

سنجش پروفایل بیان ژن *MDR1* در لوسمی لنفوبلاستیک حاد کودکان و بررسی ارزش پیش آگهی آن

مرجان عابدی^۱، سهیلا رهگذر^۲، علیرضا معافی^۳، کامران فائدی^۴، سید جمال مشتاقیان^۴، منصوره السادات انتظار قائم^۱، فاطمه منتظری^۱

چکیده

سابقه و هدف

لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL)، رایج ترین نوع سرطان کودکان می باشد. یکی از مهم ترین علل شکست درمان و عود در ALL، مقاومت دارویی چندگانه (MDR) است. ABC ترانسپورترها، مهم ترین عوامل درگیر در این اختلال هستند و ژن *MDR1* مهم ترین عضو این خانواده محسوب می شود. هدف پژوهش حاضر بررسی پروفایل بیانی mRNA ژن *MDR1* و ارزیابی اهمیت پیش آگهی آن در ALL می باشد.

مواد و روش ها

مطالعه انجام شده از نوع بنیادی - کاربردی بود. بیان ژن *MDR1* در نمونه های مورد بررسی (خون محیطی و مغز استخوان ۲۸ کودک مبتلا به ALL در بدو تشخیص و ۱۵ نمونه کنترل) با استفاده از Real time PCR سنجیده شد. وضعیت حداقل جزء باقی مانده بیماری (MRD) یک ساله به عنوان فاکتور پاسخ به درمان ارزیابی گردید. آنالیز داده ها با استفاده از نرم افزارهای Graph Pad Prism ۵ و SPSS ۲۰ انجام گرفت.

یافته ها

مشخص شد بیان ژن *MDR1* در افراد MRD^+ به صورت معناداری بیشتر از افراد MRD^- می باشد ($2/29 \pm 1/22$) در مقابل ($0/79 \pm 0/21$) ($SEM \pm$ میانگین، $p=0/49$). اکثر بیمارانی که افزایش بیان ژن *MDR1* را داشتند، MRD مثبت بودند ($66/6\%$ درصد در مقابل $33/3\%$ درصد، $p=0/48$).

نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان می دهد که پروفایل بیان ژنی *MDR1* می تواند یک فاکتور پیش آگهی نامطلوب در ALL باشد. ارزیابی پروفایل بیان mRNA ژن *MDR1* در بدو تشخیص با کمک به شناسایی افراد با خطر بالا می تواند امکان تغییر پروتکل درمانی به منظور افزایش بازده درمان را فراهم نماید.

کلمات کلیدی: لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL)، مقاومت دارویی چندگانه (MDR)، حداقل جزء باقی مانده بیماری (MRD)، پروفایل بیان ژنی

تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۱۸

تاریخ پذیرش: ۹۲/۲/۲۲

۱- کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی مولکولی - دانشکده علوم دانشگاه اصفهان - اصفهان - ایران

۲- مؤلف مسئول: PhD ایمونوهما تولوژی - استادیار دانشکده علوم دانشگاه اصفهان - خیابان هزار جریب - اصفهان - ایران - کدپستی: ۸۱۷۴۶-۷۳۴۴۱

۳- متخصص اطفال - دانشیار دانشکده علوم پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان - اصفهان - ایران

۴- PhD ایمونوهما تولوژی - استادیار دانشکده علوم دانشگاه اصفهان - اصفهان - ایران

مقدمه

تقریباً ۷۵٪ سرطان‌های خون در کودکان از نوع لنفوبلاستیک حاد (ALL) می‌باشد و این سرطان، ۸۰٪ سرطان کودکان را به خود اختصاص داده است (۱). علی‌رغم پیشرفت‌های قابل توجه صورت گرفته در درمان کودکان مبتلا به ALL، ۲۰٪ از مبتلایان با عود بیماری مواجه می‌شوند و عود بیماری مهم‌ترین علت شکست درمان می‌باشد (۲). شیوع ALL عود کرده از بروز اولیه AML، تومور ویلمز، بیماری‌های هاجکین (Hodgkin's disease) و رابدومیوسارکوما (Rhabdomyosarcoma) بیشتر می‌باشد (۳، ۴). نتیجه تحقیقات نشان داده که ALL عود کرده به عنوان پنجمین سرطان متداول در کودکان شناخته می‌شود (۵). اگرچه ویژگی‌های بالینی از قبیل سن، شمارش لوکوسیت‌ها در زمان تشخیص و مشخصه‌های بیولوژیک سلول‌های لوسمیک (تعداد کروموزومی و جابه‌جایی‌های کروموزومی)، پیش‌آگهی‌های سودمندی برای انتخاب درمان مناسب (شدت شیمی درمانی) هستند اما بسیاری از بیماران دارای این ویژگی‌ها درمان نمی‌شوند و بر عکس آن چه انتظار می‌رود، به شیمی‌درمانی پاسخ داده و فنوتیپ MDR در آن‌ها بروز می‌کند (۲). مقاومت چندگانه دارویی (MDR) یکی از مهم‌ترین علل عود بیماری و دلیل عمده ناکارآمدی شیمی درمانی در سرطان است (۶-۹). مکانیسم‌های بسیار متفاوتی از MDR مشخص شده است که از آن جمله می‌توان به: تغییر در نقاط بازرسی چرخه سلولی، ناکارآمدی مکانیسم‌های آپوپتوتیک، ترمیم سلول‌های آسیب دیده، پیام‌های بقای سلولی، پاسخ سلولی به استرس‌ها، تغییر غلظت آهن داخل سلولی و کاهش تجمع داروها اشاره کرد (۱۰-۱۵، ۷).

