مقاله تحقیقی

مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۳، دوره ۶۹، شماره ۱، ۳۹- ۳۳

Original Article

Journal of Veterinary Research. 69,1:33-39, 2014

بررسی ایمنوفنوتایپینگ و فلوسایتومتری سلول‌های مغز استخوان در گربه‌های مبتلا به اختلالات هماتوپویتیک

عاطفه عراقی[1] ناهید اطیابی[1*] سید مهدی نصیری[1] داریوش شیرانی[2] الهام محمدی[1] محمدرضا استاد علی[3] احسان جان زمین[4] اعظم زغل[3]

۱) بخش کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران- ایران

۲) گروه بیماریهای داخلی دام‌های کوچک، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران- ایران

۳) مرکز تحقیقات هماتولوژی- انکولوژی و پیوند مغز استخوان علوم پزشکی دانشگاه تهران، تهران- ایران

۴) پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاددانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست شناسی تکوینی، تهران- ایران

(دریافت مقاله: ۹ مهر ماه ۱۳۹۲ ، پذیرش نهایی: ۲۷ آذر ماه ۱۳۹۲)

چکیده

زمینه مطالعه: بررسی سیتولوژیک مغز استخوان گربه به دلیل تعداد زیاد سلول‌ها و مراحل مختلف رشد تا حدودی پیچیده است. تکنیک‌های فلوسایتومتری و آنتی‌بادی‌های منوکلونال روش مناسبی به ویژه در تشخیص بدخیمی‌های هماتوپویتیک می‌باشند. **هدف:** بررسی سلولی مغز استخوان گربه‌های مبتلا به اختلالات هماتوپویتیک با استفاده از آنتی بادی‌های منوکلونال با روش فلوسایتومتری. **روش کار:** در این مطالعه سلول‌های مغز استخوان ۴ گربه با اختلالات هماتوپویتیک و دو گربه سالم از نظر کلینیکی با روش فلوسایتومتری مقایسه شدند. آنتی بادی‌هایی مورد استفاده در این بررسی شامل CD21-like (Cr-Br)، T lymphocyte subpopulation، CD-172a، گرانولوسیتی و پن لکوسیتی (CD45-like) بودند. **نتایج:** فلوسایتومتری مغز استخوان گربه‌های مبتلا نشان دادند که تغییراتی در خصوصیات ایمنوفنوتایپی و پراکنش نوری (Scatter Light) در مقایسه با موارد کنترل وجود داشتند. در گربه مبتلا به اریترولوکمی بیان مارکر CD45، گرانولوسیتی و CD172a کمتر از موارد کنترل (نرمال) بودند. در گربه مبتلا به میلودیس پلازی، در بررسی نمودار نقطه‌ای، افزایش سلول‌های نابالغ میلوییدی و کاهش سلول‌های بالغ میلوییدی مشاهده شد. **نتیجه گیری نهایی:** این نتایج بیانگر آن است که همراه با بررسی سیتولوژی سلول‌های مغز استخوان، مطالعه خصوصیات پراکنشی سلول‌ها در فلوسایتومتری و همچنین استفاده از آنتی بادی‌های CD21-like، گرانولوسیت، پن لکوسیتی CD45، T lymphocyte subpopulation و CD172a می‌توانند در تشخیص اختلالات هماتوپویتیک گربه تکمیل کننده باشد.

واژه‌های کلیدی: گربه، فلوسایتومتری، اختلالات هماتوپویتیک، ایمنوفنوتایپینگ

مقدمه

دامپزشکان در حال استفاده از انواع روش‌های پیشرفته و دقیق در زمینه تشخیص و درمان بیماریهای حیوانات اقتصادی و خانگی هستند(۹). اگر چه بررسی آسپیراسیون مغز استخوان با میکروسکوپ نوری به عنوان بخش ضروری از بررسی کلینیکی نمونه‌های مغز استخوان رد نمی‌شود ولی استفاده از فلوسایتومتری برای بررسی مغز استخوان چندین مزیت به همراه دارد. فلوسایتومتری در زمان کوتاه و با سرعت بالا به تجزیه و تحلیل دقیق سلول‌ها می‌پردازد(۱۷). فلوسایتومتری سلول‌ها را بهتر تفکیک کرده و همچنین مراحل بلوغ و زیر گروه‌های سلولی را دقیق‌تر تعیین می‌کند. میزان بالای جریان سلولی امکان اینکه تعداد زیادی سلول در مدت بسیار کوتاهی آنالیز و بررسی شوند را نیز فراهم می‌آورد (۳). در نمونه‌های حاوی سلول‌های نئوپلاستیک هماتوپویتیک، طی چندین ساعت تشخیص انجام می‌شود که کیفیت پاسخ‌گویی را افزایش داده و انتخاب شیوه مناسب درمانی را فراهم می‌کند (۱۳،۱۸). آنتی بادی‌های اختصاصی منوکلونال کونژوگه با فلورکروم مورد استفاده در فلوسایتومتری روش مناسبی برای تشخیص افتراقی لکوسیت‌ها با استفاده از مارکرهای سطحی ویژه رده‌های سلولی به شمار می‌روند (۱۲،۱۵). آنتی بادی‌های منوکلونال به ویژه در مشخص کردن بدخیمی‌های هماتوپویتیک به علت نابالغ بودن و آتیپیک بودن سلول‌ها مفید هستند(۱۰). در حالی که آنتی بادی‌های مورد استفاده در رنگ‌آمیزی سیتوشیمی تنوع زیادی ندارد، در فلوسایتومتری تعداد زیادی از مارکرهای اختصاصی می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند. از تکنیک فلوسیتومتری و مارکرهای اختصاصی سلولی در شناسایی زیرگروهای جمعیت سلول‌های مغز استخوان در سگ و انسان به طور گسترده استفاده شده است(۳). ولی در گربه‌ها مطالعات کمتری صورت گرفته و اطلاعات مربوط به اختلالات هماتوپویتیک گربه همراه با ارزیابی‌های فلوسایتومتری، شامل گزارش‌های موردی بسیار محدود است.

