مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره هفتم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۸۷، ۲۴۴-۲۳۵

سطح بالای پاسخ ایمنی اختصاصی لنفوسیت‌های $CD4^+$ و $CD8^+$ نسبت به سیتومگالوویروس و همبستگی بین آن‌ها در بیماران مبتلا به لوسمی لنفوسیتی مزمن سلول B

بتول پورقیصری[۱]، پل ماس[۲]

دریافت مقاله: ۸۶/۶/۱۹ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸۶/۱۲/۱۵ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۸۷/۹/۱۶ پذیرش مقاله: ۸۷/۱۰/۱۰

چکیده

زمینه و هدف: لوسمی لنفوسیتی مزمن (CLL) با تکثیر منوکلونال و تجمع لنفوسیت‌ها و اغلب سلول‌های B (B-CLL) در خون و مغز استخوان مشخص می‌شود. اختلالات مرفولوژیک و عملی لنفوسیت‌های T و منوکلونال بودن آن‌ها در B-CLL مشخص شده است. این سلول‌های تکثیر یافته ممکن است برای تشخیص پاتوژن‌های خاص اختصاصی باشند و سیتومگالوویروس (CMV) محتمل‌ترین عامل درگیر در این پدیده در B-CLL است. عفونت CMV پاسخ ایمنی شدیدی در افراد مبتلا به نقص ایمنی ایجاد می‌کند. در این مطالعه امکان ارتباط افزایش لنفوسیت‌های T درB-CLL با CMV و پاسخ اختصاصی سلول‌های $CD4^+$ و$CD8^+$ نسبت به آن مورد تحقیق قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: این مطالعه از نوع مقطعی و گروه مورد بررسی ۴۱ بیمارCLL دارای سرولوژی مثبت CMV و ۳۵ فرد سالم دارای سرولوژی مثبت CMV در همان گروه سنی به عنوان کنترل بود. میزان لنفوسیت‌های اختصاصی از زیرگروه $CD4^+$ و $CD8^+$ به ترتیب با استفاده از سیتوکین‌های داخل سلولی پس از تحریک آنتی‌ژنیک و با استفاده از تترامر مشخص گردید.

یافته‌ها: پاسخ ایمنی اختصاصی نسبت به CMV در بیماران CLL با میانه ۱۰/۹۹ و ۱۱ به ترتیب برای سلول‌های تولید کننده اینترفرون- گاما (IFN-γ) و فاکتور نکروزکننده تومور-آلفا (TNF-α) به صورت معنی‌داری بیش از گروه کنترل با میانه ۴/۳ و ۴/۶ بود (p= /۰۰۰۴ برای IFN-γ و p= ۰/۰۰۳ برای TNF-α). پاسخ ایمنی سلول‌های $CD8^+$ نیز در بیماران بیش از گروه شاهد بود (p=۰/۰۳) . بین پاسخ ایمنی سلول‌های $CD4^+$ و$CD8^+$ همبستگی مثبت معنی‌داری مشاهده شد (p=۰/۰۰۹).

نتیجه‌گیری: این نتایج تأثیر عمیق CMV و پاسخ اختصاصی نسبت به آن توسط سلول‌های T را در تغییرات سلول‌های T در CLL نشان می‌دهد. افزایش تعداد لنفوسیت‌های اختصاصی CMV ممکن است عامل افزایش لنفوسیت‌های T در این بیماران باشد.

واژه‌های کلیدی: لوسمی‌لنفوسیتی مزمن، سیتومگالوویروس، لنفوسیت T، اینترفرون گاما، نکروزکننده تومور فاکتور آلفا

۱- (نویسنده مسؤول) استادیارگروه آموزشی پاتولوژی و هماتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد
تلفن: ۰۳۸۱-۳۳۳۹۹۴۱، فاکس: ۰۳۸۱-۳۳۳۴۹۱۱، پست الکترونیکی: bat238@yahoo.com
۲- پروفسور بخش مطالعات سرطان، دانشکده پزشکی، دانشگاه بیرمینگهام (انگلستان)

مقدمه

لوسمی لنفوسیتی مزمن (CLL) نوعی از بدخیمی است که با تجمع لنفوسیت‌های غیر تکثیرشونده که اغلب در مرحله G0 از سیکل سلولی متوقف شده‌اند، در خون محیطی و مغز استخوان مشخص می‌شود. هر چند اکثر موارد CLL ناشی از تکثیر منوکلونال لنفوسیت‌های B است (B-CLL) اما اختلالات سلول‌های T مکرراً گزارش شده [۲-۱] و بررسی علل ناهنجاری‌های ناشی از سلول‌های T یک هدف جاذب برای مطالعات در دهه اخیر بوده است. بیماران مبتلا به B-CLL در معرض ابتلا به انواع عفونت‌ها، هم در اثر اختلالات ایمنی مربوط به بیماری اولیه و هم در اثر عوارض درمان هستند. معرفی آنالوگ‌های پورین نظیر فلودارابین و آنتی‌بادی‌های منوکلونال نظیر Campath-1H جهت درمان این بیماران نرخ عفونت با ویروس‌هایی مانند CMV را افزایش داده است [۹-۳]. تغییرات مرفولوژیک و اختلالات عملی سلول‌های T در B-CLL گزارش شده است [۱۲-۱۰]. هم‌چنین اختلالات اتوایمیون در این بیماران دیده شده است که اختلال عملی سلول‌های T را مطرح می‌نماید [۱۳]. به نظر می‌رسد نامتعادل بودن زیر گروه‌های سلول‌های T عامل اصلی چنین اختلالاتی باشد، اما مکانیسم دقیق آن نامشخص است. اخیراً افزایش شدید لنفوسیت‌هایT سیتوتوکسیک $CTLA4^+$ در CLL گزارش شده است [۱۴] که ممکن است مسئول بخشی از این عدم تعادل ایمنی باشد.

در جمعیت لنفوسیت‌های T از هر دو زیر گروه $CD4^+$ و $CD8^+$ افزایش سلول‌های $CD28^-$ و $CD57^+$ (بیانگر فنوتیپ سلول‌های خاطره‌ای effector) گزارش شده و هم‌چنین افزایش بیان بعضی از فامیل‌های Vβ دیده شده است [۱۶-۱۵]. لنفوسیت‌های $CD28^-$ و $CD4^+$ تا حد زیادی اختصاصی CMV هستند و تنها در اثر تحریک با این آنتی‌ژن تکثیر می‌یابند [۱۷].

