

# خون

فصلنامه علمی پژوهشی

دوره ۲ شماره ۶ پاییز ۸۴

## الگوی بازآرایی رده متقاطع ژن‌های گیرنده لنفوسيت T از نوع دلتا و گاما در کودکان ایرانی مبلا به لوسی لنفوبلاستی حاد از نوع پیش‌سازهای B با استفاده از واکنش زنجیره پلیمراز

دکتر بهزاد پوپک<sup>۱</sup>، دکتر علی اکبر پورفتح‌الله<sup>۲</sup>، دکتر حسین نجم‌آبادی<sup>۳</sup>، دکتر یوسف مرتضوی<sup>۴</sup>، دکتر سید حسین یحیوی<sup>۵</sup>، دکتر پروانه وثوق<sup>۶</sup>، دکتر محمد تقی ارزانیان<sup>۷</sup>، دکتر مینا ایزدیار<sup>۸</sup>، دکتر غلامرضا باهوش<sup>۹</sup>، دکتر الهام شاهقلی<sup>۱۰</sup>، دکتر امیر علی حمیدیه<sup>۱۱</sup>، دکتر محمد فرانوش<sup>۱۲</sup>، دکتر گلاره خسروی پور، فربیا حق نژاد دوشانلو<sup>۱۳</sup>

### چکیده

ساخته و هدف

بازآرایی قطعات ژنی در مسیر تکاملی لنفوسيت‌های B و T، نوع زیادی در مولکول‌های گیرنده لنفوسيت T (TCR) بازآرایی ایجاد می‌کند. در لوسی‌های لنفوئید از نوع ALL، B-precursor TCR علی‌رغم انتظار بازآرایی رده متقاطع در ژن‌های TCR ایجاد می‌گردد. هدف از مطالعه حاضر بررسی الگوی بازآرایی ژن‌های TCR (دلتاوگاما) در لوسی لنفوبلاستی حاد (ALL) کودکان از نوع پیش‌سازهای B توسط واکنش زنجیره پلیمراز می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

در مطالعه ایندهنگ حاضر، ۱۸۳ کودک با تشخیص اولیه لوسی‌حاد، قبل از شروع درمان مورد بررسی قرار گرفتند. پس از ارزیابی مورفولوژی و ایمونوفوتیپ، تنها ۱۴۰ بیمار با تشخیص ALL B-precursor برای مطالعه انتخاب شدند. سلول‌های تک هسته‌ای که بلاست‌ها را نیز شامل می‌شدند، با گرادیان غلظتی جدا شدند. پس از استخراج DNA، آزمایش PCR به منظور تکثیر منطقه بسیار متغیر (V $\delta$ 2-D $\delta$ 3، V $\delta$ 2-D $\delta$ 3) و TCR- $\gamma$  (D $\delta$ 2-D $\delta$ 3، V $\gamma$  II، V $\gamma$  I) با استفاده از پرایمرهای مشترک انجام شد. محصولات PCR پس از تجزیه هترودوپلکس والکتروفورز بر روی ژل پلی‌آکریل‌امید و رنگ‌آمیزی نقره مورد بررسی قرار گرفته و پس از تعیین توالی جهت تأیید با توالی‌های مشابه در بانک ژنی مقایسه شد. آنالیز آماری با نرم‌افزار SPSS و آزمون *Mann whitney* و کای دو (Chi-square) انجام شد.

### نتایج

بازآرایی کلونال  $\gamma$ -TCR شامل V $\gamma$  II / V $\gamma$  I و V $\gamma$  II به ترتیب در ۹/۶۴ و ۳/۷۹٪ از بیماران وجود داشت (بای کلونال: ۵/۵٪). بازآرایی II 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 (۷/۷٪) بای کلونال، ۳/۴٪ (الیگوکلونال) و D $\delta$ 2-D $\delta$ 3 (یک بیمار با الگوی بای کلونال) بودند.

### نتیجه گیری

الگوی کلونال ژن IgH و TCR- $\delta$  (D $\delta$ 2-D $\delta$ 3، V $\delta$ 2-D $\delta$ 3) مشابه جوامع دیگر بود. فراوانی بازآرایی  $\gamma$ -TCR و V $\gamma$  II (V $\gamma$  I) قدری بیش از گزارش‌های قبلی بوده و بر خلاف بقیه گزارش‌ها به استثناء گزارشی از بزرگیل، V $\gamma$  II شایع‌ترین بازآرایی را داشت. هیچ ارتباط معنی داری بین انواع مختلف بازآرایی و متغیرهای کمی وجود نداشت و تنها نکته جالب، کاهش بروز V $\delta$ 2-D $\delta$ 3 با افزایش سن (بیشتر از ۲ سال) بود. با توجه به نتایج حاصل می‌توان از این شاخص‌ها در تشخیص کلونالیتی و ارزیابی حداقل بیماری باقی‌مانده استفاده کرد.

**کلمات کلیدی:** بازآرایی ژن‌ها، کلونالیتی، حداقل بیماری باقی‌مانده، لوسی لنفوبلاستی حاد

تاریخ دریافت: ۱۶/۳/۱۶

تاریخ پذیرش: ۲۲/۶/۱۶

- ۱- مؤلف مسئول: PhD هماتولوژی و بانک خون آزمایشگاهی- استادیار دانشگاه آزاد اسلامی و دانشگاه تربیت مدرس- صندوق پستی ۱۹۳۹۵/۱۴۹۵
- ۲- کارشناس ارشد- PhD ایمونولوژی- دانشیار دانشگاه تربیت مدرس
- ۳- پژوهش عمومی- PhD بیولوژی مولکولی- دانشیار دانشگاه علوم بهزیستی
- ۴- کارشناس ارشد آمار- PhD هماتولوژی- استادیار دانشگاه علوم پزشکی زنجان

با گرادیان غلظتی ( $1/080\text{ g/cm}^2 - 1/077\text{ g/cm}^2$  فایکول) جدا شدن. استخراج DNA سلول‌های تک هسته‌ای به دو روش اصلاح شده میکرو (دستی)<sup>۱</sup> و با استفاده از کیت استخراج (High Pure PCR Template) محصول کارخانه روش انجام شد. برای اطمینان از کیفیت، اندازه‌گیری غلظت و درجه خلوص DNA استخراج شده (بیوفوتومتر اپندراف)، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ به منظور ارزیابی قطعه قطعه شدن و انجام آزمایش PCR با پرایمرهای ژن-β-گلوبین صورت گرفت. آزمایش PCR به منظور تکثیر منطقه بسیار متغیر ژن (Vδ2-Dδ3) (Dδ2-Dδ3) و TCR-δ (TCR-γ II, Vγ II, Vγ I) با استفاده از پرایمرهای مشترک انجام شد (جدول ۱).

**جدول ۱:** پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های بازآرایی شده از نوع گاما و دلتا TCR

نام پرایمر	توالی پرایمر
TCR - γ -Ext-F	5- CTgTgACAACAAgTgTTgTTCCAC
TCR - γ -Ext-R	5-gTgCTTCTAgCTTCCCTgTCT
TCR - γ -Int-F	5-gAgTACgCTgCCTACAgAgAgg
TCR - γ -Int-R	5-CCACTgCCAAgAgTTTCTT
TCR - Vγ I	5-CAggCCgACTggTCATCTgC
TCR - Vγ II	5- CAgCCCgCCTggAATgTgTgg
TCR - Jγ 1.3/2.3	5-CCgTATATgCACAAAGCCAAATC
TCR - Jγ 1.1/2.3	5-TTACCAggTgAAgTTACTATgAgC
Vδ2Dδ2-F2	5-ACCAAACAgTgCCTgTgTCAATAgg
Vδ2Dδ2-F1	5-gAgTCATgTCAgCCATgAg
Dδ2Dδ2-F	5 ACT CCA TgT TCA AAT AgA TAT -AgT ATT
Dδ2Dδ2-R2	5-gAAATggCACTTTgCCCCTgCAg

