

تشخیص کلونالیتی در کودکان مبتلا به لوسمی لنفوبلاستی حاد از نوع پیش-سازهای B با ارزیابی بازآرایی ژن زنجیره سبک (کاپا) و سنگین ایمونوگلوبولین

دکتر بهزاد پوپک^۱، دکتر علی اکبر پورفتح اله^۲، دکتر حسین نجم آبادی^۳، دکتر یوسف مرتضوی^۴، دکتر سیدحسین یحیوی^۵، دکتر پروانه وثوق^۶، دکتر محمدتقی ارزانیان^۷، دکتر مینا ایزدیار^۸، دکتر غلامرضا باهوش^۹، دکتر الهام شاهقلی^{۱۰}، دکتر امیرعلی حمیدیه^{۱۱}، دکتر محمد فرانش^{۱۲}، دکتر گلاره خسروی پور^{۱۳}، فریبا حق نژاد دوشانلو^{۱۳}

^۱ استادیار، گروه هماتولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران

^۲ استاد، گروه هماتولوژی، دانشگاه تربیت مدرس

^۳ دانشیار، گروه ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی

^۴ دانشیار، دانشگاه علوم پزشکی زنجان

^۵ استاد، گروه بیپوشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران

^۶ استاد، گروه هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

^۷ استاد، گروه هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

^۸ دانشیار، گروه هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

^۹ استادیار، گروه هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

^{۱۰} فوق تخصص هماتولوژی-انکولوژی اطفال، مرکز تحقیقات هماتولوژی-انکولوژی پیوند مغز استخوان، بیمارستان شریعتی

^{۱۱} استادیار هماتولوژی-انکولوژی اطفال، دانشگاه علوم پزشکی سمنان

^{۱۲} پزشک، آزمایشگاه پیوند

^{۱۳} کارشناس، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران

چکیده

سابقه و هدف: بازآرایی قطعات ژنی در مسیر تکاملی لنفوسیت‌های B و T تنوع زیادی در مولکولهای زنجیره سبک (کاپا) و سنگین دارد. در لوسمی‌های لنفوئید از نوع B-precursor ALL بازآرایی ژن زنجیره سنگین به‌عنوان شایع‌ترین و بازآرایی ژن زنجیره سبک کاپا نیز در BP-ALL به میزان نسبتاً شایع گزارش شده است. هدف از مطالعه حاضر بررسی الگوی بازآرایی ژنهای زنجیره سبک (کاپا) و سنگین ایمونوگلوبولین در ALL کودکان از نوع پیش‌سازهای B توسط واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) می‌باشد.

روش بررسی: در مطالعه تجربی حاضر ۱۸۳ کودک با تشخیص اولیه ALL قبل از شروع درمان مورد بررسی قرار گرفتند. پس از ارزیابی مورفولوژی ($L1=44\%$ و $L2=41\%$) و ایمونوفنوتیپ تنها ۱۴۰ بیمار با تشخیص B-precursor ALL برای مطالعه انتخاب شدند. پس از استخراج DNA آزمایش PCR به منظور تکثیر منطقه خیلی متغیر Igh (CDRII و CDRI) و Igg با استفاده از پرایمرهای مشترک انجام شد. محصولات PCR پس از آنالیز هترو دوپلکس والکتروفورز بر روی ژل پلی‌آکریلامید و رنگ‌آمیزی نقره مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز آماری با برنامه نرم افزاری SPSS (version 11.5) انجام شد.

یافته‌ها: ۱۱۴ (۹۰/۴٪) نفر از بیماران دارای بازآرایی کلونال در ژن Igh با استفاده از پرایمرهای مشترک نواحی CDR-I و CDR-III بودند (منوکلونال ۵/۷٪، بای کلونال ۳۴/۹٪ و اولیگوکلونال ۵/۵٪). ۴ بیمار از ۹ بیمار مبتلا به TALL (۴۴/۴٪) دارای بازآرایی کلونال Igh بودند. الگوی کلونال Igg-Kde در ۵۹ (۶۷٪) بیمار از موارد BP-ALL وجود داشت (۱۰٪ بای کلونال). بیشترین بازآرایی مربوط به گروه VKI (۲۵٪) و VKIII (۲۲/۷٪) بود.

نتیجه‌گیری: الگوی کلونال ژن Igh مشابه جوامع دیگر بود. استفاده توأم از پرایمرهای FRI و FRII در یک واکنش بصورت Multiplex PCR که برای اولین بار گزارش می‌شود علاوه بر افزایش تشخیص بازآرایی Igh زمان رسیدن به نتیجه را کاهش داده و وجود بازآرایی را می‌توان توسط هر دو تأیید کرده و از منفی کاذب جلوگیری نمود. الگوی کلونال Igg-Kde کمی بیش از گزارشهای قبلی بوده و شایع‌ترین بازآرایی VKI (۲۵٪) بود. هیچ ارتباط معنی‌داری بین انواع مختلف بازآرایی و متغیرهای کمی وجود نداشت. **واژگان کلیدی:** بازآرایی ژن، کلونالیتی، لوسمی لنفوبلاستی حاد.

