

## نقش فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF – alpha) در انفارکتوس حاد قلبی

منوچهر بهنیا<sup>۱</sup>، بهاره حاجی براتعلی<sup>۱</sup>، مهدی هدایتی<sup>۲</sup>، ناصر ولایی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> گروه قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

<sup>۲</sup> پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متلبولیسزم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

<sup>۳</sup> عضو هیأت علمی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

### چکیده

**سابقه و هدف:** با توجه به شیوع و روند رو به افزایش انفارکتوس میوکارد (MI) و اهمیت اطلاع از مارکرهای التهابی، وجود کاستی‌ها در تحقیقات قبلی و آرای متفاوت در مورد نقش TNF- $\alpha$  بابرور انفارکتوس میوکارد این تحقیق در بیمارستان طالقانی طی سال‌های ۹۰-۱۳۸۹ انجام گرفت.

**روش بررسی:** مطالعه به روش مورد-شاهدی انجام گرفت. بیمارانی که با تشخیص قطعی انفارکتوس حاد قلبی بستری بودند به عنوان گروه مورد تلقی و هم‌زمان در همان بیمارستان افراد سالمی که برای آزمایش‌های معمول به آزمایشگاه بیمارستان طالقانی مراجعه کرده و مشابه گروه مورد بودند، به عنوان شاهد انتخاب گردیدند و فاکتور TNF- $\alpha$  با روش ELISA/اندازه‌گیری و مقادیر آن در دو گروه با T-test ارزیابی شد. افراد دو گروه بر اساس مقادیر کمتر یا بیش‌تر از ۹/۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر به دو گروه تقسیم شدند و با آزمون فیشر مورد قضاوت آماری قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** تحقیق روی تعداد ۲۰ نفر مورد و ۲۰ نفر شاهد واجد شرایط انجام گرفت. میزان شاخص مورد نظر در گروه شاهد برابر  $9/5 \pm 0/7$  پیکوگرم در میلی‌لیتر و در گروه مورد  $12/8 \pm 2$  پیکوگرم در میلی‌لیتر بود ( $p < 0/001$ ). در گروه شاهد ۱۲ نفر (۶۰ درصد) TNF-a بالای ۹/۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر و در گروه مورد همه بیماران (۱۰۰ درصد) TNF-a بالاتر از ۹/۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر داشتند ( $p < 0/001$ ).

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد که سطح TNF- $\alpha$  در بیماران MI بالاتر از گروه شاهد است و با توجه به اهمیت التهاب و نقش آن در بروز و توسعه آترواسکلروز تحقیق کوهورت و یا تجربی را برای نقش یا تأثیر این مارکر توصیه می‌نماییم.

واژگان کلیدی: MI, TNF-a, ELISA

### مقدمه

بیماری‌های قلبی و عروقی شایع‌ترین علت مرگ در سراسر جهان هستند که حدود ۳۰ درصد از کل موارد مرگ را شامل می‌شوند و در این میان انفارکتوس میوکارد (MI) بیش از همه توجه و

نگرانی متخصصین قلب را به خود اختصاص داده است (۱). طبق آمار رسمی وزارت بهداشت در سال ۱۳۹۰، ۳۸ درصد مرگ افراد ایرانی به علت سکته قلبی بوده است که به عنوان مهم‌ترین دلیل و اولین عامل مرگ و میر در جامعه ایرانی مطرح است و در بررسی‌های مختلفی که در سطح جهان انجام شده است، علل متفاوتی از جمله دیس لیپیدمی، دیابت، فشار خون، سیگار، سابقه فامیلی، سن، جنس و چاقی با بروز MI ارتباط دارد (۲-۴).

