خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۴ شماره ۴ زمستان ۸۶ (۲۹۵-۲۸۵)

نقش ارزیابی بازآرایی ژنی زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین توسط (IgHPCR) PCR در تشخیص موارد مشکوک لنفوم‌های غیر هوچکین از نوع سلول B

دکتر بهزاد پوپک[۱]، دکتر سید ضیاءالدین لطیف‌زاده[۲]، دکتر حسن ابوالقاسمی[۳]، ابوالفضل یوسفیان[۴]، دکتر گلاره خسروی‌پور[۵]، کبری فراهانی[۶]، محمد جهانگیرپور[۶]

چکیده

سابقه و هدف

در پاره‌ای از موارد لنفوم‌های بدخیم منظره مورفولوژیکی شبیه فرآیندهای واکنشی دارند و تشخیص قطعی آن‌ها با استفاده از روش‌های مرسوم هیستوپاتولوژیک دشوار است. یکی از بهترین روش‌های تشخیص، تعیین وجود جمعیت‌های سلولی مونوکلونال در نمونه‌های بیماران است، زیرا وجود این سلول‌های دارای بازآرایی کلونال مطرح کننده وجود بدخیمی است. با استفاده از PCR می‌توان بازآرایی ژنی زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین را بررسی کرد و جمعیت‌های کلونال لنفوسیت‌ها را مورد شناسایی قرار داد.

مواد وروش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تحلیلی بود. در مطالعه حاضر بلوک‌های پارافینه یا نمونه آسپیراسیون مغز استخوان ۱۲ بیمار با تشخیص هیستوپاتولوژیک غیر قطعی یا مشکوک به لنفوم مورد بررسی قرار گرفت. پس از استخراج DNA و انجام کنترل کیفی با استفاده از آغازگرهای ناحیه ثابت FR3 و JH ، مناطق CDR_3 ژن زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین مورد تکثیر قرار گرفت. محصولات PCR پس از آنالیز هترودوبلکس روی ژل پلی‌آکریل آمید الکتروفورز شده و با رنگ‌آمیزی نقره مشاهده گردید.

یافته‌ها

۷۵٪ بیماران مطالعه حاضر دارای بازآرایی کلونال و ۱۶/۶٪ دارای الگوی پلی‌کلونال بودند. یکی از بیماران پس از تکرار متوالی PCR دارای باند ضعیف در پس‌زمینه اسمیر بود و در نهایت مشکوک گزارش گردید.

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر به طور کلی با مطالعات انجام شده در سایر کشورها مطابقت دارد و نشان می‌دهد بررسی بازآرایی کلونال ژن IgH با استفاده از PCR ، روش مفیدی برای ارزیابی موارد مشکوک لنفوم غیر هوچکین است. به عبارت دیگر با کنار یکدیگر قرار دادن اطلاعات حاصل از بررسی هیستوپاتولوژیک و بررسی مولکولی، دستیابی به تشخیص قطعی در موارد مشکوک به لنفوم تسهیل خواهد شد.

کلمات کلیدی: **لنفوم‌های سلول B ، زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین، بازآرایی ژن**

تاریخ دریافت: ۸۶/۵/۲۳
تاریخ پذیرش: ۸۶/۱۱/۵

۱ـ مؤلف مسؤول: PhD هماتولوژی و بانک خون آزمایشگاهی ـ استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران و گروه هماتولوژی دانشگاه تربیت مدرس ـ صندوق پستی ۱۹۳۹۵/۱۴۹۵
۲ـ فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی ـ بیمارستان پارس
۳ـ فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی ـ استاد دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله و مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۴ـ کارشناس ارشد خون‌شناسی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۵- پزشک عمومی ـ آزمایشگاه تشخیص طبی پیوند
۶ـ کارشناس علوم آزمایشگاهی ـ آزمایشگاه تشخیص طبی پیوند

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-12]

مقدمه

امروزه روش‌های تشخیص مولکولی از جایگاه ویژه‌ای در تشخیص و طبقه‌بندی لنفوم‌های غیر هوچکین برخوردار بوده و در کنار سایر روش‌های تشخیصی مانند هیستوپاتولوژی و ایمونوهیستوشیمی کاربرد گسترده‌ای یافته‌اند. هدف اصلی از به کار بردن این روش‌ها در لنفوم غیر هوچکین، شناسایی جابه‌جایی‌های کروموزومی و بررسی کلونالیتی سلول‌های B و T می‌باشد(۲، ۱).

ارزیابی کلونالیتی سلول B از طریق بررسی بازآرایی ژنی ایمونوگلوبولین، یکی از پر درخواست‌ترین آزمایش‌های هماتولوژی مولکولی محسوب شده و به عنوان یک روش تشخیصی کمکی قابل اعتماد مورد توجه روزافزون قرار دارد(۶-۳).

در اکثر موارد تشخیص لنفوم غیرهوچکین بر اساس روش‌های معمول موجود مانند هیستوپاتولوژی و ایمونوهیستوشیمی امکان‌پذیر است اما در حدود ۱۰ تا ۱۵ درصد موارد، دستیابی به تشخیص قطعی نیازمند استفاده از آزمایش‌های تکمیلی از جمله بررسی مولکولی می‌باشد. در مطالعات متعدد، افتراق موارد خوش خیم از بدخیمی‌های سیستم لنفوئیدی به عنوان یکی از مشکلات پیش روی تشخیص مورفولوژیک یاد شده و بر استفاده از روش‌های مولکولی مانند بررسی کلونالیتی سلول B و T برای رسیدن به تشخیص قطعی تاکید شده است(۸، ۷، ۴). به عبارت دیگر هر چند ارزیابی هیستوپاتولوژیک در تشخیص اولیه و طبقه‌بندی لنفوم غیر هوچکین هنوز استاندارد طلایی محسوب می‌شود، ارزیابی کلونالیتی فرآیندهای لنفوپرولیفراتیو در کنار ایمونوفنوتایپینگ و بررسی مورفولوژیک در راه رسیدن به تشخیص قطعی و دقیق این گروه از بدخیمی‌ها بسیار کمک کننده است(۱۰، ۹).

به منظور تعیین کلونالیتی در نمونه‌های مختلف بیماران، تاکنون از روش‌های گوناگون مانند ساترن بلات و واکنش زنجیره پلی‌مراز(PCR) استفاده شده است(۱۱). در میان این روش‌ها PCR به دلایل متعدد از جمله امکان استفاده از نمونه‌های ذخیره شده مانند بلوک‌های پارافینه، گستره‌های تهیه شده بافتی، گستره‌های تهیه شده از آسپیره‌های مغز استخوان، استفاده از نمونه‌های تازه، امکان انجام آزمایش با مقادیر کمتر نمونه و DNA و نیز حساسیت بیشتر، کاربرد گسترده‌تری یافته است(۷). با توجه به این که منشاء سلول‌های بدخیم در یک بیمار در اکثر موارد از یک سلول بدخیم تغییر ماهیت یافته است بنابراین تمام سلول‌های توموری بازآرایی یکسانی در ژن زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین(IgH) دارند. PCR با استفاده از آغازگرهای مکمل که به مناطق ثابت ژن IgH متصل شده و مناطق فوق متغیر(CDR1-CDR3) را تکثیر می‌کنند ما را قادر به شناسایی جمعیت‌های مونوکلونال از جمعیت‌های پلی‌کلونال می‌سازد(۱۲، ۴، ۳).