عمده‌ترین مکانیسم متداول در رابطه با فنوتیپ MDR، افزایش بیان پمپ‌های وابسته به انرژی (ATP = ABC Binding Cassette ترانسپورترها) در سلول‌های سرطانی می‌باشد (۱۶-۱۸، ۷). اولین ترانسپورتر شناخته شده در ارتباط با مقاومت دارویی، پی-گلیکو پروتئین ۱۷۰ (محصول ژن *MDR1*) است (۱۹، ۱۰). بسیاری از مطالعه‌ها بر نقش *MDR1* در ایجاد مقاومت دارویی، چندگانه (MDR) در سرطان‌ها تاکید کرده‌اند (۱۲). پی-گلیکوپروتئین در

سلول‌های لوسمی حاد میلوئیدی (AML) نیز، در زمان تشخیص در ۳۰٪ از بیماران و در بیش از ۵۰٪ موارد عود بیماری بیان می‌گردد (۱۰). در رده سلولی Lucena (یک رده سلولی مقاوم به شیمی درمانی) و رده سلولی لوسمی مزمن میلوئیدی (CML) مقاوم به دارو، افزایش بیان ژن *MDR1* نشان داده شده است (۲۰). در لوسمی حاد غیر لنفوبلاستی (ANLL = Acute Non-Lymphoblastic Leukemia) نیز مقاومت دارویی مشکل عمده در درمان می‌باشد. با آن که مکانیسم دقیق مقاوم شدن سلول‌های لوسمیک به داروهای شیمی درمانی مشخص نشده است، بررسی‌های کمپوس و همکارانش پیشنهاد می‌دهد که ارزیابی پی-گلیکو پروتئین ممکن است ابزار مهمی در پیش‌بینی بازده شیمی درمانی در بیماران مبتلا باشد (۲۱). نقش *MDR1* در لوسمی لنفوبلاستیک حاد بحث‌برانگیز بوده و دانشمندان در این رابطه هنوز به نتیجه واحدی نرسیده‌اند (۲۲، ۲۳).

هدف از این مطالعه، بررسی پروفایل بیانی mRNA این ژن در کودکان مبتلا به ALL در بدو تشخیص به منظور ارزیابی اهمیت آن به عنوان یک فاکتور پیش‌آگهی عود بیماری در راستای تعدیل پروتکل درمانی و جلوگیری از عود بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و جداسازی سلول‌ها:

در یک مطالعه بنیادی - کاربردی، از نمونه خون ۲۸ بیمار مبتلا به ALL در بدو تشخیص (و پیش از شروع شیمی درمانی) به عنوان مورد و ۱۵ فرد دارای مغز استخوان سالم، به عنوان کنترل، استفاده گردید. این افراد همگی کودکان زیر ۱۵ سال مراجعه‌کننده به بیمارستان سیدالشهداء شهر اصفهان بودند که پس از کسب رضایت از والدین و مطابق قوانین اخلاق پزشکی جاری در بیمارستان سیدالشهداء، اقدام به گرفتن نمونه خونی از آن‌ها شد. نمونه‌گیری از مغز استخوان با استفاده از آسپیریشن مغز استخوان در اتاق عمل صورت پذیرفت. خون هپارینه با هم حجم آن سرم فیزیولوژیک رقیق شده و جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون با استفاده از روش

سدیمتاسیون فایکول (Lymphoprep™) انجام گرفت. سلول‌های جدا شده با انجام یک سانتیفریوژ با دور ۲۵۰g به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از سرم فیزیولوژیک شست و شو شده و پلیت سلولی لازم به دست آمد. شمارش سلولی با استفاده از هموسیتر متر انجام گرفت.

استخراج RNA:

استخراج RNA از سلول‌ها با استفاده از کیت RNeasy Mini Kit شرکت کیاژن صورت پذیرفت. غلظت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه بیوفتومتر (اپندرف) اندازه‌گیری شد.

ساخت cDNA:

تبدیل RNA به cDNA با استفاده از کیت ساخت cDNA (شرکت فرمتاز) صورت گرفت. ۲ µg RNA الگو (RNA کل)، ۱ µL آغازگر هگزامر راندوم و آب nuclease-free تا رسیدن حجم کل به ۱۲ µL، به یک تیوب استریل nuclease-free اضافه و به مدت ۵ دقیقه تحت تیمار دمایی ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در مرحله بعد، ۴ µL بافر RiboLock™ RNase، ۱ µL مهارکننده RNase، ۵x Reaction (۲۰ u/µL)، ۲ µL مخلوط ۱۰ mM dNTP و ۱ µL آنزیم MuLV Reverse RevertAid™ M- (۲۰۰ u/µL) ترانس کریپتاز به تیوب اضافه گردید. پس از مخلوط کردن محتویات تیوب، واکنش ساخت cDNA طبق برنامه دمایی خاص (به ترتیب: ۵ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتی‌گراد و ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد) در دستگاه ترموسایکلر (اپندرف) صورت پذیرفت.

