

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 علی اکبر 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 فراروش^{۱۵}، دکتر گلاره خسروی پور^{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 Igk و Igh 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 Igk ایجاد می‌گردد که می‌تواند به عنوان شاخص کلونالیتی و ارزیابی MRD مورد استفاده قرار گیرد. هدف از مطالعه حاضر بررسی الگوی بازآرایی ژن‌های Igh, Igk در ALL کودکان از نوع پیش‌سازهای B توسط PCR به منظور پی‌گیری MRD پس از شروع درمان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در مطالعه آینده‌نگر حاضر ۱۸۳ کودک با تشخیص اولیه لوسمی حاد قبل از شروع درمان بررسی شدند. پس از ارزیابی مرفولوژی (L۲: ۴۱٪؛ L۱: ۴۴٪) 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 (حدافل: 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، ۶ تا ۳ ماه و 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 Igk (VκI-IV/ Kde) با استفاده از آغازگرهای مشترک انجام شد. محصولات PCR پس از آنالیز هترو دوپلکس و الکتروفورز بر روی ژل پلی‌آکرلامید 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٪، بای کلونال ۳۴/۹٪ و اولیگوکلونال ۵/۵٪). الگوی کلونال Igh-Kde در ۵۹ (۶۷٪) بیمار از موارد BP-ALL وجود داشت (۱۰٪ بای کلونال). 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.

نتیجه‌گیری

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: ۱۵/۳/۱۱

تاریخ پذیرش: ۸۶/۲/۱۵

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

مقدمه

رده سلولی، میزان بلوغ یا رسیدگی، کاریوتیپ، ناهنجاریهای 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 می رسد و لزوم ادامه درمان پس از ایجاد رمیسیون را نشان می دهد. 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 (MRD= Minimal Residual Disease) گفته می شود. اندازه گیری میزان کاهش سلولهای لوسمی در داخل بدن تحت تاثیر متغیرهای بالینی و سلولی است اما این اندازه گیری 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 شکل شناسی سلولهای مغز استخوان و خون محیطی با رنگ آمیزی رومانوسکی	۱-۵٪
۲	روشهای کشت سلولی	؟
۳	سیتوژنتیک (کاریوتیپ)	۵٪
۴	(Flourescent In situ Hybridization) FISH	۰/۳-۵٪
۵	فلوسایتمتری و تعیین ایمونوفنوتیپ	
روشهای مولکولی		
الف-۱۰	روشهای ارزیابی ترانس لوکاسیونهای اختصاصی با روش RT-PCR	
ب-۶	ارزیابی بازآرایی ژنهای ایمونوگلوبولینها و گیرندههای لنفوسیت T	-
ع-ب-۱	روش ساترن بلات	۱-۵٪
ع-ب-۲	واکنش زنجیره پلیمرز	۱۰-۱۰۰٪

روشهای مورد استفاده برای ارزیابی درمان بیماران مبتلا به لوسمی حاد و حساسیت هر روش در جدول ۱ آمده است (۲). رایج ترین روشهای ارزیابی برای تعیین MRD شامل تکثیر نسخه ژنهای فیوژن با PCR، تکثیر ژنهای بازآرایی شده TCR/Ig و تعیین ایمونوفنوتیپ با فلوسایتمتری می باشد. 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 آینده نگر حاضر ۱۴۰ کودک مبتلا به B-ALL precursor 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٪: L۲؛ ۴۴٪: L۱) و ایمونوفنوتیپ، تنها ۱۴۰ بیمار با تشخیص B-ALL precursor 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 می دادند. 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 هسته ای که بلاستها را نیز شامل می شدند با گرادیان غلظتی (g/cm^2) $1/0.80 - 1/0.77$: فایکول) جدا شدند. استخراج DNA سلولهای تک هسته ای با استفاده از کیت استخراج (PCR Template cat. No. 1 796 828، روش) انجام شد. برای اطمینان از کیفیت DNA استخراج شده اندازه گیری غلظت، درجه خلوص (OD_{260}/OD_{280}) DNA (بیوفتومتر ایندورف)، 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

