تقييم الأهمية التشخيصية لمجموعة من المستضدات الخلوية في تشخيص ابيضاض الدم الحاد عند الأطفال

إلهام حرفوش*

الملخص

خلفية البحث: يؤدي التنميط المناعي للخلايا دوراً مهماً في تشخيص آفات الدم الخبيثة. على أن التشخيص الدقيق للحالة الابيضاضية يعتمد على الاختيار الملائم لأضداد المستضدات السطحية.

الهدف: تقييم الأهمية التشخيصية لمجموعة من المستضدات الخلوية السطحية والسيتوبلاسمية في ابيضاضات الدم الحادة عند الأطفال.

المرضى والطرائق: أُجريت الدراسة على 651 حالة ابيضاض حاد لدى أطفال مقبولين في مشفى الأطفال الجامعي خلال المدة 2005-2009. اعتمدت تقنية الجريان الخلوي باستخدام أضداد وحيدة النسيلة نوعية لمجموعة من المستضدات الخلوية.

النتائج: فقط المستضدات TdT, CD3 وMPO أبدت نوعية مطلقة لنمط ابيضاضي معين، أمّا المستضدات CD2, CD7, CD13, CD15, CD33, CD117, CD79a, DR فأبدت تعبيراً شاذاً في خط خلوي مخالف، لكن معظمها أدى دوراً مهماً في التشخيص النهائي للحالة، إذْ إنَّ معظم المستضدات المدروسة كان يفتقر إلى الحساسية التشخيصية المطلقة. أيضاً أبدى المستضد CD34 أهمية كبيرة في إبراز تشخيص الابيضاض الحاد غير أن تعبيره اقتصر على 60% من الحالات بمجملها.

الخلاصة: لإيجاد تشخيص دقيق لابيضاضات الدم الحادة عند الأطفال، لا بد من استخدام الواسمات التالية على الأقل: CD3, MPO, TdT, CD34 , CD19 ,CD10, CD2, CD7, CD117, CD33,

* مخبر البحوث و الاستشارات الوراثية- كلية الطب البشري- جامعة دمشق.

Evaluation of a Four Color Protocol for Diagnosis of Pediatrics Acute Leukemia

Ilham Harfoush*

Abstract

Background: Flow cytometry became unavoidable step in the diagnosis of Acute Leukemia . However, accurate diagnosis is conditioned by using proper markers. Objective: to evaluate the quality of performance of four colors protocol, we used for immunophenotyping of acute leukemia in children

Patients and methods: the study included 651 children with AL among those admitted in Children University hospital during 2005-2009. A variety of labeled monoclonal antibodies were used to identify a set of T,B, and myeloid differentiation antigens.

Results: Among the used markers, only TdT, CD3 and MPO showed expression restricted by the proper lineage . The co expression of CD19 and CD10 together was exclusively found in the majority of B cell lineage ALL. Otherwise,CD34 , an important indicator of immatuartion, was expressed by 60% of ALL and AML cases. The remaining markers CD2, CD7, CD13, CD15, CD33, CD117, CD79a, DR , showed translineage expression. However, most of those markers had a critical role to confirm the cell lineage relevance of the malignant cells, since the almost all markers lacked absolute sensitivity.

Conclusions: the use of CD3, MPO, TdT, CD34 , CD19 and CD10 CD2, CD7, CD117, CD33, immunomarkers to diagnosis the pediatrics AL , is essential to make decision about abnormal cells and the cell lineage they belong to.

* Faculty of Medicine, Damascus University.

مقدمة:

تنشأ ابيضاضات الدم الحادة عن انتشار نسيلي شاذ لأرومات دموية توقفت عن النضج في مرحلة مبكرة من مسيرة التمايز. ترافق الحادثة الابيضاضية مجموعة من الأنماط المورثية والمناعية التي تتناسب بدرجات مختلفة مع السلوك السريري والإنذار، وكذلك مع الاستجابة العلاجية (3-1). ومن هنا كانت دراسة الحوادث البيولوجية في حالات الابيضاض الحاد عند الأطفال من الأمور الأساسية التي يعتمد عليها التدبير العلاجي. في السبعينات من هذا القرن تم اعتماد نظام التصنيف الخلوي الفرنسي-الأمريكي البريطاني (فاب) في تشخيص الابيضاضات الحادة. يقوم هذا النظام على أساس المعطيات الكيميائية والشكلية للخلايا الابيضاضية التي سمحت بتمييز ثمانية أصناف خلوية من الابيضاضات النقوية الحادة مرقمة من م1-م8، وثلاثة أصناف من الابيضاضات اللمفاوية الحادة مرقمة من ل1- ل3.(4). ومع اكتشاف الأضداد وحيدة النسيلة التي سمحت بدراسة النمط المناعي للخلايا الابيضاضية بهدف التحديد الدقيق لمنشئها ولدرجة تمايزها، تبين قصور التصنيف الشكلي، ولاسيَّما ما يخص التمييز بين المنشئين النقوي واللمفاوي للخلايا الابيضاضية. فعلى سبيل المثال، يصعب التمييز شكلياً بين الابيضاض النقوي الحاد قليل التمايز،عن الابيضاض اللمفاوي الحاد بسبب غياب المعطيات الكيميائية الخلوية النوعية للخط النقوي (5)، وللسبب نفسه لا يمكن الفصل شكلياً بين الأرومات الابيضاضية التي تعود إلى مصورات الصفيحات وبين الأرومات الابيضاضية الناشئة من مصورات الخلايا اللمفاوية، مما أدى إلى كثير من الخلط بين الحالتين (6-7). كذلك يصعب تمييز الابيضاض اللمفاوي الحاد المترافق مع حبيبات آزورية الشكل الذي لا يشمله تصنيف الفاب عن الابيضاض النقوي الحاد (8). من جهة أخرى فإن التباين الشكلي في حالة الابيضاضات اللمفاوية الحادة قليل، هذا فضلاً عن استحالة التمييز بين المنشأ البائي والتائي للابيضاض اللمفاوي الحاد. وإذا أخذنا بالحسبان أن التدبير العلاجي يختلف بين المنشئين النقوي واللمفاوي للابيضاض،

