مقاله تحقیقی

مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره سیزدهم، شمارهٔ ۶، آبان ۱۳۹۰، صفحه ۴۴-۳۷

بررسی اثر مایع رویی کشت لنفوسیتهای انسانی تحریک شده با فیتوهماگلوتینین (PHA) بر قلب ایزوله رت

سعید نیازمند(PhD)[۱و۳]، نرگس ذبیحی(MSc)[۲]، فاطمه هرندی زاده(MSc)[۳]، سیدعبدالرحیم رضایی (PhD)[۴*]

۱- مرکز تحقیقات قلب و عروق دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۲- گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۳- گروه زیست شناسی دانشگاه فردوسی مشهد
۴- مرکز تحقیقات ایمونولوژی و گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

دریافت: ۸۹/۱۰/۱۷، اصلاح: ۸۹/۱۱/۲۰، پذیرش: ۹۰/۴/۸

خلاصه

سابقه و هدف: سایتوکاینها در پاسخهای ایمنی ترشح می شوند که در شرایط خاص مثل شوک توکسیک در نتیجه تحریک لنفوسیتها با سوپر آنتی ژنها یا طوفان سایتوکاینی میزان بسیار بالایی از آنها آزاد شده و باعث کولاپس سیستم قلبی- عروقی و مرگ می گردند. در این مطالعه اثر مایع رویی کشت لنفوسیتها بعد از سه روز تحریک با فیتوهماگلوتینین (PHA) بر قلب ایزوله رت بررسی شده است.

مواد و روشها: این مطالعه تجربی بر روی ۲۰ سر رت نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۵۰-۲۰۰ گرم که بطور تصادفی به دو گروه آزمون و کنترل تقسیم شدند، انجام گردید. در گروه آزمون اثر غلظتهای مختلف مایع رویی کشت لنفوسیتی فعال شده با PHA و در گروه کنترل اثر غلظتهای مختلف محیط کشت همراه با PHA مورد بررسی قرار گرفت. هریک از غلظتهای ۱/۸۰۰، ۱/۴۰۰، ۱/۲۰۰ مایع رویی کشت به مدت ۱۰ دقیقه از قلب عبور داده شده و به مدت ۴۰ دقیقه تغییرات فشار درون بطن چپ ثبت شد. لنفوسیتهای خون محیطی داوطلبان سالم در محیط کشت به مدت سه روز با PHA تحریک و مایع رویی کشت جمع آوری شد.

یافته ها: مایع رویی بر ضربان قلب اثرکاهشی داشت. در غلظت ۱/۸۰۰ در زمانهای ۱ و ۲ دقیقه پس از شروع انفوزیون این کاهش معنی دار بود. در غلظتهای ۱/۴۰۰ و ۱/۲۰۰ این اثر تا ۱۰ دقیقه بعد از شروع انفوزیون نیز معنی دار بود. مایع رویی اثر معنی داری بر Max dp/dt، Min dp/dt، Max LV و Min LV نداشت.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه نشان داد که تحریک الگوی سایتوکاین التهابی با PHA منجر به کاهش معنی دار ضربان قلب می شود که بیانگر تاثیر سایتوکاینها بر سیستم تحریکی و هدایتی قلب می باشد و بر قدرت انقباضی قلب تاثیر چندانی ندارد.

واژه های کلیدی: *قلب ایزوله، انقباض قلبی، ضربان قلب، فیتوهماگلوتینین، لنفوسیت.*

مقدمه

بیماریهای قلبی عروقی شایع ترین اختلالات جدی در کشورهای توسعه یافته هستند. طبق گزارش انجمن قلب آمریکا در سال ۲۰۰۲، ۶۲ میلیون آمریکایی — ۳۲ میلیون زن و ۳۰ میلیون مرد (یعنی بیش از یک نفر از هر پنج نفر) دچار یک نوع بیماری قلبی عروقی (شامل هایپرتانسیون) بودند. میزان شیوع بصورت پیشرونده با افزایش سن از ۵ درصد در ۲۰ سالگی به ۷۵ درصد در سنین بالای ۷۵ سالگی افزایش می یابد. پیش بینی می شود تا سال ۲۰۲۰، بیماریهای قلبی عروقی شایع ترین علت مرگ و میر در تمام دنیا باشد (۱). در طی دهه های اخیر التهاب یکی از موضوعات اصلی در پاتوژنز بیماریهای قلبی شده است و مدارک و شواهد روبه افزونی نقش التهاب موضعی و سیستمیک را بعنوان مکانیسم پاتوفیزیولوژیکی عمومی دخیل در بیماریهای قلبی عروقی مختلف تأیید می کند. سایتوکاینهای التهابی میانجی های مهم سیستم ایمنی هستند و افزایش مقادیر این سایتوکاینها در بافتها و در گردش خون افراد مبتلا به بیماریهای قلبی،

▣ این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی به شماره ۸۶۱۵۵ دانشگاه علوم پزشکی مشهد می باشد.
* مسئول مقاله:
آدرس: مشهد، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، تلفن: ۸۴۳۶۶۶۲-۰۵۱۱
e-mail: rezaeer@mums.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.13.6.5.4]

