Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 20:51 IRST on Thursday December 5th 2019

مجله دانشکده پزشکی تهران
فروردین و اردیبهشت ـ ۱۳۶۶ صفحه ۱

مطالعه پذیرنده های ایمونوگلولینی در لنفوسیتهای بیماران مبتلا به لوسمی لنفاوی مزمن[1] و HCL[2] CLL

دکتر احمد مسعود*ـ دکتر زهرا زوین*

در خون محیطی تعداد زیادی از بیمارانی که مبتلا به لوسمی لنفاوی مزمن میباشند مقدار لنفوسیتهای B افزایش پیدامیکنند (۳) تعدادی از بیماران فوق در حالیکه احتمالا" عوارضی غیر از ابتلاء خونی داشته و یا حتی عارضه خاصی ندارند وقتی جهت بررسی خون محیطی به آزمایشگاه مراجعه میکنند شناسائی میشوند . با اینحال این نوع بیماران بدون عارضه (Asymptomatic) احتمالا" بر اثر مسائل دیگر فوت نموده و آنها که سریعا" با پیشرفت لوسمی لنفاوی مزمن همراه هستند احتمالا" بر اثر همین عارضه طی چند ماه پس از تشخیص فوت می‌کنند (۳) . با اینحال شناخت بموقع سلولهای لوسمیک امکان مداوای نسبی را خواهد داد ویکی از مهمترین راه تشخیص بیماران مبتلا به لوسمی لنفاوی مزمن استفاده از پذیرنده های ایمونوگلولینی در لنفوسیت هاست (۱۸) . در واقع مطالعات جدید مشخص ساخته است که سلولهای B دراین بیماران حامل شاخص های ایدیوتیپیک ایمنوگلولینی یکسانی هستند (۱۹). با مطالعه پذیرنده‌های سطحی ایمونوگلولینی(Surface Markers of IgS) چه زنجیره های سبک وچه زنجیره های سنگین قادر به تفکیک این نوع سلولها از سلولهای لنفاوی طبیعی خواهیم بود (۱۳) . از طرف دیگر بیماران مبتلا به (HCL) بخاطر مزمن بودن بیماری ، پان سیتوپینیا (Pancytopenia) و بزرگی وسیع طحال بدون اینکه همراه تورم غدد لنفاوی باشند باز شناخته میشوند (۱۲، ۱۴) . این نوع سلولها در خون محیطی ، مغز استخوان ، طحال و کبد وجود دارند . از نظر سیتوشیمیائی سلولهای مزبور به تارترات اسید ـ فسفاتاز مقاوم و فاقد لیزوزوم میباشند و ضمن بررسی بکمک میکروسکوپ الکترونیک نیز حامل گرانولهای خاصی هستند . HCL ممکن است بصورت هتروژن (ناهمگن) از سلولهای مونوسیتی ، هیستیوسیتی ، لنفوسیتی و یاهیبریدی از هیستیوسیت و لنفوسیت باشد (۱۲) . مطالعات جدید بر

* ـ گروه میکربشناسی و ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران .

1- Chronic lymphocytic leukemia (CLL)

2- Hairy Cell leukemia (HCL)

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 20:51 IRST on Thursday December 5th 2019

روی پذیرنده های ایمونوگلولینی این نوع سلولهای لوسمیک نیز اطلاعات جالبی در اختیار محققین قرار داده است .

در بررسی ما سلولهای لنفاوی خون محیطی ۱۴ بیمار مبتلا به CLL و ۵ بیمار نوع HCL مورد مطالعه قرار گرفته‌اند .

بیماران و مواد لازم :

۱ـ افراد طبیعی : تعداد ۶۲ نفر از افراد معمولی که دارای فونکسیون بیولوژیک طبیعی بدون هیچگونه سابقه بیماری بودند انتخاب و مورد آزمایش قرار گرفتند . از این تعداد ۴۲ نفر زن بودند . سن متوسط این افراد ۴۴ سال بود .

