مطالعه شمارشی کروموزوم (پلوئیدی) در بیماران مبتلا به لنفوم (غیرهوچکین- هوچکین) به روش فلوسیتومتری با استفاده از بلوکهای پارافینه

فریده کریمی*، دکتر محمد فرهادی لنگرودی§، دکتر علی‌اکبر پورفتح‌اله þ، دکتر حسین جلالی‌خوü

چکیده

یکی از زمینه‌های جالب و مورد بحث دهه اخیر، اندازه‌گیری محتوی DNA به روش فلوسیتومتری می‌باشد. وضعیت DNA با محتوای کروموزوم سلول ارتباط دارد و با انجام آنالیز DNA تومورها می‌توان به چگونگی پلوئیدی، میزان سلولهای که در فاز سنتز قرار دارند و نهایتا" کینتیک سلولی در خلال بدخیمی پی برد. این اطلاعات می‌تواند در زمینه تشخیص، پیش آگهی و نحوه درمان بدخیمی‌ها مورد استفاده قرار گیرد. در این تحقیق آنالیز DNA بر روی ۸۸ بیمار مبتلا به لنفوم بدخیم (NHL۵۸ و HD۳۰) به روش Hedly و با استفاده از دستگاه فلوسیتومتر انجام گرفت. ایمنوفنوتایپ برای موارد انتخابی بیماران آنوپلوئید به روش ABC تعیین گردید.

شیوع آنوپلوئیدی در بیماران NHL، ۳۸٪ و در بیماران HD۴۷٪ دیده شد. این رخداد با عواملی مثل سن، جنس، نژاد و محل تومور و زیر گروه هیستولوژیک بی‌ارتباط بود (P>0.05). در این مطالعه ارتباط معنی‌دار بین اندکس پرولیفراسیون و میزان سلولهای فاز سنتز درجه بدخیمی لنفوم‌ها و زیرگروه هیستولوژیک آنهاو هم چنین افزایش آنها در موارد وخیم‌تر ملاحظه گردید که می‌توان از آن در تشخیص و پیش‌آگهی و انتخاب درمان اینگونه بیماران استفاده کرد.

گل واژگان: لنفوم، آنالیز DNA، فلوسیتومتری، پرولیفراسیون سلولی

مقدمه

لنفوم بدخیم، تکثیر نئوپلاستیک دودمان سلولهای لنفوئیدی می‌باشد. لنفوم‌ها به دو گروه لنفوم غیرهوچکین NHL و بیماری هوچکین HD تقسیم بندی می‌شوند. رفتار بالینی این دو بیماری کاملا" متفاوت می‌باشد(۱). برای انتخاب برنامه درمانی مناسب، پزشک باید از زیر نوع بافت‌شناسی و وسعت بیماری مطلع باشد. مطالعه ایمنوهیستو شیمیایی و فلوسیتومتری لوسمی/لنفوم‌ها کمک شایانی در جهت تعیین انواع و زیر گروههای آنها و همچنین تعیین پیش آگهی و سیربالینی این گونه بیماریها می‌کند. از طرفی پزشک برای انتخاب درمان مؤثرتر بخصوص اگر

* کارشناس ارشد هماتولوژی دانشگاه تربیت مدرس
§þ عضو هیأت علمی دانشگاه تربیت مدرس تهران
ü عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی ارتش

Scanned with CamScanner

از روش‌های جدید درمانی که علیه ویژگیهای آنتی ژنتیکی خاصی طراحی گردیده استفاده کند، نیاز به داشتن اطلاعات کافی در زمینه ایمنوفنوتایپ و میزان فعالیت پرولیفراتیوتومور دارد(۳). با تعیین میزان فعالیت پرولیفراتیو و درصد سلولهایی که در فاز سنتز DNA هستند، می‌توان پیش آگهی لنفوم‌ها و امکان تبدیل شدن آنها به درجات بدخیمی بالاتر را مشخص کرد. با آنالیز DNA می‌توان محتوی DNA سلول را در فازهای مختلف چرخهٔ سلول تعیین کرد و براساس اینکه اندکس DNA مساوی، کوچکتر و یا بزرگتر از عدد ۱ باشد جمعیت سلول دیپلوئید و یا آنوپلوئید خواهد بود. در این تحقیق آنالیز DNA به کمک دستگاه فلوسیتومتر و با استفاده از بلوکهای پارافینه مربوط به نمونه بیماران لنفوم انجام پذیرفت.

