

## The relationship between the cytokines and hs-CRP levels in children with autism and their comparison with healthy ones

Soleyman Ansari Kolachahi<sup>1</sup>, Zahra Hojjati Zidashti<sup>2</sup>, Alireza Elmieh<sup>3</sup>, Elham Bidabadi<sup>4</sup>, Jafar Filli<sup>5</sup>

<sup>1</sup>PhD Student, Department of Physical Education, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

<sup>2</sup>Associate Professor, Department of Physical Education, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

<sup>3</sup>Assistant Professor, Department of Physical Education, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht Branch, Rasht, Iran

<sup>4</sup>Associate Professor, Department of child neurology, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

<sup>5</sup>Assistant Professor, Department of Psychiatry, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

### Abstract

**Background:** Previous studies suggest that dysregulation of the immune system is involved in the pathophysiology of autism spectrum disorders (ASD). The aim of the present study was to investigate some pre-and anti-inflammatory cytokines in the serum of children with autism and healthy children and to determine the correlation between these cytokines and hs-CRP.

**Materials and methods:** Serum levels of IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  cytokines and hs-CRP were assessed in twenty boys with autism spectrum disorder, aged 6 to 14 years, and 20 healthy controls. To analyze the data, multivariate analysis of variance analysis was used to compare the variables in the two groups, and Pearson correlation coefficient was utilized to assess the relationship between the levels of the cytokines and hs-CRP at the level of 0.05. SPSS software version 21 was used.

**Results:** The results showed that the level of all cytokines as well as hs-CRP in the autistic group was significantly higher than normal children ( $p < 0.001$ ), but there was no statistically significant relationship between cytokines and hs-CRP levels in children with autism ( $p > 0.05$ ).

**Conclusion:** The results suggest that abnormal immune responses such as increased levels of cytokines can be served as one of the biological markers of ASD.

**Keywords:** Autism spectrum disorder, C-reactive protein, Inflammatory cytokines, Immune system.

**Cited as:** Ansari Kolachahi S, Hojjati Zidashti Z, Elmieh A, Bidabadi E, Filli J. The relationship between the cytokines and hs-CRP levels in children with autism and their comparison with healthy ones. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2019; 29(3): 240-248.

**Correspondence to:** Zahra Hojjati Zidashti

**Tel:** +98 9111358572

**E-mail:** zahrahojjatizidashti@gmail.com

**ORCID ID:** 0000-0002-7058-1416

**Received:** 20 Nov 2018; **Accepted:** 31 Dec 2018

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی  
دوره ۲۹، شماره ۳، پاییز ۹۸، صفحات ۲۴۰ تا ۲۴۸

## ارتباط سطح سایتوکین‌ها و hs-CRP در کودکان مبتلا به اوتیسم و مقایسه آنها با کودکان سالم

سلیمان انصاری کلاچاهی<sup>۱</sup>، زهرا حجتی ذی‌دشتی<sup>۲</sup>، علیرضا علمیه<sup>۳</sup>، الهام بیدآبادی<sup>۴</sup>، جعفر فیلی<sup>۵</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه تربیت‌بدنی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران  
<sup>۲</sup> دانشیار، گروه تربیت‌بدنی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران  
<sup>۳</sup> استادیار، گروه تربیت‌بدنی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران  
<sup>۴</sup> دانشیار، گروه اعصاب اطفال، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران  
<sup>۵</sup> استادیار گروه اعصاب و روان، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

### چکیده

**سابقه و هدف:** مطالعات پیشین نشان می‌دهند که اختلال در سیستم ایمنی در پاتوفیزیولوژی اختلالات طیف اوتیسم (ASD) دخالت دارد. هدف از پژوهش حاضر، بررسی برخی سایتوکین‌های پیش و ضدالتهابی در سرم خون کودکان اوتیسم و کودکان بهنجار و بررسی همبستگی میزان این سایتوکین‌ها با hs-CRP بود.

**روش بررسی:** سطح سرمی سایتوکین‌های  $IL-1\beta$ ،  $IL-1RA$ ،  $IL-6$ ،  $IL-10$  و  $TNF-\alpha$  و hs-CRP در بیست پسر دارای ASD در دامنه سنی ۶ تا ۱۴ سال و ۲۰ پسر هم‌سن سالم اندازه‌گیری شد. برای تحلیل داده‌ها از آزمون تحلیل واریانس چند متغیری برای مقایسه متغیرهای مورد پژوهش در دو گروه، و از ضریب همبستگی پیرسون برای ارزیابی ارتباط بین سطوح سایتوکین‌های مذکور و hs-CRP در سطح  $p < 0.05$  و نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ استفاده شد.

**یافته‌ها:** سطح همه سایتوکین‌ها و همچنین hs-CRP در گروه کودکان اوتیسم به طور معنی‌داری بالاتر از کودکان بهنجار بود ( $p < 0.001$ )، اما رابطه آماری معنی‌داری بین بالا بودن سایتوکین‌ها و بالا بودن میزان hs-CRP در کودکان مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان می‌دهد که پاسخ‌های ایمنی غیرطبیعی مانند افزایش سطوح سایتوکین‌ها می‌تواند به‌عنوان یکی از نشانگرهای بیولوژیکی ASD استفاده شوند.

**واژگان کلیدی:** اختلال طیف اوتیسم، پروتئین واکنشی C، سایتوکین‌های التهابی، سیستم ایمنی.

### مقدمه

می‌یابند (۱). دو ویژگی اصلی ASD، نقص در تعامل و ارتباطات اجتماعی و رفتارهای تکراری و کلیشه‌ای است که اغلب بر جنبه‌های مختلف عملکرد روزانه، از جمله ویژگی‌های شناختی و حسی، گفتار و مهارت‌های بازی تاثیر می‌گذارند (۱). (۲). این کودکان همچنین ممکن است اختلالاتی از جمله بیش‌فعالی و نارسایی توجه، اضطراب احساسی، تنیدگی، رشد نامتناسب، آسیب‌های روانی، اختلال وسواس فکری و تشنج را تجربه کنند (۳). تقریباً ۱ نفر از هر ۶۸ کودک در آمریکا و ۱

اختلالات طیف اوتیسم (Autism spectrum disorders) (ASDs)، اختلالات جدید نوروبیولوژیکی هستند که در سه سال اول زندگی ظاهر می‌شوند و تا اواخر دوران زندگی ادامه

آدرس نویسنده مسئول: رشت، دانشگاه آزاد اسلامی گروه تربیت‌بدنی، زهرا حجتی ذی‌دشتی

(email: zarahojjatizidashti@gmail.com)

ORCID ID: 0000-0002-7058-1416

تاریخ دریافت مقاله: ۹۷/۸/۲۹

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۷/۱۰/۱۰

به عنوان تنظیم کننده بازخورد منفی در پاسخ به افزایش سطح IL-1 $\beta$  در افراد اوتیسم افزایش یافت (۹).