مقدمه

بازآرایی‌های ژن ایمونوگلوبولین (Ig) و گیرنده لنفوسیت T (TCR) توالی‌های منحصر به‌فردی را در سلولهای لوسمی لنفوبلاستی حاد (ALL) بوجود می‌آورد. بازآرایی‌های تک/دو یا چند دودمانی Ig/TCR مختلفی در زمان تشخیص تقریباً در تمامی کودکان مبتلا به ALL وجود دارد که به‌عنوان هدف در

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی، دکتر بهزاد پوپک

(email: bpoopak@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۵/۴/۱۱

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۵/۱۰/۲۰

بازآرایی IgK و نیز تکمیل گزارش اولیه از بازآرایی IgH به عنوان مرحله ضروری در ارزیابی MRD می‌باشد.

مواد و روشها

در مطالعه تجربی حاضر ۱۸۳ کودک با تشخیص لوسمی حاد قبل از شروع درمان مورد بررسی قرار گرفتند. پس از ارزیابی مورفولوژی ($L1=44\%$ و $L2=41\%$) و ایمونوفنوتیپ تنها ۱۴۰ بیمار با تشخیص ALL B-precursor برای مطالعه انتخاب شدند که $53/3\%$ جمعیت را پسران و $46/7\%$ را دختران (M/F: ۱/۱۴) با میانگین سنی $63/6$ ماه (حداقل ۶ و حداکثر ۱۵۶ ماه) تشکیل می‌دادند. اطلاعات مربوط به تاریخچه پزشکی، علایم بالینی، اولین CBC و ایمونوفنوتیپ بیماران ثبت شد. ۱۶ مورد به دلایل مختلف از جمله دژنره شدن سلولها، ارسال نمونه پس از اولین دوره درمان، همولیز شدید، کهنه بودن نمونه و آلودگی باکتریایی از پژوهش حذف شدند. سلولهای تک‌هسته‌ای که بلاست‌ها را نیز شامل می‌شدند با گرادیان غلظتی (Ficoll: $1.077-1.080\text{g/cm}^2$) جدا شدند. استخراج DNA سلولهای تک‌هسته‌ای به دو روش اصلاح شده میکرو (Manual) و با استفاده از کیت استخراج (Roche, cat. No. 1 796 828, High Pure PCR Template) انجام شد. برای اطمینان از کیفیت DNA استخراج شده اندازه‌گیری غلظت، درجه خلوص (OD260/OD280) DNA (Eppendorf biophotometer)، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ به منظور ارزیابی فراگمانتاسیون و انجام آزمایش PCR با پرایمرهای ژن β -گلوبین انجام شد. برای تکثیر این ژن بازآرایی شده از دو روش استفاده شد که در روش اول بخش CDRIII با استفاده از پرایمرهای Consensus که عبارتند از:

5- ACACggC (C/T) (g/C)TgTATTACTgT :FR3A

و LJH: 5-TgAggAgACggTgACC در واکنش اول و

5-gTgACCAgggT(A/g/C/T)CCTTggCCCCAg:VLJH FR3, در واکنش دوم در واقع با یک روش heminested PCR انجام شد. در این واکنشها $\text{MgCl}_2:1.5\text{mM}$, $\text{dNTP}:200\text{ }\mu\text{M}$ پرایمرها $10-15\text{pmol}$ و Taq DNA polymerase به میزان یک واحد و DNA بیمار به میزان $0.1-0.5\text{ }\mu\text{g}$ در حجم نهایی ۲۵ و ۵۰ میکرولیتر با برنامه جدول ۱ تکثیر شد. محصول حاصل از واکنش اول با آب مقطر استریل رقیق ($1/1000$) شده و در واکنش دوم یک میکرولیتر از آن به‌عنوان الگو (Template) مورد استفاده قرار گرفت. در بیمارانی که موفق به