IgH PCR می‌تواند ۱ سلول رده B مونوکلونال را در میان 10^3 تا 10^6 سلول پلی‌کلونال شناسایی کند(۱۳). با استفاده از IgHPCR نمونه‌های بسیار کوچک مانند بیوپسی‌های کوچک بافتی، نمونه‌های آسپیره سوزنی ظریف(FNA) و نمونه‌های تراشیده شده از اسلایدهای سیتولوژی از نظر بازآرایی کلونال قابل بررسی هستند(۱۷-۱۴).

هدف از انجام مطالعه حاضر شناسایی بازآرایی کلونال ژن زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین(IgH) در بافت‌های پارافینه و آسپیره مغز استخوان بیماران مشکوک به بدخیمی‌های لنفوئید به منظور تشخیص افتراقی فرآیندهای نئوپلاستیک از خوش خیم می‌باشد.

مواد و روش ها

در بررسی آینده‌نگر حاضر، نمونه‌های بلوک پارافینه زمان تشخیص و یا آسپیره مغز استخوان ۱۲ بیمار با تشخیص هیستوپاتولوژیک غیر قطعی(non definite) و یا مشکوک(suspicious) به لنفوما از نظر بازآرایی کلونال ژن زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین مورد ارزیابی قرار گرفتند. پس از تهیه مقاطع ۱۰ تا ۱۵ میکرونی از بلوک‌های پارافینه، این مقاطع در میکروتیوب‌های استریل با ثبت مشخصات بیمار جمع‌آوری شدند. محتویات میکروتیوب‌ها با محلول گزیلول دپارافینه شده و با اتانل با غلظت‌های مختلف شستشو داده شدند. DNA نمونه‌های دپارافینه شده و نیز نمونه آسپیره مغز استخوان با استفاده از کیت High pure PCR template (رُوش ـ آلمان) استخراج شدند. برای

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-12]

اطمینان از کیفیت DNA استخراج شده، مراحل کنترل کیفی شامل تعیین غلظت DNA و خلوص آن(OD ۲۶۰/۲۸۰) با بیوفوتومتر اپندورف انجام شد. سپس DNAهای استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱ درصد جهت اطمینان از عدم قطعه قطعه شدن آن الکتروفورز گردیدند. به منظور ارزیابی بازآرایی ژن زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین از آغازگرهای مشترک ناحیه FR3 استفاده شد. در این واکنش‌ها غلظت $MgCl_2$ ۱/۵ میلی‌مولار، dNTP ۲۰۰ میکرومولار، آغازگرها ۱۰ تا ۱۵ پیکومول، Tag DNA Polymerase به میزان ۱ واحد بوده و DNA بیماران به میزان ۲۵۰ تا ۵۰۰ نانوگرم در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر طبق برنامه جدول ۱ تکثیر شد.

جدول ۱: برنامه واکنش زنجیره پلی‌مراز به منظور تکثیر ژن زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین بازآرایی شده

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

محصول واکنش اول PCR با آب مقطر استریل به نسبت‌های ۱/۱۰۰ و ۱/۵۰۰(با توجه به کیفیت و غلظت DNA اولیه) رقیق شده و در واکنش دوم PCR به صورت heminested یک میکرولیتر از آن به صورت الگو استفاده شد. PCR با استفاده از ترمال سایکلر PEQLab انجام شد. تمام واکنش‌های PCR بر روی نمونه‌های بیماران حداقل ۲ بار تکرار شدند. محصول PCR پس از آنالیز هترودوبلکس (۵ دقیقه حرارت در ۹۵ °C و بعد یک ساعت در ۴ °C) بر روی ژل پلی‌آکریلامید ۶٪ الکتروفورز شده و با رنگ‌آمیزی نقره مشاهده گردید. برای کنترل شرایط و ارزیابی واکنش‌های PCR از کنترل‌های مثبت و منفی طبق جدول ۲ استفاده شد.

جدول ۲: کنترل‌های مثبت و منفی که در مطالعه حاضر مورد استفاده قرار گرفته‌اند

نوع کنترل	شماره	نمونه	تشخیص	PCR
کنترل مثبت	۱	بلوک پارافینه	لنفوم بدخیم سلول B	مونوکلونال
	۲	بلوک پارافینه	لنفوم بدخیم سلول B	مونوکلونال
کنترل منفی	۱	بلوک پارافینه	هایپرپلازی فولیکولار ۸	پلی‌کلونال
	۲	سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی	فرد سالم	پلی‌کلونال
	۳	آب مقطر استریل		منفی

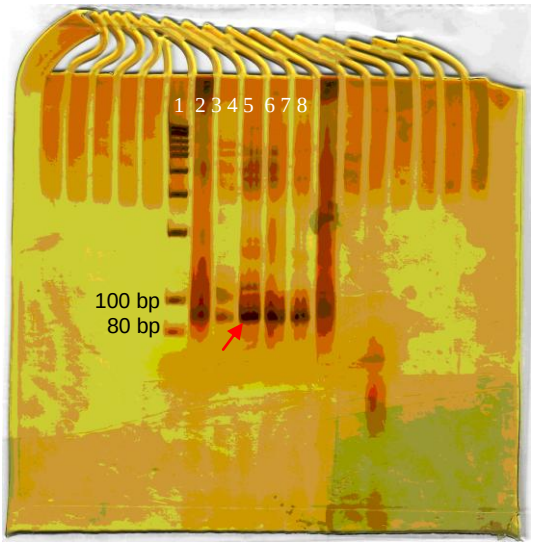
یافته ها

در مطالعه حاضر بلوک‌های پارافینه یا نمونه آسپیره مغز استخوان ۱۲ بیمار با تشخیص هیستوپاتولوژیک و ایمونوهیستوشیمی غیر قطعی یا مشکوک به لنفوم بدخیم با استفاده از PCR از نظر بازآرایی کلونال ژن IgH مورد بررسی قرار گرفتند(جدول ۳). میانگین سنی بیماران ۱۳/۹۵ ± ۴۵/۱ سال بود. ۵ نفر از بیماران مذکر و ۷ نفر مؤنث بودند. پس از آنالیز هترودوبلکس، الکتروفورز بر روی ژل پلی‌آکریل آمید انجام شد و رنگ‌آمیزی نقره مورد استفاده قرار گرفت. بازآرایی کلونال به صورت یک باند مشخص به اندازه ۸۰ تا ۱۲۰ جفت باز در ۷۵ درصد بیماران مشاهده شد. در موارد پلی‌کلونال، نتیجه واکنش PCR به صورت اسمیر یا نردبان مشاهده گردید(شکل ۱). ۱۶/۶ درصد بیماران الگوی پلی‌کلونال را نشان دادند. قابل ذکر است که تمام واکنش‌های PCR در این مطالعه به صورت دوتایی(Duplicate) انجام شدند و نتایج به دست آمده از هر دو واکنش PCR در یک بیمار با هم مطابقت داشت. هیچ کدام از موارد دارای بازآرایی کلونال در مطالعه حاضر به صورت بای یا الیگوکلونال نبودند و در تمام موارد دارای بازآرایی کلونال، مونوکلونالیتی مشاهده شد.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-12]

