Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 23:10 +0330 on Monday December 17th 2018

پژوهش در پزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی شهید بهشتی
سال ۲۶، شماره ۴، صفحات ۲۹۱ تا ۲۹۴(زمستان ۱۳۸۱)

Original Article

مطالعه محتوی DNA (پلوئیدی) در بیماران مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد به روش فلوسیتومتری

مینو شهیدی [۱]، دکتر محمد رخشان [۲]، دکتر محمد فرهادی [۳]

۱- کارشناس ارشد، گروه هماتولوژی، دانشکاه علوم پزشکی ایران
۲- استاد، بخش پاتولوژی، مرکز آموزشی درمانی لقمان حکیم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۳- سازمان انتقال خون ایران

خلاصه

سابقه و هدف : *اندازه‌گیری محتوی DNA با تعیین پلوئیدی یک ارزیابی مفید در تشخیص و درمان بدخیمی‌ها محسوب می‌شود. هدف از این مطالعه تعیین میزان شیوع آنوپلوئیدی در کودکان مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد و ارتباط آن با خصوصیات مرفولوژیک (طبقه‌بندی FAB)، فنوتیپ ایمنولوژیک، شمارش لکوسیت، سن و جنس در این افراد بوده است.*

مواد و روش‌ها: *مشخصات آزمایشگاهی و بالینی در ۶۰ بیمار مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) که سن آنها زیر ۱۵ سال بوده و هنوز تحت درمان قرار نگرفته بودند، ثبت گردید. سپس محتوی DNA با روش فلوسیتومتری اندازه‌گیری شد و شاخص DNA(DI) تعیین گردید.*

یافته‌ها : *از بین بیماران ۵۰٪ دیپلوئید، ۴۵٪ هیپردیپلوئید و ۵٪ هیپودیپلوئید بودند که به دلیل تعداد کم این افراد مقایسه آنها با دو گروه دیگر ارزش چندانی نداشت. متوسط شاخص DNA ، ۱/۲۱ بدست آمد.نتایج نشان داد هیپردیپلوئیدی با شمارش پایین گلبولهای سفید همراه است، بطوریکه توزیع شمارش گلبولهای سفید براساس پلوئیدی معنی‌دار بود ($p < ۰/۰۵$).*

نتیجه‌گیری و توصیه‌ها : *در بررسی‌های دیگر نتایج معنی‌دار گزارش نشده‌است، لیکن متوسط سنی در گروه هیپردیپلوئید کمتر از گروه دیپلوئید و نیز فنوتیپ ایمونولوژیک early – preB و مرفولوژی LI در بین این افراد به مراتب بیشتر از فرم دیپلوئید یافت گردید. در مجموع می‌توان گفت اندازه‌گیری محتوی DNA بسیار مفید بوده و در تعیین پیش آگهی این بیماران کمک کننده است.*

واژگان کلیدی : ***فلوسیتومتری، لوسمی لنفوبلاستیک حاد، محتوای DNA***

مقدمه

مطالعه آسیب‌شناسی لوسمی‌ها از جمله مسائلی است که در دهه‌های اخیر با توجه به روشهای نوین درمانی از اهمیت و ویژگی خاصی برخوردار بوده‌است. امروز اندازه‌گیری محتوی DNA سلول و سیکل سلولی اطلاعات بشر در مورد تغییرات سلولی و تکثیر آن را بهبود بخشیده است (۳-۱). شیوع بسیار زیاد لوسمی‌ها و بخصوص نوع لنفوبلاستیک حاد (ALL) درکودکان پیدایش روشهای جدید تشخیصی را جلب می‌نماید. لوسمی لنفوبلاستیک حاد در نتیجه تکثیر کلونال سلولهای لنفوئید در مراحل اولیه تمایز پدید می‌آید، منشاء آن مغز استخوان بوده و کلون سرطانی از رده سلولهای B و یا T می‌باشد (٤). بنابراین جمعیت سلولی تقریباً یکدست بوده و برای مطالعات سلولی مناسب می‌باشند. بطور کلی ناهنجاریهای ژنتیکی در لوسمی لنفوبلاستیک حاد به دو دسته تقسیم می‌شود(۵).

