خون
فصلنامه پژوهشی
پاییز ۸۳ دوره ۱ شماره ۱

بررسی فلوسایتومتریک کایمریسم گلبول‌های قرمزپس از پیوند مغز استخوان

دکتر مژگان شایگان [۱] ـ اسمردیس حاجتی [۲] ـ دکتر مسعود ایروانی [۳] ـ دکترمهناز آقائی پور [۴] ـ گیل دیوید [۵]
دانیل برنارد [۶] - اعظم السادات طباطبائیان [۷] ـ محمد حسین لطفی [۸] ـ پروین لطفی [۹]

چکیده

سابقه و هدف

این مطالعه به منظور بررسی بروزکایمریسم گلبول‌های قرمز پس از پیوند مغزاستخوان به روش فلوسایتومتری انجام شده است.

مواد و روش‌ها

نوع مطالعه مقطعی بوده و برای انجام این مطالعه از آنتی بادی های ضد گروه‌های خونی ABH,Rh,Kell,Duffy,Kidd,MNS که با ماده فلورسانس FITC نشان دار شده‌اند استفاده گردید. ۱۴ بیمار مبتلا به بدخیمی‌های هماتولوژیک که تحت پیوند مغزاستخوان قرار گرفته بودند، جهت جمعیت مورد مطالعه انتخاب شدند. نمونهٔ مورد نیاز ۵ میلی لیتر خون محیطی (در لوله حاوی EDTA) بود. ابتدا فنوتیپ گلبول‌های قرمز دهندگان و گیرندگان پیوند با هر دو روش آگلوتیناسیون و فلوسایتومتری تعیین و سپس در روزهای ۱۵، ۳۰ و ۶۰ پس از پیوند، فقط نمونه خون محیطی گیرنده از لحاظ آنتی‌ژن‌هایی که بین دهنده و گیرنده متفاوت بودند توسط فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش جستجوی آنتی بادی و سنجش تیتر ایزوهم آگلوتینین در نمونه پلاسمای بیماران قبل از پیوند وروز ۶۰ پس از پیوند انجام شد.

یافته ها

نتایج این مطالعه نشان دادند که کایمریسم گلبول‌های قرمز پس از پیوند در تمام بیماران مورد بررسی (در ۹ نفراز بیماران در روز ۱۵ و ۵ نفر در روز ۳۰ پس از پیوند) قابل مشاهده است. در پلاسمای هیچ‌یک از ۱۴ بیمار مورد بررسی قبل و پس از پیوند، هیچ نوع آنتی بادی علیه گروه‌های فرعی و Rh شناسایی نگردید. ناسازگاری ABO بین دهنده و گیرنده مانع وقوع کایمریسم نشده اما در بیمارانی که با دهنده خود ناسازگاری ABO داشته‌اند، تیتر ایزوهم آگلوتینین‌های ABH پس از پیوند کاهش نشان داده است. اگر چه حضور ایزوهم آگلوتینین‌های ABH مانع از وقوع کایمریسم نشده ولی ظاهراً با اتصال به آنتی‌ژن‌های مربوطه در غشاء گلبول‌های قرمز کایمریک، مانع رد یابی آنتی ژن شده است و وقوع کایمریسم از طریق پایش سایر آنتی‌ژن‌ها تأیید شد. بروز GVHD و مصرف داروی فلودارابین باعث تاخیر در بروز کایمریسم نشده است.

نتیجه‌گیری

بررسی فنوتیپ گلبول‌های قرمز فرد اهداکننده مغز استخوان در خون محیطی گیرنده پیوند با روش فلوسایتومتری امکان‌پذیر است و با شناسایی فنوتیپ گلبول‌های قرمز در جمعیت‌های مخلوط، بررسی رتیکولوسیت‌ها در آتیه نیز ممکن شده و به این ترتیب بررسی کایمریسم درافرادی که اخیراً خون دریافت کرده‌اند نیز مقدور می‌باشد .هم چنین با ادامه ارزیابی کایمریسم گلبول‌های قرمز درصورت حصول به کایمریسم کامل و شناسایی گلبول‌های قرمز گیرنده، می‌توان عود بیماری را پیشگویی نمود.

کلمات کلیدی: پیوند مغز استخوان، کایمریسم، گلبول‌های قرمز، آنتی‌ژن‌های گروه‌های خونی، بدخیمی‌های هماتولوژیک

۱- مؤلف مسؤول: PhD ایمونولوژی – استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۲- کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون – مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۳- فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی – استادیار مرکز تحقیقات پیوند مغز استخوان بیمارستان دکتر شریعتی
۴- متخصص آسیب‌شناسی تشریحی و بالینی- استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۵- کارشناس بیوشیمی- مرکز انتقال خون نانت -فرانسه
۶- کارشناس هماتولوژی- بخش هماتولوژی- مرکز انتقال خون نانت - فرانسه
۷- لیسانس زیست‌شناسی- مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۸- لیسانس هماتولوژی و بانک خون- مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۹- کارشناس آزمایشگاه- مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-15]
[DOR: 20.1001.1.10279520.1383.1.1.1.1]

