

اندازه گیری آپوپتوز سلول های تک هسته‌ای خون محیطی، سطح سرمی فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا و پذیرنده نوع یک آن در بیماران ایرانی مبتلا به سپتی سمی و مقایسه آن با افراد سالم

محمد مهدی امیری^{۱*}، دکتر زهره جدلی^۲، دکتر سید عباس میرشفیعی^۳، دکتر عبدالفتاح صراف نژاد^۴، دکتر مهران رسولی نژاد^۵، مسعود روانبخش^۶، مهدی روحانی^۷، محمد علی بویر^۸، علیرضا صالحی نوده^۹

چکیده

زمینه و هدف: گزارشات متعددی مبنی بر اهمیت نقش آپوپتوز در سندروم سپتی سمی وجود دارد. هدف از مطالعه حاضر بررسی میزان آپوپتوز در PBMC، سطح TNF و پذیرنده نوع یک آن در افراد مبتلا به سپتی سمی و مقایسه آن با افراد سالم می باشد.

روش بررسی: این تحقیق بر روی ۲۲ فرد بیمار مبتلا به سپتی سمی انجام گرفت. پس از اخذ ۶ سی سی خون در شرایط استریل، با استفاده از کیت الیزا میزان TNF و TNFRI سرم بیماران بررسی گردید. بلافاصله پس از جداسازی PBMC، میزان آپوپتوز این سلول‌ها بررسی گردید (آپوپتوز در زمان صفر)؛ در ادامه با کشت این سلول‌ها میزان آپوپتوز خود به خودی و تاثیر TNF نو ترکیب بر میزان آپوپتوز نیز بررسی گردید.

یافته‌ها: میزان آپوپتوز در زمان صفر و میزان آپوپتوز خود به خودی PBMC بیماران در مقایسه با افراد نرمال افزایش معنی داری داشته و نشان دهنده این است که سلول‌های ایمنی در شرایط *in vivo* برای مرگ سلولی برنامه ریزی شده‌اند. میزان آپوپتوز PBMC بیماران، تحت تاثیر TNF نسبت به خودی آنها افزایش معنی داری نداشت.

بحث و نتیجه گیری: نتایج نشان دهنده این است که مسیرهای مرگ دیگری غیر از پذیرنده‌های مرگ، در امر آپوپتوز دخیلانند. همچنین میزان سرمی هر دو پروتئین TNF و TNFRI در این بیماران بطور معنی داری در مقایسه با افراد نرمال افزایش یافته و این افزایش متناسب $r=0.908$ با یکدیگر است و نشان دهنده نقش پروتکتیو TNFRI در مراحل ابتدایی بیماری است.

واژه‌های کلیدی: سپتی سمی، آپوپتوز، فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا، گیرنده محلول نوع یک فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا، سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی، مرگ سلولی

* نویسنده مسئول :

محمد مهدی امیری ؛

کارشناس ارشد ایمونولوژی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی تهران

Email : Amiri.mm @ gmail.com

- دریافت مقاله : تیر ۸۸ - پذیرش مقاله : اسفند ۸۸

مقدمه

سپتی سمی یکی از مشکلات با اهمیت کلینیکی است که هر ساله بیش از ۷۰۰،۰۰۰ نفر را تنها در امریکا درگیر می‌کند که ۲۰ تا ۳۰ درصد از آنها در نهایت می‌میرند. هزینه‌های بیمارستانی سپتی سمی بالغ بر ۱۷ میلیارد دلار در سال است. بی شک سپتی سمی یکی از

- ۱ کارشناس ارشد ایمونولوژی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۲ دکترای تخصصی ایمونولوژی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۳ دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۴ استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۵ استاد، بیمارستان امام خمینی (ره)، دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۶ کارشناس ارشد ایمونولوژی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۷ کارشناس ارشد میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان
- ۸ رزیدنت عفونی، بیمارستان امام خمینی (ره)، دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۹ کارشناس ارشد ایمونولوژی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت و انستیتو تحقیقات بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

لنفوسیت‌ها ممکن است از دلایل اصلی مهار ایمنی باشد (۷).

