Archive of SID

بررسی کینتیک کایمریسم در گیرندگان پیوند مغز استخوان با استفاده از تکثیر لوکوس‌های ژنی اس‌تی‌آر با روش پی‌سی‌آر مالتیپلکس

بهرام چهار دولی[۱]، دکتر یوسف مرتضوی[۲]، دکتر سید حمیداله غفاری[۳]، دکتر کامران علی مقدم[٤]،
دکتر اردشیر قوام زاده[٤]، دکتر بابک بهار[٤]، دکتر مسعود ایروانی[٤]، دکتر سید اسداله موسوی[٤]

خلاصه

سابقه وهدف: *پیوند مغز استخوان در بسیاری از بیماری‌های خونی که با درمان‌های رایج قابل کنترل نیستند رو به افزایش است، از این رو توانایی ارزیابی میزان مشارکت سلول‌های دهنده در روند پیوند دارای اهمیت فراوان می‌باشد. مطالعه‌ی حاضر به منظور بررسی میزان مشارکت سلول‌های فوق (کایمریسم) پس از پیوند توسط روش‌های مبتنی بر پی‌سی‌آر با استفاده از بررسی پلی مرفیسم‌های تکراری کوتاه پشت سر هم (STR) در بیماران بیمارستان شریعتی تهران در سال ۱۳۸۱ انجام شد.*

مواد و روش‌ها: *این مطالعه‌ی توصیفی بر روی ۳٦۰ نمونه‌ی خون ۱۰ بیمار کاندید پیوند سلول‌های بنیادی آلوژنیک که از انواع مختلف لوکمی (٦ بیمار) یا اختلالات هماتولوژیکی غیر بدخیم (٤بیمار) رنج می بردند، انجام شد. با کنترل مولکولی دقیق، در طول ٦ ماه بعد از پیوند وضعیت پیوند مورد بررسی قرار گرفت. ۱/۵ سی‌سی خون وریدی قبل از عمل پیوند از دهنده و گیرنده گرفته شد و نمونه‌گیری بعد از پیوند روزانه تا یک ماه و سپس ماهیانه تا ٦ ماه ادامه یافت. الگوهای اللیک دهنده وگیرنده با روش مالتیپلکس پی‌سی‌آر با استفاده از مجموعه‌ای از نشان‌گرهای ژنی اس تی آر بر روی ژن‌های ARA ،D13S317 ،D7S820 ،D16S539 ADA ،D4S2366 ، F13A1, FES/FPS ،TPOX ،CSF1PO ،VWA و HUMTH01 تعیین شد.*

یافته‌ها: *در اکثر بیماران الگوی کایمریسم مخلوط در روزهای ۱ تا ۹ بعد از پیوند مشاهده شد. از میان این بیماران ۷ نفر در فاصله روزهای ۹ تا ١٤ و یک نفر در ماه پنجم کایمریسم کامل را به دست آوردند. ۲ بیمار که در یکی از آن‌ها از رژیم آماده سازی کم شدت استفاده شده بود تا ماه ٦ در حالت کایمریسم مخلوط باقی ماندند. موفقیت هماتولوژیکی پیوند در فاصله‌ی روزهای ۸ تا ۱۹ و موفقیت پلاکتی پیوند بین روزهای ۹ تا ۲۵ به دست آمد. بسته به ژن مورد استفاده، حساسیت روش بین ۱ تا ۲ درصد متغیر بوده است.*

نتیجه‌گیری و توصیه‌ها: *نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که بررسی اس تی آر با روش مالتیپلکس پی سی آر می‌تواند ارزیابی صحیح وکّمی باسرعت بالا از وضعیت کایمریسم بعد از پیوند را در بیماران فراهم نماید. چنین اطلاعاتی می تواند در تصمیم گیری برای استفاده از درمان‌های اضافی جهت جلوگیری از رد پیوند یا سرکوب عود بیماری مفید واقع شود.*

واژگان کلیدی: تکرارهای پشت سرهم کوتاه (STR) ، پیوند مغز استخوان آلوژنیک، کایمریسم، پی‌سی‌آر مالتیپلکس

مقدمه

پیوند مغز استخوان در گروهی از بیمارانی که از طریق راه‌کارهای درمانی رایج قابل کنترل و درمان نیستند، به عنوان یک درمان انتخابی انجام می شود. پیدایش شیوه های جدید جهت پیوند آلوژنیک از قبیل استفاده از سلول‌های بنیادی خون محیطی، مغز استخوان و خون بند ناف، تقریبا برای هر بیماری که به این نوع درمان احتیاج دارد می‌تواند مفید باشد. توانایی ارزیابی مشارکت سلول‌های دهنده در روند پیوند متعاقب استفاده از سلول‌های مغز استخوان یا سلول‌های بنیادی خون محیطی، دارای اهمیت فراوان می باشد (۱). گرفتن کامل سلول‌های بنیادی که باعث هماتوپوئزیس طولانی

[۱] کارشناس ارشد هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی تربیت مدرس
[۲] متخصص هماتولوژی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی زنجان
[۳] متخصص ژنتیک، مرکز تحقیقات خون و پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی تهران
[٤] فوق تخصص هماتولوژی ـ انکولوژی، مرکز تحقیقات خون و پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی تهران

www.SID.ir

Archive of SID

مـدت مشـتق از دهـنده شـود، می‌تواند در بقای بدون بیماری طولانی مدت مهم باشد. مشارکت مغز استخوان دهنده، هم در مرحله پر کردن فضای مغز استخوان و هم در توانایی وساطت اثـر پـیوند علیه لوکمی[1]، ممکن است توسط مطالعه‌ی کینتیک مـراحل پـیوند ارزیابی شود. کایمریسم مخلوط نشان دهنده‌ی حضور سلول‌های دهنده و سلول‌های گیرنده در درون گردش خـون شخص گیرنده‌ی پیوند می‌باشد. بیشتر گزارش‌ها وجود ۵ تـا ۱۰ درصـد سـلول‌هـای مـیزبان را به عنوان ملاکی برای کایمریسم مخلوط در نظر می گیرند (۳،۲).

