Archive of SID



# بررسی سیستم ایمنی در پیوند مغز استخوان در بیمارستان دکتر علی شریعتی تهران طی سال‌های ۷۲ تا ۷٤

سعید عابدیان (M.Sc.)*  عیسی بایبوردی(M.D.)**
اردشیر قوام زاده (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 :** بررسی‌سیستم‌ایمنی بیماران باانجام تستL.T.T[1]، احیاءN.B.T[2] وتعیین‌شاخص‌هایCD19،CD20، CD2، CD3، CD4، CD8 و CD56 با آنتی بادی منوکلونال جهت ارزیابی کمّی و کیفی سیستم ایمنی انجام گرفته است.

**یافته ها :** تعداد ۳٦ بیمار (۱۸ نفر زن و۱۸ نفر مرد) با محدودهٔ سنی٤ تا ٤۷ سال مورد بررسی قرارگرفتند. سیستم ایمنی در سه ماهه اول پس از پیوند صرف‌نظر 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[3] نقش مؤثری در مراقبت افراد از بیماری‌ها دارا می‌باشد.

**واژه های کلیدی :** پیوندمغزاستخوان، پیوند بافت، ایمنی‌شناسی پیوند، ایمنی‌سلولی، 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 میلویید و اریترویید دهنده انتقال می‌یابد،بلکه سیستم‌های

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

* دکترای علوم آزمایشگاهی
** فوق تخصص بیماری‌های خون بیمارستان دکتر شریعتی
✉ ساری: سه‌راه‌جویبار- معاونت درمان و دارو دانشگاه‌علوم پزشکی- آزمایشگاه مرکزی استان (رفرانس)
*** متخصص ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران



www.SID.ir

Archive of SID

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 عمل‌پیوندمغزاستخوان قرار می‌گیرند، توأم با مشکلاتی است(٤). فعالیت مجدد دستگاه ایمنی در گیرندگان اتولوگ و سینژنیک سریعتر از دریافت کنندگان آلوژنیک است(٥).

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، به‌طوری‌که تجدید حیات سیستم ایمنی نقش حساسی در مراقبت فرد پیوند شده از بیماری‌ها دارد(٦).

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 (به‌خصوص گاما اینترفرون) برای تخریب مواد بلع شده و دوم تخریب سلول‌های آلوده با لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک با شاخص CD8 ، به‌طوری‌که بیماران به دنبال اقدامات کموراديوتراپی نسبت به عفونت و خونریزی فوق‌العاده حساس می‌باشند(٦).

ازدیاد شمارش گلبول سفید، منوسیتوز نسبی و ظهور نوتروفیل‌های بالغ در گردش خون ۲ تا ٤ هفته پس از انجام عمل پیوند حاکی از پذیرش نسج پیوندی است(۸،۷). در سیر تکاملی لنفوسیت‌های T در تیموس مراحل تمایزی متفاوتی مورد ارزیابی قرار گرفتند که در مراحل مختلف سلول‌های مزبور می‌توانند دارای مارکرهای CD3 ، CD4 ، CD8 و CD2 باشند و به‌علاوه سلول‌های کشنده طبیعی(Natural killer) به‌عنوان اولین سلول دفاعی بدن برعلیه سلول‌های توموری، عفونت‌های ویروسی و برخی از عفونت‌های باکتریایی و قارچی و نیز به‌عنوان یکی از عوامل تنظیم کننده پاسخ ایمنی و تنظیم فعالیت‌سلول‌های‌بنیادی خونسازمحسوب می‌شوند. این سلول‌ها توسط حضور برخی از آنتی ژن‌های تمایزی مشخص می‌شوند، به‌طوری‌که 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 به‌دلیل 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 روش ها

۱۰ سی‌سی خون هپارینه از هر فرد پیوند شده تهیه و بلافاصله نمونه ها 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.


www.SID.ir

Archive of SID



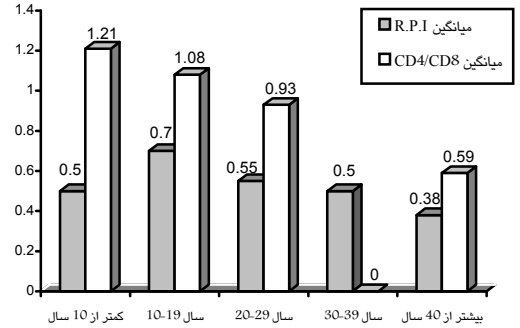
بررسی عملکرد لنفوسیت‌های T خون محیطی با انجام تست L.T.T در حضور میتوژن فیتوهماگلوتینین از طریق کشت سلول‌های T در محیط کشت RPMI با استفاده از تیمیدین نشاندار همراه با گروه شاهد جهت اندکس R.P.I و شمارش اشعه ساطع شده از سنتیلاسیون بر حسب دقیقه (CPM) با دستگاه بتاکانتر و نیز تعیین مارکرهای سطحی CD2، CD4، CD8، CD19، CD20 و CD56 لنفوسیت‌های خون محیطی با استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال به منظور ارزیابی کمّی وکیفی سیستم ایمنی به‌وسیله دستگاه فلوسیتومتری و همچنین انجام تست NBT (نیتروبلوتترازولیوم) با استفاده از محرک کاندیدا‌آلبیکانس جهت ارزیابی مسیر متابولیسم اکسیداتیو و تولید آنیون سوپر اکسید در نوتروفیل‌های بیماران پیوند شده به‌عنوان 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 ٦ ماه از زمان پیوند با استفاده از آزمون آماری t ، آنالیزواریانس یک‌طرفه و دوطرفه مورد ارزیابی قرار گرفت.

