

خون

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

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

دکتر بهزاد پوپک^۱، دکتر علی اکبر پورفتح‌الله^۲، دکتر حسین نجم‌آبادی^۳، دکتر سید حسین یحیی^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 خسروی پور^{۱۶}، فریبا حق‌نژاد دوشانلو^{۱۷}، ابوالفضل یوسفیان^{۱۸}

چکیده

ساخته و هدف

بازآرایی قطعات ژنی مختلف متغیر(7)، تنوع(D)، اتصال(I) 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 لوسومی‌های 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 گلوبولین‌های ژن‌های IgH، Igκ در کودکان از نوع ALL پیش‌سازهای B توسط PCR به منظور پی‌گیری MRD پس از شروع درمان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در مطالعه ایندهنگر حاضر ۱۸۳ کودک با تشخیص اولیه لوسومی حاد قبل از شروع درمان بررسی شدند. پس از ارزیابی سرفولوژی(٪۴۱: L2: ۴۴٪: L1) و ایمونوفوتیپ، تنها ۱۴۰ بیمار با تشخیص B-precursor ALL 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 حداً کثر ۱۵۶ ماه) ابتدا تشکیل می‌دادند. سلول‌های تک هسته‌ای که بلاست‌ها را نیز شامل می‌شد در زمان تشخیص، روز ۱۴، روز ۲۸(انهای درمان القابی)، ۴۵ روز تا ۳ ماه، ۳ تا ۶ ماه و ۶ تا ۱۲ ماه پس از شروع درمان بیماران پس از ارزیابی مرفولوژی با گردابان غلظتی جدا شدند. پس از استخراج DNA، آزمایش PCR به منظور تکثیر منطقه خیلی متغیر ژن (VκI-IV/ Kde) Igκ (CDR-3 & 1) و (VκI-IV/ Kde) IgH به استفاده از آغازگرهای مشترک انجام شد. محصولات PCR پس از آنالیز هترودوبلکس و الکتروفورز بر روی ژل پلی‌اکریلامید و رنگ آمیزی 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 SPSS ۱۱/۵ 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 ۰/۵٪/۸: ن، بای کلونال ۳/۴٪/۹: ن و اولیگوکلونال ۰/۵٪/۵: ن). گلوبولین کلونال Igκ-Kde در ۵۹/۶٪(٪۵۹) 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، لوسومی لنفوبلاستی حاد

تاریخ دریافت: ۱۱/۳/۸۵

تاریخ پذیرش: ۱۵/۲/۸۶

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

روش‌های مورد استفاده برای ارزیابی درمان بیماران مبتلا به لوسومی 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 Ig/TCR و تعیین ایمونوفوتیپ با فلوسیتومتری می‌باشد. مطالعه حاضر با هدف ارزیابی MRD با استفاده از بازآرایی ژن زنجیره سنگین و سبک ایمونوگلوبولین در کودکان مبتلا به لوسومی حاد لنفوبلاستی انجام شد.

مواد و روش‌ها

در مطالعه آینده‌نگر حاضر ۱۴۰ کودک مبتلا به ALL precursor ALL از بین ۱۸۳ کودک با تشخیص لوسومی حاد قبل از شروع درمان و ۱۵-۴۰ 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 مرفلوژی(٪۴۱؛ L2؛ ٪۴۴؛ L1) و ایمونوفوتیپ، تنها ۱۴۰ بیمار با تشخیص ALL precursor برای مطالعه انتخاب شدند که ٪۵۳/۳ میانعیت 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 آلدگی باکتریایی از پژوهش حذف شدند. پس از ارزیابی مرفلوژیک مشابه نمونه‌های زمان تشخیص، سلول‌های تک هسته‌ای که بلاست‌ها را نیز شامل می‌شدند با گرادیان غلظتی(g/cm²) ۱/۰۸۰-۱/۰۷۷: فایکول) جدا شدند. استخراج DNA سلول‌های تک هسته‌ای با استفاده از کیت استخراج PCR (Template cat. No. 1 796 828 PCR اطمینان از کیفیت DNA استخراج شده اندازه‌گیری غلظت، درجه خلوص $\frac{OD_{260}}{OD_{280}}$ (بیوفتومنتر اپندورف)، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ به منظور ارزیابی فرآگماتاسیون 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

