و تحت تاثیر سایتوکاین های پیش التهابی تولید شده از ماکروفاژها، LDL اکسید شده و انژیوتانسین ۲ به پیش می رود. فعل و انفعالات بین سایتوکاین های پیش التهابی، کموکاین های CXCL1، CXCL12، CXCL14، RANTES و گیرنده های آن ها و همچنین بیان مولکول های چسبنده در بروز التهاب و ایجاد آترواسکلروز نقش دارد (۹-۶). مونوسیت ها با حضور در محل التهاب و بعد از عبور از سد اندوتلیال به ماکروفاژ تبدیل می شوند. ماکروفاژها پاسخ التهابی مزمن را به وسیله ترشح تعدادی واسطه های التهابی شامل رادیکال های آزاد اکسیژن، سایتوکاین های پیش التهابی TNF- α و IL12p70 و کموکاین های RANTES، MCP) (MCP) تداوم می دهند و این تداوم به این دلیل صورت می گیرد که این مواد برای مونوسیت ها و سلول های T کموتاکتیک می باشند (۱۰،۱۱). ماکروفاژها به تدریج به وسیله اسکاونجر رسپتورها، کلسترول های تجمع یافته را فاگوسیتوز کرده، در اینتیمایا به فوم سل (Foam cell)

تبدیل می شوند و در ادامه حضور سایر سلول های ایمنی از قبیل نوتروفیل ها، سلول های T و فعالیت آن ها منجر به تولید پلاک های فیبروزه پیشرفته می شود (۱۴-۱۲). این پلاک ها به پلاک های پایدار تغییر پیدا می کند و سپس پارگی پلاک و ترومبوز کامل یا جزئی در رگ های قلبی، باعث سندرم کرونری حاد ACS (Acute coronary syndrome) می شود. مونوسیت ها/ ماکروفاژها در ناپایداری پلاک ها، با ترشح آنزیم های لیتیک از قبیل ماتریکس متالوپروتینازها (MMPs) نیز دخالت دارند. به علاوه مونوسیت ها می توانند آبشار انعقادی و انتشار ترومبوز را شروع کنند (۱۷-۱۵).

مونوسیت های خون محیطی براساس میزان بیان مولکول های CD14 و CD16 به زیر گروه های مختلف تقسیم بندی می شوند، ولی شایعترین فرم تقسیم بندی آن ها به دو فرم کلاسیک (CD14⁺ CD16⁻) و غیر کلاسیک (CD14⁺ CD16⁺) می باشد (۱۸). در خصوص این که کدام جمعیت مونوسیتی ممکن است در شروع روند التهاب منجر به آترواسکلروز دخالت داشته باشد، چند مطالعه انجام پذیرفت (۱۴،۱۸،۱۹). در خصوص دخالت این زیر گروه ها در روند شروع التهاب و ایجاد آترواسکلروز اختلاف نظر وجود دارد. نقش مهم کموکاین ها و گیرنده آن ها در سطح مونوسیت ها در روند ایجاد التهاب منجر به آترواسکلروز نیز در مطالعات حیوانی (سلول های موشی) مورد بررسی قرار گرفته است و یکی از این گیرنده های مورد توجه CCR1 بوده است (۲۲-۲۰).

این مطالعه با هدف بررسی نقش احتمالی مونوسیت های کلاسیک و غیر کلاسیک و مولکول CCR1 در بیماران دارای آنژین صدری و ارتباط آن با شدت گرفتگی عروق کرونری انجام پذیرفت. در این مطالعه به بررسی دو زیر جمعیت اصلی مونوسیت ها در خون محیطی افرادی که شدت بیماری آترواسکلروز در آن ها متفاوت می باشد و همچنین به بررسی گیرنده CCR1 در سطح این مونوسیت ها در پی یافتن نقش

احتمالی این زیر جمعیت ها و مولکول CCR1 در ایجاد پلاک های آترواسکلروز، پرداخته شد.

