اهمیت سرولوژی مثبت سیتومگالوویروس در تغییرات زیر گروه های لنفوسیت های $CD4^+$ و بیان نشانه های فنوتیپی آنها در لوسمی لنفوسیتی مزمن سلول B

دکتر بتول پور قیصری*[1]، مهدی بنی طالبی**

*استادیار هماتولوژی –مرکز تحقیقات گیاهان دارویی- دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، **کارشناس ارشد هماتولوژی-مرکز تحقیقات سلولی، مولکولی-دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد و دانشجوی دکتری پزشکی ملکولی دانشگاه علوم پزشکی تهران.

تاریخ دریافت:۸۸/۸/۲۳ تاریخ تایید:۸۸/۱۰/۷

چکیده:

زمینه و هدف: **لوسمی لنفوسیتی مزمن سلول B (B-CLL) یک بیماری بدخیم لنفوسیت های B است که همراه با تغییرات متعددی در لنفوسیت های T غیر بدخیم می باشد. با توجه به اینکه آنتی ژن های ویروسی می توانند تغییرات قابل توجهی در لنفوسیت های T ایجاد نمایند و سیتومگالوویروس (CMV) در افراد پیر سالم باعث تغییرات گوناگون در لنفوسیت های T بوده است، لذا این مطالعه با هدف بررسی ارتباط بین تغییرات این سلول ها و CMV در بیماران CLL انجام شده است.**

روش بررسی: **در این مطالعهٔ توصیفی –تحلیلی ۷۹ بیمار مبتلا به B-CLL وارد مطالعه شدند (٤١ بیمار CMV^+ و ۳۸ بیمار CMV^-). بررسی زیر گروه های لنفوسیت های T و تعیین فنوتیپ سلول ها با استفاده از آنتی بادی های منوکلونال و فلوسایتومتری انجام شد. ترشح سیتوکسین ها پس از تحریک آنتی ژنیک و کشت کوتاه مدت و سپس با روش رنگ آمیزی داخل سلولی سیتوکین ها تعیین گردید. از آزمون آماری من ویتنی جهت مقایسه دو گروه استفاده شد.**

یافته ها: **در بیماران CMV^+، زیر گروه لنفوسیت های $CD8^+$ (Cluster of differentiation) و $CD4^+ CD8^{dim}$ به صورت معنی داری نسبت به بیماران CMV^- بیشتر بود (P<۰/۰۰۱). لنفوسیت های T تولید کنندهٔ اینترفرون گاما (IFN-γ) در بیماران CMV^+ بیشتر (P<۰/۰۵) و در مقابل لنفوسیت های تولید کنندهٔ اینتر لوکین ۲ (IL2) در بیماران CMV^- بیشتر بود (P<۰/۰۱). کاهش قابل توجه بیان شاخص های فنوتیپی CD45RA, CD28, CD27 و CCR7 در بیماران CMV^+ مشاهده شد (P<۰/۰۰۱)، در حالی که CD45RO و CD57 در این بیماران افزایش داشت (P<۰/۰۰۱).**

نتیجه گیری: **مثبت بودن CMV در بیماران B-CLL باعث بروز تغییرات گسترده در لنفوسیت های T و بروز فنوتیپ کاملاً تمایز یافته می گردد. بنابراین چنین تغییراتی در B-CLL تا حد زیادی وابسته به سرولوژی مثبت CMV است.**

واژه های کلیدی : سیتومگاویروس، سیتوکین، لوسمی لنفوسیتی مزمن، لنفوسیت T.

مقدمه:

لوسمی لنفوسیتی مزمن (CLL)، اغلب با تجمع لنفوسیت های B بدخیم (B-CLL) که $CD19^+ CD5^+$ (Cluster of differentiation) هستند در خون محیطی مشخص می شود. علاوه بر سلول های بدخیم تغییرات متعددی در لنفوسیت های T غیر بدخیم گزارش شده است که ممکن است با علت شناسی و پیشرفت بیماری ارتباط داشته باشد. تصور می شود این ناهنجاری‌ها باعث اختلال در تشخیص سلـــول های لوسمیک به وسیلـــه لنفوسیت هـــای T و بنابراین ناتوانی در حذف آنها و نیز افزایش خطر عفونت گردند. در این بیماران افزایش جمعیت لنفوسیت های T کاملاً متمایز که $CD57^+CD28^-$ هستند گزارش شده است (۱). فعال کردن مسیر انتقال پیام از طریق CD28 در محیط کشت باعث کاهش لنفوسیت های بدخیم B از ۸۵ به ۱ درصد یا کمتر گردیده است (۲). افـــزایش معنی دار تعـــداد لنفوسیت هـــای T خاطره ای اجرایی (Effectors memory) و مرکزی که

[1]نویسنده مسئول: شهرکرد-رحمتیه- دانشکده پزشکی- گروه هماتولوژی-تلفن: ۰۳۸۱-۳۳۳۵٦٥٤، E-mail:bat238@yahoo.com

