Archive of SID

دانشور
پزشکی

ارز یا بی‌ی بازآرایی ژن زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین با واکنش زنجیره پلیمراز به‌منظور تعیین کلونالیتی و ارزیابی اولیه MRD در کودکان مبتلا به لوسمی لنفوبلاستی حاد

نویسندگان: بهزاد پوپک*[۱]، دکتر علی‌اکبر پورفتح‌اله[۲]، دکتر حسین نجم‌آبادی[۳]، دکتر پروانه وثوق[۴]، دکتر یوسف مرتضوی[۵]، دکتر مینا ایزدیار[۶]، دکتر سیدحسین یحیوی[۷]، دکتر الهام شاهقلی[۸]، دکتر غلامرضا باهوش[۸] و فریبا حق‌نژاد دوشانلو[۹]

۱. دانش‌آموخته دکترای هماتولوژی دانشگاه تربیت مدرس
۲. استاد گروه هماتولوژی دانشگاه تربیت مدرس
۳. دانشیار گروه ژنتیک دانشگاه علوم بهزیستی
۴. استاد بخش خون و انکولوژی بیمارستان حضرت علی‌اصغر(ع)
۵. استادیار دانشگاه علوم پزشکی زنجان
۶. دانشیار بخش خون و انکولوژی مرکز طبی کودکان
۷. استاد دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران
۸. فلوخون و انکولوژی بخش خون وانکولوژی بیمارستان حضرت علی‌اصغر (ع)
۹. کارشناس گروه هماتولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران
* نویسنده مسئول: Email: bpoopak@yahoo.com

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال دوازدهم-شماره ۵۷
تیر ۱۳۸۴

تاریخ وصول: ۸۳/۲/۱۳
تاریخ پذیرش: ۸۳/۹/۱۱

چکیده

مقدمه و هدف: بازآرایی قطعات J,D,V از ژن زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین به همراه نوکلئوتیدهایی که در بین قطعات وارد یا حذف می‌گردند، منجر به ایجاد مناطق خیلی متغیر (CDR-3) منحصر به فردی می‌شوند که در ارزیابی کلونالیتی و حداقل بیماری باقیمانده (MRD) مورد استفاده قرار می‌گیرد.

روش کار: در مطالعه حاضر ۷۱ کودک مبتلا به لوسمی لنفوبلاستی حاد از نوع پیش‌سازهای B که به دو مرکز (بیمارستان حضرت علی‌اصغر(ع) و مرکز طبی کودکان) مراجعه کردند قبل از شروع شیمی درمانی مورد آزمایش قرار گرفتند. پس از استخراج DNA سلول‌های تک هسته‌ای مغز استخوان آزمایش PCR با پرایمرهای طراحی شده برای مناطق ثابت به‌منظور تکثیر منطقه 3 -CDR انجام شد و پس از آنالیز هترودوپلکس با الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریلامید و رنگ‌آمیزی نقره مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج: در ۸۲ درصد از بیماران، بازآرایی کلونال به‌صورت تک دودمانی (۶۹ درصد)، دو کلونی (۲۴ درصد) و اوگیلوکلونال (۷ درصد) مشاهده گردید که با توجه به حساسیت مطلوب به‌دست آمده برای آزمایش‌ها می‌توان از آن برای بررسی حداقل بیماری باقیمانده استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: لوسمی لنفوبلاستی حاد، حداقل بیماری باقیمانده (MRD)، کلونالیتی، واکنش زنجیره پلیمراز

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

لوسمی لنفوبلاستی حاد
(Acute Lymphoblastic Leukemia ALL)

شایع‌ترین بدخیمی دوران کودکی است [۱و۲] و از سلول‌های پیش‌ساز طبیعی که در مراحل اولیه تکاملی خود متوقف شده‌اند منشأ می‌گیرد [۱،۲و۳].