برخی دیگر از سایتوکین های پیش التهابی مانند TNF- $\alpha$  و IL-6 در پاسخ ایمنی سلول دخالت دارند و توسط مغز به عنوان سیگنال های مولکولی بیماری شناخته می شوند (۱۱). TNF- $\alpha$  یک تنظیم کننده مرکزی التهاب است (۱۵) و IL-6 اغلب به عنوان نشانگر برای فعال سازی سیستمیک سایتوکین های پیش التهابی استفاده می شود. مانند برخی سایتوکین های دیگر، IL-6 دارای خواص پیش و ضد التهابی است و مانع تولید TNF- $\alpha$  و IL-1 توسط ماکروفاژها می شود (۱۶). نتیجه تحقیق Li و همکارانش در نمونه های پس از مرگ نشان داده است که سطح پروتئین TNF- $\alpha$  و IL-6 در مغز افراد مبتلا به اوتیسم نسبت به گروه شاهد به میزان قابل توجهی بیشتر بود (۱۷). از سوی دیگر، در یک مطالعه نشان داده شد که اختلاف سطوح پلاسمایی TNF- $\alpha$  بین کودکان مبتلا به اوتیسم و عادی به سطح معنی دار آماری نمی رسد (۹). سینگ نیز در سال ۱۹۹۶ نشان داد که TNF- $\alpha$  پلاسمای، در بین افراد اوتیسم و افراد سالم تفاوت معنی داری ندارد (۱۸).

مهم ترین سایتوکین ضد التهابی که در پاسخ ایمنی بدن انسان یافت می شود، IL-10 است. این سایتوکین به شدت مانع تولید IL-1 $\beta$ ، TNF- $\alpha$ ، IL-6، خود IL-10 و برخی از سایتوکین های دیگر می شود. اثرات مہاری آن بر تولید IL-1 و TNF برای فعالیت های ضد التهابی آن بسیار مهم است، زیرا این سایتوکین ها اغلب فعالیت های هم افزایی بر مسیرها و فرآیندهای التهابی دارند (۱۹). افزایش سطح IL-10 همراه با TGF- $\beta$  و IL-4 می تواند موجب کاهش التهاب شود (۱۱). یک مطالعه در مورد کودکان اوتیسم در سن ۱۴-۲ سال نشان داد که تولید IL-10 توسط سلول های تک هسته ای خون محیطی (peripheral blood mononuclear cells) (PBMC) تحریک شده با اینترلوکین-۱۸، در افراد مبتلا به اوتیسم پایین تر از افراد عادی بود؛ همچنین شوارتز و همکاران، تغییر سطوح اینترلوکین-۱۰ را در مردان مبتلا به اوتیسم گزارش دادند (۱۶). با این حال، نتایج یک مطالعه مقایسه ای بین ۲۰ کودک مبتلا به اختلال طیف اوتیسم و افراد سالم نشان داد که هیچ افزایش جبرانی در سایتوکین تنظیمی IL-10 وجود ندارد (۲۰).

نشانگر مفید دیگر برای ارزیابی نتایج درمان در بیماران مبتلا به اختلال طیف اوتیسم، سطوح پروتئین واکنشی C (-) C (reactive protein) (CRP) است (۲۱). CRP، عضوی از خانواده پنتراکسین، یک پروتئین مهم فاز حاد و یک نشانگر بالینی عفونت و آسیب بافت است (۲۲، ۲۳). مقدار بسیار کم

نفر از هر ۱۵۰ کودک در ایران مبتلا به اختلال اوتیسم تشخیص داده می شوند (۱، ۴) و پسران ۴ تا ۱۰ برابر بیشتر از دختران مبتلا می شوند (۵).

علاوه بر علائم اصلی، مشکلات فراوانی شامل اختلال خواب، صرع، عدم تحمل غذا، اختلال در دستگاه گوارش، اختلال خلقی و رفتارهای پر خاشگرانه و خود آسیبزا (۶) و اختلالات سیستمیک مانند اختلالات حرکتی، مشکل در نیمرخ ساختاری و قامتی، راه رفتن، تعادل و تحرک مفصل (۷) با ASD همراه هستند. اگرچه علت ASD هنوز مشخص نیست، احتمالاً شامل تعاملات پیچیده بین عوامل ژنتیکی، اپیژنتیکی و محیطی می شود (۸). تحقیقات اخیر نشان می دهند که اختلال در سیستم ایمنی در پاتوژنز طیف اوتیسم دخالت دارد. در افراد مبتلا به اوتیسم، تغییرات در سطوح سایتوکین های محیطی، از جمله اینترلوکین-۱ بتا (IL-1 $\beta$ )، اینترلوکین-۶ (IL-6) (۸، ۹)، آنتاگونیست گیرنده اینترلوکین-۱ (IL-1RA) (IL-1 receptor antagonist) (۹)، عامل تومور نکروز آلفا (TNF- $\alpha$ ) و اینترلوکین-۱۰ (IL-10) (۱۰) مشاهده شده است. بنابراین تعجب آور نیست که این سایتوکین ها به عنوان نشانگر پاسخ غیرطبیعی در افراد مبتلا به اوتیسم به کار روند. از سوی دیگر، احتمالاً سایتوکین ها از طریق تاثیر بر عملکرد انتقال دهنده های عصبی، فعالیت عصب-غدد درون ریز، نوروزنر و تغییرات در مغز بر رفتار موثر باشند (۱۱). به عنوان مثال، افزایش سطح IL-1 $\beta$  و IL-6 می تواند بر شدت رفتارهای کلیشه ای تاثیر بگذارد (۸). علاوه بر این، هرگونه اختلال در تنظیم IL-1 $\beta$  در اختلالات حافظه و یادگیری دخالت دارد (۱۲).