ارزیابی کلونالیتی و حداقل بیماری باقیمانده در طی بررسی روند درمان بکار می‌روند (۴-۱). در طی تمایز سلولهای B و T اولیه قطعات ژنی متغیر (Variable, V)، تنوع (Diversity, D) و اتصال (Joining, J) از ژن TCR, Ig از وضعیت اولیه (germ line) بازآرایی یافته و ترکیب کدکننده V-(D-)J مخصوص خود را ایجاد می‌کنند. این بازآرایی با واسطه ژنهای فعال‌کننده نوترکیبی (Recombination Activating Genes) که شامل RAG1 و RAG2 می‌باشند و آنزیم ترمینال دزکسی نوکلئوتیدیل ترانسفراز (Tdt) انجام می‌شود. قبل از قطعات ژنی Ig, TCR مناطقی بنام توالی‌های پیام دهنده نوترکیبی (Recombination Signal Sequences, RSS) قرار دارد که در واقع محل شناسایی برای آنزیم VDJ Recombinase هستند و محلی را مشخص می‌کنند که در آن قسمت بازآرایی اتفاق می‌افتد (۳). تنوع در محلهای اتصال توسط افزودن نوکلئوتیدهای P وابسته به الگو، نوکلئوتیدهای N غنی از GC غیر وابسته به الگو توسط Tdt، حذف نوکلئوتیدهای کد شده توسط ژن با عمل اگزونوکلازی و اتصال غیر دقیق قطعات ژنی باز هم افزایش بیشتری می‌یابند. مناطق اتصالی V(D)J مناطق خیلی متغیر (Complementary Determining Region -3, CDR3) را کد می‌کنند. ملکولهای CDR (شامل CDR1 و CDR2 در ژنهای V و CDR3 در محل اتصال VDJ) متغیرترین توالی بوده و مناطق اتصال به آنتی‌ژن را به‌طوری‌که CDR3 در مرکز محل اتصال به آنتی‌ژن برای تماس مستقیم با پتپید متصل به MHC است را تشکیل می‌دهند (۳).

بنابراین تنوع لنفوسیت‌های T و B نه تنها به‌خاطر بازآرایی قطعات V، D، J مختلف می‌باشد بلکه ناشی از افزودن و حذف در محلهای اتصال نیز است. لذا مناطق اتصال ژنهای بازآرایی شده Ig و TCR توالی هستند که در هر سلول پیش‌ساز لنفوئید متفاوت و منحصر بفرد است. از این مناطق اتصال می‌توان به‌عنوان شاخصهای اختصاصی تومور در تعیین کلونالیتی و ارزیابی MRD (Minimal Residual Disease) استفاده کرد. برای این منظور بازآرایی‌های ژن Ig و/یا TCR در بیمار مبتلا به ALL در ابتدای تشخیص باید تعیین شود (۵، ۶). برای تعیین و شناسایی توالی ناحیه اتصال اختصاصی لوسمی بازآرایی‌های کلونال ژن Ig و TCR را ابتدا با PCR تکثیر نموده و سپس محصولات PCR تعیین توالی می‌شوند. تنها در صورتی محصول PCR تولید خواهد شد که قطعات ژنی بازآرایی شده باشند زیرا که در وضعیت اولیه (Germline) فاصله قطعات ژنی بیش از اندازه‌ای است که بتوان آن را با PCR تکثیر نمود. هدف از مطالعه حاضر تعیین وضعیت

تکثیر ژن بازآرایی شده زنجیره سبک κ از نوع V κ -Kde برای چهار نوع V κ I-IV با مقادیر ذکر شده برای IgH و با پنج پرایمر (جدول ۲) طبق جدول ۳ با روش Touch down PCR انجام شد.

کنترل‌های مثبت (ارسالی توسط پروفیسور Tone و بیماران که بازآرایی مثبت داشتند)، منفی (آب مقطر استریل و مخلوط اصلی Master Mix) و کنترل DNA پلی کلونال استخراج شده از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی ۸ فرد سالم برای تمامی واکنشها منظور شد.

برای افتراق محصولات PCR تک دودمانی از محصولات PCR پلی کلونال طبیعی یا واکنشی در ارزیابی بازآرایی ژن‌های Ig κ و IgH پس از آنالیز هترو دوپلکس (محصولات PCR ابتدا ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتیگراد و سپس ۶۰ دقیقه در ۴ درجه در ترمال سایکلر قرار گرفتند) الکتروفورز بر روی ژل پلی آکرلامید ۸٪ (۲۰۰ ولت/۹۰ دقیقه) انجام شده و از رنگ‌آمیزی نقره برای مشاهده باندها استفاده شد. به منظور تایید محصولات تکثیر شده تعیین توالی بر روی تعدادی از نمونه‌ها پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ و مرحله خالص‌سازی (کیت Mega Pure) انجام شده (کمپانی SEQ Lab آلمان) و با توالی‌های مشابه در بانک ژنی مقایسه شد (www.ncbi.nlm.nih.gov). آنالیز آماری با برنامه نرم‌افزاری SPSS (version 11.5) و آزمونهای t-test، Mann Whitney و U-test و chi-square انجام شد.

