

دراسة العوامل المؤثرة في التمييز المناعي للخلايا الجذعية الدموية CD34⁺ وحساب العدد المطلق لها بتطبيق بروتوكول ISHAGE

فيحاء أبو فخر*

الملخص

خلفية البحث وهدفه: يستخدم بروتوكول ISHAGE للتمييز المناعي للخلايا الجذعية الدموية CD34⁺ لتقييم عددها وحيويتها. تحول عدة عوامل دون الإجراء الصحيح لهذا التحليل. هدفت الدراسة إلى تحديد العوامل التي تتدخل في تعداد الخلايا CD34⁺ وضبط هذه العوامل للحصول على عدد دقيق لها لما لذلك من دور في نجاح الازدراع. المواد و الطرائق: تم إجراء التمييز المناعي للخلايا الجذعية الدموية بتقانة التدفق الخلوي، بتطبيق بروتوكول ISHAGE ودراسة العوامل التي يمكن أن تؤثر على تعداد الخلايا CD34⁺ وهي نسيلة ضد CD34، وتركيزها ومدة حضنها مع الخلايا، ومدة تخزين العينة، والمحلل الحال للكريات الحمراء، والعوامل التي تتعلق بالجهاز كمعدل تدفق العينة، وعتبة التبعر الأمامي، وتأثير ضبط القطاعات وبوابات التحليل. طبقت الدراسة على عينات من 11 مريض في مشفى الأطفال قيد التحضير للزرع الذاتي باستخدام الخلايا الجذعية المقطوفة من الدم المحيطي بعد التحريض بـ G-CSF. تم سحب عينات من الدم المحيطي في اليوم السابق من عملية قطف الخلايا الجذعية، ومن الدم المحيطي في يوم عملية القطف ومن منتج القطف.

النتائج: كانت نسيلة ضد CD34 8G12 أفضل من النسيلة 581 و MY10 (P=0.06, 0.03، على التوالي). إن تركيز الضد 10% كان الأمثل. إنَّ حل الكريات الحمراء بوجود مثبت انعكس بشكل هام إحصائياً على تعداد الخلايا. لا بد أن يرافق هذه العوامل معدل تدفق للخلايا 3000 خلية / ثا (P=0.04, 0.02) وعتبة تبعر أمامي 100 مع صحة ضبط بوابات تحليل البيانات وإعدادات الجهاز حيث تؤدي دوراً كبيراً في الحصول على تعداد صحيح للخلايا CD34⁺. احتوى منتج القطف على 7 أضعاف من الخلايا CD34⁺ مقارنة مع الدم المحيطي بعد التحريض (175 ± 29.98 مقابل 1250±300 خلية / مكرو لتر).

الاستنتاجات: إنَّ العوامل المؤثرة في تعداد الخلايا الجذعية متعددة. لا بد من التركيز على هذه العوامل لتحسين استثمار بروتوكول ISHAGE للحصول على العدد الدقيق للخلايا الجذعية لما لذلك من أهمية في نجاح عملية الازدراع. الكلمات المفتاحية: التمييز المناعي، عد الخلايا CD34⁺، بروتوكول ISHAGE.

* مدرس - دكتوراه في المناعة - جامعة دمشق.

Study of the factors affecting the immunophenotyping of CD34⁺ hematopoietic stem cells and their absolute count by applying ISHAGE protocol

Faihaa Abu Fakher*

Abstract

Background and objective: ISHAGE protocol is used for immunophenotyping CD34⁺ hematopoietic stem cells to assess their number and viability. Several factors prevent its correct application. This study aimed to determine these factors and control them to obtain an accurate count of CD34⁺ cells which is the key of success of transplantation.

Materials and Methods: Immunophenotyping of hematopoietic stem cells was performed using flow cytometry technique by applying ISHAGE protocol with variables that effect the count of CD34⁺ cells. Factors were antibody anti-CD34 clone, its concentration, duration of incubation, duration of sample storage, Lysing solution and factors related to the device such as the flow rate, Forward Scatter threshold, adjusting sectors and analysis gates. The study was applied on samples from 11 patients of the Children's Hospital prepared for autotransplantation using stem cells harvested from peripheral blood after G-CSF mobilisation. Samples were drawn from blood the day before harvesting, the day of harvesting and from the apheresis product.

Results: The anti-CD34 8G12 clone was better than 581 and MY10 clone (P = 0.06, 0.03, respectively). The concentration of 10% of anti- CD34 antibody was optimal. The erythrocytes lysing solution with fixative had a significant effect on the cells count. These factors must be accompanied by a flow rate of 3000 cells/sec (P= 0.02, 0.04), a threshold of 100 with correctly set data analysis gates and device settings which play a major role in obtaining a correct CD34⁺ cells count. The apheresis product contained 7 times more cells than the peripheral blood after stimulation (175 ± 29.98 versus 1250±300 cell /µl).

Conclusions: Factors influencing stem cells count are multiples. It is necessary to focus on these factors to improve the investment of ISHAGE protocol in obtaining the exact number of stem cells because of its importance in the success of the transplantation.

Key words: immunophenotyping, enumeration CD34⁺ cells, ISHAGE protocol.

* Assistant Professor - PhD in Immunology - Damascus University.

1. المقدمة والدراسة المرجعية:

تلجأ المخابر الطبية في المشافي ومراكز الازدراع على مستوى العالم إلى عد الخلايا $CD34^+$ لتقييم نوعية الغرائس وتحديد موعد حصاد الخلايا $CD34^+$ عند تطبيق معالجات تحريضية لزيادة أعدادها في الدوران المحيطي باستعمال الأدوية أو السايوتوكينات (1، 2). تشكل غرائس الخلايا الجذعية الدموية إحدى المعالجات الداعمة لمرضى الأورام المشخصين حديثاً والمعالجين بجرعات عالية من الإشعاع أو العلاج الكيميائي. تؤخذ هذه الخلايا من الدم المحيطي ونقي العظام وودم الحبل السري، أو نواتج فصل الدم (منتج القطف: apheresis products)، سواء كانت هذه الغرائس ذاتية Autotransplant من المريض نفسه، أو من متبرع مطابق نسيجياً Allotransplants (3-7). قبل ازدراع هذه الغرائس لابد من تقييم ملاءمتها لذلك، من حيث احتوائها على أعداد كافية من الخلايا الجذعية الدموية، وهو المعيار الأساس لجودة هذه الغرائس، وفعاليتها لضمان نجاح الازدراع الذي يتطلب تأمين 2×10^6 خلية جذعية على الأقل لكل 1 كغ من وزن المريض (1).

