خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۴ شماره ۲ تابستان ۸۶ (۱۳۶-۱۲۳)

تشخیص مولکولی حداقل بیماری باقیمانده در کودکان ایرانی مبتلا به لوسمی لنفوبلاستی حاد با ارزیابی ژن‌های بازآرایی شده زنجیره‌های سنگین و سبک کاپا ایمونوگلوبولین

دکتر بهزاد پوپک[۱]، دکتر علی‌اکبر پورفتح‌اله[۲]، دکتر حسین نجم‌آبادی[۳]، دکتر سید حسین یحیوی[۴]، دکتر یوسف مرتضوی[۵]، دکتر پروانه وثوق[۶]، دکتر شهلا انصاری دماوندی[۷]، دکتر خدیجه ارجمندی رفسنجانی[۸]، دکتر محمد تقی ارزانیان[۹]، دکتر مینا ایزدیار[۱۰]، دکتر ثمین علوی[۱۱]، دکتر غلامرضا باهوش[۱۲]، دکتر الهام شاهقلی[۱۳]، دکتر امیر علی حمیدیه[۱۴]، دکتر محمد فرانوش[۱۵]، دکتر گلاره خسروی‌پور[۱۶]، فریبا حق‌نژاد دوشانلو[۱۷]، ابوالفضل یوسفیان[۱۸]

چکیده

سابقه و هدف

بازآرایی قطعات ژنی مختلف متغیر(V)، تنوع(D)، اتصال(J) و ثابت(C) تنوع زیادی را در IgH و Igκ ایجاد می‌کند و منجر به تشکیل توالی‌های اختصاصی می‌گردد که برای هر سلول یا کلون خاص است. در لوسمی‌های لنفوبلاستی نیز بازآرایی مشابه سلول‌های طبیعی در ژن‌های IgH و Igκ ایجاد می‌گردد که می‌تواند به عنوان شاخص کلونالیتی و ارزیابی MRD مورد استفاده قرار گیرد. هدف از مطالعه حاضر بررسی الگوی بازآرایی ژن‌های IgH، Igκ در ALL کودکان از نوع پیش‌سازهای B توسط PCR به منظور پی‌گیری MRD پس از شروع درمان می‌باشد.

مواد وروش‌ها

در مطالعه آینده‌نگر حاضر ۱۸۳ کودک با تشخیص اولیه لوسمی حاد قبل از شروع درمان بررسی شدند. پس از ارزیابی مرفولوژی(٪ ۴۱: L2 ؛ ٪ ۴۴: L1) و ایمونوفنوتیپ، تنها ۱۴۰ بیمار با تشخیص B-precursor ALL برای مطالعه انتخاب شدند که ۵۳/۳٪ جمعیت را پسران و ۴۶/۷٪ را دختران(۱/۱۴: M/F) با میانگین سنی ۶۳/۶ ماه(حداقل: ۶ ماه و حداکثر ۱۵۶ ماه) ابتلا تشکیل می‌دادند. سلول‌های تک هسته‌ای که بلاست‌ها را نیز شامل می‌شد در زمان تشخیص، روز ۱۴، روز ۲۸(انتهای درمان القایی)، ۴۵ روز تا ۳ ماه، ۳ تا ۶ ماه و ۶ تا ۱۲ ماه پس از شروع درمان بیماران پس از ارزیابی مرفولوژی با گرادیان غلظتی جدا شدند. پس از استخراج DNA ، آزمایش PCR به منظور تکثیر منطقه خیلی متغیر ژن IgH(CDR-3 & 1) و Igκ(VκI-IV/ Kde) با استفاده از آغازگرهای مشترک انجام شد. محصولات PCR پس از آنالیز هترودوپلکس و الکتروفورز بر روی ژل پلی‌آکریلامید و رنگ‌آمیزی نقره مورد بررسی قرار گرفته و پس از تعیین توالی جهت تایید با توالی‌های مشابه در بانک ژنی مقایسه شدند. آنالیز آماری با برنامه نرم‌افزاری SPSS۱۱/۵ انجام شد.

یافته‌ها

۱۱۴ نفر(۹۰/۵٪) از بیماران دارای بازآرایی کلونال در ژن IgH با استفاده از آغازگرهای مشترک نواحی CDR-III و CDR-I بودند(منوکلونال ۵۷/۸٪، بای‌کلونال ۳۴/۹٪ و اولیگوکلونال ۵/۵٪). الگوی کلونال Igκ-Kde در ۵۹(۶۷٪) بیمار از موارد BP-ALL وجود داشت(۱۰٪ بای‌کلونال). با توجه به ارزیابی مرفولوژی معمول حدود ۹۲٪ از بیماران در فازهای ارزیابی شده در رمیسیون کامل بودند. MRD مثبت با استفاده از بازآرایی‌های ژنی از بیش از ۹۰٪، به ۲۰٪ با درمان در فازهای مختلف تعریف شده کاهش پیدا کرد. از چهار بیماری که در زمان پیگیری عود کردند ۳ نفر MRD مثبت بوده و به جز یک بیمار همگی در رمیسیون کامل بالینی بودند.

نتیجه گیری

الگوی بازآرایی ژنی و مثبت شدن MRD در فازهای پس از درمان قابل مقایسه با موارد گزارش شده قبلی یا بیشتر از آن است و این اختلاف به دلیل اختلاف در روش، DNA و شاخص‌های مورد ارزیابی است. با توجه به نتایج حاصل می‌توان از این شاخص‌ها در تشخیص کلونالیتی و ارزیابی MRD استفاده کرد.

کلمات کلیدی: بازآرایی ژن‌ها، حداقل بیماری باقیمانده، لوسمی لنفوبلاستی حاد

تاریخ دریافت: ۸۵/۳/۱۱
تاریخ پذیرش: ۸۶/۲/۱۵

۱- مؤلف مسؤول: PhD هماتولوژی ـ استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران ـ صندوق پستی ۱۹۲۹۵/۱۴۹۵
۲- PhD ایمونولوژی ـ استاد دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۳- PhD ژنتیک ـ دانشیار دانشگاه علوم بهزیستی
۴- متخصص بیهوشی ـ استاد دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران
۵- PhD هماتولوژی ـ دانشیار علوم پزشکی زنجان
۶- فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی ـ استاد علوم پزشکی ایران
۷- فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی ـ دانشیار علوم پزشکی ایران
۸- فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی ـ دانشیار علوم پزشکی شهید بهشتی
۹- فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی ـ استاد علوم پزشکی شهید بهشتی
۱۰- فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی ـ دانشیار علوم پزشکی تهران
۱۱- فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی ـ استادیار علوم پزشکی شهید بهشتی
۱۲- فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی ـ استادیار علوم پزشکی ایران
۱۳- فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی ـ استادیار علوم پزشکی تهران
۱۴- فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی ـ مرکز تحقیقات پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی
۱۵- فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی ـ دانشیار علوم پزشکی سمنان
۱۶- پزشک عمومی ـ آزمایشگاه تشخیص طبی پیوند
۱۷- کارشناس علوم آزمایشگاهی ـ دانشگاه آزاد اسلامی ـ واحد پزشکی تهران
۱۸- دانشجوی کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-07]

مقدمه

رده سلولی، میزان بلوغ یا رسیدگی،کاریوتیپ، ناهنجارهای مولکولی ژن‌های تنظیم کننده داروها و آپوپتوزیس در توانایی رشد و تکثیر سلول‌های بدخیم و حساسیت آن‌ها به شیمی درمانی مؤثر هستند(۱). در زمان تشخیص لوسمی‌های حاد، حدود 10^{12} سلول بدخیم در بدن وجود دارد که با درمان مؤثر و ورود به فاز رمیسیون کامل، تعداد سلول باقی در بدن به کمتر از 10^{10} عدد می‌رسد و لزوم ادامه درمان پس از ایجاد رمیسیون را نشان می‌دهد. در صورتی که درمان ادامه نیابد، عود در این بیماران قطعی خواهد بود(۱). به سلول‌های باقیمانده بدخیم بعد از القای رمیسیون کامل، حداقل بیماری باقیمانده(Minimal Residual Disease= MRD) گفته می‌شود. اندازه‌گیری میزان کاهش سلول‌های لوسمی در داخل بدن تحت تاثیر متغیرهای بالینی و سلولی است اما این اندازه‌گیری در صورتی که با روش‌های مرفولوژیک انجام شود، حساسیت و صحت محدودی دارد. حداقل ۵ یا بیش از ۵ درصد سلول‌های مغز استخوان را باید سلول‌های لوسمی تشکیل دهند تا اطمینان لازم تشخیصی وجود داشته باشد. لذا این آستانه تشخیص منجر به حساسیت کم شده و عود بیماری تنها در مراحل پیشرفته قابل تشخیص خواهد بود.