آپوپتوز می‌تواند از سه مسیر مجزا رخ دهد: مسیر با واسطه گیرنده، مسیر میتوکندریایی و مسیر با واسطه شبکه اندوپلاسمی. مسیر با واسطه گیرنده (به عنوان مسیر خارجی نیز شناخته می‌شود) با اتصال لیگاند و اولیگومریزه شدن گیرنده در سطح غشاء پلاسمایی آغاز می‌شود. این لیگاندها شامل پروتئین‌های مختلفی منجمله Fas و TNF- α هستند. شناخته شده ترین گیرنده‌های مرگ CD95 (Fas, Apol) و TNFRI و (p55, CD120a) می‌باشند. سیگنال انتقال یافته توسط برخی از گیرنده‌های مرگ (مانند TNFRI) بسته به نوع سلول، ژنتیک و عوامل محیطی می‌تواند منجر به فعالیت بیولوژیکی غیر از آپوپتوز (مانند التهاب) شود. اولیگومریزه شدن TNFRI در ابتدا سبب فراخوانی RIP1 و TRADD و TRAF2 و cIAP1 و تشکیل کمپلکس I می‌شود که سبب انتقال فاکتور نسخه برداری NF- κ B به هسته می‌گردد. در ادامه RIP1 و TRAF2 و TRADD جدا شده و TNFRI سبب فراخوانی FADD و کاسپاز ۸ و تشکیل کمپلکس II می‌شود که این کمپلکس در نهایت باعث مرگ سلولی می‌شود (۷).

در حال حاضر مکانیسم‌های القاء آپوپتوز در جریان سپتی سمی به خوبی شناخته نشده و علی‌رغم تلاش‌های فراوانی که به منظور شناسایی مسیرهای منتهی شونده به مرگ سلولی در جریان سپتی سمی به عمل آمده است امکان پیش بینی نقش دقیق آنها میسر نمی‌باشد. لذا هرگونه تلاشی که در جهت درک مکانیسم مرگ سلولی به عمل آید می‌تواند کمک فراوانی به درک بهتر روند پاتوژنز بیماری و نیز ارائه پروتوکلهای درمانی مناسب شود (۸ و ۹).

بیشتر مطالعات پیشین بر روی آپوپتوز لنفوسیت‌های بافتی متمرکز شده‌اند و یافته‌های اندکی در مورد تاثیر

مهمترین مشکلات بهداشتی است که استراتژی‌های درمانی جدیدی را می‌طلبد (۱).

سپتی سمی با حضور علائم زیر و به عنوان یک فرآیند عفونی تعریف می‌شود.

(۱) درجه حرارت بدن بیشتر از 38°C یا کمتر از 36°C .

(۲) ضربان قلب بیشتر از ۹۰ ضربان/دقیقه.

(۳) سرعت تنفس بیشتر از ۲۰ تنفس/دقیقه یا هایپرونتیلیسیون با فشار CO_2 کمتر از ۳۲ میلی‌متر جیوه.

(۴) میزان گلبول‌های سفید خون بیشتر از $12/000$ در هر میلی‌متر مکعب یا کمتر از $4/000$ در هر میلی‌متر مکعب یا تعداد نوتروفیل‌های نابالغ بیشتر از $10/$.

آپوپتوز لنفوسیت‌ها بعنوان یکی از مراحل مهم در پاتوژنز سپتی سمی شناخته شده است، بطوریکه سبب القاء حالتی از فلج ایمنی شده که منجر به آسیب پذیری میزبان در برابر پاتوژن‌های مهاجم می‌گردد (۴-۲).

لنفوسیت‌ها، سلول‌های حیاتی در پاسخ به سپتی سمی هستند. اولین مطالعه در این زمینه توسط «هاچکس» و همکاران (۲۰۰۱) صورت گرفت و نشان داد که لنفوسیت‌های بیماران مبتلا به سپتی سمی دچار آپوپتوز می‌شوند (۵). آپوپتوز لنفوسیت‌ها که در تمام اندام‌های لنفاوی مثل طحال، تیموس و بافت‌های لنفاوی مرتبط با دستگاه گوارش مشاهده می‌شود ممکن است مسبب اصلی کاهش عملکرد لنفوسیت‌ها در بیماران مبتلا به سپتی سمی باشد (۶). بررسی‌ها نشان می‌دهند که سپتی سمی سبب القاء آپوپتوز در انواع سلول‌های تک هسته‌ای می‌شود. برای مثال، نتایج حاصل از مطالعه مدل‌های حیوانی نشان می‌دهد که سپتی سمی موجب القاء آپوپتوز در سلول‌های $\text{CD}4^{+}$ و $\text{CD}8^{+}$ T و همچنین سلول‌های B می‌شود. بعلاوه سلول‌های NK در پاسخ به طیفی از شرایط استرسی مانند عفونت، دچار آپوپتوز می‌شوند. فقدان این

داده شده است. هدف از مطالعه حاضر بررسی میزان آپوپتوز در PBMC، سطح TNF و پذیرنده نوع یک آن در افراد مبتلا به سپتی سمی و مقایسه آن با افراد نرمال است.