از روش‌هـای مختلفـی بـرای ارزیابـی کایمریسم بعد از پیوند اسـتفاده شـده اسـت. مـیزان حساسیت ونوع سلول مورد نیاز جهـت تجـزیه و تحلـیل در هر روش متفاوت است. بنابراین مـیزان کایمریسـم گـزارش شـده بسـته بـه روش، مـتفاوت مـی‌باشـد. از روش‌های رایج می‌توان به آنالیز کاریوتایپ، پلی مرفیسـم هـای پروتئینی، بررسی آنتی ژن اریتروسیتی، تکنیک FISH[2] و روش‌هـای مبتنـی بر دی ان آ اشاره نمود(۹-٤). هر یـک از روش‌هـای فـوق دارای مـزایا و معایبـی می باشند. به عـنوان مـثال از انجـام کاریوتایپ به طور وسیع در پیوند مغز اسـتخوان استفاده شده است. اما این روش در مورد پیوندهای دارای دهـنده و گـیرنده‌ی غـیر هـم جـنس و در زمانـی کـه کـروموزوم Y بـه عـنوان شـاخص پـیوند اسـتفاده مـی شود، بیشـترین کاربـرد را دارد. کشـف پلـی مرفیسـم های تکراری پشـت سـرهم کوتـاه (STR)[3] تحول عظیمی در علم بیولوژی مولکولـی ایجـاد کرده است. این توالی‌ها که از آن‌ها به عنوان میکروسـاتلایت‌ها[4] هم نام می برند توالی‌های تکرار شونده از ۷ ـ۳ جفـت بـاز از دی ان آ مـی‌باشـند کـه اجـازه بررسـی کایمریسـم را بـه روش پـی سی آر و در حضور تعداد اندکی سـلول گـیرنده‌ی پـیوند فـراهم می نمایند (۱۲-۱۰). از دیگر مـزایای ایـن توالـی‌هـای دی ان آ، تکثـیر سـریع آن‌ها توسط پـی‌سـی‌آر[5] و قدرت بالای تفکیک الل‌های دهنده وگیرنده در بین خواهران وبرادران بر روی ژل پلی اکریل آمید می باشد.

مـا در این مطالعه ، اهمیت بالینی کایمریسم را توسط تجزیه و تحلـیل توالـی‌هـای تکـراری پشت سر هم با استفاده از روش پـی‌سی‌آر مالتیپلکس در طول ٦ ماه بعد از پیوند بر روی خون محیطـی گـیرندگان پـیوند بـه مـنظور پیش‌گویی اولیه گرفتن پـیوند، رد پـیوند یـا عـود قریب الوقوع آن مورد بررسی قرار داده ایم.

مواد وروش‌ها

بـیماران: از بـیماران دارای اخـتلالات بدخـیم و غـیر بدخیم همـاتولوژیک کـه در سـال ۱۳۸۱ به مرکز پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی مراجعه کرده بودند، ۱۰ بیمار کاندید پیوند مغـز استخوان انتخاب شدند. از۱۰ بیمار فوق، ۲ بیمار لوسمی لنفوسـیتیک حـاد، ۲ بیمار لوسمی میلوسیتیک مزمن، ۲ بیمار لوسمی میلوسیتیک حاد، ۳ بیمار تالاسمی و یک بیمار مبتلا به آنمـی آپلاسـتیک بودنـد (جـدول ۱). ۹ نفـر از بیماران دارای خواهـر یـا برادر به عنوان دهنده‌ی پیوند بودند که در۸ نفر از نظر HLA سازگاری، ودر یک نفر (بیمار شماره ٤) در یکی از لوکـوس‌هـای HLA، ناسازگاری وجود داشت. بیمار شماره ۲ از مـادر خـود پیوند دریافت نمود و از نظر HLA در لوکوس DQ بـیمار یـک بلانـک وجـود داشت. یکی از بیماران (بیمار شماره ۷) سلول‌های مغز استخوان و مابقی بیماران، سلول‌های بنـیادی خـون محیطی دریافت داشتند. همه‌ی بیماران فوق در مرکز پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی تحت عمل پیوند قـرار گرفتند و قبل از عمل پیوند، در٦ نفر از بیماران (۱،۲، ۳، ٤، ٦و۷) رژیـم آمـاده سـازی تخریـب مغز استخوان و کاهش دهـنده‌ی سیسـتم ایمنی شامل ترکیبی از داروهای بوسولفان و اندوکسـان اسـتفاده شـد. در ۲ نفـر از بـیماران تالاسـمی

[1] Graft versus luekemia
[2] Fluorescent in situ hybridization
[3] Short tandem repeats
[4] Microsatellites
[5] Polymerase chain reaction

www.SID.ir

Archive of SID

(بیمار شماره‌ی ۸ و۹) و یک بیمار مبتلا به لوسمی مزمن میلوسیتی (بیمار شماره‌ی ۵) از رژیم آماده سازی با شدت کم و کاهش دهنده‌ی سیستم ایمنی شامل ترکیبی از داروهای فلودارابین، بوسولفان و آنتی تیموسیت گلوبولین استفاده شد. در بیمار مبتلا به آنمی آپلاستیک (شماره‌ی ۱۰) فقط از رژیم آماده سازی کاهش دهنده‌ی سیستم ایمنی اندوکسان استفاده شد (جدول ۱).