مکانیسم دقیق سوق دادن سلول‌های T به سمت تکثیر کلونال در این بیماری هنوز به خوبی روشن نیست. چنین سلول‌های T تکثیر یافته ممکن است در تشخیص سلول‌های توموری درگیر باشند و یا بخشی از یک بد تنظیمی عمومی سیستم ایمنی محسوب شوند. از طرف دیگر این سلول‌ها ممکن است اختصاصی برای پاتوژن‌های خاص باشند. به علت این که شواهد موجود بر اختصاصی بودن این سلول‌ها به آنتی‌ژن‌های توموری متقاعد کننده نیستند مطالعه حاضر بر آنتی‌ژن‌های ویروسی اختصاص یافت. آنتی‌ژن‌های ویروسی پس از تحریک، سلول‌های $CD4^+$ و $CD8^+$ را به طرف تکثیر کلونال سوق می‌دهند و سیتو مگالوویروس (CMV) محتمل‌ترین عامل درگیر در این پدیده در CLL است. تنها مقاله چاپ شده موجود در این زمینه مطالعه Mackus و همکاران است که افزایش سلول‌های $CD8^+$ اختصاصی CMV را در CLL نشان می‌دهد، اما پاسخ اختصاصی سلول‌های $CD4^+$ تاکنون در این بیماران مورد مطالعه قرار نگرفته و ارتباط آن با پاسخ سلول‌های $CD8^+$ بررسی نشده است [۱۸]. سرولوژی مثبت CMV در افراد مسن با تغییرات وسیع در زیر گروه‌های سلول‌های T [۲۰-۱۹] و هم‌چنین کاهش بقاء [۲۱] همراه بوده است.

از آن‌جا که CMV برای همیشه در میزبان باقی می‌ماند و سلول‌های T ($CD57^+$ و $CD28^-$) در افراد مسن دارای سرولوژی مثبت CMV نسبت به افراد سرولوژی منفی افزایش می‌یابد، در این جا فرضیه ارتباط اختلالات سلول‌های T در CLL با CMV مطرح گردید. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط تغییرات سلول‌های T در B-CLL با سرولوژی مثبت CMV و تعیین سطح پاسخ ایمنی اختصاصی سلول‌های $CD8^+$ و$CD4^+$ نسبت به CMV در این بیماران بود. تعیین تولید میزان سیتوکین‌ها، یک شاخص با ارزش در مطالعه پاسخ ایمنی نسبت به عوامل بیماری‌زا و سایر محرک‌های ایمونولوژیک است. اخیراً روش فلوسایتومتری برای بررسی تولید سیتوکین‌ها در سلول‌های T در پاسخ به محرک‌های آنتی‌ژنیک استفاده شده است. آنتی‌بادی‌های منوکلونال آنتیCD28 و آنتی CD49d به عنوان کمک تحریکی استفاده شده‌اند. CD49d یک α اینتگرین است که همراه با CD29 بر روی سطح سلول T وجود دارد. آنتی‌بادی آن به فعال شدن مناسب این سلول کمک می‌کند [۲۲]. در دسترس بودن تکنیک تترامر و امکان تهیه تترامرهای CMV امکان مطالعه

لنفوسیت‌های $CD8^+$ سیتوتوکسیک اختصاصی CMV را فراهم ساخت. تترامر، تعیین مستقیم سلول‌های T اختصاصی آنتی‌ژن را امکان‌پذیر می‌نماید.

مواد و روش‌ها

بیماران و گروه شاهد: مطالعه از نوع مقطعی و گروه مورد مطالعه ۷۳ بیمار مبتلا به B-CLL بودند که به درمانگاه CLL بیمارستان سلیاک بیرمینگهام انگلستان مراجعه می‌کردند. ۴۱ نفر آن‌ها دارای سرولوژی مثبت CMV بودند و میانگین سنی آن‌ها ۷۴/۶ سال بود. بیماران در مراحل مختلف بیماری قرار داشتند. گروه کنترل ۳۵ فرد سالم دارای سرولوژی مثبت CMV در همان گروه سنی با میانگین ۷۳/۱۷ سال بودند. از ۳۰ فرد دارای سرولوژی منفی CMV در همان گروه سنی جهت تأیید اختصاصی بودن پاسخ‌های ایمنی استفاده شد.

مثبت بودن CMV با استفاده ازکیت الیزای CMV IgG مشخص شد. آزمایشات پاسخ سلول‌های $CD4^+$ بر روی خون کامل و آزمایشات پاسخ سلول‌های $CD8^+$ بر روی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) انجام گردید. شمارش مطلق لنفوسیت‌ها با شمارنده سلولی اتوماتیک COULTER انجام شد.

تحریک آنتی‌ژنیک و تعیین سیتوکین‌های داخل سلولی: فراوانی لنفوسیت‌های $CD4^+$ اختصاصی CMV بر اساس روشی که قبلاً بیان شده بود تعیین گردید [۲۲]. به طور خلاصه، خون کامل در لوله‌های پروپیلن تقسیم گردید و آنتی‌بادی‌های منوکلونال آنتیCD28 و آنتیCD49d با غلظت نهایی ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر به آن‌ها اضافه گردید. سپس به لوله‌های اصلی، لیزات CMV و به کنترل مثبت SEB (آنتروتوکسین B استافیلوکوک) اضافه شد و نمونه بدون محرک آنتی‌ژنیک به عنوان کنترل منفی نگهداری شد.

لوله‌های آزمایش در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۶ ساعت نگهداری شدند و در ۴ ساعت نهایی، BrefeldinA (برای مهار خروج سیتوکین‌ها از سلول) با غلظت نهایی ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به آن اضافه شد. پس از پایان زمان کشت، EDTA با غلظت نهایی ۲ میلی‌مول به لوله‌ها اضافه شد و مدت ۱۵ دقیقه در حرارت اتاق نگهداری گردید. گلبول‌های قرمز لیز شده و گلبول‌های سفید به منظور ثابت شدن به مدت ۱۰ دقیقه در حرارت اتاق در مجاورت محلول لیزکننده FACS قرار گرفتند. سپس سلول‌ها به وسیله محلول شستشو دهنده شسته شدند و محلول نفوذپذیرکننده FACS (Fluorescence activated cell sorter) به مدت ۱۰ دقیقه به آن‌ها اضافه شد. پس از آن سلول‌ها با محلول ویژه شستشو شسته و آماده رنگ‌آمیزی شدند.

