جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجلهٔ پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۲۸ شماره ۳ پاییز ۱۳۸۵ صفحات ۲۴-۱۷

تظاهر مارکرهای ایمنولوژیک در بیماران مبتلا به اختلالات لنفوپرولیفراتیو مزمن سلول B: مطالعهء فلوسیتومتریک تعداد وسیعی از مارکرهای سلولی و ارائه پانل ایمنوفنوتایپ

دکتر ایرج اسودی کرمانی: استاد بیماریهای داخلی، فوق تخصص خون و مدیکال انکولوژی، مرکز تحقیقات هماتولوژی و انکولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز: نویسنده رابط

E-mail: irajkermani@hotmail.com

دکتر سید هادی ملجائی: دانشیار گروه بیوشیمی و آزمایشگاه بالینی، مرکز تحقیقات هماتولوژی و انکولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دکتر جمال عیوضی ضیائی: دانشیار بیماریهای داخلی، فوق تخصص خون و مدیکال انکولوژی، مرکز تحقیقات هماتولوژی و انکولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دکتر علیرضا نیکانفر: استادیار بیماریهای داخلی، فوق تخصص خون و مدیکال انکولوژی، مرکز تحقیقات هماتولوژی و انکولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دریافت: ۸۴/۶/۱۹، **پذیرش**: ۸۴/۱۱/۱۲

چکیده

زمینه و اهداف: اختلالات لنفوپرولیفراتیو مزمن سلول – B گروه هتروژنی از بیماریهاست که بر اساس مورفولوژی، مارکرهای ایمنولوژی و یافته های بالینی شناسائی می شوند. ایمنوفنوتیپ برای افتراق اختلالات سلول B از T و نیز تشخیص لوسمیهای مزمن نوع B از همدیگر یکروش اساسی میباشد و انجام آن بدون محدودیت و با دقت بیشتری میباشد. بمنظور اطلاع از نحوه تظاهر مارکرهای ایمنولوژیک در بیماران مطالعه همه جانبه و آینده نگری در ٥٤ بیمار انجام دادیم تا ضمن مقایسه با مطالعات دیگران اطلاعات لازمه را جهت طراحی پانلهای مناسب در تشخیص و تعیین پیش آگهی بیماران مورد استفاده قرار دهیم.

روش بررسی: نمونه خون ٥٤ بیمار مبتلا به لوسمی مزمن لنفوسیتی سلولB (B-CLL) تیپیک و آتیپیک وبیمار مبتلا به لوسمی-لنفوم سلول T بالغین(ATLL) ، لوسمی پرولنفوسیتیک سلولB (B-PLL) ،لنفوم غیر هوچکینیB در فاز لوسمیک (B-NHL) و لوسمی سلول موئی (HCL) با استفاده از ٢٦ معرف ضد سلولهای T،B، سلول NK و ضد مارکرهای اختصاصی با روش ایمنوفلورسانس مستقیم بوسیله فلوسیتومتری چند پارامتری مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته ها: به جز B-CLL (تیپیک و آتیپیک) تظاهر همزمان CD19, CD5 و CD23 در سایر بیماران مشاهده نشد. بیماران B-CLL تیپیک مارکرهای سلول B مخصوصا CD19 و CD22 را باشدت کمی نسبت به سایر اختلالات درسطح خود بیان می دارند ولی برخلاف بعضی منابع فقط درصد محدودی از بیماران B-CLL تیپیک CD22 منفی بودند. با این حال اختلاف مهمی در شدت بروز CD20 در نزد بیماران مشاهده نمی شود. در هیچکدام از اختلالات لنفوپرولیفراتیو مزمن سلول B ، مارکرهای سلول T به جزء CD5 تظاهر ندارد. در همین گروه ازبیماران، سایر مارکرهای مختلف لنفوئیدی با چند استثنا همانند یافته های سایر کشورها بود.

نتیجه گیری: فلوسیتومتری نقش با اهمیتی در تشخیص بیماریها داشته و بنابراین بمنظور استفاده بهینه از معرفها سه نوع پانل: پانل اول ــ برای همه بیماران جدید مبتلا به اختلالات لنفو پرولیفراتیو مزمن سلولهای T , B بکار برده میشود، پانل دوم ــ جهت تعیین هویت سلولهای T و NK مورد استفاده قرار میگیرد و پانل سوم ــ که جهت تعین هویت سلولهای -B در اختلالات لنفو پرولیفراتیو مزمن نوع B برای مطالعه این قبیل بیماران پیشنهاد می نماید.

کلید واژه: ایمونوفنوتایپ، لنفوپرولیفراتیو، مارکرها

مقدمه

پرولیفراسیون های بد خیم سلول – B بالغ؛ گروه هتروژنی از اختلالات لنفوپرولیفراتیو را شامل میشوند که سیر بیماریشان مزمن بوده و با گرفتار کردن خون و مغز استخوان بعنوان لوسمی های لنفوئیدی تعریف می شوند. همچنین تعدادی از لنفومهای غیر هوچگینی با درجه پائین نیز بواسطه گرفتار نمودن مغز استخوان و خون در مسیر ثانویه خود که تحت عنوان سندرومهای لوسمی/ لنفوم تعریف شده اند نیز در این طیف از بیماری ها گنجانده شده و اغلب مشکلاتی در تشخیص افتراقی با لوسمی اولیه ایجاد می نمایند. بخاطر پیچیدگیهای عمده ایکه در تعیین پیش آگهی و

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

درمان این قبیل بیماران وجود دارد شناسائی و تعیین هویت هر کدام از این بیماریها ضروری می باشد(۱و ۲و ۳).

