

## ارتباط میزان بیان ژن های استئوپروتگرین و رنکل با شکل گیری عروق کولترال

آرش حسین نژاد<sup>۱</sup>، حوریه ثقفی<sup>۱</sup>، خدیجه میرزایی<sup>۱</sup>، حدیث بهزادی<sup>۱</sup>، محمود شیرزاد<sup>۲</sup>، باقر لاریجانی<sup>۱\*</sup>

### چکیده

**مقدمه:** مونوسیت های موجود در گردش خون محیطی، نقش مهمی در ایجاد عروق کولترال دارند و ژن های استئوپروتگرین و رنکل نیز در رگزایی موثر هستند. بنابراین این مطالعه به منظور ارزیابی بیان ژن های استئوپروتگرین و رنکل در مونوسیت های خون افراد مبتلا به درگیری عروق کرونری در مراحل مختلف تکامل عروق کولترال طراحی شده است. **روش ها:** مطالعه حاضر بر روی ۶۰ فرد مبتلا به درگیری عروق کرونری انجام شد. شدت ابتلا به بیماری بر اساس تعداد عروق درگیر تعیین گردید. سیستم امتیازبندی TIMI برای تعیین میزان تشکیل عروق کولترال به کار گرفته شد. از مونوسیت های گردش خون محیطی برای استخراج RNA و سنتز cDNA استفاده گردید. برای ارزیابی بیان ژن های استئوپروتگرین و رنکل روش Real-time PCR به کار گرفته شد. همچنین بیان ژن  $\beta$ -کتین به عنوان کنترل داخلی اندازه گیری شد. **یافته ها:** بیان ژن استئوپروتگرین در افراد مبتلا به درگیری عروق کرونری با درجه خفیف تا شدید که عروق کولترال گسترده تر داشتند، به طور معناداری بالاتر بود ( $6/41 \pm 19/31$  در مقابل  $0/30 \pm 0/04$ ،  $P=0/04$ ). اما این اختلاف در مورد بیان رنکل در میان بیمارانی که میزان تکامل عروق کولترال شان متفاوت بود، معنادار نبود. در میان بیمارانی که عروق کولترال گسترده تر داشتند نسبت RANKL / OPG به طور معناداری پایین تر بود ( $7/40 \pm 19/32$  در مقابل  $151/13 \pm 109/66$ ،  $P=0/001$ ). **نتیجه گیری:** نتایج مطالعه حاضر پیشنهاد کننده نقش تحریکی استئوپروتگرین در تکامل عروق کرونری است. هرچند در این پدیده بیان رنکل می تواند اثر استئوپروتگرین در رشد عروق کولترال را تحت تاثیر قرار دهد.

**واژگان کلیدی:** استئوپروتگرین، رنکل، بیان ژن، عروق کولترال، بیماری عروق کرونری

۱- مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- دپارتمان جراحی قلب، مرکز قلب تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران

\* **نشانی:** تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم، تلفن: ۲۸-

۸۸۲۲۰۰۳۷، نمابر: ۸۸۲۲۰۰۵۲، پست الکترونیک: emrc@tums.ac.ir

## مقدمه

بیماری عروق کرونری، شایعترین علت بیماری و مرگ و میر در جهان است. تکامل عروق کولترال به صورت یک مسیر میانبر طبیعی در گردش خون، نقش مهمی در پیشگیری از آسیب‌های حاصل از ایسکمی ایفا می‌کند. شواهد حاصل از مطالعات بالینی در بیماران عروق کرونری که تعداد عروق درگیرشان یکسان است، تفاوت‌هایی را در میزان تکامل عروق کولترال نشان می‌دهند [۱] و دامنه این تفاوت‌ها از تشکیل کامل عروق کولترال تا فقدان کامل این عروق متغیر است. به نظر می‌رسد تفاوت در تکامل عروق کولترال به عوامل متعددی بستگی دارد.

یافته‌های حاصل از تحقیقات نشان می‌دهند که تشکیل عروق کولترال از طریق فرایند تغییر و تکامل پیش‌آرتریول‌های کوچک به عروق بزرگ است که آرتریوژنز نامیده می‌شود [۲]. سوالی که اغلب مورد بحث است نقش آرتریوژنز در تشکیل عروق کولترال است [۳]. با این حال شواهد موجود حاکی از آن است که آرتریوژنز نقش اصلی را در تکامل عروق کولترال ایفا می‌کند [۴]. در کنار سازوکارهای مختلفی که در آرتریوژنز و آرتریوژنز نقش دارند، برخی عوامل مشترک در هر دو نوع رگ‌سازی وجود دارد که فاکتورهای رشد و سلول‌های التهابی از آن جمله می‌باشند [۵]. استئوپروتگرین<sup>۱</sup> (OPG) و لیگاند آن به نام فعالگر گیرنده لیگاند kB فاکتور نوکلئار<sup>۲</sup> (RANKL)، از عوامل بالقوه تنظیمی جدیدی هستند که در عملکرد اندوتلیال نقش دارند. استئوپروتگرین گلیکوپروتئین محلول از خانواده گیرنده TNF دارد که فاقد دومین داخل‌غشایی است [۶]. رنکل از طریق جایگاه فعال خود در دومین c-ترمینال خارج سلولی به استئوپروتگرین و رنکل (که یک گیرنده میان‌غشایی نوع II از خانواده TNF- $\alpha$  است) متصل می‌شود [۷]. در ابتدا نقش مهم دو پروتئین مذکور در تنظیم متابولیسم استخوان شناخته شد [۸]. اتصال رنکل به RANK باعث تمایز سریع پیش‌ساز استئوکلاست به سلول استئوکلاست بالغ می‌شود. استئوپروتگرین باعث مهار