برای تمامی واکنش‌های PCR از dNTP به غلظت ۲۰۰ μM، کلورومینیزیم ۱/۵ mM poly Tag DNA به میزان ۱۵-۲۰ pmol به حجم ۵۰ و ۲۵ میکرولیتر استفاده شد. میزان DNA بیمار نهایی ۱۵۶ ماه ابتلا (حداقل ۶ ماه و حداً ۱۵۶ ماه)، تشکیل می‌دادند. اطلاعات مربوط به تاریخچه پزشکی، عالیم بالینی، اولین CBC و ایمونوفوتیپ بیماران ثبت شد. ۱۶ مورد به دلایل مختلف از جمله دژنرهشدن سلول‌ها، ارسال نمونه پس ازاولین دوره درمان، همولیز شدید، کهنه بودن نمونه و آلودگی باکتریایی از پژوهش حذف شدند. سلول‌های تک‌هسته‌ای که بلاست‌ها را نیز شامل می‌شدند،

1- Minimal Residual Disease  
2- Manual

#### نتایج

بازآرایی قطعات ژنی مختلف متغیر(V)، نوع (D)، اتصال (J) و ثابت (C) در مسیر تکاملی لنفوسيت‌های B و T، نوع زیادی در مولکول‌های زنجیره‌سنگین ایمونوگلوبولین (IgH)، زنجیره سبک ایمونوگلوبولین (Igκ) و گیرنده لنفوسيت T (TCR) ایجاد می‌کند (۱-۳). اضافه شدن یا حذف نوکلئوئیدها در بین قطعات ژنی بازآرایی شده، تنوع موجود را بیشتر نموده و منجر به تشکیل توالی‌هایی می‌گردد که برای هر سلول یا کلون اختصاصی است. در لوسومی‌های لنفوئیدی نیز بازآرایی مشابه سلول‌های طبیعی در ژن‌های Igκ، Igλ و TCR ایجاد می‌شود که به عنوان شاخص کلونالیتی محسوب شده و یکی از سه روش مهم ارزیابی حداقل بیماری باقیمانده<sup>۱</sup> همراه با روش‌های فلوسیتومتری و تشخیص نسخه‌های ژن‌های الحقیقی می‌باشد (۴-۶).

هدف از مطالعه حاضر، بررسی الگوی بازآرایی ژن‌های گیرنده لنفوسيت T از نوع دلتا و گاما به صورت رده متقاطع در لوسومی لنفوبلاستی حاد (ALL) کودکان از نوع پیش‌سازهای B توسط واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) برای اولین بار در کودکان ایرانی است.

#### مواد و روش‌ها

در مطالعه آینده نگر حاضر، ۱۸۳ کودک با تشخیص اولیه لوسومی حاد، قبل از شروع درمان مورد بررسی قرار گرفتند. پس از ارزیابی مورفولوژی (L1: ۴۴٪؛ L2: ۴۱٪) و ایمونوفوتیپ، تنها ۱۴۰ بیمار با تشخیص B-precursor ALL برای مطالعه انتخاب شدند که ۵۳٪ جمعیت را پسران و ۴۶٪ را دختران (۱/۱۴) میانگین سنی ۶۳/۶ ماه ابتلا (حداقل ۶ ماه و حداً ۱۵۶ ماه)، تشکیل می‌دادند. اطلاعات مربوط به تاریخچه پزشکی، عالیم بالینی، اولین CBC و ایمونوفوتیپ بیماران ثبت شد. ۱۶ مورد به دلایل مختلف از جمله دژنرهشدن سلول‌ها، ارسال نمونه پس ازاولین دوره درمان، همولیز شدید، کهنه بودن نمونه و آلودگی باکتریایی از پژوهش حذف شدند. سلول‌های تک‌هسته‌ای که بلاست‌ها را نیز شامل می‌شدند،

منفی آب مقطر استریل، کترل منفی مخلوط اصلی<sup>۱</sup> و کترل مخلوط DNA 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 گیرنده لنفوسيت T، ارزیابی هترو‌دپلکس استفاده شد.

محصولات PCR ابدا ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و سپس ۶۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد در ترمال سایکلر قرار گرفتند و سپس الکتروفوروز برروی ژل پلی آکریل‌امید 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 الکتروفوروز بر روی ژل آگارز ۱٪ و مرحله خالص سازی (کیت مگا پور از کمپانی SEQ آلمان) و با توالی‌های مشابه در بانک ژنی مقایسه شد آنالیز آماری Mann Whitney و کایدو انجام شد.

برای واکنش ۰/۵ µg D82 – D83 ۰/۱ بود. دو بازآرایی D82 – D83 به تفکیک با پرایمرهای R<sub>2</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>1</sub> برای بازآرایی اول و پرایمرهای F و R<sub>2</sub> برای بازآرایی دوم طبق جدول ۲ استفاده شد. با توجه به نتایج بهتر V82-D82 با پرایمرهای R<sub>2</sub>, F<sub>2</sub>, بیشتر از این جفت پرایم استفاده شد. تکثیر ژن بازآرایی شده گیرنده لنفوسيت T از نوع گاما با دو روش متفاوت از هم انجام شد.

در روش اول (PCR) <sup>۱</sup> دو گانه، منطقه بازآرایی شده V از γ-TCR با دو جفت پرایمرهای خارجی (γ-EXT F&R) و پرایمرهای داخلی (γ-Int F&R) تکثیر شد (جدول ۲). محصول واکنش اول را به نسبت ۱۵۰۰ ارقیق کرده و در واکنش دوم مورد استفاده قراردادیم.

در روش دوم PCR، بازآرایی‌های ذیل γ-I - J γ II - J γ III - J γ IV - J γ V با همان مقادیر ذکر شده برای TCR-δ و طبق جدول ۲ تکثیر شد.

برای تمام واکنش‌ها، کترل مثبت (ارسالی توسط پروفسور تون و بیمارانی که بازآرایی مثبت داشتند)، کترل

جدول ۲: برنامه واکنش زنجیره پلیمراز به منظور تکثیر ژن گیرنده لنفوسيت T از نوع دلتا و گاما

	دنازره سینه اولیه	دنازره سینه دوم	اصصال پرایمرهای (Annealing)	زنجیره امتداد (Extension)	تکثیر	تکثیر
TCR-δ V82-D83 / D82-D83	۹۴°C/۳min	۹۴°C/۱min	۵۷ °C vs. ۶۰ °C/۴۵sec	۷۲°C/۲min	۳۵	۷۲°C/۱۰ Min
TCR - γ	γ-Ext	۹۵°C/۳min	۹۲°C/۴۵sec	۶۰°C/۹۰ sec	۳۵	۷۲°C/۱۰ min
	γ- Int	۹۲°C/۱min	۹۲°C/۴۵sec	۶۰°C/۴۵sec	۲۰	۷۲°C/۱۰ min
TCR - γ (V γ I / II / IV)	۹۵°C/۳min	۹۲°C/۴۵sec	۶۰°C/۴۵sec	۷۲°C/۲min	۳۰ ۳۵	۷۲°C/۱۰ min