تشخیص این اختلالات، مستلزم استفاده از تکنولوژیهای متعددی از قبیل مورفولوژی سلولی ، هیستوپاتولوژی، سیتوژنتیک، بیولوژی مولکولی و مطالعه مارکرهای ایمنولوژیک سلولی می باشد. ایمنوفنوتیپ یک تست کلیدی بوده طوریکه امروزه مطالعه بدخیمی های لنفوئیدی بدون استفاده از آنتی بادیهای منوکلنال امکانپذیر نمی باشد(۲و۳).

استفاده روزمره از معرفهای منوکلنال آنتی بادی و وجود فلورو کرمهای مختلف و توسعه فلوسیتومتری مولتی پارامتر شناخت ما را نسبت به ماهیت هر چه بیشتر این بیماریها افزایش می دهد.

بمنظور اطلاع از ماهیت و نحوه تظاهر مارکرهای ایمنولوژیک تعداد ٥٤ بیمار مبتلا به اختلالات لنفو پرولیفراتیو مزمن از جمله لوسمی لنفوئید مزمن سلولB که از ۱۳۸۰ تا ۱۳۸۲ به این مرکز مراجعه نمودند را با استفاده از انواع مختلفی از آنتی بادیهای منو و پلی کلنال اختصاصی ضد سلولهای B, T, NK[1] و ضد مارکرهای ویژه در سیستم فلوسیتومتری مولتی پارامتر مرکز مورد مطالعه همه جانبه قرار دادیم تا ضمن طراحی پانل یا پانلهای مناسب از نتایج حاصله در تشخیص و تعین پیش آگهی بیماران خود استفاده بنمائیم.

مواد و روش ها

از سال ۱۳۸۰ لغایت اواسط ۱۳۸۳ بعد از پذیرش بیمار در درمانگاه و انجام معاینات اولیه و تشکیل پرونده و انجام آزمایشات روتین و تهیه اسمیر خون محیطی، آسپیراسیون و بیوپسی مغز استخوان و مطالعه و خواندن آنها جهت تکمیل پروسه تشخیص، نمونه به شرح زیر برای آزمایشگاه فلوسیتومتری ارسال میگردید.

۱۰ الی ۲۰ میلی لیتر خون هپارینه که در حرارت اتاق (۲۲-۲۵ درجه) نگهداری می شدند حداکثر تا دو ساعت مورد آزمایش قرار گرفتند.

معرفهای منوکلنال آنتی بادی نشاندار با فلوروکرمهای FITC,[2] یا PE[3] : CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10 CD11c, CD16, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD38, CD45, CD56, CD103, HLA-DR, FMC-7, IgG, IgM (ساخت شرکتهای BECTON & DICKENSON آمریکا و DAKO دانمارک) معرفهای پلی کلنال آنتی بادی نشاندار با فلوروکرم TdT FITC[4] Lambda, Kapa , ساخت شرکت داکو دانمارک.

مطالعه مارکرهای سطح سلول بروش ایمنو فلورسانس مستقیم با فلوسیتومتری:

ابتدا سلولهای تک هسته ای را بوسیله فایکول از خون جدا کرده و بعد از شستشو با محلول هنگس یا بافر فسفاته(PBS) یک میلیون سلول در هر لوله با مقدار۲۰-۱۰ میکرو لیتر از منوکلنال یا پلی کلنال آنتی بادی بمدت ۱۵-۳۰ دقیقه در حرارت توصیه شده و در تاریکی انکوبه شدند. سپس سلولها سه بار با PBS مورد شستشو قرار گرفتند.

بمنظور جلوگیری از اتصال غیر اختصاصی Ab ، ۵۰ لاندا از سرم فرد AB با غلظت ۲٪ در PBS قبل از انکوباسیون با آنتی بادیهای مربوطه به لوله ها اضافه میگردید. بالا خره نیم میلی لیتر از محلول پاراً فورمالدئید یک درصد در بافر ایزوتونیک بعنوان فیکساتیو به هر لوله اضافه می گردید.

بعد از نیم تا یک ساعت سلولهای داخل لوله ها را با استفاده از نرم افزار Cell Quest وارد دستگاه فلوسیتومتری فاکس کالیبر کرده و سپس با همان نرم افزار نسبت به آنالیز سلولها از نظر منفی/مثبت بودن و همچنین بررسی شدت تظاهر مارکرهای سطحی سلولها اقدام گردید.(۴)

مطالعه TdT بروش ایمنوفلورسانس مستقیم با فلوسیتومتری: سوسپانسیون سلولی قبل از انکوباسیون با آنتی بادی ضد TdT ، بمدت ۱۰ دقیقه با دو سی سی محلول پارافورمالدئید ۲ در صد فیکس و سپس بعد از خارج کردن فیکساتیو، سلولها بمدت ۱۰ دقیقه با دو سی سی محلول نیم در صد tween 20 در PBS پرمآبلیزه گردیدند.