سایتوکین ها پروتئین هایی هستند که شدت، مدت و ویژگی پاسخ ایمنی را کنترل می کنند؛ همچنین با سیستم عصبی تعامل دارند و در رشد و حفظ عصبی نقش دارند (۱۲). IL-1 $\beta$ ، یک سایتوکین پیش التهابی است که از منابع مختلفی از جمله مونوسیت ها، ماکروفاژها، سلول های دندریتی، لکوسیت های نوتروفیل و سلول های اندوتلیال ایجاد می شود (۹)، به وسیله مغز در پاسخ به محرک های التهابی محیطی تولید می شود و به آرامی به سمت مغزی سد خونی-مغزی با انتقال حجم منتشر می شود (۱۳). در یک مطالعه، افزایش قابل توجهی در سطوح پلاسمایی IL-1 $\beta$  در کودکان ۲ تا ۵ ساله مبتلا به اوتیسم (۸) گزارش شده است. همچنین نتایج پژوهش دیگری نشان داد که غلظت های پلاسمایی IL-1 $\beta$  و IL-1RA در افراد مبتلا به اوتیسم در مقایسه با مقادیر مربوط به هم تاییان سالم به طور قابل توجهی بیشتر است (۹). علاوه بر این، افزایش سطح پلاسمایی IL-1RA در کودکان اوتیسم (۱۴) یافت شده است، که نشان می دهد احتمالاً IL-1RA

کودکان حاضر در مطالعه با والدین خود زندگی می‌کردند. پرسش‌نامه‌ها برای جمع‌آوری اطلاعات مربوط به جمعیت‌شناسی، تاریخچه پزشکی و علائم بالینی همه کودکان استفاده شد. شرایط ورود شرکت‌کننده‌ها شامل ۱- پسر بودن، ۲- دامنه سنی ۱۴-۶ سال، ۳- تایید وجود ASD توسط روان‌پزشک متخصص با استفاده از پرسشنامه DSM-5 و ۴) نداشتن ناتوانی همراه بود.

برای جمع‌آوری داده‌ها در این پژوهش از فرم رضایت‌نامه کتبی، فرم اطلاعات فردی، دستگاه سکا (جهت اندازه‌گیری قد و وزن)، مقیاس ارزیابی رتبه‌بندی اوتیسم گیلیام-۲ (گیلیام، ۲۰۰۶) جهت تعیین شاخص اوتیسم، کیت آزمایشگاهی دیاکلون (ساخت کشور فرانسه) و کیت آزمایشگاهی زل‌بابو (ساخت کشور آلمان) جهت اندازه‌گیری اینترلوکین‌ها و کیت‌های آزمایشگاهی مخصوص اندازه‌گیری ویتامین D و hs-CRP استفاده شد.

برای اندازه‌گیری قد و وزن شرکت‌کنندگان، از دستگاه سکا (SECA) ساخت کشور آلمان استفاده شد.

دومین ویرایش مقیاس اندازه‌گیری اوتیسم گیلیام (Gilliam Gilliam-2) (Autism Rating Scale-2) ابزار استاندارد شده‌ای است که برای ارزیابی اشخاص اوتیسم و دیگر اختلالات رفتاری شدید طراحی شده است. گارز-۲، در سال ۲۰۰۶ توسط گیلیام طراحی شده و برای اشخاص ۳ تا ۲۲ ساله مناسب است. این ابزار مشکلات کودکان را در سه خرده‌مقیاس رفتارهای کلیشه‌ای، ارتباطات و تعامل اجتماعی مورد ارزیابی قرار می‌دهد. این مقیاس دارای ۴۲ سوال است (هر خرده‌مقیاس ۱۴ سوال) و نمرات کودک در هر خرده‌مقیاس جداگانه محاسبه می‌شود. نمره‌های ترکیبی در این خرده‌مقیاس‌ها، یک امتیاز نسبت به اوتیسم را به دست می‌دهند که امتیاز کلی را برای ارزیابی احتمال ابتلا به اوتیسم و میزان شدت آن ارائه می‌کند (۲۵).

اندازه‌گیری‌های آزمایشگاهی در آزمایشگاه رازی رشت انجام شد و در هر روز به ۵ نفر فرزند اوتیسم (هر یک ربع به یک فرزند اوتیسم نوبت داده شد تا اگر بیقراری یا ناآرامی داشتند با فرصت بتوان آنها را آرام کرد و کودک دیگر اوتیسم در معرض این ناآرامی‌ها قرار نگیرد) و ۵ نفر کودک عادی نوبت داده شد. تمام اندازه‌گیری‌ها بین ساعات ۷ تا ۹ صبح به صورت ۱۲ ساعت ناشتا و با حضور والدین و سه نفر خونگیر سابقه به صورت نمونه خون وریدی بازویی به میزان ۵ میلی‌لیتر با کمک سرنگ در حال نشسته بر روی صندلی انجام شد. سپس سرم خون جمع‌آوری شده در اسرع وقت با استفاده از سانتریفوژ در دور ۳۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد جداسازی شد و تمام سرم‌ها به منظور به حداقل رساندن ضریب تغییرات بین

CRP توسط آزمون hs-CRP (high sensitivity) با استفاده از آزمون ایمونوفلومتری قابل تشخیص است (۲۴). در حالی که روش‌های مرسوم می‌توانند تنها ۱۰۰۰-۱۰ میلی‌گرم در لیتر CRP را تشخیص دهند، آزمایش حساسیت بالا می‌تواند ۰/۵ تا ۱۰ میلی‌گرم در لیتر این پروتئین را تشخیص دهد. خاکزاد و همکارانش مقادیر hs-CRP را بین ۳۹ فرد اوتیسم و ۳۰ فرد سالم مقایسه کردند. نتایج نشان داد که میانگین غلظت hs-CRP در کودکان مبتلا به اوتیسم به طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود و همبستگی مثبت بین غلظت hs-CRP و شدت اوتیسم وجود داشت. بنابراین، برخی ممکن است hs-CRP را به عنوان عامل پیش‌آگهی یا پیش‌بینی‌کننده برای اوتیسم در نظر بگیرند، اما هنوز نقش این پروتئین در کودکان مبتلا به اوتیسم بحث‌برانگیز است (۲۱).

بررسی مطالعات پیشین حاکی از آن است که در ایران، هیچ مطالعه‌ای تاکنون به بررسی سطوح سایتوکین‌های التهابی در کودکان اختلال طیف اوتیسم نپرداخته است. به‌علاوه، بر اساس آخرین گزارش‌ها، هنوز تحقیقی در زمینه بررسی ارتباط سطوح سایتوکین‌ها و hs-CRP در کودکان مبتلا به اختلال طیف اوتیسم اجرا نشده است. از این رو مطالعه حاضر با اهداف زیر اجرا شد: الف) ارزیابی سطوح سرمی چند سایتوکین پیش و ضد التهابی ( $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $IL-1RA$ ,  $TNF-\alpha$  و  $IL-10$ ) در پسران ۶ تا ۱۴ ساله مبتلا به اختلال طیف اوتیسم و مقایسه میزان سطوح سرمی این سایتوکین‌ها در کودکان مبتلا به اوتیسم با کنترل‌های نرمال سالم و هم‌جنس، ب) مقایسه سطح سرمی hs-CRP بین کودکان ASD و کودکان عادی، و در نهایت ج) هدف فرعی این مطالعه، بررسی این است که آیا ارتباطی بین سطوح hs-CRP و سایتوکین‌های مذکور در کودکان مبتلا به اوتیسم وجود دارد.

