خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۲ شماره ۶ پاییز ۸۴

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 پلیمراز

دکتر بهزاد پوپک[۱]، دکتر علی اکبر پورفتح اله[۲]، دکتر حسین نجم آبادی[۳]، دکتر یوسف مرتضوی[۴]، دکتر سید حسین یحیوی[۱]، دکتر پروانه وثوق[۶]،دکتر محمد تقی ارزانیان[۷]، دکتر مینا ایزدیار[۸]، دکتر غلامرضا باهوش[۶]، دکتر الهام شاهقلی[۶]،دکتر امیر علی حمیدیه[۷]، دکتر محمد فرانوش[۶]،دکتر گلاره خسروی پور، فریبا حق نژاد دوشانلو[۱۴]

چکیده

سابقه و هدف

بازآرایی قطعات ژنی درمسیرتکاملی لنفوسیت‌های B وT، تنوع زیادی درمولکول‌های گیرنده لنفوسیتT(TCR) ایجاد می‌کند. درلوسمی‌های لنفوئید ازنوع ALL، B-precursor علی‌رغم انتظار بازآرایی رده متقاطع در ژن‌های TCR ایجاد می‌گردد. هدف از مطالعه حاضر بررسی الگوی بازآرایی ژن‌های TCR (دلتاوگاما) در لوسمی لنفوبلاستی حاد (ALL) کودکان از نوع پیش سازهای B توسط واکنش زنجیره پلیمراز می‌باشد.

مواد و روش‌ها

درمطالعه آینده‌نگرحاضر، ۱۸۳ کودک باتشخیص اولیه لوسمی‌حاد، قبل ازشروع درمان موردبررسی قرارگرفتند. 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 (Dδ2-Dδ3, Vδ2-Dδ3) و TCR-γ (Vγ I، Vγ II، Vγ) با استفاده از پرایمرهای مشترک انجام شد. محصولات PCR پس از تجزیه هترودوپلکس والکتروفورز برروی ژل پلی‌آکریل‌امید و رنگ‌آمیزی نقره مورد بررسی قرار گرفته وپس از تعیین توالی جهت تأیید با توالی‌های مشابه در بانک ژنی مقایسه شد. آنالیز آماری با نرم‌افزار SPSS و آزمون t، Mann whitney و کای‌دو (Chi-square) انجام شد.

یافته‌ها

بازآرایی کلونال TCR-γ شامل Vγ I / Vγ II و Vγبه ترتیب در۹/ ۶۴٪ و۳/ ۷۹٪ از بیماران وجود داشت (بای کلونال : ۵٪). بازآرایی Vγ II شایع‌ترین نوع (۴۶/۸٪) بود. ۴۷ (۴۵/۲٪) و ۱۱ (۶/ ۱۶٪) نفر از بیماران به ترتیب دارای بازآرایی Vδ2-Dδ3 (۲۷/۷٪ بای‌کلونال، ۴/۳٪ الیگوکلونال) و Dδ2-Dδ3 (یک بیمار با الگوی بای‌کلونال) بودند.

نتیجه گیری

الگوی کلونال ژن IgH و TCR-δ (Dδ2-Dδ3 ,Vδ2-Dδ3) مشابه جوامع دیگر بود.فراوانی بازآرایی TCR-γ (Vγ II و Vγ I) قدری بیش از گزارش‌های قبلی بوده و بر خلاف بقیه گزارش‌ها به استثناء گزارشی از برزیل، Vγ II شایع‌ترین بازآرایی را داشت.هیچ ارتباط معنی داری بین انواع مختلف بازآرایی و متغیرهای کمی وجود نداشت و تنها نکته جالب، کاهش بروز Vδ2-Dδ3 با افزایش سن (بیشتراز 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 : ۸۴/۳/۱۶
تاریخ پذیرش : ۸۴/۶/۲۲

۱- مؤلف مسؤول: 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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

مقدمه

بازآرایی قطعات ژنی مختلف متغیر(V)،تنوع (D)،اتصال (J) وثابت (C) در مسیرتکاملی لنفوسیت‌های B و T، تنوع زیادی درمولکول‌های زنجیره‌سنگین‌ایمونوگلوبولین (IgH)، زنجیره سبک ایمونوگلوبولین (Igκ) وگیرنده لنفوسیت T (TCR) ایجاد می‌کند (۳-۱). اضافه شدن یا حذف نوکلئوئیدها در بین قطعات ژنی بازآرایی شده، تنوع موجود را بیشتر نموده و منجر به تشکیل توالی‌هایی می‌گردد که برای هر سلول یا کلون اختصاصی است. در لوسمی‌های لنفوئیدی نیز بازآرایی مشابه سلول‌های طبیعی در ژن‌های IgH، Igκ و TCR ایجاد می‌شود که به‌عنوان شاخص کلونالیتی محسوب شده و یکی از سه روش مهم ارزیابی حداقل بیماری باقیمانده[1] همراه با روش‌های فلوسیتومتری و تشخیص نسخه‌های ژن‌های الحاقی می‌باشد (۶-۴).

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 پلیمراز (PCR) برای اولین بار در کودکان ایرانی است.

مواد و روش‌ها

درمطالعه آینده نگرحاضر، ۱۸۳ کودک با تشخیص اولیه لوسمی حاد، قبل از شروع درمان مورد بررسی قرار گرفتند. پس از ارزیابی مورفولوژی (۴۱٪ :L2 ;۴۴٪ :L1) و ایمونوفنوتیپ، تنها ۱۴۰ بیمار با تشخیص B-precursor ALL برای مطالعه انتخاب شدند که ۵۳/۳٪ جمعیت را پسران و۴۶/۷٪ را دختران (۱/۱۴ : $\frac{\text{مرد}}{\text{زن}}$) با میانگین سنی ۶۳/۶ ماه ابتلا (حداقل ۶ ماه و حداکثر ۱۵۶ ماه)، تشکیل می‌دادند. اطلاعات مربوط به تاریخچه پزشکی، علایم بالینی، اولینCBC و ایمونوفنوتیپ بیماران ثبت شد. ۱۶ مورد به‌دلایل مختلف ازجمله دژنره‌شدن سلول‌ها، ارسال نمونه پس ازاولین دوره درمان، همولیز شدید، کهنه بودن نمونه و آلودگی باکتریایی از پژوهش حذف شدند. سلول‌های تک‌هسته‌ای که بلاست‌ها را نیز شامل می‌شدند، با گرادیان غلظتی ($1/077-1/080 g/cm^2$ فایکول) جدا شدند. استخراج DNA سلول‌های تک هسته‌ای به دو روش اصلاح شده میکرو (دستی)[2] و با استفاده از کیت استخراج (High Pure PCR Template) محصول کارخانه رُوش انجام شد. برای اطمینان ازکیفیت، اندازه‌گیری غلظت و درجه خلوص DNA استخراج شده (بیوفتومتر اپندرف)، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ به منظور ارزیابی قطعه‌قطعه شدن وانجام آزمایش PCR با پرایمرهای ژن β-گلوبین صورت گرفت. آزمایش PCR به‌منظور تکثیر منطقه بسیار متغیر ژن TCR-δ (Dδ2-Dδ3 Vδ2-Dδ3) و TCR γ (V γ I، V γ II، V γ) با استفاده از پرایمرهای مشترک انجام شد (جدول ۱).

