

## أهمية التتميط المناعي في تشخيص وإنذار الأمراض الدموية الخبيثة مع التركيز على ابيضاض الدم اللمفاوي المزمن البائي B-CLL

الدكتور ميخائيل جرجس\*

الدكتور رياض جالق\*\*

محمود سليم بدور\*\*\*

(تاريخ الإيداع 26 / 3 / 2008. قُبِلَ للنشر في 30 / 4 / 2008)

### □ الملخص □

أجريت هذه الدراسة على مجموعة من المرضى الذين قبلوا في شعبة أمراض الدم بمشفى الأسد الجامعي باللاذقية. وقد سلطت الضوء على الدور المحوري الذي يلعبه التتميط المناعي بطريقة Flow cytometry (الجريان الخلوي) المجرى لهؤلاء المرضى في الوصول للتشخيص الدقيق وفي توزيعهم ضمن مجموعات تشخيصية فرعية لكل منها خصوصيته العلاجية والإنذارية. وقد ركزت الدراسة على مرضى الإبيضاض اللمفاوي المزمن البائي B-CLL نظراً لأنهم يشكلون 63% من مجموع المرضى. وأظهرت النتائج بأن مرضى B-CLL مع  $CD_5^+$  هم أطول بقيا من مرضى B-CLL مع  $CD_5^-$ . كذلك بينت دور  $CD_{23}$  والعلاقة الوثيقة بين إيجابيته والإنذار الجيد وعلى العكس أظهرت الترابط بين التألق الشديد للغلوبين المناعي الغشائي السطحي smIg والإنذار السيئ .

**كلمات مفتاحية:** تتميط مناعي - الجريان الخلوي - ابيضاض الدم اللمفاوي المزمن -  $CD_5$ .

\* أستاذ - قسم الأمراض الباطنة - كلية الطب - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية.

\*\* أستاذ - قسم الأمراض الباطنة - كلية الطب - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية.

\*\*\* طالب دراسات عليا - قسم الأمراض الباطنة - كلية الطب - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية.

## The Importance of Immunophenotyping for the Diagnosis and Prognosis of Malignant Blood Diseases with Special Emphasis on B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia

Dr. Micheal Georgeos\*  
Dr. Riyad Jalek\*\*  
Mahmmoud Salim Baddour\*\*\*

(Received 26 / 3 / 2008. Accepted 30/4/2008)

### □ ABSTRACT □

This study has been carried out on a group of patients admitted to the Hematology Department at Al-Assad University Hospital in Lattakia. We examine the central role of the immunophenotyping performed by Flow cytometry for the appropriate diagnosis and then distributing the patients into different subgroups according to treatment and prognosis for each disease. This study also focuses on B-cell chronic lymphocytic leukemia because it represents 63% of the total patients. The results show that B-CLL patients with CD<sub>5</sub><sup>+</sup> live longer than patients of B-CLL with CD<sub>5</sub><sup>-</sup>. This paper has also demonstrated the role of CD23 and the close relation between its positivism and good prognosis; in contrast, it has shown the connection between bad prognosis and high presentation of Smlg .

**Keywords:** Immunophenotyping, Flow cytometry, Chronic lymphocytic leukemia, CD<sub>5</sub>.

---

\*Professor, Internal Medicine Department, Faculty of Medicine, Tishreen University, Lattakia, Syria.

\*\*Associate Professor, Internal Medicine Department, Faculty of Medicine, Tishreen University, Lattakia, Syria.

\*\*\*Postgraduate Student, Internal Medicine Department, Faculty of Medicine, Tishreen University, Lattakia, Syria.