روش بررسی

در این پژوهش، تعداد ۲۲ فرد مبتلا به سپتی سمی با تشخیص متخصص عفونی وارد مطالعه شدند. ابتدا با استفاده از سیستم خونگیری در خلاء و در شرایط بسته و کاملاً استریل، از ۲۲ فرد بیمار و ۲۰ فرد نرمال (با رضایت کامل) مقدار ۶ میلی لیتر خون کامل هپارینه گرفته و ۵ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. پلاسماي نمونه‌ها جدا شده و جهت بررسی میزان TNF و sTNFRI در فریزر 20°C - نگهداری شد و سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی به وسیله گرادیان فایکول-هایپک جدا گردید. بخشی از سلول‌ها جهت تعیین میزان آپوپتوز با استفاده از کیت annexin V (Roche) رنگ آمیزی شد و توسط دستگاه فلوسایتومتر Partec PAS (Germany) مورد بررسی قرار گرفت. بخش دیگری از PBMC در محیط کشت سلول (RPMI1640, Sigma) کشت داده شد. تعداد ۸ میلیون سلول برای سنجش میزان آپوپتوز و کشت سلول مورد نیاز بود (در هر مرحله کشت بصورت triplicate)؛ ۲ میلیون سلول برای سنجش میزان آپوپتوز در زمان صفر (یعنی به محض جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی) بکار رفت که یک میلیون از آنها به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفت. برای تعیین میزان آپوپتوز، این سلول‌ها را با کیت تجاری حاوی Annexin V و PI رنگ آمیزی شد و با دستگاه فلوسایتومتری مورد آنالیز قرار گرفت. ۲ میلیون سلول دیگر در پلیت‌های کشت سلول به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور 37°C درجه با

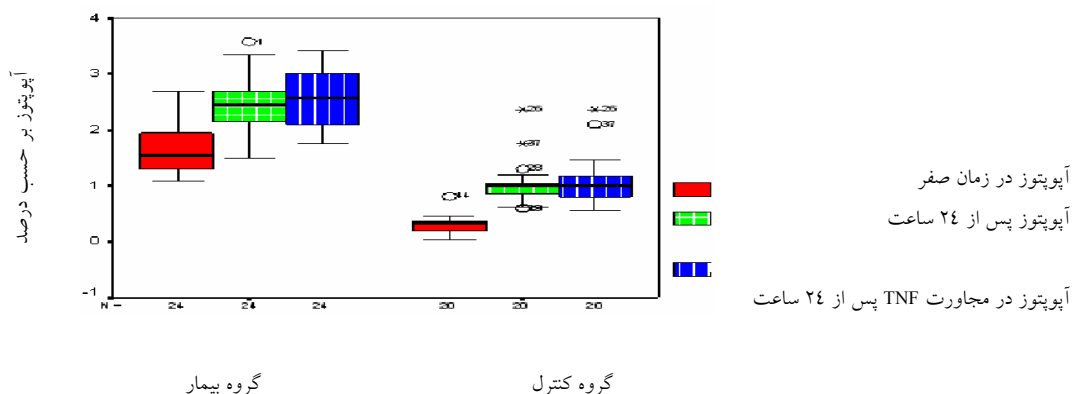
آپوپتوز بر لئوسیت‌های گردشی در دسترس می‌باشد و لذا تحقیق حاضر به بررسی میزان آپوپتوز در سلول‌های تک هسته‌ای خون بیماران مبتلا به سپتی سمی اختصاص داده شده است. در سال‌های اخیر مطالعات گسترده‌ای در رابطه با مکانیسم‌های مولکولی مرتبط با آپوپتوز انجام شده است و با توجه به گزارشات متعددی که در مورد تغییر سطح سیتوکین بیماران مبتلا به سپتی سمی در دسترس می‌باشد، بخشی از این مطالعات بر روی سیتوکین‌های مختلف و پذیرنده‌های مربوط به آن و نیز بررسی نقش احتمالی آنها در پیشبرد و یا مهار آپوپتوز متمرکز بوده است. فاکتور نکروز دهنده تومور از جمله سیتوکین‌هایی است که افزایش آن در بیماران مبتلا به سپتی سمی گزارش شده است (۱۰). TNF که توسط ماکروفاژها و سلول‌های T در پاسخ به عفونت تولید می‌شود در التهاب و آپوپتوز سلولی نقش داشته و به صورت پیش ساز ۲۶ کیلودالتنی متصل به غشاء ساخته می‌شود و توسط آنزیم مبدل TNF (TACE) به شکل ۱۷ کیلودالتنی محلول در می‌آید. پاسخ بیولوژیک به TNF از طریق دو گیرنده غشایی p55 و p75 ایجاد می‌شود (۱۱). TNF- α به دو گیرنده TNFRI و TNFRII متصل می‌شود. TNFRI مسئول اصلی القاء پاسخ‌های پیش التهابی از طریق فاکتور نسخه‌برداری NF-kB میباشد اما در عین حال می‌تواند سبب آپوپتوز نیز بشود و از این طریق ممکن است در بروز مشکلات مربوط به سپتی سمی دخالت داشته باشد (۶ و ۱۲). به عبارت دیگر TNF همانند یک شمشیر دولبه عمل می‌کند که هم در پاتوژنز و هم در دفاع میزبان نقش دارد و بررسی تغییرات و چگونگی عملکرد آن در بیماران مبتلا به سپتی سمی از اهمیت بسیاری برخوردار است. لذا بخش دیگری از تحقیق حاضر به اندازه‌گیری سطح پلاسمایی TNF و sTNFRI و بررسی ارتباط آن با آپوپتوز اختصاص

