میزان فعالیت سلولهای کشنده طبیعی (NK Cell) در افراد مبتلا به سرطان پستان قبل و بعد از درمان

احمد پیروزمند [*] ، دکتر زهیر محمد حسن [**]

خلاصه

سابقه و هدف: با توجه به این که سرطان پستان یکی از شایع‌ترین تومورهای انسانی خود به خودی می‌باشد و دفاع بر ضد این گونه تومورها توسط فعالیت سلولهای کشنده طبیعی اعمال می‌شود و این فعالیت با بروز استقرار و گسترش بسیاری از بیماری‌های سرطانی هم چون سرطان پستان کاهش می‌یابد و به منظور تعیین تاثیر محل ماستکتومی بر فعالیت سلول NK در مبتلایان به سرطان پستان، این تحقیق در افراد مبتلا به این نوع سرطان که در مرکز سرطان بیمارستان امام خمینی بستری بودند در سال ۱۳۷۳ و نیز در یک گروه شاهد طبیعی انجام گرفت.

مواد و روشها: این تحقیق به روش کارآزمایی بالینی از نوع مقایسه قبل و بعد از درمان جراحی بر روی ۱۸ بیمار مبتلا به سرطان پستان از طریق نمونه خون محیطی صورت پذیرفت و فعالیت سیتوتوکسیتی سلول NK موجود در سوسپانسیون سلولهای تک هسته‌ای با روش فلوسیتومتری اندازه‌گیری شده ، هم چنین فعالیت سلول کشنده طبیعی در فرد شاهد طبیعی نیز بررسی شد.

یافته‌ها: میزان فعالیت سلول NK از ۱۲/۶±۲۴/۴ درصد قبل از درمان به ۲۲/۳±۳۷/۷ درصد بعد از درمان افزایش یافت ($P<0/05$) . به علاوه ، ملاحظه گردید که با افزایش Stage بیماری ، کاهشی در فعالیت سلول NK دیده می‌شود ($r=-0/89$) ولی تفاوتی در قبل و بعد از درمان در آن Stage وجود ندارد. هم چنین بین سن و فعالیت سلول NK در بیمار سرطانی ارتباط همبستگی متوسطی وجود دارد ($r=-0/53$) و در گروه شاهد نیز میزان فعالیت سلول NK معادل ۳/۵±۶۲/۵ درصد اندازه‌گیری گردیدکه اختلاف معنی‌داری بااین میزان درافراد مبتلابه سرطان سینه دارد ($P<0/0001$).

نتیجه گیری: عمل ماستکتومی می‌تواند باعث فعالیت بیشتر سلولهای NK در افراد مبتلا به سرطان پستان شود و فعالیت افزایش یافته سلولهای NK می‌تواند نتیجه بخشی درمان را آشکار سازد.

واژگان کلیدی : سلولهای کشنده طبیعی (NK Cell)، سرطان پستان، فلوسیتومتری

* دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی کاشان ، گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی

** دانشگاه تربیت مدرس ، گروه ایمونولوژی و مرکز تحقیقات بیوشیمی ـ فیزیک (I.B.B) دانشگاه تهران

مقدمه

سلولهای NK به عنوان اولین خط دفاعی در برابر سلولهای توموری و عنصر اصلی نظارت ایمونولوژیک علیه تومورها ، سلولهای تغییر یافته ، عفونت‌های ویروسی، بعضی از عفونت‌های قارچی و باکتریایی و هم‌چنین به عنوان یکی از عوامل تنظیمی پاسخ ایمنی و تنظیم فعالیت سلولهای بنیادی خون ساز می‌باشد (۵،۴،۳،۲، ۱)، از این رو بروز ، استقرار و گسترش بسیاری از بیماریهای سرطانی همراه با کاهش فعالیت سلول NK است و به دلیل اهمیت این سلولها در ایجاد مصونیت طبیعی و دفاع بر ضد تومور و عوامل عفونی ، بررسی کمی و کیفی (فعالیت) این سلولها در خون محیطی ، سایر اعضای لنفاوی و هم چنین آنهایی که در خود بافت تومور ارتشاح یافته‌اند می‌توانند به عنوان یک عامل ارزنده‌ای برای پیش آگهی و مراقبت حین درمان و یا نتیجه‌بخشی درمان قلمداد شود (۶).

