خون
دوره ۵ شماره ۳ پاییز ۸۷ (۱۶۶-۱۵۷)

تشخیص مولکولی لنفومای غیر هوچکین از نوع سلول B با استفاده از بررسی بازآرایی ژنی زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین

ابوالفضل یوسفیان[۱]، دکتر بهزاد پوپک[۲]، دکتر حسن ابوالقاسمی[۳]، دکتر آزیتا آذرکیوان[۴]، دکتر محمد فرهادی لنگرودی[۵]، دکتر علیرضا صادقی‌پور[۶]، دکتر مژگان جیحونیان[۶]، دکتر سید محمد جوادپور خیاط[۶]، دکتر خندان زارع[۷]، کبری فراهانی[۸]، میترا صلاحمند[۹]

چکیده

سابقه و هدف

بازآرایی قطعات ژنی V ، D و J زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین همراه با اضافه و حذف شدن نوکلئوتیدها بین قطعات بازآرایی شده، موجب شکل‌گیری مناطق فوق متغیر منحصر به فرد می‌گردد. از این مناطق می‌توان برای بررسی کلونالیتی سلول B به منظور تشخیص مولکولی لنفومای غیر هوچکین و نیز تشخیص قطعی موارد مشکوک استفاده کرد. هدف از مطالعه حاضر استفاده از بازآرایی زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین در تشخیص مولکولی و افتراقی لنفومای غیرهوچکین از موارد واکنشی بود.

مواد وروش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع گذشته‌نگر بود. برای انجام مطالعه حاضر، بلوک‌های پارافینه ۴۲ بیمار با تشخیص پاتولوژیک لنفوم غیر هوچکین سلول B (۲۲ بیمار)، هایپرپلازی واکنشی و فولیکولار(۱۰ بیمار)، لنفوم بدخیم بدون ایمونوهیستوشیمی(۱۰ بیمار) از بخش پاتولوژی بیمارستان‌های آیت‌ا... طالقانی، حضرت بقیه‌ا... و حضرت علی‌اصغر جمع‌آوری شدند. پس از استخراج DNA و انجام مراحل کنترل کیفی، PCR با استفاده از آغازگرهای مشترک برای تکثیر مناطق CDR-III انجام شد. محصولات PCR پس از آنالیز هترودوبلکس روی ژل پلی‌آکریل آمید الکتروفورز شده، با استفاده از رنگ‌آمیزی نقره مشاهده و بررسی گردید.

یافته‌ها

۷۷٪ از(۹۵٪ :CI) گروه اول بیماران(تشخیص قطعی لنفوم غیر هوچکین سلول B) و ۷۰٪ (۹۵٪:CI) از گروه سوم(با تشخیص لنفوم بدخیم بدون ایمونوهیستوشیمی) بازآرایی کلونال را نشان دادند. در گروه دوم(هایپرپلازی واکنشی و فولیکولار) موردی از بازآرایی کلونال دیده نشد.

نتیجه گیری

با اندکی تفاوت، یافته‌های مطالعه حاضر با مطالعات متعددی که تاکنون در کشورهای مختلف انجام شده قابل مقایسه است و نشان می‌دهد که بررسی کلونالیتی سلول B با استفاده از IgHPCR روشی مفید و کمک کننده برای دست‌یابی به تشخیص دقیق‌تر یا قطعی لنفوم غیر هوچکین از نوع سلول B در بیماران ایرانی مبتلا می‌باشد.

کلمات کلیدی: **بازآرایی ژنی، لنفوم غیر هوچکین، ایمونوگلوبولین**

تاریخ دریافت : ۸۶/۵/۱۰
تاریخ پذیرش : ۸۷/۷/۱۷

۱ـ دانشجوی کارشناسی ارشد هماتولوژی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۲ـ مؤلف مسؤول: PhD هماتولوژی ـ استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران ـ صندوق پستی: ۱۹۲۹۵/۱۴۹۵
۳ـ فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی کودکان ـ استاد مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا...
۴- فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی کودکان ـ استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۵ـ متخصص آسیب‌شناسی ـ استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۶ـ متخصص آسیب‌شناسی ـ استاد دانشگاه علوم پزشکی ایران
۷- متخصص آسیب‌شناسی ـ استاد دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۸ـ کارشناس علوم آزمایشگاهی ـ دانشگاه آزاد اسلامی واحد پزشکی تهران
۹ـ کارشناس علوم آزمایشگاهی ـ آزمایشگاه پیوند

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

لنفوماهای غیر هوچکین با فنوتیپ سلول B ، جزو شایع‌ترین بدخیمی‌های لنفوئید بوده و ۵ درصد کل بدخیمی‌های انسان را تشکیل می‌دهند(۱). این نوع از لنفوم‌ها، گروه هتروژنی از بدخیمی‌ها هستند که سلول‌های آن‌ها شبیه سلول‌های غدد لنفاوی طبیعی است(۲).

تشخیص مولکولی لنفوم‌های غیر هوچکین از نوع سلول B و T با اطلاعات حاصل از روش‌های مختلف انجام شده و با پیشرفت‌های تکنولوژی، محدود به ارزیابی هیستوپاتولوژیک نمی‌باشد. در طی بیست سال گذشته، استفاده از شاخص‌های سلولی مختلف در روش‌های ایمونوهیستوشیمی جایگاه ویژه و مهمی را در تشخیص لنفوم‌ها ایفا کرده است. در ایران نیز تاکنون غالباً ایمونوهیستوشیمی به عنوان آزمایش تاییدی و طبقه‌بندی لنفوم به کار رفته است.