TNF (1.08 ± 0.45 و 2.54 ± 0.53) بدست آمد که اختلاف معنی داری ($P < 0.001$) در هر سه مورد مشاهده می شود. میزان آپوپتوز PBMC در گروه بیمار در زمان صفر و پس از گذشت ۲۴ ساعت به ترتیب 1.63 ± 0.41 و 2.5 ± 0.58 بوده که اختلاف معنی داری ($P < 0.001$) را نشان می دهد. همچنین میزان آپوپتوز PBMC در گروه بیمار پس از گذشت ۲۴ ساعت در محیط کشت و در محیط کشت همراه با TNF به ترتیب 2.47 ± 0.58 و 2.56 ± 0.53 بوده و اختلاف معنی داری ($P < 0.657$) را نشان نمی دهد (شکل ۱). غلظت TNF و sTNFRI افراد بیمار و کنترل نیز اختلاف معنی داری (برای هر دو مورد $P < 0.001$) با یکدیگر دارند (شکل ۲). افزایش غلظت TNF و sTNFRI در گروه بیمار نیز متناسب با یکدیگر و بطور معنی داری ($r = 0.908, P < 0.001$) ارتباط نشان می دهد (شکل ۳).

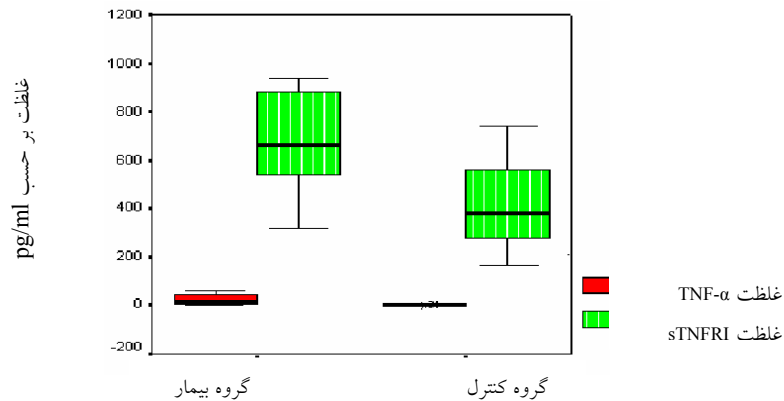
میزان Co_2 ۵٪ کشت داده شد (در هر خانه یک میلیون سلول) به یکی از این خانه ها تنها محیط کشت اضافه گردید (برای بررسی آپوپتوز خودبخودی) و به خانه ی دیگر علاوه بر محیط کشت به میزان 50pg محلول TNF (Abcam) نوترکیب اضافه گردید. برای تعیین غلظت TNF و sTNFRI به ترتیب از کیت های (Bender Med Syste) BMS223/4 و کیت Hbt HK301 (Hycultbiotechnology) استفاده شد. داده ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شده و از آزمون آماری Mann-Whitney U test برای آنالیز داده ها استفاده گردید.