وأن العلاج المناسب للابيضاضات الحادة عند الأطفال يؤدي إلى الشفاء في 80% من حالات المنشأ اللمفاوي و50% من حالات المنشأ النقوي (9)، كذلك أن إنذار الابيضاض اللمفاوي الحاد يختلف بين منشأ بائي وتائي (10)، يبدو جلياً أن التصنيف الشكلي غير كافٍ. مما دعا إلى نشوء تصنيف آخر داعم للتصنيف السابق، وهو التصنيف المناعي الذي اقترحته المجموعة الأوروبية (11) الذي يكتسي أهميته ليس فقط للأسباب المبينة أعلاه، وإنما أيضاً في المراقبة العلاجية من خلال استقصاء الخلايا الابيضاضية النادرة المتبقية (MRD) بعد إتمام شوط علاجي (12-13). يدل العديد من الدراسات على أن الشذوذات الموروثية التي يمكن أن ترافق الحادثة الابيضاضية تؤدي دوراً في الإنذار، كما أن العديد من هذه الشذوذات يبدي ارتباطاً بالنمط المناعي للخلايا الابيضاضية (14-16)، ومن هنا نشأ تصنيف منظمة الصحة العالمية لآفات الدم الخبيثة الأكثر شمولية، إذْ يأخذ بالحسبان وجود الشذوذات الصبغية المرافقة للآفة الدموية الخبيثة فضلاً عن النمط المناعي لها (17).

يقوم التصنيف المناعي للابيضاضات على إسناد المستضدات السطحية أو السيتوبلاسمية التي تعبرها الخلايا الابيضاضية إلى خط خلوي ومرحلة معينة من النضج. إذْ إنَّ نضج مصورات الدم يترافق بتبدل في نوعية المستضدات التي تعبرها في كل مرحلة من مراحل تمايزها. كما توجد مجموعة من المستضدات التي تميز خطاً خلوياً عن آخر والتي تظهر تدريجياً مع التقدم في النضج الخلوي. يمكن أن تصنف الابيضاضات استناداً إلى المعطيات المناعية للمراحل المتعاقبة من التمايز لهذه الأخيرة. وبناء على فعالية مجموعة من الأضداد وحيدة النسيلة النوعية لمثل تلك المستضدات يمكن لنا التمييز بين الابيضاض الحاد من منشأ نقوي وذاك من منشأ لمفاوي، فضلاً عن إمكانية التفريق بين المنشأ البائي والتائي لهذا الأخير. هناك مستضدات غير نوعية لخط خلوي مثل CD10 وCD34 وهي تؤدي دوراً في الإنذار والاستجابة العلاجية (18-20).

وفي نسبة مهمة من الحالات، يمكن للخلايا الابيضاضية أن تعبر في آنٍ واحد مستضدات تعود إلى خطين خلويين في آنٍ واحد (21)، في هذه الحالة تصنف إلى ابيضاض لمفاوي حاد مع تعبير لمستضدات نقوية أو ابيضاض نقوي حاد مع تعبير لمستضدات لمفاوية (11). تستدعي هذه الحالة تعديل الخطة العلاجية بما يتلاءم وحساسية مثل هذه الخلايا الابيضاضية للعقاقير الكيميائية (22-23).

على الرغم من الأهمية التي اعتلاها التنميط المناعي فإن التكلفة الباهظة للكواشف المستخدمة في هذه التقنية، تضع قيوداً ثقيلة على استخدامها. من هنا كان الترشيد الصحيح لاستخدام المستضدات الخلوية في تشخيص ابيضاضات الدم أمراً بالغ الأهمية. وفي السياق نفسه يبدو جليا أن انتقاء مستضد ما في سياق رسم استراتيجية تشخيصية ناجعة، يجب أن يستند استناداً أساسياً إلى مدى مساهمة دور المعلومات التي يمكن أن يضيفها أو يؤكدها ذلك المستضد في إصابة الهدف الصحيح، سواء كان ذلك فيما يخص تأكيد وجود الخباثة، أو تعيين نوع الخلايا الابيضاضية. إذ إنَّ النتائج المرجوة من دراسة النمط المناعي لحالة دموية ما، يجب أن تتعدى مجرد إعطاء النسب المئوية للمستضدات التي تم استقصاؤها في مجمل الخلايا الموجودة في عينة الدم المحيطي أو النقي، الأمر الذي قد لا يساعد في حسم التشخيص، أو قد يؤدي حتى إلى الوقوع في الالتباس. في هذا المضمار، أجري العديد من الدراسات التي خلصت إلى اقتراح العديد من التوصيات التي تخص سبل استخدام الجريان الخلوي في مجال تشخيص التنشؤات الدموية (24-26). ولمَّا كانت السمات المناعية لآفة دموية خبيثة يمكن لها أن ترتبط إلى حد مهم بنوع الحادثة البدئية للشذوذ الجزيئي الناشئ الذي أسهم في ظهور هذه الآفة (14،27، 28) والذي ربما يرتبط بدوره بعوامل وراثية وبيئية معينة، أمكن لنا أن نتكهن باختلاف هذه السمات من منطقة إلى أخرى ومن مجموعة بشرية إلى أخرى. ومن ثَمَّ يكون من الأهمية بمكان أن نستنبط الطريقة المثلى في استخدام المستضدات الخلوية في تشخيص الخباثات الدموية الواقعة في