۲ـ CLL : تعداد ۱۴ بیماری که ۵ نفرشان زن و ۹ نفرشان مرد بودند مطالعه گردیدند سن متوسط این بیماران ۴۷ سال بوده است . افراد فوق در زمان مطالعه بعنوان بیمار ان لوسمیائی به بخش خون مجتمع امام خمینی مراجعه نموده‌اند .

۳ـ HCL : تعداد ۵ بیمار که دو نفرشان زن و ۳ نفرشان مرد بودند مورد بررسی قرار گرفتند سن متوسط بیماران مزبور ۴۲ سال بوده است . بیماران فوق نیز از بخش خون مجتمع امام خمینی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند .

۴ـ تهیه لنفوسیت از خون محیطی : مقدار ۱۰ ml خون محیطی را در لوله‌ای که‌محتوی ۱۵۰ واحد برای هر میلی‌لیتر ضدانعقاد مثلا "هپارین است ریخته و سپس بکمک روش فایکول هایپاک سلولهای لنفوسیتی خون محیطی راجدا مینمایند (۲۱) . سلولها را حداقل ۳ بار با یک محلول مثل Tc ۱۹۹ (دیفکو) شست و شو داده و سپس جهت بررسی پذیرنده های ایمونوگلولینی مورد استفاده قرار میدهند .

۵ ـ بررسی پذیرنده‌های ایمونوگلولینی سلولهای لنفاوی خون محیطی :

برای اینکار از آنتی سرمهای کونژوگه مونواسپسیفیک وپلی ـ والان استفاده میکنیم . سلولهای لنفوسیتی (5×10^6 در میلی لیتر) را همراه با رقت مناسب از آنتی سرم کنژوگه بمدت نیم ساعت در حضور سرم گوساله غیر فعال شده براثر حرارت (Heat inactivated Fetal Calf Serum) قرار داده و سپس سه بارآنرا شسته آماده مطالعه مینمائیم . درصد سلولهای لنفوسیتی که حامل پذیرنده های ایمونو ـ گلولینی میباشند بوسیله میکروسکوپ فلورسان تشخیص داده میشوند .

۶ ـ تاثیر نورآمینیداز بر روی سلولهای لنفوسیتی :

تعداد 1×10^6 سلول لنفوسیتی در هر میلی متر مکعب رادر حضور محلول Hank's Buffer Sulfate Solution یا HBSS با ۱۰۰ میکرولیتر نورآمینیداز که از کلستریدیوم پرفرژنس Lastridium Perfringary نوع VI بدست آمده است بمدت یکساعت قرار میدهیم . در انتهای انکوباسیون سلولها را مخلوط نموده و سه بار با محلول HBSS شسته و آنرا به حجم اولیه میرسانیم . زنده بودن سلولهارا بکمک تستهای حیاتی لازم مثل بلو تریپان بررسی نموده سپس برای مطالعه پذیرنده های ایمونوگلولینی آنها را آماده میکنیم .

نتایج :

۱ـ درصد لنفوسیتهای B حامل پذیرنده ایمونو ـ گلولینی در افراد طبیعی و بیماران مبتلا به CLL و HCL قبل از تماس سلولهای فوق با نورآمینیداز در جدول شماره یک مشخص گردیده است . بطوریکه ملاحظه میگردد درصد سلولهای حامل پذیرنده های ایمونوگلولینی سطحی از نوع IgM و IgD در بیماران مبتلا به CLL اختلاف فاحشی در مقایسه با سلولهای فوق در افراد طبیعی نشان میدهد واین اختلاف از نظر آماری در هر دو مورد فوق قابل توجیه میباشد ($P<0.05$) . این اختلاف در HCL وجود ندارد .

