

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

روزبه چگنی^{۱*}، دکتر احمد زواران حسینی^۲، دکتر علی اکبر پورفتح‌الله^۳، دکتر پروانه وثوق^۴

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 هماتولوژی اطفال دانشگاه علوم پزشکی ایران

سابقه و هدف: نیتریک اکساید توسط سلول‌های مختلف از جمله مونوسیت تولید می‌شود و نقش مهمی در دفاع غیراختصاصی دارد. علاوه بر نقش‌های متعدد فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک، نیتریک اکساید 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 نیتریک اکساید هستند، لذا در این مطالعه تولید نیتریک اکساید توسط مونوسیت‌های کودکان مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد قبل و بعد از درمان در گروه شاهد بررسی شد.

مواد و روشها: بدین منظور از ۲۰ کودک مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد قبل از شروع درمان و پس از پایان اولین دوره درمانی و همچنین از ۲۰ کودک سالم نمونه‌گیری خون محیطی به عمل آمد. سلول‌های منونوکلئار و سپس مونوسیت‌ها از خون محیطی جدا شده و به مدت ۲۴ ساعت در حضور مواد تحریک کننده و مهار کننده تولید نیتریک اکساید کشت داده شدند. برای بررسی تولید نیتریک اکساید، میزان نیتريت که شاخص تولید نیتریک اکساید است در مایع روی محیط کشت با روش گریس اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج این تحقیق نشان داد که میزان تولید نیتریک اکساید 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: نیتریک اکساید، 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 سرطانی شدن سلول‌های رده لنفوسیتی ایجاد می‌شود (۲ و ۳). 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 (Immunosurveillance) است (۱۳-۴). نیتریک اکساید (NO) مولکولی است با وظایف مختلف فیزیولوژیک و پاتوفیزیولوژیک که توسط آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز از اسید آمینه آرژنین در

تعداد مونسیت‌ها 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 مئونوکلتر و در دوپلیکت‌های بعدی لنفوسیت‌ها جدا شدند، دوپلیکت دوم حاوی مونسیت و 100 IU/mL اینترفرون گاما بود، در دوپلیکت سوم به مونسیت، اینترفرون گاما و لیپولی ساکارید (10 mg/ml) اضافه شد و دوپلیکت چهارم دارای ترکیبات دوپلیکت سوم به علاوه آمینوگوانیدین (1000 mM) و دوپلیکت پنجم فقط حاوی مونسیت 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 نیتريت سدیم (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 الیزاریدر 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 نظر گرفته شد.

یافته‌ها

الف) مقایسه تولید نیتریک اکساید 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 ($p=0/000$).

سلول تولید می‌گردد. نیتریک اکساید سنتتاز سه ایزوآنزیم مختلف دارد که ایزوآنزیم شماره دو بیشتر در مونسیت‌ها یافت می‌شود. نیتریک اکساید تولید شده بوسیله مونسیت‌ها 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 نیتریک اکساید 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 مونسیت‌های مبتلایان به لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) تحقیقی صورت نگرفته است. لذا در این مطالعه تولید NO بوسیله مونسیت‌ها 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 بیمار، 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 مئونوکلتر متشکل از لنفوسیت و مونسیت است. پس از جدا کردن لایه مئونوکلتر تحت شرایط استریل، این سلول‌ها به مدت دو ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ CO_2 انکوبه می‌شوند. مونسیت‌ها 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 $2 \times 10^6 \text{ ml}$ تنظیم و بوسیله رنگ‌آمیزی و شمارش مطلق،

جدول ۱. مقایسه تولید نیتریک اکساید در دو پلیکت های مشابه گروه بیمار، قبل و بعد از درمان با گروه کنترل بر حسب نانومولار

ترکیب هر دو پلیکت	لنفوسیت	مونوسیت	مونوسیت	مونوسیت	مونوسیت
میانگین سطح	+	+	+	IFN- γ +	IFN- γ +
تولید نیتریک اکساید (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 لیپولی ساکارید: LPS
* در هر یک از موارد فوق تفاوت بین گروهها از نظر آماری معنی دار می باشد. ($p < 0/0001$).

جدول ۲. نتایج مقایسه تولید نیتریک اکساید در دو پلیکت های متفاوت به صورت درون گروهی بر حسب نانومولار

ترکیب هر دو پلیکت	لنفوسیت	مونوسیت	مونوسیت	مونوسیت	مونوسیت
میانگین سطح	+	+	+	IFN- γ +	IFN- γ +
تولید نیتریک اکساید (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 لیپولی ساکارید: LPS

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

۱- درون هر گروه پنج دو پلیکت با یکدیگر مقایسه شده اند. تفاوت در حرف لاتین نشان دهنده اختلاف آماری است. بعضی دو پلیکت ها دو حرف لاتین را دارند که این نشان دهنده عدم تفاوت آماری با دو پلیکت هایی است که آن دو حرف را دارند و نیز تفاوت آماری با دو پلیکت هایی که آن دو حرف را ندارند. نشانه حرف لاتین برای دو پلیکت ها نشان دهنده عدم تفاوت آماری با یکدیگر است.