جدول ۱: روش‌های ارزیابی MRD به همراه حساسیت هر روش

ردیف	نام روش	حساسیت
۱	ارزیابی شکل‌شناسی سلول‌های مغز استخوان و خون محیطی با رنگ‌آمیزی رومانونسکی	٪۵-٪۱
۲	روش‌های کشت سلولی	؟
۳	سیتوژنتیک(کاریوتیپ)	٪۵
۴	(Flourescent In situ Hybridization) FISH	٪۵-٪۰/۳
۵	فلوسایتومتری و تعیین ایمونوفنوتیپ	
	روش‌های مولکولی	
۶	الف- روش‌های ارزیابی ترانس لوکاسیون‌های اختصاصی با روش RT-PCR	10^{-6}
	ب- ارزیابی بازآرایی ژن‌های ایمونوگلوبولین‌ها و گیرنده‌های لنفوسیت T	-
	۶- ب-۱- روش ساترن بلات	٪۵-٪۱
	۶- ب-۲- واکنش زنجیره پلیمراز	10^{-6}-10^{-4}

روش‌های مورد استفاده برای ارزیابی درمان بیماران مبتلا به لوسمی حاد و حساسیت هر روش در جدول ۱ آمده است(۲). رایج‌ترین روش‌های ارزیابی برای تعیین MRD شامل تکثیر نسخه ژن‌های فیوژن با PCR، تکثیر ژن‌های بازآرایی شده TCR/Ig و تعیین ایمونوفنوتیپ با فلوسیتومتری می‌باشد. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی MRD با استفاده از بازآرایی ژن زنجیره سنگین و سبک ایمونوگلوبولین در کودکان مبتلا به لوسمی حاد لنفوبلاستی انجام شد.

مواد و روش‌ها

در مطالعه آینده‌نگر حاضر ۱۴۰ کودک مبتلا به B-precursor ALL از بین ۱۸۳ کودک با تشخیص لوسمی حاد قبل از شروع درمان و ۴۰-۱۵ نفر از بیماران پس از شروع شیمی درمانی(به روش BFM) در روزهای ۱۴، ۲۸، ۴۵، هفته دهم تا سه ماه، شش ماه و بیش از ۶ ماه مورد بررسی قرار گرفتند. پس از ارزیابی مرفولوژی(٪۴۱: L2 ؛ ٪۴۴: L1) و ایمونوفنوتیپ، تنها ۱۴۰ بیمار با تشخیص B-precursor ALL برای مطالعه انتخاب شدند که ٪۵۳/۳ جمعیت را پسران و ٪۴۶/۷ را دختران (M/F: ۱/۱۴) با میانگین سنی ۶۳/۶ ماه(حداقل: ۶ ماه و حداکثر ۱۵۶ ماه) ابتلا تشکیل می‌دادند. 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. پس از ارزیابی مرفولوژیک مشابه نمونه‌های زمان تشخیص، سلول‌های تک هسته‌ای که بلاست‌ها را نیز شامل می‌شدند با گرادیان غلظتی(g/cm^2 ۱/۰۸۰- ۱/۰۷۷: فایکول) جدا شدند. استخراج DNA سلول‌های تک هسته‌ای با استفاده از کیت استخراج(PCR Template cat. No. 1 796 828 ، رُوش) انجام شد. برای اطمینان از کیفیت DNA استخراج شده اندازه‌گیری غلظت، درجه خلوص($\frac{OD260}{OD280}$)DNA (بیوفتومتر اپندورف)، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ٪۱ به منظور ارزیابی فراگمانتاسیون و انجام آزمایش PCR با آغازگرهای ژن β - گلوبین انجام شد.

برای تکثیر ژن زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین بازآرایی شده، از دو روش استفاده شد. در روش اول

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-07]

بخش CDR III با استفاده از آغازگرهای مشترک: 5-ACA CggC (C/T) (g/C) TgTATTACTgT و 5-TgAggAGACggTgACC: LJH در واکنش اول و 5-gTgACCAgggT (A / g / C / T) : VLJH ،FR3A و CCTTggCCCCAg و در واکنش دوم در واقع با یک روش ، PCR دو گانه انجام شد. در این واکنش‌ها dNTP ۲۰۰ میکرومول، $MgCl_2$ mM ۱/۵، ۱۵–۱۰ pmol آغازگرها، DNA تک پلی‌مراز به میزان یک واحد و DNA بیمار به میزان ۰/۵–۰/۱ میکرو گرم در حجم نهایی ۲۵ و ۵۰ میکرولیتر با برنامه جدول ۲ تکثیر شد. محصول حاصل از واکنش اول با آب مقطر استریل به نسبت یک به هزار رقیق شده و در واکنش دوم یک میکرولیتر از آن به عنوان نمونه مورد استفاده قرار گرفت. در بیمارانی که موفق به تکثیر منطقه CDR III نشدیم، از آغازگرهای FRI: 5-C/ gAggTA /gCAgCTgC /g /TA /Tg /C /g /gAgTCA /TgC/ و LJH ، VLJH مطابق برنامه جدول ۲ استفاده شد.

جدول ۲: برنامه واکنش زنجیره پلیمراز به منظور تکثیر ژن زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین بازآرایی شده

مراحل PCR	واکنش اول FR3A-LJH	واکنش دوم FR3A-VLJH
دناتوره شدن اولیه	۹۴°C/۳Min	۹۴°C/۱min
دناتوره شدن	۹۴°C/۱min	۹۴°C/۱min
اتصال آغازگرها (Anealing)	۵۷°C/۴۵Sec	۶۰°C/۴۵sec
گسترش زنجیره (Extension)	۷۲°C/۲min	۷۲°C/۲min
تعداد سیکل	۳۰	۲۰
گسترش نهایی	۷۲°C/۱۰Min	۷۲°C/۱۰min

تکثیر ژن بازآرایی شده زنجیره سبک k از نوع Vκ-κde برای چهار نوع VκI-IV با مقادیر ذکر شده برای IgH و با پنج آغازگر جدول ۳ طبق جدول ۴ با روش Touch down PCR انجام شد. در مواردی که بازآرایی کلونال در ژن‌های IgH و Igκ وجود داشت، نمونه‌های پس از درمان بیماران مجدداً به همراه نمونه زمان تشخیص از نظر بازآرایی مشابه زمان تشخیص مورد ارزیابی قرار گرفتند.

جدول ۳: آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های بازآرایی شده Igκ

نام آغازگر		توالی آغازگر
Igκ	Vκ I	5-gTAggAgACAgAgTCACCATCACT
	Vκ II	5-TggAgAgCCggCCtCCATCTC
	Vκ III	5-gggAAAgAgCCACCCTCTCCTg
	Vκ IV	5-ggCgAgAgggCCATCAAC
	κde	5-CCCTTCATAgACCCTTCAggCAC

جدول ۴: برنامه واکنش زنجیره پلیمراز به منظور تکثیر ژن زنجیره سبک کاپا ایمونوگلوبین با استفاده از آغازگرهای VκI-IV و κde

مراحل PCR IgK (K I/ II/ III/ IV-Kde)	واکنش اول
دناتوره شدن اولیه	۹۵°C/۳min
دناتوره شدن	۹۲°C/۴۵min
اتصال آغازگرها	۶۳°C/۴۵sec
(Anealing)	Touch down-1°C for 10 cycles
گسترش زنجیره(Extension)	۷۲°C/۲min
تعداد سیکل	۱۰
دناتوره شدن	۹۲°C/۴۵sec
اتصال آغازگرها (Anealing)	۵۴°C/۹۰sec
گسترش زنجیره(Extension)	۷۲°C/۲min
تعداد سیکل	۲۵
گسترش نهایی	۷۲°C/۴۰min

کنترل‌های مثبت(ارسالی توسط پروفسور تون و بیمارانی که بازآرایی مثبت داشتند)، منفی(آب مقطر استریل و مخلوط اصلی ماسترمیکس) و کنترل DNA پلی‌کلونال استخراج شده از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی ۸ فرد سالم برای تمامی واکنش‌ها منظور شد.

برای افتراق محصولات PCR تک دودمانی از محصولات PCR پلی‌کلونال طبیعی یا واکنشی در ارزیابی بازآرایی ژن‌های Igκ و IgH زمان تشخیص و پس از درمان، از آنالیز هترودوپلکس(محصولات PCR ابتدا ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و سپس ۶۰ دقیقه در ۴ درجه

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-07]

در ترمال سایکلر) استفاده شد. الکتروفورز بر روی ژل پلی‌آکریلامید ۸٪(۲۰۰ ولت/ ۹۰ دقیقه) انجام شده و از

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-07]

جدول ۵: فراوانی بازآرایی Igκ(VκI-IV/κde) در ۹۴ بیمار مبتلا به BP-ALL نشان می‌دهد.