تعیین کینتیک کایمریسم بر روی ۳۶۰ نمونه‌ی خون ۱۰ بیمار کاندید پیوند مغز استخوان در ماه اول بعد از پیوند و هم‌چنین ۵ ماه پس از پیوند انجام شد. برای این منظور، ۱/۵ میلی‌لیتر خون وریدی برروی EDTA قبل از عمل پیوند از دهنده و گیرنده گرفته می‌شد. بعد از عمل پیوند نمونه‌گیری به صورت روزانه تا یک ماه و سپس به طور ماهانه تا ماه ششم، انجام گرفت.

در این مطالعه شمارش گلبول‌های سفید و پلاکت به وسیله‌ی دستگاه شمارشگر MS9 ساخت کشور فرانسه (از نمونه‌هاییکه به طور هم زمان برای انجام اس‌تی‌آر ـ پی‌سی‌آر گرفته می‌شد) انجام شد. طبق معیارهای بین المللی، موفقیت هماتولوژیکی پیوند شامل موفقیت پیوند سلول‌های سفید به عنوان اولین روزی که افزایش پایدار لوکوسیتی به بالای ۱۰۰۰ در هر میلی لیتر و شمارش مطلق نوتروفیلی بالای ۵۰۰ در هر میلی لیتر باشد، و موفقیت پیوند پلاکت به عنوان اولین روزی که افزایش پایدار پلاکتی پیوند بالای ۲۰۰۰۰ در هر میلی لیتر باشد، تعیین شد.

استخراج DNA ژنومی: استخراج دی ان آ توسط روش‌های مختلفی انجام شد که شامل روش‌های استفاده از کیت QIAGEN، پروتئیناز k، فنل کلروفرم و جوشانیدن می‌باشد. در این مطالعه، در اکثر موارد جهت استخراج دی ان آ از روش جوشانیدن استفاده شد .

پرایمرها: در این مطالعه از ۱۲ جفت پرایمر برای لوکوس‌های ARA, ADA, D16S539, D7S820, D13S317 ، VWA, CSF1PO, TPOX ،F13A1, FES/FPS ، D4S2366 و HUMTH01 برای تکثیر نواحی اس‌تی‌آر مربوطه استفاده شد.

اس‌تی‌آر ـ پی‌سی‌آر: برای هر بیمار مخلوطی از اجزای زیر داخل یک لوله اپندورف ریخته شد: ۵ میکرو لیتر از بافر ۱۰ بار غلیظ شده (محتوی کلرید منیزیوم)، ۲ میکرو لیتر از هر یک از پرایمرهای فوروارد و معکوس (غلظت ۱۰ میکرو مولار)، ۲ میکرو لیتر از هر یک از dNTP (۱۰ میلی مولار)، یک واحد آنزیم تک پلی مراز و ۱۰۰ تا ۲۰۰ نانو گرم از دی ان آ بیمار.حجم کل واکنش توسط آب مقطر به ۵۰ میکرو لیتر رسانیده می‌شد سپس لوله‌ها در ترمال سایکلر اپندورف (آلمان) قرار داده می‌شدند تا دی ان آ طبق برنامه‌ی مشخص تکثیر شود.

مالتیپلکس پی سی آر [6]: یکی از روش‌های تغییر یافته‌ی پی‌سی‌آر معمولی، روش مالتیپلکس پی سی آر است. در این روش در هر لوله‌ی پی‌سی‌آر به جای یک جفت پرایمر از چندین جفت پرایمر اختصاصی استفاده شد. در این مطالعه، از لوکوس‌های D7S820 , D16S539 ، D4S2366 و لوکوس‌های FES/FPS ,F13A1, VWAو هم‌چنین از لوکوس‌های CSF1PO, TPOX و HUMTH01 به صورت مالتیپلکس در یک واکنش استفاده شد.

الکتروفورز ژل وقابل رؤیت کردن باندها: محصولات پی‌سی‌آر بر روی ژل آگارز ۳ –۱/۵ درصد در بافر TBE الکتروفورز شدند تا باندهای دی ان آ قابل دید شوند. جهت رنگ آمیزی ژل از اتیدیوم بروماید(۱۰ میلی گرم در میلی لیتر) استفاده شد.

الکتروفورز بر روی ژل پلی اکریل آمید[7]: برای این منظور از ژل پلی اکریل آمید شش درصد استفاده شد. ۱/۵ تا ۲ میکرولیتر از نمونه های پی‌سی‌آر شده را با ۱میکرولیتر از بافر لکه گذاری مخلوط کرده، و درون چاهک های ژل ریخته

[6] Multiplex-PCR

[7] Polyacrylamid gel electrophrosis

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱ ـ مشخصات بیماران گیرنده‌ی پیوند مغز استخوان و وضعیت کایمریسم در آن‌ها