اجرای Real time PCR:

در این مطالعه ژن GAPDH به عنوان ژن خانه‌گردان انتخاب گردید. توالی آغازگرهای مورد استفاده عبارت بود

از: آغازگر رفت ژن GAPDH (5' to 3'):

CCCCCAGCAAGAGCACAAAGAGGAAGA
آغازگر برگشت (3' to 5'):

CATGGCAACTGTGAG GAGGGGAGATT

آغازگر رفت MDR1 (5' to 3'):

AGGCCGCTGTTTCGTTTCCTTTAGGTC

و آغازگر برگشت MDR1 (3' to 5'):

. AGATTTCATTCCGACCTCGCGCTCCT

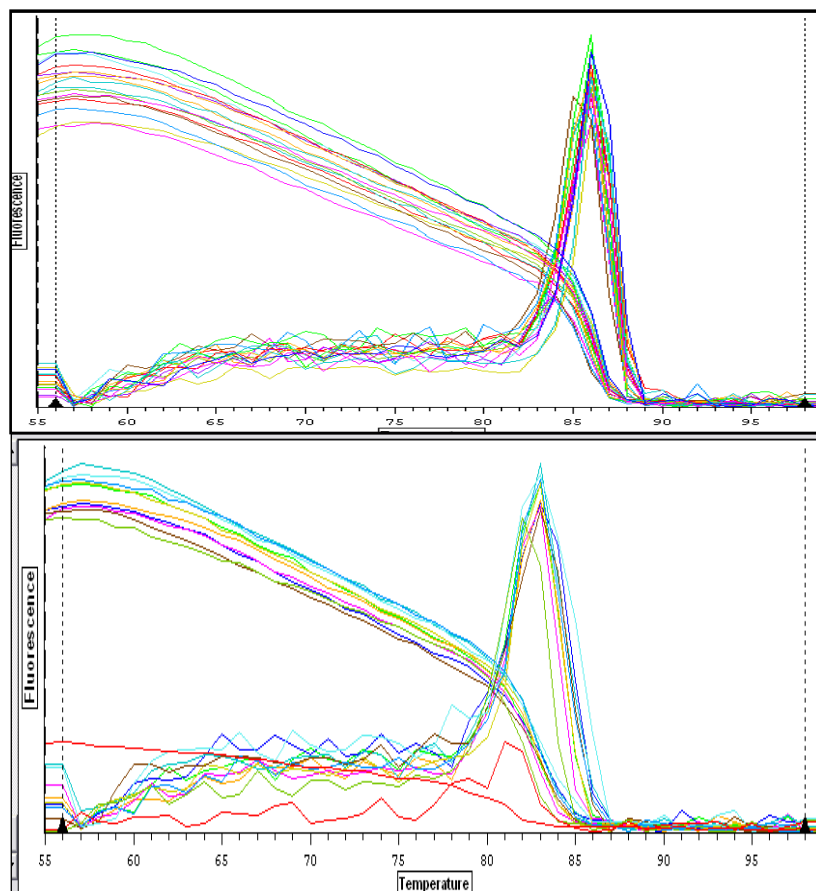
به منظور اجرای Real Time PCR از کیت SYBR premix Ex Taq™ II (شرکت تاکارا) استفاده شد. ۰/۸ از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ µmol، ۴/۴ µL ddH₂O، ۱۰ µL SYBR Green و ۴ µL cDNA با رقت ۰/۱ به تیوب‌های ویژه اضافه شد. واکنش تکثیری بر طبق الگوی دمایی خاص، ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۲۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد، خوانش پلیت‌ها، ۴۰ مرتبه تکرار مراحل از مرحله ۲، فاز صعود دمایی از ۵۵ به ۹۹ درجه سانتی‌گراد (منحنی ذوب) و خوانش در هر درجه سانتی‌گراد با توقف یک ثانیه‌ای، در داخل دستگاه Chromo 4 ویژه Real Time PCR (شرکت بیوراد) اجرا گردید. منحنی‌های ذوب به دست آمده نشان‌دهنده تکثیر مناسب محصول و نیز اختصاصیت آغازگرهای مورد استفاده بودند (شکل ۱).

