

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

مرجان عابدی<sup>۱</sup>، سهیلا رهگذر<sup>۲</sup>، علیرضا معافی<sup>۳</sup>، کامران فاندی<sup>۴</sup>، سید جمال مشتاقیان<sup>۴</sup>، منصوره السادات انتظار قائم<sup>۱</sup>، فاطمه منتظری<sup>۱</sup>

### 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 *MDRI* مهم ترین عضو این خانواده محسوب می شود. هدف پژوهش حاضر بررسی پروفایل بیانی mRNA ژن *MDRI* و ارزیابی اهمیت پیش آگهی آن در ALL می باشد.

#### مواد و روش ها

مطالعه انجام شده از نوع بنیادی - کاربردی بود. بیان ژن *MDRI* 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 *MDRI* در افراد  $MRD^+$  به صورت معناداری بیشتر از افراد  $MRD^-$  می باشد ( $1/22 \pm 2/29$  در مقابل  $0/21 \pm 0/79$ ) ( $SEM \pm$  میانگین،  $p=0/49$ ). اکثر بیماران که افزایش بیان ژن *MDRI* را داشتند، MRD مثبت بودند (۶۶/۶ درصد در مقابل ۳۳/۳ درصد،  $p=0/48$ ).

#### نتیجه گیری

مطالعه حاضر نشان می دهد که پروفایل بیان ژنی *MDRI* می تواند یک فاکتور پیش آگهی نامطلوب در ALL باشد. ارزیابی پروفایل بیان mRNA ژن *MDRI* 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 مسؤول: PhD ایمونوهماٹولوژی - 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 ایمونوهماٹولوژی - 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، بیماری‌هاجکین (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 شیمی‌درمانی 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 (ABC = ATP 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-گلیکو پروتئین 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 شیمی‌درمانی) 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 شیمی‌درمانی مشخص نشده است، بررسی‌های کمپوس و همکارانش پیشنهاد می‌دهد که ارزیابی پی-گلیکو پروتئین ممکن است ابزار مهمی در پیش‌بینی بازده شیمی‌درمانی 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 شیمی‌درمانی) 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 سیدالشهدا شهر اصفهان بودند که پس از کسب رضایت از والدین و مطابق قوانین اخلاق پزشکی جاری در بیمارستان سیدالشهدا، اقدام به گرفتن نمونه خونی از آن‌ها شد. نمونه‌گیری از مغز استخوان با استفاده از اسپیریشن 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

آغازگر رفت MDR1 (5' to 3'):

AGGCCGCTGTTTCGTTTCCTTTAGGTC

و آغازگر برگشت MDR1 (5' to 3'):

. AGATTCATTCCGACCTCGCGCTCCT

به منظور اجرای Real Time PCR از کیت SYBR premix Ex Taq TM II (شرکت تاکارا) استفاده شد. ۰/۸ از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ μmol، ۴/۴ μL ddH<sub>2</sub>O، ۱۰ μL SYBR Green و ۴ μL cDNA با رقت ۰/۱ به تیوب‌های ویژه اضافه شد. واکنش تکثیر بر طبق الگوی دمایی خاص، ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، خوانش پلیمت‌ها، 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 ایمونوگلوبولین 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 بانده در ژل که بیانگر مونوکلونالیته می‌باشد، به عنوان MRD<sup>+</sup> گزارش گردید. تعدد باندهای مورد بررسی بیانگر پلی‌کلونالیته (حالت طبیعی) بوده، نمونه‌های مربوطه MRD<sup>-</sup> گزارش شدند.

#### تجزیه و تحلیل داده‌ها:

پروفایل بیان ژنی به طور نسبی و با روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  محاسبه گردید. سپس داده‌ها به وسیله نرم‌افزارهای GraphPad Prism<sup>©</sup> ۲۰ و SPSS مورد تحلیل آماری قرار گرفتند. میانگین و خطای استاندارد میانگین محاسبه و

سدیمتاسیون فایکول (Lymphoprep<sup>TM</sup>) انجام گرفت. سلول‌های جدا شده با انجام یک سانتی‌فیوژ 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 هموسیترومتر 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<sup>TM</sup> RNase، ۱ μL مهارکننده RNase، ۵x Reaction (۲۰ u/μL)، ۲ μL مخلوط ۱۰ mM dNTP و ۱ μL آنزیم MuLV Reverse RevertAid<sup>TM</sup> 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 دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد) در دستگاه ترموسایکلر (اپندرف) صورت پذیرفت.