## مواد و روشها

مطالعه حاضر از نوع تحقیق مقطعی با هدف توصیف، مقایسه و ارتباط‌سنجی بین متغیرهای تحقیق بود. جامعه آماری این پژوهش، شامل ۹۶ دختر و پسر مبتلا به ASD عضو موسسه خیریه انجمن اوتیسم گیلان و دانش‌آموزان همتای سالم ساکن شهرستان رشت بودند که از بین این جامعه، ۲۰ پسر مبتلا به اوتیسم و ۲۰ پسر سالم (با دامنه سنی ۱۴-۶ سال)، داوطلب حضور در تحقیق شدند. در ابتدا، در یک جلسه، هدف از اجرای این مطالعه برای والدین همه کودکان تشریح شد. سپس، قبل از شرکت در مطالعه، رضایت آگاهانه توسط والدین داده شد. همه

اسمیرن (K-S Z) برای بررسی نرمال بودن توزیع متغیرها گزارش شده‌اند. نتایج جدول ۲ نشان می‌دهد که آماره Z آزمون کالموگروف - اسمیرن برای تمامی متغیرها معنی‌دار نیست؛ بنابراین توزیع متغیرها نرمال است.

**جدول ۲.** شاخص‌های توصیفی متغیرهای پژوهش و نتایج بررسی نرمال بودن توزیع متغیرها (تعداد در هر گروه = ۲۰)

| متغیر  | گروه   | میانگین | انحراف استاندارد | K-S Z | p    |
|--------|--------|---------|------------------|-------|------|
| IL-1β  | اوتیسم | ۷/۴۳    | ۱/۶۰             | ۰/۴۸  | ۰/۹۷ |
|        | عادی   | ۲/۹۷    | ۰/۵۳             | ۰/۶۸  | ۰/۷۴ |
| IL-6   | اوتیسم | ۵/۹۸    | ۳/۷۵             | ۱/۰۷  | ۰/۱۹ |
|        | عادی   | ۱/۱۴    | ۰/۴۵             | ۱/۲۹  | ۰/۰۷ |
| IL-1RA | اوتیسم | ۹۷/۷۵   | ۴۷/۳۲            | ۱/۱۵  | ۰/۱۴ |
|        | عادی   | ۱۷/۰۶   | ۱۲/۳۳            | ۰/۸۲  | ۰/۵۰ |
| TNF-α  | اوتیسم | ۱۱/۰۹   | ۲/۸۳             | ۱/۲۸  | ۰/۰۷ |
|        | عادی   | ۲/۲۷    | ۰/۸۴             | ۰/۵۵  | ۰/۹۱ |
| IL-10  | اوتیسم | ۷/۳۱    | ۱/۸۳             | ۰/۵۳  | ۰/۹۳ |
|        | عادی   | ۲/۳۶    | ۰/۷۶             | ۰/۹۸  | ۰/۲۸ |
| hs-CRP | اوتیسم | ۳/۷۸    | ۱/۷۷             | ۰/۷۱  | ۰/۶۹ |
|        | عادی   | ۰/۸۷    | ۰/۵۴             | ۰/۶۸  | ۰/۷۴ |

برای بررسی تفاوت کودکان مبتلا به اوتیسم و کودکان عادی در سطوح سرمی سایتوکین‌های پیش و ضد التهابی (IL-1β, IL-6, IL-1RA, TNF-α, IL-10) و همچنین hs-CRP از تحلیل واریانس چندمتغیری یک راه استفاده شد. در جدول ۳، نتایج آزمون تحلیل واریانس چند متغیری گزارش شده است. با توجه به جدول ۳، آماره F تحلیل واریانس چند متغیری بررسی تفاوت گروه‌ها در سایتوکین‌های پیش و ضد التهابی و hs-CRP (78/94) در سطح ۰/۰۰۱ معنی‌دار است. بنابراین می‌توان گفت که بین این دو گروه در سایتوکین‌های پیش و ضد التهابی و hs-CRP تفاوت معنی‌داری وجود دارد.

**جدول ۳.** نتایج آزمون تحلیل واریانس چندمتغیری مربوط به سایتوکین‌های پیش و ضد التهابی و hs-CRP در بین گروه‌ها

| آزمون             | مقدار F | درجه آزادی ۱ | درجه آزادی ۲ | سطح معنی داری |
|-------------------|---------|--------------|--------------|---------------|
| اثر پیلانی        | ۰/۹۴    | ۶            | ۳۳           | ۰/۰۰۱         |
| لامدای ویکلز      | ۰/۰۵    | ۶            | ۳۳           | ۰/۰۰۱         |
| اثر هوتلینگ       | ۱۷/۲۳   | ۶            | ۳۳           | ۰/۰۰۱         |
| بزرگترین ریشه روی | ۱۷/۲۳   | ۶            | ۳۳           | ۰/۰۰۱         |

آزمایش تا روز انجام یک آزمایش واحد بر روی تمام نمونه‌ها، در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

اندازه‌گیری سایتوکین‌ها با استفاده از کیت‌های مخصوص اینترلوکین-۶، اینترلوکین-۱۰، اینترلوکین TNF-α و اینترلوکین-۱ β-دیاکلون (Diacclone) ساخت کشور فرانسه و برای اندازه‌گیری اینترلوکین-۱ ra از کیت زلبایو (Zellbio) ساخت کشور آلمان بر اساس دستورات شرکت تولیدکننده و روش الایزا استفاده شد. حساسیت حداقل محدوده کشف برای سایتوکین-های مختلف به این شرح بود: IL-1β (۶/۵) پیکوگرم بر میلی‌لیتر، IL-1RA (۵) نانوگرم بر میلی‌لیتر، IL-6 (۲) پیکوگرم بر میلی‌لیتر، TNF-α (۸) پیکوگرم بر میلی‌لیتر و IL-10 (۴/۹) پیکوگرم بر میلی‌لیتر.

برای اندازه‌گیری hs-CRP سرم از روش الایزا، کیت شرکت پارس‌آزمون ساخت کشور ایران استفاده شد.