رنگ‌آمیزی سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های منوکلونال: سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های منوکلونال کنژوگه $CD4^+$ و یکی از آنتی‌بادی‌های IFN-γ , TNF-α و IL-2 به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت اتاق در تاریکی مجاور گردیدند. این سلول‌ها سپس شسته شده و در پارافرم آلدئید ۱٪ در PBS ثابت شده و برای آنالیز فلوسایتومتری آماده گردیدند. در هر لوله آزمایش حداقل ۵۰۰۰۰ سلول $CD4^+$ شمرده شد.

آنالیز سلولی بر اساس SSC (side scatter) در مقابل FSC (forward scatter) محدود به لنفوسیت‌ها شد و سپس محدوده $CD4^+$ در مقابل SSC مشخص گردید. اطلاعات به دست آمده از فلوسایتومتری سپس با نرم‌افزار WINMDI بررسی گردید و فلورسانس یک سیتوکین خاص در لنفوسیت‌های +CD4 که پس از تحریک CD69 را نیز بیان می‌کردند، بررسی شد.

روش تهیه تترامر: تترامرهای کلاس ۱ پپتیدهای CMV در آزمایشگاه محل انجام طرح بر طبق روش استاندارد ساخته شد [۲۳]. به طور خلاصه، زنجیره سنگین اصلاح شده کلاس ۱ MHC و β2M در E.coli ساخته شد. پروتئین‌های خالص شده با اضافه کردن پپتید مورد نظر از CMV همراه با بیوتین ضمن اتصال به بیوتین حول پپتید تشکیل منومر داد. سپس با اضافه کردن فایکو اریترین (PE) فلوروکروم کنژوگه با استرپتاویدین تترامر به وجود آمد. تترامر حاصل می‌تواند سلول‌های T اختصاصی پپتید مورد استفاده در تترامر را شناسایی کند. هر تترامر با سه حرف که علامت اختصاری پپتید آن است مشخص می‌شود.

رنگ‌آمیزی سلول‌ها با تترامر و آنتی‌بادی: 5×10^5 PBMC یا PBMC بدون B-Cell (با حذف سلول‌های B با روش Panning با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال آنتی‌CD19) با ۰/۱-۰/۵ گرم تترامر در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه مجاور گردید. پس از شستشو با بافر شستشودهنده سلول‌ها با آنتی‌بادی منوکلونال CD8 به مدت ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد مجاور گردیدند. سپس سلول‌ها شسته شده و با پارافرم آلدئید ۱٪ ثابت شده و برای آنالیز فلوسایتومتری آماده شدند.

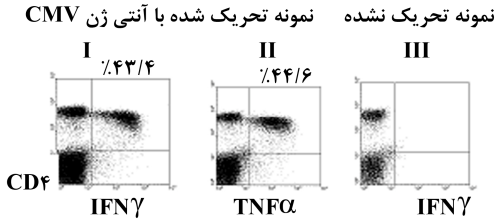
آنتی‌بادی‌های منوکلونال و سایر معرف‌ها: آنتی‌بادی‌های Anti IFN-γ (FITC,PE), anti-IL-2 (FITC,PE), anti-TNF-α (FITC,PE), mouse IgG_{2a} (FITC, PE), mouse IgG1 (FITC,PE), anti CD49d (pure), anti CD28 (pure) از شرکت Becton-Dickinson، immunocytometry system و CD4 (ECD, PC5), CD8 (FITC), CD3(PE) CD69(PC5) از Coulter immunology، SEB، BrefeldinA و EDTA از شرکت Sigma و لیزات CMV از شرکت Microbyx biosystem خریداری شد.

آنالیزهای آماری: مقایسه بین گروه‌ها با استفاده از Mann-Whitney U Test انجام گرفت. در تمام موارد P value کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد. همبستگی با استفاده از تست اسپیرمن (غیر پارامتریک) بررسی شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Graph pad prism رسم گردیدند.

نتایج

۱- تعیین داخل سلولی سیتوکین‌های مختلف در لنفوسیت‌های T- یاری‌رسان ($CD4^+$) با روش فلوسایتومتری در بیماران B-CLL .پس از تحریک خون کامل با لیزات CMV سیتوکین‌های داخل سلولی با فلوسایتومتری تعیین گردیدند. بیماران دارای سرولوژی منفی CMV هیچ پاسخی به CMV نشان ندادند.

شکل۱ رنگ‌آمیزی داخل سلولی سیتوکین‌ها را در یک بیمار به عنوان نمونه نشان می‌دهد. در این بیمار ۴۳/۴٪ از سلول‌های +CD4 در پاسخ به تحریک با CMV، IFN-γ را تولید کرده بودند. در بیماران CLL فراوانی بالایی از سلول‌های T اختصاصی CMV مشاهد شد. TNF-α و IFN-γ الگوی مشابهی داشتند، در حالی که میزان IL-2 کمتر بود. (شکل ۱).



