

RËNDËSIA DIAGNOSTIKE E IMUNOFENOTIPIZIMIT LEUKOCITAR MULTIPARAMETRIK ME CITOMETRI ME FLUKS NË LEUKOZAT AKUTE TË MOSHAVE PEDIATRIKE

*SEMANAJ V.¹, DAJA P.², CURAJ T.¹, YLLI Z.¹, KONI M.³, SULÇEBE G.¹.

^{1,2}Qendra Spitalore Universitare "Nënë Tereza" Tiranë, Shërbimi i Imunologjisë dhe Pajtueshmërisë Indore, Shërbimi i Laboratorit klinik

³Universiteti i Tiranës, Fakulteti i Shkencave të Natyrës, Departamenti i Biologjisë

e-mail: vsemanaj@yahoo.com

Përmbledhje

Leukoza akute përkufizohet si proliferim i pakontrolluar i qelizave të papjekura hematopoetike në palcën kockore me ose pa përfshirje të gjakut periferik. Në këtë patologji malinje prekursorët e qelizave të gjakut janë ndalur në një fazë të hershme të zhvillimit dhe nuk arrihet diferencimi dhe maturimi i tyre. Ky mekanizëm përfshin një aktivizim jo normal të gjeneve që shoqërohet me translokacione kromozomikë edhe anomali të tjera gjenetike. Shkaqet specifike të leukozave nuk janë të qarta por disa faktorë rrisht dhe anomali kromozomike janë identifikuar. Leukoza akute në moshën pediatrike përbën një ndër patologjitë më të shpeshta dhe më të rënda dhe që paraqet një rrezik të lartë për jetën. Megjithatë, përparimi i konsiderueshëm i kemioterapisë në kohën e sotme ka bërë të mundur që të ulet mjaft mortaliteti dhe njëkohësisht të rritet progresivisht remisioni i plotë dhe afatgjatë në këtë sëmundje. Kusht i domosdoshëm për këto arritje të rëndësishme është një diagnozë e saktë e leukozave akute në bazë të klasifikimit të tyre pasi dhe terapia vendoset sipas llojit të leukozës. Qëllimi i këtij studimi është aplikimi i metodologjisë së imunofenotipizimit leukocitar multiparametrik me citometri me fluks (IMCF) dhe përcaktimi i rolit të kësaj metodologjie në diagnozën e saktë të leukozave akute në moshën pediatrike.

Abstract

Acute leukemia is defined as a proliferation of immature cells in bone marrow with or without peripheral blood involvement. The precursors of blood cells are stopped at an early stage of development and their maturity is not reached. This process involves the activation of abnormal genes through chromosomal translocations and other genetic anomalies. The specific causes are not clear, but several risk factors and chromosomal abnormalities have been identified. Acute leukemia in the pediatric age are serious pathologies with a very high risk for life. However, due to the improved chemotherapy treatment protocols, the mortality rate has decreased significantly and in the same time there has been progressive ameliorations as far as concerns their long term or definitive remission. An indispensable condition for these outstanding achievements is an accurate and rapid diagnosis. The aim of this study is the application of the methodology of flow cytometry immunophenotyping and the investigation of its diagnostic role in the acute leukemia of the pediatric age.

Fjalëkyçe: Imunofenotipizim leukocitar, citometri me fluks, leukozë akute, moshë pediatrike.