$CD4^+$ هستند در گروه بیماران دارای ژن ایمنوگلوبولین جهش نیافته (UM-CLL) نسبت به بیماران دارای جهش (M-CLL) دیده شده است و همراه با پیشرفت بیماری و کوتاه بودن دوره ماندگاری بدون درمان بوده است (۳). وضعیت سیستم ایمنی بیمار از نظر سلول های T و کشنده طبیعی (NK) در زمان تشخیص با سرعت پیشرفت بیماری ارتباط دارد (۴). اختلالات لنفوسیت های T مکرراً در بیماران گزارش شده (۸-۵) و میزان بیان CD38 بر روی لنفوسیت های T و سلول های B-CLL به عنوان یک فاکتور تعیین پیش آگهی گزارش گردیده است (۹). بروز پدیده های خود ایمنی در این بیماران وجود دارد که علت مشخصی برای آن هنوز تعیین نشده است. اما اختلال لنفوسیت های T تنظیم کننده را مؤثر می دانند (۱۰).

Kiaii و همکاران افزایش میزان سلول های CD4 و CD8 تولید کننده اینترفرون گاما (IFN-γ) و اینترلوکین ۴ (IL-4) را در این بیماران مشاهده نموده اند (۱۰). افزایش درصد سلول های $CD152^+$ در هر دو گروه لنفوسیت های $CD4^+$ و $CD8^+$ دیده شده است (۱۱) که ممکن است دلیلی بر عدم پاسخ نسبت به سلول های توموری در CLL باشد. دلایل بروز چنین تغییرات گسترده ای در لنفوسیت های T در B-CLL هنوز به خوبی روشن نشده است و دلایل موجود بر اختصاصی بودن آنها به آنتی ژن های توموری چندان متقاعد کننده نیست. از طرف دیگر آنتی ژن های ویروسی می توانند تغییرات قابل توجهی در زیر گروه های لنفوسیت های T ایجاد نمایند. چنین تغییراتی در افراد مسن و سالم دارای سرولوژی مثبت CMV در جمعیت سلول های $CD8^+$ قبلاً گزارش شده بود (۱۴-۱۲) و ما نیز این تغییرات را در جمعیت سلول های $CD4^+$ در این افراد مشاهده نمودیم (۱۵). از طرف دیگر در بیماران CLL سطح بالایی از پاسخ ایمنی CD4 و CD8 نسبت به CMV وجود دارد (۱۶). تغییرات نسبت لنفوسیت ها، فنوتیپ سلول های T و اختلالات عملی آنها در CLL ممکن است با CMV مربوط باشد و مطالعه ما این ارتباط را بررسی می کند. بنابراین هدف از مطالعهٔ حاضر بررسی تاثیر مثبت بودن CMV بر تغییرات زیر گروه‌های لنفوسیت های T و فنوتیپ آنها در بیماران CLL بود.

روش بررسی:

مطالعه از نوع توصیفی -تحلیلی و گروه مورد مطالعه ۷۹ بیمار مراجعه کننده به درمانگاه CLL بیمارستان سیلیاک شهر بیرمینگهام انگلستان بودندکه با توجه به معیارهای تشخیصی CLL بیماری آنها قطعی شده و برای کنترل مراجعه می‌کردند. مثبت بودن CMV در بیماران با استفاده از کیت الیزای CMVIgG مشخص شد که ۴۱ نفر مثبت و ۳۸ نفر منفی بودند. شمارش مطلق لنفوسیت ها با استفاده از شمارنده سلولی Coulter تعیین گردید. آزمایشات تعیین زیر گروه ها و فنوتیپ ها بر روی سلول های تک هسته ای خون محیطی (PBMC) و آزمایش تعیین سیتوکین های داخل سلولی بر روی خون کامل انجام شد.

رنگ آمیزی سلول ها با آنتی بادی های منوکلونال

جهت بررسی زیر گروه های لنفوسیت های T، PBMC که از خون کامل جدا شده بود با آنتی بادی های منوکلونال کنژوگه CD4، CD3 و CD8 به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت اتاق در تاریکی مجاور گردیدند. سلول ها سپس شسته شده و در پارافرم‌آلدئید ۱ درصد در بافر فسفات (PBS) ثابت شده و برای آنالیز فلوسایتومتری آماده گردیدند. در مطالعهٔ فنوتیپ، سلول ها با آنتی بادی های منوکلونال CD3، CD4 و یکی از آنتی بادی های CD45RA،CD45RO، CD38، CD27، CD28، CD57، CCR7 مجاور گردیدند.