يتم هذا التقييم عبر استخدام تقانة الجريان الخلوي (Flow cytometry) حيث يتم رسم هذه الخلايا مناعياً بأضداد موجهة للواسم السطحي لهذه الخلايا $CD34$ (8-11). لا يزال حتى الآن بروتوكول (ISHAGE The International Society of Hematotherapy and Graft Engineering protocol (12)، والمعتمد للتمهيط المناعي للخلايا $CD34^+$ وتحديد عددها خاضع للمراجعة والتقييم، حيث أدخلت على البروتوكول بعض التعديلات في سنوات لاحقة (13،14). دخل هذا البروتوكول في برامج لضبط الجودة في العديد من الدول مثل برنامج NEQAS في بريطانيا (15)، وبرنامج CD34 Task Force الذي تشرف عليه مجموعة العمل الأوروبية للتحاليل الخلوية الطبية EWGCCA في دول

الاتحاد الأوربي (16)، وبرنامج الاعتمادية الذي وضعته جمعية اختصاصيي علم الأمراض الأمريكية (CAP Accrediting Program)، (CAP, 2014) (17). تعود أسباب اعتماد هذه البروتوكول عالمياً إلى أنه بسيط ودقيق وسريع وعالي الحساسية وقابل للتطبيق باستعمال أي نوع من أجهزة قياس الخلايا بطريقة التدفق الخلوي المزودة ببرامج حاسوبية مخصصة لجمع وتحليل القياسات الناتجة من الجريان الخلوي. إلا أن التطبيق الصحيح لهذا البروتوكول على بساطته تحكمه عوامل عدة تتدخل في تعداد الخلايا الجذعية الدموية. أظهرت دراسة حديثة بأن 43% من المخابر الطبية المشاركة في أحد برامج ضبط الجودة لم تكن تطبق بروتوكول ISHAGE بالشكل الصحيح (18). في هذه الدراسة قيمنا أهم العوامل التي تؤثر في عدد الخلايا $CD34^+$ وتحد من التطبيق الصحيح لهذا البروتوكول.

2. مواد البحث وطرائقه:

1.1.2. المواد والتجهيزات:

تمت الدراسة ما بين عامي 2014 و 2017 حيث تم تمهيط الخلايا الجذعية الدموية مناعياً باستخدام أضداد وحيدة النسيلة فأرية هي ضد $CD34$ ، النسيلة (Clone) 8G12 (HPACA-2)، المصنفة في ورشة العمل الخامسة حول تمهيط خلايا الدم البيضاء، مقروناً مع الفيكوإريثرين (Phycoerythrin) الذي يرمز ب-PE، (Catalog No.345802)، والنسيلة 581، المصنفة في ورشة العمل الخامسة حول تمهيط خلايا الدم البيضاء، مقروناً مع PE، (Catalog No. 555822)، والنسيلة MY10، (Catalog No. 245689) مقروناً مع PE. ضد $CD45$ ، من النسيلة HLI1 المصنفة في ورشة العمل الرابعة حول تمهيط خلايا الدم البيضاء، مقروناً مع الفلوريسين إيزوثيوسيانات (Fluorescein isothiocyanate) يرمز له ب-FITC

2.2. العينات:

من أجل دراسة كل عامل مؤثر في عد الخلايا CD34⁺ بطريقة ISHAGE تم جمع العينات من الدم المحيطي، ومن منتج القطف. تم الحصول على العينات من المرضى الأطفال المحضرين لازدراع الخلايا، وعددهم 11 طفلاً، في مشفى الأطفال، بعد الحصول على موافقة الأهالي. تم قطف الخلايا بعد التحريض بالـ (Granulocyte) G-CSF colony-stimulating factor لمدة 5 أيام. تم أخذ العينات الدموية قبل قطف الخلايا بيوم واحد أي في اليوم الرابع بعد التحريض، وبنفس يوم القطف قبل إجراء عملية القطف، ومن منتج القطف. تم الإبقاء على هذه العينات عند درجة حرارة الغرفة (18°C-25°C)، لتحلل بعد 4، 24، 48 ساعة من جمعها حسب مخطط هذه الدراسة.

3.2. طريقة تلوين وتحليل العينة.

تم إجراء الوسم المناعي لكل عينة لدراسة تأثير كل من نسائل مختلفة للضد CD34 وهي 8G12، 581، MY10، تركيزها و مدة الحضانة مع الخلايا. كما قمنا بدراسة تأثير مدة تخزين العينة في عد الخلايا CD34⁺ لمدة 4، 24، 48 ساعة كما درس تأثير المحلول الحال للكريات الحمراء مع مثبت أو بدونه. فيما يخص الجهاز، تمت دراسة عوامل تتعلق بالجهاز كشرط تمرير العينة من ناحية السرعة، وعتبة التبعر الإمامي، إضافة إلى عدد الخزرات المسجل، عدد الخلايا المسجلة، إضافة إلى تأثير ضبط القطاعات وبوابات التحليل. تمت دراسة كل عينة، ولكل عامل مدروس، بتعليم أنبوبين معقمين سعة 5 مل باسم العينة، (لكل عينة مكررين)، ويوضعان في حامل أنابيب مناسب، ثم ينقل إلى كل أنبوب 100 ميكروليتر من العينة. يضاف إلى كل أنبوب العيار المناسب من خليط الأضداد المتفلورة Anti-human pan CD34-PE، و Anti-human pan CD45-FITC، والحضن في مكان مظلم عند درجة حرارة الغرفة لمدة 20 أو 30 دقيقة، ثم يضاف إلى كل أنبوب

