

بخش ۱: متغیرهای پیش‌تحلیلی (Pre-analytical Variables) و نمونه‌گیری

بیش از ۶۰ تا ۷۰ درصد خطاهای آزمایشگاهی در مرحله پیش‌تحلیلی رخ می‌دهند. دقت نتایج هماتولوژی مستقیماً وابسته به کیفیت نمونه اولیه است.

۱. ضدانعقادهای رایج و مکانیسم عملکرد

- K_2EDTA یا K_3EDTA (دی یا تری‌پتاسیم اتیلن‌دی‌آمین‌تتراستیک اسید):
 - مکانیسم: شلاته کردن برگشت‌ناپذیر یون‌های آزاد کلسیم (Ca^{2+}).
 - کاربرد: شمارش کامل سلول‌های خون (CBC) و تهیه لام خون محیطی. غلظت استاندارد: 1.5 – 2.2 mg/mL خون.
 - تفاوت ملح‌ها: K_2EDTA پودر خشک اسپری شده است و باعث رقت نمونه نمی‌شود، در حالی که K_3EDTA مایع بوده و حدود ۱ تا ۲ درصد اثر رقتی روی هماتوکریت دارد و در غلظت‌های بالا سبب چروکیدگی گلبول‌های قرمز (Echinocytosis) می‌شود.
 - اثرات EDTA در زمان طولانی: تورم اسمزی RBC (افزایش کاذب MCV)، دگرانولاسیون کاذب نوتروفیل‌ها و ایجاد پدیده چسبندگی پلاکتی (EDTA-dependent Pseudothrombocytopenia).
- تری‌سدیم سیترات (3.2% یا 0.109 M):
 - مکانیسم: متصل شدن به کلسیم به صورت برگشت‌پذیر.
 - نسبت استاندارد: دقیقاً ۱ بخش ضدانعقاد به ۹ بخش خون (9:1).
 - اصلاح حجم در هماتوکریت بالا: اگر هماتوکریت بیمار (Hct) بیشتر از ۵۵٪ باشد، حجم ضدانعقاد باید طبق فرمول زیر کاهش یابد:

$$C = 0.00185 \times (100 - Hct) \times V$$

(که در آن C حجم سیترات بر حسب میلی‌لیتر و V حجم کل خون مورد نظر است).

- سدیم هپارین:
 - مهارکننده ترومبین از طریق فعال‌سازی آنتی‌ترومبین III؛ به دلیل ایجاد زمینه آبی‌رنگ در رنگ‌آمیزی رایت و تجمع کاذب پلاکت‌ها، برای CBC مناسب نیست و کاربرد اصلی آن در تست شکنندگی اسمزی (Osmotic Fragility) و سیتوژنتیک است.

بخش ۲: شمارش خودکار سلول‌های خون (CBC) و تفسیر شاخص‌ها

سل‌کانترهای مدرن از تلفیق دو یا سه اصل فیزیکی برای شمارش و تفکیک سلول‌ها استفاده می‌کنند:

۱. امپدانس الکتریکی (Coulter Principle): تغییر مقاومت الکتریکی بر اثر عبور سلول نارسانا از میان یک روزنه (Aperture) باریک که متناسب با حجم سلول (V) است.

۲. پراکندگی نور لیزری (Flow Cytometry-based Optical Scatter):

○ زاویه روبرو ($Forward Scatter - FSC$): اندازه سلول.

○ زاویه جانبی ($Side Scatter - SSC$): گرانش و پیچیدگی داخلی سلول.

۳. رنگ‌آمیزی فلورسنت / واکنش‌های آنزیمی: بررسی محتوای RNA/DNA سلول‌ها و میلوپروکسیداز (MPO).

شاخص‌های گلبول قرمز (RBC Indices)

• MCV (میانگین حجم گلبول قرمز):

$$MCV = \frac{Hct(\%) \times 10}{RBC \left(\frac{10^6}{\mu L} \right)} [fL]$$

○ رنج نرمال: 80 – 100 fL

• MCH (میانگین هموگلوبین در گلبول قرمز):

$$MCH = \frac{Hb \left(\frac{g}{dL} \right) \times 10}{RBC \left(\frac{10^6}{\mu L} \right)} [pg]$$

○ رنج نرمال: 27 – 33 pg

• MCHC (غلظت میانگین هموگلوبین در حجم گلبول قرمز):

$$MCHC = \frac{Hb \left(\frac{g}{dL} \right) \times 100}{Hct(\%)} = \frac{MCH}{MCV} \times 100 [g/dL]$$

○ رنج نرمال: 32 – 36 g/dL. مقادیر بالای 36.5 g/dL نشان‌دهنده خطای اندازه‌گیری، آگلوتیناسیون سرد یا وجود اسفروسیتوز ارثی است.

• RDW (پهنای توزیع گلبول‌های قرمز):

$$RDW - CV = \frac{SD \text{ of } MCV}{MCV} \times 100(\%)$$

○ (معیار میزان آنیزوسیتوز).

بخش ۳: گسترش و رنگ‌آمیزی خون محیطی (Peripheral Blood Smear)

بررسی میکروسکوپی لام خون، استاندارد طلایی (Gold Standard) اعتبارسنجی خطاهای سل‌کانتر و تشخیص نهایی نئوپلاسم‌ها و آنمی‌هاست.

۱. تکنیک تهیه لام (Wedge Technique)

- زاویه مناسب تیغه گسترش‌دهنده (Spreader slide): حدود 30° تا 45° . در نمونه‌های پلی‌سیتیک، زاویه باید کمتر ($20^{\circ} - 30^{\circ}$) و در نمونه‌های آنمیک، زاویه بیشتر انتخاب شود.
- گسترش مناسب باید دارای سه بخش مجزا باشد: Head (سر)، Body (بدنه)، و Feathered Edge (دم یا لبه پرماند).
- ناحیه مناسب برای ارزیابی مورفولوژی (Monolayer Area): منطقه‌ای درست قبل از لبه پرماند که گلبول‌های قرمز بدون هم‌پوشانی و مماس با یکدیگر قرار گرفته‌اند.