**مقدمة:**

تملك كل خلية في العضوية على سطحها مجموعة من الجزيئات البروتينية التي تعمل كمستقبلات غشائية تدعى بالواسمات الخلوية المناعية . تقوم هذه المستقبلات بوظيفة الاتصال بين الخلايا من أجل تنظيم وظائف العضوية كذلك من أجل التأقلم مع البيئة . يقابل كل مستقبلة خلوية جزيئة ترتبط معها بشكل نوعي وتدعى الربيطه (Ligand) . يمكن أن نستفيد من رباط هذه الجزيئات لاستهداف الخلايا وإدخال جزيئة فعالة إلى الخلايا التي تحمل المستقبلة النوعية ، ويمكن أن تكون هي نفسها أدوية ذات فعل مماثل أو منافس تحل محل الربيطه الطبيعية أو تحاصر الإشارات الحادئة بفعل ارتباط المستقبله بالربيطه النوعية لها [9,2] . كما يمكننا أن ندرس الواسمات على خلية ما باستخدام تقنية الجريان الخلوي (Flow cytometry) حيث تعتمد هذه الطريقة على استخدام أضداد وحيدة النسيلة نوعية لجزيئة خلوية ما وتكون هذه الأضداد موسومة بمادة ومضانية بحيث يمكن الكشف عن تثبيتها على الخلايا المدروسة لدى تعرض الأخيرة لحزمة ضوئية ليزيرية [2,1] . هذا ويرمز إلى مجموعة الأضداد التي تتعرف على جزيئة غشائية ما بـ CD (Cluster of differenciotion) متبوعاً برقم يميز الجزيئة ويمكن أن يشير الـ CD إلى الجزيئة نفسها [10,9,2] .

**أهمية البحث وأهدافه:**

هذا البحث هو الأول من نوعه في مشفى الأسد الجامعي باللاذقية حيث يسלט الضوء على استقصاء جديد هو التتميط المناعي بطريقة Flow cytometry الذي يجرى لمرضى الأمراض الدموية الخبيثة . حيث يهدف البحث إلى إظهار الدور المحوري للتتميط المناعي في الوصول للتشخيص الدقيق الذي لم تتمكن الدراسة المورفولوجية الوصول إليه وبالتالي يوجه نحو العلاج الأنسب و ينفرد في تصوير الإنذار المستقبلي للمرض ومدى استجابته للعلاج . كما يهدف بحثنا هذا إلى جعل التتميط المناعي استقصاء روتيني يجب أن يجرى لكل حالات الأمراض الدموية الخبيثة .

**طريقة البحث ومواده:**

أجريت الدراسة على 87 مريضاً من بين المرضى المقبولين بقسم أمراض الدم بمشفى الأسد الجامعي باللاذقية بين عامي (2000-2007) حيث كانت الاستقصاءات المجراة لكل مريض تتضمن:

- 1- تعداد وصيغة.
- 2- صورة صدر.
- 3- إيكو بطن.
- 4- بزل نقي عظم.
- 5- خزعة نقي عظم عند بعض الأشخاص المختارين.
- 6- تتميط مناعي ( أجري في مشفى الأسد الجامعي في دمشق - هيئة الطاقة الذرية - مخبر الدكتور ناجي سابا ) .

أما بقية المرضى المقبولين في قسم أمراض الدم فقد كان استبعادهم لأحد الأسباب التالية:

- 1- المرضى المشخصين بالمشفى والذين لم تتم متابعتهم بالمشفى.
- 2- المرضى المشخصين بالمشفى والذين لم يجرؤا تتميط مناعي.

- 3- المرضى الذين لم تتضمن أضايبيرهم الاستقصاءات الكافية للتصنيف السريري.  
4- المرضى الذين شخصوا حديثاً وبالتالي لا يمكن التنبؤ بقيامهم.

### النتائج والمناقشة:

الجدول رقم (1): توزع المرضى حسب التشخيص الأولي قبل إجراء التتميط المناعي.

النسبة المئوية	عدد المرضى	التشخيص
%84	73	CLL
%11	9	ALL
%3	3	AML
%2	2	Others

التعليق على الجدول رقم (1): نلاحظ من هذا الجدول أن القدرة التشخيصية بغياب التتميط المناعي هي قدرة محددة جداً وتقف عند خطوط عريضة فقط بدون الدخول بتفاصيل دقيقة بالتشخيص وقد تكون مؤثرة جداً بالإنداز.

لذلك وبعد الأخذ بعين الاعتبار بالتتميط المناعي لكل هؤلاء المرضى تم فرزهم وفق المجموعات التالية:

الجدول رقم (2): توزع مرضى ALL.

