ORIGINAL ARTICLE

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

Esmaeil Allahmoradi[1],
Saeid Taghiloo[1],
Ghasem Janbabaei[2],
Ramin Shekarriz[3],
Mohsen Tehrani[4,5],
Hossein Asgarian-Omran[4,6]

[1] MSc in Immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Associate Professor, Department of Hematology and Oncology, Cancer Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Hematology and Oncology, Cancer Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[5] Assistant Professor, Molecular and Cell-Biology Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[6] 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

**J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26 (145): 9-19 (Persian).**

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۴۵ بهمن سال ۱۳۹۵ (۱۹-۹)

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

اسماعیل اله مرادی[۱]
سعید تقی لو[۱]
قاسم جان بابایی[۲]
رامین شکرریز[۳]
محسن طهرانی[۵،۴]
حسین عسگریان عمران[۶،۴]

## چکیده

**سابقه و هدف:** لوسمی لنفوسیتی مزمن (CLL) نوعی بدخیمی لنفوسیتی می‌باشد که با تجمع لنفوسیت‌های B لوسمیک در خون محیطی، مغز استخوان و اعضای لنفاوی ثانویه مشخص می‌گردد. در این مطالعه، شاخص‌های ایمنوفنوتایپینگ بیماران مبتلا به CLL و ارتباط آن‌ها با پیش آگهی بیماری بررسی شده است.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه به صورت تحلیلی، موردی- شاهدی بوده که بر روی ۲۵ بیمار مبتلا به CLL و ۱۵ فرد سالم انجام شد. شمارش کامل سلول‌های خونی برای تمامی افراد انجام گرفت. بر اساس سیستم طبقه‌بندی Rai، بیماران CLL با توجه به شدت بیماری به گروه‌های مختلف تقسیم شدند. به منظور ایمونوفنوتایپینگ، سلول‌های تک هسته‌ای از خون محیطی گروه بیمار جداسازی شده و پس از رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال اختصاصی، با استفاده از دستگاه فلوسیتومتر آنالیز شدند.

**یافته‌ها:** بیان مارکرهای CD5، CD19، CD20 و CD23 که جزء شاخص‌های مهم تشخیصی در بیماران CLL هستند، در مراحل پیشرفته بیماری نسبت به مراحل اولیه آن افزایش معنی‌داری داشت (p-value به ترتیب ۰/۰۳، ۰/۰۱، ۰/۰۲ و ۰/۰۲). هم‌چنین شدت بیان CD38 با پیشرفت بیماری ارتباط مستقیم داشته و این مارکر به‌طور معنی‌داری در مراحل پیشرفته بیماری، بیش‌تر بیان شد (p =۰/۰۲).

**استنتاج:** با ورود بیماران CLL به مراحل پیشرفته بیماری، تغییرات معنی‌داری در ایمونوفنوتایپینگ و شدت بیان CD38 مشاهده می‌گردد. این تغییرات که در جهت پیش آگهی بدتر بیماری بروز می‌یابند، می‌تواند با تضعیف عملکرد سیستم ایمنی و تشدید بیماری همراه بوده و در ادامه می‌توان از آن‌ها به عنوان شاخصی ارزشمند در پایش و درمان بیماری استفاده نمود.

**واژه های کلیدی:** لوسمی لنفوسیتی مزمن، پیش‌آگهی، ایمنوفنوتایپینگ، CD38

## مقدمه

لوسمی لنفوسیتی مزمن ( Chronic Lymphocytic Leukemia-CLL) نوعی بدخیمی سلول‌های رده لنفوسیتی می‌باشد که با تجمع لنفوسیت‌های $B\text{-}CD5^{+}$ بالغ در خون محیطی، مغز استخوان و اعضای لنفاوی ثانویه

**مولف 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 ایمونوژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۵/۷/۱۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۵/۷/۲۴ تاریخ تصویب : ۱۳۹۵/۱۰/۲۰

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 مولکول های سطحی سلول‌های لوسمیک با روش فلوسیتومتری (ایمنوفنوتایپینگ) مشخص می‌گردد(۹-۷). برهمین اساس، تشخیص بیماری CLL از طریق افزایش بیان مارکرهای سطحی CD5، CD19، CD20 و CD23 و کاهش بیان CD79b و ایمونوگلبولین‌های غشایی IgM و IgD صورت می‌گیرد(۲،۱۰،۱۱).