روش‌های تشخیص مولکولی لنفوم‌ها با استفاده از تعیین کلونالیتی با ارزیابی ژن‌های گیرنده آنتی‌ژن و نیز تعیین ترانس لوکاسیون‌های کروموزومی اختصاصی انجام می‌شود(۴، ۳). با استفاده از روش‌های مختلف واکنش زنجیره پلی‌مراز(PCR)، می‌توان بازآرایی ژن‌های زنجیره‌های سنگین(IgH) و سبک(IgK) ایمونوگلوبولین و گیرنده لنفوسیت T از نوع گاما(TCRγ) را برای تعیین کلونالیتی در لنفوم به کار برد.

در طی تکامل لنفوسیت‌ها، قطعات ژنی متغیر(V)، تنوع(D) و اتصال(J) به هم نزدیک و متصل شده و DNA حدفاصل آن‌ها حذف و منجر به بازآرایی V (D) J می‌شود. علاوه بر این نوکلئوتیدهایی به طور اتفاقی در بین این قطعات ژنی وارد شده(N-region) که منجر به افزایش تنوع از بازآرایی قطعات مختلف می‌شوند. در اثر این فرآیند بازآرایی، توالی منحصر به فردی تشکیل می‌گردد که برای هر کلون سلول لنفوسیتی اختصاصی است(۶، ۵). تکثیر و ارزیابی ژن‌های بازآرایی شده با روش PCR ، افتراق بین جمعیت کلونال سلول‌های لنفوئیدی که نشان‌دهنده بدخیمی است را از افزایش پلی‌کلونال لنفوسیت‌ها که به خاطر فرآیندهای واکنشی است(Reactive Hyperplasia) امکان‌پذیر می‌سازد.

مواد و روش ها

در بررسی گذشته‌نگر حاضر، بلوک پارافینه ۴۲ بیمار با تشخیص هیستوپاتولوژیک قطعی لنفوم غیر هوچکین، لنفوم بدخیم بدون ایمونوهیستوشیمی و هایپرپلازی فولیکولار و واکنشی از بخش پاتولوژی بیمارستان بقیه‌ا... ، طالقانی و علی‌اصغر جمع‌آوری شده و مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از تهیه مقاطع ۱۰ تا ۱۵ میکرونی از بلوک‌های پارافینه در بخش پاتولوژی بیمارستان جواهری، این مقاطع در میکروتیوب‌های استریل با رعایت موارد استریلیزاسیون و با شماره‌گذاری دقیق قرار گرفت و به بخش تحقیقات هماتولوژی دانشگاه آزاد واحد پزشکی تهران منتقل شد. سپس محتویات میکروتیوب‌ها با محلول گزیلول دپارافینه شده و پس از چند مرحله شستشو با اتانل، با غلظت‌های مختلف مجاورت داده شد. DNA نمونه‌ها با استفاده از کیت High Pure PCR template (رُوش) استخراج گردید. برای اطمینان از کیفیت DNA استخراج شده، مراحل کنترل کیفی شامل تعیین غلظت DNA و خلوص آن (۲۶۰/۲۸۰ OD) با بیوفتومتر اپندورف انجام شده سپس DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۲ درصد جهت اطمینان از عدم قطعه قطعه شدن آن الکتروفورز شد. به منظور ارزیابی کیفیت DNA ، آزمایش PCR با آغازگرهای ژن β گلوبین انجام شد. برای ارزیابی بازآرایی ژن زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین از آغازگرهای مشترک استفاده شد. در این واکنش‌ها غلظت $MgCl_2$ ۱/۵ میلی مولار، DNTP ۲۰۰

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

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

Archive of SID
www.SID.ir

میکرومولار، آغازگرها ۱۰ تا ۱۵ پیکومول و آنزیم تک پلی‌مراز به میزان ۱ واحد بوده و DNA بیماران به میزان ۰/۱ تا ۰/۵ میکروگرم در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر تکثیر شد. محصول واکنش PCR ، اول با آب مقطر استریل به نسبت ۱/۵۰۰ رقیق شد و در واکنش دوم PCR به صورت heminested ، یک میکرولیتر از آن به عنوان الگو استفاده شد. PCR با استفاده از دستگاه eppendorf master cycler و طبق جدول ۱ انجام شد.

یافته ها

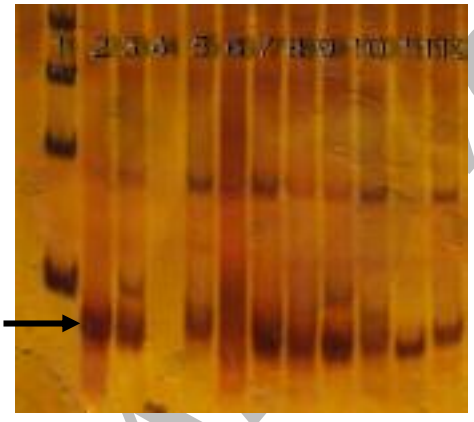
در مطالعه حاضر نمونه‌های به دست آمده از بلوک‌های پارافینه ۴۲ بیمار از نظر بازآرایی کلونال ژن زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین(IgH) با استفاده از PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور تسهیل ارزیابی نتایج به دست آمده از این مطالعه نمونه‌های بیماران در ۳ گروه مجزا طبقه‌بندی گردید(جدول ۲).

گروه اول: نمونه‌های مربوط به ۲۲ بیمار با تشخیص هیستوپاتولوژیک و ایمونوهیستوشیمی قطعی لنفوم غیر هوچکین از نوع سلول B که از بخش پاتولوژی بیمارستان حضرت بقیها... و حضرت علی‌اصغر جمع‌آوری شد.

گروه دوم: نمونه‌های مربوط به ۱۰ بیمار با تشخیص هیستوپاتولوژیک هایپرپلازی واکنشی و یا هایپرپلازی فولیکولار که از بخش پاتولوژی بیمارستان حضرت بقیها... جمع‌آوری گردیده و به عنوان کنترل منفی وارد مطالعه حاضر شدند.