بازآرایی	VkI/κde	VκII/kde	VκIII/κde	vκIV/κde
- بازآرایی کلونال	۲۲(۲۵)	۱۴(۱۵/۹)	۲۰(۲۲/۷)	۳(۴/۳)
• منوکلونال	۲۰(۹۰/۹)	۱۳ (۹۳)	۱۸(۹۰)	۲(۶۷)
• بای‌کلونال	۲ (۹/۱)	۱ (۷)	۲(۱۰)	۱(۳۳)

رنگ‌آمیزی نقره برای مشاهده باندها استفاده شد. آنالیز آماری با برنامه نرم‌افزاری SPSS(version 11.5) و با استفاده از آزمون‌های t-test، من ویتنی(برای مواردی که توزیع نرمال داشتند از آزمون t-test ، برای مقایسه میانگین دو متغیر کمی در دو گروه مستقل و برای مواردی که توزیع غیر نرمال بود از آزمون من ویتنی استفاده شد) و کای‌دو برای تعیین ارتباط دو متغیر کیفی(در مورد جدول ۲ x ۲ continuity correction و اگر بیش از یک خانه فراوانی کمتر از ۵ داشته باشد آزمون دقیق فیشر استفاده شد) انجام شد.

یافته‌ها

شایع‌ترین شکایت عمده بیماران عبارت بودند از کم خونی و علایم مربوط به آن از جمله رنگ پریدگی، ضعف و بی‌حالی، تب و دردهای استخوانی. سابقه فامیلی مبتلایان به بیماری‌های بدخیم از جمله لوسمی در ۸/۷٪ از بیماران وجود داشت. علایم بالینی بیماران شامل تب در ۳۱/۹٪، کم خونی و علایم آن در ۵۵/۱٪، بزرگی طحال و کبد به ترتیب در ۴۳/۵٪ و ۳۶/۲٪، علایم خونریزی در ۲۴/۶٪، تورم غدد لنفاوی در ۱۶/۴٪، کاهش وزن در ۱۰/۱٪، عفونت و علایم آن در ۲/۹٪ و علایم درگیری CNS در ۱/۴٪ بیماران مشاهده شد.

با توجه به ارزیابی ایمونوفنوتیپ توسط فلوسیتومتری، ۱۴۰ بیمار جزو ALL از نوع پیش‌سازهای B طبقه‌بندی شدند. سه شاخص شایع در این مجموعه عبارت بودند از: CD19(۷۴٪)، CD10(۵۷٪) و HLA-DR(۵۳٪) در میانگین متغیرهای کمی شامل سن، WBC، PLT، Hb، LDH و شاخص‌های سلولی ایمونوفنوتیپ HLA-DR ، TdT، (22s، 22c، 34، 20، 19، 10، 5، 3، CD 2) در دو گروه با بازآرایی منوکلونال و بای‌کلونال IgH و Igκ تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. تنها یافته‌های با ارزش تفاوت معنی‌دار بین میانگین شاخص‌های CD19 و CD20 در دو گروه منوکلونال و بای‌کلونال Igκ بود.

(CD19: Biclon: 51.4% + /-16.2%;
Mono: 73.7% + /-7%; P; 0.015)
(CD20 mono: 526.7+ /-11.6
Biclon: %9.5+/-4.4; P:0.010)

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 بای‌کلونال IgH ، TCR-γ ، TCR-δ و Igκ تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

در بررسی نمونه‌های مغز استخوان رنگ‌آمیزی شده با رنگ رایت، ۴۸(۴۴٪) و ۴۵(۴۱٪) نفر از بیماران بر اساس معیارهای FAB به ترتیب $ALL\text{-}L_1$ و $ALL\text{-}L_2$ تشخیص داده شدند. در ۴ بیمار تشخیص L_2L_1 و در بقیه بیماران طبقه‌بندی بر اساس FAB به علت رقیق شدن نمونه‌های مغز استخوان یا خون محیطی و کم سلول بودن نمونه ممکن نشد.

در ارزیابی بازآرایی‌های ژن IgH و Igκ ، پس از انجام آزمایش هترودوپلکس و الکتروفورز بر روی ژل با قدرت تفکیک بالا(پلی آکریلامید ۸٪) و رنگ‌آمیزی نقره بر اساس تعداد باندها، بازآرایی‌ها را در سه گروه منوکلونال، بای‌کلونال و اولیگوکلونال طبقه‌بندی کردیم. در موارد دیگر یا هیچ باندی مشاهده نمی‌شد یا نتیجه به صورت اسمیر یا نردبان در می‌آمد که دال بر نتیجه منفی یا تکثیر پلی‌کلونال بود.

از ۱۲۶ بیمار مبتلا به BP-ALL ، ۱۰۹ نفر(۸۶/۵٪) دارای بازآرایی کلونال در ژن IgH در ناحیه CDR-3 بودند. از این گروه ۶۳ نفر(۵۷/۸٪) دارای بازآرایی منوکلونال، ۳۸ نفر(۳۴/۹٪) بازآرایی بای‌کلونال و ۶

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-07]

نفر(۵/۵٪) بازآرایی اولیگوکلونال بودند. برای ۱۷ بیماری که بازآرایی کلونال برای ناحیه CDR-III نداشتند، از آغازگر FRI برای تکثیر منطقه وسیع‌تری از ژن بازآرایی شده IgH استفاده شد که ۵ نفر(۴٪) بازآرایی کلونال را نشان دادند. بنابراین ۱۱۴(۹۰/۴٪) بیمار در کل بازآرایی کلونال ژن زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین را دارا 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 مشاهده شد(جدول ۵). از بین ۱۲۶ بیمار با تشخیص BP-ALL که نمونه زمان تشخیص در آن‌ها بررسی شده است، ۳۸ بیمار دارای نمونه روز ۱۴، ۴۰ بیمار دارای نمونه روز ۲۸(انتهای درمان القایی)، ۲۴ بیمار دارای نمونه روز ۴۵ الی ۳ ماه، ۱۵ بیمار دارای نمونه ۳ الی ۶ ماه و ۱۷ بیمار دارای نمونه ۶ الی ۱۲ ماه بودند.

ارزیابی سیتومرفولوژی نمونه‌های پس از درمان از گستره‌های تهیه شده با رنگ‌آمیزی رایت انجام گرفته و نتایج آن در جدول۶ نشان داده شده است. نتایج ارزیابی MRD در بیماران مبتلا به BP-ALL که دارای بازآرایی کلونال ژن زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین در بدو تشخیص بوده‌اند، در فازهای مختلف پس از شروع درمان در جدول ۷ مشخص شده است(شکل‌های ۱ و ۲).

فراوانی بیماران MRD^+ با توجه به بازآرایی کلونال (VκI-IV/κde)Igκ در جدول ۸ نمایش داده شده است (شکل ۳). تفاوت معنی‌داری بین دو گروه با بازآرایی منوکلونال و بای‌کلونال IgH ، TCR-γ ، TCR-δ و Igκ و نتایج MRD مثبت و منفی در روز ۱۴، ۲۸ و روز ۴۵ تا یک سال پس از درمان وجود نداشت.

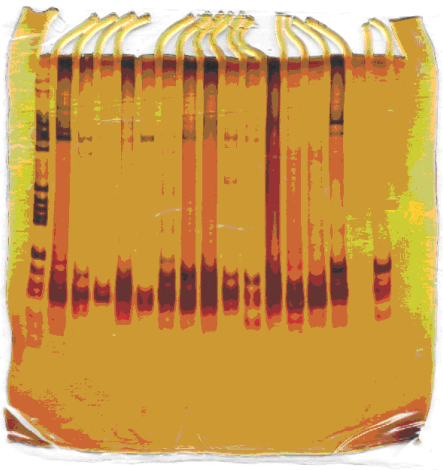
جدول ۶: تعداد نمونه، رمیسیون کامل و درصد بلاست را در آسپیره‌های تهیه شده پس از شروع درمان(در فازهای مختلف) نشان می‌دهد(در ۱۲ مورد به علت محرومیت در نمونه بررسی مورفولوژیک انجام نشد)

نمونه پس از درمان	رمیسیون کامل	Blast ≥ ٪۵
روز ۱۴	٪۹۲	٪۸
n :۳۸	n :۳۵	n :۳
روز ۲۸	٪۹۲/۵	٪۷/۵
n :۴۰	n :۳۷	n :۳
۴۵ روز الی ۱۲ ماه	٪۹۱/۹	٪۹/۱
n :۴۴	n :۴۰	n :۴

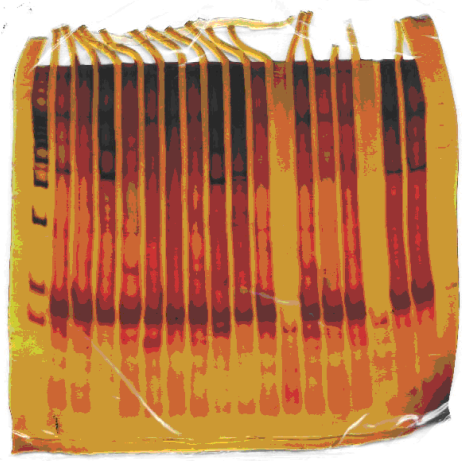
جدول ۷: فراوانی MRD با توجه به بازآرایی کلونال ژن IgH در فازهای مختلف درمانی