در بدو تشخیص بیماری، تعداد 10^{11} تا 10^{12} سلول بدخیم در بدن بیماروجود دارد [۲و۴] که با شروع درمان استاندارد و القای رمیسیون در بیمار، تعداد این سلول‌ها به 10^{9} تا 10^{10} می‌رسد؛ یعنی توده سلول بدخیم به میزان ۲ تا ۳ لگاریتم کاهش می‌یابد. به توده سلول بدخیم که پس از القای رمیسیون در بدن بیمار هنوز وجود دارد، حداقل بیماری باقیمانده (Minimal Residual Disease,MRD) گفته می‌شود [۳،۵،۴و۶]. روش رایج بررسی پاسخ به درمان در ایران، ارزیابی آسپیره‌های مغز استخوان رنگ‌آمیزی شده با رنگ‌های معمولی رومانوفسکی، به‌منظور مشاهده و تعیین درصد سلول‌های بدخیم است. حساسیت این روش ۱ تا ۵ درصد است؛ یعنی حداقل یک تا پنج سلول از یک صد سلول هسته‌دار مغز استخوان باید بلاست باشد تا رؤیت و تشخیص شود. این در حالی است که روش‌های رایج ارزیابی MRD روش‌هایی با حساسیت بیش‌تر (10^{-3}–10^{-6}) هستند [۲و۴] که عبارتند از:

۱. تعیین و بررسی ایمونوفنوتیپ توسط فلوسیتومتری برای شناسایی توأم حداقل ۲ تا ۳ شاخص سلول‌های بدخیم.
۲. ارزیابی ترانس لوکاسیون‌های اختصاصی کروموزومی با واکنش زنجیره پلیمراز معکوس.
۳. بررسی بازآرایی‌های اختصاصی ژن‌های زنجیره‌های ایمونوگلوبولین و گیرنده لنفوسیت T با استفاده از واکنش زنجیره پلیمراز.

سازماندهی اولیه (Germline) جایگاه‌های ژنی ایمونوگلوبولین دارای بخش‌هایی است که طی روند بازآرایی به هم متصل می‌شوند. جایگاه ژنی زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین بر روی کروموزوم ۱۴ است. هر لوکوس ایمونوگلوبولین در وضعیت اولیه، حداقل از سه قطعه ژنی، یعنی قطعه متغیر (Variable, V)، قطعه ثابت (C)، و قطعه اتصال (J) تشکیل شده است که در جایگاه زنجیره سنگین قطعه تنوع (D) نیز وجود دارد. در لنفوسیت‌های B در حال تمایز بازآرایی ابتدا با اتصال یک قطعه D با J و حذف DNA بین این دو قطعه در جایگاه ژنی زنجیره سنگین اتفاق می‌افتد و سپس یکی از قطعات V به کمپلکس DJ تشکیل شده متصل شده، ژن بازآرایی شده VDJ تشکیل می‌گردد [۶و۷].

تنوع بسیار زیاد لنفوسیت‌های B در طی این بازآرایی سوماتیک، ناشی از تنوع در اتصال قطعات مختلف (Combinatorial Diversity) ونیز تنوع ایجاد شده در محل اتصال قطعات (Junctional Diversity) به علت اضافه شدن یا حذف نوکلئوتیدها (N) در بین قطعات J,D ; D,V و یا J,V قبل از اتصال آن‌ها به هم است.

با توجه به ویژگی ناحیه VNDNJ که برای هرکلون لوسمی لنفوبلاستی حاد منحصربه فرد است می‌توان با ارزیابی این بخش از ژن بازآرایی شده که منطقه خیلی متغیر (CDR -3) راتشکیل می‌دهد به‌عنوان یک شاخص در این بیماران استفاده و MRD را ارزیابی کرد [۸،۹و۱۰].

در مطالعه حاضر، بازآرایی اختصاصی ژن زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین در ۷۱ کودک مبتلا به ALL از نوع پیش‌سازهای لنفوسیت B برای تعیین کلونالیتی به‌عنوان اولین مرحله در ارزیابی MRD مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

مطالعه به‌صورت آینده نگر بر روی ۷۱ بیمار مبتلا به لوسمی لنفوبلاسی حاد که به دو مرکز آموزشی ـ درمانی (بیمارستان حضرت علی‌اصغر (ع) و مرکز طبی کودکان) مراجعه کردند انجام شد. تشخیص بیماری براساس مطالعه سیتومرفولوژی مغز استخوان و فلوسیتومتری انجام گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