مطرح کنندهٔ این احتمال است که فعال شدن سیستم ایمنی یک مکانیسم مؤثر در بروز بیماریهای قلبی و عروقی می باشد (۲) و طیف وسیعی از بیماریهای قلبی عروقی با التهاب و تغییر سطح سایتوکاینها مرتبط شده اند، از جمله: نارسایی قلبی، آترواسکلروز و بیماری شریان کرونری (۴و۳) میوکاردیتها، رد پیوند آلوگرافت (۴) آسیب قلبی ناشی از ایسکمی- ریپرفیوژن (۵و۴) سوختگیها (۷و۶) شوک هموراژیک (۸) و اختلال عملکرد قلبی در عفونتها و شوک سپتیک (۹و۴) دخیل شناخته شده اند و میزان اختلال عملکرد قلبی (۱۰) و مرگ و میر بستگی به میزان ترشح این سایتوکاینها دارد (۲). هر چند که سایتوکاینها در هموستاز قلبی عروقی در شرایط سلامت یا بیماری نقش غیر قابل انکاری دارند، اما در شرایط خاص مثل شوک توکسیک در نتیجه تحریک لنفوسیتها با سوپر آنتی ژنها یا طوفان سایتوکاینی ممکن است میزان بسیار بالایی از سایتوکاینها در خون آزاد شده و باعث کولاپس سیستم قلبی-عروقی و مرگ گردند. مدل آزمایشگاهی چنین وضعیتی تحریک لنفوسیتها با یک polyclonal activator (PCA) است. در فعالیتهای آزمایشگاهی مهمترین میتوژن ها فیتوهماگلوتینین، کونکاناوالین A و لیپوپلی ساکارید باکتریایی می باشد. در این مطالعه با مدل سازی شوک توکسیک و تحریک لنفوسیتهای حاصل از خون محیطی با فیتوهماگلوتینین آثار قلبی سایتوکاینهای آزاد شده در این شرایط بر قلب ایزوله رت که متدی دقیق برای ارزیابی مواد موثر بر سیستم قلبی- عروقی است، مورد بررسی قرار گرفته تا بتوان به درک بهتری از تاثیر واسطه های التهابی آزاد شده در شوک توکسیک بر سیستم قلبی عروقی دست پیدا کرد.

مواد و روشها

این مطالعه مداخله ای بر روی ۲۰ سر رت نر نژاد ویستار با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم انجام شد. حیوانات تحت شرایط محیطی یکسان، در درجه حرارت ۲±۲۲ درجهٔ سانتیگراد و در سیکل روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شده و دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. حیوانات به طور تصادفی به ۲ گروه آزمایش و کنترل تقسیم شدند که در گروه آزمون اثر سه غلظت مختلف مایع رویی کشت لنفوسیتی فعال شده با میتوژن (۱/۸۰۰، ۱/۴۰۰، ۱/۲۰۰) مورد بررسی قرار گرفت و در گروه کنترل اثر سه غلظت مختلف مایع کنترل مورد بررسی قرار گرفت. اثر مایع رویی کشت لنفوسیتی تحریک شده با PHA (در گروه آزمون) یا مایع کشت همراه PHA به تنهایی (در گروه کنترل)، بر روی قلب جدا شده موش های صحرایی نر نژاد ویستار مورد بررسی قرار گرفت.

مواد: محیط کشت RPMI(Gibco – دانمارک)، بافر PBS، PHA(Gibco – دانمارک)، L Glutamine- و سرم گاوی (Gibco – دانمارک)، آنتی بیوتیک استرپتومایسین و پنی سیلین (جابربن حیان- ایران)، فایکولLymphocyte-H (Cedar lane)، رنگ تریپان بلو.

جداسازی سلولهای تک هسته ای خون محیطی: برای جدا سازی سلولهای تک هسته ای خون محیطی (PBMCs) از روش فایکول گرادیان استفاده شد:

۱۰ میلی لیتر نمونه خون وریدی تازه از افراد داوطلب سالم تهیه و به لوله های فالکونی ۲۰ میلی لیتری که حاوی ۱ میلی لیتر ماده ضد انعقاد EDTA می باشد، به آرامی افزوده شد سپس به لوله های فالکونی، هم حجم نمونه خون، بافر PBS استریل اضافه شد تا به نسبت دو برابر رقیق شود. در داخل لوله های آزمایش استریل، ۳ میلی لیتر فایکول استریل ریخته و به هر کدام از لوله های حاوی فایکول ۵ میلی لیتر از خون رقیق شده به آرامی اضافه گردید و پس از بستن درب لوله با فویل آلومینیومی، لوله ها به مدت ۲۰ دقیقه با دور 3000 rpm سانتریفوژ شد. سپس با سمپلر لایه بافی کوت حاوی PBMC جدا گردید. به منظور شستشو و خالص سازی، دو نوبت سلولها با بافرPBS به مدت ۱۰ دقیقه و با دور 2000 rpm سانتریفوژ گردید. پس از پایان سانتریفوژ محلول PBS را حذف و رسوب سلولی را با ۳ میلی لیتر محیط کشت RPMI به آرامی مخلوط نموده تا به حالت سوسپانسیون در آید.

شمارش و کشت سلولی: ۹۰ میکرولیتر رنگ تریپان بلو را با ۱۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون سلولی در یک میکرو تیوب نیم میلی لیتری مخلوط کرده سپس تعداد سلولها با لام نئوبار و زیر میکروسکپ (میکروسکوپ معکوس مدل Axio vert-25) شمارش شده و درصد سلولهای زنده محاسبه گردید. جهت کشت سلولی از ظروف کشت ۲۴ چاهک استفاده شد. در هر چاهک $۲x ۱۰^{۶}$ سلول منظور و محیط کشت غنی شده (محیط کشت RPMI، سرم گاوی ۱۰٪، L – گلوتامین ۲ میلی مول، پنی سیلین ۱۰۰ µl/ml و استرپتومایسین ۱۰۰ µl/ml) به آن افزوده شد تا حجم هر چاهک به یک میلی لیتر برسد. در نهایت به منظور تحریک لنفوسیتها، PHA با غلظت ۲ µg/ml به چاهکهای پلیت کشت اضافه شد. پلیتها به مدت ۷۲ ساعت در محیط (دمای ۳۷c، ٪ ۵ CO_2 و رطوبت ۱۰۰٪) انکوبه شدند. مایع رویی کشت پس از ۷۲ ساعت جمع آوری و تا جمع آوری تمام نمونه ها، در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. نمونه کنترل حاوی محیط کشت و PHA به غلظت ۲ µg/ml ولی فاقد لنفوسیت بود و در شرایط مشابه انکوبه و ذخیره گردید.