Hyrje

Leukoza akute në moshën pediatrike është ndër patologjitë me risk të lartë për jetën. Diagnostikimi i shpejtë dhe i saktë i leukozës akute përbën një domosdoshmëri për një mjekim sa më të përshtatshëm dhe efikas të tyre. Diagnoza e leukozës akute mbështetet në një sërë ekzaminimesh biologjike. Hapi i parë mbetet ekzaminimi citologjik i gjakut periferik dhe i palcës kockore, i cili vë në dukje prezencën e qelizave të papjekura (blasteve) në numër të ndryshëm deri në invazion të plotë të palcës kockore. Karakteristikat morfologjike të klonit malinj lejojnë një përcaktim paraprak të linjës së përfshirë në proliferim. Më pas ekzaminimet e mëtejshme përfshijnë imunofenotipizimin (Wood, *et al.* 2006) si dhe analizat citogjenetike apo ekzaminimet përmes biologjisë molekulare. Që me zbulimin e antitropave monoklonalë imunofenotipizimi është përdorur gjerësisht në leukozat akute (Köhler, Milstein, 1975). Me anë të IMCF duke u nisur nga shprehja e shënjesve të ndryshëm leukocitarë në sipërfaqe dhe në citoplazëm të qelizave blastike realizohet përcaktimi i linjës qelizore që ka proliferuar, kështu përcaktohet lloji i leukozave akute limfoide (LAL) apo mieloide (LAM) (Béné MC, *et al.* 2011).

Duke u nisur nga shprehja e këtyre shënjesve në linjat qelizore përkatëse bëhet dhe klasifikimi i LA sipas fazave të maturimit qelizor sipas EGIL (European Group for the Immunological Characterization of Leukemia), si dhe shprehja aberrante e disa shënjesve (Béné, *et al.* 1995), që japin informacion për prognozën e sëmundjes. Gjithashtu me anë të IMCF realizohet më së miri përcaktimi i Leukozave akute bifenotipike (Béné, *et al.* 2009). Përcaktimi i linjës qelizore me nënklasifikimet e saj ka rëndësi të madhe pasi dhe trajtimi ndryshon sipas llojit të LA (Vardiman, *et al.* 2007). Imunofenotipizimi kërkon qeliza të freskëta të marra mundësisht nga palca kockore ose gjaku periferik në rastet kur ai klon ka proliferuar dhe në gjak. Avantazhi i kësaj metodologjie është pasi IMCF jep një përgjigje të detajuar të klonit malinj që ka proliferuar brenda një kohe relativisht të shkurtër, rreth 2 orësh si dhe ka rëndësi në ndjekje të pacientit për sëmundjen minimale reziduale (MRD) pas mjekimit (Campana, 2009).

Materiali dhe metoda

Metodologjia

Citometria me fluks realizon matje sasiore multiparametrike të karakteristikave kimike dhe fizike të qelizave në suspension (Ormero, 2000; Drouet *et al.*, 2001).. Duke i inkubuar qelizat me antitropa të shënuar më lëndë fluoreshente mund të përcaktohen antigjenët specifikë ndaj të cilëve ata janë të drejtuar dhe që ndodhen si në sipërfaqen e qelizës ashtu dhe në citoplazëm.

Imunofenotipi i qelizës së studiuar përbën tërësinë e antigeneve që kanë rezultuar pozitiv me antitrupat specifikë të përdorur.

Ndarja e popullatave leukocitare bëhet në bazë të shprehjes së granularitetit (side scatter) dhe shënjesit CD45, i cili është një proteinë tirozinë fosfatazë receptor C, që njihet ndryshe si antigjeni i përbashkët i leukociteve, dhe rritë mjaft ndjeshmërinë e kapjes së blasteve për faktin e njohur tashmë që ato e shprehin këtë shënjes me intensitet mjaft të ndryshueshëm në sipërfaqe të tyre (Wood, *et al.* 2006) Figura 3.