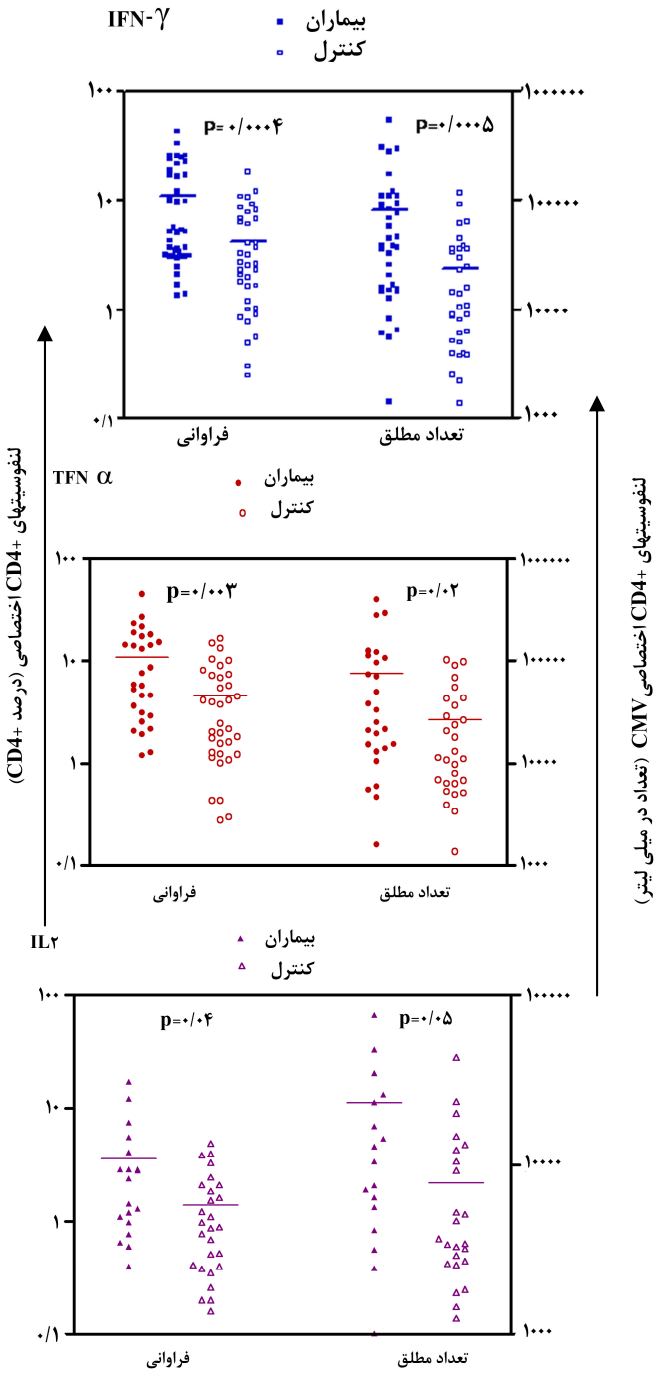
شکل ۱- تعیین فراوانی لنفوسیت‌های T اختصاصی CMV از زیر گروه $CD4^+$ و تصویر فلوسایتومتری از رنگ آمیزی داخل سلولی سیتوکین‌ها در یک بیمار CLL . فراوانی بالایی از لنفوسیت‌های $CD4^+$ پاسخ دهنده (با تولید IFN-γ و TNF-α) به تحریک آنتی‌ژنیک با لیزات CMV در بیمار مشاهده می‌شود. ٤٤/٦ ٪ از سلول‌های $CD4^+$ اختصاصی CMV بوده‌اند. شکل III کنترل منفی است و عدم پاسخ نسبت به لیزات سلول‌های کشت فاقد CMV را نشان می‌دهد.

۲- مقایسه بین فراوانی لنفوسیت‌های T ،$CD4^+$ اختصاصی CMV در بیماران مبتلا به B-CLL و گروه شاهد.

در مطالعه حاضر، فراوانی بالای سلول‌های $CD4^+$,T اختصاصی CMV نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. با توجه به تغییر نسبت زیر گروه‌های T در بیماران CLL لازم بود که انعکاس افزایش فراوانی این سلول‌ها را در تعداد مطلق سلول‌های اختصاصی بررسی کنیم. شکل ۲ مقایسه فراوانی و تعداد مطلق سلول‌های $CD4^+$ اختصاصی CMV در بیماران و گروه شاهد را نشان می‌دهد.

جدول ۱ فراوانی سلول‌های تولیدکننده TNF-α, IFN-γ و IL-2اختصاصی CMV را در بیماران و گروه شاهد مقایسه می‌کند. فراوانی سلول‌های $CD4^+$ T تولیدکننده IFN-γ در بیماران تا ۴۳/۴ با میانه ۱۰/۹۹ بود در حالی که در گروه شاهد تا ۱۸/۲٪ با میانه ۴/۳٪ بود (p=۰/۰۰۰۱). در مورد TNF-α الگوی فراوانی مشابهی مشاهده شد (میانه ۱۱ در بیماران در مقایسه با ۴/۶ در گروه شاهد، p=۰/۰۰۳) و در هر دو حالت تفاوت بین بیماران و گروه شاهد معنی‌دار بود. در مورد فراوانی سلول‌های تولیدکننده IL-2 تفاوت کمتری بین بیماران و گروه شاهد دیده شد هر چند هنوز تفاوت آن‌ها معنی‌دار بود. اطلاعات به دست آمده نشان داد که تولید سیتوکین‌های التهابی در هر بیمار از الگوی مشابه تبعیت می‌کند، به طوری که بیمارانی که دارای فراوانی بیشتری از

سلول‌های تولیدکننده IFN-γ بودند، دارای فراوانی بیشتری از TNF-α و IL-2 نیز بودند. (شکل ۲ و جدول ۱)



شکل ۲- فراوانی و تعداد مطلق لنفوسیت‌های $CD4^+$ تولیدکننده سیتوکین‌های مختلف در بیماران و گروه شاهد پس از تحریک با لیزات CMV و رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی‌های منوکلونال ضد $CD4^+$ و آنتی‌سیتوکین: محور عمودی راست تعداد مطلق و محور چپ فراوانی را نشان می‌دهد. فراوانی و تعداد مطلق لنفوسیت‌های $CD4^+$ اختصاصی CMV در هر فرد با یک نقطه مشخص شده است. میانه در هر گروه با خط افقی نشان داده شده است.

جدول ۱- مقایسه فراوانی سلول‌های $CD4^+$ اختصاصی CMV در بیماران CLL و گروه کنترل هم سن. درصد بالایی از لنفوسیت‌های $CD4^+$ نسبت به تحریک با لیزات CMV با تولید سیتوکین پاسخ داده‌اند.

درصد لنفوسیت‌های $CD4^+$ اختصاصی CMV تولید کننده یک نوع سیتوکین		بیماران CLL	گروه شاهد	ارزش P
IFN-γ	محدوده	۱/۴-۴۳/۴	-۱۸/۲	۰/۰۰۰۴
	تغییرات		۰/۳	
	میانه	۱۰/۹۹	۴/۳	
TNF-α	محدوده	-۴۴/۶	-۱۶/۷	۰/۰۰۳
	تغییرات	۱/۲۲	۰/۳	
	میانه	۱۱	۴/۶	
IL-2	محدوده	۰/۴-۱۷/۱	-۴/۹	۰/۰۴
	تغییرات		۰/۱۶	
	میانه	۳/۶۱	۱/۳۴	

۳- رنگ‌آمیزی PBMC بیماران CLL با تترامرهای CMV.