رنکل و در نتیجه مهار تمایز، عملکرد و بقای استئوکلاست می‌شود [۹].

بیان استئوپروتگرین و رنکل در بسیاری بافت‌ها [۷] دلالت بر وجود نقش‌های دیگر آنها علاوه بر واگردش استخوان است. یافته‌های مطالعه Malyankar و همکارانش [۱۰] نشان داد که استئوپروتگرین با کاهش آپوپتوز<sup>۳</sup> از طریق مهار NF- $\kappa$ B و کاهش فاکتورهای رشد، باعث حفاظت از سلول‌های اندوتلیال می‌شود. شواهد حاصل از گزارش آنها نشان داد که تجویز زیر جلدی استئوپروتگرین از طریق هیدروژل حاوی هیپارین می‌تواند باعث افزایش تشکیل عروق جدید شود و پیشنهاد کرد این عملکرد می‌تواند نقش بالقوه استئوپروتگرین در سلول‌های اندوتلیال باشد. نتایج تحقیقات Cross و همکارانش [۱۱] نشان داد استئوپروتگرین رشد سلول‌های اندوتلیال و تشکیل ساختارهای رشته‌ای مانند آن را در سوبسترای ماتریژل تحریک می‌کند.

نتایج بررسی‌های In vitro توسط Scatena و Giachelli، استئوپروتگرین را به عنوان مولکول آرتریوژنیک و محافظ سلول‌های اندوتلیال در برابر آپوپتوز پیشنهاد نمود [۱۲]. نتایج تحقیقی که اخیراً توسط McGonigle و همکارانش [۱۳] بر مدل موشی آنورت به صورت Ex vivo انجام شد، نشان داد که استئوپروتگرین نقش محرک در آرتریوژنز را دارد در حالی که رنکل به عنوان مهارکننده عمل می‌کند. آنها نشان دادند که فعالیت آرتریوژنیک استئوپروتگرین عمدتاً ناشی از توانایی آن در تکثیر سلول‌های اندوتلیال است و از طریق افزایش بقای آنها که سازوکار آن توسط Pritzker آن گزارش شده بود، نمی‌باشد. Pritzker گزارش کرده بود که افزایش بقای اندوتلیال ناشی از توانایی استئوپروتگرین در مهار آپوپتوز سلول به واسطه مهار TRAIL است [۱۴].

اگرچه مطالعات بسیاری به بررسی نقش استئوپروتگرین در آرتریوژنز پرداخته‌اند، اما مطالعه‌ای در مورد نقش آن در آرتریوژنز یافت نشد. هدف از این مطالعه بررسی اهمیت نقش احتمالی استئوپروتگرین و رنکل در آرتریوژنز است که با رشد عروق کولترال مرتبط می‌باشد. با توجه به نقش

1 -Osteoprotegerin

2- Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand

3 -Apoptosis

### نمونه گیری خون

پس از ۱۲ ساعت ناشتایی ۱۰ میلی لیتر خون وریدی بیماران گرفته شد و پس از تفکیک آن به ترتیب در لوله‌های شستشو داده شده با اسید و هپارینه برای ارزیابی‌های بیوشیمیایی و جداسازی سلول‌های مونونوکلئار خون محیطی<sup>۱</sup> (PBMC) مورد استفاده قرار گرفت.

### آزمایش‌های بیوشیمیایی

۶ میلی لیتر از نمونه خون بیماران سانتریفیوژ شده و برای اندازه گیری مقادیر قند خون ناشتا (FBS)، کلسترول تام (TC)، لیپوپروتئین با دانسیته بالا (HDL)، تری گلیسرید (TG) و لیپوپروتئین با دانسیته پایین (LDL)، روش آنزیماتیک به کار گرفته شد. از کیت تجاری (Parsazmoon Co, Iran, kit) و دستگاه اتوالایزر Roche/Hitachi 902 برای ارزیابی‌ها استفاده شد.

### جداسازی سلول‌های مونوسیت بیماران

PBMC با استفاده از روش استاندارد سانتریفیوژ گرایانی دانسیته ای فایکول و Lymphoprep<sup>®</sup> انجام گردید. سپس مونوسیت‌ها از لنفوسیت‌ها تفکیک شدند که در مطالعه پیشین مراحل آن توضیح داده شده است [۱۶].

