مقایسهٔ نسبت نئوپترین ادراری به کراتینین در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس و افراد سالم

دکتر حسین خرمی* دکتر مهری کدخدایی** دکتر جمشید لطفی*** دکتر محمدرضا اشراقیان****
علی احدی***** دکتر فرامرز امیری****** دکتر تیرنگ نیستانی*******

Comparison of urinary neopterin to creatinin ratio in multiple sclerosis patients and controlled group

H. Khorrami *M. Kadkhodae* *J. Lotfi* *M.R. Eshraghian* *A. Ahadi* *F. Amiri* *T. Neyestani*

Abstract

Background : *Multiple Sclerosis as the most common cause of demyelinating disorders has a basis of autoimmunity.*

Objective : *To describe a procedure to determine total and aromatic UNCR and their ratio as a marker of cell mediated immunity in MS patients and controlled groups.*

Methods : *In this project UNCR was determined and compared in MS patients who reffered to the neurology department of Shariati's Hospital and normal subjects. Using HPLC and Novapak C18 (3.9x300mm) column at 25 degrees centigrade.*

Findings: *Mean of aromatic UNCR were 337.6±47.2 and 1273.1±201.64 micromol/mol , mean of total UNCR were 484.64±60.2 and 1800.3±250.1 micromol/mol, and the ratio of aromatic/total UNCR were 0.664 and 0.73 in normal subjects and MS patients respectively.*

Conclusion : *Prominent elevation of aromatic UNCR in MS patients in comparison with normal subjects is the sign of high activity of cell- mediated immunity in this group even though with treatment.*

Keywords: *Urinary Neopterin to Creatinin Ratio (UNCR) , Multiple Sclerosis (MS)*

چکیده

زمینه : بیماری مولتیپل اسکلروزیس، شایع‌ترین بیماری تخریب کنندهٔ میلین با زمینهٔ خود ایمنی در بدن است.

هدف: مطالعه به منظور معرفی روش اندازه‌گیری نسبت نئوپترین ادراری به کراتینین برای تعقیب فعالیت ایمنی سلولی در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس و مقایسهٔ آن با افراد سالم انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مقطعی که در سال‌های ۱۳۷۸ و ۷۹ انجام شد، شاخص UNCR در نمونه‌های ادراری گروهی از بیماران مبتلا به ام-اس مراجعه کننده به بیمارستان دکتر شریعتی تهران و افراد داوطلب سالم با استفاده از دستگاه HPLC و ستون Novapak C18 (3.9x300mm) با سرعت جریان حلال ۰/۸ میلی‌لیتر در دقیقه و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد مورد اندازه‌گیری و مقایسه قرار گرفت. داده‌ها با آزمون آماری t تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: مقدار متوسط UNCR آروماتیک در گروه سالم ۴۷/۲±۳۳۷/۶ میکرومول در لیتر و در گروه بیمار ۲۰۱/۶۴±۱۲۷۳/۱ میکرومول در لیتر بود. مقدار متوسط UNCR تام در گروه سالم ۶۰/۲±۴۸۴/۶۴ میکرومول در لیتر و در گروه بیمار ۲۵۰/۱±۱۸۰۰/۳ میکرومول در لیتر بود. نسبت UNCR تام به UNCR آروماتیک در گروه سالم ۰/۶۶۴ و در گروه بیمار ۰/۷۳ به دست آمد.

نتیجه‌گیری: افزایش چشمگیر UNCR آروماتیک در بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس در مقایسه با گروه شاهد نشان دهندهٔ فعالیت بالای ایمنی سلولی در این بیماران حتی در شرایط دریافت دارو است.

کلید واژه‌ها: نسبت نئوپترین ادراری به کراتینین ، مولتیپل اسکلروزیس

* استادیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
** دانشیار دانشگاه علوم پزشکی تهران
*** استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران
**** استادیار دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
***** کارشناس گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران
****** استادیار دانشگاه علوم پزشکی ایران
******* استادیار دانشگاه علوم پزشکی همدان

مقدمه:

شیوع روزافزون بیماری‌های تخریب کنندهٔ میلین به خصوص شایع‌ترین شکل آن یعنی مولتیپل اسکلروزیس به یکی از مشکلات مهم درمانی کشور تبدیل شده است، به طوری که اکنون این بیماری در زمرهٔ بیماری‌های خاص به حساب می‌آید و مدتی است که انجمن ام-اس نیز فعالیت خود را آغاز نموده است.(۱و۳)