ارزیابی پاسخ به درمان:

به منظور سنجش MRD پس از گذشت یک سال از دوره درمان، نمونه‌ها به آزمایشگاه پیوند تهران ارسال و تکثیر زنجیره سنگین ایمنوگلوبولین و نیز گیرنده‌ی گامای T لنفوسیت‌ها (TCγR= T-cell gamma receptor) با به کارگیری روش PCR-SSCP انجام شد. الکتروفورز بر روی محصولات PCR الکتروفورز یک باند در ژل که بیانگر مونوکلونالیتیه می‌باشد، به عنوان MRD⁺ گزارش گردید. تعدد باندهای مورد بررسی بیانگر پلی‌کلونالیتیه (حالت طبیعی) بوده، نمونه‌های مربوطه MRD⁻ گزارش شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها:

پروفايل بيان ژني به طور نسبي و با روش ۲-ΔΔCt محاسبه گردید. سپس داده‌ها به وسیله نرم‌افزارهای GraphPad Prism© و SPSS ۲۰ مورد تحلیل آماری قرار گرفتند. میانگین و خطای استاندارد میانگین محاسبه و



شکل ۱: منحنی ذوب مربوط به ژن خانه گردان GAPDH (بالا) و ژن MDR1 (پایین)

سپس از طریق آزمون‌های t-test، فیشر و اسپیرمن وجود و میزان معناداری نتایج حاصل، مشخص شد. داده‌ها به صورت خطای استاندارد میانگین $\pm$ میانگین (SEM) $\pm$ mean و در سطوح معناداری $p < 0.05$ گزارش شده‌اند.

یافته‌ها

مقایسه پروفایل بیان ژن MDR1 در دو گروه کنترل و افراد مبتلا به ALL:

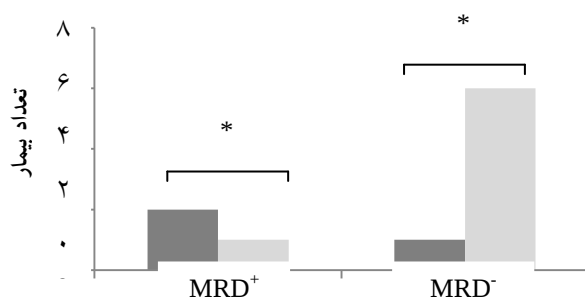
تعداد کل بیماران مورد بررسی ۲۸ نفر بودند که ۱۸ نفر از بیماران پسر و ۱۰ نفر دختر با بازه سنی ۱-۱۷ سال بودند (جدول ۱). نمونه‌گیری خون در بدو تشخیص بیماری و پیش از شروع درمان انجام گرفت. سطح متوسط بیان ژن MDR1 در گروه کنترل و در گروه مبتلایان به ALL

با تشخیص اولیه (به ترتیب $0.29 \pm$ و $0.45 \pm$ و $0.70 \pm$ (۲/۴۱) (SEM) $\pm$ میانگین، $p = 0.16$) محاسبه گردید (نمودار ۱).

جدول ۱: میانگین سنی و جنسیت گروه کنترل و مبتلایان مورد بررسی و تعداد بیماران به تفکیک ساب تایپ بیماری

گروه مورد بررسی	تعداد	سن (سال) (SEM) $\pm$ میانگین	جنسیت	
			مذکر	مؤنث
B-ALL	۲۲	5.24 ± 0.8	۱۲	۱۰
T-ALL	۶	7.14 ± 2.52	۶	۰
کنترل	۱۵	6.5 ± 0.9	۹	۶

از ۱/۵ با پاسخ به درمان (وضعیت MRD) بررسی گردید. در مقایسه بیان ژن MDR1 با بیان کمتر از ۱/۵ و بیشتر از ۱/۵ در افراد با MRD⁺ و افراد با MRD⁻، مشخص گردید که به طور معناداری سطح بالای (بیش از ۱/۵) بیان ژن MDR1 در افراد با MRD⁺ (افراد دارای مقاومت دارویی) بیشتر از افراد با MRD⁻ بود (۶۶/۶٪ در مقابل ۳۳/۳٪، $p=0/048$). همچنین آزمون دقیق فیشر نشان داد زمانی که بیان این ژن بیش از ۱/۵ باشد، احتمال مثبت شدن MRD دوازده برابر می‌باشد (odds ratio= ۱۲) (نمودار ۳).



نمودار ۳: ارتباط پروفایل بیان ژن MDR1 و وضعیت MRD (پاسخ به درمان). آزمون فیشر نشان داد که بین میزان بیان بالای ژن (بیش از ۱/۵) و مثبت شدن MRD رابطه‌ای مستقیم معنادار وجود دارد ($p=0/048$). میزان بیان mRNA بیش از ۱/۵، میزان بیان mRNA کمتر از ۱/۵.

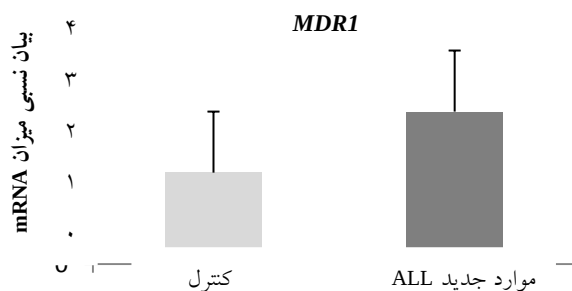
بررسی ارتباط پروفایل بیان ژن MDR1 و ویژگی‌های بالینی:

ارتباط پروفایل بیان ژن MDR1 و ویژگی‌های بالینی از جمله سن، شمارش گلبول‌های سفید (WBC) و پلاکت (Plt)، خون، سطح سرمی لاکتات دهیدروژناز (LDH) و بیان مارکرهای CD10 و CD34 در زمان تشخیص با استفاده از آزمون اسپیرمن ارزیابی گردید اما ارتباط قابل ملاحظه و معناداری بین بیان ژن MDR1 و هیچ یک از فاکتورها به دست نیامد.