مواد و روش ها

در این مطالعه موردی-شاهدی، بیماران مراجعه کننده به درمانگاه بیمارستان قلب شهید رجایی تهران، طی اسفند ۱۳۹۴ تا خرداد ۱۳۹۵، که دارای درد قفسه سینه (Stable angina pectoris) بودند، و بنا به نظر پزشک متخصص برای تشخیص بیماری خود نیاز به آنژیوگرافی داشتند در صورت امضا فرم مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران و نداشتن معیارهای خروج از مطالعه، وارد مطالعه شدند. معیارهای خروج از مطالعه شامل، ابتلا به سندرم کرونری حاد (ACS) در ۱۲ هفته اخیر، بیماران تحت درمان دیالیز، دارای سابقه مصرف بیش از یک ماه از داروهای دارای خاصیت ضد التهابی از قبیل آتورواستاتین و پلاویکس، بیماران تحت درمان با داروهای سرکوب کننده ایمنی و رادیو تراپی، بیماران مبتلا به بیماری های اتو ایمنی و بیماری های التهابی سیستمیک دیگر و بیماران مبتلا به سرطان، بوده است. بیماران جهت انجام آنژیوگرافی یک روز قبل در بخش داخلی بستری می شدند و از بیماران واجد شرایط قبل از انجام آنژیوگرافی ۵ سی سی خون هپارینه جهت انجام CBC و فلوسایتومتری و ۵ سی سی خون بدون ماده ضد انعقاد جهت انجام آزمایش های روتین (قند، کلسترول و ...) گرفته شد.

ریسک فاکتورهای بیماران از قبیل، فشار خون بالا (بیش تر از ۱۴۰/۹۰ mm/Hg)، سابقه مصرف داروهای پایین آورنده فشار خون، ابتلا به دیابت (قند خون ناشتای بیش از ۱۲۰)، سابقه مصرف داروهای پایین آورنده قند خون، دیس لیپیدمی شامل کلسترول بالای ۲۲۰ mg/dl، سابقه مصرف داروهای پایین آورنده کلسترول و سیگار کشیدن ارزیابی شده و در پرسش نامه ثبت گردید. بعد از انجام آنژیوگرافی با توجه به نتیجه، بیمار در یکی از گروه های مینیمال، Single Vessel disease (1VD)،

3+2 vessel disease (2+3 VD) و شاهد، مورد بررسی قرار گرفت. بیمارانی که گرفتگی پنجاه درصدی فقط در یک رگ داشتند، در گروه مینیمال (minimal CAD)، بیمارانی که گرفتگی کامل در یک رگ داشتند، در گروه 1VD، بیمارانی که گرفتگی در ۲ یا ۳ رگ داشتند، در گروه 2+3 VD و بیمارانی که با وجود علائم آئزین صدی ولی عروق کرونر آن ها گرفتگی نداشتند در گروه شاهد قرار گرفتند.

آنالیز فلوسیتومتری

جهت بررسی زیر جمعیت های مونوسیتی در بیماران مورد مطالعه، خون محیطی جدا شده پس از رنگ آمیزی با آنتی بادی های متصل به مواد فلورسانس با تکنیک فلوسیتومتری مورد آنالیز قرار گرفت. در این مطالعه از آنتی بادی های مونوکلونال ضد CD مارکرهای انسانی و گیرنده کموکائینی کوئزوگه با مواد فلورسانس استفاده گردید. آنتی بادی های مورد استفاده شامل، Anti CD16-PE، Anti CD14-FITC و Anti CCR1- Alexa Fluore 647 (BD, USA) بودند. به طور کلی بعد از جداسازی خون محیطی، ۵ میکرولیتر از آنتی بادی اختصاصی مربوطه در لوله های مخصوص فلوسیتومتری قرار داده شد و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه گردید. در مرحله بعد، در لوله ها با اضافه کردن محلول لیز به میزان ۱۰۰ میکرولیتر گلبول های قرمز لیز شد که در این مرحله لوله ها را به مدت ۱۰ دقیقه در محیط تاریک انکوبه گردید. در نهایت، با افزودن محلول فیکساتور به میزان ۱ میلی لیتر و انکوبه آن ها به مدت ۲۰ دقیقه، فرآیند رنگ آمیزی فلوسیتومتری به اتمام رسید. پس از اتمام انکوباسیون ها، خوانش با دستگاه فلوسیتومتر شرکت Partec PAS انجام شد. به منظور حذف اتصالات غیر اختصاصی و تعیین محدوده منفی و مثبت بیان CD مارکرها، برای تمامی نمونه های مورد مطالعه به طور مجزا نمونه های به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد که در آن خون محیطی بیمار با

آنتی‌بادی‌های ایزوتیپ کنترل IgG1-kappa-FITC و IgG1-kappa-Alexa Fluore 647 و IgG1-kappa-PE (BD, USA) رنگ آمیزی شدند. آنالیز اطلاعات با استفاده از نرم افزار FlowMax انجام گرفت. جمعیت‌های CD14⁺ CD16⁻ به عنوان مونوسیت‌های کلاسیک و جمعیت‌های CD14⁺ CD16⁺ به عنوان مونوسیت‌های غیر کلاسیک در نظر گرفته شد.

