آزمایشگاه دنا
DeNA Laboratory
شماره سند: 31-1-AH1

Flow Cytometry

در حال حاضر تعیین ایمونوفنوتایپ به روش فلوسایتومتری (Flow Cytometry Immunophenotyping) به عنوان یک روش ضروری و اجتناب ناپذیر در تشخیص، طبقه بندی، مرحله بندی و مونتورینگ بعد از درمان برای تومورهای هماتوپوئتیک و بافت لنفوئید شناخته شده است.

پیشرفت های اخیر در زمینه دستگاه های فلوسایتومتری، نرم افزارهای پیشرفته ، طراحی پنل های وسیع الطیف آنتی بادی ها برای CD Molecules و فلوروکروم های گوناگون و با کیفیت بالا این امکان را فراهم آورده تا علاوه برامکان تشخیص انواع مختلف جمعیت های نرمال سلولی ، موارد بیان نابجای آنتی ژن ها (Aberrancies) را حتی در جزء بسیار کوچکی از جمعیت مورد آنالیز مشخص نماییم.

روش فلوسایتومتری:

تکنیکی حساس و قدرتمند جهت آنالیز همزمان پارامترهای متعدد (سطحی و داخلی) هر سلول در یک جمعیت هتروژن و به بیان دیگر روشی برای ارزیابی تک تک سلول های موجود در نمونه از نظر وجود یا عدم وجود آنتی ژن های اختصاصی سلول (phenotype) می باشد.

دستگاه فلوسایتومتری اساساً یک particle Analyzer است. در این روش سوسپانسیون یکنواختی از نمونه تهیه می شود و سلول های لیبل شده با آنتی بادی های متصل به فلوروکروم بصورت تک تک از مقابل منبع نوری لیزر عبور می کنند. هر سلول بر اساس خصوصیات خاص خود یعنی سایز، گرانولاریتی یا Texture، مولکول های غشایی، سیتوپلاسمیک یا هسته ای میزان متفاوتی از تفرق نور خواهد داشت که توسط Optical Detectores شناسایی و آنالیز می شود.

بعد ازدریافت نمونه بر اساس نوع نمونه، اطلاعات بالینی در دسترس ، یافته های آزمایشگاهی، مورفولوژیک و در صورت موجود بودن، سوابق فلوسایتومتری قبلی، ارزیابی های زیر صورت می‌گیرد:

- تشخیص رده‌های مختلف سلولی و تعیین بالغ یا نابالغ بودن آنها
- تشخیص سلول های غیر طبیعی که الگوی بیان آنتی ژنی متفاوتی نسبت به جمعیت نرمال دارند
- تعیین دقیق فنوتیپ غیر طبیعی
- تعیین هرگونه کاهش یا افزایش شدت رنگ فلوروکروم های لیبل شده با آنتی بادی در مقایسه با الگوی طبیعی
- و نهایتاً تفسیر کلی یافته‌های مورفولوژی، رنگ آمیزی‌های اختصاصی سیتوشیمی و ایمنوفنوتایپ و تطابق با یافته‌های کلینیکی

براساس توصیه های اجماع بین المللی Group Bethesda، شرایط بالینی زیر **"اندیکاسیون های انجام فلوسایتومتری"** به عنوان‌یک روش غربالگری حساس و سریع برای تشخیص بدخیمی خونی می باشند:

- موارد سایتوپنی خصوصاً بای سایتوپنی و پان سایتوپنی
- افزایش تعداد لکوسیت ها شامل لنفوسیتوز، مونوسیتوز و ائوزینوفیلی
- وجود سلول‌های آتیپیک یا بلاست درخون محیطی، مغز استخوان یا مایعات بدن
- پلاسماسیتوزیس یا منوکلونال گاموتاپی
- ارگانومگالی و توده های بافتی
- ارزیابی موارد پروگنوستیک و Minimal residual Disease