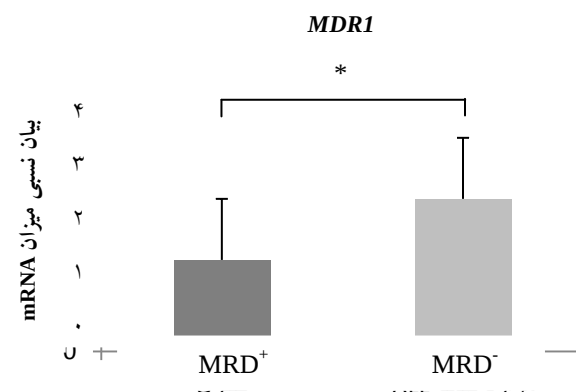
بحث

مقاومت دارویی چندانکه، عمده‌ترین علت عود بیماری در لوسمی لنفوبلاستیک حاد است. چندین دهه است که شناسایی عوامل دخیل در این مکانیسم و بررسی نقش و

مقایسه پروفایل بیان ژن MDR1 و پاسخ به درمان: به منظور ارزیابی پاسخ به درمان، در افرادی که دوره درمانی یک ساله آنان به اتمام رسید (۱۰ نفر)، وضعیت MRD بررسی شد (سنجش MRD توسط آزمایشگاه پیوند شهر تهران انجام گرفت). همان‌طور که ذکر گردید، هدف از این پژوهش بررسی نقش پروفایل بیان ژن MDR1 به عنوان فاکتور پیش‌آگهی جهت شناسایی افراد با خطر بالا و تغییر پروتکل درمانی بر این اساس، به منظور درمان کامل‌تر بیماری است. برای نیل به این مهم، ارتباط میزان بیان ژن و وضعیت MRD با استفاده از آزمون دقیق فیشر مورد بررسی قرار گرفت.



نمودار ۱: مقایسه بیان ژن MDR1 در دو گروه کنترل و افراد تازه مبتلا شده به ALL



نمودار ۲: مقایسه بیان ژن MDR1 در بین افراد با MRD⁺ و MRD⁻ ($p=0/049$)

عدد ۱/۵ (نسبت میانگین بیان $2^{-\Delta\Delta Ct}$) ژن MDR1 در مبتلایان مورد بررسی به گروه کنترل) به عنوان مرز جدایی (Cut off point) بیان بالا و پایین ژن در نظر گرفته شد. رابطه بیان این ژن در دو گروه بیان کمتر و بیان بیشتر

اهمیت آن‌ها به عنوان فاکتور پیش‌آگهی موضوع تحقیق پژوهشگران می‌باشد. یکی از مهم‌ترین این مکانیسم‌ها، نقش ABC ترانسپورترهاست. از بین اعضای این خانواده از ترانسپورترها، ترانسپورترهای ABCG، ABCC3، MRP1 و *MDR1* بیشترین ارتباط را با مقاومت دارویی در لوسمی لنفوبلاستیک حاد دارند (۲۵، ۲۴، ۱۷). با این حال نتایج به دست آمده بسیار متناقض بوده و با وجود تلاش‌های گسترده در این زمینه، نقش پیش‌آگهی این ژن‌ها در ALL هم چنان بحث برانگیز می‌باشد.

این پژوهش، مطالعه‌ای است که نقش *MDR1* را در کودکان ایرانی مبتلا به ALL بررسی نموده است. در پژوهش حاضر، میزان بیان *MDR1* mRNA با استفاده از روش کمی Real time PCR در کودکان مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد در بدو تشخیص بیماری اندازه‌گیری و ارتباط پروفایل بیان ژنی با شواهد بالینی و اهمیت پیش‌آگهی بیان این ژن در این بیماران ارزیابی گردید.

در این تحقیق با تعیین میزان بیان ژن *MDR1* در کودکان مبتلا به ALL در بدو تشخیص، افزایش بیان ۱/۶ برابری ژن *MDR1* نسبت به گروه کنترل به دست آمد ($0/70 \pm$ در مقابل $0/29 \pm$ SEM) ($1/45 \pm$ میانگین، $0/16 \leq p$). با آن که مقایسه میانگین بیان ژنی در دو گروه مورد بررسی از نظر آماری قابل ملاحظه نبود با این حال مشخص شد که در ۳۹٪ مبتلایان سطح بیان ژن *MDR1* بالاتر از میانگین بیان در گروه کنترل می‌باشد. کورتی و همکارانش نیز در مقایسه میزان بیان ژن‌های *MDR* از جمله ژن *MDR1* اعلام کردند که ۳۶/۷٪ مبتلایان دارای بیان بالای ژن *MDR1* بوده‌اند (۲۶). افزایش جمعیت آماری در بررسی‌های آتی می‌تواند نتایج دقیق‌تری را در این خصوص در برداشته باشد.