بیماران CLL از نظر شدت بیماری به دو گروه پیش رونده (Progressive) و غیر پیش‌رونده (Non-Progressive) تقسیم‌بندی می شوند. 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 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 علایم بالینی است. درمان‌ها معمولاً برای مواردی استفاده می‌شوند که بیماران دارای ارگانومگالی مشکل ساز، حملات همولیتیک و درگیری شدید مغز استخوان باشند(۱۸-۱۶). از مهم‌ترین فاکتورهای پیش‌آگهی موثر در بیماری CLL می‌توان به بیان مارکرهای CD38، ZAP-70 توسط سلول‌های لوسمیک و موتاسیون در ناحیه متغیر زنجیره سنگین ایمنوگلوبین (IGVH) اشاره کرد(۲۲-۱۹). 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 لوسمیک جدا شده از گروهی از بیماران CLL یافت شده و با پیش آگهی 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).

ازآن‌جا 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 CD20, CD19, CD5 و 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

آگهی بیماری مورد ارزیابی قرار گرفته است. هم‌چنین میزان تغییرات علائم بالینی و آزمایشگاهی بیماران و بیان CD38 و دیگر شاخص‌های ایمونوفنوتایپینگ 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، راه‌کارهای مفیدی در جهت پایش و درمان این بیماری معرفی نمود.

## مواد و روش ها

*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 مراجعه‌کننده 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 ایمونوفنوتایپ سلولی و علائم بالینی براساس 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 های 0 و I بوده و هم چنین 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 ۳۳ درصد و نهایتاً مرحله IV: علائم III-0 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 آن ها صورت نگرفته بود. گروه کنترل شامل ۱۵ فرد سالم شامل ۹ مرد و ۶ زن با میانگین سنی ۵۸/۱۱ سال بودند. مقدار ۴ میلی لیتر 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 شاخص های خونی در بیماران CLL و گروه کنترل

| پارامتر | | گروه بیماران CLL (۲۵ نفر) | گروه نرمال (۱۵ نفر) | سطح معنی داری |
|---|---|---|---|---|
| جنسیت | مرد | ۱۳ | ۹ | ۰/۲۴ |
| | زن | ۱۲ | ۶ | |
| سن (سال) | میانه ± SD | ۵۹ ± ۱۰/۶۴ | ۵۷ ± ۹/۸۳ | ۰/۳۴ |
| | محدوده | ۴۸-۸۴ | ۳۵-۷۷ | |
| شمارش گلبول های سفید در هر $mm^3$ | میانه ± SD | ۳۴۸۱۰ ± ۲۳۹۵۲ | ۷۸۰۰ ± ۱۷۷۱ | <۰/۰۰۰۱ |
| | محدوده | ۱۳۴۸۰ -۱۱۲۰۰۰ | ۴۲۰۰ - ۹۷۹۰ | |
| درصد لنفوسیت ها در خون | میانه ± SD | ۸۲/۰ ± ۱۰/۴۷ | ۳۶/۷ ± ۴/۱۵ | <۰/۰۰۰۱ |
| | محدوده | ۵۶/۰ - ۹۵/۰ | ۲۷/۶ - ۴۰/۹ | |
| شمارش مطلق لنفوسیت ها در هر $mm^3$ | میانه ± SD | ۲۹۲۶۴ ± ۲۲۹۰۵ | ۲۶۸۱ ± ۷۶۰ | <۰/۰۰۰۱ |
| | محدوده | ۸۰۸۸ - ۱۰۵۵۰۴ | ۱۵۳۰ - ۳۸۵۰ | |
| مقدار هموگلوبین(g/dl) | میانه ± SD | ۱۲/۲ ± ۲/۲۱ | ۱۳/۰ ± ۱/۶۸ | ۰/۰۴ |
| | محدوده | ۶ - ۱۵/۶ | ۱۱/۲ - ۱۵/۶ | |
| شمارش پلاکت در هر $mm^3$ | میانه ± SD | ۱۷۴,۰۰ ± ۷۶۹۵۰ | ۲۱۹۰۰۰ ± ۴۵۴۱۰ | ۰/۰۴ |
| | محدوده | ۳۸۰۰۰ -۳۶۵۰۰۰ | ۱۳۱۰۰۰-۲۷۰۰۰۰ | |

