● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ هجدهم، شمارهٔ ۳، ص ۲۴۵-۲۳۵، ۱۳۹۰

مقالهٔ پژوهشی

بررسی اثرات ید اضافی بر سیستم ایمنی در محیط برون تنی

غلامرضا مشتاقی کاشانیان*[1]، محمد حسن نژاد[2]

خلاصه

مقدمه: در حالی‌که ید یک عنصر ضروری برای ساخت هورمون‌های تیروئیدی می‌باشد، مطالعات اپیدمیولوژیکی نشان داده که استفاده از دوز بالای ید منجر به‌وجود آمدن بیماری خودایمنی تیروئید می‌شود که مکانیزیم آن هنوز ناشناخته است. مطالعات گذشته نشان دادند که عدم تعادل بین سیتوکین‌های در گردش خون یکی از عوامل آغازکننده بیماری‌های خود ایمنی می‌باشد. برای پی بردن به مکانیزیم شروع خود ایمنی تیروئید، اثرات یدور سدیم و ید بر لنفوسیت‌های T کمک‌کننده خون کامل، در محیط برون تنی مورد بررسی قرار گرفت.

روش: پس از غربال‌گری ۲۵ فرد سالم و در نظر گرفتن بررسی آزمایش‌های اولیه، ۱۰خانم میان‌سال (۴۵-۴۰ سال) که از نظر نتایج آزمایش‌ها همانند بودند انتخاب گردیدند. از هر فرد مقدار ۱۰ میلی‌لیتر خون هپارینه استریل گرفته و بلافاصله به شش گروه مختلف تقسیم شدند: کنترل، تحریک با یدورسدیم، تحریک با ید و گروه‌هایی مشابه که در حضور مخلوطی از محرک‌های استاندارد (LPS 1μg/ml & PHA 10μg/ml) بودند. این تقسیم‌بندی در سه گروه مشابه برای بررسی سایتوکین‌های ترشحی در زمان‌های ۲۴ ۴۸ و ۷۲ ساعت به‌طور همزمان انجام شد. سپس نمونه‌ها در دمای $۳۷^{o}C$ و شرایط استاندارد کشت سلولی (۵٪ CO_2 و ۹۵٪ O_2) انکوبه شدند. پس از سپری شدن زمان لازم، پلاسمای هر چاهک در شرایط استاندارد جدا شد و برای اندازه‌گیری سایتوکین‌های مربوطه (اینترلوکین‌های ۴ و ۱۰، اینترفرون گاما و فاکتورتغییر رشد بتا) در دمای $-۷۰^{o}C$ تا زمان آزمایش نگهداری شد.

یافته‌ها: مقایسه آماری غلظت‌های به‌دست آمده برای گروه‌های تحریک شده و کنترل‌های مربوطه، نشان داد که یدورسدیم به تنهائی می‌تواند باعث کاهش معنی‌داری (P<۰/۰۲) در غلظت TGF-β1 در تمام زمان‌های بررسی شده گردد، در صورتی‌که بر ترشح دیگر سایتوکین‌ها تأثیری ندارد. از سوی دیگر، ید توانست غلظت IL-4 و IL-10 را کاهش دهد (P<۰/۰۱). همچنین یدورسدیم توانست در حضور محرک‌های LPS/PHA باعث کاهش IL-10 گردد (P<۰/۰۲)، در صورتی‌که ید غلظت IL-4 و IL-10 را کاهش داد (P<۰/۰۱).

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق برای اولین بار به این نکته اشاره می‌کند که مقادیر بالای یدورسدیم و ید می‌توانند در سرکوب سیستم ایمنی و میزان سایتوکین‌های حفاظتی در گردش خون نقش داشته باشند. نهایتاً، با توجه به این نکته که غدهٔ تیروئید و هورمون‌های تیروئیدی در این آزمایش‌ها نقشی نداشته، شاید بتوان گفت که خود ایمنی تیروئید به دلیل افزایش مصرف ید از جریان خون آغاز می‌شود.

واژه‌های کلیدی: خودایمنی تیروئید، مصرف زیاد ید،یدورسدیم،ید ، INF-γ، TGF-β1، IL-4 و IL-10

۱- دانشیار بیوشیمی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۲- دانشیار بیوشیمی ، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی افضلی‌پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

* **نویسنده مسؤول، آدرس:** کرمان- انتهای بلوار ۲۲ بهمن- دانشکده پزشکی افضلی‌پور، گروه بیوشیمی ● **آدرس پست الکترونیک:** MoshtaghiKashanian@hotmail.com

دریافت مقاله: ۱۳۸۹/۶/۱۴ **دریافت مقاله اصلاح شده :** ۱۳۸۹/۷/۲۰ **پذیرش مقاله:** ۱۳۸۹/۹/۳

