

الگوی بازآرایی رده متقاطع ژن‌های گیرنده لنفوسیت T از نوع دلتا و گاما در کودکان ایرانی مبتلا به لوسمی لنفوبلاستی حاد از نوع پیش‌سازهای B با استفاده از واکنش زنجیره پلیمرز

دکتر بهزاد پوپک^۱، دکتر علی اکبر پورفتح‌اله^۲، دکتر حسین نجم‌آبادی^۳، دکتر یوسف مرتضوی^۴، دکتر سید حسین یحیوی^۱، دکتر پروانه وثوق^۱، دکتر محمد تقی ارزانیان^۱، دکتر مینا ایزدیار^۱، دکتر غلامرضا باهوش^۱، دکتر الهام شاهقلی^۱، دکتر امیر علی حمیدیه^۱، دکتر محمد فرانش^۱، دکتر گلاره خسروی پور، فریبا حق‌نژاد دوشانلو^۱

چکیده

سابقه و هدف

بازآرایی قطعات ژنی در مسیر تکاملی لنفوسیت‌های B و T، تنوع زیادی در مولکول‌های گیرنده لنفوسیت T (TCR) ایجاد می‌کند. در لوسمی‌های لنفوئید از نوع ALL، B-precursor علی‌رغم انتظار بازآرایی رده متقاطع در ژن‌های TCR ایجاد می‌گردد. هدف از مطالعه حاضر بررسی الگوی بازآرایی ژن‌های TCR (دلتا و گاما) در لوسمی لنفوبلاستی حاد (ALL) کودکان از نوع پیش‌سازهای B توسط واکنش زنجیره پلیمرز می‌باشد.

مواد و روش‌ها

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

یافته‌ها

بازآرایی کلونال TCR- γ شامل V γ I / V γ II و V γ به ترتیب در ۹/۶۴ و ۳/۷۹٪ از بیماران وجود داشت (بای کلونال: ۵٪). بازآرایی V γ II شایع‌ترین نوع (۴۶/۸٪) بود. ۴۷ (۴۵/۲٪) و ۱۱ (۱۶/۶٪) نفر از بیماران به ترتیب دارای بازآرایی V δ 2-D δ 3 (۲۷/۷٪ بای کلونال، ۴/۳٪ الیگو کلونال) و D δ 2-D δ 3 (یک بیمار با الگوی بای کلونال) بودند.

نتیجه‌گیری

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

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

تاریخ دریافت: ۱۴/۳/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۴/۶/۲۲

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

مقدمه

بازآرایی قطعات ژنی مختلف متغیر (V)، تنوع (D)، اتصال (J) و ثابت (C) در مسیر تکاملی لنفوسیت‌های B و T، تنوع زیادی در مولکول‌های زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین (IgH)، زنجیره سبک ایمونوگلوبولین (IgK) و گیرنده لنفوسیت T (TCR) ایجاد می‌کند (۱-۳). اضافه شدن یا حذف نوکلئوتیدها در بین قطعات ژنی بازآرایی شده، تنوع موجود را بیشتر نموده و منجر به تشکیل توالی‌هایی می‌گردد که برای هر سلول یا کلون اختصاصی است. در لوسمی‌های لنفوئیدی نیز بازآرایی مشابه سلول‌های طبیعی در ژن‌های Igk، IgH و TCR ایجاد می‌شود که به عنوان شاخص کلونالیتی محسوب شده و یکی از سه روش مهم ارزیابی حداقل بیماری باقیمانده^۱ همراه با روش‌های فلوسیتومتری و تشخیص نسخه‌های ژن‌های الحاقی می‌باشد (۴-۶).

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

مواد و روش‌ها

در مطالعه آینده نگر حاضر، ۱۸۳ کودک با تشخیص اولیه لوسمی حاد، قبل از شروع درمان مورد بررسی قرار گرفتند. پس از ارزیابی مورفولوژی (L1: ۴۴٪؛ L2: ۴۱٪) و ایمونوفنوتیپ، تنها ۱۴۰ بیمار با تشخیص B-precursor ALL برای مطالعه انتخاب شدند که ۵۳/۳٪ جمعیت را پسران و ۴۶/۷٪ را دختران (۱/۴ : مرد/زن) با میانگین سنی ۶۳/۶ ماه ابتلا (حداقل ۶ ماه و حداکثر ۱۵۶ ماه)، تشکیل می‌دادند. اطلاعات مربوط به تاریخچه پزشکی، علایم بالینی، اولین CBC و ایمونوفنوتیپ بیماران ثبت شد. 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. سلول‌های تک‌هسته‌ای که بلاست‌ها را نیز شامل می‌شدند،

با گرادیان غلظتی (۱/۰۷۷-۱/۰۸۰ g/cm^۲ فایکول) جدا شدند. استخراج DNA سلول‌های تک‌هسته‌ای به دو روش اصلاح شده میکرو (دستی)^۲ و با استفاده از کیت استخراج (High Pure PCR Template) محصول کارخانه رُوش انجام شد. برای اطمینان از کیفیت، اندازه‌گیری غلظت و درجه خلوص DNA استخراج شده (بیوفتومتر اپندرف)، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ به منظور ارزیابی قطعه‌قطعه شدن و انجام آزمایش PCR با پرایمرهای ژن β-گلوبین صورت گرفت. آزمایش PCR به منظور تکثیر منطقه بسیار متغیر ژن Vδ2-Dδ3 (Vδ2-Dδ3) و TCR-δ (V γ I، V γ II، V γ، TCR γ) با استفاده از پرایمرهای مشترک انجام شد (جدول ۱).

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

نام پرایمر	توالی پرایمر
TCR - γ -Ext-F	5-CTgTgACAACAAGTgTTgTTCAC
TCR - γ -Ext-R	5-gTgCTTCTAgCTTTCCTgTCT
TCR - γ -Int-F	5-gAgTACgCTgCCTACAgAgAgg
TCR - γ -Int-R	5-CCACTgCCAAAgAgTTTCTT
TCR - V γ I	5-CAggCCgACTgggTCATCTgC
TCR - V γ II	5-CAgCCgCCTggAATgTgTgg
TCR - J γ 1.3/2.3	5-CCgTATATgCACAAAgCCAAATC
TCR - J γ 1.1/2.3	5-TTACCAGgTgAAgTTACTATgAgC
Vδ2Dδ2-F2	5-ACCAAACAgTgCCTgTgTCAATAgg
Vδ2Dδ2-F1	5-gAgTCATgTCAgCCATgAg
Dδ2Dδ2-F	5 ACT CCA TgT TCA AAT AgA TAT -AgT ATT
Dδ2Dδ2-R2	5-gAAATggCACTTTgCCCCTgCAg

برای تمامی واکنش‌های PCR از dNTP به غلظت ۲۰۰ μM، کلرومینیزیم ۱/۵ mM، Tag DNA poly به میزان یک واحد، پرایمرها به غلظت ۲۰-۱۵ pmol در حجم نهایی ۲۵ و ۵۰ میکرولیتر استفاده شد. میزان DNA بیمار

1- Minimal Residual Disease
2- Manual

منفی آب مقطر استریل، کنترل منفی مخلوط اصلی^۲ و کنترل مخلوط DNA استخراج شده از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی ۸ فرد سالم و نیز با استفاده از پرایمرهای عمومی ژن زنجیره بتاگلوبین به‌عنوان استاندارد داخلی منظور شد. برای افتراق محصولات PCR تک دودمانی از محصولات PCR پلی‌کلونال طبیعی یا واکنشی در ارزیابی بازآرایی ژن‌های گیرنده لنفوسیت T، از آنالیز هترو دوپلکس استفاده شد.