بررسی کمیت سلولها به روشMTT Assay: پس از شمارش سلولی از سوسپانسیون سلولی و سلول محرک ۲۰۰ میکرولیتر در پلیت ۹۶ چاهک بصورت سه تایی منظور شد، بطوریکه در هر چاهک $۲ x ۱۰^{۵}$ سلول قرار گیرد. سلولها به مدت ۷۲ ساعت در دمای $۳۷^{°C}$، ٪۹۵ هوا و ٪۵ CO_2 و رطوبت ٪۱۰۰ انکوبه شدند. سپس ۲۰ میکرولیتر رنگ MTT به هر چاهک افزوده شد و ۴ ساعت دیگر سلولها انکوبه شدند و بعد از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO به هر چاهک، جذب نوری توسط دستگاه ELISA reader در طول موج ۵۴۵ قرائت شد.

روش اجرای آزمایش: پس از بیهوشی حیوان با استفاده از تیوپنتال سدیم (۵۰ mg/kg, i.p) حیوان تراکئوستومی شده و به دستگاه ونتیلاتور متصل گردید تا در طی مراحل کانول گذاری و جدا سازی قلب دچار هیپوکسی نشود. سپس قفسه سینه باز و آئورت کانول گذاری شده و قلب از بدن جدا و به دستگاه قلب ایزوله (لانگندورف) متصل شد. قلب در ابتدا بوسیله محلول کربس اکسیژنه شده ($۹۵٪ O_2$ و $۵٪ CO_۲$) و با فشار ثابت (۷۰ mmHg)، بمدت ۳۰ دقیقه پرفیوژن گردید تا به وضعیت پایدار برسد. ضربان قلب و فشار درون بطن چپ با استفاده کانولی که در نوک آن بالون کوچکی قرار داشت، اندازه گیری شد. این کانول از طریق ترانسدیوسر فشار (UFI ۱۰۵۰,۱) به دستگاه Power Lab (ML870 Adinstrument، استرالیا) متصل بود که داده ها را ثبت و توسط کامپیوتر ذخیره گردید. هر یک از ۳ غلظت مختلف مایع رویی کشت لنفوسیتی فعال شده با میتوژن مورد بررسی به مدت ۱۰ دقیقه به قلب انفیوژن گردید و فشار درون بطنی به مدت ۵۰ دقیقه ثبت شد. فاصله بین استفاده از دو غلظت حداقل

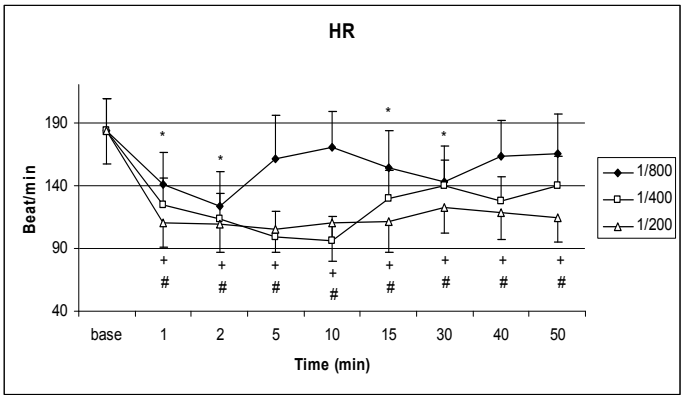
[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.13.6.5.4]

۳۰ دقیقه و پس از برگشت پارامترهای مورد اندازه گیری به حالت پایه بود. بـرای تعیین غلظتهای مورد نظر ابتدا در یک مطالعه مقدماتی کمترین غلظـت مـوثر بـر پارامترهای قلبی مشخص (غلظت ۱/۸۰۰ مایع رویی محـیط کـشت) و غلظتهـای دیگر (غلظتهای ۱/۴۰۰ و ۱/۲۰۰ مایع رویی محیط کشت) بر مبنای ایـن غلظـت پایـه انتخـاب گردیـد. پارامترهـای مـورد ارزیـابی یعنـی Max dp/dt، Min dp/dt، حـداکثر فـشار درون بطنـی (Max LV)، حـداقل فـشار درون بطنـی (Min LV) بوسـیله نـرم افـزار مربـوط بـه دسـتگاه Power Lab (Lab Chart) با استفاده از داده های ترانسدیوسر فشار محاسبه و اندازه گیری شد.

تجزیه و تحلیل داده ها: برای بررسی اثر مایع رویی کشت بر قلب ایزوله در هر گروه از Paired T-Test و جهت مقایسهٔ گروه آزمایش با گـروه کنتـرل از تست آماری Unpaired T-Test استفاده شد و مقایسهٔ اثر غلظتهای مختلف مایع رویی کشت بر قلب ایزولـه بـا تـست آمـاری One Way ANOVA و تـست تعقیبـی تـوکی (Tukey-Kramer Multiple Comparions Test) انجام شد و $p<0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