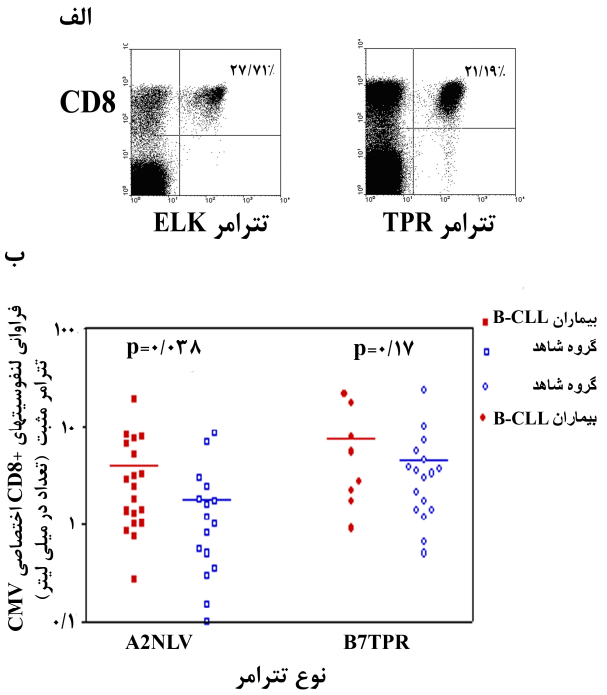
در بیماران مبتلا به B-CLL که دارای سرولوژی مثبت CMV بودند تعیین HLA کلاس I با روش PCR انجام شد. ۳۷ بیمار حداقل یکی از فنوتیپ‌های HLA-B8 , HLA-B7, HLA-A2, HLA-A1 را دارا بودند که تترامر لازم برای آن‌ها موجود بود.

برای این بیماران با استفاده از تترامرهای CMV موجود که شامل B8 ELK/ELR, B7TPR, A1VTE, A1YSE, A2VLE, A2NLV بود، رنگ‌آمیزی تترامر انجام شد. شکل ۳- الف نمونه‌ای از رنگ آمیزی تترامر را در دو بیمار نشان می‌دهد.

۴- مقایسه فراوانی لنفوسیت‌های $CD8^+$ اختصاصی CMV تترامر مثبت در بیماران و گروه شاهد.

میانگین فراوانی سلول‌های NLV مثبت در بیماران ۴٪ (محدوده تغییرات: ۱۹/۲٪ - ۰/۲۱٪) و در گروه شاهد ۱/۴٪ (محدوده تغییرات: ۸/۵٪-۰/۰۰۴٪) بود و تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده شد(شکل ۳- ب). در مورد TPR در بیماران میانگین فراوانی سلول‌های مثبت ۷/۸٪ (محدوده تغییرات: ۲۱/۱۹٪- ۰/۹٪) و در گروه شاهد ۴/۱ ٪ بود. در

بعضی از بیماران TPR و NLV هر دو مثبت بود و در کلیه این موارد فراوانی سلول‌های TPR مثبت بیش از NLV مثبت بـود. (شکل ۳)

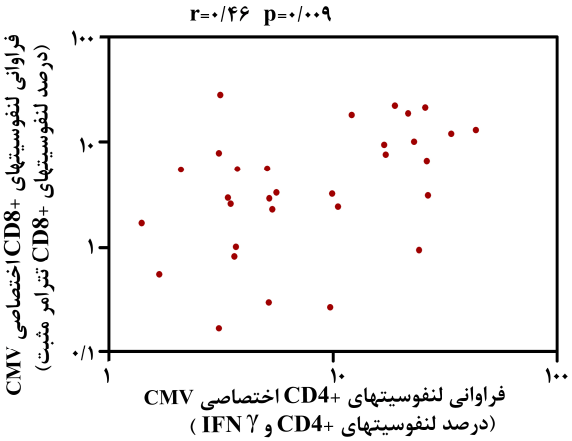


شکل۳- افزایش فراوانی لنفوسیت‌های T اختصاصی CMV از زیر گروه $CD8^+$ در بیماران CLL

الف- دو تصویر فلوسایتومتری از دو بیمار CLL که یکی دارای HLA-B8 (دارای توانایی شناسایی پپتید ELK) و دیگری دارای HLA-B7 (دارای توانایی شناسایی پپتید TPR)بوده‌اند دیده می‌شود. در این دو بیمار فراوانی بالایی از لنفوسیت‌های $CD8^+$ تترامر مثبت مشاهده می‌شود. ب- فراوانی لنفوسیت‌های $CD8^+$ واکنش داده با تترامر NLV (HLA-A2) وTPR(HLA-B7) در بیماران و گروه شاهد با یکدیگر مقایسه شد. هر نقطه بیانگر درصد سلول‌های $CD8^+$ تترامر مثبت در یک فرد است و خط افقی میانه را نشان می‌دهد.

۵- همبستگی فراوانی لنفوسیت‌های $CD4^+$ و $CD8^+$ اختصاصی CMV در بیماران CLL .

با توجه به افزایش هر دو گروه از لنفوسیت‌ها یعنی سلول‌های $CD4^+$ و سلول‌های $CD8^+$ اختصاصی CMV در بیماران، فراوانی لنفوسیت‌های $CD4^+$ اختصاصی CMV در پاسخ به تحریک آنتی‌ژنیک با فراوانی سلول‌های $CD8^+$ تترامر مثبت مقایسه شد (شکل ۴).



شکل ٤- همبستگی بین پاسخ لنفوسیت‌های $CD4^+$ نسبت به آنتی‌ژن CMV و لنفوسیت‌های $CD8^+$ واکنش‌دهنده با تترامرهای CMV

همبستگی مثبت معنی‌داری بین میزان پاسخ لنفوسیت‌های $CD4^+$ نسبت به آنتی‌ژن CMV (با روش رنگ‌آمیزی داخل سلولی سیتوکین‌ها) و لنفوسیت‌های $CD8^+$ واکنش‌دهنده با تترامرهای CMV مشاهده می‌شود (p=./۰۰۹ و r=۰/۴۶) (شکل ۴).