تحریک آنتی ژنیک با سوپر آنتی ژن و تعیین سیتوکین های داخل سلولی پس از کشت کوتاه مدت

فراوانی لنفوسیت های تولید کنندهٔ سیتوکین های خاص با روشی که قبلاً گزارش شده بـتعیین گردید (۱۷). خون کامل در لوله های پروپیلن تقسیم گردید و سوپر آنتی ژن SEB (انتروتوکسین B استافیلوکوک) به آنها

اضافه شد. لولهٔ بدون SEB به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. لوله ها در انکوباتور ۳۷°C به مدت ۶ ساعت نگهداری شدند و در ۴ ساعت آخر، Brefeldin A با غلظت نهایی ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر به آنها اضافه شد. پس از پایان زمان انکوباسیون، لوله ها با اتیلن دی‌آمین تترااستیک اسید (EDTA) به مدت ۱۵ دقیقه در حرارت اتاق تیمار شدند. سپس گلبول های قرمز لیز شده و گلبول های سفید تثبیت گردیدند. پس از آن لوله ها شسته شده و تحت تاثیر محلول نفوذ پذیر کننده قرار گرفتند. این سلول ها مجدداً شسته و آمادهٔ رنگ آمیزی شدند. سپس آنتی بادی منوکلونال CD4 و یکی از آنتی بادی های IFN-γ یا IL-2 به سلول ها اضافه شد و مشابه روش فوق رنگ آمیزی و آنالیز گردید. آنالیز سلولی با دستگاه فلوسایتومتری مدل Coulter XP انجام شد که ابتدا لنفوسیت ها محدود گردید و سپس سلول های CD4 در مقابل یکی از سیتوکین ها مشخص شد. در مطالعات زیر گروه های لنفوسیت ها محدوده CD3 در مقابل ssc (side scatter) تعیین گردید و سپس سایر مراحل آنالیز انجام شد. در مطالعات فنوتیپی لنفوسیت ها محدود به $CD3^+$ گردید و سپس CD4 در مقابل یکی از فنوتیپ ها آنالیز شد. اطلاعات به دست آمده از فلوسایتومتری سپس با نرم افزار Win MDI بررسی گردید.

آنتی بادی های منوکلونال و معرف های مورد استفاده شامل Mouse IgG2a (FITC, PE) ، Mouse IgG1 (FITC, PE)، Anti IL-2 (PE)، Anti IFN-γ (FITC) از Becton- Dickinson Immuno cytometry system و Anti CD8 (FITC)، Anti CD4 (PC5-ECD)، Anti CD69(PC5) و Anti CD3 (PE) از CoulterImmunogy خریداری شد. SEB، EDTA و BrefeldinA از Sigma تهیه گردید. از آنتی بادی های مورد استفاده در تعین فنوتیپ Anti-CD45RO (FiTC)، Anti-CD57 (FITC,PE)، Anti-CD45 RA (FITC,PE)، Anti CD28 (FITC)، Anti – CD28 (TC) از Caltag و Anti-CCR7 از R& D System تهیه گردیدند.

مقایسه بین دو گروه با استفاده از آزمون آماری من ویتنی انجام گرفت و Pvalue کمتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها:

در این مطالعه تعداد سلول های $CD3^+$ در بیماران CLL، دارای سرولوژی مثبت نسبت به بیماران دارای سرولوژی منفی به صورت معنی داری بیشتر بود (P<۰/۰۵). پس از بررسی زیر گروه های مختلف سلول های T در دو گروه، مشخص گردید که این تفاوت حاصل افزایش سلول های $CD8^+$ و نه سلول های $CD4^+$ است و تفاوت معنی داری بین دو گروه وجود دارد (P<۰/۰۰۱). هم چنین زیر گروه سلول های CD4 مثبت، CD8 ضعیف ($CD4^+CD8^{dim}$) نیز در بیماران CMV^+ نسبت به بیماران CMV^- به صورت معنی داری بیشتر بود (P<۰/۰۱) (جدول شماره ۱، تصویر شماره ۱).