۲ـ درصد لنفوسیتهای B حامل پذیرنده ایمونوگلولینی درافراد طبیعی و بیماران مبتلا به CLL و HCL بعد ازتماس سلولهای لنفوسیتی بانورآمینیداز در جدول شماره ۲ مشخص گردیده است . بطوریکه ملاحظه میگردد لنفوسیتهای B حامل پذیرنده های سطحی از نوع IgM و IgD در بیماران مبتلا به لوسمی لنفاوی مزمن درمقایسه با سلولهای فوق قبل ازتماس با نورآمینیداز اختلاف چشم گیری پیدا ننموده است وفقط این اختلاف زمانیکه ازآنتی سرم کونژوگه پلی والان استفاده شده چشم گیر بوده و ازنظر آماری قابل توجیه است ($P<0.05$) . در ضمن اختلاف فوق در سلولهای حاصل از بیماران HCL ملاحظه نمیشود .

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 20:51 IRST on Thursday December 5th 2019

بحـــــث :

لنفوسیتهای Bرامیتوان از طریق ایمونوگلولین های سطحی ،پذیرنده هائی برای اجزاء سوم و چهارم کمپلمـــان پذیرنده FC ایمونوگلولین G، پذیرنده‌برای ویروس EBوتشکیل روزت موش تشخیص داد .

در واقع بنظر میرسد که لنفوسیتهای Bحامل‌مقادیر متنابهی پذیرنده های ایمونوگلولینی باشند این پذیرنده‌ها وقتی که بر روی لنفوسیتها قراردارند متحرکند (۹) . ازطرف دیگر پذیرنده‌های ایمونوگلولینی وسیله مناسبی بـــرای رده بندی لنفوسیتهای B هستند (۵،۲،۱) در واقع تعـــداد زیادی ایمونوگلولین بر روی سطح سلول Bتشخیص داده شده است (۱/۸) میتوان گفت که‌حدود ۱۰۰۰۰۰ پذیرنـــــده ایمونوگلولینی بر روی لنفوسیتهای Bقرار دارنـــد (۱۰) . پذیرنده های ایمونوگلولینی ازمنطقه سوم قسمت ثابت بـــه سطح لنفوسیت ها چسبیده‌اند و بخش Fab آزاد است . اما این نکته رانیز باید در نظر داشت که در بعضی شرایط وقتی ایمونوگلولین ها هنوز از لنفوسیتهای Bترشح نشده‌انـــد سلولهای مزبور قادر به ثبوت مقداری ایمونوگلولین هـــای سیتوفیلی بخود هستند (۱۱) برای تشخیص پذیرنده های ایمونوگلولینی میتوان‌از روش ایمونوفلوئرسانس با کمک‌آنتی سرم و لنفوسیتهای زنده استفاده نمود (۵) . آنتی ســـرم ممکن است برعلیه خود ایمنوگلولین یا زنجیره سنگین و یـا زنجیره سبک باشد . با این روش حدود ۱۰٪ از لنفوسیتهای خون محیطی حامل پذیرنده های ایمونوگلولینی هستنـــد . بنظر میرسد در بین ایمونوگلولین‌ها IgM بیش از همه‌برروی لنفوسیتها باشد یعنی حدود ۸۰٪ از ایمونوگلولین هـــای سطح سلول Bرا تشکیل میدهند . درمورد IgM گزارشهـای متعددی در دست است ، با اینحال قسمت اعظم IgG هاجزء ایمونوگلولینهای سیتوفیلی بوده و تشکیل FC رسپتـــور را میدهند اما از خود سلول ساخته نشده‌اند . IgA حـــدود ۲ــ۱٪ ایمونوگلولین سطح سلولی را تشکیل میدهد . امـــا تحقیقات جدید نشان میدهد که IgD بر روی حدود ۱۵٪ از لنفوسیتهای خون نافی انسان و ۶٪ از لنفوسیتهای خـــون محیطی در انسان بالغ قرار دارد و مشخص شده که درغالب موارد IgD همراه IgM قرار دارند . این ایمونوگلوبولین هـا بوسیله خود سلول ساخته شده و بطریق غیر فعـــال بـه لنفوسیتها نچسبیده‌اند (۲۲/۱۵) .