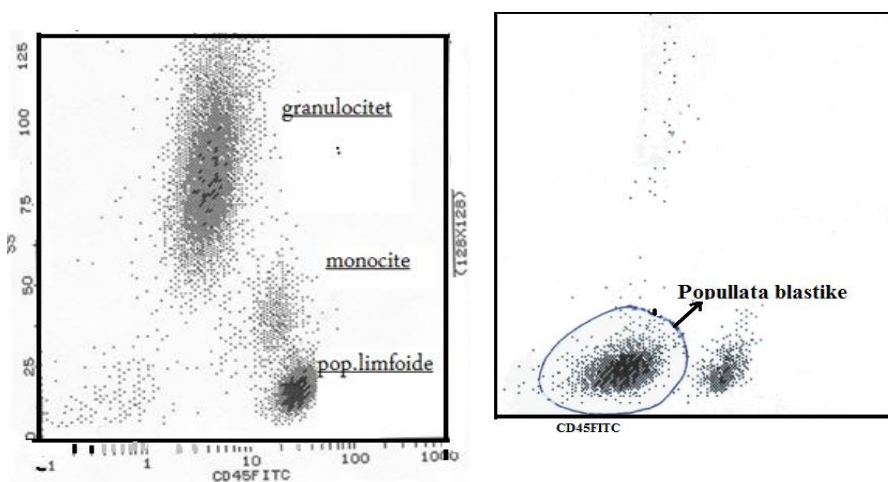


Figura 3: Shpërndarja e popullatave leukocitare sipas CD45FITC/SS në një gjak normal dhe në LAL.

Është përdorur citometri me fluks i tipit BECKMAN COULTER EPICS XL-MCL 4 ngjyrësh.

Materiali i përdorur.

Në këtë studim janë analizuar 43 raste me diagnozë “Suspekt Hemopati malinjë” të referuar në periudhën kohore janar 2011-dhjetor 2012 nga shërbimi i Onkohematologjisë pediatrike në Qendrën Spitalore Universitare “Nënë Tereza”. Nga këto, 32 kampione ishin material i marrë nga palca kockore, 10 nga gjaku periferik dhe një nga likuori cerebrospinal të mbledhura këto me tuba me antikoagulant K3EDTA (ethylene-diamine-tetraacetic acid). Janë përdorur këta shënjes: Panelet me 4 ngjyra (FITC, PE, ECD, PC5):

CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5

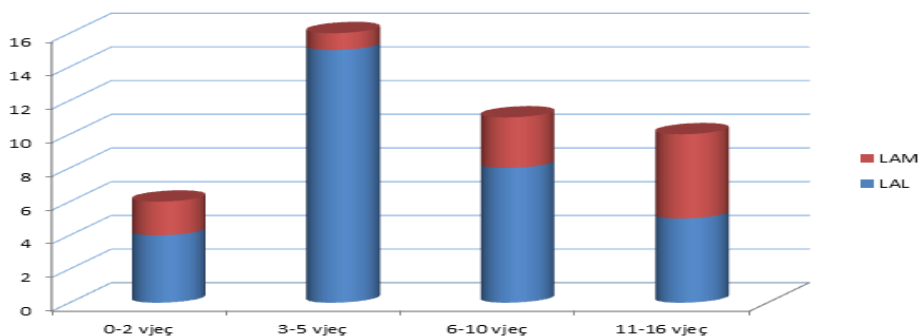
CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5

Antitruapat monoklonal njëngjyrësh:

CD3ECD, CD4PE, CD5PE, CD7PC5, CD8ECD, CD10PC5, CD13PE, CD14PC5, CD15PC5, CD16PE, CD19ECD, CD20PE, CD33PC5, CD34ECD, CD45FITC, CD56PE, CD64PE, CD79aPC5, CD117PC5, MPOPE, HLA/DR ECD.

Rezultatet

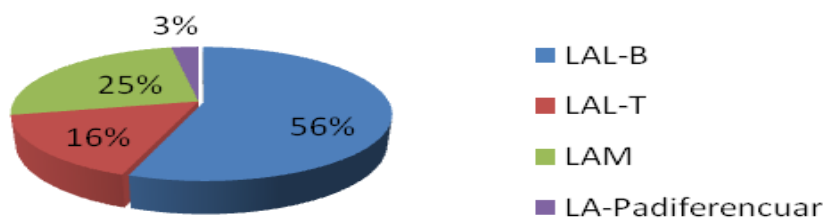
Mosha mesatare rezultoi 6.5 vjeç me interval 0-16 vjeç, mediana 5. Meshkuj rezultuan 26 raste (60,4%) dhe femra 17 raste (39,6%). Një shpërndarje e LA sipas grupmoshës paraqitet në grafikun 1.