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 IgK

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

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

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

کنترل‌های مثبت (ارسالی توسط پروفیسور تون و بیمارانی که بازآرایی مثبت داشتند)، منفی (آب مقطر استریل و مخلوط اصلی ماستر میکس) و کنترل DNA پلی کلونال 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 پلی کلونال طبیعی یا واکنشی در ارزیابی بازآرایی ژن‌های IgH و IgK زمان تشخیص و پس از درمان، از آنالیز هترو دوپلکس (محصولات PCR ابتدا ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد و سپس ۶۰ دقیقه در ۴ درجه

بخش CDR III با استفاده از آغازگرهای مشترک: 5-ACA CggC (C/T) (g/C) TgTATTACTgT LJH 5-TgAggAGACggTgACC: 5-gTgACCAGggT (A / g / C / T) : VLJH ,FR3A CCTTggCCCCAg و در واکنش دوم در واقع با یک روش ، PCR ، دو گانه انجام شد. در این واکنش‌ها ۲۰۰ dNTP میکرومول، ۱/۵، ۱۵- ۱۰ pmol آغازگرها، DNA تک پلی مرز به میزان یک واحد و DNA بیمار به میزان ۰/۱-۰/۵ میکرو گرم در حجم نهایی ۲۵ و ۵۰ میکرو لیتر 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 میکرو لیتر 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 /TgC /gAgTCA /C /g /Tg و VLJH مطابق برنامه جدول ۲ استفاده شد.

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

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

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 IgK وجود داشت، نمونه‌های پس از درمان

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

جدول ۵: فراوانی بازآرایی Igk (VkI-IV/Kde) در ۹۴ بیمار مبتلا به BP-ALL نشان می‌دهد.

بازآرایی	VkI/Kde	VkII/Kde	VkIII/Kde	VkIV/Kde
- بازآرایی کلونال	۲۲ (۲۵)	۱۴ (۱۵/۹)	۲۰ (۲۲/۷)	۳ (۴/۳)
• منوکلونال	۲۰ (۹۰/۹)	۱۳ (۹۳)	۱۸ (۹۰)	۲ (۶۷)
• بای کلونال	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 کای دو 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 علائم 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. علائم بالینی بیماران شامل تب در ۳۱/۹٪، کم خونی و علائم آن در ۵۵/۱٪، بزرگی طحال و کبد به ترتیب در ۴۳/۵٪ و ۳۶/۲٪، علائم خونریزی در ۲۴/۶٪، تورم غدد لنفاوی در ۱۶/۴٪، کاهش وزن در ۱۰/۱٪، عفونت و علائم آن در ۲/۹٪ و علائم 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، CD 2، 3، 5، 10، 19، 20، 34، 22c، 22s در دو گروه با بازآرایی منوکلونال و بای کلونال Igk و IgH تفاوت

معنی‌داری وجود نداشت. تنها یافته‌های با ارزش تفاوت معنی‌دار بین میانگین شاخص‌های CD19 و CD20 در دو گروه منوکلونال و بای کلونال Igk 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 بای کلونال IgH، TCR-γ، TCR-δ و Igk 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-L₁ و ALL-L₂ تشخیص داده شدند. در ۴ بیمار تشخیص ALL-L₁ 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 Igk و IgH، پس از انجام آزمایش هترودوپلکس و الکتروفورز بر روی ژل با قدرت تفکیک بالا (پلی آکرلامید ۸٪) و رنگ‌آمیزی نقره بر اساس تعداد باندها، بازآرایی‌ها را در سه گروه منوکلونال، بای کلونال و اولیگوکلونال طبقه‌بندی کردیم. در موارد دیگر یا هیچ باندها مشاهده نمی‌شد یا نتیجه به صورت اسمیر یا نردبان در می‌آمد که دال بر نتیجه منفی یا تکثیر پلی کلونال 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 بای کلونال و ۶