### جداسازی و خالص سازی RNA

RNA کل مستقیماً با استفاده از ترکیب TRIzol<sup>®</sup> از مونوسیت‌ها جدا گردید (Invitrogen). به طور خلاصه، ۱ میلی لیتر از ماده TRIzol افزوده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید و پس از افزودن کلروفرم (۱۰۰ μl)، لوله‌ها ورتکس شده و با سرعت ۱۳۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. RNA با حجم مساوی از ایزوپروپانول رسوب داده شد و در نهایت با اتانول ۷۵٪ شستشو داده شد. به منظور حذف باقیمانده DNA، RNA استخراج شده تحت واکنش با RNase-free (Fermentase) DNase I قرار داده شد.

مهم‌مونسیت‌ها در تشکیل عروق کولترال، بیان ژن‌های استئوپروتگین و رنکل در مونسیت‌های در حال گردش خون در بیماران عروق کرونری با وضعیت‌های متفاوت تکامل شبکه عروق کولترال کرونری ارزیابی گردید.

### روش‌ها

#### جمعیت مورد بررسی

طی یک مطالعه Case series، ۶۰ بیمار عروق کرونری از میان بیمارانی که از بهمن سال ۱۳۸۶ تا خرداد سال ۱۳۸۷ برای درمان سندرم کرونری حاد به بخش مراقبت‌های کرونری بیمارستان‌های زیر نظر دانشگاه علوم پزشکی تهران مراجعه نموده بودند، شرکت داده شدند. آنژیوگرافی کرونری توسط متخصص قلب انجام گردید. تنگی لومینال بیش از ۵۰٪ حداقل در یک شریان معیار ابتلا به بیماری شریان کرونری در نظر گرفته شد. سیستم امتیازبندی TIMI به صورت زیر برای تعیین میزان گسترش عروق کولترال به کار گرفته شد [۱۵]: ۰-عدم وجود مجاری عروق کولترال قابل رویت، ۱-رگ‌های منشعب دارای عروق کولترال بدون اینکه رنگ به بخش اپی کاردیال رگ مربوطه برسد، ۲-تشکیل ناکامل عروق کولترال در بخش اپیکاردیال عروق، ۳-تشکیل کامل عروق کولترال در اپیکاردیال بالاترین امتیاز به عنوان درجه گسترش عروق کرونری بیماران در نظر گرفته شد. بیماران با درجه ۰-۱ به عنوان گروه بیماران با عروق کولترال محدود و بیماران با درجه ۲-۳ به عنوان گروه بیماران با عروق کولترال گسترده در نظر گرفته شدند.

رضایت نامه کتبی آگاهانه از افراد شرکت کننده در مطالعه گرفته شد. پروتکل مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تهران تصویب گردید.

ارزیابی‌های جسمی تمام بیماران توسط یک تکنیسین انجام گردید. وزن بدن با استفاده از ترازوی متعادل و در حالی که بیماران بدون کفش بوده و لباس کم بر تن داشتند، گرفته شد. قد نیز با استفاده از قدسنج ارزیابی شد. نمایه توده بدن از طریق تقسیم مقدار وزن بر مربع قد محاسبه گردیده، به صورت  $\text{kg/m}^2$  ثبت گردید.

1-Peripheral Blood Mononuclear cells

هر یک از نمونه‌ها به طور جداگانه و حداقل ۲ بار برای هر یک از ژن‌ها ارزیابی شد. بیان ژن ساختمانی b-اکتین به عنوان کنترل داخلی استاندارد اندازه‌گیری شد. نسبت غلظت‌های استئوپروتگرین و رنکل به غلظت b-اکتین به عنوان میزان بیان آن ژن‌ها در نظر گرفته شد.

### آنالیز آماری

تمام اطلاعات با استفاده از نسخه ۱۵ نرم افزار SPSS آنالیز گردید. مقایسه اختلاف بین میانگین متغیرها با استفاده از آزمون‌های student T-test و آنالیز واریانس (ANOVA) انجام شد. برای مقایسه مقادیر کیفی متغیرها از آزمون Chi-square استفاده شد. برای تعیین ارتباط بین امتیاز TIMI و شدت بیماری شریان کرونری و بیان استئوپروتگرین رگرسیون لجستیک به کار گرفته شد. در تمام آزمون‌ها سطح معناداری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

درجه خلوص RNA استخراج شده با استفاده از سنجش جذب در ۲۶۰ nm و ۲۶۰/۲۸۰ nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر UV تعیین گردید. برای ارزیابی یکپارچگی (Integrity) آن نیز از الکتروفورز ژل آگارز (۱٪) و quantitative real-time رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید استفاده شد.

