# DEDICATION

- *To my family for their good-natured forbearance with the process and for their pride in this accomplishment and for being a source of encouragement and inspiration to me throughout my life, this thesis is dedicated to them who taught me that the best kind of knowledge to have is that which is learned for its own sake.*
- *To Ibn Kathir, Jabal Towaq, Alfaisal ( primary , intermediate, and secondary school) teaching staff, friends and colleagues my special regards to all of them because of their kindness I feel, was able to reach a stage where I could write this thesis.*
- *To Sudan University for Science and Technology teaching staff, friends and colleagues for their unconditional love and support.*
- *To my teacher Ustaz Majed Abdallah Alhujailan, for encouraging me to undertake the honours programme who taught me another aspect of life, that, "goodness can never be defied and good human beings can never be denied".*
- *To my special friends Mohamed Makki, Hashim Mahmoud, Mohi eldin Hashim, Khalid Mobarak, Mohamed Abobakr and Nazar Norien whose friendship, hospitality, knowledge, and wisdom have supported, enlightened, and entertained me over the many years of our friendship.*
- *To all patients, who have contributed in this work thank you from my bottom of heart for your efforts and continued dedication to participate in the study.*

# *ACKNOWLEDGEMENT*

*The work presented in this thesis would not have been possible without my close association with many people. I take this opportunity to extend my sincere gratitude and appreciation to all those who made this Ph.D. thesis possible.*

*First and foremost, I would like to express deepest gratitude to my supervisor dr. Ihsan Mohamed Osman MBBS, M.D. Pathology Associate Professor; Alzaiem Alazhri University for introducing me to this exciting field of science and for her dedicated help, advice, , encouragement and continuous support, throughout my Ph.D thesis.*

*I express my heart-felt gratitude to my Co-supervisor Dr. Mohamed Seddig (Dean of the faculty of medical laboratory Sciences at Sudan University of science and technology), for his continuous support, guidance, cooperation and especially for his confidence in me.*

*My sincere thanks go to Prof. Hussein M. Ahmed (consultant Oncologist) for offering me the internship opportunity in Western General Hospital, Edinburgh, Scotland in Flow cytometry laboratory which helped me a lot in my research. Also I would like to extend my appreciation to all RICK's staff for their friendship, trust and support.*

*I was very much privileged to learn from Dr. Malcolm Holgate head department of flow cytometry lab at Western General Hospital and Dr. Kenny Walker head department of Flow cytometer lab at Royal Hospital for Sick Children in Edinburgh, Scotland my flow cytometry teachers. I gained a lot from them I owe them my field study was made less obstacle ridden because of their effort.*

*My special words of thanks to my fellow lab mates, Tagreed, Tayseer and Hameeda for always being there and bearing with me the good and bad times during my wonderful days of Ph.D. for their valuable support and collaboration that made the lab a friendly environment for working.*

*My special thanks and highly appreciation to my friend Eman Abass (Senior molecular biology technologist) to her kindly support in every part of this thesis.*

*I share the credit of my work with Dr. Enaam Abdulrahman, Dr. Manal Mustafa, Dr. Amira A. Khalid, Dr. Abeer Bashir, Dr. Alyaaa A. Salman and Dr. Khalid Eljak and Dr. Tasneem Altahir for the discussion and interpretation of results presented in this thesis and support that I believed I learned from the best.*

*I owe my deepest gratitude to Dr. Hussin Jad Alkareem and Dr. Zahir Abbas whose have been invaluable on both an academic and a personal level, for which I am extremely grateful and for enlightening me the first glance of research*

*I am also indebted to my friend Tarig Karfis for his spiritual support is indispensable to sustain me to complete this thesis.*

*I cannot find words to express my gratitude to Eng. Mohamed Abubakr and Eng. Ezzadien Obaid, for providing me the engineering needs and software programs that I used in this research.*

*I am extremely grateful to Awad Mohamed and Ali Abdulaal for their extended support in statistical data analysis.*

*I would like to thank Uncle Alkheir O.Gangal for his good company and support. I am most grateful to El Yazeed Nimir for helping regarding the research methods which have been available and reliable methods.*

# Abstract

Flow cytometer (FC) became one of the most pivotal and definitive techniques in the diagnosis and classification of mature B cell neoplasm (MBCN). Since flow cytometer exploits the laser and photomultiplier technology for reliable high quality result with extremely high sensitivity and specificity, we used these important specifications in this cross sectional descriptive hospital based study to study the properties of B cells in the adult Sudanese patients whose have initial diagnosis as mature B cell neoplasm in the period of October 2010 and March 2013.