یافته‌ها

در مطالعه حاضر ۱۸۳ کودک با تشخیص اولیه لوسمی حاد مورد بررسی قرار گرفتند که پس از ارزیابی سیتومورفولوژی و ایمونوفنوتیپ ۷ بیمار مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد (AML)، ۹ بیمار مبتلا به T-ALL، یک نفر مبتلا به بیماری هوچکین، یک مورد مبتلا به لنفوم بزرگ و ۱۴۰ مورد مبتلا به لوسمی لنفوبلاستی حاد از نوع پیش‌سازهای B (BP-ALL) بودند.

در بررسی آسپیره‌های مغز استخوان رنگ‌آمیزی شده با رنگ رایت ۴۸ (۴۴٪) و ۴۵ (۴۱٪) نفر از بیماران بر اساس معیارهای FAB به ترتیب ALL-L1 و ALL-L2 تشخیص داده شدند. در ۴ بیمار تشخیص L2-L1 و در بقیه بیماران طبقه‌بندی بر اساس FAB ممکن نشد که بعلا رقیق شدن نمونه‌های مغز استخوان یا خون محیطی و کم سلول بودن نمونه‌ها بود. از ۱۲۶ بیمار مبتلا به BP-ALL ۱۰۹ نفر (۸۶/۵٪) دارای بازآرایی کلونال در ژن IgH در ناحیه CDR-3

تکثیر منطقه CDRIII شدیم از پرایمرهای FRI: 5-C/gAggTA/gCAGCTgC/g/TA/TgC/gAgTCA/C/g/Tg و VLJH, LJH مطابق برنامه جدول ۱ استفاده شد. در ضمن بازآرایی به صورت Multiplex PCR نیز با استفاده از دو پرایمر FR3A و FRI با پرایمرهای برگشت در یک میکروتیوب (متناسب با میزانهای مجموع دو پرایمر) انجام شد.

جدول ۱- برنامه واکنش زنجیره پلیمرز به منظور تکثیر ژن زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین باز آرای شده

PCR مراحل	واکنش اول	واکنش دوم
	FR3A - LJH	FR3A-VLJH
دنا توره شدن اولیه	94°C/3min	94°C/1min
دنا توره شدن	94°C/1min	94°C/1min
اتصال پرایمرها (Annealing)	57°C/45sec	60°C/45sec
گسترش زنجیره (Extension)	72°C/2min	72°C/2min
تعداد سیکل	30	20
گسترش نهایی	72°C/10min	72°C/10min

جدول ۲ - پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژنهای

باز آرای شده Ig κ

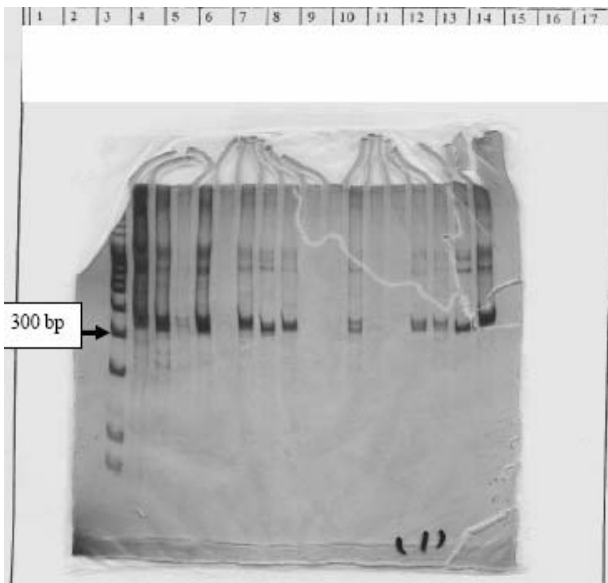
توالی پرایمر	نام پرایمر
5-gTAggAgACAgAgTCACCATCACT	VK I
5-TggAgAgCCggCCTCCATCTC	VK II
5-gggAAAAGAgCCACCCTCTCCTg	VK III
5-ggCgAgAggggCCACCATCAAC	VK IV
5- CCCTTCATAgACCTTCAgAgCAC	Kde

