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

اهمیت بررسی MRD به روش فلوسایتومتری در پایش لوسمی لنفوبلاستیک حاد

کمینه ی مانده بیماری (MRD) نشان دهنده وجود شماری ازسلول‌های لوسمی زنده در بدن پس از درمان اولیه است و یک شاخص مهم برای پیش‌آگهی و تصمیم‌گیری درمانی در گونه های لوسمی ها به ویژه لوسمی میلوئیدی حاد (AML) ولوسمی لنفوبلاستیک حاد(ALL) به شمار می آید. یکی از روش‌های رایج و استاندارد برای تشخیص MRD، فلوسایتومتری چندرنگی (MFC) است که به دلیل سرعت، حساسیت بالا و توانایی شناسایی سلول‌های غیرطبیعی بر اساس مارکرهای سطحی وسیتوپلاسمی، کاربرد گسترده‌ای در آزمایشگاه‌های تشخیصی دارد. این نوشته مروری، به بررسی نقش تکنیک فلوسایتومتری در تشخیص MRD، مزایا و محدودیت‌های آن و اهمیت پایش MRD در مدیریت بیماران مبتلا به ALL می‌پردازد.

لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌های خونی است که بیشتر در کودکان دیده می‌شود اما در بزرگسالان نیز رخ می‌دهد. ALL بر اساس منشأ سلولی و ویژگی‌های مولکولی-ژنتیکی به دو زیرگروه زیر تقسیم می‌شود:

۱. ALL با منشأ لنفوسیت‌های B (B-ALL):

شایع‌ترین نوع لوسمی لنفوبلاستیک حاد است و حدود ۸۰-۸۵٪ موارد ALL در کودکان را شامل می‌شود.

۲. ALL با منشأ لنفوسیت‌های T(T-ALL):

حدود ۱۵-۲۰٪ موارد ALLرا شامل می‌شود و معمولاً در نوجوانان و بزرگسالان شایع‌تر است.

T-ALLپیش‌آگهی ضعیف‌تری نسبت به B-ALL دارد و نیاز به درمان‌های تهاجمی‌تری دارد.

موفقیت در درمان ALL به پایش دقیق پاسخ بیمار به درمان و تشخیص زودهنگام احتمال عود بیماری بستگی دارد. کمینه مانده بیماری(MRD)، که نشان‌دهنده تعداد اندکی از سلول‌های لوسمی باقی‌مانده پس از درمان است، یکی از قوی‌ترین عوامل پیش‌بینی‌کننده عود بیماری و بقا در بیماران ALL به شمار می آید. از روش‌های مختلفی برای پایش MRD در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی استفاده می‌شود، از جمله فلوسایتومتری چندرنگی، MFC، PCR و توالی‌یابی نسل جدید NGS.

در این میان، فلوسایتومتری به دلیل سرعت و دقت بالا، هزینه کمتر نسبت به روش‌های مولکولی، به عنوان یک روش کارآمد برای پایشMRD در بسیاری از مراکز آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

نقش MRD در پیش‌آگهی و مدیریت درمان ALL

بررسی MRD در چندین مرحله از درمان ALL دارای اهمیت است:

- **پس از فاز القایی درمان (IT):** فاز القایی درمان اولین مرحله ای از درمان لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) و لوسمی میلوئید حاد (AML) است که هدف آن حذف

بیشترین تعداد ممکن از سلول‌های سرطانی و رساندن بیمار به بهبودی کامل (CR) است. این فاز معمولاً ۴ تا ۶ هفته طول می‌کشد و شامل شیمی‌درمانی شدید با داروهایی مانند ونکریستین، کورتیکواستروئیدها (پردنیزولون یا دگزامتازون)، دوکسوروبیسین و سایر عوامل سیتوتوکسیک است.

- **در طول درمان نگهدارنده:** ارزیابی پایداری بهبودی به معنای بررسی مداوم وضعیت بیمار برای اطمینان از عدم بازگشت بیماری و حفظ بهبودی موقت (Remission)است.

- **پس از پیوند مغز استخوان:** پیوند مغز استخوان(HSCT) یکی از درمان‌های مهم برای بیماران مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL)، به‌ویژه در موارد پرخطر یا مقاوم به درمان است. با این حال، خطر عود (Relapse) پس از پیوند همچنان وجود دارد، و برای کاهش این خطر، پایش مداوم و درمان‌های تکمیلی ممکن است موردنیاز باشد.