### Quantitative PCR

بیان ژن‌های استئوپروتگرین، رنکل و b-اکتین با استفاده از روش quantitative real-time با رونویسی معکوس RT-PCR ارزیابی شد. در این روش کل RNA با استفاده از کیت سنتز cDNA رشته‌ای پیشرو به صورت معکوس (Fermentase) رونویسی شد. بیان mRNA ژن‌های مورد بررسی توسط SYBR Green real-time PCR با استفاده از مستر میکس Maxima SYBR Green qPCR و Light Cycler (Roche Applied Science) ارزیابی شد. توالی پرایمرهای به کار رفته در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- زوج پرایمرهای مورد استفاده در روش Quantitative Real-Time PCR [۱۷]

ژن‌های مورد بررسی	Reverse Primer	Forward Primer
استئوپروتگرین	AGCTGCTGAAGCTGTGGAA	TGTTTCGAGTGGCCGAGAT
رنکل	CATTGATGGTGAGGTGTGCAA	TGGAAGGCTCATGGTTGGAT
b-اکتین	GGACCTGACGGACTACCTCA	TCTTTGATGTCACGCACGATT

### یافته‌ها

این مطالعه بر روی ۶۰ بیمار شریان کرونری با میانگین سنی  $58 \pm 9$  سال انجام شد. ۸۳/۳٪ افراد مورد بررسی مرد بودند. شدت بیماری شریان کرونری بر اساس تعداد عروق درگیر تعیین شد. به ترتیب ۲۱/۷٪، ۱۸/۳٪ و ۶۰٪ بیماران یک، دو و سه رگ درگیر داشتند. مشخصات دموگرافیک و یافته‌های آزمایشگاهی افراد مورد بررسی بر اساس شدت بیماری در جدول ۲ نشان داده شده است.

شیوع میزان شکل‌گیری عروق کولترال با امتیاز ۰، ۱، ۲ و ۳ به ترتیب ۵/۲، ۱۲/۱، ۵۸/۶ و ۲۴/۱٪ بود. در جدول ۳

ویژگی‌های دموگرافیک و آزمایشگاهی بیماران با درجات مختلف TIMI نشان داده شده است. نسبت بیان ژن RANKL/OPG اختلاف معناداری در میان گروه‌ها داشت. شواهد حاصل از مطالعه در ارزیابی درجات ۰ و ۱ به عنوان گروه عروق کولترال محدود و ۲-۳ به عنوان گروه با عروق کولترال گسترده نشان داد که در گروه عروق کولترال پیشرفته، بیان استئوپروتگرین به طور معناداری بالاتر بود ( $5/70 \pm 18/30$  در مقابل  $0/13 \pm 0/25$ ،  $P=0/04$ ).

جدول ۲- ویژگی های دموگرافیک و آزمایشگاهی افراد شرکت کننده در مطالعه با شدت های متفاوت بیماری شریان کرونری بر اساس تعداد عروق درگیر

تعداد عروق درگیر			متغیرها
سه رگ درگیر	دو رگ درگیر	یک رگ درگیر	
۵۹±۸	۵۶±۱۰	۵۹±۱۱	سن (سال) †
۲۷/۲±۳/۷	۲۷/۶±۴/۷	۲۵/۸±۳/۳	BMI (kg/m <sup>2</sup> ) †
۱۳۷±۵۶	۱۰۹±۳۲	۱۰۳±۱۴	FBS (mg/dl) *
۱۷۳±۳۹	۱۶۸±۳۰	۱۷۱±۳۲	TC (mg/dl) †
۹۵±۲۸	۹۳±۲۱	۹۵±۲۴	LDL (mg/dl) †
۴۲±۸	۴۶±۱۲	۴۵±۹	HDL (mg/dl) †
۱۵۴±۶۲	۱۲۶±۴۴	۱۳۷±۵۹	TG (mg/dl) †
۴۵/۷۸±۸/۵۴	۴۸/۱۸±۹/۲۹	۵۰/۴۱±۷/۸۲	کسر تخلیه (%) †
۴/۰۹±۱۲/۳۰	۱۱/۷۶±۳۲/۰۶	۰/۰۳±۰/۱۲	بیان استئوپروتگرین (نسبت) †
۱/۷۸±۵/۱۶	۱/۱۶±۱/۶۷	۰/۰۰۶±۰/۰۲	بیان رنکل (نسبت) †
۱۵/۶۶±۵۲	۱۲/۹۴±۲۹/۳۸	۰/۳۷±۰/۳۲	RANKL/OPG (نسبت) †

مقادیر ± نشانگر میانگین ± انحراف معیار است.

\* مقادیر P معنی دار بود (P < ۰/۰۵)

† مقادیر P معنی دار نبود (P > ۰/۰۵).