جدول ۳ - برنامه واکنش زنجیره پلیمرز به منظور تکثیر ژن

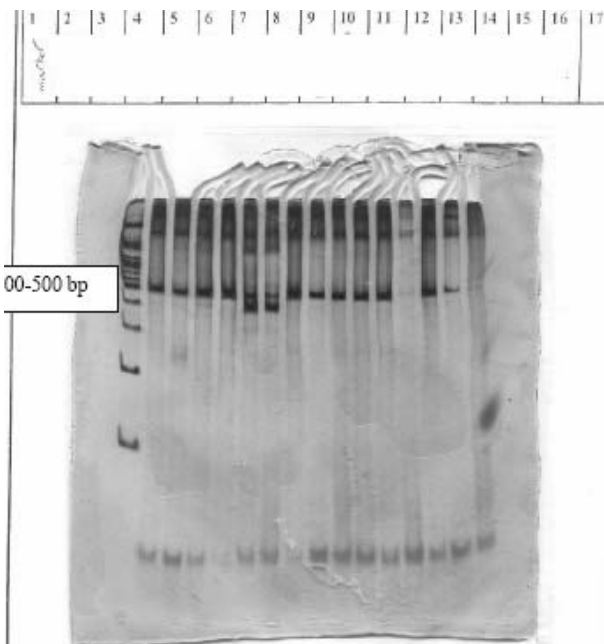
زنجیره سبک کاپا ایمونوگلوبین با استفاده از پرایمرهای

Kde و VKI - IV

واکنش اول	PCR مراحل
	Igk (k I / II / III / IV - Kde)
95°C/3min	دنا توره شدن اولیه
92°C/45sec	دنا توره شدن
63°C/45sec	اتصال پرایمرها
Touch down -1 °C for 10 cycles	(Annealing)
72°C/2min	گسترش زنجیره (Extension)
10	تعداد سیکل
92°C/45sec	دنا توره شدن
54°C/90sec	اتصال پرایمرها
	(Annealing)
72°C/2min	گسترش زنجیره (Extension)
25	تعداد سیکل
72°C/10min	گسترش نهایی



شکل ۲- نتایج بازآرایی زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین با پرایمرهای منطقه دوردست تر. لاین ۲، ۴، ۶، ۷، ۸ بازآرایی منوکلونال را به صورت یک باند نشان می دهد



شکل ۳- نتایج بازآرایی ژن Igk از نوع VκIII با پرایمرهای VκIII و kde. لاین ۲، ۱۰ و ۱۳ بازآرایی منوکلونال را به صورت یک باند در حدود ۴۵۰-۴۰۰bp نشان می دهد. لاین ۶ مربوط به بیمار با بازآرایی بای کلونال است که به صورت دو باند دیده می شود. بقیه لاین ها مربوط به نمونه های پس از درمان است

میانگین متغیرهای کمی شامل سن، WBC، PLT، LDH، Hb و شاخصهای سلولی ایمونوفنوتیپ (CD2,3,5,10,19,20,34، 22c,22s,TdT,HLA-DR) در دو گروه با و بدون بازآرایی

بودند (شکل ۱). از این گروه ۶۳ نفر (۵۷/۸٪) دارای بازآرایی منوکلونال، ۳۸ نفر (۳۴/۹٪) بازآرایی بای کلونال و ۶ نفر (۵/۵٪) بازآرایی اولیگوکلونال بودند.

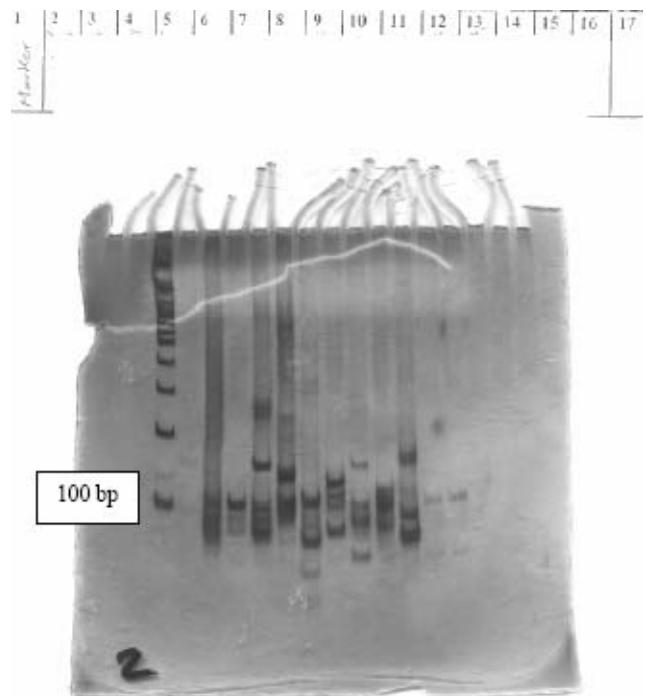
برای ۱۷ بیماری که بازآرایی کلونال برای ناحیه CDR-III نداشتند از پرایمر FRI برای تکثیر منطقه وسیعتری از ژن بازآرایی شده IgH استفاده شد که ۵ نفر (۴٪) بازآرایی کلونال را نشان دادند (شکل ۲). بنابراین ۱۱۴ (۹۰/۴٪) بیمار در کل بازآرایی کلونال ژن زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین را دارا بودند. آزمایش Multiplex برای IgH نیز تنظیم شد.

