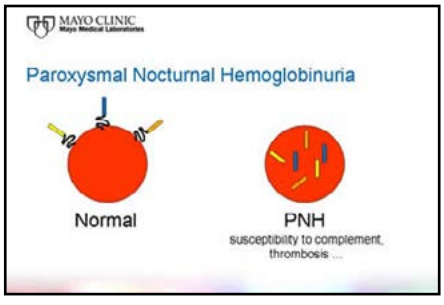
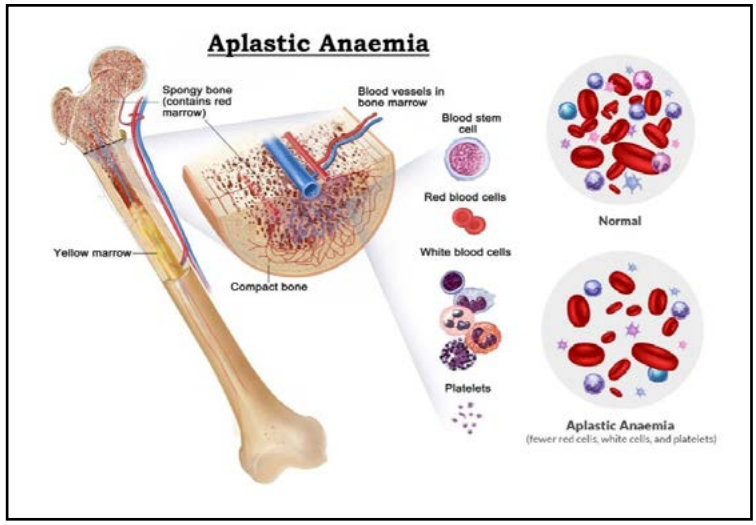
۱- حنانه محور، کارشناس علوم آزمایشگاهی و فلوسایتومتریست
۲- دکتر امیر هوشنگ نژاده، دکترای علوم آزمایشگاهی
و عضو انجمن شیمی کلینیکال آمریکا

نقش فلوسایتومتری در تشخیص بیماری PNH

PNH یک اختلال کلونال نادر سلول‌های بنیادی خون‌ساز است که به دلیل جهش اکتسابی در ژن PIGA منجر به فقدان پروتئین‌های متصل به‌GPI در سطح سلول‌های خونی می‌شود. ژن PIGA در تشکیل ساختار اتصال به غشای GPI نقش دارد، این ساختار مسئول اتصال برخی پروتئین‌ها مانند CD55 و CD59 به سطح سلول است. در صورت بروز جهش در ژن مذکور، این اتصال مختل شده و سلول‌ها در برابر تخریب سیستم کمپلمان آسیب پذیر می‌شود. این نقص به ویژه از طریق حذف تنظیم‌کننده‌های سیستم کمپلمان نظیر CD55 و CD59، زمینه‌ساز همولیز درون‌رگی، ترومبوز و نارسایی مغز استخوان است. فلوسایتومتری چندرنگی به‌عنوان استاندارد طلایی تشخیص PNH شناخته می‌شود، زیرا قادر است جمعیت‌های سلولی فاقد GPI را با حساسیت و اختصاصیت بالا شناسایی کند.

بیماری PNH یک اختلال اکتسابی نادر در سلول‌های بنیادی خون‌ساز است که با همولیز مزمن درون‌رگی، تمایل به ترومبوز و درجاتی از نارسایی مغز استخوان مشخص می‌شود. اساس مولکولی بیماری جهش در ژن PIGA است که برای تشکیل ساختار اتصال به غشای GPI ضروری می‌باشد. فقدان GPI موجب عدم اتصال مجموعه‌ای از پروتئین‌های تنظیم‌کننده به سطح سلول می‌شود. در میان این پروتئین‌ها، CD55 و CD59 اهمیت ویژه‌ای دارند زیرا نقش کلیدی در مهار فعال‌سازی سیستم کمپلمان ایفا می‌کنند. سیستم کمپلمان بخشی از سیستم ایمنی بدن است و زمانی که فعال می‌شود می‌تواند روی سطح سلول‌ها منافذی ایجاد کند و آن‌ها را از بین ببرد. به طور طبیعی، سلول‌های بدن از جمله گلبول‌های قرمز برروی سطح خود پروتئین‌های محافظ دارند تا از این حمله جلوگیری کنند.دو مورد از مهم ترین این پروتئین‌های محافظ CD55 و CD59 هستند. CD55 جلوی فعال شدن بیش از حد سیستم کمپلمان را می‌گیرد و CD59 مانع تشکیل کمپلکس حمله غشایی می‌شود، یعنی همان ساختاری که در نهایت روی غشای سلول منفذ ایجاد می‌کند. در بیماری PNH چون این دو پروتئین روی سطح گلبول قرمز وجود ندارند، سلول هم دیگر محافظی در برابر سیستم کمپلمان ندارد. در نتیجه، سیستم کمپلمان روی غشای گلبول قرمز فعال می‌شود، منافذی در آن ایجاد می‌کند و سلول در داخل رگ تخریب می‌شود که به این فرایند همولیز درون‌رگی گفته می‌شود. بنابراین حذف این پروتئین ها باعث می‌شود گلبول‌های قرمز به شدت نسبت به تخریب وابسته به سیستم کمپلمان حساس شوند و همولیز درون‌رگی رخ دهد. از دیدگاه تشخیصی، شناسایی جمعیت سلول‌های فاقد GPI تنها با استفاده از تکنیک‌های مبتنی بر فلوسایتومتری با حساسیت بالا





امکان‌پذیر است و امروزه این روش به‌عنوان استاندارد طلایی تشخیص شناخته می‌شود.