مقدمه

کمبود ید و اختلالات ناشی از آن از مشکلات بهداشتی اکثر کشورها از جمله ایران می‌باشد (۱،۲). مشکلاتی که در اثر کمبود ید ایجاد می‌شود شامل کرتینیسم، کم کاری تیروئید، ناهنجاری‌های مادرزادی و گواتر اندمیک می‌باشد که در مجموع اختلالات ناشی از کمبود ید نامیده می‌شوند (۳). بررسی‌های انجام شده در مناطق مختلف ایران بیان‌گر گواتر اندمیک در اکثر مناطق می‌باشد و علت آن به کمبود ید ربط داده شده است (۱،۲،۴). کمبود ید و اختلالات ناشی از آن به‌عنوان یک مشکل عمده بهداشتی- تغذیه‌ای در ایران از سال‌ها قبل شناخته شده است و نخستین بار در سال ۱۳۴۳ بررسی همه‌گیری‌شناسی گواتر در ایران به وسیله انستیتو تغذیه آغاز و طی چهار سال گزارش جامعی در زمینه شیوع این عارضه در کشور تهیه و منتشر گردید. پس از تشکیل کمیته کشوری مبارزه با اختلالات ناشی از کمبود ید و بررسی گواتر کشوری در سال ۱۳۶۸، تهیه و توزیع عمومی‌نمک یددار به‌عنوان راهکار اصلی مبارزه با این اختلالات انتخاب و به مرحله اجرا درآمد(۵،۶). با توجه به الگوهای رایج کشور افزودن ۴۰ گاما (۴۰ppm) ید مورد تأیید کمیته کشوری قرار گرفت. به‌دنبال اجباری‌شدن تولید نمک یددار در سال ۱۳۷۳ مصرف نمک یددار توسط خانوارها افزایش یافت به‌صورتی که آخرین بررسی انجام شده در کشور نشان دهنده مصرف نمک یددار توسط ۹۳ درصد مردم مناطق روستایی و ۹۷ درصد مردم مناطق شهری می‌باشد. اگرچه پس از چندین سال از آغاز طرح یددار کردن نمک می‌گذرد و تعداد مبتلایان به گواتر نیز در طی این چند سال کاهش قابل توجهی پیدا کرده است اما درصد قابل ملاحظه‌ای از افراد هنوز به این مشکل مبتلا هستند (۷). بررسی‌های اپیدمیولوژیک و آزمایشات حیوانی دلیل اصلی این ناهنجاری‌ها را ناشی از خودایمنی تیروئید می‌دانند و نشان‌داده‌اند که مصرف بالای ید می‌تواند باعث القای خود ایمنی تیروئید گردد (۱۰-۸)، لیکن مکانیزم آن هنوز نا شناخته است. سطح سیتوکین‌های موجود در خون و تعادل آنها نقش مهمی در پیدایش بیماری‌های خود ایمنی دارد. برای مثال اینترفرون گاما (IFN-γ) و اینترلوکین۲ (IL-2) مترشحه از لنفوسیت‌های کمک‌کننده یک، در به‌وجود آمدن ناهنجاری‌های خود ایمنی نقش عمده‌ای بر عهده دارند (۱۳-۱۱)، در صورتی که اینترلوکین ۴ و ۱۰ (IL-10, 4) و فاکتور رشد بتا (TGF-β) مترشحه از سلول‌های لنفوسیت کمک‌کننده ۲ هم دارای نقش محافظتی و هم مخرب هستند(۱۶-۱۴). نظر به این‌که هنوز مکانیزم پیدایش خود ایمنی تیروئید متعاقب مصرف ید زیاد معلوم نیست، در این تحقیق به بررسی اثرات زیادی یدور سدیم و ید بر لنفوسیت‌های T کمک کننده خون کامل در محیط برون‌تنی در افراد سالم پرداختیم، تا شاید به مکانیسم پیدایش خود ایمنی تیروئید دست بیابیم. به‌علاوه، چون اکثر مبتلایان به خود ایمنی تیروئید خانم‌های میان‌سال می‌باشند، تصمیم گرفته شد تا افراد انتخاب شده در این گروه سنی باشند.

روش بررسی

برای انجام این مطالعه، ابتدا ۲۵ زن در محدوده سنی ۴۵-۴۰ سال (بیشترین کسانی که به دلایل مختلف به بیماری‌های تیروئیدی مبتلا می‌شوند) با میانگین توده بدنی ۲۵-۲۴ kg/m^2 که توسط یک پزشک معاینه گشته و از جنبه بالینی سالم تشخیص داده شده بودند در این طرح شرکت نمودند. این افراد علاوه بر شرایط ورود ذکر شده می‌بایستی در ۶ ماه گذشته هیچ دارویی (مخصوصاً داروی ضد حاملگی) مصرف نکرده و دچار هیچگونه بیماری زمینه‌ای نباشند. برای این افراد آزمایش‌های هورمون محرک تیروئیدی (TSH)، قند، اوره، کراتینین، کلسترول، تری‌گلیسرید و CBC انجام شد. از میان این افراد تعداد ۱۰ مورد که نتایج آزمایش‌های آنان تشابه کامل داشتند انتخاب شدند (جدول ۱) و پس از تکمیل فرم رضایت نامه و آماده‌سازی (ناشتا بودن در طول شب) مقدار ۱۰ml خون وریدی به‌صورت هپارینه (۷۵ واحد هپارین برای هر میلی‌لیتر خون و در شرایط کاملا استریل) گرفته شد.

نمونه‌ها بلافاصله به آزمایشگاه کشت سلولی منتقل شد. نمونه هر فرد به شش گروه تقسیم شد: بدین صورت که ۰/۵ میلی‌لیتر از خون تام با ۰/۵ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI-1640 (Sigma) مخلوط و به‌عنوان گروه کنترل منفی در نظر گرفته شد. همین مقدار خون نیز در دو گروه دیگر با محیط کشتی مخلوط شد که حاوی ۱۰mM یدور سدیم و یا ۰/۵mM ید (غلظت نهائی در محیط کشت) بود. گروه مشابهی نیز به‌عنوان گروه با محرک در نظر گرفته شد، بدین ترتیب که نمونه‌ها علاوه بر مخلوط شدن در محیط کشتی که حاوی دوزهای یاد شده از ید بود، مقادیر استانداردی از محرک‌های لیپوپلی ساکارید و فتوهموآگلوتینین (LPS 1µg/ml & PHA 10µg/ml غلظت نهائی) نیز به آن اضافه گردید بود. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۷° C و غلظت ۹۵٪ هوا و ۵٪ CO2 برای زمان‌های مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) انکوبه گردید (برای گروه‌ها ۳ نمونه مشابه جهت بررسی در زمان‌های ۲۴، ۴۸، و ۷۲ ساعت تهیه شد). پس از پایان زمان انکوباسیون، محتویات هر چاهک به لوله اپندرف منتقل، و با دور ۸۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی جدا شده به لوله جدید منتقل گشته و دوباره برای جدا سازی پلاکت‌ها با دور ۱۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید (چون پلاکت‌ها می‌توانند TGF-β تولید کنند، مرحله دوم سانتریفیوژ شدن الزامی می‌باشد). قابل ذکر است که مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از خون هر فرد در همان لحظه خون‌گیری با ۵۰۰ میکرولیتر محیط کشت خالص مخلوط و سپس به طریق مشابه بالا سانتریفیوژ شده و پلاسمای آن جهت اندازه‌گیری مارکرهای مورد نظر در ساعت صفر محاسبه گردید. نمونه جدا شده نهایی جهت اندازه‌گیری شاخص‌های لنفوسیت‌های کمک کننده ۱ و۲ که شامل سایتوکین‌های IFN-γ ، IL-10، IL-4 و TGF-β۱ بود در دمای ۷۰° C- تا زمان انجام آزمایش نگهداری شد، و سپس با روش الایزا و طبق دستورالعمل کارخانه سازنده کیت‌ها (Bender MedSystem, Austria)، سایتوکین‌های نامبرده در یک روز کاری تعیین غلظت شد. لازم به ذکر است که کلیه وسایل مورد استفاده در طول این آزمایش‌ها کاملاً به‌صورت استریل بوده است، وپس از مخلوط نمودن یدور سدیم، ید، PHA و یا LPS محیط کشت توسط فیلترکردن (µ ۰/۲ فیلتر استریل سرنگی، Millipore) استریل می‌شد.

