

## KARDİOVASKÜLER HASTALIKLARIN KLİNİK TANISINDA TUMOR NEKROZ FAKTÖR- $\alpha$ VE İNTERLÖKİN-6'NİN ÖNEMİ ♦

Sema GENÇ\*, Figen GÜRDÖL\*, Nihal SALMAYENLİ\*, Kerim GÜLER\*\*,  
İbrahim KELEŞ\*\*, Hikmet KOÇAK\*

### ÖZET

Organizmada tümör nekroz faktörleri olarak bilinen TNF- $\alpha$  ve  $\beta$ , sentezlendikleri hücreler farklı olmakla birlikte, fonksiyonları ve biyolojik aktiviteleri açısından benzerlik gösteren sitokinlerdir. Lenfotoksin olarak da bilinen TNF- $\beta$  esas olarak T hücrelerinden salgılanmakta, buna karşılık TNF- $\alpha$  makrofajlardan kaynaklanmaktadır. Pirojen özelliği olan TNF, aralarında interlökin-1 (IL-1) ve interlökin-6 (IL-6) 'nın da bulunduğu diğer pirojenlerin sekresyonunu uyarmaktadır. IL-6, makrofaj/monosit sistemi dahil olmak üzere lenfositler, nötrofiller, endotelial hücreler, ve fibroblastlar gibi çok çeşitli hücreler tarafından salgılanmakta ve başlıca fonksiyonunu akut faz reaksiyonları, immun cevabın düzenlenmesi ve hematopoiez oluşturmaktadır.

Bu çalışma, kalp kasının fonksiyonunu etkileyen çeşitli hasta gruplarında serum TNF- $\alpha$  ve IL-6 düzeylerinin diagnostik önemini incelemek amacıyla planlanmış, bu amaçla yaşları 45-80 arasında değişen toplam 38 hasta konjestif kalp yetersizliği (I), iskemik kalp hastalığı (II), akut myokard infarktüsü (III) olarak gruplandırılmıştır.

Serum TNF- $\alpha$  düzeylerinde gruplar arasında anlamlı bir farklılık tespit edilememiş, buna karşılık IL-6 düzeylerinin konjestif kalp yetersizliği ve akut myokard infarktüsü geçiren hastalarda artmış olduğu gösterilmiştir. Bu artışın özellikle akut myokard infarktüsü geçiren hastalarda belirgin olması ve kalp adalesine özgü bir izoenzim olan CK-MB aktivitesi ile korelasyon göstermesi, IL-6'nın CK-MB ile birlikte hastalık progresyonunun izlenmesinde önemli olabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar kelimeler:** İnterlökin-6, tümör nekroz faktör- $\alpha$ , kardiovasküler hastalıklar.

### SUMMARY

*Diagnostic importance of Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 levels in cardiovascular diseases.* Two forms of Tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$  and  $\beta$ , which share similar inflammatory activities are secreted by different cell types. TNF- $\beta$ , described as "lymphotoxin", is produced mainly by T cells, whereas macrophages are the predominant source of TNF- $\alpha$ . TNF is an endogenous pyrogen that stimulates the production of other endogenous pyrogens such as interleukin-1 (IL-1) and interleukin-6 (IL-6). IL-6 is a multifunctional cytokine produced by a variety of cells including macrophage/monocyte system, lymphocytes, neutrophils, endothelial cells, fibroblasts and Kupffer cells. It regulates immune responses, acute phase reactions and haematopoiesis.

This study was planned to evaluate the diagnostic importance of serum TNF- $\alpha$  and IL-6 levels in diseases related to cardiac dysfunction. For this purpose, 38 patients (13 women and 25 men) who were admitted to the Department of Internal Medicine, Emergency Care Unit were included in this study. Patients were grouped as follows: congestive heart failure (I), ischemic heart disease and acute myocardial infarct (III).

Serum TNF- $\alpha$  levels did not show any change between the groups, whereas IL-6 concentrations showed increments in patients with congestive heart failure and acute myocardial infarct when compared to control group. A positive correlation was found between serum IL-6 levels and CK-MB enzyme activity which is generally used as an index for myocardial damage. Therefore, it is concluded that measurement of serum IL-6 levels is of diagnostic importance for the follow-up of cardiac diseases.

