

## عملکرد نوتروفیل های خون محیطی در بیماران مبتلا به تالاسمی ماژور

نصرت الله سربندی فراهانی<sup>۱</sup>

یافته / سال ششم / شماره ۲۱

### چکیده

**مقدمه:** تالاسمی شایعترین اختلال خونی در جهان است. این کم خونی ارثی که ناشی از یک دگرگونی بنیادی در تعادل زنجیره های آلفا و بتا در ساختمان هموگلوبین بالغین (Hb.A) است، در فرم ماژور خود دارای عوارض جدی و تهدید کننده حیات (توام با همولیز و تغییرات استخوانی) است. در تحقیق حاضر عملکرد سلولهای ایمنی غیر اختصاصی (نوتروفیل ها) این بیماران مورد بررسی قرار گرفته است، همچنین ارتباط بین عملکرد نوتروفیل ها با سطح فریتین سرم، طحال برداری، تزریق دسفرال و تعداد دفعات تزریق خون نیز مورد مطالعه قرار گرفته است.

**مواد و روشها:** مطالعه به روش مورد - شاهدهی روی ۳۰ بیمار مبتلا به بتا - تالاسمی ماژور و ۳۰ فرد سالم به عنوان گروه کنترل انجام شده است. برای نوتروفیلها از خون کامل حاوی ضد انعقاد هپارین (۱۵u/ml) در حضور دکستران ۰.۶٪ و به کمک سانتریفوژ یخچالدار، برای جداسازی کاندیدا آلبیکنس از کلنی های قارچ روی محیط SDA و به منظور تهیه سوسپانسیونهای نوتروفیل و قارچ از محیط RPMI۱۶۴۰ و بافر PBS استفاده شده است. عملکرد نوتروفیلها (پس از تعیین تعداد مطلق)، با تستهای احیاء NBT، کموتاکسی، بلع، اپسونیزاسیون و کشتن داخل سلولی بررسی شد. اطلاعات حاصله به کمک آزمون های آماری t-student و  $X^2$  مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته اند.

**یافته ها:** نتایج این بررسی نشان می دهد که نوتروفیلهای بیماران مبتلا به تالاسمی ماژور از نظر تعداد و فعالیتهای بیگانه خواری (بلع) واتصال به میکروارگانیزم (اپسونیزاسیون) واحیاء NBT مشابه گروه کنترل می باشند؛ درحالیکه از نظر قدرت حرکت هدفدار بسوی ارگانیزم (کموتاکسی) وکشتن ارگانیزم نسبت به گروه کنترل فعالیت کمتری نشان می دهند. **نتیجه گیری:** با انجام این تحقیق مشخص شد که بیماران مبتلا به تالاسمی ماژور در مقایسه با گروه کنترل (سالم) حساسیت بیشتری نسبت به عفونت نشان می دهند.

**واژه های کلیدی:** تالاسمی، تزریق خون، دسفرال، فاگوسیتوز، کشتن

## مقدمه

تاثیر عوامل جاذب شیمیایی (Chemoattractant) آندوژن (مثل PAF-C5a-LTB4-IL-8) و اگزوژن (مثل: nfmlp رها شده از باکتری ها) صورت می گیرد (۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵). در این مطالعه به منظور بررسی عملکرد نوتروفیل، از تست های زیر استفاده شده است: بلع (فاگوسیتوز)، اپسونیزاسیون، کشتن، احیا NBT<sup>۱</sup>، کموتاکسی روش Boyden (در سه تست اول از کاندیدا آلیکنس، استفاده شده است).

## مواد و روشها

این مطالعه به روش مورد - شاهدی روی ۳۰ بیمار مبتلا به تالاسمی ماژور (با میانگین سنی  $5/04 \pm 13/58$  ۶۳/۳ درصد پسر و ۳۶/۷ درصد دختر) مراجعه کننده به آزمایشگاههای سازمان انتقال خون استان لرستان انجام شده است و تعداد ۳۰ فرد سالم (۵۶/۷٪ پسر و ۴۳/۳٪ دختر) با میانگین سنی  $4/9 \pm 21/4$  نیز به عنوان کنترل انتخاب شده اند و افراد گروه کنترل حتی الامکان فاقد سابقه خانوادگی بیماری بوده و نیز داروی خاصی و یاسیگار مصرف نمی نموده اند. از هر فرد حدود ۱۰ ml خون کامل در ضدانعقاد هپارین (۱۵۰ u/ml) و یک نمونه حاوی EDTA<sup>۱</sup> جهت شمارش مطلق نوتروفیل (ANC) گرفته شده است:

### ۱- جداسازی نوتروفیل:

برای این منظور از دکستران ۶٪ در سرم فیزیولوژی (Pharmacia) استفاده شد. به منظور راسب سازی نوتروفیل ها، از سانتریفیوژ یخچال دار مجهز به تایمر و سرعت سنج دقیق و نیز از PBS و یا RPMI 1640 جهت تهیه سوسپانسیون نوتروفیلی با غلظت  $10^6/5 \times 10^6$  استفاده می شود.

تالاسمی به بیان ساده نوعی کم خونی ارثی می باشد؛ اما در حقیقت تالاسمی یک بیماری منحصر به فرد نیست؛ بلکه گروهی هتروژن از اختلالات ارثی تک ژنی<sup>۱</sup> هستند که تحت عنوان کلی سندروم های تالاسمی نامیده می شوند. این سندروم ها ناشی از بروز موتاسیون هایی در ساختمان ژن های آلفا و بتاگلوبین هستند که سنتز زنجیره های آلفا یا بتا را در ساختمان هموگلوبین بالغین (Hb.A) مختل نموده و باعث می شوند که زنجیره مبتلا یا خیلی کم ساخته شود (کمتر از میزان نرمال) و یا اصلا ساخته نشود (۱، ۲، ۳). به منظور ارزیابی سیستم ایمنی این بیماران، مطالعات متعددی روی سیستم ایمنی سلولی (اختصاصی و غیر اختصاصی) و هومورال بعمل آمده است، بطوری که اختلالات زیر در مورد لنفوسیت های این بیماران گزارش شده است:

۱- کاهش نسبت TH/TS<sup>۲</sup> (۴، ۵)

۲- کاهش تعداد و نقص در عملکرد سلولهای کشنده طبیعی<sup>۳</sup> (۵)

۳- کاهش تعداد سلولهای غیر محدود به MHC<sup>۴</sup> (۵)

۴- اثر سرکوب کنندگی فریتین روی پاسخ T-cell به میتوزن در *In vitro*، که در گیرندگان مکرر خون دیده می شود (۶، ۷). بعلاوه جولیا<sup>۵</sup> و همکاران از آرژانتین در بیمارستان Ninós بوئنوس آیرس، عملکرد کشتن و بلع، نسیل<sup>۶</sup> و همکاران در دانشگاه Ege در ترکیه کموتاکسی و مهاجرت تصادفی را در نوتروفیل های این بیماران مورد مطالعه قرار دادند (۸، ۹). روی ایمنی هومورال این بیماران نیز مطالعاتی صورت گرفته که ظاهرا اختلالی گزارش نشده است (۴، ۵، ۶).

نوتروفیل مهم ترین سلول بیگانه خوار محیطی است که نقش بسیار مهمی را در مقابله با عوامل مهاجم (باکتری ها و قارچ ها) بر عهده دارد. بعلاوه به سرعت به کانون های عفونت مهاجرت می کند و میکروارگانیسم های مهاجم را نابود می سازد، لذا آغازگر فرآیند التهاب می باشند. این مهاجرت تحت

1. Single-gene disorders
2. Thelper/Tsuppressor ratio
3. Null Killer
4. Major Histocompatibility Complex Cells
5. Julia M.T, et al
6. Necil Tukculor, et al
7. Nitro Bloue Tetrazolium
8. Ethylen Dinitrilo Teatractic Acid
9. Absolute Neutrophil Count