در حال حاضر روش‌های متعددی مانند ام. آر. آی، سی تی اسکن، پتانسیل برانگیخته (Evoked Potential)، آزمایش مایع مغزی ـ نخاعی و تظاهرات بالینی برای پیش بینی سرنوشت و پی‌گیری اثرات درمانی مولتیپل اسکلروزیس مورد استفاده قرار می‌گیرند.(۷)

وجود نتایج مثبت کاذب، منفی کاذب، تهاجمی و پرهزینه بودن روش‌های موجود نیاز به روش‌های کمکی دیگر را در این زمینه برمی‌انگیزد.

نئوپترین (از مشتقات GTP) اکنون به عنوان شاخص فعالیت ایمنی سلولی شناخته شده است. نئوپترین تحت تأثیر انترفرون ـ گاما از مونوسیت‌ها و ماکروفاژها ترشح می‌شود.(۷) آخرین تحقیقات نقش نئوپترین را در خودکشی برنامه‌ریزی شدهٔ سلول(Apoptosis) اثبات کرده‌اند.(۹و۱۶) در شرایط فیزیولوژیک غلظت نئوپترین سرم جنین در طول دورهٔ بارداری زیاد می‌شود که از غلظت سرمی مادر همواره بالاتر بوده، نسبت به آن مستقل است. افزایش تولید نئوپترین نشان‌دهندهٔ افزایش تدریجی فعالیت سیستم ایمنی و تکامل آن در بدن جنین است.(۱۳)

نئوپترین به شکل آروماتیک و احیا شده چه در واکنش‌های موضعی یا سیستمیک توسط تک هسته‌ای‌ها آزاد و در مایعات بدن مانند سرم، مایع مغزی- نخاعی، مایع مفصلی و ترشحات بزاق منتشر می‌شود.(۱۵) البته این ترکیبات در شرایط فیزیولوژیک نیز به علت حالت آماده‌باش سیستم ایمنی در مایعات بدن وجود دارند و در نهایت توسط ادرار از بدن دفع می‌گردند. بنابراین اندازه‌گیری نئوپترین ادراری می‌تواند شاخص مناسبی از فعالیت ایمنی سلولی بدن باشد.(۱۱) از آنجا که فعالیت بدنی و رژیم‌های غذایی از نظر دریافت مایعات بر حجم ادرار و در نتیجه غلظت نئوپترین تأثیر می‌گذارد، بنابراین جهت حذف اثر این عوامل از نسبت نئوپترین به کراتی‌نین ادراری (UNCR) استفاده می‌گردد.(۸)

از این شاخص در پیش‌بینی سیر بیماری و نیز ارزیابی پاسخ به درمان در زمینه‌های مختلف از جمله بیماری‌های قلب و عروق، سرطان‌ها، پیوند بافت و عضو، بیماری‌های عفونی میکروبی و ویروسی و ایدز استفاده می‌شود.(۲و۴و۵و۱۲)

نئوپترین محلول در آب و دارای ساختمان آروماتیک است و در شکل اکسید شده به شدت خاصیت فلورسانس از خود نشان می‌دهد. شکل‌های احیاء شدهٔ آن یعنی ۷ و ۸ دی‌هیدرونئوپترین و ۵، ۶، ۷ و ۸ تتراهیدرونئوپترین خاصیت فلورسانس ندارند. ید، فری‌سیانید و دی‌اکسید منگنز در محیط اسیدی باعث اکسیداسیون این ترکیبات و تولید نئوپترین می‌شوند.

نئوپترین قابل اکسیدشدن و آروماتیک در غلظت‌های نسبتاً بالا در ادرار انسان وجود دارند. به مجموعهٔ نئوپترین آروماتیک و قابل اکسید شدن، نئوپترین تام می‌گویند. نسبت نئوپترین آروماتیک به نئوپترین تام در ادرار انسان در حدود ۴۵ درصد برآورد شده‌است.(۱۴)

این تحقیق به منظور به‌کارگیری روش اندازه گیری نئوپترین به عنوان شاخص فعالیت بیماری مولتیپل اسکلروزیس انجام شد.