Grafiku 1. Paraqitja grafike sipas grup-moshës e LA në fëmijë.

Pozitiviteti i shënjesve intra dhe ekstra qelizorë të hasur në popullatat qelizore malinje të evidentuara.

Pas kryerjes së IMCF rezultuan 31 (72,09%) raste me diagnozë imunofenotipike Leucemi limfoide akute (LAL), përkatësisht 24 raste (58,5 %) LAL-B dhe 7 raste LAL-T (17,1%), 11 raste (25,58%) me Leuçemi mieloide akute (LAM), dhe 1 rast (2,5%) i pa diferencuar pasi paraqiste vetëm shënjesit CD34+, CD117+ (Grafiku 2).



Grafiku 2. Paraqitja grafike pas IMCF sipas llojit të leuçemisë

Përqindja e pozitivitetit të shënjesve limfoidë në LAL-B rezultoi: CD19 (100 %), CD10 (95,8%), CD79a (91,6%), HLA-DR (85,5 %), CD34 (70,8%), CD45 (16,6%). Në to u vu re shprehje aberrante e shënjesve të linjës qelizore mieloide si CD13 në një rast (4,1%) dhe CD33 në një rast tjetër (4,1%).(Tabela 1)

Shënjesit CD të studiuar (nr. i pacientëve të studiuar)	Pacientët pozitiv për shënjesin e studiuar		Pacientët negativ për shënjesin e studiuar	
	N	(%)	N	(%)
CD45 (24)	4	(16,6%)	20	(83,4%)

CD19	(24)	24	(100%)	0	(0%)
CD10	(24)	23	(95,8%)	1	(4,2%)
CD79a	(24)	22	(91,6%)	2	(8,4%)
CD34	(24)	17	(70,8%)	7	(29,2%)
HLA-DR	(24)	20	(83,3%)	4	(16,7%)
CD13	(24)	1	(4,1%)	23	(95,9%)
CD33	(24)	1	(4,1%)	23	(95,9%)

Tabela 1. Shënjesit e studiuar në LAL-B tek fëmijët.

Në 7 raste të cilat rezultuan me proliferim të linjës qelizore limfoide T (LAL-T) pozitiviteti i shënjesve të studiuar rezultoi si vijon: CD45 (100%), CD7(100%), CD5 (85,7%), cCD3 (71,4%), CD3 (28,5%), CD4 (28,5%), CD8 (28,5%), CD34 (28,5%). (Tabela 2)

Shënjesit CD të studiuar (nr.i pacientëve të studiuar)	Pacientët pozitiv për shënjesin e studiuar		për	Pacientët negativ për shënjesin e studiuar	
	N	(%)		N	(%)
CD45 (7)	7	(100%)		0	(0%)
cCD3 (7)	5	(71,5%)		2	(28,5%)
CD3 (7)	2	(28,5%)		5	(71,5%)
CD4 (7)	2	(28,5%)		5	(71,5%)
CD5 (7)	6	(85,7%)		1	(14,3%)
CD7 (7)	7	(100%)		0	(0%)
CD8 (7)	4	(57,1%)		3	(42,9%)
CD34 (7)	2	(28,5%)		5	(71,5%)

Tabela 2. Shënjesit e studiuar në LAL-T tek fëmijët.

