

ارزیابی بازآرایی بای/اولیگوکلونال ژن های ایمونوگلوبولین و گیرنده های لنفوسیت T در کودکان ایرانی مبتلا به لوسمی لنفوبلاستی حاد از نوع پیش سازهای B

دکتر بهزاد پوپک^۱، دکتر علی اکبر پورفتح اله^۲، دکتر حسین نجم آبادی^۳، دکتر سید حسین یحیوی^۴، دکتر یوسف مرتضوی^۵، دکتر پروانه وثوق^۶، دکتر شهلا انصاری دماوندی^۷، دکتر خدیجه ارجمندی رفسنجان^۸، دکتر محمد تقی ارزانیان^۹، دکتر مینا ایزدیار^{۱۰}، دکتر غلامرضا باهوش^{۱۱}، دکتر الهام شاهقلی^{۱۲}، دکتر امیر علی حمیدیه^{۱۳}، دکتر محمد فرائوش^{۱۴}، دکتر گلاره خسروی پور^{۱۵}، فریا حق نژاد دوشانلو^{۱۶}

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

استاد، گروه هماتولوژی، دانشگاه تربیت مدرس^۲

۳ دانشیار، گروه ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی

۴ استاد، گروه بیهوشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پزشکی تهران

^۵ استادیار، دانشگاه علوم پزشکی، زنجان

۶ استاد، گروه هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

^۷ استادیار، گروه هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

^۸ استاد، گروه هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۹ دانشیار، گروه هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

^{۱۰} فلوشیپ هماتولوژی-انکولوژی اطفال، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

^{۱۱} فلوشیپ هماتولوژی-انکولوژی اطفال، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۱۲ پزشک، آزمایشگاه پیوند

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

چکیده

سابقه و هدف: بازآرایی کلونال ژن‌های ایمنوگلوبولین و گیرنده نفوسیت T در کودکان مبتلا به لوسمی لنفوبلاستی حاد ممکن است به شکل منوکلونال، بای یا اولیگوکلونال باشد. با توجه به مشخص نبودن الگوی بای/اولیگوکلونال در بیماران ایرانی مطالعه حاضر در کودکان مبتلا به لوسمی لنفوبلاستی حاد از نوع بیش‌تر سازهای B انجام شد.

روش بررسی: در مطالعه آینده‌نگر حاضر ۱۴۰ بیمار با تشخیص B-precursor ALL برای مطالعه انتخاب شدند. پس از استخراج DNA آزمایش PCR به منظور تکثیر منطقه خیلی متغیر Igh Igk TCR- δ (D δ 2-D δ 3, V δ 2-D δ 3), TCR- γ (V γ I, V γ II, V γ) با استفاده از پرایمرهای مشترک انجام شد. نمونه‌های روزهای ۱۴، ۲۸، ۴۵، هفته دهم تا سه ماه، شش ماه و بیش از ۶ ماه نیز از بیماران تهیه شد و روشهای زمان تشخیص برای این نمونه‌ها نیز انجام شد.

یافته‌ها: ۱۱۴ بیمار (۹۰/۵٪) دارای بازآرایی کلونال در ثن IgH با استفاده از پرایمرهای مشترک نواحی CDR-III و CDR-I بودند (منوکلونال ۵۷/۸٪، بای کلونال ۳۴/۹٪ و اولیگوکلونال ۵/۵٪). الگوی کلونال Igk-Kde در ۵۹ بیمار (۶۷٪) وجود داشت (۱۰٪) بای کلونال. بازآرایی کلونال γ -TCR شامل $V\gamma II/V\gamma I$ و $V\gamma$ به ترتیب در ۶۴/۹٪ و ۷۹/۳٪ از بیماران وجود داشت (بای کلونال ۵٪). بازآرایی $V\gamma II$ شایعترین نوع (۴۶/۸٪) بود. ۴۷ (۴۵/۲٪) و ۱۱ (۱۶/۶٪) نفر از بیماران به ترتیب دارای بازآرایی $V\delta 2$ - $D\delta 3$ (۲۷/۷٪ بای کلونال، ۴/۳٪ الیگوکلونال) و $D\delta 2$ - $D\delta 3$ (یک بیمار با الگوی بای کلونال) بودند. تفاوت معنی‌داری بین دو گروه با بازآرایی منوکلونال و بای کلونال و نتایج پاسخ به درمان در روز ۱۴، ۲۸ و روز ۴۵ تا یکسال پس از درمان وجود نداشت.

نتیجه گیری: الگوی بای/اولیگوکلونال در ژن‌های بازآرایی شده $TCR-\gamma$, $TCR-\delta$ و $Ig\kappa$ تقریباً مشابه گزارشهای قبلی است و از نظر پاسخ به درمان نیز اختلاف معنی‌داری تا زمان پیگیری بین دو گروه با بازآرایی منوکلونال و بای کلونال وجود نداشت.

واژگان کلیدی: بازآرایی، ژن، لوسمی، لنفوبلاستی، حاد، الگوی بای کلونال.

مقدمه

بازآرایی ژن ایمونوگلوبولین (Ig) و گیرنده لنفوسیت T

(T cell receptor = TCR) شاخصهای منحصر بفردی را برای

ارزیابی کلونالیتی (Clonality) و حداقل بیماری باقیمانده در

لوسمي، لنفوبلاستي، حاد (Acute lymphoblastic leukemia=ALL)

بوجود می‌آورد. این بازآرایی که ممکن است در زمان تشخیص

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

(email: bpoopak@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۴/۵/۱۳

تاریخ یذیر شی: مقاله: ۱۳۸۴/۸/۱۰

تک/دو یا چند دودمانی باشد تقریباً در تمامی کودکان مبتلا به ALL وجود دارد (۴-۱).