For the studying of these properties, we depended up on the evaluation of immunophenotypic antibodies using in the diagnosis and classification of MBCN against (CD45, HLA, CD34, CD3, CD5, CD23, CD22, CD79b, FMC7, Kappa, Lambda, CD10, CD11c, CD25 and CD103) with calculation of the mean of their flow cytometric parameters for each markers (Percentage, Fluorescence Intensity and Positive Peak Width), and focusing on the substantial feature which important in differentiation between CLL and other NHL. Also we evaluated the best type of sample between venous blood, bone marrow aspiration and lymph node aspiration in the highlighting of accurate result of markers.

One hundred and forty-six samples were conducted. (17.7 %) was lymph nodes (LN) samples, (48.8 %) was bone marrow (BM) samples and (33.5%) was venous blood samples. We prepared the lymph node samples which collected as Fine Needle Aspirations in a 3.0 ml PBS (pH=7.2), Mononuclear cells for flow cytometry preparation were separated from LN and BM samples using HISTOPAQUE-1077. Mononuclear cells from LN suspensions, BM suspensions and PB samples were conjugated with fluorescence labelled antibodies in the dark place. Tubes of kappa and lambda were going through washing procedure for 3 times by PBS before adding of Abs. Then all tubes were analyzed by flow cytometer and all flow cytometric parameters were recorded for each marker.

Data acquisition and analysis were performed with an EPICS XL Beckman Coulter flow cytometer and SYSTEM II software. Both 3 and 4 color protocols were performed using CD45 and light scatter gating system to identify cell populations and exclude the cells debris.

The majority (70%) of MBCN were males and the rest were females (30%). The mean age was (60.7) years. (66.5%) of patients had initial diagnosis as CLL, (28.7%) diagnosed as NHL and (4.8%) were normal samples. The sub-classification of NHL was done

and there were (6) cases diagnosed as DLBCL, (13) cases as PLL, (2) cases as MCL, (2) cases as LPL, (1) case as SLVL, (2) cases as FL, (1) case as Hairy cell leukaemia and (17) cases had inconclusive diagnosis. The mean Hb% value for MBCN patients was (84.7 %), (82 X $10^3$) for TWBC mean, (164.4 X $10^{3)}$ for platelets mean and (78.6%) for lymphocytes mean.

CD45 showed an important role in the identification of MBCN (p.value = 0.0021). CD45 Min had significant difference between CLL and NHL (p.value = 0.004). CD34 was insignificant for diagnosis of MBCN or differentiation between CLL and NHL (p.value = 0.598). While HLA-DR could differentiate between them (p.value = 0.001). When we used CD20 and CD19 together, they showed very high significant values to differentiate between CLL and NHL. NHL cases showed high CD20 Min than CLL cases (p.value = 0.000), high CD20Min:CD19Min ratio (p.value = 0.000) and low CD20 Pw (p.value = 0.000).

The immunophenotyping features of CLL was (s+ve CD45, -ve CD34, +ve HLA, +ve CD19, w+ve/-ve CD20, +ve CD5, +ve CD23, -ve/w+ CD22, -ve/w+ CD79b, -ve/w+ Ig), while the immunophenotyping of NHL was (s+ve CD45, -ve CD34, +ve HLA, +ve VD19, s+ve CD20, -ve or +ve CD5, -ve/rare +ve CD23, s+ve CD22, s+ve CD79b, s+ve Ig). The characteristic markers for diagnosis of hairy group were CD11c, CD25 and CD103 and for follicular lymphoma was CD10. Venous blood and LN samples showed the best results to differentiate between CLL and other NHL.