بلادنا من خلال دراسة الحالات المصادفة لدينا، وليس اعتماداً على نتائج دراسات قد لا يمكن إسقاطها على شعبنا.

وفي هذا المقال نقوم بتقييم الخطة المتبعة وأهمية كل من المستضدات المستخدمة من حيث الجدوى التشخيصية، وذلك من خلال تحليل المعطيات التي تمكنا من الحصول عليها لدى دراسة 651 حالة من حالات الابيضاض الحاد عند الأطفال.

أهمية البحث:

يساعد البحث في وضع ترشيد قويم لاستخدام المستضدات الخلوية في تشخيص ابيضاضات الدم الحادة عند الأطفال اعتماداً على معطيات تجريبية، بما يضمن التشخيص القائم على أسس متينة من جهة، وتجنب التكلفة المادية غير المجدية من جهة أخرى. وهذا أمر في غاية الأهمية، نظراً إلى ارتباط صحة التشخيص بمدى قدرة المستضدات المستخدمة للإيفاء بالغرض المطلوب، وكذلك بكفاءة الفاحص في تحليل المعطيات وتفسيرها التي تقدمها تلك المستضدات.

المرضى والعينات:

أُجريت الدراسة على 651 عينة توزعت كما يأتي: 412 عينة نقي العظم، فضلاً عن 213 عينة دم محيطي، 8 عينات سائل جنب، 4 عينات سائل حبن، و14 عينة سائل دماغي شوكي. تلك العينات أخذت من أطفال تتراوح أعمارهم بين شهرين و13 سنة، وكان يشك بوجود ابيضاض حاد لديهم بناء على المعطيات البيولوجية والسريرية.

المواد والطرائق:

استخدمت أضداد وحيدة النسيلة momoclonal antibodies نوعية للمستضدات الآتية: CD2, CD3, CD7, CD13, CD15, CD33, CD117, CD19, CD10, CD34, DR, MPO. كل من الأضداد السابقة مرتبط بإحدى المواد الومضانية الآتية: FITC, PE, PerCP, APC.

تم الحصول على جهاز الجريان الخلوي Flow Cytometer والأضداد ومحلول تفجير الكريات الحمر فضلاً عن محلول تثبيت الخلايا والكريات المجهرية رباعية الألوان (facs comp من شركة Bekton Dikenson.

بعد توزيع الأضداد في خمسة أنابيب وفقاً لخمس صيغ مناعية، كان يضاف حجم من العينة المرضية. وبعد مدة الحضن التي تسمح بتثبيت الأضداد على الخلايا بشكل نوعي، كانت الكريات الحمر تفجر ثم يتم التخلص من أشلائها بالغسل، وبعد ذلك يضاف محلول التثبيت، ثم تمرر العينة في جهاز الجريان الخلوي الذي يسمح بتحليل أربعة ملونات ومضانية مختلفة في آنٍ واحد Four colors.

تمرير العينات و ضبط الجودة:

كان يتم ضبط الجهاز بالتمرير الأسبوعي للكريات المجهرية رباعية الألوان، أما ضبط الجودة فكان يتم بالتمرير الأسبوعي لعينة دم محيطي طبيعية بعد معالجتها بالأضداد الآتية: CD3, CD4, CD8, CD45.

أخذت نافذة التمرير استناداً إلى معلمي الحجم FSC والتحبب SSC، مما سمح باستبعاد الأشلاء الخلوية المتبقية في العينة، كما تمت برمجة مدة التمرير بحيث تتوافق مع عبور 10000 خلية في هذه النافذة من الأنبوب الواحد.

اتخاذ القرار التشخيصي النهائي:

كان التشخيص النهائي لكل حالة على حدة يعتمد على المعطيات السريرية والشكلية ومعطيات التنميط المناعي. فيما يخص معطيات التنميط المناعي، اعتمدنا تصنيف المجموعة الأوروبية لتصنيف الابيضاضات الحادة (تصنيف European Group for Immunophhenotyping of Leukemia ,EGIL)

تحليل المعطيات الأولية:

بعد تمرير الأنابيب، كان يتم تحليل المعطيات الأولية للعينة المدروسة في صفحة تحليل يتم إنشاؤها باستخدام البرنامج الحاسوبي CellQuest. كانت تعين التجمهرات

الخلوية المختلفة في العينة من أجل معاينة كل منها على حدة من حيث المستضدات التي تعبرها كما اعتماداً على المعلمين CD45 و SSC، كما هو مبين بالشكل (1).