در ادامه به منظور بررسی نقش پیش‌آگهی این ژن، ارتباط پروفایل بیان ژنی و پاسخ به درمان ارزیابی گردید. در بررسی بیان ژن *MDR1* در مقایسه با وضعیت MRD یک ساله، مشخص شد که افزایش بیان بیش از ۱/۵ برابری این ژن در افراد MRD^+ به طور معناداری بیش از افراد MRD^- می‌باشد ($1/22 \pm$ در مقابل $0/21 \pm$ SEM) ($0/48 \leq p$).

ارزیابی‌های آماری نشان داد، زمانی که بیان *MDR1* ۱/۵ یا بیش از ۱/۵ برابر بیان ژن در جمعیت نرمال باشد، احتمال مثبت شدن MRD که حکایت از پاسخ نامطلوب به درمان دارد دوازده برابر می‌باشد. در منابع علمی نتایج مخالف این تحقیق هم وجود دارد. از جمله آن که والرا و کورتز نشان دادند که بیان این ژن در کودکان مبتلا به ALL اهمیت پیش‌آگهی ندارد (۲۷، ۱۷). باید توجه داشت که در مطالعه این دانشمندان وضعیت بیماران از لحاظ MRD پس از ۲۸ روز محاسبه شده است، حال آن که در بررسی حاضر این ارزیابی ۱۰ الی ۱۲ ماه پس از شروع شیمی درمانی (۳ ماه پس از اتمام مرحله تثبیت مجدد و ورود به مرحله درمان نگهدارنده) انجام شده است. به نظر می‌رسد بررسی MRD در این گونه تحقیقات، با کمی تعجیل انجام گرفته و اصولاً با توجه به طول درمان ۳ ساله (برای موارد معمول لوسمی لنفوبلاستی) به منظور درمان کامل بیماری، قاعدتاً این عدم کاهش شدید میزان MRD نمی‌تواند دور از انتظار باشد. در مقالات دیگری مانند مقاله کانرو و اولسون نیز نتایج مشابهی عنوان شده که حاکی از عدم ارتباط بیان این ژن با نتیجه درمان هستند (۲۹، ۲۸). در دو تحقیق مذکور، بیان ژن در سطح پروتئین و با استفاده از روش فلوسیتومتری انجام گرفته است. بررسی بیان ژن *MDR1* در دو سطح بسیار متفاوت پروتئین و mRNA (در پژوهش حاضر) و البته تفاوت‌های ژنتیکی، وجود عوامل زمینه‌ای دیگر، تفاوت ژنوتیپ بیماری و اتیولوژی بیماری در افراد مختلف، از جمله عواملی هستند که می‌توانند تفاوت در نتایج به دست آمده را توضیح دهند.

در تایید نتایج تحقیق حاضر، مقالات متعددی را می‌توان یافت. از جمله تافوری و همکارانش بیان بالاتر از حد نرمال p-gp را دارای نقش پیش‌آگهی نامطلوب بر پاسخ به درمان (موفقیت تحقق ریمسیون کامل) در بالغین مبتلا به ALL دانسته‌اند (۳۰). هم چنین استیسنزینسکی و همکارانش نیز گزارش کرده‌اند که افزایش بیان p-gp در ALL عود کرده شایع‌تر بوده و یک معیار پیش‌آگهی نامطلوب بر pDFS (Patient Disease Free Survival = بقای عاری از علائم بیماری فرد مبتلا) است (۳۱). گروه دیگری از محققان نیز نشان داده‌اند که میانگین سطح mRNA

نتيجه گيري

مطالعه حاضر با گزارش ارتباط مستقيم فنوتپ MDR (افزايش بيان ژن MDR1) با بروز مقاومت دارويي (مثبت شدن MRD) در نمونه هاي باليني، پيشنهاد مي دهد كه بيان اين ژن در زمان تشخيص را مي توان به عنوان فاكتور پيش آگهي نامطلوب مدنظر قرار داد. ارزيابي پروفايل بيان اين ژن مي تواند منجر به شناسايي افراد با خطر بالاي عود گردد. با توجه به آن كه بر اساس اطلاعات پيش آگهي امكان تغيير يا تشديد پروتكل درمانی در بيماران با خطر بالا فراهم مي آيد؛ اين امر مي تواند نقش به سزايي در جهت افزايش بازده درمان و جلوگیری از عود در اين گروه از مبتلایان به ALL ايفا نمايد.

