● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل، سال سوم ، شمارهٔ ۱ (پی‌درپی ۹) ، صفحه ۸ الی ۱۳ ، زمستان ۱۳۷۹

ارزیابی تولید نیتریک اکساید در مونوسیت‌های کودکان مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد

روزبه چگنی[1*] ، دکتر احمد زواران حسینی[2]، دکتر علی‌اکبر پورفتح‌الله[3]، دکتر پروانه وثوق[4]
۱- عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی لرستان ۲- دانشیار گروه ایمونولوژی دانشگاه تربیت مدرس
۳- استادیار گروه ایمونولوژی دانشگاه تربیت مدرس ۴- استاد گروه هماتوانکولوژی اطفال دانشگاه علوم پزشکی ایران

سابقه و هدف: نیتریک‌اکساید توسط سلول‌های مختلف از جمله مونوسیت تولید می‌شود و نقش مهمی در دفاع غیراختصاصی دارد. علاوه بر نقش‌های متعدد فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک، نیتریک‌اکساید دارای خاصیت ضد سرطانی نیز است. با توجه به اینکه به نظر می‌رسد بیماران مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد دارای نوعی عدم تعادل و نقص در سیستم ایمنی خود از جمله تولید نیتریک‌اکساید هستند، لذا در این مطالعه تولید نیتریک‌اکساید توسط منوسیت‌های کودکان مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد قبل و بعد از درمان در گروه شاهد بررسی شد.

مواد و روشها: بدین منظور از ۳۰ کودک مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد قبل از شروع درمان و پس از پایان اولین دوره درمانی و همچنین از ۳۰ کودک سالم نمونه‌گیری خون محیطی به عمل آمد. سلول‌های منونوکلئر وسپس منوسیت‌ها از خون محیطی جدا شده و به مدت ۲۴ ساعت در حضور مواد تحریک کننده و مهار کننده تولید نیتریک‌اکساید کشت داده شدند. برای بررسی تولید نیتریک‌اکساید، میزان نیتریت که شاخص تولید نیتریک‌اکساید است در مایع رویی محیط کشت با روش گریس اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج این تحقیق نشان داد که میزان تولید نیتریک‌اکساید قبل از درمان در مقایسه با گروه شاهد بیشتر است ($p<0/0001$).

نتیجه‌گیری : علیرغم نقص در ایمنی سلولی افراد مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد، به نظر می‌رسد که تولید نیتریک اکساید از مسیر غیر اختصاصی به وسیله مونوسیت دچار مشکل نمی‌شود و می‌تواند نقش ضد سرطانی در این بیماران داشته باشد.

واژه‌های کلیدی : *نیتریک‌اکساید، مونوسیت، لوسمی لنفوبلاستیک حاد.*

مقدمه

لوسمی‌ها سرطان سلول‌های پیش‌ساز خونی هستند که مشخصه آنها تجمع گلبولهای سفید غیرطبیعی در مغز استخوان است (۱). لوسمی لنفوبلاستیک حاد یکی از انواع لوسمی است که در اثر سرطانی‌شدن سلول‌های رده لنفوسیتی ایجاد می‌شود (۳و۲). این بیماری شایع‌ترین نوع سرطان در کودکان است و البته در افراد بالغ نیز دیده می‌شود (۱). یکی از عواملی که علاوه بر عوامل دیگر بستر را برای ابتلا به سرطان فراهم می‌کند اختلال در تعادل سیستم ایمنی بدن، به خصوص قسمتی از این سیستم که مسئولیت مبارزه با سلول سرطانی را به عهده دارد یعنی سیستم مراقبت ایمنی (Immunosurvilance) است (۱۳-۴). نیتریک‌اکساید (NO) مولکولی است با وظایف مختلف فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک که توسط آنزیم نیتریک‌اکساید سنتتاز از اسید آمینه آرژینین در

[DOR: 20.1001.1.15614107.1379.3.1.1.6]

سلول تولید می‌گردد. نیتریک‌اکساید سنتتاز سه ایزوآنزیم مختلف دارد که ایزوآنزیم شماره دو بیشتر در مونوسیت‌ها یافت می‌شود. نیتریک‌اکساید تولید شده بوسیله مونوسیت‌ها دارای اثرات مختلفی است که یکی از آنها اثر ضدسرطانی است (۲۴-۱۴). در بعضی سرطانهای دیگر مانند سرطان سینه، NO خود باعث سرطان می‌شود (۱۵).