مقدمه

کایمریسم به حضور پایدار سلول‌های غیرخودی درگیرنده پیوند یا میزبان اطلاق می‌شود(۱). کایمریسم یکی از پی‌آمدهای قابل انتظار پیوند است و در شرایطی خاص پس از انتقال خون و در دوران بارداری در نتیجه تردد دو جانبه سلول‌های زنده بین مادر و جنین نیز دیده می‌شود. کایمریسم به‌صورت کامل[1] (جایگزینی کامل سلول‌های گیرنده با دهنده) و یا مخلوط[2] (جایگزینی برخی از رده‌های سلولی درگیرنده با سلول‌های دهنده) و یا میکروکایمریسم (جایگزینی کمتر از ۲/۵٪ سلول‌های گیرنده باسلول‌های دهنده) می‌باشد (٤-۱). بروز کایمریسم بیانگر موفقیت پیوند و دوام آن شناخته شده است. از آنجا که پی‌گیری و کنترل بیماران پس از پیوند مغزاستخوان در ارزیابی پیوند بسیار حیاتی است، شناسایی کایمریسم مخلوط و یا کامل بسیار مفید ومؤثر می‌باشد (۱،۳). بررسی سلول‌های پیش ساز خونی در نمونه مغز استخوان گیرندهٔ پیوند بسیار ارزشمند است ولی انجام آن به صورت مکرر مقدور نیست، بنابراین شناسایی زود هنگام کایمریسم در گلبول‌های قرمز خون محیطی معیاری است که اخیراً جهت کنترل و پی‌گیری بیمارانی که تحت پیوند مغزاستخوان قرار گرفته‌اند استفاده می‌شود. رایج‌ترین روش برای شناسایی کایمریسم گلبول‌های قرمز، آگلوتیناسیون افتراقی گلبول‌های قرمز است. در این روش با مشاهدهٔ انواع (Mix Field Agglutination) و (Continuous Flow Agglutination) نمونه را از لحاظ کایمریسم مورد بررسی قرار می‌دهند. علیرغم پیشرفت‌هایی که در تکنیک آگلوتیناسیون به وجود آمده، این روش از تکرارپذیری کمی برخوردار بوده و حساسیت آن پایین می‌باشد به‌طوری‌که جمعیت‌های کمتر از ۵٪ با این روش قابل شناسایی نیستند (۵).

فلوسایتومتری ازجمله جدیدترین تکنیک‌هایی است که اخیراً در بررسی میکروکایمریسم (جمعیت‌های مخلوط گلبول‌های قرمز) نیز از آن استفاده شده است. فلوسایتومتری علاوه بر سنجش و شناسایی کایمریسم از طریق شناسایی آنتی‌ژن‌های خاص در دهنده و گیرنده، امکان تشخیص هموزیگوت یا هتروزیگوت بودن آنتی‌ژن‌های رایج گلبول‌های قرمز را نیز فراهم می‌آورد(٦). استفاده از فلوسایتومتری با دورنگ مختلف فلورسانس، امکان بررسی آنتی‌ژن‌های سطحی رتیکولوسیت‌ها در جمعیت مخلوط را میسر می‌سازد. در سال ۱۹۹٤، Griffin و همکاران با استفاده از فلوسایتومتری به بررسی آنتی ژن‌های گروه‌های خونی روی رتیکولوسیت پرداختند و به این ترتیب بررسی کایمریسم در افرادی که اخیراً خون دریافت کرده‌اند نیز امکان‌پذیرشد (۷).

با توجه به نتایج ارایه شده توسط Griffin ،Blanchard و David پیرامون ردیابی موفقیت‌آمیز گلبول‌های قرمز دهنده پیوند درخون محیطی گیرنده کایمریسم گلبول‌های‌قرمز، این مطالعه به‌منظور راه‌اندازی بررسی فنوتیپ گلبول‌های قرمز به روش فلوسایتومتری و مطالعه مقدماتی بروز کایمریسم گلبول‌های قرمز در افرادی که تحت پیوند مغزاستخوان قرار گرفته‌اند، انجام گردید(۵،۷،۸).

مواد و روش‌ها

نوع تحقیق مقطعی[3] بوده و تعداد جمعیت مورد مطالعه ١٤ نفر می‌باشند که طی نیمه دوم بهمن ۱۳۸۱ تا مرداد ۱۳۸۲ از بین بیماران بخش‌های پیوند مغزاستخوان مرکز تحقیقات بیمارستان شریعتی که تحت پیوند مغزاستخوان آلوژن قرارگرفته بودند، انتخاب شدند. عدم دریافت خون به‌مدت ۳ ماه قبل از نمونه‌گیری ازشرایط ورود به این مطالعه بود. ٦ بیمار مبتلا به AML[4]، ٤ بیمار مبتلا به ALL[5]، ۳ بیمار مبتلا به CLL[6] و یک بیمار مبتلا به MDS[7] بودند.

کلیه پیوندها از برادر یا خواهر بیماران انجام شده بودند. نمونه مورد نیاز، ۵ میلی‌لیتر خون محیطی (در لوله حاوی EDTA) بود. که قبل از پیوند از دهنده وگیرنده و پس از آن در روزهای ۱۵، ۳۰ و٦۰ پس از پیوند فقط از گیرنده

1- Full Chimerism
2- Partial or Mixed Chimerism
3- Cross Sectional
4- Acute Myeloblastic Leukemia
5- Acute Lymphoblastic Leukemia
6- Chronic Lymphoblastic Leukemia
7- Myelo Dysplastic Syndrom

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-15]
[DOR: 20.1001.1.10279520.1383.1.1.1.1]

جمع‌آوری شده بود. از نمونه جمع‌آوری شده در روزهای قبل از پیوند و روز ٦٠ پس از پیوند، ١ میلی لیتر پلاسما جداسازی و در لوله‌های کوچک تقسیم و تا زمان انجام آزمایش در دمای ٧٠- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. طبق مراجع موجود، بررسی پارامترهای مختلف گلبول‌قرمز با فلوسایتومتر نمونه‌هایی که تا ٤روز ازجمع‌آوری آنها گذشته و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده امکان‌پذیر است (٩). در این تحقیق نمونه‌ها درصورت نگهداری در یخچال در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد، تا یک هفته پس از جمع‌آوری نیز بررسی گردیدند و نتایج مقایسه‌ای طی این مدت با نمونه‌های یک روزه مشابه بودند.