ژن MDR1 در بيمارانی كه رميسيون كامل در آنان محقق نشده، به طور قابل ملاحظه اي بيشتر بوده است (32). نتايج به دست آمده از اين پژوهش بيانگر ارتباط مستقيم افزايش بيان ژن MDR1 و بروز مقاومت دارويي در كودكان مبتلا به ALL مي باشد و با توجه به احتمال تاثير ديگر اعضاي هم خانواده اين ژن در اين خصوص، از جمله ترانسپورترهاي ABCG3، ABCB1 و MRP1، بررسي پروفايل بيان ژني هر يك از اين ژنها، ارتباط بين اين ترانسپورترها با يكديگر، بررسي بيان ژن در سطح پروتئين و هم چنين ارزيابي ساير مكانسيم هاي مقاومت دارويي، از جمله افزايش بيان ژن هاي ضد آپوپتوزي در سلول هاي لوسميك، نقش به سزايي در درك بهتر پديده چند فاكتوری مقاومت دارويي در ALL خواهد داشت.

References:

- Beishuizen A. Immunogenetic studies in childhood acute lymphoblastic leukemia: analysis at diagnosis and relapse [dissertation]. Rotterdam: Afdeling immunologie, Erasmus Universiteit; 1994. p. 249.
- Lugthart S, Cheok MH, den Boer ML, Yang W, Holleman A, Cheng C, et al. Identification of genes associated with chemotherapy crossresistance and treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 2005; 7(4): 375-86.
- Szczepanek J, Styczyński J, Haus O, Tretyn A, Wysocki M. Relapse of acute lymphoblastic leukemia in children in the context of microarray analyses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2011; 59(1): 61-8.
- Gaynon PS. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia and Relapse. *Us S Pecial Populations Pediatrics Review* 2006; 1-7.
- Bhojwani D, Kang H, Moskowitz NP, Min DJ, Lee H, Potter JW, et al. Biologic pathways associated with relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Blood* 2006; 108(2): 711-7.
- Ross DD. Novel mechanisms of drug resistance in leukemia. *Leukemia* 2000; 14(3): 467-73.
- Swerts K, De Moerloose B, Dhooge C, Laureys G, Benoit Y, Philippé J. Prognostic significance of multidrug resistance-related proteins in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Cancer* 2006; 42(3): 295-309.
- Bakos E, Homolya L. Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1). *Pflugers Arch* 2007; 453(5): 621-41.
- Leonard GD, Fojo T, Bates SE. The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist* 2003; 8(5): 411-24.
- Ambudkar SV, Kimchi - Sarfaty C, Sauna ZE, Gottesman MM. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 2003; 22(47): 7468-85.
- Tsuruo T. Molecular cancer therapeutics: recent progress and targets in drug resistance. *Intern Med* 2003; 42(3): 237-43.
- Lage H. Reversal of MDR1/P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by RNA interference. *International Congress Series* 2005; 1277: 144-53.
- Abedi M, Rahgozar S. Molecular mechanisms of drug resistance in acute lymphoblastic leukemia. *The 6th Annual Congress of Iranian Blood and pediatric cancer Society*; 2011; Ahwaz. p. 74.
- Abedi M, Rahgozar S. Iron deprivation effects on leukemic cells. *Iranian Journal of Pediatric Hematology & Oncology* 2012; 2(2(Supplement 1)): 57.
- Fang D, Bao Y, Li X, Liu F, Cai K, Gao J, et al. Effects of iron deprivation on multidrug resistance of leukemic K562 cells. *Chemotherapy* 2010; 56(1): 9-16.
- Biondi A, Baruchel A, Hunger S, Masera G, Schmiegelow K, Schrappe M, et al. The Eleventh International Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Workshop Report: Ponte di Legno, Italy, 6-7 May 2009. *Leukemia* 2009; 23(12): 2318-24.
- Cortez MA, Scrideli CA, Yunes JA, Valera ET, Toledo SR, Pavoni-Ferreira PC, et al. mRNA expression profile of multidrug resistance genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. Low expression levels associated with a higher risk of toxic death. *Pediatr Blood Cancer* 2009; 53(6): 996-1004.
- Aouali N, Eddabra L, Macadré J, Morjani H. Immunosuppressors and reversion of multidrug-resistance. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 56(1): 61-70.
- Mruk DD, Su L, Cheng CY. Emerging role for drug transporters at the blood - testis barrier. *Trends Pharmacol Sci* 2011; 32(2): 99-106.