بنا براین برای شناسایی اختلالات هماتوپویتیک گربه‌ها، وضعیت اپیدمیولوژی و پاسخ به درمان در این اختلالات، ضروری به نظر می‌رسد که بررسی سلولی مغز استخوان گربه‌های مبتلا با استفاده از آنتی بادی‌های منوکلونال اختصاصی رده با روش فلوسایتومتری انجام شود و گامی برای استاندارد کردن روش ایمنوفنوتایپینگ و ارتباط آن با درمان ارائه گردد.

مواد و روش کار

از ۴ گربه بیمار و ۲ گربه سالم که به کلینیک دام‌های کوچک دانشگاه

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۰۲۱-۶۱۱۱۷۱۲۸ نمابر: ۰۲۱-۶۶۴۳۸۳۲۷ Email: natyabi@ut.ac.ir

تهران ارجاع شده بودند، بررسی یافته‌های هماتولوژیک (CBC)، گسترش خون و مغز استخوان انجام گرفت. بدین ترتیب که در حدود 5cc مغز استخوان با سوزن شماره ۱۶ از استخوان ایلیاک آسپیره شده و همچنین 1cc نمونه خون گرفته شد .سپس گستره خون تهیه با رنگ هماتولوژی گیمسا رنگ‌آمیزی شد. در ادامه، شمارش افتراقی سلول‌های خون محیطی(۱۰۰ سلول) و سلول‌های مغز استخوان (۵۰۰ سلول) به صورت دستی انجام شد.

گروه بیمار که ابتلا به اختلالات هماتوپویتیک آنها تأیید شد، شامل یک مورد اریترولوکمی (نمونه۱)، یک مورد گربه مبتلا به سندرم میلودیس پلازی (نمونه۲)، یک مورد گربه با هایپرپلازی رده میلوییدی(نمونه۳) و همچنین یک مورد گربه که از نظر ویروس سرکوب کننده ایمنی (FIV)مثبت بودند(نمونه۴). نمونه‌های مغز استخوان برای تعیین دقیق‌تر ماهیت سلول‌های غیرطبیعی با آنتی بادی‌های منوکلونال و با روش فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آن با نمونه‌های نرمال مقایسه و ثبت شد.

به منظور فلوسایتومتری 100µL از سلول‌های خونی مغز استخوان (شامل $10^{6}\times1$سلول، که احتمال بهم چسبیدن سلول‌ها را به حداقل می‌رساند) برداشته و به لوله‌های پلی استرن شماره ۱۰ منتقل شد. سپس 50µL آنتی‌بادی اولیه شامل آنتی‌بادی‌های منوکلونال برای شاخص‌های CD21-like (Cr-Br)، T lymphocyte subpopulation، CD-172a، گرانولوسیتی، پن‌لکوسیتی (CD45-like)(ساخت شرکت VMRD کشور آمریکا) با ایزوتایپ کنترل اضافه کرده و در دمای اتاق به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. بعد از این گلبول‌های قرمز بالغ (بدون هسته) با اضافه کردن 3cc کلرید آمونیوم ۰/۸۵٪ به مدت ۵-۲ دقیقه در دمای اتاق لیز شدند، لوله‌ها را در ۱۰۰۰ دور به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ کرده و سلول‌ها جدا شدند. مایع رویی دور ریخته شده و سلول‌ها در 3cc محلول فسفات بافر سالین PBS (buffered saline phosphate) که حاوی سرم گاماگلوبولین اسبی ۱٪ بود شسته و سپس مطابق آنچه در بالا گفته شد سانتریفیوژ شد. آنتی بادی ثانویه کونژوگه فلورسئین ایزوتیوسیانات [Goat anti mouse IgG: FITC, Serotec] و [PE, Serotec Goat anti mouse IgM:] یا پیکواریترین به هر لوله اضافه کرده و به مدت ۲۰ دقیقه در $4^{o}C$ انکوبه شد. بعد از انکوباسیون سلول‌ها دوبار با 3cc PBS شسته شده و دوباره در 250mL PBS سوسپانسیون گردید. برای مشخص کردن بک گراند فلورسانتی، سلول‌ها با آنتی بادی ثانویه گونژوگه با PE یا FITC بدون آنتی‌بادی اولیه انکوبه شدند (۱،۱۴،۱۹). چنانچه نمونه‌ها بلافاصله بعد از آماده سازی برای فلوسایتومتری آنالیز نمی‌شدند، با پارا فرمالدهید ۵٪ فیکس شده تا طی حداکثر یک روز آنالیز شوند(۵). سلول‌های رنگ شده از طریق لوله حاوی نمونه به دستگاه فلوسایتومتری داده شده و ۱۰۰۰۰ سلول توسط آن شمرده و سپس داده‌های فلوسایتومتری بدست آمده با فرمت و شکل استاندارد در کامپیوتر ذخیره شدند. سلول‌ها به صورت سیگنال‌های بازتابیده مستقیم (Forward Scatter) و سیگنال‌های جانبی(Side Scatter) نمایش داده شدند. در حالیکه مارکرها که فلورسانت PE یا FITC داشتند به صورت لگاریتمی نمایش داده شدند.

