

بررسی سیستم ایمنی در پیوند مغز استخوان در بیمارستان دکتر علی شریعتی تهران طی سال‌های ۷۲ تا ۷۴

سعید عابدیان (M.Sc.)
** بهروز نیکبین (Ph.D.) *** اردشیر قوام زاده (M.D.)

سابقه و هدف : عملکرد فعال سیستم ایمنی در بیمارانی که به منظور درمان بدخیمی‌های هماتولوژیک، آنما آپلاستیک یا ناهنجاری‌های سیستم ایمنی تحت عمل پیوند مغز استخوان قرار می‌گیرند توأم با تغییرات و مشکلاتی است که هدف از این پژوهش ارزیابی سیستم ایمنی در افراد پیوند شده می‌باشد.

مواد و روش‌ها : بررسی سیستم ایمنی بیماران بالجام تست L.T.T'، احیاء T.N.B' و تعیین شاخص‌های CD19، CD20، CD3، CD4، CD2، CD8 و CD56 با آنتی‌بادی منوکلونال جهت ارزیابی کمی و کیفی سیستم ایمنی انجام گرفته است.

یافته‌ها : تعداد ۳۶ بیمار (۱۸ نفر زن و ۱۸ نفر مرد) با محدوده سنی ۴ تا ۴۷ سال مورد بررسی قرار گرفتند. سیستم ایمنی در سه ماهه اول پس از پیوند صرف نظر از نوع پیوند و بیماری زمینه‌ای کاهش شدیدی داشت که پس از آن تعداد و عملکرد سیستم ایمنی رو به افزایش گذاشت. تست فاگوسیتوز در سه ماهه اول پس از پیوند و پس از آن طبیعی بود. سلول‌های کشنده طبیعی با شاخص CD56 در اولین سه ماهه افزایش داشته و نسبت CD4 به CD8 در سه ماه اول کاهش داشت ($P < 0.05$)، تعداد سلول‌های B با مارکر CD19 و CD20 در سه ماهه اول کاهش داشته و پس از آن زمان رو به افزایش گذاشت.

استنتاج : حیات مجدد سیستم ایمنی عامل مهمی در سلامت بیماران پیوند شده از عفونت‌ها می‌باشد و به نظر می‌رسد که وجود سلول‌های طبیعی با شاخص CD56 نقش مهمی در مراقبت ایمنی در زمان‌های اولیه پس از پیوند دارد. همچنین برقراری مجدد توانایی دفاعی سلول‌های T در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ نقش مؤثری در مراقبت افراد از بیماری‌ها دارا می‌باشد.

واژه‌های کلیدی : پیوندمغز استخوان، پیوند بافت، ایمنی‌شناسی پیوند، ایمنی‌سلولی، ایمنی، تست‌های ایمنی‌شناسی

مقدمه

سلول‌ها سریعاً در پاسخ به تغییر نیازهای بدن افزایش یا کاهش می‌یابد(۱). در پیوند مغز استخوان نه تنها سیستم میلوبیوت و اریتروبیوت دهنده انتقال می‌یابد، بلکه سیستم‌های

سیستم خونساز از اجزاء متعددی تشکیل یافته است که در بدن موجود زنده در تعادل با یکدیگر به سر می‌برند. روند خونسازی با دقت تنظیم می‌شود و تولید

- 1.Lymphocyt Transeformation Test
- 2.Nitroblue Tetrazolium
- 3.Reproduction Index

✉ ساری: سهراه‌جویبار - معاونت درمان و دارو دانشگاه علوم پزشکی - آزمایشگاه مرکزی استان (فرانس)

* دکترای علوم آزمایشگاهی

** متخصص ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران

** فوق تخصص بیماری‌های خون بیمارستان دکتر شریعتی

مراحل تمایزی متفاوتی مورد ارزیابی قرار گرفتند که در مراحل مختلف سلول‌های مزبور می‌توانند دارای مارکرهای CD3، CD4، CD8 باشند و به علاوه سلول‌های کشنده طبیعی (Natural killer) به عنوان اولین سلول دفاعی بدن بر علیه سلول‌های توموری، عفونت‌های ویروسی و برخی از عفونت‌های باکتریایی و قارچی و نیز به عنوان یکی از عوامل تنظیم کننده پاسخ ایمنی و تنظیم فعالیت سلول‌های بینادی خونساز محسوب می‌شوند.