الگوی تولید نیتریک‌اکساید در مراحل مختلف درمانی و ارتباط آن با مشکلات سیستم ایمنی اختصاصی در بسیاری از سرطان‌ها تعیین نشده است. تاکنون در مورد میزان تولید NO در مونوسیت‌های مبتلایان به لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) تحقیقی صورت نگرفته است. لذا در این مطالعه تولید NO بوسیله مونوسیت‌ها در لوسمی لنفوبلاستیک حاد کودکان قبل و بعد از درمان بررسی خواهد شد.

مواد و روشها

▫ **نمونه‌گیری:** در این تحقیق ۳۰ کودک مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد قبل و بعد از درمان اولیه مورد بررسی قرار گرفتند. سن این کودکان بین ۱ تا ۱۰ سال بود. بعد از نمونه‌گیری از خون محیطی بیماران، نمونه‌گیری از گروه کنترل که کودکانی در همین محدوده سنی بودند به عمل آمد.

▫ **جداسازی سلول‌ها:** توسط فایکول و سانتریفوژ، خون محیطی به چند قسمت تقسیم می‌شود که یکی از این قسمت‌ها سلول‌های منونوکلئر متشکل از لنفوسیت و مونوسیت است. پس از جدا کردن لایه منونوکلئر تحت شرایط استریل، این سلول‌ها به مدت دو ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ Co_2 انکوبه می‌شوند. مونوسیت‌ها به دلیل خاصیت چسبندگی به کف چاهک می‌چسبند و به این وسیله می‌توان آنها را از لنفوسیت‌ها جدا کرد.

▫ **کشت سلول‌ها:** بعد از شمارش سلول‌ها تعداد آنها روی 2×10^6ml تنظیم و بوسیله رنگ‌آمیزی و شمارش مطلق، تعداد مونوسیت‌ها نیز مشخص شد. قبل از کشت سلول‌ها درصد زنده بودن (Viability) نیز تعیین گردید که بیش از ۵٪ بود. سلول‌ها در ۱۰ چاهک کشت داده شدند و مواد مختلف مهارکننده و تحریک‌کننده تولید NO به آنها اضافه شد بطوریکه هر دوچاهک (دوپلیکت) دارای یک ترکیب شدند. دوپلیکت اول فقط سلولهای منونوکلئر و در دوپلیکت‌های بعدی لنفوسیت‌ها جدا شدند، دوپلیکت دوم حاوی مونوسیت و ۱۰۰IU/mL اینترفرون گاما بود، در دوپلیکت سوم به مونوسیت، اینترفرون گاما و لیپوپلی‌ساکارید (۱۰mg/ml) اضافه شد و دوپلیکت چهارم دارای ترکیبات دوپلیکت سوم به علاوه آمینوگوانیدین (۱۰۰۰mM) و دوپلیکت پنجم فقط حاوی مونوسیت بود. بعد از کشت ۲۴ ساعته سلول‌ها مایع رویی محیط کشت جهت اندازه‌گیری NO مورد بررسی قرار گرفت.

▫ **سنجش میزان نیتریک اکساید:** منحنی استاندارد با غلظت‌های مختلف نیتریت‌سدیم (بر حسب نانومول) رسم گردید. مقادیر هم‌حجم از مایع رویی محیط کشت بیمار با معرف گریس مجاور شد. رنگ ارغوانی تولید شده نسبت مستقیم با میزان تولید NO دارد. جذب این رنگ توسط دستگاه الایزاریدر در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد. و در مقایسه با منحنی استاندارد میزان NO برای بیمار بر حسب نانومولار گزارش شد.