محصولات PCR ابتدا ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و سپس ۶۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد در ترمال سایکلر قرار گرفتند و سپس الکتروفورز بر روی ژل پلی‌آکریل‌امید ۸٪ (۲۰۰ ولت / ۹۰ دقیقه) انجام شد و از رنگ‌آمیزی نقره برای مشاهده باندها استفاده شد. به منظور تایید محصولات تکثیر شده، تعیین توالی بر روی تعدادی از نمونه‌ها پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ و مرحله خالص سازی (کیت مگا پور از کمپانی SEQ آلمان) و با توالی‌های مشابه در بانک ژنی مقایسه شد آنالیز آماری با برنامه نرم افزاری SPSS و آزمون‌های t، Mann Whitney و کای دو انجام شد.

برای واکنش $\mu\text{g } 0.5 - 0.1$ بود. دو بازآرایی $V\delta 2 - D\delta 3$ و $D\delta 2 - D\delta 3$ به تفکیک با پرایمرهای R_2, F_2, F_1 برای بازآرایی اول و پرایمرهای R_2 و F برای بازآرایی دوم طبق جدول ۲ استفاده شد. با توجه به نتایج بهتر $V\delta 2 - D\delta 2$ با پرایمرهای R_2, F_2 بیشتر از این جفت پرایمر استفاده شد. تکثیر ژن بازآرایی شده گیرنده لنفوسیت T از نوع گاما با دو روش متفاوت از هم انجام شد.

در روش اول (PCR)^۱ دو گانه، منطقه بازآرایی شده V از $\gamma - \text{TCR}$ با دو جفت پرایمرهای خارجی ($\gamma - \text{EXT F\&R}$) و پرایمرهای داخلی ($\gamma - \text{Int F\&R}$) تکثیر شد (جدول ۲). محصول واکنش اول را به نسبت ۱ به ۱۵۰۰ رقیق کرده و در واکنش دوم مورد استفاده قرار دادیم.

در روش دوم PCR، بازآرایی‌های ذیل $V \gamma I - J \gamma$ ، $V \gamma II - J \gamma$ ، $V \gamma I - J \gamma$ ، $V \gamma II - J \gamma$ و $V \gamma I - J \gamma$ ، $V \gamma II - J \gamma$ با همان مقادیر ذکر شده برای $\text{TCR-}\delta$ و طبق جدول ۲ تکثیر شد.

برای تمام واکنش‌ها، کنترل مثبت (ارسالی توسط پروفیسور تون و بیمارانی که بازآرایی مثبت داشتند)، کنترل

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

گسترش نهایی	تعداد سیکل	گسترش زنجیره (Extension)	اتصال پرایمرها (Annealing)	دنا توره شدن	دنا توره شدن اولیه
$72^{\circ}\text{C}/10 \text{ Min}$	۳۵	$72^{\circ}\text{C}/2 \text{ min}$	57°C vs. $60^{\circ}\text{C}/45 \text{ sec}$	$94^{\circ}\text{C}/1 \text{ min}$	$94^{\circ}\text{C}/3 \text{ min}$
$72^{\circ}\text{C}/10 \text{ min}$	۳۵	$72^{\circ}\text{C}/2 \text{ min}$	$60^{\circ}\text{C}/90 \text{ sec}$	$92^{\circ}\text{C}/45 \text{ sec}$	$95^{\circ}\text{C}/3 \text{ min}$
$72^{\circ}\text{C}/10 \text{ min}$	۲۰	$72^{\circ}\text{C}/2 \text{ min}$	$60^{\circ}\text{C}/45 \text{ sec}$	$92^{\circ}\text{C}/45 \text{ sec}$	$92^{\circ}\text{C}/1 \text{ min}$
$72^{\circ}\text{C}/10 \text{ min}$	۳۰ ۳۵	$72^{\circ}\text{C}/2 \text{ min}$	$60^{\circ}\text{C}/45 \text{ sec}$	$92^{\circ}\text{C}/45 \text{ sec}$	$95^{\circ}\text{C}/3 \text{ min}$

1- Nested PCR

2- Master mix

یافته‌ها

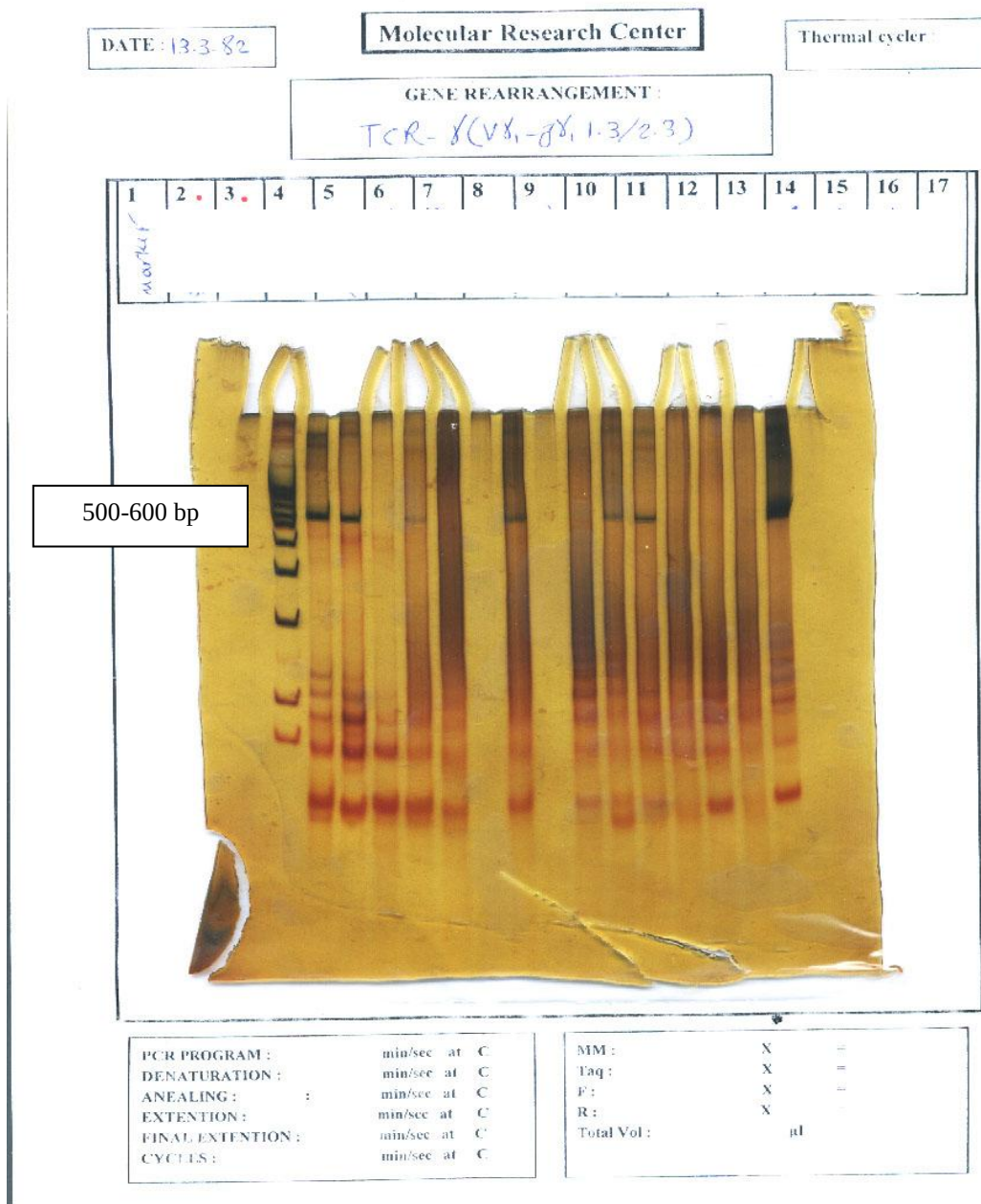
در مطالعه حاضر، ۱۸۳ کودک با تشخیص اولیه لوسمی حاد مورد بررسی قرار گرفتند که پس از ارزیابی سیتومورفولوژی و ایمونوفنوتیپ، ۷ بیمار مبتلا به لوسمی میلوئیدی حاد (AML)، ۹ بیمار مبتلا به T-ALL، یک نفر مبتلا به بیماری هوجکین، یک مورد مبتلا به لنفوم بورکیت و ۱۴۰ مورد مبتلا به لوسمی لنفوبلاستی حاد از نوع پیش‌سازهای B (BP-ALL) بودند. در گروه BP-ALL، ۷۲ نفر (۵۳/۳٪) از کودکان مبتلا مذکر و ۶۳ نفر (۴۶/۷٪) مونث بودند. میانگین سنی کودکان مبتلا $5/3 \pm 3/5$ (۵/۳ ± ۳/۵) با حداقل سن ۶ ماه و حداکثر ۱۳ سال بود. شایع‌ترین شکایات عمده بیماران عبارت بودند از کم‌خونی و علائم مربوط به آن از جمله رنگ پریدگی، ضعف و بی‌حالی، تب و دردهای استخوانی. سابقه فامیلی ابتلا به بیماری‌های بدخیم از جمله لوسمی در ۸/۷٪ از بیماران وجود داشت. علائم بالینی بیماران شامل تب در ۳۱/۹٪، کم‌خونی 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. در اولین CBC، بیماران از نظر شمارش گلبول‌های سفید در چهارگروه نرمال (۲۸/۷۵٪)، لکوپنی (۱۶/۲۵٪)، لکوسیتوز (۴۷/۵٪) و هیپرلکوسیتوز (۷/۵٪) قرار گرفتند. در بررسی