النتائج:

1- توزع الحالات بحسب المنشأ الخلوي للابيضاض

تبيّن اللوحة رقم (1) توزع حالات الابيضاض الحاد المدروسة بحسب المنشأ الخلوي للخلايا الورمية.

2- التعبير الشاذ للمستضدات النقوية واللمفاوية:

تبيّن اللوحة رقم (2) نسبة حالات الابيضاض اللمفاوي الحاد المتشارك مع تعبير شاذ لمستضد نقوي واحد أو أكثر (بحسب تصنيف أوجيل My-ALL)، وكذلك نسبة حالات الابيضاض النقوي الحاد المتشارك مع تعبير شاذ لمستضد لمفاوي واحد أو أكثر Ly-AML)

3- تعبيير المستضدات المختلفة في كل مجموعة نمطية من الابيضاضات الحادة:

تبيّن اللوحة (3) نسب إيجابية كل من المستضدات، وذلك في حالات الابيضاض الحاد اللمفاوي والنقوي.

المناقشة:

في سبيل تقييم الجدوى التشخيصية لبعض المستضدات الخلوية في ابيضاضات الدم الحادة عند الأطفال، بغية ترشيد استخدامها بالشكل الأنجع والأمثل، قمنا بدراسة 651 حالة ابيضاض حاد عند الأطفال، وذلك من حيث النمط المناعي للخلايا الابيضاضية. استخدمت في هذه الدراسة مجموعة من الأضداد وحيدة النسيلة النوعية لمستضدات خاصة بخط خلوي لمفاوي أو نقوي التي وزعت في خمس صيغ مناعية، تدخل في تركيب كل منها الواسمة CD45. حللت المعطيات الأولية بعد فصل الخلايا الخبيثة اعتماداً على المعلمين CD45 وSSC، مما مكننا من تمييز 506 حالة ابيضاض لمفاوي حاد (78% من الحالات الإجمالية)، فضلاً عن 136 حالة ابيضاض نقوي حاد (21% من الحالات) و9 حالة ابيضاض حاد من منشأ خلوي غير محدد (1% من الحالات).

بينّت دراستنا أن معظم الابيضاضات اللمفاوية الحادة عند الأطفال هي ذات نمط بائي (84% من مجمل الحالات اللمفاوية). تقارب نسب التوزع هذه تلك المدونة في الدراسات المختلفة لدى الأطفال (29-30).

تبدي دراستنا وجود التعبير الشاذ للمستضدات النقوية في الابيضاضات اللمفاوية الحادة بنسبة مهمة (37% من الحالات ذات المنشأ البائي، 43% من الحالات ذات المنشأ التائي). كما لوحظ وجود التعبير الشاذ للمستضدات اللمفاوية بنسبة مشابهة (41% من حالات الابيضاض النقوي). في دراسة أمريكية سجل بوي Pui أن نحو ثلث حالات الابيضاض اللمفاوي الحاد عند الأطفال يترافق بتعبير مستضدات نقوية، وبين أن ذلك ارتبط بوجود شذوذات مورثية (31). وفي دراسة ماليزية بلغت هذه النسبة 23% (32)، في حين دون بينيه Bene نسبة 62% (33). وبحسب دراسات أخرى تراوحت النسب المسجلة للتعبير الشاذ للمستضدات اللمفاوية في ابيضاضات الدم النقوية الحادة عند الأطفال من 21-60% (34-35).

بدت حالات الابيضاض النقوي في دراستنا شديدة التغاير من حيث تعبير المستضدات النقوية التي كان أكثرها حساسية هو المستضد CD33، وتليه المستضدات CD13، CD117، والبيروكسيداز التي تتمتع بالمستوى نفسه من الحساسية تقريباً، بينما يبدو المستضد CD15 الأقل حساسية، لكنه الأكثر نوعية بعد البيروكسيداز التي تبدي نوعية مطلقة. نتفق مع العديد من الباحثين الذين ركزوا على أهمية المستضد CD117 في تشخيص الابيضاضات النقوية لنوعيته التي تفوق كلا المستضدين CD13 وCD33، (36،33-38). كما نتفق مع كاليم Kaleem في ترتيب المستضدين CD33 وCD13 من حيث الحساسية، غير أن الأخير وجد أن CD33 كان أقل نوعية منCD13 (36).

لدى النظر إلى المستضدات اللمفاوية في دراستنا: يبدي المستضد CD19 حساسية مطلقة للابيضاض اللمفاوي الحاد من منشأ بائي، كما يبدي المستضد CD79a السيتوبلاسمي حساسية عالية. غير أن نوعية الأخير تفوق الأول بقليل. وبحسب

دراستنا ، يمكن لنوعية المستضد CD19 أن ترقى إلى نسبة 100% فيما لو اقترن بالمستضد CD10. مما يدعو إلى استخدامهما معاً كخطوة تشخيصية أولى، وهذا يتوافق مع دراسات الأخرى (39-40). من جهة أخرى، فإن أكثر المستضدات اللمفاوية حساسية للابيضاض اللمفاوي التائي الحاد هو المستضدCD7، ويليه المستضد CD3 السيتوبلاسمي، ثم المستضد CD2. في حين يبدي المستضد CD3 السطحي حساسية ضعيفة نسبياً. وبالنظر إلى نوعية هذه المستضدات، نلاحظ أن للمستضد CD3 نوعية شبه مطلقة، كما يبدي المستضد CD2 نوعية عالية أيضاً، في حين نصادف المستضد CD7 في نحو 20% من الابيضاضات النقوية الحادة. أخيراً يبدي المستضد TdT في دراستنا حساسية ونوعية عالية للابيضاضات اللمفاوية(79%،99% على التوالي).

