

## *Immunophenotypic Characterization of Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia by Flow Cytometry; Association with Disease Prognosis*

Esmail Allahmoradi<sup>1</sup>,  
Saeid Taghiloo<sup>1</sup>,  
Ghasem Janbabaie<sup>2</sup>,  
Ramin Shekarriz<sup>3</sup>,  
Mohsen Tehrani<sup>4,5</sup>,  
Hossein Asgarian-Omran<sup>4,6</sup>

<sup>1</sup> MSc in Immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Department of Hematology and Oncology, Cancer Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Department of Hematology and Oncology, Cancer Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>4</sup> Assistant Professor, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>5</sup> Assistant Professor, Molecular and Cell-Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

<sup>6</sup> Assistant Professor, Immunogenetic Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received October 2, 2016 ; Accepted January 8, 2017)

### **Abstract**

**Background and purpose:** Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by clonal proliferation and accumulation of long-lived B lymphocytes within the peripheral blood, bone marrow, and secondary lymphoid organs. In this study, immunophenotypic characteristics of leukemic cells and their association with disease prognosis were investigated in CLL patients.

**Materials and methods:** A case-control study was carried out in 25 CLL patients and 15 healthy individuals. Complete blood count was performed for all subjects. CLL patients were classified into different clinical stages based on the Rai staging system. For immunophenotypic characterization of leukemic cells, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from CLL patients and stained using specific monoclonal antibodies. They were then analyzed by flow cytometry.

**Results:** The CD5, CD19, CD20, and CD23 were expressed significantly more in advanced clinical stages of CLL compared to those in primary stages ( $P= 0.03, 0.01, 0.02,$  and  $0.02,$  respectively). The mean fluorescence intensity (MFI) of CD38 in advanced progressive stages of CLL patients was higher than that of primary non-progressive stages ( $P=0.02$ ).

**Conclusion:** Our results indicated significant immunophenotypic profile and higher CD38 expression in CLL patients with advanced clinical stages. These immunophenotypic characteristics are useful biomarkers for the disease monitoring and therapy.

**Keywords:** chronic lymphocytic leukemia, prognosis, immunophenotyping, CD38

## ایمونوفونوتایپینگ بیماران مبتلا به لوسمی لنفوسیتی مزمن (CLL) به روش فلوسیتومتری؛ ارتباط با پیش آگهی بیماری

اسماعیل اله مرادی<sup>۱</sup>سعید تقی لو<sup>۱</sup>قاسم جان بابایی<sup>۲</sup>رامین شکرریز<sup>۳</sup>محسن طهرانی<sup>۵،۴</sup>حسین عسگریان عمران<sup>۶،۴</sup>

### چکیده

**سابقه و هدف:** لوسمی لنفوسیتی مزمن (CLL) نوعی بدخیمی لنفوسیتی می باشد که با تجمع لنفوسیت های B لوسمیک در خون محیطی، مغز استخوان و اعضای لنفاوی ثانویه مشخص می گردد. در این مطالعه، شاخص های ایمونوفونوتایپینگ بیماران مبتلا به CLL و ارتباط آن ها با پیش آگهی بیماری بررسی شده است.

**مواد و روش ها:** این مطالعه به صورت تحلیلی، موردی-شاهدی بوده که بر روی ۲۵ بیمار مبتلا به CLL و ۱۵ فرد سالم انجام شد. شمارش کامل سلول های خونی برای تمامی افراد انجام گرفت. بر اساس سیستم طبقه بندی Rai، بیماران CLL با توجه به شدت بیماری به گروه های مختلف تقسیم شدند. به منظور ایمونوفونوتایپینگ، سلول های تک هسته ای از خون محیطی گروه بیمار جداسازی شده و پس از رنگ آمیزی با آنتی بادی های مونوکلونال اختصاصی، با استفاده از دستگاه فلوسیتومتر آنالیز شدند.

**یافته ها:** بیان مارکرهای CD5، CD19، CD20، CD23 که جزء شاخص های مهم تشخیصی در بیماران CLL هستند، در مراحل پیشرفته بیماری نسبت به مراحل اولیه آن افزایش معنی داری داشت (p-value به ترتیب ۰/۰۳، ۰/۰۱، ۰/۰۲ و ۰/۰۲). هم چنین شدت بیان CD38 با پیشرفت بیماری ارتباط مستقیم داشته و این مارکر به طور معنی داری در مراحل پیشرفته بیماری، بیش تر بیان شد (p=۰/۰۲).

**استنتاج:** با ورود بیماران CLL به مراحل پیشرفته بیماری، تغییرات معنی داری در ایمونوفونوتایپینگ و شدت بیان CD38 مشاهده می گردد. این تغییرات که در جهت پیش آگهی بدتر بیماری بروز می یابند، می تواند با تضعیف عملکرد سیستم ایمنی و تشدید بیماری همراه بوده و در ادامه می توان از آن ها به عنوان شاخصی ارزشمند در پایش و درمان بیماری استفاده نمود.

**واژه های کلیدی:** لوسمی لنفوسیتی مزمن، پیش آگهی، ایمونوفونوتایپینگ، CD38

### مقدمه

می باشد که با تجمع لنفوسیت های B-CD5<sup>+</sup> بالغ در خون محیطی، مغز استخوان و اعضای لنفاوی ثانویه

لوسمی لنفوسیتی مزمن (Chronic Lymphocytic Leukemia-CLL) نوعی بدخیمی سلول های رده لنفوسیتی

**مؤلف مسئول:** حسین عسگریان عمران - ساری: کیلومتر ۱۸ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی E-mail: asgarianhossein@yahoo.com

۱. کارشناسی ارشد ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
  ۲. دانشیار، گروه خون شناسی و سرطان شناسی، مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
  ۳. استادیار، گروه خون شناسی و سرطان شناسی، مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
  ۴. استادیار، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
  ۵. استادیار، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
  ۶. استادیار، مرکز تحقیقات ایمونونوتیک، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
- تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۷/۱۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۷/۲۴ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۱۰/۲۰

Binet می‌باشد که پایه این طبقه‌بندی‌ها، علائم بالینی و آزمایشگاهی مانند درصد و شمارش مطلق لنفوسیت‌های خون محیطی، لنفادنوپاتی، هپاتومگالی، اسپلنومگالی، شمارش پلاکت و درصد هموگلوبین صورت می‌گیرد (۱۵،۱۴).