(Catalog No.555482). استعمل المحلول الحال لكريات الدم الحمراء الحاوي على مادة مثبتة FACS lysing solution، (Catalog No. 349202)، كما تم تحضير المحلول الحال لكريات الدم الحمراء غير المشتمل على مادة مثبتة باستخدام الأملاح وهي: كلوريد الأمونيوم (Sigma catalog No. A-5666)، بيكربونات البوتاسيوم (Sigma catalog No. P-4913)، والـ Na₄EDTA (Sigma catalog No. ED4SS)، من شركة Sigma. تم شراء معلق خزرات العد المتفلورة (Flow count) Coulter Beckman Coulter من شركة (catalog No. 7547053) (الولايات المتحدة الأمريكية). استخدمت أنابيب التحليل المعقمة سعة 5 مل (Falcon, 352054) و أنابيب جمع عينات الدم بالتخلية Vacutainer tubes تحوي على مانع تجلط EDTA (Catalog No. 356457). استخدمت صبغة أزرق التريبان (Sigma, C979Q87) لتقييم حيوية الخلايا وتمت قراءة التلوين بمجهر ضوئي Olympus. اعتمدنا في هذه الدراسة طريقة العد التي تعتمد على استعمال جهاز واحد (platform-ISHAGE single) (14) وهو جهاز قياس الخلايا بطريقة التدفق من الطراز FACSCalibur والموجود في هيئة الطاقة الذرية. الجهاز المستعمل في التحليل والمزود ببرنامج FACSComp لضبط إعدادات الجهاز وبرنامج CellQuest-Pro لجمع وتحليل القياسات الفلوسايتومترية، من شركة BD-Biosciences (الولايات المتحدة الأمريكية). تم ضبط العمل على الجهاز باستخدام طاقم ضبط معاوضة التفلور (Catalog No. 349502)، وسائل غمد التدفق (Sheath) (Catalog No.342003) (fluid)، وسائل تنظيف منظومة التدفق (FACSClean) (Catalog No. 340345) من شركة BD Biosciences (الولايات المتحدة الأمريكية).

والمحبيات وذلك في التمثيل البياني النقطي لتفلور Anti-CD34-PE بمقابل بعثرة الضوء في الاتجاه الجانبي SSC. (6) من البوابة G2 يتم اختيار الخلايا CD34⁺ التي تُعبر بشكل منخفض إلى متوسط عن CD45⁺، وتُضمّن في قطاع التحليل R3 أو البوابة R3=G3، وذلك في تمثيل بياني نقطي جديد لتفلور Anti-CD45-FITC بمقابل بعثرة الضوء في الاتجاه الجانبي SSC.

(7) في تمثيل بياني نقطي جديد لبعثرة الضوء في الاتجاه الأمامي FSC عن خرزات العد بمقابل الزمن يتم إنشاء قطاع تحليل R7 أو البوابة G7=R7&G6 لتضم خرزات العد المقاسة بتابعية زمن التحليل.

في التمثيل البياني النقطي الثاني (2) لتفلور Anti-CD45-FITC بمقابل بعثرة الضوء في الاتجاه الجانبي SSC. يتم إنشاء قطاع تحليل R5 أو البوابة G5=R5 لتضم للمفاويات. يطلب إلى برنامج التحليل حساب أعداد الخلايا أو الحاديات المسجلة في كل قطاع تحليل وبوابة تحليل تم إنشاؤها لتستعمل في حساب النسبة المئوية والعدد المطلق للخلايا CD34⁺ وذلك بتطبيق المعادلات التالية:

$$\text{عدد الخلايا } CD34^+ = \mu I / CD34^+$$

$$\frac{\text{عدد الخلايا } CD34^+ \text{ المقاسة } \times \text{عدد الخرزات المضافة}}{\text{عدد الخرزات المقاسة}}$$

$$= \text{النسبة المئوية للخلايا } CD34^+$$

$$100 \times \frac{\text{عدد الخلايا } CD34^+ \text{ المقاسة}}{\text{عدد الخلايا } CD45^+ \text{ المقاسة}}$$

ويوضح الشكل (2) تحليل عينة دم كمثال .

5.2. المعالجة الإحصائية لنتائج حساب العدد المطلق للخلايا CD34⁺:

تم تحليل التباين في نتائج حساب العدد المطلق للخلايا CD34⁺ تحت تأثير عوامل مختلفة وذلك بتطبيق اختبار

م2م من المحلول الحال لكريات الدم الحمراء والحضن في مكان مظلم عند درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة. يضاف إلى كل أنبوب 100 ميكرونتر من معلق خرزات العد، ثم تحلل العينة مباشرة بجهاز قياس تدفق الخلايا المعد مسبقاً لتحليل التفلور المناعي ثنائي اللون وفق تعليمات الشركة الصانعة، وتسجل لكل أنبوب قياسات العدد المناسب من الخلايا أو الخرزات بما يحقق شرط أو معيار جمع البيانات المختار.

4.2. تحليل البيانات وحساب العدد المطلق للخلايا

CD34⁺. يتم تحليل القياسات على جهاز الفلوسيتوميتر بإنشاء قطاعات وبوابات تحليل وفقاً لما ورد في بروتوكول ISHAGE⁽¹⁴⁾ وذلك كما في الشكل (1). وهي كما يلي:

(1) تمثيل نقطي للخلايا المتدفقة بدون تفلور عبر جهاز الفلوسيتوميتر تبعثر امامي (FSC (Forword Satter) بمقابل التبعثر الجانبي (SSC (Side Scatter).

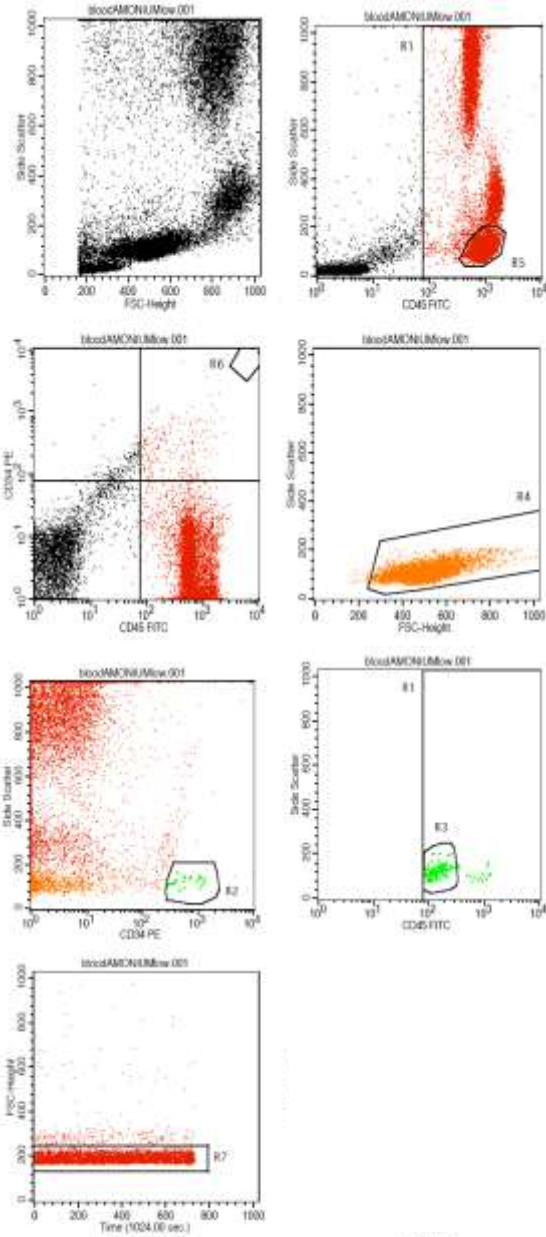
(2) يتم إنشاء قطاع تحليل R1 أو البوابة G1=R1 لتضم كل الخلايا CD45⁺ وتستبعد كل الخلايا الأخرى والأشلاء الخلوية التي تكون سلبية CD45 (CD45⁻)، وذلك في التمثيل البياني النقطي لتفلور Anti-CD45-FITC بمقابل بعثرة الضوء في الاتجاه الجانبي SSC.