بازآرایی ژن زنجیره سبک ایمونوگلوبولین از نوع کاپا (κ) در ۸۸ بیمار مبتلا به BP-ALL ارزیابی شد که در ۵۹ (۶۷٪) بیمار یکی از بازآرایی های VκI تا VκIV (شکل ۳) مشاهده شد که در جدول ۴ مشخص شده است.

جدول ۴- فراوانی بازآرایی Igk I(VκI-IV/kde) در ۹۴

بیمار مبتلا به BP-ALL

بازآرایی	VκI/kde	VκII/kde	VκIII/kde	VκIV/kde
کلونال	۲۲	۱۴	۲۰	۳
منوکلونال	۲۰	۱۳	۱۸	۲
بایکلونال	۲	۱	۲	۱



شکل ۱- نتایج بازآرایی زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین. لاین ۴ بازآرایی منوکلونال را به صورت یک باند و لاین ۶، ۷، ۱۱ بازآرایی بای کلونال با حضور دو باند را نشان می دهد. لاین ۲، ۸ حالت اسمیر و نردبان را که نشان دهنده عدم وجود بازآرایی کلونال است را نشان می دهد.

کلونال IgH و Igk توسط T-test تفاوت معنی داری نشان نداد (NS). بین متغیرهای کیفی شامل جنس، تب، کم خونی، هیپاتومگالی، اسپلنومگالی، کاهش وزن، تمایل به خونریزی، عفونت و تورم غدد لنفاوی در دو گروه با و بدون بازآرایی کلونال IgH و Igk توسط Pearson chi-square و Fisher's exact test تفاوت معنی داری وجود نداشت (NS).

بحث

مطالعه حاضر بر روی ۱۸۳ کودک مبتلا به انواع لوسمی های حاد که به سه مرکز هماتولوژی-انکولوژی کودکان در تهران مراجعه نمودند، انجام شد. در مطالعه حاضر میزان BP-ALL (۹۳/۸٪) در مقایسه با T-ALL (۶/۲٪) بیش از گزارشهای موجود که فراوانی را بین ۷۵٪ الی ۸۹٪ اعلام می دارند، می باشد (۷-۴، ۹). ۵۳٪ بیماران مذکر و ۴۷٪ مونث بودند که نشان دهنده افزایش نسبی ابتلاء دختران در مقایسه با گزارشهای دیگر در مورد کلونالیتی و MRD است که هیچ انتخابی از نظر جنس صورت نگرفته است (۱۳-۱۰، ۴). ۴۹/۵٪ از بیماران بر اساس معیارهای FAB جزء گروه ALL-L1 و ۴۶/۵٪ جزء گروه ALL-L2 و چهار بیمار L2 L1 طبقه بندی شدند. مورفولوژی L1 و L2 ارتباطی با ایمونوفنوتیپ و سیتوژنتیک ندارد و در طبقه بندی سازمان بهداشت جهانی (WHO) نیز به کار گرفته نشده است (۱۴) و بیشتر ارزش تاریخی دارد (۱۵). در تعیین پیش آگهی نیز جایگاهی را برای این طبقه بندی قائل نیستند. سه شاخص شایع بیماران مورد بررسی عبارت بودند از CD 19 (۷۴٪)، CD 10 (۵۷٪) و HLA-DR (۵۳٪) که با توجه به اینکه گروه اصلی مطالعه BP-ALL بود، منطقی به نظر می رسد. بازآرایی ژن IgH و Igk برای تعیین کلونالیتی در زمان تشخیص با پرایمرهای مشترک مورد ارزیابی قرار گرفت. با پرایمرهای مشترک برای ناحیه FR III و قطعه J با روش hemi nested PCR بازآرایی کلونال در ۱۰۹ (۸۶/۵٪) بیمار از ۱۲۶ بیماری که با تشخیص BP-ALL ارزیابی شدند وجود داشت. در مواردی که نتایج منفی شد آزمایش با پرایمر FRI که به منطقه دوردست تری متصل می - شود تکرار شد و در کل در ۹۰/۴٪ از بیماران در مطالعه حاضر بازآرایی کلونال IgH تشخیص داده شد. مطالعات متفاوت با استفاده از ترکیب پرایمرهای مختلف بازآرایی کلونال را در ۸۰-۹۹٪ از بیماران مبتلا به BP-ALL گزارش کرده اند که با نتایج حاصل مطابقت دارد (۱۷، ۱۶، ۴، ۳). Roos و همکاران در مطالعه ای از سوئد بازآرایی کلونال را در ۹۴٪ گزارش کردند