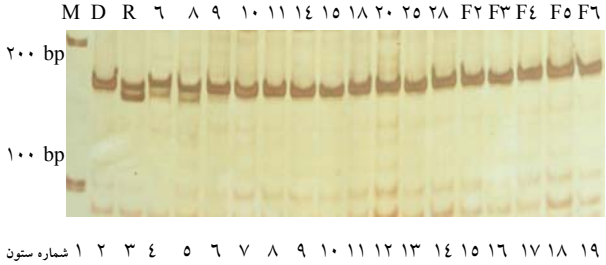
ردیف	جنس	سن (سال)	تشخیص	رژیم آماده سازی	روز کایمریسم	روز برقراری پیوند سلول‌های سفید	روز برقراری پیوند پلاکت‌ها
۱	مذکر	۲۳	لوسمی لنفوسیتی حاد	BU,EN	+۱۰	+۱۰	+۱۰
۲	مذکر	۲۳	لوسمی لنفوسیتی حاد	BU,EN	+۱۲	+۱۰	+۹
۳	مؤنث	۱۸	لوسمی میلوسیتی حاد	BU,EN	+۹	+۹	+۱۱
٤	مذکر	۱۹	لوسمی میلوسیتی حاد	BU,EN	کایمریسم مخلوط	+۱۲	+۱۳
٥	مذکر	٤۳	لوسمی میلوسیتی مزمن	FLU,BU, ATG	+۱٥	+۱۲	بدون تغییر
٦	مذکر	۲۳	لوسمی میلوسیتی مزمن	BU,EN	+۱۲	+۱۲	+۱۲
۷	مذکر	٤	تالاسمی	BU,EN	+۱٤	+۱۲	+۲٥
۸	مؤنث	۱٤	تالاسمی	FLU,BU, ATG	ماه دوم	بدون تغییر	+۱۹
۹	مؤنث	۲٤	تالاسمی	FLU,BU, ATG	کایمریسم مخلوط	بدون تغییر	بدون تغییر
۱۰	مؤنث	۲٤	آنمی آپلاستیک	EN	+۱۱	+۸	+۸

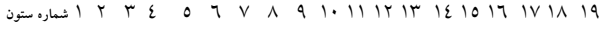
BU : بوسولفان، EN : اندوکسان، FLU : فلودارابین، ATG : آنتی تیموسیت گلوبولینی، NC: بدون تغییر

می‌شد. ژل در ولتاژ ۱۲۰ برای مدت ۱۲-۱۰ ساعت الکتروفورز می شد. پس از اتمام الکتروفورز، باندهای دی ان آ توسط رنگ آمیزی نقره قابل رؤیت شده و در نهایت باندهای به دست آمده، در ناحیه‌ی مورد نظر تفسیر می‌شدند. حساسیت پی‌سی‌آر برای لوکوس‌های موردنظر توسط مخلوط کردن نمونه‌های دی ان آ قبل ازپیوند دهنده وگیرنده با انجام یک توالی غلظتی انجام شد. حساسیت به صورت کمترین غلظتی از دی ان آ که یک باند اس‌تی‌آر قابل رؤیت روی ژل پلی‌اکریل‌آمید رنگ‌آمیزی شده با نیترات نقره ایجاد بکند، تعیین شد.

یافته‌ها

نمونه‌های دهنده و گیرنده قبل از پیوند مغز استخوان با پرایمرهای مورد نظر، پی‌سی‌آر شده و جهت تعیین هتروزیگوسیتی، برروی ژل پلی‌اکریل‌آماید الکتروفورز شدند این پرایمرها ۱۲ لوکوس مختلف را بر روی کروموزوم X وسایر کروموزوم‌ها تکثیر می نمایند. در این مطالعه اکثر دهندگان وگیرندگان برای چند ناحیه‌ی مورد مطالعه پلی مرفیک بودند. بیشترین پلی مرفیسم ها برای لوکوس های D4S2366, D16S539, HUMTH01, VWA و TPOX به دست آمد (شکل ٤ـ۱). حساسیت پی‌سی‌آر در نشان دادن درصد سلول‌های دهنده برای ژن‌ها ولوکوس‌های مختلف، حساسیتی از ۱ تا ۲ درصد را نشان داد. بررسی دی ان آ خون محیطی همه‌ی بیماران در ۲٤ ساعت اول بعد از پیوند حضور کایمریسم مختلط را نشان می داد. در اکثر بیماران کایمریسم مخلوط ادامه داری در طول روزهای اول ودوم هفته‌ی اول بعد از پیوند مشاهده شد. در ۷ بیمار (٦،۷،۱۰،۱،۲،۳،٤) این حالت تا روز ۹+ ادامه داشت و اکثر این بیماران در فاصله‌ی بین روزهای ۹+ تا ۱٤+ به کایمریسم کامل دست یافتند. در شکل‌های (۱) و (۲) تغییرات کایمریسم مخلوط به کایمریسم کامل در ۳ بیمار نشان داده شده است.





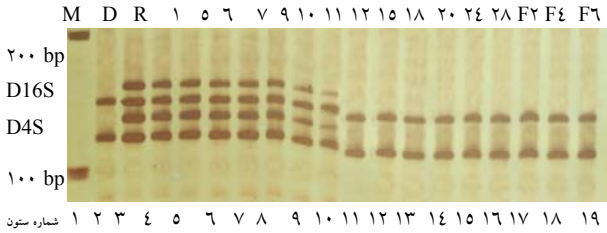
شکل ۱ـ الکتروفورز نمونه دهنده وگیرنده بیمار شماره‌ی ۱ برای لوکوس D16S539 بر روی ژل پلی اکریل آماید ٦ درصد