۲. رنگ‌آمیزی‌های رومانوفسکی (Wright و Wright-Giemsa)

- اجزای رنگ:
 - ائوزین Y (Eosin Y): رنگ اسیدی با بار منفی که به ساختارهای بازی سلول متصل می‌شود (سیتوپلاسم هموگلوبینی RBC، گرانول‌های ائوزینوفیل - رنگ نارنجی/قرمز).
 - متیلن بلو (Methylene Blue) و اکسیدهای آن (آزورها): رنگ‌های بازی با بار مثبت که به ساختارهای اسیدی متصل می‌شوند (هسته، RNA سیتوپلاسمی، گرانول‌های بازوفیل - رنگ بنفش/آبی).
- اهمیت pH بافر:
 - بافر فسفات با $pH = 6.4 - 6.8$ تنظیم می‌شود.
 - $pH < 6.4$: لام بسیار قرمز و کم‌رنگ می‌شود (هسته‌ها بازوفیل نیستند).
 - $pH > 6.8$: لام بیش از حد آبی و تیره می‌شود (گرانول‌ها و کروماتین نامشخص).

۳. ناهنجاری‌های مورفولوژیک گلبول قرمز و ارزش بالینی آن‌ها

content_copy

انحراف مورفولوژیک	ویژگی میکروسکوپی	مفهوم پاتوفیزیولوژیک / تشخیص بالینی
شیستوسیت (Schistocyte)	قطعات بریده‌شده، شاخدار یا کلاه‌خودی RBC	آنمی‌های همولیتیک میکروآنژیوپاتیک (TTP, HUS, DIC)، دریاچه‌های مصنوعی قلب
اسفروسیت (Spherocyte)	کروی، کوچک، بدون هاله مرکزی روشن	اسفروسیتوز ارثی (HS)، آنمی همولیتیک خودایمن (AIHA)
تارگت سل (Target Cell / Codocyte)	نمای سیبل با افزایش سطح غشا به حجم	تالاسمی‌ها، بیماری‌های انسدادی کبد، هموگلوبینوپاتی E و C

انحراف مورفولوژیک	ویژگی میکروسکوپی	مفهوم پاتوفیزیولوژیک / تشخیص بالینی
داکریوسیت (Dacrocyte)	سلول قطره‌اشکی (Teardrop)	میلو فیبروز اولیه (Primary Myelofibrosis)، تهاجم تومورال به مغز استخوان
اکانتوسیت (Acanthocyte)	زوائد نامنظم، خاردار و با طول متغیر	آبتالیوپروئتینمی، بیماری‌های شدید کبدی (Spur cell anemia)
اجسام هاول-جولی (Howell-Jolly bodies)	باقیمانده هسته‌ای متراکم و گرد DNA	اسپلنکتومی، هایپواسپلنسیسم، کم‌خونی مگالوبلاستیک
حلقه‌های کابوت (Cabot rings)	رشته‌های حلقه‌ای یا عدد ۸ مانند (باقیمانده میکروتوبول‌ها)	مسمومیت با سرب، آنمی پرنیسیوز

بخش ۴: ارزیابی خط رتیکولوسیتی و ترومبوسیتی (Platelets & Reticulocytes)

۱. شمارش رتیکولوسیت‌ها

- رنگ‌آمیزی سوپراویتال (Supravital Staining): با نیومتیلن بلو (New Methylene Blue) قبل از فیکساسیون؛ رسوب ریبوزوم‌ها و RNA باقیمانده به شکل شبکه مشبک.
- شاخص تولید رتیکولوسیت (RPI - Reticulocyte Production Index): برای اصلاح اثر آنمی و خروج زودرس رتیکولوسیت‌ها از مغز استخوان (Shift Reticulocytes):

$$RPI = \frac{\text{Reticulocyte (\%)} \times \frac{Hct_{\text{patient}}}{Hct_{\text{normal}}}}{\text{Maturation Time in Days}}$$

(زمان بلوغ بر اساس Hct معمولاً بین ۱ تا ۲.۵ روز در نظر گرفته می‌شود).

- $RPI > 2 - 3$: پاسخ مناسب مغز استخوان به همولیز یا خونریزی.
- $RPI < 2$: نارسایی تولید مغز استخوان (آپلازی، فقر آهن، فقر فولات/B12).

۲. کسر رتیکولوسیت نابالغ (IRF) و کسر پلاکتی نابالغ (IPF)

- IRF (Immature Reticulocyte Fraction): رتیکولوسیت‌هایی با فلورسانس بالا (محتوای RNA بیشتر) که زودترین نشانه ریکاوری مغز استخوان پس از پیوند سلول‌های بنیادی یا شیمی‌درمانی هستند.
- IPF (Immature Platelet Fraction): پلاکت‌های مشبک جوان با اندازه بزرگتر و حاوی mRNA؛ تمایز ترومبوسیتوپنی ناشی از تخریب محیطی (مانند ITP که IPF بالا دارد) از نقص تولید مرکزی (مانند آپلازی مغز استخوان که IPF پایین دارد).

بخش ۵: تست‌های انعقادی پایه (Coagulation & Hemostasis)

۱. تست زمان پروترومبین (PT) و نسبت بین‌المللی نرمال شده (INR)

- ارزیابی مسیر: مسیر خارجی (Extrinsic) و مشترک (عوامل I, II, V, VII, X).
- معرف: ترومبوپلاستین بافتی + کلسیم ($\text{Tissue Factor} + \text{CaCl}_2$).
- محاسبه INR:

$$INR = \left(\frac{PT_{\text{patient}}}{PT_{\text{control, geometric mean}}} \right)^{ISI}$$

(که ISI شاخص حساسیت بین‌المللی معرف ترومبوپلاستین است).