با توجه به این که مطالعه‌های گوناگون در این زمینه بیانگر این مطلب هستند که فعالیت سلولهای NK و بیماران سرطانی و به خصوص سرطان پستان که از شایع‌ترین بدخیمی‌ها در خانمها می‌باشد کاهش می‌یابد(۱). اگر در روشهای درمانی موجود (به خصوص جراحی) بتوان فعالیت این سلولها را به سوی طبیعی شدن پیش برد، می‌توان از این سلولها به عنوان یک عامل پیش‌آگهی و مراقبت حین درمان استفاده کرد.

به منظور بررسی تاثیر درمان در فعالیت سلول NK افراد مبتلا به سرطان پستان و مقایسه این فعالیت با افراد طبیعی ، این تحقیق بر روی بیماران مبتلا به سرطان پستان بستری در مرکز سرطان بیمارستان امام خمینی طی سال ۱۳۷۳ انجام گرفت.

مواد و روشها

تحقیق به روش کارآزمایی بالینی (Clinical trial) از نوع مقایسه قبل و بعد از درمان و مقایسه با یک گروه شاهد مستقل است. نمونه‌های مورد مطالعه ۱۸ بیمار مبتلا به سرطان پستان که با روش پاتولوژیک تشخیص Stage بیماری در آنها داده شده بود و دارای میانگین سنی ۸/۲±۵۱/۲ سال و محدوده سنی ۶۲-۳۴ سال می‌باشند، یک بار قبل از درمان از آنها ۱۰-۸ سی سی خون محیطی با سرنگ ۱۰ سی سی حاوی ماده ضد انعقاد هپارین گرفته شد و به لوله‌های سانتریفوژ استریل حاوی ۴ سی سی شیب غلظتی فایکول - هایپک (۷) انتقال یافت و سپس سلولهای منونوکلئربافی کوت را جدا ساخته و با سه بار شستشوی با محیط کشت RPMI 1640 ، آن را به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور قرار داده تا سلولهای فاگوسیت آن به شیشه بچسبندوسپس سلولهای‌افکتور شامل لنفوسیت‌های خون محیطی (Pripheral Blood Lymphocyte) را با تریپان‌بلو شمارش کرده و Viability آن را مشخص نموده و با RPMI آن را به غلظت دلخواه رسانده تا در سنجش فلوسیتومتریک به کار رود. از طرفی ویال‌های حاوی سل لاین توموری K562 فریز شده در ازت مایع در ۱۷oc- را از ازت خارج کرده و سلولها را به بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد منتقل نموده و سپس با محیط کشت C.M.RPMI آن را سه بار شستشو داده تا چیزی از DMSO که به شدت توکسیک است باقی نماند و سپس سلولها را با استفاده از تریپان بلو شمارش و Viability آنها تعیین گردیدند. سپس به غلظت دلخواه در RPMI 1640 و FCS