▣ مواد و روش‌ها:

در این مطالعه مقطعی افراد داوطلب از دو گروه انتخاب گردیدند: یکی بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس که از بیماران مراجعه کننده به بخش نورولوژی بیمارستان دکتر شریعتی تهران بودند (۲۷ نفر) و دیگری، افراد داوطلب سالم ۲۰ تا ۵۰ ساله که به گروه فیزیولوژی مراجعه کردند و حاضر به همکاری شدند (۳۱ نفر).

به علت حساسیت نئوپترین به نور و حرارت، در تمام مراحل شرایط تاریکی و سرما حفظ شد.از هر داوطلب ۳الی ۴ نمونه(هر هفته در ابتدای صبح) گرفته شد. از کلیهٔ افراد مورد مطالعه درخواست شد تا در صورت ابتلا به یکی از بیماری‌های ویروسی از یک هفته قبل از نمونه گیری تا ۴۸ ساعت بعد از آن، موضوع را اطلاع دهند. نمونه‌هایی که شرایط نگه‌داری آنها رعایت نشده بود و داوطلبین مبتلا به یکی از بیماری‌های ویروسی از مطالعه حذف شدند.

اندازه گیری نئوپرین آروماتیک ادراری با استفاده از دستگاه HPLC و ستون Novapak C18 (3.9x300mm) با سرعت جریان حلال ۰/۸ میلی‌لیتر در دقیقه و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. ردیاب فلورسانس با فیلتر تهییجی ۳۳۸ نانومتر و فیلتر خروجی ۴۲۵ نانومتر جهت اندازه گیری نئوپترین استفاده شد. قسمتی از هر نمونهٔ ادرار با محلول یددار با غلظت ۱ میلی‌مول در لیتر اکسید شد و تمام نئوپترین‌های قابل اکسید شدن به شکل اکسید تبدیل و به این ترتیب نئوپترین تام اندازه گیری شد. کراتی‌نین نمونه‌های ادراری از روش ژافه (Jaffe) و با کمک دستگاه اسپکروفتومتر اندازه گیری شد.

با داشتن مقادیر نئوپترین تام و آروماتیک، UNCR تام و آروماتیک محاسبه شدند و داده‌ها با آزمون t مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

▣ یافته‌ها :

میانگین UNCR آروماتیک در گروه بیمار ۲۰۱±۱۲۷۳ و در گروه سالم ۴۷±۳۳۷ میکرومول در لیتر به دست آمد. که این اختلاف از نظر آماری معنی دار بود. البته نسبت UNCR آروماتیک به تام در دو گروه بیمار و سالم به ترتیب ۰/۰۷۵۴±۰/۷۳۱ و ۰/۰۹۳±۰/۶۶۴ میکرومول در لیتر به دست آمد که اختلاف این نسبت در بین دو گروه از نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول شمارهٔ ۱).

جدول ۱ :

مقایسهٔ میانگین UNCR آروماتیک و تام (میکرومول در لیتر) در گروه‌های مورد مطالعه

گروه‌مورد مطالعه	UNCRآروماتیک	UNCR تام	نسبت UNCRآروماتیک به تام
بیماران مبتلا به‌ام. اس ۲۷ نفر (۱/۴±۳۳/۹)	۱۲۷۳/۰۸±۲۰۱/۶۴ (۱۷۲-۳۸۷۶)	۱۸۰۰/۲۸±۲۵۰/۹ (۳۲۴-۵۸۱۰)	۰/۷۳۰۶±۰/۰۷۵۴ (۰/۲۱۶۱-۱/۷۵)
داوطلبین سالم ۳۱ نفر (۱/۹±۳۰/۸)	۳۳۷/۶۱±۴۷/۱۷ (۴۷-۷۸۵)	۴۸۴/۶۴±۶۰/۱۸ (۸۵-۱۳۴۰)	۰/۶۶۴۲±۰/۰۹۲۹ (۰/۲۱۶-۲/۱۹)
کل افراد ۵۸ نفر	۸۵۲/۲±۱۲۵ (۱۲/۷-۴۲۵۰)	۱۰۶۹/۵۲±۱۲۴/۱ (۸۵-۵۸۱۰)	۰/۶۹±۰/۰۵۵۲ (۰/۱۳۵-۲/۳۲)
سطح معنی داری	۰/۰۵ *	۰/۰۵ *	۰/۷۷

* تفاوت معنی‌دار است.