محاسبات آماری توسط نرم افزار SPSS 16 انجام شد. برای مقایسه دو گروه مشابه از آزمون paired-t-test و برای مقایسه چند گروه از آزمون one way-ANOVA (post-hoc-Tukey) استفاده شد. کلیه اعداد ذکر شده در متن و جداول Mean ± SD بوده، در صورتی‌که اعداد ارائه شده در نمودارها Mean ± SEM می‌باشد. مقادیر P<۰/۰۵ در تمام موارد معنی‌دار در نظر گرفته شد.

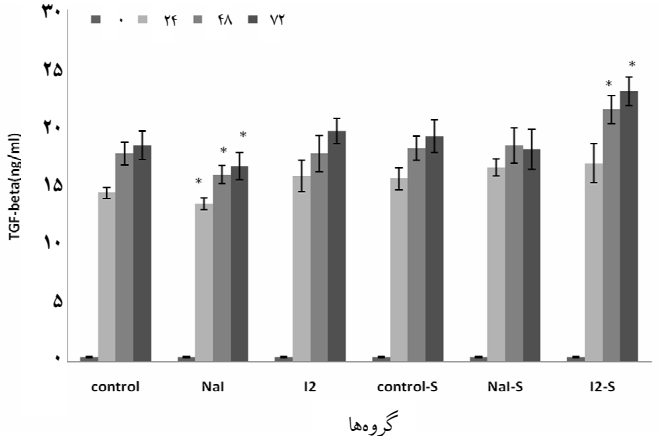
جدول ۱. *شاخص‌های اندازه‌گیری شده افراد شرکت‌کننده در طرح (n=۱۰)*

	سن (سال)	BMI	WBC $*10^3/\mu l$	RBC $*10^6/\mu l$	PLT $*10^3/\mu l$	Lymph %	Chol mg/dl	TG mg/dl	FBS mg/dl	Urea mg/dl	Creat mg/dl	TSH mIU/ml
میانگین	۳۸/۰۰	۲۴/۱۱	۶/۰۴	۵/۳۳	۲۲۰/۲	۳۵/۹۳	۱۸۲/۳۳	۹۳/۲۲	۸۳/۰۰	۲۳/۵۵	۰/۸۴	۱/۴۰
انحراف معیار	۱/۳۲	۰/۳۳	۰/۲۱	۰/۱۴	۱۶/۲	۱/۳۱	۶/۶۱	۱۱/۰۰	۲/۳۵	۱/۵۰	۰/۰۱	۰/۱۱

نتایج

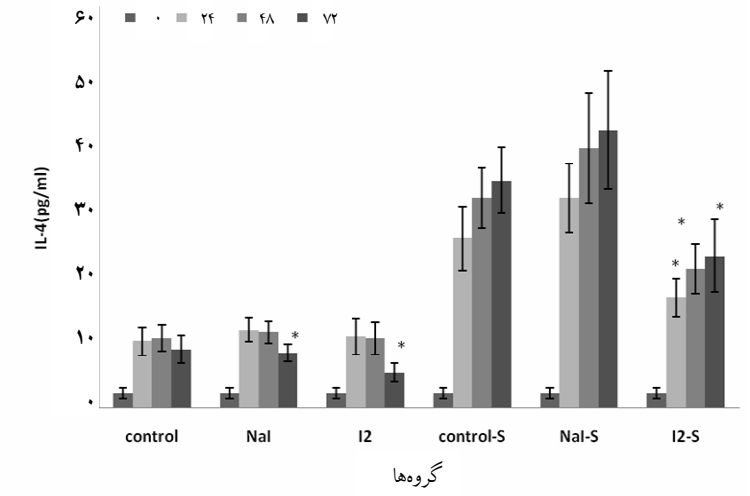
ارزیابی سایتوکین‌ها نشان‌گر این نکته بود که رقیق نمودن خون با محیط کشت و انکوباسیون آن، خود می‌تواند باعث تحریک سلول‌های ایمنی گشته و غلظت TGF-β۱، IL-4 و IL-10 را در مقایسه با زمان صفر به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۱) افزایش داد، در صورتی که تغییرات چشمگیری در غلظت IFN-γ ایجاد ننمود. به این دلیل، برای بررسی‌های آماری، تغییرات به‌دست آمده در زمان‌های مختلف با کنترل مشابه در همان زمان مقایسه شد.