این سلول‌ها توسط حضور برخی از آنتی‌ژن‌های تمایزی مشخص می‌شوند، به طوری که تمامی سلول‌های کشنده طبیعی دارای مارکر CD56 هستند^(۹).

از جمله آنتی‌ژن‌های تمایزی جهت شناسایی لنفوسيت‌های B که محدود به رده این سلول‌ها می‌باشند، شاخص‌های CD19 و CD20 هستند. با توجه به مطالعات انجام شده توسط محققین دیگر و اختلاف نظر موجود در مورد فعالیت مجدد سیستم ایمنی در افراد دریافت کننده پیوند مغز استخوان و نیز به دلیل تفاوت‌هایی که در نوع رژیم دارویی و تکنیک پیوند مغز استخوان وجود دارد، این مطالعه برای اولین بار در کشور، سیستم ایمنی افراد پیوند شده را در بیمارستان دکتر علی شریعتی تهران مورد بررسی قرار داد.

مواد و روش‌ها

۱۰ سی‌سی خون هپارینه از هر فرد پیوند شده تهیه و بلا فاصله نمونه‌ها به دو مرکز سازمان انتقال خون و بخش ایمونوژنتیک دانشکده پزشکی دانشگاه تهران ارسال شدند تا آزمایشات مربوطه انجام گیرد. در ضمن، برای هر دریافت کننده پیوند پرسشنامه‌ای تهیه کرده و مشخصات افراد را با توجه به پرونده بالینی ثبت کردیم. با توجه به امکانات موجود مطالعه سیستم ایمنی بیماران بعد از پیوند مغز استخوان برای اولین بار در کشور با انجام تست L.T.T، استفاده از فلوسیتومتری و احیاء N.B.T انجام گرفت.

لنفوییدی و ماکروفاژی نیز پیوند می‌شوند^(۲). بیولوژی پیوند مغز استخوان حاکی از واقعیتی است که سه تیپ سلولی مختلف شامل لنفوسيت‌های T دهنده بالغ، سلول‌های بینادی خونساز و سلول‌های بینادی لنفوییدی از دهنده به دریافت کننده پیوند منتقل می‌گردند. وجود این سلول‌ها یانگر حوادث بیولوژیکی و کلینیکی است که پس از پیوند مغز استخوان رخ می‌دهد^(۳).

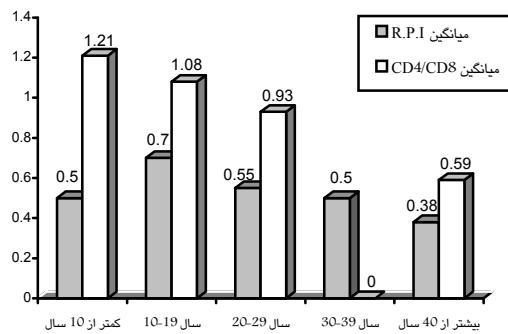
عملکرد فعال سیستم ایمنی در بیمارانی که به منظور درمان بدخیمی‌های هماتولوژیک، آنمی آپلاستیک یا ناهنجاری‌های سیستم ایمنی تحت عمل پیوندمغزاستخوان قرار می‌گیرند، توأم با مشکلاتی است^(۴). فعالیت مجدد دستگاه ایمنی در گیرندگان اتلولوگ و سیترنیک سریعتر از دریافت کننده‌گان آلورژنیک است^(۵).

در طی ماه‌های اول پس از پیوند، قبل از ظاهر شدن نوتروفیل‌ها در جریان خون محیطی، دریافت کننده پیوند مغز استخوان از سیستم دفاعی کاهش یافته‌ای برخوردار است و یکی از مهمترین مشکلات افراد پیوند شده سیستم ایمنی این افراد است، به طوری که تجدید حیات سیستم ایمنی نقش حساسی در مراقبت فرد پیوند شده از بیماری‌ها دارد^(۶).