**Key words:** Interleukin-6, tumor necrosis factor- $\alpha$ , cardiovascular diseases.

## GİRİŞ

Organizmada tümör nekroz faktörleri olarak bilinen TNF- $\alpha$  ve TNF- $\beta$ , sentezlendikleri hücreler farklı olmakla birlikte, fonksiyonları ve biyolojik aktiviteleri açısından benzerlik gösteren sitokinlerdir. Lenfotoksin olarak da bilinen TNF- $\beta$  esas olarak T hücrelerinde salgılanmakta (33), buna karşılık TNF- $\alpha$  makrofajlardan kaynaklanmaktadır. Myokardial makrofajlar ve myositlerde TNF- $\alpha$  'nın sentezlendiği gösterilmiştir (10,12,28,35,36). TNF- $\alpha$  ilk defa fare tümörlerinde nekrotizan etki oluşturan bir protein olarak tanımlanmıştır (3). Daha sonraki çalışmalarda TNF- $\alpha$ 'nın biyolojik aktivitesinin sadece sitotoksik etkiyle sınırlı olmayıp kardiyak myositler de dahil olmak üzere çeşitli hücrelerde pleitropik etki yaptığı bildirilmiştir (9). Deneysel çalışmalarda, kısa süreli uygulamanın ateş ve hipotansiyon, uzun süreli uygulamanın kaşeksi ve anoreksiye yol açtığı gösterilmiştir (29,37,38). Birçok klinik çalışmayla da ciddi kilo kaybının ve anoreksinin karakteristik özelliklerini oluşturduğu neoplastik, infeksiyöz, kollajen vasküler hastalık gruplarında TNF- $\alpha$ 'nın dolaşımdaki düzeyinin arttığı saptanmıştır (1,22,39). Pirojen özelliği olan TNF aralarında interlökin-1 (IL-1) ve interlökin-6 (IL-6)'nın da bulunduğu diğer pirojenlerin sekresyonunu uyarmaktadır (4). IL-6, makrofaj/monosit sistemi dahil olmak üzere lenfositler, nötrofiller, endotelial hücreler ve fibroblastlar gibi çok çeşitli hücre tipleri tarafından salgılanmakta, başlıca fonksiyonunu akut faz reaksiyonlarının ve immün cevabın düzenlenmesi ve hematopoiéz oluşturmaktadır (2,13,15).

Proinflamatuvar bir sitokin olan TNF'ün akut myokard infarktüsü, kronik kalp yetersizliği, ateroskleroz, viral myokardit, kardiyak allograft rejeksiyonu gibi kardiovasküler patolojilerde rol oynadığı bildirilmiştir (19,20,28,36,41). Ancak TNF- $\alpha$  düzeylerinin metoda bağlı olmaksızın hastalar arasında ve aynı hastanın tekrarlanan tetkiklerinde bü-

yük farklılıklar gösterdiği, bunun yanında ciddi kalp yetersizliği olan birçok hastanın plazmasında ölçülemediği gözlemlenmiştir (6). Bu çalışma, kalp kasının normal fonksiyonunu etkileyen çeşitli hastalık gruplarında serum TNF- $\alpha$  ve IL-6 düzeylerinin diagnostik önemini incelemek amacıyla planlanmıştır.

## MATERYAL ve METOD

### Çalışma grubu:

İstanbul Tıp Fakültesi Acil Dahiliye Ünitesine başvuran, yaşları 45-80 arasında değişen (medyan = 65) toplam 38 hasta (13 kadın, 25 erkek) deney grubunu oluşturdu. Hastalar konjestif kalp yetersizliği (I), iskemik kalp hastalığı (II) ve akut myokard infarktüsü (III) olmak üzere gruplandırıldı. İskemik kalp yetersizliği ve konjestif kalp yetersizliği tanısı klinik, EKG ve ekokardiyografi bulguları ile, akut myokard infarktüsü tanısı klinik, laboratuvar ve EKG bulguları ile konuldu. İnfeksiyon, otoimmün hastalık, böbrek yetersizliği, kanser gibi kronik bir hastalığı olanlar çalışma grubuna alınmadı. Benzer yaş grubundaki 19 sağlıklı kişi kontrol grubunu oluşturdu.