لازم به توضیح است که در نمودار نقطه‌ای جمعیت سلولی، سیگنال‌های Forward Scatter (FSC) مشخص کننده سایز سلول‌ها و Side Scatter (SSC) مشخص کننده گرانولوسیتی و پیچیدگی سلول‌ها است.

لازم به ذکر است که برای تعیین نمودار نقطه‌ای مغز استخوان، ۲ گربه سالم از نظر کلینیکی مورد آزمایش قرار گرفتند که در این حالت بر اساس شدت و میزان پراکنش نور سلول‌ها، ۵ ناحیه در نظر گرفته شد.

نتایج

بررسی فلوسایتومتری گربه‌های با اختلالات هماتوپویتیک(نمونه ۱):

جدول۱. یافته‌های خون محیطی در گربه‌های مبتلا به اختلالات هماتوپویتیک.

	پارامترهای خون محیطی																			
	هماتوکریت (٪)	تعداد گلبول‌های قرمز (۱۰۶)	هموگلوبین (g/dL)	MCHC (g/L)	MCV(fL)	پلاکت (۱۰۳)	گلبول سفید (۱۰۳)	نوتروفیل (٪)	باند (٪)	متامیلوسیت (٪)	میلوسیت (٪)	پرومیلوسیت (٪)	میلوبلاست (٪)	ائوزینوفیل (٪)	مونوسیت (٪)	لنفوسیت (٪)	روبری‌پلاست (٪)	پرورونروسیت (٪)	رونروسیت (٪)	متارونروسیت (٪)
نمونه۱	۷	۰/۸	۲/۵	۶۱	۵۲/۶	۱۱۳	۳۴/۵	۳۲	۵	۳	۰	۰	۰	۰	۰	۴/۵	۲/۵	۴/۵	۲	۴۴/۵
نمونه۲	۲۴/۳	۳/۷	۷/۷	۶۶	۳۱/۸	۳۸	۴۹/۸	۷۱	۲۲	۳	۲	۱	۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
نمونه۳	۲۵/۲	۹	۱۳	۴۵	۳۳/۷	۲۰۰	۷۷	۷۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	۱	۲۸	۰	۰	۰	۰
نمونه۴	۲۲	۴/۷	۱۲	۶۰	۲۹	۱۰۰	۴/۶	۸۷	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
میزان مرجع	۴۵-۲۴	۱۰-۵	۱۵-۸	۵۵-۳۹	۱۷/۵-۱۲/۵	۶۰۰-۱۵۰	۱۹/۵-۵/۵	۸۰-۳۵	-	۰	۰	۰	۰	۰	-	-	۰	۰	۰	۰

جدول ۲. پارامترهای تشخیص تفریقی سلول‌های خونی مغز استخوان.

	رده اریتروئیدی	رده میلوئیدی	نسبت میلوئید به اریتروئید
نمونه ۱	۸۲/۸	۱۵/۸	۰/۱۹
نمونه ۲	۴/۴	۶۰/۸	۱۳/۸
نمونه ۳	۷/۶	۸۶/۴	۱۱/۳۶
نمونه ۴	۱۱/۸	۸۶/۸	۷/۳
میزان مرجع	-	-	۲/۲-۱/۲

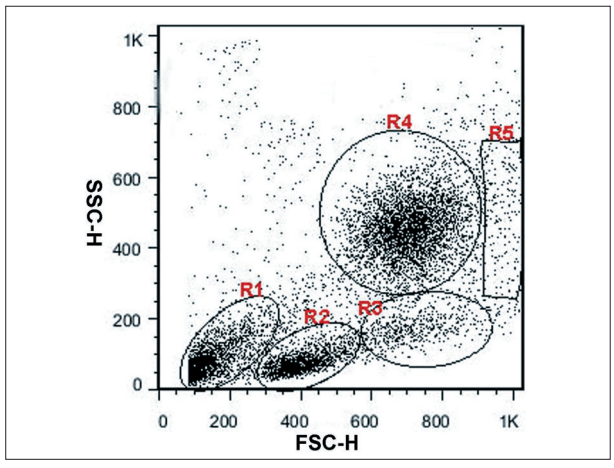
جدول ۳. بررسی آنتی بادی‌های منوکلونال در نمونه نرمال و گربه‌های مبتلا به اختلالات هماتوپویتیک.