النسبة المئوية	عدد المرضى	
33.3%	3	Early pre- B- ALL
33.3%	3	Commun B-ALL
11.2%	1	Mature B-ALL
22.2%	2	T-ALL

الجدول رقم (3): توزع مرضى AML.

النسبة المئوية	عدد المرضى	
33.33 %	1	M <sub>0</sub>
33.33 %	1	M <sub>4</sub>
33.34 %	1	M <sub>5</sub>

الجدول رقم (4): توزع مرضى CLL.

النسبة المئوية	عدد المرضى	
90%	66	B – CLL
10%	7	T – CLL

الجدول رقم (5): توزع مرضى B - CLL.

النسبة المئوية	عدد المرضى	
83%	54	B – CLL/SLL
11.5%	7	B - PLL
4%	3	HCL
1.5%	2	SLVL

حيث: Small Lymphocytic Lymphoma – SLL (لمفوما صغيرة الخلايا).  
 Prolymphocytic Leukemia – B – PLL (ابيضاض الدم بسليفة للمفاويات).  
 Hairy Cell Leukemia – HCL (ابيضاض الدم بالخلايا المشعرة).  
 Splenic Lymphoma with Villous Lymphocytes – SLVL (لمفوما طحالية ذات الخلايا اللمفية الزغابية).

**التعليق:** نظراً لعدد مرضى B-CLL/SLL البالغ 54 مريضاً والذي يشكل 63% من مرضى الدراسة فقد ركزنا بحثنا على هذه العينة والتي تم تقسيمها إلى مجموعتين رئيسيتين وذلك بناءً على إيجابية أو سلبية CD<sub>5</sub>. حيث تعتبر الخلايا البائية B-cell على أنها CD<sub>5</sub><sup>+</sup> عند مقابلة نسبة الخلايا لنسبة خلايا CD<sub>20</sub><sup>+</sup> أو خلايا HLA-DR<sup>+</sup> وذلك مقارنة مع نسبة خلايا CD<sub>3</sub><sup>+</sup>. ووفقاً لذلك تم توزيع المرضى حسب الجدول رقم (6).

الجدول رقم (6): توزيع مرضى B – CLL حسب إيجابية أو سلبية CD<sub>5</sub>.

النسبة المئوية	عدد المرضى	
93%	50	CD <sub>5</sub> <sup>+</sup>
7%	4	CD <sub>5</sub> <sup>-</sup>

حيث درست الخلايا وحيدة النوى المأخوذة من هؤلاء المرضى بواسطة Flow cytometry وذلك لعدد من واسمات الغشاء السطحية والتي تضم الغلوبولين المناعي (IgM) والغلوبولين المناعي (IgD) والأضداد أحادية الأنسال: (Anti (CD3 – CD5 – CD21 – CD22 – CD23 – FMC7) كما تم فرز المرضى حسب الجنس والعمر وتعداد الكريات البيض والمراحل السريرية وذلك وفق تصنيف Rai – Binet. علماً بأنه وفق Rai هناك خمس مراحل هي:

المرحلة	الموجودات
0 –	– كثرة اللمفاويات بالدم .
I –	– كثرة اللمفاويات وضخامة العقد اللمفاوية.
II –	– كثرة اللمفاويات وضخامة طحالية +/- ضخامة عقد أو كبد .
III –	– كثرة اللمفاويات مع فقر دم (Hb < 10 g/dl)
V –	– كثرة اللمفاويات ونقص صفيحات (تعداد الصفيحات > 100000).

أما تصنيف Binet:

- مرحلة A: كثرة للمفاويات مع ضخامة عقد لمفاوية في أقل من 3 نواحي عقدية.
  - مرحلة B: كثرة للمفاويات مع ضخامة عقد لمفاوية في 3 نواحي عقدية أو أكثر.
  - مرحلة C: كثرة للمفاويات مع (Hb < 10 g/dl) و/أو صفيحات > 100000 / ميكرو لتر.
- ووضع المرضى على علاج وفق أحد الأنظمة التالية: [ 8,7,1 ] .