- 20- Marques DS, Sandrini JZ, Boyle RT, Marins LF, Trindade GS. Relationships between multidrug resistance (MDR) and stem cell markers in human chronic myeloid leukemia cell lines. *Leuk Res* 2010; 34(6): 757-62.
- 21- Campos L, Guyotat D, Archimbaud E, Calmard-Oriol P, Tsuruo T, Troncy J, *et al.* Clinical significance of multidrug resistance P-glycoprotein expression on acute nonlymphoblastic leukemia cells at diagnosis. *Blood* 1992; 79(2): 473-6.
- 22- Svirnovski AI, Shman TV, Serhiyenka TF, Savitski VP, Smolnikova VV, Fedasenka UU. ABCB1 and ABCG2 proteins, their functional activity and gene expression in concert with drug sensitivity of leukemia cells. *Hematology* 2009; 14(4): 204-12.
- 23- Wu CP, Calcagno AM, Ambudkar SV. Reversal of ABC drug transporter-mediated multidrug resistance in cancer cells: evaluation of current strategies. *Curr Mol Pharmacol* 2008; 1(2): 93-105.
- 24- El-Sharnouby JA, Abou El-Enein AM, El Ghannam DM, El-Shanshory MR, Hagag AA, Yahia S, *et al.* Expression of lung resistance protein and multidrug resistance-related protein (MRP1) in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *J Oncol Pharm Pract* 2010; 16(3): 179-88.
- 25- Huh HJ, Park CJ, Jang S, Seo EJ, Chi HS, Lee JH, *et al.* Prognostic significance of multidrug resistance gene 1 (MDR1), multidrug resistance-related protein (MRP) and lung resistance protein (LRP) mRNA expression in acute leukemia. *J Korean Med Sci* 2006; 21(2): 253-8.
- 26- Kourti M, Vavatsi N, Gombakis N, Sidi V, Tzimagiorgis G, Papageorgiou T, *et al.* Expression of multidrug resistance 1 (MDR1), multidrug resistance-related protein 1 (MRP1), lung resistance protein (LRP), and breast cancer resistance protein (BCRP) genes and clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Hematol* 2007; 86(2): 166-73.
- 27- Valera ET, Scrideli CA, Queiroz RG, Mori BM, Tone LG. Multiple drug resistance protein (MDR-1), multidrug resistance-related protein (MRP) and lung resistance protein (LRP) gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Sao Paulo Med J* 2004; 122(4): 166-71.
- 28- Kanerva J, Tiirikainen MI, Mäkipernaa A, Riikonen P, Möttönen M, Salmi TT, *et al.* Initial P-glycoprotein expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: no evidence of prognostic impact in follow-up. *Pediatr Hematol Oncol* 2001; 18(1): 27-36.
- 29- Olson DP, Taylor BJ, La M, Sather H, Reaman GH, Ivy SP. The prognostic significance of P-glycoprotein, multidrug resistance-related protein 1 and lung resistance protein in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a retrospective study of 295 newly diagnosed patients by the Children's Oncology Group. *Leuk Lymphoma* 2005; 46(5): 681-91.
- 30- Tafuri A, Gregorj C, Petrucci MT, Ricciardi MR, Mancini M, Cimino G, *et al.* MDR1 protein expression is an independent predictor of complete remission in newly diagnosed adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2002; 100(3): 974-81.
- 31- Styczynski J, Wysocki M, Debski R, Czyzewski K, Kolodziej B, Rafinska B, *et al.* Predictive value of multidrug resistance proteins and cellular drug resistance in childhood relapsed acute lymphoblastic leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007; 133(11): 875-93.
- 32- Gurbuxani S, Sazawal S, Arya LS, Raina V, Marie JP, Bhargava M. MDR1 mRNA expression in young patients with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2000; 109(4): 897-9.

Original Article

Evaluation of the expression profile of MDR1 gene and assessment of its prognostic value in childhood ALL

Abedi M.¹, Rahgozar S.¹, Moafi A.R.², Ghaedi K.¹, Moshtaghian S.J.¹,
Entezar-e-Ghaem M.S.¹, Montazeri F.¹

¹Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran

²Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Abstract

Background and Objectives

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common cancer among children. Multi drug resistance (MDR) is the major cause of treatment failure and relapse in ALL. ABC transporters mainly contribute to this disorder and *MDR1* gene is the most popular member of this family. The aim of this study is to evaluate the gene expression profile of *MDR1* at mRNA level and its prognostic value in ALL.

Materials and Methods

Bone marrow and peripheral blood samples were obtained from 28 newly diagnosed ALL patients and 15 controls. *MDR1* gene expression profile was evaluated by using real time PCR. The minimal residual disease (1-year MRD) was considered as the factor of response to therapy. Data were analyzed by using SPSS 20 and Graph Pad Prism 5 softwares.

Results

MDR1 gene expression level in patients with MRD⁺ was significantly higher than MRD⁻ patients (2.29 ± 1.22 vs 0.79 ± 0.21)(mean $\pm$ SEM, $p=0.049$). Most of the patients with over expression of *MDR1* gene were MRD⁺ (66.6% vs 33.3)(mean $\pm$ SEM, $p=0.048$).

Conclusions

MDR1 gene expression profile is suggested to be an unfavorable prognostic factor in ALL. The evaluation of the mRNA expression profile of *MDR1* in new case patients facilitates identification of the high risk patients and helps modifying the protocols applied for ALL treatment in order to improve the therapeutic outcome.

Key words: Lymphoblastic Leukemia· Acute, Multidrug Resistance, Minimal Residual Disease, Gene Expression Profiles

Received: 8 Dec 2012

Accepted: 12 May 2013

Correspondence: Rahgozar S., PhD of Immuno-Hematology. Assistant Professor of Faculty of Science, University of Isfahan, Hezarjerib St.
Postal Code: 81746-73441, Isfahan, Iran. Tel: (+98311) 7932365; Fax: (+98311)7932456
E-mail: rahgozar@sci.ui.ac.ir