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، گروه قلب و عروق،

دکتر منوچهر بهنیا (e-mail: behniamanouchehr@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۵/۲۳

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۰/۱۱/۱۲

میکرولیتری الیکوت شده، در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان تشخیص در آزمایشگاه مرکز تحقیقات غدد در بیمارستان طالقانی ذخیره گردید. سنجش TNF- $\alpha$  به روش ELISA کیت کمپانی Diaclone فرانسه اندازه‌گیری گردید. اساس روش، ساندویچ شدن TNF- $\alpha$  بین دو آنتی‌بادی مونوکلونال است. هر قدر میزان آنالیت (TNF- $\alpha$ ) بالاتر باشد، ساندویچ بیشتری تشکیل شده و واکنش آنزیمی بیشتری مشاهده می‌شود. این روش اندازه‌گیری در تحقیقات قبلی نیز انجام گرفته و روایی (Validity) آن تأیید شده است (۵، ۶). میانگین شاخص TNF- $\alpha$  به عنوان حد طبیعی تلقی گردید. این میانگین با روش دلفی و با رایزنی از اساتید قلب و عروق، به عنوان نقطه برش تلقی شد. در این تحقیق بررسی گردید که آیا افراد در دو گروه مورد و شاهد مشابه هستند یا خیر و میزان این مارکر در دو گروه با آزمون T-Test مورد قضاوت آماری قرار گرفت. بیماران در گروه‌های مورد و شاهد نسبت به مواجهه با سطح مارکر التهابی TNF- $\alpha$  بالاتر از ۹/۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر (میانگین گروه افراد سالم) به وسیله آزمون دقیق فیشر مورد قضاوت آماری قرار گرفتند.

## یافته‌ها

تحقیق روی ۴۰ نفر شامل ۲۰ نفر در گروه انفارکتوس میوکارد (MI) و ۲۰ نفر در گروه شاهد انجام گرفت. توزیع افراد مورد بررسی بر حسب خصوصیات فردی و بیماری آنها و به تفکیک گروه‌های MI و شاهد در جدول ۱ ارائه شده است و نشان می‌دهد که افراد در دو گروه انفارکتوس میوکارد و گروه شاهد به لحاظ جنس، ابتلا به دیابت، مصرف سیگار، مصرف استاتین و سطح BMI، HDL و LDL مشابه بوده و یا اختلاف آنها به لحاظ آماری معنی‌دار نیست ( $p < 0/06$ )، ولی دو گروه از نظر فشار خون و سن اختلاف معنی‌داری داشتند ( $p < 0/05$ ). میزان شاخص TNF- $\alpha$  در گروه شاهد  $9/5 \pm 0/7$  پیکوگرم در میلی‌لیتر و در گروه MI برابر با  $12/8 \pm 2$  پیکوگرم در میلی‌لیتر بود که در گروه مورد به میزان  $3/3$  پیکوگرم در میلی‌لیتر و یا حدود  $34/7$  درصد بیشتر از گروه شاهد بود و آزمون T-test نشان داد که این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار است ( $p < 0/01$ ). توزیع افراد مورد بررسی بر حسب گروه‌های مورد مطالعه از نظر مقادیر TNF- $\alpha$  در جدول ۲ ارائه شده است و نشان می‌دهد تمامی بیمارانی که دچار انفارکتوس میوکارد شده‌اند (۱۰۰ درصد) دارای TNF- $\alpha$  بالای ۹/۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر بودند، در حالی که در گروه شاهد تعداد ۱۲ نفر (۶۰ درصد) افراد TNF- $\alpha$

با توجه به شیوع روزافزون آترواسکلروز در جامعه و اثرات مخرب و ناتوان کننده بیماری عروق کرونر و به خصوص انفارکتوس میوکارد مطالعات در جهت یافتن راه‌های درمانی بهتر و موثرتر در جنبه‌های مختلف در جریان است. یکی از این جنبه‌ها نقش عوامل التهابی در گسترش آترواسکلروز و بروز سندرم حاد کرونری است. فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF- $\alpha$ ) نیز یک فاکتور پیش التهابی است که در التهاب موضعی و سیستمیک نقش دارد و از اولین مراحل پیشرفت آترواسکلروز تا انسداد کامل رگ شرکت دارد. TNF- $\alpha$  با تحریک تولید ۹، ۱۱، ۱۳، ۱ MMP در اندوتلیوم و سلول عضله صاف و ماکروفاژ عامل پارگی پلاک آترواسکلوز و احتمالاً بروز سندرم حاد کرونری است (۵). در برخی مطالعات ارتباط معنی‌داری بین سطوح افزایش یافته TNF- $\alpha$  و بروز MI وجود داشته است (۵، ۶)، در حالی که در برخی مطالعات این رابطه دیده نشده است (۶). نکته مهم عدم بررسی این شاخص در جمعیت ایرانی است و با توجه به اهمیت تحقیق اتیولوژیک بیماری و روند رو به افزایش بروز آن، این مطالعه برای اولین بار در ایران به منظور تعیین نقش TNF- $\alpha$  در بروز MI در مراجعین بیمارستان طالقانی در سال‌های ۱۳۹۰-۱۳۸۹ انجام گرفت.