سیستم جنسینی اسکور (Gensini score)

سیستم جنسینی اسکور برای ارزیابی شدت بیماری تنگی عروق کرونر قلب (CAD) استفاده شد. جنسینی اسکور برای هر بیمار از روی آنژیوگرام عروق کرونر بر حسب تعداد رگ مبتلا به تنگی، شدت تنگی و محل تنگی محاسبه شد.

آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS 20 صورت گرفت. آزمون‌های پارامتری برای متغیرهایی که دارای توزیع نرمال بودند استفاده شد و همچنین در صورت عدم برقراری پیش فرض نرمالیتی آزمون‌های ناپارامتری استفاده شد. آزمون پارامتری T test و ناپارامتری Mann-Whitney U برای مقایسه تعداد سلول‌ها در دو گروه مستقل از هم مورد استفاده قرار گرفت. همچنین تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) و معادل ناپارامتری آن کروسکال والیس برای مقایسه میانگین‌های چند گروه مستقل از هم استفاده گردید. مقایسه‌های چندگانه Tukey برای شناسایی جفت میانگین‌های معنی دار در چهار گروه نرمال، مینیمال، 1VD و 2+3VD استفاده شد. برای مقایسه فاکتورهای کیفی و ارتباط آن با چهار گروه بیماری آزمون‌های Chi-square و Fisher exact test استفاده شد.

یافته ها

در این مطالعه ۸۸ بیمار مشکوک به CAD که ۶۲ نفر (۷۰/۵ درصد) مرد و ۲۶ نفر (۲۹/۵ درصد) زن بودند، براساس تشخیص پزشک متخصص و نتایج آنژیوگرافی

در چهار گروه نرمال ۳۲ نفر (۳۶/۳ درصد)، مینیمال ۱۴ نفر (۱۵/۹ درصد)، گروه 1VD ۱۷ نفر (۱۹/۳ درصد)، گروه 2+3VD ۲۵ نفر (۲۸/۴ درصد) قرار گرفتند. اطلاعات کامل دموگرافیک بیماران و متغیرهای بررسی شده در آن‌ها به تفکیک گروه‌های بیماری در جدول شماره ۱ ذکر شده است. همچنین متغیرهای کلینیکی و آزمایشگاهی بیماران براساس ریسک فاکتورهای هایپر تانسین، دیابت ملیتوس، دیس لیپیدمیا و مصرف سیگار بررسی شد و به تفکیک گروه‌های مورد بررسی بیماران در جدول شماره ۲ ذکر گردید.

جدول شماره ۱: اطلاعات دموگرافیک بیماران مبتلا به آنژین صدری پایدار با نتیجه آنژیوگرافی

سطح معنی داری	2+3VD (درصد)	1VD (درصد)	Minimal (درصد)	Normal (درصد)	
	۲۴ (۹۶)	۱۲ (۷۰/۶)	۸ (۵۷/۱)	۱۸ (۵۶/۳)	مرد
	۱ (۴)	۵ (۲۹/۴)	۶ (۴۲/۹)	۱۴ (۴۳/۸)	زن
	۶۲/۳۶ ± ۱۱/۷۶	۵۹/۰۶ ± ۸/۴۰	۵۸/۵۰ ± ۱۰/۵۶	۵۱/۷ ± ۹/۷۱	میانگین سنی (حرف معیار ± س.س)
۰/۸۸۲	۹ (۳۶/۰)	۷ (۴۱/۲)	۶ (۴۶/۳)	۱۱ (۳۴/۴)	سابقه قانلی
۰/۶۹	۳ (۱۲)	۱ (۵/۹)	۲ (۱۴/۳)	۴ (۱۳/۵)	مصرف سیگار