بهبودی کامل در بیماری CLL به ندرت اتفاق می‌افتد. خط‌مشی اغلب پروتکل‌های درمانی محافظتی بوده و هدف آن‌ها بیش از آن که طبیعی شدن شمارش سلول‌های خونی باشد، کنترل علائم بالینی است. درمان‌ها معمولاً برای مواردی استفاده می‌شوند که بیماران دارای ارگانومگالی مشکل ساز، حملات همولیتیک و درگیری شدید مغز استخوان باشند (۱۶-۱۸). از مهم‌ترین فاکتورهای پیش‌آگهی موثر در بیماری CLL می‌توان به بیان مارکرهای CD38، ZAP-70 توسط سلول‌های لوسمییک و موتاسیون در ناحیه متغیر زنجیره سنگین ایمنوگلوبین (IGHV) اشاره کرد (۱۹-۲۲). ZAP70 یک پروتئین داخل سلولی است که پس از شناسایی آنتی‌ژن توسط سلول، سیگنال‌های فعال شونده را به لنفوسیت‌های T و NK انتقال می‌دهد (۲۳). اگرچه این پروتئین در سلول‌های B نرمال به ندرت بیان شده، ولی در سلول‌های B لوسمییک جدا شده از گروهی از بیماران CLL یافت شده و با پیش‌آگهی بد بیماری در ارتباط است (۲۲). پروتئین CD38 یک مولکول غشایی تک زنجیره نوع II با وزن مولکولی ۴۵ کیلو دالتون می‌باشد که همانند ZAP70 در دسته‌ای از بیماران مبتلا به CLL بیان شده و با پیش‌آگهی بد بیماری در ارتباط می‌باشد (۲۴).

از آن‌جا که تاکنون مطالعه مشابهی بر روی بیماران CLL استان مازندران انجام نگرفته است، مطالعه حاضر بر روی بیماران مراجعه کننده به بیمارستان امام (ره) ساری انجام گرفت تا در کنار مارکر CD38، به بررسی ارتباط میان مارکرهای CD5، CD19، CD20، CD23 و پیشرفت بیماری پرداخته شود. در این مطالعه شاخص‌های آزمایشگاهی، علائم بالینی و شاخص‌های ایمنوفنوتایپینگ بیماران مبتلا به CLL و ارتباط آن‌ها با شدت و پیش

مشخص می‌گردد (۳-۱). بالاترین میزان شیوع این بیماری در استرالیا، آمریکای شمالی و اروپا (به خصوص ایرلند، ایتالیا و سوئیس) و کم‌ترین میزان شیوع آن در آسیا و آمریکای جنوبی یافت شده است (۵،۴،۲). بیماری CLL در جوامع غربی حدود ۳۰-۲۵ درصد لوسمی‌ها را شامل می‌شود، این در حالی است که تاکنون آمار دقیقی از میزان شیوع CLL در ایران گزارش نشده است (۷،۶،۲). تشخیص بیماری CLL طبق معیارهای NCI-WG (National Cancer Institute-Sponsored Working Group) از طریق علائم بالینی، معاینات فیزیکی، تغییرات تعداد و درصد لنفوسیت‌های خون محیطی، مشاهده مستقیم اسمیر مغز استخوان و در نهایت تعیین بیان مولکول‌های سطحی سلول‌های لوسمییک با روش فلوسیتومتری (ایمنوفنوتایپینگ) مشخص می‌گردد (۷-۹). بر همین اساس، تشخیص بیماری CLL از طریق افزایش بیان مارکرهای سطحی CD5، CD19، CD20، CD23 و کاهش بیان CD79b و ایمنوگلوبولین‌های غشایی IgM و IgD صورت می‌گیرد (۱۱،۱۰،۲).

بیماران CLL از نظر شدت بیماری به دو گروه پیش‌رونده (Progressive) و غیر پیش‌رونده (Non-Progressive) تقسیم‌بندی می‌شوند. معیار تعیین شدت بیماری علائم بالینی و آزمایشگاهی از قبیل کاهش وزن، تب، عرق شبانه، خستگی شدید، اسپلنومگالی، لنفادنوپاتی‌های بزرگ، زمان دو برابر شدن لنفوسیتی (Lymphocyte Doubling Time) کم‌تر از ۶ ماه، نقص پیش‌رونده مغز استخوان (آنمی و ترومبوسیتوپنی) و ... می‌باشند. بیماران غیر پیش‌رونده، میزان بقای طولانی‌تری را از خود نشان می‌دهند و کم‌تر نیاز به درمان پیدا می‌کنند؛ در حالی که بیماران پیش‌رونده، حالت پیشرفته‌ای از بیماری را نشان داده که به درمان زود هنگام نیازمند هستند و هم‌چنین اغلب مرگ و میرهای ناشی از CLL در این بیماران مشاهده می‌شود (۱۳،۱۲). طبقه‌بندی (Staging) شدت بیماری در بیماران CLL بر اساس دو نوع سیستم طبقه‌بندی Rai و

۳۳ درصد و نهایتاً مرحله IV: علائم 0-III به همراه کاهش پلاکت به کم‌تر از ۱۰۰۰۰۰ در هر میلی‌متر مکعب است.