	CD45	CD172a	گرانولوسیت CD	CD21 like	CD T lymphocyte
نمونه ۱	٪۲۰	٪۸	٪۴	تست نشد	تست نشد
نمونه ۲	٪۸۰	٪۴۸	٪۴۵	تست نشد	تست نشد
نمونه ۳	تست نشد	٪۷۵	٪۷۵	تست نشد	تست نشد
نمونه ۴	٪۳۰	٪۴۰	٪۳۵	٪۶	٪۳
میزان مرجع	٪۵۴	٪۴۲	٪۳۷	٪۱۰	٪۸

این گربه مبتلا به اریترولوکمی، آنمی شدید و ترمبوسیتوپنی به همراه پره کورسورهای اریتروئیدی شامل روبری‌بلاست، روبری‌سیت و متاروبروسیت در لام تهیه شده از خون محیطی دیده شد(جدول۱). در بررسی سیتولوژیکی آسپیراسیون مغز استخوان رده‌ی اریتروئیدی ۸۲٪ سلول‌های هسته‌دار را تشکیل دادند (جدول۲). در فلوسایتومتری، نمودار نقطه‌ای FSC/SSC الگوی متفاوتی از توزیع سلول‌ها در مقایسه با مغز استخوان نرمال (تصویر۱) نشان داد که بیشترین سلول‌ها در گیت R2 و R3 بودند(a-2).

بیان متفاوتی از مارکر پن‌لکوسیت (CD (45-like، گرانولوسیتی و (CD172a) مشاهده شد. درصد سلول‌هایی که از نظر CD45 و CD172a و مارکر گرانولوسیتی مثبت بودند بسیار پایین‌تر از درصد سلول‌ها در مغز استخوان نرمال بود (جدول۳)، که با افزایش سلول‌های نئوپلاستیک اریتروئیدی و کاهش جمعیت لکوسیتی در این گربه همخوانی دارد. در نمودار نقطه‌ای CD45- به SSC جمعیتی با بیان کم CD45 و همچنین SSC کم مشاهده شد (تصویر۲-b).

نمونه ۲: گربه با سندرم میلودیس پلاستیک که از نظر (FeLV Feline Leukemia Virus) مثبت بود. در این گربه آنمی جبران ناپذیر ماکروسیتیک نورموکرومیک به همراه ترومبوسیتوپنی و میلوبلاست و پرومیلوسیت و پلاکت‌های غول پیکر در خون محیطی دیده شد (جدول۱). همچنین تغییرات توکسیک شامل هایپوسگمانتاسیون و هایپرسگمانتاسیون در نوتروفیل‌های خون محیطی دیده شد. سلول‌های بلاستی ۱۵٪ کل سلول‌های هسته‌دار را در مغز استخوان تشکیل دادند. در آنالیز فلوسایتومتری، در بررسی نمودار نقطه‌ای