## مواد و روشها

تحقیق به روش مورد-شاهدی انجام گرفت. کلیه بیمارانی که با تشخیص قطعی MI بستری شدند به عنوان گروه مورد تلقی گردیدند. خصوصیات فردی بیماران شامل جنس، سن، اندکس توده بدنی (BMI) و سابقه دیابت، فشار خون و سابقه مصرف سیگار و سابقه مصرف استاتین (حداقل یک ماه مصرف مداوم) در موقع بستری ثبت گردید. هم زمان و در همان بیمارستان کلیه کسانی که برای بررسی‌های معمول شاخص‌های خونی به آزمایشات مراجعه نمودند و علائم و نشانه‌ای از بیماری قلبی نداشته و از نظر خصوصیات فردی جنس، دیابت، مصرف سیگار، میزان LDL کلسترول، LDH-کلسترول و BMI مشابه گروه مورد بودند به عنوان شاهد تلقی و فرم اطلاعاتی آنها نیز ثبت گردید. از کلیه بیماران گروه مورد و شاهد نمونه خون از ورید آنته‌کوبیتال دست چپ به میزان حداقل ۱ میلی‌لیتر گرفته شد. خون مذکور به میکروتیوب منتقل گردیده و در مدت ده دقیقه در دمای اتاق انکوبه و بعد از لخته شدن به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. حدود ۰/۵ میلی‌لیتر سرم به دست آمد که در دو میکروتیوب به صورت دوویال ۰/۲۵

جدول ۱- توزیع افراد مورد بررسی بر حسب خصوصیات فردی و بیماری به تفکیک گروه‌های مورد مطالعه

جنس	دیابت	فشار خون	مصرف سیگار	HDL-کلسترول <sup>†</sup>	LDL-کلسترول <sup>†</sup>	BMI <sup>‡</sup>	سن
مرد	زن	داشته	داشته	داشته	داشته	نداشته	نداشته
فاقد MI (n=۲۰)*	۱۰	۱۰	۰	۲۰	۰	۲۰	۲۳/۶±۲/۳
دارای MI (n=۲۰)	۱۰	۱۰	۴	۱۶	۱۴	۶	۲۴/۷±۱/۵

\* MI: انفارکتوس میوکارد؛ †: میلی‌گرم در دسی‌لیتر؛ ‡: اندکس بدنی (کیلوگرم بر مترمربع)

در مطالعه XiBao و همکارانش در سال ۲۰۱۰ که در چین انجام شد، ارتباط سطح سرمی TNF- $\alpha$ ، hsCRP و IL-18 با شدت ضایعات کرونری بر اساس Gensini Score بررسی شد. در این مطالعه، ۱۰۶ بیمار کرونری و ۱۰۰ نفر شاهد بررسی شدند. در این مطالعه نشان داده شد که سطح سرمی TNF- $\alpha$  در گروه بیماران کرونری به طور مشخصی بالاتر از گروه شاهد است و هر چه سطح TNF- $\alpha$  در گروه بیماران کرونری افزایش می‌یافت ضایعات کرونری نیز شدیدتر می‌شدند (۱۰).