As a conclusion of this study, Flow cytometer have a very distinctive role in the diagnosis of MBCN and also ability to differentiate between CLL and NHL. Diversity of FC parameters can help in the minimization of markers following into the minimization of panel cost without affecting in the result accuracy like using of CD20 & CD19 with their flow cytometric parameters and without the other markers showed a significant role in the differentiation between the two diseases. MBCN immunophenotyping feature of Sudanese patients was not much differing from other immunophenotyping feature in the other world especially when using the scoring system of Matutes as a guide.

**ملخص الدراسة**

عداد الخلويات التدفقي (FC) اصبح واحدا من الأساليب الأكثر محورية وحسم استخداما في تشخيص وتصنيف اورام الخلويات البائية الناضجة (MBCN) منذ استغلال عداد الخلايا التدفقي لتكنولوجيا الليزر ومضخم الفوتونات للوصول الى نتيجة ذات جودة عالية مع حساسية وخصوصية مرتفعة للغاية ، استخدمنا هذه المواصفات الهامة في هذه الدراسة الوصفية لدراسة خصائص الخلايا بي في المرضى السودانيين البالغين المشخصين مبدئيا باورام خلايا بي الناضجة في الفترة من أكتوبر 2010 الى مارس 2013.

لدراسة هذه الخصائص، اعتمدنا على تقييم النمط المناعي الظاهري للاضداد المستخدمة في تشخيص وتصنيف اورام خلايا بي الناضجة مقابل (CD45، HLA، CD34، CD3، CD5، CD23، CD22، CD79b، FMC7، Kappa، Lambda، CD10، CD11c و، CD25 و CD103) مع حساب متوسط مؤشرات عداد الخلايا التدفقي لكل واسم (النسبة المئوية، كثافة ضور الفلورسنت وعرض المنحنى الايجابي)، والتركيز على الميزة الجوهرية والهامة في التفريق بين ابيضاض الدم اللمفي المزمن و لمفوم لا هودجكن الاخرى. أيضا قمنا بتقييم أفضل نوع من العينات بين الدم الوريدي ورشف نقي العظم والعقدة الليمفاوية في تسليط الضوء على نتائج دقيقة للواسمات.

تم الكشف عن مائة وستة وأربعين عينة. (17.7٪) كانت من العقد الليمفاوية (LN) ، (48.8٪) كانت من نقي العظم (BM) العينات و(33.5٪) كانت عينات الدم الوريدي. قمنا بتحضير عينات العقد اللمفاوية التي كانت على شكل عينات رشف الابر الناعمة في 3.0 مل من PBS (الرقم الهيدروجيني = 7.2)، الخلايا وحيدات النوى المعدة لعداد الخلايا التدفقي فصلت من نقي العظم والغدد اللمفاوية باستخدام محلول HISTOPAGUE-1077 . كانت الخلايا وحيدات النوى للـ LN، ومعلقات BM وعينات PB مرتبطة مع الأجسام المضادة الموسمة بالفلورسنت في مكان مظلم. أنابيب Kappaو Lambda كانوا في طريقهم من خلال إجراء الغسيل لمدة 3 مرات بواسطة PBS قبل اضافة الاجسام المضادة. ثم كانت جميع الأنابيب تحلل بواسطة عداد الخلاي التدفقي وسجلت جميع مؤشرات عداد الخلايا التدفقية لكل واسم.

تم اجراء تحليل البيانات باستخدام عداد الخلويات التدفقي EPICS XL بيكمان كولتر وبرنامج النظام الثاني. أجريت على حد سواء بروتوكولات اللون الثلاثي والرباعي باستخدام نظام العزل CD45 والضوء المبعثر للتعرف غلى فئات الخلاي واستبعاد حطام الخلايا.