ایمنوفنوتایپ تولید مثل
Reproductive Immunophenotype

مطالعات اخیر این مسئله را به اثبات رسانده است که سلامتی سیستم ایمنی برای داشتن یک باروری موفق ضروری است. مشکلات سیستم ایمنی می تواند زمینه ساز ناباروری های با علت نامعلوم، سقط های مکرر و موارد ناموفق IVF باشد. در سال های اخیر بسیاری از عوامل ایمنی دخیل در مشکلات باروری شناخته شده اند. تشخیص این عوامل در شناسایی موارد ناباروری با علل نامعلوم و درمان مناسب آنها بسیار حائز اهمیت است. یکی از این تست ها که می توان به آن اشاره نمود ارزیابی ایمونوفنوتایپ باروری یا Reproductive Immunophenotype Assay می باشد.

ارزیابی ایمونوفنوتایپ باروری یا Reproductive Immunophenotype Assay

تعیین فنوتایپ و غلظت نسبی جمعیت های مختلف گلبول های سفید در خون محیطی در تعیین ریسک و خطر از دست دادن حاملگی یا سقط ارزشمند است و از طرفی می تواند زنان دارای جنین با کاریوتایپ نرمال اما در معرض ریسک برای عدم لانه گزینی، خصوصاً در موارد IVF/ET را مشخص نماید.

در این تست تخصصی نسبت لنفوسیت ها شامل انواع سلول های B و T (Helper & Supressor) و سلول های NK در خون محیطی مورد ارزیابی قرار می گیرد. نسبت و درصد

غیر طبیعی این سلول ها می تواند پیشگویی کننده از دست دادن حاملگی در آینده باشد، چه بیمار دچار مشکل ناباروری بوده و کاندید استفاده از روش های کمک باروری باشد و یا بیماری باشد که باردار می شود اما دچار مشکل سقط مکرر است.

افزایش در صد سلو ل های $CD56^{+}$ موجود در گردش خون با از دست دادن باروری مرتبط است و نسبت افزایش یافته سلول های $CD4^{+}/CD8^{+}$ در مواردی از اختلالات اتوایمیون شامل سندرم Reproductive Autoimmune Failure دیده شده است.

اثبات سطح افزایش یافته سلول های $CD56^{+}$ در خون می تواند زنان در معرض ریسک برای ا ز دست دادن یک حاملگی نرمال از نظر کاریوتایپ و نیز مستعد برای عدم لانه گزینی امبریو را مشخص نماید. تشخیص به هنگام و درمان های تعدیل کننده سیستم ایمنی می تواند شانس تولد زنده را افزایش دهد.

روش ارزیابی و تشخیص

به کارگیری تکنیک ایمونو فلورسانس با استفاده از آنتی بادی های منوکلونال اختصاصی به وسیله روش فلوسایتومتری می تواند در صد سلول های خونی منونوکلئر که مارکرهای CD4, CD3, CD16, CD19 / CD5, CD8 و CD56 را بیان می کنند، را تعیین کند.

CD3 (pan T-Cells)

سلول های نوع Tاکثریت لنفوسیت های خون محیطی را تشکیل می دهند و مهم ترین سلول ها در سیستم ایمنی محسوب می شوند. کاهش آنها در موارد ضعف سیستم ایمنی دیده می شود. در بیماران با مشکلات ناباروری و نیز سقط مکرر این سلول ها افزایش یافته و یادر حداکثر میزان نرمال هستند و به بیان دیگر بیمار دارای سیستم ایمنی بیش فعال می باشد.

CD8 (T- Cytotoxic Suppressors)

این سلول ها نوعی از لنفوسیت $CD3^{+}$ هستند. عملکرد درست این سلول ها باعث حذف سلول های غیر طبیعی و عفونی می شود. بندرت در مشکلات باروری میزان غیر طبیعی (کمتر از حد نرمال) دارند.

$CD19^{+}/5^{+}$ (B-1 Cells)

سلول های B به دو گروه B-1 و B-2 تقسیم می شوند. سلول های B-1 مارکر CD5 را برروی سطح خود بیان می کنند و در اختلالات اتوایمیون افزایش می یابند. خانم ها با افزایش این رده سلولی ممکن است در معرض افزایش ریسک برای تیروئیدیت و منوپوز زودرس باشند.