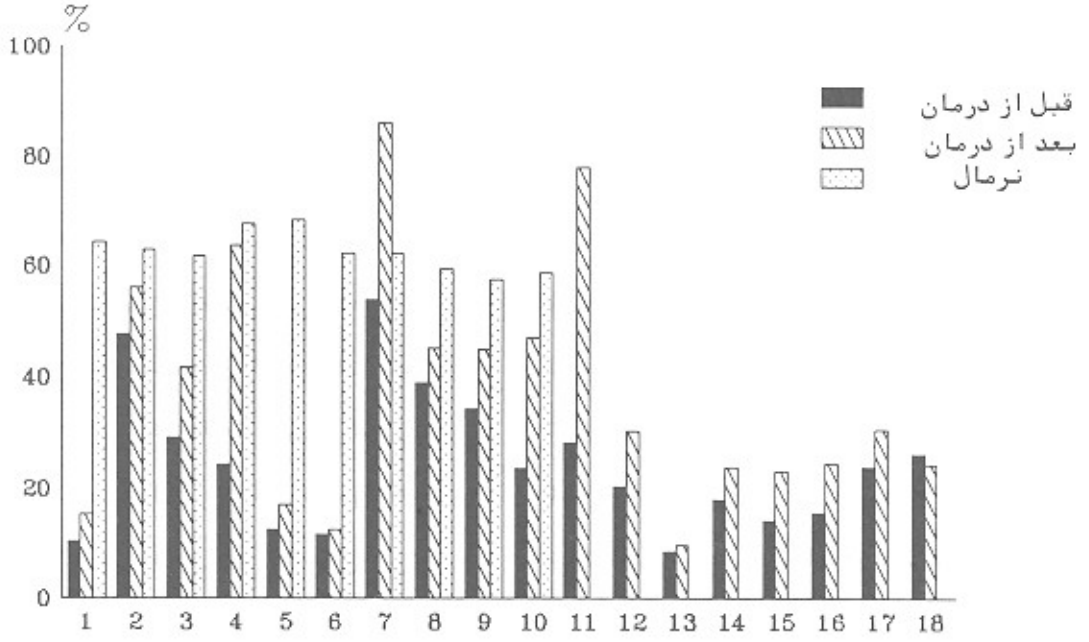
10% استرپتومایسین رسانده شد و برای سنجش NK آماده گردید. بعد از آن سلولهای هدف K562 و لنفوسیت‌ها در نسبتهای 20:1 E:T با هم مخلوط شدند.

در مرحله بعدی ابتدا شاهدی از سلول افکتور و شاهد سلول هدف K562 تهیه می‌گردد و جایگاه هر یک به طور مجزا در اشکال فلوسیتومتر (Becton Dickinson Facs Scan) مشخص می‌شود و سپس در مورد شاهد هدف، میزان 10^5 سلول هدف را با حجمی که دارد با ۱۰۰λ از پروپودیوم یدید (PI) مخلوط کرده و به حجم ۱ ml رسانده می‌شود. آن گاه از لحاظ فلوسیتومتر مورد بررسی قرار گرفته و میزان لیز خود به خودی از طریق میزان رنگ پذیری با PI تعیین می گردد و به عنوان شاخص لیز خود به خودی هدف در نظر گرفته می‌شود.

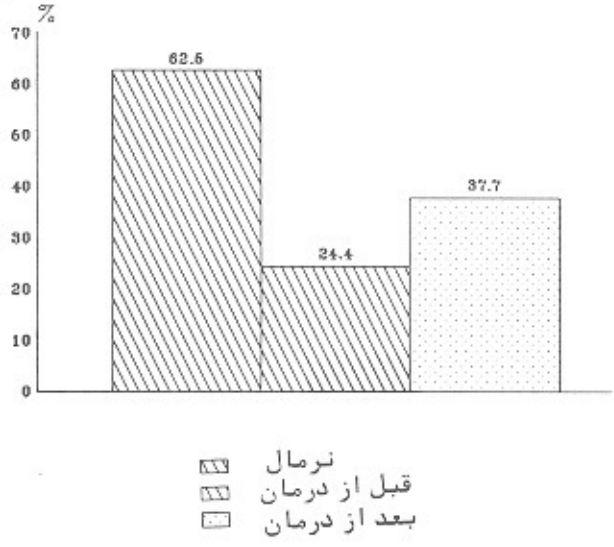
Viability سلول هدف ۹۹-۹۷ درصد بود (البته به دو سلول هدف یک gate ایجاد کرده و لیز سلول در آن gate بررسی می‌گردد). سپس سلولهای هدف K562 و لنفوسیت‌ها را در نسبت‌های 20: 1 E:T با هم مخلوط کرده و حجم را با RPMI به ۹۰۰λ رسانده و سپس لوله‌های مخصوص این نسبت‌ها را به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۵۰۰ دور سانتریفوژ نموده تا سطح تماس و کونژوگاسیون بیشتر شود و سپس لوله‌ها را به مدت ۱ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد حاوی ۵ درصد Co_2 قرار داده و به هر یک از لوله‌ها ۱۰۰λ از PI اضافه نموده تا حجم کل به ۱ml برسد. ۱۵ تا ۳۰ دقیقه زمان لازم است تا رنگ هسته‌ای PI جذب شود، سپس می‌توان با فلوسیتومتر به بررسی میزان فعالیت NK پرداخت. در ابتدا سه جمعیت مشخص در نمودار Scatter قابل تشخیص بودند که همان سلولهای افکتور، سلولهای هدف زنده و سلولهای هدف مرده بودند و سپس gate مجددی به دور دو جمعیت زنده و مرده هدف کشیده و درصد میزان رنگ پذیری با PI در آنها مشخص می‌گردد. هر سنجش ۱۰۰۰۰ سلول بررسی شدند. می‌توان فعالیت لیتیک NK را از نظر تغییرات FS (Forward Scatter)، SS (Side Scatter) (۸،۹) و نظر رنگ پذیری با PI بررسی نمود. تفاوت درصد رنگ پذیری با PI در مرحله مخلوط افکتور و هدف را با درصد رنگ پذیری سلول هدف لیز شده در حالت لیز خود به خودی را به عنوان میزان سیتوتوکسیسیتی سلول NK در نظر می‌گیرند. بررسی فلوسیتومتریک میزان فعالیت سلول NK، ۱۵ روز بعد از درمان ماستکتومی توسط جراح متخصص بر روی ۱۸ بیمار و در ۱۰ فرد طبیعی از کارکنان زن بیمارستان در محدوده سنی ۶۲-۳۴ سال صورت می‌پذیرفت. آن گاه میزان فعالیت سلول NK قبل و بعد از درمان با T-test مورد بررسی قرار می‌گرفت و با میزان فعالیت این سلول در افراد طبیعی مقایسه گردید.