▫ **محاسبات آماری:** برای یافتن اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های مختلف از آنالیز واریانس یکطرفه و مقایسه میانگین به روش Tukey و آزمون t-student یک‌طرفه استفاده گردید و ارزش p برای تمام تفاوتهای معنی‌دار زیر ۰/۰۵ در نظره گرفته شد.

یافته‌ها

الف) مقایسه تولید نیتریک‌اکساید در گروههای قبل و بعد از درمان با گروه کنترل: همانطور که در جدول ۱ مشخص شده سه گروه مورد مطالعه از نظر آماری با یکدیگر متفاوت هستند (p=۰/۰۰۰).

[DOR: 20.1001.1.15614107.1379.3.1.1.6]

جدول ۱. مقایسه تولید نیتریک‌اکساید در دوپلیکت‌های مشابه گروه بیمار، قبل و بعد از درمان با گروه کنترل برحسب نانومولار

ترکیب هر دوپلیکت	لنفوسیت	مونوسیت	مونوسیت	مونوسیت
میانگین سطح	+	+	IFN-γ +	IFN-γ +
تولید نیتریک‌اکساید (nM) در هر گروه	مونوسیت	IFN-γ	LPS	LPS+AG
قبل از درمان	۶۱۹	۳۸۰	۴۳۶	۵۲۱	۲۸۸
بعد از درمان	۸۰۲	۶۷۲	۶۳۶	۶۶۴	۴۸۱
کنترل	۷۸	۶۶	۴۴	۶۷	۱۰۶

آمینوگوانیدین: AG اینترفرون گاما: IFN-γ لیپوپلی ساکارید: LPS

* در هر یک از موارد فوق تفاوت بین گروهها از نظر آماری معنی دار می‌باشد.($p<0/0001$).

جدول ۲. نتایج مقایسه تولید نیتریک‌اکساید در دوپلیکت‌های متفاوت به صورت درون گروهی برحسب نانومولار

ترکیب هر دوپلیکت	لنفوسیت	مونوسیت	مونوسیت	مونوسیت
میانگین سطح	+	+	IFN-γ +	IFN-γ +
تولید نیتریک‌اکساید (nM) در هر دو گروه	مونوسیت	IFN-γ	LPS	LPS+AG
قبل از درمان	۶۱۹a	۳۸۰c	۴۳۶b	۵۲۱ab	۲۸۸d
بعد از درمان	۸۰۲a	۶۷۲ab	۶۳۶b	۶۶۴b	۴۸۱c
کنترل	۷۸a	۶۶a	۴۴a	۶۷a	۱۰۶a

آمینوگوانیدین: AG اینترفرون گاما: IFN-γ لیپوپلی ساکارید: LPS

* در هر یک از موارد فوق تفاوت بین گروهها از نظر آماری معنی دار می‌باشد($p<0/0001$).

۱- درون هر گروه پنج دوپلیکت با یکدیگر مقایسه شده‌اند. تفاوت در حرف لاتین نشان دهنده اختلاف آماری است. بعضی دوپلیکت‌ها دو حرف لاتین را دارند که این نشاندهنده عدم تفاوت آماری با دوپلیکت‌هایی است که آن دو حرف را دارند و نیز تفاوت آماری با دوپلیکت‌هایی که آن دو حرف را ندارند. تشابه حرف لاتین برای دوپلیکت‌ها نشان دهنده عدم تفاوت آماری با یکدیگر است.