بعد از خارج کردن محلول پر مآبلیزان، بمدت ۳۰ دقیقه سلولهای داخل لوله ها در حرارت اتاق و در شرایط تاریک با مقدار توصیه شده از آنتی بادی ضد TdT مخلوط و انکوبه شدند. جهت بلوکه کردن FC رسپتور و جلوگیری از مثبت کاذب، سلولها قبل از افزودن آنتی بادی با ۵۰ میکرولیتر AB سرم ۲٪ در PBS انکوبه می شدند. بقیه مراحل همانند روش شماره یک بود با این تفاوت که شستشوی سلولها بعد از انکوباسیون با Ab بوسیله محلول پرمآبایزان انجام می گرفت(۴).

تنظیم دستگاه فلوسیتومتری برای این قبیل نمونه ها انجام و تا پایان تحقیق ثابت می ماند. برای اطمینان از درستی عملکرد دستگاه کنترلهای لازم با استفاده از معرفهای استاندارد بطور مرتب اعمال میگردید.

همراه هر نمونه بیمار سه لوله کنترل منفی با آنتی بادی غیر اختصاصی کونژکه با FITC یا PE ایزو گروپ با أنتی بادی های اولیه، و یک لوله کنترل بدون آنتی بادی جهت تعیین مناطق منفی در هیستوگرام و یا سیتوگرام به سری لوله ها اضافه میگردد. روشهای مذکور با توجه به انواع آنتی بادیهای کونژوکه با رنگهای مختلف فلورسانس بطریقه تک رنگ برای TdT و کاپا و لامبدا یا دو رنگی برای سایر مارکرها طراحی شدند.

داده های گرداوری شده با استفاده از نرم أفزار أماری SPSS نسخه ۱۲ تجزیه و تحلیل شدند. بطوریکه برای مقایسه گروه ها به لحاظ داده های کمی از تحلیل واریانس و آزمون LSD[5] استفاده شده است.

1. Natural Killer
2. Fluorescein Isothiocynate(FITC)
3. Phycoerythrin (PE)
4. Terminal deoxynucleutidyl Transferase(TdT)
5. Least Significant analyse Difference

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

یافته ها

با توجه به علایم بالینی و آزمایشگاهی و نتایج حاصل از سیتولوژی و ایمنوفنوتیپ (جداول شماره ۱ و ۲) از ٥٤ بیمار بترتیب ٤٢ نفر مبتلا به B-CLL تیپیک و ٤ نفر مبتلا به B-CLL آتیپیک و ۸ نفر مبتلا به انواع دیگری از اختلالات لنفوپرولیفراتیو مزمن (non-CLL) مورد شناسائی قرار گرفتند. نسبت مبتلایان مذکر به مونث (۲ به ۱)برای B-CLL تیپیک و (۳ به ۱) برای آتیپیک و (۳ به ۱)برای انواع دیگر بود. متوسط سن ابتلا به B-CLL تیپیک ٦٤ سال و به آتیپیک ۷۸ سال و در بقیه موارد ٦٧/٦٤ سال بود. طبق تحلیل واریانس تفاوت میانگین سن بین گروه ها معنی دار است (p=۰/۰۴۴) در واقع میانگین سن ابتلا به B-CLL آتیپیک نسبت به هر دو گروه دیگر بیشتر است (p=۰/۰۳۵) و بین نوع تیپیک و non-CLL تفاوت معنی داری وجود ندارد (p>۰/۰۵). میانگین تعداد WBC در آتیپیک بیشتر از گروه non-CLL بوده (p=۰/۰۴۴) ولی با گروه تیپیک متفاوت نبود (p=۰/۰۶). میانگین تعداد درصد لنفوسیت ها در گروه تیپیک و آتیپیک بیشتر از non-CLL (p=۰/۰۰۸) بوده و تفاوتی بین تیپیک و آتیپیک وجود ندارد (p=۰/۳۶۳). میانگین مقدار مطلق لنفوسیت در گروه آتیپیک بیشتر از دو گروه دیگر بوده (p=۰/۰۱۵ و p=۰/۰۰۳). از لحاظ مقدار هموگلوبین و تعداد پلاکت تفاوت معنی داری بین گروه ها مشاهده نشد بترتیب p=۰/۲۸۴ و p=۰/۵۲۰ .

بجز بیمار مبتلا به لوسمی سلولT بالغین (جدول ۲) همه سلول های لنفوئیدی هد ف در بیماران مبتلا به B-CLL تیپیک و آتیپیک و چهار بیمار موجود در گروه Non-BCLL دو آنتی ژن CD5 و CD19 را توأماً بروز داده بودند. مارکرهای TdT, CD1a, CD10, CD16, CD56 در کلیه بیماران منفی و CD103 فقط در بیماران مبتلا به HCL[1] مثبت بود. ۲۵ بیمار از ٤٢ نفر بیمار گروه تیپیک آزمایش شده برای CD22 دو نفرشان منفی و ۲۳ نفر باقی مانده با تظاهری نسبتاً ضعیف آنرا بروز داده بودند. این مارکر در گروه های آتیپیک و non-BCLL با شدت بیشتری تظاهر داشت بطوریکه طبق تحلیل آماری اختلاف معنی داری از نظر شدت بروز CD22 بین گروه ها وجود داشت (p=۰/۰۱۷) یعنی این آنتی ژن با شدت کمتری در گروه تیپیک نسبت به سایر گروه ها تظاهر داشت(p=۰/۰۰۵). از لحاظ در صد و یا شدت تظاهر آنتی ژنهای CD19, CD20 تفاوت محسوسی بین بدخیمی های رده B بدست نیامد. مارکر CD23 در همه بیماران موجود در گروه های تیپیک و آتیپیک و در چهار بیمار گروه non-BCLL تظاهر داشت و از بابت در صد و شدت تظاهر آنتی ژن تفاوت معنی داری بین گروه ها مشاهده نگردید(p=۰/۴۳۶ و p=۰/۲۶۱). آنتی ژن CD25 فقط در ۱۲ در صد از گروه تیپیک با درصد و شدت کمی (بترتیب۳۹ ٪ و شدت ٦/۸) بروز داشت. این مارکر در ۵۰٪ گروه non-CLL با درصد و شدت بیشتری تظاهر داشت.از بین بیماران B-CLL تیپیک آزمایش شده ۵۲ درصد و آتیپیک ها ۷۵ درصد و از گروه non-CLL ٦٧ در صدشان CD38 مثبت بودند و از نظر در صد سلولها و شدت تظاهر تفاوت قابل توجهی بین گروه ها مشاهده نگردید (p=۰/۵۷ و p=۰/۹۲۵).