مواد و روشها

این تحقیق روی ۵۸ بیمار مبتلابه لنفوم غیر هوچکین نوع منتشر و ۳۰ بیمار مبتلا به بیماری هوچکین انجام گرفت. بیماران از هر دو جنس، بالای ۱۵ سال و در مرحله قبل از درمان بودند، لازم به ذکر است بیماران NHL مورد مطالعه از دو گروه بدخیمی متوسط و بالا بودند و نوع بدخیمی پایین و فولیکولار حذف گردیده بود.

روش انتخابی برای آنالیز DNA روش پیشنهادی Hedley (۳) در سال ۱۹۸۴ بود. چند برش ضخیم (حدود ۲۵تا ۳۰ میکرون) از بلوک پارافینه بافت مورد مطالعه تهیه شد، سپس توسط گزیل این برش‌ها را موم زدایی کرده و مراحل آب دهی را با قرار دادن نمونه‌ها در اتانول به ترتیب ۱۰۰٪، ۹۶٪، ۷۰٪ و ۳۰٪ انجام دادیم. بعد از الکل، نمونه‌ها را بمدت ۲۴ ساعت در آب مقطر رها کردیم. سپس بوسیلهٔ Pepsin اسیدی (PH=۱/۵) (محصول Sigmaa) عمل هضم انجام پذیرفت. نمونه را از صافی مخصوص (Nylon-mesh) عبور داده و سانتریفوژ کرده و بعد سوسپانسیون سلولی تهیه می‌کنیم به طریقی که در هر میلی لیتر ۱۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ سلول داشته باشیم. فلورو کروم انتخابی پروپیدیم یوداید (محصول Sigma) بود که هم با RNA و هم با DNA واکنش می‌داد. برای حذف RNA از Rnase (محصول Sigma) و برای نفوذپذیر کردن غشأ از Triton X 100 (محصول Sigma) استفاده گردید. نمونه‌ها را بعد از مرحله رنگ‌آمیزی با دستگاه فلوسیتومتر Epics profile II مطالعه کردیم. هر قدر محتوی DNA سلول بیشتر باشد میزان فلوروسانس جذب شده توسط سلول بیشتر خواهد بود.

هیستوگرام محتوی DNA بدست آمده نه تنها وجود جمعیت آنوپلوئید را آشکار می‌سازد بلکه معرف حضور سلولها در مراحل مختلف سیکل سلولی می‌باشد. سلولهایی که در فاز سنتز DNA هستند را می‌توان با اندازه‌گیری کمی، منطقه بین G_0 G_1 و G_2M و یا با استفاده از فرمول:

$$S\ Phase\ Fraction = \frac{\text{تعداد سلولهای فاز S}}{\text{تعدادکل سلولها}} \times ۱۰۰$$

تعیین کرد.

اندکس پرولیفراسیون از حاصل جمع سلولهای فاز S و G_2M به کل جمعیت سلولی بدست می‌آید و نشان دهندهٔ درصد جمعیت سلولی است که بعد از ناحیه G_0G_1 بوده و فعالیت پرولیفراتیو سلولها را مشخص می‌سازد.

ایمنوفنوتایپ ۱۰ مورد NHL آنوپلوئید به روش آویدین، بیوتین، کمپلکس (ABC)[1] تعیین گردید. در این بررسی از آنتی بادیهای

(Monoclonal Mouse-Clone -26DAKO)CD20,

(Monoclonal Mouse-UCHLI-DAKO)CD45RO,

(Monoclonal Mouse-clone-DF-TI-DAKO)CD43

و (Monoclonal Mouse-Clone KPI-DAKO)CD68

1- Avidin-Biotin-Complex

Scanned with CamScanner

استفاده شد. منشأ سلول در مواردی که CD_{20}^+ بودند لنفوسیت تعیین B در مواردی که CD_{45RO}^+ و که از CD_{45}^+ بودند لنفوسیت T تعیین گردید. داده‌های مختلف این تحقیق و با کمک نرم‌افزار SPSS استفاده از روش‌های آماری آنالیز واریانس (Anova) یک طرفه و دو طرفه و آزمون X^2 (کای دو) و R مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

در این تحقیق دیده شد لنفوم غیر هوچکین در افراد مذکر شایع‌تر می‌باشد ($P<0.001$) ولی جنسیت در ابتلا به بیماری هوچکین برخلاف انتظار و در مطالعات غربی تأثیری نداشت $P>0.05$بین بیماران NHL مورد بررسی زیر گروه Diffuse large cell از بقیه شایع‌تر و در بیماران هوچکین نوع Mixed cellularity از فراوانی بیشتری برخوردار بود.