Përqindja e pozitivitetit të shënjesve në rastet me LAM rezultoi: CD45 (100%), CD33(77,7%), CD13(77,7%), MPO(77,7%), HLA-DR(55,8 %), CD117(44,4%), CD64 (33,3%), CD34 (22,2%) dhe CD56(22,2%). Në 3 raste me LAM (33,3%) u vu re një shprehje aberrante e shënjesit CD4. (Tabela 3)

Shënjesit CD të studiuar (nr.i pacientëve të studiuar)	Pacientët pozitiv për shënjesin e studiuar		për	Pacientët negativ për shënjesin e studiuar	
	N	(%)		N	(%)
CD45 (11)	11	(100%)		0	(0%)

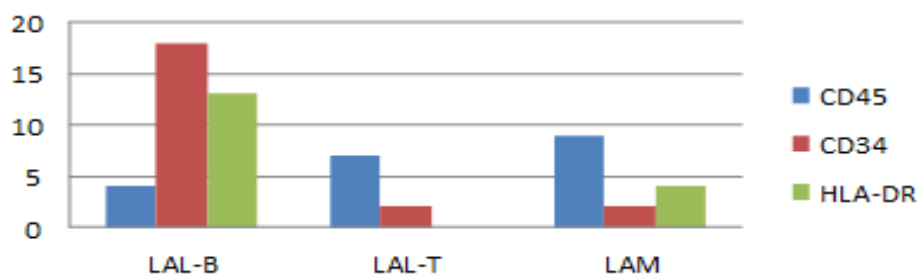
CD34	(11)	4	(36,36%)	7	(63,63%)
CD117	(11)	6	(54,54%)	5	(75,0%)
HLA-DR	(11)	7	(63,63%)	4	(36,36%)
MPO	(11)	9	(81,81%)	2	(18,18%)
CD13	(11)	8	(72,72%)	3	(27,27%)
CD33	(11)	9	(81,81%)	2	(18,18%)
CD14	(11)	2	(18,18%)	9	(81,81%)
CD15	(11)	1	(9,09%)	10	(90,9%)
CD16	(11)	1	(9,09%)	10	(90,9%)
CD56	(11)	2	(18,18%)	9	(81,81%)
CD64	(11)	3	(27,27%)	8	(72,72%)
cCD3	(11)	1	(9,09%)	10	(90,9%)
CD4	(11)	3	(27,27%)	8	(72,72%)

Tabela 3. Shënjesit e studiuar në LAM tek fëmijët.

Në të gjitha rastet diagnoza sipas IMCF ishte përfundimtare me diagnozën e daljes në kartelën klinike. Në një rast u vu re diskordancë mes morfologjisë së popullatës blastike e cila paraqiste karakteristikat e një limfoblasti ndërsa me IMCF rezultoi LAM me shënjesit e linjës mieloide (MPO+, CD33+, CD13+, CD64+).

Studimi i shënjesve jo specifik për linja të vecanta qelizore: CD45, CD34, HLA-DR.

Shprehja e shënjesit CD45 rezultoi sinjifikative mes LAL-B dhe LAL-T ($p=0,0001$) si dhe mes LAL me LAM ($p=0,0001$). Grafiku 3. Shënjesi CD34 rezultoi sinjifikativ mes LAL-B dhe LAL-T ($p=0,037$), si dhe mes LAL dhe LAM ($p=0,03$). Shprehja e HLA-DR nuk rezultoi sinjifikative mes LAL dhe LAM.



Grafiku 3. Paraqitja grafike e shprehjes së shënjesve jospecific për linjën qelizore.

Diskutime

Leukoza akute zë përqindjen më të madhe të kancereve në moshën pediatrike (Howlader, *et al.* 2012). Përcaktimi i linjës qelizore malinje që ka

proliferau është shumë i rëndësishëm në leukozat akute, sepse trajtimi i leukozave akute mieloide dhe limfoide ndryshon nga njëri tjetri, gjithashtu ka ndryshime terapie edhe brenda llojit të LAM sic është rasti i LAM-M3 (Leuçemi akute promielocitare). (Sanz, *et al.* 2009). Në studimin tonë frekuencën më të lartë të LA në moshën pediatrike e zë Leuçemia limfoide akute (LAL), përkatësisht 75,6% të rasteve, e njohur kjo dhe në vendet evropiane dhe ato amerikane (Howlader, *et al.* 2012; Pirard, 2009). Ndër këto 58,5 % rezultuan LAL-B në bazë të shprehjes së shënjesëve imunofenotipikë ekstra dhe intra qelizorë. Në këtë linjë qelizore frekuencë më të lartë patën shënjesit CD19, CD10, cCD79a dhe HLA-DR. 17,1% të rasteve me LA e përbën linja qelizore limfoide me T (LAL-T), ku mbizotëron shprehja e shënjesve cCD3, CD5, CD7.