#### اجرای Real time PCR:

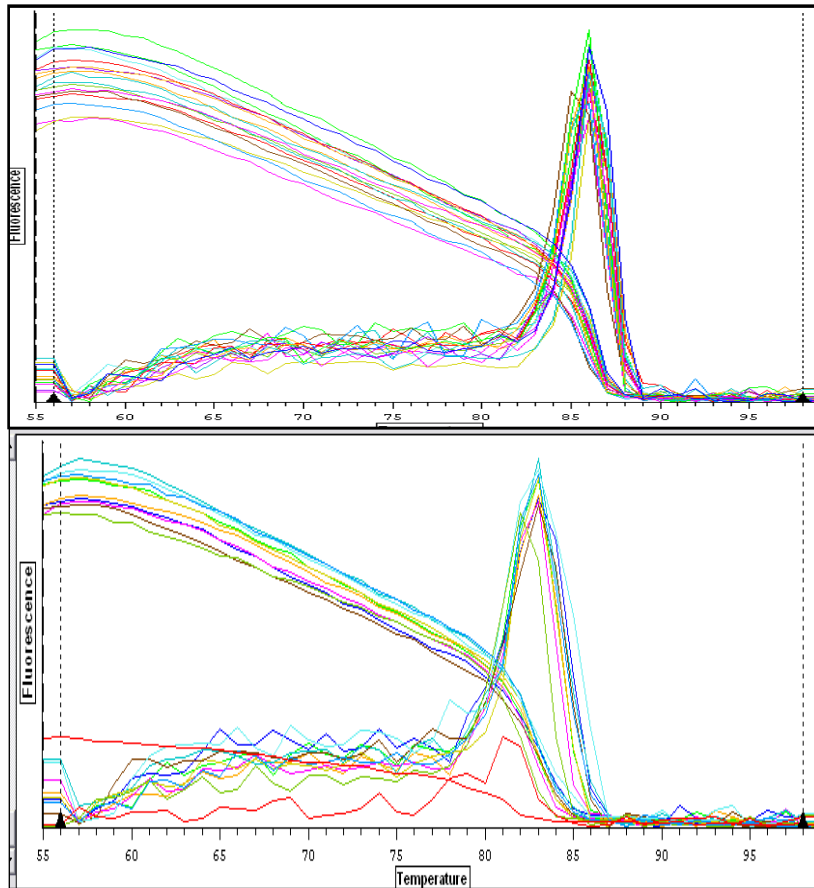
در این مطالعه ژن GAPDH به عنوان ژن خانه‌گردان انتخاب گردید. توالی آغازگرهای مورد استفاده عبارت بود

از: آغازگر رفت ژن GAPDH (5' to 3'):

GCCCCAGCAAGAGCACAAAGAGGAAGA

آغازگر برگشت (5' to 3') GAPDH:

CATGGCAACTGTGAG GAGGGGAGATT



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

با تشخیص اولیه (به ترتیب  $\pm 0/29$  و  $1/45 \pm 0/70$ )  
( $2/41$ ) ( $\pm$  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 سبب تایپ بیماری

گروه مورد بررسی	تعداد	سن (سال)	
		مؤنث	مذکر
B-ALL	۲۲	$5/24 \pm 0/8$	
T-ALL	۶	$7/14 \pm 2/52$	
کنترل	۱۵	$6/5 \pm 0/9$	

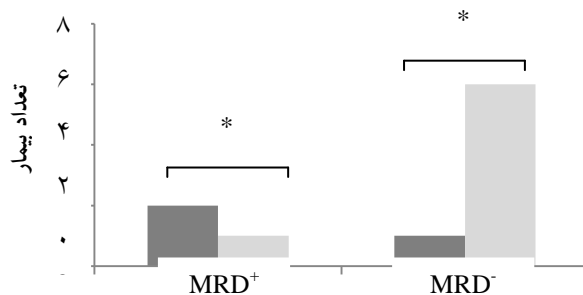
سپس از طریق آزمون‌های t-test، فیشر و اسپیرمن وجود و  
میزان معناداری نتایج حاصل، مشخص شد. داده‌ها به  
صورت خطای استاندارد میانگین  $\pm$  میانگین ( $\pm$  SEM  
mean) و در سطوح معناداری  $p < 0/05$  گزارش  
شده‌اند.