### Biyokimyasal yöntemler:

Kliniğe başvuran hastalardan ilk 12-20 saat içerisinde kuru tüpe alınan 10 ml kan santrifüj edilerek serumlar ayrıldı. Aspartat amino transferaz (AST), kreatin kinaz=CK ve CK-MB izoenzimi aktivite ölçümleri aynı gün Cobas Integra 700 otoanalizörü ile çalışıldı. Artan serum, TNF- $\alpha$  ve IL-6 ölçümleri için -80° C'de çalışma gününe kadar saklandı. IL-6 ve TNF- $\alpha$  konsantrasyonları sandviç enzim immunoassay prensibini esas alan ELISA (Immunotech, Fransa) kiti kullanılarak gerçekleştirildi.

İstatistiksel değerlendirmeler için Student's t test ve Pearson korelasyon yöntemi kullanıldı.

## BULGULAR

Kontrol grubu ve çalışma gruplarını oluşturan olgulardan elde edilen sonuçlar Tablo 1'de gösterilmiştir.

Serum IL-6 düzeyleri; konjestif kalp yetersizliği olan grupta ( $31.9 \pm 29.3$  pg/ml) kontrol grubuna ( $14.15 \pm 3.93$  pg/ml) göre anlamlı olarak artmış bulundu ( $p < 0.05$ ). Akut myokard infarktüsli grupta ise ( $162 \pm 107$  pg/ml) bu artışın daha belirgin olduğu saptandı ( $p < 0.001$ ). IL-6 düzeyleri ile hem AST ve hem de CK-MB enzim aktiviteleri arasında anlamlı pozitif korelasyon olduğu görüldü ( $r$  değerleri sırasıyla  $0.77$  ve  $0.72$ ;  $p < 0.01$ ).

## TARTIŞMA

Dolaşım yetersizliği olarak da tanımlanabilen kalp yetersizliğinin genellikle belli başlı bulgusu efor dispnesidir. Fonksiyonel kapasitede gelişen bu yetersizlik, kalbin atım gücünün azalması veya periferik direncin artmasına bağlı olarak gelişir. Periferik direnci arttıran bu durum, endotel hücrelerinin nitrik oksit (NO) serbestleştirme yeteneğini kaybetmesiyle açıklanmaktadır (<sup>14,18</sup>). Spesifik

olarak TNF'ün, endotelial NO sentezinden sorumlu olan enzimin mRNA düzeyini azaltmak (<sup>42</sup>) veya endotel tarafından sentezlenen NO'ı peroksi nitrite dönüştüren süperoksit radikalının sentezini arttırmak suretiyle etkili olduğu düşünülmektedir (<sup>21</sup>). Diğer taraftan, TNF'ün direkt olarak hastalıklı kalp kasına etki etmek suretiyle kalp yetersizliğinin daha da ilerlemesine yol açabileceği görüşü ortaya atılmıştır. Kardiyak TNF reseptörleri ile etkileşimi sonucu TNF, hücrede nitrik oksit sentezi için gerekli bir kofaktör olan tetrahidrobiopterin düzeyini ve dolayısıyla inaktif metaboliti olan neopterin düzeyini arttırmaktadır (<sup>11</sup>). Bunun sonucunda artan NO hem myokardial kontraktiletiyi inhibe eder (<sup>7</sup>), hem de apoptozisi uyarmak suretiyle sitotoksik etki gösterir (<sup>32</sup>). Bu durumda TNF'ün, gerek kalp kası, gerekse endotel hücreleri üzerindeki etkisini hücre içi NO düzeylerini değiştirerek yaptığı anlaşılmaktadır.

Myokardial kontraksiyon ve relaksasyon siklusunda kalsiyum homeostazının önemi uzun yıllardan beri bilinmektedir. İntrasellüler kalsiyum, sistolik kontraksiyonu, diastolik relaksasyonu, enzimatik aktiviteyi ve mitokondrial fonksiyonu düzenlemektedir (<sup>23</sup>).

**Tablo 1.** Kardiyovasküler hastalıklarda serum IL-6 ve TNF- $\alpha$  düzeyleri ile doku hasarını gösteren bazı rutin parametreler (ort.  $\pm$  SD).