(۱۸). Bhargava و همکاران از هند بازآرایی کلونال IgH را در ۹۹٪ از BP-ALL گزارش نمودند (۱۷). استفاده توأم از پرایمرهای FRI و FR III در یک واکنش بصورت Multiplex PCR که برای اولین بار گزارش می شود علاوه بر افزایش تشخیص بازآرایی IgH، زمان رسیدن به نتیجه را کاهش داده و وجود بازآرایی را می توان توسط هر دو تأیید کرده و از منفی کاذب جلوگیری کرد. بیشترین بازآرایی نیز مربوط به ژن IgH است که شاید بتوان آن را به این صورت توجیه نمود که در روند بازآرایی ژنهای Ig و TCR در سلولهای رده لنفوئید به ترتیب ژنهای TCR β و TCR γ ، TCR δ ، IgH بازآرایی می یابند و بخاطر نارس بودن سلولها در لوسمی لنفوبلاستی حاد بیشترین بازآرایی مربوطه به IgH است (۱۹). بازآرایی کلونال رده متقاطع (Cross Lineage Gene Rearrangement) در IgH و TCR در بدخیمی لنفوئید سری B و T وجود دارد. بازآرایی کلونال IgH در ALL از نوع سلول T نیز در ۲۳٪ از موارد T-ALL گزارش شده است (۲۰). در بررسی حاضر ۴ بیمار از ۹ بیمار مبتلا به TALL (۴۴/۴٪) دارای بازآرایی کلونال IgH بودند که اگر چه تعداد نمونه کم است (۹: n) ولی از گزارشهای موجود بیشتر است. ژنهای Ig و TCR هر دو دارای توالی پیام بازآرایی (Recombination Signal Sequence, RSS) هستند که مناطقی را مشخص می کنند که برای بازآرایی در دسترس است و می تواند منجر به ادامه بازآرایی شود. اما این قضیه نشان دهنده نوع نهایی رده سلولهای بدخیم نخواهد بود. بازآرایی نسبی (DJ recombination) بیشتر از بازآرایی های کامل (VJ یا VDJ) اتفاق می افتد. علاوه بر این بازآرایی رده متقاطع در بین بدخیمی های لنفوئید (ALL) بیش از انواع رسیده تر است. بازآرایی رده متقاطع IgH نیز در بدخیمی های سری T محدود به IgH است و بازآرایی زنجیره سبک ایمونوگلوبولین ندرتاً در این گروه گزارش شده است (۳). از بین ۹ بیمار مبتلا به T-ALL در شش مورد آزمایش از نظر بازآرایی IgK-Kde انجام شد که در ۵ مورد بازآرایی وجود داشت (۴: VKIII؛ ۱: VKII) که با گزارشهای موجود کاملاً متفاوت است و برای ارزیابی بیشتر نیاز به بررسی ALL از نوع T ضروری است.

بازآرایی IgK در ۶۰٪ و Ig λ تقریباً ۲۰٪ از موارد BP-ALL گزارش شده است (۲۱). بازآرایی IgK به صور مختلف از جمله VK-Kde، VK-intron RSS و VK-intron RSS انجام می شود. در مطالعه حاضر بازآرایی VK-Kde با توجه به اینکه شایعترین بازآرایی در کودکان مبتلا به ALL گزارش شده و عمدتاً نمایانگر بازآرایی حذفی با درگیری K-deleting elements در

VKIII (۲۲/۷٪) بود در حالی که Van Dongen و همکاران در بین ۷۷ بیمار بیشترین را مربوط به گروه VKII (۳۳/۷٪) و بعد VKIII قید کرده‌اند که با مطالعه حاضر متفاوت است (۲۱).

یک یا هر دو آلل است جهت بررسی انتخاب شد. پرایمرهای مشترک برای گروه VK I-IV و Kde با روش PCR استفاده می‌شود. از ۸۸ بیمار BP-ALL، ۶۷٪ دارای بازآرایی IgK-Kde بودند که نسبت به گزارشهای موجود که میزان این نوع بازآرایی را ۳۲٪ (۳)، ۴۲٪ (۲۲) و ۵۰٪ (۲۱) ذکر کرده‌اند، بیشتر است. بیشترین بازآرایی مربوط به گروه VKI (۲۵٪) و

