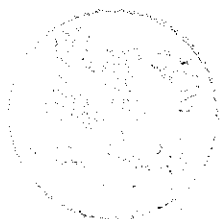


مطالعه پذیرنده های ایمنوگلوبولینی در لنفوسیت های بیماران مبتلا به لوسمی
لنفوای مزمن^۱ و HCL^۲ CLL

دکتر احمد مسعود* - دکتر زهرا زویسن*



ایمنوگلوبولینی یکسانی هستند (۱۹). با مطالعه پذیرنده های سطحی ایمنوگلوبولینی (Surface Markers of IgS) چه زنجیره های سبک و چه زنجیره های سنگین قادر به تفکیک این نوع سلولها از سلولهای لنفوی 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 لنفوی باشند باز شناخته میشوند (۱۲، ۱۴). این نوع سلولها در خون محیطی، مغز استخوان، طحال و کبد وجود دارند. از نظر سیتوشیمیایی سلولهای مزبور به تارترات اسید 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، هیستوسیتی، لنفوسیتی و یا هیبریدی از هیستوسیت و لنفوسیت باشد (۱۲). مطالعات جدید بر

در خون محیطی تعداد زیادی از بیمارانی که مبتلا به لوسمی لنفوی مزمن میباشند مقدار لنفوسیت های B افزایش پیدا میکنند (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 سریعاً با پیشرفت لوسمی لنفوی مزمن همراه هستند احتمالا بر اثر همین عارضه طی چند ماه پس از تشخیص فوت می کنند (۳). با اینحال شناخت بموقع سلولهای لوسمیک امکان مداوای نسبی را خواهد داد و یکی از مهمترین راه تشخیص بیماران مبتلا به لوسمی لنفوی مزمن استفاده از پذیرنده های ایمنوگلوبولینی در لنفوسیت هاست (۱۸). در واقع مطالعات جدید مشخص ساخته است که سلولهای B در این بیماران حامل شاخص های ایدیوتیپیک

* - گروه میکربشناسی و ایمنولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران.

1- Chronic lymphocytic leukemia (CLL)

2- Hairy Cell leukemia (HCL)

گلولینی میباشند بوسیله میکروسکوپ فلورسان تشخیص داده میشوند .

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

نتایج:

۱- درصد لنفوسیتهای B حامل پذیرنده ایمنو-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 ایمنوگلولینی سطحی از نوع Igm و IgD در بیماران مبتلا به CLL اختلاف فاحشی در مقایسه با سلولهای فوق در افراد طبیعی نشان میدهد و این اختلاف از نظر آماری در هر دو مورد فوق قابل توجیه میباشد (P < 0.05) . این اختلاف در HCL وجود ندارد .

۲- درصد لنفوسیتهای B حامل پذیرنده ایمنوگلولینی در افراد طبیعی و بیماران مبتلا به CLL و HCL بعد از تماس سلولهای لنفوسیتی با نورآمینیداز 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 در مقایسه با سلولهای فوق قبل از تماس با نورآمینیداز اختلاف چشم گیری پیدا ننموده است و فقط این اختلاف زمانیکه از آنتی سرم کونژوگه پلی والان استفاده شده چشم گیر بوده و از نظر آماری قابل توجیه است (P < 0.05) . در ضمن اختلاف فوق در سلولهای حاصل از بیماران HCL ملاحظه نمیشود .

روی پذیرنده های ایمنوگلولینی 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 گرفته اند .

بیماران و مواد لازم:

۱- 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 .

۲- 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 نموده اند .

۳- 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 گرفته اند .

۴- تهیه لنفوسیت از خون محیطی: مقدار ۱۰ ml خون محیطی را در لوله ای که محتوی ۱۵۰ واحد برای هر میلی لیتر ضد انعقاد مثلا "هپارین است ریخته و سپس بکمک روش فایکول هایپاک سلولهای لنفوسیتی خون محیطی را جدا مینمایند (۲۱) . سلولها را حداقل ۳ بار با یک محلول مثل Tc ۱۹۹ (دیفکو) شست و شو داده و سپس جهت بررسی پذیرنده های ایمنوگلولینی مورد استفاده قرار میدهند .