جدول ۳: نتیجه بررسی بازآرایی کلونال ژن IgH با توجه به نوع و محل نمونه و گزارش هیستوپاتولوژی بیماران

شماره	نوع نمونه	محل نمونه	گزارش پاتولوژی، ایمونوهیستوشیمی	بررسی کلونال
۱	بلوک پارافینه	ضایعات پوستی	۱- لنفوسیتوماکوتیس ۲- لنفوم کاذب	پلی‌کلونال
۲	بلوک پارافینه	ضایعات پوستی	۱- مشکوک به لنفوم ۲- فرآیند واکنشی	پلی‌کلونال
۳	بلوک پارافینه	توده‌های ریوی	۱- لنفوم با درجه پایین برونش ۲- هایپرپلازی واکنشی	مونوکلونال
۴	بلوک پارافینه	توده گردنی	۱- هایپرپلازی واکنشی ۲- لنفوم سلول B بزرگ غنی از سلول T	مونوکلونال
۵	آسپیراسیون	مغز استخوان	۱- مشکوک به لنفوم	مونوکلونال
۶	بلوک پارافینه	مغز استخوان	۱- مشکوک به لنفوم با درجه پایین ۲- اختلال لنفوپرولیفراتیو	مونوکلونال
۷	بلوک پارافینه	توده نازوفارنکس	مشکوک به اختلال لنفوپرولیفراتیو از نوع سلول T	مونوکلونال
۸	بلوک پارافینه	توده گردنی	لنفوم سلول B بزرگ	مونوکلونال
۹	بلوک پارافینه	غده لنفاوی سرویکال	۱- لنفوم غیرهوچکین با درجه بالا از نوع سلول B ۲- لنفوم هوچکین	مونوکلونال
۱۰	بلوک پارافینه	ضایعات پوستی	میکوزیس فونگوئیدس؟	مونوکلونال
۱۱	بلوک پارافینه	ضایعات پوستی	میکوزیس فونگوئیدس؟	مونوکلونال
۱۲	بلوک پارافینه	غده لنفاوی سرویکال	هایپرپلازی پاراکورتیکال آتیپیک؟	غیر قطعی



شکل ۱: ژل پلی‌آکریلامید۶٪ رنگ‌آمیزی شده با نیترات نقره است. لاین۱ مربوط به مارکر ۱۰۰ جفت نوکلئوتیدی، لاین ۲ کنترل مثبت با بازآرایی منوکلونال و لاین ۴ الی ۶ مربوط به بیمار مشکوک به لنفوم است که در هر سه به صورت منوکلونال(تک باند، با فلش قرمز در لاین ۴) مشخص است. لاین ۷ کنترل منفی است که به صورت اسمیر مشخص است(باکروشه سفید مشخص شده است). لاین ۸ کنترل بدون نمونه است.

بیمار شماره ۱ دارای ضایعات پوستی اندام تحتانی بود. در بررسی هیستوپاتولوژیک این بیمار، تشخیص لنفوم پوستی مطرح شد. اما پس از انجام ایمونوهیستوشیمی، این تشخیص تایید نگردید و یافته‌های ایمونوهیستوشیمی با وجود یک فرآیند نئوپلاستیک سازگار نبود. در بررسی بازآرایی کلونال این مورد الگوی پلی‌کلونال مشاهده شد.

در گزارش پاتولوژی بیمار دیگر مطالعه حاضر(بیمار شماره ۲)، لزوم تشخیص افتراقی لنفوسیتوما کوتیس از لنفوم کاذب مطرح گردیده بود. در بررسی بازآرایی کلونال ژن IgH ، این بیمار دارای الگوی پلی‌کلونال بود.

بیمار شماره ۳ با گزارش پاتولوژی که تشخیص لنفوم برونش با درجه پایین را مطرح ساخته بود وارد مطالعه حاضر شد. در گزارش پاتولوژی این بیمار انجام بررسی مولکولی توسط PCR به منظور تایید تشخیص مورفولوژیک، توصیه شده بود. در بررسی بازآرایی کلونال ژن IgH این بیمار بازآرایی مونوکلونال مشاهده گردید.

در گزارش پاتولوژی بیمار شماره ۴ هایپرپلازی واکنشی به عنوان تشخیص مطرح گردیده بود اما گزارش

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-12]

ایمونوهیستوشیمی بیمار فوق به نفع وجود لنفوم سلول B بزرگ منتشر غنی از سلول T (TCRBCL) بود و تشخیص هایپرپلازی واکنشی را تایید نمی‌کرد. الگوی مونوکلونال در بررسی بازآرایی کلونال این بیمار مشاهده شد. بیماران شماره ۵ و ۶ با تجمع‌های مشکوک لنفوسیتی در مغز استخوان، بازآرایی کلونال ژن IgH را نشان دادند.

بیمار شماره ۷ در بررسی میکروسکوپیک و ایمونوهیستوشیمی مشکوک به اختلال لنفوپرولیفراتیو از نوع سلول T بود. در گزارش ایمونوهیستوشیمی بیمار فوق، انجام بررسی مولکولی توسط PCR برای تایید وجود اختلال لنفوپرولیفراتیو توصیه شده بود. این مورد بازآرایی کلونال ژن IgH را نشان داد. بازآرایی کلونال ژن IgH در بیمار با تشخیص هیستوپاتولوژیک مشکوک به لنفوم بدخیم سلول B مشاهده گردید(بیمار شماره ۸).

در مطالعه حاضر یکی از بیماران دارای دو گزارش پاتولوژی با تشخیص متفاوت بود(بیمار شماره ۹). در یکی از گزارش‌ها تشخیص لنفوم هوچکین و در دیگری لنفوم غیر هوچکین از نوع سلول B بزرگ با درجه بالا مطرح شده بود. این بیمار در بررسی بازآرایی کلونال ژن IgH ، مونوکلونالیتی را نشان داد.

در هر دو بیمار با تشخیص هیستوپاتولوژیک میکوزیس فونگوئیدس، بازآرایی کلونال ژن IgH مشاهده گردید(بیماران شماره ۱۰، ۱۱). در مطالعه حاضر، تنها در یک بیمار(۸/۳٪ موارد) بررسی بازآرایی کلونال ژن IgH نتیجه قطعی در بر نداشت(بیمار شماره ۱۲).