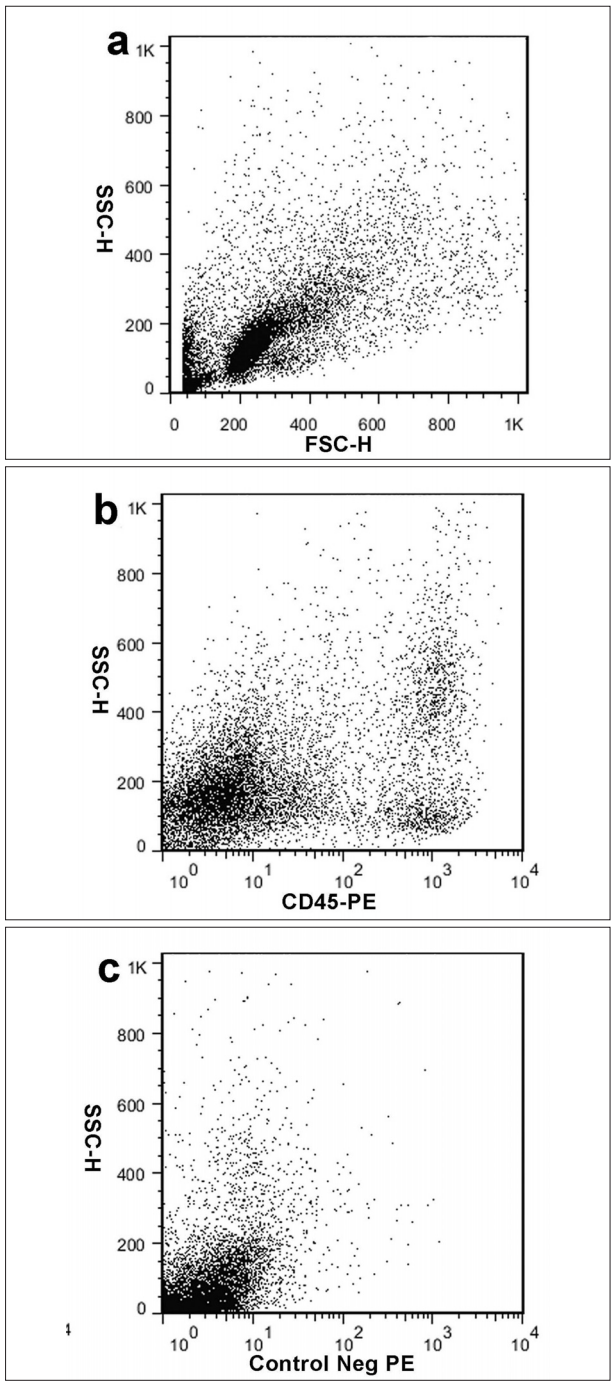


تصویر ۱.نمودار نقطه‌ای مغزاستخوان گربه سالم: زیر جمعیت‌های سلولی در ۵ ناحیه مشخص و جدا شده‌اند.

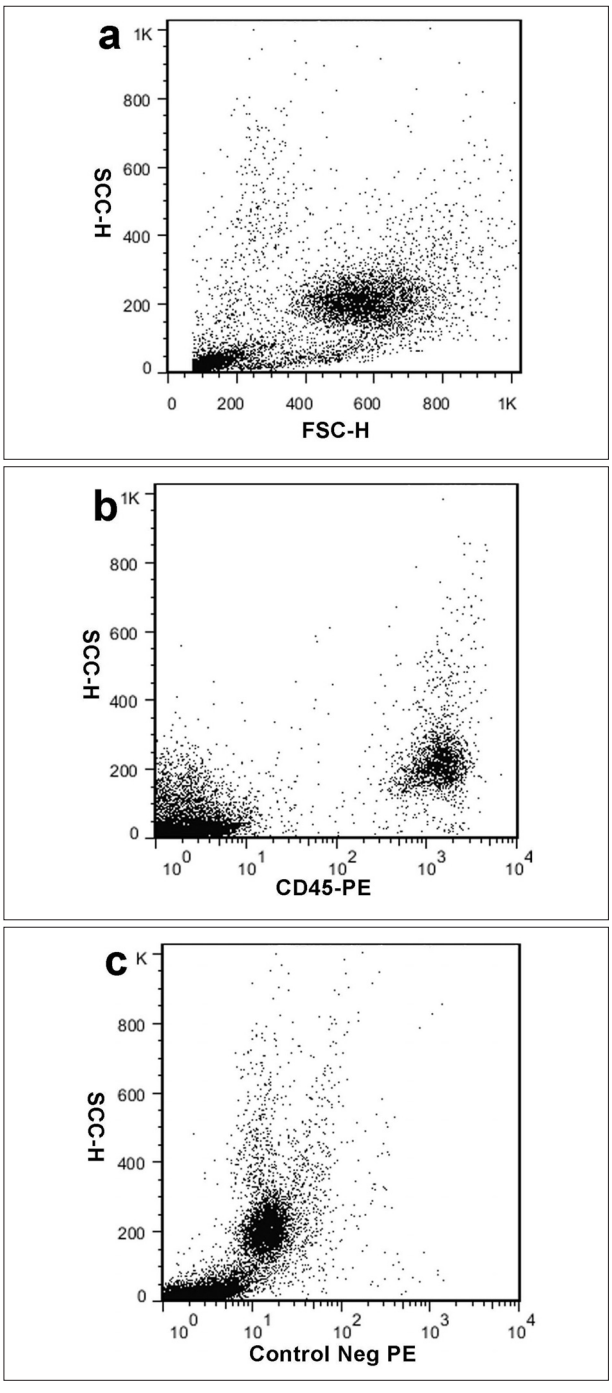
FSC/SSC افزایش در سلول‌های نابالغ میلوئیدی و کاهش در سلول‌های میلوئیدی بالغ دیده شد (تصویر۳-a). سلول‌های بلاستی ناحیه واضحی را نشان داده و درصد مارکر گرانولوسیتی (۴۵٪) و مارکر پن‌لکوسیتی (like-CD-45) حدود ۸۰٪ برآورده شد (جدول۳). الگوی جمعیتی مارکر CD45 در نمودار SSC/CD45- متفاوت از الگوی آن در حالت نرمال بود (تصویر۳-b). در این گربه سایر مارکرهای اختصاصی گربه برای فلوسایتومتری آزمایش نشد.