نمونه‌ها ازنظر آنتی‌ژن‌های گروه‌های خونی اصلی ABH و Rh (D, C, c, E, e) وآنتی‌ژن‌های گروه‌های خونی فرعی Kidd (Jka, Jkb), Kell (K), Duffy (Fya), MNS(Ss) به روش فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌هایی که قبل از پیوند از دهنده و گیرنده تهیه می‌شد، علاوه بر فلوسایتومتری به روش آگلوتیناسیون نیز مورد بررسی قرارگرفت. درمورد نمونه‌های روزهای ١٥، ٣٠ و٦٠ پس از پیوند، فقط نمونه خون محیطی گیرنده از لحاظ آنتی‌ژن‌های متفاوت بین دهنده و گیرنده توسط فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. تست جستجوی آنتی‌بادی به روش آگلوتیناسیون بر روی نمونه پلاسمای بیمار در روزهای قبل از پیوند و روز ٦٠ پس از پیوند، به‌منظور بررسی حضور یا عدم حضور آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های گروه خونی فرد اهداکننده انجام شد. در مورد بیمارانی که در شرایط ناسازگاری ABO تحت پیوند مغز استخوان قرار گرفته بودند، سنجش تیتر ایزوهم آگلوتینین‌های ABO (ازکلاس IgM) برای نمونه تهیه شده در روز قبل و روز ٦٠ پس از پیوند صورت پذیرفت(١٠).

٨ بیمار پس از پیوند به تشخیص پزشک معالج به تزریق خون کامل اشعه دیده (١ تا ٦ واحد) نیاز پیدا کردند.

در تحقیقات انجام شده توسط Blanchard، Griffin و David سیاست انتقال خون کاملاً کنترل شده بوده و خون‌هایی با آنتی‌ژن‌های گروه‌های خونی غیر مشابه با دهنده پیوند، پس از بررسی کلیه آنتی‌ژن‌های گروه‌های خونی مورد مطالعه تزریق می‌شد(٥،٧،٨). اما از آنجا که با توجه به محدودیت مواد قادر به انجام این امر نبودیم، در صورت نیاز بیماران به دریافت خون، پیش از تزریق، یک نمونه خون محیطی از بیمار جهت ادامه بررسی‌ها و یک نمونه از کیسه خون تزریق شده جهت بررسی آنتی‌ژن‌های گروه خونی وی (با استفاده از روش آگلوتیناسیون)، گرفته شد و در صورتی‌که تشابه آنتی‌ژنی بین خون تزریقی به‌نحوی با ردیابی آنتی‌ژن نامتشابه بین دهنده و گیرنده پیوند تداخل داشت، نمونه آن بیمار ازمطالعه حذف گردید.

مواد مورد استفاده جهت بررسی فنوتیپ گلبول‌های‌قرمز به روش فلوسایتومتری شامل کیت‌های تهیه شده از شرکت Bioatlantic (Diagast) فرانسه و به‌ترتیب زیر می‌باشند:

Erythrokit ABH kit, Erythrokit-Fya-kit,
Erythrokit JK- Kit, Erythrokit Ss-Kit,
ErythroKit Rhesus-Kit, Erythrokit Kell- Kit,
Negative Control Human IgM-FITC
(کنترل منفی از کلاس IgM)
Negative Control Human IgG-FITC
(کنترل منفی از کلاس IgG)
Monoclonal Antibody To Glycophorins A and B
(به‌عنوان کنترل مثبت)

در هر بار بررسی، نمونه‌های کنترل مثبت و منفی و یک کنترل حاصل از مخلوط مساوی گلبول‌های حاوی آنتی‌ژن گروه خونی مربوطه و فاقد آن تحت عنوان مخلوط مصنوعی[1] به‌همراه نمونه‌های بیماران به‌روش ذکر شده مورد بررسی قرار می‌گرفتند. روش کار به‌طور خلاصه شامل مراحل زیر می‌باشد: شستشوی گلبول‌های مورد بررسی با بافر PBS و سانتریفوژ وتهیه مخلوط ١٠٪ از آنها در همان بافر، افزودن ١٠ میکرولیتر از سوسپانسیون حاصله به لوله‌های مختلف و اضافه کردن ١٠میکرولیتر از رقت مناسب آنتی بادی‌های مونوکلونال (IgG یا IgM) ضدآنتی ژن‌های گروه‌های خونی به لوله‌ها، انکوباسیون در اتاق به‌مدت ٣٠ –٦٠ دقیقه، تکرار مراحل شستشو و سپس افزودن آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضد آنتی‌بادی‌های (IgG یاIgM) کنژوگه با FITC[2] به همه لوله‌ها، انکوباسیون در دمای اتاق به مدت ٣٠–٦٠ دقیقه (که برحسب نوع کیت مورد استفاده متفاوت می‌باشد) و شستشوی گلبول‌های

1- Artificial mixture
2- Flourecinated Isothiocyanat Conjugated Abs

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-15]
[DOR: 20.1001.1.10279520.1383.1.1.1.1]

مورد بررسی با استفاده از سانتریفوژ و بافر PBS ودر پایان نیم میلی لیتر از بافر PBS اضافه جهت باز کردن توده آگلوتینه، به آرامی با پیپت مخلوط می‌شد و نتایج با دستگاه فلوسایتومتری (PasIII Partec در MHz ۶۰۱) قرائت می‌گردید(۷، ۵) . در مورد آنتی‌ژن‌های ABH آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ضدآنتی‌ژن‌های گروه‌های خونی(IgG بر علیه آنتی‌ژن‌های A و B و IgM برعلیه آنتی ژن H که مستقیماً با FITC کنژوگه‌اند) استفاده می‌شدند، در حالی‌که در مورد سایر آنتی‌ژن‌های مورد بررسی، روش غیرمستقیم بود.