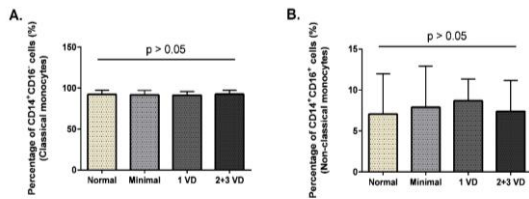
گروه Normal: بیمارانی که با وجود علامت آنژین صدری ولی عروق کرونر آن‌ها گرفتگی نداشت.
گروه Minimal: بیماران گرفتگی پنجاه درصدی فقط در یک رگ داشتند،
گروه 1VD: بیمارانی که گرفتگی کامل در یک رگ داشتند،
گروه 2+3VD: بیمارانی که گرفتگی در ۲ یا ۳ رگ داشتند،
منظور از سابقه قانلی وجود بیماری‌های کرونری قلب در فامیل درجه اول در همه بیماران وارد شده در مطالعه می باشد.

جدول شماره ۲: اطلاعات آزمایشگاهی بیماران در چهار گروه مورد بررسی نرمال، مینیمال، 1VD و 2+3VD

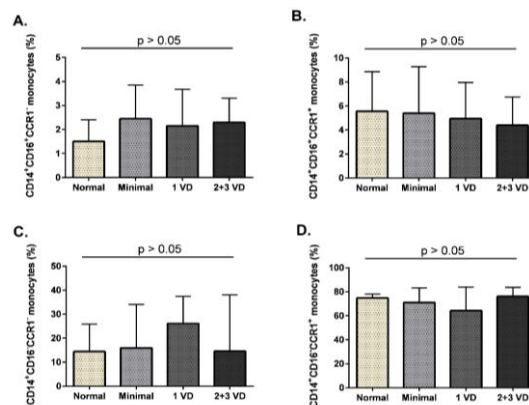
ویژگی های بیمار	Normal (درصد)	Minimal (درصد)	1VD (درصد)	2+3VD (درصد)	سطح معنی داری
هایپرتانسین	۱۳ (۴۰/۶)	۱۲ (۸۶/۷)	۱۲ (۷۰/۶)	۲۰ (۸۰/۰)	۰/۰۰۳
دیابت ملیتوس	۹ (۲۸/۱)	۴ (۲۸/۶)	۸ (۵۶)	۱۴ (۵۶/۰)	۰/۱۲۹
دیس لیپیدمیا	۱۲ (۳۷/۵)	۵ (۳۵/۷)	۷ (۴۲)	۲۳ (۹۲)	۰/۰۰۰
مصرف سیگار	۴ (۱۲/۵)	۲ (۱۴/۳)	۱ (۵/۹)	۳ (۱۲/۰)	۰/۸۷۹

گروه Normal: بیمارانی که با وجود علامت آنژین صدری ولی عروق کرونر آن‌ها گرفتگی نداشت،
گروه Minimal: بیماران گرفتگی پنجاه درصدی فقط در یک رگ داشتند،
گروه 1VD: بیمارانی که گرفتگی کامل در یک رگ داشتند،
گروه 2+3VD: بیمارانی که گرفتگی در ۲ یا ۳ رگ داشتند.

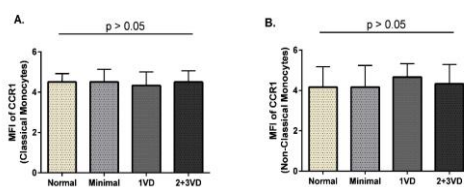
درصد فراوانی مونوسیت‌های کلاسیک و غیر کلاسیک براساس تفکیک بیماران در گروه‌های



تصویر شماره ۱: فراوانی مونوسیت های کلاسیک و غیر کلاسیک در چهار گروه مورد بررسی (گروه کنترل، مینیمال، 1VD و 2+3VD)، گروه Normal: بیمارانی که با وجود علائم آنژین صدری ولی عروق کرونر آن ها گرفتگی نداشت، گروه Minimal: بیمارانی که گرفتگی در یک رگ داشتند، گروه 1VD: بیمارانی که گرفتگی کامل در یک رگ داشتند، گروه 2+3VD: بیمارانی که گرفتگی در ۲ یا ۳ رگ داشتند.