برای تحلیل داده‌های به‌دست آمده از این پژوهش، از روش‌های آمار توصیفی مانند میانگین و انحراف استاندارد، و در سطح استنباطی پس از اطمینان از توزیع طبیعی داده‌ها و همگنی واریانس‌ها، از آزمون تحلیل واریانس چند متغیری برای مقایسه متغیرهای مورد پژوهش در دو گروه، و از ضریب همبستگی پیرسون برای ارزیابی ارتباط بین سطوح سایتوکین‌های مذکور و hs-CRP در سطح معنی‌دار کمتر از ۰/۰۵ و نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ استفاده شد.

## یافته‌ها

در جدول ۱، شاخص‌های توصیفی سن، قد، وزن و BMI در گروه کودکان دارای ASD و کودکان سالم گزارش شده است.

**جدول ۱.** مشخصات فردی کودکان اوتیسم و کودکان سالم (تعداد در هر گروه = ۲۰)

| متغیر                | گروه   | کمینه | بیشینه | میانگین |
|----------------------|--------|-------|--------|---------|
| سن                   | اوتیسم | ۶     | ۱۴     | ۱۰/۳۰   |
|                      | عادی   | ۶     | ۱۴     | ۱۰/۳۰   |
| قد                   | اوتیسم | ۱/۳۸  | ۱/۶۸   | ۱/۴۹    |
|                      | عادی   | ۱/۳۵  | ۱/۶۹   | ۱/۴۷    |
| وزن                  | اوتیسم | ۴۰    | ۸۲     | ۵۸/۲۰   |
|                      | عادی   | ۳۹    | ۶۹     | ۴۹/۴۵   |
| نمایه توده بدن (BMI) | اوتیسم | ۲۰/۵۵ | ۳۰/۶۳  | ۲۶/۰۵   |
|                      | عادی   | ۱۶/۸۵ | ۲۷/۳۹  | ۲۲/۷۴   |

در جدول ۲، شاخص‌های توصیفی متغیرهای پژوهش به تفکیک گروه‌ها و همچنین نتایج آزمون کالموگروف-

جدول ۵، میانگین کودکان مبتلا به اوتیسم در سایتوکین‌های پیش و ضدالتهابی ( $IL-1\beta$ ،  $IL-6$ ،  $IL-1RA$ ،  $TNF-\alpha$ ،  $IL-10$ ) و hs-CRP به ترتیب ۷/۴۳، ۵/۹۸، ۹۷/۷۵، ۱۱/۰۹، ۷/۲۱ و ۳/۷۸ است که به صورت معنی-داری بیشتر از میانگین کودکان سالم است. میانگین کودکان سالم در این شاخص‌ها به ترتیب ۲/۹۷، ۱/۱۴، ۱۷/۰۶، ۲/۲۷، ۲/۳۶ و ۰/۸۷ است.

برای بررسی رابطه سایتوکین‌ها و سطح سرمی hs-CRP در کودکان مبتلا به اوتیسم از ضریب همبستگی گشتاوری پیرسون استفاده شد. در جدول ۶ ماتریس همبستگی رابطه

برای بررسی تفاوت گروه‌ها در سایتوکین‌های پیش و ضدالتهابی در جدول ۴ نتایج تحلیل واریانس یک راهه گزارش شده است. با توجه به جدول ۴، آماره F برای سایتوکین‌های پیش و ضدالتهابی ( $IL-1\beta$ ،  $IL-6$ ،  $IL-1RA$ ،  $TNF-\alpha$ ،  $IL-10$ ) و hs-CRP به ترتیب ۱۳۸/۷۹، ۳۲/۷۱، ۵۴/۴۳، ۱۷۷/۷۹، ۱۱۹/۱۰ و ۴۸/۶۹ است که در سطح ۰/۰۰۱ معنی‌دار است. این یافته نشان می‌دهد بین گروه‌ها در این متغیرها تفاوت معنی‌داری وجود دارد.

در جدول ۵، نتایج مقایسه میانگین گروه‌ها در سایتوکین‌های پیش و ضدالتهابی گزارش شده است. با توجه به

جدول ۴. نتایج تحلیل واریانس یک‌راهه تفاوت گروه‌ها در سایتوکین‌های پیش و ضد التهابی

| مولفه        | SS گروه  | SS خطا   | MS گروه  | MS خطا  | F      | p     |
|--------------|----------|----------|----------|---------|--------|-------|
| $IL-1\beta$  | ۱۹۹/۳۱   | ۵۴/۵۷    | ۱۹۹/۳۱   | ۱/۴۳    | ۱۳۸/۷۹ | ۰/۰۰۱ |
| $IL-6$       | ۲۳۴/۱۱   | ۲۷۱/۹۵   | ۲۳۴/۱۱   | ۷/۱۵    | ۳۲/۷۱  | ۰/۰۰۱ |
| $IL-1RA$     | ۶۵۱۰۸/۷۶ | ۴۵۴۵۴/۲۹ | ۶۵۱۰۸/۷۶ | ۱۱۹۶/۱۶ | ۵۴/۴۳  | ۰/۰۰۱ |
| $TNF-\alpha$ | ۷۷۷/۶۵   | ۱۶۶/۲۰   | ۷۷۷/۶۵   | ۴/۳۷    | ۱۷۷/۷۹ | ۰/۰۰۱ |
| $IL-10$      | ۲۳۴/۷۸   | ۷۴/۹۱    | ۲۳۴/۷۸   | ۱/۹۷    | ۱۱۹/۱۰ | ۰/۰۰۱ |
| hs-CRP       | ۸۴/۳۶    | ۶۵/۸۳    | ۸۴/۳۶    | ۱/۷۳    | ۴۸/۶۹  | ۰/۰۰۱ |

جدول ۵. نتایج مقایسه میانگین گروه‌ها در سایتوکین‌های پیش و ضدالتهابی

| متغیر        | گروه   | میانگین | تفاوت میانگین | خطای استاندارد | سطح معنی‌داری |
|--------------|--------|---------|---------------|----------------|---------------|
| $IL-1\beta$  | اوتیسم | ۷/۴۳    | ۴/۴۶          | ۰/۳۷           | ۰/۰۰۱         |
|              | عادی   | ۲/۹۷    |               |                |               |
| $IL-6$       | اوتیسم | ۵/۹۸    | ۴/۸۳          | ۰/۸۴           | ۰/۰۰۱         |
|              | عادی   | ۱/۱۴    |               |                |               |
| $IL-1RA$     | اوتیسم | ۹۷/۷۵   | ۸۰/۶۹         | ۱۰/۹۳          | ۰/۰۰۱         |
|              | عادی   | ۱۷/۰۶   |               |                |               |
| $TNF-\alpha$ | اوتیسم | ۱۱/۰۹   | ۸/۸۱          | ۰/۶۶           | ۰/۰۰۱         |
|              | عادی   | ۲/۲۷    |               |                |               |
| $IL-10$      | اوتیسم | ۷/۲۱    | ۴/۸۴          | ۰/۴۴           | ۰/۰۰۱         |
|              | عادی   | ۲/۳۶    |               |                |               |
| hs-CRP       | اوتیسم | ۳/۷۸    | ۲/۹۰          | ۰/۴۱           | ۰/۰۰۱         |
|              | عادی   | ۰/۸۷    |               |                |               |