یافته ها

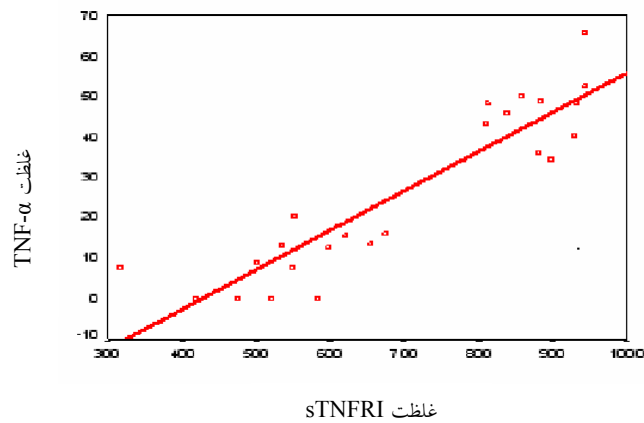
در این مطالعه میزان آپوپتوز PBMC افراد بیمار و کنترل در زمان صفر به ترتیب (0.29 ± 0.18) و (1.6 ± 0.41) ، ۲۴ ساعت پس از کشت (1.04 ± 0.4) و (2.47 ± 0.58) و ۲۴ ساعت پس از کشت در مجاورت



شکل ۱: مقایسه میانگین آپوپتوز گروه بیمار و کنترل در زمان صفر، پس از گذشت ۲۴ ساعت در محیط RPMI 1640 و پس از مجاورت با TNF- α در محیط کشت



شکل ۲: مقایسه میانگین غلظت $TNF-\alpha$ و sTNFR1 در گروه بیمار و کنترل



شکل ۳: ارتباط میان $TNF-\alpha$ و sTNFR1 در گروه بیمار

بحث

بیمار به شدت از جانب باکتری مهاجم تهدید می‌شود (۱۴-۱۳). بنظر می‌رسد مکانیسم این فلج ایمنی در ارتباط با آپوپتوز سلول‌های ایمنی باشد. نتایج این بررسی نشان می‌دهد که میزان آپوپتوز PBMC بیماران مبتلا به سپتی سمی در زمان صفر (بلافاصله پس از اخذ نمونه و جداسازی PBMC) بطور معنی‌داری ($P < 0.001$) با میزان آپوپتوز گروه کنترل تفاوت نشان می‌دهد که با نتایج حاصل از برخی بررسی‌های مشابه همخوانی دارد. برای مثال در مطالعات اولیه، وانگ و همکاران (۱۹۹۴) دریافتند که

طی دهه گذشته مطالعه بر روی مدل‌های حیوانی و انسانی سپتی سمی پیشنهاد نمود که پاسخ ایمنی در سپتی سمی از یک الگوی دو مرحله‌ای^۱ پیروی می‌کند، یک مرحله ابتدایی (Hyperinflammator) که مشخصه آن حضور مقادیر فراوانی از سایتوکاین‌های التهابی می‌باشد و مرحله دوم که با کاهش پاسخ دهی سلول‌های ایمنی به محرک‌های التهابی شناخته می‌شود (Immunoparalysis). مرحله فلج ایمنی، مرحله‌ای با آسیب پذیری بالاست که در این زمان

^۱. Biphasic

برنامه‌ریزی قبلی^۲ باشد که برای مرگ سلول‌ها در نظر گرفته شده زیرا با حذف سایتوکاین‌ها و عوامل دخیل در آپوپتوز، پس از گذشت ۲۴ ساعت هنوز هم درصد معنی‌داری از سلول‌ها دچار آپوپتوز می‌شوند.

بر طبق نتایج بدست آمده، میزان آپوپتوز PBMC بیماران که در مجاورت TNF قرار گرفته بودند با میزان آپوپتوز خود به خودی آنها تفاوت معنی‌داری $p < 0.068$ نشان نداد. که احتمال دخالت سایر مسیرهای القاء آپوپتوز را در جریان سپتی سمی مطرح می‌کند. این احتمال با مشاهداتی نظیر اهمیت نقش مسیر میتوکندریایی در آپوپتوز القاء شده در اثر سپتی سمی و عدم کاهش آپوپتوز القاء شده توسط سپتی سمی در لنفوسیت‌های موش‌های مقاوم به اندوتوکسین و موش‌هایی که ژن p55 و p75 در آنها تخریب شده است تقویت می‌شود (۱۷ و ۲۲).

از طرف دیگر در محیط *in vitro* لوکوسیت‌ها به سرعت توانایی خود جهت اتصال به TNF و IL-1 را از دست می‌دهند این پدیده احتمالا در اثر ریزش و بدون کشی TNFR و کاهش ظرفیت اتصال لوکوسیت‌ها به TNF صورت می‌گیرد که به نوبه خود ممکن است در کاهش اثر TNF تاثیر گذار باشد (۲۳). نظر به اینکه گزارشات متعددی در مورد تغییر سطح سایتوکاین‌های مختلف در بیماران مبتلا به سپتی سمی در دسترس می‌باشد و در بین آنها TNF از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است لذا بخشی از تحقیق حاضر به اندازه‌گیری سطح پلاسمایی TNF و sTNFRI اختصاص داده شده است (۹). طبق نتایج بدست آمده میزان TNF و sTNFRI بطور معنی‌داری $p < 0.001$ نسبت به گروه کنترل بالا و با برخی گزارشات دیگر در این زمینه مطابقت دارد (۲۸-۲۴). در این مطالعه ارتباط معنی‌داری بین غلظت TNF و sTNFRI $(r = 0.908$ و $p < 0.001)$ نیز مشاهده گردید که نشان

تزیق داخل صفاقی باکتری‌های گرم منفی به موش منجر به ایجاد آپوپتوز لنفوسیت‌های CD4+CD8+ در تیموس می‌شود (۱۵).