گروه سوم: نمونه‌های مربوط به بلوک پارافینه ۱۰ بیمار با تشخیص مورفولوژیک(بدون ایمونوهیستوشیمی) لنفوم بدخیم که از بخش پاتولوژی بیمارستان آیت‌ا... طالقانی جمع‌آوری شدند و به منظور ارزیابی کلونالیتی در نمونه‌های بدون ایمونوهیستوشیمی وارد مطالعه حاضر شدند.

از ۴۲ بیمار حاضر، ۱۵ نفر مونث و ۲۷ نفر مذکر بودند. میانگین سنی بیماران ۹ ± ۴۵ سال بود. از ۲۲ بیمار گروه اول(موارد با تشخیص قطعی لنفومای غیر هوچکین) ۱۳ بیمار دارای تشخیص لنفوم سلول B بزرگ منتشر، ۲ مورد دارای تشخیص لنفوم فولیکولار، ۲ مورد دارای تشخیص لنفوم بورکیت و ۵ مورد دارای تشخیص لنفوم سلول B (B cell type lymphoma) بودند. از ۲۲ بیمار ذکر شده، بازآرایی کلونال در ۱۷ مورد(۷۷٪) با فاصله اطمینان ۹۵٪ مشاهده گردید. در میان مواردی که بازآرایی کلونال IgH را دارا بودند، ۱۲ مورد بازآرایی منوکلونال(۷۰/۵٪) با فاصله اطمینان ۹۵٪، ۳ مورد بازآرایی بای‌آللیک(۱۷/۶٪) و ۲ مورد بازآرایی الیگوکلونال(۱۱/۷٪) داشتند. هر دو مورد لنفوم فولیکولار و نیز هر دو مورد لنفوم بورکیت بازآرایی کلونال را نشان دادند. از میان ۱۳ مورد DLBCL ، کلونالیتی در ۹ مورد(۶۹٪) مشاهده شد. در ۴ مورد باقیمانده از موارد DLBCL ، PCR از تکرارپذیری مناسب برخوردار نبوده و نتیجه قطعی در تعیین کلونالیتی حاصل نگردید. از ۵ مورد با تشخیص هیستوپاتولوژیک B cell type lymphoma ، بازآرایی کلونال در ۴ مورد(۸۰٪) مشاهده گردید(شکل ۱).



شکل ۱: نتایج بازآرایی ژنی زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین. لاین ۱ مارکر، لاین ۴ مستر میکس، لاین ۳ و ۹ بازآرایی بای‌آللیک را به صورت حضور دو باند نشان می‌دهد. لاین‌های ۲، ۵، ۷، ۸، ۱۰، ۱۱ و ۱۲ بازآرایی مونوکلونال را به صورت یک باند مشخص نشان می‌دهد. لاین ۶ کنترل منفی می‌باشد که به صورت اسمیر واضح پلی‌کلونالیتی را نشان می‌دهد.

در گروه دوم نمونه‌های مربوط به بلوک پارافینه ۱۰ بیمار با تشخیص هیستوپاتولوژیک هایپرپلازی واکنشی و نیز هایپرپلازی فولیکولار از نظر کلونالیتی سلول B مورد ارزیابی قرار گرفتند. در هیچ کدام از بیماران بازآرایی کلونال مشاهده نگردید و پلی کلونالیتی به صورت وجود

Archive of SID
www.SID.ir

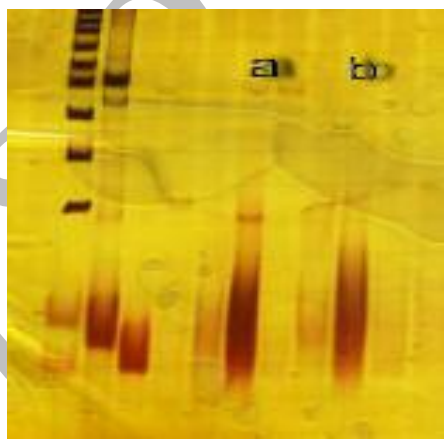
جدول ۲: نتایج بررسی بازآرایی ژنی زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین در ۴۲ بیمار مطالعه حاضر. تشخیص پاتولوژیک و نوع نمونه هر بیمار نیز ذکر شده است.