نمونه‌های پس از درمان	روز ۱۴ n :۳۴	روز ۲۸ n :۳۶	روز ۴۵ تا ۳ ماه n :۲۴	۳-۶ ماه n :۹	۶-۱۲ ماه n :۱۵
– موارد MRD مثبت	٪۷۳/۵(n :۲۵)	٪۵۵/۵(n :۲۰)	٪۵۰(n :۱۲)	٪۵۵/۵(n :۵)	٪۲۰(n :۳)
– موارد MRD منفی	٪۲۶/۵(n :۹)	٪۴۴/۵(n :۱۶)	٪۵۰(n :۱۲)	٪۴۴/۵(n :۴)	٪۸۰(n :۱۲)
– باند مثبت مشابه به زمان تشخیص	٪۶۰(n :۱۵)	٪۵۰(n :۱۰)	٪۴۱/۷(n :۵)	٪۴۰(n :۲)	٪۶/۷(n :۱)
– واکنش یا باند ضعیف	٪۲۰(n :۵)	٪۱۰(n :۲)	٪۸/۳(n :۱)	٪۲۰(n :۱)	۰
– واکنش یا باند خیلی ضعیف	٪۴(n :۱)	٪۱۲(n :۳)	٪۸/۳(n :۱)	٪۲۰(n :۱)	٪۶/۷(n :۱)
– واکنش مثبت با اسمیر	٪۱۶(n :۴)	٪۲۵(n :۵)	٪۴۱/۷(n :۵)	٪۲۰(n :۱)	٪۶/۷(n :۱)

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-07]



شکل ۱- نتایج ارزیابی MRD در بیماران مبتلا به BP-ALL با ارزی‌ابی بازآرایی کلونال ژن زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین پس از الکتروفورز بر روی ژل پلی آکری‌لامی‌د را نشان می دهد. لای‌ن ۲ و ۳ مربوط به زمان Dx و D14 ی‌ک بی‌مار است که همچنان باند زمان تشخی‌ص باقی است(MRD^+) ، لای‌ن ۴ و ۵ مربوط به زمان Dx و D57 و لای‌ن ۸ و ۹ مربوط به زمان Dx و D28 دو بی‌مار است که به صورت اسمی‌ر درآمده است و MRD منفی است.



شکل ۲: نتایج ارزیابی MRD در بیماران مبتلا به BP-ALL با ارزی‌ابی بازآرایی کلونال ژن زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین(-CDR III و FR1) پس از الکتروفورز بر روی ژل پلی‌آکری‌لامی‌د. لای‌ن ۲ ، ۳ ، ۴ و ۵ مربوط به زمان Dx و D45 دو بی‌مار است که هم چنان باند زمان تشخی‌ص ناحی‌ه CDR-III باقی است(MRD^+) و ناحی‌ه FR1 منفی شده است. لای‌ن ۶ ، ۷ و ۸ مربوط به زمان Dx ، D14 و D28 ی‌ک بی‌مار را نشان می‌دهد که MRD^+ است. لای‌ن ۹ ، ۱۰ ، ۱۱ و ۱۲ و نی‌ز لای‌ن ۱۳، ۱۴ ، ۱۵ و ۱۶ مربوط به زمان Dx ، D14 ، D28 و شروع درمان نگهدارنده دو بی‌مار است که تا

شکل ۳: نتایج ارزیابیMRD در بیماران مبتلا به BP-ALL با ارزی‌ابی بازآرایی منطقه متغیر Ig-κ-vκI پس از الکتروفورز بر روی ژل پلی‌آکری‌لامی‌د. لای‌ن ۲، ۳ و ۴ مربوط به زمان Dx ، D14 و D28 و لای‌ن ۱۰، ۱۱ و ۱۲ مربوط به زمان Dx ، D28 و شروع درمان نگهدارنده دو بی‌مار می‌باشد که باند زمان تشخی‌ص با درمان ضعی‌ف‌تر شده ولی هم چنان باقی است(MRD^+). لای‌ن ۱۳، ۱۴ و ۱۵ مربوط به زمان Dx، D28 است و شروع درمان نگهدارنده بی‌مار دی‌گری را نشان می‌دهد که هم چنان باند زمان تشخی‌ص در D28 با زمی‌نه اسمی‌ر وجود دارد(MRD^+) ولی با شروع درمان نگهدارنده منفی شده است(MRD^-).

بحث

در مطالعه حاضر بازآرایی ژن IgH و Igκ برای تعیین کلونالیتی در زمان تشخیص با آغازگرهای مشترک مورد ارزیابی قرار گرفت. با آغازگرهای مشترک برای ناحیه FRIII و قطعه J با روش PCR دوگانه، 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 آغازگر FRI تکرار شد و در کل در ۹۰/۴٪ از بیماران در مطالعه حاضر، بازآرایی کلونال IgH تشخیص داده شد.

مطالعات متفاوت با استفاد از ترکیب آغازگرهای مختلف، بازآرایی کلونال را در ۹۹٪-۸۰٪ از بیماران مبتلا به BP-ALL گزارش کرده‌اند که با نتایج حاصل مطابقت دارد(۶-۳). روس و همکاران در مطالعه‌ای از سوئد، بازآرایی کلونال را در ۹۴٪ گزارش کردند(۷). بهارگاوا و

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-07]

همکاران از هند، بـازآرایی کلونـال IgH را در ۹۹٪ از BP- ALL گزارش نمودند(۶).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-07]

جدول ۸: فراوانی MRD^+ در فازهای مختلف درمان با توجه به بازآرایی کلونال ژن Igκ را نشان می‌دهد.

نمونه‌های پس از درمان	D14 n :۲۴	D28 n :۳۰	D45-3m n :۱۷	3-6 m n :۵	6-12 m n :۹
– موارد MRD^+	٪۸۷/۵(n :۲۱)	٪۹۳(n :۲۸)	٪۸۲(n :۱۴)	٪۸۰(n :۴)	٪۵۵/۵(n :۵)
– موارد MRD^-	٪۱۲/۵(n :۳)	٪۷(n :۲)	٪۱۸(n :۳)	٪۲۰(n :۱)	٪۴۴/۵(n :۴)
– باند مثبت مشابه زمان تشخیص	٪۶۷(n :۱۴)	٪۵۴(n :۱۵)	٪۴۳(n :۶)	٪۲۵(n :۱)	۰
– واکنش یا باند ضعیف	٪۱۹(n :۴)	٪۱۱(n :۳)	٪۲۱(n :۳)	٪۲۵(n :۱)	٪۴۰(n :۲)
– واکنش یا باند خیلی ضعیف	۰	٪۱۴(n :۴)	٪۷(n :۱)	٪۲۵(n :۱)	٪۶۰(n :۳)
– واکنش مثبت با اسمیر	٪۱۴(n :۳)	٪۲۱(n :۶)	٪۲۹(n :۴)	٪۲۵(n :۱)	۰

بازآرایی Igκ در ٪۶۰ و Igλ تقریباً در ٪۲۰ از موارد BP-ALL گزارش شده است(۶). بازآرایی Igκ به صور مختلف از جمله Vκ-κde، intron-κde و Vκ-intron RSS انجام می‌شود. در مطالعه حاضر بازآرایی Vκ-κde ، با توجه به این که شایع‌ترین بازآرایی در کودکان مبتلا به ALL می‌باشد و عمدتاً نمایانگر بازآرایی حذفی با درگیری κ-deleting elements در یک یا هر دو الل است، جهت بررسی انتخاب شده است. آغازگرهای مشترک برای گروه Vκ-I-IV و κde با روش PCR استفاده شد. از ۸۸ بیمار BP-ALL ، ٪۶۷ دارای بازآرایی Igκ-κde بودند. نسبت به گزارش‌های موجود که میزان این نوع بازآرایی را ٪۳۲، ٪۴۲ و ٪۵۰ ذکر کرده‌اند، این رقم بیشتر است(۱۰– ۸). بیشترین بازآرایی مربوط به گروه VκI(٪۲۵) و VκIII(٪۲۲/۷) بود در حالی که ون دانگن و همکاران در بین ۷۷ بیمار، بیشترین را مربوط به گروه VκII(۳۳/۷۴) و بعد VκIII قید کرده‌اند که با مطالعه حاضر متفاوت است(۸).