1- Nested PCR

2- Master mix

**یافته‌ها**

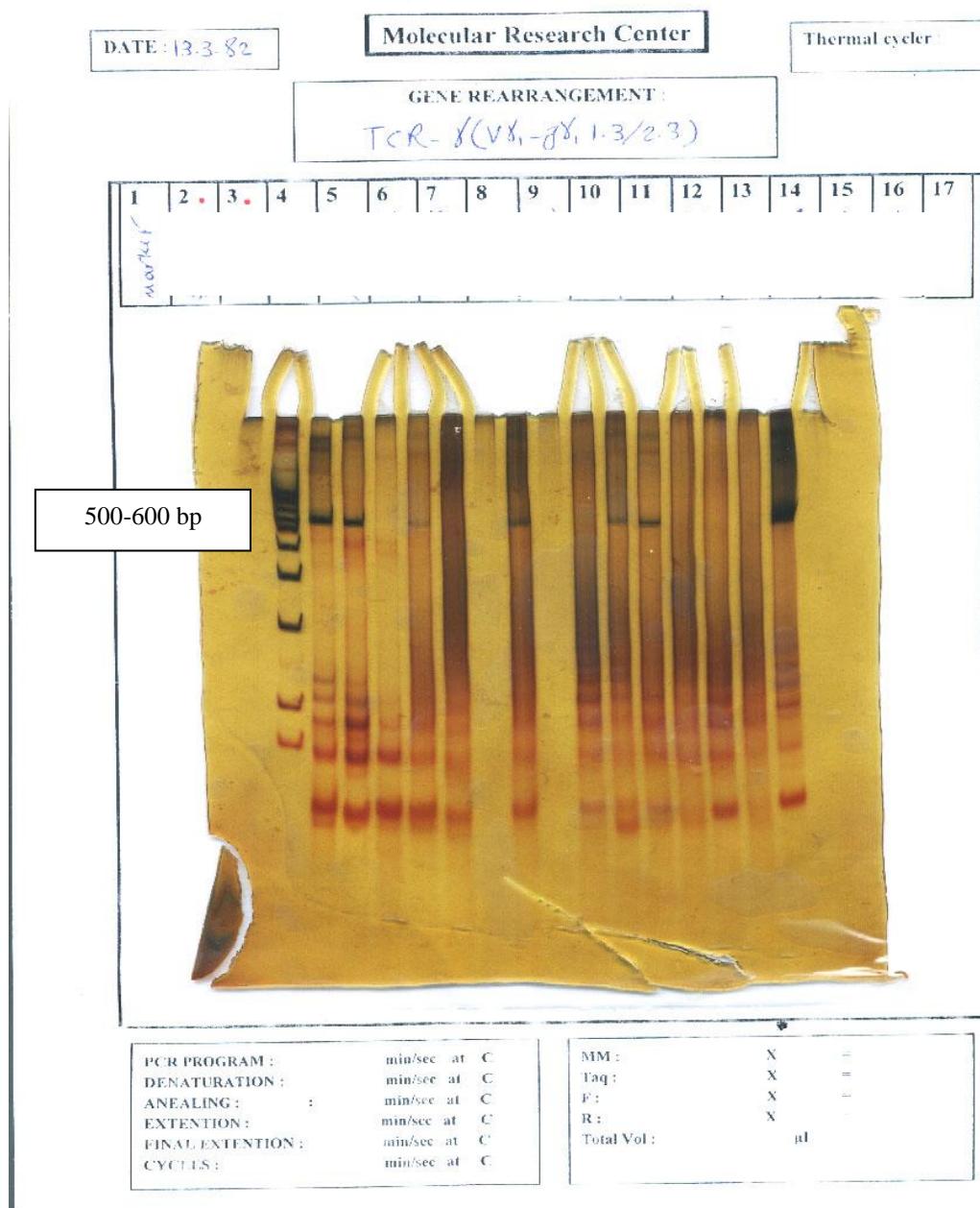
در مطالعه حاضر، ۱۸۳ کودک با تشخیص اولیه لوسمی حاد مورد بررسی قرار گرفتند که پس از ارزیابی سیتومورفولوژی و ایمونوفوتیپ، ۷ بیمار مبتلا به لوسمی میلؤیدی حاد (AML)، ۹ بیمار مبتلا به T-ALL (T-ALL)، ۷۲ بیمار مبتلا به لنفوبلاستی حاد از نوع BP-ALL (BP-ALL) بودند. در گروه ۷۲ پیش‌سازهای B طبقه‌بندی شدند. سه شاخص شایع در این بودند. میانگین سنی کودکان مبتلا ۵/۳ ± ۳/۵ (۵/۳) با حداقل سن ۶ ماه و حداکثر ۱۳ سال بود. شایع ترین شکایات عمدۀ بیماران عبارت بودند از کم خونی و علایم مربوط به آن از جمله رنگ پریدگی، ضعف و بی حالی، تب و دردهای استخوانی. سابقه فامیلی ابتلا 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. در اولین CBC، بیماران از نظر شمارش گلوبولهای سفید در چهار گروه نرمال (۲۸/۷۵٪)، لکوپنی (۱۶/۲۵٪)، لکوسیتوز (۴۷/۵٪) و هیپرلکوسیتوز (۷/۵٪) قرار گرفتند. در بررسی

آسپره‌های مغزاستخوان رنگ آمیزی شده با رنگ رایت، ۴۸ FAB<sup>۱</sup> و (۴۱٪) نفر از بیماران براساس معیارهای ALL-L1 و ALL-L2 تشخیص داده شدند. در ۴ بیمار تشخیص L2L1 و در بقیه بیماران طبقه‌بندی براساس FAB ممکن نشد که علت آن، رقیق شدن نمونه‌های مغزاستخوان یا خون محیطی و کم سلول بودن نمونه گزارش شد. با توجه به ارزیابی ایمونوفوتیپ 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).

بازآرایی کلونال ناحیه متغیر (Variable.V) ژن گیرنده BP-ALL از نوع گاما (TCR-γ)، در ۱۲۶ بیمار ارزیابی شد که به دو صورت بود، در نوع اول موارد مثبت و مثبت به همراه اسپیر خفیف کلونال در نظر گرفته شدند در حالی که در نوع دوم فقط مواردی که باند بدون اسپیر داشتند کلونال تلقی شدند که به تفکیک در ۱۱۴ (٪/۹۰/۴) و ۱۰۰ (٪/۷۹/۳) نفر از بیماران مشاهده شد. در ۱۰۰ بیمار، منوکلونال و در ۵ بیمار (٪/۴)، با کلونال بوده و هیچ مورد اولیگوکلونال مشاهده نشد (شکل ۱). بازآرایی VγI-JγI.3/2.3 ۲/۳ و VγI-JγI.1/۱ ۲/۱ در ۷۳ TCR-γ مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج آن در جدول ۳ آمده است.

جدول ۳: فراوانی بازآرایی کلونال ژن گیرنده لنفوسيت T از نوع γ در ناحیه I-V-γI.3/2.3 با JγI.1/2.1 مثبت بوده‌اند مخاط شده است و مواردیکه با هر دو مثبت بوده اند حذف گردیده است

VγI-JγI.3/2.3 + JγI.1/2.1	VγI-JγI.1/2.1 n : ۷۳	VγI-JγI.3/2.3 n : ۷۴	بازآرایی
۲۲ (٪/۲۹/۷)	۱۰ (٪/۱۳/۶)	۲۰ (٪/۲۷)	- کلونال
۱۸ (٪/۸۱/۸)	۷ (٪/۷۰)	۱۷ (٪/۸۵)	• منوکلونال
۴ (٪/۱۸/۲)	۳ (٪/۳۰)	۳ (٪/۱۵)	• با کلونال



شکل ۱: نتایج بازآرایی ژن گیرنده لنفوسیت T از نوع گاما با پرایمرهای مشترک را نشان می‌دهد. لاین ۲، ۵، ۷، ۸ و ۱۰ بازآرایی متکلونال را به صورت یک باند در حدود ۴۰۰-۵۰۰ bp را نشان می‌دهد. لاین ۱۱ مربوط به DNA پلی کلونال تهیه شده از سلولهای تک هسته‌ای هشت فرد سالم است

در ارزیابی بازآرایی ژن گیرنده لنفوسیت T از نوع دلتا (TCR-δ) که برای دو باز آرایی Vδ2-Dδ3 و Dδ2-Dδ3 (TCR-γ) میانگین متغیرهای کمی شامل سن، گلبول سفید، پلاکت، هموگلوبین و شاخص‌های سلولی ایمونوفنوتیپ

برای بیمارانی که قادر بازآرایی ناحیه VγI بودند، منطقه VγII از ژن γ TCR-γ مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۳). نتایج کلی بازآرایی مناطق VγI (۴/۲۹٪) و VγII (۸/۴۶٪) از ژن γ TCR-γ نشان دهنده بازآرایی کلونال در ۹/۶۴٪ از بیماران ارزیابی شده است.

کاهش وزن، تمايل به خونریزی، عفونت و تورم غدد لنفاوی در دو گروه با و بدون بازآرایی کلونال  $\gamma$ -TCT و TCR- $\delta$  و توسط آزمون‌های کایدو و دقیق فیشر تفاوت معنی داری وجود نداشت.