تصویر شماره ۲: فراوانی مونوسیت های کلاسیک و غیر کلاسیک براساس بیان مولکول CCR1 در چهار گروه مورد بررسی (گروه کنترل، مینیمال، 1VD و 2+3VD)، گروه Normal: بیمارانی که با وجود علائم آنژین صدری ولی عروق کرونر آن ها گرفتگی نداشت، گروه Minimal: بیمارانی که گرفتگی پنجاه درصدی فقط در یک رگ داشتند، گروه 1VD: بیمارانی که گرفتگی کامل در یک رگ داشتند، گروه 2+3VD: بیمارانی که گرفتگی در ۲ یا ۳ رگ داشتند.



تصویر شماره ۳: میزان MFI مولکول CCR1 در چهار گروه مورد بررسی (گروه کنترل، مینیمال، 1VD و 2+3VD)، گروه Normal: بیمارانی که با وجود علائم آنژین صدری ولی عروق کرونر آن ها گرفتگی نداشت، گروه Minimal: بیمارانی که گرفتگی پنجاه درصدی فقط در یک رگ داشتند، گروه 1VD: بیمارانی که گرفتگی کامل در یک رگ داشتند، گروه 2+3VD: بیمارانی که گرفتگی در ۲ یا ۳ رگ داشتند.

نرمال، مینیمال، 1VD و 2+3VD مقایسه شد. براساس این نتایج، مونوسیت های غیر کلاسیک با افزایش گرفتگی رگ افزایش می یابند به طوری که در بیماران 2+3VD درصد بیش تری مونوسیت غیر کلاسیک نسبت به بیماران نرمال، مینیمال و 1VD وجود دارد، اما این افزایش معنی دار نیست (تصویر شماره ۱).

میزان فراوانی مولکول CCR1 در مونوسیت های کلاسیک و غیر کلاسیک در تصویر شماره ۲ نشان داده شده است. فراوانی مولکول CCR1 روی مونوسیت کلاسیک و غیر کلاسیک، تغییرات محسوس و معنی داری را از نظر آماری نشان نداد. طبق این نتایج مولکول CCR1 در سطح هر دو جمعیت مونوسیت کلاسیک و غیر کلاسیک بروز می یابند، اما غالب جمعیت سلول های کلاسیک CD14⁺، CD16⁻ این مولکول را بیان می کنند. مونوسیت های غیر کلاسیکی که مولکول CCR1 را بیان می کنند، با افزایش پیشروی در گرفتگی رگ در مقایسه با گروه نرمال، کاهش غیر معناداری را نشان داد و همچنین مونوسیت های کلاسیک که CCR1 را بیان نمی کنند، در بیماران 2+3VD نسبت به سایر گروه های مورد بررسی افزایش یافتند.

در بررسی شدت MFI بیان مولکول CCR1 در گروه های مورد بررسی بیماران شامل نرمال، مینیمال، 1VD و 2+3VD نشان داده شد که شدت MFI مارکر CCR1 در گروه های مورد بررسی معنا دار نبوده است (تصویر شماره ۳). هم چنین در ارتباط با جنسینی اسکور، در این بررسی بیماران با Non CAD با جنسینی اسکور پایین تر و بیماران با 1VD و 2+3VD با جنسینی اسکور بالاتر ارزیابی شدند. بر این اساس نتایج همبستگی میان اسکور جنسینی با فراوانی مونوسیت های کلاسیک و غیر کلاسیک در سه گروه مورد بررسی مینیمال، 1VD و 2+3VD در جدول شماره ۳ بیان شده است.

جدول شماره ۳: همبستگی میان اسکور جنسینی (Genssini score) با فراوانی مونوسیت های کلاسیک و غیر کلاسیک در سه گروه مورد بررسی مینمال، 1VD و 2+3VD

گروه			
Genssini score	مینمال (درصد)	1VD (درصد)	2+3VD (درصد)
با مونوسیت کلاسیک (CD14 ⁺ /CD16 ⁻)	r: ۰/۱۴۶	r: ۰/۰۸۲	r: -۰/۰۱۹
	p: ۰/۰۵	p: ۰/۰۷	p: ۰/۰۹
با مونوسیت غیر کلاسیک (CD14 ⁺ /CD16 ⁺)	r: -۰/۱۵۶	r: -۰/۰۶۳	r: -۰/۰۲۵
	p: ۰/۰۵	p: ۰/۰۸	p: ۰/۰۹

