۱- حنانه محور، کارشناس علوم آزمایشگاهی
۲-دکتر امیرهوشنگ نژاده، دکترای علوم آزمایشگاهی و عضو انجمن شیمی کلینیکال آمریکا

نقش فلوسایتومتری در تشخیص دقیق لوسمی‌ها

فلوسایتومتری یک تکنیک قدرتمند در پزشکی و زیست‌شناسی سلولی است که برای بررسی و تحلیل خصوصیات فیزیکی و شیمیایی سلول‌ها یا ذرات معلق در یک مایع استفاده می‌شود. این روش با استفاده از لیزر و آشکارسازهای حساس، اطلاعات دقیقی درباره اندازه، شکل، میزان فلوئورسانس و ویژگی‌های دیگر سلول‌ها ارائه می‌دهد. فلوسایتومتری یکی از پرکاربردترین روش‌ها در حوزه‌های ایمونولوژی، سرطان‌شناسی، میکروبیولوژی و زیست‌فناوری محسوب می‌شود.

روش کار

۱. آماده‌سازی نمونه:

سلول‌ها یا ذرات مورد بررسی ابتدا در یک مایع معلق می‌شوند. این مرحله می‌تواند شامل رنگ‌آمیزی سلول‌ها با مواد فلوئورسانس باشد تا بتوان ویژگی‌های خاصی را در آن‌ها بررسی کرد.

۲. عبور از مسیر لیزر:

نمونه از طریق یک لوله باریک وارد دستگاه می‌شود. طراحی خاص این سیستم باعث می‌شود که سلول‌ها به‌صورت تک‌تک از مقابل پرتو لیزر عبور کنند.

۳. برخورد لیزر و انتشار سیگنال:

هنگامی که لیزر به هر سلول برخورد می‌کند، دو نوع پراکندگی نوری ایجاد می‌شود:

- پراکندگی رو به جلو FSC که اطلاعاتی درباره اندازه سلول ارائه می‌دهد.
- پراکندگی جانبی SSC که اطلاعاتی درباره پیچیدگی و گرانولاسیون داخلی سلول نشان می‌دهد.

علاوه بر این، اگر سلول‌ها با رنگهای فلورسانس نشاندار شده باشند، لیزر باعث تحریک این رنگ‌ها شده که باعث می شود این سلول ها نور را در طول موج‌های خاصی منتشر کنند.

۴. آشکارسازی و تحلیل داده‌ها:

سیگنال‌های نوری دریافت‌شده توسط حسگرهای دستگاه ثبت و به داده‌های قابل تحلیل تبدیل می‌شوند. این داده‌ها می‌توانند اطلاعات مختلفی مانند تعداد، نوع، اندازه و ویژگی‌های شیمیایی سلول‌ها را مشخص کنند.

کاربردها

فلوسایتومتری امکان مطالعه و بررسی گسترده‌ای از خصوصیات سلول را فراهم میکند که شامل موارد زیر است.

- **بررسی مارکرها و پروتئین های سطحی سلول:** شناسایی آنتی ژن های خاص روی سطح سلول که در شناسایی انواع سلول ها و بررسی پاسخ های ایمنی کاربرد دارند.

اندازه و گرانولیتی سلول: ارزیابی ابعاد و میزان گرانول های داخل سلولی که در تشخیص انواع سلول های خونی و ایمنی ارزشمندهستند.

- **تحلیل محتویات سیتوپلاسمی:** بررسی اجزای داخل سلولی برای درک بهترعملکرد و وضعیت فیزیولوژیک سلول ها.

مطالعه پیگمان های سلولی: از جمله بررسی کلروفیل در تحقیقات گیاهی یا سایر پیگمان های زیستی در سلول های جانوری.

- **آنالیز DNA و RNA:** اندازه گیری میزان مواد ژنتیکی(DNA وRNA) برای بررسی تکثیر سلولی، چرخه سلولی و تغییرات ژنتیکی.
- **آنالیز کروموزوم ها:** بررسی ساختار و تغییرات کروموزومی که در مطالعات ژنتیکی و تشخیص ناهنجاری های کروموزومی اهمیت دارد.

• **شناسایی و مطالعه پروتئین های داخل سلولی یا متصل به غشا:** که در عملکرد و ارتباطات سلولی تاثیر دارند.

علاوه بر تجزیه و تحلیل ویژگی‌های سلولی، فلوسایتومتری در حوزه‌های تخصصی مختلف نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد، از جمله:

• **جداسازی جمعیت‌های سلولی هموژن از بین سلول‌های هتروژن:** این فرآیند به‌ویژه در جداسازی سلول‌های بنیادی، سلول‌های ایمنی یا سایر انواع سلول‌های تخصصی مفید است.