بحث

نتایج این مطالعه تأثیر عمیق CMV و پاسخ اختصاصی به CMV توسط سلول‌های T را در تغییرات لنفوسیت‌های T در بیماران B-CLL نشان داد. سرولوژی مثبت CMV به عنوان یک عامل منفی در پیش‌آگهی بیماران پیوند شده شناخته شده است [۲۴]. CMV همچنین همراه با مایکوزیس فونگوئید و سندروم سزاری گزارش شده است [۲۵] که نشان‌دهنده این است که تحریک مزمن آنتی‌ژنیک باعث پرولیفراسیون سلول‌های T می‌شود. مطالعه حاضر معکوس شدن نسبت $CD4^+/CD8^+$ را در بیماران CLL دارای سرولوژی مثبت CMV اما نه در بیماران سرولوژی منفی نشان داد (نتایج نشان داده نشده‌اند) که بیانگر به هم خوردن توزیع طبیعی زیر گروه‌های لنفوسیت‌های T در بیماران دارای سرولوژی مثبت است. با این حال تعداد مطلق لنفوسیت‌های $CD4^+$ نیز نسبت به گروه شاهد افزایش داشت. در این مطالعه پاسخ ایمنی اختصاصی بسیار شدید لنفوسیت‌های $CD4^+$ نسبت به CMV در بیماران CLL دارای سرولوژی مثبت دیده شد. با محاسبه تعداد مطلق لنفوسیت‌های $CD4^+$ مشخص

گردید که تعداد مطلق لنفوسیت‌های $CD4^+$ اختصاصی CMV نیز به طور قابل ملاحظه‌ای نسبت به گروه شاهد افزایش دارد.

این موضوع ممکن است بیانگر این باشد که افزایش مطلق لنفوسیت‌های $CD4^+$ در بیماران CLL با سرولوژی مثبت CMV در واقع انعکاس افزایش لنفوسیت‌های $CD4^+$ اختصاصی CMV است. نقش سیتوکین‌ها در بقاء لنفوسیت‌های B در CLL در مطالعات مختلف نشان داده شده است. علی‌رغم بقاء طولانی مدت این سلول‌ها در بدن، در محیط کشت این سلول‌ها به سرعت از بین می‌روند. این امر بیانگر این است که در داخل بدن عواملی وجود دارند که به حفاظت این سلول‌ها کمک می‌کنند. IL-2 و IFN-γ به عنوان عوامل کاهش‌دهنده اپوپتوز خودبخودی سلول‌های B در CLL گزارش شده‌اند [۲۷-۲۶]. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که سیتوکین‌های ترشح شده از سلول T نقش بیشتری نسبت به سلول‌های B در ماندگاری سلول‌های B دارند [۲]. همه این مطالعات با استفاده از میتوژن‌های عمومی انجام شده است .در مطالعه حاضر پاسخ به آنتی‌ژن‌های اختصاصی ویروس CMV بررسی شده است. پاسخ اختصاصی سلول‌های $CD4^+$ به CMV اساساً پاسخ TH1 است. عقیده بر این است که CMV در افراد طبیعی گاهی فعال می‌گردد اما سیستم ایمنی آن را کنترل می‌کند [۲۸]. آیا این فعال شدن در بیماران CLL مکررتر اتفاق می‌افتد، مشخص نیست. احتمال دارد که چنین فعال شدنی منجر به افزایش لنفوسیت‌های اختصاصی در بیماران گردد و یکی از عوامل افزایش سیتوکین‌هائی باشد که در CLL گزارش شده است. این افزایش ممکن است در اثر سلول‌های اختصاصی CMV باشد. سلول‌های $CD4^+$ سیتوتوکسیک پرفورین مثبت قادر به سوق دادن سلول‌های B به سمت اپوپتوز بوده‌اند. اما این کار تنها در حضور آنتی‌بادی‌های منوکلونال با استفاده از سلول‌های کشت شده امکان‌پذیر گشته است [۲۹]. مطالعات اولیه رنگ‌آمیزی پرفورین در این مطالعه نشان داد که بعضی از سلول‌های T زیر گروه $CD4^+$ اختصاصی CMV، مثبت هستند. با این حال داده‌ها برای نتیجه‌گیری کافی نمی‌باشند.

در مطالعه حاضر، بیماران فراوانی بیشتری از لنفوسیت‌های $CD8^+$ اختصاصی CMV نسبت به گروه شاهد نشان دادند که در توافق با مطالعه Kater AP و همکاران می‌باشد [۳۰]. این یافته نشان می‌دهد که این بیماران احتمالاً لنفوسیت‌های $CD8^+$ کافی برای کنترل عفونت CMV دارند. در مطالعه Mackus و همکاران سلول‌های $CD8^+$ اختصاصی CMV فنوتیپ سیتوتوکسیک داشته‌اند [۱۸]. همانند پاسخ ایمنی سلول‌های $CD4^+$، چنین سطحی از پاسخ نسبت به CMV بالاترین پاسخ گزارش شده به جز در بیماران پیوندی است.

این مطالعه به وضوح نشان داد که بین تغییرات کمی در زیر گروه‌های سلول‌های T و سرولوژی CMV در بیماران CLL ارتباط وجود دارد. این مطالعه زمینه جدیدی از تحقیق را در B-CLL گشود و سؤالاتی را نیز برانگیخت. ارتباط بین سطوح سلول‌های $CD8^+$ و $CD4^+$ اختصاصی CMV و میزان ویروس در خون محیطی می‌تواند از موضوعات قابل تحقیق در این زمینه باشد. هم‌چنین با توجه به دخالت گونه خاصی از ویروس در آنمی‌آپلاستیک و در نوتروپنی کشنده در بیماران پیوند شده [۱۳] احتمال دارد سوش خاصی از ویروس با پیش‌آگهی بدتری در بیماران همراه باشد که از زمینه‌های قابل بررسی است.

آیا اختصاص یافتن نسبت بالایی از لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک به یک ویروس نقشی در پی آمد بالینی چنین بیمارانی دارد؟ محدودیت زمان مطالعه و تعداد بیماران، بررسی چنین موضوعی را غیرممکن می‌نمود. با این حال نسبت مرگ و میر، ابتلاء به سرطان‌های ثانویه و ابتلاء به عفونت‌های ویروسی غیرمعمول در مدت مطالعه در بیماران CMV مثبت به مراتب بیش از بیماران CMV منفی بود.