ردیف ۱: روش‌های ارزیابی MRD به همراه حساسیت هر روش
ردیف ۲

روه 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 لوسومی‌های 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 10^6 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 لوسومی در داخل بدن تحت تاثیر متغیرهای بالینی و سلولی است اما این اندازه‌گیری در صورتی که با روش‌های مرفلوژیک انجام شود، حساسیت و صحت محدودی دارد. حداقل ۵ یا بیش از ۵ درصد سلول‌های مغز استخوان را باید سلول‌های لوسومی تشکیل دهنند 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	٪۱-٪۵
۲	روش‌های کشت سلولی	؟
۳	سیتوژنیک(کاریوتیپ)	٪۵
۴	FISH (Flourescent In situ Hybridization)	٪۰/۸۳-٪۰/۵
۵	فلوساپتومتری و تعیین ایمونوفوتیپ روش‌های مولکولی	
۶	الف- روش‌های ارزیابی ترانس لوکاسیون‌های اختصاصی با روش RT-PCR	٪۰-٪۶
۶	ب- ارزیابی بازآرایی ژن‌های ایمونوگلوبولین‌ها و گیرنده‌های لنفوسيت T	-
۶-۱	روش ساترن بلاست	٪۱-٪۵
۶-۲	واکنش زنجیره پلیمراز	٪۰-٪۴

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
IgK	Vκ I	5-gTAggAgACAgAgTCACCATCACT
	Vκ II	5-TggAgAgCCggCCtCCATCTC
	Vκ III	5-gggAAAgAgCCACCCCTCCCTg
	Vκ IV	5-ggCgAgAgggCCATCAAC
	kde	5-CCCTTCATAgACCCTTCAGCAC

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

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

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 هترو‌دopolیکس (محصولات PCR ابتدا ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و سپس ۶۰ دقیقه در ۴ درجه

بخش CDR III با استفاده از آغازگرهای مشترک: 5-ACA CggC (C/T) (g/C) TgTATTACTgT و 5-TgAggAGACggTgACC: LJH ۵-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 ۱/۵ mM MgCl₂ ۱۵ pmol آغازگرهای DNA تک پلی‌مراز به میزان یک واحد و DNA بیمار به میزان ۱/۰۵ 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 ۵-C/ gAggTA /gCAgCTgC /g /TA :FRI و VLJH /TgC /gAgTCA /C /g /Tg مطابق برنامه جدول ۲ استفاده شد.

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

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

تکثیر ژن بازآرایی شده زنجیره سبک κ از نوع Vκ-kde برای چهار نوع VκI-IV با مقادیر ذکر شده برای IgH و با پنج آغازگر جدول ۳ طبق جدول ۴ با روش Touch down انجام شد. در مواردی که بازآرایی کلونال در ژن‌های PCR وجود داشت، نمونه‌های پس از درمان Igκ و IgH و 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 یا زارایی Igκ I(VκI-IV/κde) در ۹۴ بیمار مبتلا به BP-ALL نشان می‌دهد.

వKIV/kde	VKIII/kde	VKII/kde	VKI/kde	بازآرایی
۳(۴/۳)	۲۰(۲۲/۷)	۱۴(۱۵/۹)	۲۲(۲۵)	- بازآرایی کلونال
۲(۶۷)	۱۸(۹۰)	۱۳ (۹۳)	۲۰ (۹۰/۹)	منوکلونال •
۱(۳۳)	۲(۱۰)	۱ (۷)	۲ (۹/۱)	بای کلونال •

معنی داری وجود نداشت. تنها یافته های با ارزش تفاوت معنی دار بین میانگین شاخص های CD19 و CD20 در دو گروه منوکلونال و باکلولونال 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، اسپلئنومگالی، کاهش وزن، تمایل به خونریزی، عفونت و تورم غدد لنفاوی در دو گروه با بازآرایی منوکلونال و باکلولونال Igκ ، TCR-δ ، TCR-γ و TCR-β تفاوت معنی داری وجود نداشت.