در مبتلایان نوع HD فراوانی جنس مؤنث در دو زیر گروه Lymphocytic Depletion (LD) Sclerosis, (NS)Nodular- بیشتر بود ولی در زیر گروههای NHL تفاوتی از لحاظ میزان ابتلا در دو جنس دیده نشد ($P>0.05$). از نظر محل تومور در NHL و HD تفاوتهایی دیده شد بطوریکه در نوع NHL لنف آدنوپاتی‌های شکم بیشتر از HD دیده شد، ولی در هر دو بیماری شایع‌ترین محل تومور، گردن بود.

بررسی بیماران HD در دو گروه سنی زیر ۱۵ سال و بالای ۵۵ سال نشان داد که در گروه اول (زیر ۱۵ سال) این بیماری شایع‌تر است ($P<0.001$).

نتیجه حاصل از آنالیز DNA، ۳۸٪ آنوپلوئیدی را در بیماران NHL و ۴۷٪ آنوپلوئیدی را در بیماران HD نشان داد. آنوپلوئیدی در زیر گروه LD بیماران هوچکین ۷۵٪ و شایع‌تر از بقیه انواع بود ولی بطور کلی آنوپلوئیدی با زیر گروه هیستولوژیک NHL و HD ارتباط معنی‌داری نشان نداد ($P>0.05$) میانگین درصد سلولهای آنوپلوئیدی در نوع LD بیشتر از بقیه زیر گروههای هوچکین ۴۸/۷٪ بود ($P<0.05$) ولی در بدخیمی‌های متوسط و بالای NHL تفاوتی از این لحاظ دیده نشد ($P<0.05$).

سن بیماران در رخداد آنوپلوئیدی دخیل نبود. NHL ($P>0.12$) و در مورد HD($P>0.05$). جنسیت نیز در وقوع آنوپلوئیدی اثری نداشت ($P>0.05$).

ارتباط معنی داری بین وضعیت پلوئیدی (Ploidy status) و میزان SPF% و PI% وجود نداشت (به ترتیب $P>0.05$ و $P>0.5$).

میزان SPF% و PL% با وخیم شدن و بالا رفتن بدخیمی افزایش پیدا می‌کند. این موضوع هم در مورد بیماران NHL و هم در HD صادق بود و بنابراین ارتباط معنی‌داری بین این دو پارامتر و تشخیص لنفوم غیر هوچکین وجود دارد (۴/۸ =f ۵/۳ =f) این رابطه همچنین در تشخیص بیماران هوچکین وجود داشت (۴/۲ =f ۳/۶ =f) نمودار ۱ و ۲ این اطلاعات را به نمایش گذارده است. هر چقدر پرولیفراسیون سلول بیشتر باشد پیش آگهی بیماری بدتر خواهد بود.

در ایمنو فنوتایپ، نتیجه بدست آمده بدین قرار بود که ۸۰٪ لنفوم‌های مورد مطالعه دارای منشأ سلولی لنفوسیت B و ۲۰٪ بقیه منشأ T هستند. همچنین شیوع آنوپلوئیدی در لنفوم‌های سلول، سلول B بالاتر از T بود.

بحث

در این تحقیق با توجه به اطلاعات قبلی در مورد تفاوت‌های واضح دیده شده در اواع لنفوم و وجود پیش آگهی متفاوت و سیر بالینی کاملا" متغیر در آنها که از طرفی سبب ابراز در تقسیم‌بندی‌های مختلف ضایعات نئوپلازیک سیستم لنفورتیکولر گردیده است، اطلاعاتی در مورد وضعیت DNA این بیماران و نقش آن به عنوان یک پارامتر مستقل از سایر عوامل در پیش آگهی مورد توجه قرار گرفتند.

Scanned with CamScanner

سعی گردیده است تا با استفاده نتایج حاصل از اطلاعات بدست آمده با روش فلوستیومتری بتوان به نوع رابطه حاصله پیشگفت دست یازید.