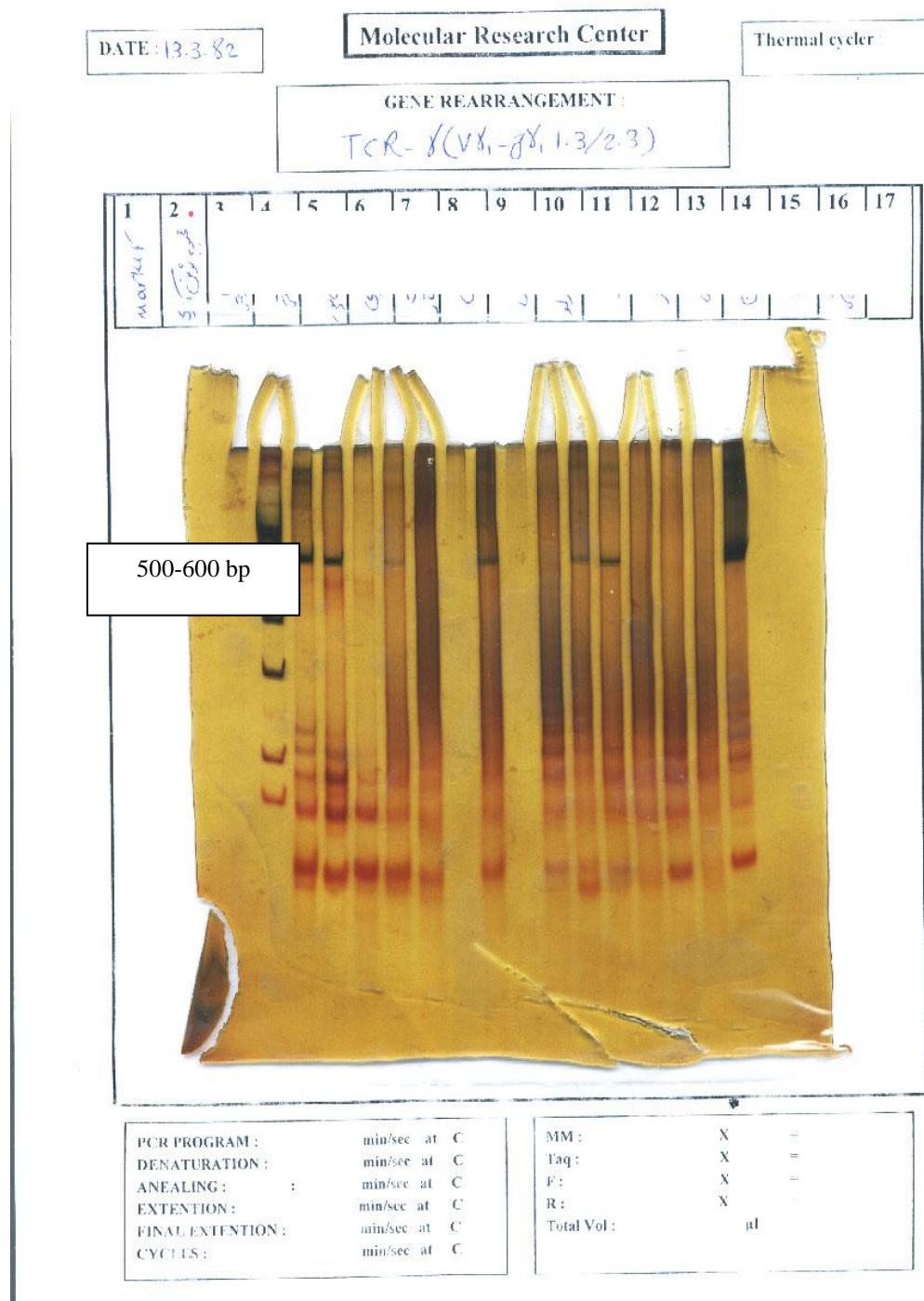
(CD, ۲, ۲۲c, ۲۲s, HLA-DR) در دو گروه با و بدون بازآرایی کلونال  $\gamma$ -TCT- $\delta$  و TCT- $\delta$  توسط آزمون  $\chi^2$ ، تفاوت معنی داری نداشت. بین متغیرهای کیفی شامل جنس، تب، کم خونی، هپاتومگالی، اسپلنتومگالی،

جدول ۴: فراوانی بازآرایی کلونال در ژن گیرنده لنفوسيت T از نوع  $\gamma$  در ناحیه V $\gamma$ II، در ستون سوم تنها مواردی قید شده است که بازآرایی یکی از دو ناحیه J $\gamma$ l.1/2.3 یا J $\gamma$ l.1/2.1 را داشته است و مواردی که با هر دو مثبت بوده‌اند لحاظ نگردیده است.

V $\gamma$ II-J $\gamma$ 1/۳ / ۲/۳ or J $\gamma$ l.1/۱ ۲/۱ n : ۶۴	V $\gamma$ II-J $\gamma$ 1/۱ ۲/۱ n : ۴۱	V $\gamma$ II-J $\gamma$ 1/۳ ۲/۳ n : ۶۴	بازآرایی
۲۹(۴۵/۳)	۱۲(۲۹/۲)	۲۰(۳۱/۲)	- کلونال
۲۸(۹۶/۵)	۱۱(۹۱/۶)	۲۲(۱۰۰)	• منوکلونال
۱(۳/۵)	۱(۸/۴)	.	• بايكلونال

جدول ۵: فراوانی بازآرایی کلونال D $\delta$ 2-D $\delta$ 3 و V $\delta$ 2-D $\delta$ 3 از ژن TCR- $\delta$  در BP-ALL را نشان می‌دهد.

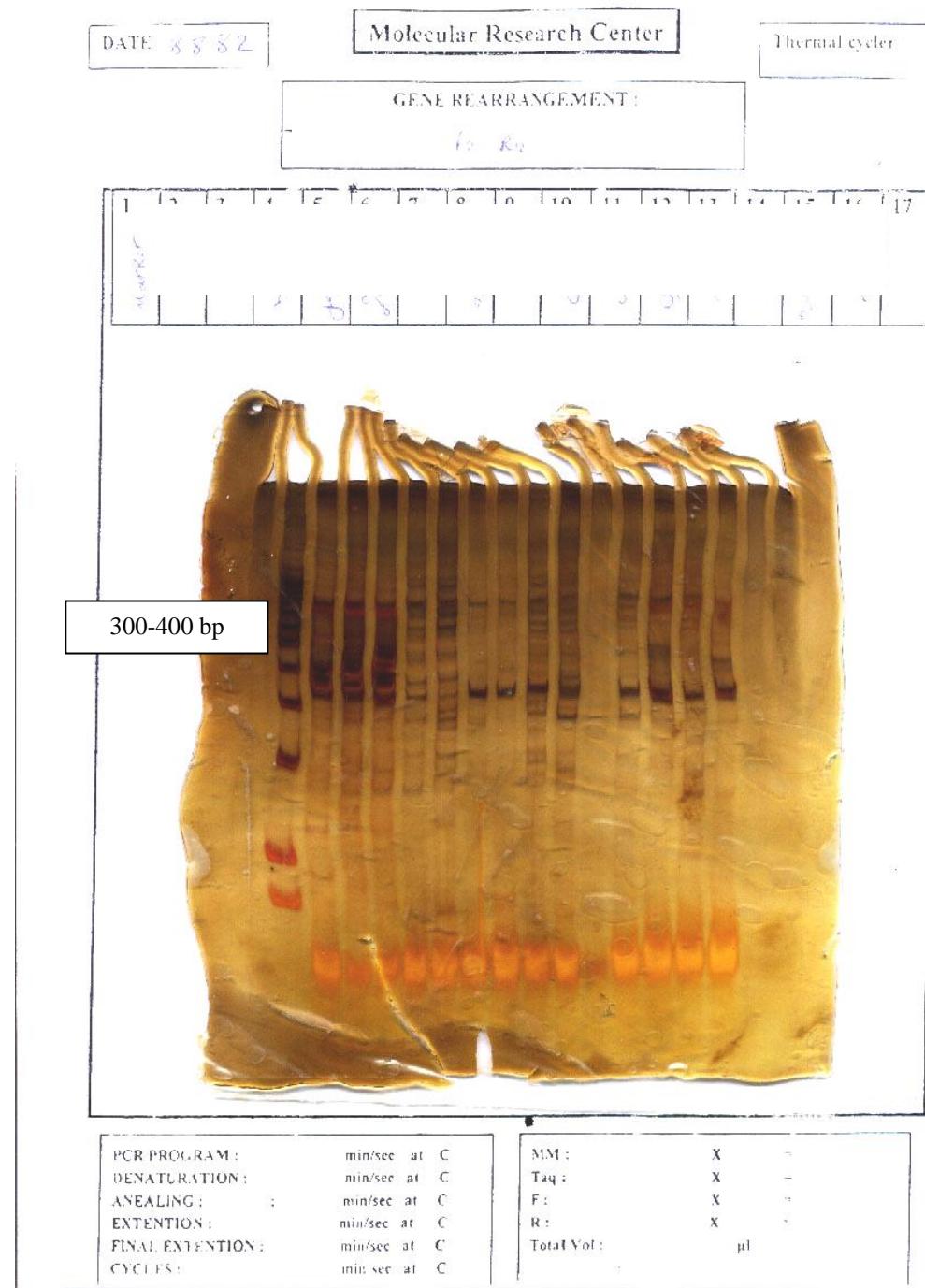
TCR- $\delta$		بازآرایی
D $\delta$ 2-D $\delta$ 3 n : ۶۶	V $\delta$ 2-D $\delta$ 3 n : ۱۰۴	
۱۱(۱۶/۶)	۴۷(۴۵/۲)	- کلونال
۱۰(۹۱)	۳۲(۶۸/۱)	• منوکلونال
۱(۹)	۱۳(۲۷/۷)	• بايكلونال
.	۲ (۴/۳)	• اولیگوکلونال
۵۸ (۵۵/۸)	مجموع هر دو بازآرایی	•