از جمله مزیت‌های این مطالعه بررسی ارتباط سطح TNF- $\alpha$  و شدت ضایعه آنژیوگرافی می‌باشد. در این مطالعه کلیه بیماران کرونری وارد شده بودند و بیماران از نظر آنژیوگرافی قلبی و این که در حمله حاد کرونری بودند یا نه، بررسی نشدند.

در این مطالعه TNF- $\alpha$  به عنوان فاکتور التهابی موثر در پیشرفت آترواسکلروز به طور مزمین تأکید شده است و نقش آن به عنوان فاکتور موثر در حملات حاد کرونری مورد بحث قرار نگرفته است. در مطالعه Walesh و همکارانش که در سال ۲۰۰۹ در انگلستان انجام شد، هدف بررسی سطح IL-18 و TNF- $\alpha$  در بیماران انفارکتوس میوکارد و مقایسه آن با گروه شاهد بود. در این مطالعه، ۴۴۶ مورد انفارکتوس میوکارد و ۴۷۷ نفر شاهد که از نظر سن و جنس با گروه مورد همسان شده بودند مورد بررسی قرار گرفتند. در این مطالعه پس از انطباق سایر عوامل خطر کلاسیک، سطح TNF- $\alpha$  در بیماران MI بالاتر از گروه شاهد بود. این مطالعه ذکر می‌کند با توجه به آن که نمونه‌گیری در بیماران Post-MI بوده است، TNF- $\alpha$  به عنوان فاکتور موثر در Remodeling میوکارد نقش دارد (۵). از نقاط قوت این مطالعه حجم نمونه بالای آن است و نیز بررسی عوامل خطر کلاسیک آترواسکلروز به طور همزمان که توانسته است نقش TNF- $\alpha$  را پررنگ‌تر بیان کند. ولی از نکاتی که در مطالعه مطرح نشده است، زمان نمونه‌گیری در گروه مورد است که اهمیت وقوع حادثه حاد کرونری

بیشتر از ۹/۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر داشتند و آزمون دقیق Fisher نشان داد که این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار است (p=۰/۰۰۱۶) و در بیماران MI میزان TNF- $\alpha$  چندین برابر بیشتر از گروه شاهد بود.

جدول ۲- مقادیر TNF- $\alpha$  در افراد مورد مطالعه به تفکیک گروه‌ها

سطح TNF- $\alpha$	بدون MI (شاهد)	دارای MI (مورد)
$\leq 9/5$	۸(۴۰)*	۰
$> 9/5$	۱۲(۶۰)	۲۰(۱۰۰)
جمع	۲۰ (۱۰۰)	۲۰ (۱۰۰)

\* تعداد (درصد)

## بحث

تحقیق نشان داد که در بیماران دچار انفارکتوس میوکارد میزان TNF- $\alpha$ ، ۳۴/۷ درصد بیشتر از گروه شاهد بود و نیز کسانی که دچار انفارکتوس میوکارد شدند چندین برابر بیشتر از گروه شاهد دارای TNF- $\alpha$  بیشتر از ۹/۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر بودند. یافته مشابه مطالعه فعلی در مطالعه Goswami و همکاران در سال ۲۰۰۹ به دست آمده است. در این مطالعه که در هند انجام شده است، هدف آن بررسی مارکرهای التهابی TNF- $\alpha$  و CRP در بیماران با انفارکتوس حاد میوکارد بود که در این مطالعه ۱۰۰ بیمار انفارکتوس حاد و ۱۰۰ بیمار که از نظر سنی و جنسی با گروه مورد همسان بودند به عنوان گروه شاهد بررسی شدند (۹). از نقاط قوت این مطالعه حجم نمونه بالای آن و همسانی گروه‌های مورد و شاهد است ولی از نقاط ضعف آن عدم وجود زمان مشخص نمونه‌گیری در بیماران بعد از MI بود. این مطالعه نشان داد سطح TNF- $\alpha$  در گروه بیماران انفارکتوس حاد به طور معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد است (۸۶/۹±۴/۷) پیکوگرم در میلی‌لیتر در مقابل ۷/۱±۰/۶۷ پیکوگرم در میلی‌لیتر).