الف ـ تغییرات در تعداد کروموزومها یا محتوی DNA

ب ـ تغییرات در ساختمان کروموزمها

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 23:10 +0330 on Monday December 17th 2018

تغییرات نوع اول را می‌توان با اندازه‌گیری تعداد کروموزومها با استفاده از روش‌های سیتوژنیک و یا با اندازه‌گیری محتوی DNA با روش فلوسیتومتری و ایمیج آنالیز بررسی کرد. فلوسیتومتری روش نسبتاً ساده‌ای است که ذرات را بر اساس خصوصیات فیزیکی و شیمیایی شناسایی می‌نماید و بوسیله آن می‌توان محتوی DNA را محاسبه نمود. با توجه به موارد فوق لزوم بررسی‌های همه جانبه نظیر مرفولوژی، شناسائی شاخص‌های ایمنی و اندازه‌گیری محتوی DNA برای تشخیص دقیق‌تر احساس می‌گردد. لذا مطالعه حاضر با هدف تعیین شیوع آنوپلوئیدی در کودکان مبتلا به ALL و ارتباط آن با خصوصیات مورفولوژیک، فنوتیپ ایمونولوژیک، شمارش لکوسیت، سن و جنس صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها

۶۰ بیمار مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد در مراجعات اولیه به بیمارستانهای کودکان مفید، مرکز طبی کودکان و حضرت علی اصغر مورد مطالعه قرارگرفتند. سن بیماران بین ۱۵-۱ سال بود و از آنجائیکه مطالعات قبلی تاثیر داروها را بر میزان محتوی DNA نشان داده‌اند، بیماران تا زمان نمونه‌گیری تحت درمان واقع نشده بودند. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری به بیمارستان بقیه‌ا... که محل انجام آزمایشات بود، منتقل می‌شد، سپس آزمایشات مربوطه (CBC و تهیه گسترش خونی) انجام گرفت. لامهای تهیه شده به وسیله رایت گیمسا رنگ‌آمیزی و مورد بررسی مرفولوژیک قرار می‌گرفتند و بر طبق معیارهای گروه FAB (French-American - British) طبقه‌بندی شدند (۶).

علاوه بر این آزمایشات شاخص‌های سلولی CD (cluster differentiation) با روش فلوسیتومتری و با استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال تجارتی بر روی سلولهای لوسمیک تعیین گردید تا بدین ترتیب بتوان نوع سلول درگیر و نیز مرحله تکامل آن را تعیین نمود(۷).

همانطوریکه در جدول شماره ۱ نشان داده‌است آنتی‌بادی‌های ضد CD13 و CD33 مشخص کننده رده میلوئید می‌باشند و برای افتراق اولیه لوسمی لنفوئید حاد ازمیلوئید بکار می‌روند.

آنتی‌بادیهای ضد CD7 و CD3 نماینده سلولهای T می‌باشند وبرای متمایز نمودن لوسمی لنفوئید حاد نوع T از لوسمی لنفوئید حاد نوع B مورد استفاده قرار می‌گیرند.

آنتی‌بادیهای ضدCD19 وCD22 و زنجیره سیتوپلاسمی(Cyt μ) جهت مشخص نمودن لوسمی حاد نوع B بکار گرفته می‌شوند. آنتی بای ضد CD10 که در مرحله early – PreB بر روی سلولهای B ظاهر می‌گردد و نشاندهنده پیش آگهی بهتر در بیماران می‌باشد برای تعیین وضعیت بیماران مورد بررسی قرار گرفت.

همچنین نمونه بیماران جهت اندازه‌گیری محتوی DNA تیمار گردید به این ترتیب که با استفاده از رنگ فلورسانت اختصاصی برای ملکول DNA (پروپیدیوم آیودایـد) سلولها نشاندار شده سپس آزمایشات مربوطه صورت می‌گرفت.

در هنگام عبور سلولها از مقابل لیزر، فلورسانس دریافت شده توسط دستگاه فلوسیتومتر نشان‌دهنده محتوی DNA بود. برای انجام آزمایش بر روی هر نمونه لازم بود که همزمان با نمونه بیمار یک نمونه مرجع هم بکار گرفته شود (۸،۹). به این منظور از لنفوسیتهای خون محیطی افراد طبیعی (دیپلوئید) استفاده شد و این گروه سلول به عنوان شاهد در نظر گرفته شد(۱۰). در نهایت DNA برای سلولهای لوسمیک هر بیمار تعیین گردید.