۵- بررسی پذیرنده های ایمنوگلولینی سلولهای لنفاوی خون محیطی:
برای اینکار از آنتی سرمهای کونژوگه مونواسپسیفیک پلی- والان استفاده میکنیم . سلولهای لنفوسیتی (5×10^6 در میلی لیتر) را همراه با رقت مناسب از آنتی سرم کونژوگه بمدت نیم ساعت در حضور سرم گوساله غیر فعال شده بر اثر حرارت (Heat inactivated Fetal Calf Serum) قرار داده و سپس سه بار آنرا شسته آماده مطالعه مینمائیم . درصد سلولهای لنفوسیتی که حامل پذیرنده های ایمنو-

بحث:

لنفوسیت‌های B را میتوان از طریق ایمونوگلوبولین‌های سطحی، پذیرنده‌هایی برای اجزای سوم و چهارم کمپلمان پذیرنده FC ایمونوگلوبولین G، پذیرنده‌های ویروس EB و تشکیل روزت موش تشخیص داد.

در واقع بنظر میرسد که لنفوسیت‌های B حامل مقادیر مقناهی پذیرنده‌های ایمونوگلوبولینی باشند این پذیرنده‌ها وقتی که بر روی لنفوسیت‌ها قرار دارند متحرکند (۹). از طرف دیگر پذیرنده‌های ایمونوگلوبولینی وسیله مناسبی برای رده بندی لنفوسیت‌های B هستند (۵، ۲، ۱) در واقع تعداد زیادی ایمونوگلوبولین بر روی سطح سلول B تشخیص داده شده است (۱/۸) میتوان گفت که حدود ۱۰۰۰۰۰۰ پذیرنده ایمونوگلوبولینی بر روی لنفوسیت‌های B قرار دارند (۱۰). پذیرنده‌های ایمونوگلوبولینی از منطقه سوم قسمت ثابت به سطح لنفوسیت‌ها چسبیده‌اند و بخش Fab آزاد است. اما این نکته را نیز باید در نظر داشت که در بعضی شرایط وقتی سلول‌های مزبور قادر به ثبوت مقداری ایمونوگلوبولین‌های سیتوفیلی بخود هستند (۱۱) برای تشخیص پذیرنده‌های ایمونوگلوبولینی میتوان از روش ایمونوفلوئورسانس با کمک آنتی سرم و لنفوسیت‌های زنده استفاده نمود (۵). آنتی سرم ممکن است بر علیه خود ایمونوگلوبولین یا زنجیره سنگین و یا زنجیره سبک باشد. با این روش حدود ۱۰٪ از لنفوسیت‌های خون محیطی حامل پذیرنده‌های ایمونوگلوبولینی هستند. بنظر میرسد در بین ایمونوگلوبولین‌ها IGM بیش از همه بر روی لنفوسیت‌ها باشد یعنی حدود ۸۰٪ از ایمونوگلوبولین‌های سطح سلول B را تشکیل میدهند. در مورد IGM گزارش‌های متعددی در دست است، با اینحال قسمت اعظم IGM اجزای ایمونوگلوبولین‌های سیتوفیلی بوده و تشکیل FC رسپتور را میدهند اما از خود سلول ساخته نشده‌اند. IGA حدود ۱-۲٪ ایمونوگلوبولین سطح سلولی را تشکیل میدهد. اما تحقیقات جدید نشان میدهد که IGD بر روی حدود ۱۵٪ از لنفوسیت‌های خون نافی انسان و ۶٪ از لنفوسیت‌های خسون محیطی در انسان بالغ قرار دارد و مشخص شده که در غالب موارد IGD همراه IGM قرار دارند. این ایمونوگلوبولین‌ها بواسطه خود سلول ساخته شده و بطریق غیر فعال به لنفوسیت‌ها چسبیده‌اند (۲۲/۱۵).