نمونه ۳: در این گربه در بررسی گستره تهیه شده از مغز استخوان هایپرپلازی رده‌ی میلوئیدی مشاهده شد. آنالیز مغز استخوان مبین افزایش سلولاریتی حدود ($۷۷/۳\times۳^{۱۰}$ mL) بود. نسبت میلوئید به اریتروئید حدود ۱۱/۴ بود (جدول۲). بررسی فلوسایتومتری سلول‌ها در نمودار نقطه‌ای SSC/FSC نشان از افزایش سلول‌ها در گیت R3 و R4 بود. که این سلول‌ها CD172a مثبت بودند و مارکر گرانولوسیتی توسط ۷۵٪ سلول‌ها بیان شد که بیشتر از میزان میانگین آن در گربه‌های نرمال بود (جدول۳). مارکرهای لنفوسیتی و پن‌لکوسیتی (CD45-like) برای بررسی درصد بیان سلول‌ها مورد بررسی قرار نگرفت.

نمونه ۴: در این گربه یافته‌های هماتولوژی در خون محیطی شامل لکوسیتوز، کم‌خونی ماکروسیتیک هایپوکرومیک به همراه ترمبوسیتوپنی بود (جدول۱). سلول‌های مغز استخوان در هر دو رده میلوئیدی و اریتروئیدی دیس‌پلاستیک بودند. آزمایش سرولوژی برای تشخیص FIV (Feline Immunodeficiency Virus) با آزمایش الایزا (IDEXX) در این گربه مثبت بود و تأیید شد. در بررسی فلوسایتومتری نمودار نقطه‌ای SSC/FSC تفاوت قابل توجه‌ای با سلول‌های مغز استخوان در حالت نرمال نشان نداد (تصویر۴-a)، اما نمودار SSC/CD45 الگوی متفاوتی با حالت نرمال داشت، بدین نحو که جمعیت سلول‌های CD45 مثبت کاهش پیدا کرد (تصویر۴-b). همچنین درصد مارکرهای T lymphocyte subpopulation و CD 21-like کمتر از موارد نرمال بود



تصویر۲. نمودار FSC/SSC و SSC/CD45 در گربه مبتلا به اریترولوکمی. (a نمودار نقطه‌ای، توزیع متفاوتی از سلول‌ها را در مقایسه با مغز استخوان گروه کنترل (نرمال) نشان می‌دهد. (b نمودار نقطه‌ای SSC/CD45، جمعیت سلولی با SSC کم و همچنین بیان کم CD45 را نشان می‌دهد که با خصوصیات سلول‌های اریتروییدی هسته‌دار هم‌خوانی دارد (کنترل منفی = c).



تصویر ۳. (a نمودار FSC/SSC گربه مبتلا به سندرم میلودیس‌پلازی، سلول‌های بلاستی، منطقه‌ای مشخص را در نمودار نقطه‌ای نشان می‌دهند. (b الگوی متفاوت در نمودار SSC/CD45 نسبت به حالت نرمال مشاهده شد (کنترل منفی = c).

(جدول۳).

بحث

در بررسی فلوسایتومتری، تشخیص زیرگروه‌های لکوسیتی تنها براساس پارامترهای مورفولوژیکی بخصوص در موارد نئوپلاستیک کاری دشوار است (۳). ایمنوفنوتایپینگ و بررسی فلوسایتومتری مغز استخوان ابزار مناسبی برای بررسی لوسمی حاد، سندروم میلودیسپلازی و لمفوم غیر هوچکینی در انسان می‌باشد (۴،۸). در گربه مبتلا به اریترولوکمی گربه، درصد سلول‌هایی که CD45 مثبت بودند نسبت به حالت نرمال کاهش چشم‌گیری داشت. در انسان در بدخیمی‌های لنفوسیتی درصد

بیان CD45 بسیار پایین‌تر از مقدار بیان آن توسط لنفوسیت‌ها در حالت سلامت و نرمال است. بنابراین بررسی بیان مارکر CD45 در تشخیص بدخیمی‌های لنفوسیتی کمک کننده است (۶). در همین گربه مبتلا به اریترولوکمی جمعیتی با SSC کم و بیان CD45 کم (low SSC/low CD45) همراه با درصد بالایی از سلول‌های هسته‌دار اریتروئیدی مشاهده شد. چنانچه در مغز استخوان انسان هم شرح داده شده است (۱۲). بنابراین به نظر می‌رسد که این مارکر در تشخیص بدخیمی‌های رده اریتروئیدی در گربه مفید باشد (۷،۱۱). همچنین در نمودار نقطه‌ای جمعیت بلاستی که FSC/SSC کمی دارند به خوبی قابل شناسایی است. در گربه‌ای که از نظر سرمی FIV مثبت بود کاهش جمعیت لنفوسیت T با کاهش مارکر اختصاصی این سلول و همچنین کاهش جمعیت لنفوسیتی در نمودار نقطه‌ای CD45 تأیید کننده روند بیماریزایی این ویروس در گربه مبتلا است. از طرفی استفاده همزمان مارکر CD45 به همراه سایر مارکرها می‌تواند برای جدا کردن رده‌های مختلف سلولی مفید باشد. بررسی کمّی بیان آنتی‌ژن‌های سطحی در بیماریهای تک گیر و انفرادی تا حدودی دشوار است و ممکن است همبستگی مستقیم بین بررسی سیتولوژیکی سلول‌ها و فلوسایتومتری بخاطر تعداد کم موارد مبتلا به اختلالات هماتوپویتیک بدست نیاید. اما بررسی نمودار نقطه‌ای (FSC/SSC) و سلولاریتی اطلاعات عینی دقیق و قابل تکرار را از طریق امکان بررسی تعداد زیادی سلول فراهم می‌آورد (۲،۹). اگرچه فلوسایتومتری به تنهایی جایگزین بررسی میکروسکوپی سلول‌های گرفته شده از مغز استخوان نمی‌شود. به طور کلی وقتی که در خون محیطی و یا مغز استخوان، نشانه‌هایی از بلاست‌ها یافت شود، معین کردن دسته‌ی سلولی دشوار خواهد بود و فلوسایتومتری می‌تواند در این‌گونه موارد بسیار مفید باشد. با وجود این، گزارشات اندکی وجود دارند که همبستگی ویژگی‌های مورفولوژیک را با ایمونوفنوتیپ بخصوص در گربه بررسی کرده باشند.