نمونه‌ها و استخراج DNA

نمونه مغز استخوان بیماران با روش آسپیراسیون و با ضد انعقاد EDTA در بدو تشخیص بیماری و قبل از شروع شیمی‌درمانی جمع‌آوری شد. سپس سلول‌های تک هسته‌ای نمونه‌ها را پس از مخلوط کردن با فسفات بافرسالین (PBS) با روش سانتریفوژ غلظتی بر روی فایکول (ymphodex,1,077-1,080g/cm) جدا کرده، شمارش سلول‌های تک هسته‌ای با روش هموسیتومتری انجام شد. استخراج DNA سلول‌های تک هسته‌ای با دو روش پروتئیناز K و رسوب با ایزوپروپیل الکل و نیز کیت استخراج DNA (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche) انجام گرفت. غلظت و درجه خلوص DNA با بیوفتومتر اندازه‌گیری شد و جهت اطمینان از سلامت DNA و عدم‌آسیب به آن الکتروفورز بر روی آگارز ۱ درصد و واکنش زنجیره پلیمراز با پرایمرهای ژن بتا انجام شد.

واکنش زنجیره پلیمراز (PCR)

برای تکثیر ناحیه خیلی متغیر ژن بازآرایی شده زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین (Complementarity Determining Region-3) از روش‌واکنش زنجیره پلیمراز (Heminested) با پرایمرهایی که به مناطق ثابت (Conserve) انتهای 3' قطعات J,V متصل می‌شوند استفاده‌شد. در واکنش اول، یک واحد آنزیم پلیمراز DNA (Tag DNA Polymerase) ، کلرورمنیزیم ۲mM، مخلوط dNTP ۲۰۰ میکرومولار و پرایمرهای FR3A {5'- ACACGGC (C/T) (G/C) TGTATTACTGT-3}, و LJH (5-TGAGGAGACGGTGACC-3) با غلظت 12/5 Pmol /50µl و DNA ژنومیک به میزان ۰/۱ تا یک میکروگرم در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر استفاده شد.

سپس محصول واکنش اول به میزان۱/۱۰۰۰ رقیق شد و یک میکرولیتر از آن مجدداً با پرایمرهای FR3A (مثل واکنش اول) VLJH (5-GTGACCAGGGT CCTTGGCCCCAG-3) (A\G\C\T با همان غلظت های ذکر شده برای واکنش اول وحجم نهایی ۵۰ میکرولیتر واکنش PCR انجام شد.

واکنش PCR با دستگاه ترمال سایکلر (Eppendorf - Mastercycler) و طبق برنامه مشخص شده در جدول ۱ انجام گردید.

جدول ۱- برنامه PCR در واکنش اول ودوم تکثیر ژن زنجیره سنگین ایمونوگلوبین

مراحل PCR	واکنش اول	واکنش دوم
دناتوره شدن اولیه	94ºC/3min	94ºC/1min
دناتوره شدن	94ºC/1min	94ºC/1min
اتصال پرایمرها (Anealing)	57ºC/45sec	61ºC/45sec
گسترش زنجیره (Extension)	72ºC/2min	72ºC/2min
تعداد سیکل	30	20
گسترش نهایی	72ºC/10min	72ºC/10min

کنترل‌ها

برای تمام واکنش‌ها، کنترل مثبت، کنترل منفی آب مقطر استریل، کنترل مخلوط اصلی (Master Mix) و کنترل مخلوط DNA استخراج شده از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی ۸ فرد سالم منظور شد.

ارزیابی محصول PCR

برای مشاهده محصول PCR از الکتروفورز بر روی ژل پلی‌آکریلامید ۸ درصد و رنگ‌آمیزی نقره استفاده شد و برای ارزیابی باندهای تک دودمانی از روش آنالیز هترودوپلکس استفاده گردید. در ارزیابی هترودوپلکس، ابتدا محصولات PCR را به مدت ۵ دقیقه در ۹۵C° دناتوره کرده، سپس به مدت یک ساعت در ۴C° به منظور دناتوره کردن انکوبه کردیم و بلافاصله بر روی ژل پلی‌آکریلامید الکتروفورز شدند.

برای ارزیابی طول محصولات PCR همزمان از شاخص اندازه (Size Marker) ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت نوکلوئید (100 BP Ladder) استفاده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

تعیین حساسیت آزمایش PCR

برای ارزیابی حساسیت آزمایش PCR از دو روش رقیق کردن با آب مقطر استریل و رقیق کردن با DNA مخلوط ژنومیک ۸ فرد سالم استفاده شد [۱۲].