داده‌ها به صورت میانه ±انحراف معیار (Median ± SD) به همراه محدوده (Range) ارائه شده است p-value های کم‌تر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

*جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی (PBMCs)*

سلول های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) از هر دو گروه بیمار و شاهد با استفاده از روش شیب

غلظت و محلول فایکول با وزن مخصوص ۱/۰۷۷ جداسازی گردید(۲۵). برهمین 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 g ۴۰۰ 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 پنی‌سیلین 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 رنگ آمیزی با آنتی‌بادی‌های متصل به مواد فلورسانس با تکنیک فلوسیتومتری مورد آنالیز قرار گرفت. در این مطالعه از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضد CD مارکرهای انسانی کونژوگه با مواد فلورسانس استفاده گردید. آنتی‌بادی‌های مورد استفاده شامل: anti-CD5-PE, anti-CD23-PE (DAKO, Denmark) و 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 $۱\times۱۰^{۶}$ 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 آنتی بادی 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، سلول ها با بافر فلوسیتومتری شستشو داده 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 مارکرهای 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 $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism 6 رسم گردید.

## یافته ها

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

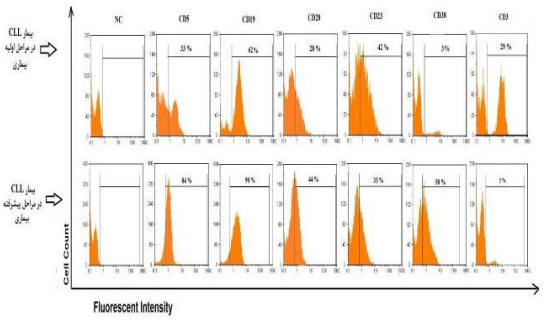
تعریق شبانه مشاهده گردید که از این میان، شیوع علائم لنفادنوپاتی، اسپلنومگالی، خستگی و تب به مراتب بالاتر از علائمی هم چون کاهش وزن، بی‌اشتهایی، هپاتومگالی و تعریق شبانه بود (جدول شماره ۲).

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

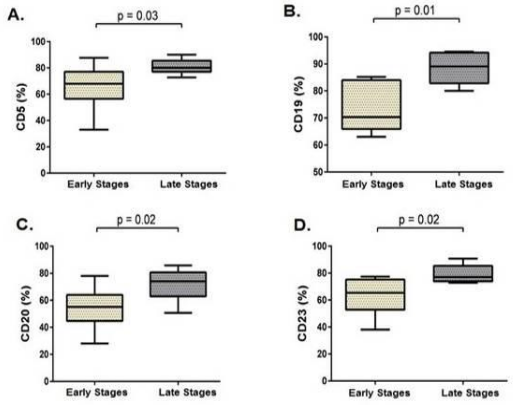
| پارامتر | | بیماران CLL | | سطح معنی داری |
|---|---|---|---|---|
| | | مراحل اولیه بیماری (۱۶ نفر) | مراحل پیشرفته بیماری (۹ نفر) | |
| شمارش گلبول های سفید در هر $mm^3$ | میانه ± SD | ۳۲۹۵۵ ± ۱۰۵۳۹ | ۴۳۳۰۰ ± ۳۲۲۵۹ | ۰/۰۱ |
| | محدوده | ۱۳۴۸۰ – ۴۷۲۰۰ | ۲۶۹۰۰ – ۱۱۲۰۰۰ | |
| درصد لنفوسیت ها در خون | میانه ± SD | ۷۹/۵ ± ۱۱/۵۴ | ۸۴/۰ ± ۶/۳۷ | ۰/۰۷ |
| | محدوده | ۵۶/۰ – ۹۵/۰ | ۷۶/۳۰ – ۹۴/۲۰ | |
| شمارش مطلق لنفوسیت ها در هر $mm^3$ | میانه ± SD | ۲۷۸۹۶ ± ۹۷۷۷ | ۳۸۹۷۰ ± ۲۹۳۷۳ | ۰/۰۲ |
| | محدوده | ۸۰۸۸ – ۳۶۰۰۰ | ۲۱۰۶۳ – ۱۰۵۵۰۴ | |
| مقدار هموگلوبین (g/dl) | میانه ± SD | ۱۲/۴ ± ۱/۶۹ | ۱۱/۳ ± ۲/۷۹ | ۰/۰۳ |
| | محدوده | ۱۰/۰ – ۱۵/۳ | ۶/۰ – ۱۵/۶ | |
| شمارش پلاکت در هر $mm^3$ | میانه ± SD | ۱۹۵۰۰۰ ± ۵۸۹۲۰ | ۱۰۵۰۰۰ ± ۴۱۷۲۰ | ۰/۰۰۳ |
| | محدوده | ۱۵۵۰۰۰ – ۳۶۵۰۰۰ | ۳۸۰۰۰ – ۱۷۸۰۰۰ | |
| لنفادنوپاتی (درصد) | | (۱۸/۷۵) ۳ | (۱۰۰) ۹ | ۰/۰۰۰۱ |
| اسپلنومگالی (درصد) | | (۰) ۰ | (۶۶/۶۶) ۶ | ۰/۰۰۰۵ |
| هپاتومگالی (درصد) | | (۰) ۰ | (۰) ۰ | – |