جدول ۱: وضعیت شاخص های بکار رفته در ارزیابی بیماران مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد

شاخص	ALL				
	Null	c ALL	PreB	B-ALL	T-ALL
CD3	-	-	-	-	+
CD7	-	-	-	-	+
CD10	-	+	+	-/+	-
CD13/33	-	-	-	-	-
CD19	+	+	+	+	-
CD22	+	+	+	+	-
Cyt μ	-	-	+	+/-	-

یافته‌ها

در این مطالعه ۶۰ کودک مبتلا به ALL با میانگین سنی ۷±۲/۳۴ سال مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج آنالیز DNA نشان داد که ۵۰٪ بیماران در گروه دیپلوئید، ۴۵٪ در گروه هیپردیپلوئید و ۵٪ در گروه هیپودیپلوئید قرار داشتند. در جدول شماره ۲، خصوصیات و یافته‌های این مطالعه آورده شده است. متوسط شاخص DNA (DI) در افراد هیپردیپلوئید ۱/۲۱ بدست آمد، حال آنکه در گروه دیپلوئید ۱ بود.

بیشترین میزان فنوتیپ early Pre-B در افراد هیپردیپلوئید مشاهده گردید که حدود ۴۰/۷٪ این افراد را تشکیل می‌داد. سایر

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 23:10 +0330 on Monday December 17th 2018

افراد این گروه بـــه تـــرتیب ٪٤٨/١ فنوتیپ perB، ٪٧/٤ فنوتیـپ T و ٪٣/٧ فنوتیپ unclassified یا Null داشتند.

از نظـر جنـس در گروه هیـــپردیپلوئید ٪٣٧ مونـث و ٪٦٣ مذکـر بودند حـال آنکـه در گروه دیپلوئیـــد ٪٣٠ مونـث و ٪٧٠ مذکـر بودند.

جدول ۲: توزیع خصوصیات دموگرافیک و آزمایشگاهی در گروههای دیپلوئید و هیپردیپلوئید

خصوصیات	گروه	
	دیپلوئید	هیپردیپلوئید
میانگین WBC(μL)	٦٨٢٧٨*	١٤٦٢٤
میانگین سنی (سال)	٨	٥/٨
نسبت مرد به زن	٧٠/٣٠	٦٣/٣٧
ایمونوفنوتیپ(درصد)		
Early Pre-B	٦/٧	٤٠/٧
Pre-B	٥٠	٤٨/١
T	٤٠	٧/٤
unclassified	٣/٣	٣/٧
میانگین شاخص DNA	١	١/٢١
زیر گروه FAB(درصد)		
L1	٤٦/٧	٦٣
L2	٥٣/٣	٣٧

* اختلاف بین دو گروه با p< ۰/۰۵ معنی دار بود.

بحث

در بررسی نتایج آنالیز DNA ، ارقام حاصل شباهت زیادی با نتـایج مطالعات گذشته داشت، بطوریکه هیپردیپلوئیدی در ٤٥٪ بیماران مـا گزارش شد. در مطالعات قبلی هیپردیپلوئیدی در ٤٠-٢٠ درصد افراد گزارش شده بود (٥). متوسط شاخص DNA در افراد هیپردیپلوئیـد ١/٢١ گزارش شد که این رقم با تحقیقـات گذشـته کـاملاً مطـابقت داشت (١). با توجه به تعـداد کـم افـراد هیپودیپلوئیـد(٥٪) بـه نظـر می‌رسد برای رسیدن به نتایج منطقی نیاز بـه تعـداد نمونـه بیشـتری باشد. گروه هیپردیپلوئید خود به دوزیر گروه بالاو پایین تقسـیم‌بندی می‌شود. در گروه اول محتـوی DNA بـا محتـوای آن در سـلولهای دیپلوئید اختلاف بیشـتری داشـته و شـاخص DNA بیشـتر از ١/١٦ می‌باشد در حالیکه در سلولهای دیپلوئید برابر عدد یک است.