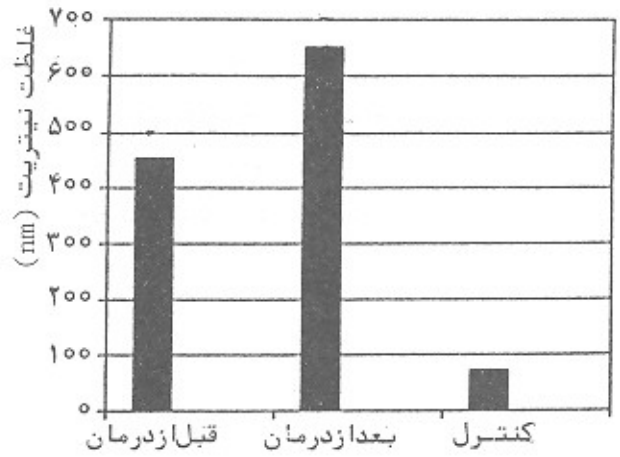
۲- مبنای تفاوت آماری درون هر گروه $p<0/05$ می‌باشد.

مونوسیتهای بیماران بعد از درمان بیشترین مقدار NO و مونوسیت‌های گروه کنترل کمترین مقدار NO را تولید کردند. بطوریکه قبل از درمان مونوسیت‌ها ۴۵۴ نانومولار، بعد از درمان ۶۵۱ نانومولار و در گروه کنترل ۷۲ نانومولار NO تولید کرده‌اند. نمودار ۱ مقایسه گروههای قبل و بعد از درمان و کنترل را نشان می‌دهد.

ب) مقایسه درون گروهی تولید نیتریک‌اکساید در گروههای قبل و بعد از درمان و گروه کنترل: جدول ۲ نتیجه مقایسه دوپلیکتهای متفاوت با یکدیگر را درون هر گروه مورد مطالعه، نشان می‌دهد. تفاوت آماری با سیستم الفبایی نشان داده شده است. در گروه قبل از درمان، در مقایسه با چاهک‌های سلولهای مونوکلئر، چاهک مونوسیت، چاهک مونوسیت + اینترفرون گاما + لیپوپلی ساکارید و چاهک مونوسیت + اینترفرون گاما دارای تفاوت معنی‌دار آماری هستند ($p<0/0001$). ضمن اینکه چاهک مونوسیت + اینترفرون گاما + لیپوپلی‌ساکارید + آمینوگوانیدین هیچ تفاوتی با چاهک سلول‌های مونونوکلئر و چاهک مونوسیت + اینترفرون گاما + لیپوساکارید ندارد ($p>0/05$).

در گروه بعد از درمان در مقایسه با چاهک سلولهای

[DOR: 20.1001.1.15614107.1379.3.1.1.6]



نمودار ۱. مقایسه میانگین تولید نیتریک‌اکساید توسط ۵ دوپلیکت مختلف در گروه‌های قبل و بعد از درمان و کنترل

مونونوکلئر، چاهک مونوسیت به تنهایی، چاهک مونوسیت + اینترفرون گاما + لیپوپلی‌ساکارید دارای تفاوت معنی‌دار هستند. ضمن اینکه چاهک مونوسیت + اینترفرون هیچ تفاوت معنی‌داری با چاهک سلولهای مونونوکلئر، چاهک مونوسیت + اینترفرون گاما + لیپوپلی‌ساکارید و چاهک مونوسیت + اینترفرون گاما + لیپوپلی‌ساکارید + آمینوگوانیدین ندارد. در گروه کنترل هیچ یک از چاهکها با هم اختلاف معنی‌دار آماری ندارند($p> ۰/۰۵$).

همچنین نتایج نشان داد بیمارانی که بهبودی کامل یافته‌اند نیتریک‌اکساید بیشتری نسبت به بیمارانی که بهبود نیافته‌اند، تولید کرده‌اند. جنس مؤنث NO بیشتری نسبت به جنس مذکر تولید کرد.