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 $Igk(VkI-IV/kde)$ در جدول ۸ نمایش داده شده است (شکل ۳). تفاوت معنی‌داری بین دو گروه با بازآرایی منوکلونال و بای‌کلونال IgH ، $TCR-\gamma$ ، $TCR-\delta$ و Igk 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	$Blast \geq 5\%$
روز ۱۴ n: ۳۸	۹۲٪ n: ۳۵	۸٪ n: ۳
روز ۲۸ n: ۴۰	۹۲/۵٪ n: ۳۷	۷/۵٪ n: ۳
روز ۴۵ الی ۱۲ ماه n: ۴۴	۹۱/۹٪ n: ۴۰	۹/۱٪ n: ۴

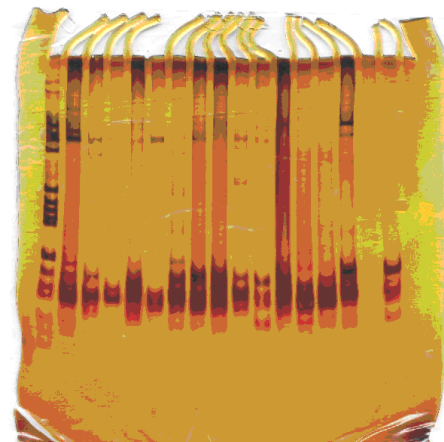
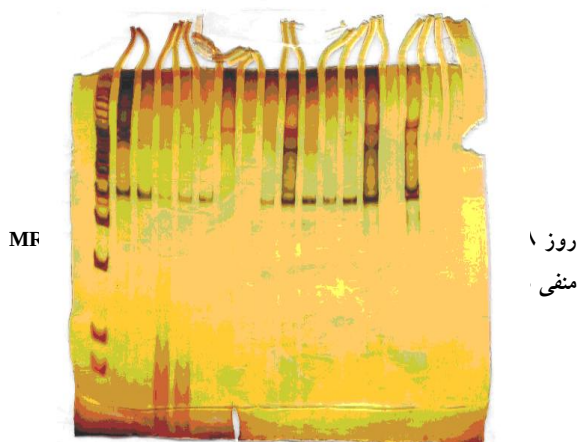
نفر (۵/۵٪) بازآرایی اولیگوکلونال بودند. برای ۱۷ بیماری که بازآرایی کلونال برای ناحیه CDR-III نداشتند، از آغازگر FRI برای تکثیر منطقه وسیع‌تری از ژن بازآرایی شده IgH استفاده شد که ۵ نفر (۴٪) بازآرایی کلونال را نشان دادند. بنابراین ۱۱۴ (۹۰/۴٪) بیمار در کل بازآرایی کلونال ژن زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین 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 VkI تا $VkIV$ 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 سیتومورفولوژی نمونه‌های پس از درمان از گستره‌های تهیه شده با رنگ‌آمیزی رایت انجام گرفته و نتایج آن در جدول ۶ نشان داده شده است. نتایج ارزیابی MRD در بیماران مبتلا به BP-ALL که دارای بازآرایی کلونال ژن زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین در بدو تشخیص

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)٪



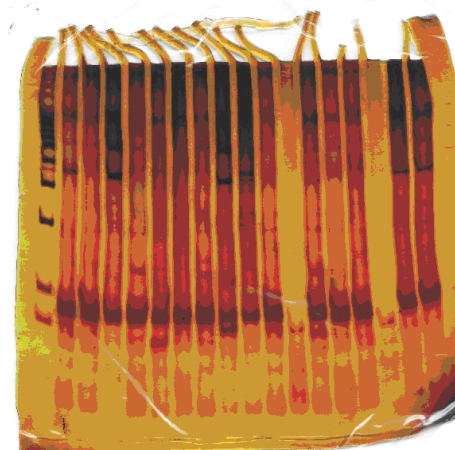
شکل ۱- نتایج ارزیابی MRD در بیماران مبتلا به BP-ALL با ارزیابی بازآرایی کلونال ژن زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین پس از الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریلامید را نشان می دهد. لاین ۲ و ۳ مربوط به زمان Dx و D14 یک بیمار است که همچنان باند زمان تشخیصی باقی است (MRD⁺)، لاین ۴ و ۵ مربوط به زمان Dx و D57 و لاین ۸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