- Wait and see
- L.P (Leukeran – Prednisolone)
- CHOP (Cytosan – Adriamycin – Oncovine – Prednisolone )
- C.V.P (Cytosan – Vincristine – Prednisolone )
- F.C (Fludarabine – Cytosan)

من بين المرضى البالغ عددهم 54 مريضاً كان هناك 33 ذكراً و 21 أنثى وكان وسطي العمر عند التشخيص 68 سنة. هذا و يعطي الجدول (7) البيانات السريرية والتتميطية لمجموعتي المرضى.

الجدول رقم (7): يعطي البيانات السريرية والتتميطية لمجموعتي المرضى.

P	CD <sub>5</sub> <sup>-</sup>	CD <sub>5</sub> <sup>+</sup> (50)	
0,05 >	1	32	ذكور
0,05 >	3	18	إناث
N.S	68	67	وسطي العمر
N.S	54	67	تعداد الكريات البيض
0,00001 >	50% (حالتين)	14% (7 حالات)	FMC 7 <sup>+</sup> حالات
0,0006	50% (حالتين)	24% (12 حالة)	المرحلة II بتصنيف Rai %
N.S	50% (حالتين)	58% (29 حالة)	المرحلة A بتصنيف Binet %
N.S	25% (حالة واحدة)	28% (14 حالة)	المرحلة B بتصنيف Binet %
N.S	25% (حالة واحدة)	14% (7 حالات)	المرحلة C بتصنيف Binet %
0.0001 >	75% (ثلاث حالات)	14% (7 حالات)	تركيز مرتفع بشدة لـ IgM %
0,0001 >	25% (حالة واحدة)	72% (36 حالة)	CD23 <sup>+</sup>
0.05	3.6	4.9	البقايا الوسطية (بالسنوات)

N.S: Not significant.

**التعليق على الجدول:** نلاحظ أن بقاء مرضى CD<sub>5</sub><sup>-</sup> أقصر من بقاء مرضى CD<sub>5</sub><sup>+</sup> (P = 0.05) بالنسبة لشدة تآلق الغلوبولين المناعي للغشاء السطحي Smlg: لوحظ أن المرضى ذوي شدة تآلق IgM منخفضة عاشوا مدة أطول من المرضى ذوي شدة تآلق عالٍ مع (P < 0.00001).

**CD<sub>3</sub>**: كان لدى 38% من المرضى عددٌ من الكريات إيجابية CD<sub>3</sub> أعلى من المجال الطبيعي الأعلى وبدا ذلك واضحاً خاصة لدى مرضى المراحل B و C أكثر مما هو عليه في المرحلة A إلا أنه لم يكن هناك فرق هام في البقيا مقارنة مع المرضى الذين يملكون تعداد كريات CD<sub>3</sub><sup>+</sup> منخفض.

**CD<sub>20</sub>**: كانت إيجابية بنسبة 97% بالمراحل الثلاث لحالات CD<sub>5</sub><sup>+</sup> وترافقت مع إيجابية CD19 و CD24 و HLA-DR لكن لم يكن هناك فرق في البقاء بين حالات CD<sub>20</sub><sup>+</sup> و CD<sub>20</sub><sup>-</sup>.

**CD<sub>21</sub>**: كانت إيجابية بنسبة 65% من حالات CD<sub>5</sub><sup>+</sup> كما أن 96% من هذه الحالات عبّرت أيضاً عن CD<sub>20</sub><sup>+</sup> ولكن لم يكن هناك فرق في البقيا بين حالات CD<sub>21</sub><sup>+</sup> و CD<sub>21</sub><sup>-</sup>.

**CD<sub>22</sub>**: كانت إيجابية بنسبة 86% ومن الملحوظ ترافقها مع تعبير واضح لـ IgD ولكن أيضاً لم يكن هناك فارق في البقاء بين حالات CD<sub>22</sub><sup>+</sup> و CD<sub>22</sub><sup>-</sup>.

**CD<sub>23</sub>**: الإيجابية بنسبة 71% وكانت 93% من هذه الحالات هي حالات CD<sub>22</sub><sup>+</sup> و 80% منها ترافقت مع IgM<sup>+</sup> و IgD<sup>+</sup> و 50% مع حالات CD<sub>21</sub><sup>+</sup> ولوحظ بقيا أطول لمرضى CD<sub>23</sub><sup>+</sup> من مرضى CD<sub>23</sub><sup>-</sup> [10].