در گزارش پاتولوژی این بیمار، تشخیص هایپرپلازی آتیپیک پاراکورتیکال ذکر شده بود، در بررسی بازآرایی کلونال ژن IgH یک باند ضعیف در زمینه اسمیر مشاهده شد.

بدین ترتیب تفسیر قطعی نتیجه حاصل از بررسی بازآرایی کلونال در مورد این بیمار، میسر نگردید. هر دو مورد کنترل مثبت مطالعه حاضر، بازآرایی کلونال ژن IgH را به صورت یک باند مشخص با اندازه ۸۰ تا ۱۲۰ جفت باز در ژل پلی‌آکریل آمید نشان دادند. الگوی پلی‌کلونال در موارد کنترل منفی به صورت اسمیر واضح در ژل پلی‌آکریل آمید مشاهده شد.

بحث

ارزیابی هیستوپاتولوژیک و ایمونوهیستوشیمی جمعیت‌های لنفوسیتی بیماران در پاره‌ای از موارد منجر به شناسایی دقیق ماهیت تکثیری این سلول‌ها نگردیده و خوش خیم(واکنشی) یا بدخیم(لنفوم) بودن آن‌ها را در پرده‌ای از ابهام باقی می‌گذارد. در چنین مواردی استفاده از روش‌های تشخیص کمکی مانند بررسی مولکولی کلونالیتی توسط ارزیابی بازآرایی ژن زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین توصیه گردیده است(۱۰، ۹، ۴).

در مطالعه حاضر نمونه‌های مربوط به ۱۲ بیمار با تشخیص مورفولوژیک و ایمونوهیستوشیمی غیر قطعی یا مشکوک به لنفوم بدخیم از نظر بازآرایی کلونال ژن IgH مورد ارزیابی قرار گرفتند. «غیر قطعی» به مواردی اطلاق شد که ارزیابی هیستوپاتولوژیک یا ایمونوهیستوشیمی نمونه یک بیمار وجود بدخیمی لنفوئیدی را مطرح ساخته بود اما برای تایید تشخیص، انجام بررسی مولکولی توسط PCR توصیه شده بود. هم چنین بیمارانی که در بررسی مورفولوژیک مشکوک به یک بدخیمی لنفوئیدی گزارش شده بودند، به عنوان موارد«مشکوک» وارد مطالعه حاضر شدند. از ۱۲ بیمار مطالعه حاضر، بازآرایی کلونال به صورت الگوی مونوکلونال در ۷۵ درصد مشاهده شد. ماس و همکاران، بلوک‌های پارافینه بیوپسی مغز استخوان بیمارانی را که در بررسی هیستوپاتولوژیک و ایمونوهیستوشیمی به عنوان مشکوک و یا غیر قطعی طبقه‌بندی شده بودند، از نظر بازآرایی کلونال ژن IgH با استفاده از آغازگرهای مشترک ناحیه FR3 بررسی کردند. آن‌ها در ۴۳ درصد مورد بازآرایی کلونال ژن IgH را مشاهده کردند که از مقدار مشاهده شده در مطالعه حاضر کمتر است(۱۸). ماروتو ۱۴ بیمار مشکوک به لنفوم بدخیم را از نظر بازآرایی کلونال ارزیابی کرد و در ۱۰ مورد(۷۱/۴٪) بازآرایی کلونال را مشاهده کرد. در مطالعه وی ۲۱/۴٪ موارد مشکوک، الگوی پلی‌کلونال را نشان دادند و در۷/۱٪ موارد نیز نتیجه قطعی در بررسی کلونالیتی حاصل نگردید(۱۹). در مطالعه حاضر نیز مانند مطالعه ماروتو بررسی بازآرایی کلونال در یکی از بیماران(۸/۳٪ موارد) نتیجه قطعی در پی نداشت. در بررسی بازآرایی

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-12]

کلونال این بیمار، یک باند ضعیف در پس زمینه اسمیر در ژل پلی‌آکریل آمید مشاهده شد. بدین ترتیب قراردادن این مورد در گروه بیماران پلی‌کلونال یا کلونال امکان‌پذیر نبود.

در تشخیص هیستوپاتولوژیک بیمار شماره ۱ مطالعه حاضر که دارای ضایعات پوستی اندام تحتانی بود، وجود لنفوم بدخیم مطرح گردیده بود. ارزیابی ایمونوهیستوشیمی این مورد به نفع وجود یک فرآیند بدخیم نبود و تشخیص هیستوپاتولوژیک را تایید نمی‌کرد. در بررسی بازآرایی کلونال ژن IgH این بیمار، الگوی پلی‌کلونال مشاهده شد. بنابراین نتیجه حاصل از بررسی مولکولی نیز مانند ایمونوهیستوشیمی با وجود بدخیمی سازگار نبود.

در بررسی بازآرایی کلونال ژن IgH ضایعات پوستی مشکوک به لنفوم، بروز موارد منفی کاذب شایع نمی‌باشد. در نقطه مقابل از آن جایی که جمعیت لنفوسیتی در ضایعات پوستی مشکوک غالباً به صورت پراکنده قرار دارند و در این ضایعات تعداد سلول لنفوئیدی نیز محدود می‌باشد، بروز موارد مثبت کاذب در بررسی بازآرایی کلونال درگیری‌های مشکوک پوست از امکان بیشتری برخوردار بوده و باید مورد توجه قرار گیرد(۲۳-۲۰).

در مطالعه‌ای که توسط تریولت و همکاران روی بلوک‌های پارافینه ۱۱ بیمار با لنفوم پوستی از نوع سلول B انجام شد، بازآرایی کلونال ژن IgH در ۹ مورد(۸۱٪) مشاهده گردید. در مطالعه وی با در کنار هم قراردادن اطلاعات حاصل از بررسی بالینی،ایمونوهیستوشیمی و بازآرایی کلونال ژن IgH در ۶۶٪ موارد مشکوک به لنفوم پوستی از نوع سلول B ، دستیابی به تشخیص قطعی(definite) لنفوم پوستی امکان‌پذیر گردید(۲۱).

نیهال توصیه کرد در مواردی که بازآرایی کلونال در ضایعات پوستی مشکوک مشاهده شده است، از درماتوزهای التهابی و سلول‌های طبیعی پوست به عنوان کنترل منفی بررسی کلونالیتی استفاده شود تا از مثبت تلقی شدن موارد مثبت کاذب جلوگیری گردد(۲۲).

وی هم چنین پیشنهاد کرد در مواردی که بر اساس ایمونوهیستوشیمی، سلول‌های B در ضایعات پوستی تعداد محدودی داشته و به صورت پراکنده قرار دارند، در صورت وجود بازآرایی کلونال IgH در بررسی مولکولی، واکنش PCR به صورت سه تایی(triplicate) انجام شود و در صورت مشاهده بازآرایی کلونال در هر سه مورد، نتیجه بررسی بازآرایی کلونال، مثبت واقعی تلقی گردد. در مطالعه حاضر نیز واکنش زنجیره پلیمراز بیماران دارای ضایعات پوستی مشکوک به لنفوم به صورت سه تایی انجام شد و تکرارپذیری قابل قبول مشاهده گردید.