با توجه به عدم وابستگی اقتصادی مطالعه فعلی با شرکت سازنده این Kit و انجام آزمایش به صورت دو سو کور احتمال سوگیری در این مطالعه وجود ندارد.

اما اگر برسید که مهمترین جنبه با ارزش این تحقیق کدام است، به نظر می‌رسد که بررسی  $TNF-\alpha$  به صورت کیفی در این مطالعه نکته قابل توجهی است. به طوری که در کلیه مطالعات قبلی سطح  $TNF-\alpha$  به صورت کمی بررسی شده است. اگر چه محدوده طبیعی برای سطح  $TNF-\alpha$  تعریف نشده است، ولی با روش دلفی و با رایزنی از اساتید مشاور آمار و متدولوژی و آزمایشگاهی، میانگین افراد سالم را مبنا قرار دادیم.

در جمع بندی نهایی به نظر می‌رسد که  $TNF-\alpha$  به عنوان مارکر پیش التهابی چه به لحاظ کمی و چه بررسی به شیوه کیفی در بروز MI موثر است.  $TNF-\alpha$  از سلول‌های عضله صاف اندوتلیال دیواره عروق ترشح شده و عامل قوی التهاب موضعی است. این عامل سبب افزایش پرمایلیتی سلول‌های اندوتلیال و افزایش بیان adhesion molecules از طریق NF- $\kappa$ B می‌باشد که سبب افزایش تجمع ماکروفاژ در ضایعات آترواسکلروز می‌گردد و به طور مستقیم سبب تشدید آترواسکلروز می‌شود (۵، ۶).

افزایش سلول‌های التهابی در ضایعات مقصر در سندرم حاد کرونری در مقایسه با Chronic stable Angina دیده می‌شود و هر چه ضایعه شدیدتر و پیچیده‌تر باشد، سلول‌های التهابی بیشتری داریم (۵). در نتیجه  $TNF-\alpha$  یک شرایط پیش التهابی و پره‌ترومبوتیک ایجاد می‌کند.  $TNF-\alpha$  در تشکیل و پارگی پلاک نقش دارد. این عامل باعث تحریک تولید MMP ۱، ۹، ۱۱ و ۱۳ در اندوتلیوم و سلول عضله صاف و ماکروفاژ می‌گردد.

$TNF-\alpha$  به عنوان یک عامل عروقی پیش‌التهابی، عامل تولید استرس اکسیداتیو، آپوپتوز اندوتلیال و افزایش Adhesion molecules می‌باشد و با توجه به کلیه نقش پاتوفیزیولوژیکی که از آن شناخته شده است، در ایجاد پلاک آترواسکلروز و ناپایداری آن و بروز سندرم حاد کرونری و انفارکتوس میوکارد موثر است.

با توجه به این که به نظر می‌رسد  $TNF-\alpha$  در بروز انفارکتوس میوکارد نقش دارد، انجام مطالعه تشخیصی جهت بررسی این که این فاکتور تا چه حد می‌تواند در غربالگری بیماران پرخطر مفید باشد، را توصیه می‌نماییم.

### تشکر و قدردانی

از مرکز تحقیقات غدد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به واسطه همکاری و اندازه‌گیری مارکرها، از مرکز تحقیقات قلب

را نشان دهد. Patel و همکارانش در سال ۲۰۰۹ در ایرلند به بررسی سطوح فاکتورهای التهابی از جمله  $TNF-\alpha$ ، IL-8، IL-6 و IL-2 در بیماران با سندرم حاد کرونری پرداختند. در این مطالعه، ۴۸ مورد انفارکتوس میوکارد، ۱۴ بیمار Unstable Angina و ۱۲ نفر شاهد وجود داشتند و  $TNF-\alpha$  در گروه‌های مورد و شاهد تفاوتی نداشت (۴). در این مطالعه، حجم نمونه در گروه‌های مورد و شاهد مساوی نیست و از ضعف‌های مطالعه به شمار می‌رود. از طرفی بیماران در این مطالعه تحت درمان با دوز بالای استاتین قبل از نمونه‌گیری بودند که شاید توجیه‌گر نتیجه آزمون باشد. یکی دیگر از دلایل استفاده از Platform متفاوت در آزمایش بود که در مطالعات دیگر از آن استفاده نشده است. این Platform‌های جدید که در این مطالعه استفاده شده است، دقیق‌تر از Elisa‌های متداول ذکر شده است. البته از جمله ضعف‌های دیگر این مطالعه عدم همسانی گروه‌های مورد و شاهد می‌باشد. از جمله نکات دیگری که باید به آن توجه کرد، منطقه جغرافیایی و تفاوت نژادی در این مطالعه نسبت به مطالعه قبلی است که ممکن است تفاوت این مطالعه را توجیه کند.