**FMC7**: الإيجابية بنسبة 14% وترافقت مع CD<sub>22</sub><sup>+</sup> باستثناء حالة واحدة. كما لوحظ أنها ترافقت في معظمها (10 حالات من أجل 12 حالة) مع مرحلة Rai II (أي مع تضخم طحال).

**أما بالنسبة لحالات CD<sub>5</sub><sup>-</sup>**: فلو حظ أن CD<sub>5</sub><sup>-</sup> هي أكثر وجود عند الإناث (3 حالات من أصل 4) وحالتين من أصل أربعة هي في مرحلة Rai II (مع تضخم طحال). بالإضافة إلى تعبير عالٍ لـ IgM (3 حالات من أصل 4) كذلك FMC7 مرتفع بمقابل تعبير منخفض لـ CD23 (حالة واحدة من أصل أربعة).

إذاً :

حوالي 80% من حالات B-CLL سوف تكون CD<sub>5</sub><sup>+</sup> وذات غلوبولين غشائي سطحي مناعي Smlg ضعيف حيث إن تركيز Smlg على خلايا B-CLL نمطية يقارب عشر التركيز على اللمفاويات البائية الطبيعية. واللمفاويات ذات تآلق الغلوبولين المناعي الأعلى قد تمثل مجموعات كريات ابيضاضية في فترة لاحقة وقد أفيد من ذلك في التعبير عن الإنذار المستقبلي لتآلق IgM وذلك بمعزل حتى عن بعض الملامح الأخرى لإبيضاض الدم اللمفاوي المزمن مثل (CD<sub>5</sub> - CD<sub>23</sub> - FMC<sub>7</sub>) [3].

• IgD و CD<sub>22</sub> غالباً ما يعبران بشكل مشترك وهما واسمان للخلايا البائية الهاجعة ولكن لم يلاحظ أن لهما أهمية انذارية وخلافاً لدراسات سابقة لم نجد ارتباطاً بين CD<sub>22</sub><sup>+</sup> وتضخم الطحال أو شدة التآلق القوي للغلوبولين المناعي IgM وكانت غالباً حالات CD<sub>22</sub><sup>+</sup> هي حالات FMC<sub>7</sub>.

• CD<sub>23</sub>: هو واسم تفعيل محفز على الغشاء السطحي للخلايا البائية إيجابية IgM - IgD وقد ارتبطت إيجابيته بإنذار جيد. ومن الممكن إيجاد CD<sub>23</sub> المنحل بالمصل كنتاج انقسام CD<sub>23</sub> الغشائي في تراكيز أعلى في B-CLL منه في الأمصال الطبيعية وتشير هذه المعطيات إلى علاقة معكوسة بين مقدار CD<sub>23</sub> المرتبط بالغشاء و المنحل [10].

• FMC<sub>7</sub>: لوحظ إيجابية لدى المرضى ذوي تآلق IgM العالي وتضخم الطحال وارتباط سلبي مع CD<sub>23</sub><sup>+</sup>. مع الإشارة إلى أن إيجابيته العالية قد تقود التشخيص إلى (HCL أو B-PLL) [3,4,5].

### وختاماً:

تؤكد ملاحظتنا أنه من بين مرضى B-CLL  $CD5^+$  فإن الغالبية لديهم نمط ظاهري متجانس تقريباً مع تعبير ضعيف للغلوبولين المناعي (IgD - IgM) كما ولديهم إيجابية للواسمات البائية الهاجعة  $CD22-CD21$  إضافة إلى واسمة الخلايا البائية المنشطة حديثاً  $CD23$ . وفي بعض المرضى يبدو التوسع الإبيضاضي الدموي قد حدث في مستوى أعلى من تفاضل الخلية البائية المحدد بشدة تآلق غلوبولين مناعي غشائي سطحي Smlg عالٍ أو تعبير غشائي  $CD23$  منخفض. ولهذه المتغيرات أهمية إنذارية ذات دلالة بمعزل عن المرحلة السريرية ويجب أخذها بعين الاعتبار في تدبير مرضى ابيضاض الدم اللمفاوي المزمن ذوي تعبير  $CD5^+$ .