«هاچکس» و همکاران (۱۹۹۷ و ۲۰۰۱) از یک مدل موشی (cecal ligation and puncture) استفاده نمودند تا نشان دهند که آپوپتوز لنفوسیت‌ها در طحال و سایر اندام‌های حیاتی نیز دیده می‌شود؛ آنها سپس نشان دادند که آپوپتوز وسیع لنفوسیتی در بیماران مبتلا به سپتی سمی نیز دیده می‌شود (۱۷-۱۶).

در مطالعه‌ای با استفاده از روش annexin V میزان آپوپتوز لنفوسیت‌های گردشی افراد مبتلا به سپتی سمی را بررسی نمودند. نتایج مطالعات آنها نشان داد که میزان آپوپتوز لنفوسیت‌های بیماران مبتلا به شوک سپتیک در حدود $3/5 \pm 16/5$ است در حالیکه میزان آپوپتوز در بیماران سپتی سمی بدون شوک در حدود $1/5 \pm 7/5$ است. در تحقیقی دیگر نیز میزان آپوپتوز سلول‌های تک هسته‌ای در بیماران مبتلا به سپتی سمی و شوک سپتیک به ترتیب معادل $0/1 \pm 9/4$ برای $0/1 \pm 10/6$ گزارش گردید (۱۸).

در بخش دیگری از این تحقیق میزان آپوپتوز سلول‌های PBMC خون افراد مبتلا به سپتی سمی پس از مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت بررسی شد. میزان آپوپتوز خود به خودی^۱ افراد بیمار تفاوت معنی‌داری ($p < 0.001$) با گروه کنترل داشت. این آپوپتوز می‌تواند به دلیل عدم حضور سایتوکاین‌های *in vivo* (مانند IL-2 و سایر مولکول‌های ضد آپوپتوزی) در محیط *ex vivo* باشد (۱۹). همچنین برخی مطالعات نشان می‌دهند که سلول‌های فعال شده سریعتر از سلول‌های در حال استراحت تحت آپوپتوز قرار می‌گیرند (۲۱-۲۰). ولی با توجه به بررسی‌های اخیر این افزایش مرگ سلولی ممکن است بدلیل

^۲. Preprogram

^۱. Spontaneous

در مجموع به نظر می‌رسد آپوپتوز یک رخداد اولیه در جریان سپتی سمی می‌باشد که نه تنها در لنفوسیت بافت‌های بیمار بلکه در سلول‌های خون محیطی نیز بوقوع می‌پیوندد. بعلاوه یافته‌های این مقاله نشان می‌دهد که سطح پلاسمایی TNF و sTNFRI بیماران در مقایسه با افراد کنترل از افزایش معنی‌داری برخوردار است. معذالک از آنجایی که سپتی سمی یک ناهنجاری بسیار پیچیده می‌باشد که شامل فعال شدن شمار بسیاری از آبشارها از جمله سیستم‌های پیش التهابی، ضد التهابی، انعقادی و کمپلمان است، بنابراین دور از ذهن نیست که در پاتوژنز بیماری، مسیرهای متعدد مرگ سلولی نیز دخیل باشند(۳۲).

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از سرکار خانم دکتر مهرناز رسولی‌نژاد (متخصص عفونی بیمارستان امام خمینی تهران) جهت تشخیص بیماران مبتلا به سپتی سمی، اعلام می‌دارند.

می‌دهد غلظت TNF و sTNFRI متناسب با یکدیگر افزایش می‌یابد. یافته‌های فوق با نتایج بدست آمده از برخی تحقیقات دیگر همخوانی دارد(۲۹-۳۰). از آنجایی که دومین خارج سلولی پذیرنده sTNFRI دارای خاصیت بازدارنده علیه TNF- α می‌باشد به نظر می‌رسد که در تعدیل فعالیت بیولوژیک TNF- α از اهمیت بسیار زیادی برخوردار باشد. برای مثال لسور و همکارانش نشان دادند که قطعات نو ترکیب پذیرنده TNF انسان در مدل موشی حساس شده با D-گالاکتوز آمین که تحت تزریق اندوتوکسین قرار گرفته نقش پروتکتیو دارند(۳۱). نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که تناسب و یا عدم تناسب TNF و sTNFRI نقش مهمی در تعیین فعالیت بیولوژیک TNF- α و نیز عواقب کلینیکی پسین بازی می‌کند.