بازآرایی ژن TCR و Ig در لوسمی لنفوبلاستی حاد از نوع پیش‌سازهای B و T ممکن است مستعد به تشکیل زیر کلون (Subclone) باشد. این فرایند بخاطر ادامه روند بازآرایی و یا بازآرایی ثانویه بعثت وجود سیستم فعال آنزیم recombinase در بدخیمی‌های نارس لنفوئید است. در مطالعات مختلف روی کودکان از نوع پیش‌سازهای B، اولیگوکلونالیته با میزانهایی متفاوت در ژنهای بازآرایی شده در زمان تشخیص گزارش شده است. به عنوان مثال بازآرایی بای/اولیگوکلونال در ژن IgH را ۴۵-۱۵٪ گزارش کرده‌اند (۷-۵). هدف از مطالعه حاضر که برای اولین بار در ایران انجام می‌شود ارزیابی موارد بای/اولیگوکلونال در کودکان ایرانی مبتلا به لوسمی لنفوبلاستی حاد از نوع پیش‌سازهای B از جنبه‌های مختلف از جمله فراوانی، ارتباط با پارامترهای کمی و کیفی و بالاخره از نظر پاسخ به درمان است.

مواد و روشها

در این مطالعه آینده‌نگر، ۱۸۳ کودک با تشخیص لوسمی حاد قبل از شروع درمان مورد بررسی قرار گرفتند. پس از ارزیابی مرفولوژیک ($L_1=44\%$ و $L_2=41\%$) و ایمونوفنوتیپ، ۱۴۰ بیمار با تشخیص ALL B-precursor (BP-ALL) برای مطالعه انتخاب شدند. اطلاعات مربوط به تاریخچه پزشکی، علایم بالینی، اولین CBC و ایمونوفنوتیپ بیماران ثبت شد. ۱۶ مورد به دلایل مختلف از جمله دژنه 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 g/cm²) جدا شدند. استخراج DNA سلول‌های تک‌هسته‌ای به دو روش اصلاح شده میکرو (manual) و با استفاده از کیت استخراج (High Pure PCR (Roche, Cat. No. 1-796-828, Template اطمینان از کیفیت DNA استخراج شده اندازه‌گیری غلظت، درجه خلوص (DNA (OD260/OD280) biophotometer)، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ به منظور ارزیابی فراگمانتاسیون و انجام آزمایش PCR با پرایمرهای ژن β -گلوبین انجام شد. آسیپره‌های مغز استخوان طبق برنامه از پیش تعیین شده پس از شروع شیمی‌درمانی (به روش BFM) و نیز در روزهای ۱۴، ۲۸، ۴۵، هفته دهم تا سه ماه، شش ماه و بیش از ۶ ماه از بیماران تهیه شد و پروتکل‌های تهیه گستره،

رنگ‌آمیزی رایت، جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای و استخراج DNA و کنترل کیفیت مثل نمونه‌های قبلی انجام شد. برای تکثیر ژن IgH، زنجیره سبک κ ، ژن TCR- γ (V γ ۰ V γ II.V γ I)، TCR- δ (D δ 2-D δ 3, V δ 2-D δ 3) بازآرایی شده از روشهای موجود استفاده شد (۷-۱۰، ۱۳، ۱۶، ۱۲).

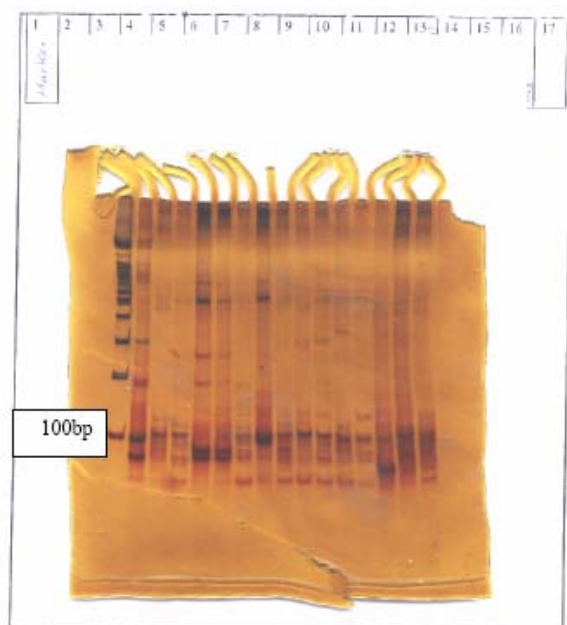
برای تمام واکنشها، کنترل مثبت (ارسالی توسط پروفیسور Tone و بیمارانی که بازآرایی مثبت داشتند)، کنترل منفی (آب مقطر استریل و مخلوط اصلی Master mix) و کنترل مخلوط DNA پلی‌کلونال استخراج شده از سلولهای تک‌هسته‌ای خون محیطی ۸ فرد سالم و نیز با استفاده از پرایمرهای عمومی ژن زنجیره بتاگلوبین به عنوان استاندارد داخلی منظور شد.

برای افتراق محصولات PCR تک دودمانی از محصولات PCR پلی‌کلونال طبیعی یا واکنشی در ارزیابی بازآرایی ژن‌های Ig κ و IgH پس از آنالیز هترودوپلکس (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 پلی‌آکرلامید ۸٪ (۲۰۰ ولت/۹۰ دقیقه) انجام شد 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 با استفاده از کیت Mega Pure انجام شد (کمپانی SEQ Lab آلمان) و با توالی‌های مشابه در بانک ژنی مقایسه شد.