جدول۱ : پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های بازآرایی شده TCR از نوع گاما و دلتا

نام پرایمر	توالی پرایمر
TCR – γ -Ext-F	5- CTgTgACAACAAgTgTTgTTCCAC
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- CAgCCCgCCTggAATgTgTgg
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-gAAATggCACTTTTgCCCCTgCAg

برای تمامی واکنش‌های PCR از dNTP به غلظت ۲۰۰µM، کلرورمنیزیم ۱/۵ mM، Tag DNA poly به میزان یک واحد، پرایمرها به غلظت ۲۰- ۱۵ pmol در حجم نهایی ۲۵و۵۰ میکرولیتر استفاده شد. میزان DNA بیمار

1- Minimal Residual Disease
2- Manual

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

برای واکنش µg ۰/۵ – ۰/۱ بود. دو بازآرایی Vδ2 – Dδ3 و Dδ2 – Dδ3 به تفکیک با پرایمرهای R_2, F_2, F_1 برای بازآرایی اول و پرایمرهای F و R_2 برای بازآرایی دوم طبق جدول۲ استفاده شد. با توجه به نتایج بهتر Vδ2-Dδ2 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)[1] دوگانه، منطقه بازآرایی شدهV از TCR- γ با دو جفت پرایمرهای خارجی (γ-EXT F&R) و پرایمرهای داخلی (γ-Int F&R) تکثیر شد (جدول۲). محصول واکنش اول را به نسبت ۱به ۱۵۰۰رقیق کرده ودر واکنش دوم مورد استفاده قرار دادیم.

در روش دوم PCR، بازآرایی‌های ذیل V γ I - J γ ۱/۳/۲/۱، ۲/۱ ۱/۱ V γ I - J γ، ۲/۳ ۱/۳ V γ II- J γ و ۲/۱ ۱/۱ V γ II- J γ با همان مقادیر ذکر شده برای TCR-δ و طبق جدول ۲ تکثیر شد.

برای تمام واکنش‌ها، کنترل مثبت (ارسالی توسط پروفسور تون و بیمارانی که بازآرایی مثبت داشتند)، کنترل منفی آب مقطر استریل، کنترل منفی مخلوط اصلی[2] وکنترل مخلوطDNA استخراج شده ازسلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی ۸ فرد سالم و نیز با استفاده از پرایمرهای عمومی ژن زنجیره بتاگلوبین به‌عنوان استاندارد داخلی منظور شد.

برای افتراق محصولاتPCR تک دودمانی‌از محصولات PCR پلی‌کلونال طبیعی یا واکنشی در ارزیابی بازآرایی ژن‌های گیرنده لنفوسیتT، ازآنالیز هترودوپلکس 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 برروی ژل پلی آکریل‌امید ۸٪ (۲۰۰ ولت / ۹۰ دقیقه) انجام شد و از رنگ‌آمیزی نقره برای مشاهده باندها استفاده شد. به منظور تایید محصولات تکثیر شده، تعیین توالی بر روی تعدادی از نمونه‌ها پس از 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 کای‌دو انجام شد.

جدول۲ : برنامه واکنش زنجیره پلیمراز به منظور تکثیر ژن گیرنده لنفوسیت T از نوع دلتا و گاما

		دناتوره شدن اولیه	دناتوره شدن	اتصال پرایمرها (Anealing)	گسترش زنجیره (Extension)	تعداد سیکل	گسترش نهایی
TCR-δ Vδ2-Dδ3 / Dδ2-Dδ3		۹۴°C/۳min	۹۴°C/۱min	۵۷ °C vs. ۶۰°C/۴۵sec	۷۲°C/۲min	۳۵	۷۲°C/۱۰Min
TCR - γ	γ-Ext	۹۵°C/۳min	۹۲°C/۴۵sec	۶۰°C/۹۰sec	۷۲°C/۲min	۳۵	۷۲°C/۱۰min
	γ- Int	۹۲°C/۱min	۹۲°C/۴۵sec	۶۰°C/۴۵sec	۷۲°C/۲min	۲۰	۷۲°C/۱۰min
TCR – γ (V γ I / II / IV)		۹۵°C/۳min	۹۲°C/۴۵sec	۶۰°C/۴۵sec	۷۲°C/۲min	۳۰ ۳۵	۷۲°C/۱۰min

1- Nested PCR
2- Master mix

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

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 هوچکین، یک مورد مبتلابه 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 ٪) ازکودکان مبتلا مذکر و۶۳ نفر (۴۶/۷٪) مونث بودند. میانگین سنی کودکان مبتلا۵/۳ (۵ /۳ ± ۵/۳) با حداقل سن۶ ماه وحداکثر ۱۳ سال بود. شایع‌ترین شکایات عمده بیماران عبارت بودند از کم‌خونی و علایم مربوط به آن از جمله رنگ پریدگی، ضعف و بی حالی، تب و دردهای استخوانی. سابقه فامیلی ابتلا به بیماری‌های بدخیم از جمله لوسمی در ۸/۷٪ از بیماران وجود داشت. علایم بالینی بیماران شامل تب در ۳۱/۹٪، کم خونی و علایم آن در ۵۵/۱ ٪، بزرگی طحال و کبد به ترتیب در ۴۳/۵٪ و ۳۶/۲٪، علایم خونریزی در ۲۴/۶٪، تورم غدد لنفاوی در۱۶/۴٪، کاهش وزن در ۱۰/۱٪، عفونت و علایم آن در ۲/۹٪ و علایم درگیری CNS در ۱/۴٪ بیماران مشاهده شد.

در اولین CBC، بیماران ازنظر شمارش گلبول‌های سفید درچهارگروه 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[1] به‌ترتیب ALL-L1 وALL-L2 تشخیص داده شدند. در ۴ بیمار تشخیص L2L1 و در بقیه بیماران طبقه‌بندی براساسFAB ممکن نشد که علت آن، رقیق شدن نمونه‌های مغزاستخوان یا خون محیطی وکم سلول بودن نمونه گزارش شد. باتوجه 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 ٪).