مطالعات گذشته نشان می‌دهد که مرفولوژی L1 از نظـر پیـش‌آگهـی مطلوب‌تر از L2 و L3 می‌باشد (٨). در این تحقیق مشخص شد کـه بین مورفولوژی L1 و وضعیت هیپردیپلوئیدی ارتباطی وجود داشته، به طوریکه مورفولوژی L1 در بین بیماران هیپردیپلوئیدی این تحقیق از برتری بالایی برخوردار بـود. پـایین بـودن متوسـط سـن در گروه هیپردیپلوئید نسبت بـه گروه دیپلوئیـد هـر چنـد معنـی‌دار نبـود امـا محسوس بود. از آنجائیکه پایین بودن سن در این بیماران مطلوب‌تـر می‌باشد شاید بتوان این کاهش را با هیپردیپلوئید بودن بیماران مرتبط دانست.

با توجه به این که بسیاری از محققین ارتباط بین تعداد گلبول سـفید و پیش آگهی را خطی و پیوسـته تلقـی نموده‌انـد (٤) و بـا نظـر بـه معنـی‌دار بـودن اختـلاف شـمارش WBC در دو گروه (p<۰/۰۵)، افراد هیپردیپلوئید می‌توانند در گروه کم خطرتری قرار گیرند. ارتباط جنس و محتوی DNA معنی‌دار نبود، لیکـن تعـداد افـراد مونـث در گروه هیپردیپلوئید به نسبت بیشتر بود. این در حالیست که در افـراد مذکر پیش آگهی نامطلوبتر است(٨).

برتـــری ایمنوفنوتیـپ early PreB در بیـن افـراد هیپردیپلوئیـد افزایش چشگیری را نشان مـــی‌دهد. ایـن فنوتیـپ در واقـع همـان CALL (Comnon All) است (همراه با بروز شاخص CD10) و در بیماران پیش‌آگهی بهتری را نشان می‌دهـد (٧). بنـابراین می‌تـوان استنباط نمود که بیماران هیپردیپلوئیـد نسـبت بـه بیمـاران دیپلوئیـد پیـش‌آگهـی بـهتر دارنـد، عـلاوه بـر آن ایمنوفنوتیـپ T در گروه هیپردیپلوئید بسیار کمتر از گروه دیپلوئیـد می‌باشـد و بـا توجـه بـه پیش‌آگهـی بـد در بیمـاران T-ALL ، گروه هیپردیپلوئیـد وضعیـت مطلوب‌تری را نسبت به دیپلوئید نشان می‌دهد.

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد کـه انـدازه‌گیـری محتـوی DNA بـه منظور تعیین پلوئیدی در بیماران مبتلا بـه ALL می‌توانـد در تعییـن پیش آگهی بیماری کمک کننده باشد.

REFERENCES

1- Hoffman R (ed). Hematology Basic Principle and Practice. 1 st ed, Churchil Livingston, 1991:763.

2- Widell S, Auer R, Reizentein P. Variation in DNA content of immature normal bone marrow cell. Am J Hematol 1993; 43: 43.

3- Duque RE, Andreef M, Braylan RC, et al. Consensus review of the clinical utility of DNA flowcytometery in neoplastic hematology . Cytometry 1993;14: 492.

4- Cabera ME. Immunologic calssfication of acute lymphoblastic leukemia . Am J Pediatr Hematol Oncol 1990;12(3): 2933.

5- Whitchead VM, Vuchich MJ et al. Accumulation of high levels of Metotrexate Polyglatamates in lymphoblast from children with hyperdiploid (>50 chromosomes) B- lineageacute lymphoblastic leukemia. Blood 1992 ; 80(5): 316.

6- Bain BJ (ed). Leukemia Diagnosis , A Guide to FAB classification. Medical Publishing 1990.

7- Browitz MJ. Immunologic markers in childhood ALL. Hematol Oncol Clin North Am 1990; 4: 729.

8- Lorna M, Judith M, et al. Chromosomes and other prognostic factors in acute lymphoblastic leukemia : a long – term follow –up. Br J Hematol 1989; 72: 336.

9- Chan GC, Wan TSK, et al Near - haploid common acute lymphoblastic leukemia of childhood with a second hyperdiploid line : a DNA ploidy and flouresence in – situ hybridization study. Br J Hematol 1990 ;103:750.

10- Jenning CD, Foon KA. Flowcytometry : recent advances in diagnosis and monitoring of leukemia . Cancer Invest 1994; 15(4): 384

Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir at 23:10 +0330 on Monday December 17th 2018