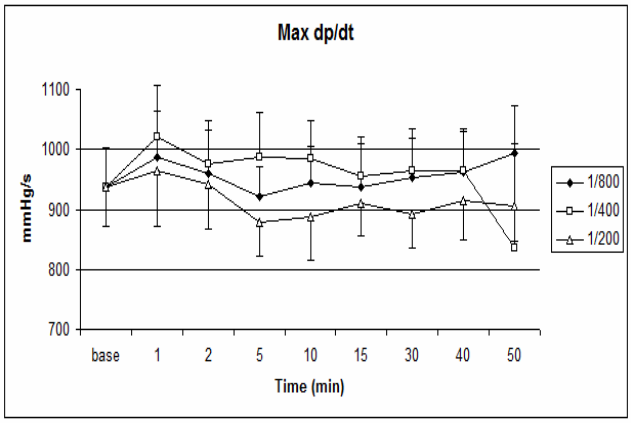
یافته ها

اثر بر تعداد ضربان قلب: در گروه کنترل مقایسه تعداد ضربان قلب قبل با بعد از انفوزیون غلظتهای بکار رفته مایع محـیط کـشت بـدون لنفوسـیت ولـی دارای PHA اثر معنی داری را بروز نداد. در حالیکه مایع رویی میحط کشت لنفوسـیتی تحریک شده با PHA دارای اثر معنی داری بود ($p<0/05$). در گروه آزمون مایع رویی محیط کشت لنفوسـیتهای تحریـک شـده بـا PHA در غلظـت ۱/۸۰۰ در دقایق اول و دوم پس از شروع انفوزیون ونیز ۵ و ۲۰ دقیقه پس از خاتمه انفوزیون بطور معنی داری تعداد ضربان قلب کاهش یافت. غلظتهای ۱/۴۰۰ و ۱/۲۰۰ تعداد ضربان قلب را بطور معنی داری در دقیقه اول پس از شروع انفوزیون تا ۴۰ دقیقـه پس از خاتمه انفوزیون بطور معنی داری کاهش داد ($p<0/05$) (نمودار ۱).



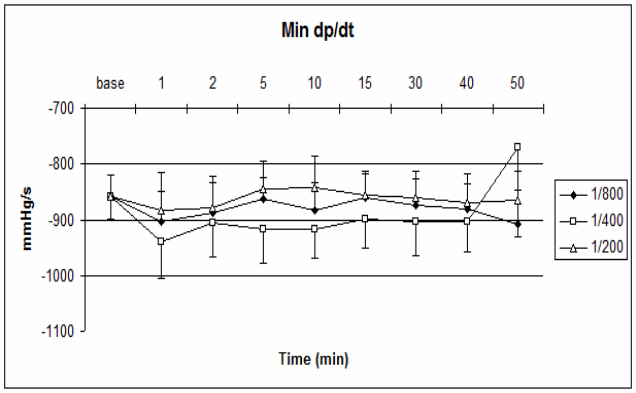
نمودار ۱. اثر دوزهای مختلف مایع رویی کشت لنفوسیتی تحریک شده با PHA بر تعداد ضربان قلب ایزوله رت. (n=۱۰، P<0.05 #,+,* در مقایسه با مقدار پایه)

اثر بر پارامترهای فشار درون بطنی: در گروه کنتـرل کـه قلـب مـایع رویـی محیط کشت همراه PHA را دریافت میکرد، غلظتهای بکار رفته اثر معنـی داری را بر تعداد ضربات قلب بروز نداد. مایع رویی محیط کـشت لنفوسـیتهای تحریـک شده با PHA بر Max dp/dt تا حدودی اثر افزایـشی بـویژه در دقـایق اولیـه انفیوژن مایع رویی محیط کشت نشان داد اگرچه این اثر معنی دار نبود (نمودار ۲).



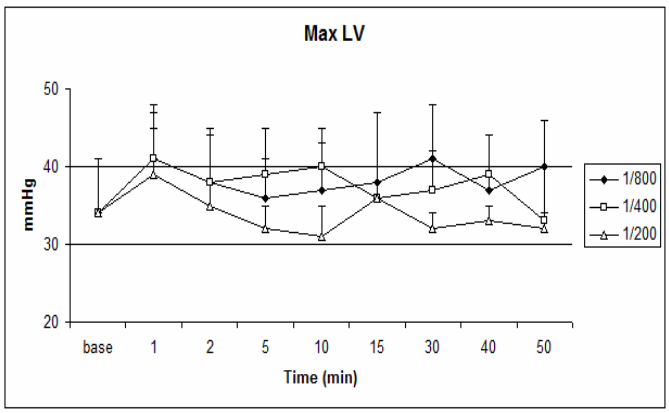
نمودار ۲. اثر دوزهای مختلف مایع رویی کشت لنفوسیتی تحریک شده با PHA بر Max dp/dt قلب ایزوله رت. (n=۱۰)

Max dp/dt و Min dp/dt بعنـوان شاخـصهای معتبـر بـرای ارزیـابی عملکرد قدرت انقباضی قلبی مطرح هستند. مایع رویی محیط کشت لنفوسـیتهای تحریک شده با PHA بر Min dp/dt اثر کاهـشی در دقـایق اولیـه انفوزیـون مایع رویی محیط کشت نشان داد که معنی دار نبود (نمودار ۳).



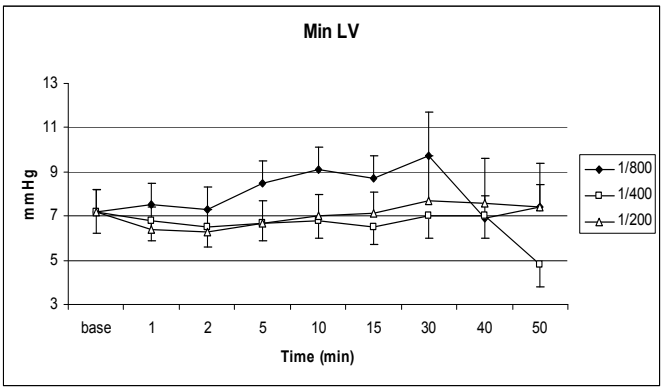
نمودار ۳. اثر دوزهای مختلف مایع رویی کشت لنفوسیتی تحریک شده با PHA بر Min dp/dt قلب ایزوله رت. (n=۱۰)

حداکثر فشار بطن چپ (Max LV) نیز در دقایق اولیه انفوزیون مایع رویی محیط کشت افزایش غیر معنی داری را نشان داد (نمودار ۴). مـایع رویـی محـیط کشت اثر معنی داری بر حداقل فشار بطن چپ(Min LV) نشان نداد (نمودار ۵).