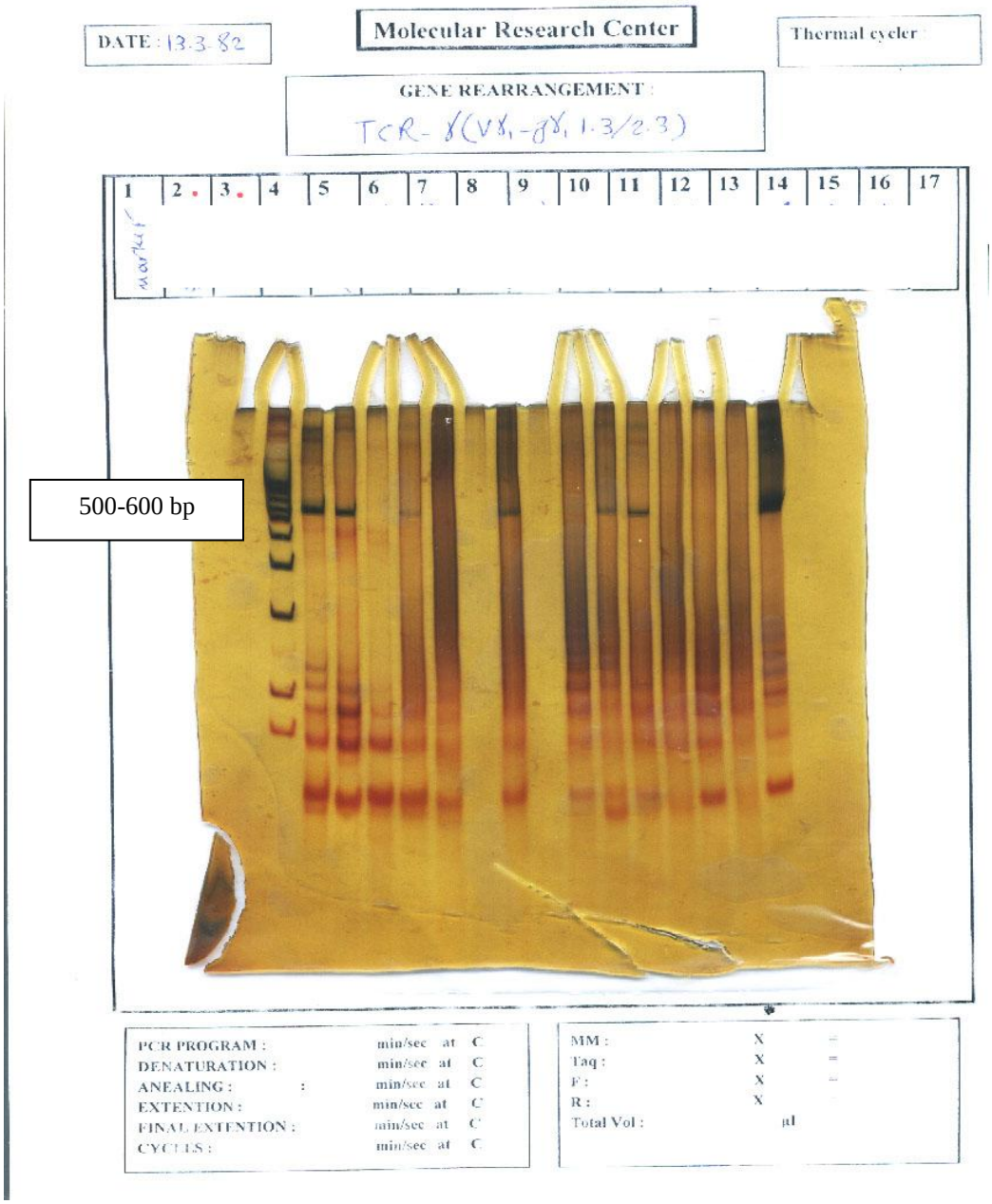
بازآرایی کلونال ناحیه متغیر (Variable.V) ژن گیرنده لنفوسیتT از نوع گاما (TCR-γ)، در ۱۲۶ بیمار BP-ALL ارزیابی شد که به دو صورت بود، در نوع اول موارد مثبت و مثبت به همراه اسمیر خفیف کلونال در نظر گرفته شدند در حالی‌که در نوع دوم فقط مواردی که باند بدون اسمیر داشتند کلونال تلقی شدندکه به‌تفکیک در ۱۱۴ (۹۰/۴٪) و ۱۰۰(۷۹/۳٪) نفر از بیماران مشاهده شد. در ۱۰۰ (۹۶٪) بیمار، منوکلونال و در ۵ بیمار (۴٪)، بای‌کلونال بوده و هیچ مورد اولیگوکلونال مشاهده نشد (شکل ۱).

بازآرایی VγI-Jγ۱/۳ ۲/۳ و VγI-Jγ۱/۱ ۲/۱ از ژن TCR-γ مورد ارزیابی قرارگرفت که نتایج آن در جدول ۳ آمده است.

جدول۳ : فراوانی بازآرایی کلونال ژن گیرنده لنفوسیت T از نوع γ در ناحیه V γ I– در ستون سوم مجموع مواردی‌که با Jγl.3/2.3 یا Jγl.1/2.1 مثبت بوده‌اند مخاط شده است و مواردیکه با هر دو مثبت بوده اند حذف گردیده است

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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]



شکل۱ : 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 ۵۰۰-۴۰۰bp را 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 VγI بودند، منطقه VγII از ژن TCR- γ مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۳). نتایج کلی بازآرایی مناطق VγI (۴/ ۲۹٪) و VγII (۴۶/۸٪) از ژن TCR- γ نشان دهنده بازآرایی کلونال در ۶۴/۹٪ از بیماران ارزیابی شده است.

در ارزیابی بازآرایی ژن گیرنده لنفوسیت T از نوع دلتا (TCR- δ) که برای دو باز آرایی Vδ2-Dδ3 و Dδ2-Dδ3 انجام شد، نتایج در جدول ۵ مشخص شده است (شکل ۴ و۵). میانگین متغیرهای کمی شامل سن، گلبول سفید، پلاکت، هموگلوبین و شاخص‌های سلولی ایمونوفنوتیپ

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

(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 کیفی‌شامل 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 معنی داری وجود نداشت.