در بررسی موارد مشکوک و یا بدون نتیجه قطعی هیستوپاتولوژیک، تشخیص افتراقی لنفوم بدخیم از لنفوم کاذب دارای اهمیت ویژه‌ای است. بیمار شماره ۲ مطالعه حاضر با گزارش پاتولوژی که بیانگر لزوم تشخیص افتراقی لنفوسیتوماکوتیس از لنفوم کاذب بود به بخش تشخیص مولکولی آزمایشگاه پیوند ارجاع شد. در بررسی کلونالیتی بیمار فوق، منظره اسمیر در تکرارهای متعدد PCR مشاهده گردید در نتیجه این مورد پلی‌کلونال گزارش شد. مشاهده الگوی پلی‌کلونال در این بیمار،وجود لنفوم کاذب را مطرح ساخت و از تشخیص لنفوسیتوماکوتیس حمایت نکرد.

گروه گسترده‌ای از بیماری‌های پوستی با افزایش قابل توجه لنفوسیت‌ها در پوست همراه هستند. برای درمان بیمار در چنین شرایطی، تشخیص افتراقی هایپرپلازی واکنشی از فرآیندهای نئوپلاستیک ضروری است. هوگس در سال ۲۰۰۱ بلوک‌های پارافینه ۳۱ بیمار با درگیری لنفوم پوستی را از نظر بازآرایی کلونال ژن IgH بررسی کرد. در مطالعه وی نتایج حاصل از بررسی کلونالیتی ژن IgH با تشخیص هیستوپاتولوژیک و ایمونوهیستوشیمی تمام بیماران ارزیابی شده مطابقت داشت(۲۴).

بیمار شماره ۳، با تشخیص مورفولوژیک لنفوم برونش با درجه پایین و اطلاعات بالینی که بیانگر وجود توده‌های مکرر در ریه‌ها بود، به بخش هماتولوژی مولکولی جهت بررسی بازآرایی کلونال ژن IgH ارجاع شد. بر اساس گزارش‌های متعدد، تشخیص درگیری ریه‌ها با لنفوم بدخیم دشوار بوده و در این شرایط بررسی وجود جمعیت کلونال سلول B در لنفوسیت‌های آلوئولار می‌تواند به طور غیر مستقیم تشخیص لنفوم ریوی را مطرح سازد(۲۷-۲۵). توصیه شده است که در صورت شک به درگیری ریه‌ها با لنفوم بدخیم، به عنوان اولین اقدام بررسی بازآرایی کلونال مایع لاواژ برونکوآلوئولار(BAL) انجام شود. سپس در

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-12]

صورت مشاهده جمعیت کلونال سلول B در بررسیPCR ، از روش تهاجمی مانند بیوپسی با جراحی برای ارزیابی هیستوپاتولوژیک و رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی استفاده گردد(۳۰-۲۸). مشاهده بازآرایی کلونال ژن IgH در نمونه به دست آمده از بلوک پارافینه بیمار شماره ۳ مطالعه حاضر که دارای توده‌های متعدد مشکوک در ریه‌ها بود، از وجود لنفوم بدخیم حمایت می‌کرد. گزارش پاتولوژی بیمار دیگر مطالعه حاضر(بیمار شماره ۴) تشخیص هایپرپلازی واکنشی را مطرح کرده بود در حالی که یافته‌های بررسی ایمونوهیستوشیمی بیمار فوق به نفع لنفوم سلول B بزرگ منتشر غنی از سلول T (TCRBCL) اعلام شده و با تشخیص میکروسکوپیک سازگار نبود. TCRBCL از موارد نادر لنفومای غیرهوچکین سلول B بوده و در طبقه‌بندی REAL ، زیر گروه DLBCL محسوب می‌گردد(۳۱). تشخیص افتراقی TCRBCL از لنفوم کاذب و لنفوم هوچکین از نوع لنفوسیت غالب(Lymphocyte predominant) دشوار است(۳۲). در بررسی پاتولوژیک TCRBCL با جمعیت ناچیز سلول‌های B بدخیم، مشخص می‌گردد که این لنفوم در بین تعداد زیادی سلول T واکنشی قرار گرفته است(۳۳). از آن جایی که TCRBCL از موارد نادر DLBCL محسوب می‌گردد(۳٪-۱٪ موارد)، مطالعه‌ای که بازآرایی کلونال IgH را با استفاده از یک جفت آغازگر ناحیه FR3 بررسی کند یافت نگردید(۳۱). به هر حال مشاهده بازآرایی کلونال در بیمار شماره ۴ از یافته‌های ایمونوهیستوشیمی حمایت کرده و مطرح کننده وجود TCRBCL بود. دو بیمار با گزارش درگیری مشکوک به لنفوم مغز استخوان، بازآرایی کلونال ژن IgH را نشان دادند(بیماران شماره ۵ و ۶). بدین ترتیب بررسی مولکولی با استفاده از IgHPCR نیز از بدخیم بودن تجمع‌های لنفوسیتی مشکوک مشاهده شده در مغز استخوان این دو بیمار، حمایت کرد. ویژگی‌های مورفولوژیک و ایمونولوژیک متعددی وجود دارند که بر اساس آن‌ها تشخیص افتراقی یک بدخیمی لنفوئید از یک روند واکنشی امکان‌پذیر است. به طور مثال تجمع‌های لنفوسیتی بدخیم در مقایسه با انواع خوش‌خیم، تمایل به بزرگ‌تر بودن داشته و در گروه‌هایی با تعداد بیشتر مشاهده می‌شوند.

علاوه بر این تجمع‌های بدخیم معمولاً دارای حاشیه‌های محدود و مشخص نمی‌باشند و ممکن است سلول‌های طبیعی مغز استخوان از جمله مگاکاریوسیت‌ها را احاطه کنند(۳۴). در بررسی ایمونولوژیک تجمع‌های لنفوسیتی بدخیم سلول B ، از نظر شاخص‌های سلولی مانند CD20 مثبت هستند در حالی که سلول‌هایی که از نظر شاخص‌های لنفوسیت T مثبت می‌باشند به صورت پراکنده و محدود مشاهده می‌شوند. در نقطه مقابل تجمع‌های خوش‌خیم لنفوسیتی به طورعمده از سلول‌های T تشکیل شده‌اند(۳۵). با وجود این تفاوت‌ها میان تجمع‌های خوش خیم و بدخیم لنفوسیتی در مغز استخوان، تشخیص افتراقی این دو جمعیت از یکدیگر در پاره‌ای از موارد بسیار دشوار و یا حتی غیر ممکن می‌باشد، به خصوص در شرایطی که یافته‌های بالینی بیمار نیز مبهم است(۳۶). بن ـ ازرا تجمع‌های لنفوسیتی بدخیم مغز استخوان ۱۸ بیمار را از نظر بازآرایی کلونال IgH بررسی کرد. وی در ۴۴٪ موارد مونوکلونالیتی را مشاهده کرد. هیچ کدام از موارد تجمع‌های خوش‌خیم در مغز استخوان دارای بازآرایی کلونال نبودند و تمام موارد پلی‌کلونالیتی را نشان دادند. این محقق توصیه کرد در مواردی که تشخیص قطعی ماهیت تجمع‌های لنفوسیتی مغز استخوان با تکیه بر روش‌های مرسوم مورفولوژیک امکان‌پذیر نیست، از بررسی بازآرایی کلونال ژل IgH توسط PCR سود برده شود تا با استفاده از یافته‌های PCR در کنار یافته‌های بالینی و مورفولوژیک، دست‌یابی به تشخیص قطعی امکان‌پذیر گردد(۳۵).