بحث

هدف مطالعه حاضر بررسی نقش احتمالی مونوسیت های کلاسیک و غیر کلاسیک و مولکول CCR1 در بیماران دارای آترواسکلروز عروق کرونری و ارتباط آن با شدت گرفتگی عروق کرونری بوده است. در این مطالعه ۸۸ بیمار که ۶۲ نفر (۷۰/۵ درصد) مرد و ۲۶ نفر (۲۹/۵ درصد) زن بودند، تحت آنژیوگرافی قرار گرفته و براساس تشخیص پزشک متخصص و نتایج آنژیوگرافی در چهار گروه شامل، مینمال ۱۴ نفر (۱۵/۹)، 1VD ۱۷ نفر (۱۹/۳)، 2+3VD ۲۵ نفر (۲۸/۴) و گروه نرمال ۳۲ نفر (۳۶/۳) قرار گرفتند. طبق نتایج مطالعه حاضر مونوسیت های غیر کلاسیک با افزایش گرفتگی رگ افزایش می یابند به طوری که در بیماران 2+3VD درصد بیشتری مونوسیت غیر کلاسیک نسبت به بیماران نرمال، مینمال و 1VD وجود دارد، با این حال این اختلاف از نظر آماری معنی دار نبود.

در مطالعات قبلی، بررسی نقش احتمالی زیر جمعیت های مونوسیتی از قبیل CD14⁺CD16⁻ و CD14⁺CD16⁺ در بیماری شریانی کرونری (CAD) مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۹،۱۸،۲۳). در مطالعه Yamamoto و همکاران نشان داده شد که مونوسیت های CD14⁺CD16⁺ در شریانی کرونری حائز اهمیت می باشد، و همچنین در مطالعه ی خود به ارتباط آن با بیماران دیابتی پرداختند (۲۳).

Ozaki و همکاران در مطالعه خود نشان دادند که فراوانی مونوسیت های CD14⁺CD16⁺ در گردش، در بیماران Multiple vascular disease نسبت به Single vascular disease بیش تر بوده است، و همچنین

افزایش ترجیحی در مونوسیت های غیر کلاسیک CD14⁺CD16⁺ با شدت CAD در بیماران Stable Angina Pectoris مرتبط بود (۱۸).

در مطالعه دیگر، Rogacev و همکاران در بررسی زیر جمعیت های اختصاصی مونوسیت و ارتباط آن با وقایع کاردیووسکولار نشان دادند، مونوسیت های CD14⁺⁺CD16⁺ نقش غالبی در اتفاقات کاردیووسکولار در بیماران دارند. این خاصیت زمانی که مونوسیت های اینترمدیت در اتصال پلاک های جدید در رگ ها باشند، بیش تر می شود و در نتیجه این مونوسیت ها، به عنوان یک جزء مهم در پیشرفت مراحل آترواسکلروز محسوب می شوند (۱۹). به نظر می رسد در مطالعه حاضر حجم نمونه کم بیماران نتایج را تحت تاثیر قرار داده است، با این حال نتایج مطالعه ی حاضر تا حدودی هم راستا با نتایج مطالعات قبلی است. مطالعات اخیر نشان داده اند که تعداد مونوسیت های غیر کلاسیک با سطوح کلسترول توتال پلاسما، LDL و تری گلیسرید رابطه مثبت و با HDL رابطه منفی دارد (۲۴،۱۹). همچنین مشخص شده است که تعداد مونوسیت های غیر کلاسیک در بیماران با کلسترول بالا افزایش می یابد (۲۶،۲۵). از دیگر اهداف این مطالعه بررسی مولکول CCR1 در بیماران بود. این مولکول در سطح هر دو جمعیت مونوسیت کلاسیک و غیر کلاسیک بروز می یابد، اما جمعیت غالب از سلول های کلاسیک CD14⁺CD16⁻ این مولکول را بیان می کنند. در این مطالعه تغییر معنی داری در بیان این مارکر بین گروه بیمار و شاهد دیده نشد. با این حال در برخی مطالعات اثر این مولکول در مهاجرت و تجمع مونوسیت ها تایید شده است. Drechsler و همکاران طی مطالعه ای نشان دادند که تجمع مونوسیت های کلاسیک در شریان ها با گیرنده های کمو کاینی CCR1 و CCR5 مرتبط هستند. در این مطالعه تعداد مونوسیت های کلاسیک در سلول های آنورث موش های CCR1^{-/-}، CX3CR1^{-/-}، CCR5^{-/-}، CCR2^{-/-}، ApoE^{-/-}، CCR1^{-/-} به وسیله فلوسایتومتری اندازه گیری شد، و نشان داده شد در مقایسه با گروه کنترل تعداد