گروه	شماره بیمار	نوع نمونه	تشخیص پاتولوژیک	PCR : کلونال ـ پلی‌کلونال
اول: لنفومای غیر هوچکین سلول B	۱	بیوپسی توده سینه‌ای	لنفوم سلول B بزرگ منتشر	کلونال
	۲	غده لنفاوی زیر بغلی	لنفوم سلول B بزرگ منتشر	کلونال
	۳	سینوس آرواره‌ای راست	لنفوم سلول B بزرگ منتشر	کلونال
	۴	توده سینه‌ای	لنفوم سلول B بزرگ منتشر	کلونال
	۵	توده گردنی	لنفوم سلول B بزرگ منتشر	کلونال
	۶	توده گردنی	لنفوم سلول B بزرگ منتشر	کلونال
	۷	توده کشاله ران	لنفوم سلول B بزرگ منتشر	کلونال
	۸	غده لنفاوی گردنی	لنفوم سلول B بزرگ منتشر	کلونال
	۹	گاستركتومی	لنفوم سلول B بزرگ منتشر	کلونال
	۱۰	توده کشاله ران	لنفوم سلول B بزرگ منتشر	مشکوک
	۱۱	بیوپسی توده روده‌ای	لنفوم سلول B بزرگ منتشر	مشکوک
	۱۲	تومور زیر پوستی	لنفوم سلول B بزرگ منتشر	مشکوک
	۱۳	غده لنفاوی گردنی	لنفوم سلول B بزرگ منتشر	مشکوک
	۱۴	توده شکمی	لنفوم بورکیت	کلونال
	۱۵	توده کولون	لنفوم بورکیت	کلونال
	۱۶	توده سینه‌ای	لنفوم سلول B	کلونال
	۱۷	توده سینه‌ای	لنفوم سلول B	کلونال
	۱۸	بیوپسی طناب نخاعی	لنفوم سلول B	کلونال
	۱۹	توده گردنی	لنفوم سلول B	کلونال
	۲۰	توده کولون	لنفوم سلول B	مشترک
	۲۱	توده گردنی	لنفوم فولیکولار	کلونال
	۲۲	توده زیر آرواره‌ای	لنفوم فولیکولار	کلونال
دوم: هایپرپلازی واکنشی و فولیکولار	۲۳	غده لنفاوی زیر آرواره‌ای	لنف آدنیت واکنشی	پلی‌کلونال
	۲۴	توده گردنی	لنف آدنیت واکنشی	پلی‌کلونال
	۲۵	توده گردنی	هایپر پلازی واکنشی	پلی‌کلونال
	۲۶	لوزه	هایپر پلازی واکنشی	پلی‌کلونال
	۲۷	لوزه	هایپر پلازی واکنشی	پلی‌کلونال
	۲۸	توده گردنی	هایپر پلازی واکنشی	پلی‌کلونال
	۲۹	لوزه	هایپر پلازی واکنشی	پلی‌کلونال
	۳۰	لوزه	هایپر پلازی واکنشی	پلی‌کلونال
	۳۱	لوزه	هایپر پلازی فولیکولار	پلی‌کلونال
	۳۲	لوزه	هایپر پلازی فولیکولار	پلی‌کلونال
سوم: موارد با تشخیص مورفولوژیک لنفوم بدخیم بدون ایمونوهیستوشیمی	۳۳	غده لنفاوی	لنفوم غیر هوچکین	کلونال
	۳۴	مغز استخوان	تجمع‌های کوچک سلول‌های بدخیم لنفوئیدی	کلونال
	۳۵	غده لنفاوی	لنفوم غیر هوچکین با درجه بالا	کلونال
	۳۶	غده لنفاوی	لنفوم غیر هوچکین با درجه بالا، بورکیت	کلونال
	۳۷	غده لنفاوی	لنفوم بدخیم	کلونال
	۳۸	غده لنفاوی	لنفوم غیر هوچکین با درجه بالا	کلونال
	۳۹	مغز استخوان	لنفوم سلول بزرگ منتشر	کلونال
	۴۰	مغز استخوان	لنفوم سلول بزرگ منتشر	مشکوک
	۴۱	غده لنفاوی	لنفوم بدخیم	مشکوک
	۴۲	غده لنفاوی	لنفوم بدخیم	مشکوک

Archive of SID

www.SID.ir

اسمیر در ناحیه مورد انتظار در ژل پلی‌آکریل آمید مشاهده شد. از آن‌جایی که در مطالعه‌های متعدد انجام شده ، از موارد هایپرپلازی واکنشی به عنوان کنترل منفی در بررسی بازآرایی کلونال استفاده شده است، مشاهده نشدن کلونالیتی در این گروه از بیماران، عدم وجود موارد مثبت کاذب در روش به کار رفته در مطالعه حاضر را نشان می‌دهد(شکل ۲).



شکل ۲: نتایج بازآرایی ژنی زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین در بیماران گروه دوم(هایپرپلازی فولیکولار و واکنشی). در لاین‌های a و b اسمیر واضح قابل مشاهده است.

در گروه سوم(نمونه‌های با تشخیص مورفولوژیک لنفوم بدخیم، بدون ایمونوهیستوشیمی)، ۱۰ بیمار از نظر بازآرایی کلونال بررسی شدند. از ۱۰ بیمار در ۷ مورد(۷۰٪) بازآرایی کلونال به صورت منوکلونالیتی مشاهده شد. ۳ نمونه دیگر در تکرارهای متوالی IgHPCR ، باند مشخص نداشتند و به صورت یک یا دو باند ضعیف در زمینه اسمیر مشاهده گردیدند، بنابراین با عنوان مشکوک یا غیر تشخیصی طبقه‌بندی شدند.

بحث

هدف اصلی مطالعه حاضر ارزیابی کاربرد PCR در شناسایی بازآرایی کلونال ژن زنجیره سنگین ایمونوگلوبولین(IgH) در تشخیص روتین لنفومای غیرهوچکین از نوع سلول B با استفاده از یک جفت آغازگر متصل شونده به ناحیه FR_3 ژن IgH بود.

به منظور تعیین کلونالیتی در نمونه‌های مختلف بیماران، تاکنون از روش‌های گوناگون مانند FISH ساترن بلات و PCR استفاده شده است(۲) در میان این روش‌ها PCR به دلایل گوناگون از جمله امکان استفاده از نمونه‌های ذخیره شده مانند بلوک‌های پارافینه و نیز به علت نیاز به مقادیر بسیار ناچیز نمونه، کاربرد گسترده‌تری یافته است(۷). امروزه ارزیابی بازآرایی ژن IgH با استفاده از PCR یک روش سریع، ساده و در عین حال اقتصادی در تشخیص روتین کلونالیتی سلول B محسوب می‌شود. در مطالعه‌های متعدد، کاربرد IgHPCR به خصوص در دست‌یابی به تشخیص نمونه‌هایی که ارزیای هیستوپاتولوژیک و ایمونوهیستوشیمی در آن‌ها منجر به تشخیص قطعی نمی‌گردد مورد تاکید قرار گرفته است(۹-۷). به عبارت دیگر هر چند ارزیابی هیستوپاتولوژیک در تشخیص اولیه و طبقه‌بندی لنفوم غیر هوچکین هنوز استاندارد طلایی محسوب می‌شود، بر اساس نتایج به دست آمده از تحقیقات گسترده انجام شده، ارزیابی کلونالیتی فرآیندهای لنفوپرولیفراتیو در کنار ایمونوفنوتایپینگ و بررسی مورفولوژیک در راه رسیدن به تشخیص قطعی و دقیق این گروه از بدخیمی‌ها بسیار کمک کننده است(۱۲-۱۰).