(3) في تمثيل بياني نقطي جديد لتفلور Anti-CD45-FITC بمقابل تفلور Anti-CD34-PE، يتم إنشاء قطاع تحليل R6 أو البوابة G6=R6 لتضم خرزات العد المقاسة.

(4) في تمثيل بياني نقطي جديد لتبعثر الضوء في الاتجاه الأمامي (FSC) بمقابل بعثرة الضوء في الاتجاه الجانبي SSC يتم إنشاء قطاع تحليل R4 أو البوابة G3 & G4=R4 لتضم الخلايا CD34⁺ الحقيقية.

(5) من البوابة G1 يتم اختيار الخلايا CD34⁺ ويتم إنشاء قطاع تحليل R2 أو البوابة G1 & G2=R2 لتضم كل الخلايا CD34⁺ CD45⁺ وتستبعد للمفاويات والوحدات

تحليل التباين One Group Variance test على فرق التعداد، باستعمال برنامج StatView Version 4.57 (Abacus Concepts Inc.) . اعتبرت قيمة P أقل من 0.05 ذات دلالة إحصائية.



Gate Statistics

File: bloodAMONIUMlow 001 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: Patient ID:
 Tube: tube #1 Panel: drteha
 Acquisition Date: 30-Apr-14 Gate: No Gate
 Gated Events: 118660 Total Events: 118660
 X Parameter: CD45 FITC (Log) Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Gate	Events	% Gated	% Total
G1	98409	82.93	82.93
G2	122	0.10	0.10
G3	107	0.09	0.09
G4	102	0.09	0.09
G5	41451	34.93	34.93
G6	6068	5.11	5.11
G7	5901	4.89	4.89

الشكل (1): كيفية تحليل القياسات الفلوسايتومترية بإنشاء قطاعات وبوابات التحليل وفقاً لما ورد في بروتوكول ISHAGE. CD34 .ISHAGE موسوم بالفيكواريثرين (CD34 PE). CD45 موسوم بالفلوريسين ايزوثيوسيانات (CD45 FITC). FSC : Forward Scatter . Side Scatter:SSC

الشكل (2): مثال يوضح نتائج عد الخلايا CD34⁺ في عينة دم كما يبين مواضع وحدود وبوابات أو قطاعات تحليل البيانات في التمثيلات البيانية النقطية المختلفة كما شُرح في الطرائق.

3. النتائج والمناقشة

لذلك من الواضح أن اختيار نسيلة ضد الـ CD34 هو عامل مهم في التحليل وأن تكون النسيلة المنتجة للضد مصنفة وفق نظام صفوف التمايز في ورشات العمل الخاصة بالتميط المناعي للكريات البيضاء، و موجهة ضد النموذج الثالث من الحواتم، وبالتالي يتفاعل الضد مع أغلب المحددات المستضدية وبذلك تكون إشارة الفلورة الناجمة عن الوسم قوية.

2.3. دراسة تأثير تركيز الضد ومدة الحضان. تم دراسة ثلاثة تراكيز، وهي 5، 10، 15% لنسيلتي ضد الـ CD34 8G12 و 581. تبين وجود اختلاف في نتائج حساب العدد المطلق للخلايا CD34⁺ باختلاف عيار ضد الـ CD34 المستعمل كما هو موضح في الجدول (2). بالنسبة للنسيلة 8G12 كان التركيز الأفضل هو 10%، حيث كان العدد المطلق للخلايا CD34⁺ باستعمال هذه النسبة أفضل من تركيز 5% (P = 0.04) بينما لم يكن هناك فرق عند استعمال التراكيز العالية (15%) (P= 0.25). بالنسبة للنسيلة 581 بقيت جودتها أقل من سابقتها، كما أنها تحتاج الى تركيز أكبر من الضد (15%) لتلوين أكبر عدد من الخلايا.

الجدول (2): تأثير تركيز الضد في متوسط عدد الخلايا CD34⁺.

نسيلة ضد الـ CD34	تركيز الضد (%)	CD34 ⁺ دم محيطي	CD34 ⁺ منتج القطف
8G12	5	160±45	1050±149
	10	185±36	1255±133
	15	183±27	1256±116
581	5	155±45	997±125
	10	166±36	1204±143
	15	173±27	1230±101

هذا يؤكد على ضرورة استعمال تراكيز مناسبة من هذه الأعداد لتكون نتيجة التحليل صحيحة، لأن استعمال تركيز منخفض من الضد بهدف توفير المواد يؤدي إلى تلوين منخفض للخلايا CD34⁺ وبالتالي ستقع قياساتها

اختلفت العوامل التي قد تؤثر في نتيجة حساب العدد المطلق للخلايا CD34⁺ بتطبيق بروتوكول ISHAGE و قد تمت دراسة هذه العوامل على عينات الدم المحيطي في يوم القطف وعلى منتج القطف وذلك لاحتوائها على عدد مهم من الخلايا الجذعية الدموية مقارنة مع عينات الدم العادية، وكونها العينات الأساسية التي نحن بحاجة إليها لتقييم عدد الخلايا CD34⁺ الموجودة ضمنها.

1.3. دراسة تأثير نساءل الضد الـ CD34. إن فرق حساسية الجزيء CD34 تجاه أنظيم النورامينيداز و / أو البروتياز الانتقائي للميوسين أدى إلى تصنيف المحددات المستضدية (epitopes) أو ما نسميها بالحواتم للجزيء CD34 إلى ثلاثة نماذج: النموذج I من الحواتم حساس كلياً أو جزئياً لكلا الأنظيمين، بينما النموذج II حساس فقط للبروتياز أما النموذج الثالث III غير حساس لكلا الأنظيمين. تم اختبار ثلاث نساءل للضد CD34 و هي 8G12 موجه للحواتم نموذج III، 581 يرتبط بالنموذج II. MY10 يتعرف على النموذج I. أظهرت هذه الدراسة أن تعرف كل من هذه الأعداد على محددات مستضدية مختلفة من CD34، أدى إلى تباين في العدد المطلق للخلايا الجذعية بين النسيلتين 8G12 و 581 بنسبة حوالي 5% (الجدول 1) (P= 0.06) بينما تباين حساب العدد المطلق للخلايا الجذعية بأقل بحوالي 20% باستعمال النسيلة MY10 (الجدول 1) و بفارق إحصائي هام (P= 0.03).