جهت مقایسه بروز کایمریسم در بیمارانی که از فلودارابین استفاده کرده‌اند با بیمارانی که از آن استفاده نکرده‌اند و وقوع یا عدم وقوع GVHD از آزمون X^2 استفاده شده است.

یافته‌ها

تعداد جمعیت مورد مطالعه ۱۴ نفر شامل ۱۰ فرد مذکر (۷۱/۴٪) و ۴ فرد مؤنث (۲۸/۶٪) در محدوده سنی ۴۲-۱۰ سال بودند. یافته‌های ما نشان دادند که همه بیماران مورد بررسی کایمریسم را بروز داده‌اند، به‌عبارتی در ۹ نفر (۶۴٪)، در روز پانزدهم پس از پیوند و در ۵ نفر (۳۶٪)، ۳۰ روز پس از پیوند، کایمریسم (پدیدار شدن گلبول‌های قرمز حاوی آنتی‌ژن‌های گروه‌های خونی دهنده) مشاهده شده است. در بین افرادی که کایمریسم را ۱۵ روز پس از پیوند بروز داده‌اند، نسبت بیماران مؤنث بیشتر از بیماران مذکر می‌باشد. به‌عبارتی زمان مشاهده کایمریسم در بیماران مؤنث زودتر از بیماران مذکر است.

با انجام تست غربالگری آنتی‌بادی بر روی نمونه‌های پلاسمای جمع آوری شده در روزهای قبل از پیوند و روز ۶۰ پس از پیوند، مشاهده شده که هیچ آنتی‌بادی از کلاس IgG و IgM در گیرندگان پیوند وجود ندارد و تا روز ۶۰ پس از پیوند نیز تولید نشده است. هم‌چنین در کلیه بیمارانی که علی‌رغم ناسازگاری ABO تحت پیوند مغزاستخوان قرار گرفته بودند، کایمریسم گلبول‌های قرمز مشاهده شده است.

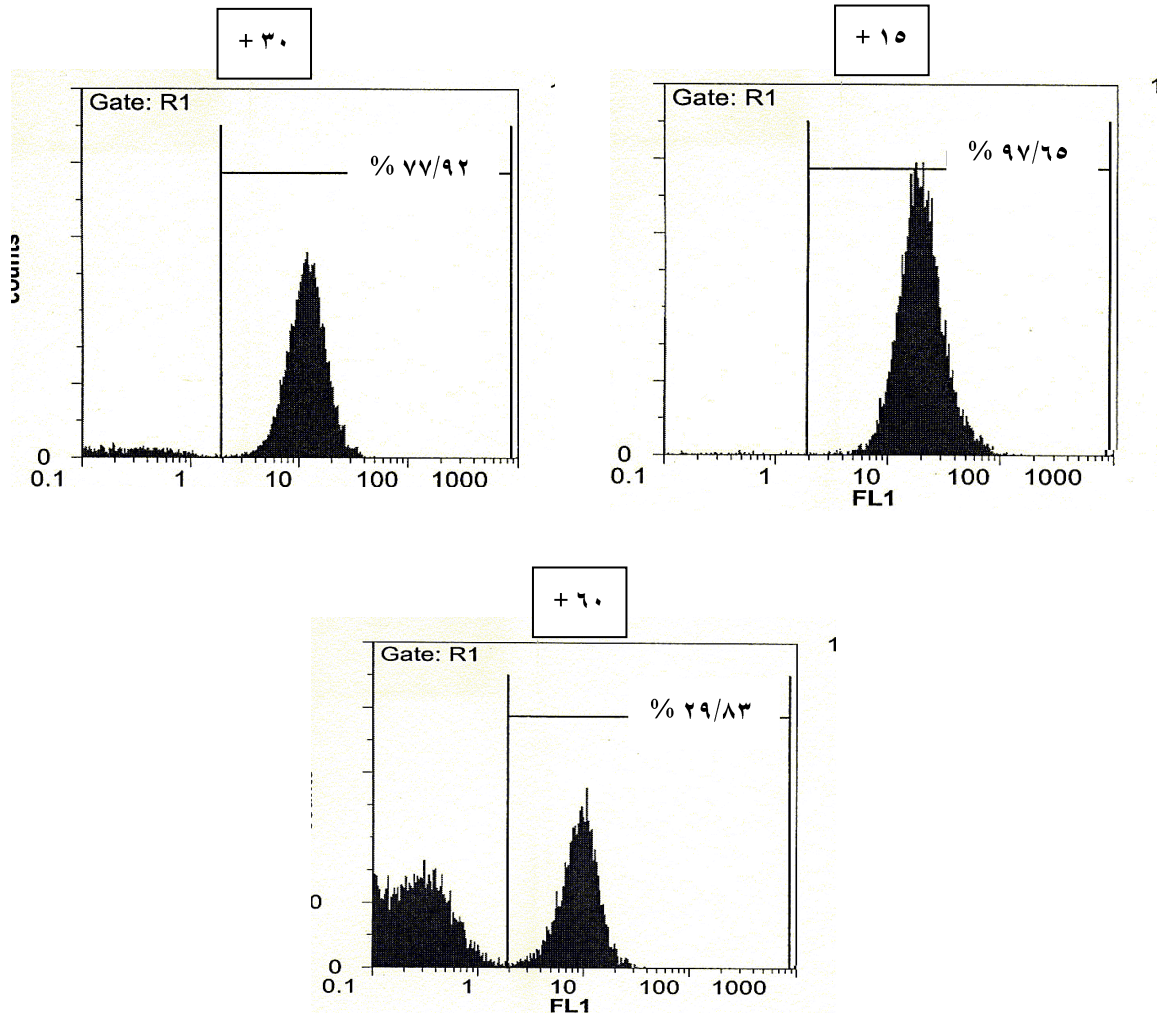
یافته‌های ما نشان دادند بیمارانی که داروی فلودارابین مصرف نموده‌اند در۱۵ روز اول پس از پیوند کایمریسم را نشان داده‌اند (با$P<0.05$). بنابراین استنتاج می‌گردد که داروی فلودارابین باعث تأخیر در زمان مشاهده کایمریسم نمی‌شود، با فرض آن که رابطه معنی‌داری بین مشاهده کایمریسم و وقوع GVHD وجود دارد. حدود ۵۰٪ از کل بیماران تحت بررسی، افرادی بودند که در ۱۵ روز اول پس از پیوند، کایمریسم در آنها ایجاد شده اما GVHD در آنها ایجاد نشده است لذا این فرضیه با ۰/۰۵= P معنی‌دار است. بدین معنی که در کل، نسبت بیمارانی که در آنها کایمریسم پدیدار گشته اما GVHD مشاهده نشده، نسبت به بیمارانی که به این عارضه مبتلا شده‌اند بیشتر است.