در بررسی نمونه‌های مغز استخوان رنگ‌آمیزی شده با رنگ رایت، (۴۵٪) و (۴۸٪) نفر از بیماران بر اساس معیارهای FAB به ترتیب L_1 و L_2 ALL تشخیص داده شدند. در ۴ بیمار تشخیص L_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 H و Igκ، پس از انجام آزمایش هترودوبلکس و الکتروفورز بر روی ژل با قدرت تدقیکیک بالا (پلی آکریلامید ۰/۸٪) و رنگ‌آمیزی نقره بر اساس تعداد باندها، بازآرایی‌ها را در سه گروه منوکلونال، بای کلونال و او لیگوکلونال طبقه‌بندی کردیم. در موارد دیگر یا هیچ باندی مشاهده نمی‌شد یا نتیجه به صورت اسپیر یا نرdban در می‌آمد که دال بر نتیجه منفی یا تکثیر پلی کلونال

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 کلونال و ۶

رنگ آمیزی نقره برای مشاهده باندها استفاده شد. آنالیز آماری با برنامه نرم افزاری SPSS (version 11.5) و با استفاده از آزمون های 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 فراوانی کمتر از ۵ داشته باشد آزمون دقیق فیشر استفاده شد) انجام شد.

پافتہ

شایع ترین شکایت 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 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 ۴۲/۵٪، 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 فللوسیتو متری،
۱۴۰ بیمار جزو ALL از نوع پیش سازهای B طبقه بندی
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، LDH، Hb و
شاخصهای سلولی ایمونوفنوتیپ TdT، HLA-DR،
CD 2، 3، 5، 10، 19، 20، 22c، 22s) در دو گروه با
یا آر ای، منه کلونال و بای، کلونال IgH و Igκ تفاوت

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 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 مورفو‌لولوژیک انجام نشد)

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

نفر(۰/۵/۵) بازآرایی اولیگوکلونال بودند. برای ۱۷ بیماری که بازآرایی کلونال برای ناحیه CDR-III نداشتند، از آغازگر FRI برای تکثیر منطقه وسیع تری از ژن بازآرایی شده IgH استفاده شد که ۵ نفر(۰/۴) بازآرایی کلونال را نشان دادند. بنابراین ۱۱۴(۰/۹۰) 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(۰/۶۷) 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 سیتو‌مورفو‌لولوژی نمونه‌های پس از درمان از گسترده‌های 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 بد و 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	ماه ۶-۳	n :۹	۱۲-۶ ماه	n :۱۵
- موارد MRD مثبت	%۷۳/۵(n :۲۵)	%۵۵/۵(n :۲۰)	%۵۰(n :۱۲)	%۵۵/۵(n :۲۰)	%۲۰(n :۳)	%۵۵/۵(n :۵)	%۴۴/۵(n :۴)	%۴۴/۵(n :۱۲)	%۵۵/۵(n :۱۲)	%۲۰(n :۳)
- موارد MRD منفی	%۲۶/۵(n :۹)	%۴۴/۵(n :۱۶)	%۵۰(n :۱۲)	%۴۴/۵(n :۱۶)	%۸۰(n :۱۲)	%۴۴/۵(n :۴)	%۲۰(n :۱)	%۲۰(n :۱)	%۵۵/۵(n :۱)	%۲۰(n :۱)
- واکنش یا باند مشابه به زمان تشخیص	%۶۰(n :۱۵)	%۵۰(n :۱۰)	%۴۱/۷(n :۵)	%۴۱/۷(n :۵)	%۶/۷(n :۱)	%۴۰(n :۲)	%۲۰(n :۱)	%۲۰(n :۱)	%۴۰(n :۲)	%۶/۷(n :۱)
- واکنش یا باند ضعیف	%۲۰(n :۵)	%۱۰(n :۲)	%۸/۳(n :۱)	%۸/۳(n :۱)	%۶/۷(n :۱)	%۲۰(n :۱)	%۱۰(n :۱)	%۱۰(n :۱)	%۲۰(n :۱)	%۶/۷(n :۱)
- واکنش یا باند خیلی ضعیف	%۴(n :۱)	%۱۲(n :۳)	%۸/۳(n :۱)	%۸/۳(n :۱)	%۶/۷(n :۱)	%۲۰(n :۱)	%۲۰(n :۱)	%۲۰(n :۱)	%۲۰(n :۱)	%۶/۷(n :۱)
- واکنش مثبت با اسمیر	%۱۶(n :۴)	%۲۵(n :۵)	%۴۱/۷(n :۵)	%۴۱/۷(n :۵)	%۶/۷(n :۱)	%۲۰(n :۱)	%۲۰(n :۱)	%۲۰(n :۱)	%۲۰(n :۱)	%۶/۷(n :۱)