کاربرد آنالیز DNA و تعیین Ploidy status، شیوع و مفهوم بالینی آنوپلوئیدی در لنفوم‌های بدخیم در سالهای اخیر با جدیت در حال بررسی است. در اغلب این بررسی‌ها با توجه به نقش عوامل محیطی، ژنتیکی، ویروس‌ها و بخصوص عوامل اجتماعی، اقتصادی در شیوع و انواع هیستولوژیک لنفوم‌ها سعی گردید در گروه مشخصی از بیماران ایرانی به بررسی آنها و ارتباط دیده شده با وضعیت در DNA ایشان پرداخته شود. بررسی در DNA این تحقیق به DNA صورت سنجش کمی مقدار DNA فازهای مختلف چرخه سلولی و تعیین وضعیت ploidy و سنجش SPF با روش فلوسیتومتری با متد Hedley انجام پذیرفته است. پس از انجام آنالیز DNA، برخی از موارد بیماران را با استفاده از روش ایمنوهیستو شیمی مورد ایمنوفنوتایپ قرار داده تا با توجه به تفاوتهای مشخص دیده شده در سیر و پیش آگهی انواع لنفوم‌های حاصل از لنفوسیت‌های B و T در این گروه بیماران نیز هر گونه همراهی احتمالی با عوامل مورد نظر را بررسی کنیم.

در این تحقیق، عدم ارتباط بین وضعیت پلوئیدی و پارامترهایی چون سن، جنس و محل تومور مشاهده گردید که با تحقیقات قبلی مطالقت داشت. با در بیماران مبتلا به NHL، Ploidy status زیر گروه هیستولوژیک و میزان بدخیمی (Grade) ارتباط معنی داری نداشت این یافته مؤید تحقیقات غربی در این زمینه می‌باشد.

رخداد بالای، مقوله آنوپلوئیدی در مبتلایان HD، یافته مهمی در این تحقیق است. لذا، با توجه به خصوصیات نژادی، اقتصادی و اجتماعی بیماران ایرانی و مطالعه پیش آگهی این بیماران با پروتکل‌های درمانی بکار رفته در ایشان و مقایسه پاسخ‌های دیده شده با بیماران غربی می‌تواند در یافتن پارامتری با ارزش در افتراق گروه مجزایی از بیماران که نیازمند رژیم درمانی سخت گیرانه‌تری هستند کمک کننده باشند.

نکته دیگری که در این بررسی به آن رسیدیم که با تحقیقات غربی. نیز مطابقت داشت عدم ارتباط معنی دار مابین پارامترهایی مثل سن و جنس با و میانگین درصد سلولهای فازسنتز (SPF%) ایندکس پرولیفراسیون (PI%) بود.

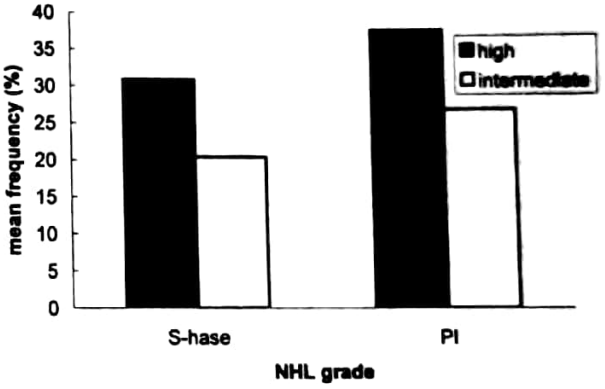
نتایج تحقیقات قبلی اکثرا" بر وجود ارتباط به مشخص مابین وضعیت آنالیز DNA وانواع NHL عنوان یک یافته مستقل پیش آگهی کننده دلالت داشته ولی در اغلب آنها نیاز بررسی بیشتر با تعداد قابل ملاحظه‌ای از زیرمجموعه‌های NHL و رفتار بالینی آنان برای استنتاج این پدیده توصیه شده است. یکی از مهمترین یافته‌های تحقیق فعلی که از اهداف اصلی آن نیز می‌باشد یافتن ارتباط فوق در بیماران ایرانی و در انواع لنفوم می‌باشد که نتایج با بدست آمده درخصوص وضعیت که در SPF% زیر مجموعهٔ هیستوپاتولوژیک بالاتری NHL درجه بدخیمی یا پدیده grade قرار دارد ضمن تأیید این می‌تواند به عنوان یافته مهم پیش آگهی دهنده در این بیماران محسوب گردد.