۲. تست زمان ترومبوپلاستین نسبی فعال شده (aPTT)

- ارزیابی مسیر: مسیر داخلی (Intrinsic) و مشترک (عوامل VIII, IX, XI, XII و فاکتورهای تماسی).
- معرف: فعال‌کننده سطحی فاز تماس (مانند کائولن، سیلیکا یا لائیک اسید) + فسفولیپید جزئی + کلسیم.
- بررسی اختلال (Mixing Study): اگر aPTT طولانی باشد، مخلوط ۱:۱ پلاسمای بیمار و پلاسمای نرمال انکوبه می‌شود:

○ اصلاح (Correction): نشان‌دهنده کمبود فاکتور انعقادی است.

○ عدم اصلاح (No Correction): نشان‌دهنده وجود مهارکننده (Inhibitor) مانند آنتی‌کواگولانت لوپوس (Lupus Anticoagulant) یا آنتی‌بادی ضد فاکتور VIII.

اختلالات هماتولوژیک از نقص در تکوین، تمایز، عملکرد یا بقای رده‌های سلولی مشتق از سلول‌های بنیادی خونساز پلوری پوتنت (HSCs) در مغز استخوان ناشی می‌شوند. این اختلالات بر اساس رده سلولی درگیر و ماهیت پاتولوژیک (نئوپلاستیک در برابر غیرنئوپلاستیک، کمی در برابر کیفی) طبقه‌بندی می‌شوند:

۱. اختلالات رده اریتروئیدی (گلبول‌های قرمز - Erythrocytes)

گلبول‌های قرمز وظیفه انتقال گازهای تنفسی از طریق هموگلوبین را بر عهده دارند. اختلالات این رده عمدتاً شامل دو طیف است:

- کم‌خونی‌ها (Anemias): کاهش توده گلبول قرمز ($Hb < 13.0 \text{ g/dL}$ در مردان و $< 12.0 \text{ g/dL}$ در زنان):
 - میکروسیتیک هایپوکروم ($MCV < 80 \text{ fL}$): اختلال در سنتز هم (فقر آهن، آنمی بیماری مزمن) یا سنتز زنجیره‌های گلوبین (تالاسمی‌های α و β).
 - ماکروسیتیک ($MCV > 100 \text{ fL}$): مگالوبلاستیک به دلیل نقص سنتز DNA ناشی از کمبود ویتامین B_{12} یا فولات (همراه با هیپرسگمانتاسیون نوتروفیل‌ها در لام)، یا غیرمگالوبلاستیک (هیپوتیرئیدی، الکلیسم و میلودیسپلازی).

○ نرموسیتیک / همولیتیک: کوتاهی طول عمر RBC (کمتر از ۱۲۰ روز طبیعی) به علل درون‌گلبولی (نقص آنزیمی مثل فاویسم/ $G6PD$ ، نقایص غشایی مانند اسفروسیتوز ارثی، یا هموگلوبینوپاتی داسی‌شکل) و علل برون‌گلبولی (آنمی همولیتیک خودایمن - AIHA، تخریب مکانیکی میکروآنژیوپاتیک نظیر TTP و DIC).

- پلی‌سیتمی‌ها (Erythrocytosis): افزایش توده RBC ($Hct > 49\%$ در مردان، $> 48\%$ در زنان) که می‌تواند ثانویه به هیپوکسی/افزایش اریتروپویتین باشد یا اولیه و نئوپلاستیک ناشی از جهش کلونال، مانند پلی‌سیتمی ورا (Polycythemia Vera) با جهش شایع $JAK2^{V617F}$.

۲. اختلالات رده لکوسیتی (گلبول‌های سفید - Leukocytes)

لکوسیت‌ها شامل گرانولوسیت‌ها (نوتروفیل، ائوزینوفیل، بازوفیل)، مونوسیت‌ها و لنفوسیت‌ها هستند که سیستم دفاعی و ایمنی را شکل می‌دهند.

- اختلالات واکنشی و کمی (Non-neoplastic):

- نوتروپنی و آگرانولوسیتوز ($ANC < \frac{1500}{\mu L}$ یا $< \frac{500}{\mu L}$): ناشی از تهاجم مغز استخوان، داروها، یا تخریب ایمنی که فرد را مستعد عفونت‌های کشنده باکتریایی و قارچی می‌کند.

- لکوسیتوز واکنشی و واکنش لوکموئید: افزایش نوتروفیل‌ها با انحراف به چپ (Left Shift) در عفونت‌ها و التهاب‌های شدید؛ همراه با گرانولاسیون توکسیک و اجسام دول (Döhle bodies).

- بدخیمی‌های خونی (Hematologic Malignancies):

- لوسمی‌های حاد (ALL و AML): تجمع و کلونالیزاسیون سلول‌های بلاست نارس ($\geq 20\%$ در خون محیطی یا مغز استخوان) و توقف تمایز سلولی که منجر به نارسایی حاد مغز استخوان (سیتوپنی سه‌گانه) می‌شود. در AML، وجود اجسام آور (Auer rods) نشانه اختصاصی است.

- اختلالات میلوپرولیفراتیو مزمن (مانند CML): ناشی از جابجایی کروموزومی $(9;22)(q34;q11.2)$ و تشکیل ژن اتصال $BCR::ABL1$ با فعالیت تیروزین کینازی بالا که منجر به تکثیر کنترل‌نشده رده میلوئیدی با طیف کاملی از پیش‌سازها در لام می‌شود.

- اختلالات لنفوپرولیفراتیو و پلاسماسل: لوسمی لنفوسیتی مزمن (CLL با سلول‌های مشخصه Smudge cells)، لنفوم‌های هاجکین و غیرهاجکین، و میلوم مولتیپل (Multiple Myeloma) که با تکثیر کلونال پلاسماسل‌ها، پروتئینوری Bence-Jones و ترشح ایمونوگلوبولین مونوکلونال (M-protein) همراه است.