در مطالعه حاضر ۷۷٪ بیماران با تشخیص هیستوپاتولوژیک لنفومای غیر هوچکین از نوع سلول B(گروه اول) دارای بازآرایی کلونال بودند. نتیجه حاضر با نتایج به دست آمده از مطالعه‌های متعدد مطابقت دارد. بررسی بازآرایی کلونال با استفاده از IgHPCR بر روی بلوک‌های پارافینه در لنفومای غیر هوچکین از نوع سلول B میزان موفقیتی در حدود ۶۰ تا ۸۵ درصد را دارا می‌باشد(۱۴، ۱۳، ۹).

در گزارشی که کالج پاتولوژیست‌های آمریکا(CAP) در سال ۲۰۰۷ منتشر کرد، بازآرایی کلونال در ۷۶ درصد موارد لنفوم غیر هوچکین سلول B با استفاده از IgHPCR مشاهده شد. بر اساس گزارش فوق، ۳۹ نمونه شامل ۲۹ نمونه دارای بازآرایی(کنترل مثبت) و ۱۰ نمونه فاقد بازآرایی کلونال(کنترل منفی) بین آزمایشگاه‌های مختلف شرکت کننده در این ارزیابی(۱۶۱ آزمایشگاه از آمریکا، کانادا و سایر کشورها) به منظور بررسی بازآرایی ژن IgH توسط PCR توزیع شد(۹).

Archive of SID
www.SID.ir

اویـزل در سـال ۲۰۰۶ بلوک‌های پارافینه ۳۹ بیمار مبتلا به لنفوم سلول B را با استفاده از آغازگرهای مشترک ناحیه FR_3 (IgHPCR) از نظر بازآرایی کلونال مورد ارزیـابی قـرار داد. وی در ۷۹ درصد موارد، بـازآرایی کلونـال را مـشاهده کرد(۱۵). کوزیک نیز از همان روش اویزل استفاده کـرد، و در ۸۱ درصد موارد لنفوم غیر هوچکین از نـوع سـلول B ، کلونالیتی را مـشاهده کـرد(۱۶). نتـایج بـه دسـت آمـده از مطالعـه حاضـر(۷۷٪) بـا نتـایج مطالعـه اویـزل (۷۹٪) و کوزیک(۸۱٪) هم خوانی مناسبی دارد. عدم دست‌یـابی بـه موفقیت ۱۰۰٪ در مشاهده بازآرایی کلونال در مـورد لنفـوم غیر هوچکین، می‌تواند دلایل متعددی داشته باشد. با توجه به تجربیات حاصل از مطالعه حاضر و گزارش‌هـای متعـدد منتشر شده به عوامل زیر می‌توان اشاره کرد:

۱- استفاده از چند جفت آغازگر که علاوه بر ناحیه FR_3 به نواحی دور دست‌تر ژن مانند FR_2 و FR_1 متصل مـی‌شـوند، قـدرت روش IgHPCR را در تعیـین کلونـالیتی افـزایش می‌دهد. در مطالعه حاضر و بسیاری از مطالعـه‌هـای انجـام شـده بـه منظـور ارزیـابی کلونـال لنفومـای بـدخیم، از آغازگرهای متصل شونده به نواحی FR_3 استفاده شده است که به تنهـایی توانـایی بیـشتری در آشکارسـازی کلونـالیتی نسبت به آغازگرهای متصل شونده به FR_1 و FR_2 دارد و در عین حال روشی سـریع، اقتـصادی و بـا قابلیـت کـافی در آشکارسازی کلونالیتی IgH است(۱۸-۱۶).

۲- وجود ترانس لوکاسیون‌های خـاص در مـوارد مختلـف لنفومای غیر هوچکین بر میزان موفقیت در تعیین کلونالیتی اثرگذار است. به طور مثال(۱۸، ۱۴) t در ۸۰ درصد مـوارد لنفوم فولیکولار و ۱۰ تا ۳۰ درصد مـوارد لنفـوم سـلول B بـزرگ منتـشر DLBCL مـشاهده شـده اسـت(۱۹، ۱۶). آغازگرهایی که برای بررسی کلونالیتی توسـط IgHPCR بـه کار می‌روند در صورت وجود این ترانس لوکاسیون قادر به آشکارسازی کلونالیتی نیستند(۲۰، ۱۶). از آن جایی کـه بـر اساس اطلاعات ما تاکنون از ایران هیچ گزارشـی از میـزان شیوع(۱۸، ۱۴) t در مـوارد DLBCL و FL ارایـه نگردیـده، برقـراری ارتبـاط بـین میـزان مـشاهده کلونـالیتی در ایـن بیماری‌ها با میزان شیوع(۱۸، ۱۴) t امکان‌پذیر نمی‌باشد.

۳- DNA استخـراج شـده از بافت‌هـای پارافینـه کیفیـت کمتری نسبت به DNA به دست آمده از بافت‌هـای تـازه و خـون محیطـی دارا مـی‌باشـد(۲۱، ۹). در مطالعـه حاضـر استخراج DNA از بلوک‌های پارافینه در تمـام نمونـه‌هـا بـا توجه به روش‌های کنترل کیفی از جمله PCR ژن β گلوبین و الکتروفورز ژل آگارز، مورد ارزیابی قـرار گرفـت. DNA استخراج شده از تمام نمونه‌ها دارای کیفیت مناسب بـود و هیچ نمونه‌ای از مطالعه خارج نگردید.