میزان ایندکس پرولیفراسیون با بالارفتن درجه بدخیمی بیماران (NHL و HD) بالا می‌رود و این نکته با مطالعات قبلی که توسط گروههای مختلف و در سالهای متوالی مورد بررسی قرار گرفته بود مطابقت قبلی که توسط گروههای مختلف و در NHL سالهای متوالی مورد بررسی قرار گرفته بود مطابقت دارد. بالاتر بودن SPF% در انواعی از که grade بالاتری دارند می‌تواند ضمن در نظر گرفتن آن به عنوان معیار پیش آگهی در تعقیب این بالینی درمان (monitoring) بیماران و نحوهٔ پاسخ به ایشان مورد استفاده قرار گیرد. ذکر این نکته که همواره

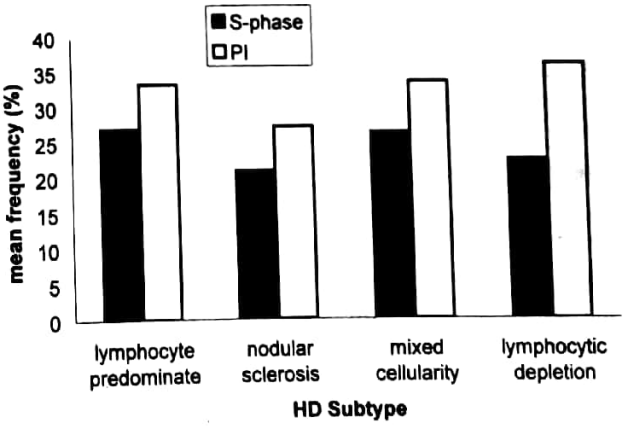
Scanned with CamScanner

Survival بیماران ایرانی مبتلا به ضایعات بدخیم لنفوپرولیفراتیو علیرغم استفاده از رژیم‌های شیمی درمانی یا احیاناً پرتو درمانی مشابه با بیماران غربی از بقای کمتری برخوردار می‌باشند، می‌تواند به نسبت سلولهای ایشان در فازهای مختلف چرخهٔ سلول نیز ارتباط داشته باشد.

به هر حال ادامه و انجام تحقیقات در جهت استفاده از رژیم‌های درمانی قویتر در گروه بیماران جوانتر همراه با و SPF% بالاتر در گروه NHL و یا آنوپلوئیدی بیشتر در گروه HD مقایسه ایشان با گروه مشابه از لحاظ سن ولی متفاوت به لحاظ وضعیت DNA می‌تواند در ارایه این نظریه کارساز بوده باشد.



شکل ۱- میانگین PI% و Sphase% بین درجات مختلف بدخیمی در NHL



شکل ۲- میانگین PI% و Sphase% بین زیر گروههای مختلف HD

Scanned with CamScanner

REFERENCES

1- Fredrick R., Hitson, R., Hematologic malignancies in clinical diagnosis and management by laboratory methods, Henry Davidson., 19th ed., 1996, 27, 657-699.

2- Jaffe E.S, Mederios, J., Stevenson M.S., Surgical pathology, 1995, 2, 22-57.

3- Hedley, D.W., Flow cytometry using paraffin-embedded tissue, Five years on Cytometry, 1989, 10, 229-241.

4- Jsu S.M., Raine L, Use of evidence peroxidase complex (ABC) in immuno peroxidase techniques, A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures, J. Histochem. Cytochem, 1981, 29, 577-580.

5- Jaffe E.S., The role of immunophenotypic marker's in the classification on Non Hodgkin's Lymphoma., Semin. Oncol., 1990, 17, 11-19.

6- Orfao., A. Ruiz Arguelles, Flow, cytometry: it's application in hematology, hematologica, 1995, 80, 1, 69-81.

7- Cowan, R.A., Harris, M., Jones, M, DNA content in high and intermediate grade Non-Hodgkin's lymphoma prognostic significance and clinicopathological correlations, Cancer, 1980, 60, 904-910.

8- Macartney J.C., Camplejohn R.S., DNA flow cytometry of non- Hodgkin's lymphoma Eur, J. Cancer, 1990, 26, 5, 635-637.

9- Lehtinen, T., Aine, R., Lehtinen M., Flow cytometric DNA analysis of 197 histologically favorable or unfavorable non Hodgkin lymphoma, J. pathol, 1989, 157, 27-36.

10- Christenssson, B., Tibukait B., LInder Cell proliferation and DNA content in non-Hodgkins lymphoma, Cancer, 1986, 58, 1295-1304.

11- Bauer, K.,D. Merkel D.E., winter J.N. prognostic implication of ploidy proliferation activity in diffuse large cell lymphoma, Cancer Res, 1990, 26(5), 635-636.

12- Salmon, E., Forrest, J.R., Dargent J.L., Relationship between DNA ploidy level, nuclear size, and survival in large cell lymphoma , Hemato. Pathol. 1995, 103(5) 568-573.

Scanned with CamScanner