بحث

با بررسی میزان NO در ALL این نتیجه حاصل شد که تولید NO قبل از درمان شروع به افزایش کرده و تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل دارد ($p< ۰/۰۰۰۱$). بعد از درمان نیز میزان NO نسبت به قبل از درمان باز هم افزایش یافته که این اختلاف معنی‌دار است ($p< ۰/۰۰۰۱$). قبلاً عنوان شد که یکی از عواملی که به نظر می‌آید بستر را برای ابتلا به ALL و یا کلاً سرطان فراهم کند یک نوع عدم تعادل در سیستم ایمنی است و مشخص شد افرادی که دچار بیماریهای اتوایمیون هستند بیشتر دچار لوسمی می‌شوند اما وجود یا عدم NO چه نقشی در روند سرطانی شدن دارد؟ آیا نقص سیستم مراقبت ایمنی که وظیفه نابودی سلول سرطانی را به عهده دارد و به وضوح در ALL مختل است باعث ایجاد نقص در تولید NO که یک مولکول ضد تومور است می‌شود. بعبارت دیگر آیا مشکل در سیستم مراقبت ایمنی که جزیی از سیستم ایمنی سلولی اختصاصی است باعث بروز اختلال در سیستم تولید NO که جزیی از ایمنی غیراختصاصی ولی وابسته به ایمنی اختصاصی است می‌شود؟ نتایج این تحقیق چنین چیزی را نشان نمی‌دهد و به نظر نمی‌رسد که نقصی در تولید NO وجود داشته باشد و NO بلافاصله با ایجاد روند سرطانی، تولید خود را آغاز کرده و بعد از درمان افزایش همچنان ادامه یافته است. ضمناً این افزایش چون ناگهانی و به مقدار زیاد است طبق مطالعات جنکینز و ژائو (۲۵و۱۹) باید در جهت مبارزه با سرطان باشد نه در جهت القاء آن.

نتایج جدول ۲ نشان می‌دهد که در مقایسه با یکدیگر بعضی دوپلیکت‌های درون هر گروه با هم تفاوت دارند. مرحله قبل از درمان نشان می‌دهد که مونوسیت‌ها از لحاظ تولید NO بسیار فعال هستند و این شاید دلیلی برای عدم مهار این تولید توسط دوز استفاده شده آمینوگوانیدین باشد. ضمناً به نظر نمی‌رسد که مسیر تولید NO در کار خود دارای نقصی باشد چون به اینترفرون گاما و به اثر تشدید کنندگی لیپوپلی‌ساکارید پاسخ داده است در عین حال نظرات ژائو (۲۵) و آیگلر (۲۶) در ارتباط با تولید NO توسط خود لنفوسیت‌های سرطانی با این نتایج بیش از پیش تقویت می‌شود. نتایج مرحله بعد از درمان نشان می‌دهدکه مونوسیت‌ها در هر پنج دوپلیکت نسبت به پنج دوپلیکت قبل از درمان، NO بیشتری تولید کرده‌اند. اما در عین حال ابعادی از مسیر تولید NO مانند تشدید پذیری قدرت تولید NO در افزودن لیپوپلی‌ساکارید ممکن است تحت تأثیر قرار گرفته باشد چون دوپلیکت سوم تفاوتی از

[DOR: 20.1001.1.15614107.1379.3.1.1.6]

نظر آماری با دوپلیکت دوم ندارد. این تحقیق به مطالعات بیشتری نیاز دارد. در گروه کنترل هیچکدام از دوپلیکت‌ها با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند. به نظر می‌رسد که چون مونوسیت‌ها همه از نقطه صفر باید کار خود را آغاز می‌کرده‌اند مدت زمان کافی برای نشان دادن تفاوت در دوپلیکت‌ها وجود نداشته و ۲۴ ساعت، زمان کمی برای نشان‌دادن تفاوت بود.

الگوی تولید NO در سرطان نیاز به بررسی‌های بیشتر دارد و شاید در آینده بتوان با تجویز داروهای آزاد کننده NO مبادرت بدرمان بعضی سرطانهامانندلوسمی کرد که در آن افزایش NO باعث تخریب سلولهای سرطانی می‌شود.

****

References

1. Hughes Jones NC, Wickramasinghe SN. Lecture notes on hematology, 6th edition. Blackwell Sciences, Australia 1996; 134-160.