در جدول ۱ و شکل ۱، تغییرات بروز آنتی‌ژن‌های S و s در یکی از گیرندگان با دهنده مربوطه، در روزهای ۱۵، ۳۰ و۶۰ پس از پیوند نشان داده شده‌است.

جدول شماره ۱ : درصد بروز آنتی ژن‌های S و s در یک زوج دهنده – گیرنده به روش فلوسایتومتری قبل وبعد از پیوند
(به ظهور گلبول‌های قرمز +s در روز ۱۵+ توجه کنید)

گیرنده	قبل از پیوند	+ ۱۵	+ ۳۰	+ ۶۰	دهنده
آنتی ژن S	۹۸/۶۱	۹۷/۶۵	۷۷/۹۲	۲۹/۸۳	۱/۰۷
آنتی ژن s	۱/۰۴	۳/۱۴	۲۳/۸۲	۶۷/۱	۹۷/۶۳

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-15]
[DOR: 20.1001.1.10279520.1383.1.1.1.1]



نمودار شماره ۱ : نمودار فلوسایتومتری درصد کاهش بروز آنتی ژن S، با استفاده از آنتی بادی ضد S کنژوگه به FITC، در روزهای ۱۵ ، ۳۰ و ۶۰ پس از پیوند در بیمار +S و- s از دهنده -S و+s (به افزایش جمعیت گلبول‌های -S در ناحیه سلول‌های منفی توجه فرمایید)

بحث

نتایج ما به‌طور خلاصه نشان دادند که بررسی وقوع کایمریسم درگلبول‌های قرمز به روش فلوسایتومتری انجام‌پذیر است، در کلیه بیماران تحت بررسی وقوع کایمریسم بین روزهای ۳۰-۱۵ پس از پیوند مشاهده گردیده، وقوع کایمریسم در گلبول‌های قرمز با مصرف فلودارابین ارتباطی ندارد و بروز کایمریسم وقوع GVHD را کاهش می‌دهد.

تاکنون پیوند کامل با موفقیت ۱۰۰٪ حاصل نشده است و احتمال رد پیوند، عود بیماری و GVHD پس از پیوند وجود دارد. از آنجایی که عود بیماری و رد پیوند با ظهور مجدد سلول‌های خونساز با منشا گیرنده همراه است، پی گیری و کنترل بیماران پس از پیوند مغز استخوان در ارزیابی پیوند واقدامات درمانی، مناسب و بسیار حیاتی است (۸). روش‌های مختلفی به منظور ارزیابی و شناسایی سریع سلول‌های خودی گیرنده و پیش بینی عوارض فوق

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-15]
[DOR: 20.1001.1.10279520.1383.1.1.1.1]

از قبیل روش‌های سیتوژنتیک و روش‌های مولکولی که پرهزینه و وقت گیر می‌باشند، به‌کار گرفته شده است. بررسی سلول‌های پیش‌ساز خونی با استفاده از نمونه های بیوپسی و آسپیراسیون مغزاستخوان گیرندگان، بسیار ارزشمند است ولی تکرار آن به دفعات مقدور نیست(۵). لذا بررسی کایمریسم مختلط، در گلبول‌های قرمز به منظور ارزیابی قبول پیوند و جایگزینی سلول‌های دهنده وحتی اطلاع از عود مجدد بیماری به عنوان معیار مناسبی برای پی‌گیری وضعیت پیوند در بیماران تحت پیوند مغز استخوان، مطرح می‌باشد. شناسایی جمعیت‌های مخلوط گلبول‌های قرمز خون محیطی از طریق آگلوتیناسیون، اولین بار توسط Petz و همکاران، Van Dijk و همکاران انجام شده که حساسیت آن محدود و در حد ۵-۳٪ می‌باشد (۵،۷). برخی محققین اعلام کرده‌اند که شناسایی جمعیت‌های کمتر از ۵/۲٪ نیاز به روش‌های حساس‌تری دارد(۱۱). درحال حاضر ارزیابی کمی جمعیت‌های مخلوط دربیمارانی که تحت پیوند مغزاستخوان قرارگرفته‌اند توسط تکنیک فلوسایتومتری امکان‌پذیر بوده و حداقل جمعیت قابل شناسایی با این روش (۱-۰/۱ درصد) می‌باشد (۵،۱۲،۱۳).