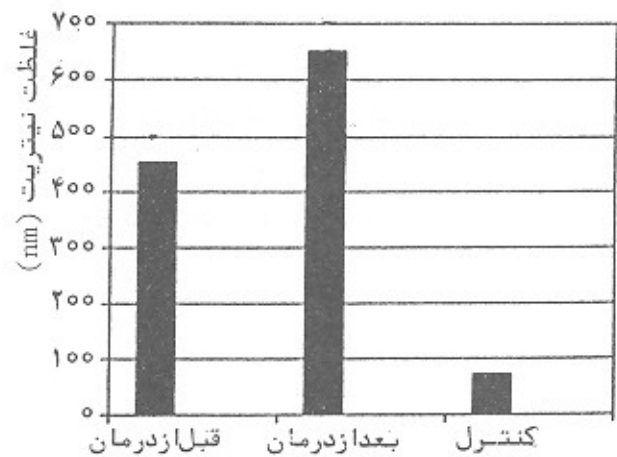
۲- مبنای تفاوت آماری درون هر گروه $p < 0/05$ می باشد.

نشان داده شده است. در گروه قبل از درمان، در مقایسه با چاهک های سلولهای مونوکلتر، چاهک مونوسیت، چاهک مونوسیت + اینترفرون گاما + لیپولی ساکارید و چاهک مونوسیت + اینترفرون گاما دارای تفاوت معنی دار آماری هستند ($p < 0/0001$). ضمن اینکه چاهک مونوسیت + اینترفرون گاما + لیپولی ساکارید + آمینوگوانیدین هیچ تفاوتی با چاهک سلولهای مونوکلتر و چاهک مونوسیت + اینترفرون گاما + لیپوساکارید ندارد ($p > 0/05$).

در گروه بعد از درمان در مقایسه با چاهک سلولهای

مونوسیت های بیمارانی بعد از درمان بیشترین مقدار NO و مونوسیت های گروه کنترل کمترین مقدار NO را تولید کردند. بطوریکه قبل از درمان مونوسیت ها ۴۵۴ نانومولار، بعد از درمان ۶۵۱ نانومولار و در گروه کنترل ۷۲ نانومولار NO تولید کرده اند. نمودار ۱ مقایسه گروه های قبل و بعد از درمان و کنترل را نشان می دهد.

ب) مقایسه درون گروهی تولید نیتریک اکساید در گروه های قبل و بعد از درمان و گروه کنترل: جدول ۲ نتیجه مقایسه دو پلیکتهای متفاوت با یکدیگر را درون هر گروه مورد مطالعه، نشان می دهد. تفاوت آماری با سیستم الفبایی



نمودار ۱. مقایسه میانگین تولید نیتریک اکساید

توسط ۵ دپلیکت مختلف در گروه‌های قبل و بعد از

درمان و کنترل

مونونوکلئر، چاهک مونسیت به تنهایی، چاهک مونسیت + ایتترفرون گاما + لیپولی ساکارید دارای تفاوت معنی دار هستند. ضمن اینکه چاهک مونسیت + ایتترفرون هیچ تفاوت معنی داری با چاهک سلولهای مونونوکلئر، چاهک مونسیت + ایتترفرون گاما + لیپولی ساکارید و چاهک مونسیت + ایتترفرون گاما + لیپولی ساکارید + آمینوگوانیدین ندارد. در گروه کنترل هیچ یک از چاهکها با هم اختلاف معنی دار آماری ندارند ($p > 0.05$).

همچنین نتایج نشان داد بیمارانی که بهبودی کامل یافته اند نیتریک اکساید بیشتری نسبت به بیمارانی که بهبود نیافته اند، تولید کرده اند. 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 معنی داری با گروه کنترل دارد ($p < 0.001$). بعد از درمان نیز میزان NO نسبت به قبل از درمان باز هم افزایش یافته که این اختلاف معنی دار است ($p < 0.001$). قبلاً عنوان شد که یکی از عواملی که به نظر می آید 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 می شوند 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 می شود. عبارت دیگر آیا مشکل در سیستم مراقبت ایمنی که جزیی از سیستم سلولی اختصاصی است باعث بروز اختلال در سیستم تولید NO که جزیی از ایمنی غیراختصاصی ولی وابسته به ایمنی اختصاصی است می شود؟ نتایج این تحقیق چنین چیزی را نشان نمی دهد و به نظر نمی رسد 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 (۱۹ و ۲۵) باید در جهت مبارزه با سرطان باشد نه در جهت القاء آن. نتایج جدول ۲ نشان می دهد که در مقایسه با یکدیگر بعضی دپلیکت‌های درون هر گروه با هم تفاوت دارند. مرحله قبل از درمان نشان می دهد که مونسیت‌ها 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 نمی رسد که مسیر تولید NO در کار خود دارای نقصی باشد چون به ایتترفرون گاما و به اثر تشدید کنندگی لیپولی ساکارید 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 می شود. نتایج مرحله بعد از درمان نشان می دهد که مونسیت‌ها در هر پنج دپلیکت نسبت به پنج دپلیکت قبل از درمان، NO بیشتری تولید کرده اند. اما در عین حال ابعادی از مسیر تولید NO مانند تشدید پذیری قدرت تولید NO در افزودن لیپولی ساکارید ممکن است تحت تأثیر قرار گرفته باشد چون دپلیکت سوم تفاوتی از

نظر آماری با دوپلیکت دوم ندارد. این تحقیق به مطالعات بیشتری نیاز دارد. در گروه کنترل هیچکدام از دوپلیکت‌ها با یکدیگر تفاوت معنی داری 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

نشان دادن تفاوت بود.

الگوی تولید NO در سرطان نیاز به بررسی‌های بیشتر دارد و شاید در آینده بتوان با تجویز داروهای آزاد کننده NO مبادرت به درمان بعضی سرطان‌ها مانند لوسمی 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 Livingstone, 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 sellafeld 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.

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 apoptotic 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.