مقایسه آماری غلظت‌های به‌دست آمده برای گروه‌های تحریک شده و کنترل‌های مربوطه، نشان داد که یدورسدیم به تنهائی می‌تواند باعث کاهش معنی‌داری در غلظت TGF-β۱ گردد (نمودار شماره ۱). مقادیر به‌دست آمده برای این گروه به ترتیب ۱/۶۲ ± ۱۳/۴۷ (P<۰/۰۲) نانوگرم بر میلی‌لیتر برای ساعت ۲۴، ۲/۲۹ ± ۱۶/۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر برای ساعت ۴۸ و ۳/۴۹ ± ۱۶/۶۸ نانوگرم بر میلی‌لیتر برای ساعت ۷۲ بود. این مقادیر با غلظت‌های مشابه به‌دست آمده برای گروه کنترل‌ها به ترتیب ۱/۴۴ ± ۱۴/۴۳ نانوگرم بر میلی‌لیتر برای ساعت ۲۴، ۲/۹۱ ± ۱۷/۷۴ نانوگرم بر میلی‌لیتر برای ساعت ۴۸ و ۳/۶۶ ± ۱۸/۴۶ نانوگرم بر میلی‌لیتر برای ساعت ۷۲ بود. این در حالی بود که ید نتواست تغییر معنی‌داری در غلظت این سیتوکین ایفا نماید. از طرف دیگر، یدورسدیم به تنهائی نتوانست در هیچیک از زمان‌ها تغییری معنی‌داری در غلظت‌های IL-4 و یا IL-10 ایجاد نماید، در صورتی که ید در زمان ۷۲ ساعت باعث کاهش معنی‌داری (p<۰/۰۵) در غلظت IL-4 گردید. میانگین IL-4 در این گروه ۳/۹۱ ± ۵/۳۱ پیکوگرم بر میلی‌لیتر، در مقابل ۵/۹۰ ± ۸/۷۸ پیکوگرم بر میلی‌لیتر برای گروه کنترل بود (نمودار ۲). به‌علاوه، ید توانسته در گروه‌های بدون محرک به‌طور معنی داری (P<۰/۰۱) باعث کاهش غلظت IL-10 مترشحه در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ گردد. میانگین در این گروه‌ها به ترتیب ۱۸۳/۹ ± ۴۵۴/۷ پیکوگرم بر میلی‌لیتر برای ساعت ۴۸ و ۱۵۷/۸ ± ۴۰۶/۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر برای ساعت ۷۲ گردید. در صورتی که غلظت‌های به‌دست آمده برای کنترل‌های مشابه به‌ترتیب ۱۶۶/۳ ± ۷۲۷/۳ پیکوگرم بر میلی‌لیتر برای ساعت ۴۸ و ۲۳۸/۹ ± ۶۴۰/۲ پیکوگرم بر میلی‌لیتر برای ساعت ۷۲ گردید (نمودار ۳). نهایتاً، ید و یا یدورسدیم نتوانستند در زمان‌های مختلف هیچ تغییری در غلظت اینترفرون گاما ایجاد کنند (نمودار ۴).



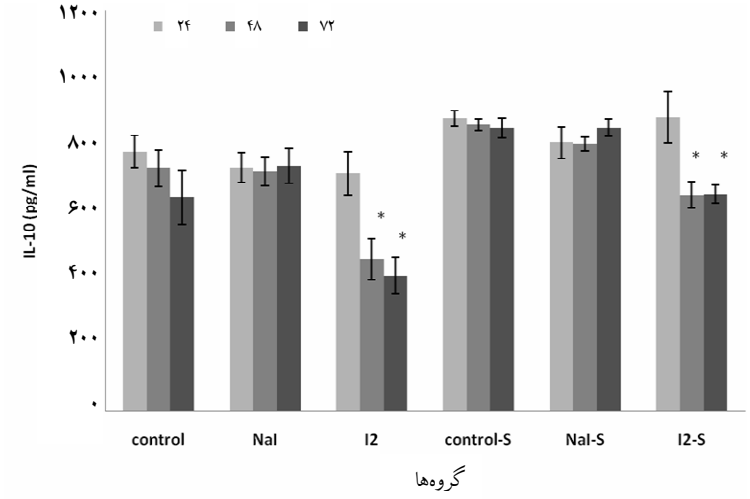
نمودار ۱. *میزان تغییرات TGF-β1 در گروه مختلف*

گروه‌ها به ترتیب عبارتند از کنترل، تحریک شده به تنهائی با یدورسدیم، تحریک شده با ید، کنترل تحریک شده با مخلوطی از محرک‌های استاندارد (LPS 1μg/ml & PHA 10μg/ml) با عنوان control-S، تحریک شده با یدورسدیم در حضور LPS/PHA (Na-S) و تحریک شده با ید در حضور LPS/PHA (I_2-S).علامت * نشان‌گر کاهش معنی‌دار (P<۰/۰۵) IL-4 در مقایسه با گروه‌های کنترل مربوطه در زمان‌های مشابه می‌باشد.



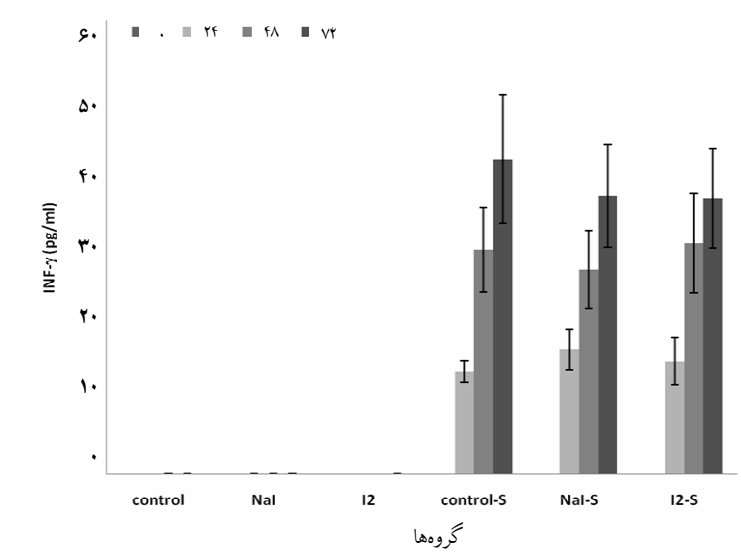
نمودار ۲. *میزان تغییرات IL-4 در گروه‌های مختلف*