مروری بر تکامل روش‌های تشخیصی

در گذشته برای تشخیص PNH از روش هایی مانند Hams test و تست لیز ساکارز استفاده می‌شد. اساس این آزمایش‌ها بر این بود که گلبول‌های قرمز بیماران مبتلا به PNH نسبت به فعال‌سازی سیستم کمپلمان حساس‌تر هستند و در شرایط خاص آزمایشگاهی سریع‌تر دچار همولیز می‌شود، بنابراین اگر گلبول‌های قرمز در محیط آزمایش تخریب می‌شدند، نتیجه به نفع PNH تفسیر می‌گردید. با این حال، این روش‌ها چند محدودیت مهم داشتند، نخست آن‌که حساسیت پایینی داشتند و قادر به شناسایی کلون‌های کوچک یا همان اندازه جمعیت سلول‌های درگیر نبودند؛ همچنین نتیجه آن‌ها به شرایط انجام آزمایش بسیار وابسته بود و نیز تکرارپذیری محدودی داشتند. به همین دلیل، به‌تدریج جای خود را به روش‌های دقیق‌تر دادند. با پیشرفت فلوسایتومتری چندرنگی، امکان بررسی مستقیم بیان پروتئین‌های وابسته به GPI روی سطح سلول‌ها فراهم شد. به جای آن‌که حساسیت سلول به همولیز اندازه‌گیری شود، خودِ نقص مولکولی به‌صورت مستقیم شناسایی گردید. این تحول باعث افزایش چشمگیر دقت و حساسیت تشخیص شد.

نقطه عطف مهم دیگر، معرفی لیگاند فلورسنت FLAER بود.این ماده از سم باکتریایی Aerolysin مشتق شده و به طور اختصاصی به ساختار GPI روی سطح سلول متصل می‌شود.

در نتیجه، سلول‌هایی که فاقد GPI هستند مانند سلول‌های PNH، اتصال FLAER را نشان نمی دهد و به راحتی از سلول‌های طبیعی قابل افتراق می‌شود. استفاده از FLAER، به ویژه در بررسی گرانولوسیت ها و مونوسیت‌ها، حساسیت تشخیص کلون‌های کوچک را به طور قابل توجهی افزایش داده است. به این صورت که در آنالیز فلوسایتومتری، پس از گیتینگ دقیق جمعیت گرانولوسیتی و مونوسیتی، میزان اتصال FLAER و بیان مارکرهای وابسته به GPI در این جمعیت‌ها ارزیابی می‌شود. از آنجا که این سلول‌ها برخلاف RBCها تحت تأثیر همولیز قرار نمی‌گیرند، اندازه کلون در آن‌ها نمای دقیق تری از درگیری کلونال سلول بنیادی ارائه می‌دهد.

نقش فلوسایتومتری در پایش و مدیریت درمان PNH

فلوسایتومتری فقط برای تشخیص اولیه PNH مورد استفاده قرار نمی‌گیرد بلکه در طول درمان نیز نقش مهمی ایفامی‌کند. دلیل این موضوع این است که PNH یک بیماری کلونال پویا است، یعنی اندازه جمعیت سلول‌های درگیر یا همان کلون ها ممکن است در طول زمان تغییرپیدا کند. به کمک تکنیک فلوسایتومتری، درصد گرانولوسیت‌ها یا مونوسیت‌های فاقد GPI، اندازه‌گیری می‌شود. این درصد نشان می‌دهد چه مقدار از مغز استخوان توسط کلون PNH درگیر شده است. در پیگیری‌های دوره‌ای، اگر درصد کلون افزایش یابد ممکن است فعالیت بیماری بیشتر شده باشد، اگر درصد کلون پایدار بماند وضعیت بیماری بدون تغییر است و اگر این درصد کاهش یابد، ممکن است بهبود یا تغییر در وضعیت مغز استخوان رخ داده باشد. بنابراین فلوسایتومتری کمک می‌کند روند تغییرات اندازه کلون در طول زمان را بررسی کنیم.

در بیماران تحت درمان با مهارکننده‌های سیستم کمپلمان، مثلا بیمارانی که دارویی مانند Eculizumab دریافت می‌کنند، نکته مهمی وجود دارد، این داروها کلون PNH را از بین نمی‌برند، آن‌ها فقط سیستم کمپلمان را مهار می‌کنند و از تخریب گلبول‌های قرمز جلوگیری می‌کنند.