یافته‌ها

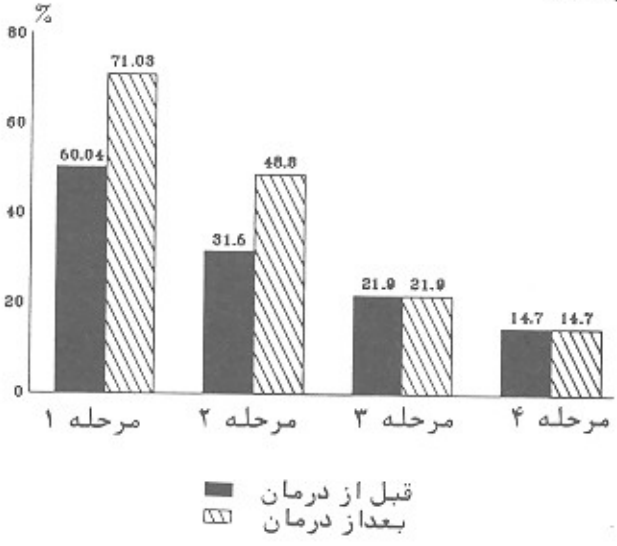
متوسط فعالیت سلول NK در افراد بیمار مورد بررسی از ۱۲/۶±۲۴/۴ درصد قبل از درمان به ۲۲/۳±۳۷/۷ درصد بعد از درمان جراحی افزایش یافت ($P< ۰/۰۵$) که بیانگر درمان جراحی موفقیت آمیز می‌باشد و میزان فعالیت سلول NK را افزایش داده است ولی با وجود این موفقیت در افزایش میزان NK (۲۲/۳±۳۷/۷) هنوز میزان آن خیلی کمتر از متوسط فعالیت سلول NK در افراد طبیعی می‌باشد (۳/۵±۶۲/۵ درصد) ($P< ۰/۰۰۰۱$) (نمودار ۱ و ۲).