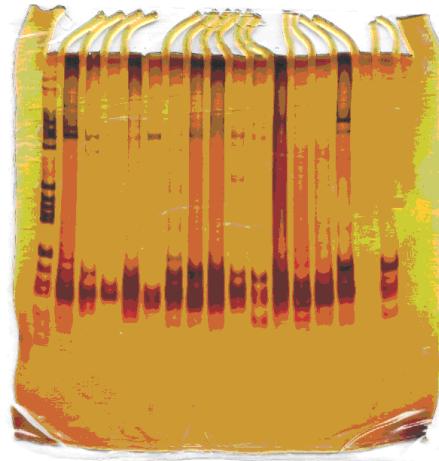


شکل ۳: نتایج ارزیابی MRD در بیماران مبتلا به BP-ALL با ارزیابی بازآرایی کلونال ژن زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین پس از الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریلامید را نشان می دهد. لاین ۲ و ۳ مربوط به زمان Dx و D14 و ۴ مربوط به زمان D28 و لاین ۱۰، ۱۱ و ۱۲ مربوط به زمان Dx، D28 و شروع درمان نگهدارنده دو بیمار می باشد که باند زمان تشخیص با درمان ضعیف تر شده ولی هم چنان باقی است⁽⁺⁾. لاین ۱۳، ۱۴ و ۱۵ مربوط به زمان Dx-D28 است و شروع درمان نگهدارنده بیمار دیگری را نشان می دهد که هم چنان باند زمان تشخیص در D28 با زمینه اسمی ر وجود دارد⁽⁺⁾ (MRD⁺) ولی با شروع درمان نگهدارنده منفی شده است^(−).

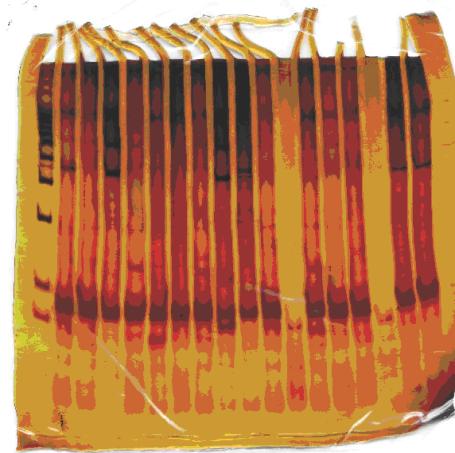
بحث

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 BP-ALL بیمار از ۱۲۶ بیماری که با تشخیص ALL ارزیابی شدند وجود داشت. در مواردی که نتایج منفی شد، آزمایش با آغازگر FRI تکرار شد و در کل در ۹۰٪ از بیماران در مطالعه حاضر، بازآرایی کلونال IgH تشخیص داده شد.