M:شاخص وزن مولکولی(۱۰۰ جفت بازی)، D : دهنده، R:گیرنده، ستون‌های ٤ تا۱۹ روزهای بعد از پیوند را نشان میدهد،F: ماه‌های پی‌گیری

www.SID.ir

Archive of SID

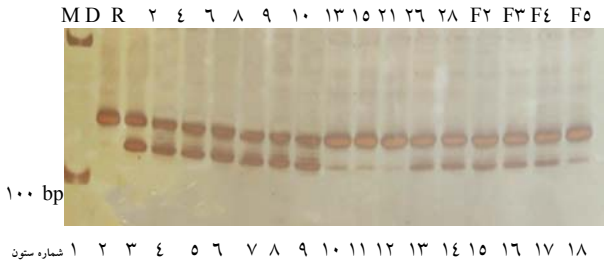
همان‌طور که در شکل (۱) ملاحظه می‌شود آلل‌های دهنده (D) برای *لوکوس* D16S539 هموزیگوس، و آلل‌های گیرنده (R) هتروزیگوس می‌باشد. اندازه‌ی باندها در محدوده‌ی ۱۷۰ جفت باز است. در روزهای ٦+ ، ۸+ و ۹+ الگوی کایمریسم مخلوط مشاهده می‌شود ودر روز ۱۰+ بیمار به حالت کایمریسم کامل می‌رسد و تا آخر پایدار می‌ماند (ستون‌های ۱۹- ۷، کایمریسم کامل را نشان می دهد).



شکل ۲ ـ الکتروفورز نمونه‌ی دهنده و گیرنده بیمار شماره‌ی۲ با لوکوس D16S539 و D4S2366 به صورت مالتیپلکس بر روی ژل پلی اکریل آماید٦ درصد

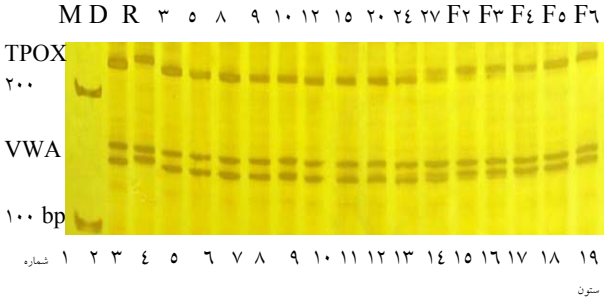
در شکل (۲) ملاحظه می‌شود که آلل‌های دهنده (D) برای دو لوکوس *D16S539* و *D4S2366* هموزیگوس، وآلل‌های گیرنده (R) هتروزیگوس می باشد. اندازه باندها در محدوده‌ی ۱۲۰ـ۱۷۰ جفت باز می‌باشد. در روزهای ۱+، ۵+ ،٦+ ، ۷+، ۹+ ،۱۰+ و ۱۱+ الگوی کایمریسم مخلوط مشاهده می‌شود ودر روز ۱۲+ بیمار به حالت کایمریسم کامل می رسد وتا آخر پایدار می‌ماند (ستون‌های ۱۹-۱۱ کایمریسم کامل رانشان می دهد).

در دو نفر از بیماران(٤و۹) که در یکی از آن‌ها (بیمار ٤)، رژیم آماده سازی کم شدت استفاده شده بود، کایمریسم مخلوط پایداری از ابتدا تا انتهای پی گیری (ماه ٦) مشاهده شد (شکل ۳). در مجموع بررسی‌های متوالی، یک افزایش تدریجی سیگنال آللیک اختصاصی دهنده که بر آلل‌های اختصاصی گیرنده، در بین روزهای ۹ تا ١٤، غالب می‌شدند را نشان داد.



شکل ۳ ـ نتیجه‌ی الکتروفورز نمونه‌ی دهنده وگیرنده بیمار شماره‌ی ٤ با لوکوس‌های D16S539 و D4S2366 به صورت مالتیپلکس بر روی ژل پلی اکریل آماید ٦ درصد

شکل (۳) نشان می‌دهد که آلل‌های دهنده(D) برای لوکوس *D16S539* و *D4S2366* هموزیگوس، و آلل‌های گیرنده (R)هتروزیگوس می‌باشد. اندازه باندها در محدوده‌ی ۱۳۵ جفت باز است. در همه‌ی روزها الگوی کایمریسم کامل مشاهده می شود و تا آخر پایدار می ماند.



شکل ٤ ـ نتیجه الکتروفورز نمونه‌ی دهنده و گیرنده بیمار شماره‌ی۱۰ برای لوکوس‌های D16S539 و D4S2366 به صورت مالتیپلکس بر روی ژل پلی اکریل آماید ٦ درصد

همان‌طور که در شکل (٤) ملاحظه می‌شود آلل‌های دهنده (D) و گیرنده(R) برای لوکوس *VWA* هتروزیگوس است که یکی از آلل‌های آن‌ها (آلل فوقانی) هم‌پوشانی دارد. اندازه باندها در محدوده‌ی ۱۵۰ جفت باز است و برای لوکوس TPOX، آلل‌ها به صورت هموزیگوس است که باند دهنده وگیرنده با هم اختلاف سایز دارند و اندازه‌ی باندها در محدوده‌ی ۱۲۵ جفت باز می باشد. آن چنان که مشاهده می‌شود در هر دو لوکوس تا روز ۲٤+ فقط الگوی باند گیرنده مشاهده می شود سپس بیمار در روزهای ۲٤+، ۲۸+، ماه دوم(F_2) ،ماه سوم (F_3) وتا ماه پنجم (F_5) الگوی کایمریسم

www.SID.ir

Archive of SID

مخلوط را نشان می دهد.

