

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

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

سابقه و هدف : عملکرد فعال سیستم ایمنی در بیمارانی که به منظور درمان بدخیمی‌های هماتولوژیک، آنمی 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 با انجام تست L.T.T^۱، احیاء N.B.T^۲ و تعیین شاخص‌های CD19، CD20، CD2، CD3، CD4، CD8 و CD56 با آنتی بادی 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^۳ نقش مؤثری در مراقبت افراد از بیماری‌ها دارا می‌باشد.

واژه‌های کلیدی : پیوند مغز استخوان، پیوند بافت، ایمنی‌شناسی پیوند، ایمنی سلولی، ایمنی، تست‌های ایمنی‌شناسی

مقدمه

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

1. Lymphocytr Transeformation Test
2. Nitroblue Tetrazolium
3. Reproduction Index

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

*** متخصص ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران

* دکترای علوم آزمایشگاهی

** 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 و CD2 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 بنیادی خونساز محسوب می‌شوند. این سلول‌ها توسط حضور برخی از آنتی ژن‌های تمایزی مشخص می‌شوند، به طوری که تمامی سلول‌های کشنده طبیعی دارای مارکر CD56 هستند (۹).

از جمله آنتی ژن‌های تمایزی جهت شناسایی لنفوسیت‌های 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 بلافاصله 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 لنفوسیت‌های T دهنده بالغ، سلول‌های بنیادی خونساز و سلول‌های بنیادی لنفوییدی از دهنده به دریافت کننده پیوند منتقل می‌گردند. وجود این سلول‌ها بیانگر حوادث بیولوژیکی و کلینیکی است که پس از پیوند مغز استخوان رخ می‌دهد (۳).

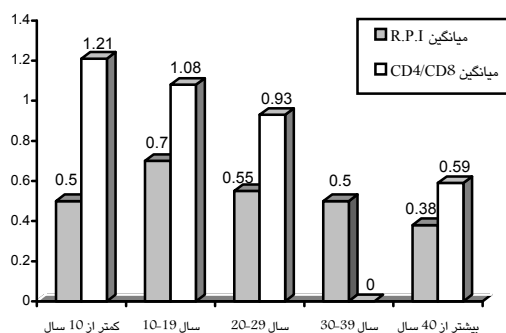
عملکرد فعال سیستم ایمنی در بیمارانی که به منظور درمان بدخیمی‌های هماتولوژیک، آنمی آپلاستیک یا ناهنجاری‌های سیستم ایمنی تحت عمل پیوند مغز استخوان قرار می‌گیرند، توأم با مشکلاتی است (۴). فعالیت مجدد دستگاه ایمنی در گیرندگان اتولوگ و سینژنیک سریعتر از دریافت کنندگان آلوژنیک است (۵).

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).

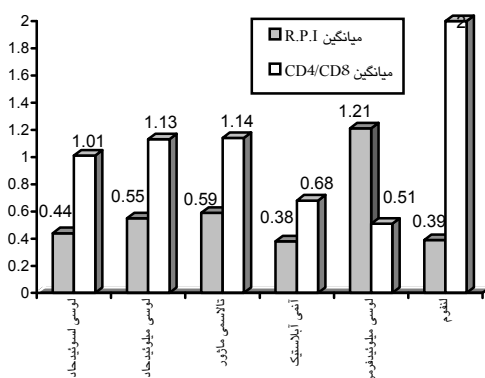
ایمنی با واسطه سلولی پاسخ اصلی دفاعی در مقابل عوامل پاتوژن است که دو نوع از واکنش‌ها را در بر می‌گیرد. اول فعال‌سازی ماکروفاژها با سایتوکاین‌های حاصل از سلول‌های T (به خصوص گاما اینترفرون) برای تخریب مواد بلع شده و دوم تخریب سلول‌های آلوده با لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک با شاخص CD8، به طوری که بیماران به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

از دیاد شمارش گلبول سفید، منوسیتوز نسبی و ظهور نوتروفیل‌های بالغ در گردش خون ۲ تا ۴ هفته پس از انجام عمل پیوند حاکی از پذیرش نسج پیوندی است (۷، ۸). در سیر تکاملی لنفوسیت‌های 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 و ۲).