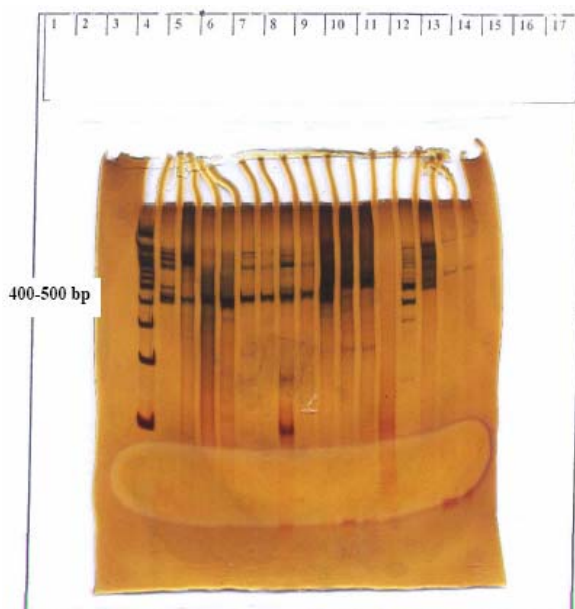
آنالیز آماری با برنامه نرم‌افزاری SPSS و آزمونهای t-test، Mann Whitney U-test و کای‌دو انجام شد.

یافته‌ها

در مطالعه حاضر ۱۸۳ کودک با تشخیص اولیه لوسمی حاد مورد بررسی قرار گرفتند که پس از ارزیابی سیتومرفولوژیک و ایمونوفنوتیپی، ۷ بیمار مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد (Acute myelogenous leukemia=AML)، ۹ بیمار مبتلا به T-ALL، یک نفر مبتلا به بیماری هوجکین، یک نفر مبتلا به لنفوم بورکیت و ۱۴۰ مورد مبتلا به لوسمی لنفوبلاستی حاد از نوع پیش‌سازهای B (BP-ALL) بودند. در گروه BP-ALL ۷۲ نفر (۳/۵۳٪) پسر و ۶۳ نفر (۷/۴۶٪) دختر بودند. میانگین سنی کودکان مبتلا ۵/۳±۵ سال (از حداقل شش ماه تا حداکثر ۱۳ سال) بود. شایعترین شکایات عمده بیماران عبارت بودند از: کم‌خونی و علائم مربوط به آن از جمله رنگ‌پریدگی،



شکل ۱- نتایج بازآرایی زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین. لاین ۸ و ۱۴ بازآرایی منوکلونال را به صورت یک باند و لاین ۵، ۲ و ۶ بازآرایی بای کلونال با حضور دو باند را نشان می‌دهند. لاین ۱۵ و ۱۶ حالت اسمیر را که نشان‌دهنده عدم وجود بازآرایی کلونال است، نشان می‌دهند



شکل ۲- نتایج بازآرایی زنجیره سبک ایمونوگلوبولین. لاین ۶ تا ۹ بازآرایی منوکلونال را به صورت یک باند و لاین ۱۴ و ۱۵ بازآرایی بای کلونال با حضور دو باند را نشان می‌دهد. بقیه لاین‌ها حالت اسمیر یا منفی را نشان می‌دهند.

ضعف و بی‌حالی، تب و دردهای استخوانی. سابقه فامیلی ابتلا به بیماریهای بدخیم از جمله لوسمی در ۸/۷٪ از بیماران وجود داشت. شایعترین علائم بالینی بیماران عبارت بودند از: تب (۳۱/۹٪)، کم‌خونی و علائم آن (۵۵/۱٪)، بزرگی طحال (۴۳/۵٪) و بزرگی کبد (۳۶/۲٪)، علائم خونریزی (۲۴/۶٪)، تورم غدد لنفاوی (۱۶/۴٪)، کاهش وزن (۱۰/۱٪)، عفونت و علائم آن (۲/۹٪) و علائم درگیری CNS (۱/۴٪).

با توجه به ارزیابی‌های ایمونوفنوتیپی با فلوسیتومتری، سه شاخص شایع در بیماران عبارت بودند از: CD19 (۷۴٪)، CD10 (۵۷٪) و HLA-DR (۵۳٪).

از ۱۲۶ بیمار مبتلا به BP-ALL، ۱۰۷ بیمار (۸۴/۹٪) دارای بازآرایی کلونال در ژن IgH در ناحیه CDR-3 بودند (شکل ۱). از این گروه ۶۳ نفر (۵۸/۹٪) دارای بازآرایی منوکلونال، ۳۸ نفر (۳۵/۵٪) بازآرایی بای کلونال و ۶ نفر (۵/۶٪) بازآرایی اولیگوکلونال بودند.

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 بازآرایی‌های VκI تا VκIV (شکل ۲) مشاهده شد (جدول ۱).

جدول ۱- فراوانی بازآرایی Igk (VκI-IV/kde) در ۹۴ بیمار

مبتلا به BP-ALL				
بازآرایی	VκI/kde	VκII/kde	VκIII/kde	VκIV/kde
کلونال	۲۲*(۲۵/۰)	۱۴(۱۵/۹)	۲۰(۲۲/۷)	۳(۴/۴)
منوکلونال	۲۰(۹۰/۹)	۱۳(۹۳)	۱۸(۹۰)	۲
بایکلونال	۲(۹/۱)	۱(۷)	۲(۱۰)	۱