نوع مطالعه: Case-Series

تعداد شرکت کنندگان: ۶۰ بیمار مبتلا به بیماری عروق کرونری

جدول ۳- ویژگی های دموگرافیک و آزمایشگاهی افراد شرکت کننده در مطالعه با درجات متفاوت TIMI

پیشرفت عروق کولترال				متغیرها
امتیاز TIMI = ۳	امتیاز TIMI = ۲	امتیاز TIMI = ۱	امتیاز TIMI = ۰*	
۵۹±۹	۵۹±۹	۵۳±۵	۶۱±۱۷	سن (سال)
۲۵±۲/۸	۲۸/۴±۳/۸	۲۴/۸±۲/۳	۲۷/۱±۵/۷	BMI (kg/m <sup>2</sup> )
۱۳۲±۶۳	۱۲۹±۴۸	۱۰۸±۳۰	۱۰۹±۲۰	FBS (mg/dl)
۱۷۳±۳۴	۱۷۰±۳۸	۱۸۰±۲۴	۱۶۶±۴۷	TC (mg/dl)
۹۶±۲۳	۹۴±۲۹	۹۹±۱۷	۹۱±۳۱	LDL (mg/dl)
۴۵±۱۲	۴۲±۸	۴۷±۷	۴۳±۸	HDL (mg/dl)
۱۴۸±۵۲	۱۴۱±۵۵	۱۴۰±۴۳	۱۴۷±۷۷	TG (mg/dl)
۴۶/۵۳±۸/۷۵	۴۶/۷۶±۸/۶۹	۴۸/۵۰±۹/۵۶	۵۳/۳۳±۵/۷۷	کسر تخلیه (%)
۱۲/۸۳±۲۹/۲۹	۲/۴۸±۹/۲۲	۰/۰۱±۰/۰۰۹	۰/۰۲±۰/۰۰۴	بیان استئوپروتگرین (نسبت)
۳/۳۱±۷/۶۸	۰/۶۹±۱/۷۹	۱/۱±۲/۶۱	۰/۰۰۳±۰/۰۰۴	بیان رنکل (نسبت)
۳/۷۱±۶/۶۹	۸/۱۳±۲۲	۶۶±۱۲۲/۴	۰/۷۷±۰/۵۰	RANKL/OPG (نسبت)

مقادیر ± نشانگر میانگین ± انحراف معیار است.

در هیچ یک از موارد مقادیر P معنی دار نبود (P > ۰/۰۵).

نوع مطالعه: Case-Series

\* سیستم امتیاز بندی برای تعیین میزان گسترش عروق کولترال (توضیح در متن)

تعداد شرکت کنندگان: ۶۰ بیمار مبتلا به بیماری عروق کرونری

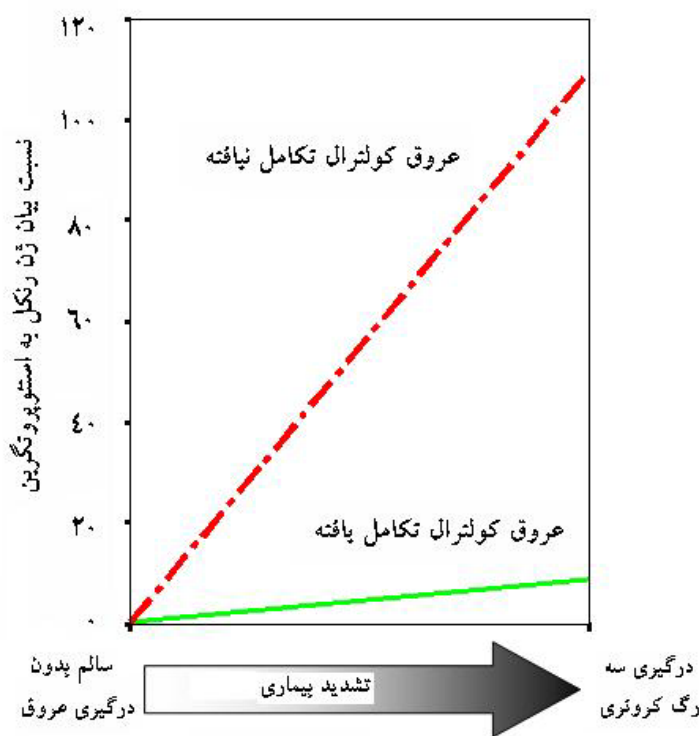
لجستیک، شدت بیماری با عروق کولترال پیشرفته تر ارتباط داشت ( $P=0/006$ ) و ارتباطی بین استئوپروتئین با پیشرفت عروق کولترال یافت نشد. ارزیابی تفاوت بیان استئوپروتئین در میان افراد با بیماری شریان کرونری متوسط تا شدید نشان داد که بیان آن در افرادی که عروق کولترال گسترده داشتند به طور معناداری بالاتر بود ( $6/41 \pm 19/31$  در مقابل  $0/03 \pm 0/04$ ،  $p=0/04$ ) اما اختلاف معناداری در بیان رنکل میان گروه‌های با عروق کولترال محدود و پیشرفته یافت نشد.

نسبت RANKL / OPG در بین بیماران با عروق کولترال پیشرفته به طور معناداری پایین تر بود ( $7/40 \pm 19/32$  در مقابل  $109/66 \pm 151/13$ ،  $P=0/001$ ) (شکل ۱).