۳. اختلالات رده مگاکاریوسیتی و پلاکتی (Platelets & Megakaryocytes)

پلاکت‌ها قطعات سیتوپلاسمی بدون هسته هستند که از مگاکاریوسیت‌های مغز استخوان جوانه می‌زنند و مسئول هموستاز اولیه هستند.

- ترومبوسیتوپنی‌ها (کاهش شمارش پلاکت $< 150,000/\mu L$):

- نقص تولید مغز استخوان: آپلازی، میلودیسپلازی یا مهار دارویی (همراه با کاهش مگاکاریوسیت‌ها و کاهش کسر پلاکتی نابالغ - IPF).

- تخریب محیطی با واسطه ایمنی: ترومبوسیتوپنی ایمنی (ITP) که با تخریب با واسطه اتوآنتی‌بادی‌های ضد GPIIb/IIIa و افزایش پلاکتی مشبک/جوان همراه است.

- میکروآنژیوپاتی‌های ترومبوتیک (TMA): پورپورای ترومبوسیتوپنیک ترومبوتیک (TTP) ناشی از نقص آنزیم ADAMTS13، سندرم همولیتیک-اورمیک (HUS) و سندرم HELLP در بارداری که مصرف شدید پلاکت همزمان با تشکیل لخته‌های میکروواسکولار و تخریب مکانیکی RBC (ایجاد سیستوسیت) دارند.

• اختلالات کیفی پلاکت (Thrombocytopathies):

- شمارش پلاکت ممکن است طبیعی باشد اما تست‌های عملکردی (مانند Aggregometry یا PFA) مختل هستند؛ نظیر سندرم برنارد-سولیه (نقص کمپلکس گیرنده GPIb/IX/V) و ترومباستنی گلانزمن (نقص گیرنده GPIIb/IIIa).

۴. سندرم‌های میلودیسپلاستیک (Myelodysplastic Syndromes - MDS)

ناهنجاری‌های سلول بنیادی خونساز که مشخصه آن‌ها خونسازی ناکارآمد (Ineffective Hematopoiesis)، دیسپلازی مورفولوژیک در یک یا چند رده سلولی (مانند نوتروفیل‌های هیپوگرانولار یا با هسته دوتایی Pelger-Huët، سیدروبلاست‌های حلقوی)، سیتوپنی محیطی و خطر بالای ترانسفورماسیون به لوسمی میلوئیدی حاد (AML) است.

تشخیص دقیق لوسمی‌ها امروزه مبتنی بر رویکرد تلفیقی پنج‌گانه است: مورفولوژی خون و مغز استخوان، سیتوشیمی، فلوسایتومتری (Immunophenotyping)، سیتوژنتیک (Karyotype/FISH) و ژنتیک مولکولی (PCR/NGS) که مبنای طبقه‌بندی‌های نوین سازمان جهانی بهداشت (WHO 5th Edition / ICC) قرار دارد.

۱. لوسمی میلوئیدی حاد (Acute Myeloid Leukemia - AML)

معیار تشخیصی پایه

- حضور حداقل ۲۰٪ میلوبلاست در آسپیره مغز استخوان یا خون محیطی.
- استثنای تشخیصی (Genetic-defined AML): در صورت وجود برخی بازآرایی‌های ژنتیکی شاخص (مانند $t(8; 21)$ یا $inv(16)$ یا $PML::RARA$)، صرف‌نظر از درصد بلاست‌ها (حتی کمتر از ۲۰٪)، بیماری مستقیماً AML تعریف می‌شود.

ابزارهای تشخیصی اختصاصی

۱. مورفولوژی و سیتوشیمی:

- میلوبلاست‌ها: سلول‌های بزرگ با سیتوپلاسم متوسط تا وسیع، کروماتین باز و دانه‌ای، هستک‌های مشخص و حضور اختصاصی اجسام آور (Auer Rods) که از به هم پیوستن کریستالی گرانول‌های اولیه حاوی میل operoxidase تشکیل می‌شوند.

○ رنگ‌آمیزی‌های سیتوشیمیایی:

- میلوپروکسیداز (MPO) و سودان بلک B (SBB): در رده میلوئیدی قویاً مثبت.
- استراز غیراختصاصی (α -Naphthyl Acetate Esterase / NSE): در انواع مونوسیتی (AML-M4/M5) مثبت شده و با سدیم فلوراید (NaF) مهار می‌شود.

۲. ایمونوفنوتایپینگ با فلوسایتومتری:

- مارکرهای پیش‌ساز/سلول‌های بنیادی: $CD34^+$, $CD117^+$, $HLA-DR^+$.
- مارکرهای تمایز میلوئیدی: $CD13^+$, $CD33^+$, $cyMPO^+$ (قطعی‌ترین نشانگر برای نسبت دادن به رده میلوئیدی).
- مارکرهای تمایز مونوسیتی (در صورت درگیری رده مونوسیت): $CD14^+$, $CD64^+$, $CD11b^+$.
- مارکرهای مگاکاریوسیتی: $CD41^+$, $CD61^+$.

۳. لوسمی پرومیلوسیتی حاد (APL - سابقاً AML-M3):

- اورژانس هماتولوژیک: همراه با انعقاد داخل عروقی منتشر (DIC) شدید ناشی از ترشح فاکتور بافتی و انکسین II از گرانول‌ها.
- مورفولوژی: پرومیلوسیت‌های هایپرگرانولار، هسته‌های دوقسمتی با دسته‌های متراکم اجسام آور (Faggot Cells).
- ژنتیک اختصاصی: جابجایی $(q24.1; q21.2)$ $t(15; 17)$ و ایجاد پروتئین فیوژن $PML::RARA$ (پاسخ‌دهنده به درمان اختصاصی تمایزی با ATRA و آرسنیک تری‌اکسید).