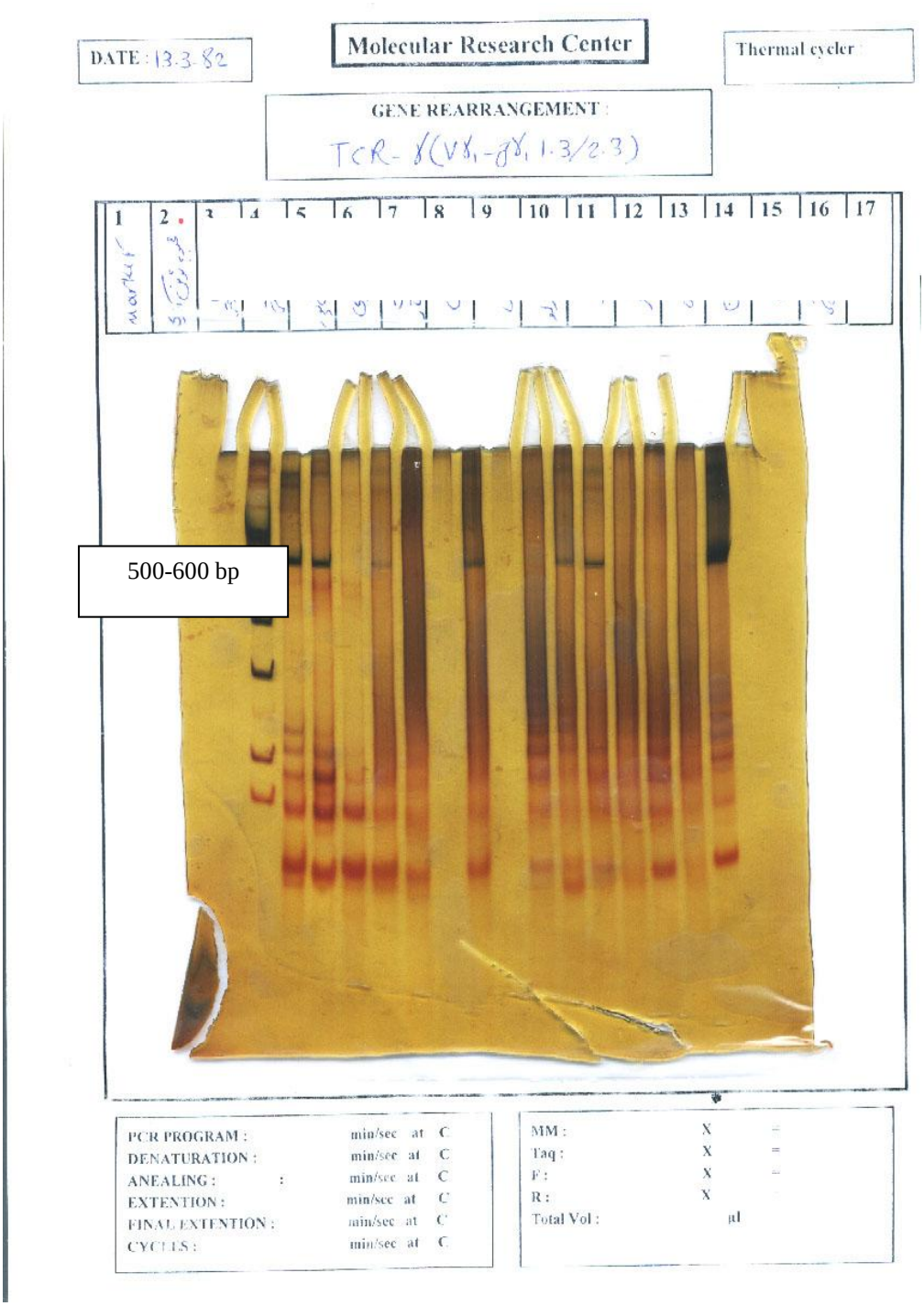
جدول ۴ : فراوانی بازآرایی کلونال در ژن گیرنده لنفوسیت T از نوع γ در ناحیه VγII، در ستون سوم تنها مواردی قید شده است که بازآرایی یکی از دو ناحیه Jγ1.3/2.3 یا Jγ1.1/2.1 را داشته است و مواردی که با هر دو مثبت بوده‌اند لحاظ نگردیده است.

بازآرایی	VγII-Jγ۱/۳ ۲/۳ n :۶۴	VγII-Jγ۱/۱ ۲/۱ n : ۴۱	VγII-Jγ۱/۳ / ۲/۳ or Jγ1.۱/۱ ۲/۱ n :۶۴
- کلونال	۲۰(۳۱/۲)	۱۲(۲۹/۲)	۲۹(۴۵/۳)
• منوکلونال	۲۲(۱۰۰)	۱۱(۹۱/۶)	۲۸(۹۶/۵)
• بایکلونال	۰	۱(۸/۴)	۱(۳/۵)

جدول ۵ : فراوانی بازآرایی کلونال Vδ2-Dδ3 و Dδ2-Dδ3 از ژن TCR-δ در BP-ALL را نشان می دهد.

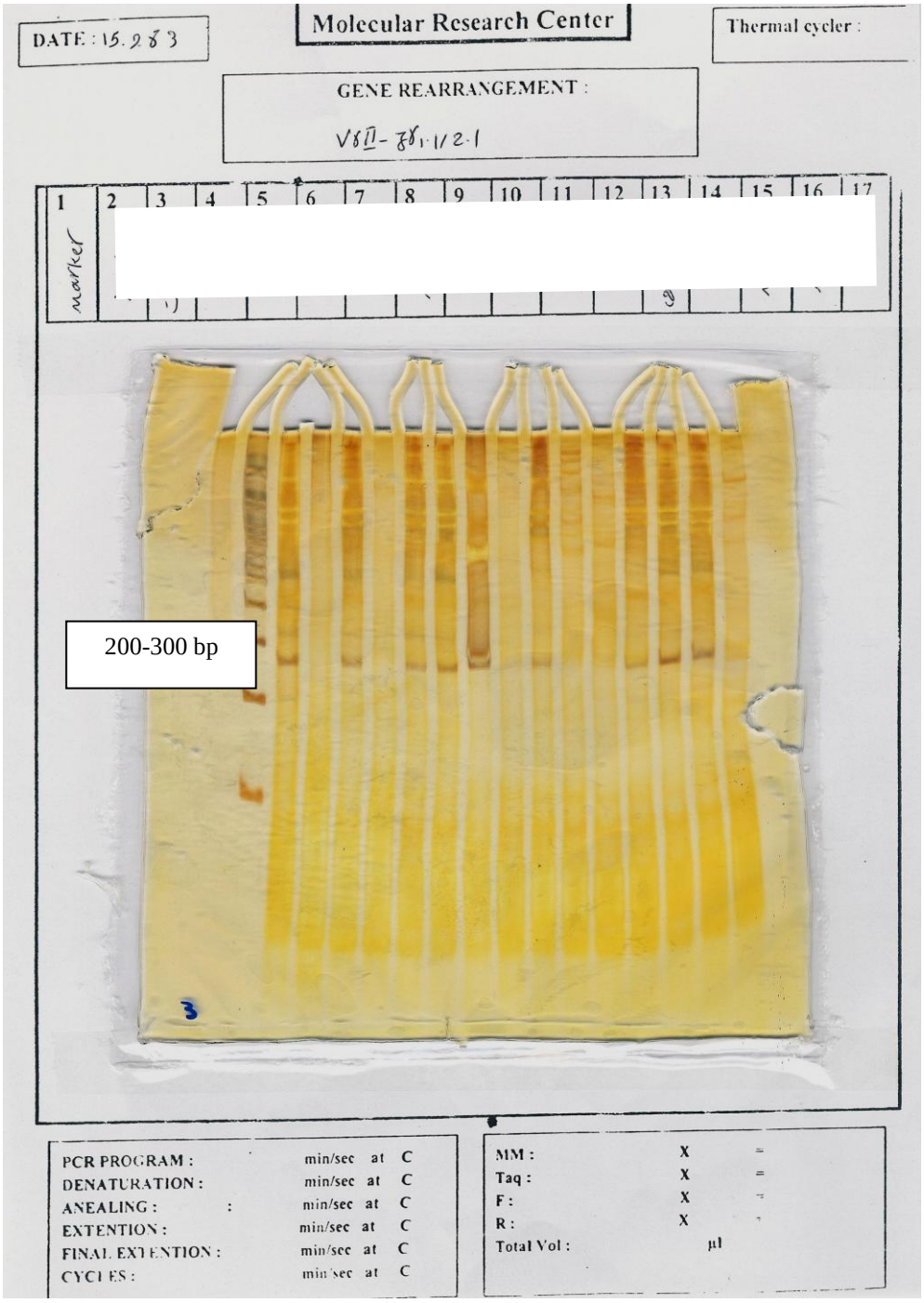
بازآرایی	Tcr-δ	
	Vδ2-Dδ3 n : ۱۰۴	Dδ2-Dδ3 n :۶۶
- کلونال	۴۷(۴۵/۲)	۱۱(۱۶/۶)
• منوکلونال	۳۲(۶۸/۱)	۱۰(۹۱)
• بایکلونال	۱۳(۲۷/۷)	۱(۹)
• اولیگوکلونال	۲ (۴/۳)	۰
• مجموع هر دو بازآرایی	۵۸ (۵۵/۸)	