نمودار ۱ـ میزان فعالیت سلولهای NK در افراد طبیعی و افراد مبتلا به سرطان پستان قبل و بعد از جراحی در بیمارستان امام خمینی طی سال ۱۳۷۳



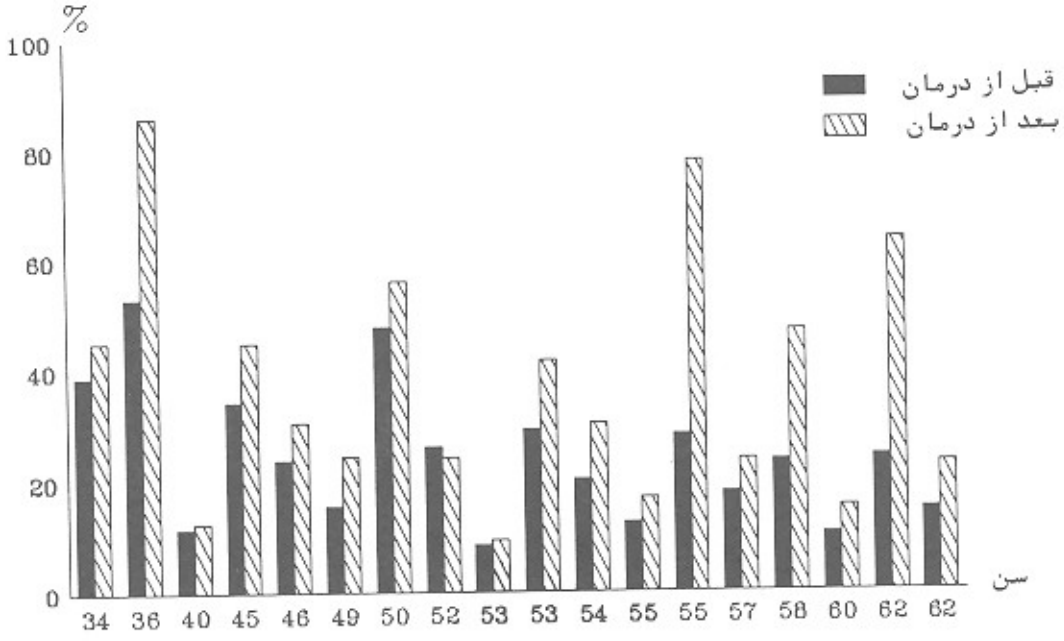
نمودار ۲ـ متوسط میزان فعالیت سلولهای NK در افراد طبیعی و افراد مبتلا به سرطان پستان قبل و بعد از درمان جراحی در بیمارستان امام خمینی طی سال ۱۳۷۳



نمودار ۳ـ ارتباط بین Stage بیماری و متوسط فعالیت سلول NK در بیماران مبتلا به سرطان پستان قبل و بعد از درمان جراحی

فعالیت سلول NK در Stages مختلف بیماری متفاوت است و با افزایش Stage بیماری فعالیت سلول NK کاهش می‌یابد و از این رو ارتباط معنی‌داری بین Stage بیماری و میزان سیتوتوکسیسیتی سلول NK وجود دارد ($r = -0/89$) (نمودار ۳).

اما یک تناقض وجود دارد و آن این که بیماری با Stage III دارای فعالیت NK پایین تری نسبت به بیماری با Stage IV می‌باشد. ارتباطی بین سن و میزان فعالیت سلول NK در افراد مبتلا وجود ندارد ($r = -0/53$) ولی بین سن و Stage بیماری در این افراد ارتباطی مشاهده می‌شود که با افزایش سن Stage بیماری بالاتر می‌رود (نمودار ۴).



نمودار ۴ـ ارتباط بین سن و میزان فعالیت سلول NK در بیماران مبتلا به سرطان پستان قبل و بعد از درمان جراحی

بحث

هدف از این مطالعه پاسخ به این سوال بود که آیا با کاهش حجم تومور (در اثر جراحی) فعالیت سلول NK افزایش می‌یابد یا نه؟ که یافته‌های این مطالعه جواب مثبت را در پی داشت.

در بررسی‌های مختلف نقش سلولهای NK در امر نظارت این مهم تشخیص داده شده و به طور کلی رابطه معکوس بین فعالیت این سلول و پیشرفت متاستاز تومورهای مختلف وجود دارد (۴). بررسی‌ها نشان می‌دهد که طول عمر بیماران دارای تومور که تومور آنها مهار شده است رابطه مستقیمی با فعالیت سلولهای NK نشان می‌دهد (۵،۸).