Parametreler	Kontrol (n= 19)	konjestif kalp yetersizliği (n= 10)	iskemik kalp hastalığı (n= 20)	akut myokard infarktüsli (n= 8)
AST (U/L)	N	$28.5 \pm 9.0$	$25.9 \pm 16.8$	$152 \pm 50.5$
CK (U/L)	N	$42.9 \pm 21.2$	$47.6 \pm 22.8$	$761 \pm 613$
CK-MB (U/L)	N	$23.0 \pm 9.97$	$19.8 \pm 4.22$	$107 \pm 73$
IL-6 (pg/ml)	$14.1 \pm 3.93$	$31.9 \pm 29.3^*$	$18.6 \pm 18.2$	$162 \pm 107^{**}$
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	ND	ND	ND	ND

N: Normal değerler arasında, ND; ölçülemeyen değerler  
Kontrol grubu ile kıyaslandığında; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$

Yokoyama ve arkadaşları TNF verilmesini takiben sistolde kalsiyum geçişinin azaldığını saptamışlardır (40). TNF'ün erken evrede sistolik fonksiyonu bozan bu etkisinin sarkoplazmik retikulumdan kalsiyum-bağımlı kalsiyum salınımını bozmasından kaynaklandığı ve sfingozin ile kontrol edildiği bildirilmiştir (30). Bu evre nitrik oksitten bağımsızdır. Buna karşılık kontraktıl fonksiyon bozukluğunun geç evresinin, iNOS ile kontrol edildiği ve miyofilamanların kalsiyuma duyarız hale gelmesinin NO'ya bağımlı olduğu düşünülmektedir (8). Kalp yetersizliğinde TNF'ün yapımının arttığı ve bunun sirkülasyondaki TNF düzeylerine yansıdığı bir çok çalışmayla gösterilmiştir (5,17,20). Ancak TNF'ün artmasına yol açan uyarı(lar)ın niteliği hakkında çeşitli görüşler mevcuttur. Bugün için TNF artışının hasta myokardın varlığına bir işaret olduğu herkesin benimsediği bir sonuçtur. Ancak bu artışın serumda saptanabilmesi her zaman mümkün olmamaktadır. Çünkü dolaşımda TNF antagonistleri tanımlanmıştır. Bunlar hücre yüzeyinden dışarı çıkarak sitokin ile etkileşen çözünebilir reseptörlerdir ve TNF'ün etki gösterebilmesi için gerekli hücre yüzeyindeki reseptör sayılarını azaltmakla kalmaz, aynı zamanda TNF'ün hedef hücreler üzerindeki etkilerini de nötralize eder (16,25). Örneğin bizim çalışmamızda, serum TNF- $\alpha$  düzeyleri kullandığımız yöntemle (ELISA) ölçülememiştir. Çözünebilir TNF- $\alpha$  reseptörlerinin bazı ELISA kitleri ile TNF- $\alpha$  ölçümlerini interfere edici etkisinin olduğu ve ciddi konjestif yetersizliği olan birçok hastada TNF'nin ölçülemediği saptanmıştır (6). Bu nedenle serumda çözünebilir reseptör konsantrasyonu ve neopterin düzeyi ölçümünün TNF konsantrasyonu ölçümünden daha duyarlı ve spesifik olduğuna dair çalışmalar vardır (31). Bunun yanısıra ELISA metodları ile yüksek antijenik TNF- $\alpha$  saptanan olguların hiçbirisinde sitotoksitesite ölçümleri ile biyolojik aktivite yüksek bu-

lanamamıştır. Bu durum, kalp yetersizliği olan hastaların dolaşımında sitokinin kendisinden çok reseptörlerinin ve antagonistlerinin bulunduğunu düşündürmektedir. TNF- $\alpha$  reseptörlerindeki artışın antijenik TNF- $\alpha$ 'dan daha fazla olduğu bildirilmiştir (28).

Kalp yetersizliği olan hastalarda TNF'ün yanısıra serum IL-6 konsantrasyonu da ölçülmüş, özellikle ileri düzeyde yetersizliği olan olgularda (evre III ve IV) IL-6'nın arttığı saptanmıştır (34). IL-6 makrofaj/monositler, lenfositler, nötrofiller, endotelial hücreler, fibroblastlar gibi çok farklı hücre tiplerinde sentezlenen bir sitokindir. TNF- $\alpha$ 'nın mononükleer fagositler ve endotelial hücrelerden IL-6 ve IL-1 sekresyonlarını uyardığı bilinmektedir. Munger ve arkadaşları orta derecedeki kalp yetersizliğinde IL-6'nın arttığını ancak TNF- $\alpha$  düzeylerinin değişmediğini bildirmiştir (26). Bizim çalışmamızda konjestif kalp yetersizliği ve akut myokard infarktüsü geçiren hastalarda serum IL-6 düzeylerinin arttığı bulunmuştur. Bu artışın özellikle akut myokard infarktüsü grubunda belirgin olması ve bunun yanısıra IL-6 düzeylerinin kalp adalesine özgü bir enzim olan ve kalp hasarının büyüklüğü ile yakından ilişkisi bulunan CK-MB enzim aktiviteleri (27) ile pozitif korelasyon göstermesi, bu sitokinin myokard hasarıyla yakından ilişkili olduğunu düşündürmektedir. IL-6'nın çalışmamızda incelenen diğer hastalık gruplarına göre anlamlı olarak artmış olması, doku hasarına bağlı olarak gelişen inflamasyondan kaynaklanan nonspesifik bir yanıt olarak değerlendirilebilir. Bununla birlikte, serum IL-6 düzeylerinin hastalığın ileri evrelerinde ölçülerek CK-MB ile korelasyonunun uzun süreli değerlendirilmesinin daha anlamlı olacağı düşünülmektedir.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir. Proje No: Ö-626 / 080699 ve Ö-661 / 110899.