## ۲- تست NBT

در این تست انفجار اکسیداتیو سنجیده می شود؛ به طوری که نوتروفیل ها با یک عامل محرک مناسب مثل اندوتوکسین باکتری E.coli (LPS)<sup>۱</sup> و یا PMA<sup>۲</sup> (سیگما) محلول ۱ mg/ml در DMSO<sup>۳</sup> و محلول زرد رنگ NBT (سیگما) انکوبه می شوند. روی یک لام مقداری خون بیمار (و کنترل) ریخته می شود و پس از انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد نوتروفیل ها به شیشه چسبیده که توسط PBS لخته پاک می شود. روی نوتروفیل ها PMA و NBT اضافه می شود و مجدداً انکوبه می شوند. محلول زرد رنگ NBT توسط نوتروفیل متعاقب تولید رادیکالهای سوپر اکساید ( $O_2^-$ ) به فورمازان آبی نامحلول احیا شده، درون گرانولها رسوب می کند که زیر میکروسکوپ مشاهده می شوند. (محدوده نرمال ۰.۹۰٪)

## ۳- تست کموتاکسی

به منظور بررسی آزمایشگاهی حرکت جهت دار نوتروفیل از تست کموتاکسی با تکنیک boydem استفاده شده است. در این تحقیق عامل جاذب شیمیایی بکاررفته نیز nFMLP (که به صورت تجارتي در دسترس بوده و در غلظت  $10^{-9}$  -  $10^{-8}$  ml در حضور آلبومین انسانی یا گاوی استفاده می شود) می باشد. در این روش از دو اطاقک استفاده می شود که اطاقک های boyden نامیده می شوند. سوسپانسیون نوتروفیلی ( $10^6$  /ml  $\times$  ۲/۵) در اطاقک بالایی و ماده جاذب شیمیایی در اطاقک پایینی ریخته شده و بین این دو یک فیلتر micropore از جنس نترات سلولز (۵-۳ میکرون) قرار داده می شود. در طول زمان انکوباسیون مشخص، نوتروفیل ها به سمت عامل کموتاکتیک جذب می شوند، وارد فیلتر شده و درون آن متوقف می گردند. در این تکنیک اندازه گیری حرکت نوتروفیل درون فیلتر بر اساس Front Leading می باشد و مساحت بین منشا و میدانی که در آن دو سلول (سریعترین سلولها) قرار دارند با استفاده از پیچ تنظیم میکرومتری میکروسکوپ اندازه گیری میشود. (محدوده نرمال ۱۲۰-۶۰ میکرون).

## ۴- تست اپسونیزاسیون:

یک ذره (میکروب) برای اینکه توسط نوتروفیل بهتر بلع گردد، بایستی ابتدا اپسونیزه شود؛ یعنی توسط مواد اپسونین موجود در سرم (مثل C3b و IgG) پوشیده شود. در این بررسی از سرم بیمار بعنوان منبع اپسونین برای پوشاندن بلاستوسپور های کاندیدا استفاده شده است. بدین صورت که ابتدا سرم بیمار با نوتروفیل های نرمال و مخمر فوق در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه می شوند. مخمر از راه آلتر ناتيو کمپلمان را فعال می کند که منجر به تولید C3b می گردد (که سطح آن را پوشانده) و نوتروفیل نیز برای C3b رسپتور دارد (CR1) که آن را بلع می نماید.

از این محلول انکوبه یک لام تهیه شده (Wet film) با متیلن بلو ۱٪ رنگ آمیزی می گردد و درصد نوتروفیل هائی که عمل بلع را انجام داده اند گزارش می شود. (محدوده نرمال: ۸۵-۵۰٪)

## ۵- تست بلع (فاگوسیتوز):

نوتروفیل های بیمار در سرم خودش و سرم نرمال به همراه بلاستوسپورهای کاندیدا انکوبه می شوند که مخمر اپسونیزه شده توسط نوتروفیل ها بلعیده خواهند شد. پس از تهیه لام و رنگ آمیزی با گیمسا تعداد پلاستوسپور های موجود در 100 نوتروفیل شمارش می شوند. (محدوده نرمال: ۱۰۰-۳۵۰/۱۰۰ pmm)

## ۶- تست کشتن (Killing):

نوتروفیل های بیمار در سرم نرمال به همراه کاندیدا آلبیکنس به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه می شود که منجر به کشته شدن کاندیدا توسط نوتروفیل می گردد.