در بیماری که دارای دو گزارش پاتولوژی با دو تشخیص متفاوت لنفوم هوچکین و لنفوم غیر هوچکین سلول B با درجه بالا بود، بازآرایی کلونال ژن IgH مشاهده گردید(بیمار شماره ۹).

آیلو و همکاران ۸ بیمار مبتلا به انواع مختلف لنفوم هوچکین را از نظر بازآرایی کلونال ژن IgH بررسی کردند و در هیچ کدام از بیماران مونوکلونالیتی را مشاهده نکردند(۳۷). وان و همکاران نیز در بیماران مبتلا به هوچکین، الگوی پلی‌کلونال ژن IgH را مشاهده کردند(۳۸). ماروتو در ۲۰ درصد انواع لنفوم هوچکین بازآرایی کلونال ژن IgH را مشاهده کرد(۳۸). در مطالعه

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-12]

وی ۸۴٪ موارد لنفوم غیر هوچکین از نوع سلول B، بازآرایی کلونال را نشان دادند(۱۹). در مطالعه جداگانه‌ای که توسط تامارو و دنگ انجام شد، بازآرایی کلونال ژن IgH در سلول‌های ریداشتنبرگ جدا شده از مقاطع بافتی مشاهده گردید(۴۰ ، ۳۹).

هر چند تشخیص افتراقی لنفوم هوچکین و لنفوم غیر هوچکین از نوع سلول B با استفاده از بررسی بازآرایی کلونال ژن IgH ، بر اساس اطلاعات ما تاکنون در هیچ مطالعه‌ای بررسی نگردیده است، با توجه به این که اکثر موارد لنفوم هوچکین فاقد بازآرایی کلونال ژن IgH هستند، مشاهده بازآرایی کلونال ژن IgH در بیمار شماره ۹ مطالعه حاضر، یافته‌ای به نفع وجود لنفوم غیر هوچکین از نوع سلول B محسوب می‌گردد و از تشخیص لنفوم هوچکین حمایت نمی‌کند.

هر دو بیمار با تشخیص هیستوپاتولوژیک میکوزیس فونگوئیدس و نیز بیمار مشکوک به اختلال لنفوپرولیفراتیو از نوع سلول T ، بازآرایی کلونال ژن IgH را نشان دادند، مشاهده بازآرایی کلونال ژن IgH در لنفوماهای سلول T در مطالعات متعدد گزارش شده است و عدم انطباق با رده سلولی(Lineage infidelity) نام دارد(۴۲، ۴۱ ، ۱۳).

علاوه بر بررسی بازآرایی کلونال IgH ، سه بیمار فوق از نظر بازآرایی کلونال ژن زنجیره گامای گیرنده سلول T نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند و الگوی پلی‌کلونال ژن زنجیره گامای TCR را نشان دادند. در بررسی هیستولوژیک معمول، میکوزیس فونگوئیدس شباهت زیادی با درماتوزهای التهابی خوش خیم داشته و تشخیص افتراقی این بدخیمی لنفوئیدی از روندهای خوش خیم می‌تواند دشوار باشد(۴۳).

از آن جایی که امروزه بررسی بازآرایی کلونال ژن IgH در مواردی با تشخیص غیر قطعی یا مشکوک لنفوم غیر هوچکین دارای اهمیت ویژه‌ای می‌باشد، توجه به اقداماتی که حساسیت و ویژگی این روش مولکولی را ارتقاء می‌دهد ضروری است. از جمله این اقدامات به موارد زیر می‌توان اشاره کرد.

هر چند بررسی بازآرایی کلونال ژن IgH با استفاده از یک جفت آغازگر متصل شونده به ناحیه FR3 ، دارای ویژگی قابل قبولی بوده و موارد مثبت کاذب آن محدود است، به منظور پرهیز از موارد کاذب احتمالی، واکنش‌های PCR باید به صورت دوتایی و یا سه تایی برای هر بیمار انجام شوند و در صورت مشاهده تکرارپذیری واکنش‌ها، نتیجه مثبت واقعی تلقی گردد. برای ارتقای حساسیت بررسی بازآرایی کلونال IgH و پرهیز از موارد منفی کاذب، واکنش زنجیره پلی‌مراز هر بیمار باید حداقل ۲ بار تکرار شود و در صورت عدم وجود بازآرایی کلونال در هر دو واکنش، نتیجه منفی تلقی گردد. علاوه بر این بهتر است از آغازگرهایی که به مناطق دوردست متصل می‌شوند(FR1 و FR2)، برای جلوگیری از موارد منفی کاذب استفاده شود(۱۶).

مساله مهم دیگر در ارزیابی نمونه‌های بافتی، کیفیت نمونه است. در صورتی که استخراج DNA از قسمتی از نمونه بلوک پارافینه یا مغز استخوان انجام شود که درگیری با سلول‌های توموری ندارد، یا میزان سلول‌های توموری در آن کم است، امکان بروز منفی کاذب وجود دارد. در چنین مواردی استفاده از سیستم Microdisection بسیار توصیه می‌گردد(۴۴). در مراکزی که به این سیستم دسترسی ندارند، افزایش تعداد برش‌ها از بلوک پارافینه و استخراج DNA در بیش از یک نوبت توصیه می‌شود. علاوه بر این با توجه به عدم استفاده از فرمالین بافره در اکثر موارد در کشور، استخراج DNA از بلوک پارافینه ممکن است با مشکل مواجه شود، به همین دلیل کیفیت DNA استخراج شده باید توسط بررسی‌های دقیق کنترل کیفی مورد ارزیابی قرار گیرد.