نمودار ۴. اثر دوزهای مختلف مایع رویی کشت لنفوسیتی تحریک شده با PHA بر حداکثر فشار درون بطنی (Max LV) قلب ایزوله رت. (n=۱۰)

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.13.6.5.4]



نمودار ۵: اثر دوزهای مختلف مایع رویی کشت لنفوسیتی تحریک شده با PHA بر حداقل فشار درون بطنی (Min LV) قلب ایزوله رت. (n=۱۰)

بحث و نتیجه گیری

مایع رویی کشت لنفوسیتی تحریک شده با PHA بیشترین اثر قابل ملاحظه بر فعالیتهای قلبی را بر تعداد ضربان قلب نشان داد. بنابراین میتوان نتیجه گرفت که آثار بروز کرده در گروه آزمون مربوط به مدیاتورها و سایتوکاینهای موجود در مایع رویی محیط کشت لنفوسیتهای تحریک شده با PHA از قبیل IL-2، IL-4، TNFβ یا IFNγ باشد. اگر چه انتظار میرفت که آثار همگام بر پارامترهای فشار درون بطنی نیز بروز کند اما چنین آثاری مشاهده نشد. بنابراین میتوان نتیجه گرفت که سایتوکاینهای آزاد شده در چنین شرایطی که باید الگویی از شوک توکسیک و ناشی از اثر ابر آنتی ژنها بر لنفوسیتها باشد بیشترین اثر واضح را بر تعداد ضربان قلب دارد به بیان دیگر میتوان نتیجه گرفت که این سایتوکاینها بیشتر اثر را بر سیستم تحریکی و هدایتی قلب اعمال کرده اند و اثر چندانی بر قدرت انقباضی عضله قلبی نداشته اند.

مهمترین سیستمی که در طی آزاد سازی سایتوکاینها در شرایط التهاب ساب کلینیکال یا کلینیکال تحت تأثیر قرار می گیرد سیستم قلبی – عروقی می باشد. شاید به همین دلیل است که امروزه به بررسی آثار قلبی – عروقی پاسخهای ایمنی وبه خصوص شبکه سایتوکاینی در رشته نورو ایمونواندوکرینولوژی توجه ویژه میشود. پژوهشهای مرتبط با آثار قلبی سایتوکاینها به خصوص در قلب ایزوله اهمیت بسیار دارد چرا که میتوان آثار قلبی این مواد بسیار مهم را در عدم حضور آثار سیستمهای عصبی و هورمونی بهتر شناسایی نمود. اما آنچه در این تحقیق مد نظر ما بوده است، تقلید الگوی سایتوکاینهای آزاد شده در پاسخ ایمنی اختصاصی با واسطه سلول T و در شرایط برون تنی است که با اثر هر سایتوکین به تنهایی کاملا متفاوت است. آنچه سیستم قلبی- عروقی را در شرایط پاسخ ایمنی تحت تأثیر قرار می دهد حضور یک سایتوکاین بخصوص نیست، بلکه آثار مجموعه ای از شبکه سایتوکاینهایی است که الگویی مشخص دارد. تحریک با میتوژن بازسازی شرایط مواجهه سیستم ایمنی با آنتی ژنهای فعال کننده پلی کلونال وسوپر آنتی ژنهاست. در این مدل مقادیر فراوانی از سایتوکاینهای دسته اول (سایتوکاینهای التهابی) از قبیل TNF-α و TNF-β ، IL-1, IL-2, IFN-γ و IL- 6 و مقادیر ناچیز از سایتوکاینهای دسته دوم (سایتوکایتهای ضد التهابی) مانند IL-4 و IL-10 تولید می شود. در این مطالعه در غلظت ۱/۸۰۰ کاهش تعداد ضربان قلب در دقایق اول و دوم از شروع انفوزیون و سپس دقایق ۱۵و۳۰ معنی دار شد اما در دو غلظت ۱/۲۰۰و ۱/۴۰۰ این کاهش ضربان قلب در تمام دقایق پس از شروع انفوزیون معنی دار می باشد و از آنجا که آثار سایتوکاینها وابسته به غلظت آنها است این تفاوت پاسخ قابل توجیه است. اگرچه سایتوکاینهای التهابی IL-1 ، IL-6 و TNF و سایتوکاین تعدیل کنندهٔ سیستم ایمنی IL-2 بعنوان عواملی با آثار اینوتروپیک منفی بر قلب در نظر گرفته می شوند، طبیعت و الگوی آثار اینوتروپیک پیچیده می باشد. در مطالعات برون تنی مشاهده شده است که آثار سایتوکاینها بر قلب از نظر زمانی به دو صورت زودرس و تأخیری بروز می کند:

آثار زودرس و فوری که در طی دقایقی پس از تماس میوسیتهای قلبی با سایتوکاینهای التهابی، مایع رویی کشت لکوسیتی و یا با سرم افراد مبتلا به سپسیس بروز می کند (۱۲و۱۱) و این پاسخ زودرس بر حسب شرایط تجربی و محیط فیزیولوژیک می تواند تحریکی (۱۴و۱۳) و یا تضعیفی باشد (۱۶و۱۵). پاسخ تضعیفی دیررس و طولانی ساعتها پس از تماس بروز می کند و تا روزها باقی می ماند (۱۹-۱۷).