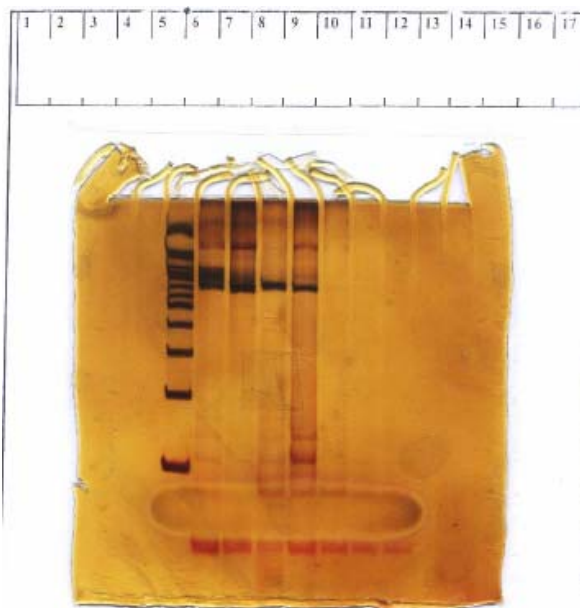
* اعداد داخل پرانتز معرف درصد هستند

بازآرایی کلونال ناحیه متغیر (V=Variable) ژن گیرنده لنفوسیت T از نوع گاما (TCR-γ) در ۱۲۶ بیمار BP-ALL به دو صورت ارزیابی شد. در حالت اول موارد مثبت و مثبت همراه اسمیر خفیف کلونال در نظر گرفته شد در حالیکه در حالت دوم فقط مواردی که باند بدون اسمیر داشتند کلونال تلقی شدند. در این بین ۱۰۰ (۹۶٪) مورد منوکلونال و ۵ مورد (۴٪) بای کلونال گزارش شد ولی هیچ مورد اولیگوکلونالی مشاهده نشد (شکل ۳). بازآرایی VγI-JγI.3/2.3 و VγI-JγI.1/2.1 از ژن TCR-γ مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج آن در جدول ۲ آمده است. برای بیمارانی که فاقد بازآرایی ناحیه VγI بودند، منطقه VγII از ژن TCR-γ مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۳).

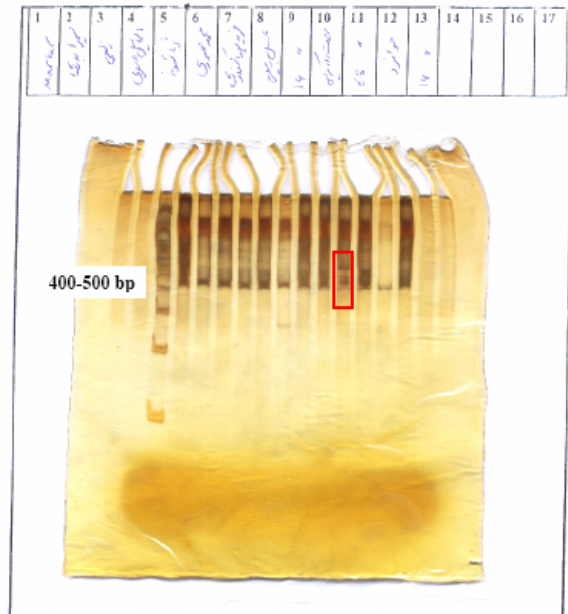
ارزیابی شده است. نتایج ارزیابی بازآرایی ژن گیرنده لنفوسیت T از نوع دلتا (TCR- δ) که برای دو بازآرایی V δ 2-D δ 3 و D δ 3 (شکلهای ۴ و ۵) انجام شد در جدول ۴ آورده شده است.



شکل ۴- نتایج بازآرایی ژن گیرنده لنفوسیت T نوع دلتا (V δ 2 D δ 3). لاین ۱۰ بازآرایی منوکلونال را به صورت یک باند، لاین ۴ و ۵ بازآرایی بای کلونال با حضور دو باند و لاین ۲ بازآرایی اولیگوکلونال را نشان می‌دهد. لاین‌های ۹-۶ و ۱۱ حالت اسمیر و نردبان را که نشان‌دهنده عدم وجود بازآرایی کلونال است، نشان می‌دهند.



شکل ۵- نتایج بازآرایی ژن گیرنده لنفوسیت T نوع دلتا (D δ 2 D δ 3). لاین ۵-۲ بازآرایی منوکلونال را به صورت یک باند نشان می‌دهد.



شکل ۳- نتایج بازآرایی ژن گیرنده لنفوسیت T نوع گاما. لاین ۷-۳ بازآرایی منوکلونال را به صورت یک باند با اسمیر خفیف زمینه، لاین ۱۰ بازآرایی بای کلونال با حضور دو باند و لاین‌های ۲، ۸، ۹، ۱۱ و ۱۳ حالت اسمیر را که نشان‌دهنده عدم وجود بازآرایی کلونال است، نشان می‌دهد.

جدول ۲- فراوانی بازآرایی کلونال ژن گیرنده لنفوسیت T از نوع γ در ناحیه V γ I*

بازآرایی	V γ I-J γ 1.1/2.1	V γ I-J γ 1.3/2.3	V γ I-J γ 1.3/2.3+J γ 1.1/2.1
کلونال	۲۰ (۲۷)	۱۰ (۱۳/۶)	۲۲ (۲۹/۷)
منوکلونال	۱۷ (۸۵)	۷ (۷۰)	۱۸ (۸۱/۸)
بای کلونال	۳ (۱۵)	۳ (۳۰)	۴ (۱۸/۲)

*در ستون سوم مجموع مواردی که با J γ 1.3/2.3 یا J γ 1.1/2.1 مثبت بوده‌اند، لحاظ شده است و مواردی که با هر دو مثبت بوده‌اند، حذف شده است. اعداد داخل پرانتز نیز معرف درصد هستند.