• **اندازه‌گیری pH داخل سلولی:** برای بررسی تنظیم محیط داخلی سلول‌ها و پاسخ‌های متابولیکی آن‌ها.

• **تحلیل مسیرهای سیگنالینگ سلولی:** بررسی نحوه انتقال پیام‌های درون‌سلولی و پاسخ به محرک‌های مختلف.

• **شناخت رده‌های سلولی:** شناسایی و طبقه‌بندی انواع مختلف سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی و بالینی.

• **شناسایی و تحلیل اگزوزوم‌ها:** بررسی نانوذرات خارج‌سلولی که در ارتباطات بین‌سلولی و بیماری‌های مختلف نقش دارند.

• **مطالعه بافت‌های سلولی بالغ:** برای درک بهتر ساختار و عملکرد انواع بافت‌ها.

• **ارزیابی فرآیندهای مرگ سلولی (آپوپتوز و نکروز):** تشخیص سلول‌های در حال مرگ در شرایط مختلف بیماری یا تحت تأثیر داروها.

• **بررسی لانه‌گزینی سلول‌های پیوند شده به حیوانات مدل:** جهت مطالعه رفتار و بقای سلول‌های پیوندی در بدن موجود زنده.

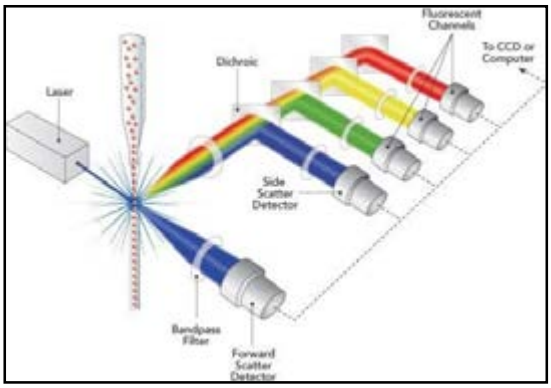
• **تشخیص بیماری‌های بدخیم:** از جمله لوسمی‌های حاد و مزمن و اختلالات پلاسماسل‌ها ولنفوم ها که با تغییرات خاص در ویژگی‌های سلولی همراه هستند.

تشخیص بیماری های غیربدخیم:ازجمله M.S،PNH

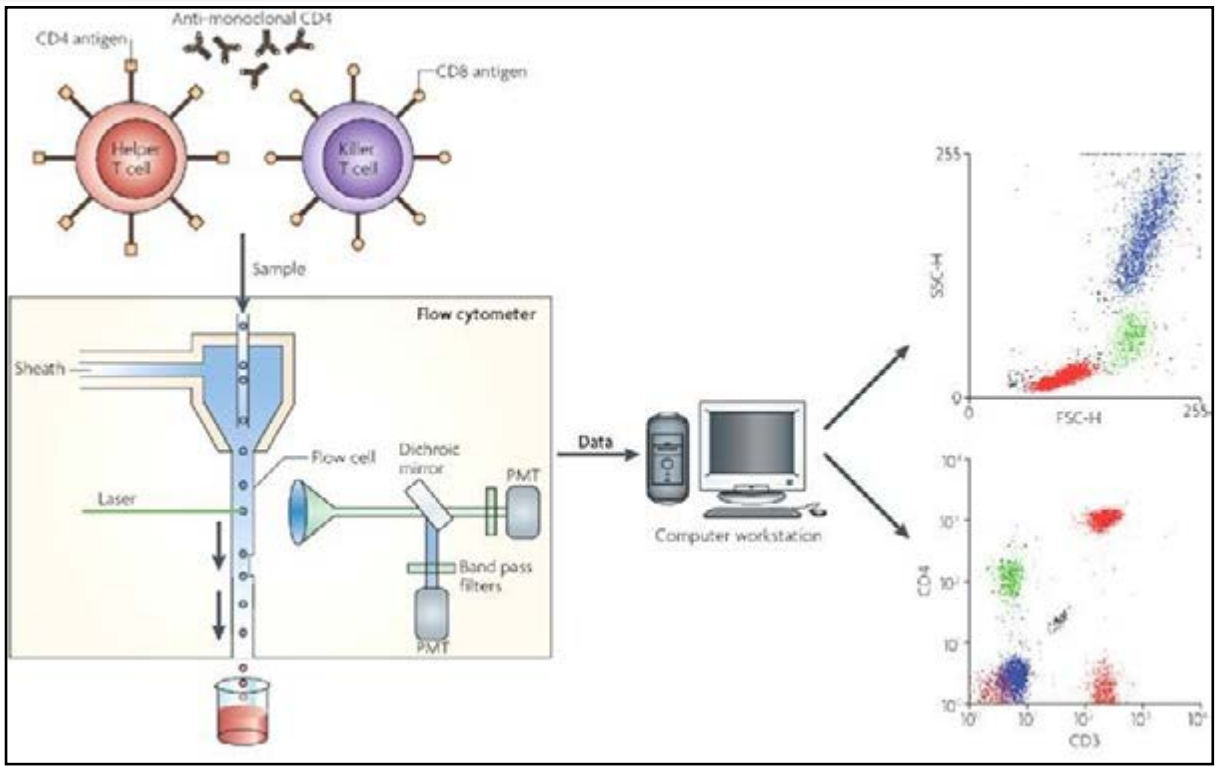
در حوزه تشخیص بیماری، فلوسایتومتری دارای نقش بسزایی در روند تشخیص و طبقه بندی انواع لوسمی‌ها و لنفوم ها، تشخیص مالتیپل میلوما و سایر اختلالات پلاسماسل‌ها است. این بررسی با ارزیابی CD مارکرها انجام می‌شود. CD مارکرها که به آنها آنتی ژن‌های CD نیز گفته می‌شود مولکول‌های پروتئینی هستند که بر روی سطح سلول‌ها قرار دارند و به تمایز یک نوع سلول از سلول‌های دیگر کمک می‌کنند. هر کدام یک عدد انحصاری دارند و امکان شناسایی فنوتایپ‌های سلولی را فراهم می‌کنند. این نامگذاری اولین بار در سال ۱۹۸۲ دراولین کنفرانس بین المللی لوکوسیت های تمایز یافته انجام شد.