2. Babior BM, Stossel TP. Hematology a pathophysiological approach, 2nd edition. Churchill Livingston, New York 1990; pp: 231-280.

3. Lukens JN. Acute Lymphocytic Leukemia. Wintrob's Clinical Hematology, 9th edition. Eds, Lee, GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN. Lea & Febiger, Pennsylvania 1993; 1892-1920.

4. Lichtman A. Cellular and Molecular Immunology, 3rd edition. Saunders Text and Review Series. Pennsylvania 1997; 397-405.

5. Ching H. Acute Lymphoblastic leukemia. Pediatric Clinics of North America 1997; 44(4): 831.

6. Greaves MF. Aetiology of acute leukemia. Lancet 1997; 344-49.

7. Kinlen LJ et al. Childhood leukemia and non Hodgkin's lymphoma near large rural construction sites with a comparison with sellafield nuclear site. BMJ 1995; 310: 763.

8. Mac Micking J, Oia wen X, & Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. Annu Rec Immunol 1997; 15: 323.

9. Xie K, Fidler I. Therapy of cancer metastasis by activation of the inducible nitric oxide synthase. Cancer Metastasis Review 1998; 17: 55.

10. Singh S, et al. Nitric oxide the biological mediator of the decade fact or fiction. Eur Respir J 1997; 10: 699.

11. Jenkins DC, et al. Role of nitric oxide in tumor growth. Proc Natl Acad Sci 1995; 92: 4392.

12. Zhao H, et al. B cell chronic lymphocytic leukemia cells express a functional inducible nitric oxide synthase displaying anti-apoptotic activity. Blood 1998; 92(3): 1031.

13. Eigler A, et al. The hairy cell leukemia cell line Eskol spontaneously synthesizes tumor necrosis factor alpha and nitric oxide. Leukemia Res 1998; 22: 501.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1379.3.1.1.6]

14. Mac Micking J, Qia-wen X, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function Annu Rev Immunol 1997; 15:323.

15. Xie K, Fidler I. Therapy of cancer metastasis by activation of the inducible nitric oxide synthase. Cancer Metastasis Review 1998; 17: 55.

16. Singh S. et al. Nitric oxide the biological mediator of the decade: fact or fiction. Eur Respir J 1997; 10: 699.

17. Marleta MA. et al. Macrophage oxidation of L-Arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate agent. Biochemistry 1988; 27: 8706.

18. Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. J Biol Chem 1994; 269: 13725.

19. Jenkins DC, et al. Role of nitric oxide in tumor growth. Proc Natl Acad 1995; 92: 4392.

20. Farias- Eisner R, et al. The chemistry and tumoricidal activity of nitric oxide hydrogen peroxide and the implications to cell resistance susceptibility. J Biol Chem 1996; 271: 6144.

21. Thomsen LL, Miles DW. Role of nitric oxide in tumor progression lessons from human tumors. Cancer Metastasis Rev 1998; 17: 107.

22. Wie X, et al. Altered immune response in mice lacking inducible nitric oxide synthase. Nature 1995; 375-408.

23. Lander HM, et al. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nitric oxide generating compounds. J Immunol 1993; 150: 1509.

24. Drapier JC, et al. Interferon gamma and tumor necrosis factor induce the L-Arginine dependent effector cytotoxic mechanism in murine macrophages. Eur J Immunol 1988; 18: 1587.

25. Zhao H, et al. B cell chronic lymphocytic leukemia cells express a functional inducible nitric oxide synthase displaying anti apototic activity. Blood 1998; 92(3): 1031.

26. Eigler A, et al. The hairy cell leukemia cell line eskol spontaneously synthesizes tumor necrosis factor alpha and nitric oxide. Leukemia Res 1998; 22: 501.

* آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، گروه ایمونولوژی، صندوق پستی ۴۸۳۸-۱۴۱۵۵.

[DOR: 20.1001.1.15614107.1379.3.1.1.6]