در روش اول، ابتدا یک میکروگرم از DNA ژنومیک زمان تشخیص بیمار را با آب مقطر به ۱۰۰ میکرولیتر رسانده، سپس در درجه حرارت ۱۰۰C° به مدت ۵ دقیقه حرارت دادیم و بلافاصله در ۶۰۰۰g به مدت ۵ ثانیه سانتریفیوژ کردیم. ده میکرولیتر از محلول رویی را به لوله اپندورف دیگری که ۹۰ میکرولیتر آب مقطر داشت منتقل کرده، به مدت یک دقیقه در ۱۰۰C° حرارت دادیم و به همان روش سانتریفیوژ کردیم. ده میکرولیتر را از محلول رویی برداشته به لوله بعدی منتقل و عیناً روش را تا رقت 10^{-6} تکرار کردیم. سپس از تمامی رقت‌های تهیه شده مثل نمونه‌های بیماران آزمایش PCR به‌عمل آمد. در روش دوم نمونه DNA ژنومیک زمان تشخیص بیماری را با DNA گرفته شده از سلول‌های تک هسته‌ای افراد سالم رقیق کردیم. ابتدا به پنج لوله اپندورف یک میکروگرم از DNA مخلوط افراد سالم را اضافه کرده، در مرحله بعد ابتدا ۰/۱ میکروگرم از DNA بیماری که بازآرایی تک دودمانی آن ثابت شده بود اضافه کردیم و حجم کل را با آب مقطر استریل به ۱۰۰ میکرولیتر رسانده لوله را در ۱۰۰C° به مدت یک دقیقه حرارت داده با ۶۰۰۰g به مدت کوتاه سانتریفیوژ و ده میکرولیتر از محلول رویی را به لوله دومی که یک میکروگرم از DNA افراد سالم را دارد (90µl) منتقل وعیناً روش را تکرار تا رقت‌های ده تایی در زمینه DNA سالم را تهیه کردیم (10^{-1} تا 10^{-5}).

تعیین توالی محصولات PCR

به‌منظور تأیید محصول PCR به‌دست آمده ۱۰ تا ۱۵ میکرولیتر از محصول را بر روی ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز کردیم و پس از جداسازی و خالص‌سازی (Megapure) محصول تعیین توالی دو طرفه انجام شد (SEQ LAB).

نتایج

در ارزیابی آزمایش PCR انجام شده تنها نتایج مواردی که کنترل آب مقطر و مخلوط اصلی منفی بود و شاهد مثبت باند مربوط را داشت مورد استفاده قرار گرفت.

با توجه به نتایج PCR والکتروفورز آن‌ها ۵۸ بیمار (۸۲ درصد) از ۷۱ بیمار مورد بررسی دارای بازآرایی در ژن زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین (CDR-3) بودند. تعداد ۴۰ نفر (۶۹ درصد) ازبیمارانی که بازآرایی داشتند تنها یک باند درمحدوده ۸۰ تا ۱۲۰ جفت نوکلئوتید (Base-Pair)، چهارده (۲۴ درصد) بیمار دارای دو باند و۴ بیمار (۷ درصد) بیش از دو باند در محدوده ذکر شده داشتند. در ۱۳ بیمار (۱۸ درصد)از ۷۱ بیمار مورد بررسی یا هیچ محصولی مشاهده نشد و یا واکنش به‌صورت اسمیر یا نردبان (Ladder) بود (تصویر ۱).

در تعیین حساسیت آزمایش که رقیق کردن نمونه بیمار با آب مقطر استریل انجام شد واکنش تا بیش از 10^{-5} مثبت گردید (تصویر ۲) و در نمونه‌های رقیق شده با DNA مخلوط افراد سالم واکنش تا 10^{-3}– 10^{-4} مثبت شد که با افزایش رقت زمینه اسمیر مشخص‌تری داشت (تصویر ۳).