۴. طبقه‌بندی پیش‌آگهی مولکولی بر اساس راهنمای ELN:

- مطلوب (Favorable): جهش $NPM1$ بدون جهش $FLT3-ITD$ ، جهش‌های $bZIP-CEBPA$ ، بازآرایی‌های فاکتور متصل‌شونده به هسته (CBF) شامل $RUNX1::RUNX1T1$ و $CBFB::MYH11$.
- نامطلوب (Adverse): جهش $TP53$ ، کاریوتیپ کمپلکس (≥ 3 ناهنجاری ساختاری/عددی)، جهش‌های همراه با میلودیسه‌پلازی ($ASXL1$, $RUNX1$, $SRSF2$, $U2AF1$) و نسبت آلی بالای $FLT3-ITD^{high}$.

۲. لوسمی لنفوبلاستی حاد (Acute Lymphoblastic Leukemia - ALL)

ابزارهای تشخیصی اختصاصی

۱. مورفولوژی و سیتوشیمی:

- لنفوبلاست‌ها: سلول‌هایی با نسبت هسته به سیتوپلاسم بسیار بالا (High N:C Ratio)، سیتوپلاسم محدود و بدون گرانول، کروماتین فشرده‌تر از میلو بلاست، هستک‌های کم‌وضوح یا نامشخص.
- سیتوشیمی: کاملاً منفی برای MPO و SBB؛ مثبت برای واکنش اسید پریدیگ-شیف (PAS) با نمای کلوخه‌ای (Coarse/Block-like Positivity).

۲. ایمونوفنوتایپینگ (تعیین رده B در برابر T):

- مارکر عمومی لنفوبلاست‌ها: ترانسفراز دئوکسی‌نوکلئوتیدیل ترمینال (TdT^+ در بیش از ۹۵٪ موارد).

○ B-ALL (شایع‌تر، حدود ۸۰ تا ۸۵٪):

• مثبت برای مارکرهای اولیه رده B: $CD19^+$, $cCD79a^+$, $Pax5^+$.

• تفکیک بر اساس مرحله بلوغ:

• $CD10^-$ Pro-B

• Common ALL (بسیار شایع در اطفال): $CD10^+$ (CALLA).

• Pre-B: وجود μ cy (زنجیره سنگین ایمنوگلوبولین سیتوپلاسمی).

○ T-ALL (حدود ۱۵ تا ۲۰٪، اغلب با توده مدیاستین و لنفوسیتوز شدید):

• مارکر قطعی لاین T: $CD3^+$ cy (فرم سیتوپلاسمی CD3).

• مارکرهای کمکی: $CD7^+$ (حساس‌ترین ولی غیراختصاصی)، $CD2^+$, $CD5^+$ ، و در مراحل بعدی $\frac{CD4}{CD8}$.

۳. ناهنجاری‌های ژنتیکی و سیتوژنتیک شاخص در B-ALL:

○ کروموزوم فیلادلفیا مثبت (Ph^+ ALL): جابجایی $(q34.1; q11.2)(9; 22)t$ ایجادکننده پروتئین انکوژنیک $BCR::ABL1$ (اغلب با وزن مولکولی $p190^{BCR::ABL1}$)؛ پیش‌آگهی کلاسیک نامطلوب که نیازمند افزودن مهارکننده‌های تیروزین کیناز (TKI) به رژیم درمانی است.

○ جابجایی ژن $(MLL)KMT2A$: بازآرایی‌های کروموزوم $11q23$ (شایع در نوزادان و اطفال <1 سال، همراه با پیش‌آگهی بسیار نامطلوب).

○ $ETV6::RUNX1$ یا $t(12; 21)$: شایع‌ترین ضایعه در اطفال، با پیش‌آگهی عالی.

○ هایپرپلوئیدی بالا (> 50 کروموزوم): پیش‌آگهی بسیار مطلوب در برابر هایپوپلوئیدی (<44 کروموزوم) با پیش‌آگهی وخیم.

۳. لوسمی میلوئیدی مزمن (Chronic Myeloid Leukemia - CML)

یک نئوپلاسم میلوپرولیفراتیو کلونال که مشخصه آن تولید بیش از حد پیش‌سازها و سلول‌های بالغ رده گرانولوسیتی است.

مراحل تشخیصی

۱. لام خون محیطی و مغز استخوان:

○ لکوسیتوز شدید: معمولاً ۵۰,۰۰۰ تا فراتر از $\frac{200,000}{\mu L}$.

○ طیف کامل تمایز میلوئیدی: از میلو بلاست تا نوتروفیل سگمانته با الگوی شاخص "برآمدگی میلو سیت‌ها" (Myelocyte Bulge: درصد میلو سیت‌ها $<$ متامیلوسیت‌ها).

○ بازوفیلی مطلق (یکی از پایدارترین نشانه‌ها) همراه با ائوزینوفیلی.

- امتیاز آلکالین فسفاتاز لکوسیتی (LAP/NAP Score): به شدت کاهش یافته یا نزدیک به صفر (ابزار سنتی تمایز CML از واکنش‌های لوکموئید ناشی از سپسیس که در آن‌ها LAP بسیار بالاست).

۲. فازبندی بالینی:

- فاز مزمن (Chronic Phase): بلاست‌ها $< 10\%$ در خون و مغز استخوان.
- فاز تسریع شده (Accelerated Phase): بلاست‌ها ۱۰ تا ۱۹٪، بازوفیل‌ها $\geq 20\%$ ، ترومبوسیتوپنی پایدار نامرتبط با درمان یا ترومبوسیتوز مقاوم.
- فاز بلستیک / بحران بلاست (Blast Crisis): بلاست‌ها $\geq 20\%$ یا وجود کلروما (تومور میلوئیدی خارج مدولاری)؛ در ۷۰٪ موارد به AML و در ۳۰٪ موارد به ALL ترانسفورم می‌شود.