دیگر دلایل تفاوت در نتایج به تعداد کم مونسیت‌های مورد بررسی در انجام فلوسایتومتری می‌باشد. طبق نتایج این مطالعه مونسیت‌های غیر کلاسیک با افزایش گرفتگی رگ افزایش می‌یابد به طوری که در بیماران 2+3VD درصد بیش تری مونسیت غیر کلاسیک نسبت به بیماران نرمال، مینیمال و 1VD وجود دارد، این افزایش معنی دار نیست. CCR1 با بروز آترواسکلروز ارتباطی نداشته و این مولکول در سطح مونسیت‌های غیر کلاسیک کاهش نشان می‌دهد.

سپاسگزاری

از بیماران و خانواده‌های آن‌ها برای حمایت، همکاری و صبر، و از کارکنان بخش‌های مختلف درمانی که ما را یاری کردند، نهایت تشکر و قدر دانی را داریم. لازم به ذکر است، این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام پذیرفت.

مونسیت کلاسیکال در آئورت‌های آترواسکلروتیک موش‌های فاقد CCR1، CCR2، CCR5 به طور مشخصی کاهش دارد. موش‌های CCR2^{-/-}، ApoE^{-/-} کاهش مونسیت‌های در چرخش را نشان دادند در حالی که هیچ تفاوتی در موش‌های CCR1^{-/-}، CX3CR1^{-/-}، CCR5^{-/-} مشاهده نکردند. آن‌ها به این نتیجه رسیدند که فقدان CCR1 تجمع ماکروفاژها را در مرحله اول محدود می‌کند ولی در مراحل بعدی به تجمع ماکروفاژها کمک می‌کند. با این حال در مطالعه دیگر نتایج متناقضی مشاهده شد (۲۷). همان طور که گفته شد نتایج این مطالعه در این زمینه اطلاعات دقیقی ارائه نداد. از محدودیت‌ها و نواقص مطالعه حاضر حجم کم نمونه بوده است و از دیگر دلایل تفاوت نتایج می‌توان به مرحله و شدت بیماری در نمونه‌های مورد بررسی در این مطالعه و دیگر مطالعات اشاره نمود، زیرا در هر مرحله از بیماری رفتار و عملکرد مونسیت‌ها می‌تواند تغییر کند. همچنین از

References

- Peng J, Luo F, Ruan G, Peng R, Li X. Hypertriglyceridemia and atherosclerosis. *Lipids Health Dis* 2017; 16(1): 233.
- Bakogiannis C, Sachse M, Stamatelopoulos K, Stellos K. Platelet-derived chemokines in inflammation and atherosclerosis. *Cytokine*. 2017; 4666(17): 30270-30273.
- Hamilton JA, Hasturk H, Kantarci A, Serhan CN, Van Dyke T. Atherosclerosis, Periodontal Disease, and Treatment with Resolvins. *Curr Atheroscler Rep* 2017; 19(12): 57.
- Ndrepepa G, Colleran R, Kastrati A. Gamma-glutamyl transferase and the risk of atherosclerosis and coronary heart disease. *Clin Chim Acta* 2017; 476: 130-138.
- Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol* 2011; 12(3): 204-212.
- Alvarez A, Cerdá-Nicolás M, Naim Abu Nabah Y, Mata M, Issekutz AC, Panés J, et al. Direct evidence of leukocyte adhesion in arterioles by angiotensin II. *Blood*. 2004; 104(2): 402-408.
- Eriksson EE, Werr J, Guo Y, Thoren P, Lindbom L. Direct Observations In Vivo on the Role of Endothelial Selectins and $\alpha 4$ Integrin in Cytokine-Induced Leukocyte-Endothelium Interactions in the Mouse Aorta. *Circ Res*. 2000; 86(5): 526-533.
- Alamanda V, Singh S, Lawrence NJ, Chellappan SP. Nicotine-mediated induction of E-selectin in aortic endothelial cells requires Src kinase and E2F1 transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 418(1): 56-61.
- Riou S, Mees B, Esposito B, Merval R, Vilar J, Stengel D, et al. High pressure promotes