سلولهای همه بیماران مطالعه شده آنتی ژن CD45 را بروز داده و با این حال شدت بروز آن در نزد گروه non-CLL نسبت به گروه تیپیک بیشتر (p=۰/۰۳۴) ولی تفاوتی با گروه آتیپیک نداشتند (p=۰/۱۴۳). تظاهر دیگر مارکر سلول B یعنی FMC7 به ترتیب در ۱۷٪ و ۸۸٪ بیماران تیپیک و گروه non-CLL مثبت و در گروه آتیپیک منفی بود. تفاوت از نظر در صد سلولهای مثبت نا محسوس (p=۰/۱۱۱) و لی از جهت شدت بروز آنتی ژن معنی دار بود (p<۰/۰۵).

٤٣, ۲۹ و ۲۸ درصد بیماران تیپیک به ترتیب: K-/L- , K- K+/L- L+/بودند و این منظره در آتیپیک بصورت ۵۰ درصد (K+) و ۵۰ در صد (L+) و در گروه سوم ۵۰ درصد (K+) و ۱۲/۵ درصد (L+) و ۳۷ درصد (K-/L-) مشاهده شد. شدت تظاهر آنان در گروه non-BCLL بیشتر از دو گروه دیگر بود (p=۰/۰۰۷).

ایمنوگلوبین سطح سلولی IgM در ٧٤ درصد تیپیک ها مثبت و هر چهار بیمار گروه آتیپیک آنرا بروز داده بودند. این چهره در نزد گروه سوم ٦٢/٥ در صد بود. تظاهر این مارکر در non-BCLL ها شدید تر از دو گروه دیگر بود (p=۰/۰۰۲ و p=۰/۰۲۱).

بحث

با توجه به علایم بالینی ومورفولوژی ٥٤ بیمار مبتلا به اختلال لنفوپرولیفراتیومزمن درسه گروه: لوسمی لنفوئیدی مزمن سلول B تیپیک، که درآن سلولهای هدف دارای مورفولوژی کلاسیک بودند؛ لوسمی لنفوئیدی مزمن سلولB غیر تیپیک که درآن هسته سلولهای هدف بصورت شیاردار یا پلاسما سیتوئید بودند و بقیه بیماران بصورت لوسمی لنفوئیدی مزمن غیرB-CLL گروه بندی گردیدند. سلولهای تمام بیماران گروه ۱و۲ ونیز چهار بیماراز گروه ۳ نسبت به CD5 وCD19 مثبت بودند .این یافته درمورد بیماران B-CLL اعم از تیپیک و آتیپیک با یافته دیگران (۵ و ٦) مطابقت دارد. دو بیمار از گروه ۱ نسبت به CD22 منفی بودند ولی بقیه بیماران با اختلال در رده سلولی – B آنتی ژن مذکور را درشدت های مختلفی داشته اند. یعنی شدت تظاهر CD22 در B-CLL تیپیک کمتر از بقیه است (p=۰/۰۱۷) به هر حال هر چند که در مطالعه ای (۱) بعضی از نمونه های B- CLL نسبت به CD19 و CD22 منفی گزارش شده هیچکدام از بیماران مشابه در این مطالعه CD19 منفی نبودند؛ با این حال این یافته حداقل با دوگزارش دیگر (۵و ٦) مطابقت دارد.

1. Hairy Cell Leukemia

جدول ۱. خلاصه ایی از علایم بالینی و آزمایشگاهی گزارش شده در منابع خارجی در بیماران مبتلا به B-CLL و مطالعه حاضر