بحث و نتیجه‌گیری :

در این مطالعه افزایش نسبت UNCR آروماتیک و همچنین غلظت بالاتر UNCR تام در مبتلایان به ام. اس در مقایسه با افراد سالم، فعالیت اتوایمنی و ایمنی سلولی را در این بیماران نشان داد. این یافته با مطالعه واچر و همکاران مطابقت دارد. البته در آن مطالعه نمونه‌های ادراری هر روز تهیه می‌شد و در پایان مورد ارزیابی قرار می‌گرفت.[۱۰] از آنجا که در تحقیق مذکور، UNCR برای چند روز ثابت می‌ماند، در تحقیق حاضر نمونه‌ها به طور هفتگی از افراد تهیه و ارزیابی شدند.

مقایسه نسبت UNCR آروماتیک به تام نشان داد که مقدار متوسط این نسبت در کل جمعیت مورد مطالعه حدود ۰/۷ بوده و بین گروه‌های مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری در این مورد وجود نداشته است. در یک مطالعه مقدار این نسبت در نمونه‌های تازه تهیه شده ادرار و سرم در حدود ۴۵ درصد گزارش شده است.[۸] از آنجا که افزایش UNCR آروماتیک یا کاهش UNCR تام یا هر دو می‌توانند باعث افزایش این نسبت شوند و با توجه به این یافته که UNCR آروماتیک در جمعیت سالم مورد مطالعه حاضر بیشتر از گزارش‌های دیگر است، این اختلاف می‌تواند به علت فعالیت بیشتر سیستم ایمنی در گروه‌های مورد مطالعه حاضر و یا مصرف مواد اکسید کنندهٔ بیشتر در رژیم غذایی این افراد مثلاً به صورت نمک‌های یددار باشد که اکنون به وفور در اختیار همه افراد قرار دارد و می‌تواند باعث تبدیل هر چه بیشتر نئوپترین قابل اکسید شدن به شکل آروماتیک گردد. متوسط UNCR در یک مطالعه ۱۳۴ میکرومول در لیتر اعلام شده است،[۶] در حالی که تحقیق حاضر مقدار ۳۳۷/۶ را نشان می‌دهد.

اکنون ترشح نئوپترین به عنوان شاخص فعالیت ایمنی سلولی به خوبی شناخته شده است و مطالعات زیادی در این زمینه انجام گرفته است. قسمت عمدهٔ این مطالعات روی بیماری‌های خودایمن، قلب و عروق، سرطان، ایدز، پیوند اعضا و بیماری‌های عفونی متمرکز هستند. اگرچه اندازه گیری نئوپترین یک روش حساس است ولی به علت غیراختصاصی بودن در ارزیابی تغییرات آن عوامل متعددی باید مورد نظر قرار گیرد که از آن جمله می‌توان به گروه سنی، جنس و وجود بیماری‌های زمینه‌ای دیگر اشاره نمود.[۶] یکی از کاربردهای بسیار مهم اندازه گیری نئوپترین در ارزیابی پاسخ سیستم ایمنی بیمار به روش‌های مختلف درمانی است.

سلول‌های ایمنی مبتلایان به مولتیپل اسکلروزیس به علت زمینه‌های ایجادکنندهٔ بیماری (ژنتیک، عفونت و غیره) همیشه در حالت آماده‌باش هستند و این عاملی است که باعث می‌شود سطح UNCR حتی در شرایط درمان، بالاتر از افراد طبیعی سالم باشد. از سوی دیگر ابتلای افراد طبیعی به بیماری‌های ویروسی باعث افزایش UNCR می‌شود ولی با آنچه در شرایط مشابه برای افراد مبتلا به بیماری مولتیپل اسکلروزیس اتفاق می‌افتد، تفاوت می‌کند.