باید توجه داشت که حضور باند مونوکلونال همیشه معادل بدخیمی نمی‌باشد، گروهی از شرایط خوش خیم مانند لنفوسیتوزیس $CD8^+$ (گاهی $CD4^+$)، گاموپاتی‌های خوش‌خیم مونوکلونال، مراحل ابتدایی لنفوپرولیفراسیون‌های EBV مثبت، بیماران با نقص ایمنی و تکثیرهای خوش خیم پوستی از نوع سلول T مانند لنفوماتوئیدپاپولوزیس می‌توانند منشا کلونال داشته باشند. بنابراین نتایج بررسی کلونال همواره باید با توجه به شرایط بالینی،تشخیص مورفولوژیک و ایمونوهیستوشیمی بیماران تفسیر گردد و به تنهایی مورد قضاوت قرار نگیرد(۴۵).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-12]

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر با سایر مطالعات انجام شده در زمینه کاربرد IgHPCR در کمک به تشخیص قطعی لنفوم‌های غیر هوچکین، قابل مقایسه است و با توجه به امکان انجام این آزمایش مولکولی در ایران، ارزیابی و بررسی تعداد بیشتر بیماران مشکوک نتایج ارزشمندتری را می‌تواند به دنبال داشته و در امر تشخیص صحیح بیماران ایرانی کمک کننده باشد. استفاده از بازآرایی‌های دیگر از جمله بازآرایی ژن زنجیره سبک ایمونوگلوبولین از نوع کاپا و ژن گیرنده لنفوسیت T از نوع گاما و بتا در تکمیل فرآیند تشخیص مفید خواهد بود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مقاله از دکتر محمدرضا عزیزی و دکتر زهرا قربانی به خاطر همکاری صمیمانه و راهنمایی‌های ارزشمندشان تشکر و قدردانی به عمل می‌آورند.

References :

1- Wilkins BS. Molecular genetic analysis in the assessment of lymphomas. Current Diagnostic Pathology 2004;10:351-9.
2- Macintyre E, Bahloul M, Asnafi V. Clinical impact of molecular diagnostics in low-grade lymphoma. Best Practice and Research Clinical Haematology 2005;18 (1):97-11.
3- Bagg A, Braziel RM, Arber D, Bijwaard K, Y Chu A. Immunoglobulin heavy chain gene analysis in lymphomas: a multi-center study demonstrating the heterogeneity of performance of polymerase chain reaction asssays. J Mol Diagn 2002;4:81-9.
4- Nikiforova M, His E, Braziel R, Gulley M, Leonard D, Nowak J *et al*. Detection of clonal IGH gene rearrangements: summary of Molecular oncology surveys of the college of American pathologists. Arch Pathol Lab Med 2007;131:185-9.
5- Fend F, Bock O, Kremer M, Specht K, Quintanilla-Martinez L. Ancillary techniques in bone marrow pathology: molecular diagnostics on bone marrow trephine biopsies. Virchows Arch 2005;447:909-19.
6- Achille A, Scarpa A, Montresor M. Routine application of polymerase chain reaction in the diagnosis of monoclonality of B cell lymphoid proliferations. Diagn Mol Pathol 1995;4:14-24.
7- Rezuke WN, Abernathy EC, Tsongalis GJ. Molecular diagnosis of B- and T-cell lymphomas: fundamental priiples and clinical applications clinical chemistry 1997:1814-23.
8- Weirich G, Funk A, Hoepner I, Heidner U, Noll S, Putz B, *et al*. PCR-based assays for the detection of monoclonality in non-Hodgkin's lymphoma: application to formalin-fixed paraffin-embedded tissue and decalcified bone marrow samples. J Mol Med 1995;73:235-324.
9- Krober SM, Horney HP, Greschniok A, Kaiserling E. Reactive and neoplastic lymphocytes in human bone marrow: morphological, immunohistological, and molecular biological investigations on biopsy specimens. J Clin Pathol 1999;52:521-26.
10- Maes B, Achten R, Demunter A, Peeters B, Verhoef G, Wolf-Peters C. Evaluation of B cell lymphoid infiltrates in bone marrow biopsies by morphology, immunohistochemistry, and molecular analysis. J Clin Pathol 2000;53:835-40.
11- Kocjan G. Cytological and molecular diagnosis of lymphoma. J Clin Path 2005;1:561-7.
12- Deane M, Norton JD. Detection of immunoglobulin gene monoclonal rearrangement in B lymphoid malignancies by polymerase chain reaction gene amplification. Br J Haematol 1990;74:251-6.
13- Medeiros L, Carr J. Overview of the role of molecular methods in the diagnosis of malignant lymphomas. Arch Pathol Lab Med 1999;123:1189-1207.
14- Calvert RJ, Evans PA, Randerson JA, Jack AS, Morgan GJ, Dixon MF. The significance of B-cell clonality in gastric lymphoid infiltrates. J Pathol 1996;180:26-32.
15- Sukpanichnant S, Vnencak-Jones CL, McCurley TL. Determination of B-cell clonality in paraffin-embedded endoscopic biopsy specimens of abnormal lymphocytic infiltrates and gastrointestinal lymphoma by polymerase chain reaction reaction. Am J Clin Pathol 1994;102:299-305.
16- Wan JH, Sykes PJ, Orell SR, Morley AA. Rapid method for detectingmonoclonality in B cell lymphoma in lymph node aspirates using the polymerase chain reaction. J Clin Pathol 1992;45:420-423.
17- Alkan S, Lehman C, Sarago C, Sidawy MK, Karcher DS, Garrett CT.Polymerase chain reaction detection of immunoglobulin gene rearrangement and bcl-2 translocation in archival glass slides of cytologic material. Diagn Mol Pathol 1995;4:25-31.
18- Maes B, Achten R, Demunter A, Peeters B, Verhoef G, De Wolf-Peeters C. Evaluation of B cell lymphoid infiltrates in bone marrow biopsies by morphology, immunohistochemistry, and molecular analysis. J Clin Pathol 2000;53:835-40.
19- Maroto A, Rodri guez J, Martinez MA, Martinez M, Agustin PD. A single primer pair immunoglobulin polymerase chain reaction assay as a useful tool in fine-needle aspiration biopsy differential diagnosis of lymphoid malignancies. Cancer Cytopathology 2003; 99:196-205.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-12]