Leuçemia mieloide akute rezultoi në 21,9% të rasteve, fakt ky i njohur që në moshën pediatrike kjo lloj leukoze ka frekuencë më të ulët, e kundërta në moshën adulte (Howlader, *et al.* 2013). Shënjesit që u hasen më shpesh në këtë linjë qelizore ishin cMPO, CD13, CD33. Në studimin tonë prospektiv në periudhën kohore janar 2011-dhjetor 2012 në 41 raste leukozash akute, të analizuar me flow citometri katërngjyrësh, imunofenotipizimi ishte i rëndësishëm për përcaktimin e linjës në ato raste që ishin të padiferencuara morfologjikisht dhe gjithashtu ndryshoi linjën e përcaktuar nga ekzaminimi morfologjik në një rast. Në këtë rast blastet paraqisnin karakteristika morfologjike të linjës limfoide, por rezultuan me imunofenotip të linjës mieloide. Për këtë arsye është e rëndësishme të realizohet tipizimi i shënjesve të hershëm të linjave qelizore, CD79a, cCD3 dhe MPO, të cilët janë shënjes intracitoplazmike (Dohner, *et al.* 2009).

E rëndësishme është dhe identifikimi i disa shënjesve që janë të lidhur me prognozën, sic është prania e CD10+CD34+ tek LAL e cila flet për prognozë më të mirë, apo prania e shënjesve aberrantë të linjave të tjera qelizore që korelojnë me prognozë jo të mirë (Supriyadi, *et al.* 2012). Gjithashtu futja e një numri të konsiderueshëm të shënjesve qelizorë ndihmon së shumti në përcaktimin e saktë të linjës qelizore të interesuar.

«Gate»-mi me shënjesin CD45 në çdo protokoll të leukozave akute rrit mjaft ndjeshmërinë e kapjes së blasteve për faktin se ato e shprehin këtë shënjes me intensitet më të ulët në sipërfaqen e tyre se qelizat normale, gjë që është përdorur në çdo rast dhe në studimin tonë (Borowitz, *et al.* 1999, Harrington, *et al.* 2012). Grupmosha me frekuencë më të lartë me LA i përkiste grupit 2-5vjeç ashtu sikurse në vendet e tjera (Hjalgrim, *et al.* 2003).

Konkluzione

IMCF rezulton në studimin tonë si mjaft i rëndësishëm dhe determinant në përcaktimin e detajuar të tipit të qelizës si dhe të nivelit të diferencimit të saj në proliferimet malinje të leuçemive akute në moshën pediatrike. Përdorimi në çdo panel i shpërndarjes së qelizave sipas shënjesit CD45 si dhe të “side scatter” (që mat granularitetin e qelizave) rrit mjaft ndjeshmërinë e kapjes së

qelizave malinje duke mundësuar një imunofenotipizim të qelizave anormale edhe në numër shumë të pakët të tyre.

Literatura

Béné M. C., Nebe T., Bettelheim P., Buldini B., Bumbea H., Kern W., Lacombe F., Lemez P., Marinov I., Matutes E., Maynadie M., Oelschlagel U., Orfao A., Schabath R., Solenthaler M., Tschurtschenthaler G., Vladareanu A. M., Zini G., Faure C., Porwit A. (2011): Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European. *Leukemia* 25: 567-574

Morilla R. (1999) : Immunophenotyping by Flow Cytometry : Leukaemia Panels Material and Methods. Vol. 34: 443-446

Craig F. E., Foon K. A. (2008): Flow Cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood* 111: 3941-3967