الجدول (1) تأثير نوع نسيلة ضد الـ CD34 المستخدمة في متوسط عدد الخلايا CD34⁺.

نسيلة ضد الـ CD34	CD34 ⁺ دم محيطي	CD34 ⁺ منتج القطف
8G12	180 ± 20	1115 ± 54
581	171 ± 35	1055 ± 32
MY10	145 ± 24	890 ± 52

نسبة الخلايا الآخذة للصبغ بعد 24 ساعة 2% وارتفعت إلى 5% بعد 48 ساعة. تدل هذه الدراسة على ضرورة الإسراع في تحليل العينة بعد جمعها، وحفظها بدرجة حرارة مناسبة.

4.3. تأثير المحلول الحال للكريات الحمراء. بينت النتائج أن اختلاف نوع المحلول الحال قد أثر في نتائج حساب العدد المطلق للخلايا $CD34^+$. عند استعمال المحلول الحال المشتمل على مادة مثبتة، والجاهز تجارياً، أدى إلى الحصول على عدد أعلى من العدد الذي يتم الحصول عليه باستعمال المحلول الحال غير المشتمل على مادة مثبتة كما هو مبين في الجدول (4). إن اختلاف نوع المحلول الحال قد أثر في نتائج حساب العدد المطلق للخلايا $CD34^+$ لأن المادة المثبتة الموجودة في المحلول الحال التجاري وهي البارافورم الدهيد يثبت معقد الضد - مستضد على سطوح الخلايا من خلال تشكيل روابط تصالبية بينما لا يتحقق ذلك في المحلول الحال غير المشتمل على مادة مثبتة وهذا ما يفسر ارتفاع متوسط تعداد الخلايا $CD34^+$ عند استعمال المحلول الحال التجاري بفارق إحصائي هام (الجدول 4) لذلك فإن استعمال المحلول الحال المشتمل على مادة مثبتة، يعطي نتائج تحليل أكثر صحة.

الجدول (4) : تأثير نوع المحلول الحال في متوسط عدد الخلايا $CD34^+$.

P	بدون مثبت (تركيب يدوي)	مع مثبت (كلوريد الامونيوم التجاري)	نوع المحلول الحال
0.01	120 ±62.15	154 ±32.54	$CD34^+$ دم محيطي
0.002	843 ±245	1240 ± 300	$CD34^+$ منتج القطف

خارج بوابة التحليل واستعمال تراكيز عالية قد يكون غير مجدي وهدر للمواد لذلك يجب أن يحدد تركيز الضد منذ البداية. تم اعتماد التركيز 10 % والنسيئة 8G12 في الاختبارات التالية. فيما يتعلق بمدة الحضان، أظهرت الدراسة أن اختلاف زمن الحضان للأضداد مع الخلايا لمدة 20 أو 30 دقيقة لم يؤثر في نتائج التحليل، لذلك اعتمدنا الوقت الأقصر وهو 20 دقيقة.

3.3. دراسة تأثير المدة الفاصلة بين الحصول على العينة وإجراء التحليل. بينت الدراسة أن تعداد الخلايا $CD34^+$ يختلف باختلاف مدة التخزين بدرجة حرارة المخبر ($18-25^{\circ}C$)، إذ أدى تخزين العينة إلى رفع تعداد الخلايا $CD34^+$ (الجدول 3).

الجدول (3): تأثير مدة التخزين في متوسط عدد الخلايا $CD34^+$.

مدة التخزين	4 سا	24 سا	48 سا	P
$CD34^+$ دم محيطي	147 ±29.98	152 ±25.30	177 ±17.87	0.25
$CD34^+$ منتج القطف	1045 ±300	1100 ±245	1204 ±78	0.31

على الرغم من عدم وجود فارق إحصائي في تعداد الخلايا بين الأوقات المدروسة في الدم المحيطي أو في منتج القطف إلا أنه من الواضح تأثر التعداد مع مرور الوقت حيث يميل التعداد إلى الارتفاع، وهذا قد يعود إلى انخفاض عيوشية الخلايا، وبالتالي تقوم الخلايا الميتة بربط الأضداد بشكل غير نوعي مما يؤدي إلى رفع تعداد الخلايا $CD34^+$ بشكل كاذب. تشير الدراسات العالمية إلى أن درجة الحرارة $4^{\circ}C$ هي الأفضل لحفظ الخلايا المقطوفة من الدم المحيطي بينما بالنسبة لنقي العظم فيمكن تخزينه بين $4^{\circ}C$ و $20^{\circ}C$ (19). إن ضبط شرط الحفاظ على العينة بدرجة حرارة الغرفة ($18-25^{\circ}C$) لم يكن ممكناً دائماً لأن العينات تترك في المخبر، ولا شيء يؤكد أو ينفي حدوث انقطاع في التيار الكهربائي ليلاً. تم تحري عيوشية الخلايا بتلوينها بأزرق التريبيان وفحصها تحت المجهر الضوئي حيث كانت

اختلاف نتيجة حساب العدد المطلق للخلايا CD34⁺ باختلاف معدل التدفق، الجدول (5)، ورفع عتبة القياسات على أساس إشارة بعثرة الضوء بزواوية أمامية FSC، وهما عاملان متعلقان بجهاز التحليل، قد يعود إلى أن معدل التدفق المرتفع يُخَلِّب قياسات خرزات العد التي تدخل في معادلة الحساب للعدد فتكون أعداد الخلايا المقاسة أكبر بكثير من أعداد خرزات العد المقاسة مما يؤدي إلى رفع تعداد الخلايا CD34 بشكل كاذب. الشكل (2.3) يظهر نتائج تمرير عينة من منتج قطف يظهر عدد الخرزات المقاسة 12 رغم تسجيل ما يقارب 100.000 خلية في G1 و أدى إلى الحصول على مخطط بعثرة ضوء غير نموذجية للخرزات في العينات المحللة كما يبدو في الشكل (3.3)، بينما أدى رفع عتبة القياسات أكثر من 100 للتخلص من إشارات الأشلاء الخلوية إلى اختفاء إشارات خرزات العد المضافة كما يظهر في الشكل (4.3) و لذلك كان من الصعب عد الخلايا. لذلك لابد من الإبقاء على معدل تدفق منخفض وعلى عتبة قياسات منخفضة بما يسمح بقياس أعداد كافية من خرزات العد وللمحافظة على مخطط بعثرة ضوء نموذجية للعينات المحللة. كما وتؤكد هذه الدراسة على ضرورة مراقبة استقرار تدفق العينة .