معرفی گروه‌ها همانند نمودار ۱ می‌باشد



نمودار ۳. *میزان تغییرات IL-10 در گروه‌های مختلف*

معرفی گروه‌ها همانند نمودار ۱ می‌باشد



نمودار ٤. *میزان تغییرات INF-μ در گروه‌های مختلف*

معرفی گروه‌ها همانند نمودار ۱ می‌باشد

نتایج به‌دست آمده برای یدورسدیم به همراه محرک‌های استاندار (LPS 1μg/ml & PHA 10μg/ml) نشان‌داد که یدورسدیم نمی‌تواند تغییر چشمگیری در غلظت TGF-β۱ ایجاد نماید، در صورتی‌که ید توانست غلظت این فاکتور رشد را در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت افزایش دهد (P<۰/۰۲). غلظت‌های به‌دست آمده برای این گروه‌ها به ترتیب ۳/۱۰ ± ۱۹/۲۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر برای ۴۸ ساعت و ۳/۶۸±۲۳/۰۶ نانوگرم بر میلی‌لیتر برای ۷۲ ساعت بود. این در حالی بود که غلظت‌های مشابه برای گروه‌های کنترل به ترتیب ۳/۱۰±۱۸/۹۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر برای۴۸ ساعت و ۳/۵۱±۲۱/۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر برای ۷۲ ساعت بود. همچنین، یدورسدیم نتوانست باعث تغییرات معنی‌داری در غلظت‌هایIL-4 و IL-10، در حضور محرک‌های استاندار گردد، در صورتی‌که ید توانست غلظت IL-4 را در تمام ساعات مطالعه شده به‌طور معنی‌داری کاهش دهد (P<۰/۰۲). غلظت‌های به‌دست آمده در این گروه‌ها به ترتیب ۸/۱۱±۱۶/۵۹ پیکوگرم بر میلی‌لیتر برای ۲۴ ساعت، ۱۰/۵۰±۲۰/۸۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر برای ۴۸ ساعت و ۱۵/۳۹±۲۲/۷۸ پیکوگرم بر میلی‌لیتر برای ۷۲ ساعت بود. غلظت‌های به‌دست آمده برای گروه کنترل‌های مشابه به ترتیب ۱۳/۶۶±۲۵/۳۵ پیکوگرم بر میلی‌لیتر برای ۲۴ ساعت، ۱۲/۶۸±۳۱/۴۵ پیکوگرم بر میلی‌لیتر برای ۴۸ ساعت و ۱۳/۹۶±۳۴/۰۴ پیکوگرم بر میلی‌لیتر برای ۷۲ ساعت بود. درمورد IL-10، تنها در زمان‌های ۴۸ و۷۲ ساعت غلظت این سایتوکین توسط ید کاهش معنی داری داشت (P<۰/۰۱). میانگین IL-۱۰ پس از تحریک سلولی با مخلوطی از LPS/PHA به‌ترتیب ۲۸۸/۹ ± ۸۷۸/۷ پیکوگرم بر میلی‌لیتر برای ۲۴ساعت، ۱۱۷/۴±۶۴۶/۹ پیکوگرم بر میلی لیتر برای ۴۸ ساعت، و ۸۰ ±۶۴۹/۶ پیکوگرم بر میلی‌لیتر برای ۷۲ ساعت بود، درصورتی‌که غلظت‌های مشابه برای گروه‌های کنترل به ترتیب ۸۸/۶±۸۷۶/۲ پیکوگرم بر میلی‌لیتر برای ۲۴ ساعت، ۵۲/۲±۸۵۷/۲ پیکوگرم بر میلی‌لیتر برای ۴۸ ساعت و ۸۸/۶±۸۴۸/۰ پیکوگرم بر میلی‌لیتر برای ۷۲ بود. نهایتاً، ید و یا یدورسدیم در حضور مخلوطی از LPS/PHA، نتوانستد در زمان‌های مختلف هیچ تغییری در غلظت اینترفرون گاما ایجاد کنند.

بحث و نتیجه گیری

مطاعات اپیدمیولوژیک و آزمایشگاهی نشان داده‌اند که مصرف زیاد ید به‌عنوان یکی از عوامل ایجاد بیماری خودایمنی تیروئید می‌باشد (۱۰-۸)، اما مکانیزم آن هنوز شناخته نیست. از عواملی که تاکنون مطرح شده، می‌توان به این نکته اشاره نمود که افزایش ید باعث صدمه به تیروئید شده و تولید آنتی‌بادی بر علیه پروتئین‌های خاص تیروئیدی همچون تیروئید پراکسیداز، تیروگلوبولین و پروتئین گیرنده TSH باعث آغاز خود ایمنی تیروئید می‌گردد (۱۹-۱۷). با توجه به این نکته که غده تیروئید نوعی خود تنظیمی در برداشت ید داشته و دفع ید زیادی بدن نیز از طریق کلیه‌ها به اثبات رسیده، پس امکان دارد افزایش ید با مکانیزیمی ناشناخته در تحریک سیستم ایمنی و تغییر در غلظت سیتوکین‌های موجود در گردش خون باعث آغاز خود ایمنی تیروئید گردد. نتایج به‌دست آمده ما اولین تحقیق در این راستا بوده و نشان می‌دهد که ید به‌صورت I_2 و یدور سدیم می‌تواند باعث تغییرات در غلظت سیتوکین‌های مؤثر در سیستم ایمنی گشته و این تغییرات ممکن است منشأ پیدایش خود ایمنی باشد.

نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر نشان داد که افزایش یدورسدیم به تنهائی می‌تواند باعث کاهش ترشح TGF-β1 گردد. از طرف دیگر، گرچه یدورسدیم نتواست در حضور محرک‌های LPS/PHA هیچ نقشی در ترشح TGF-β1 داشته باشد، لیکن توانست باعث کاهش نسبی در غلظت IL-10 گردد. این کاهش‌ها نشان‌گر این نکته می‌باشد که سطح سیتوکین‌های محافظتی در اثر افزایش یدورسدیم کاهش پیدا کرده و تعادل بین TGF-β1 و IL-10 و دیگر سایتوکین‌ها ممکن است مختل گردد. به‌علاوه، با توجه به این نکته که در این تحقیق غده تیروئید و تولید هورمون‌های تیروئیدی هیچ نقشی نداشتند، می‌توان نتیجه گرفت که مازاد ید به‌صورت یدور سدیم، ممکن است باعث آغاز خود ایمنی تیروئید از جریان خون شود. این نظریه را می‌توان با اشاره به نتایج تحقیقات گذشته غنی‌تر نمود. برای مثال Marazuela و همکاران نتیجه تحقیق خود را این‌گونه گزارش کردند که یکی از عوامل ایجاد و پیشرفت بیماری خودایمنی تیروئید کاهش غلظت IL-10 می‌باشد و نشان دادند که این سایتوکین نقش مهمی‌در جلوگیری از شروع و پیشرفت بیماری خود ایمنی تیروئیدی دارد (۱۴). همچنین Horwitz و همکاران نشان دادند که TGF-β1 همانند IL-10 یک سرکوب‌کننده ایمنی می‌باشد و کاهش این سیتوکین‌ها می‌تواند اثر مضاعف (synergic) در سیستم ایمنی داشته باشد و تعادل در ساخت و ترشح این دو بسیار مهم و ضروری است (۲۰). نتایج تحقیق Cohen و همکاران نیز نشان داد که TGF-β1 دارای اثرات ضد اتوایمنی تیروئید می‌باشد و در موش‌هایی که از آنتی‌بادی ضد TGF-β1 استفاده شده، پیشرفت اتوایمنی تیروئید به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (۲۱). Braley-Mullen و همکاران نیز در تحقیقی متفاوت نشان دادند که TGF-β1 می‌تواند دارای اثرات هم مثبت و هم منفی باشد که بستگی به حالات تمایز سلولی و سایتوکین‌های دیگر در محیط کشت دارد و در مطالعه مذکور حذف ژن کد کننده TGF-β1 باعث التهابات گسترده و مرگ موش‌ها در هفته سوم تا چهارم زندگی شد (۱۷). نقش منفی این سایتوکین نیز نشان داده شده است. به این صورت که افزایش ترشح TGF-β1 در داخل غده تیروئید صدمه دیده می‌تواند باعث مهاجرت و تجمع سلول‌های ایمنی (T, B و CD4+) و متعاقب آن افزایش سرعت پیشرفت بیماری اتوایمنی گردد (۱۷). شاید عدم تغییر TGF-β1 در حضور محرک‌های استاندارد خود دلیلی بر افزایش ترشح این سایتوکین در حالت التهاب بوده وممکن است باعث مهاجرت سلولی به بافت‌های التهاب دیده، همچون تیروئید گردد. برای بهتر روشن شدن این مطلب مطالعات بیشتری لازم است.

نقش سایتوکین‌های سنتز شده از سلول‌های Th1 نیز در پیدایش خود ایمنی تیروئید بررسی گردیده است.O'Garra و همکاران نشان دادند که سایتوکین‌های سنتز شده از سلول‌های Th1 می‌تواند عامل اصلی التهاب و بروز مشکلات

خود ایمنی در انسان باشد و سایتوکین‌های ترشح شده از این سلول‌ها (TNFα, IFNγ) باعث پیشرفت التهاب و پاسخ‌های ایمنی کنترل نشده‌ای می‌شود. این محققین همچنین سلول‌های Th2 را به‌عنوان مهار کننده سلول‌های Th1 در تولید و ساخت سایتوکین‌های التهاب زا معرفی کردند. سلول‌های Th2 این عمل را از طریق ساخت IL-4 انجام می‌دهند. پس با توجه تحقیق آنان IL-4 به‌عنوان یک مارکر محافظت‌کننده و سد کننده ایجاد و پیشرفت واکنش‌های شدید ایمنی از طریق مهار سلول‌های سازنده سایتوکین‌های التهاب‌زا می‌باشد(۲۲). در مطالعه‌ی دیگری که توسط Seddon و همکاران صورت گرفت، مشخص شد که IL-4 نقشی محافظتی در مقابل بیماری خودایمنی تیروئیددارد. نتایج تحقیق آنان نشان داد که IL-4 که توسط آنتی بادی ضد آن مهار شده بود، پیشرفت بیماری خودایمنی تیروئیدی را به‌طور معنی‌داری افزایش می‌دهد. در این تحقیق پیشنهاد شده که IL-4 نقش یک فاکتور رشد را برای سلول‌های T تنظیمی (T Regulatory) دارد و می‌تواند باعث سرعت بخشیدن به رشد و پیشرفت سلول‌های Tتنظیمی گردد و از این طریق باعث کاهش فعالیت سلول‌های Th1 که عامل اصلی بروز التهاب و بیماری‌های خود ایمنی است، گردند(۲۳). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که ید به دو صورت یدورسدیم و ید به تنهائی و یا در حضور محرک‌های LPS/PHA نمی‌تواند تغییری در غلظت INF-γ ایجاد نماید، لیکن ید توانست باعث کاهش IL-4 گردد. این عدم تعادل بین سیتوکین‌های ترشحی Th1 و Th2 ممکن است عاملی برای پیدایش خود ایمنی تیروئید توسط ید درحضور یا عدم حضور عفونت‌ها باشد.