Bennett J. M., Catovsky D., Daniel M. T., Flandrin G., Galton D. A., Gralnick H. R., Sultan C. (1985): Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 103:620-625

Ormerod M. G. (2000): Flow Cytometry. Practical Approach 1-277

Béné M. C., Castoldi G., Knapp W., Ludwig W.D., Matutes E., Orfao A., Veer M.B. (1995): Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemia (EGIL). *Leukemia* 9:1783-6

Vardiman J. W., Thiele J., Arber D. A., Brunning R.D., Borowitz M. J., Porwit A., Harris N. L., Le Beau M. M., Lindberg H. E., Tefferi A., Clara D., Bloomfield C.D. (2009): The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114:937-51

Campana D. (2009): Role of minimal residual disease monitoring in adult and pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 23:1083-98

Harrison C. J., Hills R. K., Moorman A. V., Grimwade D. J., Hann I., David K. H., Wheatley K., De Graaf S. N., Van den Berg E., Burnett A. K., Gibson B. E.S. (2010): Cytogenetics of childhood acute myeloid leukemia: United Kingdom Medical Research Council Treatment trials AML 10 and 12. *J Clin Oncol.* 28:2674-2681

Hehlmann R., Grimwade D., Simonsson B., Apperley J., Baccarani M., Barbui T. (2011): The European Leukemia Net: achievements and perspectives. *Hematologica* 96:156-62

Béné C. M. (2009): Biphenotypic, bilineal, ambiguous or mixed lineage: strange leukemias! *Haematologica* 94(7):919-27

Qadir M., Barcos M., Stewart C. C., Sait S. N. J., Ford L. A., Baer M. R. (2006): Routine Immunophenotyping in Acute Leukemia: Role in Lineage Assignment and Reassignment. *New York Cytometry Part B Clinical Cytometry* 70B: 329–334

Wood B. L., Arroz M., Barnett D., DiGiuseppe J., Greig B., Kussick S. J. (2007): Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic

analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. *Cytometry B Clin Cytom* ; 72: 14-22

Bennett J. M., Catovsky D., Daniel M. T. (1976). Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br. J. Haematol.* 33:451-8

Köhler G., Milstein C. (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of pre defined specificity. *Nature* 256 495-497

Howlander N., Noone A. M., Krapcho M., Garshell J., Neyman N., Altekruse SF., Kosary CL., Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Lewis DR, .,Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (2013): SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010, National Cancer Institute.Bethesda.

Pirard P. (2009): National Institute of Public Health Surveillance, Paris, France. Standardized incidence rate of leukaemia as defined by ICD-10 codes C90-95 in children aged 0 to 14 years. www.euro.who.int/ENHIS

Hjalgrim L. L., Rostgaard K., Schmiegelow K., Soderha S., Kolmannskog S., Vettenranta K., Kristinsson J., Clausen N., Melbye M., Hjalgrim H., Gustafsson G. (2003): Age and Sex-Specific Incidence of Childhood Leukemia by Immunophenotype in the Nordic Countries. *J Natl Cancer Ins*; 95:1539-44

Harrington A. M., Olteanu H., Steven H., Kroft S. H. (2012). A Dissection of the CD45/Side Scatter "Blast Gate" *Am J Clin Pathol*: 137:800-804

Supriyadi E., Veerman A. J. P., Purwanto I, Peter M. Cloos M. J. (2012): Detection of CD10, CD34 and their combined expression on Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia and the association with clinical outcome in Indonesia. *Journal of Cancer Therapeutics&Research*.1:10-20

Borowitz M. J., Guenther K. L., Shults K. E. (1993): Immunophenotyping of acute leukemia by flow cytometric analysis: use of CD45 and right-angle light scatter to gate on leukemic blasts in three-color analysis. *Am J Clin Pathol*: 100:534-540

Miguel A. S., David G., Martin S.T., Bob L., Pierre F., Elihu H.E., Tomoki N., Eva L., Thomas B ., Hartmut D., Alan K. B. (2009) : Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*: vol 113 : 1875-1891