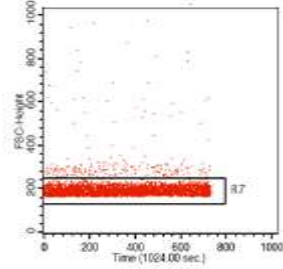
5.3 . التأثيرات الخاصة بشروط تمرير العينة على جهاز FACScalibur

إن معدل التدفق المعتاد للتمهيط المناعي عبر جهاز الفلوسيتوميتر هو 3000 خلية / ثا. نحتاج في تمهيط الخلايا الجذعية الدموية إلى تسجيل عدد كبير من الخلايا يتراوح بين 75.000 إلى 100.000 خلية لزيادة حساسية الاختبار لأن تواتر الخلايا الجذعية الدموية يعتبر نادراً ضمن العينات، وبالتالي يتم استخدام معدل تدفق خلوي عالي لاختصار الوقت. تمت دراسة تأثير دراسة معدل تدفق ضعف المعتاد (6000 خلية / ثا) واستخدام عتبة القياسات على أساس إشارة بعثرة الضوء بزواوية أمامية بحيث تكون 100, 150, 200.

الجدول (5): تأثير معدل التدفق للعينة في متوسط عدد الخلايا الجذعية الدموية CD34⁺.

معدل تدفق الخلايا	6000 خلية / ثا	3000 خلية / ثا	P
CD34 ⁺ دم محيطي	350±76	166±27	0.02
CD34 ⁺ منتج القطف	3500±535	1256±39	0.04

أظهرت الدراسة أن هذه المتغيرات تؤدي إلى تباين كبير جداً في نتائج حساب العدد المطلق للخلايا CD34. إن



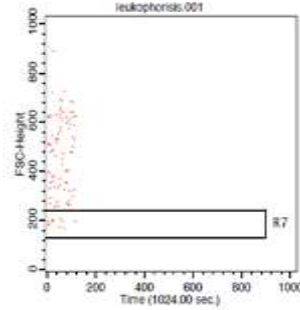
1

Gate Statistics

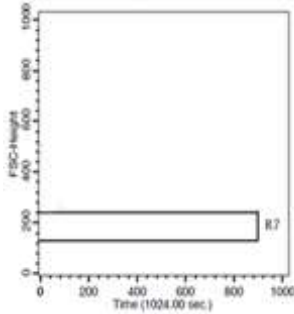
File: leukophoria.001 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: Patient ID:
 Tube: tube #1 Panel: others
 Acquisition Date: 30-Apr-14 Gate: No Gate
 Gated Events: 102963 Total Events: 122865
 X Parameter: CD45 FITC (Log) Y Parameter: Side Scatter (Linear)

Gate	Events	% Gated	% Total
G1	99907	97.11	81.31
G2	77110	74.89	74.89
G3	76870	74.76	74.76
G4	85697	83.81	69.81
G5	4580	4.45	4.45
G6	101	0.10	0.10
G7	12	0.01	0.01

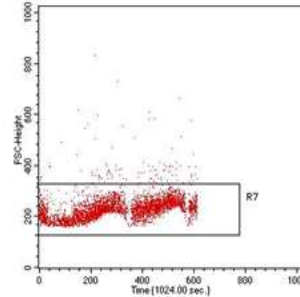
2



3



4



5

الشكل (3). مثال عن تمرير العينات على جهاز FACSCalibur يوضح تأثير العوامل المتعلقة بأداء الجهاز على قياسات خرزات العد 1. الشكل النموذجي لقياسات الخرزات. 2. معدل التدفق المرتفع أدى إلى خفض عدد خرزات العد المقاسة: 3. بعثرة ضوء غير نموذجية للخرزات بسبب معدل التدفق العالي. 4. رفع عتبة القياسات أدى إلى فقدان إشارات خرزات العد. 5. عدم استقرار تدفق العينة بسبب وجود فقاعات هوائية.

قطاعات التحليل المتعلقة بصفات تبعثر وتفلور الخلايا CD34⁺ وهي أن هذه الخلايا تعبر عن المستضد CD34 بقوة، وتعتبر بشكل منخفض إلى متوسط عن المستضد CD45 وهي الصفة الأهم، ولها صفات بعثرة ضوء جانبي منخفضة، وصفات بعثرة ضوء بزواوية أمامية منخفضة إلى متوسطة. لذلك يجب تقليص مساحات القطاعات R1 و R2، و R4 بما يفي بصفات تفلور وبعثرة الخلايا CD34⁺ للضوء، الشكل (2). تقترح هذه الدراسة أن الضبط الصحيح لحدود قطاعات تحليل البيانات يجب أن يؤدي إلى الحصول على تجمع نقطي منفصل تماماً للخلايا في التمثيل البياني لتفلور CD45 بمقابل تبعثر الضوء الجانبي الحاوي على قطاع التحليل R3، الشكل (2).

4. نتائج العد للخلايا CD34⁺ بعد ضبط العوامل المدروسة. يختلف تعداد الخلايا CD34⁺ باختلاف نوع العينة، فقد احتوت عينات منتج القطف على التعداد الأعلى وهذا يحقق الهدف من قطف الخلايا من الدم المحيطي بعد التحريض للحصول على العدد الأكبر من هذه الخلايا. بلغ متوسط عدد الخلايا CD34⁺ / μ l في الدم المحيطي قبل يوم القطف وبعد أربعة أيام من التحريض بـ G-CSF 18.03 ± 3.52 بينما في صباح يوم القطف بلغ العدد في الدوران المحيطي 175 ± 29.98 (أي ما يعادل حوالي تسعة أضعاف العدد مقارنة مع اليوم السابق للقطف، وهذا يدل على ضرورة الالتزام بالتحريض خمسة أيام حيث أن أعلى زيادة في العدد يكون في اليوم الخامس بينما بعد ذلك تأخذ الخلايا بالتناقص. يعكس هذا العدد أيضاً نجاح عملية التحريض بـ G-CSF التي قد تفشل لدى بعض المرضى. بلغ متوسط عدد الخلايا في كيس القطف CD34⁺ 1250 ± 300 μ l أي أن تركيز الخلايا قد زاد حوالي سبعة أضعاف عما هو موجود في الدم المحيطي بعد انتهاء التحريض، وهو عدد ممتاز للحصول على