آسپیره‌های مغزاستخوان رنگ آمیزی شده با رنگ رایت، ۴۸ (۴۴٪) و ۴۵ (۴۱٪) نفر از بیماران براساس معیارهای FAB^۱ به ترتیب ALL-L1 و ALL-L2 تشخیص داده شدند. در ۴ بیمار تشخیص L2L1 و در بقیه بیماران طبقه‌بندی براساس FAB ممکن نشد که علت آن، رقیق شدن نمونه‌های مغزاستخوان یا خون محیطی و کم سلول بودن نمونه گزارش شد. با توجه به ارزیابی ایمونوفنوتیپ توسط فلوسیتومتری، ۱۴۰ بیمار جزو ALL از نوع پیش‌سازهای B طبقه‌بندی شدند. سه شاخص شایع در این مجموعه عبارت بودند از CD۱۹ (۷۴٪)، CD۱۰ (۵۷٪) و HLA-DR (۵۳٪).

بازآرایی کلونال ناحیه متغیر (Variable.V) ژن گیرنده نفوسیت T از نوع گاما (TCR-γ)، در ۱۲۶ بیمار BP-ALL ارزیابی شد که به دو صورت بود، در نوع اول موارد مثبت و مثبت به همراه اسمیر خفیف کلونال در نظر گرفته شدند در حالی که در نوع دوم فقط مواردی که باند بدون اسمیر داشتند کلونال تلقی شدند که به تفکیک در ۱۱۴ (۹۰/۴٪) و ۱۰۰ (۷۹/۳٪) نفر از بیماران مشاهده شد. در ۱۰۰ (۹۶٪) بیمار، منوکلونال و در ۵ بیمار (۴٪)، بای کلونال بوده و هیچ مورد اولیگوکلونال مشاهده نشد (شکل ۱). بازآرایی Vγ۱-Jγ۱/۳ ۲/۳ و Vγ۱-Jγ۱/۱ ۲/۱ از ژن TCR-γ مورد ارزیابی قرارگرفت که نتایج آن در جدول ۳ آمده است.

جدول ۳: فراوانی بازآرایی کلونال ژن گیرنده نفوسیت T از نوع γ در ناحیه Vγ۱- در ستون سوم مجموع مواردی که با Jγ۱.3/2.3 یا Jγ۱.1/2.1 مثبت بوده‌اند مخاط شده است و مواردیکه با هر دو مثبت بوده اند حذف گردیده است

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



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

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

در ارزیابی بازآرایی ژن گیرنده لنفوسیت T از نوع دلتا (TCR- δ) که برای دو باز آرای V δ 2-D δ 3 و V δ 2-D δ 3 انجام شد، نتایج در جدول ۵ مشخص شده است (شکل ۴ و ۵). میانگین متغیرهای کمی شامل سن، گلبول سفید، پلاکت، هموگلوبین و شاخص‌های سلولی ایمونوفنوتیپ