IL-10 نیز همانند IL-4 به‌عنوان یک مهارکننده ساخت و ترشح سایتوکین‌های التهاب‌زا از سلول‌های Th1 می‌باشد (۲۰). به‌علاوه، افزایش IL-10 قادر به مهار سلول‌های Th2 نیز بوده و از این طریق می‌تواند باعث کاهش تولید سایتوکین‌های ترشح‌شده از این سلول‌ها گردد (۲۴). Patrick و همکاران نشان دادند که IL-10 می‌تواند باعث مهار پاسخ ایمنی به یک پاتوژن گردد، و کاهش غلظت این سایتوکین می‌تواند باعث افزایش حساسیت سیستم ایمنی گردد. سایر تحقیقات نیز نشان دادند که IL-10 اثرات کاملاً محافظتی در مقابل بیماری‌های خود ایمنی دارد و در جوندگانی که به‌طور تجربی به بیماری اتوایمنی تیروئید مبتلا شده بودند تزریق IL-10 باعث کاهش وخامت و پیشرفت این بیماری گردید. این محققین خاطر نشان کردند که IL-10 نه تنها یک عامل جلوگیری کننده از بیماری خود ایمنی تیروئید است بلکه در جلوگیری از ایجاد و پیشرفت کلیه بیماری‌های خود ایمنی نقش مهمی‌بر عهده دارد، و پیشنهاد نمودند که استفاده از این سایتوکین به‌عنوان یک راه حل مناسب جهت جلوگیری از پیشرفت بیماری‌های خود ایمنی می‌باشد (۲۵). به‌علاوه، IL-10 با اثر سرکوبگری که بر روی سلول‌های Th1 دارد می‌تواند در مراحل شروع بیماری‌های اتوایمنی نقش مهاری خود را ایفا کند ونقش بسیار مهمی در کاهش وخامت بیماری هاشیماتوز (هیپوتیروئیدیسم) داشته باشد، یعنی نقشی محافظتی که در مراحل ابتدایی شروع بیماری بارزتر است (۲۵،۲۶). در تحقیق دیگری که Young و همکاران انجام دادند نشان دادند که در ابتدای ورود لنفوسیت‌ها به داخل غده تیروئید (مرحله اول آغاز بیماری خودایمنی) بیان و تولید IL-10 به‌شدت کاهش می‌یابد و همین امر باعث برداشته شدن مهار از روی سلول‌های Th1 شده و باعث شروع تولید سایتوکین‌های التهاب‌زا و پیشرفت بیماری خود ایمنی می‌شود (۲۶). با توجه به مطالعات گذشته و نتایج به‌دست آمده در بررسی حاضر که ید و تا حدودی یدورسدیم توانستند باعث کاهش سنتز IL-10 گردند، می‌توان نتیجه گرفت که مصرف زیادی ید ممکن است در جریان خون باعث کاهش تولید IL-10 از سلول‌های Th2 گردد و نقشی در شروع بیماری‌های خود ایمنی تیروئید در حضور یا عدم حضور یک پاتوژن داشته باشد.

نهایتاً، با توجه به این نکته که غده تیروئید در این تحقیق هیچ نقشی نداشته، نتایج ما برای اولین بار به این نکته

اشاره می‌نماید که ید اضافه به‌صورت‌های یدورسدیم و ید با ایجاد اختلال در ترشح سایتوکین‌ها حفاظتی IL-10 و TGF-β1 در جریان خون، نقش خود را در پیدایش خود ایمنی تیروئید ایفا می‌نمایند. از طرفی، اگرچه جامعه تحت مطالعه در این تحقیق بسیار کوچک بود، لیکن این نتایج می‌تواند راه‌گشائی برای مطالعات آینده در این زمینه باشد تا با بررسی‌های بیشتر بتوان به مکانیزیم دقیق‌تر در شروع بیماری‌های خود ایمنی تیروئیدی دست یافت.

سپاسگزاری

نویسندگان بدین وسیله از کلیه کسانی که با اهدای خون خود اجرای این تحقیق را میسر نمودند تشکر و قدردانی می‌نمایند. هزینه اجرائی این طرح (۸۸/۵٤) توسط معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمان پرداخت گردیده است، که جا دارد تشکر خود را از زحمات مسئولین این معاونت در تصویب این کار اعلام داریم.

The Effects of Excess Iodine on Immune System; an *in-vitro* study

Moshtaghi Kashanian GH., Ph.D.[1*], Hasannejad M., Ph.D.[2]

1. Associate Professor of Biochemistry, Physiology Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.
2. Associate Professor of Biochemistry, Afzalipour School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

* Corresponding author, e-mail: MoshtaghiKashanian@hotmail.com

(Received: 7 July 2010 Accepted: 24 Nov. 2010)

Abstract

Background & Aims: While iodine is an essential element for the synthesis of thyroid hormones, epidemiological studies have showed that excessive iodine intake leads to autoimmune thyroid diseases, with an unknown mechanism. Previous studies have showed disturbance in the circulating cytokines could lead to autoimmune diseases. To determine the role of iodine in cytokine production and development of thyroid autoimmune diseases, whole blood was stimulated with NaI (10 mm) and I_2 (0.5 mm).

Methods: After evaluation of laboratory results of 25 healthy females (aged 40-45 years), 10 subjects with matched results were selected. Ten ml of sterile heparinized peripheral blood was taken from each subject and immediately were divided into 6 groups (control, NaI stimulated, I_2 stimulated and matching groups in presence of standard stimulators (LPS 1μg/ml & PHA 10μg/ml). Three identical sets were setup to investigate cytokine production at 24, 48, and 72 hours. All samples were incubated in cell culture incubator (95% O2 and 5% CO2) and after elapse of appropriate time, plasma was separated from each well and kept at -70 ºC till the time of cytokines (IL-4, IL-10, INF-γ and TGF-β1) analysis.

Results: NaI could significantly decrease the production of TGF-β1at all time points (P<0.02), while it did not affect the level of other cytokines. On the other hand, I_2 significantly decreased the level of IL-4 and IL-10 (P<0.01). In the presence of LPS/PHA, NaI also reduced the production of IL-10 (P<0.02), while I_2 decreased the level of IL-4 as well as IL-10 (P<0.01).

Conclusion: For the first time, the results of this study indicated that high levels of NaI and I_2 may reduce the level of protective cytokines in circulation. Finally, since neither thyroid hormones nor thyroid gland had role in this process, it may be concluded that thyroid autoimmunity is initiated from high consumption of iodine leading to the imbalance in cytokine production.

Keywords: Autoimmune thyroid diseases, High iodine intake, Iodine, Sodium iodide, TGF-β1, INF-γ, IL-4, IL-10.

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2011; 18(3): 235-245

References

1. Hashemipour M., Siavash M, Amini M, Aminorroaya A, Rezvanian H, Kachuei A, et al. Goiter persistence after iodine replenishment, the potential role of selenium deficiency in goitrous schoolchildren of Semirom, Iran. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2008; 116(2): 75-9.