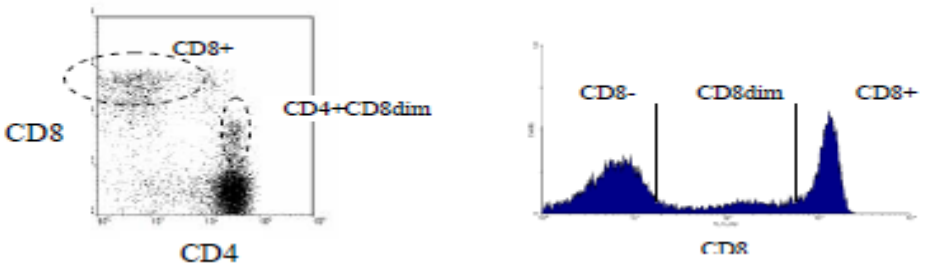
سوپر آنتی ژن SEB به عنوان منبع آنتی ژن برای تحریک لنفوسیت های T، $CD4^+$ در هر دو گروه بیماران CMV^+ و CMV^- استفاده شد و پاسخ به وسیله فلوسایتومتری و بررسی داخل سلولی سیتوکین ها بررسی گردید. میزان پاسخ سیتوکین 1FN-γ در بیماران CMV^+ نسبت به بیماران CMV^- به صورت معنی داری بیشتر بود (P<۰/۰۵). در مورد IL-2، پاسخ در بیماران CMV^+ کمتر از CMV^- بود (P<۰/۰۱). بررسی زیر گروه های لنفوسیت های CD4 از نظر سیتوکین‌ها نشان داد که در بیماران CMV^+ ، فنوتیپ $IFN\text{-}\gamma^+IL\text{-}2^-$ و در بیماران CMV^- فنوتیپ $IFN\text{-}\gamma^-IL\text{-}2^+$ بیشتر است و در هر دو حالت این تفاوت معنی دار بود (P<۰/۰۵). فنوتیپ $IFN\text{-}\gamma^-IL\text{-}2^+$ بیانگر سلول های T، Naïve (بکر) و خاطره ای مرکزی است که در بیماران CMV^+ نسبت به بیماران CMV^- به صورت معنی داری کمتر بود (P<۰/۰۵). در حالی که فنوتیپ $IFN\text{-}\gamma^+IL\text{-}2^-$ نشان دهنده لنفوسیت های T خاطره ای اجرایی است که در یماران CMV^+ نسبت به CMV^- به صورت معنی داری بیشتر بود (P<۰/۰۵) (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۱: مقایسه زیر گروه های لنفوسیت های T در بیماران سیتومگالوویروس مثبت (CMV^+) و منفی (CMV^-) مبتلا به لوسمی لنفوسیتی مزمن سلول B (B-CLL)

گروه / زیر گروه لنفوسیت های T	بیماران CMV^+	بیماران CMV^-	pvalue
$CD3^+$	۲۶۴۸ (۱۷۵–۹۹۳۶)	۲۲۲۵ (۱۱۳–۸۹۹۶)	P<۰/۰۵
$CD4^+$	۱۱۳۹ (۱۲۳–۴۰۷۲)	۱۲۶۲ (۵۷–۵۱۸۳)	P>۰/۰۵
$CD8^+$	۱۴۷۵ (۱۵۱–۷۵۷۳)	۱۰۷۲ (۴۹–۶۳۷۷)	P<۰/۰۰۱
$CD4^+CD8^{dim}$	۱۹ (۵–۱۷۶)	۱۰ (۱–۴۲)	P<۰/۰۱
$CD8^-CD4^-$	۶۶ (۱۲–۶۳۴)	۲۳ (۱–۱۵۹)	P<۰/۰۵

CMV: سیتومگالوویروس CD: Cluster of differentiation

داده ها به صورت (محدوده توزیع) میانه و تعداد سلول در میکرولیتر می باشد.



تصویر شماره ۱: . لنفوسیت های $CD4^+CD8^{dim}$ T در لوسمی لنفوسیتی مزمن

$CD4^+CD8^{dim}$: لنفوسیت های CD4 مثبت، CD8 ضعیف CD: Cluster of differentiation

بیان ۷ علامت فنوتیپی بر روی لنفوسیت های T، $CD4^+$ بیماران B-CLL، CMV^+ و CMV^- بررسی شد. مولکول CD27 یک مولکول کمک تحریکی است که در طی تمایز لنفوسیت T را حمایت می کند و در بقاء لنفوسیت های T فعال شده مؤثر است. این علامت کاهش قابل توجهی در بیماران CMV^+ داشت (P<۰/۰۰۱). CD28 نیز یک مولکول کمک تحریکی است که در بیماران CMV^+، ۱۸/۶ درصد از سلول های $CD4^+$ این علامت را از دست داده اند، در حالی که در بیماران CMV^- ۱۰/۳ درصد لنفوسیت‌های $CD4^+$ فاقد این علامت هستند. CD57 و CD38 پس از فعال شدن لنفوسیت ظاهر می گردند. در بیماران مورد مطالعه مثبت بودن CMV تاثیر قابل ملاحظه ای بر افزایش سلول های CD57 در لنفوسیت های CD4 داشت بطوری که تا ۵۰ درصد این سلول ها آن را بیان کردند، در حالی که در بیماران CMV^- میانه بیان آن ۲/۲ درصد بود (P<۰/۰۰۱). در بیان CD38 تفاوت قابل ملاحظه ای بین دو گروه مشاهده نشد. $CD45RO^+$ نشانه برخورد با آنتی ژن است و درصد لنفوسیت های $CD45RO^+CD4^+$ بطور معنی دار در بیماران CMV^+ بیش از بیماران CMV^- بود (P<۰/۰۰۱). در حالی که در این بیماران CD45RA که علامت سلول های بکر است نسبت به بیماران CMV^- به صورت معنی داری کمتر بود (P<۰/۰۵). CCR7 نیز که معمولاً بر روی