## یـــافـــتـــه هـــا

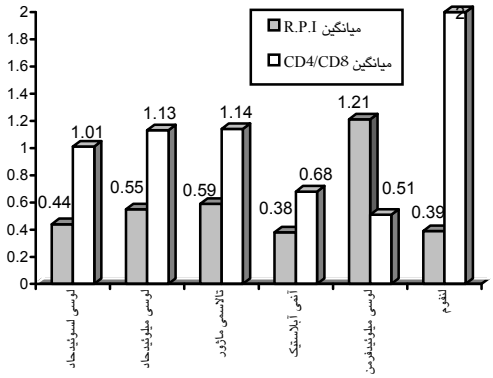
۳٦ فرد پیوند شده (۱۸ نفر زن و ۱۸ نفر مرد) در محدودهٔ سنی ٤ تا ٤٧ قرار داشتند. سیزده نفر به بیماری زمینه‌ای تالاسمی ماژور، ۱۰ نفر به لوسمی میلوییید حاد، ٦ نفر به آنمی آپلاستیک، ۳ نفر به لوسمی لنفوییید حاد، ۳ نفر به لوسمی میلوییید مزمن و یک نفر به لنفوم لنفوبلاستیک مبتلا بودند. دوازده نفر از این افراد 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 و٤ درصد بوده است. در سه ماهه دوم به بعد، درصد سلول‌های فوق به ترتیب ۱۰،۱۳،٤۰ و ۱۱ بوده است.

میانگین شاخص RPI در فاصله زمانی سه ماهه اول ۳۹ درصد، سه ماهه دوم ٤ درصد و بعد از شش ماه ٦۹ درصد شد که این تفاوت‌ها معنی دار می‌باشد (P<۰/۰۵) (نمودار شمارهٔ۱و۲).




**نمودار شمارهٔ ۱ :** نسبت CD4/CD8 و R.P.I در سنین مختلف در بیمارستان دکتر علی شریعتی تهران (۷٤-۷۲)




**نمودار شمارهٔ ۲ :** نسبت CD4/CD8 و R.P.I در انواع بیماری‌ها در بیمارستان دکتر علی شریعتی تهران (۷٤-۷۲)

میانگین نسبت CD4 به CD8 در فاصله زمانی سه ماهه اول ۷/۳ ، سه ماهه دوم ۷/٤ و بعد از شش ماه ۱۱ بود که اختلاف معنی داری در سه فاصله زمانی مشاهده نشد (جدول شمارهٔ 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.


www.SID.ir

Archive of SID

درصد احیاء N.B.T در سه ماهه اول ۷۸ درصد، سه ماهه دوم ۸۵ درصد و سه ماهه سوم ۸۵ درصد بود که اختلاف معنی داری در سه فاصله زمانی مشاهده نشد.

**جدول شمارهٔ ۱:** نتایج حاصل از مطالعات انجام شده به ترتیب زمان پس از پیوند افراد دریافت کنندهٔ پیوند مغز استخوان در بیمارستان دکتر علی شریعتی تهران طی سال‌های ۷۲ تا ۷٤

| 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 | ٤۳۰۰ | ۷۸ درصد | ۷/۳ | ۰/۳۹ |
| سه ماهه دوم پس از پیوند | ٤۵۰۰ | ۸۵ درصد | ۷/٤ | ۰/٤ |
| پس از ٦ ماه از زمان پیوند | ٦۵۰۰ | ۸۵ درصد | ۱۱ | ۰/٦۹ |

## بحث

یافته‌های این تحقیق نشان داد که تولید مجدد لنفوسیت‌ها 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 لنفوسیت‌ها در سه ماهه اول پس از پیوندصرف‌نظر ازبیماری‌های زمینه‌ای ونوع پیوندکاهش پیدا کرده است.

تعداد سلول‌های T با شاخص CD4 در سه ماهه اول و پس از آن کاهش داشته است، به‌طوری‌که 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 لنفوسیت‌های T دارای شاخص CD4، سریعتر به حد طبیعی می‌رسد، به‌طوری‌که 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 سلول های 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 می‌باشد(۱۱).

کامانی (۲۰۰۰) گزارش نمود که سلول‌های کشنده طبیعی نخستین سلول‌هایی هستند که پس از پیوند در مغز استخوان تجمع می‌یابند(۱۱). از آنجایی‌که 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 صرف‌نظر از بیماری‌های زمینه‌ای و نوع مصرف دارو، سیستم ایمنی بیماران پیوند شده از قدرت پایینی برخوردار بودند که با نتایج سایر پژوهش‌ها مطابقت دارد(۹،۱۰،۱۱). به نظر می‌رسد زمان عامل‌مهمی در تجدید حیات سیستم ایمنی به منظور گسترش دفاع در مواجهه با اجرام بیگانه باشد.


www.SID.ir

Archive of SID



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 (۹،۱۰،۱۱) می‌باشد، به‌طوری‌که افزایش سلول‌های T با شاخص CD8، دفاع سلولی از نوع سیتوتوکستی را مطرح و می‌تواند تئوری تمایز این‌گروه از سلول‌ها را در خارج از تیموس توجیه کند. سریعتر ظاهر شدن جمعیت سلول‌های B با شاخص CD19 وCD20می‌تواند دلیلی بر حضور سلول‌های T و ترشح سیتوکاین‌های مؤثر حتی 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 تشکر و قدردانی می‌شود.

## فهرست منابع

1. Lee G, Thomasc R, Bitehel L. Wintrobes 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: 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. 10rd 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, Caroll A, Campbell D, Bunin N. Immune reconstitution after autologons purged bone marrow transplantation in children. ***Jornal of Pediatric Hematiology/Oncology.*** 2000; 22(1): 13-19.

1.Graft versus host disease



www.SID.ir

Archive of SID


www.SID.ir