### الاستنتاجات والتوصيات:

- إن علم أمراض الدم هو علم واسع جداً فلم يعد محدوداً بخطوط عريضة للتشخيص بل يتعداها إلى أنماط تشخيصية متشعبة فلم يعد من المقبول مثلاً أن نطرح تسمية CLL كهوية كافية للتشخيص بل يجب أن نحدد B-CLL أو T-CLL حتى إن الموضوع يتعدى ذلك لما هو أكثر تفصيلاً.
- بات اليوم من اللازم تحديد هوية كل مرض بدقة لما لذلك من دور محوري في انتقاء العلاج والتكهن بالإنداز.
- أثبت التتميط المناعي أنه وحده القادر على الوصول للتشخيص الأكيد الدقيق في علم الأورام الدموية وبعض الأمراض الأخرى.
- لا بد أن يصبح التتميط المناعي فحص روتيني يجرى لجميع المرضى الذين يشته لديهم بأفة دموية خبيثة .
- يتطلب ذلك تطوير الطب المخبري ودعمه وتأمين جهاز لإجراء التتميط المناعي في مشفى الأسد الجامعي باللاذقية بالإضافة لوجود كادر فني وطبي قادر على التعامل مع الجهاز وتفسير النتائج .
- نظراً لأن كل بحث علمي ما هو إلا قطرة صغيرة تضاف إلى محيط العلم اللامتناهي لذلك أتمنى أن يعقب هذا البحث دراسات أخرى تدور حول التتميط المناعي ودوره في B-CLL وكشف خفايا تشخيصية وإنذارية أخرى لا تزال عالقة.
- كذلك نتمنى أن تكون هناك أبحاث لاحقة لتسلط الضوء على الدور المحوري للتتميط في باقي أمراض الدم الخبيثة هذا الدور الذي لا يقل أهمية عن الدور الذي نوهنا إليه في B-CLL .

## المراجع:

- 1- YS KIM, RJ FORD JR., JA FABER, RH BELL, KS ELENITOBA-HOHNSON, JL MEDEIROS. *B-Cell chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma involving bone marrow with an interfollicular pattern*. Am J Clin Pathol 114:41-6, 2000.
- 2- MJ BOROWITZ, R BRAY, R GASCOYNE, ET AL. *U.S.-Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: data analysis and interpretation* Cytometry. 30:236-44, 1997.
- 3- TJ HAMBLIN, Z DAVIS, A GARDINER, DG OSCIER, FK STEVENSON. *Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia [see comments]*. Blood 94:1848-54, 1999.
- 4- K MALOUM, F DAVI, H MERLE-BERAL, ET AL. *Expression of unmutated VH genes is a detrimental prognostic factor in chronic lymphocytic leukemia [letter]*. Blood 96:377-9, 2000.
- 5- A CUNEO, MG ROBERTI, R BIGONI, ET AL. *Four novel non-random chromosomes rearrangements in B-cell chronic lymphocytic leukemia: 6p24-25 and 12p12-13 translocations, 4p21 anomalies and monosomy 21*. Br J Haematol 108:559-64, 2000.
- 6- D CAPELLO, U VITOLO, L PASQUALUCCI, ET AL. *Distribution and pattern of BCL-6 mutations throughout the spectrum of B-cell neoplasia*. Blood 95:651-9, 2000.
- 7- F SOLE, S WOESSNER, L FLORENSA, ET AL. *Cytogenetic findings in five patients with hairy cell leukemia*. Cancer Genet Cytogenet 110:41-3, 1999.
- 8- M PARRENS, P DUBUS, P AGAPE, ET AL. *Splenic lymphoma with villous lymphocytes: vascular lymphomatosis*. Leuk Lymphoma 37:219-23, 2000.
- 9- D,M,KNOWLES ; *Immunophenotyping Markers in Neoplastic Hematopathology* . 2<sup>nd</sup> edition , 2005 , 93 -190 .
- 10- G,MAROTTA; D,RASPADORI; C, SESTIGIANI; G, SCALIA ;C, BIGAZZI; F,LAURIA . *Expression of the CD23 antigen in B-cell chronic lymphoproliferative disorders* . Leuk Lymphoma , 37: 145-149, 2006.