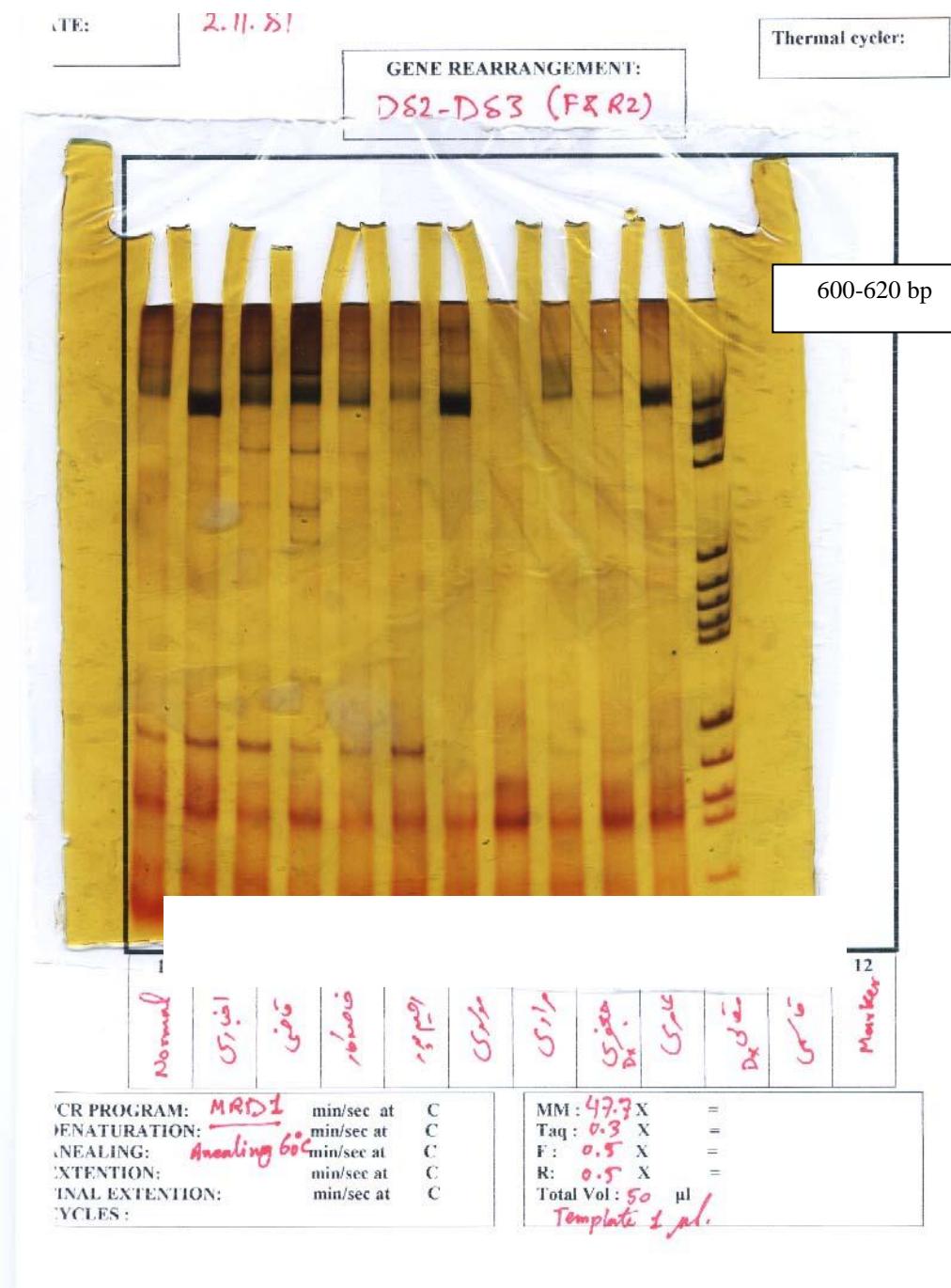
شکل -۲- نتایج بازآرایی ژن گیرنده لنفوسیت T از نوع گاما با پرایمرهای V $\gamma$ 1 و J $\gamma$ 1.3/2.3 را نشان می دهد. لاین ۲ و ۳ بازآرایی منوکلونال را به صورت یک باند در حدود ۵۰۰-۶۰۰ bp را نشان می دهد. لاین ۴ تا ۱۶ مربوط به بیماران قادر بازآرایی مذبور است که به صورت باند خفیف یا اسپیر و یا منفی است.



شکل - ۳ - نتایج بازآرایی ژن گیرنده لنفوسیت T از نوع گاما با پرایمرهای VγI/2.1 و JγI.1 را نشان می دهد. لاین ۲، ۴، ۷، ۸، ۱۴ و ۱۵ بازآرایی منوکلونال را به صورت یک باند در حدود ۲۰۰-۳۰۰ bp را نشان می دهد.



شکل - ۴- نتایج بازآرایی ژن گیرنده لنفوسیت T از نوع دلتا با پرایمرهای F2 و R2 را نشان می دهد که برای شناسایی بازآرایی Vδ2-Dδ3 به کار می رود . لاین ۲ ، ۳ ، ۴ ، ۷ ، ۸ ، ۱۲ ، ۱۵ الی ۱۵ بازآرایی منوکلونال را به صورت یک باند در حدود ۳۰۰-۴۰۰ bp را نشان می دهد. لاین ۱۰ مربوط به بیمار با بازآرایی بایکلونال است که به صورت دو باند دیده می شود.



شکل -5- نتایج بازآرایی ژن گیرنده لنفوسیت T از نوع دلتا با پرایمرهای F و R2 را نشان می دهد که برای شناسایی بازآرایی D82-D83 به کار می رود . لاین ۱، ۲ و ۱۱ بازآرایی منوکلونال را به صورت یک باند در حدود ۶۰۰-۶۵۰ bp را نشان می دهد. لاین ۱ مربوط به نمونه نرمال با بازآرایی پلی کلونال است که به صورت اسپیر دیده می شود.