جدول ۳- فراوانی بازآرایی کلونال در ژن گیرنده لنفوسیت T از نوع γ در ناحیه V γ II*

بازآرایی	V γ II-J γ 1.1/2.1	V γ II-J γ 1.3/2.3	V γ IIJ γ 1.3/2.3OrJ γ 1.1/2.1
کلونال	۲۰ (۳۱/۲)	۱۲ (۲۹/۲)	۲۹ (۴۵/۳)
منوکلونال	۲۲ (۱۰۰)	۱۱ (۹۱/۶)	۲۸ (۹۶/۵)
بای کلونال	۰	۱ (۸/۴)	۱ (۳/۵)

*در ستون سوم تنها مواردی قید شده است که بازآرایی یکی از دو ناحیه J γ 1.1/2.1 یا J γ 1.3/2.3 را داشته باشد و مواردی که با هر دو مثبت بوده‌اند، لحاظ نگردیده است. اعداد داخل پرانتز نیز معرف درصد هستند.

نتایج کلی بازآرایی مناطق V γ I (۲۹/۴٪) و V γ II (۴۶/۸٪) از ژن TCR- γ نشان‌دهنده بازآرایی کلونال در ۶۴/۹٪ از بیماران

جدول ۴- فراوانی بازآرایی کلونال Vδ2-Dδ3 و TCR-δ از ژن Dδ2-Dδ3

بازآرایی	ژن TCR-δ	
	Vδ2-Dδ3	Dδ2-Dδ3
کلونال	۴۷ (۴۵/۲)*	۱۱ (۱۶/۶)
منوکلونال	۳۲ (۶۸/۱)	۱۰ (۹۱)
بای کونال	۱۳ (۲۷/۷)	۱ (۹)
اولیگوکلونال	۲ (۴/۳)	۰
مجموع هر دو بازآرایی	۵۸ (۵۵/۸)	

* اعداد داخل پرانتز نیز معرف درصد هستند

میانگین متغیرهای کمی شامل سن، شمارش گلبولهای سفید خون، پلاکت، هموگلوبین، LDH و شاخصهای ایمونوفنتیپ (CD2,3,5,10,19,20,34,22c,22s,TdT,HLA-DR) در دو گروه با بازآرایی منوکلونال و بای کونال IgH, TCR-γ, TCR-δ و IgK تفاوت معنی داری نشان ندادند. تنها تفاوت معنی دار بین دو گروه منوکلونال و بای کونال IgK، میانگین شاخصهای CD19 (۷۳/۷±۷/۰ در مقابل ۵۱/۴±۱۶/۲، $p<0/01$) و CD20 (۲۶/۷±۱۱/۶ در مقابل ۹/۵±۴/۴، $p<0/01$) بود.

میانگین HLA-DR در دو گروه با بازآرایی منوکلونال و بای کونال TCR-γ تفاوت معنی داری نشان داد (۴۸/۸±۷/۰ در مقابل ۸۲/۴±۴/۰، $p<0/05$).

بین متغیرهای کیفی شامل جنس، تب، کم خونی، هپاتومگالی، اسپلنومگالی، کاهش وزن، تمایل به خونریزی، عفونت و تورم غدد لنفاوی در دو گروه با بازآرایی منوکلونال و بای کونال IgH, TCR-γ, TCR-δ و IgK تفاوت معنی داری گزارش نشد. تفاوت معنی داری بین دو گروه با بازآرایی منوکلونال و بای کونال IgH, TCR-γ, TCR-δ و IgK و نتایج پاسخ به درمان مثبت و منفی در روز ۱۴، ۲۸ و روز ۴۵ تا یکسال پس از درمان وجود نداشت.

بحث

در ارزیابی بازآرایی های ژن های IgH, TCRγ, TCR-δ, IgK پس از انجام آزمایش هترو دوپلکس و الکتروفورز بر روی ژل با قدرت تفکیک بالا (پلی آکرلامید ۸٪) و رنگ آمیزی نقره بر اساس تعداد باندها، بازآرایی ها در سه گروه منوکلونال، بای کونال و اولیگوکلونال قرار می گیرند. بازآرایی ژن IgH در بیماران ایرانی در ۵۸٪، ۳۵٪ و ۵/۵٪ موارد به ترتیب منوکلونال، بای کونال و اولیگوکلونال بود. مطالعات مختلف فراوانی بازآرایی بای/اولیگوکلونال را ۴۵-۱۵٪ در BP-ALL گزارش نموده اند (۱۰-۸) که در این راستا با نتایج حاصل

مطابقت دارد. نکته جالب دیگر در مطالعه حاضر وجود بای کلونالیتی در بازآرایی IgH در T-ALL بود که ۳ بیمار از ۴ بیمار دارای بازآرایی، الگوی بای کونال داشتند که برای حصول نتایج بهتر باید تعداد نمونه بیشتری را ارزیابی نمود.

در مورد TCR-γ با بررسی ناحیه متغیر (V) تنها ۴٪ از بیماران الگوی بای کونال داشته و هیچ مورد اولیگوکلونال مشاهده نشد. در بررسی با پرایمرهای گروه VγI و VγII به ترتیب بای کونالیتی در ۱۸/۲٪ و ۸/۴٪ بیماران مشاهده شد. بازآرایی دو آلی (Bi-allelic) در ۳۵٪ موارد BP-ALL گزارش شده است (۱۱) اما بیش از دو بازآرایی TCR-γ تنها در ۳٪ موارد ثبت شده است که همگی جزء گروه BP-ALL بودند (۱۱). علت شیوع کمتر بای/اولیگوکلونالیتی در TCR-γ فعالیت کمتر سیستم Jrecombinase V(D) است که در بازآرایی Ig و TCR مسئول بازآرایی رده متقاطع می باشد (۱۳، ۱۲). علت دیگر در دسترس نبودن لوکوس TCR در پیش سازهای خیلی نارس لنفوئیدی است.