بنابراین ممکن است علائم همولیز کاهش یابد وسطح LDH به محدوده طبیعی باز گردد اما اندازه کلون در فلوسایتومتری تغییری نکند. این نکته بسیار مهم است، چون اگر دراین شرایط انتظار داشته باشیم اندازه کلون کاهش یابد، ممکن است تفسیر اشتباه انجام گیرد. فلوسایتومتری در اینجا نشان می‌دهد که درمان از نظر مهار همولیز موفق بوده اما کلون همچنان وجود دارد.اما اگر بیمار پیوند مغز استخوان انجام دهد، هدف حذف کامل کلون PNH است. در این حالت، فلوسایتومتری با حساسیت بالا می‌تواند حتی مقادیر بسیار کم سلول‌های درگیر را شناسایی کند. دراین صورت اگر هیچ سلول فاقد GPI دیده نشود احتمالاً پیوند موفق بوده است واگر درصد کمی باقی بماند، ممکن است هنوز بیماری به صورت کامل ازبین نرفته باشد مثلا در بیماران مبتلا به کم‌خونی آپلاستیک گاهی در طول زمان یک کلون کوچک PNH ظاهر می‌شود. فلوسایتومتری دوره‌ای می‌تواند این تغییر را در مراحل اولیه نشان دهد، حتی اگر بیمار هنوز علائم واضحی نداشته باشد.

به طور خلاصه، فلوسایتومتری در پایش درمان سه کار اصلی انجام می‌دهد:

- اندازه کلون را در طول زمان دنبال می‌کند.
- کمک می‌کند پاسخ به درمان مهارکننده سیستم کمپلمان درست تفسیر شود.
- بیماری باقیمانده یا عود را با حساسیت بالا شناسایی می‌کند.

نتیجه‌گیری

هموگلوبینوری حمله‌ای شبانه یک اختلال کلونال نادر ولی بالقوه تهدیدکننده حیات است که تشخیص دقیق و به‌موقع آن نقش تعیین‌کننده‌ای در پیشگیری از عوارض جدی، از جمله همولیز شدید و ترومبوز دارد. در این میان، فلوسایتومتری چندرنگی به‌عنوان روش مرجع تشخیصی، جایگاه محوری در شناسایی و ارزیابی این بیماری یافته است. این تکنیک با بهره‌گیری از مارکرهای وابسته به GPI و استفاده از FLAER، امکان شناسایی دقیق و کمی کلون‌های PNH را حتی در مقادیر بسیار اندک فراهم می‌کند. بررسی جمعیت‌های گرانولوسیتی و مونوسیتی، به دلیل عدم تأثیرپذیری از همولیز درون‌رگی، تصویری واقعی‌تر از اندازه کلون و درگیری سلول بنیادی ارائه می‌دهد. این ویژگی، فلوسایتومتری را به روشی حساس، اختصاصی و قابل اعتماد برای تشخیص اولیه و همچنین پایش روند بیماری و ارزیابی پاسخ به درمان بیماران تبدیل کرده است.علاوه بر نقش تشخیصی، فلوسایتومتری در ارزیابی روند تغییرات کلونال بیماری، تفسیر پاسخ به درمان‌های مهارکننده سیستم کمپلمان و شناسایی بیماری باقیمانده پس از مداخلات درمانی پیشرفته اهمیت ویژه‌ای دارد. بنابراین این روش نه تنها ابزاری آزمایشگاهی، بلکه جزء جدایی ناپذیر راهبردهای مدیریت بالینی بیماران مبتلا به PNH محسوب می‌شود. با توجه به پیشرفت‌های مستمر در طراحی پنل‌های چندرنگی و افزایش حساسیت روش‌های آنالیز، انتظار می‌رود فلوسایتومتری همچنان به‌عنوان استاندارد طلایی و روش مرجع در تشخیص و پایش این بیماری باقی بماند و نقش آن در بهبود پیامدهای بیماران بیش از پیش تقویت شود.

منابع:

1-Richards SJ, Barnett D. The role of flow cytometry in the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Clin Lab Med. 2007;27(3):577-590.

2-Höchsmann B, Rojewski M, Schrezenmeier H. PNH: higher sensitivity and validity in diagnosis and serial monitoring by flow cytometric analysis of reticulocytes. Ann Hematol. 2011;90:887-899.

3-Borowitz MJ, Craig FE, Digiuseppe JA, et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of PNH by flow cytometry. Cytometry B Clin Cytom. 2010;78B:211-230.

4-Sutherland DR, Keeney M, Illingworth A. Practical guidelines for the high-sensitivity detection of PNH clones by flow cytometry. Cytometry B Clin Cytom. 2012;82B:195-208.

5-Hillmen P, Young NS, Schubert J, et al. The complement inhibitor eculizumab in PNH. N Engl J Med. 2006;355:1233-1243.