۴- میـزان موفقیـت در مـشاهده کلونـالیتی بـه تـشخیص هیستولوژیک لنفوم غیر هوچکین بستگی دارد(۲۲، ۱۶). بـر اسـاس گـزارش‌هـای متعـدد کـه تـاکنون منتـشر شـده، آشکارسازی کلونالیتی در لنفوم فولیکولار و سلول B بزرگ منتشر(DLBCL) با میزان موفقیت کمتری نـسبت بـه سـایر مـوارد لنفـوم ماننـد Mantle cell و لنفـوم بورکیـت همـراه است(۲۳، ۱۹، ۱۶).

در مطالعه حاضر هـر دو مـورد لنفـوم فولیکـولار دارای بازآرایی کلونال بود که بیشتر از مقدار گزارش شده توسـط یاموچی(۶۶٪) و نیکی فوروا(۷۸٪) است(۲۴، ۹).

هم چنین در مطالعه حاضر هر دو مورد لنفـوم بورکیـت دارای بازآرایی کلونال بود که ایـن مقـدار بـا مطالعـه آربـر (۱۰۰٪) مطابقـت دارد و از مطالعـه آمـارا(۶۴/۵٪) بیـشتر است(۲۵، ۱۳).

از ۱۳ مورد DLBCL در مطالعه حاضـر، ۹ مـورد(۶۹٪) دارای بازآرایی کلونال بودند. وفـری در ۵۰ درصـد مـوارد DLBCL کلونالیتی را مشاهده کرد. در اکثر مطالعه‌ها در ۵۰ تـا ۷۰ درصـد DLBCL ، بـازآرایی کلونـال مـشاهده شـده است(۲۵، ۱۰).

از ۲۲ بیمار حاضر در گروه اول بیماران، ۵ بیمار دارای تشخیص هیستوپاتولوژیک B cell type lymphoma بودنـد. از این ۵ مورد در ۴ مورد(۸۰٪) بازآرایی مشاهده شد.

در مطالعـه‌ای کـه توسط فیلیپ و همکاران انجـام شـد، از ۷ بیمار با تشخیص لنفوم سلول B ، در ۶ مـورد(۸۵/۷٪) بازآرایی کلونال مشاهده گردید(۲۶). در مطالعه دیگری کـه توسط رابر و همکاران انجام شـد، بـازآرایی کلونـال در ۵۰ درصد بیماران با تشخیص non classifiable NHL مـشاهده شد که از مقدار مشاهده شده در مطالعه حاضر(۸۰٪) کمتـر است(۱۰).

Archive of SID
www.SID.ir

در گروه دوم بیماران مطالعه حاضر(موارد هایپرپلازی واکنشی و فولیکولار)، بازآرایی کلونال در هیچ کدام از موارد هایپرپلازی مشاهده نگردید. در تمام موارد فوق در ژل پلی‌آکریل آمید، منظره اسمیر مشخص بدون هیچ گونه باند مشاهده گردید بنابراین پلی‌کلونال گزارش شدند. در این گروه از بیماران تشخیص هیستوپاتولوژیک با نتایج به دست آمده از PCR کاملاً مطابقت داشت(۱۰۰٪). به عبارت دیگر از آن جایی که موارد هایپرپلازی واکنشی و فولیکولار به عنوان کنترل منفی وارد مطالعه حاضر شدند، عدم وجود بازآرایی کلونال در این موارد به معنای عدم وجود موارد مثبت کاذب در مطالعه حاضر بود. نتیجه مطالعه حاضر با نتایج مطالعه ترینور(۱۰۰٪) و گونزالز (۱۰۰٪) مطابقت دارد(۲۸، ۲۷). در بررسی گونزالز هنگامی که الکتروفورز روی ژل آگارز انجام شد ۱۸ درصد موارد کنترل منفی(هایپرپلازی واکنشی) به صورت مونوکلونال مشاهده گردید(مثبت کاذب ۱۸٪) اما پس از آنالیز هترودوبلکس و الکتروفورز پلی‌اکریل آمید، موارد مثبت کاذب حذف گردید و پلی‌کلونالیتی در ۱۰۰ درصد موارد دیده شد. در مطالعه حاضر به منظور حذف موارد مثبت کاذب، آنالیز هترودوبلکس برای تمام نمونه‌ها انجام شد که با توجه به نتایج به دست آمده و هزینه بسیار کم، آزمایش بسیار مفیدی برای افتراق موارد کلونال از پلی‌کلونال محسوب می‌شود.

بررسی بازآرایی کلونال IgH با استفاده از PCR از ویژگی بالایی برخوردار بوده و موارد مثبت کاذب آن محدود است. بروز مثبت کاذب به علت ناکافی بودن DNA به کار رفته به عنوان الگو و انتخاب اتفاقی DNA از یک کلون خاص در بررسی کلونالیتی، عدم تکرار PCR و تفسیر بر اساس یک بار انجام آزمایش و عدم آنالیز هترودوبلکس، گزارش شده است(۳۰، ۲۹، ۲۲، ۹).

گروه سوم بیماران مطالعه حاضر(موارد با تشخیص مورفولوژیک لنفومای بدخیم و بدون ایمونوهیستوشیمی)، در ۷۰٪ موارد بازآرایی کلونال داشتند(جدول ۲). ۳۰٪ موارد این گروه پس از آنالیز هترودوبلکس و الکتروفورز پلی‌آکریل آمید در ناحیه مورد انتظار ژل دارای یک یا دو باند ضعیف در زمینه اسمیر بودند و کلونال تلقی نگردیدند. فرمالینی که در اکثر مراکز کشور مورد استفاده قرار می‌گیرد از نوع غیره بافره بوده موجب تخریب آنتی‌ژن‌های سطحی می‌شود و انجام ایمونوهیستوشیمی را با مشکل مواجه می‌سازد. به علاوه برای انجام PCR ، به مقدار ناچیز نمونه نیازمند هستیم در حالی که نمونه با حجم کم برای ایمونوهیستوشیمی مناسب نمی‌باشد.