مطالعه موجود نشان داده که تفاوت قابل ملاحظه‌ای در فعالیت سلول NK قبل و بعد از درمان وجود دارد که نمایانگر نقش موثر جراحی در کاهش حجم تومور و در نتیجه برداشته شدن اثر ساپرسیو بافت توموری بر روی سلولهای NK و افزایش سیتوتوکسیسیتی آنها می‌باشد. هم چنین با آزمون همبستگی بین Stage بیماری و فعالیت NK مشخص شد که این ارتباط به صورت معکوس می‌باشد مگر در یک مورد که بیماری با Stage III دارای فعالیت NK پایین‌تری نسبت به بیماری با Stage IV بود که ممکن است دلیل لیز خود به خودی بیشتر سلول هدف (K562) و یا عفونت ویروسی و یا اشتباه در Stage بندی بیماری باشد.

این مطالعه نشان داد که رابطه بین سن و فعالیت سلول NK نه در افراد طبیعی و نه در افراد مبتلا به سرطان پستان وجود ندارد. از طرفی در مطالعات انجام گرفته در دیگر کشورها (۵) و شیخی در ایران (۸) با روش رها شدن کروم (51 Cr release) میزان فعالیت سلول NK در افراد طبیعی ۷۰-۵۵ درصد را نشان می‌دهد که با روش فلوسیتومتری این میزان به ۶۲/۵ درصد می‌رسد، بنابراین این روش می‌تواند برای تشخیص سیتوتوکسیسیتی طبیعی

قابل اطمینان باشد زیرا دارای مزایایی از جمله : دقیق و قابل تکرار ، سریع ، عدم وجود خطر رادیوایزوتوپ و انجام بررسی همزمان کمی و کیفی می‌باشد (۹).

نتیجه گیری نهایی این که عمل ماستکتومی می‌تواند باعث فعالیت بیشتر سلولهای NK در افراد مبتلا به سرطان پستان شود و فعالیت افزایش یافته سلولهای NK می‌تواند نتیجه بخشی درمان را آشکار سازد.

در نهایت توصیه می‌شود که برای درک بیشتر ارتباط سلول NK با تومور نقش روشهای مختلف درمانی دیگر (شیمی درمانی، پرتودرمانی و ایمنی درمانی) هم مورد مطالعه قرار گیرد تا با جمع‌آوری اطلاعات همه جانبه در این مورد بتوان به عنوان یک عامل پیش‌آگهی این بیماری و یا درمان و مهار پیشرفت آن اقدام نمود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری پرستاران مرکز سرطان بیمارستان امام خمینی و اپراتور دستگاه فلوسیتومتر انستیتورازی کرج جناب آقای منتظری تشکر و قدردانی می‌گردد.

References:

1. Pnina B. Tumor immunology: Three decades in review. Ann Rev Microbiol. 1983; 37: 447-476.
2. Salomon L. Tempe JL. Stage-related dectease in natural killer cell activity in untreated patients with mycosis fungoides cancer, Immunol Immunopath. 1989; 78: 138-140.
3. Papa S. Lack of correlation between NK-activity and tumor growth control in unde mice with different immune defects, Cancer Res. 1984; 200-204.
4. Vital M. An assessment of natural killer cell mediated cytoxicity in patients with malignant lymphoma. Eur J Cancer Clin Oncol. 1985; 21: 775-778.
5. Avent JNK. Function following allogeneic bone marrow transplantation. Transplantation. 1983; 45: 1080-1085.
6. Whiteside TL. Herberman RB. The role of NK cells in human disease. Clin Immunol Immunopath. 1989; 53: 1-23.
7. Bojum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand J Clin Invest. 1968; 97: 23-28.
۸- شیخی ع. بررسی فعالیت سلولهای کشنده طبیعی (NK Cells) در بیماران سرطانی و مقایسه آن با افراد نرمال. پایان نامه جهت دانش نامه ایمنی‌شناسی و سرم شناسی.تهران : دانشکده پزشکی تربیت مدرس ؛ ۱۳۷۱ : ۶۸-۶۰.
9. Zarcone D. Tilden AB. Flow cytometry evaluation of cell mediated cytotoxicity. J Immunol Methods. 1986; 96: 247-256.