پیچیدگی‌ها و تنوع بیماری‌های خود ایمن و به خصوص مولتیپل اسکلروزیس و فقدان یک روش درمانی مشخص و همچنین ناکارآمدی و عوارض جنبی روش‌های درمانی موجود که گاه از خود بیماری خطرناک‌تر هستند، بیماران را به استفاده از روش‌های درمانی غیرمتعارف سوق داده است. در این جا حداقل کاری که بایدبرای این بیماران انجام داد استفاده از

شاخص‌هایی است که فعالیت سیستم ایمنی را منعکس کند. در این خصوص شاخصی را می‌توان ایده‌آل دانست که بتوان به نتایج آن تکیه نمود؛ فعالیت سیستم ایمنی را حتی زمانی که علائم ظاهری وجود ندارد، منعکس نماید؛ در حد امکان آسیب روحی و جسمی به بیماران تحمیل ننماید، کم هزینه، قابل اجرا و تکرار و تا حدامکان اختصاصی باشد.

نتایج این تحقیق و سایر تحقیقات به عمل آمده در مورد نئوپترین نشان می‌دهد که نئوپترین تمام خصوصیت‌های مذکور به غیر از اختصاصی بودن برای هریک از بیماری‌های مربوطه را داراست. البته این شاخص در زمینهٔ ایمنی سلولی کاملاً اختصاصی است و آنچه در بیماری‌های مختلف می‌تواند مورد توجه قرار گیرد، اهمیت این شاخص در پی‌گیری اثرات درمان و پیش‌بینی سرنوشت بیماران است.

سپاسگزاری:

بدین وسیله از همکاری صمیمانهٔ معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران قدردانی می‌شود.

مراجع:

۱- آدی بیک بلال، شقاقی همایون. بیماری مولتیپل اسکلروزیس و مشکلات تشخیصی آن. تهران، انتشارات مؤلفین، ۱۳۷۲، ۲۰-۳

2. Baier Bitterlich G,Watcher H,Fuchs D. Role of neopterin and 7,8 DHN in HIV infection:marker for disease progression and pathogenic link. J Acqu Immune Def Syn Hum Retrovir 1996; 13(2): 184-93

3. Bone RC, Robert L, Rosen RL. Quick reference to internal medicine. NewYork, IGAKU–SHOIN, 1994, 1421- 38

4. Denz H, Fuchs D, Hausen A, Huber H. Value of urinary neopterin in the differential diagnosis of bacterial and viral infections[abs]. Klin Woechenschr 1990; 68(4): 218-22

5. Garcia Mol X, Cole D, Zouridakis E, Kaski JC. Increased serum neopterin: a marker of coronary artery disease activity in women [abs]. Heart 2000; 83(3): 346-50

6. Giovannoni G,Silver NC. Increased urinary NO metabolites in patients with MS correlates with early and relapsing disease. Mult Scler 1999; 5(5): 335-41

7. Hamerlinck FF. Neopterin: A review. Experi Dermatol 1999;8(3): 167- 76

8. Hausen A, Fuchs D, Wachter H. Determination of neopterin in human urine by reversed phase HPLC. J Chemography 1982; (27) 61-70

9. Hoffman G, Kenn S, Wirleitner B. Neopterin induces NO-dependent apoptosis in rat vascular smooth muscle cells[abs]. Immunobiology 1998; 199(10): 63-73

10. Huber C, Batchelor JR, Fuchs D, Wachter H. Immune response-associated production of neopterin. J Exp Med 1984; 160: 310-6

11. Melichar B. Neopterin and its importance in clinical diagnosis. Cas Lek Cesk 1994; 133(15):

455-8

12. Murr C, Fuith LC, Winder B. Increased neopterin concentrations in patients with cancer: indicator of oxidative stress?. Anticancer Res 1999; 19(38): 1721-8

13. Radunovic N, Kuczynski E, Rebarber A, Nastic D. Neopterin concentration in fetal and maternal blood [abs]. Am J Obstet Gynecol 1999; 181(1): 170-3

14. Rolac LA, Harati Y. Neuroimmunology for The clinician. Boston, Butterworth Heinemann, 1997, 3-200

15. Vrecko K, Staedtler P, Mischak I. Periodontitis and concentrations of the cellular immune activation marker neopterin in saliva and urine [abs]. Clin Chem 1997, 268(1-2) 31-40

16. Wirleitner B, Baier Bitterlich G, Winder B, Fuchs D. 7,8 DHN- induced apoptosis is Jurkat T lymphocytes: a comparison with anti fas and hydrogen peroxide- mediated cell death. Biochem Pharmacol 1998; 56(9): 1181 -7