با توجه به آن چه ذکر گردید و نتایج حاصل از ارزیابی کلونالیتی با IgHPCR در مطالعه حاضر(گروه اول و دوم)، می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از روش مولکولی حتی در صورت عدم انجام ایمونوهیستوشیمی به دلایل مختلف، در دست‌یابی به تشخیص قطعی و دقیق موارد لنفوم غیر هوچکین کمک کننده است.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که استفاده از IgHPCR به منظور تشخیص مولکولی لنفومای غیر هوچکین در کنار سایر روش‌های کمکی مانند ایمونوهیستوشیمی، در دست‌یابی به تشخیص دقیق این گروه از بیماری‌ها بسیار مفید است. به ویژه این که امروزه در سراسر دنیا ارزیابی بازآرایی کلونال سلول B با استفاده از IgHPCR ، یک روش مقرون به صرفه سریع و قابل اعتماد در بررسی معمول فرآیندهای لنفوپرولیفراتیو محسوب می‌گردد. استفاده از این نوع ارزیابی مولکولی به خصوص در موارد مشکوک به لنفومای بدخیم و مواردی که ایمونوهیستوشیمی انجام نشده است به منظور بهبود روند فعالیت‌های تشخیصی و به طبع آن درمان و بهبود عاقبت بیماران ایرانی توصیه می‌گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

References :

1- Stevenson GT, Cragg MS. Molecular markers of B-cell lymphoma. Seminars in cancer biology 1999; 9: 139-147.
2- Kocjan G. Cytological and molecular diagnosis of lymphoma. J clin path 2005; 1: 561-567.
3- Wilkins BS. Molecular genetic analysis in the assessment of lymphomas. Current Diagnostic Pathology 2004; 10: 351–359.
4- Macintyre E, Bahloul M, Asnafi V. Clinical impact of molecular diagnostics in low-grade lymphoma. Best Practice & Research Clinical Haematology 2005; 18(1): 97–111.
5- Meier VS, Rufle A, Gudat F. Simultaneous evaluation of T- and B-cell clonality, t(11;14) and t(14;18), in a single reaction by a four-color multiplex polymerase chain reaction assay and automated high-resolution fragment analysis. Am J Pathol 2001; 159: 2031–2043.
6- Oscier DG, Gardiner AC. Lymphoid neoplasms. Best Practice & Research Clinical Haematology 2001; 14:609–630.
7- Rezuke WN, Abernathy EC, Tsongalis GJ. Molecular diagnosis of B- and T-cell lymphomas: fundamental principles and clinical applications. Clinical Chemistry 1997; 1814–1823.
8- Weirich G, Funk A, Hoepner I, Heidner U, Noll S, Putz B, *et al*. PCR-based assays for the detection of monoclonality in non- Hodgkin's lymphoma: application to formalin-fixed paraffin- embedded tissue and decalcified bone marrow samples. J Mol Med 1995; 73:235–24.
9- Nikiforova M, Hsi E, Braziel R, Gulley M, Leonard D, Nowak J, *et al.* Detection of clonal IGH gene rearrangements: summary of molecular oncology surveys of the College of American Pathologists. Arch Pathol Lab Med 2007;131:185-89.
10- Krober SM, Horney HP, Greschniok A, Kaiserling E. Reactive and neoplastic lymphocytes in human bone marrow: morphological, immunohistological, and molecular biological investigations on biopsy specimens. J Clin Pathol 1999; 52: 521–526.
11- Maes B, Achten R, Demunter A, Peeters B, Verhoef G. Evaluation of B cell lymphoid infiltrates in bone marrow biopsies by morphology, immunohistochemistry and molecular analysis. J Clin Pathol 2000;53: 835–840.
12- Braunschweig R, Baur AS, Delacretaz F, Bricod C, Benhattar J. Contribution of IgH-PCR to the evaluation of B-cell lymphoma involvement in paraffin-embedded bone marrow biopsy specimens. Am J Clin Pathol 2003; 119:634–642.
13- Amara K, Trimeche M, Ziadi S, Sriha B, Mokni M, Korbi S. PCR-based clonality analysis of B-cell lymphomas in paraffin-embedded tissues: Diagnostic value of immunoglobulin κ and λ light chain gene rearrangement investigation. Pathology Research and Practice 2006; 202: 425–431.
14- Fend F, Bock O, Kremer M, Specht K, Quintanilla-Martinez L. Ancillary techniques in bone marrow pathology: molecular diagnostics on bone marrow trephine biopsies. Virchows Arch 2005; 447: 909–919.
15- Oizl H , Hung x , Zhu H . Value of combinational detection by IgH and IgL primers in improving detection rate of lymphoma gene in paraffin-embedded tissue. J Mol Diagn 2006; 98:808-12.
16- Kusic B, Dominis M, Dzerbo S, Antica M. Molecular insight into the diagnosis of lymphoma. Int J Mole Med 2003;12: 667–671.
17- Maroto A, Rodrıguez J, Martinez MA, Martinez M, Agustin PD. A single primer pair immunoglobulin polymerase chain reaction assay as a useful tool in fine-needle aspiration biopsy differential diagnosis of lymphoid malignancies. Cancer cytopathology 2003; 99 :196-205.
18- Bagg A, Braziel RM, Arber DA, Bijwaard KE, Chu AY. Immunoglobulin heavy chain gene analysis in lymphomas: a multi-center study demonstrating the heterogeneity of performance of polymerase chain reaction assays. J Mol Diagn 2002; 4: 81–89.
19- Corbally N, Grogan L, Dervan PA, Carney DN. The detection of specific gene rearrangements in non-Hodgkin's lymphoma using the polymerase chain reaction. Br J Cancer 1992; 66: 805-809.
20- Aubin J, Davi F, Nguyen-Salomon F, Leboeuf D, Debert C, Taher M, *et al.* Description of a novel FR1 IgH PCR strategy and its comparison with three other strategies for the detection of clonality in B cell malignancies. Leukemia 1995; 9: 471–9.
21- Camilleri-Broet S, Devez F, Tissier F, Ducruit V, Le Tourneau A, Diebold J, *et al.* Quality control and sensitivity of polymerase chain reaction gene rearrangements from fixed and paraffin embedded samples. Ann Diagn Path 2000; 14: 71-76.
22- Hoeve MA, Krol AD, Philippo K, Derksen PW, Veenendaal RA, Schuuring E, *et al.* Limitations of clonality analysis of B cell proliferations using CDR3 polymerase chain reaction. J Clin Pathol 2000; 53:194–200.
23- Achille A, Scarpa A, Montresor M, Scardoni M, Zamboni G, Chilosi M, *et al.* Routine application of polymerase chain reaction in the diagnosis of monoclonality of B cell lymphoid proliferations. Diagn Mol Pathol 1995; 4:14–24.
24- Yamauchi A, Nakatsuka S, Miyanaga I, Hoshida Y, Sakamoto H, Aozasa K, *et al*. Clonality analysis of follicular lymphoma using laser capture microdissection method. Int Jour of Mole Med 2002; 10: 649-653.
25- Arber DA. Molecular diagnostic approach to non-Hodgkin's lymphoma. Journal of Molecular Diagnostics 2000; 4: 677-82.
26- Philippe B, Delfau-Larue MH, Epardeau B, Autran B, Clauvel JP, Farcet JP, *et al.* Gene rearrangement analysis of bronchoalveolar lymphocytes by polymerase chain reaction. Chest 1999; 115: 1242-1247.
27- Trainor KJ, Brisco MJ, Wan JH, Neoh S, Grist S, Morley AA. Gene rearrangement in B- and T-lymphoproliferative disease detected by the polymerase chain reaction. Blood 1991; 78: 192-196.
28- González M, González D, López-Pérez R, García-Sanz R, Chillón MC, Balanzategui A, et al. Heteroduplex analysis of VDJ amplified segments from rearranged IgH genes for clonality assessments in B-cell non-