CD4 (T-Helper cells)

این سلول ها نوعی از لنفوسیت های $CD3^{+}$ هستند. نوع Th1 قادر به تولید مواد شبه هورمونی تحت عنوان سیتوکین های پیش التهابی می باشد و منجر به پاسخ ایمنی در برابر عوامل خارجی داخل سلولی مثل ویروس ها می گردد. سلول های Th2 با آزاد کردن سیتوکین های ضد التهابی باعث حذف ارگانیسم های خارج سلولی می شوند. در بیماران با مشکلات ناباروری و نیز سقط مکرراین سلولها افزایش یافته و یا حداکثر میزان نرمال هستند.

CD19 (B Cells)

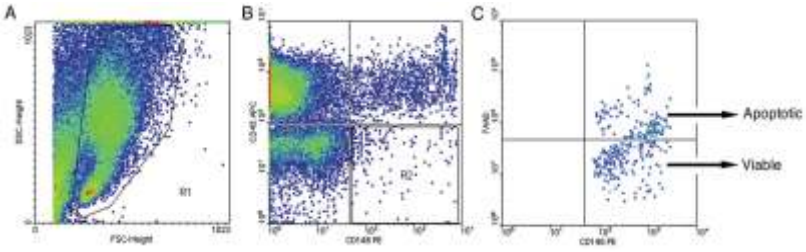
سلول های B بعداز بلوغ به پلاسماسل با توانایی تولید آنتی بادی تبدیل می شوند. نشان داده شده که خانم های با مشکلات ناباروری و سقط در زمینه ایمنو لوژیک، در حد بالای نرمال و یا افزایش یافته هستند (معمولاً بالای ۱۲٪).

$CD56^{+}$ (Natural Killer Cells)

NK Cells پروتئین CD56 را بر روی سطح خود بروز می دهند و بر خلاف لنفوسیت های T دارای توانایی ذاتی برای تشخیص عوامل خارجی و حتی داخلی غیر طبیعی می باشند. سطح افزایش یافته آن ها با کاهش باروری همراه است.

RIP

سلول های NK هم درخون محیطی و هم در بافت رحمی حاملگی وجود دارند. این سلول ها در رحم بر خلاف همتای خود در خون محیطی در تغییر شکل و مسیر عروق خونی رحم در جهت حمایت از جفت و جنین در طول نه ماه حاملگی نقش ایفا می کنند. بعضی از انواع این سلول ها یعنی گروه $CD16^{+}$ و CD56 وقتی توسط سیتوکین IL-2 و تروفوبلاست جفتی سیتوتوکسیک فعال شوند تولید TNF (Tumor Necrosis Factor) می کنند که می تواند برای جنین توکسیک باشد و سریعاً سلول های در حال تقسیم جنین و جفت را از بین ببرد. شمارش بیش از ۲۰ در صد این سلول ها ریسک سقط مکرر را علی رغم درمان های ایمنی (پردنیزون، آسپرین، هپارین و Paternal Leukocyte) بالا می برد. در گروهی از زنانی با چندین IVF ناموفق، مشخص شده است که میزان ترشح TNF به اندازه ای است که باعث مهار لانه گزینی و تشکیل زودرس جفت می‌شود.



اندیکاسیون های انجام تست:

- تمام موارد نازایی غیر قابل توجیه در خانم ها
- موارد ناموفق IVF و ترانسفر یا انتقال امبریوی به ظاهر سالم
- موارد سقط پی درپی دوبار و بیشتر

آزمایشگاه دنا
D©NA Laboratory
تهران، آزمایشگاه دنا، خیابان ولیعصر، بین بیمارستان دی و پل همت، خیابان نیلو، نبش بن بست دوم
تلفن: ۴۳۹۳۶
www.DNA-Lab.ir

ISO 9001:2015
TÜV NORD