## KAYNAKLAR

1. Balkwill F, Osborne R, Burke F: Evidence for tumour necrosis factor/cachectin production in cancer. *Lancet* 2: 1229 (1987).
2. Brach MA, Hermann F: IL-6: presence and future. *Int J Clin Lab Res* 22: 143 (1992).
3. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B: An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 72: 3666 (1975).
4. Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM, Bernheim H, Beutler B, Cerami A, Figari S, Palladino MA, O'Connor JV: Tumor necrosis factor (Cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of IL-1. *J Exp Med* 163: 1433 (1986).
5. Dutka DP, Elborn JS, Delamere F, Shale DJ, Morris GK: Tumor necrosis factor- $\alpha$  in severe congestive cardiac failure. *Br Heart J* 70: 141 (1993).
6. Ferrari R, Bachetti T, Confortini R, Opasich C, Febo O, Corti A, Cassani G, Visioli O: Tumor necrosis factor soluble receptors in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation* 92: 1479 (1995).
7. Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL: Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* 257: 387 (1992).
8. Goldhaber JL, Kim KH, Natterson PD, Lawrence T, Yang P, Weiss JN: Effects on TNF- $\alpha$  on (Ca<sup>2+</sup>) and contractility in isolated adult rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol* 271(Heart Circ Physiol) 40: 1449- (1996).
9. Gulick TS, Chung MK, Pieper SJ, Lange LG, Schreiner GF: Interleukin-1 and tumor necrosis factor inhibit cardiac myocyte  $\beta$ -adrenergic responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 86: 6753 (1989).
10. Gurevitch J, Frolkis I, Yuhas Y, Paz Y, Matsa M, Mohr R, Yakirevich V: Tumor necrosis factor-alpha is released from the isolated heart undergoing ischemia and reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 28: 247 (1996).
11. Hatakeyama K, Kagamiyama H, Simmons RL, Billiar TR: Tetrahydrobiopterin synthesis and inducible nitric oxide production in pulmonary artery smooth muscle. *Am J Physiol* 266: 455 (1994).
12. Herskovitz A, Choi S, Ansari A, Wesselingh S.: Cytokine mRNA expression in the postischemic/reperfused myocardium. *Am J Pathol* 146: 419 (1995).
13. Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T: Biological and clinical aspects of interleukin-6. *Immunol Today* 11: 443 (1990).
14. Hirooka Y, Imaizumi T, Tagawa T, Shiramoto M, Endo T, Ando S, Takeshita A: Effects of L-arginine on impaired acetylcholine-induced vasodilation of the forearm in patients with heart failure. *Circulation* 90: 658 (1994).
15. Houssiau F, Van Snick J: IL-6 and T-cell response. *Res Immunol* 143: 740 (1992).
16. Kapadia S, Torre-Amione G, Yokoyama T, Mann DL: Soluble TNF binding proteins modulate the negative inotropic properties of TNF- $\alpha$  in vitro. *Am J Physiol* 268: 517- (1995).
17. Katz SD, Rao R, Berman JW, Schwarz M, Demopoulos L, Bijou R, LeJemtel TH: Pathophysiological correlates of increased serum tumor necrosis factor in patients with congestive heart failure: relation to nitric oxide-dependent vasodilation in the forearm circulation. *Circulation* 90: 12 (1994).
18. Kubo SH, Rector TS, Bank AJ, Williams RE, Heifetz SM: Endothelium-dependent vasodilation is attenuated in patients with heart failure. *Circulation* 85: 1364 (1991).
19. Latini R, Bianchi M, Correale E, Dinarello A, Fantuzzi G, Fresco C, Maggioni AP, Mengozzi M, Romano S, Shapiro L: Cytokines in acute myocardial infarction: selective increase in circulating tumor necrosis factor, its soluble receptor, and interleukin 1 receptor antagonist. *J Cardiovasc Pharmacol* 23: 1 (1994).
20. Levine B, Kalman J, Mayer L, Fillit H, Packer M: Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 323: 236 (1990).
21. Matsubara T, Ziff M: Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. *J Immunol* 137: 3295 (1986).
22. Maury CP, Teppo A-M: Tumor necrosis factor in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 32: 146 (1989). Meldrum
23. Meldrum DR, Cleveland JC, Sheridan BC, Rowland RT, Banerjee A, Harken AH: Cardiac preconditioning with calcium: clinically accessible myocardial protection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 112: 778 (1996).
24. Meldrum DR: Tumor necrosis factor in the heart. *Am J Physiol* 274 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 43): 577 (1998).
25. Mohler KM, Torrence DS, Smith CA, Goodwin RG, Stremel KE, Fung VP, Widmer MB: Soluble tumor necrosis factor receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J Immunol* 151: 1548 (1993).
26. Munger M, Johnson B, Amber I, Callahan K, Gilbert E: Circulating concentrations of proinflammatory cytokines in mild or moderate heart failure secondary to ischemic or IDC. *Am J Cardiol* 77: 723 (1996).
27. Neufeld HN, Rabinowitz B, Clejan S, et al: Isoenzymes of creatine phosphokinase in acute myocardial infarction. *Angiology* 28: 853 (1977).
28. Neumann Ott, I, Gawaz M, Richardt, G, Holzapfel, H, Jochum, M, Schomig A: Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction. *Circulation* 92: 748 (1995).
29. Oliff A: The role of tumor necrosis factor (Cachectin) in cachexia. *Cell* 54: 141 (1988).
30. Oral H, Dorn GW, Mann DL: Sphingosine mediates the immediate negative inotropic effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the adult mammalian cardiac myocyte. *J Biol Chem* 272: 4836 (1997).
31. Packer M: Is tumor necrosis factor an important neurohormonal mechanism in chronic heart failure? *Circulation* 92: 1379 (1995).
32. Pinsky DJ, Cai B, Yang X, Rodriguez C, Sciacca RR, Cannon PJ: The lethal effects of cytokine-induced nitric oxide on cardiac myocytes are blocked by nitric oxide synthase antagonism or transforming growth factor  $\beta$ . *Clin Invest* 95: 677 (1995).
33. Ruddle NH, Waksman BH: Cytotoxic effect of lymphocyte-antigen interaction in delayed hypersensitivity. *Science* 157: 1060 (1967).
34. Testa M, Yeh M, Fanelli R, Loperfido F, Berman, JW, LeJemtel TH: Circulating levels of cytokines and their endogenous modulators in patients with mild to severe congestive heart failure due to coronary artery disease or hypertension. *JACC* 28: 964 (1996)

35. Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Bies RD, Lebovitz R, Mann DL: Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the studies of left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 27:1201 (1996).
36. Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, Durand JB, Bies RD, Young JB, Mann DL: Tumor necrosis factor- $\alpha$  and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation* 93:704 (1996).
37. Tracey KJ, Lowry SF, Cerami A: Cachectin: a hormone that triggers acute shock and chronic cachexia. *J Infect Dis* 157: 413 (1988).
38. Tracey KJ, Wei H, Manogue KR: Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation: *J Exp Med* 167: 1211 (1988).
39. Waage A, Halstensen A, Espevik T: Association between tumour necrosis factor in serum and fatal outcome in patients with meningococcal disease. *Lancet* 1:355 (1987).
40. Yokoyama TL, Vaca L, Rossen RD, Durante W, Hazarka P, Mann DL: Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the adult mammalian cardiac myocyte. *J Clin Invest* 92: 2303 (1993).
41. Yokoyama T, Nakano M, Bednarczyk JL, McIntyre BW, Entman M, Mann DL: Tumor necrosis factor- $\alpha$  provokes a hypertrophic growth response in adult cardiac myocytes. *Circulation* 95:1247 (1997).
42. Yoshizumi M, Perrella MA, Burnett JCI, Lee M-E: Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half life. *Circ Res* 73: 205 (1993).