متغیرها	مقادیر رفرانس شماره ۱ ۹۳ مورد(۱۹)	مقادیررفرانس شماره ۲ ۲۱۸ مورد(۷)	مقادیر مطالعه حاضر
میانه سن (سال)	۶۳/۲	۶۲	۶۵
(طیف)	(۸۵/۳-۲۳)	(۸۳-۲۹)	(۸۷-۳۹)
جنس مذکر : مونث	۲۸:۶۵	۸۳:۱۳۸	۱۴:۲۸
میانه شمارش گلبول سفید به ۱۰۰۰در میکرولیتر	۲۹/۳	۸۳	۳۴/۵
(طیف)	(۳۶۷/۲-۷)	(۶۵۲-۳)	(۴۴۶-۳)
میانه شمارش مطلق لنفوسیت به ۱۰۰۰ در میکرولیتر	۲۲/۴	۷۷	۲۷/۵
(طیف)	(۳۳۶-۳/۴)	(۳۴۰-۶)	(۲۶۲-۱/۳)
میانه مقدار هموگلوبین g/dl	۱۳/۹	۱۲/۵	۱۲/۵
(طیف)	(۱۶/۶-۷/۶)	(۱۷/۴-۴)	(۱۸/۵-۵/۹)
میانه شمارش پلاکت به ۱۰۰۰ در میکرولیتر	۲۰۴	۱۶۰	۱۴۰
(طیف)	(۴۹۵-۸۳)	(۵۴۱-۱۲)	(۴۳۸-۳۸)
Rai stage*			
۰	۴۸	۱۶۰ (۰ تا ۲)	۱۵
۱	۲۳		۶
۲	۱۸		۸
۳	۳	۵۸ (۳ تا ۴)	۳
۴	۱		۱۰
Binet stage*			
A	۷۵	A+B= ۱۶۳	
B	۱۷		
C	۱	۵۵	
لنفادنوپاتی<۲	۲۴	۳-۲ (یا بیشتر)= ۱۱۳	بلی=۲۴

جدول ۲- مارکرهای ایمونولوژیک در ۵۴ بیمار مبتلا به اختلال لنفوپرولیفراتیو مزمن

نمونه	ایمنو فنو تیپ *f*
Typical B-CLL (42)	**CD5+,CD19+**,CD20+,CD22+¶,CD23+,CD25-,CD38+/-,CD45+,CD79b-,CD103-,FMC-7-,**SmIg-/+**
Atypical B-CLL (4)-CLL/PLL(1)	**CD5+,CD19+**,CD20+/CD22+,CD23+,CD25-,CD38+/-,CD45+,CD79b-,CD103-,FMC-7-,SmIg - CD5+,CD19+,CD23+,CD25-,CD38-,CD45+,CD103-,FMC-7+,SmIg+
HCL(2)	CD5-, CD19+, CD20+, CD22+, CD23-, CD25+,CD38-, CD45+,**CD79b+, CD103+, FMC-7+, SmIg +s**
B-NHL(3)	CD5+, CD19+, CD20+, CD22+, CD23+-, CD25-, CD38+, CD45+, **CD79b+**, CD103-, FMC-7-/+, SmIg+ CD5-, CD19+, CD20+, CD22+, CD23-, CD25-, CD38-, CD45+, **CD79b+**, CD103-, FMC-7-, **SmIg+s** CD5+, CD19+, CD20+, CD22+, CD23-, CD25-, CD38+, CD45+, **CD79b+**, CD103-, FMC-7+, **SmIg+s**
B-PLL(1)	CD5+, CD19+, CD20+, CD22+, CD23+, CD25-, CD38+, CD45+, **CD79b+**, CD103-, **FMC-7+, SmIg+s**
ATLL(1)	CD2+, CD3+, CD4+, CD5+, **CD7-**, CD8- CD19-, CD20-, CD22-, CD23-, **CD25+**, CD38+, CD45+, TdT-

* (-): Negative expression, (-/+): dim expression, (+): positive expression, S: bright expression.

f: All B cell cases were CD2-, CD3-, CD7-, CD10-, CD16-, CD56-, CD138-, HLA-DR+ and TdT-.
B cell markers particularly CD22 was dim in typical CLL. 52% of cases with typical CLL, and 75% of cases with atypical CLL had CD38. Also see text.

جدول ۳. مقایسه تظاهر مارکرهای ایمنولوژیک در بیماران مبتلا به B-CLL با سه منبع خارجی

مارکرها	منبع ۶	منبع ۴	منبع ۱	در این مطالعه
SIg	مثبت ضعیف	مثبت ضعیف	مثبت ضعیف	مثبت ضعیف
CD5	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت
CD10	منفی	منفی	منفی	منفی
CD11c	NA	مثبت ضعیف در بعضی موارد	بعضی موارد	بعضی موارد
CD19	مثبت	مثبت	بعضی موارد	مثبت
CD20	مثبت	مثبت ضعیف	بعضی موارد	NA
CD22	NA	منفی	بعضی موارد	در اغلب موارد
CD23	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت
CD25	NA	بعضی موارد	بعضی موارد	در موارد کم
CD38	منفی	NA	منفی	بعضی موارد
CD43	NA	+	NA	+
CD79a	NA	+	NA	NA
CD79b	NA	NA	منفی	منفی
CD103	منفی	منفی	منفی	منفی
FMC-7	منفی یا + ضعیف	NA	بعضی موارد	در موارد کم
HLA-DR	NA	مثبت	مثبت	مثبت

NA : در دسترس نیست یا انجام نشده است.

برابر یافته های محققین مختلف (۱، ۵ و ٦) انتی ژن CD23 علاوه بر B-CLL درسلولهای بعضی از بیماران مبتلا به FL و لوسمی پرولنفوسیتیک سلول B نیز وجود دارد؛ با اینحال در FL سلولها فاقد آنتی ژن CD5 بوده وعلاوه بر مثبت بودن برای CD10، تظاهر شدیدتر ایمنوگلوبین سطح سلولی آنرا از B-CLL متمایز می سازد (۵، ٦). بعضی از بیماران B-PLL دارای آنتی ژنهای CD5 و CD23 هستند؛ با اینحا ل شدید بودن تظاهر آنتی ژنهای CD22 ایمنوگلوبین سطح سلولی و FMC-7 نسبت به B-CLL کمک می کند که B-PLL از B-CLL متمایز گردد (۱).