2. Najafi M., Khodaee G.H, Bahari M, Sabahi M, Farsi M.M, Kiani F. Neonatal thyroid screening in a mild iodine deficiency endemic area in Iran. *Indian J Med Sci* 2008; 62(3): 113-6.

3. Patrick L. Iodine: deficiency and therapeutic considerations. *Altern Med Rev* 2008; 13(2): 116-27.

4. Khaleeli A. A. Prevalence of thyroid antibodies in Shiraz, Iran, an area with iodine deficiency. *Postgrad Med J* 1981; 57(663): 23-7.

5. Azizi F, Mehran L Experiences in the prevention, control and elimination of iodine deficiency disorders: a regional perspective. *East Mediterr Health J* 2004; 10(6): 761-70.

6. Mirmiran P., Kimiagar M, Azizi F. Three-year survey of effects of iodized oil injection in schoolchildren with iodine deficiency disorders. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2002; 110(8): 393-7.

7. Aminorroaya A., Momenzadeh M, Hovsepian S, Haghighi S, Amini M. Thyroid autoantibodies in women with and without thyroid disorders in an iodine-replete area. *East Mediterr Health J* 2008; 14(2): 325-32.

8. Mooij P., de Wit H.J, Drexhage H.A. An excess of dietary iodine accelerates the development of a thyroid-associated lymphoid tissue in autoimmune prone BB rats. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 69(2): 189-98.

9. Teng W., Shan Z, Teng X, Guan H, Li Y, Teng D, et al. Effect of iodine intake on thyroid diseases in China. *N Engl J Med* 2006; 354(26): 2783-93.

10. Teng X., Shan Z, Teng W, Fan C, Wang H, Guo R. Experimental study on the effects of chronic iodine excess on thyroid function, structure, and autoimmunity in autoimmune-prone NOD.H-2h4 mice. *Clin Exp Med* 2009; 9(1): 51-9.

11. Corona G., Biagini C, Rotondi M, Bonamano A, Cremonini N, Petrone L, et al. Correlation between, clinical, biochemical, color Doppler ultrasound thyroid parameters, and CXCL-10 in autoimmune thyroid diseases. *Endocr J* 2008; 55(2): 345-50.

12. Ikeda Y., Yoshida W, Noguchi T, Asaba K, Nishioka T, Takao T, et al. Lack of association between IL-12B gene polymorphism and autoimmune thyroid disease in Japanese patients. *Endocr J* 2004; 51(6): 609-13.

13. Schuppert F., Rambusch E, Kirchner H, Atzpodien J, Kohn L.D, von zur Muhlen A. Patients treated with interferon-alpha, interferon-beta, and interleukin-2 have a different thyroid autoantibody pattern than patients suffering from endogenous autoimmune thyroid disease. *Thyroid* 1997; 7(6): 837-42.

14. Marazuela M., Garcia-Lopez M.A, Figueroa-Vega N, de la Fuente H, Alvarado-Sanchez B, Monsivais-Urenda A, et al. Regulatory T cells in human autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(9): 3639-46.

15. Nielsen C. H., Hegedus L, Rieneck K, Moeller A.C, Leslie R.G, Bendtzen K. Production of interleukin (IL)-5 and IL-10 accompanies T helper cell type 1 (Th1) cytokine responses to a major thyroid self-antigen, thyroglobulin, in health and autoimmune thyroid disease. *Clin Exp Immunol* 2007; 147(2): 287-9.

16. Yu S., Fang Y, Sharp G.C, Braley-Mullen H. Transgenic expression of TGF-{beta} on thyrocytes inhibits development of spontaneous autoimmune thyroiditis and increases regulatory T Cells in thyroids of NOD.H-2h4 Mice. *J Immunol* 2010; 184(9): 5352-9.

17. Braley-Mullen H., Chen K, Wei Y, Yu S. Role of TGFbeta in development of spontaneous autoimmune thyroiditis in NOD.H-2h4 mice. J Immunol 2001; 167(12): 7111-8.

18. Kerimovic-Morina D. Autoimmune thyroid disease and associated rheumatic disorders. *Srp Arh Celok Lek* 2005; 133 Suppl 1: 55-60.

19. Yabuta T., Ito Y, Hirokawa M, Fukushima M, Inoue H, Tomoda C, et al. Preoperative administration of excess iodide increases thyroid volume of patients with Graves' disease. *Endocr J* 2009; 56(3): 371-5.

20. Horwitz D. A., Zheng S.G, Gray G.D. The role of the combination of IL-2 and TGF-beta or IL-10 in the generation and function of CD4+ CD25+ and CD8+ regulatory T cell subsets. *J Leukoc Biol* 2003; 74(4): 471-8.

21. Cohen M.M Jr. TGF beta/Smad signaling system and its pathologic correlates. *Am J Med Genet A* 2003; 116 A (1): 1-10.

22. O'Garra A., Vieira P.L, Vieira P, Goldfeld A.E. IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage." *J Clin Invest* 2004; 114(10): 1372-8.

23. Seddon B, Mason D. Regulatory T cells in the control of autoimmunity: the essential role of transforming growth factor beta and interleukin 4 in the prevention of autoimmune thyroiditis in rats by peripheral CD4(+)CD45RC- cells and CD4(+)CD8(-) thymocytes. *J Exp Med* 1999; 189(2): 279-88.

24. Atkins M B., Mier J.W, Parkinson D.R, Gould J.A, Berkman E.M, Kaplan M.M. Hypothyroidism after treatment with interleukin-2 and lymphokine-activated killer cells. *N Engl J Med* 1988; 318(24): 1557-63.

25. de la Vega J. R., Vilaplana J.C., Biro A, Hammond L, Bottazzo GF, Mirakian R. IL-10 expression in thyroid glands: protective or harmful role against thyroid autoimmunity? *Clin Exp Immunol* 1998; 113(1): 126-35.

26. Young D. A., Lowe L.D, Booth S.S, Whitters M.J, Nicholson L, Kuchroo V.K, et al. IL-4, IL-10, IL-13, and TGF-beta from an altered peptide ligand-specific Th2 cell clone down-regulate adoptive transfer of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2000; 164(7): 3563-72.