جدول شماره ۲: مقایسه نسبت سلول های تولید کننده سیتوکین های اینترفرون گاما و اینترلوکین ۲ در بیماران سیتومگالو ویروس مثبت و منفی مبتلا به لوسمی لنفوسیتی مزمن سلول B

گروه / سیتوکین	بیماران CMV^+	بیماران CMV^-	Pvalue
$IFN\text{-}\gamma^+$	۳/۵ (۰/۵–۱۴/۶)	۵/۴ (۱/۴–۷/۲)	P<۰/۰۵
$IL\text{-}2^+$	۳/۸ (۱,۵–۶,۲)	۶ (۱,۸–۸,۵)	P<۰/۰۱
$IFN\text{-}\gamma+IL\text{-}2^+$	۱/۳۵ (۰/۳–۲/۸)	۲/۳ (۰/۹–۷/۲)	P<۰/۰۵
$IFN\text{-}\gamma+IL\text{-}2^-$	۲/۷ (۱/۱–۱۲/۷)	۱/۱ (۰/۸–۴/۷)	P<۰/۰۵
$IFN\text{-}\gamma\text{-}IL\text{-}2^+$	۲/۶ (۰/۷–۳/۶)	۳/۸ (۱–۸/۳)	P<۰/۰۵

CMV: سیتومگالو ویروس، IFN-γ: اینتر فرون گاما، IL-2 اینتر لوکین۲، –داده ها به صورت (محدوده توزیع) میانه می باشند.

جدول شماره ۳: فنوتیپ لنفوسیت های $CD4^+$ در بیماران سیتومگالوویروس مثبت (CMV^+) و منفی (CMV^-) مبتلا به لوسمی لنفوسیتی مزمن سلول B (B-CLL)

گروه / زیر گروه لنفوسیت های CD	بیماران CMV^+	بیماران CMV^-	Pvalue
CD27	۵۶/۸ (۳۳/۵ –۷۰/۳)	۹۱/۳ (۸۷/۷ – ۹۳/۲)	P<۰/۰۰۱
CD38	۴۰/۶ (۳۸–۵۰)	۴۶ (۲۷/۳ – ۵۷/۸)	P>۰/۰۵
CD45RO	۸۱/۷ (۶۲/۵ – ۹۲/۲)	۲۶/۶ (۱۷/۴–۴۴/۲)	P<۰/۰۰۱
CD45RA	۱۳/۴ (۱/۷ – ۶۸/۲)	۴۰/۷ (۲۲/۳ – ۴۹/۵)	P<۰/۰۵
CCR7	۱۹/۵ (۱۳/۸–۵۳)	۷۹/۹(۶۲/۲–۸۶/۶)	P<۰/۰۱
CD57	۱۶/۵ (۶/۵–۵./۵)	۲/۲(./۳–۶/۴)	P<۰/۰۰۱
CD28	۸۵/۷ (۶۹/۵–۹۱/۵)	۸۹/۳ (۶۷/۲–۹۹/۲)	P<۰/۰۱

CMV: سیتو مگالو ویروس

CD : Cluster of differentiation

– داده ها به صورت (محدود و توزیع) میانه می باشد.

سلول های بکر و خاطره مرکزی بیان می شود در بیماران CMV^+ بطور قابل ملاحظه ای کمتر بود (P<۰/۰۱) (جدول شماره ۳).

بحث:

اختلالات پیشروندهٔ لنفوسیت های T و آسیب عمل این سلول ها در B-CLL همواره مورد نظر محققین بوده و مطالعات متعددی را در مورد بررسی تغییرات این لنفوسیت ها به خود اختصاص داده است. اختلالات گسترده این سلول ها معمولاً موازی با پیشرفت بیماری است. در اکثر بیماران CLL تعداد لنفوسیت های T افزایش می یابد و این افزایش اساساً بر روی سلول های $CD8^+$ اثر می گذارد که موجب معکوس شدن نسبت CD4/CD8 می گردد (۱۸). در مطالعهٔ ما تعداد سلول های $CD8^+$ در بیماران CMV^+ CLL نسبت به بیماران CMV^- به صورت معنی داری بیشتر بود و معکوس شدن نسبت