نتیجه‌گیری

منابع

1. Lang JD, Matute-Bello G. Lymphocytes, apoptosis and sepsis: making the jump from mice to humans. Crit Care 2009; 13(1):109-12.
2. Opal SM, Fisher CJ, Dhainaut JF, Vincent JL, Brase R, Lowry SF, et al. Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. Crit Care Med 1997; 25(7): 1115-24.
3. Angus DC, Birmingham MC, Balk RA, Scannon PJ, Collins D, Kruse JA, et al. E5 Murine monoclonal antiendotoxin antibody in gram-negative sepsis: a randomized controlled trial. JAMA 2000; 283(13): 1723-30.
4. Abraham E, Laterre PF, Garbino J, Pingleton S, Butler T, Dugernier T, et al. Lenercept (p55 tumor necrosis factor receptor fusion protein) in severe sepsis and early septic shock: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter phase III trial with 1,342 patients. Crit Care Med 2001; 29(3): 503-10.
5. Hotchkiss RS, Swanson PE, Cobb JP, Jacobson A, Buchman TG, Karl IE. Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: findings in normal and T- and B-cell-deficient mice. Crit Care Med 1997; 25(8): 1298-307.
6. Remick DG. Pathophysiology of Sepsis. Am J Pathol 2007; 170(5): 1435-44.

7. Pinheiro DA, Silva F, Nizet V. Cell death during sepsis: integration of disintegration in the inflammatory response to overwhelming infection. *Apoptosis* 2009; 14(4): 509-21.
8. Hsieh YC, Athar M, Chaudry IH. When apoptosis meets Autophagy: deciding cell fate after trauma and sepsis. *Trends Mol Med* 2009; 15(3): 129-30.
9. Ward PA. Sepsis, apoptosis and complement. *Biochem Pharmacol* 2008; 76(11): 1383-8.
10. Kurt AN, Aygun AD, Godekmerdan A, Kurt A, Dogan Y, Yilmaz E. Serum IL-1beta, IL-6, IL-8, and TNF-alpha levels in early diagnosis and management of neonatal sepsis. *Mediators Inflamm* 2007; 31: 397-401.
11. Oberholzer C, Oberholzer A, Clare-Salzler M, Moldawer LL. Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. *FASEB J* 2001; 15(6): 879-92.
12. Chen G, Goeddel DV. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 2002; 296(5573): 1634-5.
13. Docke WD, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, et al. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med* 1997; 3: 678-81.
14. Volk HD, Reinke P, Krausch D, Zuckermann H, Asadullah K, Muller JM, et al. Monocyte deactivation-rationale for a new therapeutic strategy in sepsis. *Intensive Care Med* 1996; 22(4): 474-81.
15. Wang SD, Huang KJ, Lin YS, Lei HY. Sepsis-induced apoptosis of the thymocytes in mice. *J Immunol* 1994; 152: 5014-21.
16. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 1997; 27(7): 1230-51.
17. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmiege RE. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol* 2001; 166: 6952-63.
18. Hotchkiss RS, Osmon SB, Chang KC, Wagner TH, Coopersmith CM, Karl IE. Accelerated lymphocyte death in sepsis occurs by both the death receptor and mitochondrial pathways. *J Immunol* 2005; 174: 5110-8.
19. Marrack P, Kappler J, Mitchell T. Type I interferons keep activated T cells alive. *J Exp Med* 1999; 189(3): 521-30.
20. Kabelitz D, Pohl T, Pechhold K. Activation-induced cell death (apoptosis) of mature peripheral T lymphocytes. *Immunol Today* 1993; 14(7): 338-9.
21. Shi YF, Szalay MG, Pasksr L, Sahai BM, Boyer M, Singh B, et al. Activation-induced cell death in T cell hybridomas is due to apoptosis. *J Immunol* 1990; 144(9): 3326-33.
22. Hiramatsu M, Hotchkiss RS, Karl IE, Buchman TG. Cecal ligation and puncture (CLP) induces apoptosis in thymus, spleen, lung, and gut by an endotoxin and TNF-independent pathway. *Shock* 1997; 7: 247-53.
23. VanDer Poll T, Coyle SM, Kumar A, Barbosa K, Agosti JM, Lowry SF. Down-regulation of surface receptors for TNF and IL-1 on circulating monocytes and granulocytes during human endotoxemia: effect of neutralization of endotoxin-induced TNF activity by infusion of a recombinant dimeric TNF receptor. *J Immunol* 1997; 158: 1490-7.
24. Oriordain MG, Oriordan DS, Molloy RG, Mannick JA, Rodrick ML. Dosage and timing of anti-TNF-alpha antibody treatment determine its effect of resistance to sepsis after injury. *J Surg Res* 1998; 64: 95-101.