لدى دراسة تعبير المستضدات غير النوعية لخط خلوي معين، لاحظنا أن المستضد DR يبدي تعبيراً واضحاً في حالات الابيضاض اللمفاوي الحاد من منشأ بائي كلّها، ونادراً ما يعبر في تلك من منشأ تائي، غير أنه يصادف في قسم مهم من الابيضاضات النقوية الحادة (53%)، لكن هذه النسبة تبقى أقل من تلك التي لاحظها Kaleem الذي سجل أن 86% من الابيضاضات النقوية الحادة عند الأطفال تترافق بتعبير المستضد DR (36)

مما سبق نستنتج أن غياب تعبير هذه المستضد يمكن له أن ينفي المنشأ البائي لكن وجوده لا يمكن أن يؤكده.

من جهة أخرى لاحظنا تعبير المستضد CD10 في 86% من حالات الابيضاض البائي، وفقط في 37% من حالات الابيضاض التائي، وفي أقل من 10 % من حالات الابيضاض النقوي، وهي نسب تقارب تلك التي وجدها كل من Consolini وKaleem (36،39). يمكننا أن نستنتج من ذلك أن هذا المستضد يبدي نوعية وحساسية عاليتين باتجاه الابيضاضات اللمفاوية وخاصة بائية المنشأ.

أمَّا المستضد CD34 فأكثر ما يصادف في دراستنا في الابيضاض البائي، (78%من الحالات)، ثم في الابيضاض النقوي (58%من الحالات) وأخيراً في الابيضاض التائي (43% من الحالات). يشابه هذا الترتيب ما جاء في دراسات أخرى وإن كانت نسب الحالات إيجابية المستضد CD34 أعلى نسبياً في دراستنا (19، 41). إن ما يمكن قوله بشأن المستضد سالف الذكر هو أنه ذو نوعية مطلقة للابيضاضات الحادة بشكل عام وليس لنوع محدد من الابيضاض، غير أنه يفتقر إلى الحساسية المطلقة، إذْ بلغت حساسيته التشخيصية للابيضاضات الحادة بشكل عام 68% في دراستنا.

إذا تناولنا مجمل المعطيات السابقة معاً يبدو جلياً أنه ما عدا المستضدين DR، CD19 لا يوجد أي مستضد ذي حساسية كاملة لأي من الأنماط الخلوية للابيضاضات الحادة، وبالمقابل، فيما عدا البيروكسيداز والمستضدين TdT, CD3 فإن أياً من المستضدات التي عايناها لا يتمتع بنوعية مطلقة لأي من الأنماط الخلوية للابيضاضات الحادة. إن ذلك يفرض علينا استخدام أكثر من مستضد نوعي لكل الخطوط الخلوية التائية والبائية والنقوية في مرحلة أولى. وهذا يتوافق مع التوصيات التي خلصت إليها الدراسات التي تمت بهذا الشأن (23-27).

إن حادثة التعبير الشاذ، فضلاً عن افتقار غالبية الواسمات المستخدمة إلى الحساسية الكاملة، يطرحان مشكلة تشخيصية مهمة، وتدعوان إلى ضرورة توخي الحذر لدى تفسير نتائج التنميط المناعي للابيضاضات الحادة عند الأطفال، إذ إنَّ ملاحظة إيجابية مستضد ما، غير كافية لإسناد منشأ الخلايا الابيضاضية إلى الخط الخلوي الموافق، بل يجب أن تفسر في إطار مجمل نتائج البحث عن المستضدات الأخرى. أخيراً تشير الدراسات إلى أهمية تحليل معطيات التنميط الخلوي اعتماداً على المعلمين SSC /CD45 (42)، وفي دراستنا سمح ذلك بفصل الخلايا الابيضاضية عن الخلايا الطبيعية المتبقية، مما أتاح تقدير نسبة الكتلة الخلوية الابيضاضية في العينة المدروسة، والحصول على نسب دقيقة وحقيقية لتعبير كل من الواسمات المدروسة في الخلايا

الابيضاضية. كما أن توفير إمكانية دراسة كل تجمهرة خلوية على حدة منح الدراسة إمكانيات كبيرة لاستخدام الواسمات المستخدمة كمعالم جودة داخلية جميعها.

الاستنتاجات والتوصيات:

يبدو تحليل الخلايا باستخدام المستضد CD45 مقترناً بمعلم البنية الحبيبيةSSC ذا أهمية كبيرة في تعيين الخلايا الابيضاضية، ولاسيَّما في الحالات التي لا تغلب فيها نسبة هذه الخلايا في العينة المدروسة. إِذْ يسمح بدراسة تعبير المستضدات المستخدمة في كل من الخلايا الخبيثة والطبيعية بشكل مستقل، مما يسمح بالحصول على نسب دقيقة له ضمن التجمهرة الخلوية الواحدة.