اولیگوکلونالیتی TCR-γ در BP-ALL ۸-۰٪ (۱۷-۱۴) و در T-ALL ۵-۰٪ (۱۴، ۷، ۲۱-۱۸) گزارش شده است. تنها مورد استثناء مطالعه Szczepanski و همکاران بود که اولیگوکلونالیتی در ۳۸٪ از بیماران BP-ALL گزارش شده است (۱۲). در مطالعه Tone و همکاران که اولیگوکلونالیتی با حضور بیش از دو بازآرایی در یک بیمار بدون پلی زومی کروموزوم ۷ تعریف شده بود، در ۴٪ بیماران ALL رده B الگوی اولیگوکلونال گزارش شد و هیچ بیمار T-ALL این الگو را نداشت (۱۱).

در مطالعه حاضر ۲۷/۷٪ از موارد بازآرایی Vδ2Dδ3 دارای الگوی بای کونال و ۴/۳٪ الگوی اولیگوکلونال داشتند. در مورد Dδ2Dδ3 تنها در یک بیمار (۹٪) بازآرایی بای کونال مشاهده شد. Grumayer و Zurstadt بازآرایی بای/اولیگوکلونال را به ترتیب در ۲۵٪ و ۳۰٪ از کودکان مبتلا به BP-ALL گزارش نمودند (۲۳، ۲۲). طبق نظر Grumayer و همکاران بازآرایی های چندگانه TCR-δ(V-D) یا TCR-γ فقط ناشی از بازآرایی از وضعیت اولیه بر روی آللهای مختلف است زیرا فرایند بازآرایی بیشتری بر روی بازآرایی موجود اتفاق نمی افتد. استثناء در مورد بازآرایی ثانویه و اتصال Vδ2Dδ3 به ناحیه Jα می باشد که منجر به حذف لوکوس TCR-γ می شود. این نوع بازآرایی در ۲۰٪ از بیماران BP-ALL گزارش شده است.

ژن IgH بر روی کروموزوم ۱۴ قرار داشته و در پلی زومی ۱۴ بیشتر توسط PCR تکثیر شده و می تواند توجیهی بر اولیگوکلونالیتی باشد. Kitchingman و همکاران

هیپردیپلوئیدی را در ۹ نفر از ۱۸ بیماری که الگوی اولیگوکلونال داشتند، گزارش نمودند (۷). ۸ نفر از این گروه پلی زومی ۱۴ داشتند. Tone و همکاران تغییر در کروموزوم ۱۴ بصورت پلی زومی (یک مورد) و یک مورد (2;14)t را تنها در دو بیمار از بیمارانی که بازآرایی بای/اولیگوکلونال داشتند، گزارش کردند. این مکانیسم می تواند نشان دهد مکانیسمی علاوه بر پلی زومی ممکن است عامل این مسئله باشد (۷).

توجه دیگر حضور دو جمعیت متفاوت در مغز استخوان، حضور دو اتفاق مجزا بخاطر تشکیل زیرکلون (Subclone) می باشد. چهار مکانیسم برای تشکیل زیرکلون پیشنهاد شده است: جایگزینی VH با VH، بازآرایی VH با قطعه D-JH، بازآرایی شده از قبل، جایگزینی در ژن بازآرایی شده D-JH، بازآرایی ادامه دار در سلول های پیش ساز بازآرایی نشده.

بازآرایی چندگانه V_HDJ_H و ادامه دار در ژن IgH در سلول های بدخیم ALL شایع بوده و نشان می دهد مهار فعالیت سیستم آنزیمی Recombinase ممکن است در بلاست های ALL اتفاق نیفتد (۶). توالی پیام نوترکیب (RSS) بخش Kde تقریباً ۲Kb پایینتر از قطعه ژنی CK قرار گرفته و می تواند با قطعه های ژنی VK (VKI-VKVI) بازآرایی یافته و منجر به بازآرایی VK-Kde (حذف JK-CK) شود. تنوع ناحیه اتصال بازآرایی IgK-Kde در BP-ALL نسبتاً زیاد است بطوریکه متوسط ورود (insertion) ۴/۷ نوکلئوتید و متوسط حذف ۹/۵ نوکلئوتید است (۲۴). فراوانی و ناحیه اتصال نسبتاً بزرگ بازآرایی IgK-Kde اهداف جالبی را برای PCR در ارزیابی MRD فراهم می سازد. علاوه بر این بر خلاف اکثر بازآرایی های ژنی IgH، TCR- γ و TCR- δ بازآرایی ادامه دار یا ثانویه ندارند و این مسئله ناشی از عدم حضور RSS در منطقه پائین Kde است. بنابراین می توان آنها را بعنوان بازآرایی مرحله نهایی در نظر گرفت. اطلاعات حاصل از دو روش PCR و SB مشخص ساخت که بازآرایی منوکلونال IgK-Kde در هر دو گروه بیماران بازآرایی منوکلونال/اولیگوکلونال IgH با فراوانی قابل مقایسه اتفاق می افتد. بنابراین با توجه به فراوانی نسبتاً زیاد (۵۰٪) در BP-ALL بخصوص که غالباً بازآرایی در هر دو آل اتفاق می افتد (۶۰-۵۰٪) بنظر می رسد لوکوس IgK راحت در دسترس سیستم آنزیمی Recombinase قرار می گیرد و بدین ترتیب فعالیت زیادی را برای اولیگوکلونالیتی انتظار داریم اما عملاً اولیگوکلونالیتی تنها در موارد کمی از بیماران با این نوع بازآرایی (۱۰٪) دیده می شود و بقیه منوکلونال هستند (۲۴). در مطالعه حاضر تنها ۱۰٪ از بیماران بازآرایی بای کلونال داشته و هیچ مورد اولیگوکلونال مشاهده

نکردیم (۶ مورد از ۵۹ مورد). بنظر می آید بازآرایی نهایی سریعاً اتفاق افتاده و بصورت منوکلونال دیده می شود.