جدول ۶. ماتریس همبستگی R بین سایتوکین‌های پیش و ضدالتهابی و سطح سرمی hs-CRP در کودکان مبتلا به اوتیسم

| شماره | متغیر        | ۱     | ۲     | ۳     | ۴     | ۵    | ۶ |
|-------|--------------|-------|-------|-------|-------|------|---|
| ۱     | $IL-1\beta$  | ۱     |       |       |       |      |   |
| ۲     | $IL-6$       | ۰/۲۴  | ۱     |       |       |      |   |
| ۳     | $IL-1RA$     | ۰/۲۳  | -۰/۱۳ | ۱     |       |      |   |
| ۴     | $TNF-\alpha$ | -۰/۰۱ | ۰/۰۹  | ۰/۰۱  | ۱     |      |   |
| ۵     | $IL-10$      | -۰/۰۳ | ۰/۰۳  | ۰/۱۱  | -۰/۱۰ | ۱    |   |
| ۶     | hs-CRP       | -۰/۰۸ | ۰/۱۹  | -۰/۲۲ | -۰/۰۷ | ۰/۲۶ | ۱ |

بین این متغیرها گزارش شده‌اند. با توجه به جدول ۶، رابطه معنی‌داری بین سایتوکین‌های  $IL-1\beta$ ،  $IL-6$ ،  $IL-1RA$ ،  $IL-10$  و  $TNF-\alpha$  و سطح سرمی hs-CRP در کودکان دارای ASD وجود ندارد. مقدار ضریب همبستگی این متغیرها با سطح سرمی hs-CRP به ترتیب  $0/08$ ،  $0/19$ ،  $0/22$ ،  $0/07$  و  $0/26$  است.

## بحث

هدف پژوهش حاضر، مقایسه سطوح سرمی سایتوکین‌های  $IL-1\beta$ ،  $IL-6$ ،  $IL-1RA$ ،  $TNF-\alpha$ ،  $IL-10$  و hs-CRP در پسران ۶ تا ۱۴ ساله دارای ASD با کودکان سالم هم‌سن و هم‌جنس و همچنین بررسی ارتباط بین سطوح hs-CRP و سایتوکین‌های مذکور در کودکان مبتلا به اوتیسم بود. مرور مطالعات پیشین نشان می‌دهد که پژوهش حاضر برای اولین بار به بررسی سطوح سرمی چند سایتوکین پیش و ضدالتهابی در جامعه کودکان ایرانی پرداخته است. نتایج این تحقیق حاکی از آن است که سطح سرمی سایتوکین‌های  $IL-1\beta$ ،  $IL-6$ ،  $IL-1RA$ ،  $TNF-\alpha$  و  $IL-10$  در گروه کودکان اوتیسم به طور معنی‌داری بیشتر از گروه کودکان بهنجار است. این یافته با نتایج پژوهش‌های جیونوچی (۱۰)، مولوی و همکاران (۲۰)، لی (۱۷)، سوزوکی (۹) و اشوود (۸) همخوانی دارد.

اگر چه علت ASD به طور واضح مشخص نیست، مطالعات اخیر نشان داده‌اند که التهاب موضعی سیستم عصبی مرکزی می‌تواند علت آن باشد (۱۷). شواهد جمع‌آوری شده در مورد تغییرات در عملکرد سیستم ایمنی مرکزی و محیطی نشان می‌دهند که یک زیرگروه از افراد دارای اوتیسم وجود دارند که دارای برخی اختلالات در سیستم ایمنی هستند. به‌طور مثال، سوزوکی و همکارانش (۸) و ریچی و همکارانش (۲۶) نشان داده‌اند که سطوح پلاسمایی  $IL-1\beta$ ،  $IL-1Ra$ ،  $IL-6$  و  $TNF-\alpha$  در افراد دارای اختلال طیف اوتیسم بالاتر از افراد سالم است.

در تبیین نتایج به‌دست آمده در این پژوهش می‌توان بیان کرد که سیستم ایمنی بدن و سیستم عصبی به شدت با هم تعامل دارند. وضعیت عملکرد سیستم ایمنی، مانند وقتی که پاسخ‌های ایمنی ذاتی و سازشی مختل می‌شوند، بر بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی از جمله عملکرد و رشد مغز تأثیر می‌گذارد؛ بنابراین تعجب‌آور نیست که اختلال عملکرد سیستم ایمنی اغلب به‌عنوان اختلالات عصبی نام برده می‌شوند (۲۷). با تولید سایتوکین‌های پیش‌التهابی در محل عفونت، رفتار بیمار آغاز می‌شود. مغز، سایتوکین‌هایی مانند سایتوکین‌های پیش‌التهابی  $TNF-\alpha$ ،  $IL-1\beta$

و  $IL-6$  را به عنوان نشانه‌های مولکولی بیماری شناسایی می‌کند. علاوه بر این،  $TNF-\alpha$  و  $IL-6$  همچنین می‌توانند از سد خونی-مغزی عبور کنند و بر هیپوتالاموس، که تب و بیماری را افزایش می‌دهد، عمل نماید (۱۵).

اعتقاد بر این است که سیگنال‌های سایتوکین محیطی می‌توانند از طریق سه مسیر به مغز دسترسی داشته باشند: بزاقی (با دخالت آنتی بادی)، عصبی و سلولی. این مسیرهای ارتباطی شامل حداقل پنج مکانیزم هستند: (۱) عبور سایتوکین‌ها از طریق نواحی نامتراکم سد خونی-مغزی (۲) انتقال فعال از طریق مولکول‌های انتقال ویژه سایتوکین‌های اشباع‌پذیر در آندوتلیوم مغز؛ (۳) فعال‌سازی سلول‌های اندوتلیال، که پیام‌برهای ثانویه را درون پارانشیمی مغز آزاد می‌کنند؛ (۴) انتقال سیگنال‌های سایتوکین از طریق تارهای عصبی آوران، از جمله واگوس؛ و (۵) ورود به پارانشیمی مونسیت‌های فعال‌شده محیطی مغز که سایتوکین‌ها را آزاد می‌کنند (۲۸).