طبقه‌بندی FAB، ALLهایی با مرفولوژی L_2 را به عنوان یک فاکتور پیش آگهی بد در نظر گرفته است که هنوز نیز از آن استفاده می‌کنند. در حالی که به جز این که مرفولوژی L_1 و L_2 در کودکان و بزرگسالان به تفکیک شایع‌تر است، هیچ مقوله خاصی از بیماری را تعریف نکرده و ارتباطی با ایمونوفنوتیپ و سیتوژنتیک ندارد و در طبقه‌بندی سازمان بهداشت جهانی(WHO) نیز که بر اساس ایمونوفنوتیپ و ژنوتیپ است، به کار گرفته نشده است.

در مطالعه حاضر ارتباط مرفولوژی L_1 و L_2 باMRD در روزهای ۱۴ و ۲۸ و نمونه‌های پس از درمان القایی تا یک سال بر اساس بازآرایی‌های کلونال IgH و Igκ بررسی شد و ارتباط معنی‌داری نداشت که می‌تواند دلیلی بر عدم اهمیت این تقسیم‌بندی مرفولوژی در پاسخ به درمان، حداقل تا زمانی که در مطالعه حاضر پی‌گیری شده است باشد.

در ارزیابی مرفولوژیک نمونه‌های پس از درمان به ترتیب ٪۹۲، ٪۹۲/۵، ٪۹۱/۹ از بیماران در ارزیابی آسپیره‌های مغز استخوان روز ۱۴، ۲۸ و روز ۴۵ الی یک سال پس از درمان، در رمیسیون کامل مرفولوژیک بودند. در ٪۷/۵ تا ٪۹ موارد، آسپیره‌ها دارای بلاست ٪۵≥ بوده و به درمان انجام شده خوب پاسخ نداده بودند. تون و همکاران بیش از ٪۵ بلاست را در انتهای درمان القایی در ٪۱۱/۷ از بیماران گزارش کردند که تقریباً مشابه مطالعه انجام شده است. در تمامی مواردی که بیماران از نظر مرفولوژی، در هر کدام از مراحل بررسی ٪۵≥ بلاست در مغز استخوان داشتند، نتایج ارزیابی MRD توسط اکثر بازآرایی‌های انجام شده مثبت بود. ارزیابی مرفولوژیک آسپیره‌های مغز استخوان بعد از ۱ الی ۳ هفته از درمان القایی، پیش‌گویی کننده مستقل عاقبت بیماران است. اخیراً حضور بلاست در مغز استخوان بعد از ۳ هفته از درمان القایی را، اندکسی از عاقبت بد بیماری می‌دانند(۱۱).

گزارش‌هایی مبنی بر شانس عود بیشتر در بیمارانی که بلاست در آسپیره مغز استخوان آن‌ها ٪۱≥ بعد از اتمام درمان القایی است وجود دارد(۱۲، ۱). در آزمایش میکروسکوپی روز ۱۴، پس از شروع درمان القایی در

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-07]

صورتی که بلاست ≥ ۵٪ باشد، ارزش پیش‌گویی کننده مثبت(PPV)، ۷۵٪ با حساسیت ۳۰٪ برای عود بیماری خواهد بود. این روش ساده اما وابسته به تجربه و تبحر فرد مشاهده کننده است. وقتی تعداد سلول‌ها کم باشد به خصوص در نمونه‌های روز ۱۴(این مطلب به صورت واضح در نمونه‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر نیز مشاهده شد) منجر به افزایش عدم اطمینان شمارش می‌شود(۱۳).

بنابراین ارزیابی مرفولوژیک به علت حساسیت کم، کم سلول بودن نمونه‌ها، بررسی توسط هماتولوژیست و با توجه به شانس اشتباه با سلول‌های در حال تکثیر طبیعی که ممکن است با بلاست‌های لوسمی اشتباه شود، به عنوان روش مطلوب ارزیابی پاسخ به درمان محسوب نمی‌گردد و به همین دلیل روش‌های مختلف در ارزیابی MRD به کار گرفته شده است تا بتوان بر مشکلات روش‌های مرفولوژیک به خصوص حساسیت کم آن فائق آمد. روش های توصیه شده برای تشخیص MRD باید دارای مشخصات ذیل باشد(۱۴):

الف ـ حداقل حساسیت 10^{-3} داشته باشد.

ب ـ توانایی تفکیک بین سلول‌های بدخیم و سالم را بدون نتایج مثبت کاذب داشته باشند.

ج- شاخص ثابتی را باید ارزیابی کنند و گرنه منجر به منفی کاذب خواهند شد.

دـ قابلیت تکرار در بین مراکز مختلف داشته باشند که برای دستورالعمل‌های درمانی و تشخیص چند مرکزی ضروری است.

هـ ـ استاندارد سازی آن‌ها ساده باشد و نتایج زود در دسترس قرار گیرد.

وـ بتوان آن را کمی نمود.

در مطالعه حاضر که ارزیابی ژن IgH و Igκ در کنار بررسی مرفولوژی استفاده شد، حساسیت تشخیص MRD در IgH با رقت‌های تهیه شده در DNA مخلوط سلول‌های تک هسته‌ای افراد سالم، 10^{-3} و در برخی موارد حتی 10^{-4} نیز بود و در Igκ 10^{-2} تا 10^{-3} تعیین شد که تا حد زیادی حساسیت مورد نظر را تامین می‌کند. علاوه بر این به خصوص در فازهایی که بیمار کم سلول می‌شود(مثل روز ۱۴) حتی با حساسیت‌های کم نیز بسیار مفید است.

اگر چه اندازه‌گیری و تشخیص MRD امروزه مساله ثابت شده‌ای در پیش‌گیری عود بیماری به عنوان یک فاکتور پیش‌آگهی مستقل در درمان بیماری است اما اختلاف در روش‌ها، مقاطع زمانی سنجش MRD و حساسیت روش‌های اندازه‌گیری، قابلیت مقایسه نتایج حاصل از مطالعات مختلف را محدود می‌سازد(۲۰ – ۱۵، ۱۱). عمده‌ترین ضعف استفاده از بازآرایی در تشخیص MRD ، تغییر در کلون اولیه(Clonal Evolution) است که منجر به منفی کاذب در ارزیابی نمونه‌های پس از درمان می‌شود(۲۱). دکتر کامپانا و همکاران با بررسی الگوی کلونالیتی در زمان تشخیص و پس از درمان، نشان دادند که ۷۱٪ از بازآرایی‌های مورد استفاده IgH و TCR در ارزیابی MRD در زمان عود ثابت است و پایدارترین بازآرایی مربوط به Igκ-κde و حداقل پایداری مربوط به TCR-δ می‌باشد(۱).

ون دانگن و همکاران از اهداف کلونال TCR Ig در ارزیابی ۹۴ بیمار استفاده کردند که ۷۱٪ از اهداف در زمان تشخیص و بیشترین پایداری مربوط به Igκ-κde(۹۰٪) و بعد از آن TCR-γ(۷۵٪)، IgH(۶۴٪) و TCR-δ(۶۳٪) بود. پایداری در اهداف منوکلونال(۸۹٪) بیش از موارد اولیگوکلونال(۴۰٪) بود(۱۰).

روس و همکاران تفاوت کلونال در زمان تشخیص و عود را که می‌تواند منجر به منفی کاذب در ارزیابی MRD شود، ناشی از از دست دادن بازآرایی اولیه، اتصال VH به DJH ، جابجایی ژن VH و ظاهر شدن بازآرایی جدید که می‌تواند با ورود یاحذف در نوکلئوتیدها در محل اتصال VH-N-DH باشد می‌دانند(۲۲).

روس، ماسین‌تیر، بیزژوزن و کیو همگی در مطالعات مختلف اظهار می‌دارند که با توجه به تغییر کمتر در TCR-γ(۱۳٪)، هر زمان که ممکن باشد لازم است از TCR-γ به همراه TCR-δ و یا IgH در مطالعه MRD استفاده نمود(۲۲). پایدارترین ژن Igκ-κde ، ثابت‌ترین هدف برای PCR است چرا که ندرتاً اولیگوکلونال بوده و ناشی از بازآرایی نهایی است.

بنا به دلایل ذکر شده، توصیه بر این است که بیش از

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-07]

یک هدف(حداقل ۲ هدف) در ارزیابی MRD مورد استفاده قرار گیرد تا در صورتی که تغییر در کلون اولیه اتفاق افتد، منجر به منفی کاذب نشود(۲۱، ۱). در پژوهش حاضر ارزیابی MRD با تمام بازآرایی‌هایی که در زمان تشخیص مثبت بود انجام شد. موارد MRD^+ در روز ۱۴ با توجه به بازآرایی IgH و Igκ به ترتیب ۷۳/۵٪ و ۸۷/۵٪ تعیین شد. MRD^+ در روز ۱۴ در تمام موارد الگوی یکسانی نداشت به طوری که برخی بیماران باند مثبت مشابه زمان تشخیص داشتند و عدم پاسخ به درمان را به وضوح نشان می‌دادند. در گروهی دیگر واکنش به صورت باند ضعیف یا خیلی ضعیف بود که به نظر می‌رسد نشان‌دهنده پاسخ به درمان باشد. موارد فوق اگر چه با حساسیت آزمایش‌ها هنوز قابل تشخیص هستند و می‌توانند به عنوان دلیلی بر حضور سلول‌های لوسمی تفسیر شوند، اما ارزیابی دقیق و قضاوت کمی قابل انجام نیست. بالاخره در گروهی از بیماران نیز باند مربوط به زمان تشخیص را در زمینه پلی‌کلونال یا اسمیر ایجاد شده حاصل از سلول‌های طبیعی مشاهده کردیم. برای اطمینان از نتایج، برخی از مواردحتی تا چهار بار تکرار شدند و حداقل آزمایش برای دو مرحله بود.