## بحث

HLA-DR (%.۵۳) و CD10 (%.۰۵۷) که با توجه به این که گروه اصلی مطالعه BP-ALL بود، منطقی به نظر می رسد.  
بازآرایی کلونال TCR-γ با پرایمرهای مشترک برای ناحیه متغیر (Vγ) و نیز پرایمرهای گروه VγI و VγII که اختصاصی تر هستند، توسط روش PCR دوگانه و روش PCR معمولی ارزیابی شد که به ترتیب ۷۹/۳٪ و ۶۴/۹٪ از بیماران به تفکیک بازآرایی کلونال را داشتند. بازآرایی کلونال γ-TCR در مطالعات مختلف، ۳۹٪ تا ۷۹٪ در BP-ALL گزارش شده است(۱۷-۱۹، ۴، ۳). علت اختلاف میزان بازآرایی در استفاده از دو گروه پرایمر، می تواند مربوط به ماهیت آزمایش PCR انجام شده (PCR دوگانه در مقابل PCR معمولی) و نیز عدم استفاده از پرایمرهای گروه VγIII و VγIV از سری پرایمرهای اختصاصی تر باشد.  
میزان بازآرایی γ-TCR در مطالعه حاضر نسبت به برخی از گزارش های قبلی که ۲۳٪ تا ۶۰٪ را ذکر نموده اند بیشتر است (۲۲-۲۰). شایع ترین بازآرایی این نوع نیز در ناحیه متغیر مربوط به گروه VγI در ALL های نوع B و T است که در ۷۰٪ از آل های بازآرایی شده گزارش شده است در حالی که در مطالعه حاضر در ۴/۲۹٪ از بیماران و ۷۵/۴۳٪ از آل های بازآرایی شده دیده شده که نسبت به گزارش های قبلی کمتر است (۷). نکته جالب دیگر بیشتر بودن بازآرایی گروه VγII است که در ۸/۴۶٪ از بیماران و ۲۵/۵۶٪ از آل ها وجود داشت، در حالی که بازآرایی VγII تنها برای ۲۰٪ از موارد BP-ALL گزارش شده است.

در مطالعه ای که توسط ٹون و همکاران انجام شده، بازآرایی ناحیه VγII را در ۴۸٪ از آل ها گزارش کردند که در مطالعه ما حتی از این مقدار هم بیشتر است. شایع ترین قطعه بازآرایی شده در γ-TCR از طرف مقابل مربوط به بازآرایی γ-TCR-ALL گزارش شده است (۲۱-۲۴). در مطالعه حاضر نیز بیش از ۷۹٪ از آل های بازآرایی شده دارای این قطعه از ژن بودند. استفاده از روش های مختلف (ساترن بلات، PCR پرایمرهای مشترک، PCR همراه با همو/هتردوپلکس، تعیین توالی DNA) ممکن است قدری از این اختلاف را توجیه نماید اما تفاوت جوامع از نظر نژاد، وضعیت اقتصادی - اجتماعی، ازدواج با نژادهای دیگر

مطالعه حاضر بر روی گروه نسبتاً بزرگی (n: ۱۸۳) از کودکان مبتلا به انواع لوسومی های حاد که به سه مرکز هماتولوژی - انکولوژی کودکان در تهران مراجعه نموده بودند، انجام شد. با توجه به مورفو لوژی و ایمونوفوتوتیپ، ۱۳۵ بیمار مبتلا به لوسومی لنفوبلاستی حاد از نوع پیش سازهای B (BP-ALL) و ۶/۲۵ بیمار مبتلا به T-ALL بودند. میزان فراوانی BP-ALL در مطالعه حاضر، بیش از گزارش های موجود که فراوانی را بین ۷۵٪ تا ۸۹٪ اعلام می دارند، می باشد (۴-۹). نفر ۷۲ نفر (۰/۵۳٪) از بیماران مذکور و ۶۳/۴۶٪ نفر مؤنث بودند (مرد: زن ۱/۱۴) که نشان دهنده افزایش نسبی ابتلا دختران در مقایسه با گزارش های دیگر در مورد کلونالیتی و MRD که هیچ انتخابی از نظر جنس صورت نگرفته می باشد (۱۳-۱۰). در گزارشی از انگلستان و ترکیه، Gameiro و همکاران نسبت ابتلا پسران به دختران را ۲/۲۵ و Scrideli و همکاران از بزریل این نسبت را ۲ به یک گزارش کردند که بیش از مقاله موجود است (۷-۴). سریو و همکاران نسبت فوق را ۱/۶ گزارش نمودند (۱۲). میانگین سنی بیماران مبتلا، ۵/۳ سال با حداقل و حداکثر ۶ ماه و ۱۳ سال به تفکیک بود.

تغییرات مورفو لوژیک آسپیره های مغزا استخوان در بدوان تشخیص، همان تغییرات قابل انتظار از جمله افزایش بارز بالاست ها، کاهش پیش سازی های گلبلوں سفید و پلاکتی بود. ۵/۴۹٪ از بیماران بر اساس معیارهای FAB جزو گروه ALL-L1 و ALL-L2 و ۵/۴۶٪ جزو گروه ALL-L2 و چهار بیمار جزو L1 L2 طبقه بندی شدند. امروزه مورفو لوژی L1 و L2 جز این که در کودکان و بزرگسالان به تفکیک شایع تر است، مقوله خاصی از بیماری را تعریف نکرده و ارتباطی با ایمونوفوتوتیپ و سیتوژنتیک ندارد و در طبقه بندی سازمان بهداشت جهانی (WHO) نیز به کار گرفته نشده و بیشتر ارزش تاریخی دارد (۱۵، ۱۶). در تعیین پیش آگهی نیز جایگاهی را برای این طبقه بندی قائل نیستند. سه شاخص شایع بیماران مورد بررسی عبارت بودند از ۱۹ CD (٪۷۴)،

با قدرت تفکیک بالا (پلی آکرپلامید٪/۸) و رنگ آمیزی نقره، براساس 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 نرdban در می‌آمد که دال بر نتیجه منفی یا تکثیر پلی کلونال بود. در مورد TCR-γ با بررسی ناحیه متغیر(V)، تنها ۴٪ از بیماران الگوی بایکلونال داشته و هیچ مورد اولیگوکلونال مشاهده نشد. در بررسی با پرایمرهای گروه VγII و VγI به ترتیب بایکلونالیتی در ۱۸٪ و یک بیمار مشاهده شد. بازآرایی دو آلتی در ۳۵٪ از موارد BP-ALL گزارش شده است اما بیش از دو بازآرایی γ-TCR، تنها در ۳٪ موارد ثبت شده است که همگی نیز جزو گروه BP-ALL بوده‌اند (۷).

علت شیوع کمتر بایکلونالیتی در TCR-γ فعالیت کمتر بازآرایی نسبی است که در بازآرایی Ig و TCR مسؤول بازآرایی رده متقطع می‌باشد و علت دیگر در دسترس نبودن لکوس TCR در پیش سازهای خیلی نارس لنفوئیدی است (۶، ۳۰).

اولیگوکلونالیتی γ-TCR در BP-ALL صفر تا ۸ درصد و در T-ALL، صفر تا ۵ درصد گزارش شده است (۳۶، ۳۱-۳۳، ۲۱، ۱۳). استثنائاً توسط شپانسکی و همکاران، اولیگوکلونالیتی در ۳۸٪ از بیماران BP-ALL گزارش شده است (۶). در مطالعه گونه بازآرایی در یک بیمار بدون پلی زومی کروموزوم ۷ تعریف کرده‌اند، تنها ۲ مورد از ۵۴ بیمار (٪۴) Rده ALL دارای الگوی اولیگوکلونال بوده و هیچ بیمار T-ALL این الگو را نداشته است (۷).

در مطالعه حاضر، ۲۷٪ از موارد بازآرایی V82Dδ3 دارای الگوی بایکلونال و ۴٪ الگوی اولیگوکلونال داشتند. در مورد D82Dδ3 تنها در یک بیمار (٪۹) بازآرایی بایکلونال مشاهده شد. زورستاد و پانزرگرمایر بازآرایی بای و اولیگوکلونال را به ترتیب در ۲۵٪ و ۳۰٪ از کودکانمتلا به BP-ALL گزارش نمودند (۲۷، ۳۷).