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]



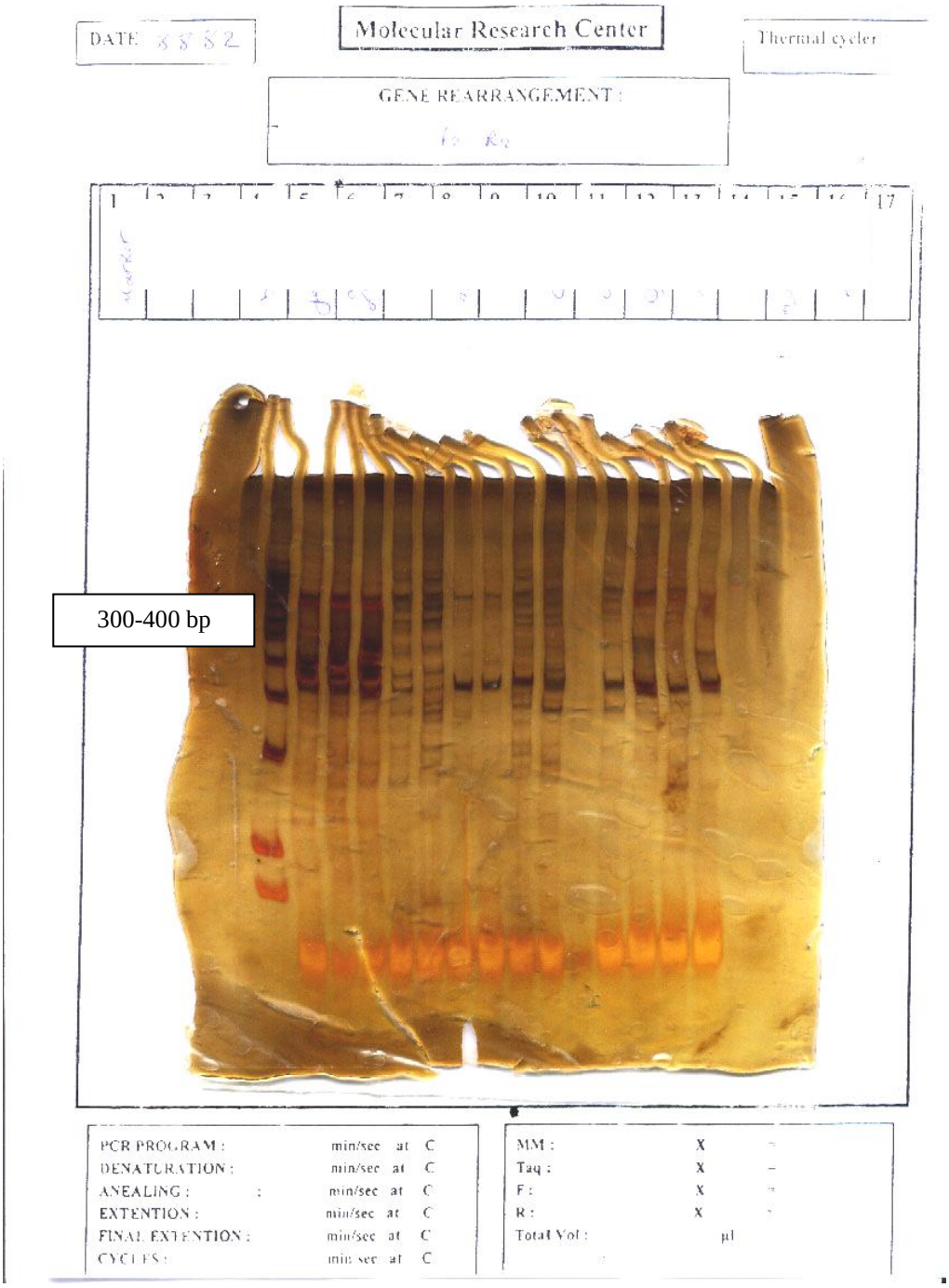
شکل -۲- نتایج بازآرایی ژن گیرنده لنفوسیت T از نوع گاما با پرایمرهای V γ I و Jγ1.3/2.3 را نشان می دهد. لاین ۲ و۳ بازآرایی منوکلونال را به صورت یک باند در حدود ۶۰۰bp-۵۰۰ را نشان می‌دهد. لاین ۴ تا ۱۶ مربوط به بیماران فاقد بازآرایی مزبور است که به صورت باند خفیف یا اسمیر و یا منفی است.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]