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر با پرایمرهایی که به مناطق ثابت ناحیه J, V متصل می‌شوند ناحیه خیلی متغیر CDR-3 (VNDNJ) مورد بررسی قرار گرفت. بازآرایی کلونال زنجیره سنگین در ۵۸ (۸۲ درصد) نفر از بیماران مورد مطالعه مشاهده شد که در ۷۵ درصد تا بیش از ۹۰ درصد در مطالعات قبلی گزارش شده است [۵،۶و۷]. یکی از علل این تفاوت، عدم استفاده از پرایمرهایی است که به مناطق دور دست‌تر ژن زنجیره سنگین (FRI, FR-2) متصل می‌شوند. نکته حائز اهمیت در این ارزیابی، تغییرپذیری بود که در آزمایش‌های مکرر ملاحظه شد و البته با تغییر در شرایط آزمایش به‌حداقل ممکن رسیده، ولی هنوز وجود دارد. لذا توصیه می‌گردد حتی در شرایط ایدئال نیز تنها به یک بار آزمایش اکتفا نگردد.

www.SID.ir

Archive of SID

تمایز محصولات PCR کلونال از پلی‌کلونال (واکنشی و حالت‌های طبیعی) با استفاده از الکتروفوزر بر روی ژل آگارز استاندارد تقریباً غیر ممکن است و لذا روش‌های دیگری برای این تمایز باید به‌کار گرفته شوند. تعیین توالی محصول PCR، آنالیز با SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)، الکتروفوزر بر روی ژل «گرادیان‌دناتوره‌کننده» (DGGE)، الکتروفوزر بر روی ژل «گرادیان حرارتی» (TGGE) و آنالیز هترودوپلکس از جمله روش‌ها است [۵]. از آن‌جا که آنالیز هترودوپلکس ساده‌ترین و سریع‌ترین روش و از نظر اقتصادی نیز مقرون به صرفه است معمولاً از این روش استفاده می‌شود که در آن اگر باند کلونال باشد، زنجیره‌های مشابه (Homoduplex)، و در صورتی که باند پلی‌کلونال باشد زنجیره‌های غیرهمسان (Heteroduplex) تشکیل می‌شوند که سرعت حرکت کم‌تری نسبت به همودوپلکس‌ها دارند و به‌صورت اسمیر در الکتروفوزر دیده‌می‌شوند. در ارزیابی‌محصول PCR ۱۸ (۳۱ درصد) نفر از بیماران دو یا بیش از دو باند در الکتروفوزر مشاهده شد که دال بر دوکلونی/چندکلونی (Bi/Oligo-Clonality) است. تعیین موارد دو کلونی و اولیگوکلونال که پاسخ درمانشان کم‌تر و پیش آگهی بدتری نسبت به موارد منوکلونال دارند [۱۱] و در ضمن ارزیابی MRD در آن‌ها به‌خاطر تنوع کلون پیچیده‌تر است. در ارزیابی اولیه MRD با توجه به نتایج (تصویر ۱) بیمار دو پس از انجام آنالیز هترودوپلکس دو باند دارد که دال بر دو کلونی بودن است و با وجود شیمی درمانی هر دو باند با شدت کم‌تر در روز ۱۴و۲۸ همچنان باقی است، در حالی که بیمار از نظر سیتومرفولوژی مغزاستخوان در روز ۲۸ در رمیسیون کامل وعاری از بلاست است. نتیجتاً بیمار MRD مثبت در نظر گرفته می‌شود و با توجه به حساسیت تعیین شده (10^{-3}–10^{-4}) MRD بیمار ارزشمند است. در گزارش‌های موجود میزان دو کلونی / چند کلونی با روش PCR ۱۰تا ۴۰ درصد گزارش شده است [۵و۱۱] که گزارش حاضر نیز مطابق با گزارش‌های موجود بوده، اهمیت توجه به آن در ارزیابی بیماران ALL ایران کاملاً روشن است. دلایل مختلفی برای ایجاد این حالت عنوان می‌گردد؛ از جمله کیچینگمن (Kitchingman) و همکاران او علت آن را وجود پلی زومی کروموزوم ۱۴ در بیماران ALL و تفاوت در بازآرایی آن‌ها می‌دانند. در تحقیق دیگری که توسط تون (Tone) و همکارانش [۱۱] در برزیل انجام شده در یک مورد تریزومی کروموزوم ۱۴ گزارش شده است. علت دیگر حالت دو کلونی یا اولیگوکلونال وجود دو جمعیت ازسلول‌های بدخیم در مغز استخوان است که می‌تواند ناشی از دو اتفاق مجزا و یا به‌صورت شایع‌تر به خاطر ایجاد زیر کلون‌ها (Sub Clones) باشد [۱۱].