۳. تست‌های قطعی سیتوژنتیک و مولکولی:

- کاریوتایپینگ/FISH: اثبات کروموزوم فیلادلفیا Ph^1 ناشی از جابجایی متعادل دوطرفه $t(9; 22)(q34.1; q11.2)$.

○ Quantitative RT-PCR (qPCR)

- تشخیص ترانس کریپت الحاقی $BCR::ABL1$ (عمدتاً فرم اصلی $p210^{BCR::ABL1}$ با الحاق‌های $e13a2$ یا $e14a2$).
- پایش پاسخ به درمان (Molecular Monitoring): گزارش نسبت $\frac{BCR::ABL1}{Control\ gene}$ طبق مقیاس استاندارد بین‌المللی (IS). دستیابی به پاسخ مولکولی مازور (MMR یا MR^3) یعنی کاهش بیان به زیر ۰.۱٪.

۴. لوسمی لنفوسیتی مزمن (Chronic Lymphocytic Leukemia - CLL)

شایع‌ترین لوسمی در بزرگسالان جوامع غربی ناشی از کلونالیزاسیون لنفوسیت‌های کوچک B با عمر طولانی و نقص در آپوپتوز.

معیارهای تشخیصی

۱. شمارش مطلق لنفوسیت‌ها (ALC):

- لنفوسیتوز B مونوکلونال پایدار $\geq 5 \times \frac{10^9}{L} \geq \frac{5000}{\mu L}$ در خون محیطی به مدت حداقل ۳ ماه.

۲. مورفولوژی خون محیطی:

- تجمع لنفوسیت‌های کوچک، گرد با هسته متراکم، کروماتین تکه‌تکه با نمای شاخص “توپ فوتبال” (Soccer-ball chromatin)، بدون هستک مشخص و با حاشیه سیتوپلاسمی بسیار باریک.
- سلول‌های لکه‌شده یا بسکت (Smudge Cells / Gumprecht Shadows): به دلیل شکنندگی مکانیکی بالای غشای این لنفوسیت‌ها حین گسترش خون ایجاد می‌شوند (افزودن یک قطره آلبومین گاوی به نمونه مانع از تخریب آن‌ها روی لام می‌شود).

۳. پانل ایمونوفنوتایپینگ اختصاصی (سیستم امتیازدهی Matutes):

- هم‌بیانی نابجای مارکر T با مارکرهای رده B: $CD5^+$, $CD19^+$.
- مارکرهای تاییدکننده CLL کلاسیک:
- $CD23^+$ (در لنفوم مانتل منفی است؛ افتراق بسیار کلیدی).
- بیان بسیار ضعیف (Dim) آنتی‌بادی سطحی (slg^{dim}) و بیان ضعیف $CD20^{dim}$.
- منفی بودن مارکر $FMC7^-$ و $CD79b^{dim/-}$.
- تعیین زنجیره سبک ایمونوگلوبولین (Light Chain Restriction): انحصار بیان به زنجیره κ یا λ جهت اثبات کلونالیتی.
- ۴. بیومارکرهای پیش‌آگهی و مولکولی:

- وضعیت جهش ژن ناحیه متغیر زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین ($IGHV$):
- جهش‌یافته (Mutated)، با تشابه $<98\%$ با توالی ژرم‌لاین: سیر بسیار آرام و پیش‌آگهی عالی.
- جهش‌نیافته (Unmutated)، با تشابه $\geq 98\%$: بیماری تهاجمی‌تر و پاسخ ضعیف‌تر به درمان‌های سنتی.
- سیتوژنتیک مولکولی اینترفاز (FISH):
- $del(13q)$ ایزوله: شایع‌ترین اختلال ($\approx 55\%$) و حامل پیش‌آگهی بسیار مطلوب.
- تریزومی ۱۲: پیش‌آگهی متوسط.
- $del(11q)$ (محل ژن ATM): پیش‌آگهی نامطلوب با لنفادنوپاتی گسترده.
- $del(17p)$ (محل ژن سرکوب‌گر تومور $TP53$): بدترین پیش‌آگهی، مقاوم به کمورژیم‌های پایه آلکیلان/فلودارابین؛ نیازمند درمان اختصاصی با مهارکننده‌های BTK (مانند ایبروتینیب) یا مهارکننده‌های BCL-2 (مانند ونتوکلاکس).

راجب لوسمی‌های میلوئیدی شرح بیشتری بنویس

لوسمی‌های میلوئیدی گروهی هتروژن از بدخیمی‌های بافت خونساز هستند که در اثر تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی در سلول بنیادی خونساز (HSC) یا پیش‌سازهای میلوئیدی متعهد (CMP) ایجاد می‌شوند. وجه اشتراک این رده از بیماری‌ها، اختلال در کنترل تکثیر، مسدود شدن مسیر بلوغ فیزیولوژیک (Maturation Arrest) و مقاومت به آپوپتوز در رده‌های گرانولوسیتی، مونوسیتی، اریترئوئیدی و مگاکاریوسیتی است.

۱. پاتوفیزیولوژی مولکولی و مکانیسم‌های لوسموژنز (Leukemogenesis)

از منظر بیولوژی مولکولی، شکل‌گیری نئوپلاسم‌های میلوئیدی حاصل تجمع جهش‌های کلونال در طی زمان است:

الف) فرضیه دو ضربه‌ای کلاسیک و بازنگری نوین

- جهش‌های کلاس I (فعال‌کننده مسیرهای سیگنالینگ پروليفراتیو):