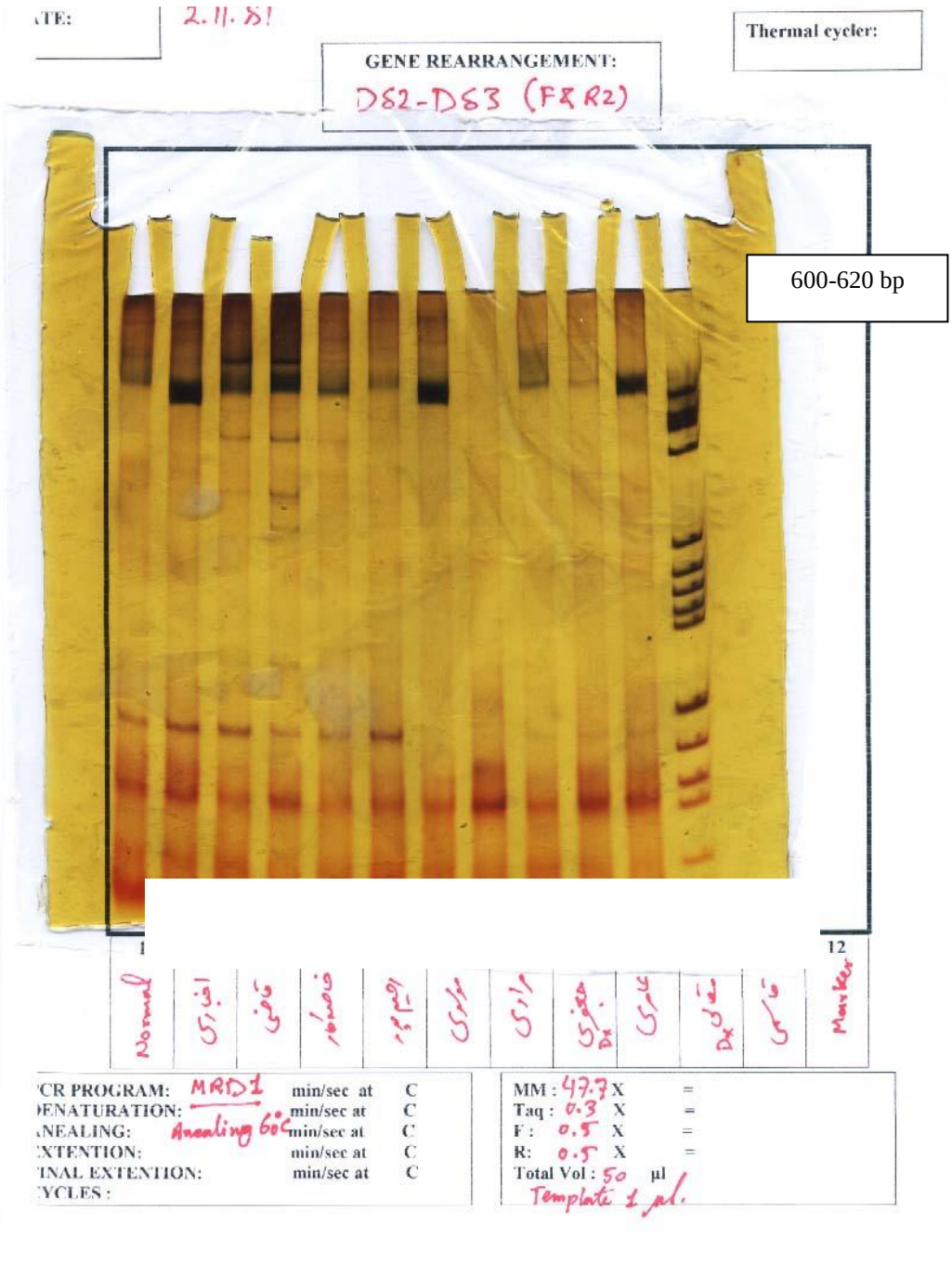
شکل- ۳ - نتایج بازآرایی ژن گیرنده لنفوسیت T از نوع گاما با پرایمرهای V γ II و Jγ1.1/2.1 را نشان می دهد. لاین ۲، ۴، ۷، ۸، ۱۴ و ۱۵ بازآرایی منوکلونال را به صورت یک باند در حدود ۳۰۰bp-۲۰۰ را نشان می‌دهد.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]



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 ۴۰۰bp–۳۰۰ را نشان می‌دهد. لاین ۱۰ مربوط به بیمار با بازآرایی بایکلونال است که به صورت دو باند دیده می شود.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]



شکل -۵- نتایج بازآرایی ژن گیرنده لنفوسیت T از نوع دلتا با پرایمرهای F و R2 را نشان می دهد که برای شناسایی بازآرایی Dδ2-Dδ3 به کار می رود . لاین ۲ ، ۷ و ۱۱ بازآرایی منوکلونال را به صورت یک باند در حدود ۶۵۰-۶۰۰bp را نشان می‌دهد. لاین ۱ مربوط به نمونه نرمال با بازآرایی پلی کلونال است که به صورت اسمیر دیده می شود.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

بحث

مطالعه حاضر بـر روی گـروه نسـبتاً بزرگـی(n: ۱۸۳) از کودکان مبتلا به انواع لوسمی‌هـای حـاد کـه بـه سـه مرکـز هماتولوژی- انکولوژی کودکـان در تهـران مراجعـه نمـوده بودند، انجام شد. با توجه به مورفولـوژی و ایمونوفنوتیـپ، ۱۳۵(۹۳/۷۵٪) بیمار مبتلا بـه لوسـمی لنفوبلاسـتی حـاد از نوع پیش سازهای B (BP-ALL) و ۹(۶/۲۵٪) بیمـار مبـتلا بـه T-ALL بودنـد. میـزان فراوانـی BP-ALL در مطالعـه حاضر، بیش از گزارش‌های موجود که فراوانی را بـین ۷۵٪ تا ۸۹٪ اعلام می‌دارند، می‌باشد (۹-۴). ۷۲ نفر (۵۳/۳٪) از بیماران مذکر و ۶۳(۴۶/۷٪) نفر مؤنث بودند (۱/۱۴ : $\frac{\text{مرد}}{\text{زن}}$) که نشان دهنده افزایش نسبی ابـتلا دختـران در مقایسـه بـا گزارش‌های دیگـر در مـورد کلونـالیتی و MRD کـه هـیچ انتخابی از نظر جنس صورت نگرفته می‌باشد (۱۳-۱۰، ۴). در گزارشـی از انگلسـتان و ترکیـه، Gameiro و همکـاران نسـبت ابـتلا پسـران بـه دختـران 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 همکـاران نسـبت فوق را ۱/۶ گزارش نمودنـد (۱۲). میـانگین سـنی بیمـاران مبتلا، ۵/۳ سال با حـداقل و حـداکثر ۶ مـاه و ۱۳ سـال بـه تفکیک بود.