در مورد گروههای فرعی IgG باید گفت که IgG_2 در بیشتر موارد ملاحظه میشود ۲ تا ۵ درصد IgG جزء IgG_1 بوده و بعداز آن IgG_3 و IgG_4 قرار دارند (۲۲) .

در مطالعات مامشخص شد که بیماران مبتلا بـــه لوسمی لنفاوی مزمن درخون خود دارای تعداد زیادی از لنفوسیتهای حامل پذیرنده های ایمونوگلولینی سطحـــی میباشند . یافته های فوق مطابق نتایجی است که محققیـن دیگر در اینمورد بدست آورده‌اند = (۴ ــ ۱۹) همانطور که گفته شد پذیرنده های سطحی نوع IgM غالبا " با نوع IgD دیده میشود و نتایج بدست آمده این نظر را تائید مینماید که در بیماری CLL افزایش یک ستون سلولی Bوجود دارد با اینحال این موضوع‌آخرین نتایج بدست آمده نخواهد بود . برخی ازمحققین ضمن استفاده ازآنتی سرمهای ایدیوتیپیک توانسته‌اند مسئله مونوکلونال بودن‌ستون سلولی Bرا در بیماری لوسمی لنفاوی مزمن مشخص کنند در حالیکه ایـــن نکته در HCL بدلیل هتروژن بودن نوع سلول ایجاد کننده بیماری مشاهده نمیشود (۱۹) و (۱۴) و تقریبا " تنها راه تفکیک سلولهای لنفوسیتی در لوسمی لنفاوی مزمن از HCL استفاده‌از روشهای فاگوسیتوزی‌ذرات گرانوله‌توسط سلولهای اخیر میباشد در حالیکه سلولهای B در CLL فاقد قـــدرت مزبور است (۱۴ و ۶) با اینحال مطالعات متعدد دربیماران مبتلا به لوسمی لنفاوی مزمن یک نوع هیپوگاما گلوبولنمی را نشان میدهدو درعین حال هیچ‌نوع آنتی بادی مونوکلونال در سرمشان تشخیص داده نشده است . و در واقع میتـــوان گفت که در بیماران مزبور بدلیل عدم امکان تمایزسلولهای B و تبدیلشان به سلولهای تولید کننده ایمونوگلوبولین و انباشته شدن‌آنها بصورت سلول لنفاوی اولیه احتمالا " بصورت تاثیر Feed Back قادر به جلوگیری از عملکـرد لنفوسیتهای B طبیعی خواهد شد (۱۷ و ۱۲) . با اینحال میتوان گفت‌که عدم یکنواختی خاصی در تکامل و عملکـرد سلولهای B در بیماران مبتلا به لوسمی لنفاوی مزمن‌مشاهده میشود . از طرف دیگر تماس سلولهای لوسمیک با نـــور آمینیداز هیچگونه تغییری در مشخص تر شدن پذیرنده‌های ایمونوگلولینی ایجاد نمینمایند . در اینجا این سئوال‌مطرح میشود که آیا پذیرنده های IgM و IgD بر روی سلولهـــای B در لوسمی لنفاوی مزمن حامل یک خصوصیت میباشنـــد . مطالعات‌متعدد ضمن بکارگیری آنتی‌سرمهای آنتی‌ایدیوتیپ

کونژوگه ضد IgM و IgDمشخص ساخته که دو ایمونوگلولین فوق حامل یک‌نوع بخش متغیر بوده وبنابراین از یک خصوصیت مشترک آنتی بادی برخوردارند با اینحال لازم است مطالعات دیگری صورت گیرد تا افزایش این دوپذیرنده ایمونوگلولین را بر روی لنفوسیتهای B در لوسمی لنفاوی مزمن نشان دهد .