در مطالعه Grumayer و همکاران در لوسمی هایی که بازآرایی های هتروژن (V δ 2D δ 3(Bi/oligoclonal) داشتند، ۳ بیمار از نظر ژن IgH و TCR- γ هتروژن بودند (۲۳). در بررسی حاضر ۹ بیمار دارای بازآرایی بای کلونال/اولیگوکلونال توام برای IgH و TCR- δ ؛ ۵ نفر IgH و TCR- γ ؛ یک نفر TCR- δ و IgK؛ و یک نفر نیز برای IgH و IgK بازآرایی بای کلونال/اولیگوکلونال توام داشتند. علاوه بر این در یک بیمار هر سه بازآرایی IgH، TCR- δ و TCR- γ الگوی بای کلونال/اولیگوکلونال گزارش شد. از آنجائی که بیشترین بازآرایی سنجیده شده مربوط به ژن IgH است بنظر می رسد در صورتیکه تعداد برابری از بیماران برای تمام بازآرایی های مورد ارزیابی قرار گیرند، هتروژنیسیته توام در تعداد بیشتری از موارد دیده خواهد شد.

تنها یافته های با ارزش حاصل از ارزیابی پارامترهای کمی در دو گروه با بازآرایی منوکلونال و بای/اولیگوکلونال مربوط به اختلاف بین میانگین شاخصهای CD19 و CD20 در دو گروه مزبور با بازآرایی IgK بود بطوریکه در گروه منوکلونال میزان شاخصها بیشتر بود. بین میانگین HLA-DR در دو گروه با بازآرایی منوکلونال و بای کلونال TCR- γ نیز تفاوت معنی داری وجود داشته و در گروه بای کلونال بیشتر بود. ارزش این تفاوتها در دو گروه مشخص نیست و باید مطالعات بیشتری در این زمینه انجام شود. در این مطالعه بازآرایی منوکلونال و بای/اولیگوکلونال ژن IgH را در دو گروه با و بدون شاخص CD10 (CALLA) بررسی کردیم که از نظر وفور بازآرایی و الگوی آن تفاوتی مشاهده نشد. Tone و همکاران نیز همین نتیجه را گزارش نمودند (۷).

در متغیرهای کیفی نیز اختلاف معنی داری بین دو گروه مشاهده نشد. نکته جالب در مطالعه حاضر فقدان اختلاف در نتایج ارزیابی MRD در روز ۱۴، ۲۸ (انتهای درمان القایی) و روز ۴۵ تا یکسال پس از درمان در دو گروه منوکلونال و بای/اولیگوکلونال بازآرایی های IgH و TCR- γ ، TCR- δ و IgK بود که شاید تائیدی بر عدم اختلاف دو گروه از نظر پارامترهای بالینی باشد.

Stankovic و همکاران میزان عود و عدم پاسخ به درمان را در بیمارانی که در زمان تشخیص اولیگوکلونال بودند نسبت به بیمارانی که بازآرایی منوکلونال داشتند، بیشتر عنوان کردند (۶۴٪ در مقابل ۲۶٪) و متغیر بودن کلون را بطور مستقل در پیشگویی عاقبت بیمار مهم دانستند (۶). البته در این مطالعه

مدت پیگیری بیماران ۱۸ تا ۹۰ ماه پس از شروع درمان بود که با مطالعه حاضر متفاوت است. Tone و همکاران درصد عود را در موارد منوکلونال و بای/اولیگوکلونال با توجه به بازآرایی IgH به ترتیب ۲۸/۱٪ و ۲۶/۶٪ گزارش نمودند و معتقدند که این حالت با عاقبت کلینیکی بدتری همراه نیست (۷).

در مطالعه دیگری Foroni و همکاران پیامد بالینی در بیماران با بازآرایی منوکلونال و اولیگوکلونال را قابل مقایسه با هم دانسته و میزان زندگی بدون بیماری (Disease free survival) را در دو گروه تا حدی مشابه گزارش کردند. این در حالیست که در مطالعات دیگر نیز اولیگوکلونالیتی با پیامد بد بالینی همراه نبوده است (۲۷-۲۵).

مشکلی اولیگوکلونالیتی در زمان تشخیص مشخص نبودن کلون منجر به عود است که باید با تکنیکهای MRD-PCR مورد ارزیابی و پیگیری قرار گیرد. بازآرایی‌های در حال انجام و ثانویه IgH ممکن است در فاصله زمانی بین تشخیص و عود اتفاق افتاده و منجر به از دست دادن اهداف اختصاصی در پیگیری MRD شود (۲۸).

ادامه بازآرایی‌های ویا بازآرایی ثانویه در ALL اغلب بخاطر بازآرایی VH به DH-JH و یا جایگزینی VH به تفکیک اتفاق می‌افتد. در این دو نوع بازآرایی ناحیه اتصالی DH-JH بدون

تغییر باقی می‌ماند لذا طراحی پرایمرها برای ناحیه ثابت و پایدار می‌تواند از نتایج منفی کاذب در PCR جلوگیری نماید. اهداف MRD-PCR منوکلونال در ALL پیش‌سازهای B از پایداری زیادی برخوردار است بطوری‌که تقریباً ۹۰٪ همان اهداف در زمان عود بیماری قابل تشخیص هستند. در مقابل تنها ۴۰٪ از اهداف MRD-PCR اولیگوکلونال در زمان عود بیماری ثابت هستند لذا جداسازی بازآرایی‌های منوکلونال از اولیگوکلونال ژن TCR/Ig مهم خواهد بود. پایداری در اهداف منوکلون (۸۹٪) بیش از موارد اولیگوکلونال (۴۰٪) بود (۹). Dongen و همکاران از اهداف کلونال TCR, Ig در ارزیابی ۹۴ بیمار استفاده کردند که ۷۱٪ از اهداف در زمان تشخیص بود و بیشترین پایداری مربوط به IgK-Kde (۹۰٪) و سپس TCR-γ (۷۵٪)، IgH (۶۴٪) و TCR-δ (۶۳٪) بود (۹).