سپس نوتروفیل ها توسط سدیم دزوکسی کولات ۲/۵٪ لیز می شوند تا بلاستوسپورها آزاد گردند. با استفاده از متیلن بلو ۰/۱٪ مخمر های مرده به رنگ آبی دیده می شوند و مخمر های زنده رنگ نخواهند گرفت. در حقیقت اساس این

1. Lipopovsacarid  
2. Phorbol Myristate Acetate

3. Dimethyl Sulfoxid

داری وجود نداشت. همچنین بین سن و عملکرد نوتروفیل ها (تست های مذکور) ارتباط معنی دار وجود نداشت.

جدول شماره ۲- مقایسه نتایج تست در گروه بیماران و گروه کنترل

تست	بیمار		سالم		سطح معنی دار (p)
	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	
کشتن	۲۱/۶	۲/۸۹	۲۴/۵۳	۳/۴۶	<۰/۰۰۱
اپسونیزاسیون	۷۳/۲۳	۷/۸۵	۷۵/۱۳	۸	NS
احیاء (NBT)	۹۸/۶۲	۱/۳۱	۹۸/۵۰	۱/۴۰	NS

### بحث

عموما عقیده بر این است که مبتلایان به تالاسمی ماژور، به ویژه پس از طحال برداری، مستعد ابتلا به عفونت های مختلف می باشند که به عوامل گوناگون از جمله نقص در فعالیت کمپلمان، نقص در عملکرد ماکروفاژها و نقص ایمنی سلولی نسبت داده شده است (۴، ۵، ۶، ۹، ۱۰). لذا در این مطالعه مبادرت به بررسی فعالیت نوتروفیل ها به عنوان سلول اصلی ایمنی سلولی غیر اختصاصی نموده ایم. مراحل عملکرد نوتروفیل ها در داخل بدن برای از بین بردن یک مهاجم شامل: دیپد ز- کمو تاکسی - اتصال به سلول هدف - فاگو سیتوز (بلع) - و کشتن می باشند (۶، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۶، ۱۷، ۱۸). این اعمال نوتروفیل در تحقیق حاضر با تست های زیر بررسی شده اند: ۱- کمو تاکسی ۲- اپسونیزاسیون ۳- بلع ۴- NBT ۵- کشتن.

نتایج مطالعه ما نشان می دهد که نوتروفیل های بیماران مبتلا به تالاسمی ماژور از نظر تعداد - فعالیت های بیگانه خواری (بلع) - اپسونیزاسیون و یا NBT مشابه گروه کنترل می باشند و به نظر می رسد که از نظر اتصال به عوامل اپسونیزه شده و بلع آنها و تولید برخی متابولیت های اکسیژن در مسیر انفجار تنفسی واحد قدرت طبیعی می باشند؛ در حالی که از نظر قدرت کمو تاکسی و کشتن کاندیدیا نسبت به گروه کنترل فعالیت کمتری را نشان می دهند. نوتروفیل های انسان

تست Vital Dye Exclusion می باشد با قرار دادن مقداری از محلول فوق و قرار دادن آن روی لام نئوبار، ۲۰۰ بلاستوسپور کانت می گردد و درصد بلاستوسپورهای مرده (آبی رنگ) گزارش می گردد. (محدوده نرمال ۴۰-۲۰٪) به منظور تهیه سوسپانسیون کاندیدا، ابتدا کلنی های آن را از روی محیط ۲۴ ساعته B.A<sup>۱</sup> و یا S.D.A<sup>۲</sup> برداشت نموده سپس کشت با RPMI 1640 و یا Tc.medium 199 شستشو داده از آن سوسپانسیون باغلظت  $5 \times 10^5 / ml$  تهیه می شود که برای سه تست ۴ و ۵ بکار می رود.

لازم به ذکر است که کلیه مراحل فوق روی نمونه های کنترل نیز صورت گرفته است.

### یافته ها

برای تحلیل داده ها از آزمون  $X^2$  و t استیودنت استفاده شد. مقایسه تستهای شمارش مطلق نوتروفیل و تست بلع در بیماران و گروه کنترل (سالم) با استفاده از آزمون t نشان داد که تفاوت معنی داری بین آنها وجود ندارد. اما بین نتایج تست کمو تاکسی دو گروه، تفاوت معنی دار وجود داشت ( $p < 0/001$ ) (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱- مقایسه نتایج تست در گروه بیماران و گروه کنترل