يبدو من الدراسة أيضاً أنه لا يمكن اتخاذ القرار التشخيصي اعتماداً على إيجابية مستضد وحيد لخط خلوي معين أو سلبيته نظراً إلى افتقار معظم المستضدات إلى النوعية والحساسية المطلقة، مما يحتم استخدام أكثر من مستضد لكل خط خلوي، وتفسير إيجابية تعبيره بشكل مقترن بمجمل معطيات التنميط المناعي الأخرى.

وأخيراً، للحصول على تشخيص و تصنيف واضح ودقيق لابيضاض الدم الحاد عند الأطفال ينبغي على الأقل استخدام المستضدات التالية في خطوة تشخيصية أولى CD3, MPO, CD33, CD7, CD19, TdT ,DR, CD10, CD117, CD34 مع ملاحظة استقصاء المستضد ,CD3 السيتوبلاسمي وليس السطحي.

نوع الابيضاض	الحالات المصادفة	
	العدد	النسبة المئوية
ابيضاض لمفاوي حاد من منشأ بائي	423	%65
ابيضاض لمفاوي حاد من منشأ تائي	83	%13
ابيضاض نقوي حاد	136	%21
ابيضاض حاد من منشأ غير محدد	9	%1

اللوحة رقم (1) توزع الحالات بحسب المنشأ الخلوي للابيضاض

نوع الابيضاض	الحالات المصادفة	
	العدد	النسبة المئوية ضمن المجموعة النمطية
ابيضاض لمفاوي حاد من منشأ بائي متشارك مع مستضدات نقوية (My-ALL)	158	37% من الابيضاضات البائية
ابيضاض لمفاوي حاد من منشأ تائي متشارك مع مستضدات نقوية(My-ALL)	36	43% من الابيضاضات التائية
ابيضاض نقوي حاد متشارك مع مستضدات لمفاوية(Ly-AML)	56	41%من الابيضاضات النقوية الحادة

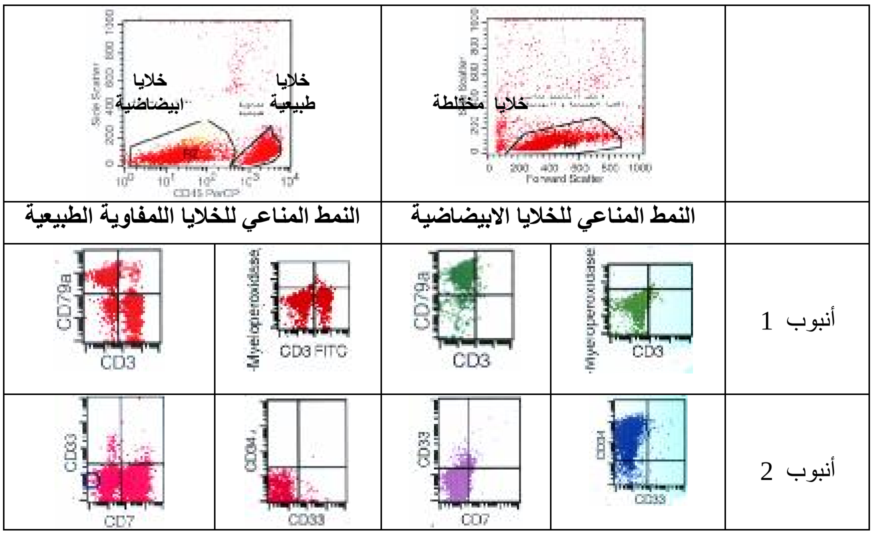
اللوحة رقم (2) التعبير الشاذ للمستضدات النقوية واللمفاوية:

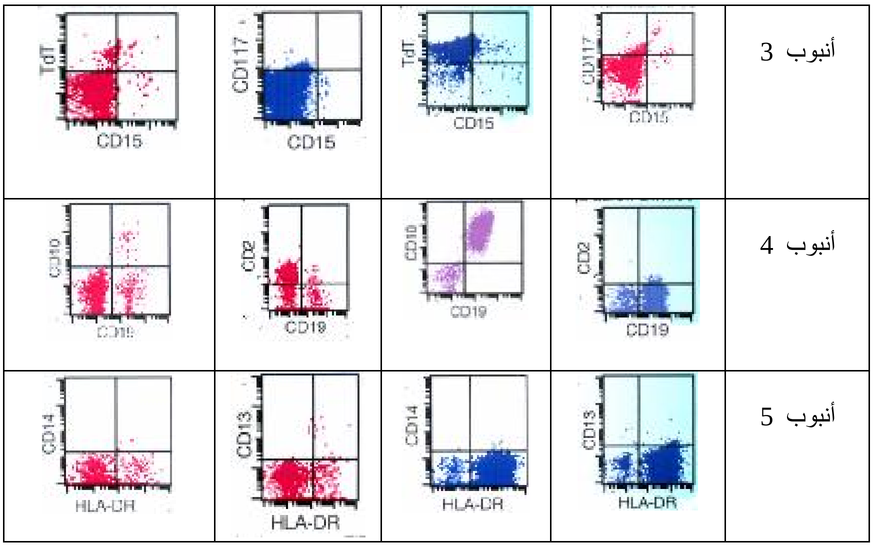
نوع المستضد	ALL		AML	الحساسية التشخيصية للمستضد	النوعية التشخيصية للمستضد
	منشأ بائي (423حالة)	منشأ تائي (83 حالة)	(136 حالة)		
CD2	0	56	6	%67	%95
CD3cyt	0	73	0	%88	%100
CD3s	0	32	0	%38	%100
CD7	0	80	28	%96	%80
CD79a	406	5	16	%96	%88
CD19	420	5	24	%100	%82