سرولوژی مثبت CMV در افراد سالم مسن همراه با معکوس شدن نسبت سلول‌های $CD4^+/CD8^+$ و کوتاه شدن طول عمر بوده است [۳۲-۳۱]. در این مطالعه افزایش قابل ملاحظه لنفوسیت‌های T اختصاصی CMV همراه با معکوس شدن نسبت سلول‌های $CD4^+/CD8^+$ در بیماران CLL سرولوژی مثبت یافت شد که ممکن است در ابتلا به عفونت‌های غیر معمول در این بیماران نقش داشته باشد.

نتیجه‌گیری

CMV یک ویروس پایدار است و سیستم ایمنی نقش مهمی در کنترل تکثیر ویروس بازی می‌کند. فعال شدن مکرر باعث تکرار تحریک سلول‌های T و تجمع تعداد زیادی از سلول‌های اختصاصی T می‌شود. این فعال شدن ممکن است در بیماران داری نقص ایمنی به طور مکررتری اتفاق افتد. این دوره‌های مکرر فعال شدن می‌تواند پاسخ ایمنی را به سمت افزایش سلول‌های T اختصاصی CMV سوق دهد که همان حالتی است که در بیماران مطالعه حاضر دیده شد. این موضوع پیشنهاد می‌کند که CMV ممکن است سیستم ایمنی را در چنین بیمارانی به سمت فتوتیپ تمایز یافته‌تر سلولی سوق دهد که همراه با افزایش عفونت در این موارد است.

تشکر و قدردانی

این مقاله قسمتی از طرح دکترای تخصصی است که با حمایت مالی وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی در دانشگاه بیرمینگهام انگلستان انجام شده است که بدین وسیله از وزارتخانه فوق قدردانی می‌شود.

References

[1] Kiaii S, Choudhury A, Mozaffari F, Rezvany R, Lundin J, Mellstedt H, et al. Signaling molecules and cytokine production in T cells of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: long-term effects of fludarabine and alemtuzumab treatment. *Leuk Lymphoma*, 2006; 47(7): 1229-38.

[2] Podhorecka M, Dmoszynska A, Rolinski J. Intracellular IFN-gamma expression by CD3+/CD8+ cell subset in B-CLL patients correlates with stage of the disease. *Eur J Haematol*, 2004; 73(1): 29-35.

[3] Christian BA, Lin TS. Antibody therapy for chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol*, 2008; 45(2): 95-103.

[4] Hillmen P, Skotnicki AB, Robak T, Jaksic B, Dmoszynska A, Wu J, et al. Alemtuzumab compared with chlorambucil as first-line therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*, 2007; 25(35): 5616-23.

[5] Laros-van Gorkom BA, Huisman CA, Wijermans PW, Schipperus MR. Experience with alemtuzumab in treatment of chronic lymphocytic leukaemia in the Netherlands. *Neth J Med,* 2007; 65(9): 333-8.

[6] O'Brien SM, Keating MJ, Mocarski ES. Updated guidelines on the management of cytomegalovirus reactivation in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with alemtuzumab. *Clin Lymphoma Myeloma*, 2006 ; 7(2): 125-30.

[7] Church J, Goyal S, Tyagi AK, Scott RA, Stavrou P. Cytomegalovirus retinitis in chronic lymphocytic leukaemia. Eye. 2007; 21(9): 1230-3.

[8] Lin TS, Flinn IW, Lucas MS, Porcu P, Sickler J, Moran ME, et al. Filgrastim and alemtuzumab (Campath-1H) for refractory chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 2005; 19(7): 1207-10.

[9] Laurenti L, Piccioni P, Cattani P, Cingolani A, Efremov D, Chiusolo P, et al. Cytomegalovirus reactivation during alemtuzumab therapy for chronic lymphocytic leukemia: incidence and treatment with oral ganciclovir. *Haematologica*, 2004; 89(10): 1248-52.

[10] Mainou-Fowler T, Miller S, Proctor SJ, Dickinson AM. The levels of TNF alpha, IL4 and IL10 production by T-cells in B-cell chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL). *Leuk Res*, 2001; 25(2): 157-63.

[11] Scrivener S, Kaminski ER, Demaine A, Prentice AG. Analysis of the expression of critical activation/interaction markers on peripheral blood T cells in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: evidence of immune dysregulation. *Br J Haematol*, 2001; 112(4): 959-64.

[12] Scrivener S, Goddard RV, Kaminski ER, Prentice AG. Abnormal T-cell function in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma*, 2003; 44(3): 383-9.

[13] Mauro FR, Foa R, Cerretti R, Giannarelli D, Coluzzi S, Mandelli F, et al. Autoimmune hemolytic anemia in chronic lymphocytic leukemia: clinical, therapeutic, and prognostic features. *Blood*. 2000; 95(9): 2786-92.

[14] Beyer M, Kochanek M, Darabi K, Popov A, Jensen M, Endl E, et al. Reduced frequencies and suppressive function of

CD4+CD25hi regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine. *Blood.* 2005; 106(6): 2018-25.

[15] Rezvany MR, Jeddi-Tehrani M, Osterborg A, Kimby E, Wigzell H, Mellstedt H. Oligoclonal TCRBV gene usage in B-cell chronic lymphocytic leukemia: major perturbations are preferentially seen within the CD4 T-cell subset. *Blood*. 1999; 94(3): 1063-9.

[16] Serrano D, Monteiro J, Allen SL, Kolitz J, Schulman P, Lichtman SM, et al. Clonal expansion within the CD4+CD57+ and CD8+CD57+ T cell subsets in chronic lymphocytic leukemia. *J Immunol*, 1997; 158(3): 1482-9.

[17] van Leeuwen EM, Remmerswaal EB, Vossen MT, Rowshani AT, Wertheim-van Dillen PM, van Lier RA, et al. Emergence of a CD4+ CD28- Granzyme B+ Cytomegalovirus-specific T cell Subset after Recovery of primary Cytomegalovirus Infection. *J Immunol*,, 2004; 173: 1834-41.