مطالعه حاضر مورد تایید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران با کد ۱۲۸۲ بوده و رضایتنامه آگاهانه از تمامی افراد قبل از ورود به مطالعه اخذ گردید. ۱۲ نفر از بیماران در مرحله تشخیص اولیه بوده و مابقی بیمارانی بودند که قبلاً تشخیص داده شده و هیچ نوع رژیم درمانی بر روی آن‌ها صورت نگرفته بود. گروه کنترل شامل ۱۵ فرد سالم شامل ۹ مرد و ۶ زن با میانگین سنی ۵۸/۱۱ سال بودند. مقدار ۴ میلی‌لیتر خون محیطی حاوی ضد انعقاد هپارین از افراد مورد مطالعه اخذ گردیده و پرسشنامه مربوط به اطلاعات بالینی - آزمایشگاهی از هر فرد به صورت جداگانه تکمیل گردید. اطلاعات دموگرافیک بیماران مورد مطالعه در جدول شماره ۱ آورده شده است.

جدول شماره ۱: اطلاعات دموگرافیک و تفاوت شاخص‌های خونی در بیماران CLL و گروه کنترل

پارامتر	گروه بیماران CLL (نفر ۲۵)	گروه نرمال (نفر ۱۵)	سطح معنی داری
جنسیت	مرد ۱۳ زن ۱۲	۹ ۶	۰/۲۴
سن (سال)	میانگین $SD \pm$ ۵۹ ± ۱۰/۶۴ محدوده ۴۸-۸۴	میانگین $SD \pm$ ۵۷ ± ۹/۸۳ محدوده ۳۵-۷۷	۰/۳۴
شارش گلبول‌های سفید در هر $mm^3$	میانگین $SD \pm$ ۳۴۸۱ ± ۳۳۹۵۲ محدوده ۱۱۲۰۰۰-۱۳۴۸۰	میانگین $SD \pm$ ۷۸۰۰ ± ۱۷۷۱ محدوده ۹۷۹۰-۴۲۰۰	< ۰/۰۰۰۱
درصد لنفوسیت‌ها در خون	میانگین $SD \pm$ ۸۲/۰ ± ۱۰/۴۷ محدوده ۵۶/۰-۹۵/۰	میانگین $SD \pm$ ۳۶/۷ ± ۴/۱۵ محدوده ۲۷/۶-۴۰/۹	< ۰/۰۰۰۱
شارش مطلق لنفوسیت‌ها در هر $mm^3$	میانگین $SD \pm$ ۲۹۲۶۴ ± ۲۲۹۰۵ محدوده ۸۰۸۸-۱۰۵۵۰۴	میانگین $SD \pm$ ۲۶۸۱ ± ۷۶۰ محدوده ۳۸۵۰-۱۵۳۰	< ۰/۰۰۰۱
مقدار هموگلوبین (g/dl)	میانگین $SD \pm$ ۱۲/۲ ± ۲/۲۱ محدوده ۶-۱۵/۶	میانگین $SD \pm$ ۱۳/۰ ± ۱/۶۸ محدوده ۱۱/۲-۱۵/۶	۰/۰۴
شارش پلاکت در هر $mm^3$	میانگین $SD \pm$ ۱۷۴,۰۰ ± ۷۶۹۵۰ محدوده ۳۸۰۰۰-۳۶۵۰۰۰	میانگین $SD \pm$ ۲۱۹,۰۰ ± ۴۵۴۱۰ محدوده ۱۳۱,۰۰۰-۲۷۰,۰۰۰	۰/۰۴

داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار (Median  $\pm$  SD) به همراه محدوده (Range) ارائه شده است. p-value های کم‌تر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs)

سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs)

از هر دو گروه بیمار و شاهد با استفاده از روش شیب

آگهی بیماری مورد ارزیابی قرار گرفته است. هم‌چنین میزان تغییرات علائم بالینی و آزمایشگاهی بیماران و بیان CD38 و دیگر شاخص‌های ایمونوفونوتایپینگ به عنوان فاکتورهای مهم در ارزیابی پیشرفت بیماری در مراحل اولیه و پیشرفته بیماری مورد ارزیابی قرار گرفت تا در ادامه بتوان با معرفی این شاخص‌ها، راه کارهای مفیدی در جهت پایش و درمان این بیماری معرفی نمود.

## مواد و روش‌ها

بیماران و گروه شاهد

این مطالعه از نوع تحلیلی، موردی-شاهدی بوده که بر روی ۲۵ بیمار مبتلا به CLL شامل ۱۳ بیمار مرد و ۱۲ بیمار زن با میانگین سنی ۶۲/۲۴ سال از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی (ره) دانشگاه علوم پزشکی مازندران در سال‌های ۹۴-۱۳۹۳ انجام گرفت. بیماران مبتلا به CLL توسط پزشک متخصص خون و انکولوژی و با توجه به شمارش سلول‌های خونی، بررسی لام خون محیطی، بررسی ایمونوفونوتایپ سلولی و علائم بالینی بر اساس معیارهای سازمان بهداشت جهانی (WHO) تشخیص داده شدند. تقسیم‌بندی بیماران بر اساس طبقه‌بندی Rai صورت گرفت که بر همین اساس، بیماران به دو گروه مراحل اولیه بیماری (Early Stages) که شامل Stage 0 و I بوده و هم‌چنین مراحل پیشرفته بیماری (Late Stages) که شامل Stage های II، III و IV سیستم طبقه بندی Rai بودند، تقسیم‌بندی شدند. اساس تقسیم‌بندی Rai به مراحل 0-IV به این صورت می‌باشد: مرحله 0: لنفوسیتوز یا افزایش میزان لنفوسیت در خون به بیش از ۱۵۰۰۰ سلول در هر میلی‌متر مکعب و در مغز استخوان به بیش از ۴۰ درصد، مرحله I: علائم مرحله 0 به همراه بزرگ شدن غدد لنفاوی، مرحله II: علائم مرحله 0 و I به همراه بزرگ شدن طحال و کبد و یا هر دو، مرحله III: علائم مرحله 0-II به همراه کاهش هموگلوبین به میزان کم‌تر از ۱۱ گرم بر دسی‌لیتر و کاهش هماتوکریت به کم‌تر از