مطالعه فعلی نیز مانند عموم مطالعات محدودیت‌هایی دارد، از جمله این که سن بیماران MI بیشتر از گروه شاهد بود و امکان مشابه‌سازی و همسان‌سازی ممکن نبود و با قبول این که سن به عنوان عامل خطر در بروز MI مطرح است (۴)، این مورد از جمله ضعف‌های این مطالعه محسوب می‌شود. از طرفی، این مطالعه در مرکز آموزشی-درمانی انجام شده است که تعداد قابل توجهی از بیماران با وضعیت اقتصادی-اجتماعی پایین می‌باشند و قطعاً نتایج بیانگر کل جامعه نخواهد بود. یکی دیگر از محدودیت‌های مطالعه این است که پایایی آزمایشگاه را برای اندازه‌گیری  $TNF-\alpha$  به دست نیاوردیم. از آنجا که Kit مورد نظر جهت آزمایش وارداتی از کشور فرانسه بوده و مبلغ قابل توجهی جهت آن صرف شده است، با توجه به محدودیت هزینه این مطالعه از بررسی پایایی تست در آزمایشگاه صرف نظر شد که البته توجیه خوبی به نظر نمی‌رسد. از طرف دیگر در این تحقیق تلاش نمودیم که جنبه‌های مناسبی از فواید را به دست آوریم. با توجه به این که Kit مورد نظر جهت بررسی سطح  $TNF-\alpha$  (Diacalone)، ساخت کشور فرانسه) قبلاً در مطالعات متعددی مورد استفاده قرار گرفته و اعتبار آن تأیید شده است، در انجام این مطالعه بر اساس تحقیق‌های گذشته از این Kit استفاده شد (۵، ۶).

و عروق دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به سبب تصویب  
 طرح و حمایت های مالی و تحقیق و در نهایت از بیماران  
 مبتلا به انفارکتوس میوکارد و گروه شاهد که اجازه انجام  
 تحقیق را دادند، سپاسگزاری می نماید.

### **REFERENCES:**

1. Goswami B, Rajapp M, Mallika V, Shokla DK, Kumar S. TNF-alpha/IL-10 ratio and C-reactive protein as markers of the inflammatory reponse in CAD-prone North Indian patients with acute myocardial infarction. Clin Chim Acta 2009; 408: 14-18.
2. Luo JG. Relationship between serum IL-8 hsCRP, TNF- $\alpha$  and coronary lesions in CHD patients. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi 2010; 26: 789-91.
3. Welsh P, Woodward M, Rumley A, Lowe G. Association of circulatory TNF-alpha and IL-18 with myocardial infarction and cardiovascular risk marker; the Glasgow myocardial infarction study. Cytokine 2009; 47: 143-47.
4. Girm HRS, Orsi NM, Homer-Vanniasinkam S. An overview of cytokine interactions in atherosclerosis and implications for peripheral arterial disease Vasc Med 2007; 12: 299-309.
5. Csiszar A, Ungvari Z. Synergistic effects of vascular IL-17 and TNFalpha may promote coronary artery disease. Med Hypotheses 2004; 63: 696-98.
6. Hashmi S, Zeng QT. Role of interleukin-17 and interleukin-17-induced cytokines interleukin-6 and interleukin-8 in unstable coronary artery disease. Coron Artery Dis 2006; 17: 699-706.