لوسمی:

گروهی از بدخیمی‌های خونی که با تکثیر سلول‌های خونساز



نابالغ در مغز استخوان و درگیری مکرر خون محیطی و سایر اندام‌ها مشخص می‌شوند، لوسمی می‌نامند. لوسمی ها را می‌توان براساس میزان پیشرفت آنها به دو نوع حاد یا مزمن طبقه‌بندی کرد. لوسمی‌ها بر اساس نوع رده سلولی به دو گروه لنفوئیدی و میلوئیدی و از نظر بالینی به دو نوع حاد و مزمن تقسیم می‌شوند. با پیشرفت فوق العاده در ابزار دقیق و معرف‌ها در چند دهه گذشته، فلوسایتومتری به یک ابزار قدرتمند ایمونوفنوتایپ تبدیل شده است و نقش مهمی در تشخیص انواع لوسمی ایفا می‌کند. فلوسایتومتری می‌تواند به سرعت جمعیت سلولی غیرطبیعی را شناسایی و فنوتایپ آن را مشخص کند، دودمان را طبقه بندی و تشخیص دهد یا فهرست تشخیص افتراقی را محدود کند. همچنین می‌تواند کلونالیته یک جمعیت سلول B یا T بالغ را ارزیابی کند که برای تشخیص یا پیش بینی پیش آگهی بیمار نیز بسیار مفید است. همبستگی نتایج فلوسایتومتری با مورفولوژی و اطلاعات بالینی وپاتولوژیک و گاهی اوقات یافته‌های سیتوژنتیک و مولکولی برای تفسیر دقیق یا تشخیص ضروری است. ایمنوفنوتایپینگ به روش فلوسایتومتری یک روش آزمایشگاهی است که وجود یا عدم وجود نشانگرهای گلبول سفید به نام آنتی ژن را تشخیص می‌دهد. این آنتی ژن‌ها ساختارهای پروتئینی هستند که روی گلبول‌های سفید یا درون آنها یافت می‌شوند. گروه های خاصی از این آنتی ژن‌ها معمولاً روی سطح یا درون گلبول‌های سفید وجود دارند و منحصر به انواع سلول‌ها و مراحل بلوغ سلولی هستند. علاوه بر این، در سلول‌های غیرطبیعی مرتبط با لوسمی‌ها و لنفوم‌ها، الگوهای خاصی از بیان آنتی‌ژن‌ها مشاهده می‌شود. این الگوها شامل حضور یا غیاب برخی از مارکرهای سطحی و داخل سلولی هستند که می‌توانند در تشخیص و تمایز بین انواع مختلف این بیماری‌ها نقش مهمی داشته باشند. به‌عنوان مثال، برخی سلول‌های لوسمی ممکن است



آنتی‌ژن‌هایی را بیان کنند که در شرایط طبیعی فقط در مراحل خاصی از تکامل سلول‌های خونی دیده می‌شوند، یا ممکن است ترکیب غیرمعمولی از مارکرهای سطحی را نشان دهند.