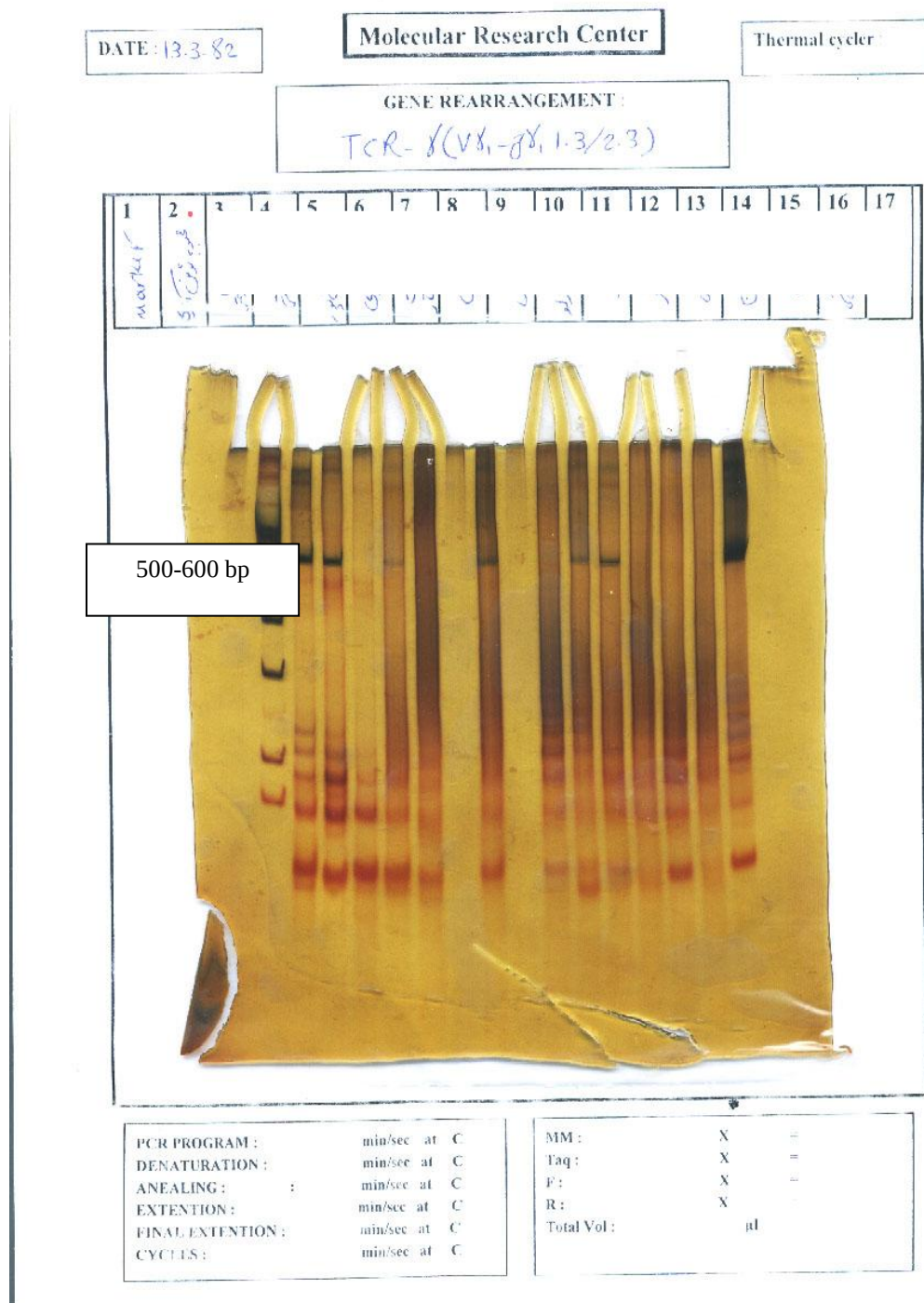
(CD.۲، ۵، ۱۰، ۱۹، ۲۰، ۳۴، ۲۲c، ۲۲s، TdT، HLA-DR) در دو گروه با و بدون بازآرایی کلونال TCT- γ و TCT- δ توسط آزمون t، تفاوت معنی‌داری نداشت. بین متغیرهای کیفی شامل جنس، تب، کم‌خونی، هپاتومگالی، اسپلنومگالی، کاهش وزن، تمایل به خونریزی، عفونت و تورم غدد لنفاوی در دو گروه با و بدون بازآرایی کلونال TCT- γ و TCR- δ و توسط آزمون‌های کای‌دو و دقیق فیشر تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

جدول ۴: فراوانی بازآرایی کلونال در زن گیرنده لنفوسیت T از نوع γ در ناحیه V γ II، در ستون سوم تنها مواردی قید شده است که بازآرایی یکی از دو ناحیه J γ 1.3/2.3 یا J γ 1.1/2.1 را داشته است و مواردی که با هر دو مثبت بوده‌اند لحاظ نگردیده است.

بازآرایی	V γ II-J γ ۱/۳ ۲/۳ n : ۶۴	V γ II-J γ ۱/۱ ۲/۱ n : ۴۱	V γ II-J γ ۱/۳ ۲/۳ n : ۶۴
- کلونال	۲۹(۴۵/۳)	۱۲(۲۹/۲)	۲۰(۳۱/۲)
• منوکلونال	۲۸(۹۶/۵)	۱۱(۹۱/۶)	۲۲(۱۰۰)
• بایکلونال	۱(۳/۵)	۱(۸/۴)	۰

جدول ۵: فراوانی بازآرایی کلونال V δ 2-D δ 3 و D δ 2-D δ 3 از زن TCR- δ در BP-ALL را نشان می‌دهد.

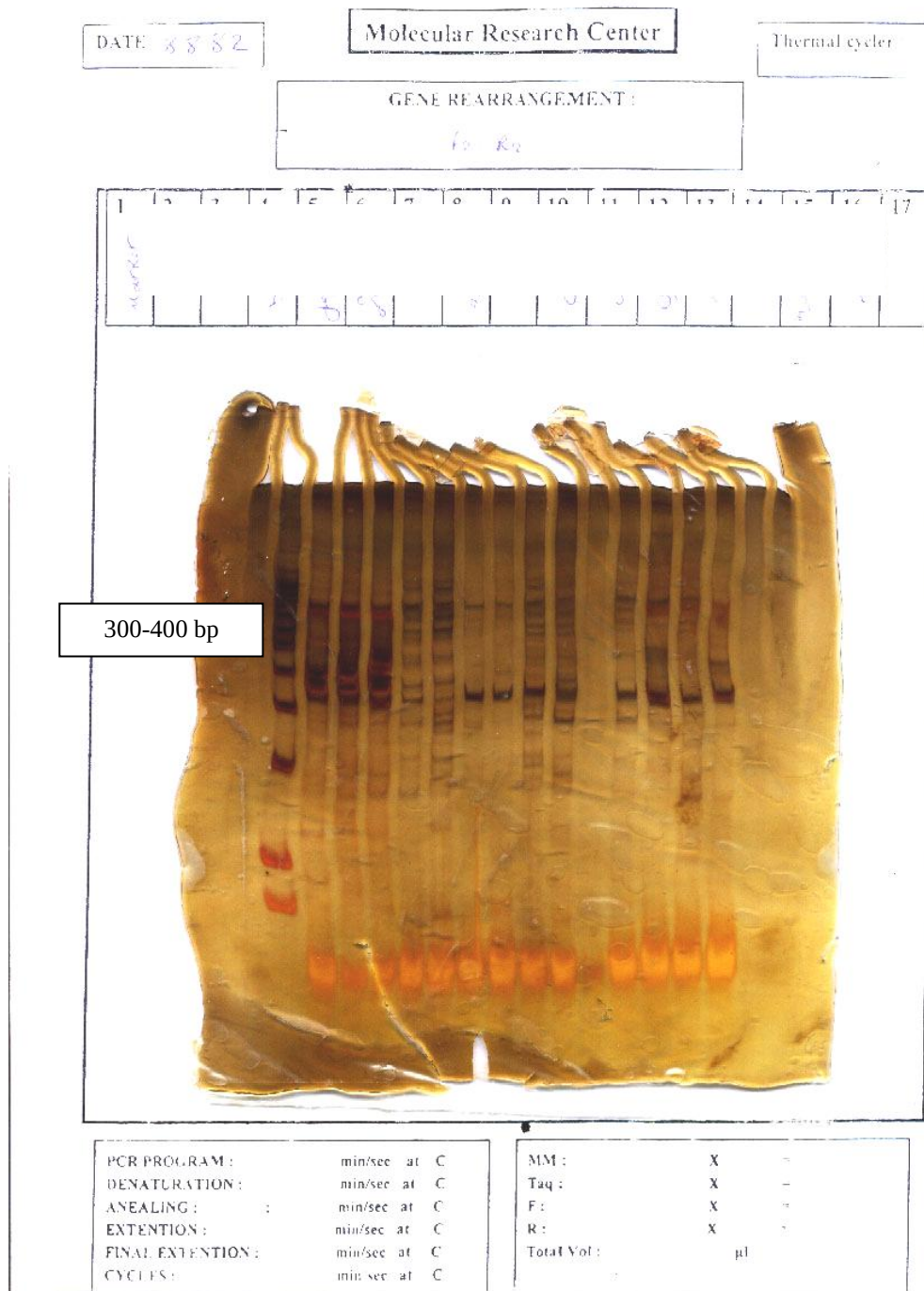
بازآرایی	TCR- δ D δ 2-D δ 3 n : ۶۶	V δ 2-D δ 3 n : ۱۰۴
- کلونال	۱۱(۱۶/۶)	۴۷(۴۵/۲)
• منوکلونال	۱۰(۹۱)	۳۲(۶۸/۱)
• بایکلونال	۱(۹)	۱۳(۲۷/۷)
• اولیگوکلونال	۰	۲ (۴/۳)
• مجموع هر دو بازآرایی	۵۸ (۵۵/۸)	