أثناء تحليلها، والذي قد يستغرق 15 دقيقة، وذلك خوفاً من تشكل أية فقاعات هوائية. من الأفضل إجراء تنظيف لمنظومة تدفق العينة وتنفيذ عملية تفرغ لمنظومة التدفق من الفقاعات الهوائية بعد تحليل كل عينة والتي تليها، وذلك للتخلص من آثار العينة السابقة ومن أية فقاعات هوائية دقيقة عالقة داخل منظومة التدفق، الشكل (3). (5). تقترح هذه الدراسة الإبقاء على عتبة القياسات عند القيمة 100، والإبقاء على معدل منخفض التدفق العينة (3000 خلية / ثانية) ومراقبة استقرار التدفق في التمثيل البياني لتبعثر الضوء الأمامي عن خرزات العد بتابعية الزمن وإعادة تحليل العينة في حالة اضطراب التدفق، الشكل (5.3).

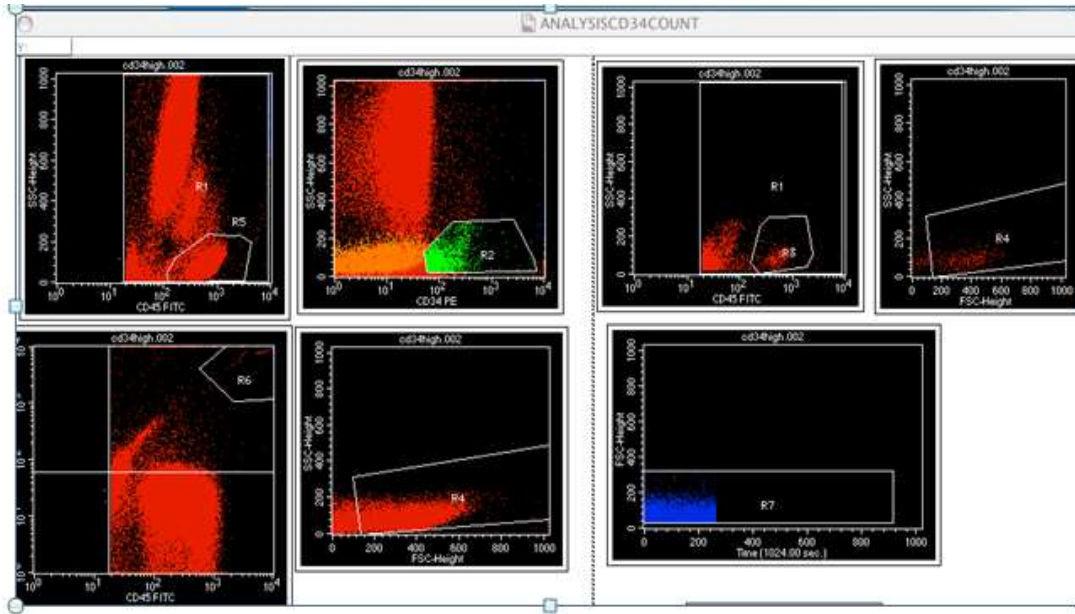
فيما يتعلق باختلاف معيار جمع البيانات وتأثيره في العدد المطلق للخلايا CD34⁺، سواء كان شرط جمع البيانات هو جمع قياسات 100 خلية CD34⁺، أو جمع قياسات 1000 خرزة، أو تسجيل قياسات بين 75.000 و 100.000 خلية CD45⁺ لم تكن الاختلافات معنوية، حيث لا يزيد التباين عن 2%، لذلك يمكن اختيار أحدها كمعيار لجمع البيانات.

3.6. تأثير ضبط القطاعات وبوابات التحليل:

بينت هذه الدراسة اختلاف نتائج عد الخلايا CD34⁺ باختلاف ضبط حدود قطاعات وبوابات التحليل، وهذا العامل هو الذي يعطي أكبر تباين في نتائج حساب العدد المطلق للخلايا CD34⁺. فعند توسيع قطاعات التحليل R1 (من 10^2 الى 10^1) و R2 (من 10^3 الى 10^2)، الشكل (4)، لتضم قياسات خلايا خافتة التفلور زاد عدد الخلايا CD34⁺ بمقدار الضعف تقريباً، كذلك فإن توسيع حدود قطاع التحليل R4، لتضم الحادئات events الواقعة أسفل المقياس زاد من عدد الخلايا CD34⁺. إن الاختلاف في جمع البيانات سببه عدم الالتزام بشروط وضع حدود

تحريض (175 خلية مقابل أقل من خمس خلايا / مكرو لتر). تفسر هذه النتائج اللجوء حديثاً إلى هذا النوع من الخلايا بشكل كبير عوضاً عن الزروع من نقي العظم والذي يحتاج إلى تخدير وتداخل في غرفة العمليات أو من دم الحبل السري الذي تشكل الخلايا $CD34^+$ عادة أقل من 0.1 %.

الكمية المطلوبة من الخلايا الجذعية الدموية لإجراء الازدراع. كانت نسبة الخلايا $CD34^+$ في الدم المحيطي قبل يوم القطف وفي الدم المحيطي في يوم القطف وفي كيس القطف 0.025%، 1.13%، 2.1% على التوالي. إن نسبة الخلايا $CD34^+$ في الدم المحيطي بدون تحريض لا تتجاوز 0.1 % (أقل من 5 خلية / مكرو لتر). أظهرت نتائج الدراسة ارتفاعاً في نسبة الخلايا بالدم المحيطي بعد التحريض بما يعادل 35 ضعفا مقارنة مع عينات الدم بدون



الشكل (4) ضبط حدود قطاعات وبيانات التحليل. يظهر الشكل توسيع قطاعات التحليل R1 (من 10^1 إلى 10^2) و R2 (من 10^3 إلى 10^2)، لتضم قياسات خلايا خافتة التفلور، كذلك توسيع حدود قطاع التحليل R4، لتضم الحادثات events الواقعة أسفل المقياس كل ذلك يزيد من عدد الخلايا $CD34^+$.