داده ها به صورت میانه ± انحراف معیار (Median±SD) به همراه محدوده (Range) ارائه شده است. p-value های کم‌تر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

سلول‌های B لوسمیک در بیماران مبتلا به CLL با بیان بالای CD5، CD19، CD23 و هم‌چنین بیان ضعیف CD20 مشخص می‌گردند که نتایج این مطالعه نیز موید این مطلب می‌باشد. 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 به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است (تصویر شماره ۲).



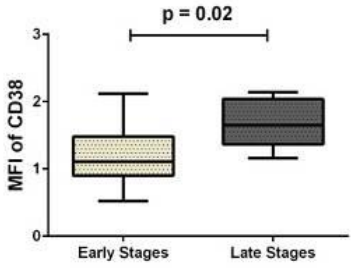

**تصویر شماره ۱:** نتایج فلوسیتومتری مربوط به دو بیمار CLL که در مراحل اولیه و پیشرفته بیماری بوده اند.NC: Negative control. CD: Cluster of differentiation




**تصویر شماره ۲:** تغییرات بیان CD مارکرهای مختلف در مراحل اولیه (Early Stages) و مراحل پیشرفته (Late Stages) بیماری CLL. A: فراوانی سلول های $CD5^+$، B. فراوانی سلول های $CD19^+$، C. فراوانی سلول های $CD20^+$، D. فراوانی سلول های $CD23^+$ 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 پیش‌آگهی بیماران CLL مطرح شده است، در این مطالعه نیز بیان این CD مارکر در سطح سلول‌های لوسمیک بررسی شده و ارتباط آن با شدت بیماری مورد آنالیز قرار گرفت. به دلیل حجم پایین نمونه‌های مورد بررسی، تفاوت معنی‌داری از نظر درصد سلول‌های بیان کننده CD38 در دو گروه بیماران مراحل اولیه و پیشرفته بیماری یافت نشد. ولی بررسی بیان مارکر CD38 از طریق پارامتر

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 =۰/۰۲).




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

## بحث

در حالی که بیماری CLL به عنوان یکی از شایع‌ترین لوسمی‌ها در کشورهای غربی شناخته می شود، در کشورهای آسیایی شیوع کم‌تری از این بیماری گزارش شده(۱۶) که به همین دلیل ویژگی‌های ایمونوفنوتیپی سلول‌های لوسمیک CLL در این جمعیت به‌طور 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. به‌طوری‌که مطالعه حاضر، دومین مطالعه در کشور در ارتباط با بررسی ایمونوفنوتیپینگ سلول‌های لوسمیک در بیماران CLL و اولین مطالعه در استان مازندارن 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 اولیه بیماری وارد مراحل پیشرفته آن می‌شوند(۲۸،۸). 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 لنفوسیت ها 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 بیمارن 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 کمک کننده 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 بیان کننده مقادیر بالای CD5، CD19 و CD23 می‌باشند که بر خلاف لنفوسیت‌های B بالغ مقادیر پایین‌تری از CD20 را بیان می کنند. بیان بالای CD23 در تشخیص و تمایز CLL از سایر لوسمی‌های $B\text{-}CD5^{+}$ مانند Mantle Cell Lymphoma-MCL بسیار کمک کننده 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