در بیمار شماره‌ی ۸ که از رژیم آماده سازی کم شدت برای او استفاده شده بود، آلل اختصاصی بیمار تا روز ۲٤+ مشاهده شد و سپس بیمار الگوی کایمریسم مخلوط را نشان داد و در نهایت در ماه پنجم به کایمریسم کامل دست یافت.

در این مطالعه موفقیت هماتولوژیکی پیوند در فاصله‌ی بین روزهای ۹ تا ۱٤ به دست آمد. تقریبا در همه‌ی بیماران در روزهای ابتدایی، شمارش اولیه‌ی گلبول‌های سفید بیمار شروع به افت می‌کرد و تاچند روز در این افت سلولی باقی می‌ماند (متوسط۵روز) و سپس شروع به افزایش سلولی می‌نمود. موفقیت پلاکتی پیوند در فاصله روزهای ۹ تا ۲۵ به دست آمد (جدول ۱).

بیشتر گیرندگان پیوند ۱تا ۳ روز بعد از موفقیت هماتولوژیکی پیوند یا به طور هم‌زمان، که در فاصله بین روزهای۸ تا ۱۹ صورت می گرفت، کایمریسم کامل را به دست آوردند.

بحث

در این مطالعه نمونه های خون محیطی به دست آمده در ۲٤ ساعت اول بعد از پیوند اغلب وجود کایمریسم مخلوط را نشان داد که نشان‌گر حضور سلول‌های باقی‌مانده از میزبان و سلول‌های در حال گردش دهنده می باشد. در بیشتر بیماران کایمریسم مخلوط ادامه داری در طول روزهای اول و دو هفته اول بعد از پیوند مشاهده شد.

گرفتن پیوند (Engraftment) اغلب توسط عوارض بعد از پیوند از قبیل رد پیوند، GVHD [۸] و عود بیماری، محدود می‌شود. رد پیوند هنگامی مشاهده می‌شود که سلول‌های ایمنی باقی مانده‌ی میزبان به سلول‌های ورودی حمله کنند و در بررسی مولکولی به صورت ناپدید شدن پیشرونده‌ی باند دی ان آ مربوط به الل‌های دهنده بعد از پیوند مشخص می‌شود. GVHD توسعه‌ی یک پاسخ ایمنی را توسط سلول‌های پیوندی بر علیه بافت‌های گیرنده منعکس می نماید. حتی هنگامی که دهنده و گیرنده بافت از نظر HLA مشابه باشند، رد پیوند وGVHD می تواند اتفاق بیافتد. اگر چه این عوارض در نهایت بعد ازپیوند با علایم بالینی مشخص می‌شود، بررسی دی ان آ[۹] می‌تواند در تعیین اولیه‌ی این حوادث مفید باشد. در موارد عود، شکل‌گیری مجدد مجموعه سلول‌های لوکمیک را می‌توان در اغلب موارد با بررسی دی ان آ قبل از عود هماتولوژیکی که باعث شواهد بالینی می‌شود، تعیین کرد (۱۸).

روش ارزیابی وضعیت پیوند در مراحل اولیه‌ی پس از پیوند از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد. تا به حال از روش‌های بسیاری برای بررسی کایمریسم استفاده شده است که در درجه‌ی حساسیت واطلاعاتی که می دهند متفاوت هستند. روش‌هایی که برای کنترل پیوند مغز استخوان استفاده شده‌اند، شامل روش‌های سیتوژنتیک بررسی آنتی ژن‌های اریتروسیتی[۱۰]، بررسی آنتی‌ژن‌های لکوسیت انسانی و پلی مرفیسم سکانس دی ان آ می‌باشد. سیتوژنتیک زمانی مفید است که یک اختلاف کروموزوم جنسی یا اتوزوم وجود دارد. بررسی آنتی ژن‌های اریتروسیت به دلیل دریافت خون توسط گیرندگان پیوند معمولاً مفید نیستند. اما تکنیک‌های مولکولی برای کنترل پیوند، با استفاده از RFLP[۱۱]، VNTR [12] یا ترکیبات مختلفی از VNTR، اس‌تی‌آر و سیتوژنتیک استفاده شده است. تکنیک‌های پی‌سی‌آر اختصاصی کروموزوم Y خیلی حساس هستند اما فقط برای جفت‌های دهنده و گیرنده‌ی از جنس‌های مخالف، قابل استفاده است. تعیین چند شکلی با قطعات متفاوت توسط ساترن بلات، دارای حساسیتی از ۱ تا ۱۰ درصد بوده وتقریبا به ۱۰[٦] سلول احتیاج دارد، که گرفتن این تعداد سلول از بیماران در مراحل اولیه