فلوسایتومتری امکان بررسی تعداد زیادی سلول در زمانی کوتاه را فراهم می‌سازد لذا به‌ویژه برای ردیابی تعداد اندکی سلول و کنترل و پی‌گیری روتین بیماران پس از پیوند مغزاستخوان مناسب است. در این روش آنتی‌ژن‌های گروه‌های خونی اصلی و فرعی به‌صورت غیر مستقیم توسط FITC نشان دار می‌شوند. شدت فلورسانس ساطع شده از گلبول‌های قرمز مثبت از لحاظ آنتی ژن مورد بررسی از فردی به فرد دیگر متفاوت است، این اختلاف عمدتاً به دلیل تفاوت در تراکم آنتی‌ژن‌ها و در دسترس بودن آنها است. اولین کاربرد روش فلوسایتومتری در شناسایی جمعیت‌های مخلوط گلبول‌های قرمز در تعیین شدت خونریزی مادر و جنین توسط Nance و همکاران (۱۹۸۹)، Bayliss و همکاران (۱۹۹۱) گزارش شده که پس از آنها Blanchard و Hendriks روش فوق را به بررسی کایمریسم گلبول‌های قرمز پس از پیوند مغز استخوان توسعه داده و حساسیت روش را به ۰/۱ تا ۱درصد رساندند(۵،۱۲). با استفاده از دورنگ فلورسانس در فلوسایتومتری می‌توان به بررسی رتیکولوسیت ها پرداخت که این کار امکان تشخیص سریع کایمریسم را فراهم می‌سازد (۷،۱۱). هم چنین با این کار پی گیری کلیه بیمارانی که به تازگی نیز خون دریافت کرده‌اند، تسهیل می‌شود. از آنجایی که بررسی رتیکولوسیت در بیماری PNH ضروری است فلوسایتومتری امکان کنترل و پی‌گیری دقیق‌تر بیمارانی که دچار این عارضه هستند را فراهم می‌سازد(۱٤). حتی مطرح شده است پی گیری بیماران با روش فوق با توجه به ظهور مجدد شاخص‌های گیرنده در مراحل زودرس، راهنمای خوبی برای اطلاع از عود مجدد بیماری می‌باشد.

نتایج ما نشان دادند که روش فلوسایتومتری به خوبی قادر به ردیابی کایمریسم در کلیه بیماران تحت بررسی بوده است. ۳٦٪ از بیماران تحت مطالعه در روز ۳۰ پس از پیوند و ٦٤٪ از آنان در روز ۱۵ پس از پیوند، کایمریسم واضح را نشان دادند که از این لحاظ با گزارش Hendriks مبنی بر مشاهده کایمریسم در روز ۱٤ پس از پیوند و گزارش B.David مبنی بر مشاهده کایمریسم بین روزهای ۲۰-۱۵ پس از پیوند مشابه می‌باشد(۸،۱۲).

٤ نفر (۲۸ درصد) از بیماران مورد بررسی در روزهای ۲٦،۱۱،٦ و ۱۰۵ پس از پیوند دچار عارضه GVHD شدند. بررسی آماری نشان داد، نسبت بیمارانی که میکروکایمریسم در آنها ایجاد شده ولی دچار GVHD نشده‌اند بیشتر است که این امر بیانگر اثر مطلوب ایجاد کایمریسم بر عدم بروز GVHD می‌باشد، و با گزارش های C. pascal و Mcsweeney و Childs مشابه است ولی MC.Walers و همکاران که در مورد کایمریسم گلبول‌های قرمز پس از BMT بیماران دچار کم خونی داسی شکل ، تحقیق نموده بودند، ارتباط واضحی بین GVHD و وجود کایمریسم بیان نمی‌کنند(۱۱،۱۵،۱٦،۱۷).

۴ نفر از بیماران مورد بررسی در شرایط ناسازگاری اصلی و یک نفر در شرایط ناسازگاری جزئی ABO بین دهنده و گیرنده تحت پیوند مغزاستخوان قرار گرفتند.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-15]
[DOR: 20.1001.1.10279520.1383.1.1.1.1]

۲ نفر (۵۰٪) از ٤ بیماری که در شرایط ناسازگاری اصلی ABO عمل پیوند مغزاستخوان روی آنها انجام شده بود، کایمریسم را در روز ۳۰ پس از پیوند نشان دادند، داده‌ها بیانگر آن است که درصد افرادی که کایمریسم را در روز ۳۰ پس از پیوند نشان داده‌اند، در بین این دسته از بیماران بیشتر است. این مشاهدات در مطالعه Worel Maciej Zaucha و Bolan نیز گزارش شده‌اند(۱۸،۱۹،۲۰). به عبارتی وجود آنتی‌بادی‌های ضد ABO از بروز کایمریسم ممانعت نکرده است. با تعیین تیتر ایزوهم‌آگلوتینین‌ها از کلاس IgM در بیماران، مشاهده شد که تیتر ایزوهم آگلوتینین ضد آنتی‌ژن‌های ABO دهنده، پس از پیوند کاهش می‌یابد که می‌تواند ناشی از اتصال به جایگاه‌های آنتی ژنتیک سطح گلبول‌های قرمز دهنده که در گیرنده جایگزین شده‌اند و یا اثر پیوند علیه پلاسماسل تولیدکننده ایمونوگلوبولین باشد (۲۱،۲۲،۲۳).

بررسی آماری نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که فلودارابین بر زمان ظهور کایمریسم در گلبول‌های قرمز اثری ندارد. این نتیجه با نتیجه والترز که گزارش نمود فلودارابین باعث تأخیر در زمان جایگزینی رده میلوئیدی دهنده و جایگزینی قابل توجه رده خونساز می‌گردد، مشابه است(۱۸).