چهار مکانیسم مختلف برای ایجاد زیر کلون عنوان شده‌که عبارتند از: ۱) جایگزینی VH– VH ۲) بازآرایی جدید VH در قطعه DJH که از قبل بازآرایی شده است، ۳) جایگزینی در ژن بازآرایی شده D-JH و ۴) بازآرایی جاری در یک پیش‌ساز بازآرایی نشده باشد.

در بیمار ۵ (تصویر ۱) پس از شروع درمان، باند زمان تشخیص محو شده و به‌صورت اسمیر درآمده و در نتیجه بیمار MRD منفی است که با سیتومرفولوژی مطابقت دارد.

ارزش دیگری که برای تعیین بازآرایی ژن زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین متصور است در نمونه‌های روز ۱۴ و ۲۸ (بخصوص روز ۱۴) تعداد سلول‌های مغز استخوان کم شده و یا با خون محیطی رقیق می‌شود و ارزیابی را غیرقابل اعتماد می‌کند، در حالی که با توجه به حساسیت PCR این مشکل وجود ندارد.

اگر چه با تعیین توالی محصولات PCR و ساخت پرایمرهای اختصاصی برای هر بیمار، امکان افزایش حساسیت و ویژگی آزمایش وجود دارد، اما این امر مستلزم صرف وقت و هزینه قابل توجه است. لذا با توجه به حساسیت تعیین شده، استفاده از پرایمرهای عمومی در ارزیابی مفید خواهد بود. نتایج قطعی با آزمایش بر روی تعداد بیش‌تری از بیماران و در مدت زمان طولانی‌تر پس از شروع درمان قابل دستیابی است.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1. Lee G.R., Foerster J., et al: Wintrobe's clinical hematology 10th ed, Lippincott Williams & Wilkins; pp.2241-2272, 2001.
2. Hoffbrand A.V, Lewis S.M., Tuddenham E.D.G: Postgraduate Hematology, 4th ed., Butterworth – Heinemann; pp.354-373, 1999.
3. Provan D., Gribben J.: Molecular Hematology Blackwell Science: pp 42-59, 2000.
4. Willemse M.J.P., Seriu T., et al: "Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL 1 deletions as PCR targets", Leukemia, 13; 110 – 118, 1999.
5. Szczepanski T., Flohr T., et al: "Molecular monitoring of residual disease using antigen receptor genes in child hood acute lymphoblastic leukemia", Clin. Hematol, 15 (1); 37-57, 2002.
6. Van Dongen JJM, Szczepanski T., et al: "Detection of minimal residual disease in acute Leukemia patients", Cytokin Mol Ther, 2:121 – 133, 1996.
7. Tone L.G., Bernardes J.E., et al: "Minimal Residual Disease in Brazilian children with acute lymphoid Leukemia, comparison of three detection methods by PCR", Leuk. Research, 26; 431 – 438, 2002.
8. Sykes P.J., Snell L.E., et al: "The use of monoclonal gene rearrangement for detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia of childhood", Leukemia, 11; 153-158, 1999.
9. Trainor K.J., Brisco M.J., et al: "Gene rearrangement in B-and T-Lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction", Blood, 78(1); 192-196, 1991.
10. Steward C.G., Goulden N.J., et al: "A polymerase chain reaction study of the stability of Ig heavy – chain and T-cell receptor& gene rearrangements between presentation and relapse of childhood B – Lineage acute lymphoblastic Leukemia", Blood, 83 (5); 1355 – 1362, 1994.
11. Tone L.G, et al: "Prognostic significance of bi / oligoclonality in childhood acute Lymphoblastic leukemia as determined by polymerase chain reaction", Sao Paulo Med j, 119 (5); 175 – 80, 2001.
12. Ouspenskain M. V., Johnston D.A.: "Accurate quantitation of residual B – Precursor acute Lymphoblastic leukemia by limiting dilution and a PCR – based detection system: a description of the method and the principles involved", Leukemia, 9: 321 – 328, 1995.

www.SID.ir