همه بیماران گروه ۱و۲ وچهار بیمار از گروه ۳ نسبت به CD23 مثبت بودند؛ این یافته درمورد بیماران مبتلا به B-CLL تیپیک و آتیپیک با یافته های سایر محققین (جدول ۱) مطابقت داشته ودر مورد دو بیمار از گروه ۳ بخاطر تظاهر همزمان آنتی ژن های CD5 وCD19 وهمچنین ضعیف بودن تظاهر آنتی ژنهای CD22 وFMC-7 وایمنوگلوبین های سطحی در گروه B-CLL آتیپیک قرار داده می شوند .بروز مارکر CD25 (رسپتور IL-2) فقط در تعداد اندکی(۱۲ درصد) از بیماران مبتلا به B-CLL تیپیک مشاهده گردید. هیچکدام ازبیماران مبتلا به B-CLL آتیپیک آنرا ازخود بروز ندادند و در ۵۰ درصد ازبیماران گروه non B-CLL آنتی ژن CD25 با شدت بیشتری نسبت به بقیه تظاهر داشته است.

شدت بروز CD25 دربین بیماران B-CLL تیپیک درمقایسه با گروه non B-CLL کمتر بوده واین یافته با بیماران گزارش شده در رفرانس شماره ۱ مطابقت دارد. در بین گروه ۳ دو بیمار مبتلا به HCL آنتی ژن CD25 را به مقدار زیاد نسبت به بقیه بیماران بروز داده و دو بیمار دیگر از همین گروه که بعد با توجه به نتایج مارکرها بصورت B-CLL آتیپیک تائید شدند نسبت به CD25 منفی بودند.

همانطوریکه درگزارشات موجود است (۱ و ٦) فقط بعضی از نمونه های B-CLL و B-PLL و LCL آنهم با شدت کم CD25 را درسطح سلولهای خود ظاهر می کنند و همینطور شدت تظاهر CD25 با استناد به منابع مذکور در HCL وATLL بیشتر بوده ومیتواند یک پارامتر قابل توجهی برای تمایز دادن بیماران مختلف بکار گرفته شود.

برخلاف گزارشات قبلی (۱ و ٦) تعداد قابل توجهی از بیماران CLL در این مطالعه CD38 مثبت بودند. این یافته با نتایج مطالعات جدیدتر همآهنگ می باشد (۸، ۹، ۱۰، ۱۱،۱۲، ۱۳، ۱۴)

CD45 بعنوان پان لکوسیت آنتی ژن و با شدت های مختلف درسطح تمامی گلبولهای سفید طبیعی خون ظاهر می شود. درمطالعه حاضر ٢٤ نفر از بیماران مبتلا به B-CLL تیپیک وهمه بیماران B-CLL آتیپیک و پنج بیمار از گروه non B-CLL از نظر درصد و شدت تظاهر آنتی ژن CD45 مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تمامی سلولها در منطقه لنفوسیتهای بالغ قرار دارند. بااین حال همانطوریکه قبلا گزارش نموده ایم (۱۸) در مقایسه با گروه های دیگر CLL تیپیک از CD45 کمتری برخوردار هستند.

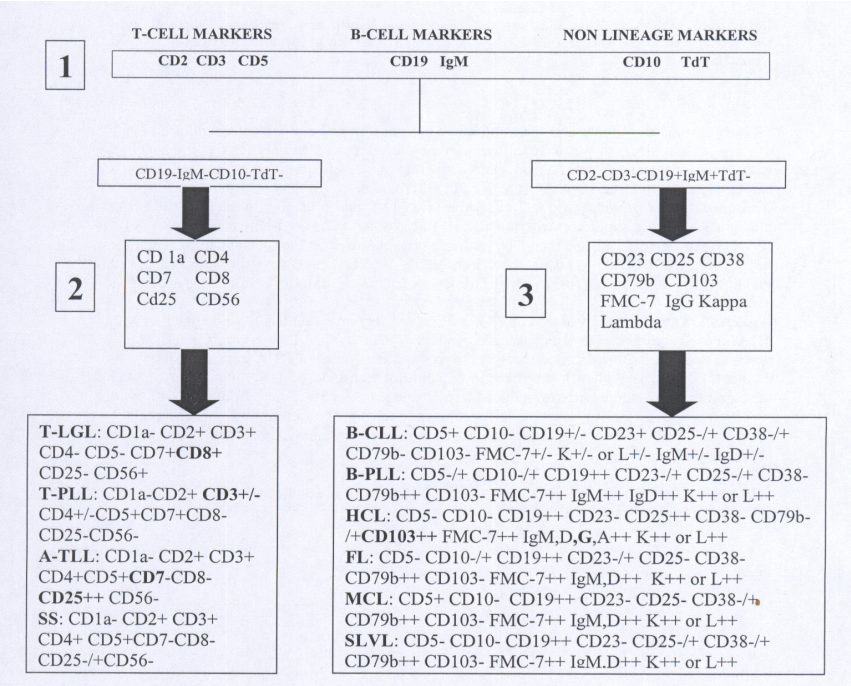
با توجه به مقادیر مختلف بدست آمده هتروژن بودن درصد وشدت بروز بعضی ازآنتی ژنها ازقبیل CD45, CD23, CD19, CD20, CD22, در B-CLL تیپیک را نیز می توان مشاهده نمود. با اینحال هنوز این قبیل سلولها بایستی ازلحاظ وجود و یا عدم وجود اختلال کروموزومی و DNA وRNA وارتباط آنها باهم مورد مطالعه گسترده تری قرارگیرد و همانگونه که وجود ارتباط بین B-CLL آتیپیک و تریزومی کروموزم ۱۲ و اختلال در کروموزوم ۱۳ (۷) گزارش گردیده؛ دلیل ویا دلایل واضحتر و کارگشاتری در ارتباط با ایمنوفنوتیپ برای هتروژن بودن B-CLL بدست آید.