[8] Graft Versus Host Disease

[۹] DNA Typing

[۱۰] Erythrocyte Typing

[11] Restriction Fragment Length Polymorphisms

[12] Variable Number of Tandem Repeats

www.SID.ir

Archive of SID

پیوند مشکل می‌باشد. از طرفی روش ساترن بلات روش وقت‌گیری بوده و نیازمند پروب‌های رادیو اکتیو می‌باشد (۹ـ٤). از چند شکلی‌های با طول قطعات متفاوت یا مینی ساتلایت‌ها نیز برای بررسی وضعیت کایمریسم بعد از پیوند استفاده می‌شود ولی تکثیر این نواحی همواره با مشکلاتی روبرو بوده است. در حال حاضر توالی‌های اس‌تی‌آر، بهترین شاخص‌های ژنتیکی در بررسی کایمریسم هستند. نزدیک به یک چهارم از لوکوس‌های اس‌تی‌آر انسان پلی مرفیک می‌باشند ویک منبع غنی از شاخص‌های ژنتیکی را فراهم می‌کنند. بررسی کردن نتایج اس‌تی‌آر سریع بوده و کاری مطمئن ودقیق را نسبت به دیگر روش‌های پی‌سی‌آر، از جمله قطعات طولانی مثل چند شکلی‌های با طول قطعات متفاوت فراهم می کند. حساسیت تکنیک اس‌تی‌آر وابسته به پروب‌های استفاده شده بین۱تا ۰/۰۵ درصد بوده و قابل مقایسه با چند شکلی‌های با طول قطعات متفاوت می باشد. ازآنجایی که سکانس‌های اس‌تی‌آر نسبت به این چند شکلی‌ها کوتاه‌تر هستند بنابراین احتمال مداخله‌ی کمی یا تقویت ترجیحی **۱۳**به وسیله دی ان آ شکسته شده وجود ندارد. بنابراین اس‌تی‌آر حساسیت مشابه ومشکلات پتانسیلی کمتری را نسبت به چند شکلی‌هایی با طول قطعات متفاوت دارد (۱۹). مالتیپلکس پی‌سی‌آر روشی از پی‌سی‌آر می‌باشد که امکان بررسی چند ژن را در یک واکنش پی‌سی‌آر فراهم می نماید. از آنجا که بررسی نتایج در این روش نسبت به پی‌سی‌آر معمولی خیلی سریع‌تر می‌باشد در مطالعه حاضر از روش مالتیپکس پی‌سی‌آر استفاده شد.

طبق یافته های این مطالعه کایمریسم مخلوط ادامه داری در طول روزهای اول و دو هفته بعد از پیوند مشاهده شد که این یافته به طور آشکار نشان‌دهنده‌ی یک تداخل موقتی بین حضور سلول‌های باقی‌مانده یا به تازگی تولید شده‌ی دهنده در خون محیطی می باشد (١٤). در ۷ بیمار کایمریسم مخلوط تا روز ۹+ ادامه داشت و بسته به بیمار، این بیماران در فاصله‌ی بین روزهای ۹+ تا ١٤+ به کایمریسم کامل دست یافتند. باندهای دی ان آ به دست آمده که هر یک معرف یک آلل از دهنده و یا گیرنده می‌باشند توسط نرم افزار مخصوص تعیین مقدار شده و درصد هر باند به صورت کمی محاسبه شد. با توجه به نتایج به دست آمده بررسی متوالی اس‌تی‌آر توسط پی‌سی‌آر افزایش تدریجی سیگنال آللیک اختصاصی دهنده رانشان می داد که در فاصله بین روزهای ۹ تا ١٤ بر آلل‌های اختصاصی گیرنده غالب می شدند.

در این مطالعه موفقیت پیوند از نظر هماتولوژیکی در فاصله بین روز های ۸ تا ۱۹ به دست آمد. تقریبا در همه‌ی بیماران، شمارش اولیه‌ی سلول‌های سفید شروع به افت می‌کرد و تا چند روز در این افت سلولی باقی می‌ماند که این حالت به علت اثر داروهای آماده سازی بود و سپس شروع به افزایش می‌نمود که این می‌تواند بیان‌گر این واقعیت باشد که سلول‌های پیوندی از شخص دهنده شروع به تکثیر وتمایز کرده و وارد خون محیطی شده‌اند (١٤). در اکثر بیماران در همان آغاز موفقیت هماتولوژیکی پیوند و یا ۱ تا ۳ روز بعد از آن کایمریسم کامل را به دست آوردند، که نشان دهنده‌ی آن است که وقتی سلول‌های پیوندی تزریق می‌شوند، مدتی طول خواهد کشید تا سلول‌ها در مغز استخوان مستقر و شروع به تمایز و تکثیر نمایند(١٤).

ارزیابی کایمریسم مخلوط در طول مراحل بعد از پیوند ممکن است شناسایی تغییراتی که علامت رد، یعنی افزایش نسبی یا عود سیگنال‌های آللیک اختصاصی گیرنده در نمونه های سلولی بررسی شده باشد را میسر سازد (۲۰). تعیین زودرس و به موقع رد آلوگرافت می‌تواند در تصمیم برای روش درمانی مناسب نقش مهمی داشته باشد و از جمله در تنظیم درمان ایمنوساپرسیو ،تجویز تزریق لنفوسیت دهنده **١٤** یا یک پیوند آلوژنیک دوم اهمیت دارد (۲۱). بیمارانی که پیوند سلول بنیادی یا مغز استخوان را برای درمان اختلالات بدخیم هماتولوژیک دریافت می‌کنند، تعیین کایمریسم گیرنده در

[13] Preferential amplification

[14] Donor Lymphcyte Infusion

www.SID.ir

Archive of SID

حال افزایش درون نمونه‌های لکوسیت مشتق شده از خون محیطی ممکن است نشان‌گر عود آغازین، رد پیوند یا برگشت اتولوگوس باشد. از آن جایی که بررسی ژنوتیپ، فقط شواهد غیر مستقیمی از حضور جمعیت سلولی لوکمیک را فراهم می‌کند، تکنیک‌های دیگری که اجازه شناسایی شاخص‌های اختصاصی بیمار از قبیل یک ژن بدخیم بیماری یا شاخص‌های کلونالیتی از قبیل ژن ایمونوگلبولین یا باز آرایی گیرنده سلول T را می‌دهد، می‌بایست در هر زمان ممکن برای تایید منشاء لوکمیک سلول‌های گسترش یافته به کار رود (۲۱). از این رو استفاده از روش‌هایی مشابه مطالعه‌ی حاضر در این گونه موارد توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

برخود لازم می‌دانیم از کلیه‌ی بیمارانی که جهت این مطالعه نمونه‌ی مغز استخوان و یا خون محیطی در اختیار ما قرار دادند تشکر و سپاسگزاری نمائیم. هزینه این مطالعه توسط مرکز ملی تحقیقات علوم پزشکی کشور تامین گردید. از این روی از مسئولین مربوطه کمال تشکر و قدردانی را داریم

منابع

1 - Thiede C, Bornhauser M, Oelschlagel U, etal. Sequential monitorring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers. ***Leukemia*** 2001; 15: 293-302.