CD4/CD8 در بیماران CMV^+ و نه بیماران CMV^- وجود داشت. این تغییر مشابه همان تغییراتی است که در لنفوسیت های T در افراد سالم CMV^+ در سنین پیری مشاهده می شود (۱۹). با توجه به این یافته می توان این تغییر نسبت را در CLL به CMV و نه ماهیت بیماری نسبت داد. لنفوسیت های $CD4^+CD8^+$ ($CD8^{dim}$) سلول های کمیابی در خون محیطی هستند. افزایش این سلول ها در بیماری های لنفوپرولیفراتیو نظیر لوسمی سلول های مویی شکل گزارش شده است (۲۰). Suni و همکاران نشان داده اند که این سلول ها مستقیماً اختصاصیت ضد ویروسی (CMV یا HIV) دارند و در پاسخ به تحریک با CMV افزایش سیتوکین و فعالیت سیتوتوکسیک نشان می دهند (۲۱). در مطالعهٔ حاضر این جمعیت از لنفوسیت های T به صورت معنی داری در بیماران CMV^+ نسبت به بیماران CMV^- بیشتر بود که بیانگر این است که در B-CLL افزایش این جمعیت سلولی احتمالاً مرتبط با CMV است. Lambert و همکاران این جمعیت را در طی چند سال در بیماران پیگیری کرده و میزان آن را ثابت یافته اند (۲۲) که می تواند با ماهیت CMV که ویروس پایدار است و مکرراً سیستم ایمنی را تحریک می کند ارتباط داشته باشد.

تعیین فنوتیپ ایمنی لنفوسیت های $CD4^+$ T, در بیماران CLL افزایش قابل توجه نشانه های فعال شدن نظیر HLA-DR, CD57 و CD69 و کاهش CD28 را نشان داده است (۱،۲۳). از دست دادن CD28 در سلول های T به عنوان علامتی از پیری این سلول ها بیان شده است (۲۴). در مطالعه ما، لنفوسیت های $CD4^+$ در بیمارن CMV^+ و CMV^- به تفکیک از نظر نشانه های فنوتیپی مورد مطالعه قرار گرفت تا ارتباط بین تغییرات فنوتیپی گزارش شده در جمعیت سلول های $CD4^+$ بیماران B-CLL با CMV مشخص گردد. سلول های $CD4^+$ به طور وضوح افزایش قابل توجه سلول های $CD45RO^+$ (میانه ۸۱/۷٪ در مقایسه با ۲۶/۶٪) و $CD57^+$ (تقریباً ۵ برابر) را در بیماران CMV^+ نسبت به بیماران CMV^- نشان داد. در مقابل نسبت سلول های بیان کنندهٔ CD28, CCR7, CD45RA, CD27 به میزان قابل ملاحظه ای کمتر بود. فنوتیپ لنفوسیت های $CD4^+$ اختصاصی CMV نشان داده است که این سلول ها عمدتاً $CD57^+$, $CD45RO^+$, $CD27^-$, $CCR7^-$, $CD28^-$ هستند (۱۵). از طرف دیگر در بیماران CLL، پاسخ ایمنی CD4 اختصاصی CMV بالاست و این سلول ها حدود ۱۱ درصد از کل جمعیت CD4 را شامل می شوند (۱۶). بنابراین تغییر فنوتیپی مشاهده شده در کل جمعیت $CD4^+$ می تواند نشانه ای از پاسخ شدید نسبت به CMV باشد. مثبت بودن CMV همراه با گسترش فنوتیپ خطر زای ایمنی است (۲۵) و به همین دلیل در افراد سالم CMV^+ پاسخ ایمنی نسبت به واکسیناسیون آنفولانزا ناقص بوده است (۲۶). این احتمال وجود دارد که اکثر سلول های $CD4^+$ $CD28^-$ در این بیماران اختصاصی CMV باشند. تعداد سلول های $CD45RO^+$ که نشان دهنده سلول های برخورد کرده با آنتی ژن است در بیماران CMV^+ بیشتر و سلول های $CCR7^+$ که علامت سلول های بکر است کمتر بود که همگی بیانگر این نکته است که سلول های بکر در جمعیت سلول های $CD4^+$ این بیماران به طور قابل توجهی کمتر است. بنابراین احتمال دارد که گسترش چنین جمعیتی از سلول های خاطره ای همراه با آسیب پاسخ ایمنی نسبت به آنتی ژن های دیگری باشد که بدن با آن برخورد می کنند و این می تواند یک عامل بالقوه در افزایش عفونت هایی باشد که بیماران CLL با آن مواجه هستند. تغییر فنوتیپ لنفوسیت های $CD4^+$ در بیماران CMV^+ ممکن است باعث تغییر پاسخ نسبت به آنتی ژن در این بیماران گردد. سوپر آنتی ژن SEB به عنوان محرک انتخاب گردید و پاسخ ایمنی نست به آن بررسی شد. در بیماران CMV^+ پاسخ IFN-γ بیش از بیماران CMV^- بود، در حالی که در این بیماران پاسخ IL-2 کمتر بود. وقتی که سلول‌ها از نظر تولید هر دو سیتوکسین همزمان آنالیز شدند نسبت سلول های $IFN\text{-}\gamma^+IL\text{-}2^-$ در بیماران CMV^+ بیش از CMV^- و در مقابل سلول های $IFN\text{-}\gamma^-IL\text{-}2^+$ در این گروه

کمتر بود. ترشح IFN-γ به تنهایی ویژگی سلوهای خاطره ای اجرایی در جمعیت سلول های $CD4^+$ است و این احتمالاً نشان دهندهٔ تمایل به سمت تجمع این زیر گروه در بیماران CMV^+ است. کاهش سلول های $CD4^+$ تولیـــد کننـــدهٔ IL-2 و نیز جمعیت سلول های $IFN\text{-}\gamma^-$ $IL\text{-}2^+$ در بیماران CMV^+ نشانه ای از کمتر بودن جمعیت سلول های بکر و خاطره ای مرکزی است که می تواند تا حدی علت ناتوانی بیماران CLL را در پاسخ به عفونت ها توضیح دهد.