شکل ۳: نتایج ارزیابی MRD در بیماران مبتلا به BP-ALL با ارزیابی بازآرایی منطقه متغیر Ig-k-vkl پس از الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریلامید. 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 می باشد که باند زمان تشخیصی با درمان ضعیف تر شده ولی هم چنان باقی است (MRD⁺). لاین ۱۳، ۱۴ و ۱۵ مربوط به زمان Dx، D28 است و شروع درمان نگهدارنده بیمار دی گری را نشان می دهد که هم چنان باند زمان تشخیصی 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 Igk برای تعیین کلونالیتی در زمان تشخیص با آغازگرهای مشترک مورد ارزیابی قرار گرفت. با آغازگرهای مشترک برای ناحیه FR1 و قطع 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 استفاده از ترکیب آغازگرهای مختلف، بازآرایی کلونال را در ۹۹٪-۸۰٪ از بیماران مبتلا به BP-ALL گزارش کرده اند که با نتایج حاصل مطابقت دارد (۳-۶). روس و همکاران در مطالعه ای از سوئد، بازآرایی کلونال را در ۹۴٪ گزارش کردند (۷). بهارگاو و



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 پلی آکریلامید. لاین ۲، ۳ و ۴ مربوط به زمان Dx و D45 دو بیمار است که هم چنان باند زمان تشخیصی 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 می دهد که MRD⁺ است. لاین ۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۲ نیز لاین ۱۳، ۱۴، ۱۵ و ۱۶ مربوط به زمان Dx، D14، D28 و شروع درمان نگهدارنده دو بیمار است که تا

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

جدول ۸: فراوانی MRD⁺ در فازهای مختلف درمان با توجه به بازآرایی کلونال ژن IgK 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

روزهای ۱۴ و ۲۸ و نمونه‌های پس از درمان القایی تا یک سال بر اساس بازآرایی‌های کلونال IgH و IgK 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 $\geq 5\%$ 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 $\geq 5\%$ 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 $\geq 1\%$ بعد از اتمام درمان القایی است وجود دارد (۱۲، ۱). در آزمایش میکروسکوپی روز ۱۴، پس از شروع درمان القایی در

بازآرایی IgK در ۶۰٪ و Igλ تقریباً در ۲۰٪ از موارد BP-ALL گزارش شده است (۶). بازآرایی IgK به صورت مختلف از جمله Vκ-kde، intron-kde و Vκ-intron انجام می‌شود. در مطالعه حاضر بازآرایی Vκ-kde، 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 آلل است، جهت بررسی انتخاب شده است. آغازگرهای مشترک برای گروه Vκ-I-IV و kde با روش PCR استفاده شد. از ۸۸ بیمار BP-ALL، ۶۷٪ دارای بازآرایی Igκ-kde بودند. نسبت به گزارش‌های موجود که میزان این نوع بازآرایی را ۳۲٪، ۴۲٪ و ۵۰٪ ذکر کرده‌اند، این رقم بیشتر است (۸-۱۰). 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 L₂ را به عنوان یک فاکتور پیش‌آگهی بد در نظر گرفته است که هنوز نیز از آن استفاده می‌کنند. در حالی که به جز این که مرفولوژی L₁ و L₂ 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 L₁ و L₂ با MRD در

صورتی که بلاست $\geq 5\%$ باشد، ارزش پیش‌گویی کننده مثبت (PPV)، 75% با حساسیت 30% 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. روش‌های توصیه شده برای تشخیص MRD باید دارای مشخصات ذیل باشد (۱۴):

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

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

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

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

ه - استاندارد سازی آن‌ها ساده باشد و نتایج زود در دسترس قرار گیرد.

و - بتوان آن را کمی نمود.

در مطالعه حاضر که ارزیابی ژن Igh و Igk 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 Igh 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 71% از بازآرایی‌های مورد استفاده Igh و TCR در ارزیابی MRD در زمان عود ثابت است و پایدارترین بازآرایی مربوط به Igk-kde 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 71% از اهداف در زمان تشخیص و بیشترین پایداری مربوط به Igk-kde (90%) و بعد از آن TCR- γ (75%)، Igh (64%) و TCR- δ (63%) بود. پایداری در اهداف منوکلونال (89%) بیش از موارد اولیگوکلونال (40%) 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 دست دادن بازآرایی اولیه، اتصال VH به DJH، جابجایی ژن VH و ظاهر شدن بازآرایی جدید که می‌تواند با ورود یا حذف در نوکلئوتیدها در محل اتصال VH-N-DH باشد می‌دانند (۲۲).