كان هناك (70 بالمائة) من مرضى اورام خلايا بي الناضجة من الذكور و (30 بالمائة) من الإناث. وكان متوسط عمرهم (60.7) سنة. (66.5 بالمائة) من المرضى كان التشخيص الأولي لهم ابيضاض دم لمفي مزمن، (28.7 بالمائة) مشخصون بلمفوم لا هودجكن و (4.8 بالمائة) كانت عينات طبيعية. وقد تم عمل التصنيف الفرعي للمفوم لا هودجكن حيث كانت هناك (6) حالات تم تشخيصها باللمفوم المنتشر بالخلويات البائية الكبيرة، (13) حالة لمفوم بيلمفات

اللمفاوية، (حالتين) MCL، (حالتين) LPL، (حالة واحدة) SLVL، (حالتين) FL، و (حالة واحدة) لابيضاض الدم المزمن للخلويات الشعرية و(17) حالة غير محسومة التشخيص. وكان متوسط نسبة الهيموغلوبين المئوية لمرضى اورام الخلويات البائية الناضجة (84.7 بالمائة) ، ومتوسط مجموع خلايا الدم الابيض ($10^3$ × 82) ، ومتوسط الصفائح الدموية ($10^3$ X 164.4 ) ومتوسط الحلايا الليمفاوية (78.6 بالمائة).

وأظهرت الدراسة ان لـ CD45 دورا هاما في اكتشاف اورام الخلويات البائية الناضجة (قيمة p تساوي 0.002 ). اوجد CD45 Min دلالة فرقية بين ابيضاض دم اللمفي مزمن ولمفوم لا هودجكن (قيمة p تساوي 0.004 ). ولم يكن للـ CD34 اي دلالة في التشخيص اورام الخلويات البائية الناضجة أو التمييز بين ابيضاض دم لمفي مزمن ولمفوم لا هودجكن (قيمة p تساوي 0.598 ). بينما امكن HLA التفريق بينهما (قيمة p تساوي 0.001 ). وعند استخدام CD20 وCD19 ومعا فإنها أظهرت قيم ذات دلالات عالية جدا في التفريق بين ابيضاض دم لمفي مزمن ولمفوم لا هودجكن. وأظهرت حالات لمفوم لا هودجكن ارتفاعا في CD20 Min اكثر منها في حالات ابيضاض دم اللمفي مزمن (قيمة p تساوي 0.000 ). ، وارتفاع معدل CD20Min الى CD19Min (قيمة p تساوي 0.000 ) وانخفاضCD20 Pw (قيمة p تساوي 0.000 ).

وكانت السمات المناعية الظاهرية لابيضاض دم اللمفي مزمن (مرتفعة الايجابية للCD45، سلبية للـ CD34، ايجابية للـ HLA، ايجابية للـ CD19، منخفضة الايجابية او سلبية للـ CD20، ايجابية للـ CD5، ايجابية للـ CD23، سلبية او منخفضة الايجابية للـ CD22، سلبية او منخفضة الايجابية للـ CD79b، سلبية او منخفضة الايجابية للـ Ig )، بينما كانت السمات المناعية الظاهرية للمفوم لا هودجكن (مرتفعة الايجابية للـ CD45، سلبية للـ CD34، ايجابية للـ HLA، ايجابية للـ CD19، مرتفعة الايجابية للـ CD20، سلبية او ايجابية للـ CD5، سلبية او نادرا ماتكون ايجابية للـ CD23، مرتفعة الايجابية للـ CD22، مرتفعة الايجابية للـ CD79b، مرتفعة الايجابية للـ Ig) .

الواسمات المميزة لتشخيص مجموعة ابيضاض الدم المزمن للخلويات الشعرية كانت CD11c و CD25 و CD103، وللمفوما الجرابية كانت CD10. عينات الدم الوريدية وعينات العقد اللمفاوية اظهرت افضل النتائج للتفريق بين ابيضاض دم اللمفي مزمن و لمفوم لا هودجكن.