۱ــ بررسی پذیرنده های ایمونوگلولینی فقط در لوسمی لنفاوی مزمن نوع لنفوسیت B انجام گرفته است و درصد مختصری از این نوع لوسمی از نوع لنفوسیتهای T میباشند که در تحقیق فوق قرار نداشته اند .

۲ــ از بخش هماتولوژی بیمارستان ولی عصر و مخصوصا " آقای دکتر زمانیان پور بخاطر همکاریهای صمیمانه ایشان در ارسال بیماران تشکر میکنیم .

جدول شماره ۱ ــ درصد پذیرنده های ایمونوگلولینی بر روی لنفوسیت های افراد طبیعی و بیماران مبتلا به CLL و HCL قبل از تماس تیمار تومور آمینداز

مورد	پذیرنده سطحی IgG	پذیرنده سطحی IgM	پذیرنده سطحی IgA	پذیرنده سطحی IgD	پذیرنده سطحی پلی والان	SMIg زنجیره کاپا	زنجیره لامدا
افراد طبیعی	۱۱° (۹ – ۱۳)*	۴ (۱ – ۵)	۲ (۱ – ۲)	۵ (۱ – ۵)	۱۶ (۱۳ – ۱۹)	۶ (۴ – ۸)	۸ (۸ – ۱۰)
CLL	۱۷ (۵ – ۲۰)	۱۸ (۶ – ۴۵)	۶ (۴ – ۱۰)	۱۱ (۳ – ۳۸)	۲۸ (۹ – ۸۲)	۴ (۱ – ۴)	۶ (۵ – ۶)
HCL	۶ (۵ – ۷)	۳/۵ (۳ – ۵)	۱/۵ (۱ – ۳)	۲ (۲ – ۳)	۱۵ (۱۰ – ۲۲)	۴ (۳ – ۷)	۵ (۴ – ۱۰)

° = میانگین

* = Range

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 20:51 IRST on Thursday December 5th 2019

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 20:51 IRST on Thursday December 5th 2019

جدول شماره ۲ – درصد پذیرنده های ایمونوگلولینی بر روی لنفوسیت های افراد سالم و بیماران مبتلا به CLL و HCL بعد از تاءثیر نور آمینداز

مورد	پذیرنده سطحی IgG	پذیرنده سطحی IgM	پذیرنده سطحی IgA	پذیرنده سطحی IgD	پذیرنده سطحی پلی والان	SMIg زنجیره کاپا	زنجیره لاندا
افراد طبیعی	۱۲° (۱۰ – ۱۴)*	۱۵ (۱۲ – ۱۸)	۶ (۴ – ۱۰)	۵ (۱ – ۵)	۳۵ (۱۸ – ۴۹)	۶ (۴ – ۸)	۸ (۵ – ۱۰)
لوسمی لنفاوی مزمن CLL	۱۵ (۸ – ۳۰)	۱۹ (۶ – ۳۲)	۱۱ (۴ – ۲۰)	۱۴ (۴ – ۲۶)	۴۶ (۳۰ – ۸۶)	۵ (۳ – ۸)	۱۰ (۵ – ۱۴)
HCL	۱۰ (۹ – ۱۱)	۶ (۵ – ۷)	۲/۵ (۲ – ۳)	۲ (۱ – ۳)	۱۸ (۱۰ – ۲۲)	۵ (۴ – ۷)	۷ (۶ – ۱۰)

° = میانگین

* = Range

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 20:51 IRST on Thursday December 5th 2019

REFERENCES

1- Abdou, M.I. and Abdou, N.L.
Immunoglobulin receptors on human leukocytes.
Clin.exp. Immunol. 13: 45-54, 1973.

2- Andres, T.L, Kadin, M.E.
Immunologic markers in the differential diagnosis of small round cell tumors from lymphocytic Lymphoma and Leukemia. Am J Clin Pathol.79 (5): 546-52, 1983.