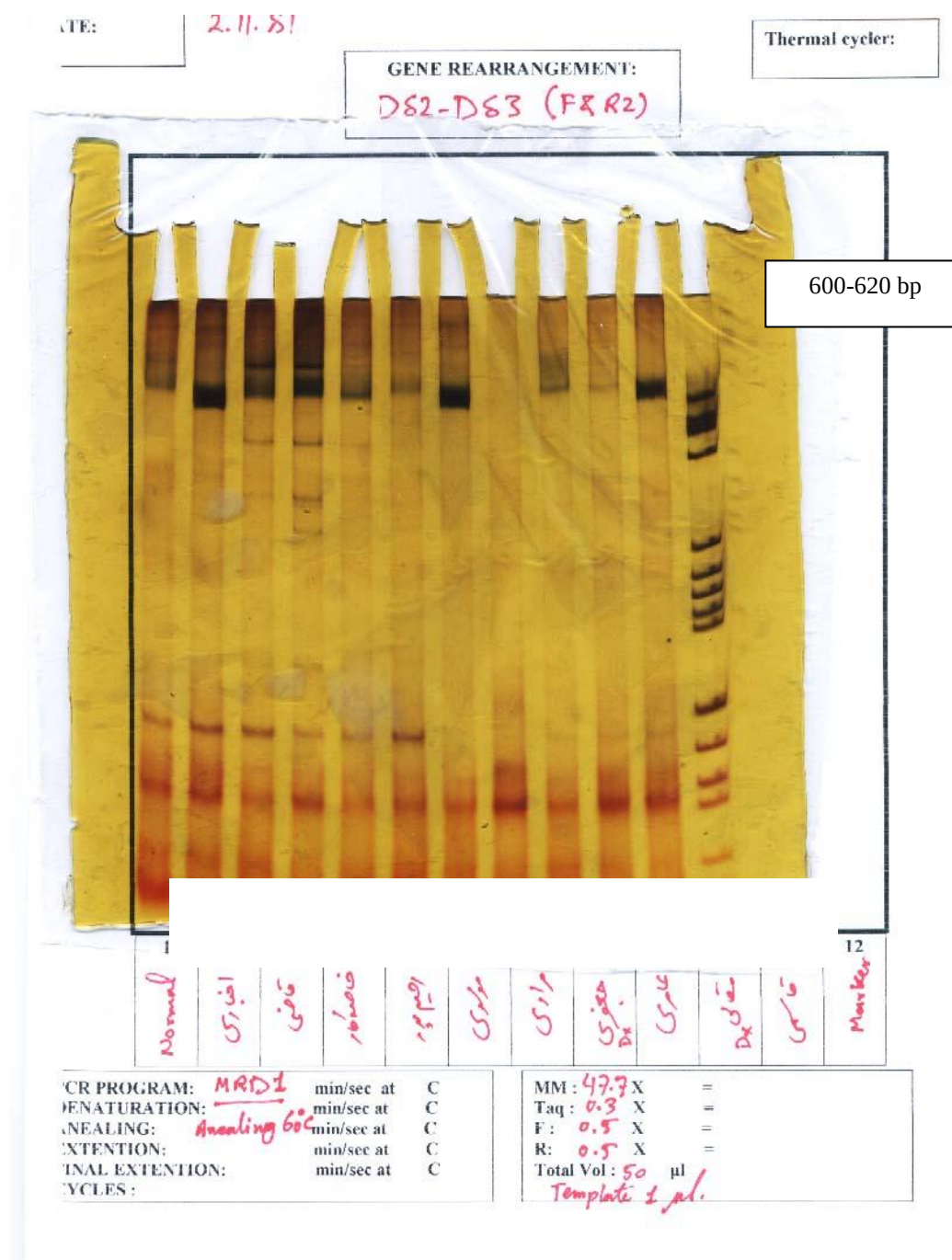
شکل ۲- نتایج بازآرایی ژن گیرنده لنفوسیت T از نوع گاما با پرایمرهای V γ I و J γ 1.3/2.3 را نشان می دهد. لاین ۲ و ۳ بازآرایی منوکلونال را به صورت یک باند در حدود ۵۰۰-۶۰۰bp را نشان می دهد. لاین ۴ تا ۱۶ مربوط به بیماران فاقد بازآرایی مزبور است که به صورت باند خفیف یا اسمیر و یا منفی است.



شکل - ۳ - نتایج بازآرایی ژن گیرنده لنفوسیت T از نوع گاما با پرایمرهای γ II و J γ 1.1/2.1 را نشان می دهد. لاین ۲، ۴، ۷، ۸، ۱۴ و ۱۵ بازآرایی منوکلونال را به صورت یک باند در حدود ۲۰۰-۳۰۰bp را نشان می دهد.



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



شکل ۵- نتایج بازآرایی ژن گیرنده لنفوسیت T از نوع دلتا با پرایمرهای F و R2 را نشان می دهد که برای شناسایی بازآرایی D82-D83 به کار می رود. لاین ۷، ۱۱ و بازآرایی منوکلونال را به صورت یک باند در حدود ۶۵۰-۶۰۰ bp را نشان می دهد. لاین ۱ مربوط به نمونه نرمال با بازآرایی پلی کلونال است که به صورت اسمیر دیده می شود.

بحث

مطالعه حاضر بر روی گروه نسبتاً بزرگی (n: ۱۸۳) از کودکان مبتلا به انواع لوسمی‌های حاد که به سه مرکز هماتولوژی-انکولوژی کودکان در تهران مراجعه نموده بودند، انجام شد. با توجه به مورفولوژی و ایمونوفنوتیپ، ۱۳۵ (۹۳/۷۵٪) بیمار مبتلا به لوسمی لنفوبلاستی حاد از نوع پیش سازهای B (BP-ALL) و ۹ (۶/۲۵٪) بیمار مبتلا به T-ALL بودند. میزان فراوانی BP-ALL در مطالعه حاضر، بیش از گزارش‌های موجود که فراوانی را بین ۷۵٪ تا ۸۹٪ اعلام می‌دارند، می‌باشد (۴-۹). ۷۲ نفر (۵۳/۳٪) از بیماران مذکر و ۶۳ (۴۶/۷٪) نفر مؤنث بودند (۱/۱۴ مرد : ۱ زن) که نشان دهنده افزایش نسبی ابتلا دختران در مقایسه با گزارش‌های دیگر در مورد کلونالیتی و MRD که هیچ انتخابی از نظر جنس صورت نگرفته می‌باشد (۱۳-۱۰، ۴). در گزارشی از انگلستان و ترکیه، Gameiro و همکاران نسبت ابتلا پسران به دختران را ۲/۲۵ و Scrideli و همکاران از برزیل این نسبت را ۲ به یک گزارش کردند که بیش از مقاله موجود است (۴،۷). سریو و همکاران نسبت فوق را ۱/۶ گزارش نمودند (۱۲). میانگین سنی بیماران مبتلا، ۵/۳ سال با حداقل و حداکثر ۶ ماه و ۱۳ سال به تفکیک بود.