شده و سپس خوانش با دستگاه فلوسیتومتر شرکت Partec PAS انجام شد. به منظور حذف اتصالات غیر اختصاصی و تعیین محدوده منفی و مثبت بیان CD مارکرها، برای تمامی نمونه‌های مورد مطالعه به طور مجزا نمونه‌ای به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد که در آن سلول‌های PBMC بیمار با آنتی‌بادی‌های ایزوتیپ کنترل IgG1-kappa-PE و IgG-kappa-FITC (eBioscience, USA) رنگ‌آمیزی شدند. آنالیز اطلاعات با استفاده از نرم‌افزار FlowMax انجام گرفته و در نهایت سطح مثبت بودن CD مارکرهاى مختلف (positivity) بیش از ۲۰ درصد در نظر گرفته شد (۲۶).

#### آنالیز آماری

آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS 20 صورت گرفت. مقایسه بین گروه‌ها با استفاده از آزمون آماری Mann-Whitney U test برای داده‌های کمی و آزمون آماری مربع کای دو برای داده‌های کیفی انجام پذیرفته و  $p < 0/05$  معنی دار در نظر گرفته شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 6 رسم گردید.

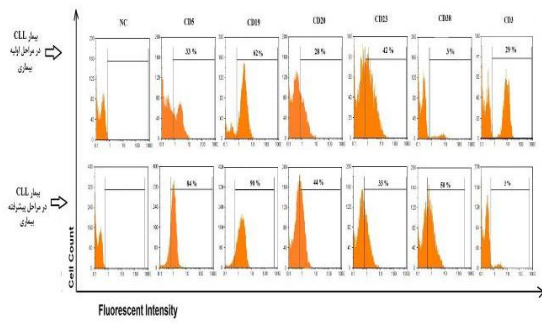
#### یافته‌ها

مطابق انتظار، شمارش گلبول‌های سفید و درصد لنفوسیت‌ها در خون محیطی بیماران CLL به‌طور معنی‌داری از گروه کنترل بالاتر بوده و هم‌چنین این بیماران دارای مقادیر کم‌تری از هموگلوبین و پلاکت در مقایسه با گروه کنترل بودند (جدول شماره ۱). هم‌چنین، در بیماران CLL با مراحل پیشرفته بیماری، تعداد گلبول‌های سفید، فراوانی و تعداد مطلق لنفوسیت‌ها نیز با پیشرفت بیماری افزایش داشت. در همین راستا، میزان هموگلوبین و تعداد پلاکت‌ها در مراحل پیشرفته بیماری کاهش قابل ملاحظه‌ای نسبت به مراحل اولیه بیماری از خود نشان دادند. علاوه بر آن، با پیشرفت بیماری، علائم بالینی از قبیل لنفادنوپاتی، اسپلنومگالی، خستگی، تب، کاهش وزن، بی‌اشتهایی، هپاتومگالی و

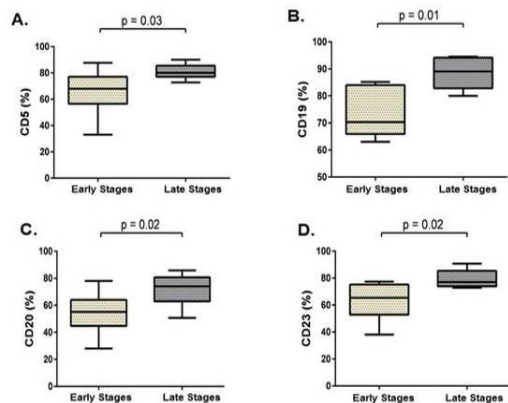
غلظت و محلول فایکول با وزن مخصوص ۱/۰۷۷ جداسازی گردید (۲۵). بر همین اساس، ابتدا خون محیطی هپارینه با محیط کشت RPMI 1640 (Biosera, France) حاوی پنی سیلین 100 IU/ml (Biosera, France) و استرپتومایسین 100 µg/ml (Biosera, France) به نسبت برابر رقیق شد. سپس خون رقیق شده، به نسبت ۱:۲ بر روی فایکول اضافه شده و به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۹۰۰ سانتریفیوژ گردید. پس از اتمام سانتریفیوژ، لایه سلول‌های تک‌هسته‌ای که در بین فایکول و محیط RPMI 1640 قرار داشت، جداسازی گردید. سلول‌های تک‌هسته‌ای جدا شده برای انجام سایر آزمایشات با استفاده از محیط کشت RPMI 1640 حاوی پنی سیلین و استرپتومایسین، دو بار شستشو داده شد. در نهایت میزان زنده بودن سلول‌های جدا شده به وسیله رنگ‌آمیزی تریپان بلو تعیین گردید که بیش از ۹۵ درصد بود.