CD10	364	31	13	%78	%90
DR	420	3	73	*%100	*%46
TdT	333	53	10	%79	%100
CD13	141	10	86	%64	%70
CD15	20	6	57	%42	%95
CD117	44	14	86	%64	%89
CD33	73	19	109	%81	%82
CD34	331	36	80	**%60	100
MPO	0	0	85	%64	%100

اللوحة رقم (3) تعبير المستضدات المختلفة في كل مجموعة نمطية من الابيضاضات الحادة

- **فقط في الابيضاضات الحادة البائية******في الابيضاضات الحادة بشكل عام**





الشكل رقم (1): صفحة تحليل لعينة نقي مأخوذة من طفل مصاب بابيضاض لمفاوي حاد بائي.

في أعلى الشكل: تبدو خلايا العينة من خلال تحليلها بطريقتين مختلفتين: إلى يمين الصفحة: تحليل باستخدام المعلمين SSC, FSC حيث لا يمكن التمييز بين الخلايا الطبيعية والخلايا الابيضاضية في عينة النقي. و إلى اليسار، نلاحظ تحليل الخلايا باستخدام المعلمين SSC و CD45، حيث نميز بين تجمهرتين، إحداهما تمثل خلايا لمفاوية طبيعية، و الثانية تمثل الخلايا الابيضاضية في العينة.

في الأسفل: معطيات التنميط المناعي بعد تحليل الخلايا اعتماداً على المعلمين SSC و CD45

الأنبوب1: الخلايا الابيضاضية -CD3- CD79a+MPO ، الخلايا اللمفاوية الطبيعية موزعة بين تجمهرتين ، إحداهما إيجابية المستضد CD79a و تمثل الخلايا البائية ، و الثانية إيجابية المستضد CD3 تمثل التائية.

الأنبوب 2: تبدو الخلايا الابيضاضية -CD34+CD33-CD7 و الخلايا الطبيعية - CD33-CD7+CD34

الأنبوب 3 الخلايا الابيضاضية -TdT+CD15-CD117، و الخلايا الطبيعية -TdT+CD15 CD117-

الأنبوب 4: الخلايا الابيضاضية -CD10+ CD19+CD2 و الطبيعية +CD10-CD19+-CD2

الأنبوب :5 الخلايا الابيضاضية -DR+CD13-CD14 ، و الطبيعية -DR+-CD13-CD14

Reference

1-Einsiedel HG et al,.Long-term outcome in children with relapsed ALL by risk-stratified salvage therapy: results of trial acute lymphoblastic leukemia-relapse. J Clin Oncol. 2008 May 1;26(13):2238.
2- Winter, S. et al., Identification of genomic classifiers that distinguish induction failure in T-lineage acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. Blood . 2007, 110: 1429
3-Pui CH, et al, Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2004:118-45
4-Bennett JM, et al, Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. Ann Intern Med. 1985 Oct;103(4):620-5.
5-Bernier M, et al, Immunological definition of acute minimally differentiated myeloid leukemia (M0) and acute undifferentiated leukemia (AUL). Leuk Lymphoma 18:13, 1995
6-Woods WG, et al,. Intensively timed induction therapy followed by autologous or allogeneic bone marrow transplantation for children with acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome J Clin Oncol 1993;11:1448-1457
7-Ribeiro RC, et al. Acute megakaryoblastic leukemia in children and adolescents: a retrospective analysis of 24 cases. Leuk Lymphoma 1993;10:299-306.
8-Cerezo L, et al. Laboratory correlates and prognostic significance of granular acute lymphoblastic leukemia in children . Am J Clin Pathol 1991;95:526-531
9-Pui CH, et al,. Childhood and adolescent lymphoid and myeloid leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2004:118-45
10-Richards SM, et al,Analysis of the immunophenotype of children treated on the Medical Research Council United Kingdom Acute Lymphoblastic Leukaemia., Leukemia. 1998 Aug;12(8):1249-55.
11-Bene MC, et al, Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). Leukemia 9:1783, 1995
12-Al-Mawali A, et al, The role of multiparameter flow cytometry for detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. Am J Clin Pathol. 2009 Jan;131(1):16-26.
13-Dworzak MN, et al. Standardization of flow cytometric minimal residual disease evaluation in acute lymphoblastic leukemia: Multicentric assessment is feasible. Cytometry B Clin Cytom. 2008 Jun 11.
14-Basso G, et al, New methodologic approaches for immunophenotyping acute leukemias. Haematologica. 2001 Jul;86(7):675-92.
15-K Kita, et al, Phenotypical characteristics of acute myelocytic leukemia associated with the t(8;21)(q22;q22) chromosomal abnormality. Haematologica. 1999 May;84(5):405-12.
16-Orfao A, et al, The flow cytometric pattern of CD34, CD15 and CD13 expression in acute myeloblastic leukemia is highly characteristic of the presence of PML-RARalpha gene rearrangements.
17-Harris NL, et al,The World Health Organization classification of neoplasms of the hematopoietic and lymphoid tissues:,November, 1997., Bloomfield CD. Hematol J. 2000;1(1):53-66.