3- Belpomme, D, Lelarge, N, Joseph, R. and Mathe,G.
An Immunological classification of leukemias and Non Hodgkin,s hematosarcomas Based on T and B cell Membrane markers with special reference to Null Cell desorders .
Europ.J.Cancer, 13: 311-Ia, 1977.

4- Ellen, S, Bianco, C; Nussenzweig, V. and uhr, J.W.
Cell seuface Immunoglobulin.
J. Exp. Medicin, 136: 81-93, 1972.

5- Foon, K.A.
Surface markers on leukemia and lymphoma cell, Recent advances.
Blood. 60(1): I-I9, 1982.

6- Fu, S.M., Winchester, R.J., Rai, K.R. and Kunkel, H.G,
Hairy cell leukemia proliferation of a cell with Phagocytic and B-Lymphocytic and B-lymphocyte properties Scand,J, Immunol.,3:847-51, 1974.

7- Gupta. S.
Cell surface markers of human T and B lymphocytes New York Journal of medicin, 16(I):24-31, 1976.

8- Jondal, M., Hulm, G. and wigzell, H.
Surface Markers on human T and B Iymphecytes J.Exp.med. 136: 207-15, 1972.

9- Jondal, M., klein, G., oldstone, M.B.A., Bokish,V. and yefenof, E.
Swface markers on human B and T lymphocytes Scad. J.Immunol., 5: 401, 1976.

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 20:51 IRST on Thursday December 5th 2019

10-Jondal, M. and Klein. G,
Surface Markers on human B and T lymphocytes J.Exp. Medicine, 138: 1365-1378, 1973.

11-Natvig, J.B., Froland, S-S.,
Surface bound Immunoglobulin on B lymphocytes Ann. Immunol. 125 C: 281-286, 1974.

12- Matre. R, Talstad. I, and Haugen A.
Surface markers in non-phagocytic Hairy cell Leukemia. Acta,Path. Microbiol. Scand, 85: 406-12, 1977.

13- Minowada, J. Markers profiles on human leukemia and lyuphoma Cell lines. J.cancer, Res.Clin.Oncol. 101(9): 91-100, 1981.

14- Moorl, N. Ultrastructural localization of Immunoglobulin in Hairy cell leukemia.
Hum. Pathol. 15(11): 1042-7. 1984.

15- ORR, K.B. and Parakevas, F.
Cell surface associated Gamma-globulin in lymphocytes The. J. Immunol 110(2): 456-64, 1976.

16- Pepys, M.B., Sategna, G.C. and Mir jah, D.D.
Enumeration of Immunoglobulin bearing lymphocytes in Whole peripheral. blood. Clin. Exp. Immunol. 26: 91-4, 1976.

17- Preud, homme, J.L.
Lymphocyte markers in human leukemias and Lymphomas methodologic remarks Semin, Hematol, 21(4): 296-301, 1984.

18- Rudders. R.A. Woward.J.P.
Clinical and cell surface marker characterization of the Early phase of chronic lymphocytic leukemia Blood. 52(I): 25-35, 1976.

19- Salsano, S, Frolands.S, Natvig.J.B, Michaelsen T.E. Same Idiotype of B-lymphocyte membran IgD and IgM. Formal evidence for monoclonality of chronic Lynphocytic lerkemia cells.
Scand. J.Immunol.3; 841-46, 1974.

20- Slease, R.B.
Surface Immunoglobulin density on human Peuipheral blood mononuclear cells Blood. 54(1)72-87, 1979.

21- Yamamura. M,
Standardization of lymphocyte Transfomation test To PHA
Clin. exp. Immunol. 4: 457-61, 1973.

22- Yefnof, E., Klein, G., Jondal, M., and Olstone, M.
Surface Markers on human T and B Lymphocytes Int. J. Cancer, 17: 693-700, 1976.

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 20:51 IRST on Thursday December 5th 2019