5. الاستنتاجات

يؤثر عدد من العوامل التي ينطوي عليها بروتوكول ISHAGE لعد الخلايا $CD34^+$ بدرجات متفاوتة في نتيجة العد. كان لنسيلة الضد المستخدمة وتركيزها تأثير هام في تعداد الخلايا. لا بد من أن انتقاء نسيلة ضد $CD34$ موجهة للحوام النموذج الثالث. الحضان مع المحلول الحال للكريات الحمر الحاوي على المثبت يعطي نتائج أفضل بكثير من المحلول المحضر يدوياً والخالي من المادة المثبتة. إن التعامل مع تقنية التدفق الخلوي والخبرة على الجهاز والتعامل معه والتمكن من تحديد الشروط المثلى للحصول على النتائج الأكثر دقة يحتاج إلى خبرة من الفاحص وإلمام منه في هذه التقنية. تعاني العديد من البلدان من سوء تطبيق لهذا البروتوكول ولا سيما استراتيجية التوبوب وعدم توحيد منهجية لتعداد خلايا $CD34^+$ بين المختبرات. لذلك يتطلب السعي لمواءمة الجودة والاعتماد من قبل هيئات الاعتمادية تنفيذ منهجية تعداد خلايا $CD34^+$ (20, 21). نستنتج من هذه الدراسة ضرورة تدريب العاملين ذوي الصلة على التطبيق الصحيح لبروتوكول ISHAGE ومراعاة كافة العوامل التي تؤثر في هذا التحليل، والمتابعة عن طريق إنشاء برنامج ضبط جودة لهذا التحليل أسوة بباقي البلدان (15,16,17,20) حيث أن الحصول على تعداد صحيح للخلايا الجذعية وبكميات كافية هو أساس نجاح عمليات الاغتراس.

References:

1. The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies . 7th edition. Chapter 15, Mobilization and Collection of HSC.
2. Devine H, Tierney D. K, Schmit-Pokorny K, McDermott K, Mobilization of Hematopoietic Stem Cells for Use in Autologous Transplantation. *Clinical Journal of Oncology Nursing* 2010; Vol. 14 (2), P:212-222.
3. Kessinger A, Armitage JO. The evolving role of autologous peripheral stem cell transplantation following high-dose therapy for malignancies. *Blood*. 1989; 77:211.
4. Chao NJ, Schriber JR, Grimes K, et al. Granulocyte colony stimulating factor mobilized peripheral blood progenitor cells accelerate granulocyte and platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Blood*. 1993; 81: 2031.
5. Karadurmus N, Sahin U, Basgoz B. B, Arpaci F, Demirer T. Review of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation with reduced intensity conditioning in solid tumors excluding breast cancer. *World J Transplant* . 2016; P: 675-681.
6. Luider J. Brown C, Selinger S, Quinlan D, Karlsson L, Ruether D, Stewart D, et al. Factors influencing yields of progenitor cells for allogeneic transplantation: Optimization of G-CSF dose, Day of collection, and duration of leukapheresis. *J. Hematotherapy*. 1997; 6: 575-580.
7. Santosa D, Pangarsa E. A, Setiawan B, Naibaho R. M, Rizky D. Dharmana E. Establishing the hematopoietic stem cell transplant (HSCT) in a developing country; the journey of HSCT in Semarang, Indonesia. *Bone Marrow Transplantation*. 2021; 56:270–273.
8. Siena S, Bregni M, Belli N, Brando B, Ravagnani F, et al. Flow cytometry for clinical estimation of circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation in cancer patients. *Blood*. 1991; 77:400-409.
9. Gratama JW, Kraan J, Keeny M, Mandy F, Sutherland DR, Wood BL. Enumeration of immunologically defined cell populations by flow cytometry: approved guideline-second edition. *Clinical and laboratory standards institute (CLSI) Document H42-A2*. 2007; Vol. 27 NO.16.
10. Gratama JW, Orfao A, Barnett D, Brando. B, Huber A, Janossy G et al. Flow cytometric enumeration of CD34⁺ hematopoietic stem and progenitor cells. *European working Group on clinical cell analysis. Cytometry*. 1998; 34: 128-142.
11. Huble W, et al. Measurements of absolute concentration and viability of CD34⁺ cells in cord blood products using fluorescent beads and cyanine nucleic acid dyes. *Cytometry*. 1998; 34: 121-127.
12. Sutherland DR, Anderson L, Keeny M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE Guidelines for CD34⁺ cell determination by flow cytometry. *Journal of hematotherapy*. 1996; 5:213-226.
13. Keeny M, Chin-Yee I, Weir K, Popma J, Nayar R, Sutherland DR. Single platform flow cytometry absolute CD34⁺ cell counts based on ISHAGE guidelines. *International society of hematotherapy and graft engineering. Cytometry*. 1998; 34:61-70.
14. Sutherland DR, Keeny M, Gratama JW. Enumeration of CD34⁺ hematopoietic stem and progenitor cells. *Current Protocols in Cytometry*. 2003; P6.4.1-6.4.23.
15. Barnett D, Granger V, Storie I, Peel J, Pollitt R, Smart T, et al. Quality assessment of CD34⁺ stem cell enumeration: Experience of the united kingdom national external quality assessment scheme (UK NEQAS) using a unique whole blood preparation. *Br. J. haematol*. 1998; 102: 553-565.
16. Barnett D, Granger V, Kraan J, Whitby I, Reilly JT, Papa S, et al. Reduction of intra- and interlaboratory variation in CD34⁺ stem cell enumeration using stable test material, standard protocols and targeted training. *CD34 Task force of the European working group of clinical cell analysis (EWGCCA). Br. J. Haematol*. 2000; 108:784-792.

17. College of American Pathologists (CAP) Accrediting program. flow cytometry checklist. CD34 stem cell enumeration. 2014; P.17-18.
18. Whitby A, Whitby L, Fletcher M, Reilly JT, Sutherland DR, Keeny M, et al. ISHAGE protocol: are we doing it correctly ? Cytometry part B. 2012; 82B: 9-17.
19. Grace S Kao, Haesook T Kim, Heather Daley, et al. Validation of short-term handling and storage conditions for marrow and peripheral blood stem cell products
January 2011, Transfusion 51(1):137-47
20. Pedrosa de Lira de Morais CC, et al. Validation of the single-platform ISHAGE protocol for enumeration of CD34⁺ hematopoietic stem cells in umbilical cord blood in a Brazilian center. Hematol Transfus Cell Ther. 2020.
21. Carl G. Simon JR, Sheng lin-Gibson, John T. Elliott, Sumona Sarkar, anne L. Plant. Strategies for Achieving Measurement Assurance for Cell Therapy Products. Stem cells translational medicine 2016;5:705–708.