18-R. T. Costello, et al,Human Acute Myeloid Leukemia CD34+/CD38- Progenitor Cells Have Decreased Sensitivity to Chemotherapy and Fas-induced Apoptosis, Cancer Res., August 1, 2000; 60(16): 4403

19-Hann IM, et al, .Analysis of the immunophenotype of children treated on the Medical Research Council United Kingdom Acute Lymphoblastic Leukaemia. Leukemia. 1998 Aug;12(8):1249-55.

20-Uckun FM, et al, Prognostic significance of the CD10+CD19+CD34+ B-progenitor immunophenotype in children with acute lymphoblastic leukemia, Leuk Lymphoma. 1997 Nov;27(5-6):445-57.

21-Pui CH, et al, Reappraisal of the clinical and biologic significance of myeloid-associated antigen expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol. 1998 Dec;16(12):3768-73.

22-Pituch-Noworolska A . Biological properties and sensitivity to induction therapy of differentiated cells expressing atypical immunophenotype in acute leukemia of children. Folia Med Cracov. 2001;42(3):5-80.

23-Pui C-H, et al, Myeloid-antigen expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 1991;325:1378-1379.

24-Wood BL, et al, Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents Cytometry B Clin Cytom. 2007;72 Suppl 1:S14-22

25-Braylan RC, et al, Optimal number of reagents required to evaluate hematolymphoid neoplasias: results of an international consensus meeting.- Cytometry. 2001 Feb 15;46(1):23-7,

26-Rothe G, et al, Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. Working Group on Flow Cytometry and Image Analysis. Leukemia. 2000 Feb;14(2):336

27-Jansen MW, et al,. Immunobiological diversity in infant acute lymphoblastic leukemia is related to the occurrence and type of MLL gene rearrangementLeukemia. 2007 Apr;21(4):633-41. Epub 2007 Feb 1.

28-Liu Y, et al,. Immunophenotypic characteristics of children with acute lymphoblastic leukemia carrying TEL-AML1 fusion gene. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. 2006 Aug;14(4):714-6.

29-Sandler DP, et al, Epidemiology of acute leukemia in children and adults. Sem oncol, 1997, vol. 24, no 1 pp. 3-16

30-SEER data, British Journal of Cancer (2004) 90, 1771–1776. Childhood leukaemia incidence and the population mixing hypothesis in US

31-Pui CH, et al, Reappraisal of the clinical and biologic significance of myeloid-associated antigen expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol. 1998 Dec;16(12):3768-73

32-Ng SM, et al, Clinical features and treatment outcome of children with myeloid antigen coexpression in B-lineage acute lymphoblastic leukemia: a study of 151 Malaysian children. J Trop Pediatr. 2000 Apr;46(2):73-8.

33-Bene MC, et al, The reliability and specificity of c-kit for the diagnosis of acute myeloid leukemias and undifferentiated leukemias. The European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL). Blood. 1998 Jul 15;92(2):596-9.

34-Smith FO, et al, Expression of lymphoid-associated cell surface antigens by childhood acute myeloid leukemia cells lacks prognostic significance. Blood 1992;79:2415-2422
35-Kuerbitz SJ, et al, Expression of myeloid-associated and lymphoid-associated cell-surface antigens in acute myeloid leukemia of childhood: a Pediatric Oncology Group study. J Clin Oncol 1992;10:1419-1429.
36-Kaleem Z, et al, Flow cytometric analysis of acute leukemias. Diagnostic utility and critical analysis of data.Arch Pathol Lab Med. 2003 Jan;127(1):42-8.
37-Schwartz S, et al, Expression of the C-kit receptor (CD117) is a feature of almost all subtypes of de novo acute myeloblastic leukemia (AML), including cytogenetically good-risk AML, and lacks prognostic significance. Leuk Lymphoma. 1999 Jun;34(1-2):85-94.
38- Karaagaoglu E, et al,CD34/CD117 co-expression in childhood acute leukemia.
Uckan D, Hicsonmez G, Yetgin S, Gurgey A, Cetin M,
Leuk Res. 2000 Mar;24(3):201-6.
39-Consolini R, et al, Clinical relevance of CD10 expression in childhood ALL. Haematologica. 1998 Nov;83(11):967-73.,
40-Lucio P, et al , BIOMED-I concerted action report: flow cytometric immunophenotyping of precursor B-ALL with standardized triple-stainings. Leukemia. 2001 Aug;15(8):1185-92
-41-` Sperling C, et al, Clinical, morphologic, cytogenetic and prognostic implications of CD34 expression in childhood and adult de novo AML. Leuk Lymphoma. 1995 May;17(5-6):417-26.
42- Kern W, et al , Four-fold staining including CD45 gating improves the sensitivity of multiparameter flow cytometric assessment of minimal residual disease in patients with acute myeloid leukemia. - Hematol J. 2004;5(5):410-8.

تاريخ ورود البحث إلى مجلة جامعة دمشق: 2009/3/31.
تاريخ قبوله للنشر: 2009/8/10.