سایتوکین‌ها می‌توانند از طریق اثر بر عملکرد انتقال‌دهنده عصبی، فعالیت عصبی درون‌ریز، نوروزنژ، و تغییرات در مدار مغزی بر رفتار تأثیرگذار باشند (۲۸). سطوح تغییر یافته سایتوکین می‌تواند شناسایی زیرنوع‌های اختلال طیف اوتیسم را تسهیل کند و همچنین نشانگرهای بیولوژیکی پاسخ به درمان‌های موثر را تأمین کند (۲۹). ارتباط بین تغییرات در بیان سایتوکین‌های محیطی و شدت اختلالات رفتاری و علائم همراه در کودکان اوتیسم نشان داده شده است. نتایج تحقیق اشوود و همکاران (۸)، مشخص کرده است که بالا بودن  $IL-1\beta$  و  $IL-6$  با افزایش رفتارهای کلیشه‌ای در کودکان اوتیسم همراه می‌باشد. همچنین، اختلال در تنظیم  $IL-1\beta$  افراد را در معرض نقص حافظه و یادگیری قرار می‌دهد (۱۲). به‌طورسیستماتیک،  $IL-1B$  باعث تحریک  $IL-6$ ، تولید آن و در نهایت باعث ایجاد یک پاسخ فاز حاد در کبد می‌شود. کودکان و بزرگسالان دارای اوتیسم، پس از تحریک،  $IL-1B$  پلاسمایی بالا و پاسخ‌های سلولی  $IL-1B$  نامتعادل دارند (۸، ۹).  $IL-1RA$  به گیرنده  $IL-1$  سطح سلول متصل می‌شود، فعالیت‌های  $IL-1\beta$  را مهار می‌کند و واکنش‌های ایمنی مرتبط با  $IL-1$  را تعدیل می‌کند. افزایش  $IL-1ra$  در اوتیسم در تلاش برای موازنه کردن  $IL-1\beta$  است (۹) و می‌تواند مفید باشد یا نباشد.  $IL-1ra$  با رقابت کردن برای گیرنده  $IL-1B$  التهاب را کاهش می‌دهد، و سطوح بالای آن ممکن است نشان‌دهنده تلاش برای مقابله با التهاب در اوتیسم باشد (۱۷). در تحقیق Suzuki و همکاران نشان داده شد که کودکان و بزرگسالان دارای اختلال اوتیسم، سطح  $IL-6$  در گردش بالاتری را در مقایسه با افراد دارای رشد معمولی داشتند (۹).

ایمنی ذاتی ثانویه در دستگاه عصبی مرکزی (CNS) یا نشانگر یک رویدادی مثل عفونت در CNS است. اما، وجود ارتباط به معنای علیت نیست (۲۱).

در مجموع، یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد سطح سرمی سایتوکین‌های  $TNF-\alpha$ ،  $IL-1\beta$ ،  $IL-10$ ،  $IL-6$  و  $IL-1ra$  و همچنین  $hs-CRP$  در پسران مبتلا به اختلالات طیف اوتیسم به طور قابل ملاحظه‌ای بالاتر از پسران سالم هم‌سن آنان است، اما ارتباط آماری معنی‌داری بین بالابودن سطح سرمی سایتوکین‌های موردنظر با سطح سرمی  $hs-CRP$  مشاهده نشد.

از محدودیت‌های پژوهش حاضر می‌توان به تعداد نمونه کم تحقیق اشاره کرد.

پیشنهاد می‌شود محققان در پژوهش‌های آینده به بررسی عوامل اثرگذار در افزایش عوامل التهابی در کودکان اوتیسم بپردازند. همچنین، پیشنهاد می‌شود تحقیقی مشابه بر روی نمونه‌ای با تعداد بیشتر، رده‌های سنی متفاوت‌تر از جمله اطفال و پس از بلوغ صورت پذیرد. علاوه بر این، بررسی سایتوکین‌های دیگری از جمله اینترلوکین-۸، اینترلوکین-۱۷ و اینترلوکین-۱۲ پی ۴۰ در گروه کودکان اوتیسم توصیه می‌شود.

### تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر، حاصل از رساله دکتری رشته فیزیولوژی ورزشی، با کد اخلاق IR.IAU.RASHT.REC.1396.99 در مرکز ثبت کارآزمایی بالینی IRCT20180503039517N1 است. بدین وسیله از تمام پرسنل موسسه خیریه اوتیسم گیلان، به ویژه جناب آقای زاهدی، مدیرکل موسسه، همچنین تمامی والدین گرامی که موجب حضور فرزندانشان در آزمایشگاه شدند و پرسنل زحمتکش آزمایشگاه رازی رشت، و سرکار خانم وصال، تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

جیونوچی و همکاران ۷۱ کودک مبتلا به اوتیسم را با خواهران و برادران سالم و سایر کنترل‌ها مقایسه کردند (۱۰). یافته‌های آن‌ها نشان داد که سطح  $TNF-\alpha$ ،  $IL-1\beta$  و  $IL-6$  در بیشتر کودکان اوتیسم (۸۳/۱ درصد) نسبت به گروه شاهد بالاتر بود. محققان نتیجه گرفتند که اکثر کودکان اوتیسم در گروه، به ویژه افرادی که دارای  $TNF-\alpha$  بالایی هستند، تنظیم پاسخ‌های ایمنی بدن بیش از حد یا ضعیف دارند. همچنین لی (۱۷) و اشوود (۸) نشان دادند که  $TNF-\alpha$  به طور قابل ملاحظه‌ای در افراد اوتیسم افزایش داشته است.  $IL-10$  نیز، که کاهش دهنده شدت پاسخ التهابی با پایین آوردن تولید سایتوکین پیش التهابی در بافت آسیب دیده است؛ و همچنین مارکر ضدالتهابی است با سطوح پایین‌تر اختلالات رفتاری مرتبط با اوتیسم ارتباط دارد و نسبت  $IL-6$  به  $IL-10$  با نقص رفتار اجتماعی مرتبط است (۳۰).