CLL نیز پرداخته شده است. نتایج این بررسی حاکی از افزایش درصد سلول‌های بیان کننده 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 بیان کننده 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 نشان دهنده ارتباط مستقیم بین بیان بالای CD38 و ZAP70 در مراحل پیشرفته بیماری است که می‌توان از این مارکرها در تعیین پیش‌آگهی بیماری استفاده نمود(۳۱،۲۱)، 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 می تواند به عنوان یک مارکر مهم تعیین کننده پیش‌آگهی در این بیماران مطرح باشد(۲۷). علاوه بر ایمونوفنوتیپ سلول‌های لوسمیک، جهش در ناحیه متغیر ژن‌های ایمونوگلبولین نیز از شاخص‌های مهم در تعیین پیش‌آگهی بیماران CLL مطرح شده است(۳۲). مشابه لنفوسیت‌های B بالغ، سلول های لوسمیک CLL در سطح خود، گیرنده‌های ایمونوگلبولینی سلول B را بیان می‌کنند که به وسیله ژن‌های ایمونوگلوبین 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 $CD38^+$ و $ZAP70^+$، حالت تهاجمی‌تری از بیماری را ایجاد می‌کنند که معمولاً کشنده بوده و نیاز به درمان‌های گسترده دارند.

در حالی که بیماران CLL دارای کلون‌های جهش یافته ژن در ناحیه IGHV و یا کاهش بیان $CD38^+$ و $ZAP70^+$ در سلول‌های لوسمیک، حالت ملایمی از بیماری و فرم غیر پیش رونده را ایجاد می‌کنند(۳۳،۳۲). 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 $CD38^-$ 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 بیان کننده 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 به طور 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

پیشرفته بیماری، تغییرات محسوسی در ایمنوفنوتایپینگ سلول‌های لوسمیک از جمله بیان بیش‌تر CD38 مشاهده می‌گردد. این تغییرات که غالباً در جهت پیش‌آگهی 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 پیشرفت بیماری از اهمیت ویژه‌ای در درمان این بیماران برخوردار می‌باشد، در نهایت پیشنهاد می‌شود که می‌توان با استفاده از ویژگی‌های ایمونوفنوتایپینگ سلول‌های لوسمیک و بیان CD مارکرهای مورد نظر در جهت پایش و شناسایی پیشرفت بیماری و شروع زود هنگام درمان اقدام نمود.

## References


1. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. N Eng J Med 2005; 352(8): 804-815.
2. Ghia P, Ferreri AJ, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia. Crit Rev Oncol Hematol 2007; 64(3): 234-246.
3. Barrientos JC. Sequencing of chronic lymphocytic leukemia therapies. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2016; 2016(1): 128-136.
4. Catovsky D. Definition and diagnosis of sporadic and familial chronic lymphocytic leukemia. Hematol Oncol Clin North Am 2004; 18(4): 783-794.
5. Weiss NS. Geographical variation in the incidence of the leukemias and lymphomas. Nat Cancer Inst Monogr 1979; (53): 139-142.
6. Lanasa MC. Novel insights into the biology of CLL. ASH Education Program Book 2010; 2010(1): 70-76.
7. 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.
8. 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.
9. Smolewski P, Witkowska M, Korycka-Wołowiec A. New insights into biology, prognostic factors, and current therapeutic strategies in chronic lymphocytic leukemia. ISRN Oncology 2013; 2013.
10. Boelens J, Lust S, Vanhoecke B, Offner F. Chronic lymphocytic leukaemia. Anticancer Res 2009; 29(2): 605-615.
11. 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.
12. Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med 1995; 333(16): 1052-1057.
13. 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 Nati Cancer Inst 2007; 99(9): 706-714.
14. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack B. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. Blood. 1975;46(2):219-234.
15. Binet J, Leporrier 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, Neuberg 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.