20- Bouloc A, Delfau-Larue MH, Lenormand B, Meunier F, Wechsler J, Thomine E, *et al*. Polymerase chain reaction analysis of immunoglobulin gene rearrangement in cutaneous lymphoid hyperplasias. Arch dermatol 1999;135:168-72.
21- Theriault C, Galoin S, Valmary S, Selves J, Lamant L, Roda D, *et al*. PCR Analysis of immunglobulin heavy chain (IgH) and TcR-g chain gene rearrangments in the diagnosis of lymphoproliferative disorders: results of a study of 525 cases. Mod Pathol 2000;13:1269-79.
22- Minakshi Nihal, Debra Mikkola, Gary S, Wood. Detection of clonally restrited immunoglobulin heavy chain gene rearrangements in Normal and lesional skin. Journal of Molecular Diagnostics 2000;2:5-10.
23- Sabath DE, Wood BL, Kussick SJ. PCR methods for determining B cell clonality. Journal of Molecular Diagnostics 2000;2:92-6.
24- Hughes J, Weston S, Bennetts B, Prasad M, Angulo R, Jaworskit R, *et al*. The application of a PCR technique for the detection of immunoglobulin heavy chain gene rearrangementin fresh or paraffin embedded skin tissues. Pathology 2001;33:222-225.
25- Betsuyaku T, Munakata M, Yamaguchi E, Ohe S, Hizawa N, Sukoh N, *et al*. Establishing diagnosis of pulmonary malignant lymphoma by gene rearrangement analysis of lymphocytes in bronchoalveolar lavage fluid. Am J Respir Crit Care Med 1994;149:526-9.
26- Philippe B, Delfau-Larue MH, Epardeau B, Autran B, Clauvel JP, Farcet, *et al*. B-cell pulmonary lymphoma: gene rearrangement analysis of bronchoalveolar lymphocytes by polymerase chain reaction. Chest 1999;115:1242-7.
27- Subramanian D, Albrecht S, Gonzalez JM, Cagle PT. Primary pulmonary lymphoma diagnosis by immunoglobulin gene rearrangement study using a novel polymerase chain reaction technique. Am Rev Respir Dis 1993;148: 222-6.
28- Cadranel J, Wislez M, Antoine M. Primary pulmonary lymphoma. Eur Respir J 2002;20:1-13.
29- Cazzadori A, Di Perri G, Todeschini G, Luzzati R, Boschiero L, Perona G, *et al*. Transbronchial biposy in the diagnosis of pulmonary infiltrates in immunocompromised patients. Chest 1995;107:101-6.
30- Staroselsky AN, Schwarz Y, Man A, Marmur S, Greif J. Additional information from percutaneous cutting needle biopsy following fine-needle aspiration in the diagnosis of chest lesions. Chest 1998;113: 1522-5.
31- Li S, Griffin CA, Mann RB, Borowitz MJ. Primary Cutaneous T-cell-rich B-Cell lymphoma: clinically distinct from its nodal counterpart? Mod Pathol 2001;14:10-3.
32- Macon WR, Williams ME, Greer JP, Stein RS, Collins RD, Cousar JB. T-cell-rich B-cell lymphomas: a clinicopathologic study of 19 cases. Am J Surg Pathol 1992;16:351-63.
33- Abramson JS. T-cell/Histiocyte-Rich B-cell lymphoma: biology, diagnosis, and management. Oncologist 2006;11;384-92.
34- McKenna RW, Hernandez JA. Bone marrow in malignant lymphoma. Hematol Oncol Clin North Am 1988;2:617-35.
35- Ben-Ezra JM, King BE, Harris AC, Todd WM, Kornstein MJ. Staining for bcl-2 protein helps to distinguish benign from malignant lymphoid aggtegates in bone marrow biopsies. Mod Pathol 1994; 7:560-4.
36- Ben-Ezra J, Hazelgrove K, Ferreira-Gonzalez A, Garrett CT. Can polymerase chain reaction help distinguish benign from malignant lymphoid aggregates in bone marrow aspirates? Arch Pathol Lab Med 2000;124:511-5.
37- Aiello A, Delia D, Giardini R, Alasio L, Bartoli C, Pierotti MA, *et al*. PCR analysis of IgH and BCL2 gene rearrangement in the diagnosis of follicular lymphoma in lymph node fine-needle aspiration. Diagn Mol Pathol 1997;6:154-60.
38- Wan JH, Sykes PJ, Orell SR, Morley AA. Rapid method for detection of monoclonality in B cell lymphoma in lymph node aspirates using the polymerase chain reaction. J Clin Pathol 1992;54:420-3.
39- Tamaru J, Hummel M, Zemlin M, Kalvelage B, Stein H. Hodgkin's disease with a B-cell phenotype often shows a VDJ rearrangement and somatic mutations in the VH genes. Blood 1994;84:708-15.
40- Deng F, Lu G, Li G, Yang G. Hodgkin's disease: immunoglobulin heavy and light chain gene rearrangements revealed in single Hodgkin/Reed-Sternberg cells. Mol Pathol 1999;52(1):37.
41- Diss TC, Watts M, Pan LX, Burke M, Linch D, Isaacson PG. The polymerase chain reaction in the demonstration of monoclonality in T cell lymphomas. J Clin Pathol 1995;48:1045-50.
42- Higgins JPT, Van de Rijn M, Jones CD, Zehnder JL, Warnke RA. Peripheral T-cell lymphoma complicated by a proliferation of large B cells. Am J Clin Pathol 2000;14:236-47.
43- Liebmann RD, Anderson B, McCarthy KP, Chow JW. The polymerase chain reaction in the diagnosis of early mycosis fungoides. The Journal of Pathology 1999;182(3):282-7.
44- Yamauchi A, Nakatsuka S, Miyanaga I, Hoshida Y, Sakamoto H, Aozasa K, *et al*. Clonality analysis of follicular lymphoma using laser capture microdissection method Int Jour of mole Med; 2002, 10: 649-653.
45- Van Dongen Ma, Langerak AW, Schuuring EM, San MJF, Garzia SR, Parreira A, *et al*. nucleic Acid Amplification Primers for PCR-Based clonality studies. 2005; Univ erasmus http://www.freepatentsonline.com/EP1549764.html.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-12]

فصلنامه پژوهشی خون

Malignant B cell lymphomas vs benign lymphoproliferations and the role of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement analysis

Poopak B.[1](PhD), Latifzadeh Z.[2](MD), Abolghasemi H.[3,4](MD), Yousefian A.[3](MS), Khosravipoor G.[5](MD), Farahani K.[5](BS), Jahangirpour M.[5](BS)

[1] *Department of Hematology, Islamic Azad University- Tehran Medical Branch*
[2] *Blood and Oncology Department, Pars Hospital*
[3] *Iranian Blood Transfusion Organization- Research Center*
[4] *Baghiatallah University of Medical Sciences*
[5] *Payvnand Medical Lab*

Abstract

Background and Objectives

Malignant lymphoma may be very difficult to be diagnosed through routine histopathological methods because they may mimic reactive architecture or contain reactive infiltrates. Detection of the monoclonal lymphocyte population is one of the best methods of diagnosis since a monoclonal proliferation is strongly suggestive of neoplasia. By means of a PCR method it is possible to detect the immunoglobulin heavy chain (IgH) gene rearrangement and consequently the lymphocyte clonality.

Materials and Methods

We evaluated formalin-fixed, paraffin-embedded biopsies, and bone marrow aspiration of 12 cases with non definite or suspicious histopathological diagnosis of non Hodgkin B cell lymphoma. After DNA extraction and quality control, semi-nested PCR was performed using consensus primers for amplification of CDR-3 region. PCR products were analyzed after heteroduplex analysis using polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining.

Results

75% and 16.6% of patients showed clonal and polyclonal patterns respectively. One case showed weak monoclonal band in smear background and remained suspicious after duplicate PCR.

Conclusions

Our findings are comparable with other international studies and support the concept that molecular techniques such as PCR provide a helpful approach in detection of monoclonal immunoglobulin rearrangements in malignant lymphoma. This is especially true for suspicious cases, but always in combination with clinical and histopathological information.

Key words: B-cell Lymphoma, Immunoglobulin Heavy Chain, Gene rearrangement
SJIBTO 2008; 4(4): 285-295

Received: 14 Aug 2007
Accepted: 25 Jan 2008

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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-12]