#### ایمونوفنوتایپینگ سلول‌ها به روش فلوسیتومتری

جهت بررسی ایمونوفنوتایپ بیماران مورد مطالعه، PBMC جدا شده پس از رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی‌های متصل به مواد فلورسانس با تکنیک فلوسیتومتری مورد آنالیز قرار گرفت. در این مطالعه از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضد CD مارکرهاى انسانی کونژوگه با مواد فلورسانس استفاده گردید. آنتی‌بادی‌های مورد استفاده شامل: anti-CD5-PE, anti-CD23-PE (DAKO, Denmark) anti-CD3-PE, anti-CD19-PE, anti-CD20-FITC, anti-CD38-PE, anti-HLA-DR-PE (eBioscience, USA) بودند. به‌طور کلی بعد از جداسازی PBMC، ابتدا تعداد  $1 \times 10^6$  سلول با استفاده از بافر شستشوی فلوسیتومتری (بافر PBS حاوی ۰/۵ درصد سرم آلبومین گاوی) شستشو داده شده و سپس سلول‌ها در حجم ۱۰۰ میکرولیتر به همراه ۵ میکرولیتر از آنتی‌بادی اختصاصی مربوطه در لوله‌های مخصوص فلوسیتومتری قرار داده شده و به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی انکوبه گردیدند. پس از اتمام انکوباسیون، سلول‌ها با بافر فلوسیتومتری شستشو داده



تصویر شماره ۱: نتایج فلوسیتومتری مربوط به دو بیمار CLL که در مراحل اولیه و پیشرفته بیماری بوده اند. NC: Negative control. CD: Cluster of differentiation



تصویر شماره ۲: تغییرات بیان CD مارکرهای مختلف در مراحل اولیه (Early Stages) و مراحل پیشرفته (Late Stages) بیماری CLL. A: فراوانی سلول های CD5<sup>+</sup>. B: فراوانی سلول های CD19<sup>+</sup>. C: فراوانی سلول های CD20<sup>+</sup>. D: فراوانی سلول های CD23<sup>+</sup> در مراحل اولیه و مراحل پیشرفته بیماری CLL نشان داده شده است. نمودار نشان دهنده میانه، چارک اول و چارک سوم می باشد.

از آنجا که در مطالعات گذشته، بیان مارکر CD38 به عنوان یکی از فاکتورهای مهم در پیش آگهی بیماران CLL مطرح شده است، در این مطالعه نیز بیان این CD مارکر در سطح سلول های لوسمیک بررسی شده و ارتباط آن با شدت بیماری مورد آنالیز قرار گرفت. به دلیل حجم پایین نمونه های مورد بررسی، تفاوت معنی داری از نظر درصد سلول های بیان کننده CD38 در دو گروه بیماران مراحل اولیه و پیشرفته بیماری یافت نشد. ولی بررسی بیان مارکر CD38 از طریق پارامتر

تعریق شبانه مشاهده گردید که از این میان، شیوع علائم لنفادنوپاتی، اسپلنومگالی، خستگی و تب به مراتب بالاتر از علائمی هم چون کاهش وزن، بی اشتها، هیپاتومگالی و تعریق شبانه بود (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: مقایسه نتایج آزمایشگاهی و علائم بالینی بیماران مبتلا به CLL بر اساس سیر پیشرفت بیماری

پارامتر	بیماران CLL		میان ± SD	محدوده	معنی داری
	مراحل اولیه بیماری (۱۶ نفر)	مراحل پیشرفته بیماری (۹ نفر)			
شمارش گلبول های سفید در هر mm <sup>3</sup>	۳۱۹۵۵ ± ۱۰۵۳۹	۳۳۲۰۰ ± ۳۳۲۵۹	SD ±	محدوده	۰/۰۱
درصد لنفوسیت ها در خون	۷۹/۵ ± ۱۱/۵۴	۸۴/۰ ± ۶/۳۷	SD ±	محدوده	۰/۰۷
شمارش مطلق لنفوسیت ها در هر mm <sup>3</sup>	۲۷۸۹۶ ± ۹۷۷۷	۲۸۹۷۰ ± ۲۹۳۳۳	SD ±	محدوده	۰/۰۲
مقدار هموگلوبین (g/dl)	۱۲/۴ ± ۱/۶۹	۱۱/۳ ± ۲/۷۹	SD ±	محدوده	۰/۰۳
شمارش پلاکت در هر mm <sup>3</sup>	۱۹۵۰۰۰ ± ۵۸۹۲۰	۱۰۵۰۰۰ ± ۴۱۷۲۰	SD ±	محدوده	۰/۰۳
لنفادنوپاتی (درصد)	(۱۸۷۵)۳	(۱۰۰)۹			۰/۰۰۱
اسپلنومگالی (درصد)	(۰)۰	(۶۶/۶۶)۶			۰/۰۰۵
هیپاتومگالی (درصد)	(۰)۰	(۰)۰			-

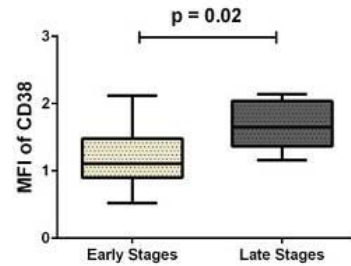
داده ها به صورت میان ± انحراف معیار (Median ± SD) به همراه محدوده (Range) ارائه شده است. p-value های کم تر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

سلول های B لوسمیک در بیماران مبتلا به CLL با بیان بالای CD5، CD19، CD23 و هم چنین بیان ضعیف CD20 مشخص می گردند که نتایج این مطالعه نیز موید این مطلب می باشد. میانگین درصد بیان مارکرهای CD5، CD19، CD20 و CD23 در بیماران CLL مورد مطالعه به ترتیب ۷۴/۳۳ درصد، ۷۸/۱۳ درصد، ۵۸/۴۳ درصد و ۶۵/۸۷ درصد بوده است. در تصویر شماره ۱، نتایج فلوسیتومتری مربوط به دو بیمار CLL که در مراحل اولیه و پیشرفته بیماری بودند، نشان داده شده است. مقایسه درصد بیان CD مارکرهای یاد شده با شدت مراحل بالینی بیماری نشان داد که میانگین بیان مارکرهای CD5، CD19، CD20 و CD23 در مراحل پیشرفته بیماری نسبت به مراحل اولیه بیماری به طور معنی داری افزایش یافته است (تصویر شماره ۲).