در حال حاضر آنتی بادی قابل استفاده در فلوسایتومتری علیه مهم ترین آنتی ژن‌های گروه‌های خونی به‌صورت تجاری در دسترس می‌باشد، به این ترتیب امکان بررسی و کنترل بیمارانی که تحت پیوند مغز استخوان آلوژنی قرار می‌گیرند از طریق کنترل حداقل یک آنتی ژن گروه خونی متفاوت بین دهنده – گیرنده وجود دارد. این روش کمک شایانی به پزشکان معالج می‌نماید وبا استفاده از این تکنیک شواهدی دال بر قبول پیوند در رده اریتروئیدی در اختیار آنان قرار می‌دهد.

با توجه به موفقیت راه‌اندازی روش بررسی فنوتیپ گلبول‌های قرمز با فلوسایتومتری و نتایج مطالعات گوناگون تأیید می‌گردد که فلوسایتومتری روشی ساده و سریع به‌منظور تشخیص جمعیت‌های مخلوط گلبول‌های قرمز است. این روش نسبت به بسیاری از روش‌ها در زمان کوتاه‌تر نتایج دقیق در اختیار قرار می‌دهد. در حالی‌که غلظت‌های کمتر از ۵٪ به‌روش آگلوتیناسیون قابل تشخیص نمی‌باشد. گفته شده‌است که با فلوسایتومتری، جمعیت‌های اندکی در حد ۰/۱ درصد را نیز می‌توان ردیابی کرد.

با توجه به امکان بررسی رتیکولوسیت‌ها با استفاده از فلوسایتومتری دو رنگ، امکان بررسی کایمریسم در کلیه افرادی که اخیراً نیز انتقال خون داشته‌اند ممکن می‌باشد(۵). با توجه به موفقیت این مطالعه در راه‌اندازی روش فلوسایتومتری برای بررسی جمعیت‌های دوگانه گلبول قرمز، پیشنهاد می‌گردد که مطالعه‌ای وسیع‌تر با پی گیری بیماران در مدت زمان بیشتر پس از پیوند و به‌طور هم زمان با سایر روش‌های ملکولی در مورد عود بیماری صورت پذیرد، زیرا در صورت عود بیماری، درصد گلبول‌های قرمز که دارای آنتی‌ژن‌های گروه خونی گیرنده هستند، پس از یک دوره کاهش، مجددا افزایش می‌یابند.

تشکرو قدردانی

هزینه‌های این تحقیق توسط مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران تأمین گردیده است. نویسندگان مقاله از همکاری دکتر اردشیر قوام‌زاده، خانم‌ها مهین نیکوگفتار، دکترمریم خیراندیش، سیمیندخت بصیرپناه، زهرا شهریاری، سهیلا خلیلوند و سایر پرسنل محترم بخش‌های ۲، ۳ و ٤ پیوند در مرکز تحقیقات هماتولوژی- انکولوژی و پیوند مغزاستخوان بیمارستان دکتر شریعتی، تشکر می‌نمایند.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-15]
[DOR: 20.1001.1.10279520.1383.1.1.1.1]

منابع

1- Reed. W, Fiebig.E, Hae lee .T, Bush.M, Graft versus host disease and microchimerism in book Hillyer, Silberstine,Anderson: Blood Banking and Transfusion Medicine 2003, Chapter 36, Churchil Livingstone, USA, 421-430

2- Antin. J, *et al*.: Establishment of complete and Mixed Donor Chimerism After Allogenic Lymphohematopoietic Transplantation : Recommendation from a workshop at the 2001 tandem meetings – Biology of Blood and Marrow Transplantation , 2001 – Vol.7 , 473-475

3- Knechtle . J, Hamawy.M: Tolerance Induction in book: modern immunosuppressive , 2001 dirchauser verlag, Switzerland, 149-168.

4- Dzik.W.H : Mononuclear cell microchimerism and the Immunomodulatory effect of transfusion , Transfusion 1994 Vol.34 No (11) , 1007 – 1012

5- Blanchard.D, Bruneau V, Bernard D, Germond-Arnoult F, Gourbil A, *et al.*: flow cytometry analysis dual red blood cell populations after Bone Marrow Transplantation . bjh , Vol.89,741-477

6- Nelson .M : An overview of the use of flow cytometery in the analysis of mixed redcell populations, pathology, 1999-Vol.31(3) . 19-18

7- Griffin.LD G, Lippert LE, Dow NS, Berger TA, Hickman MR *et al.*: A flow cytometric Method for phenotyping rceipient red cells following transfusion, Transfusion,1994,vol.34 (3),233-7

8- David B, Bernard D, Navenot JM, Muller JY, Blanchard D : Flow cytometric monitoring of red blood cell chimerism after Bone Marrow Transplantation, Transfusion medicine, 1999, Vol.9. 209-217

9- Hanlin.H, Hobson.P, Staplton.J: Recommended guidelines For the detection / quantitation of reticulocytes, www.scooter.cyto.purdue.edu/pucl-cd/flow/vol4/11std/data/reticulo.htm , 1996,1-5

10- Jefferies.L.C, Smith. M.E: Autoimmune hemolytic anemia (Chapter 123) In: Rose .N.R, Hamilton.R.G, Detrick.B : Manual of clinical laboratory Immunology (6 th edittion), 2002, ASM press (Washington DC), p: 1070-80

11- Mcsweeney.A, Storb.R: Mixed Chimerism:Preclinical studies and clinical applications, biology of blood and marrow transplantation 1999,vol.5,192-203