در پژوهش حاضر، همچنین سطح سرمی  $hs-CRP$  در گروه کودکان مبتلا به اوتیسم به طور قابل ملاحظه‌ای بالاتر از گروه کودکان سالم بود که این نتیجه با یافته خاکزاد و همکاران (۲۱) مطابقت داشت.  $CRP$ ، یک عامل مهم تشخیصی، پیش‌آگهی یا پیش‌بینی‌کننده برای اوتیسم است. البته وجود سایر نشانگرهای التهابی در اوتیسم باید مورد بررسی قرار گیرد تا تأیید شود که آیا فرایند التهاب در بروز اوتیسم نقش مهمی دارد. در ادامه نتایج تحقیق حاضر، با بررسی همبستگی بین سایتوکین‌های مذکور و  $hs-CRP$ ، نشان داده شد اگرچه، افزایش سطح سایتوکین‌ها در گروه کودکان اوتیسم با افزایش سطح  $hs-CRP$  همراه بود، اما این افزایش از لحاظ آماری، دارای ارتباط معنی‌داری نبود. می‌توان علت این امر را به تعداد کم شرکت‌کنندگان گروه اوتیسم نسبت داد.  $hs-CRP$ ، در کبد توسط عوامل پیش‌التهابی  $IL-6$  و به میزان کمتری توسط  $IL-1\beta$  و  $TNF-\alpha$  در پاسخ به التهاب و عفونت در فاز حاد بیمار سنتز می‌شود، به سرعت در طی ۶ تا ۸ ساعت اولیه افزایش می‌یابد و تا سطوح ۳۵۰-۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر بعد از ۴۸ ساعت به اوج می‌رسد. همچنین، تولید  $CRP$ ، احتمالاً پاسخ

### REFERENCES

1. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th ed. Arlington, VA: American Psychiatric Publishing; 2013.
2. Developmental Disabilities Monitoring Network Surveillance Year 2010 Principal Investigators; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years - autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2010. *MMWR Surveill Summ* 2014;63:1-21.
3. Fox LC. Physical activity and adolescent girls with ASD: effects of an individualized exercise program on cognitive, social, and physical-health indicators [Doctoral dissertation]. Chapel Hill, NC, USA: The University of North Carolina at Chapel Hill; 2014.
4. Samadi SA, McConkey R. Screening for autism in Iranian preschoolers: Contrasting M-CHAT and a scale developed in Iran. *J Autism Dev Disord*. *J Autism Dev Disord* 2015;45:2908-16.
5. Schwarz E, Guest PC, Rahmoune H, Wang L, Levin Y, Ingudomnukul E, et al. Sex-specific serum biomarker patterns in adults with Asperger's syndrome. *Mol Psychiatry* 2011;16:12-13.



- 6-Ming X, Brimacombe M, Chaaban J, Zimmerman-Bier B, Wagner GC. Autism spectrum disorders: concurrent clinical disorders. *J Child Neurol* 2008;23:6-13.
- 7-Nazary Sharif H, Daneshmandi H, Norasteh AA, Aboutalebi S. Postural Profile in Children with Autism. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2016;26:79-1.
- 8-Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah I, Van de Water J. Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain Behav Immun* 2011;25:40-5.
- 9-Suzuki K, Matsuzaki H, Iwata K, Kamenoy Y, Shimmura C, Kawai S, et al. Plasma cytokine profiles in subjects with high-functioning autism spectrum disorders. *PLoS One* 2011; 6:e20470.
- 10-Jyonouchi H, Sun S, Le H. Proinflammatory and regulatory cytokine production associated with innate and adaptive immune responses in children with autism spectrum disorders and developmental regression. *J Neuroimmunol* 2001; 120:170-9.
- 11-Masi A, Glozier N, Dale R, Guastella AJ. The immune system, cytokines, and biomarkers in autism spectrum disorder. *Neurosci Bull* 2017; 33:194-204.
- 12-Goines PE, Ashwood P. Cytokine dysregulation in autism spectrum disorders (ASD): possible role of the environment. *Neurotoxicol Teratol* 2013;36:67-81.
- 13-Dantzer R. Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? *Brain Behav Immun* 2001;15:7-24.
- 14-Croonenberghs J, Bosmans E, Deboutte D, Kenis G, Maes M. Activation of the inflammatory response system in autism. *Neuropsychobiology* 2002; 45:1-6.
- 15-Chez MG, Dowling T, Patel PB, Khanna P, Kominsky M. Elevation of tumor necrosis factor-alpha in cerebrospinal fluid of autistic children. *Pediatr Neurol* 2007;36:361-5.
- 16-Wieseler-Frank J, Maier SF, Watkins LR. Glial activation and pathological pain. *Neurochem Int* 2004;45:389-95.
- 17-Li X, Chauhan A, Sheikh AM, Patil S, Chauhan V, Li XM, et al. Elevated immune response in the brain of autistic patients. *J Neuroimmunol* 2009; 207:111-6.
- 18-Singh VK. Plasma increase of interleukin-12 and interferon-gamma. Pathological significance in autism. *J Neuroimmunol* 1996;66:143-5.
- 19-Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683-765.
- 20-Molloy CA, Morrow AL, Meinzen-Derr J, Schleifer K, Dienger K, Manning-Courtney P, et al. Elevated cytokine levels in children with autism spectrum disorder. *J Neuroimmunol* 2006;172:198-205.
- 21-Khakzad MR, Javanbakht M, Shayegan MR, Kianoush S, Omid F, Hojati M, et al. The complementary role of high sensitivity C-reactive protein in the diagnosis and severity assessment of autism. *Res Autism Spectr Disord* 2012; 6:1032-7.
- 22-Szalai AJ. The biological functions of C-reactive protein. *Vascul Pharmacol* 2002;39:105-7.
- 23-Qian FH, Zhang Q, Zhou LF, Liu H, Huang M, Zhang XL, et al. High-sensitivity C-reactive protein: a predicative marker in severe asthma. *Respirology* 2008;13:664-9.
- 24-Chenillot O, Henny J, Steinmetz J, Herbeth B, Wagner C, Siest G. High sensitivity C-reactive protein: biological variations and reference limits. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:1003-11.
- 25-Gilliam JE. Gilliam autism rating scale: GARS 2. Pro-ed. Second Edition. Austin, TX: PRO-ED; 2006.
- 26-Ricci S, Businaro R, Ippoliti F, Vasco VL, Massoni F, Onofri E, et al. Altered cytokine and BDNF levels in autism spectrum disorder. *Neurotox Res.* 2013; 24:491-501.
- 27-Filiano AJ, Gadani SP, Kipnis J. Interactions of innate and adaptive immunity in brain development and function. *Brain Res* 2015;1617:18-27.
- 28-Capuron L, Miller AH. Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. *Pharmacol Ther* 2011;130:226-38.
- 29-Mead J, Ashwood P. Evidence supporting an altered immune response in ASD. *Immunol Lett* 2015;163:49-55.
- 30-Ross HE, Guo Y, Coleman K, Ousley O, Miller AH. Association of IL-12p70 and IL-6: IL-10 ratio with autism-related behaviors in 22q11.2 deletion syndrome: a preliminary report. *Brain Behav Immun* 2013;31:76-81.