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



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 و ۴ که 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 اسمی 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) پس از الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریلامید. لاین ۲، ۳، ۴ و ۵ مربوط به زمان Dx و D45 دو بیمار است که هم چنان باند زمان تشخیص ناچیه CDR-III باقی است⁽⁺⁾ (MRD⁺) و ناچیه FR1 منفی شده است. لاین ۶، ۷ و ۸ مربوط به زمان Dx و D28 و D14 که بیمار را نشان می دهد که MRD⁺ است. لاین ۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۲ و نیز لاین ۱۳، ۱۴، ۱۵ و ۱۶ مربوط به زمان Dx و D28 و شروع درمان نگهدارنده دو بیمار است که تا

همکاران از هند، بازارایی کلونال ALL گزارش نمودند(۶). BP- IgH را در ۴۹٪ از

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

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

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 %۹۲/۵، %۹۱/۹، %۹۲/۵ از بیماران در ارزیابی آسپیرهای 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، آسپیرهای دارای بلاست 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 مرفو‌لوژیک، در هر کدام از مراحل بررسی %۵٪ بلاست در مغز استخوان داشتند، نتایج ارزیابی MRD توسط اکثر بازآرایی‌های انجام شده مثبت بود. ارزیابی مرفو‌لوژیک آسپیرهای 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، اندرسکسی از عاقبت بد بیماری می‌دانند(۱۱).

گزارش‌هایی مبنی بر شناس 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 Igκ در %۶۰ و Igλ تقریباً در %۲۰ از موارد گزارش شده است(۶). بازآرایی Igκ به $V\kappa$ -intron و $intron-kde$ از جمله $V\kappa-kde$ ، $V\kappa$ -intron RSS انجام می‌شود. در مطالعه حاضر بازآرایی ALL می‌باشد و عمدتاً نمایانگر بازآرایی حذفی با درگیری k -deleting elements در یک یا هر دو ال است، جهت بررسی انتخاب شده است. آغازگرهای مشترک برای گروه $V\kappa-I-IV$ و $V\kappa-kde$ با روش PCR استفاده شد. از ۸۸ بیمار ۶۷٪ دارای بازآرایی Igκ-kde بودند. نسبت به گزارش‌های موجود که میزان این نوع بازآرایی را %۳۲ و %۴۲ ذکر کرده‌اند، این رقم بیشتر است(۱۰-۸). بیشترین بازآرایی مربوط به گروه $V\kappa I$ (%۲۵) و $V\kappa III$ (%۲۲) بود در حالی که ون دانگن و همکاران در بین ۷۷ بیمار، بیشترین را مربوط به گروه $V\kappa II$ (%۳۳/۷۴) و بعد $V\kappa III$ قید کرده‌اند که با مطالعه حاضر متفاوت است(۸).

طبقه‌بندی FAB ALL هایی با مرفو‌لوژی L_2 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 L_1 و L_2 در کودکان و بزرگسالان به تفکیک شایع‌تر است، هیچ مقوله خاصی از بیماری را تعریف نکرده و ارتباطی با ایمونوفوتیپ و سیتوژنتیک ندارد و در طبقه‌بندی سازمان بهداشت جهانی (WHO) نیز که بر اساس ایمونوفوتیپ و ژنوتیپ است، به کار گرفته نشده است. در مطالعه حاضر ارتباط مرفو‌لوژی L_1 و L_2 با MRD در

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). عمدترين ضعف استفاده از بازارايي در تشخيص MRD، تغيير در کلون اوليه(Clonal Evolution) است که منجر به منفي کاذب در ارزيايی نمونه‌های پس از درمان می‌شود(۲۱). دکتر کامپانا و همکاران با بررسی الگوی کلوناليتی در زمان تشخيص و پس از درمان، نشان دادند که ۷۱٪ از بازارايي های مورد استفاده IgH و TCR در ارزيايی MRD در زمان عود ثابت است و پايدارترین بازارايي مربوط به Igκ-kde و حداقل پايداري مربوط به TCR-δ می‌باشد(۱).

ون دانگن و همکاران از اهداف کلونال Ig TCR در ارزيايی ۹۴ بيمار استفاده کردند که ۷۱٪ از اهداف در زمان تشخيص و ييشترین پايداري مربوط به Igκ- kde TCR-γ(٪۹۰) و بعد از آن IgH(٪۷۵) و TCR-δ(٪۶۴) بود. پايداري در اهداف منوكلونال(٪۸۹) بيش از موارد اوليكوکلونال(٪۴۰) بود(۱۰).