روس، ماسین تیر، بیژرزن و کیو همگی در مطالعات مختلف اظهار می‌دارند که با توجه به تغییر کمتر در TCR- γ (13%)، 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 Igk-kde، 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

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 Igk 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 موارد حتی 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 Igk مشاهده شد که روند کاهش MRD⁺ در IgH به صورت مشخصی وجود داشت و در Igk 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 به ۲۵/۲٪، ۲۲/۲٪ و ۱۸/۹٪ در طی ۳-۵، ۶-۹ و ۱۰-۲۴ 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 (n: ۴) 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 ۶-۹ ماه پس از درمان ذکر می‌کنند (۱۵). ون دانگن و همکاران اعلام کردند، بیماران MRD⁺ ≥ 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

از درمان MRD^+ هستند. گروه مطالعه IBFM میزان MRD^+ را در هفته پنجم، دوازدهم و هفته ۲۵-۲۲ به ترتیب ۶۰٪-۵۰٪، ۳۰٪ و ۲۲٪-۲۰٪ گزارش می‌کنند (۱). بریسکو و همکاران معتقدند در صورتی که در روز ۱۴ پس از شروع درمان، MRD با حساسیت 10^{-2} مثبت شود، PPV ۱۰۰٪ با حساسیت ۷۱٪ برای تعیین عود در مغز استخوان وجود دارد (۲۴).

پانزروگرومایر نشان دادند که تخمین MRD روز ۱۴ از نظر تعیین پیش آگهی مفید است. اگر ارزش پیش‌آگهی اندازه‌گیری MRD روز ۱۴ تایید شود، می‌توان آن را به عنوان راهنمای درمان و تصمیم‌گیری به موقع درمانی استفاده کرد (۲۵).

کامپانا و همکاران نشان دادند در بیمارانی که MRD آن‌ها در هفته ۱۴ درمان منفی شد، بروز جمعی عود مشابه بیمارانی بود که هر زمانی بعد از درمان القایی MRD منفی شدند. در مقابل اگر MRD در طی ادامه درمان باقی بماند با گذشت زمان شانس عود بیشتر می‌شود. بنابراین بیمارانی که پس از درمان القایی MRD^+ هستند ممکن است از ارزیابی‌های بیشتر MRD در طی رمیسیون بالینی سود ببرند (۱۲).

در مطالعه چند مرکزی ۲۴۰ کودک مبتلا به ALL که بر طبق پروتکل BFM تحت درمان قرار گرفتند، ون دانگن و همکاران با استفاده از TCR ، IgH و حذف $TAL-1$ مشخص کردند که بیمارانی MRD^+ ، ۵-۱۰ برابر شانس عود بالاتری (۸۶٪-۳۹٪ در سه سال) در مقایسه با بیمارانی MRD منفی در مقطع مختلف (۱۵-۳٪ در سه سال) دارند (۲۶).

مطالعات انجام شده توسط کیو، اسمیت، سان میگوئل، برنت، ون دانگن و دایوریو معتقدند که در ارزیابی MRD در بیمارانی مبتلا به ALL می‌توان حساسیت ۰/۰۱٪ را با فلوسیتومتری و PCR به دست آورد. ساده‌سازی روش‌های MRD مثل کاهش تعداد مارکرها در فلوسیتومتری و عدم استفاده از آغازگرهای اختصاصی Ig ، TCR در PCR بدون شک حساسیت را کاهش می‌دهد. اما به هر حال بر اساس نتایج این تحقیق می‌توان با این معیار موافق بود که حساسیت با میزان ۰/۱٪ ممکن است برای تشخیص

بیماران با خطر بالا کافی باشد (۱). در مطالعه حاضر نیز در اکثر بازآرایی‌ها ما به این میزان از حساسیت دست یافتیم. تون و همکاران، MRD^+ را در ۵۸/۸٪ از بیمارانی که در انتهای درمان القایی، ۲۱/۴٪ در مدت ۳-۶ ماه، ۱۹٪ در طی ۱۲-۲۴ ماه و ۸/۶٪ در انتهای درمان نشان دادند. در این مطالعه MRD^+ در طی هفته چهارم و بین ۳ الی ۶ ماه بیشتر از گزارش‌های قبلی در کشورهای توسعه یافته است (۲۳).