- شامل جهش‌های فعال‌کننده در تیروزین‌کینازهای گیرنده‌ای و انکوژن‌های مسیرهای آبخاری نظیر *FLT3* (جهش‌های *FLT3-ITD* و *FLT3-TKD*)، *c-KIT*، *NRAS*، *KRAS* و *JAK2*. این جهش‌ها مزیت بقا و تکثیر سریع به سلول می‌دهند.
- جهش‌های کلاس II (مهار تمایز و خاموشی فاکتورهای رونویسی):
 - منجر به توقف تمایز رده میلوئیدی و تجمع بلاست‌ها می‌شوند؛ از جمله همجوشی‌های فاکتورهای متصل به هسته (*RUNX1::RUNX1T1* و *CBFB::MYH11*) و نوآرایی‌های زنجیره رتینوئیک اسید (*PML::RARA*).
 - جهش‌های اپی‌ژنتیک و تنظیم‌کننده‌های اسپلایسوزوم (جهش‌های پیش‌ساز/مقدماتی):
 - متیلاسیون DNA (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1*, *IDH2*).
 - تغییرات کروماتین (*ASXL1*, *EZH2*).
 - کمپلکس اسپلایسوزوم (*SRSF2*, *U2AF1*, *SF3B1*).
 - این جهش‌ها اغلب در مرحله خونسازی کلونال با پتانسیل نامشخص (CHIP) آغاز شده و زمینه را برای جهش‌های ثانویه و ترانسفورماسیون لوسمیک فراهم می‌کنند.

۲. لوسمی میلوئیدی حاد (Acute Myeloid Leukemia - AML)

در سیستم‌های نوین طبقه‌بندی (WHO 5th Edition 2022 و ICC 2022)، تأکید اصلی از مورفولوژی صرف به ژنتیک مولکولی تغییر یافته است.

الف) طبقه‌بندی مبتنی بر ناهنجاری‌های ژنتیکی شاخص (AML with Defining Genetic Abnormalities)

در حضور این ناهنجاری‌ها، آستانه تشخیصی ۲۰٪ بلاست الزامی نبوده و حتی با درصدهای پایین‌تر نیز بیماری، AML در نظر گرفته می‌شود:

۱. AML با *PML::RARA* یا $t(15; 17)(q24.1; q21.2)$ (لوسمی پرومیلوسیتی حاد - APL):

- نقص در گیرنده رتینوئیک اسید آلفا ($RAR\alpha$) منجر به توقف تمایز در مرحله پرومیلوسیت می‌شود.
- کواگولوپاتی حاد: ترشح شدید فاکتور بافتی (Tissue Factor) و میکروذرات پروکواگولانت همراه با هایپرفیبرینولیز اولیه ناشی از بیان انکسین II، سندرم DIC کشنده ایجاد می‌کند.

۲. Core-Binding Factor (CBF) AML

- شامل $t(8; 21)(q22; q22.1)$ تشکیل‌دهنده *RUNX1::RUNX1T1* و $inv(16)(p13.1q22)$ یا $t(16; 16)$ تشکیل‌دهنده *CBFB::MYH11*.

- در لام مغز استخوان اغلب ائوزینوفیل‌های غیرطبیعی با گرانول‌های ارغوانی درشت (در نوع $inv(16)$) دیده می‌شود و پاسخ درمانی عالی به رژیم‌های مبتنی بر دوز بالای سایتارابین (HiDAC) دارند.

۳. AML با بازآرایی $KMT2A(11q23.2)$:

- اغلب مورفولوژی مونوبلاستیک یا میلو مونوسیتی، تهاجم خارج مدولاری (نظیر هایپر تروفی لته و درگیری سیستم عصبی مرکزی) و پیش آگهی ضعیف.

۴. AML با جهش $NPM1$:

- در ۳۰٪ بزرگسالان، وابسته به جابجایی پروتئین نوکلئوفوسمین به سیتوپلاسم، عموماً در کاریوتیپ نرمال، بدون وجود $FLT3-ITD$ با پیش آگهی بسیار مطلوب همراه است.

۵. AML مرتبط با میلودیسیپلازی (AML-MR):

- حضور جهش در ژن های اختصاصی دیسیپلازی ($ASXL1, BCOR, EZH2, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, ZRSR2$) یا ناهنجاری های کاریوتیپیک مانند $del(5q), -7, del(7q)$ ؛ معمولاً مقاوم به کموتراپی استاندارد ۳ + ۷.

(ب) ایمونوفنوتایپینگ تشخیصی با فلوسایتومتری چندرنگ

استراتژی درجه بندی اصلی بر اساس $CD45$ در برابر Side Scatter (SSC) است. بلاست های میلو بلاستی بیان ضعیف $CD45^{dim}$ و گرانولاریته کم دارند:

- پیش سازها: $CD34^+, CD117^+, HLA-DR^+$.
- لاین میلوئیدی: $cyMPO^+$ (اختصاصی ترین مارکر رده)، $CD13^+, CD33^+, CD15^+$.
- تمایز مونوسیتی: $CD4^+, CD36^+, CD11b^+, CD14^+, CD64^+$.
- تمایز مگاکاریوسیتی: $CD41^+ (GPIIb), CD61^+ (GPIIIa)$.
- تمایز اریثروئیدی: $CD235a^+ (Glycophorin A), CD71^+ (Transferrin Receptor)$.

(ج) سیستم طبقه بندی خطر ژنتیکی بر اساس رهنمود شبکه ای بین المللی (ELN 2022)

content_copy

گروه خطر (Risk)
اختلالات ژنتیکی و سیتوژنتیک شاخص
(Category)

مطلوب
(Favorable)
• $CBFB::MYH11$ جهش $NPM1$ بدون جهش های تیپ میلودیسیپلازی • $inv(16)(p13.1q22) \cdot RUNX1::RUNX1T1$ / $t(8;21)(q22;q22.1)$
درون کادری لوپ bZIP ژن $CEBPA$

متوسط
(Intermediate)
• کاریوتیپ طبیعی یا سیتوژنتیک غیر قابل دسته بندی در مطلوب/نامطلوب • جهش $NPM1$ همزمان با $FLT3-ITD$ با نسبت آلی بالا • $MLLT3::KMT2A$ / $t(9;11)(p21.3;q23.3)$