به نظر می رسد در ایجاد پاسخ تأخیری طولانی مسیرهای بیوشیمیایی متفاوتی از پاسخ زودرس دخالت داشته باشند و با تولید میانجی های ثانویه مرتبط می باشد. در مطالعات درون تنی نیز انفوزیون کوتاه مدت سایتوکاینهای التهابی موجب بروز سریع تضعیف قلبی می شود و علی رغم عمر کوتاه سایتوکاینها این پاسخ می تواند چندین روز تا یک هفته دوام داشته باشد. علت اختلاف در نتایج حاصل از مطالعات مختلف در مورد آثار اینوتروپیک زودرس سایتوکاینها کاملاً مشخص نیست اما چندین فاکتور می تواند در آن دخیل باشد. یکی از این فاکتورها نوع سایتوکاین است، سایتوکاینها علاوه بر آثار مشابه، هر یک اثر منحصر به فردی نیز اعمال می کنند. بعلاوه مشخص شده است که آثار سایتوکاینها بر قلب وابسته به غلظت و زمان می باشد و سایتوکاینها می توانند در غلظتهای مختلف آثار متفاوتی بروز دهند. در آزمایشاتی که اثر مایع رویی کشت لکوسیتی را بر قلب بررسی کرده اند، انتخاب روش تحریک و نوع مادهٔ محرک در پروفایل سایتوکاینهای ترشح شده بر پاسخ قلبی تأثیر داشت (۲۰). مثلاً در کشت مختلط لکوسیتی مقادیر دو سایتوکاین IL-2 و IFN-γ فراوان است. پروفایل سایتوکاینهای تولید شده نه تنها با نوع میتوژن انتخابی در کشت لنفوسیتی ربط دارد بلکه در شرایط درون تنی نیز با بیماریها و وضعیتهای کلینیکی مختلف تغییر می کند (۲۱). از آنجاییکه سایتوکاینها بر یکدیگر آثار متقابل داشته و بعضی سایتوکاینها اثر یکدیگر را تشدید و برخی یکدیگر را آنتاگونیزه می کنند (۲۳و۲۲و۱۱) پروفایل سایتوکاینی بر نوع پاسخ قلبی تأثیر خواهد داشت. در مطالعاتی که در مورد آثار سایتوکاینها انجام شده، مکانیسمهای سلولی متعددی برای این پاسخها ذکر شده است. معلوم شده که نیتریک اکساید سنتاز ساختاری (۲۵و۲۴)، مدیاتورهای اسفنگولیپید (۲۸-۲۶) آراشیدونیک اسید (۳۰و۲۹) و تغییر در جریانهای کلسیم داخل سلولی (۳۳-۳۱) در ایجاد آثار سریع سهیم می باشند. در صورتیکه پاسخ تأخیری بطور اولیه، حاصل تأثیر NO تولید شده از فعالیت نیتریک اکساید سنتاز القایی (۳۳و۱۴) تولید گونه های فعال اکسیژن و تغییر در سیگنالینگ گیرنده های آدرنرژیک است (۲۰). مکانیسمهای ابتدایی و واسط هرچه باشند تغییرات در کلسیم سیتوزولی و یا تغییر در حساسیت میوفیلامانها به کلسیم یکی از علل احتمالی دخیل در تغییر قدرت انقباضی میوکاردی برشمرده می شود. تغییرات گذرا در کلسیم همگام با پاسخ اینوتروپیک، در اثر سایتوکاین گزارش شده است. Amadou و همکاران در مطالعه ای که بر میوسیت ایزولهٔ رت انجام

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.13.6.5.4]

دادند نشان دادند که TNF- α یک اثر دوگانه بر جریانهای کلسیم درون سلولی و انقباض اعمال می کند، در غلظت کم موجب افزایش مقدار کلسیم درون سلولی و در غلظتهای بیشتر موجب کاهش کلسیم درون سلولی و انقباض می شود (۱۳). آثار اینوتروپیک مثبت و منفی سایتوکاینها به فعال شدن فسفولیپاز A2 و تشکیل آراشیدونیک اسید (AA) نسبت داده می شود و با استفاده از آراشیدونیل تری فلورومتیل (یک مهار کنندهٔ فسفولیپاز A2) هر دو اثر بلوک می شود. در غلظتهای پائین تر، آراشیدونیک اسید اثر اینوتروپیک مثبت دارد و موجب افزایش کلسیم گذرای درون سلولی و افزایش انقباض میوسیت ایزوله می شود در حالیکه آثار منفی اسید آراشیدونیک در غلظتهای بالاتر آن ظاهر می شود و آثار منفی AA نیازمند فعال شدن سرامیداز می باشد. سرامیداز آنزیم تبدیل کنندهٔ سرامید به اسفنگوزین است و در تأیید این مطلب نشان داده شد که اسفنگوزین اگزوژن در طی ۳۰ دقیقه یک اثر تضعیفی وابسته به دوز بر کلسیم درون سلولی و انقباض دارد و مهار کننده های سرامیداز اثر TNFو AA را برکاهش کلسیم درون سلولی و انقباض کمرنگ کرد. آراشیدونیک اسید بر سرامیداز تأثیر ندارد بلکه از طریق فعال کردن اسفنگومیلیناز و تبدیل اسفنگومیلین به سرامید، موجب افزایش سرامید و نتیجتاً افزایش اسفنگوزین می شود (۱۳) از آنجاییکه مقادیر داخل سلولی گلوتاتیون بطور بارزی فعالیت اسفنگومیلیناز خنثی را تعدیل می کند، استرس اکسیداتیو و کاهش گلوتاتیون می تواند بر آثار اینوتروپیک وابسته به فعالیت این مسیر تأثیر داشته باشد (۳۵و۳۴). علاوه بر این استرس اکسیداتیو بر فراهمی زیستی نیتریک اکساید نیز اثر دارد و می تواند پاسخهای سایتوکاینی وابسته به NO را تحت تأثیر قرار دهد (۳۶).