2 -Barta A, Batai A, Kelemen E, Lengyel L, Remenyi P, Sipos A. Immunological importance of chimerism in transplantation:new conditioning protocol in BMT the development of chimeric state. ***Human Immunol*** 2000;61:101-10.

3 - Antin JH, Cbilds R, Filipovicb AH, et al. Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic trasplantation: recommendation from a workshop at the 2001 tandem repeat meetings. ***Biol Blood Marrow Transplant*** 2001; 7: 473-85.

4 - Zehnbaure B, Griffin C, Santos G, Wagner J. Compartion of molecular and cytogenetic methods in the evaluation of engraftment following allogeneic bone marrow transplantation. ***Cancer Genet Cytogenet*** 1991; 55: 181-190.

5 - Gozzetti A, Le Beau MM. Fluorescent in situ hybridization uses and limitations. ***Seminar Hematology*** 2000; 37(4): 320-33.

6 - Rondon G, Giralt S, Periera M, etal. Analysis of chimerism following allogenic bone marrow transplantation by fluorescent in situ hybridization. ***Leuk Lymphoma*** 1997; 25(5-6):463-7.

7 - Yam PY, Petz LD, Knowlton RG, et al. Use of DNA restriction length polymorphisms to document marrow engraftment and mixed hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation. ***Transplantation*** 1987; 43: 399-407.

8 - Sreenan JJ, Pettay JD, Tbakhi A, et al. The use of amlifid variable number of tandem repeats (VNTR) in the detection of chimerism following bone marrow transplantation: a compartion with restriction fragment length polymorphism (RFLP) by Southern Blotting. ***Am J of Clin Pathol***1997; 107: 292-8.

9 - LeClair B, Fregeau CJ, Aye MT, Fourney RM. DNA typing for bone marrow engraftment follow-up after allogenic transplant: a comparative study of current technologies. ***Bone Marrow Transplant***1995; 16: 43-55.

10 - Schichman SA , Suess P, Vertino AM, Gray PS. Comparison of short tandem repeat and variable number tandem repeat genetic markers for quantitative determination of allogeneic bone marrow transplant engraftment. ***Bone Marrow Transplant*** 2002; 29: 243-8.

www.SID.ir

Archive of SID

11 - Edwards Al, Civitello A, Hammnd HA, Caskey CT. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. ***Am J Hum Genet*** 1991; 49 :746-56.

12 - Thiede C, Florek M, Bornhauser M, et al. Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. ***Bone Marrow Transplantn*** 1999; 23: 1055-60.

13 - Kolger G, Hernandez A, Heyll A, Wolf HH, Wernet P. Qualitative assessment of mixed chimerism after allogenic bone marrow transplantation with regard to leukemic relapse. ***Cancer Detect Prev*** 1996; 20(6): 601-9.

14 - Briones J, Urbano-Ispizua A, et al. Study of hematopoietic chimerism following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation using PCR amplification of short tandem repeats. ***Ann hematol*** 1996; 72 : 265-8.

15 - McCann SR, Lawler M. Mixed chimerism; detection and significance following BMT. ***Bone Marrow Transplant*** 1993; 11: 91-7.

16 - Nakao S, Nakatsumi T, Chuhjo T, et al. Analysis of late graft failure after allogeneic bone marrow transplantation: detection of residual host cells using amplification of variable number of tandem repeats loci. ***Bone Marrow Transplant*** 1992; 9: 107-11.

17 - Gleissner B, Blau IW, Sindram A, Reinhardt R, Knauf W, Thiel E. Analysis of chimerism during the period after allogeneic peripheral stem cell transplantation. ***Clin Lab Haematol*** 2001; 23: 401-6.

18 - Scharf SJ, Smith AG, Hansen JH, McFarland C, Erlish HA. Quantitative determination of bone marrow transplant engraftment using polymerase chain reaction primers for human identity markers. ***Blood*** 1995; 85(7): 1954-63.

19 -Frankel W, Chan A, Corringham RET, Shepherd S, Rearden A, Wang-Rodriguez J. Detection of chimerism and early engraftment after allogeneic peripheral blood stem cell or transplantation by short tandem repeats. ***Am J Hematol*** 1996; 52: 281- 7.

20 - Dubovsky J, Daxberger H, Fritsch G, et al. Kinetics of chimerism during the early post-transplantation period in pediatric patients with malignant and non-malignant hematologic disorders:implication for timely detection of engraftment,graft failure and rejection. ***Leukemia*** 1999; 13 : 2060-9.

21 - DeWeger RA, Tilanus MJT, Scheidel KC, VanDen Tweel JG, Verdonck LF. Monitoring of residual disease and guided donor leucocyte infusion after allogeneic bone marrow transplantation by chimerism analysis with Short Tandem Repeats. ***Br J of Haematol*** 2000; 110: 647-53.

www.SID.ir