طبق نظر گرومایر و همکاران بازآرایی‌های چندگانه

و شاید به خاطر بیشتر یا طولانی‌تر شدن تحریک سیستم ایمنی به علت برخورد با آنتیژن‌های متنوع ویروسی و باکتریایی در کشورهای در حال توسعه مثل ایران در مقایسه با کشورهای توسعه یافته باشد. در گزارشی از برزیل توسط گون و همکاران، موارد مشابه ایران گزارش شده است (۷). در دو مطالعه که در هند توسط سازاوال و نیرمالا انجام شده، شیوع بازآرایی γ-TCR از کشورهای توسعه یافته متفاوت بوده است به طوری که تنها در ۲۲٪ از موارد BP-ALL این نوع بازآرایی گزارش شده است (۲۵-۲۶). البته دریکی از این مطالعات نوع بازآرایی بررسی شده متفاوت با مطالعات دیگر است و بیشتر حذف ناحیه Cγ1 از ژن γ-TCR را بررسی کرده است که می‌تواند توجیهی بر این اختلاف باشد (۲۵).

با توجه به گزارش‌های قبلی که شایع‌ترین بازآرایی TCR-δ V82Dδ3 و D82Dδ3 اعلام کرده‌اند، ما نیز در بررسی بیماران ایرانی الگوی بازآرایی این دونوع را ارزیابی کردیم. بازآرایی کلونال V82Dδ3 در ۴۵٪ و D82Dδ3 در ۱۶٪ از بیماری که ارزیابی شدند وجود داشت و در کل بازآرایی δ-TCR-δ ۵۵٪ تعیین شد. این بازآرایی‌ها منجر به تولید ژن بازآرایی شده ناقص بدون محصول شده و هیچ عملکردی نخواهند داشت (۲۷). در بررسی‌های مختلف، میزان بازآرایی δ-TCR-δ، ۲۸٪ تا ۶۷٪ گزارش شده است که اختلاف بارزی با نتایج ما ندارد (۳-۲۹). در ضمن بازآرایی V82Dδ3 در شرایط طبیعی دیده نشده و منحصر در BP-ALL گزارش شده است که این پدیده آن را به عنوان یکی از شاخص‌های ارزشمند ارزیابی کلونالیتی و MRD مطرح می‌سازد (۲۱).

ژن‌های Ig و TCR هردو دارای توالی پیام بازآرایی<sup>۱</sup> هستند و مناطقی را مشخص می‌کنند که برای بازآرایی در دسترس است و می‌تواند منجر به ادامه بازآرایی شود. اما این مطلب نشان دهنده نوع نهایی رده سلول‌های بدخیم نخواهد بود. بازآرایی نسبی<sup>۲</sup> بیشتر از بازآرایی‌های کامل (VDJ یا VJ) اتفاق می‌افتد. علاوه بر این بازآرایی رده متقطع در بین بدخیمی‌های لنفوئید (ALL) بیش از انواع رسیده تر است. در ارزیابی بازآرایی‌های ژن‌های δ-TCR و γ-TCR پس از انجام آزمایش هترودوبلکس و الکتروفورز بر روی ژل

1- Recombination Signal Sequence : RSS  
2- DJ Recombinant

بینی نیست و تنها در کودکان BP-ALL کمتر از ۲ سال، شانس بازآرایی V<sub>δ</sub>2D<sub>δ</sub>3 زیاد است.

بین وجود یا عدم وجود متغیرهای کیفی مثل جنس، تب، کم خونی، هپاتومگالی، اسپلنومگالی، تمایل به خونریزی، عفونت و تورم غدد لنفاوی نیز در دو گروه با و بدون بازآرایی اختلاف معنی داری وجود نداشت. تنها یک گزارش از هند توسط بهارگاوا و همکاران وجود دارد که بازآرایی TCR-δ را در پسرها بیش از دخترها گزارش کرده است (۷۴٪ در مقابله با ۴۰٪ P=۰/۰۰۸). در همین ۳/۵ BP-ALL بررسی در هند نسبت پسر به دختر مبتلا به (۲۸٪ زن، ۹۲٪ مرد) بوده است که بیش از موارد گزارش شده از کشورهای دیگر است (۲۵٪). در مطالعه ما نیز نسبت پسر به دختر حدود ۱/۱۴ می‌باشد و چون نسبت هر دو جنس در ابتلا تقریباً نزدیک است، بین وجود و عدم وجود بازآرایی تفاوت معنی داری مشاهده نشد. با توجه به نتایج حاصل که شباهت‌ها و اختلافاتی با جوامع دیگر دارد می‌توان از آن‌ها در تشخیص کلونالیتی و به دنبال آن در ارزیابی MRD در کودکان ایرانی استفاده کرد (در حال انجام).

### تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندها مقاله از استادار جمند جناب آقای دکتر سیدحسین یحیوی ریاست واحد پزشکی تهران که امکانات لازم جهت انعام پژوهش را فراهم نمودند کمال تشکر را دارند. از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه به خاطر همکاری مستمر و از خانم‌ها: فراهانی، بیاری و خانی تشکر و قدردانی به عمل می‌آورند.

TCR-γ TCR-δ(V-D) فقط ناشی از بازآرایی از وضعیت اولیه بر روی آلل‌های مختلف است، زیراکه فرآیند بازآرایی بیشتری بر روی بازآرایی موجود اتفاق نمی‌افتد. استثنای در مورد بازآرایی ثانویه و اتصال V<sub>δ</sub>2D<sub>δ</sub>3 به ناحیه J<sub>α</sub> می‌باشد که منجر به حذف لکوس TCR-γ می‌شود. این نوع بازآرایی در ۲۰٪ از بیماران BP-ALL گزارش شده است. در ۱۱ بیمار کمتر از ۲ سال که بازآرایی ناقص V<sub>δ</sub>2D<sub>δ</sub>3 در موردهشان ارزیابی شد، ۸ بیمار دارای بازآرایی بوده، ۲ مورد منفی و ۱ مورد هم آزمایش انجام نشد. برای بیماران بیش از ۲ سال، در گروهی که سن در دسترس بود و PCR نیز انجام شده بود، ۲۷ بیمار از ۵۹ بیمار مورد ارزیابی (۴۵٪)، بازآرایی V<sub>δ</sub>2D<sub>δ</sub>3 را داشتند که نسبت به گروه کمتر از ۲ سال کمتر بود و نشان دهنده این مطلب است که روند کاهش بازآرایی با افزایش سن وجود دارد. گزارش مشابهی توسط ماسین تایر و همکاران مبنی بر کاهش بازآرایی V<sub>δ</sub>2D<sub>δ</sub>3 با افزایش سن وجود دارد (۲۱٪). در همین گزارش، عدم بازآرایی TCR-γ را در شیرخواران ۱ تا ۲ سال قید می‌کنند در حالی که در بررسی انجام شده از ۱۱ کودک کمتر از ۲ سال، ۷ مورد (۶۳٪) بازآرایی TCR-γ با پرایمرهای ناحیه متغیر و از نظر II/VγI ۲ مورد از ۵ مورد بررسی شده مثبت بود. برای ارزیابی بهتر باید برروی تعداد بیشتری بررسی شود.

در مرور مقالات موجود، ارتباط بین متغیرهای کمی قید شده و نوع بازآرایی سنجیده نشده است و تنها ارتباط این پارامترها را با پیش آگهی و پاسخ به درمان مورد ارزیابی قرار داده‌اند (۱۱,۳۷). با توجه به نتایج بررسی، به نظر می‌آید که نوع بازآرایی با توجه به پارامترهای ذکر شده قابل پیش