تغییرات مورفولوژیک آسپیره‌های مغزاستخوان در بدو تشخیص، همان تغییرات قابل انتظار از جمله افزایش بارز بلاست‌ها، کاهش پیش‌سازی‌های گلبول سفید وپلاکتی بود. ۴۹/۵٪ از بیماران بر اساس معیارهای FAB جزو گروه ALL-L1 و ۴۶/۵٪ جزو گروه ALL-L2 و چهار بیمار جزو L1 L2 طبقه بندی شدند. امروزه مورفولوژی L1 و L2 جز این‌که درکودکان 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 به‌کار گرفته نشده و بیشتر ارزش تاریخـی دارد (۱۶، ۱۵). در تعیین پیش آگهـی 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 به‌نظر می‌رسد.

بازآرایی کلونال TCR-γ با پرایمرهای مشترک برای ناحیه متغیر (Vγ) و نیز پرایمرهای گروهVγI و VγII که اختصاصی‌تر هستنـد، توسط روش PCR دوگانـه و روش PCR معمولی ارزیابی شد که به ترتیب ۷۹/۳٪ و ۶۴/۹٪ از بیماران به تفکیک بازآرایی کلونال را داشتند. بازآرایی کلونـال TCR-γ در مطالعـات مختلف، ۳۹٪ تـا 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 VγIII وVγIV ازسری پرایمرهای اختصاصی‌تر باشد.

میزان بازآرایی TCR-γ در مطالعه حاضر نسبت به برخی از گزارش‌های قبلی که ۳۳٪ تا۶۰٪ را ذکر نموده اند بیشتر است (۲۳،۲۰-۶). شایع‌ترین بازآرایی این نوع نیز در ناحیه متغیر مربوط به گروه VγI در ALLهای نوع B وT است که در ۷۰٪ از آلل‌های بازآرایی شده گزارش شده است در حالی‌که در مطالعه حاضر در ۲۹/۴٪ از بیماران و ۴۳/۷۵٪ ازآلل‌های بازآرایی شده دیده شده که نسبت به گزارش‌های قبلی کمتر است (۷). نکته جالب دیگر بیشتر بودن بازآرایی گروه VγII است که در ۴۶/۸٪ از بیماران و ۵۶/۲۵٪ از آلل‌ها وجود داشت، در حالی‌که بازآرایی VγII تنها برای ۲۰٪ از موارد BP-ALL گزارش شده است.

در مطالعه‌ای که توسط تُون و همکاران انجام شده، بازآرایی ناحیه VγII را در ۴۸٪ از آلل‌ها گزارش کرده‌اند که در مطالعه ما حتی ازاین مقدارهم بیشتر است. شایع‌ترین قطعه بازآرایی شده در TCR-γ از طرف مقابل مربوط به ۲/۳ Jγ۱/۳ 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 آلل‌های بازآرایی شده دارای این قطعه از ژن بودند. استفاده از روش‌های مختلف (ساترن بـلات، PCR، پرایمـرهـای مشتـرک، PCR همـراه بـا همو/هتردوپلکس، تعیین توالی DNA) ممکن است قدری از این اختلاف را توجیه نماید اما تفاوت جوامع از نظر نژاد، وضعیت اقتصادی - اجتماعی، ازدواج با نژادهای دیگر

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

و شاید به‌خاطر بیشتر یا طولانی‌تر شدن تحریک سیستم ایمنی به‌علت برخورد با آنتی‌ژن‌های متنوع ویروسی و باکتریایی در کشورهای درحال توسعه مثل ایران در مقایسه با کشورهای توسعه یافته باشد. در گزارشی از برزیل توسط تُون 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 دریکی از این مطالعات نوع بازآرایی بررسی شده متفاوت با مطالعات دیگر است و بیشتر حذف ناحیه Cγ1 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 Vδ2Dδ3 و Dδ2Dδ3 اعلام کرده‌اند،ما نیز در بررسی بیماران ایرانی الگوی بازآرایی این دونوع را ارزیابی کردیم. بازآرایی کلونال Vδ2Dδ3 در ۴۵/۲٪ و Dδ2Dδ3 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 Vδ2Dδ3 در شرایط طبیعی دیده نشده و منحصراً 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 هردو دارای توالی پیام بازآرایی[1] هستند و مناطقی را مشخص می‌کنند که برای بازآرایی دردسترس است و می‌تواند منجر به ادامه بازآرایی شود. اما این مطلب نشان دهنده نوع نهایی رده سلول‌های بدخیم نخواهد بود. بازآرایی نسبی[2] بیشتر از بازآرایی‌های کامل (VJ یا VDJ) اتفاق می‌افتد. علاوه براین بازآرایی رده متقاطع در بین بدخیمی‌های لنفوئید (ALL) بیش از انواع رسیده تر است.

در ارزیابی بازآرایی‌های ژن‌های TCR-δ و TCRγ پس از انجام آزمایش هترودوپلکس و الکتروفورز بر روی ژل با قدرت تفکیک بالا (پلی آکرپلامید ۸٪) و رنگ آمیزی نقره، براساس تعداد باندها بازآرایی‌ها را در سه گروه منوکلونال، بای‌کلونال و اولیگوکلونال طبقه‌بندی کردیم. در موارد دیگر یا هیچ باندی مشاهده نمی‌شد یا نتیجه به‌صورت 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 بای‌کلونال داشته و هیچ مورد اولیگوکلونال مشاهده نشد. در بررسی با پرایمرهای گروه VγI و VγII به ترتیب بای‌کلونالیتی در ۱۸/۲٪ و یک بیمار مشاهده شد. بازآرایی دو آللی در ۳۵٪ از موارد BP-ALL گزارش شده است اما بیش از دو بازآرایی TCR-γ، تنها در۳٪ 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 لنفوئیدی 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 شپانسکی و همکاران، اولیگوکلونالیتی در ۳۸٪ از بیماران BP-ALL گزارش شده است (۶). در مطالعه تُون وهمکاران 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 Vδ2Dδ3 دارای الگوی بای‌کلونال و۴/۳٪ الگوی اولیگوکلونال داشتند. در مورد Dδ2Dδ3 تنها در یک بیمار (۹٪) بازآرایی بای‌کلونال مشاهده شد. زورستاد و پانزرگرومایر بازآرایی بای و اولیگوکلونال را به ترتیب در ۲۵٪ و ۳۰٪ از کودکانمبتلا به BP-ALL گزارش نمودند.(۲۷،۳۷).

طبق نظر گرومایر و همکاران بازآرایی‌های چندگانه

1- Recombination Signal Sequence : RSS
2- DJ Recombinant

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

TCR-δ(V-D) یا TCR-γ فقط ناشی از بازآرایی از وضعیت اولیه بر روی آلل‌های مختلف است، زیراکه فرآیند بازآرایی بیشتری بر روی بازآرایی موجود اتفاق نمی‌افتد. استثنا در مورد بازآرایی ثانویه واتصال Vδ2Dδ3 به ناحیه Jα می‌باشد که منجربه 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 Vδ2Dδ3 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 Vδ2Dδ3 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 Vδ2Dδ3 با افزایش سن وجود دارد (۲۱). در همین گزارش، عدم بازآرایی TCR-γ را در شیرخواران ۱ تا ۲ سال قید می‌کنند در حالی‌که در بررسی انجام شده از ۱۱ کودک کمتر از ۲ سال، ۷ مورد (۶۳٪) بازآرایی TCR-γ با پرایمرهای ناحیه متغیر و از نظر Vγ I/ II، ۲ مورد از ۵ مورد بررسی شده مثبت بود. برای ارزیابی بهتر باید برروی تعداد بیشتری بررسی شود.