در مورد گروه‌های فرعی IGG باید گفت که IGG₂ در بیشتر موارد ملاحظه میشود ۲ تا ۵ درصد IGG₁ جز IGG₁ بوده و بعد از آن IGG₃ و IGG₄ قرار دارند (۲۲). در مطالعات مامشخص شد که بیماران مبتلا به لوسمی لنفاوی مزمن در خون خود دارای تعداد زیادی از لنفوسیت‌های حامل پذیرنده‌های ایمونوگلوبولینی سطحی میباشند. یافته‌های فوق مطابق نتایجی است که محققین دیگر در اینمورد بدست آورده‌اند = (۴ - ۱۹) همانطور که گفته شد پذیرنده‌های سطحی نوع IGM "مقالبا" با نوع IGD دیده میشود و نتایج بدست آمده این نظر را تأیید مینماید که در بیماری CLL افزایش یک ستون سلولی B وجود دارد با اینحال این موضوع آخرین نتایج بدست آمده نخواهد بود. برخی از محققین ضمن استفاده از آنتی سرم‌های ایدیوتیپیک توانسته‌اند مسئله مونوکلونال بودن ستون سلولی B را در بیماری لوسمی لنفاوی مزمن مشخص کنند در حالیکه ایسن نکته در HCL بدلیل هتروژن بودن نوع سلول ایجاد کننده بیماری مشاهده نمیشود (۱۹) و (۱۴) و تقریباً "تنها راه تفکیک سلول‌های لنفوسیتی در لوسمی لنفاوی مزمن از HCL استفاده از روش‌های فاگوسیتوزی ذرات گرانوله توسط سلول‌های اخیر میباشد در حالیکه سلول‌های B در CLL فاقد قدرت مزبور است (۱۴ و ۶) با اینحال مطالعات متعدد در بیماران مبتلا به لوسمی لنفاوی مزمن یک نوع هیپوگاما گلوبولنمی را نشان میدهد و در عین حال هیچ‌نوع آنتی بادی مونوکلونال در سرشان تشخیص داده نشده است. و در واقع میتوان گفت که در بیماران مزبور بدلیل عدم امکان تمایز سلول‌های B و تبدیلیشان به سلول‌های تولید کننده ایمونوگلوبولین و انباشته شدن آنها بصورت سلول لنفاوی اولیه احتمالاً بصورت تأثیر Feed Back قادر به جلوگیری از عملکرد لنفوسیت‌های B طبیعی خواهد شد (۱۷ و ۱۲). با اینحال میتوان گفت که عدم یکنواختی خاصی در تکامل و عملکرد سلول‌های B در بیماران مبتلا به لوسمی لنفاوی مزمن مشاهده میشود. از طرف دیگر تماس سلول‌های لوسمیک با نسور آمینیداز هیچگونه تغییری در مشخص تر شدن پذیرنده‌های ایمونوگلوبولینی ایجاد نمینمایند. در اینجا این سؤال مطرح میشود که آیا پذیرنده‌های IGM و IGD بر روی سلول‌های B در لوسمی لنفاوی مزمن حامل یک خصوصیت میباشند. مطالعات متعدد ضمن بکارگیری آنتی سرم‌های آنتی ایدیوتیپ

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

کونژوگه ضد IGM و IGD مشخص ساخته که دو ایمونوگلوبولین فوق حامل یک نوع بخش متغیر بوده و بنابراین از یک خصوصیت مشترک آنتی بادی برخوردارند با اینحال لازم است مطالعات دیگری صورت گیرد تا افزایش این دو پذیرنده ایمونوگلوبولین را بر روی لنفوسیت‌های B در لوسمی لنفاوی مزمن نشان دهد .
 ۱- بررسی پذیرنده های ایمونوگلوبولینی فقط در

جدول شماره ۱ - درصد پذیرنده های ایمونوگلوبولینی بر روی لنفوسیت های افراد طبیعی و بیماران مبتلا به CLL و HCL قبل از تاثير نورآمینیداز

منسورد پذیرنده سطحی IGG پذیرنده سطحی IGM پذیرنده سطحی IGA پذیرنده سطحی IgD پذیرنده سطحی پلی والان SMIg زنجیره کاپا زنجیره لامدا							
افراد طبیعی	۱۱ ^o	۴	۲	۵	۱۶	۶	۸
	(۹-۱۳)*	(۱-۵)	(۱-۲)	(۱-۵)	(۱۳-۱۹)	(۴-۸)	(۸-۱۰)
CLL	۱۷	۱۸	۶	۱۱	۲۸	۴	۶
	(۵-۲۰)	(۶-۴۵)	(۴-۱۰)	(۳-۳۸)	(۹-۸۲)	(۱-۴)	(۵-۶)
HCL	۶	۲/۵	۱/۵	۲	۱۵	۴	۵
	(۵-۷)	(۳-۵)	(۱-۳)	(۲-۳)	(۱۰-۲۲)	(۳-۷)	(۴-۱۰)

o = میانگین
 * = Range

جدول شماره ۲ - درصد پذیرنده های ایمنوگلوبولینی بر روی لنفوسیت های افراد سالم و بیماران مبتلا به CLL و HCL بعد از ثناء شیر نور آمین - دواز

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

° = میانگین

¶ = Rang*

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 disorders .
Europ.J.Cancer, 13: 311-Ia, 1977.
- 4- Ellen, S, Bianco, C; Nussenzweig, V. and uhr, J.W.
Cell seurface 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.

- 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 lymphoma 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 Idiotypic of
B-lymphocyte membran IgD and IgM. Formal evidence for monoclonality
of chronic Lymphocytic leukemia cells.
Scand. J.Immunol.3; 841-46, 1974.
- 20- Slease, R.B.
Surface Immunoglobulin density on human Peripheral blood mononuclear
cells Blood. 54(1)72-87, 1979.
- 21- Yamamura. M,
Standardization of lymphocyte Transformation 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.