## References :

- 1- Hoffbrand AV, Lewis SM, Tuddenham EDG. Postgraduate Hematology. 4<sup>th</sup> ed, Butterworth – Heinemann; 1999: 354-373.
- 2- Provan D, Gribben J. Molecular Hematology Blackwell Science. 2000: 42-59.
- 3- Hodges E, Krishna MT, Pickard C, et al. Diagnostic role of tests for T cell receptor (TCR) genes. *J Clin Patho* 2003; 56(1):1-10
- 4- Gameiro P, Moreira I, Yetgin S, 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;119:685-696.
- 5- Pongers-Willems MJ, Seriu T, Stoltz F. 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;13:110-118.
- 6- Szczepanski T, Beishuizen A, Pongers-Willems MJ, 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.
- 7- Scrideli CA, Queiróz Rosane GP, Kashima S, et al. 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: 267-273.
- 8- Brisco MJ, Sykes PJ, Hughes E, et al. Comparison of methods for assessment of minimal residual disease in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2001;15:385-390.
- 9- Neale GAM, Smith EC, Pan Q, et al. Tandem application of flowcytometry and polymerase chain reaction for comprehensive detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1999; 13:1221-1226.
- 10- Silverman LB, Sallan ES. Newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors and treatment. *Current Opin Haematol* 2003;10:290-296.
- 11- Green E, McConville CM, Powell JE, 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):952-958.
- 12- Seriu T, Yokota M, Nakao M, 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: 615-623.
- 13- Scrideli CA, Defavory R, Tone LG, et al. 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):175-180.
- 14- Cave H, Werff Ten Bosch JVD, Suciu S, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1998;339(9):591-598.
- 15- Harris NL, Jaffe ES, Diebold 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.
- 16- Szczepanski T, Velden VHJ, Dongen JJM. Classification systems for acute and chronic leukemias. *Best Pract Res Clin Haematol* 2003; 16(4): 561 - 582.
- 17- Szczepanski T, Flohr T, Van der Velden VHJ, et al. Molecular monitoring of residual disease using antigen receptor genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* 2002; 15(1): 37-57.
- 18- Szczepanski T, Willems 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):2315-2323.
- 19- Scrideli CA, Kashima S, Tone LG, et al. Minimal residual disease in Brazilian children with acute lymphoblastic leukemia: comparison of three detection methods by PCR. *Leuk Res* 2002; 26: 431-438.
- 20- Beishuizen A, Verhoeven MA, Van Wering ER, et al. 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; 83:2238-2247.
- 21- Brumpt C, Delabess E, Beld Jord K, 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):2254-2261
- 22- Chen Z, Font MP, Loiseau P, et al. The human T-cell V-gene locus: cloning of new segments and study of V-rearrangements in neoplastic T and B cells. *Blood* 1998;72:776-83.
- 23- Cavé H, Guidal C, Rohrlich P, et al. Prospective monitoring and quantification of residual blasts in childhood acute lymphoblastic leukemia by polymerase chain reaction study of  $\delta$  and  $\gamma$  T-cell receptor genes. *Blood* 1994;83:1892-1902.
- 24- Van der Velden VH, Wijkhuijs JM, Jacobs DC, et al. T cell receptor gamma gene rearrangements as targets for detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia by real-time quantitative PCR analysis. *Leukemia* 2002; 16: 1372-80.
- 25- Sazawal S, Bhatia K, Gurbuxani S, et al. Pattern of immunoglobulin (Ig) and T-cell receptor (TCR) gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia in India. *Leuk Res* 2000;24:575-582
- 26- Nirmala K, Rajalekshmy KR, Raman SG, et al. PCR-heteroduplex analysis of TCR gamma, delta and

- TAL-1 deletions in T-acute lymphoblastic leukemias: implications in the detection of minimal residual disease. Leuk Res 2002; 26: 335-43.
- 27- Zur Stadt U , Eckert C , Rischewski J, *et al.* 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: 287-298.
- 28- Campana D. Determination of minimal residual disease in leukemia patients. Br J Haematol 2003; 121: 823-838.
- 29- Li AH, Rosenquist R, Forestier E, *et al.* Detailed clonality analysis of relapsing precursor B acute lymphoblastic leukemia: implications for minimal residual disease Detection. Leuk Res 2001; 25: 1033-1045.
- 30- 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.
- 31- Sykes PJ, Snell LE, Brisco MJ, *et al.* The use of monoclonal gene rearrangement for detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia of childhood. Leukemia 1997;11:153-158.
- 32- Januszkieiewicz DA, Nowak JS. Detection of clonality by polymerase chain reaction in childhood
- 38-
- B-lineage acute lymphoblastic leukemia. Ann Hematol 1994; 69:107-110.
- 33- 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: 1208-1214.
- 34- Jacquy C, Delepaut B, 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: 140-146.
- 35- Roberts WM, Estrov Z, Zipf TL, *et al.* Measurements of residual leukemia during remission in childhood acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 1997; 336: 317-323.
- 36- Scrideli CA, Kashima S, Tone LG, *et al.* 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.
- 37- Kressler E, Panzar S, Panzar Grumayer ER, *et al.* Heterogenous TCR delta V $\delta$ 2-D $\delta$ 3 rearrangements and their relation to IgH and TCR gamma status in childhood B cell precursor Leukemias. Leuk Res 1999; 23: 1089-1096.

## The pattern of cross lineage t-cell receptor δ/γ gene rearrangements in B-precursor acute lymphoblastic leukemia of iranian children using Polymerase Chain Reaction

*Poopak B.<sup>2</sup>, Poorfatollah A.<sup>2</sup>, Najmabadi H.<sup>3</sup>, Mortazavi Y.<sup>4</sup>, Yahyav i S.H.<sup>1</sup>  
 Vosough P.<sup>5</sup>, Arzanian MT<sup>6</sup>, Izadya r M.<sup>7</sup>, Shahgholi E.<sup>5</sup>, Bahoosh GR.<sup>5</sup>, Hamidieh AA<sup>6</sup>,  
 Faranoosh M<sup>5</sup>, Khosravipoor G.<sup>9</sup>, Haghnejad F.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Iranian Blood Transfusion Organization-Research Center*

<sup>2</sup>*Bushehr Regional Blood Transfusion Center*

<sup>3</sup>*Paramedic College, Bushehr Medical Sciences University*

### Abstract

#### **Background and Objectives**

Diversity of heavy chain immunoglobulin (IgH) and T-cell receptor (TCR) molecules is generated during B- and T-lymphocyte differentiation through the rearrangement of variable (V), diversity (D), junction (J) and constant (C) gene segments. Additionally, random insertion and deletions of nucleotides between gene segments make unique sequences which are cell or clone specific. Lymphoid leukemia cells are similar to normal precursors and have rearranged IgH, Igκ and TCR (cross-lineage rearrangement) genes which can be used as a marker of clonality and evaluation of minimal residual disease (MRD). The purpose of this study is to evaluate the pattern of TCR- δ/γ gene rearrangements using polymerase chain reaction (PCR) in B-precursor acute lymphoblastic leukemia (ALL) in Iranian children.

#### **Materials and Methods**

In our prospective study, bone marrow aspirates of 183 children including B-precursor ALLs and 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. Sixteen were excluded from our study due to various reasons including cellular degeneration. Mononuclear cells including leukemic blasts isolated by density gradient. After DNA extraction, hyper-variable regions TCR- δ (Vδ2-Dδ3 and Dδ2-Dδ3) and TCR- γ(V γ ; V γ I and V γ II) 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 to the sequences homologous for VγI , Vγ II and Vγ of TCR γ , Vδ2-Dδ3 and Dδ2-Dδ3 of TCR-δ published by Gene Bank.

#### **Results**

Clonal rearrangement of TCR-γ (Vγ) and VγI/II were present in 79.3% and 64.9% of patients respectively and only 5% of cases showed biclonal pattern. The VγII rearrangement was the most common (46.8%) type in TCR-γ. 47 (45.2%) and 11 (16.6%) of patients had Vδ2- Dδ3 and Dδ2-Dδ3 partial gene rearrangements, respectively. Biclonal/oligoclonal patterns were present respectively in 27.7% and 4.3% of cases with Vδ2-Dδ3 rearrangement. Only one patient had biclonal Dδ2 Dδ3 rearrangement.

#### **Conclusions**

Clonal rearrangement of TCR-δ (Vδ2-Dδ3 and Dδ2-Dδ3) genes had similar pattern to other populations. Frequency of TCR- γ (V γ I and V γ II) rearrangements were slightly higher than previous reports and in contrast to others except Brazilian report the V γ II rearrangement was the most common type. We found no significant correlation between presence of different types of rearrangements and quantitative variables and the only significant point was the

reduction of V $\delta$ 2D $\delta$ 3 with increase in age . According to preliminary results, these clonal markers can be used in diagnosis and follow up of MRD.

**Key words:** Gene rearrangement, Clonality, Minimal residual disease (MRD)

---

*Correspondence:* Pourkarim M.R., MS of Microbiology, IBTO- Research Center  
Tel.: (+8771) 2528822-3; Fax : (+8771) 2523960  
E-mail: [bpoopal@yahoo.com](mailto:bpoopal@yahoo.com)