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



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

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 لنفوسیت‌های T خون محیطی با انجام تست L.T.T در حضور میتوزن فیتوهمگلوتنین 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 و آنتی‌بادی‌های منوکلونال به منظور ارزیابی کمی و کیفی سیستم ایمنی به وسیله دستگاه فلوسیتومتری و همچنین انجام تست NBT (نیتروبلوترازولیوم) با استفاده از محرک کاندیدا آلبیکانز 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 ایمنی 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، آنالیز واریانس 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 ماژور، ۱۰ نفر به لوسمی میلوئید حاد، ۶ نفر به آنمی آپلاستیک، ۳ نفر به لوسمی لنفوبلاستیک حاد، ۳ نفر به لوسمی میلوئید مزمن و یک نفر به لنفوم لنفوبلاستیک مبتلا بودند. دوازده نفر از این افراد پیوند اتولوگ و بقیه پیوند آلوژنیک دریافت داشتند.

در فاصله زمانی سه ماهه اول، لنفوسیت‌های دارای شاخص CD2 در مقایسه با افراد شاهد ۱۰ درصد، لنفوسیت‌های دارای شاخص CD4، ۷ درصد و لنفوسیت‌های 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.

درصد احیاء N.B.T در سه ماهه اول ۷۸ درصد، سه ماهه دوم ۸۵ درصد و سه ماهه سوم ۸۵ 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 سالهای ۷۲ تا ۷۴

زمان پس از پیوند	میانگین تعداد WBC	میانگین NBT	میانگین نسبت CD4 به CD8	میانگین اندکس RPI=LTTP/LTTN
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	۶۵۰۰	۸۵ درصد	۱۱	۰/۶۹

بحث

لنفوسیت‌های 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.

درصد سلول‌های CD8 چهار تا هشت ماه بعد از پیوند در مقایسه با سلول‌های CD4 افزایش نسبی دارد که دلیل آن کاهش سلول‌های CD4 می باشد که مطالعات انجام شده مطابق با این تحقیق می باشد (۱۱).

کامانی (۲۰۰۰) گزارش نمود که سلول‌های کشته 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 سیتومگالو و کمک به سنتز ایمونوگلوبولین‌ها 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 پائینی برخوردار بودند که با نتایج سایر پژوهش‌ها مطابقت دارد (۹، ۱۰، ۱۱). 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 لنفوسیت‌ها در سه ماهه اول پیوند وجود دارد و تعداد سلول‌های کشته طبیعی دارای شاخص CD56 بیش از سایر سلول‌ها بوده است. عدم تغییر شاخص RPI نشان می‌دهد که عملکرد لنفوسیت‌ها 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 CD4 به CD8 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 گیرندگان پیوند در سه ماهه اول و پس از آن طبیعی بود که دلیلی بر سلامت دفاع نوتروفیلی در تولید آنیون سوپر اکسید در مقایسه با ایمنی کاهش یافته سلولی می باشد.

مطالعه آقای Davison و همکاران (۲۰۰۰) نشان داد که تولید مجدد زیر گروه‌های لنفوسیتی 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 کشته‌شده طبیعی در ابتدای پس از پیوند به همراه دفاع نوتروفیلی جهت انجام فاگوسیتوز عامل مهمی در جلوگیری از عفونت‌ها و نقش مؤثر سلول‌های کشته‌شده طبیعی در خونسازی می‌باشد.

سپاسگزارى

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

نوع رژیم دارویی جهت سرکوب سیستم ایمنی قبل از پیوند و بعد از آن و وجود عارضه پیوند علیه میزبان (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 سلولی از نوع سیتوتوکستی 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

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