در مرور مقالات موجود، ارتباط بین متغیرهای کمی قید شده و نوع بازآرایی سنجیده نشده است و تنها ارتباط این پارامترها را با پیش آگهی و پاسخ به درمان مورد ارزیابی قرار داده‌اند (۱۱،۳۷). باتوجه به نتایج بررسی، به‌نظر 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 Vδ2Dδ3 زیاد است.

بین وجود یا عدم وجود متغیرهای کیفی مثل جنس، تب، کم‌خونی، هپاتومگالی، اسپلنومگالی، تمایل به خونریزی، عفونت و تورم غدد لنفاوی نیز در دو گروه با و بدون بازآرایی اختلاف معنی داری وجود نداشت. تنها یک گزارش از هند توسط بهارگاوا و همکاران وجود دارد که بازآرایی TCR-δ را در پسرها بیش از دخترها گزارش کرده‌است (۷۴٪ در مقابل ۴۰٪، P= ۰/۰۰۸). در همین بررسی در هند نسبت پسر به دختر مبتلا به BP-ALL ۳/۵ (۲۸ : زن، ۹۲ : مرد) بوده است که بیش از موارد گزارش شده از کشورهای دیگر است (۲۵). در مطالعه ما نیز نسبت پسر به دختر حدود ۱/۱۴ می‌باشد و چون نسبت هر دو جنس در ابتلا تقریباً نزدیک است، بین وجود و عدم وجود بازآرایی تفاوت 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

بدین‌وسیله 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.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

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 Patho 2003; 56(1):1-10
4- Gameiro P, Moreira I, Yetgin S, *et al*. Polymerase chain reaction (PCR) and reverse transcription PCR-based minimal residual disease detection in long-term follow-up of childhood acute lymphoblastic leukemia, Br J Haematol 2002;119:685-696.
5- Pongers-Willemse 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- Szczenpanski T, Beishuizen A, Pongers-Willemse 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, Willemse MJ, Brinkhof B. Comparative analysis of Ig and TCR gene rearrangements at diagnosis and at relapse of childhood precursor-B–ALL provides improved strategies for selection of stable PCR targets for monitoring of minimal residual disease. Blood 2002;99(7):2315-2323.
19- Scrideli CA, Kashima S, Tone LG, *et al*. Minimal residual disease in Brazilian children with acute lymphoblastic leukemia: comparison of three detection methods by PCR. Leuk Res 2002; 26: 431-438.
20- Beishuizen A, Verhoeven MA, Van Wering ER, *et al*. Analysis of Ig and T-cell receptor genes in 40 childhood acute lymphoblastic leukemias at diagnosis & subsequent relapse: implications for the detection of minimal residual disease by polymerase chain reaction analysis. Blood 1994; 83:2238-2247.
21- Brumpt C, Delabess E, Beld jord K, *et al*. The incidence of clonal T-cell receptor rearrangements in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia varies with age and genotype. Blood 2000; 9(6):2254-2261
22- Chen Z, Font MP, Loiseau P, *et al*. The human T-cell V-gene locus: cloning of new segments and study of V-rearrangements in neoplastic T and B cells. Blood 1998;72:776–83.
23- Cavè H, Guidal C, Rohrlich P, *et al*. Prospective monitoring and quantification of residual blasts in childhood acute lymphoblastic leukemia by polymerase chain reaction study of 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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

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- Januszkieewicz DA, Nowak JS. Detection of clonality by polymerase chain reaction in childhood
38-
B-lineage acute lymphoblastic leukemia. Ann Hematol 1994; 69:107–110.
33- Szczepanski T, Langerak AW, van Dongen JJM. T-cell receptor gamma (TCRG) gene rearrangements in T-cell acute lymphoblastic leukemia reflect 'end-stage' recombinations: implications for minimal residual disease monitoring. Leukemia 2000; 14: 1208–1214.
34- Jacquy C, Delepaut B, Brichard B, *et al*. A prospective study of minimal residual disease in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia: MRD level at the end of induction is a strong predictive factor of relapse. Br J Haematol 1997; 98: 140–146.
35- Roberts WM, Estrov Z, Zipf TL, *et al*. Measurements of residual leukemia during remission in childhood acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 1997; 336: 317–323.
36- Scrideli CA, Kashima S, Tone LG, *et al*. Clonal evolution as the limiting factor in the detection of minimal residual disease by polymerase chain reaction in children in Brazil with acute lymphoid leukemia. J Pediatr Hematol/Oncol 2002;24: 364–7.
37- Kressler E, Panzar S, Panzar Grumayer ER, *et al*. Heterogenous TCR delta Vδ2-Dδ3 rearrangements and their relation to IgH and TCR gamma status in childhood B cell precursor Leukemias. Leuk Res 1999; 23: 1089-1096.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

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], Yahyav i S.H.[1]
Vosough P.[5], Arzanian MT[6], Izadya r M.[7], Shahgholi E.[5], Bahoosh GR.[5], Hamidieh AA [6],
Faranoosh M[5], Khosravipoo r G.[9], Haghnejad F.[1]

[1]*Iranian Blood Transfusion Organization-Research Center*
[2]*Bushehr Regional Blood Transfusion Center*
[3]*Paramedic College, Bushehr Medical Sciences University*

Abstract

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

Materials and Methods
In our prospective study, bone marrow aspirates of 183 children including B-precursor ALLs and with diagnosis of acute leukemia were collected at admission before any chemotherapy. After reviewing cytomorphology and immunophenotyping, only 140 cases with diagnosis of B-precursor ALLs were selected for study. Sixteen were excluded from our study due to various reasons including cellular degeneration. Mononuclear cells including leukemic blasts isolated by density gradient. After DNA extraction, hyper-variable regions TCR- δ (Vδ2-Dδ3 and Dδ2-Dδ3) and TCR- γ(V γ ; V γ I and V γ II) were amplified by consensus primers using PCR. PCR products were analyzed after heteroduplex analysis and polyacrylamide gel electrophoresis (silver stain). The DNA sequences were compared and aligned to the sequences homologous for VγI , Vγ II and Vγ of TCR γ , Vδ2-Dδ3 and Dδ2-Dδ3 of TCR–δ published by Gene Bank.

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

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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]

1- Nested PCR
2- Master mix

reduction of Vδ2Dδ3 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*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-01]