بروز FMC-7 دراکثر بیماران مبتلا به B-CLL اعم از تیپیک وآتیپیک منفی بود فقط ۱۷ درصد از B-CLL های تیپیک آنهم باشدت کمتری نسبت به non-B-CLL آنرا بیان داشته اند (p=<۰/۰۵) بنابراین یافته های ما یافته های سایر محققین (۱، ٦) را تا ئید و می توان ازآن بعنوان مارکر افتراق دهنده B-CLL از موارد non-B-CLL استفاده نمود.

به استناد حداقل دو گزارش (۱ و۵) آنتی ژنCD11c دربعضی از بیماران مبتلا به B-CLL؛B-PLL؛LCL بصورت ضعیف مثبت گزارش گردیده درحالیکه این آنتی ژن درسلولهای HCL بشدت تظاهر دارد. در حدود ۵۲ درصد ازبیماران گروه B-CLL دراین مطالعه مارکر CD11c را درسلولهای خویش بیان و درمقایسه با شدت بروز آن درنزد بیمار مبتلا به HCL با اختلاف معنی داری کمتر بوده (p=۰/۰۰۸) و لذا با یافته های دو گزارش مذکور مطابقت دارد. مطابق رفرانسهای (۱، ۲ ، ۵، ٦) شدت تظاهر زنجیره های سبک وسنگین ایمنوگلوبین ها در نزد گروه بیماران B-CLL تیپیک و B-CLL آتیپیک با اختلاف معنی داری کمتر از تظاهر آنها در گروه non-CLL (p=۰/۰۲۱ و p=۰/۰۰۲) بود.

نتیجه گیری

در هیچکدام از اختلالات لنفوپرولیفراتیو مزمن سلول B به استثناً CD5 مارکرهای ایمنولوژیک مربوط به سلول T تظاهر ندارد. شدت وتظاهر نابجای CD5 در B-CLL کمتر از شدت تظاهر آن درسلولهای-CD5+/CD19 که بنظر می رسد با قیمانده سلولهای T طبیعی باشند است. همه بیماران B-CLL مارکرهای عمومی سلول B یعنی CD19, CD20, CD22 را باشدت کمی نسبت به سایر اختلالات درسطح خود بیان می دارند و برخلاف بعضی منابع فقط درصد خیلی اندکی ازاین بیماران CD22 منفی هستند. در همین گروه ازبیماران سایر مارکرهای مختلف لنفوئیدی همانند یافته های سایر کشورها بود. هر چند تفاوت اندکی در بعضی از پارامترهای مربوط به بیماران مورد مطالعه با منابع غربی مشاهده می شود با اینحال بیماران زیادی بایستی مورد مطالعه قرار گیرند.



شکل شماره ۱: پانلهای پیشنهادی برای ایمنو فنوتایپ اختلالات لنفوپرولیفراتیو مزمن:
۱ – پانل عمومی، ۲ – پانل مخصوص اختلالات رده سلولی – T، ۳ – پانل مخصوص رده سلولی– B
–منفی –/+ مثبت ضعیف ++ مثبت قوی
+/– مثبت در بعضی از بیماران
حروف پر رنگ: بیانگر اختصاصیت است.
بروز همزمان CD4,CD8 در ۲۰٪ T-PLL ها و بندرت در SS,ATLL و بعضی T-NHL ممکن است اتفاق بیفتد