تست	بیمار		سالم		سطح معنی دار (p)
	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار	
شمارش مطلق نوتروفیل (ANC)	۳۴۰۰/۷۰	۷۰۷/۸۶	۲۹۸۷/۶۰	۸۵۴/۶۶	NS
بلع	۲۶۱/۹۳	۵۲/۰۷	۲۸۵/۹۳	۴۸/۸۷	NS
کمو تاکسی	۸۳/۲۴	۱۱/۰۵	۹۸/۶۴	۱/۶۵	<۰/۰۰۱

همچنین بین نتایج تست کشتن در دو گروه (بیمار و سالم) تفاوت معنی دار وجود داشت ( $P < 0/001$ )؛ اما بین نتایج تست اپسونیزاسیون و نتایج تست احیاء دو گروه تفاوت معنی دار وجود نداشت (جدول شماره ۲).

بین نتایج تست کمو تاکسی با طحال برداری و همچنین تست ANC با طحال برداری ارتباط معنی دار وجود داشت ( $p < 0/05$ )؛ اما بین طحال برداری با سایر تست ها ارتباط معنی

ارتباطی نیز با سطح فریتین سرم و تعداد دفعات تزریق خون نداشته است. نتایج بررسی قدرت اپسونیزاسیون در گروه بیماران مشابه گروه کنترل بود و با توجه به استفاده از سرم بعنوان منبع مواد اپسونین (مثل C3b و IgG)، می توان مطرح نمود که سرم بیماران تحت بررسی از نظر حضور مواد اپسونین دچار نقصان نمی باشد. لازم به ذکر است که برخی قارچها (از جمله کاندیدا) قادرند سیستم کمپلمان را از مسیر آلترناتیو (مستقل از آنتی بادی) فعال نموده تولید اپسونین (C3b) نمایند که نوتروفیلها نیز برای آن رسپتور دارند (CR1) (۲۲، ۲۳). در این مطالعه مشخص شده که از لحاظ آماری فعالیت کموتاکسی در گروه بیماران کمتر از گروه کنترل می باشد. اما با توجه به محدوده طبیعی آن (۶۰-۱۲۰ میکرون) نشان داده شده که فعالیت کموتاکسی کلیه بیماران نیز در محدوده طبیعی میباشد. به علاوه نشان داده شده که فعالیت تحت بررسی نوتروفیلها با سن و جنس (در گروه کنترل و بیمار) نیز ارتباطی ندارد.

قادرند کاندیدیا رادرمسیر وابسته به میلوپراکسیداز (MPX) تخریب نمایند (مسیر اکسیداتیو) و در صورت نقص در فعالیت این آنزیم نیز قادر به نابودی عوامل عفونی میباشند (مسیر اکسیداتیو مستقل از MPX) (۱۲، ۱۴، ۱۸، ۱۹، ۲۰). نتایج بررسی انجام شده توسط هامپتون<sup>۱</sup> در سال ۱۹۹۶ نشان میدهد که مسیر اکسیداتیو در صورت فعال بودن MPX سریعتر انجام می شود، ولی عدم حضور آن به معنای ناتوانی در بیگانه خواری نمی باشد (۲۰، ۲۱) لذا به نظر می رسد که در بیماران مورد مطالعه نقص آنزیم MPX وجود دارد، به طوری که احتمالاً در نوتروفیلهای آنها تولید متابولیتهای سمی هیپوهالید در ادامه مسیر انفجار تنفسی (وابسته به MPX) مختل می باشد. با توجه به اینکه در برخی مطالعات، افزایش فعالیت NBT به علت افزایش تولید آنیون سوپراکساید (که به افزایش سطح فریتین سرم و تزریقات مکرر نسبت داده شده است)، در نوتروفیل های بیماران تالاسمی ماژور گزارش شده است (۶) نتایج مطالعه ما بیانگر طبیعی بودن احیاء NBT بوده که