روس و همکاران تفاوت کلونال در زمان تشخيص و عود را که می‌تواند منجر به منفي کاذب در ارزيايی MRD شود، ناشی از از دست دادن بازارايي اوليه، اتصال VH به DJH، جابجايی ژن VH و ظاهر شدن بازارايي جديد که می‌تواند با ورود ياحذف در نوکلئوتيدها در محل اتصال VH-N-DH باشد می‌دانند(۲۲).

روس، ماسين تير، بيزژوزن و كيو همگي در مطالعات مختلف اظهار می‌دارند که با توجه به تغيير كمتر در TCR-γ(٪۱۳)، هر زمان که ممکن باشد لازم است از TCR-γ به همراه TCR-δ و يا IgH در مطالعه MRD استفاده نمود(۲۲). پايدارترین ژن Igκ-kde، ثابت‌ترین هدف برای PCR است چرا که ندرتاً اوليكوکلونال بوده و ناشی از بازارايي نهايی است.

بنا به دلائل ذكر شده، توصيه بر اين است که بيش از

صورتی که بلاست $\geq 5\%$ باشد، ارزش پيش‌گويی کننده مثبت(PPV)، $\geq 75\%$ با حساسیت $\geq 30\%$ برای عود بیماری خواهد بود. اين روش ساده اما وابسته به تجربه و تبحر فرد مشاهده کننده است. وقتی تعداد سلول‌ها کم باشد به خصوص در نمونه‌های روز(۱۴) اين مطلب به صورت واضح در نمونه‌های مورد بررسی در مطالعه حاضر نیز مشاهده شد منجر به افزایش عدم اطمینان شمارش می‌شود(۱۳).

بنابراین ارزیابی مرفوولوژیک به علت حساسیت کم، کم سلول بودن نمونه‌ها، بررسی توسط هماتولوژیست و با توجه به شناس 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 مرفوولوژیک به خصوص حساسیت کم آن فائق آمد. روش‌های توصیه شده برای تشخيص 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 باشد.

ج - شانحص ثابتی را باید ارزیابی کنند و گرنه منجر به منفي کاذب خواهند شد.

د - قابلیت تکرار در بین مراکز مختلف داشته باشند که برای دستورالعمل‌های درمانی و تشخيص 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 Igκ در کنار مرفوولوژی استفاده شد، حساسیت تشخيص MRD در IgH با رقت‌های تهیه شده در DNA مخلوط سلول‌های تک هستمای 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

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٪-۱۵٪ 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 ۱-۲ ماه پس از شروع درمان به ۲۵٪، ۲۲٪ و ۱۸٪ در طی ۳-۵ و ۶-۹ و ۱۰-۲۴ ماه می‌رسد. نسبت بیماران با MRD⁺ در گروهی که عود کردن بیش از گروهی بود که در رمیسیون کامل بالینی باقی ماندند. در عین حال در این گروه MRD⁺ برای مدت طولانی تری 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 ۶-۹ ماه پس از درمان ذکر می‌کنند (۱۵). ون دانگن و همکاران اعلام کردند، بیماران $\geq 1\%$ MRD⁺ 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، $MRD^+ \text{ هستند و } 45\% \text{ از این گروه عود خواهند کرد. در حالی که تنها درصد کمی از بیماران MRD منفی (۵٪/۷٪) عود می‌کنند} (۲۳).$

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

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، ۲۲). 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 نشان دهنده پاسخ به درمان باشد. موارد فوق اگر چه با حساسیت آزمایش‌ها هنوز قابل تشخیص هستند و می‌توانند به عنوان دلیلی بر حضور سلول‌های لوسومی 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 پلی کلونال 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 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 تأیید 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 ۲۸، ۱۴ و ۶ ماه (در یک