بررسی این الگوهای آنتی‌ژنی با استفاده از فلوسایتومتری به پزشکان و محققان کمک می‌کند تا نوع دقیق لوسمی یا لنفوم را تشخیص داده، پیشرفت بیماری را ارزیابی کنند و استراتژی‌های درمانی مناسبی را انتخاب نمایند. ایمنوفنوتایپینگ با فلوسایتومتری در کمک به تشخیص، طبقه‌بندی، درمان و تعیین پیش آگهی سرطان‌های سلول‌های خونی مفید است. لوسمی‌ها و لنفوم‌ها با یک گلبول سفید غیر طبیعی که شروع به تقسیم غیر قابل کنترل می‌کند و کپی‌های متعددی از خود می‌سازد ایجاد می‌شوند. در سال‌های اخیر ایمنوفنوتایپینگ با استفاده از فلوسایتومتری امکان طبقه‌بندی لوسمی‌ها، تعیین شاخصه‌های کارآمد در پیش آگهی لوسمی‌ها، اهداف درمانی و ارزیابی MRD را فراهم نموده است. MRDیا حداقل بیماری باقی‌مانده به تعداد کمی از سلول‌های سرطانی گفته می‌شود که پس از درمان در بدن بیمار باقی می‌مانند و با روش‌های معمول قابل تشخیص نیستند.

MRD نشان‌دهنده احتمال عود بیماری است و بررسی آن به پزشکان کمک می‌کند تا میزان پاسخ بیمار به درمان، خطر بازگشت بیماری و نیاز به درمان‌های تکمیلی را ارزیابی کنند. فلوسایتومتری و PCR از روش‌های دقیق تشخیص MRD هستند که می‌توانند حتی یک سلول سرطانی را در بین میلیون‌ها سلول سالم شناسایی کنند. تشخیص زودهنگام MRD به بهبود پیش‌آگهی بیماران مبتلا به سرطان‌های خونی مانند لوسمی و لنفوم کمک می‌کند و در تصمیم‌گیری برای ادامه یا تغییر درمان نقش مهمی دارد.

انواع لوسمی و مارکرهای مرتبط در تشخیص آن ها به عبارت زیر است:

• **لوسمی لنفوبلاستیک حاد(ALL):** که با ایجاد تعداد زیادی لنفوسیت نابالغ مشخص می‌شود. علائم ممکن است شامل احساس خستگی، رنگ پریدگی، تب، خونریزی یا کبودی و بزرگ شدن غدد لنفاوی باشد.ALL شامل دو زیر گروه ALL T cell type و type cell B ALL است. جهت تشخیص ALL B cell type می‌توان از مارکرهای زیر استفاده کرد:

CD19, CD20, CD22, CD34, CD10, CD38, CD45, TDT

و جهت تشخیص ALL T cell type می‌توان از مارکرهای ذکر شده کمک گرفت که عبارت اند از: CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD1a, CD45, CD34, TDT

• **لوسمی میلوئیدی حاد(AML):** که شامل۸ زیر گروه M0تا M7 است. علائم معمولاً طی چند هفته ایجاد می‌شود و با گذشت زمان شدت می‌گیرد. علائم می‌تواند شامل رنگ پریدگی، احساس خستگی یا ضعف، تنگی نفس، عفونت‌های مکرر، کبودی یا خونریزی غیرمعمول و مکرر مانند خونریزی لثه یا خونریزی بینی و کاهش وزن باشد. برای تشخیص می‌توان از مارکرهای زیر استفاده کرد که عبارتنداز: HLA-, CD33, CD13, CD117, CD34

DR,CD14,CD64,CD45

لازم به ذکراست برای تشخیص هرکدام از زیرگروه های AML،علاوه برمارکرهای فوق،مارکرهای دیگری نیزبه صورت اختصاصی وجود دارند که بهتراست درمباحث مرتبط دیگر به صورت فوق تخصصی عنوان و بررسی شود.