اولیه بیماری وارد مراحل پیشرفته آن می‌شوند (۲۸۸). در همین راستا، نتایج این مطالعه نشان داد که مطابق انتظار همگام با پیشرفت بیماری، شاخص‌های خونی از جمله شمارش گلبول‌های سفید خون و درصد لنفوسیت‌ها افزایش یافته و تعداد پلاکت‌ها و میزان هموگلوبین نیز کاهش یافته است که این تغییرات با بروز علائم بالینی شدید بیماری همراهی داشت. در مطالعات گذشته نشان داده شده است که ویژگی‌های بالینی CLL ارتباط مستقیمی با تجمع تهاجمی سلول‌های B لوسمیک در بافت‌های لنفوئیدی و مغز استخوان دارد (۱). شایع‌ترین علائم بالینی CLL شامل لنفادنوپاتی و اسپلنومگالی می‌باشند که به ترتیب در ۸۰ درصد و ۵۰ درصد بیماران دیده شده‌اند و این در حالی است که هپاتواسپلنومگالی از شیوع کم‌تری در این بیماران برخوردار است (۲۹، ۱۶). همان‌طور که در جدول شماره ۲ به نمایش گذاشته شده است، نتایج مطالعه حاضر همراستا با مطالعات قبلی بوده و لنفادنوپاتی و اسپلنومگالی به عنوان شایع‌ترین علائم مشاهده شده در بیماران CLL این مطالعه بوده که مطابق انتظار در مراحل پیشرفته بیماری شاهد شیوع بیش‌تر این علائم بالینی می‌باشیم.

آنالیز ایمونوفنوتیپینگ به روش فلوسیتومتری یکی از روش‌های بسیار مهم و کمک‌کننده برای رسیدن به تشخیص نهایی CLL و افتراق آن از سایر لوسمی‌های مزمن لنفوسیت B و اختلالات لنفوپرولیفراتیو مرتبط می‌باشد. مطابق معیارهای NCI-WG، سلول‌های لوسمیک در CLL دارای فنوتیپ بسیار مشخصی بوده و در واقع سلول‌های B بالغ بیان‌کننده مقادیر بالای CD19، CD5 و CD23 می‌باشند که بر خلاف لنفوسیت‌های B بالغ مقادیر پایین‌تری از CD20 را بیان می‌کنند. بیان بالای CD23 در تشخیص و تمایز CLL از سایر لوسمی‌های B-CD5<sup>+</sup> مانند Mantle Cell Lymphoma-MCL بسیار کمک‌کننده است (۳۰). در این مطالعه علاوه بر سنجش مارکرهای فوق در جهت تشخیص بیماری، به بررسی ارتباط میان افزایش بیان این مارکرها با پیشرفت بیماری

میانگین شدت بیان (Mean Fluorescence Intensity, MFI) نشان داد که میانگین شدت بیان CD38 در بیماران CLL مراحل پیشرفته به طور معنی‌داری از بیماران مراحل اولیه بالاتر است (تصویر شماره ۳،  $p = 0.02$ ).



تصویر شماره ۳: تغییرات شدت بیان مارکر CD38 در مراحل اولیه (Early Stages) و مراحل پیشرفته (Late Stages) بیماری CLL. نمودار نشان‌دهنده میانه، چارک اول و چارک سوم می‌باشد. MFI: Mean Fluorescence Intensity

## بحث

در حالی که بیماری CLL به عنوان یکی از شایع‌ترین لوسمی‌ها در کشورهای غربی شناخته می‌شود، در کشورهای آسیایی شیوع کم‌تری از این بیماری گزارش شده (۱۶) که به همین دلیل ویژگی‌های ایمونوفنوتیپی سلول‌های لوسمیک CLL در این جمعیت به طور گسترده بررسی نشده است (۲۷). در ایران نیز آمار و اطلاعات دقیقی از شیوع CLL وجود نداشته و در رابطه با بررسی ایمونوفنوتیپینگ بیماران CLL نیز مطالعات اندکی صورت گرفته است. به طوری که مطالعه حاضر، دومین مطالعه در کشور در ارتباط با بررسی ایمونوفنوتیپینگ سلول‌های لوسمیک در بیماران CLL و اولین مطالعه در استان مازندران بوده که در ادامه ارتباط این یافته‌ها با پیش‌آگهی بیماری را نیز مورد بررسی قرار داده است. بر اساس سیستم طبقه‌بندی Rai که در اغلب مراکز درمانی ایران نیز از این سیستم استفاده می‌شود، بیماران مبتلا به CLL با تغییرات شاخص‌های خونی از قبیل افزایش تعداد لنفوسیت‌ها، کاهش تعداد پلاکت‌ها، کاهش میزان هموگلوبین و بروز ارگانومگالی از مراحل

در حالی که بیماران CLL دارای کلون‌های جهش یافته ژن در ناحیه IGHV و یا کاهش بیان CD38<sup>+</sup> و ZAP70<sup>+</sup> در سلول‌های لوسمیک، حالت ملایمی از بیماری و فرم غیر پیش رونده را ایجاد می‌کنند (۳۲،۳۳). مطالعات گذشته نشان داده اند که با افزایش بیان مارکر CD38 بر روی سلول‌های B لوسمیک در بیماران CLL، این مارکر با اتصال به مارکرهای سطح سلولی B (BCR) از قبیل CD19، سبب افزایش کلسیم داخل سلولی و در نتیجه تشدید سیگنال رسانی می‌شود که به این طریق سبب افزایش بقای این سلول‌ها و هم‌چنین افزایش میزان تکثیر آن‌ها، در مقایسه با سلول‌های CD38<sup>-</sup> B می‌گردد. از طرفی مطالعات نشان داده‌اند که این مارکر می‌تواند با اتصال به مارکرهای مهارکننده آپوپتوز در مراکز زایا (germinal center) از آپوپتوز سلول‌های B در بیماران CLL جلوگیری کند که این عوامل سبب افزایش تعداد سلول‌های لوسمیک شده و در پیشرفت بیماری CLL دخیل می‌باشند (۳۴).