در مطالعه حاضر مشخص شد که بخصوص مارکر CD45 که مارکر پن‌لکوسیتی است و لکوسیت‌ها این مارکر را بسته به رده سلولی در مقادیر مختلف بیان می‌کنند، برای تشخیص گرانولوسیت‌های بالغ و نابالغ و لنفوسیت‌ها می‌تواند بسیار مفید باشد. چون این مارکر هم بر روی سلول‌های بالغ و هم نابالغ میلوییدی بیان می‌شود. در صورتی که مارکر گرانولوسیتی و CD172a فقط توسط سلول‌های بالغ میلوییدی بیان می‌شوند. پانلی شامل مارکرهای CD45، گرانولوسیتی ،CD172a، T lymphocyte subpopulation و CD21-like (Cr-Br) می‌تواند برای ایمنوفنوتایپینگ مغز استخوان گربه کاربردی باشد. اگرچه بررسی تعداد بیشتر موارد بیمار ضروری است تا بتوان شاخص‌های سلولی بیشتری را در موارد بیماریهای هماتوپویتیک گربه‌ها مورد مطالعه قرار داد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از همکاری آقای عیسی نژاد کارشناس بخش جراحی کلینیک دام‌های کوچک دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و همچنین آقای فاضل سامانی و سرکار خانم پردیس خسروانی کارشناسان بخش فلوسایتومتری پژوهشگاه رویان صمیمانه قدردانی می‌شود. این مطالعه توسط Iran National Science Foundation (INSF) مورد حمایت مالی (گرنت شماره ۸۹۰۰۲۳۷۴) قرار گرفته است.

References

1. Ameri, M., Wilkerson, M.J., Stockham, S.L., Almes, K.M., Patton, K.M., Jackson, T. (2010) Acute megakaryoblastic leukemia in a German Shepherd dog. Vet Clin Pathol. 39: 39-45.
2. Comazzi, S., Gelain, M.E. (2011) Use of flow cytometric immunophenotyping to refine the cytological diagnosis of canine lymphoma. Vet J. 188: 149-155.
3. Comazzi, S., Gelain, M.E., Spagnolo, V., Riondato, F., Guglielmino, R., Sartorelli, P. (2006) Flow cytometric patterns in blood from dogs with non-neoplastic and neoplastic hematologic diseases using double labeling for CD18 and CD45. Vet Clin Pathol. 35: 47-54.
4. Del Poeta, G., Stasi, R., Venditti, A., Suppo, G., Aronica, G., Bruno, A., Papa, G. (1994) Prognostic value of cell marker analysis in de novo acute myeloid leukemia. Leukemia. 8: 388-394.
5. Gelain, M.E., Mazzilli, M., Riondato, F., Marconato, L., Comazzi, S. (2008) Aberrant phenotypes and quantitative antigen expression in different subtypes of canine lymphoma by flow cytometry. Vet Immunol Immunopathol. 121: 179-188.
6. Hendrickx, A., Bossuyt, X. (2001) Quantification of the leukocyte common antigen (CD45) in mature B-cell malignancies. Cytometry. 46: 336-339.
7. Jain, N. (1993) Classification of myeloproliferative disorders in cats using criteria proposed by the animal leukaemia study group: A retrospective study of 181 cases (1969-1992). Comp Haematol Int. 3: 125-134.
8. Jensen, I.M. (1995) Myelopoiesis in myelodysplasia evaluated by multiparameter flow cytometry. Leuk Lymphoma. 20: 17-25.