بیان رنکل در میان دو گروه اختلاف معناداری نداشت. مقایسه بیان استئوپروتئین در میان افراد با بیماری خفیف (یک درگیر) و متوسط تا شدید (دو و سه درگیر) اختلاف معناداری نشان داد ( $0/03 \pm 0/12$  در مقابل  $5/8 \pm 18/49$ ،  $P=0/04$ ). اگرچه اختلاف معناداری در بیان رنکل در میان این گروه‌ها یافت نشد.

به ترتیب ۵۰٪ و ۹۱/۳٪ افراد با عروق کولترال پیشرفته در گروه‌های با بیماری شریان کرونری خفیف و متوسط تا شدید قرار داشتند ( $Odds\ ratio=10/5$  و  $95\% CI: 2/28 - 48/35$ ؛  $P=0/003$ ).

با در نظر گرفتن شدت بیماری شریان کرونری و بیان استئوپروتئین به عنوان متغیر وابسته در ارزیابی رگرسیون



شکل ۱- ارتباط نسبت بیان ژن RANKL/OPG با شدت ابتلا به بیماری شریان کرونری در مراحل مختلف تکامل عروق کولترال همانطور که در شکل نمایان است، با تشدید بیماری نسبت بیان ژن RANKL/OPG افزایش می یابد اما این تغییر در بیماران با عروق کولترال گسترده، کمتر است

## بحث

سلول های مونوسیت گردش خون، نقش مهمی در سازوکار تشکیل عروق کولترال ایفا می کنند. بیان ن ها در مونوسیت های گردش خون را در بیماران شریان کرونری با سطوح مختلف تکامل عروق کولترال نشان دادند. یافته های حاصل از مطالعه آنها نشان داد که میزان بیان فاکتورهای رونویسی با میزان گستردگی عروق کولترال ارتباط دارد.

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که بیان ژن استئوپروتگترین در مونوسیت های خون بیماران با عروق کولترال گسترده بالاتر است.

آرتیوژنز، سازوکار مهم مطرح در تشکیل عروق کولترال است و عواملی مانند فاکتورهای رشد در آرتیوژنز دخالت دارند [۲۱]. نتایج تحقیقات پیشین نقش استئوپروتگترین را به عنوان مولکول آرتیوژنیک که باعث تحریک تشکیل عروق جدید در *In vivo* و *In vitro* می شود، گزارش نموده اند [۱۰، ۱۲].

با این حال در مطالعات پیشین گزارشی در مورد نقش استئوپروتگترین در آرتیوژنز یافت نشد.

نتایج یافته های بررسی McGonigle و همکارانش [۱۳] رنکل لیگاند استئوپروتگترین را به عنوان عامل مهار کننده آرتیوژنز پیشنهاد نمود. با این وجود نتایج مطالعه حاضر اختلاف معناداری در بیان رنکل در مونوسیت های گردش خون بیماران با عروق کولترال محدود و گسترده نشان نداد که با یافته های Pritzker [۱۴] همخوانی داشت. گزارش آنها حاکی از نقش استئوپروتگترین در بقای اندوتلیال از طریق مهار واسطه های TRAIL و نه از طریق مهار مرگ سلولی برنامه ریزی شده توسط رنکل بود.

در مطالعه حاضر، عوامل مختلف مرتبط با تشکیل عروق کولترال ارزیابی شدند. هیپرکلسترولمی علاوه بر تحریک آترواسکلروز، بر تشکیل عروق کولترال نیز اثر منفی می گذارد [۲۲].

نتایج حاصل از بررسی های Czepluch و همکارانش [۲۳] نشان داد که هیپرکلسترولمی به شدت باعث اختلال در کموتاکسی مونوسیت ها در زمان تحریک با فاکتور رشد VEGF-A و کموکین MCP-1 شده و عملکرد مونوسیت ها را در افراد مبتلا به بیماری عروق کرونری مختل می کند.

عوامل دیگری که در تشکیل عروق کولترال نقش دارند، هیپرگلیسمی و اختلالات ناشی از بیماری دیابت است. نتایج بررسی Van Golde و همکارانش [۲۴] تاثیر منفی هیپرگلیسمی مزمن را در مراحل مختلف آرتیوژنز نشان داد که باعث اختلال در رشد عروق کولترال و مهار فرایند کموتاکسی مونوسیت ها می شوند.

یافته های بررسی Weihrauch و همکارانش [۲۵] نشان داد که هیپرگلیسمی مزمن با تولید آنژیوستاتین ها باعث کاهش گسترش عروق کولترال و اختلال در تولید مایعات بینابینی سلول های میوکاردیال می شوند. مطالعه حاضر اختلاف معناداری در سطوح FBS و پروفایل چربی در میان بیماران با سطوح متفاوت عروق کولترال نشان نداد. شواهد حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که بیان استئوپروتگترین، به طور معناداری در مونوسیت های خون بیماران عروق کرونری با درجه متوسط تا شدید بالاتر است.