بطور کلی نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که در هر نوع بخصوص از پاسخ ایمنی که الگوی سایتوکاینی ویژه خود را دارد، آثار قلبی عروقی مربوط به آن نوع از پاسخ ایمنی را خواهد داشت که برآیند آثار آن الگوی خاص می باشد. در پاسخ ایمنی مدل شوک سپتیک یا به عبارت بهتر تحریک الگوی سایتوکاینی التهابی با PHA آثار قلبی بیشتر بصورت کاهش معنی دار تعداد ضربان قلب بوده است.

تشکر و تقدیر

بدینوسیله از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مشهد به دلیل حمایت مالی از تحقیق، تشکر و قدردانی می گردد.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.13.6.5.4]

The Effect of the Supernatant of Phytohemagglutinin (PHA) Stimulated Lymphocytes on the Isolated Rat Heart

S. Niazmand (PhD) [1, 2], N. Zabihi (MSc) [2], F. Harandizadeh (MSc) [3], S.A. Rezaee (PhD) [4*]

1. Cardiovascular Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
2. Physiology Department, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
3. Biology Department, Faculty of Sciences, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
4. Immunology Research Center and Immunology Department, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

J Babol Univ Med Sci; 13(6); Nov 2011

Received: Jan 7th 2011, Revised: Feb 9th 2011, Accepted: Jun 29th 2011.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Cytokines are mainly released during immune responses to antigens. In some circumstances such as toxic shock during super-antigen stimulation, high level of cytokines are released which it may have a dramatic impact on cardiovascular system. Therefore, in the present study the effects of supernatant of Phytohemaglotinin (PHA)- stimulated lymphocytes on isolated heart in rat have been evaluated.

METHODS: This is an interventional study which was arranged on 20 male Wistar rats weighed 200-250g. The animals were randomly divided in two groups of control and test. The isolated heart in control group received the cell culture medium with PHA, while in test group the supernatants of PHA stimulated lymphocytes were introduced to isolated hearts. Three dilutions of supernatants (1/800, 1/400 and 1/200) on isolated rat hearts were used. Each concentration was infused to the heart for 10 minutes and the heart rate and the intraventricular pressure were recorded for 40 minutes. The peripheral blood mononuclear cells from healthy volunteers were isolated and stimulated by PHA in vitro for three days and then the supernatants were harvested.

FINDINGS: The highest dilution, 1/800, reduced the heart rate 1 and 2 minute after infusion significantly ($p<0.05$). This effect was significant 10 minutes after infusion for 1/400 and 1/200 dilutions as well. However, the effect of supernatant on the Max dp/dt, Min dp/dt, Max LV and Min LV were not significant.

CONCLUSION: In general the data in the present study shows that cytokine pattern of PHA stimulated lymphocyte had a marked negative impact on heart rate which might be due to the effect of these cytokines on stimulatory and conductivity (chronotropy) of cardiac muscle. On the other hand, there was not any significant effect on contractility.

KEY WORDS: *Isolated heart, Heart contractility, Heart rate, Phytohemagglutinin, Lymphocyte.*

[*] **Corresponding Author;**
Address: Immunology Research Center, Immunology Dept, Ghaem Hospital, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
Tel: +98 511 8436626
E-mail: rezaeer@mums.ac.ir

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.13.6.5.4]

References

1. Longo D, Fauci A, Kasper D, et al. Harrison's principles of internal medicine. 18th ed. New York: McGraw Hill; 2011; pp: 224-31.
2. Charney P, Meyer BR, Frishman WH, et al. Heart diseases in women. In: Fuster V, Alexander RW, O' Rourke RA. Hurst's the heart. 10th ed. New York: McGraw Hill 2001; p: 525.
3. Kofler S, Nickel T, Weis M. Role of cytokines in cardiovascular diseases: a focus on endothelial responses to inflammation. Clin Sci (Lond) 2005;108(3):205-13.
4. Mehra VC, Ramgolam VS, Bender JR. Cytokines and cardiovascular disease. J Leukoc Biol 2005;78(4):805-18.
5. Horton JW, White DJ. Cardiac contractile injury after intestinal ischemia-reperfusion. Am J Physiol 1991;261(4 pt 2):1164-70.
6. Baxter CR, Cook WA, Shires GT. Serum myocardial depressant factor of burn shock. Surg Forum 1996; 17: 1-2.
7. Horton JW, Garcia NM, White DJ, Keffer J. Postburn cardiac contractile function and biochemical markers of postburn cardiac injury. J Am Coll Surg 1995;181(4):289-98.
8. Horton JW. Hemorrhagic shock depresses myocardial contractile function in the guinea pig. Circ Shock 1989;28(1): 23-35.
9. Parrillo JE, Burch C, Shelhamer JH, Parker MM, Natanson C, Schuette W. A circulating myocardial depressant substance in humans with septic shock. Septic shock patients with a reduced ejection fraction have a circulating factor that depresses in Vitro myocardial cell performance. J Clin Invest 1985;76(4):1539-53.
10. Horton JW, Maass D, White J, Sanders B. Nitric oxide modulation of TNF-alpha-induced cardiac contractile dysfunction is concentration dependent. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000;278(6):1955-65.
11. Roberts AB, Roche NS, Winokur TS, Burmester JK, Sporn MB. Role of transforming growth factor-β in maintenance of function of cultured neonatal cardiac myocytes. Autocrine action and reversal of damaging effects of interleukin-1. J Clin Invest 1992;90(5):2056-62.
12. Grandel U, Fink L, Blum A, et al. Endotoxin-induced myocardial tumor necrosis factor- α synthesis depresses contractility of isolated rat hearts: evidence for a role of sphingosine and cyclooxygenase-2-derived thromboxane production. Circulation 2000;102(22):2758-64.
13. Amadou A, Nawrocki A, Best-Belpomme M, Pavoine C, Pecker F. Arachidonic acid mediates dual effect of TNF-α on Ca2+ transients and contraction of adult rat cardiomyocytes. Am J Physiol Cell Physiol 2002;282(6):1339-47.
14. Schulz R, Panas DL, Catena R, Moncada S, Olley PM, Lopaschuk GD. The role of nitric oxide in cardiac depression induced by interleukin-1β and tumour necrosis factor- α. Br J Pharmacol 1995;114(1):27-34.
15. Evans HG, Lewis MJ, Shah AM. Interleukin-1β modulates myocardial contraction via dexamethasone sensitive production of nitric oxide. Cardiovasc Res 1993;27(8):1486-90.
16. Chung MK, Gulick TS, Rotondo RE, Schreiner GF, Lange LG. Mechanism of cytokine inhibition of beta-adrenergic agonist stimulation of cyclic AMP in rat cardiac myocytes. Impairment of signal transduction. Circ Res 1990;67(3): 753-63.
17. Ohlsson K, Bjork P, Bergenfeldt M, Hageman R, Thompson RC. Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality from endotoxin shock. Nature 1990;348(6301):550-2.
18. Oyama J, Shimokawa H, Momii H, et al. Role of nitric oxide and peroxynitrite in the cytokine-induced sustained myocardial dysfunction in dogs in vivo. J Clin Invest 1998;101(10):2207-14.
19. Kubota T, McTiernan CF, Frye CS, et al. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-α. Circ Res 1997;81(4):627-35.
20. Prabhu SD. Cytokine-induced modulation of cardiac function. Circ Res 2004;95(12):1140-53.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.13.6.5.4]