- monocyte adhesion to the vascular wall. *Circ Res*. 2007; 100(8): 1226-1233.
10. van der Wal AC, Das PK, Tigges AJ, Becker AE. Adhesion molecules on the endothelium and mononuclear cells in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1992; 141(6): 1427-1433.
 11. Gui T, Shimokado A, Sun Y, Akasaka T, Muragaki Y. Diverse roles of macrophages in atherosclerosis: from inflammatory biology to biomarker discovery. *Mediators Inflamm* 2012; 2012(3): 693083.
 12. Kuchibhotla S, Vanegas D, Kennedy DJ, Guy E, Nimako G, Morton RE, et al. Absence of CD36 protects against atherosclerosis in ApoE knock-out mice with no additional protection provided by absence of scavenger receptor AI/II. *Cardiovasc Res* 2007; 78(1): 185-196.
 13. Kunjathoor VV, Febbraio M, Podrez EA, Moore KJ, Andersson L, Koehn S, et al. Scavenger receptors class AI/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *J Biol Chem* 2002; 277(51): 49982-49988.
 14. Sakaguchi H, Takeya M, Suzuki H, Hakamata H, Kodama T, Horiuchi S, et al. Role of macrophage scavenger receptors in diet-induced atherosclerosis in mice. *Lab Invest* 1998; 78(4): 423-44.
 15. Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46(6): 937-954.
 16. Gough PJ, Gomez IG, Wille PT, Raines EW. Macrophage expression of active MMP-9 induces acute plaque disruption in apoE-deficient mice. *J Clin Invest* 2006; 116(1): 59- 69.
 17. Newby AC. Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28(12): 2108-2114.
 18. Ozaki Y, Imanishi T, Taruya A, Aoki H, Masuno T, Shiono Y, et al. Circulating CD14+ CD16+ monocyte subsets as biomarkers of the severity of coronary artery disease in patients with stable angina pectoris. *Circ J* 2012; 76(10): 2412-2418.
 19. Rogacev KS, Cremers B, Zawada AM, Seiler S, Binder N, Ege P, et al. CD14++ CD16+ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography. *J Am Cardiol* 2012; 60(16): 1512-1520.
 20. Woollard KJ, Geissmann F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol* 2010; 7(2): 77-86.
 21. Soehnlein O, Drechsler M, Döring Y, Lievens D, Hartwig H, Kemmerich K, et al. Distinct functions of chemokine receptor axes in the atherogenic mobilization and recruitment of classical monocytes. *EMBO Mol Med* 2013; 5(3):471-481.
 22. Hristov M, Weber C. Differential role of monocyte subsets in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2011;105(05): 757-762.
 23. Yamamoto H, Yoshida N, Shinke T, Otake H, Kuroda M, Sakaguchi K, et al. Impact of CD14(++)CD16(+) monocytes on coronary plaque vulnerability assessed by optical coherence tomography in coronary artery disease patients. *Atherosclerosis* 2018; 269: 245-251.
 24. Rogacev KS, Zawada AM, Emrich I, Seiler S, Böhm M, Fliser D, et al. Lower apo AI and lower HDL-C levels are associated with higher intermediate CD14++ CD16+ monocyte counts that predict cardiovascular events in

- CKD. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2014; 34(9): 2120-2127.
25. Gouni-Berthold I, Sachinidis A. Possible non-classic intracellular and molecular mechanisms of LDL cholesterol action contributing to the development and progression of atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol* 2004; 2(4): 363-3670.
26. Gautier EL, Jakubzick C, Randolph GJ. Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29(10): 1412-1418.
27. Drechsler M, Soehnlein O, Döring Y, Hartwig H, Ortega-Gomez A, Garlachs C, et al. Distinct function of chemokine receptor axes in the atherogenic mobilization and recruitment of classical monocytes. *Europ J Clin Invest* 2013; 43(11): 1203-1223.