نتایج بررسی های پیشین توسط Rhee و همکارانش [۲۶] ارتباط غلظت سرمی استئوپروتگترین را با شدت عروق درگیر کرونری نشان داد.

همچنین نتایج تحقیق Schoppet [۲۷] ارتباط سطح سرمی آن را با شدت بیماری عروق کرونری نشان داد.

نتایج مطالعه حاضر نیز با یافته های پیشین همخوانی دارد، همچنین اولین مطالعه ای است که بیان بالاتر استئوپروتگترین را در سلول های مونونوکلئار افراد با بیماری عروق کرونری شدیدتر نشان داد.

بررسی های بیشتر در این زمینه نشان داد که استئوپروتگترین به تنهایی باعث تحریک تشکیل عروق کولترال در بیماران عروق کرونری نمی شود. اگر چه شواهد نشان می دهند که در افراد مبتلا به بیماری عروق کرونری متوسط تا شدید، تشکیل عروق کولترال، با بیان بالاتر استئوپروتگترین ارتباط دارد. بر اساس این یافته ها به نظر می رسد استئوپروتگترین با میزان تشکیل عروق کولترال در افراد با شدت برابر بیماری ارتباط دارد.

یافته های ضد و نقیضی در مورد تاثیر استئوپروتگترین در سیستم قلبی عروقی وجود دارد. اگر چه اغلب مطالعات حیوانی نقش محافظتی استئوپروتگترین را در عروق

استئوپروتگرین در محافظت یا پیشبرد بیماری پیشنهاد می‌کند.

شواهد حاصل از بررسی Schaper و Scholz [۴] بیانگر وجود ویژگی‌های مشترک فراوانی در بین دو پدیده آرتروپوز و آترواسکلروز است. همچنین نتایج آنها نشان داد که اغلب عوامل رشد آنژیوژنز، پروترومبوتیک و پروآتروژنیک هستند. در ارزیابی یافته‌های حاصل از این مطالعه نیز چنین به نظر می‌رسد که استئوپروتگرین چنین نقش دوگانه‌ای را در ابتلا به بیماری شریان کرونری ایفا می‌کند و در حالی که با افزایش شدت بیماری شریان کرونری، سطح آن افزایش می‌یابد، در عین حال می‌تواند آغازگر آرتروپوز باشد. یافته‌های حاصل از این مطالعه پیشنهاد می‌کند که ممکن است تغییرات بیان رنکل، تنظیم‌کننده تاثیر استئوپروتگرین بر آرتروپوز باشد. بنابراین در ارائه شیوه‌های درمانی القاگر تکامل عروق کولترال، عدم تعادل در سیستم رنکل / استئوپروتگرین را نیز باید در نظر داشت.

#### سپاسگزاری

این مطالعه تحت حمایت مالی مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است. نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از پرسنل محترم آزمایشگاه هورمون مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران اعلام می‌نمایند.

پیشنهاد نموده اند [۲۸]، اما نتایج این بررسی‌ها در بیان ارتباط مثبت سطح سرمی استئوپروتگرین با شاخص‌های بالینی بیماری قلبی-عروقی در افراد بیمار ضد و نقیض هستند [۲۹]. اینکه آیا استئوپروتگرین تنها یک شاخص آسیب عروقی است و یک سازوکار محافظتی در برابر فرایند پاتولوژیک آترواسکلروز است و یا فعالانه در پیشرفت بیماری نقش دارد مشخص نیست و به نظر می‌رسد بررسی‌های بیشتری در این زمینه ضروری است [۳۰].

این مطالعه پیشنهاد می‌کند که این نتایج ضد و نقیض ممکن است به علت تغییرات حاصل از رنکل باشد که تاثیرات استئوپروتگرین را تحت تاثیر قرار می‌دهد. نتایج این مطالعه نشان داد که با تشدید بیماری عروق کرونری، میزان بیان استئوپروتگرین و رنکل روند افزایشی دارد، اما بیان رنکل بیش از استئوپروتگرین است به طوری که نسبت بیان ژن رنکل / استئوپروتگرین با تشدید بیماری کم می‌شود.

برعکس افراد با عروق کولترال گسترده با وضعیت یکسان بیماری، افزایشی در سطح رنکل نشان نمی‌دهند. همچنین نسبت بیان ژن رنکل / استئوپروتگرین به طور معناداری در این بیماران پایین تر است. نتایج مطالعات پیشین نشان داده بود که عملکرد آنژیوژنیک سیستم استئوپروتگرین عمدتاً ناشی از توانایی آن در القای تکثیر سلول‌های آندوتلیال از طریق مهار رنکل است. در این راستا، مطالعه حاضر رنکل را به عنوان مشخص‌کننده نقش