• **لوسمی لنفو بلاستیک مزمن(CLL):** که در آن مغز استخوان تعداد زیادی لنفوسیت تولید می‌کند در ابتدای بیماری معمولاً هیچ علامتی وجود ندارد. بعدها ممکن است تورم غدد لنفاوی بدون درد، احساس خستگی، تب، تعریق شبانه یا کاهش وزن بدون هیچ دلیل مشخص رخ دهد. جهت تشخیص می‌توان از مارکرهای زیر استفاده کرد:

CD5,CD10,CD19,CD23,CD20,CD22,FMC7,ZAP70,CD38

• **لوسمی میلوئیدی مزمن(CML):** این نوع لوسمی که با افزایش و رشد غیر قابل تنظیم سلول‌های میلوئیدی در مغز استخوان و تجمع این سلول‌ها در خون مشخص می‌شود اغلب علائمی ایجاد نمی‌کند و معمولاً در طول آزمایش خون تشخیص داده می‌شود.

• **لوسمی میلومونوسیتی مزمن(CMML):** شایع‌ترین علامت آن افزایش قابل توجه مونوسیت هاست که در آزمایش خون دیده می‌شود. از علائم دیگر می‌توان به کم خونی (کاهش گلبول‌های قرمز)، احساس خستگی شدید، تنگی نفس، رنگ پریدگی، لوکوپنی، ترومبو سایتوپنی، عفونت‌های مکرر، کبودی بدن،خونریزی‌های مکرر از بینی یا لثه، کاهش وزن و تب اشاره کرد. جهت تشخیص می‌توان از مارکرهای زیر استفاده کرد:

CD13, CD33, CD64, CD14,CD34,CD117,CD45

• **لوسمی سلول مویی(Hairy cell leukemia):** یک بدخیمی خونی غیرمعمول است که با تجمع لنفوسیت‌هایB غیرطبیعی مشخص می‌شود. معمولاً به عنوان زیر گروه لوسمی لنفوبلاستیک مزمن طبقه‌بندی می‌شود. برخی از افراد هیچ علامت یا نشانه‌ای ندارند و به صورت تصادفی با آزمایش خون متوجه بیماری می‌شوند. از علائم آن می‌توان به احساس سنگینی(پری) در شکم که ممکن است باعث ناراحتی فرد بعد از کمی غذا خوردن شود، احساس خستگی، کبودی بدن، عفونت‌های مکرر، ضعف، کاهش وزن بدون دلیل مشخص، درد زیر دنده‌ها، تب، تنگی نفس، توده‌های بدون درد در گردن زیر بغل، معده یا کشاله ران اشاره کرد. جهت تشخیص می‌توان از مارکرهای زیر استفاده کرد:

CD11c ,CD25 ,CD103 ,CD5 ,CD19.CD20 ,CD22,

CD23 ,CD10

• **لوسمی پلاسماسل(PCL):** شکل نادر و تهاجمی سلول‌های پلاسماسل است. از جمله علائم این بیماری می‌توان به خونریزی،عفونت‌های مکرر،آدنوپاتی وهپاتواسپلنومگالی اشاره کرد. جهت تشخیص می‌توان از مارکرهای زیر استفاده کرد:

CD38, CD138, cyKappa,cyLambda,CD56,CD117,CD19,CD20

نتیجه گیری

فلوسایتومتری روشی است که ویژگی های سلول را همان طور که درحال جریان درون یک مایع است اندازه گیری می کند. با این روش می توان چندین خاصیت سلول را به طور همزمان وباسرعت بالابررسی کرد.

این تکنیک روش سریع و قابل اطمینان برای بررسی های ایمونوفنوتیپی بدخیمی های مرتبط باخون ومغزاستخوان براساس مارکرهای سلولی است که در تشخیص و بررسی روند درمان بدخیمی های خونی یا لوسمی بسیار موثر است.

لوسمی ها بسیار متنوع هستند و مارکرهای متنوعی را در سطح سلول بیان می کنند، لذا به لحاظ بالینی، درمانی و یافته های آزمایشگاهی متفاوت از هم هستند. همچنین درمواقعی به دلیل وجود عوامل غیرعادی با سایر اختلالات خونی شباهت پیداکرده وتشخیص داده نمی شوند.علاوه براین در لوسمی ها پس ازدرمان و بهبود شاهد

سلول های باقی مانده بیماری هستیم که اگر تشخیص داده نشوند موجب عود مجدد می گردند که نسبت به لوسمی اولیه نیز مقاوم به درمان خواهند بود. هریک از این سلول ها نیز مارکرهای خاصی در سطح خود بیان می کنند که لازم است به درستی مشخص گردند. لذا روش های تشخیصی دقیق وسریع، دربررسی روند درمان و تشخیص زودهنگام بسیار حائز اهمیت است.

منابع:

1-Metaorganon.com

2- My.Clevelandclinic.org

3-Marion G.Macey,2007,Flowcytometry:Principles and Applications,Humana Press

4-www.nejadeh-lab.com