گروه خطر (Risk Category)
اختلالات ژنتیکی و سیتوژنتیک شاخص

• کاریوتیپ کمپلکس (≥ 3 ناهنجاری ساختاری/عددی) • اختلالات کروموزوم‌های ۵ و ۷ (مانند $(-5, del(5q), -7$ نامطلوب
• بازآرایی‌های ژن *MECOM* در $3q26.2$ • جهش‌های مرتبط با
• میلودیسیپلازی (*ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, ...*) • جهش در ژن سرکوب‌کننده
(Adverse)
TP53 (همراه با مقاومت درمانی بالا)

۳. نئوپلاسم‌های میلوپرولیفراتیو مزمن (MPN) با تمرکز بر CML

نئوپلاسم‌های با تکثیر کلونال موثر و افزایش رده‌های بالغ خونی:

الف) لوسمی میلوئیدی مزمن (CML):

- رویداد آغازگر: جابجایی متقابل متعادل ($t(9; 22)(q34.1; q11.2)$ ؛ قرارگیری ژن *ABL1* (یک تیروزین کیناز تنظیمی روی کروموزوم ۹) در مجاورت اگزون‌های ژن *BCR* روی کروموزوم ۲۲.
- پروتئین کیناز کایمیریک: پروتئین ادغامی انکوژنیک *p210^{BCR::ABL1}* با دُمین تیروزین کینازی دائماً فعال (Constitutively Active Tyrosine Kinase).
- مسیرهای پیام‌رسانی فعال‌شده: فسفوریلاسیون آبشاری پروتئین‌های *STAT5*، $\frac{RAS}{RAF}$ و $\frac{PI3K}{AKT}$ و $\frac{MAPK}$ که منتهی به مهار آپوپتوز و هایپرپرولیفراسیون پیش‌سازهای میلوئیدی و خروج آن‌ها از استروما به جریان خون می‌شود.
- مکانیسم‌های مقاومت دارویی:

○ مقاومت وابسته به کیناز در برابر مهارکننده‌های نسل ۱ و ۲ (TKI) مانند ایماتینیب، داساتینیب، نیلوتینیب).

○ شایع‌ترین جهش دروازه‌بان (Gatekeeper Mutation): جهش نقطه ای ترئونین به ایزولوسین در کدون ۳۱۵ (*T315I*) که پیوندهای هیدروژنی داروها را مختل ساخته و نیازمند تجویز مهارکننده‌های نسل سوم (پوناتینیب) یا مهارکننده آلوستریک اختصاصی پاکت STAMP (آسیمینیب) است.

۴. بیماری‌های بینابینی میلودیسیپلاستیک/میلوپرولیفراتیو (MDS/MPN Overlap)

این گروه دارای خصوصیات همزمان دیسپلازی (خونسازی ناکارآمد) و پرولیفراسیون لکوسیتی هستند:

لوسمی میلومونوسیتی مزمن (Chronic Myelomonocytic Leukemia - CMML)

• معیار تشخیصی اختصاصی:

○ مونوسیتوز پایدار خون محیطی $\geq 1.0 \times \frac{10^9}{L}$ ($\geq \frac{1000}{\mu L}$) همراه با این شرط که مونوسیت‌ها حداقل ۱۰٪ از کل لکوسیت‌های خون محیطی را تشکیل دهند.

○ فقدان کروموزوم فیلادلفیا یا بازآرایی‌های *PDGFRA, PDGFRB, FGFR1*

○ بلاست‌ها کمتر از ۲۰٪ در خون و مغز استخوان.

• زیرگروه‌ها:

○ فرم میلودیسپلاستیک (MDS-CMML): شمارش لکوسیت $\frac{000}{\mu L} < 13$.

○ فرم میلوپرولیفراتیو (MPN-CMML): شمارش لکوسیت $\frac{13,000}{\mu L} \geq$ غالباً همراه با طحال بزرگ و نارسایی بالینی مشهودتر).

• پروفایل ژنتیکی شایع: جهش همزمان در ژن‌های اسپلیسوزوم (*SRSF2*)، متیلاسیون (*TET2*) و سیگنالینگ $\left(\frac{KRAS}{NRAS}\right)$.

۵. پایش بیماری باقیمانده قابل اندازه‌گیری (MRD - Measurable Residual Disease)

ارزیابی MRD کلیدی‌ترین شاخص پیش‌بینی عود و تصمیم‌گیری برای پیوند آلودنیک سلول‌های بنیادی خونساز (allo-HSCT) است:

۱. Multiparametric Flow Cytometry (MFC-MRD):

○ ارزیابی همزمان ۸ تا ۱۰ رنگ فلورسنت جهت شناسایی فنوتیپ‌های ایمونولوژیک وابسته به لوسمی (LAIP) و پایش تمایزات خارج از قاعده طبیعی مغز استخوان (Different-from-Normal / DfN).

○ آستانه حساسیت: توانایی تشخیص ۱ بلاست لوسمیک در 10^4 یا 10^5 سلول طبیعی (10^{-4} تا 10^{-5}).

۲. Real-Time Quantitative PCR (RT-qPCR) و Digital Droplet PCR (ddPCR):

○ استاندارد طلایی پایش در مواردی با ترانس‌کریپت فیوژن مشخص

(*PML::RARA*, *RUNX1::RUNX1T1*, *BCR::ABL1*) یا جهش‌های کلیدی مانند *NPM1*.

○ حساسیت بسیار بالا: تا سطح 10^{-6} (شناسایی ۱ نسخه جهش‌یافته در میان یک میلیون نسخه طبیعی).

۳. Next-Generation Sequencing (NGS-MRD):

○ تعیین توالی پنل‌های تارگت چندژنی جهت ردگیری کلون‌های لوسمیک باقیمانده و شناسایی پدیده تکامل کلونال (Clonal Evolution) در زمان مقاومت و عود بالینی.