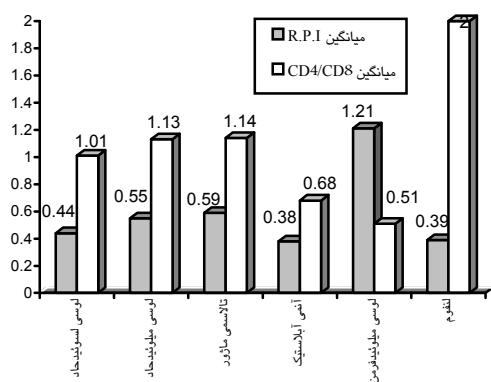
ایمنی با واسطه سلولی پاسخ اصلی دفاعی در مقابل عوامل پاتوژن است که دو نوع از واکنش‌ها را در بر می‌گیرد. اول فعال‌سازی ماکروفاژها با سایتوکاین‌های حاصل از سلول‌های T (به خصوص گاما اینترفرون) برای تخریب مواد بلع شده و دوم تخریب سلول‌های آلوده با لنفوسيت‌های T سیتوتوکسیک با شاخص CD8، به طوری که بیماران به دنبال اقدامات کمورادیوتراپی نسبت به عفونت و خونریزی فوق العاده حساس می‌باشند^(۶).

از دیاد شمارش گلبول سفید، منوستیوز نسبی و ظهور نوتروفیل‌های بالغ در گردش خون ۲ تا ۴ هفت‌پس از انجام عمل پیوند حاکی از پذیرش نسج پیوندی است^(۸,۷). در سیر تکاملی لنفوسيت‌های T در تیموس

میانگین شاخص RPI در فاصله زمانی سه ماهه اول ۳۹ درصد، سه ماهه دوم ۴ درصد و بعد از شش ماه ۶۹ درصد شد که این تفاوت‌ها معنی دار می‌باشد ($P < 0.05$). (نمودار شماره ۱).



نمودار شماره ۱ : نسبت R.P.I و CD4/CD8 در سنین مختلف در بیمارستان دکتر علی شریعتی تهران (۷۲-۷۴)



نمودار شماره ۲ : نسبت R.P.I و CD4/CD8 در انواع بیماری‌ها در بیمارستان دکتر علی شریعتی تهران (۷۲-۷۴)

میانگین نسبت CD4 به CD8 در فاصله زمانی سه ماهه اول ۷/۳، سه ماهه دوم ۷/۴ و بعد از شش ماه ۱۱ بود که اختلاف معنی داری در سه فاصله زمانی مشاهده نشد (جدول شماره ۱). درصد سلول‌های کشنده طبیعی با شاخص CD56 در اولین سه ماهه بعد از پیوند در مقایسه با افراد شاهد ۲۰ درصد بوده است که پس از آن به حد ۵/۵ درصد رسیده است.

بررسی عملکرد لنفوسيت‌های T خون محیطی با انجام تست L.T.T در حضور میتوژن فیتوهاماگلوتینین از طریق کشت سلول‌های T در محیط کشت RPMI با استفاده از تیمیدین نشاندار همراه با گروه شاهد جهت اندکس R.P.I و شمارش اشعه ساطع شده از سنتیلاسیون بر حسب دقیقه (CPM) با دستگاه بتاکانتر و نیز تعیین مارکرهای سطحی CD20، CD19، CD8، CD4، CD2 و CD56 لنفوسيت‌های خون محیطی با استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال به منظور ارزیابی کمی و کیفی سیستم اینمی به وسیله دستگاه فلوسیتوتمتری و همچنین انجام تست NBT (نیتروبلوتروازولیوم) با استفاده از محرك کاندیداآلیکانس جهت ارزیابی مسیر متابولیسم اکسیداتیو و تولید آنیون سوپر اکسید در نوتروفیل‌های بیماران پیوند شده به عنوان شاخص از عملکرد نوتروفیل‌های بیماران پیوند شده انجام گرفت. سیستم اینمی بیماران با انجام تست‌های فوق در سه ماهه اول، سه ماهه دوم و بعد از ۶ ماه از زمان پیوند با استفاده از آزمون آماری t ، آنالیزواریانس یک‌طرفه و دو‌طرفه مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها

۳۶ فرد پیوند شده (۱۸ نفر زن و ۱۸ نفر مرد) در محدوده سنی ۴ تا ۴۷ قرار داشتند. سیزده نفر به بیماری زمینه‌ای تالاسمی مژور، ۱۰ نفر به لوسومی میلویید حاد، ۶ نفر به آنمی آپلاستیک، ۳ نفر به لوسومی لنفویید حاد، ۳ نفر به لوسومی میلویید مزمن و یک نفر به لنفوم لنفویلاستیک مبتلا بودند. دوازده نفر از این افراد پیوند اтолوگ و بقیه پیوند آلوژنیک دریافت داشتند. در فاصله زمانی سه ماهه اول، لنفوسيت‌های دارای شاخص CD2 در مقایسه با افراد شاهد ۱۰ درصد، لنفوسيت‌های دارای شاخص CD4، ۷ درصد و لنفوسيت‌های دارای شاخص CD19 و CD20 به ترتیب ۵ و ۴ درصد بوده است. در سه ماهه دوم به بعد، درصد سلول‌های فوق به ترتیب ۱۰، ۱۳، ۴۰ و ۱۱ بوده است.