در انتهای درمان القایی(روز ۲۸)، MRD^+ در ۵۵/۵٪ و ۹۳٪ از بیماران مورد بررسی بازآرایی IgH و Igκ مشاهده شد که روند کاهش MRD^+ در IgH به صورت مشخصی وجود داشت و در Igκ این روند تغییری نسبت به روز ۱۴ نداشت. اما در نوع واکنش MRD^+ که به صورت باند ضعیف یا خیلی ضعیف و یا باند مثبت با زمینه اسمیر بود، افزایش مشخصی وجود داشت که احتمالاً دال بر ادامه پاسخ به درمان است و با روش کمی باید تایید شود.

در مورد MRD^+ با IgH نیز میزان بیماران با باند مثبت اسمیر، افزایش نشان داد که می‌تواند دلیلی دیگر بر پاسخ به درمان باشد.

در ارزیابی نمونه‌های روز ۴۵ الی یکسال پس از درمان نیز روند کاهش MRD^+ مشاهده شد.

بیماری در ۴ بیمار از بیماران مورد بررسی در طی مطالعه عود کرد که ۳ بیمار از این گروه در رمیسیون کامل مرفولوژی بودند اما در بررسی روز ۱۴، ۲۸ و ۶ ماه(در یک بیمار)، MRD^+ توسط ۲ تا ۳ نوع بازآرایی و در یک بیمار توسط یک نوع بازآرایی مثبت بود. یکی از بیماران نیز در انتهای درمان القایی و ۳ ماه پس از شروع دارای ۱۰٪-۵٪ بلاست در آسپیره مغز استخوان بود. از چهار بازآرایی کلونال مثبت در زمان تشخیص، سه بازآرایی در این دو فاز مثبت ماند و یکی از بازآرایی‌ها حذف شد که می‌تواند به علت اشکال در PCR یا تغییر کلون دیگر باشد که باز ضرورت استفاده از حداقل دو هدف PCR را خاطر نشان می‌سازد.

فرونی و همکاران، کاهش پیشرونده‌ای از نظر MRD^+ با گذشت زمان از شروع درمان را گزارش کردند به طوری که از ۴۳/۲٪ MRD^+ در ۲-۱ ماه پس از شروع درمان به۲۵٪، ۲۲/۲٪ و ۱۸/۹٪ در طی ۵-۳، ۹-۶ و ۲۴-۱۰ ماه می‌رسد. نسبت بیماران با MRD^+ در گروهی که عود کردند بیش از گروهی بود که در رمیسیون کامل بالینی باقی ماندند. در عین حال در این گروه MRD^+ برای مدت طولانی‌تری پس از شروع درمان وجود داشت(۱۵).

در مطالعه حاضر نیز روند کاهش MRD^+ به وضوح دیده شد که پایش مستمر برای ارزیابی MRD را به خصوص در بیماران MRD^+ ضروری می‌سازد. در عین حال تمام بیمارانی که عود داشتند(۴: n) همگی MRD^+ بودند که اهمیت این روش ارزیابی را نشان می‌دهد.

فرونی و همکاران، بیشترین ارتباط بین نتایج MRD و عاقبت بیمار در زمان ارزیابی را ۹-۶ ماه پس از درمان ذکر می‌کنند(۱۵). ون دانگن و همکاران اعلام کردند، بیماران $MRD^+ \geq$ ۰/۱٪ در انتهای درمان القایی سه برابر شانس عود بیشتری در مقایسه با بیمارانی که MRD^+ کمی دارند خواهند داشت و در مقایسه با گروه MRD منفی شانس عودشان ۲۰-۱۰ برابر است(۱۰). ۵۰ درصد از کودکان مبتلا به ALL در انتهای درمان القایی بدون توجه به روش، MRD^+ هستند و ۴۵٪ از این گروه عود خواهند کرد. در حالی که تنها درصد کمی از بیماران MRD منفی(۷/۵٪)، عود می‌کنند(۲۳).

طبق گزارش سازمان پژوهش و درمان سرطان اروپا (EORTC: European Organization for Research & Treatment of Cancer) ۴۰٪ از بیماران در چهار هفته پس

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-07]

از درمـان MRD^+ هسـتند. گـروه مطالعـه IBFM میـزان MRD^+ را در هفتـه پـنجم، دوازدهـم و هفتـه ۲۵-۲۲ بـه ترتیب ۶۰٪-۵۰٪، ۳۰٪ و ۲۲٪-۲۰٪ گزارش می‌کنند(۱).

بریسکو و همکاران معتقدند در صورتی کـه در روز ۱۴ پس از شروع درمان، MRD با حساسیت 10^{-2} مثبت شـود، PPV ۱۰۰٪ با حساسـیت ۷۱٪ بـرای تعیـین عـود در مغـز استخوان وجود دارد(۲۴).

پانزروگرومایر نشان دادند که تخمـین MRD روز ۱۴ از نظر تعیین پیش آگهی مفید اسـت. اگـر ارزش پـیش‌آگهـی اندازه‌گیری MRD روز ۱۴ تایید شـود، مـی‌تـوان آن را بـه عنوان راهنمای درمـان و تصـمیم‌گیـری بـه موقـع درمـانی استفاده کرد(۲۵).

کامپانا و همکاران نشـان دادنـد در بیمـارانی کـه MRD آن‌ها در هفته ۱۴ درمان منفی شد، بروز جمعی عود مشـابه بیمارانی بود که هر زمانی بعد از درمان القایی MRD منفـی شدند. در مقابل اگر MRD در طی ادامه درمان بـاقی بمانـد با گذشت زمان شانس عود بیشتر می‌شود. بنابراین بیمارانی که پس از درمـان القـایی MRD^+ هسـتند ممکـن اسـت از ارزیابی‌هـای بیشـتر MRD در طـی رمیسـیون بـالینی سـود ببرند(۱۲).

در مطالعه چند مرکزی ۲۴۰ کودک مبتلا به ALL که بـر طبق پروتکل BFM تحت درمان قرار گرفتند، ون دانگـن و همکـاران بـا اسـتفاده از IgH، TCR و حـذف TAL-1 مشخص کردند که بیماران MRD^+، ۱۰-۵ برابر شانس عود بـالاتری(۸۶٪-۳۹٪ در سـه سـال) در مقایسـه بـا بیمـاران MRD منفـی در مقطـع مختلـف(۱۵-۳٪ در سـه سـال) دارند(۲۶).

مطالعات انجام شده توسط کیو، اسمیت، سـان میگوئـل، برنت، ون دانگن و دایوریو معتقدند کـه در ارزیـابی MRD در بیماران مبتلا به ALL می‌تـوان حساسـیت ۰/۰۱٪ را بـا فلوسیتومتری و PCR به دست آورد. ساده‌سازی روش‌هـای MRD مثل کاهش تعداد مارکرها در فلوسـیتومتری و عـدم استفاده از آغازگرهای اختصاصی Ig، TCR در PCR بـدون شک حساسیت را کاهش می‌دهد. اما به هر حال بر اسـاس نتایج این تحقیق مـی‌تـوان بـا ایـن معیـار موافـق بـود کـه حساسـیت بـا میـزان ۰/۱٪ ممکـن اسـت بـرای تشـخیص بیماران با خطر بالا کافی باشد(۱). در مطالعه حاضر نیـز در اکثر بازآرایی‌ها ما به این میزان از حساسیت دست یافتیم.

تـون و همکـاران، MRD^+ را در ۵۸/۸٪ از بیمـاران در انتهای درمان القایی، ۲۱/۴٪ درمدت ۶-۳ ماه، ۱۹٪ در طی ۲۴-۱۲ ماه و۸/۶٪ در انتهای درمـان نشـان دادنـد. در ایـن مطالعه MRD^+ در طـی هفتـه چهـارم و بـین ۳ الـی ۶ مـاه بیشتر از گـزارش‌هـای قبلـی در کشـورهای توسـعه یافتـه است(۲۳).