21. Katial RK, Sachanandani D, Pinney C, Lieberman MM. Cytokine production in cell culture by peripheral blood mononuclear cells from immunocompetent hosts. Clin Diagn Lab Immunol 1998;5(1):78-81.
22. Natanson C, Eichenholz PW, Danner RL, et al. Endotoxin and tumor necrosis factor challenges in dogs simulate the cardiovascular profile of human septic shock. J Exp Med 1989;169(3):823-32.
23. Ungureanu-Longrois D, Balligand JL, et al. Contractile responsiveness of ventricular myocytes to isoproterenol is regulated by induction of nitric oxide synthase activity in cardiac microvascular endothelial cells in heterotypic primary culture. Circ Res 1995;77(3):486-93.
24. Panas D, Khadour FH, Szabó C, Schulz R. Proinflammatory cytokines depress cardiac efficiency by a nitric oxide-dependent mechanism. Am J Physiol 1998; 275(3Pt 2):1016-23.
25. Sun X, Delbridge LM, Dusting GJ. Cardiodepressant effects of interferon-γ and endotoxin reversed by inhibition of NO synthase 2 in rat myocardium. J Mol Cell Cardiol 1998;30(5):989-97.
26. Oral H, Kapadia S, Nakano M, et al. Tumor necrosis factor-alpha and the failing human heart. Clin Cardiol 1995; 18(9 Suppl 4): IV20-7.
27. Edmunds NJ, Lal H, Woodward B. Effects of tumour necrosis factor-α on left ventricular function in the rat isolated perfused heart: possible mechanisms for a decline in cardiac function. Br J Pharmacol 1999;126(1):189-96.
28. Friedrichs GS, Swillo RE, Jow B, et al. Sphingosine modulates myocyte electrophysiology, induces negative inotropy, and decreases survival after myocardial ischemia. J Cardiovasc Pharmacol 2002;39(1):18-28.
29. Jayadev S, Linardic CM, Hannun YA. Identification of arachidonic acid as a mediator of sphingomyelin hydrolysis in response to tumor necrosis factor. J Biol Chem 1994;269(8):5757-63.
30. Damron DS, Summers BA. Arachidonic acid enhances contraction and intracellular Ca2+ transients in individual rat ventricular myocytes. Am J Physiol 1997;272(1 Pt 2):350-9.
31. Stamm C, Friehs I, Cowan DB, et al. Inhibition of tumor necrosis factor-α improves post ischemic recovery of hypertrophied hearts. Circulation 2001;104 (12 Suppl 1):350-5.
32. Stamm C, Cowan DB, Friehs I, Noria S, del Nido PJ, McGowan FX Jr. Rapid endotoxin-induced alterations in myocardial calcium handling: obligatory role of cardiac TNF-α. Anesthesiology 2001;95(6):1396-405.
33. Krown KA, Yasui K, Brooker MJ, et al. TNF α receptor expression in rat cardiac myocytes: TNF-α inhibition of L-type Ca2+ current and Ca2+ transients. FEBS Lett 1995;376(1-2):24-30.
34. Cailleret M, Amadou A, Andrieu-Abadie N, et al. N-acetylcysteine prevents the deleterious effect of tumor necrosis factor-α on calcium transients and contraction in adult rat cardiomyocytes. Circulation 2004;109(3):406-11.
35. Liu B, Andrieu-Abadie N, Levade T, Zhang P, Obeid LM, Hannun YA. Glutathione regulation of neutral sphingomyelinase in tumor necrosis factor-α induced cell death. J Biol Chem 1998;273(18):11313-20.
36. Prabhu SD. Nitric oxide protects against pathological ventricular remodeling: reconsideration of the role of NO in the failing heart. Circ Res 2004;94(9):1155-7.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1390.13.6.5.4]