مطابق مطالعات گذشته، در مطالعه حاضر بررسی بیان CD38 در سطح سلول‌های لوسمیک CLL نشان داده است که همراه با پیشرفت سیر بالینی بیماری، میانگین شدت فلورسانس (MFI) مارکر CD38 نیز به‌طور معنی‌داری افزایش یافته و می‌تواند به عنوان یک شاخص ارزشمند در تعیین پیش‌آگهی این بیماران مطرح باشد. اگرچه درصد سلول‌های بیان‌کننده CD38 در مراحل پیشرفته بیماری بیش‌تر از مراحل اولیه آن بوده است، ولی به دلیل حجم پایین نمونه‌های مورد بررسی، تفاوت معنی‌داری از این نظر در دو گروه بیماران مراحل اولیه و پیشرفته مشاهده نشد. در تایید نتایج مطالعه ما، در مطالعه دیگری نشان داده شده است که با افزایش میانگین شدت فلورسانس (MFI) مارکر CD38، میزان بقای بیماران CLL به‌طور قابل توجهی کاهش یافته و بیماری پیش‌آگهی ضعیفی از خود نشان می‌دهد (۳۵). بر اساس نتایج این مطالعه و مطالعات گذشته باید عنوان کرد که با ورود بیماران CLL به مراحل

CLL نیز پرداخته شده است. نتایج این بررسی حاکی از افزایش درصد سلول‌های بیان‌کننده CD5، CD19، CD20 و CD23 در مراحل پیشرفته بیماری CLL نسبت به مراحل اولیه آن داشت. این افزایش به دلیل لنفوسیتوز و افزایش سلول‌های B لوسمیک بیان‌کننده این مارکرها در خون محیطی بیماران مراحل پیشرفته بیماری می‌باشد که نشان‌دهنده اهمیت بیان این CD مارکرها در تعیین پیش‌آگهی بیماری می‌باشد. نتایج ایمونوفنوتیپینگ بیماران CLL در مطالعات مختلف نشان‌دهنده ارتباط مستقیم بین بیان بالای CD38 و ZAP70 در مراحل پیشرفته بیماری است که می‌توان از این مارکرها در تعیین پیش‌آگهی بیماری استفاده نمود (۲۱،۳۱)، هم‌چنین در ایران هم ارتباط بیان CD38 با مراحل پیشرفته بیماری توسط فرسنگی و همکاران در جمعیت ایرانی مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که CD38 می‌تواند به عنوان یک مارکر مهم تعیین‌کننده پیش‌آگهی در این بیماران مطرح باشد (۲۷). علاوه بر ایمونوفنوتیپ سلول‌های لوسمیک، جهش در ناحیه متغیر ژن‌های ایمونوگلوبولین نیز از شاخص‌های مهم در تعیین پیش‌آگهی بیماران CLL مطرح شده است (۳۲). مشابه لنفوسیت‌های B بالغ، سلول‌های لوسمیک CLL در سطح خود، گیرنده‌های ایمونوگلوبولینی سلول B را بیان می‌کنند که به وسیله ژن‌های ایمونوگلوبولین کد می‌شود. آنالیز مولکولی و توالی نوکلئوتیدی این ژن‌ها و به ویژه بررسی ژن‌های ناحیه متغیر لوکوس زنجیره سنگین (IGHV) نشان داده است که در بیش از ۵۰ درصد بیماران CLL جهش‌های سوماتیک در این ناحیه دیده می‌شود. حضور یا عدم حضور جهش‌های سوماتیک در ژن‌های IGHV به عنوان یک شاخص پیش‌آگهی مهم در بیماران CLL می‌باشد. مطالعات مختلف نشان داده‌اند سلول‌های لوسمیک بدون جهش‌های سوماتیک در ناحیه IGHV و یا سلول‌های لوسمیک بیان‌کننده CD38<sup>+</sup> و ZAP70<sup>+</sup>، حالت تهاجمی‌تری از بیماری را ایجاد می‌کنند که معمولاً کشنده بوده و نیاز به درمان‌های گسترده دارند.



پیشرفت بیماری از اهمیت ویژه‌ای در درمان این بیماران برخوردار می‌باشد، در نهایت پیشنهاد می‌شود که می‌توان با استفاده از ویژگی‌های ایمونوفنوتایپینگ سلول‌های لوسمییک و بیان CD مارکرهای مورد نظر در جهت پایش و شناسایی پیشرفت بیماری و شروع زود هنگام درمان اقدام نمود.