استفاده از روش‌های PCR دوگانه(IgH) ممکن است تـا حدی این اختلاف را توجیه نماید. خیلـی از مطالعـات بـر روی DNA استخراج و خالص شده از گستره‌های قـدیمی است که به خصوص در مورد تهیـه DNA از گسـتره‌هـای مغز استخوان، مراحل پیچیده‌ای وجـود دارد کـه مـی‌توانـد منجر به آسیب DNA شده و منفی کاذب ایجاد نماید و این در حالی است کـه مـا در مطالعـه خـود بلافاصـله پـس از جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای، DNA آن‌ها را استخراج نموده و در فاصله کوتـاهی از اسـتخراج، آزمـایش PCR را انجام دادیم. در عین حال استفاده از شاخص‌های مولکـولی متفاوت و چندین شاخص هم زمان ممکـن اسـت در ایـن موضوع مهم باشد.

اسـتفاده از روش‌هـایی بـا حساسـیت بیشـتر منجـر بـه تشخیص مقادیر کمتر MRD می‌شود، واقعیتی کـه همیشـه در ارتبـاط بـا عـود بیشـتری نیسـت(۲۸-۲۶، ۲۳). شـدت درمان، فاکتورهای مربوط به سـطح اقتصـادی ـ اجتمـاعی کودکان و وضعیت تغذیـه و نـژاد در بهبـود بیمـاران مـؤثر است و ممکن است با تشخیص MRD نیز تداخل کند(۲۹، ۲۳). امروزه مطالعه MRD جزیی از مدیریت درمان بیماران مبتلا به لوسمی است اما خیلی وابسته به وجود امکانـات و تجربه است. مهـم‌تـرین مسـاله در ارزیـابی MRD ، سـاده نمودن روش‌ها هم زمان با قابل اعتمـاد نگـه‌داشـتن نتـایج حاصـل از ارزیـابی آن‌هـا و گسـترش اسـتفاده از ارزیـابی MRD برای تمـام بیمـاران در تمـام نقـاط دنیـا اسـت. در مطالعه حاضر پس از تعیین بازآرایی با آغازگرهای مشـترک و تعیین تـوالی محصـولات PCR و بـه دنبـال آن سـاخت آغازگرهای اختصاصی توانستیم به حساسـیت 10^{-5} ـ 10^{-4} دست یابیم. اما این امر مستلزم صرف وقت زیاد، هزینه بالا

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-07]

برای تعیین توالی و ساخت آغازگرهای اختصاصی است و برای هر بیمار باید به صورت فردی انجام پذیرد. از طرف دیگر توافق بر این مساله که عدم حضور MRD توسط آغازگرهای مشترک در انتهای درمان القایی به عنوان یک معیار رمیسیون می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد و در بیماران MRD^+ در اصلاح روش درمانی مفید باشد، وجود دارد(۲۹). این یافته اخیراً توسط بریسکو نیز گزارش شده است(۱۳). اگر چه استفاده از آغازگرهای مشترک حساسیت کمتری نسبت به آغازگرهای اختصاصی دارند، غیر کمی هستند و قدری متغیرند اما ساده‌تر، سریع‌تر و ارزان‌تر هستند و اگر مثبت شدند با شانس عود بالا(۹۰٪<) همراهند(۲۹).

برخی از محققین نیز سعی در حذف استفاده از آغازگرهای اختصاصی را داشته‌اند و از شناسایی بر اساس سایز و شدت باند بعد از جداسازی بر روی الکتروفورز، روی ژل با قدرت تفکیک بالا و آغازگرهای مشترک استفاده کرده‌اند(۸). زمینه پلی‌کلونال حاصل از سلول‌های طبیعی مختلف است اما معمولاً حساسیت این روش را به تشخیص یک سلول در بین 10^{-3} سلول طبیعی محدود می‌کند. تشخیص منوکلونالیتی با آغازگرهای مشترک در زمان‌های طولانی‌تر از درمان ممکن است منجر به شناسایی بیمارانی شوند که در حال عود هستند. این امر به خصوص در مواردی که بیمار در نمونه قبلی فاقد باند کلونال بوده باشد صادق است(۳۰).

با شیمی درمانی معمولی حدود ۲۵٪-۲۰٪ از کودکان مبتلا به ALL عود می‌کنند. عودهای پس از درمان با گذشت زمان کاهش یافته و در بیمارانی که برای ۱۰ سال از انتهای درمان القایی در رمیسیون باشند، شفا یافته تلقی می‌گردند. مطالعه طولانی‌تری برای فهم رفتار این سلول‌های لوسمی و ارتباط‌شان با عود لازم است. به نظر می‌رسد جمعی از سلول‌های لوسمی قابلیت خفتگی طولانی مدت را دارند. این حالت می‌تواند ناشی از تغییرات داخل سلولی که منجر به جلوگیری از افزایش کلونال شده یا فاکتورهای دیگری مثل محیط میکرو مغز استخوان، سیستم ایمنی بیمار یا فاکتورهای دیگر که هنوز ناشناخته است باشد(۳۱).

در عین حال برخی معتقدند که ریشه کنی کامل کلون لوسمی برای شفا لازم نیست و فقط با کاهش به حداقل لزوم، در محدوده‌ای قرار می‌گیرند که سیستم ایمنی اثر مهاری روی آن‌ها جهت نگه‌داشتن در فاز غیر تکثیری را اعمال می‌نماید(۳۲، ۲۷). لذا استفاده از روش‌های خیلی حساس می‌تواند در عین افزایش قدرت تشخیص منجر به شناسایی سلول‌هایی شود که در فاز سکون و خفته قرار دارند و MRD^+ بدون عود را تشخیص دهند(مثبت کاذب)، علاوه بر این منفی شدن MRD لزوماً رمیسیون کامل بالینی را تضمین نمی‌کند(۳۳، ۲۹). بیمارانی که در طی یا اتمام درمان MRD منفی بوده‌اند ممکن است عود نمایند. این اشکال در تکثیر و MRD منفی ممکن است مربوط به اشکالات روش‌های PCR، به حضور کمتر از قدرت تشخیص روش مربوطه و یا به علت تغییر در توالی هدف PCR به خاطر اولیگوکلونالیتی یا تغییر کلونال باشد(۳۵-۳۴).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل، ارزیابی کلونالیتی و حداقل بیماری باقیمانده در بیماران ایرانی مبتلا به لوسمی لنفوبلاستی حاد فراهم گردیده و نتایج قابل مقایسه با مطالعات دیگر است. عمده‌ترین محدودیت، عدم انجام کمی حداقل بیماری باقیمانده به علت هزینه زیاد آن می‌باشد. در عین حال استفاده از ارزیابی کلونالیتی نه تنها در این گروه از بیماران بلکه در تشخیص و افتراق لنفوم‌های غیر هوچکینی از موارد واکنشی و نیز در تشخیص درگیری مایعات بدن مثل مایع نخاع با سلول‌های بدخیم چه در لوسمی و چه در لنفوم با حساسیت قابل قبولی کاربرد دارد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مقاله از دکتر سید حسین یحیوی و دکتر شهلا چایچیان و خانم‌ها فراهانی، رادپور، رستمی، بیاری و خانی کمال تشکر را دارند.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-07]

References:

1- Campana D. Determination of minimal residual disease in leukemia patients. Br J Haematol 2003; 121:823- 38.
2- Provan D, Gribben J. Detection of minimal residual disease in hematological malagnancies. In: Provan A, Gribben J, editors. Molecular Hematology. 1st edition. London; Blackwell Science:2000: 42-59.
3- Groves FD, Linet MS, Devesa SS. Patterns of occurrence of the leukemia. Eur J of cancer 1995; 31A: 941 - 9.
4- Greaves M. Childhood leukemia. Br Med J 2002; 324: 283 - 7.
5- Khalidi HS, Chang KL, Medeiros LJ, Brynes RK, Slovak ML, Murata-Collins JL, *et al*. Acute lymphoblastic leukemia: survey of immunophenotype, FAB classification, frequency of myeloid antigen expression, and karyotypic abnormalities in 210 pediatric and adult cases. Am J Clin Pathol 1999; 111: 467 - 76 .
6- Kim Y, Kang CS, Lee EJ, Kim WI, Shim SI, Kim SM, *et al*. Acute lymphoblastic leukemia with maturation - a new entity with clinical significance. Leukemia 1998; 12: 875 - 81.
7- Ott G, Kalla J, Ott MM, Schryen B, Katzenberger T, Muller JG , *et al*. Blastoid variants of mantle cell lymphoma: frequent bcl-1 rearrangements at the major translocation cluster region and tetraploid chromosome clones. Blood 1997; 89: 1421 - 9.
8- Van Der Velden VHJ , Willemse MJ, Van Der Schoot CE, Hahlen K, Van Wering ER, Van Dongen JJ. 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.
9- 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.
10- Szczepanski T, Willemse MJ, Brinkhof B, Van Wering ER, Van Der Burg M, Van Dongen JJ. 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.
11- Rubnitz JE, Pui CH. Recent advances in the treatment and understanding of childhood acute lymphoblastic leukemia. Cancer Treat Rev 2003; 29:31-44.
12- Campana D. Detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia: the St Jude experience. Leukemia 2001; 15:278-79.
13- Brisco MJ, Sykes PJ, Hughes E, Neoh SH, Snell LE, 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.
14- Szczepanski T, Orfão A, Van Der Velden VH, San Miguel JF, Van Dongen JJ. Minimal residual disease in leukemia patients. Lancet Oncol 2001; 2: 409– 17.
15- 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.
16- Cave H, Guidal C, Rohrlich P, Delfau MH, Broyart A, Lescoeur B, *et al*. 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.
17- 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
18- Biondi A, Valsecchi MG , Seriu T, D'Aniello E, Willemse MJ, Fasching KER Panzer-Gru¨mayer ER, *et al*. Molecular detection of minimal residual disease is a strong predictive factor of relapse in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia with medium risk features: a case control study of the International BFM study group. Leukemia 2000; 14: 1939– 43.
19- De Haas V, Verhagen OJHM, Von Dem Borne AE, Kroes W, Van Den Berg H, Van der Schoot CE. Quantification of minimal residual disease in children with oligoclonl B-precursor acute lymphoblastic leukemia indicates that the clones that grow out during relapse already have the slowest rate of reduction during induction therapy. Leukemia 2001; 15:134- 40.
20- Silverman LB, Sallan ES. Newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors and treatment. Current Opin Haematol 2003; 10:290-6.
21- 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.
22- 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.
23- Foroni L, Harrison CJ, Hoffbrand AV, Potter MN. Investigation of minimal residual disease in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia by molecular analysis. Br J Haematol1999; 105:7-24.
24- 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.
25- Panzer-Grumayer ER, Schneider M, Panzer S, Fasching K, Gadner H. Rapid molecular response during early induction chemotherapypredicts a good outcome in childhood acute lymphoblasticleukemia. Blood 2000; 95: 790– 4.
26- Van Dongen JJ, Seriu T, Panzar -Grumayer ER, Biondi A, Pongers-Willemse MJ, Corral L, *et al*. Prognostic

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-07]

value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia in childhood. Lancet 1998; 352: 1731 - 8.

27- Roberts WM, Estrov Z, Ouspenskaia MV, Johnston DA, McClain KL, Zipf TL. Measurements of residual leukemia during remission in childhood acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 1997; 336:317–23.

28- Gruhn B, Hongeng S, Yi H, Hancock ML, Rubnitz JE, Kitchingman GR, *et al*. Minimal residual disease after intensive induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia predicts outcome. Leukemia 1998; 12;675-81.

29- Scrideli CA, Kashima S, Cipolloti R, Defavery R, Bernardes JE, Tone LG. Minimal residual disease in Brazilian children with acute lymphoblastic leukemia: comparison of three detection methods by PCR. Leuk Res 2002;26:431- 8.

30- 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.

31- Okcu MF, Roberts WM, Johneston DA, Ouspenskaia MV, Papusha VZ, Brandt MA, *et al*. Risk classification at the time of diagnosis differentially affects the level of residual disease in children with B-precursor acute lymphoblastic leukemia after completion of therapy. Leuk Res 2003; 27:743- 50.

32- Lo Nigro L, Cazzaniga G, Cataldo A , Pannunizio A, Masera G, Biondi A, *et al*. Clonal stability in children with acute lymphoblastic leukemia ALL who relapsed 5 or more years after diagnosis. Leukemia 1999; 13:190- 5.

33- Goulden NJ, Knechtli CJ, Garland RJ, Langlands K, Hancock JP, Oakhil A, *et al*. Minimal residual disease analysis for the prediction of relapse in children with standard risk acute lymphoblastic leukemia. Br J Haematol 1998; 100:235- 44.

34- Steward CG, Goulden NJ, Katz F, Baines D, Martin PG, Oakhil A , *et al*. A polymerase chain reaction study of the stability of Ig heavy chain and T-cell receptor delta gene rearrangements between presentation and relapse of childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. Blood 1994; 83: 1355- 62.

35- Szczenpanski T, Beishuizen A, Pongers-Willemse MJ, Hahlen K, Van Wering ER, Van Dongen JJ, *et al*. 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.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-07]

Use of immunoglobulin heavy chain and kappa light chain gene rearrangements by PCR for molecular diagnosis of minimal residual disease in Iranian children suffering from β-precursor acute lymphoblastic leukemia

Poopak B.[1](PhD), Pourfathollah A.A.[2](PhD), Najmabadi H.[3](PhD), Yahyavi S.H.[1](MD), Mortazavi Y.[4](PhD), Vosough P.[5](MD), Ansari Damavandi S.[5](MD), Arjomandy rafsanjani K.[6](MD), Arzanian MT.[6](MD), Izadyar M.[7](MD), Alavi S.[6](MD), Shahgholi E.[7](MD), Bahoosh GR.[5](MD), Hamidieh AA.[8](MD), Faranoosh M.[9](MD), Khosravipoor G.[10] (MD), Haghnejad F.[1](MS), Yousefian A.[11](MS)

[1]*Islamic Azad University, Tehran Medical Branch*
[2]*Hematology Department, Tarbiat Modaress University*
[3]*Genetic Research Center, University of Social welfare and Rehabilitation Sciences*
[4]*Hematology Department, Zanjan Medical University*
[5]*Iran University of Medical Sciences*
[6]*Shaheed Beheshti University of Medical Sciences*
[7]*Tehran University of Medical Sciences*
[8]*Shariati Medical Center Hospita – Research Center*
[9]*Semnan University of Medical Sciences*
[10]*Payvand Medical Laboratory*
[11]*Iranian Blood Transfusion Center – Research Center*

Abstract

Background and Objectives

Diversity of IgH and *Igκ* molecules is generated during B and T Lymphocyte differentiation through the rearrangement of variable, diversity, junction and constant gene segments. Additionally, random insertion and deletions of nucleotides between gene segments make unique sequences which are cell or clone specific. Similar IgH and Igκ genes rearranged in normal cells of lymphoid leukemia cases can be used as a marker of clonality and for evaluation of minimal residual disease (MRD). The purpose of this study is to evaluate the pattern of *IgH* chain and *Igκ* gene rearrangements using polymerase chain reaction (PCR) in B-precursor acute lymphoblastic leukemias (ALL) to follow the MRD at day 14, day 28 (end of remission induction), week 10 , 3-6 months and 6-12 months after the initiation of treatment.

Materials and Methods

In our prospective study bone marrow aspirates of 183 children at the mean age of 63.6 months with diagnosis of acute leukemia were collected at admission before any chemotherapy. After reviewing cytomorphology and immunophenotyping, only 140 cases with diagnosis of B-precursor ALLs were selected for study. Mononuclear cells including leukemic blasts were isolated by density gradient. After DNA extraction, IgH and Igκ (Vκ I-IV / Kde) were amplified by consensus primers using PCR. PCR products were analyzed after heteroduplex analysis and polyacrylamide gel electrophoresis (silver stain). The DNA sequences were compared and aligned with the sequences homologous for IgH and IgK published by Gene Bank. The follow up specimens were collected at day 14, day 28 (end of remission induction), day 45-month 3 , and 3-6 months and 6-12 months after initiation of treatment. After routine cytomorphologic analysis, similar PCR was done on follow up extracted DNAs in parallel with diagnosis DNA. MRD was considered to be approved positive if bands similar to those at the time of diagnosis were present. Statistical analysis using SPSS software (version 11.5) was performed.

Results

90.5% of patients had clonal IgH gene rearrangements. Monoclonal, biclonal and oligoclonal patterns were observed in 57.8%, 34.9% and 5.5% of patients with IgH (CDR III) rearrangement, respectively. Clonal patterns of Igκ-Kde were detected in 59 (67%; n: 88) of BP-ALLs. According to cytomorphology about 92% of patients were in complete remission. MRD positivity decreased from more than 90% to 20% using different gene rearrangements in defined time points. Four patients who relapsed during follow up were MRD positive using 1-3 rearrangements and all except one were in clinical remission.

Conclusions

Clonal rearrangement of IgH had a pattern similar to other populations. IgK was slightly more frequent than previously reported and the VKI (25%) was the most common type. These differences can be explained by different techniques, DNAs and clonality markers. According to the results, these clonal markers can be used in diagnosis and follow up of MRD.

Key words: Gene rearrangement, Minimal residual disease (MRD), Acute lymphoblastic leukemia
SJIBTO 2007; 4(2):123-136

Received: 1 June 2006
Accepted: 5 May 2007

Correspondence: Poopak B.,PhD of Hematology. Islamic Azad University- Tehran Medical Branch.
P.O.Box:19295-1495, Tehran, Iran. Tel: (+9821)22006660; Fax: (+9821)22264145
E-mail:bpoopak@yahoo.com

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-07]