روش فلوسایتومتری چندرنگی در بررسی MRD

فلوسایتومتری چندرنگی(MFC) یک روش مبتنی بر بررسی ویژگی‌های آنتی‌ژنی سلول‌های لوسمیک است که از آنتی‌بادی‌های دارای رنگ فلورسنت با استفاده از فلوروکروم های مختلف برای شناسایی مارکرهای سطحی و سیتوپلاسمی استفاده می‌کند. این روش قادر است سلول‌های بدخیم را براساس الگوی بیان آنتی‌ژن‌های غیرطبیعی(LAIP) از سلول‌های طبیعی متمایز کند. فلوروکروم‌ها، رنگ‌های فلورسنتی است که در فلوسایتومتری برای شناسایی و آنالیز سلول‌ها و مولکول‌ها براساس نشانه گذاری آنتی‌بادی‌ها استفاده می‌شود. این رنگ‌ها با نور لیزر برانگیخته شده و نور فلورسانس را با طول موج های خاصی منتشر می‌کند که توسط دتکتورهای دستگاه فلوسایتومتری ثبت می‌شود.

در پنل‌های چندرنگ (Multiparametric Flow Cytometry)، باید ترکیب مناسبی از فلوروکروم‌ها انتخاب شود. فلوروکروم‌ها بخش مهمی از آنالیز فلوسایتومتری است که با انتخاب صحیح آن‌ها، می‌توان داده‌های دقیق‌تری از جمعیت‌های سلولی به دست آورد. بسته به لیزرهای دستگاه، میزان بیان آنتی‌ژن و نیازهای آزمایشگاهی، ترکیب بهینه‌ای از فلوروکروم‌ها انتخاب می‌شود.

مراحل کلی انجام آزمایش به منظور بررسی MRD به روش فلوسایتومتری

۱. جمع‌آوری نمونه: نوع نمونه می تواند مغز استخوان یا خون محیطی باشد.

۲.طراحی پنل های مناسب و کارآمد.

هنگام طراحی پنل های فلوسایتومتری موارد زیر باید در نظر گرفته شوند:

-**شدت فلورسانس:** برای آنتی‌ژن‌های کم بیان، فلوروکروم‌های با شدت بالا مانند PE یا APC مناسب‌ترند.

- **حداقل همپوشانی طیفی:** همپوشانی طیفی زمانی اتفاق می‌افتد که دو یا چند فلوروکروم دارای طول موج‌های انتشار مشابه باشد و سیگنال آن‌ها در کانال‌های فلورسانسی یکدیگر وارد شود. این موضوع باعث می‌شود که سیگنال یک فلوروکروم در کانال اختصاصی فلوروکروم دیگر ثبت شود و در نتیجه، تداخل ایجاد کند. پس ضروری است که فلوروکروم‌ها طوری انتخاب شود که سیگنال آن‌ها کمترین تداخل را با یکدیگر داشته باشد تا نیاز به جبران کاهش یابد و نتایج دقیق‌تری به دست آید.

- **نوع لیزر دستگاه:** برخی دستگاه‌ها محدودیت‌هایی در تعداد و نوع فلوروکروم‌های قابل استفاده دارد.

- **پایداری در برابر فوتوبلیچینگ:** فلوروکروم‌هایی مانند APC-Cy۷ به نور حساس است.

۳. رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی‌های مونوکلونال: استفاده ترکیبی از مارکرهای سطحی و سیتوپلاسمیک به این دلیل که در ALL سلول‌های لوسمیک اغلب دارای پروفایل‌های آنتی‌ژنی غیرطبیعی است که آن‌ها را از لنفوبلاست‌های طبیعی متمایز می‌کند. استفاده ترکیبی از مارکرهای سطحی(SM) و سیتوپلاسمیک (CM) به دلایل زیر اهمیت دارد:

- تشخیص دقیق‌تر سلول‌های لوسمیک با فنوتیپ غیرطبیعی (LAIP)
- افزایش حساسیت و ویژگی تشخیصی (Sensitivity & Specificity)
- کاهش خطای تشخیص ناشی از بیان متغیر آنتی‌ژن‌ها در طول درمان
- تمایز سلول‌های طبیعی بازسازی‌شده مغز استخوان از سلول‌های لوسمیک باقی‌مانده

۴.**فرآوری نمونه:** لیز گلبول‌های قرمز و تهیه سوسپانسیون سلولی.

۵. **تحلیل داده‌ها با نرم‌افزارهای فلوسایتومتری:** بررسی سلول‌های لوسمیک باقی‌مانده درنمونه بیمار.

مزایای روش فلوسایتومتری در بررسی MRD

◆ **حساسیت بالا:** توانایی تشخیص یک سلول لوسمیک در میان ۱۰,۰۰۰ تا ۱۰۰,۰۰۰ سلول طبیعی را دارد.

◆ **سرعت بالا:** امکان تحلیل نتایج در کمتر از ۲۴ساعت وجود دارد.