REFERENCES

- Hoffbrand AV, Lewis SM, Tuddenham EDG. Postgraduate hematology. 4th edition. Butterworth-Heinemann; 1999;p:354-73.
- Provan D, Gribben J. Molecular hematology. 2nd edition. Blackwell Science, 2000;p:42-59.
- Hodges E, Krishna MT, Pickard C, Smith JL. Diagnostic role of tests for T cell receptor (TCR) genes. J Clin Pathol 2003;56(1):1-10.
- Gameiro P, Moreira I, Yetgin S, Papaioannou M, Potter MN, Prentice GP. Polymerase chain reaction (PCR)- and reverse transcription PCR-based minimal residual disease detection in long-term follow-up of childhood acute lymphoblastic leukemia. Br J Haematol 2002;119:685-96.
- Szczepanski T, Flohr T, Van der Velden VHJ, Bartram CR, Van Dongen JJM,. Molecular monitoring of residual disease using antigen receptor genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. Best Pract Res Clin Haematol 2002;15(1):37-57.
- Pongers-Willems MJ, Seriu T, Stolz F, d'Aniello E, Gameiro P, Pisa P, et al. Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets. Leukemia 1999;13:110-18.
- Scrideli CA, Queiróz Rosane GP, Kashima S, Sankarankutty BOM, Tone LG. T cell receptor gamma (TCRG) gene rearrangements in Brazilian children with acute lymphoblastic leukemia: analysis and implications for the study of minimal residual disease. Leuk Res 2004;28:267-73.
- Brisco MJ, Sykes PJ, Hughes E, Neoh SH, Snel LE I, G Dolman G , et al. Comparison of methods for assessment of minimal residual disease in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 2001;15:385-90.
- Neale GAM, Smith EC, Pan Q, Chen X, Pui C-H, Campana D, et al. Tandem application of flow cytometry and polymerase chain reaction for comprehensive detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 1999;13:1221-26.
- Silverman LB, Sallan ES. Newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors and treatment. Current Opin Haematol 2003;10:290-96.
- Green E, McConville CM, Powell JE, Mann JR, Darbyshire PJ, Taylor AM, Stankovic T. Clonal diversity of Ig and T-cell receptor rearrangements identifies a subset of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia with increased risk of relapse. Blood 1998;92(3):952-58.
- Seriu T, Yokota M, Nakao M, Misawa S, Takaue Y, Koizumi S, et al. Prospective monitoring of minimal residual disease during the course of chemotherapy in patients with acute lymphoblastic leukemia , and detection of contaminating tumor cells in peripheral blood stem cells for auto transplantation. Leukemia 1995;9:615-23.
- Scrideli CA, Defavary R, Kashima S, Bernardes JE, Tone LG. Prognostic significance of bi/oligoclonality in childhood acute lymphoblastic leukemia as determined by polymerase chain reaction. Sao Paulo Med J/Rev Paul Med 2001;119(5):175-80.
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. The world health organization : Classification of hematological malignancies, report of the clinical advisory Committee meeting, Mod Pathol 2000; 13(2):193-207.
- Szczepanski T, Velden VHJ, Dongen JJM. Classification systems for acute & chronic leukemias. Best Pract Res Clin Haematol 2003;16(4):561-82.

16. Steward CG, Goulden NJ, Katz F, Baines D, Martin PG, Langlands K, et al. A polymerase chain reaction study of the stability of Ig heavy chain and T-cell receptor delta gene rearrangements between presentation & relapse of childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1994;83:1355-62.
17. Sazawal S, Bhatia K, Gurbuxani S, Arya LS, Raina V, Bhargava M, et al. Pattern of immunoglobulin (Ig) and T-cell receptor (TCR) gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia in India. *Leuk Res* 2000;24:575-82.
18. Li AH, Rosenquist R, Forestier E, Lindh J, Roos G. Detailed clonality analysis of relapsing precursor B acute lymphoblastic leukemia: implications for minimal residual disease Detection. *Leuk Res* 2001;25:1033-45.
19. Kressler E, Panzer S, Ghali DW, Haas OA, Gadner H, Panzer-Grumayer ER. Heterogenous TCR delta Vδ2-Dδ3 rearrangements and their relation to IgH and TCR gamma status in childhood B cell precursor Leukemias. *Leuk Res* 1999;23:1089-96.
20. Cazzaniga G, Aniello ED, Corral L, Biondi A. Results of minimal residual disease (MRD) evaluation and MRD based treatment stratification in childhood ALL. *Best Pract Res Clin Haematol* 2003;15(4):623-38.
21. VHG Van der Velden, Willemse MJ, van der Schoot CE, Hahlen K, van Wering ER, van Dongen JJM. Immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in precursor-B acute lymphoblastic leukemia are stable targets for detection of minimal residual disease by real-time quantitative PCR. *Leukemia* 2002;16:928-36.
22. Szczepanski T, Willemse MJ, Brinkhof B, Wering ER, van der Burg M, Van Dongen JJM. Comparative analysis of Ig and TCR gene rearrangements at diagnosis and at relapse of childhood precursor-B-ALL provides improved strategies for selection of stable PCR targets for monitoring of minimal residual disease. *Blood* 2002;99(7):2315-23.