پیشنهادات

همانطوریکه در شکل شماره ۱ نشان داده شده؛ بمنظور استفاده بهینه از معرفها که از طریق واردات تامین می شوند؛ بر اساس رده سلول؛ سه نوع پانل از آنتی بادیها طراحی و پیشنهاد گردیده است: پانل شماره یک، مجموعه ای از آنتی بادیهاست که درمرحله اول برای همه بیماران جدید مبتلا به اختلالات لنفو پرولیفراتیو مزمن بکار برده شوند. این پانل کمک می کند تا اولا رده سلولی سلولهای هدف مشخص گردد؛ ثانیا ضمن تائید بلوغ سلولی با آگاهی قبلی و بدون استفاده از معرفهای غیر ضروری که هزینه آزمایش را بالا می برد پانل بعدی که فرایند ایمنوفنوتیپ را تکمیل خواهد نمود روی سلولها اعمال گردد. پانل شماره ۲، جهت تعیین هویت سلولهای T و NK در اختلالات لنفوپرولیفراتیو مزمن نوع T مورد استفاده قرارگیرد؛ در مورد NK چنانچه CD3 منفی و CD56 مثبت باشد با استفاده از آنتی بادیهای معرف وضد CD57 که برروی سلول NK تظاهر می نماید هویت سلول تعیین و تشخیص بطرف NK- LGL[1] سوق داده می شود. پانل شماره ۳ جهت تعین هویت سلولهای -B در اختلالات لنفو پرولیفراتیو مزمن نوع B می باشد. علیرغم یکنواخت بودن مورفولوژی سلول در B-CLL تیپیک؛ مارکرها درشدت های متفاوتی دراین گروه از بیماریها مشاهده می شود؛ بنابراین پیشنهاد می گردد که در مطالعات بعدی روشهای سیتوژنتیک معمولی و FISH و مولکولار بیولوژی نیز اعمال گردد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از آقای دکتر کامران صداقت به بخاطر کمک در تجزیه وتحلیل آماری داده ها واز پرسنل محترم آزمایشگاه مخصوصا آقای محمد حسین مقد سی کارشناس ارشد که درمراحلی از آزمایشات فلو سیتومتری همکاری داشته اند و از سرکار خانم دکتر رویا دولتخواه به منظور ویراستاری و کادر محترم پرستاری درمانگاه و پرسنل محترم کتابخانه مرکز آموزش ودرمانی شهید قاضی طباطبایی مخصوصا خانم رسولیان بخاطر تهیه مقالات مورد نیاز و از آقای سید مصطفی حدودی و خانم زارعی بخاطر تایپ صمیمانه سپاسگزاری و تشکر مینماید.

References

1. Catovsky D. Chronic lymphoid leukemia, In: Hoffbrand et al ed. *Postgraduate Hematology*, forth edition. Oxford Butlerworth-Heinmann international edition. 1999; PP: 405-433.
2. Jennings CD, Kenneth AF. Recent advances in flow cytometry application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood* 1997; **90**, (8): 2863-2892.
3. Bennett JM, Catovsky D, Daniel T-M, Flandrin G, Galton DAG, Gralnjck HR, et al. Proposals for the classification of chronic(mature)B and T lymphoid leukaemias. Chronic Lymphoid Leukemia. *J Clin Pathol* 1989; **42**: 567-584.
4. Maljaie SH, Brito-Babapulle V, Matutes E, Hiorns LR, De Schouwer PJJC, and Catovsky D. Expression of c-myc oncoprotein in T-cell Leukemias. *Leukaemia* 1995; **9**: 1694-1699.
5. Jennings CD, Kenneth AF, Flow Cytometry: Recent advances in diagnosis and monitoring of leukemia. *Cancer Investigation* 1997; **15**(4): 384-399.
6. Serke S. Multiparameter flow cytometry. In: Huhn D, ed. New Diagnostic Methods in oncology and hematology. 1 st ed. Belin Heidelberg, Springer Verlag, 1998, pages: 39-80.
7. Matutes E, Oscier D, Garcia-Marco J, Ellis J, Copplestone A, Gillingham R, et al. Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology: correlation between cytogenetic, clinical and laboratory features in 544 patients, *British Journal of Haematology* 1996; **22**: 382- 388.
8. Ibrahim Sh, Keating M, Do KA, O' Brien S, Huh YO, Jilani I, et al. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic Lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; **98**(1): 181-186
9. Ibrahim Sh, Jialani I, O' Brien S, Rogers A, Manshouri T, Giles F, et al. Clinical relevance of the CD31 ligand for CD38 in patients with B-CLL chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2003; **97**(8): 1914-1919.
10. Mainou – Fowler T, Dignum H, Taylor RAP, Dickinson MA, Saunders WGP, et al. Quantification improves the prognostic value of CD38 expression in B-cell chronic lymphoeytic leukaemia. *British Journal of Hematology* 2002; 118: 755-761.
11. Montserrat E. Classical and new prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia: where to now? , *Hematology* 2002; **3**: 7-9.
12. Hsi ED, Kopecky KJ, Appelbaum FR, Boldt D, Frey T, Loftus M, et al Prognostic significance of CD38 and CD20 expression as assessed by quantitative flow cytometry in chronic lymphocytic leukaemia, *Br J Haemato* 2003; **120**(6): 1017-25.
13. Hamblin JT, Orchard AJ, Ibbotson ER, Davis Z, Thomas WP, Stevenson KF et al. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood* 2002; **99** (3): 1023-1029.
14. Rajendran ND, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen LS, et al. IgV gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in

1. Natural Killer-Large Granular Lymphocyte

chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; **94**(6): 1840 - 1847.

15. Yuille RM, Matutes E, Marssoy A, Hilditch B, Catovsky D, Houlston RS. Familial chronic lymphocytic leukaemia: a survey and review of published studies. *British Juornal of Hematology* 2000; **109**: 794-799.
16. Rawstron CA, Yuille MR, Fuller J, Cullen M, Kennedy B, Richard S, et al. Inherited predisposition to CLL is detectable as subclinical monoclonal B-lymphocyte expansion. *Blood* 2002; **100**(7): 2289-2291
17. Rawstron CA, Green JM, Kuzmicki A, Kennedy B. Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of indolent chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts. *Blood* 2002; **100**(2): 635-639.
18. Maljaei SH, Asvadi I, Eivazi J, Nikanfar A, Vaez J. Usefulness of CD 45 density in the diagnosis of B-cell chronic lymphoproliferative disorders *Indian J Med Sci* 2005; **59**(5): 187-94