#### ماخذ

- 1- Tayebjee MH, Lip GY, MacFadyen RJ. Collateralization and the response to obstruction of epicardial coronary arteries. *QJM* 2004; 97:259-272.
- 2- Baroldi G, Mantero O, Scmazzone G. The collaterals of the coronary arteries in normal and pathologic hearts. *Circ Res* 1956; 4:223-229.
- 3- Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000;6:389-395.
- 4- Schaper W, Scholz D. Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1143-1151.
- 5- Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* 2004;94: 678- 685.
- 6- Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89:309-319.
- 7- Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in



- the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res* 2000;15:2-12.
- 8- Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, et al. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 234:137-142.
  - 9- Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998; 93:165-176.
  - 10- Malyankar UM, Scatena M, Suchland KL, Yun TJ, Clark EA, Giachelli CM. Osteoprotegerin is an avb3-induced, NF-kB-dependent survival factor for endothelial cells. *J Biol Chem* 2000;275:20959-20962.
  - 11- Cross SS, Yang Z, Brown NJ, et al. Osteoprotegerin (OPG)-a potential new role in the regulation of endothelial cell phenotype and tumour angiogenesis? *Int J Cancer* 2006;118:1901-1908.
  - 12- Scatena M, Giachelli C. The alpha(v)beta3 integrin, NFkappaB, osteoprotegerin endothelial cell survival pathway. Potential role in angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* 2002; 12:83-88.
  - 13- McGonigle JS, Giachelli CM, Scatena M. Osteoprotegerin and RANKL differentially regulate angiogenesis and endothelial cell function. *Angiogenesis* 2009;12:35-46.
  - 14- Pritzker LB, Scatena M, Giachelli CM. The role of osteoprotegerin and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in human microvascular endothelial cell survival. *Mol Biol Cell* 2004;15:2834-2841.
  - 15- Rentrop KP, Cohen M, Blanke H, Phillips RA. Changes in collateral channel filling immediately after controlled coronary artery occlusion by an angioplasty balloon in human subjects. *J Am Coll Cardiol* 1985; 5:587-592.
  - 16- Helgason CD, Miller CL. *Basic Cell Culture Protocols*. 3<sup>rd</sup> ed. Totowa, N.J.: Humana Press, 2005:105-116.
  - 17- Palmqvist P, Lundberg P, Persson E, et al. Inhibition of hormone and cytokine-stimulated osteoclastogenesis and bone resorption by interleukin-4 and interleukin-13 is associated with increased osteoprotegerin and decreased RANKL and RANK in a STAT6-dependent pathway. *J Biol Chem* 2006;281:2414-2419.
  - 18- Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest* 1998;101:40-50.
  - 19- Heil M, Ziegelhoeffer T, Pipp F, et al. Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: H2411-H2419.
  - 20- Chittenden TW, Sherman JA, Xiong F, Hall AE, Lanahan AA, Taylor JM, et al. Transcriptional profiling in coronary artery disease: indications for novel markers of coronary collateralization. *Circulation* 2006; 114: 1811-1820.
  - 21- Phelps EA, Garcia AJ. Update on therapeutic vascularization strategies. *Regen Med* 2009; 4: 65-80.
  - 22- van Weel V, de Vries M, Voshol PJ, et al. Hypercholesterolemia reduces collateral artery growth more dominantly than hyperglycemia or insulin resistance in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 1383-1390.
  - 23- Czepluch FS, Bergler A, Waltenberger J. Hypercholesterolaemia impairs monocyte function in CAD patients. *J Intern Med* 2007; 261: 201-204.
  - 24- Van Golde JM, Ruiter MS, Schaper NC, et al. Impaired collateral recruitment and outward remodeling in experimental diabetes. *Diabetes* 2008; 57: 2818-2823.
  - 25- Weihrauch D, Lohr NL, Mraovic B, et al. Chronic hyperglycemia attenuates coronary collateral development and impairs proliferative properties of myocardial interstitial fluid by production of angiostatin. *Circulation* 2004; 109: 2343-2348.
  - 26- Rhee EJ, Lee WY, Kim SY, et al. Relationship of serum osteoprotegerin levels with coronary artery disease severity, left ventricular hypertrophy and C-reactive protein. *Clin Sci (Lond)* 2005; 108: 237-243.
  - 27- Schoppet M, Sattler AM, Schaefer JR, Herzum M, Maisch B, Hofbauer LC. Increased osteoprotegerin serum levels in men with coronary artery disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 1024-1028.
  - 28- Bennett BJ, Scatena M, Kirk EA, et al. Osteoprotegerin inactivation accelerates advanced atherosclerotic lesion progression and calcification in older ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2117-2124.
  - 29- Kiechl S, Werner P, Knoflach M, Furtner M, Willeit J, Schett G. The osteoprotegerin/RANK/RANKL system: a bone key to vascular disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2006; 4: 801-811.
  - 30- Van Campenhout A, Gollidge J. Osteoprotegerin, vascular calcification and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2008 [Epub ahead of print] doi:10.1016/j.
  - 31- Coats AJ. Ethical authorship and publishing. *Int J Cardiol* 2009; 131: 149-50.