اختلاف معنی داری در سه فاصله زمانی مشاهده نشد.

در صد احیاء N.B.T در سه ماهه اول ۷۸ درصد، سه

ماهه دوم ۸۵ درصد و سه ماهه سوم ۸۰ درصد بود که

جدول شماره ۱: نتایج حاصل از مطالعات انجام شده به ترتیب زمان پس از پیوند افراد دریافت کننده پیوند مغز استخوان در بیمارستان دکتر

علی شریعتی تهران طی سال های ۷۲ تا ۷۴

زمان پس از پیوند	تعداد WBC	میانگین NBT	نسبت CD8 به CD4	میانگین RPI=LTTP/LTTN	میانگین اندکس
سه ماهه اول پس از پیوند	۴۳۰۰	۷۸ درصد	۷/۳	۰/۳۹	
سه ماهه دوم پس از پیوند	۴۵۰۰	۸۵ درصد	۷/۴	۰/۴	
پس از ۶ ماه از زمان پیوند	۶۰۰۰	۸۵ درصد	۱۱	۰/۶۹	

بحث

لنسویت‌های T دارای شاخص CD4، سریعتر به حد طبیعی می‌رسد، به طوری که تعداد این سلول‌ها در ابتدای پیوند کاهش داشته و بعد از شش ماه به حد طبیعی می‌رسد(۱۱). در حالی که در مطالعه ما تعداد سلول‌های B با شاخص CD19 و CD20 در سه ماهه دوم (از ماه چهارم) به حد طبیعی رسید.

در صد سلول‌های CD8 چهار تا هشت ماه بعد از پیوند در مقایسه با سلول‌های CD4 افزایش نسبی دارد که دلیل آن کاهش سلول‌های CD4 می‌باشد که مطالعات انجام شده مطابق با این تحقیق می‌باشد(۱۱). کامانی (۲۰۰۰) گزارش نمود که سلول‌های کشنده طبیعی نخستین سلول‌هایی هستند که پس از پیوند در مغز استخوان تجمع می‌یابند(۱۱). از آنجایی که این سلول‌ها نقش مؤثری در خونسازی دارند، میزان موفقیت پیوند در مراحل اولیه بستگی به حضور فعال این سلول‌ها دارد. این سلول‌ها سبب تحریک، تمایز و تکثیر سلول‌های خونساز، حذف سلول‌های آلوده به ویروس سیتوگالو و کمک به سنتر ایمونو گلوبولین‌ها توسط سلول‌های B می‌شوند(۵).

در این مطالعه، در سه ماهه اول صرف نظر از بیماری‌های زمینه‌ای و نوع مصرف دارو، سیستم ایمنی بیماران پیوند شده از قدرت پایینی برخوردار بودند که با نتایج سایر پژوهش‌ها مطابقت دارد(۱۱،۱۰،۹). به نظر می‌رسد زمان عامل مهمی در تجدید حیات سیستم ایمنی به منظور گسترش دفاع در مواجهه با اجرام بیگانه باشد.

یافته‌های این تحقیق نشان داد که تولید مجدد لنفسویت‌ها در سه ماهه اول پیوند وجود دارد و تعداد سلول‌های کشنده طبیعی دارای شاخص CD56 بیش از سایر سلول‌ها بوده است. عدم تغییر شاخص RPI نشان می‌دهد که عملکرد لنفسویت‌ها در سه ماهه اول پس از پیوند صرف نظر از بیماری‌های زمینه‌ای و نوع پیوند کاهش پیدا کرده است.

تعداد سلول‌های T با شاخص CD4 در سه ماهه اول و پس از آن کاهش داشته است، به طوری که نسبت سلول‌های CD8 به CD4 در هر سه فاصله زمانی کمتر از حد طبیعی بوده است.