ملخص هذه الدراسة يبين ان عداد الخلايا التدفقي له دور مميز جدا في تشخيص اورام خلايا بي الناضجة والتفريق بين ابيضاض دم اللمفي مزمن لمفوم لا هودجكن. التنوع في مؤشرات عداد الخلايا الجرياني ساعد في تقليص الواسمات والذي ادى الى تقليل تكلفة مجموعة الواسمات من دون احداث تاثير على دقة النتيجة مثل استخدام CD20 و CD19 مع مؤشراتهما وبدون استخدام الواسمات الاخرى اظهرا دورا هاما في التفريق بين المرضين. الملامح المناعية الظاهرية لاورام خلايا بي الناضجة في المرضى السودانيين لم يختلف كثيرا عن الملامح المناعية الظاهرية للدول الاخرى خاصة عند استخدام نظام النقاط لماتيوتس كموجه.

## LIST OF CONTENTS

## LIST OF ABBREVIATIONS

| | | | |
|---|---|---|---|
| **ADCC** | Antibody Dependent Cell Mediated Cytotoxity | **MCL** | Mantle Cell Lymphoma |
| **ALL** | Acute Lymphoblastic Leukemia | **MDS** | Myelodysplastic syndrome |
| **BCR** | B Cell Receptor | **MFI** | Mean Fluorescence Intensity |
| **BL** | Burkitt Lymphoma | **MHC** | Majorhistocompatibility |
| **BM** | Bone Marrow | **MRD** | Minimal Residual Disease |
| **CD** | Cluster Differentiation | **MYC** | Myelocytomatosis |
| **CLL** | Chronic Lymphocytic Leukemia | **MZL** | Marginal Zone Lymphoma |
| **CNS** | Central Nervous System | **NHL** | Non-Hodgkin Lymphoma |
| **DF** | Degree of Freedom | **NK** | Natural Killer |
| **DLBCL** | Diffuse Large B Cell Lymphoma | **NPV** | Negative Predictive Value |
| **DNA** | Deoxyribonucleic acid | **PALS** | Periateriolar Lymphoid Sheath |
| **EDTA** | Ethylenediaminetetraacetic acid | **PB** | Peripheral Blood |
| **FISH** | Fluorescence in situ hybridization | **PBS** | Phosphate Buffer Saline |
| **FITC** | Fluorescein Isothiocyanate | **PE** | Phycoerythrin |
| **FL** | Follicular Lymphoma | **PLL** | Prolymphocytic Leukemia |
| **FNA** | Fine Needle Aspiration | **PPV** | Positive Predictive Value |
| **FSC** | Forward Scatter Light | **Pw** | Peak width |
| **Hb** | Haemoglobin | **RICK** | Radiation and Isotopes Centre-Khartoum |
| **HCL** | Hairy Cell Leukemia | **RNA** | Ribonucleic acid |
| **HIV** | Human immunodeficiency virus | **SCF** | Stem Cell Factor |
| **HL** | Hodgkin Lymphoma | **SLL** | Small Lymphocytic Lymphoma |
| **HLA** | Human Leukocyte Antigen | **SLVL** | Splenic Lymphoma with Villous Lymphocytes |
| **Ig** | Immunoglubuline | **SMZL** | Splenic Marginal Zone Lymphoma |
| **IL** | Interleukin | **SSC** | Side Scatter Light |
| **IPBSS** | Isotonic Phosphate Buffered Saline Solution | **TCR** | T Cell Receptor |
| **IPSID** | Immuno proliferation small index disease | **TdT** | Terminal Deoxyribonucleotidyl tranferase |
| **LN** | Lymph Node | **TRAP** | Tartrate-resistant acid phosphatise |
| **LPD** | Lymphoproliferative Disorders | **TWBC** | Total White B cells |
| **LPL** | Lymphoplasmacytic Lymphoma | **WHO** | World Health Organization |
| **MALT** | Mucosal-Associated Lymphoid Tissue | **ZAP-70** | Zeta-chain-associated protein kinase 70 |
| **MBCN** | Mature B Cell Neoplasm | | |

# LIST OF TABLES

## LIST OF FIGURES

# LIST OF HISTOGRAMS