تغییرات مورفولوژیک آسپیره‌های مغزاستخوان در بدو تشخیص، همان تغییرات قابل انتظار از جمله افزایش بارز بلاست‌ها، کاهش پیش‌سازی‌های گلبول سفید و پلاکتی بود. ۴۹/۵٪ از بیماران بر اساس معیارهای FAB جزو گروه ALL-L1 و ۴۶/۵٪ جزو گروه ALL-L2 و چهار بیمار جزو L2 L1 طبقه بندی شدند. امروزه مورفولوژی L1 و L2 جز این‌که در کودکان و بزرگسالان به تفکیک شایع‌تر است، مقوله خاصی از بیماری را تعریف نکرده و ارتباطی با ایمونوفنوتیپ و سیتوژنتیک ندارد و در طبقه بندی سازمان بهداشت جهانی (WHO) نیز به کار گرفته نشده و بیشتر ارزش تاریخی دارد (۱۶، ۱۵). در تعیین پیش آگهی نیز جایگاهی را برای این طبقه بندی قائل نیستند. سه شاخص شایع بیماران مورد بررسی عبارت بودند از CD 19 (۷۴٪)،

CD10 (۵۷٪) و HLA-DR (۵۳٪) که با توجه به این‌که گروه اصلی مطالعه BP-ALL بود، منطقی به نظر می‌رسد. بازآرایی کلونال TCR- γ با پرایمرهای مشترک برای ناحیه متغیر (V γ) و نیز پرایمرهای گروه V γ I و V γ II که اختصاصی‌تر هستند، توسط روش PCR دوگانه و روش PCR معمولی ارزیابی شد که به ترتیب ۷۹/۳٪ و ۶۴/۹٪ از بیماران به تفکیک بازآرایی کلونال را داشتند. بازآرایی کلونال TCR- γ در مطالعات مختلف، ۳۹٪ تا ۷۹٪ در BP-ALL گزارش شده است (۱۹-۱۷، ۴، ۳). علت اختلاف میزان بازآرایی در استفاده از دو گروه پرایمر، می‌تواند مربوط به ماهیت آزمایش PCR انجام شده (PCR دوگانه در مقابل PCR معمولی) و نیز عدم استفاده از پرایمرهای گروه V γ III و V γ IV از سری پرایمرهای اختصاصی‌تر باشد. میزان بازآرایی TCR- γ در مطالعه حاضر نسبت به برخی از گزارش‌های قبلی که ۳۳٪ تا ۶۰٪ را ذکر نموده اند بیشتر است (۲۰، ۲۳-۶). شایع‌ترین بازآرایی این نوع نیز در ناحیه متغیر مربوط به گروه V γ I در ALL‌های نوع B و T است که در ۷۰٪ از آل‌های بازآرایی شده گزارش شده است در حالی‌که در مطالعه حاضر در ۲۹/۴٪ از بیماران و ۴۳/۷۵٪ از آل‌های بازآرایی شده دیده شده که نسبت به گزارش‌های قبلی کمتر است (۷). نکته جالب دیگر بیشتر بودن بازآرایی گروه V γ II است که در ۴۶/۸٪ از بیماران و ۵۶/۲۵٪ از آل‌ها وجود داشت، در حالی‌که بازآرایی V γ II تنها برای ۲۰٪ از موارد BP-ALL گزارش شده است.

در مطالعه‌ای که توسط تون و همکاران انجام شده، بازآرایی ناحیه V γ II را در ۴۸٪ از آل‌ها گزارش کرده‌اند که در مطالعه ما حتی از این مقدار هم بیشتر است. شایع‌ترین قطعه بازآرایی شده در TCR- γ از طرف مقابل مربوط به ۲/۳ J γ ۱/۳ می‌باشد که در ۶۵ تا ۸۰ موارد BP-ALL با بازآرایی TCR- γ گزارش شده است (۲۴-۲۱). در مطالعه حاضر نیز بیش از ۷۹٪ از آل‌های بازآرایی شده دارای این قطعه از ژن بودند. استفاده از روش‌های مختلف (ساترن بلات، PCR، پرایمرهای مشترک، PCR همراه با همو/هترودوپلکس، تعیین توالی DNA) ممکن است قدری از این اختلاف را توجیه نماید اما تفاوت جوامع از نظر نژاد، وضعیت اقتصادی - اجتماعی، ازدواج با نژادهای دیگر

با قدرت تفکیک بالا (پلی آکرپلامید ۸٪) و رنگ آمیزی نقره، براساس تعداد باندها بازآرایی‌ها را در سه گروه منوکلونال، بای کلونال و اولیگوکلونال طبقه‌بندی کردیم. در موارد دیگر یا هیچ باندی مشاهده نمی‌شد یا نتیجه به صورت اسمیر یا نردبان در می‌آمد که دال بر نتیجه منفی یا تکثیر پلی کلونال بود. در مورد TCR- γ با بررسی ناحیه متغیر (V)، تنها ۴٪ از بیماران الگوی بای کلونال داشته و هیچ مورد اولیگوکلونال مشاهده نشد. در بررسی با پرایمرهای گروه V γ I و V γ II به ترتیب بای کلونالیتی در ۱۸/۲٪ و یک بیمار مشاهده شد. بازآرایی دو آلی در ۳۵٪ از موارد BP-ALL گزارش شده است اما بیش از دو بازآرایی TCR- γ ، تنها در ۳٪ موارد ثبت شده است که همگی نیز جزو گروه BP-ALL بوده‌اند (۷).

علت شیوع کمتر بای/اولیگوکلونالیتی در TCR- γ ، فعالیت کمتر سیستم بازآرایی نسبی است که در بازآرایی Ig و TCR مسؤول بازآرایی رده متقاطع می‌باشد و علت دیگر در دسترس نبودن لکوس TCR در پیش سازهای خیلی نارس لنفونیدی است (۳۰، ۶).

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

در مطالعه حاضر، ۲۷/۷٪ از موارد بازآرایی V δ 2D δ 3 دارای الگوی بای کلونال و ۴/۳٪ الگوی اولیگوکلونال داشتند. در مورد D δ 2D δ 3 تنها در یک بیمار (۹٪) بازآرایی بای کلونال مشاهده شد. زورستاد و پانزرگرومیر بازآرایی بای و اولیگوکلونال را به ترتیب در ۲۵٪ و ۳۰٪ از کودکان مبتلا به BP-ALL گزارش نمودند (۳۷، ۲۷).