9. Meister, R.K., Taglinger, K., Haverson, K., Strohminger, N., Mathes, L.E. (2007) Progress in the discovery and definition of monoclonal antibodies for use in feline research. Vet Immunol Immunopathol. 119: 38-46.
10. Reggeti, F., Bienzle, D. (2011) Flow Cytometry in Veterinary Oncology. Vet Pathol. 48: 223-235.
11. Shirani, D., Nassiri, S.M., Aldavood, S.J., Seddigh, H.S., Fathi, E. (2011) Acute erythroid leukemia with multilineage dysplasia in a cat. Can Vet J. 52: 389-393.
12. Stelzer, G.T., Shults, K.E., Loken, M.R. (1993) CD45 gating for rouinet flow cytometric analysis of human bone marrow specimens. Ann N Y Acad Sci. 677: 265-280.
13. Tasca, S., Carli, E., Caldin, M., Menegazzo, L., Furlanello, T., Gallego, L.S. (2008) Hematologic abnormalities and flow cytometric immunophenotyping results in dogs with hematopoietic neoplasia: 210 cases (2002-2006). Vet Clin Pathol. 38: 2-12.
14. Villiers, E., Baines, S., Law, A.M., Mallows, V. (2006) Identification of acute myeloid leukemia in dogs using flow cytometry with myeloperoxidase, MAC387, and a canine neutrophil-specific antibody. Vet Clin Pathol. 35: 55-71.
15. Weiss, D.J. (2001a) Determination of differential cell counts in feline bone marrow by use of flow cytometry. Am J Vet Res. 62: 474-478
16. Weiss, D.J. (2001b) Evaluation of monoclonal antibodies for identification of subpopulations of myeloid cells in bone marrow obtained from dogs. Am J Vet Res. 62: 1229-1233.
17. Weiss, D.J. (2002) Application of flow cytometric techniques to veterinary clinical hematology. Vet Clin Pathol. 31: 72-82.
18. Wilkerson, M.J. (2012) Principles and applications of flow cytometry and cell sorting in companion animal medicine. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 42: 53-71.
19. Wilkerson, M.J., Dolce, K., Koopman, T., Shuman, W., Chun, R., Garrett, L., Avery, A. (2005) Lineage differentiation of canine lymphoma/leukemias and aberrant expression of CD molecules. Vet Immunol. Immunopathol. 106: 179-196.

Flow cytometric immunophenotyping of bone marrow in cats diagnosed with hematopoietic disorders

Araghi, A.[1], Atyabi, N.[1*], Nassiri, S.M.[1], Shirani, D.[2], Mohammadi, E.[1], Ostadali, M.R.[3], Janzamin, E.[4], Zaghal, A.[3]

[1]*Department of Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

[2]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

[3]*Laboratory Department, Hematology, Oncology, and Stem Cell Transplantation Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran-Iran*

[4]*Department of Stem Cells and Developmental Biology at Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran-Iran*

(Received 1 October 2013 , Accepted 18 December 2013)

Abstract:

BACKGROUND: Cytological examination of bone marrow in cats, due to the large number of cells and various growth phases is somewhat complicated. The use of flow cytometric techniques and monoclonal antibodies are appropriate methods in the diagnosis of hematopoietic malignancies. **OBJECTIVES:** The purpose of the present study is to determine cell-surface antigens for various developmental stages of feline bone marrow cells in hematopoietic disorders using flow cytometric. **METHODS:** In this study, bone marrow cells from 4 cats with hematopoietic disorders and 2 clinically healthy cats, were labeled with 5 types of anti-feline MAbs included: CD21-like (Cr-Br), T lymphocyte subpopulation, CD-172a, Granulocyte, Pan-Leukocyte (CD45-like) and then analyzed using flow cytometric. **RESULTS:** The results revealed changes in immunophenotyping and light scatter properties compared with normal cases. The percentage of CD45, Granulocyte and CD172a markers in the bone marrow of a cat with erythroleukemia were lower compared with normal bone marrow. In a cat with myelodysplastic syndrome, scatter plot indicated an increase in the immature myeloid cells and a decrease in mature myeloid cells. **CONCLUSIONS:** It was concluded that cytological examination of bone marrow with studying dispersion studies on cells using flow cytometric and usage of a panel of antibodies such as CD21-like(Cr-Br), T lymphocyte subpopulation, CD-172a, Granulocyte, Pan-Leukocyte (CD45-like) could support the diagnosis of feline hematopoietic abnormalities.

Key words: cat, flow cytometric, hematopoietic disorders, immunophenotyping

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. Representative of scatter plot of healthy-cat bone marrow. Cellular subpopulations shown in five distinct regions.

Figure 2. Representative of forward and side scatter plot and side scater-CD45 diagram in cat with erythroleukemia. a) Scatter plot shows different cellular distribution as compared to normal cats. b) Side scatter-CD45 scatter plot presents CD45 dull positive cells with low side scatter intensity that shows nucleated erythroid cells (C; negative control).

Figure 3. a) FSC/SCC plot in cat with myelodysplasia. The blast cells are shown in distinct region of scatter plot. b) Different SSC/CD45 pattern was shown as compared to control (C; negative control).

Figure 4. a) FSC/SCC plot of FIV positive cat. b) SSC/CD45 different plot with reduction in lymphocyte population (c; negative control).

Table 1. Complete blood count data from cats with hematopoietic disorders.

Table 2. Differential count of cells in bone marrow from the cats with hematopoietic disorders.

Table 3. Percentage of positive cells using a panel of antibodies by flow cytometric for 4 cases of hematopoietic disorders and normal cats.

***Corresponding author's email: natyabi@ut.ac.ir, Tel: 021-61117128, Fax: 021-66438327**