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه سرکار خانم دکتر چایچیان و همکاران ایشان در حوزه معاونت بخصوص سرکار خانم امینیان به خاطر همکاری مستمر تشکر و قدردانی می‌شود. از خانمها فراهانی، رادپور، رستمی، بیاری و خانی کمال تشکر را داریم.

REFERENCES

- Hoffbrand AV, Lewis SM, Tuddenham EDG, editors. Postgraduate hematology. 4th edition. Butterworth-Heinemann, 1999;p:354-73.
- Provan D, Gribben J, editors. Molecular hematology. New York, 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 HG, et al. 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 JJ. Molecular monitoring of residual disease using antigen receptor genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. Best Pract Res Clin Haematol 2002;15(1):37-57.
- Green E, McConville CM, Powell JE, Mann JR, Darbyshire PJ, Taylor AM, et al. 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):952-8.
- Scrideli CA, Defavary R, Bernards 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.
- Campana D. Determination of minimal residual disease in leukemia patients. Br J Haematol 2003;121:823-38.
- Szczepanski T, Willemse MJ, Brinkhof B. 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.

10. 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 Tcell receptor delta gene rearrangements between presentation & relapse of childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1994;83:1355-62.
11. Scrideli CA, Queiróz Rosane GP, Kashima S, Sankarankutty BO, 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.
12. Szczepanski T, Beishuizen A, Pongers-Willemse MJ. Cross-lineage T cell receptor gene rearrangements in more than ninety percent of childhood precursor-B acute lymphoblastic leukemias: alternative PCR targets for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1999;13:196-205.
13. Van Dongen JJM, Wolvers-Tettero ILM. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part I. Basic and technical aspects. *Clin Chem Acta* 1991;198:1-92.
14. Brumpt C, Delabesse E, Beldjord K, Davi F, Cayuela JM, Millien C, et al. The incidence of clonal T-cell receptor rearrangements in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia varies with age and genotype. *Blood* 2000;9(6):2254-61.
15. Cavè H, Guidal C, Rohrlich P. Prospective monitoring and quantification of residual blasts in childhood acute lymphoblastic leukemia by polymerase chain reaction study of δ and γ T-cell receptor genes. *Blood* 1994;83:1892-902.
16. Sykes PJ, Snell LE, Brisco MJ, Neoh SH, Hughes E, Dolman G, et al. The use of monoclonal gene rearrangement for detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Leukemia* 1997;11:153-8.
17. Januszkiewicz DA, Nowak JS. Detection of clonality by polymerase chain reaction in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol* 1994;69:107-10.
18. Szczepanski T, Langerak AW, van Dongen JJM. T cell receptor gamma (TCRG) gene rearrangements in T-cell acute lymphoblastic leukemia reflect 'end-stage' recombinations: implications for minimal residual disease monitoring. *Leukemia* 2000;14:1208-14.
19. Jacquy C, Delepaut B, Brichard B, Vaerman JL, Zenebergh A, Brichard B, et al. A prospective study of minimal residual disease in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia: MRD level at the end of induction is a strong predictive factor of relapse. *Br J Haematol* 1997;98:140-6.
20. Roberts WM, Estrov Z, Zipf TL. Measurements of residual leukemia during remission in childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1997;336:317-23.
21. Scrideli CA, Kashima S, Tone LG, Defavary R. Clonal evolution as the limiting factor in the detection of minimal residual disease by polymerase chain reaction in children in Brazil with acute lymphoid leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2002;24:364-7.
22. Zur Stadt U, Eckert C, Rischewski J. Identification and characterization of clonal incomplete T-cell receptor Vd2-Dd3/Dd2-Dd3 rearrangements by denaturing high-performance liquid chromatography and subsequent fragment collection: implications for minimal residual disease monitoring in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Chromatogr* 2003;792:287-98.
23. Kressler E, Panzar S, Ghali DW, Haas OA, Gadner H, Panzer-Grumayer ER. Heterogenous TCR delta V δ 2-D δ 3 rearrangements and their relation to IgH and TCR gamma status in childhood B cell precursor Leukemias. *Leuk Res* 1999;23:1089-96.
24. Van der Velden VHJ, Willemse MJ, 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.
25. Coyle LA, Papaioannou M, Yaxley JC, Chim JS, Attard M, Hoffbrand AV, et al. Molecular analysis of leukemic B cells in adult and childhood acute lymphoblastic leukemia. *Br J Haematol* 1996;94:685-93.
26. Forestier E, Nordenson I, Lindstrom A, Roos G, Lindh J. Simultaneous immunoglobulin T-cell receptor gene rearrangements and multiclonality in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Acta Paediatr* 1994;83:319.
27. Moreira I, Papaioannou M, Palmisano GL, et al. B-cell oligoclonality in ALL: a mixed bag of IgH clone with important biological, clinical and prognostic significance. *Blood* 1998;92:224a.
28. Beishuizen A, Verhoeven MA, Van Wering ER, Hahlen K, Hooijkaas H, van Dongen JJ. Analysis of Ig and T-cell receptor genes in 40 childhood acute lymphoblastic leukemias at diagnosis & subsequent relapse: implications for the detection of minimal residual disease by polymerase chain reaction analysis. *Blood* 1994; 83:2238-47.