در این پژوهش تعداد سلول‌های B با شاخص CD19 و CD20 در سه ماهه اول کاهش داشته است که پس از آن رو به افزایش گذاشته و بعد از شش ماه به حد طبیعی رسید.

احیاء N.B.T (تست فاگوسیتوز) در اکثر گیرندهای پیوند در سه ماهه اول و پس از آن طبیعی بود که دلیلی بر سلامت دفاع نوتروفیلی در تولید آئیون سوپر اکسید در مقایسه با ایمنی کاهش یافته سلولی می‌باشد.

مطالعه آقای Davison و همکاران (۲۰۰۰) نشان داد که تولید مجدد زیر گروه‌های لنفسویتی متفاوت بوده و تعداد سلول‌های T دارای شاخص CD4 حتی بعد از ۱۸ ماه در مقایسه با افراد طبیعی پایین بوده است(۱۰). گزارش‌ها حاکی از آن است که تعداد سلول‌های B دارای شاخص CD19 و CD20 در مقایسه با

به مقادیر کم جهت تمایز آنها باشد. همچنین تجدید

حیات سریعتر سلول‌های کشنده طبیعی در ابتدای پس از پیوند به همراه دفاع نوتروفیلی جهت انجام فاگوسیتوز عامل مهمی در جلوگیری از عفونت‌ها و نقش مؤثر سلول‌های کشنده طبیعی در خونسازی می‌باشد.

سپاسگزاری

در خاتمه از همه همکاران خود در بیمارستان امام خمینی(ره) تهران، بخش ایمونوژنتیک دانشکده پزشکی تهران، سازمان انتقال خون ایران و بخش پیوند مغز استخوان دکتر علی شریعتی تشكر و قدردانی می‌شود.

1. Lee G, Thomasc R, Bitehel L. Wintrob's clinical hematology. 10rd ed. Pennsylvania: Lee, febiger; 1999.
2. Hofman R, Benz E, Sanford J, Shatti J. Hematology basaic principle and practice. 3rd ed. Newyork: Churchill Livingston; 1998.
3. Komatsuda M. Change of Lymphocyte, subset in leukemia patients who receive allogeneic bone marrow transplantation. *J.acta hematol.* 1991; 45(4): 257-265.
4. Witherspoon R. Bone marrow transplantation. *Blood.* 1998; 20(24): 360-365.
5. Ivan R. Essential immunology. 10rd ed. California: Blackwell scientific. 1988.
6. Abbas A, Lichtman A, Roba J. Cellular and molecular immunology. 3rd ed. California: W.B. Saunders; 1999.

نوع رژیم دارویی جهت سرکوب سیستم ایمنی قبل از پیوند و بعد از آن و وجود عارضه پیوند علیه میزان (G.V.H.D)¹ در بیماران پیوندی دلیلی بر تفاوت‌های موجود بین زمان بازیافت ایمنی در این افراد پس از سه ماهه اول پیوند در مقایسه با مطالعات محققین دیگر (۱۱، ۱۰، ۹) می‌باشد، به‌طوری‌که افزایش سلول‌های T با شاخص CD8، دفاع سلوکی از نوع سیتو توکستی را مطرح و می‌تواند تئوری تمایز این گروه از سلول‌ها را در خارج از تیموس توجیه کند. سریعتر ظاهر شدن جمعیت سلول‌های B با شاخص CD19 و CD20 می‌تواند دلیلی بر حضور سلول‌های T و ترشح سیتوکاین‌های مؤثر حتی

فهرست منابع

7. Santes T. Marrow transplantation in acute non lymphocytic leukemia. *Blood.* 1989; 10(3): 901-908.
8. Lawrence G. Immune recovery after bone marrow transplantation. *J of Hematology oncology.* 1990; 4(3): 100-101.
9. Janeč J, Stinchco B. Immune system after bone marrow transplantation. *Immunology.* 2001; 10(3): 10-16.
10. Davison A, Glenda M, Noritzky N, Kline A. Immune reconstitution after allogeneic bone marrow transplantation depleted of T cells. *Transplantation.* 2000; 69(7): 1341-1347.
11. Kamani N, Kattamis A, Caroll A, Campbell D, Bunin N. Immune reconstitution after autologous purged bone marrow transplantation in children. *Jornal of Pediatric Hematology/Oncology.* 2000; 22(1): 13-19.

1.Graft versus host disease