25. Sriskandan S, Moyes D, Lemm G, Cohen J. Lymphotoxin-alpha (TNF-beta) during sepsis. *Cytokine* 1996; 8: 933-7.
26. Neilson D, Kavanagh JP, Rao PN. Kinetics of circulating TNF-alpha and TNF soluble receptors following surgery in a clinical model of sepsis. *Cytokine* 1996; 8: 938-43.
27. Timokhov VS, Iakovleva II, Kalashnikova EA, Ipateva EI. Plasma contents of cytokines (TNF-alpha, IL-1 beta, IL-6) and their clearance during continuous hemofiltration in patients with sepsis and multiple organ failure. *Anesteziol Reanimatol* 1997; 3: 59-62.
28. Rigato O, Ujvari S, Castelo A, Salomao R. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) and sepsis: evidence for a role in host defense. *Infection* 1996; 24: 314-8.
29. Girardin E, Roux-Lombard P, Grau GE, Suter P, Gallati H, Dayer JM. Imbalance between tumour necrosis factor-alpha and soluble TNF receptor concentrations in severe meningococcaemia. *Immunology* 1992; 76: 20-3.
30. Aderka D, Sorkine P, Abu-Abid S, Lev D, Setton A, Cope AP, et al. Shedding kinetics of soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors after systemic TNF leaking during isolated limb perfusion. *J Clin Invest* 1998; 101: 650-9.
31. Lesslauer W, Tabuchi H, Gentz R, Brockhaus M, Schlaeger EJ, Grau G, et al. Recombinant soluble tumor necrosis factor receptor proteins protect mice from lipopolysaccharide-induced lethality. *Eur J Immunol* 1991; 21: 2883-6.
32. Hotchkiss RS, Karl IE. The Pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003; 348: 138-50.

Comparison of apoptosis, circulating levels of tumor necrosis factor- α and tumor necrosis factor type-I receptor in Iranian patients with sepsis and normal controls

Amiri MM^{1*}(MSc.) - Jadali Z¹(Ph.D.) - Rasoolinejad M²(M.D.) - Salehi Nodeh AR¹(MSc.)
Mirshafie SA¹(Ph.D.) - Sarrafnezhad A¹(Ph.D.) - Ravanbakhsh M¹(MSc.) - Rohani M³(MSc.) - Boyer MA²(M.D.)

1 Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2 Infection Department, Imam Khomeini Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3 Department of Microbiology and Immunology, Kashan University of Medical Science, Kashan, Iran

Abstract

Received : Jul 2009
Accepted : Mar 2010

Background and Aim: The present study was designed to compare the cell death, circulating levels of tumor necrosis factor- α and tumor necrosis factor type-I receptor in Iranian patients with sepsis and normal controls.

Materials and methods: Twenty-two patients with sepsis were included in this study. After blood collection, the serum circulating levels of TNF- α and TNFRI measured with ELISA kits. The PBMCs isolated from blood samples and proportion of apoptotic cells measured by flowcytometry at the time of blood draws (0 time) and after 24-h incubation. PBMCs incubated at 37°C in culture (spontaneous apoptosis) and in the presence of rTNF that is capable of inducing apoptosis in activated T cells expressing the TNF family of receptors.

Results: PBMCs obtained from the patients showed significantly higher ($P < 0.001$) proportion of apoptotic cells than PBMCs of controls at 0 time, indicated that a higher fraction of PBMCs were undergoing apoptosis in vivo in patients but not in controls. After 24-h incubation, spontaneous ex vivo apoptosis of PBMCs was nearly as high as that of TNF- α induced apoptosis, indicating that activated T cells had been preprogrammed in vivo to die.

Discussion and Conclusion: The circulating levels of both TNF- α and TNFRI showed significantly higher in patients ($P < 0.001$) than controls and this increase is proportional ($r = 0.908$) in both indicating that TNFRI may have a protective effect in the early stage of sepsis.

Key words: Sepsis, Apoptosis, TNF, sTNFR1, PBMC, Cell Death

* Corresponding author :
Amiri mm ;
e-mail : Amiri.mm @ gmail.
com