Archive of SID
www.SID.ir

Hodgkin's lymphoma. A comparison between different strategies. Haematologica 1999; 84: 779-784.
29- Ling FC, Clarke CE, Lillicrap D. Positive immunoglobulin gene rearrangement study by the polymerase chain reaction in colonic adenocarcinoma. Am J Clin Pathol 1992; 198: 116–19.
30- Wan JH, Sykes PJ, Orell SR, Morley AA. Rapid method for detecting monoclonality in B cell lymphoma in lymph node aspirates using the polymerase chain reaction. J Clin Pathol 1992; 45: 420–25.

Archive of SID

www.SID.ir

Molecular diagnosis of B cell Non-Hodgkin Lymphoma by evaluation of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement

Yousefian A.[1](MS), Poopak B.[2](PhD), Abolghasemi H.[1,3](MD), Azarkeivan A.[1](MD), Farhadi Langroudi M.[1](MD), Sadeghipour A.[4](MD), Jeyhonian M.[4](MD),Pourkhayat M.J.[4](MD), Zare K.[5](MD), Farahani K.[2](BS), Salahmand M.[6](BS)

[1]Iranian Blood Transfusion Organization-Research Center-Iran
[2]Islamic Azad University-Medical Branch. Tehran- Iran
[3]Baghiyatalah University of Medical Sciences-Molecular Biology Research Center, Tehran-Iran
[4]IranUniversity of Medical Sciences, Iran
[5]Shahid Beheshti University of Medical Sciences,Iran
[6]Payvand Medical Laboratory, Iran

Archive of SID

Abstract

Background and Objectives

Rearrangement of V, D, and J segments of immunoglobulin heavy chain gene with inserted or deleted nucleotides within rearranged segments makes unique hypervariable regions (CDR-3). These regions can be used for evaluation of B cell clonality for the purpose of molecular diagnosis of Non-Hodgkin Lymphoma (NHL) and for confirmatory diagnosis in suspicious cases.

Materials and Methods

In this study, samples of 42 patients were collected from Taleghani, Baqhiyatalah, and Aliasghar hospitals; out of this number, there were 22 patients with diagnosis of B cell NHL, 10 with reactive hyperplasia, and 10 with malignant lymphoma. After DNA extraction from formalin fixed paraffin embedded tissues, PCR was done using consensus primers for amplification of CDR-3 region. PCR products were analyzed after heteroduplex analysis using polyacrylamide gel electrophoresis and silver stain.

Results

Clonal patterns in group 1 (B cell NHL), 2 (reactive and follicular hyperplasia), and 3 (morphological diagnosis without immunohistochemistry) were observed in 77.2%, 0%, and 70% of patients, respectively.

Conclusions

Our findings are compatible with other international studies with minor differences. The diagnosis of B-cell lymphoid malignancy can frequently be substantiated by detecting clonal immunoglobulin heavy chain (IGH) gene rearrangement.

Key words: Gene rearrangement, Non-Hodgkin Lymphoma, Immunoglobulin
SJIBTO 2008; 5(3): 157-166

Received: 31 Aug 2007
Accepted: 8 Oct 2008

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

www.SID.ir