استفاده از روش‌های PCR دوگانه (IgH) ممکن است تا حدی این اختلاف را توجیه نماید. خیلی از مطالعات بر روی DNA استخراج و خالص شده از گستره‌های قدیمی است که به خصوص در مورد تهیه DNA از گستره‌های مغز استخوان، مراحل پیچیده‌ای وجود دارد که می‌تواند منجر به آسیب DNA شده و منفی کاذب ایجاد نماید و این در حالی است که ما در مطالعه خود بلافاصله پس از جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای، DNA آن‌ها را استخراج نموده و در فاصله کوتاهی از استخراج، آزمایش PCR را انجام دادیم. در عین حال استفاده از شاخص‌های مولکولی متفاوت و چندین شاخص هم زمان ممکن است در این موضوع مهم باشد.

استفاده از روش‌هایی با حساسیت بیشتر منجر به تشخیص مقادیر کمتر MRD می‌شود، واقعیتی که همیشه در ارتباط با عود بیشتری نیست (۲۸-۲۶، ۲۳). شدت درمان، فاکتورهای مربوط به سطح اقتصادی - اجتماعی کودکان و وضعیت تغذیه و نژاد در بهبود بیمارانی مؤثر است و ممکن است با تشخیص MRD نیز تداخل کند (۲۹، ۲۳). امروزه مطالعه MRD جزیی از مدیریت درمان بیمارانی مبتلا به لوسمی است اما خیلی وابسته به وجود امکانات و تجربه است. مهم‌ترین مساله در ارزیابی MRD ، ساده نمودن روش‌ها هم زمان با قابل اعتماد نگه داشتن نتایج حاصل از ارزیابی آن‌ها و گسترش استفاده از ارزیابی MRD برای تمام بیمارانی در تمام نقاط دنیا است. در مطالعه حاضر پس از تعیین بازآرایی با آغازگرهای مشترک و تعیین توالی محصولات PCR و به دنبال آن ساخت آغازگرهای اختصاصی توانستیم به حساسیت 10^{-4} - 10^{-5} دست یابیم. اما این امر مستلزم صرف وقت زیاد، هزینه بالا

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 مهای روی آن‌ها جهت نگه داشتن 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 (۳۴-۳۵).

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 یحوی و دکتر شهلا چایچیان و خانم‌ها فراهانی، رادپور، رستمی، بیاری و خانی کمال تشکر را دارند.

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 ($>90\%$) 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 پلی کلونال 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 $25\%-20\%$ 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

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 malignancies. 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, Rohrlisch 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 oligoclonal 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 Haematol* 1999; 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 chemotherapy predicts a good outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000; 95: 790- 4.
- 26- Van Dongen JJ, Seriu T, Panzar -Grumayer ER, Biondi A, Pongers-Willemse MJ, Corral L, *et al.* Prognostic

- 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, Johnston 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- Szczepanski T, Beishuizen A, Pongers-Willems 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.

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)

¹Islamic Azad University, Tehran Medical Branch

²Hematology Department, Tarbiat Modaress University

³Genetic Research Center, University of Social welfare and Rehabilitation Sciences

⁴Hematology Department, Zanzan Medical University

⁵Iran University of Medical Sciences

⁶Shaheed Beheshti University of Medical Sciences

⁷Tehran University of Medical Sciences

⁸Shariati Medical Center Hospita – Research Center

⁹Semnan University of Medical Sciences

¹⁰Payvand Medical Laboratory

¹¹Iranian Blood Transfusion Center – Research Center

Abstract

Background and Objectives

Diversity of IgH and Ig κ 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 Ig κ 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 Ig κ 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 Ig κ (V κ I-IV / K κ) 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 Ig κ -K κ 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
SJBTO 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