طبق نظر گرومیر و همکاران بازآرایی‌های چندگانه

و شاید به‌خاطر بیشتر یا طولانی‌تر شدن تحریک سیستم ایمنی به‌علت برخورد با آنتی‌ژن‌های متنوع ویروسی و باکتریایی در کشورهای در حال توسعه مثل ایران در مقایسه با کشورهای توسعه یافته باشد. در گزارشی از برزیل توسط تون و همکاران، موارد مشابه ایران گزارش شده است (۷). در دو مطالعه که در هند توسط سازاوال و نیرمالا انجام شده، شیوع بازآرایی TCR- γ از کشورهای توسعه یافته متفاوت بوده است به‌طوری که تنها در ۲۲٪ از موارد BP-ALL این نوع بازآرایی گزارش شده است (۲۶-۲۵). البته در یکی از این مطالعات نوع بازآرایی بررسی شده متفاوت با مطالعات دیگر است و بیشتر حذف ناحیه C γ 1 از ژن TCR- γ را بررسی کرده است که می‌تواند توجیهی بر این اختلاف باشد (۲۵).

با توجه به گزارش‌های قبلی که شایع‌ترین بازآرایی TCR- δ را V δ 2D δ 3 و D δ 2D δ 3 اعلام کرده‌اند، ما نیز در بررسی بیماران ایرانی الگوی بازآرایی این دونوع را ارزیابی کردیم. بازآرایی کلونال V δ 2D δ 3 در ۴۵/۲٪ و D δ 2D δ 3 در ۱۶/۶٪ از ۱۰۴ بیماری که ارزیابی شدند وجود داشت و در کل بازآرایی TCR- δ ، ۵۵/۸٪ تعیین شد. این بازآرایی‌ها منجر به تولید ژن بازآرایی شده ناقص بدون محصول شده و هیچ عملکردی نخواهند داشت (۲۷). در بررسی‌های مختلف، میزان بازآرایی TCR- δ ، ۲۸٪ تا ۶۷٪ گزارش شده است که اختلاف بارزی با نتایج ما ندارد (۲۹-۳). در ضمن بازآرایی V δ 2D δ 3 در شرایط طبیعی دیده نشده و منحصرأ در BP-ALL گزارش شده است که این پدیده آن را به‌عنوان یکی از شاخص‌های ارزشمند ارزیابی کلونالیتی و MRD مطرح می‌سازد (۲۱).

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

1- Recombination Signal Sequence : RSS
2- DJ Recombinant

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

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

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

بین وجود یا عدم وجود متغیرهای کیفی مثل جنس، تب، کم‌خونی، هیپاتومگالی، اسپلنومگالی، تمایل به خونریزی، عفونت و تورم غدد لنفاوی نیز در دو گروه با و بدون بازآرایی اختلاف معنی داری وجود نداشت. تنها یک گزارش از هند توسط بهارگاو و همکاران وجود دارد که بازآرایی TCR- δ را در پسرهای بیش از دخترها گزارش کرده‌است (۷۴٪ در مقابل ۴۰٪، $P=0/008$). در همین بررسی در هند نسبت پسر به دختر مبتلا به BP-ALL ۳/۵ (۲۸: ۹۲ زن، مرد) بوده است که بیش از موارد گزارش شده از کشورهای دیگر است (۲۵). در مطالعه ما نیز نسبت پسر به دختر حدود ۱/۱۴ می‌باشد و چون نسبت هر دو جنس در ابتلا تقریباً نزدیک است، بین وجود و عدم وجود بازآرایی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. با توجه به نتایج حاصل که شباهت‌ها و اختلافاتی با جوامع دیگر دارد می‌توان از آن‌ها در تشخیص کلونالیتی و به دنبال آن در ارزیابی MRD در کودکان ایرانی استفاده کرد (در حال انجام).

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مقاله از استادارجمند جناب آقای دکتر سیدحسین یحیوی ریاست واحد پزشکی تهران که امکانات لازم جهت انجام پژوهش را فراهم نمودند کمال تشکر را دارند. از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه به‌خاطر همکاری مستمر و از خانم‌ها: فراهانی، بیاری و خانی تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آورند.

References :

- 1- Hoffbrand AV, Lewis SM, Tuddenham EDG. Postgraduate Hematology. 4th ed, Butterworth – Heinemann; 1999: 354-373.
- 2- Provan D, Gribben J. Molecular Hematology Blackwell Science. 2000: 42-59.
- 3- Hodges E, Krishna MT, Pickard C, *et al.* Diagnostic role of tests for T cell receptor (TCR) genes. J Clin Pathol 2003; 56(1):1-10
- 4- Gameiro P, Moreira I, Yetgin S, *et al.* Polymerase chain reaction (PCR) and reverse transcription PCR-based minimal residual disease detection in long-term follow-up of childhood acute lymphoblastic leukemia, Br J Haematol 2002;119:685-696.
- 5- Pongers-Willems MJ, Seriu T, Stolz F. Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets. Leukemia 1999;13:110-118.
- 6- Szczepanski T, Beishuizen A, Pongers-Willems MJ, *et al.* Cross-lineage T cell receptor gene rearrangements in more than ninety percent of childhood precursor-B acute lymphoblastic leukemias: alternative PCR targets for detection of minimal residual disease. Leukemia 1999;13: 196-205.
- 7- Scrideli CA, Queiróz Rosane GP, Kashima S, *et al.* T cell receptor gamma (TCRG) gene rearrangements in Brazilian children with acute lymphoblastic leukemia: analysis and implications for the study of minimal residual disease, Leuk Res 2004; 28: 267-273.
- 8- Brisco MJ, Sykes PJ, Hughes E, *et al.* Comparison of methods for assessment of minimal residual disease in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 2001;15:385-390.
- 9- Neale GAM, Smith EC, Pan Q, *et al.* Tandem application of flowcytometry and polymerase chain reaction for comprehensive detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 1999; 13:1221-1226.
- 10- Silverman LB, Sallan ES. Newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors and treatment. Current Opin Haematol 2003;10:290-296.
- 11- Green E, McConville CM, Powell JE, *et al.* Clonal diversity of Ig and T-cell receptor rearrangements identifies a subset of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia with increased risk of relapse. Blood 1998;92(3):952-958.
- 12- Seriu T, Yokota M, Nakao M, *et al.* Prospective monitoring of minimal residual disease during the course of chemotherapy in patients with acute lymphoblastic leukemia, and detection of contaminating tumor cells in peripheral blood stem cells for auto transplantation. Leukemia 1995; 9: 615-623.
- 13- Scrideli CA, Defavery R, Tone LG, *et al.* Prognostic significance of bi/oligoclonality in childhood acute lymphoblastic leukemia as determined by polymerase chain reaction. Sao Paulo Med J/Rev Paul Med 2001;119 (5):175-180.
- 14- Cave H, Werff Ten Bosch JVD, Suciu S, *et al.* Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 1998;339(9):591-598.
- 15- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, *et al.* The world health organization Classification of hematological malignancies, report of the clinical advisory Committee meeting, Mod Pathol 2000; 13(2): 193-207.
- 16- Szczepanski T, Velden VHJ, Dongen JJM. Classification systems for acute and chronic leukemias. Best Pract Res Clin Haematol 2003; 16(4): 561 - 582.
- 17- Szczepanski T, Flohr T, Van der Velden VHJ, *et al.* Molecular monitoring of residual disease using antigen receptor genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. Best Pract Res Clin Haematol 2002; 15(1): 37-57.
- 18- Szczepanski T, Willems MJ, Brinkhof B. Comparative analysis of Ig and TCR gene rearrangements at diagnosis and at relapse of childhood precursor-B-ALL provides improved strategies for selection of stable PCR targets for monitoring of minimal residual disease. Blood 2002;99(7):2315-2323.
- 19- Scrideli CA, Kashima S, Tone LG, *et al.* Minimal residual disease in Brazilian children with acute lymphoblastic leukemia: comparison of three detection methods by PCR. Leuk Res 2002; 26: 431-438.
- 20- Beishuizen A, Verhoeven MA, Van Wering ER, *et al.* Analysis of Ig and T-cell receptor genes in 40 childhood acute lymphoblastic leukemias at diagnosis & subsequent relapse: implications for the detection of minimal residual disease by polymerase chain reaction analysis. Blood 1994; 83:2238-2247.
- 21- Brumpt C, Delabess E, Beldjord K, *et al.* The incidence of clonal T-cell receptor rearrangements in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia varies with age and genotype. Blood 2000; 9(6):2254-2261
- 22- Chen Z, Font MP, Loiseau P, *et al.* The human T-cell V-gene locus: cloning of new segments and study of V-rearrangements in neoplastic T and B cells. Blood 1998;72:776-83.
- 23- Cavè H, Guidal C, Rohrlach P, *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;83:1892-1902.
- 24- Van der Velden VH, Wijkhuijs JM, Jacobs DC, *et al.* T cell receptor gamma gene rearrangements as targets for detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia by real-time quantitative PCR analysis. Leukemia 2002; 16: 1372-80.
- 25- Sazawal S, Bhatia K, Gurbuxani S, *et al.* Pattern of immunoglobulin (Ig) and T-cell receptor (TCR) gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia in India. Leuk Res 2000;24:575-582
- 26- Nirmala K, Rajalekshmy KR, Raman SG, *et al.* PCR-heteroduplex analysis of TCR gamma, delta and