پیشرفته بیماری، تغییرات محسوسی در ایمونوفنوتایپینگ سلول‌های لوسمییک از جمله بیان بیش تر CD38 مشاهده می‌گردد. این تغییرات که غالباً در جهت پیش آگهی بدتر بیماری بروز می‌یابند، می‌توانند با تضعیف عملکرد پاسخ ضد تومور سیستم ایمنی و تشدید بیماری همراه باشند. از آنجایی که پایش به موقع و دقیق مراحل

## References

- Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Eng J Med* 2005; 352(8): 804-815.
- Ghia P, Ferreri AJ, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 64(3): 234-246.
- Barrientos JC. Sequencing of chronic lymphocytic leukemia therapies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2016; 2016(1): 128-136.
- Catovsky D. Definition and diagnosis of sporadic and familial chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2004; 18(4): 783-794.
- Weiss NS. Geographical variation in the incidence of the leukemias and lymphomas. *Nat Cancer Inst Monogr* 1979; (53): 139-142.
- Lanasa MC. Novel insights into the biology of CLL. *ASH Education Program Book* 2010; 2010(1): 70-76.
- Diez P, Gongora R, Orfao A, Fuentes M. Functional proteomic insights in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Expert Rev Proteomics* 2017; 14(2): 137-146.
- Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S, et al. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 1996;87(12): 4990-4997.
- Smolewski P, Witkowska M, Korycka-Wołowicz A. New insights into biology, prognostic factors, and current therapeutic strategies in chronic lymphocytic leukemia. *ISRN Oncology* 2013; 2013.
- Boelens J, Lust S, Vanhoecke B, Offner F. Chronic lymphocytic leukaemia. *Anticancer Res* 2009; 29(2): 605-615.
- Ghalamfarsa G, Jadidi-Niaragh F, Hojjat-Farsangi M, Asgarian-Omran H, Yousefi M, Tahmasebi F, et al. Differential regulation of B-cell proliferation by IL21 in different subsets of chronic lymphocytic leukemia. *Cytokine* 2013; 62(3): 439-445.
- Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1995; 333(16): 1052-1057.
- Schulz H, Bohlius JF, Trelle S, Skoetz N, Reiser M, Kober T, et al. Immunochemotherapy with rituximab and overall survival in patients with indolent or mantle cell lymphoma: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99(9): 706-714.
- Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack B. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1975;46(2):219-234.
- Binet J, Lepage M, Dichiero G, Charron D, D'athis P, Vaucier G, et al. A Clinical Staging System For Chronic Lymphocytic

- Leukemia Prognostic Sign \$ cance. *Cancer*. 1977; 40(2): 855-856.
16. Ghia P, Ferreri AM, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia. *Critical Rev Oncol Hematol* 2007; 64(3): 234-246.
  17. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol* 2013; 88(9): 803-816.
  18. Li XL, Zhang CX. New emerging therapies in the management of chronic lymphocytic leukemia. *Oncol Lett* 2016; 12(5):3051-3054.
  19. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94(6): 1840-1847.
  20. Del Poeta G, Maurillo L, Venditti A, Buccisano F, Epiceno AM, Capelli G, et al. Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; 98(9): 2633-2639.
  21. Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, 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.
  22. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrickson SE, et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 2003; 101(12): 4944-4951.
  23. Richardson SJ, Matthews C, Catherwood MA, Alexander HD, Carey BS, Farrugia J, et al. ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood* 2006; 107(9): 3584-3592.
  24. Alessio M, Roggero S, Funaro A, De Monte LB, Peruzzi L, Geuna M, et al. CD38 molecule: structural and biochemical analysis on human T lymphocytes, thymocytes, and plasma cells. *J Immunol* 1990; 145(3): 878-884.
  25. Asgarian Omran H, Shabani M, Vossough P, Sharifian R, Tabrizi M, Khoshnoodi J, et al. Cross-sectional monitoring of Wilms' tumor gene 1 (WT1) expression in Iranian patients with acute lymphoblastic leukemia at diagnosis, relapse and remission. *Leuk Lymphoma* 2008;49(2):281-290.
  26. Asgarian-Omran H, Shabani M, Shahrestani T, Sarafnejad A, Khoshnoodi J, Vossough P, et al. Immunophenotypic subtyping of leukemic cells from Iranian patients with acute lymphoblastic leukaemia: association to disease outcome. *Iran J Immunol: IJI* 2007; 4(1): 15-25.
  27. Hojjat Farsangi M, Jeddi-Tehrani M, Razavi SM, Sharifian RA, Shamsian Khoramabadi A, Rabbani H, et al. Immunophenotypic characterization of the leukemic B-cells from Iranian patients with chronic lymphocytic leukemia: association between CD38 expression and disease progression. *Iran J Immunol: IJI* 2008; 5(1): 25-35.
  28. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, Caligaris-Cappio F, Dighiero G, Döhner H, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group

- 1996 guidelines. *Blood* 2008; 111(12): 5446-5456.
29. Gorgun G, Holderried TA, Zahrieh D, Neuberger D, Gribben JG. Chronic lymphocytic leukemia cells induce changes in gene expression of CD4 and CD8 T cells. *J Clin Invest* 2005; 115(7): 1797-1805.
30. Campana D, Behm FG. Immunophenotyping of leukemia. *J Immunol Methods* 2000; 243(1-2): 59-75.
31. Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S, Bergui L, D'Arena G, Bonello L, et al. CD38 and ZAP-70 are functionally linked and mark CLL cells with high migratory potential. *Blood* 2007; 110(12): 4012-4021.
32. Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Stella S, Guida G, et al. Geographic patterns and pathogenetic implications of IGHV gene usage in chronic lymphocytic leukemia: the lesson of the IGHV3-21 gene. *Blood* 2005; 105(4): 1678-1685.
33. Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, Sellars B, Valetto A, Allen SL, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest* 1998; 102(8): 1515-1525.
34. Deaglio S, Capobianco A, Bergui L, Dürig J, Morabito F, Dührsen U, et al. CD38 is a signaling molecule in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2003; 102(6): 2146-2155.
35. Morabito F, Mangiola M, Oliva B, Stelitano C, Callea V, Deaglio S, et al. Peripheral blood CD38 expression predicts survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2001; 25(11): 927-932.