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،^۲ MRD⁺ را در ۵۸/۸٪ از بیماران 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 بلافضله پس از جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای، 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(۲۴-۲۸). شدت درمان، فاکتورهای مربوط به سطح اقتصادی - اجتماعی کودکان و وضعیت تغذیه و نژاد در بهبود بیماران مؤثر است و ممکن است با تشخیص MRD نیز تداخل کند(۲۹)، (۲۳). امروزه مطالعه MRD جزیی از مدیریت درمان بیماران مبتلا به لوسی است اما خیلی وابسته به وجود امکانات و تجربه است. مهم‌ترین مساله در ارزیابی MRD، ساده نمودن روش‌ها هم زمان با قابل اعتماد نگهداشت نتایج حاصل از ارزیابی آنها و گسترش استفاده از ارزیابی MRD برای تمام بیماران در تمام نقاط دنیا است. در مطالعه حاضر پس از تعیین بازآرایی با آغازگرهای مشترک و تعیین توالی مخصوص‌الات PCR و به دنبال آن ساخت آغازگرهای اختصاصی توانستیم به حساسیت ۱۰^{-۴} - ۱۰^{-۵} دست یابیم. اما این امر مستلزم صرف وقت زیاد، هزینه بالا

از درمان⁺ MRD هستند. گروه مطالعه IBFM میزان MRD⁺ را در هفته پنجم، دوازدهم و هفته ۲۲-۲۵ به ترتیب ۶۰٪، ۵۰٪، ۳۰٪ و ۲۰٪ گزارش می‌کنند(۱). برسیکو و همکاران معتقدند در صورتی که در روز ۱۴ پس از شروع درمان، MRD با حساسیت ۱۰^{-۷} 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 پیش‌آگهی 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 شناس 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 IgH، TCR و حذف TAL-1 مشخص کردند که بیماران ۵-۱۰٪ MRD⁺ برابر شناس عود بالاتری(۸۶-۳۹٪ در سه سال) در مقایسه با بیماران 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 بیماران 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 در PCR بدون TCR نتایج این تحقیق می‌توان با این معیار موفق بود که حساسیت با میزان ۰/۰۱٪ ممکن است برای تشخیص

ناشناخته است باشد(۳۱). در عین حال برخی معتقدند که ریشه کنی کامل کلون لوسومی برای شفا لازم نیست و فقط با کاهش به حداقل لزوم، در محدوده‌ای قرار می‌گیرند که سیستم ایمنی اثر مهاری روی آن‌ها جهت نگهداشت 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 دهنده(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 است 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 لوسومی لنفوبلاستی حاد فراهم گردیده و نتایج قابل مقایسه با مطالعات دیگر است. عمدترين محدوديت، عدم انجام کمي حداقل بیماري باقیمانده به علت هزينه زياد آن می‌باشد. در عین حال استفاده از ارزیابی کلونالیتی نه تنها در اين گروه از بیماران بلکه در تشخيص و افتراء لفوم‌های غير هوچکینی از موارد واکنشی و نیز در تشخيص درگیری مایعات بدنه مثل مایع نخاع با سلول‌های بدخیم چه در لوسومی و چه در لفوم با حساسیت قابل قبولی کاربرد دارد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسنده‌گان مقاله از دکتر سید حسین یحیوی و دکتر شهرلا 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 شанс عود بالا(٪۹۰) هم‌ا亨ند(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 الکتروفسورز، 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 ۱۰^{-۳} 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 ٪۲۰-٪۲۵ 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 می‌گردد. مطالعه طولانی‌تری برای فهم رفتار این سلول‌های لوسومی و ارتباطشان با عود لازم است. به نظر می‌رسد جمعی از سلول‌های لوسومی 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, 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 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, Sankaranutty 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, Defavory 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 , Pannunzio 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-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.

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

⁶Shaheed Beheshti University of Medical Sciences

²Hematology Department, Tarbiat Modares University

⁷Tehran University of Medical Sciences

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

⁸Shariati Medical Center Hospital – Research Center

⁴Hematology Department, Zanjan Medical University

⁹Semnan University of Medical Sciences

⁵Iran University of Medical Sciences

¹⁰Payvand Medical Laboratory

¹¹Iranian Blood Transfusion Center – Research Center

Abstract

Background and Objectives

Diversity of IgH and Igk 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 Igk 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 Igk 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 Igk (V_k 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 Igk-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