- TAL-1 deletions in T-acute lymphoblastic leukemias: implications in the detection of minimal residual disease. *Leuk Res* 2002; 26: 335-43.
- 27- Zur Stadt U , Eckert C , Rischewski J, *et al.* Identification and characterization of clonal incomplete T-cell receptor Vd2-Dd3/Dd2-Dd3 rearrangements by denaturing high-performance liquid chromatography and subsequent fragment collection: implications for minimal residual disease monitoring in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Chromatogr* 2003; 792: 287-298.
- 28- Campana D. Determination of minimal residual disease in leukemia patients. *Br J Haematol* 2003; 121: 823-838.
- 29- Li AH, Rosenquist R, Forestier E, *et al.* Detailed clonality analysis of relapsing precursor B acute lymphoblastic leukemia: implications for minimal residual disease Detection. *Leuk Res* 2001; 25: 1033-1045.
- 30- Van Dongen JJM, Wolvers-Tettero ILM. Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part I. Basic and technical aspects. *Clin Chem Acta* 1991;198:1-92.
- 31- Sykes PJ, Snell LE, Brisco MJ, *et al.* The use of monoclonal gene rearrangement for detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Leukemia* 1997;11:153-158.
- 32- Januszkiewicz DA, Nowak JS. Detection of clonality by polymerase chain reaction in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Ann Hematol* 1994; 69:107-110.
- 33- Szczepanski T, Langerak AW, van Dongen JJM. T-cell receptor gamma (TCRG) gene rearrangements in T-cell acute lymphoblastic leukemia reflect 'end-stage' recombinations: implications for minimal residual disease monitoring. *Leukemia* 2000; 14: 1208-1214.
- 34- Jacquy C, Delepaut B, Brichard B, *et al.* A prospective study of minimal residual disease in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia: MRD level at the end of induction is a strong predictive factor of relapse. *Br J Haematol* 1997; 98: 140-146.
- 35- Roberts WM, Estrov Z, Zipf TL, *et al.* Measurements of residual leukemia during remission in childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1997; 336: 317-323.
- 36- Scrideli CA, Kashima S, Tone LG, *et al.* Clonal evolution as the limiting factor in the detection of minimal residual disease by polymerase chain reaction in children in Brazil with acute lymphoid leukemia. *J Pediatr Hematol/Oncol* 2002;24: 364-7.
- 37- Kressler E, Panzar S, Panzar Grumayer ER, *et al.* Heterogenous TCR delta Vδ2-Dδ3 rearrangements and their relation to IgH and TCR gamma status in childhood B cell precursor Leukemias. *Leuk Res* 1999; 23: 1089-1096.

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

Poopak B.², Poorfatollah A.², Najmabadi H.³, Mortazavi Y.⁴, Yahyavi S.H.¹,
Vosough P.⁵, Arzanian MT⁶, Izadyar M.⁷, Shahgholi E.⁵, Bahoosh GR.⁵, Hamidieh AA⁶,
Faranoosh M⁵, Khosravipour G.⁹, Haghnejad F.¹

¹Iranian Blood Transfusion Organization-Research Center

²Bushehr Regional Blood Transfusion Center

³Paramedic College, Bushehr Medical Sciences University

Abstract

Background and Objectives

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

Materials and Methods

In our prospective study, bone marrow aspirates of 183 children including B-precursor ALLs and with diagnosis of acute leukemia were collected at admission before any chemotherapy. After reviewing cytomorphology and immunophenotyping, only 140 cases with diagnosis of B-precursor ALLs were selected for study. Sixteen were excluded from our study due to various reasons including cellular degeneration. Mononuclear cells including leukemic blasts isolated by density gradient. After DNA extraction, hyper-variable regions TCR- δ (V δ 2-D δ 3 and D δ 2-D δ 3) and TCR- γ (V γ I and V γ II) were amplified by consensus primers using PCR. PCR products were analyzed after heteroduplex analysis and polyacrylamide gel electrophoresis (silver stain). The DNA sequences were compared and aligned to the sequences homologous for V γ I, V γ II and V γ of TCR γ , V δ 2-D δ 3 and D δ 2-D δ 3 of TCR- δ published by Gene Bank.

Results

Clonal rearrangement of TCR- γ (V γ) and V γ I/II were present in 79.3% and 64.9% of patients respectively and only 5% of cases showed biclonal pattern. The V γ II rearrangement was the most common (46.8%) type in TCR- γ . 47 (45.2%) and 11 (16.6%) of patients had V δ 2- D δ 3 and D δ 2-D δ 3 partial gene rearrangements, respectively. Biclinal/oligoclonal patterns were present respectively in 27.7% and 4.3% of cases with V δ 2-D δ 3 rearrangement. Only one patient had biclonal D δ 2 D δ 3 rearrangement.

Conclusions

Clonal rearrangement of TCR- δ (V δ 2-D δ 3 and D δ 2-D δ 3) genes had similar pattern to other populations. Frequency of TCR- γ (V γ I and V γ II) rearrangements were slightly higher than previous reports and in contrast to others except Brazilian report the V γ II rearrangement was the most common type. We found no significant correlation between presence of different types of rearrangements and quantitative variables and the only significant point was the

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

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

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