نتیجه گیری:

مثبت بودن CMV در بیماران CLL همراه با تغییر گسترده در لنفوسیت های T، تغییر زیر گروه های سلول های T، افزایش سلول های $CD4^+CD8^{dim}$ و بروز فنوتیپ سلول های کاملاً تمایز یافته می باشد. کاهش لنفوسیت های بکر و خاطره ای مرکزی ممکن است لنفوسیت های T را در شروع، حفظ و تکمیل پاسخ ایمنی نسبت به پاتوژن ها و سلول های توموری ناتوان سازد. هر چند آلودگی CMV در افراد دارای سیستم ایمنی توانا، نادیده گرفته می شود، اما در افراد مسن همراه با کاهش ماندگاری بوده است. در بیماران CLL نیز با توجه به سوق یافتن سیستم ایمنی به سمت پیری در بیماران CMV^+ ناتوانی سیستم ایمنی مطرح می گردد، اما بررسی های بالینی گسترده تری مورد نیـــاز است. بنابـــراین پیشنهاد می گـــردد ماندگاری در دو گروه بیماران CMV مثبت و CMV منفی مقایسه گردد که می تواند گامی در جهت حل معمای عدم پاسخ سیستم ایمنی به سلول های توموری باشد.

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از تمامی کسانی کـه مـا را در انجـام ایـن مطالعه یاری نمودند قدردانی می نماییم.

منابع:

1.Van den Hove LE, Van Gool SW, Vandenberghe P, Boogaerts MA, Ceuppens JL. $CD57^+/CD28^-$ T cells in untreated hemato-oncological patients are expanded and display a Th1-type cytokine secretion profile, ex vivo cytolytic activity and enhanced tendency to apoptosis. Leukemia. 1998 Oct; 12(10): 1573-82.

2.Bonyhadi M, Frohlich M, Rasmussen A, Ferrand C, Grosmaire L, Robinet E, et al. In vitro engagement of CD3 and CD28 corrects T cell defects in chronic lymphocytic leukemia. J Immunol. 2005 Feb; 174(4): 2366-75.

3.Tinhofer I, Weiss L, Gassner F, Rubenzer G, Holler C, Greil R. Difference in the relative distribution of $CD4^+$ T-cell subsets in B-CLL with mutated and unmutated immunoglobulin (Ig) VH genes: implication for the course of disease. J Immunother. 2009 Apr; 32(3): 302-9.

4.Palmer S, Hanson CA, Zent CS, Porrata LF, Laplant B, Geyer SM, et al. Prognostic importance of T and NK-cells in a consecutive series of newly diagnosed patients with chronic lymphocytic leukaemia. Br J Haematol. 2008 May; 141(5): 607-14.

5.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.

6.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 Mar; 112(4): 959-64.

7. 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 Sep; 106(6): 2018-25.

8. Tinhofer I, Rubenzer G, Holler C, Hofstaetter E, Stoecher M, Egle A, et al. Expression levels of CD38 in T cells predict course of disease in male patients with B-chronic lymphocytic leukemia. Blood. 2006 Nov; 108(9): 2950-6.

9. Hamblin TJ. Autoimmune complications of chronic lymphocytic leukemia. Semin Oncol. 2006 Apr; 33(2): 230-9.

10. Kiaii S, Choudhury A, Mozaffari F, Kimby E, Osterborg A, Mellstedt H. Signaling molecules and cytokine production in T cells of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL): comparison of indolent and progressive disease. Med Oncol. 2005; 22(3): 291-302.

11. Frydecka I, Kosmaczewska A, Bocko D, Ciszak L, Wolowiec D, Kuliczkowski K, et al. Alterations of the expression of T-cell-related costimulatory CD28 and downregulatory CD152 (CTLA-4) molecules in patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia. Br J Cancer. 2004 May; 90(10): 2042-8.

12. 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 Dec; 121(1-3): 187.

13. 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 Jan; 37(2-3): 445-53.

14. 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 Feb; 90(2): 213-9.

15. 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.