12- Hendirks,E.C.M *et al.* : flow cytometric method for the routin follow-up at red cell population after Bone Marrow Transplantation, bjh1997,Vol.97, 141-145

13- Schattenberg A, De Witte T, Salden M, Vet J, Van Dijk B *et al.*: Mixed Hematopoietic chimerism after Allogenic transplantation with lymphocyte – Depleted Bone marrow is not associated with a higher incidence of relaps, Blood 1988

14- Tomas Neble.C :Paroxismal Nocturnal Heamoglubinurea: Clinical Aspects and Flow Cytometric Analysis, Lab publication, 1997, 81-94, Vol78 (5), 1372-76

15- Pascal.C , Ilstad. S:Mixed Allogenic chimerism Transplantation , 2001 , Vol.72 No (8) 536-542

16- Childs R, Clave E, Contentin N, Jayasekera D, Hensel N *et al.* : Engraftment Kinetics After nonmyeloablative Allogenic: Full Donor T-cell chimerism Precedes Alloimmune Responses, Blood, 199, Vol.94 No(9) 3234-3241

17- Andreani M, Manna M, Lucarelli G, Tonucci P, Agostinelli F *et al.* : persistence of mixed chimerism in patients transplanted for the treatment of thalassemia, Blood, 1996, Vol87 No (8), 3494-3499

18- Worel N, Greinix HT, Schneider B, Kurz M, Rabitsch W *et al.*: Regeneration of erythropoiesis after related – and unrelated – Donor BMT or peripherial blood HPC Transplantation: a major ABO Mismatch means problem, Transfusion, 200, l.40 543-550

19- Zaucha.M *et al.* : Engraftment of early erythoid progenitors is not delayed after nonmyeloablative major ABO-Incompatible haematopoietic stem cell transplantion, bjh, 2002, Vol.119, 740-750

20- Bolan CD, Leitman SF, Griffith LM, Wesley RA, Procter JL *et al.*: Deleyed Donor red cell chimerism and pure red cell Aplasia following Major ABO–Incompatible nonmyeloablative hematopoietic stem cell Transplantation, Blood , 2001, Vol.98 No (6) 1687-1694

21- Mielcarek M, Leisenring W, Torok-Storb B, Storb R: Graft versus Host Disease and Donor Directed Hemagglutinin titers after ABO – mismatched related and unrelated marrow allograft, : evidence for a graft versus plasma cell effect , Blood , 2000 , Vol.96(3) , 1150-1156

22- Peggs KS, Morris EC, Kottaridis PD, Geary J, Goldstone AH *et al.*: outcome of Major ABO Incompatible nonMyeloablative hematopoietic stem cell transplantation maybe Influenced by condition Regimen , Blood , 2002 , Vol.99 No(12) 4642-4644

23- Badros A, Tricot G, Toor A, Morris C, Guo C *et al.* : ABO Mismatch may affect engraftment in Multiple Myeloma patients receiving nonmyeloablative conditioning, Transfusion , 2002 , Vol.42(2) 205-209

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-15]

[DOR: 20.1001.1.10279520.1383.1.1.1.1]

1- Full Chimerism
2- Partial or Mixed Chimerism
3- Cross Sectional

Flow cytometric survey of RBC chimerism after bone marrow transplantation

Shaiegan M.[1], Hadjati S.[1], Iravani M.[2], Aghaiipour M.[1] , David G.[3] , Bernard D.[3], Tabatabaian A.[1], Lotfi M. H.[1], Lotfi P.[1]

[1]*Iranian Blood Transfusion Organization- Research Center*
[2]*Haematology, Oncology and Bone Marrow Research Center- Dr. Shariati Hospital*
[3]*Nantes Blood Transfusion Center, France*

Abstract

Background and Objectives
The aim of the present study was to evaluate red blood cell chimerism after bone marrow transplantation by flow cytometry.

Materials and Methods
In order to perform this assay, FITC labeled antibodies against blood groups ABH, Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS were used.14 hematologic patients under BMT were selected for this study. The required sample was 5 ml peripheral blood that is collected in tubes containing EDTA. At first, donor and recipients red cells phenotypes were identified with the use of both agglutination and flow cytometry methods; then, on post-transplantation days of 15, 30 and 60, only blood samples of the recipients were analyzed by flow cytometry for the antigens differing from donors to recipients. Antibody screening test and titration of ABH Isohemagglutinins were performed on recipients' plasma samples and then repeated on post-transplantation day of 60.

Results
After BMT, red cell chimerism was detected in all 14 patients (in 9 patients on post-transplantation day of 15 and in 5 patients on day of 30). Antibodies against minor blood groups and Rh blood group were not detected at all. The occurrence of chimerism was not inhibited by ABO incompatibility of donors and recipients but in patients who were ABH incompatible with their donors, ABH isohemagglutinins titer following transplantation decreased. Although the presence of isohemagglutinins did not prevent chimerism but it seems these antibodies by attaching to their related antigens on chimeric red cells membrane prevented corresponding antigen detection.

Conclusions
Now by using flow cytometry, red cell phenotyping is applicable and reticulocyte analysis is much easier to perform so that chimerism can be detected in patients who have recently experienced blood transfusion. Moreover, through further evaluation of red cell chimerism and detection of recipient autologous red cells, disease relapse can be predicted.

Key words: Bone Marrow Transplantation (BMT), Chimerism, Red cells, Blood group antigens, Hematological disorders

Correspondence: Shaiegan M., PhD, IBTO-Research Center- Tehran
Tel.: (+9821) 8278346; Fax : (+9821) 8288555
E-mail: *shaiegan@ibto.ir*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-07-15]

[DOR: 20.1001.1.10279520.1383.1.1.1.1]