◆ **عدم نیاز به مارکرهای مولکولی خاص:** برخلاف روش PCR که نیاز به مارکرهای ژنتیکی خاص دارد، در روش فلوسایتومتری از مارکرهای سطحی و سیتوپلاسمیک پروتئینی برای شناسایی و تفکیک سلول‌های لوسمیک از سلول‌های طبیعی استفاده می‌شود. این روش با استفاده از آنتی‌بادی‌های فلورسنت متصل به آنتی‌ژن‌های اختصاصی سلول‌های سرطانی، امکان تشخیص حداقل بیماری باقی‌مانده (MRD) را با دقت بالا و در زمان کوتاه‌تر فراهم می‌کند. همچنین فلوسایتومتری وابسته به بیان پروتئین‌های سطحی و داخلی سلول‌ها است و می‌تواند تغییرات فنوتیپی ناشی از درمان را نیز شناسایی کند، در حالی که PCR بیشتر بر توالی‌های ژنتیکی ثابت تمرکز دارد و ممکن است تغییرات سطح پروتئین را نشان ندهد.

◆ **قابلیت تحلیل همزمان چندین مارکر:** دراین روش امکان شناسایی همزمان مارکرهای سطحی و سیتوپلاسمی وجود دارد.

محدودیت‌ها و چالش‌های فلوسایتومتری در بررسی MRD

◆ **کاهش بیان مارکرهای لوسمیک پس از درمان:** برخی سلول‌های لوسمی ممکن است پروفایل ایمونوفنوتیپی خود را تغییر دهند و تشخیص MRD را دشوار کنند.

◆ **نیاز به تخصص بالا در تحلیل داده‌ها:** تحلیل فلوسایتومتری نیازمند کارشناسان متبحر وبا تجربه در تفسیر الگوهای آنتی‌ژنی است.

◆ **حساسیت کمتر نسبت به روش‌های مولکولی (مانند PCR و NGS):** روش‌های مولکولی می‌توانند MRD را با حساسیت ۱,۰۰۰,۰۰۰ نیز شناسایی کنند، در حالی که فلوسایتومتری حداکثر به ۱۰۰,۰۰۰ می‌رسد.

◆ **تفاوت در پروتکل‌های آزمایشگاهی:** عدم وجود استاندارد واحد جهانی در نحوه رنگ‌آمیزی، انتخاب مارکرها و تحلیل داده‌ها ممکن است باعث تفاوت در نتایج شود.

کاربردهای بالینی بررسی MRD به روش فلوسایتومتری در ALL

نتایج MRD که از طریق فلوسایتومتری به دست می‌آید، می‌تواند به طور مستقیم بر رویکردهای درمانی بیمار تأثیرات زیررا بگذارد:

◆ **هدایت استراتژی درمانی:** اگر MRD پس از درمان اولیه مثبت باشد، پزشکان ممکن است تصمیم به افزایش شدت درمان یا پیوند مغز استخوان بگیرند.

◆ **ارزیابی اثربخشی درمان:** بیمارانی که مقدارMRD آنها به سرعت کاهش یافته و به سطح غیرقابل تشخیص می رسد، معمولاً پیش‌آگهی بهتری دارند.

◆ **تشخیص زودهنگام عود بیماری:** حتی در بیماران بدون علامت بالینی، افزایش سطح MRD می‌تواند نشان‌دهنده عود زودرس ALL باشد و منجر به مداخله درمانی سریع‌تر شود.

◆ **بررسی پاسخ به ایمونوتراپی مانند (CAR-T cell therapy):** در بیماران تحت ایمونوتراپی، کاهش MRD می‌تواند نشان‌دهنده پاسخ موفقیت‌آمیز به درمان باشد.

جمع‌بندی و نتیجه‌گیری

بررسی MRD به روش فلوسایتومتری نقش مهمی در پایش بیماران مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) دارد. این روش، به دلیل سرعت بالا، حساسیت مناسب و قابلیت اجرا در بیشتر مراکز آزمایشگاهی، به عنوان یک استاندارد در پایش MRD شناخته می‌شود. هرچند که حساسیت آن نسبت به روش‌های مولکولی کمتر است، اما به دلیل عدم نیاز به مارکرهای ژنتیکی خاص و قابلیت کاربرد در طیف وسیعی از بیماران، یک ابزار ارزشمند در مدیریت ALL محسوب می‌شود.

برای بهبود تشخیص MRD و کاهش میزان عود بیماری، ترکیب فلوسایتومتری با روش‌های مولکولی مانند PCR و NGS می‌تواند یک راهکار ایده‌آل باشد. همچنین، با پیشرفت در تکنولوژی‌های فلوسایتومتری و تحلیل داده‌ها، انتظار می‌رود که این روش در آینده حساس‌تر و دقیق‌تر شود و نقش پررنگ‌تری در مدیریت بیماران خونی ایفا کند.

منابع:

1-Metaorganon.com

2-https://www.mypathologyreport.ca

3-biomindlabs.com

4-www.nejadeh-lab.com