## References

1. William J, Beut ler E, Thomas J. William's Hematology. 6th Ed, McGraw, Hill, N.Y, 2001; vol 1, pp: 547-574
2. Lee GR, Thomas CB. Wintrob's clinical Hematology. 9th Ed, Lea febiger, Philadelphia, 1993; vol 1, pp: 1102-1139
3. Bun HF & Forget BG. Hemoglobin: Molecular, Genetic and clinical Aspects, 2nd, Ed, Philadelphia, W.B Saunders, 1998
4. Gool HC, Chapel H. Clinical immunology: a Practical approach. 3th Ed, LWW London, 1990: 68-84
5. Rrich RR. Clinical Immunology: Principles & practice approach. 1th Ed, LWW, London, 1996: 32-58
6. Stewart Sell: Immunology, Immunopathology and Immunity. 5th Ed, McGraw-Hil, 1996: 894-912
7. Consolini R, Calleri A, Legitimo A, Massei F. Immunological evaluation of patients with beta-thalassemia major. Act Haematol 2001; 105 (1): 7-12

8. Kutukculer N, Kutlu O, Nisli G, Oztop S, Cotingul N: Assessment of Neutrophil chemotaxis and random migration in children with thalassemia major, *ped hematol*, 1996; 13: 239 – 245
9. Giuntoli JM, Esterez ME, Sen L, Penalver JA: Defective function of peripheral blood neutrophils in thalassemia major, *The AmJ. Hemato/onco*, 1984; 6: 215-217
10. Athanassiou- Metaxa M, Tzimoli V, Econou M, Taparkou A. Immune Status of thalassemic patients receiving deferiprone or combined deferiprone and desferrioxamine chelation treatment. *Acta Haematol*, 2003; 110 (4): 224-226
11. Ezer U, Gulderen F, Culha VK, Akgul N, Gubuz O. Immunological status of thalassemia syndrome. *Padiat Haematoloncol*. 2002 Jan-Feb; 19 (1): 51-58
12. Abramson JS and Wheeler JG. *The neutrophil*. 1th Ed, Oxford University press, 1993: 33-65
13. Stamatoyannopoulos G, Majerus PW, Perutter RM: *The molecular basis of blood diseases*. 3 rd ed. Philadelphia, WB Saunders, 2001: 183-226
14. Farmakis D, Giakoumis A, Aessopos A, Polymeripoulos E: Pathogenic aspects of immune deficiency associated with beta-thalassemia. *Med Sci Monit*, 2003 Jan; 9 (1): RA 19-22
15. Oren H, Sahin B, Irjen G, Ates H, Duman M, Yilmanz S, Turker M: Neutrophil apoptosis in patients with beta- thalassemia major, *Pediatr Haematol Oncol*, 2003 Apr-May; 20 (3): 237-243
16. Wiener E. Impaired phagocyte antibacterial effector functions in beta- thalassemia: a likely factor in the increased susceptibility to bacterial infections. *Haematology* 2003 feb; 8 (1): 35-40
17. Angelis- Stoforidis P, Vajda FJ, Christophidis N: Effects of NSAIDS on human PMN function in buffer and plasma. *Cinical Experimental Reumatology*, 1998 Nov-Dec; 16(6):703-708 (abstract)
18. Klebanof SJ, Olszowski S, Vanvoorhis WC, Ledbetter JA, Walterdorff AM: Effects of gama ( $\gamma$ ) -INF on human neutrophil :protection from deterioration on storage, *Blood*, 1992 july 1; 80(1): 225-234
19. Sakagami H, Utsumi A, Fujinaga S, Takeda M, Naoe T: Stimulation of iodination and cytokine production by dehydrogenation polymers of phenyl propenoids. *Anticancer Research*, 1993 july –aug; 13 (40): 1001-1005
20. Hampton MB: Involvement of super-oxide anion and MPO in oxygen-dependent killing of s.aureus by neutrophils. *Infection & Immunity* 1996 Sep; 164 (9): 3512-3517
21. Wilairal P, Kittikalayamong A, Chachavoen S: The thalassemic red cell membrane, *South East Asian Journal of tropical medicine and public health*, 1992; 23 supp2: 74-78
22. Loebestein R, Dalal I, Nisbet- Brown E, Berkovitch M: Immune function in patients with beta thalassemia receiving the orally active iron – chellating agent deferiprone, *BrJ Hematol* 1997 Sep; 98 (3): 597- 600
23. Tatsuzama H, Maruyama T, Hori K, Sano Y, Nakano M: Singel Oxegen (O<sub>2</sub>) as the principal oxidant in MPO-mediated bacterial killing in neutrophil phagosome. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Sep 7; 262 (3): 647 -650