16. Pourgheysari B, Moss P. [High level of CMV-specific CD4+ and CD8+ cells immune response and correlation between them in B-cell Chronic lymphocytic leukemia patients. J Rafsanjan Univ of Med Sci. 2009; 7(4): 235-244.]Persian.

17. Bitmansour AD, Douek DC, Maino VC, Picker LJ. Direct ex vivo analysis of human CD4(+) memory T cell activation requirements at the single clonotype level. J Immunol. 2002; 169: 1207-18.

18. Hamblin AD, Hamblin TJ. The immunodeficiency of chronic lymphocytic leukemia. Br Med Bull. 2008; 87: 49-62.

19. Musiani M, Zerbini M, Zauli D, Cometti G, La Placa M. Impairment of cytomegalovirus and host balance in elderly subjects. J Clin Pathol. 1988; 41: 722–5.

20. Airo P, Rossi G, Facchetti F, Marocolo D, Garza L, Lanfranchi A, et al. Monoclonal expansion of large granular lymphocytes with a $CD4^{+}$ $CD8^{dim+/-}$ phenotype associated with hairy cell leukemia. Haematologica. 1995 Mar-Apr; 80(2): 146-9.

21. Suni MA, Ghanekar SA, Houck DW, Maecker HT, Wormsley SB, Picker LJ, et al. CD4(+)CD8(dim) T lymphocytes exhibit enhanced cytokine expression, proliferation and cytotoxic activity in response to HCMV and HIV-1 antigens. Eur J Immunol. 2001 Aug; 31(8): 2512-20.

22. Lambert C, Ibrahim M, Iobagiu C, Genin C. Significance of unconventional peripheral CD4+CD8dim T cell subsets. J Clin Immunol. 2005 Sep; 25(5): 418-27.

23. 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.

24. Warrington KJ, Vallejo AN, Weyand CM, Goronzy JJ. CD28 loss in senescent $CD4^+$ T cells: reversal by interleukin-12 stimulation. Blood. 2003 May; 101(9): 3543-9.

25. Pawelec G, Akbar A, Caruso C, Effros R, Grubeck-Loebenstein B, Wikby A. Is immunosenescence infectious? Trends Immunol. 2004; 25: 406-10.

26. Trzonkowski P, Mysliwska J, Szmit E, Wieckiewicz J, Lukaszuk K, Brydak LB, et al. Association between cytomegalovirus infection, enhanced proinflammatory response and low level of anti-hemagglutinins during the anti-influenza vaccination-an impact of immunosenescence.Vaccine. 2003; 21: 3826-36.

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences

Received: 14/Nov/2009 *Accepted: 25/Dec/2009*

Significance of CMV-seropositivity in the alterations of $CD4^+$ T-cell subsets and expression of their phenotyping markers in B-cell chronic lymphocytic leukemia

Pourgheysari B (PhD)*, Banitalebi M (MSc)**

**Assistant professor, Hematologist, Medical Planets Research Center, Shahrekord Univ. of Med. Sci., Shahrekord, Iran, **Cellular and Molecular Research Center, Shahrekord Univ. of Med. Sci., Shahrekord, Iran and PhD Student, Molecular medicine Dept., Tehran Univ. of Med. Sci. Tehran, Iran.*

Background and aim: B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) is a B-cell malignancy which has been associated with a variety of abnormalities in non-malignant T cells. Viral antigens are able to produce profound alterations in T-cells and cytomegalovirus (CMV) has been involved in T-cell abnormalities in healthy elderly individuals. Therefore, the relationship between these changes and CMV was studied in CLL patients.

Methods: This was a cross sectional study and included 79 B-CLL patients (41 CMV seropositive and 38 CMV seronegative). The cell counting was done by Coulter cell counter. The T-cell subgroups and cell phenotype were studied by monoclonal antibodies and flow cytometry. The secretion of cytokine was detected by intracellular cytokine staining post stimulation and short time culture.

Results: $CD8^+$ and $CD4^+CD8^{dim}$ T cell subgroups were significantly more in CMV^+ patients than CMV negatives ($P<0.01$). IFN-γ producing T cells were significantly more in CMV^+ patients, whereas IL-2 producing T cells were more in CMV^- patients ($P<0.05$ and $P<0.01$, respectively). A prominent decrease was seen in the expression of CD27, CD28, CD45RA and CCR7 in CMV^+ patients, whereas CD45RO and CD57 showed significant rise ($P<0.05$ and $P<0.001$, respectively).

Conclusion: CMV seropositivity causes broad alterations in T-cells and expression of terminally differentiated phenotype in B-CLL patients. Therefore, such profile in B-CLL is highly related to CMV seropositivity.

Keywords: **Cytokine**, **Chronic lymphocytic leukemia, Cytomegalovirus, T lymphocyte,**

[1]***Corresponding author***:
Hematology Dept,, Medical Faculty, Rahmatieah, Shahrekord, Iran.
Tel: 0381-3345654
E-mail: Bat238@yahoo.com