[18] Mackus WJ, Frakking FN, Grummels A, Gamadia LE, De Bree GJ, Hamann D, et al. Expansion of CMV-specific CD8+CD45RA+ CD27-T cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2003; 102(3): 1057-63.

[19] Olsson J, Wikby A, Johansson B, Lofgren S, Nilsson BO, Ferguson FG. Age-related change in peripheral blood T-lymphocyte subpopulations and cytomegalovirus infection in the very old the Swedish longitudinal OCTO immune study. *Mech Ageing Dev*, 2000; 121(1-3): 187-201.

[20] Wikby A, Johansson B, Olsson J, Lofgren S, Nilsson BO, Ferguson F. Expansions of peripheral blood CD8 T-lymphocyte subpopulations and an association with cytomegalovirus seropositivity in the elderly: the Swedish NONA immune study. *Exp Gerontol*, 2002; 37(2-3): 445-53.

[21] Looney RJ, Falsey A, Campbell D, Torres A, Kolassa J, Brower C, et al. Role of cytomegalovirus in the T cell changes seen in elderly individuals. *Clin Immunol*, 1999; 90(2): 213-9.

[22] Pourgheysari B, Khan N, Best D, Bruton R, Nayak L, Moss PA. The Cytomegalovirus-Specific CD4+ T-Cell Response Expands with Age and Markedly Alters the CD4+ T-Cell Repertoire. *J Virol*, 2007 ;81(14):7759-65.

[23] Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*, 1996; 274(5284): 94-6.

[24] Kroger N, Zabelina T, Kruger W, Renges H, Stute N, Schrum J, et al. Patient cytomegalovirus seropositivity with or without reactivation is the most important prognostic factor for survival and treatment-related mortality in stem cell transplantation from unrelated donors using pretransplant in vivo T-cell depletion with anti-thymocyte globulin. *Br J Haematol,* 2001; 113(4): 1060-71.

[25] Herne KL, Talpur R, Breuer-McHam J, Champlin R, Duvic M. Cytomegalovirus seropositivity is significantly associated with mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Blood*, 2003; 102(7): 2706-7.

[26] Zaki M, Douglas R, Patten N, Bachinsky M, Lamb R, Nowell P, et al. Disruption of the IFN-gamma cytokine network in chronic lymphocytic leukemia contributes to resistance of leukemic B cells to apoptosis. *Leuk Res*, 2000; 24(7):611-21.

[27] Scrivener S, Goddard RV, Kaminski ER, Prentice AG. Abnormal T-cell function in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma*, 2003; 44(3): 383-9.

[28] Toro AI, Ossa J. PCR activity of CMV in healthy CMV-seropositive individuals: dose latency need redefinition. *Res Virol*, 1996; 147(4): 233-8.

[29] Porakishvili N, Kardava L, Jewell AP, Yong K, Glennie MJ, Akbar A, et al. Cytotoxic CD4+ T cells in patients with B cell chronic lymphocytic leukemia kill via a perforin-mediated pathway. *Haematologica*, 2004; 89(4): 435-43.

[30] Kater AP, Remmerswaal EB, Nolte MA, Eldering E, van Oers MH, van Lier RA. Autologous cytomegalovirus-specific T cells as effector cells in immunotherapy of B cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 2004; 126(4): 512-6.

[31] Randolph-Habecker J, Iwata M, Torok-Storb B. Cytomegalovirus mediated myelosuppression. *J Clin Virol*, 2002; 25 Suppl 2: 51-6.

[32] Looney RJ, Falsey A, Campbell D, Torres A, Kolassa J, Brower C, et al. Role of cytomegalovirus in the T cell changes seen in elderly individuals. *Clin Immunol*, 1999; 90(2): 213-9.

High level of CMV-specific $CD4^+$ and $CD8^+$ Cells Immune Response and Correlation Between them in B-cell Chronic Lymphocytic Leukemia Patients

B. Pourgheysari[1], **P. Moss**[2]

Received: 10/09/07 **Sent for Revision: 05/03/08** **Received Revised Manuscript: 06/12/08** **Accepted: 30/12/08**

Background and Objective: Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by a monoclonal proliferation of lymphocytes mainly B cells (B-CLL) in the blood and bone marrow. Morphological and functional abnormalities of T cells and monoclonality of them have been documented in CLL. Such expanded cells may be specific for recognition of pathogens. Cytomegalovirus (CMV) is most likely involved in this phenomenon in CLL. CMV infection causes a high level of immune response in immunodeficient patients. In this study, the association between expanded T cells and the immune responses of CMV-specific $CD4^+$ and $CD8^+$ cells in B-CLL was investigated.

Matherials and Methods: This was a cross sectional study and the study group were 41 CMV seropositive B-CLL patients and 35 CMV seropositive healthy donors (control group). The level of CMV-specific $CD4^+$ and $CD8^+$ cells immune responses were detected by intracellular cytokine response to antigenic activation and CMV tetramer respectively.

Results: The level of CMV-specific $CD4^+$ cells responses was significantly higher in patients with a median of 10.99% and 11% for IFN-γ and TNF-α producing CD4+T cells respectively than age-matched controls with a median of 4.3% and 4.6 ($p= 0.0001$ for IFN-γ and $p= 0.003$ for TNF-α). The level of CMV-specific $CD8^+$ cells immune responses was also higher in patients compared to control group ($p= 0.03$ for NLV). There was a positive correlation between the level of $CD4^+$ and $CD8^+$ cells immune responses ($p=0.009$).

Conclusions: These results show the deep influence of CMV infection and the immune response to it in T-cell alteration in CLL patients. The increased level of CMV-specific T cells may be the cause of increased level of absolute T cells in these patients.

Key words: Chronic Lymphocytic Leukemia, Cytomegalovirus, T-Cell, Interferon γ, Tumor Necrosing Factor α

Funding: This work was supported by a scholarship from the Iranian Ministry of Health and Medical Education and UK Molecular Research Centre.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: Approval for this study was obtained from the South Birmingham Local Research Ethics Committee.

1- Assistant Prof., Dept. of Pathology and Hematology, University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran
(Corresponding Author) Tel: (0381)3339941, Fax: (0381)3334911, E-mail: bat238@yahoo.com
2- Prof., Dept. of Hematology, C.R.UK Institute for Cancer Studies, University of Birmingham, Birmingham, UK