#### 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

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<sup>+</sup> و افراد با MRD<sup>-</sup>، مشخص گردید که به طور معناداری سطح بالای (بیش از ۱/۵) بیان ژن *MDR1* در افراد با MRD<sup>+</sup> (افراد دارای مقاومت دارویی) بیشتر از افراد با MRD<sup>-</sup> بود (۶۶/۶٪ در مقابل ۳۳/۳٪،  $p=۰/۰۴۸$ ). 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 ( $p=۰/۰۴۸$ ). 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 (Pit) 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.

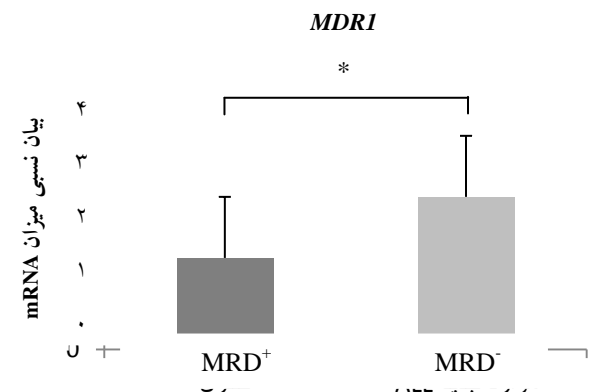
### بحث

مقاومت دارویی چندگانه، 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<sup>+</sup> و MRD<sup>-</sup> ( $p=۰/۰۴۹$ )

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

ارزیابی‌های آماری نشان داد، زمانی که بیان *MDRI* 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 کانروا 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 *MDRI* 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 ریمیسون کامل) در بالغین مبتلا به *ALL* دانسته‌اند (۳۰). هم چنین استیسیزنسکی 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*

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 *MDRI* 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 *MDRI* را در کودکان ایرانی مبتلا به *ALL* بررسی نموده است. در پژوهش حاضر، میزان بیان *MDRI 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 *MDRI* در کودکان مبتلا به *ALL* در بدو تشخیص، افزایش بیان ۱/۶ برابری ژن *MDRI* نسبت به گروه کنترل به دست آمد (۰/۷۰ ± ۲/۴۱ در مقابل ۱/۴۵ ± ۰/۲۹) (SEM ± میانگین،  $p \leq 0/16$ ). 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 *MDRI* بالاتر از میانگین بیان در گروه کنترل می‌باشد. کورتی و همکارانش نیز در مقایسه میزان بیان ژن‌های *MDR* از جمله ژن *MDRI* اعلام کردند که ۳۶/۷٪ مبتلایان دارای بیان بالای ژن *MDRI* 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 *MDRI* در مقایسه با وضعیت *MRD* یک ساله، مشخص شد که افزایش بیان بیش از ۱/۵ برابری این ژن در افراد *MRD*<sup>+</sup> به طور معناداری بیش از افراد *MRD*<sup>-</sup> می‌باشد (۱/۲۲ ± ۲/۲۹ در مقابل ۰/۲۱ ± ۰/۷۹) (SEM ± میانگین،  $p \leq 0/048$ ).

### نتیجه گیری

مطالعه حاضر با گزارش ارتباط مستقیم فنوتیپ MDR (افزایش بیان ژن MDR1) با بروز مقاومت دارویی (مثبت شدن MRD) در نمونه‌های بالینی، پیشنهاد می‌دهد که بیان این ژن در زمان تشخیص را می‌توان به عنوان فاکتور پیش‌آگهی نامطلوب مدنظر قرار داد. ارزیابی پروفایل بیان این ژن می‌تواند منجر به شناسایی افراد با خطر بالای عود گردد. با توجه به آن که بر اساس اطلاعات پیش‌آگهی امکان تغییر یا تشدید پروتکل درمانی در بیماران با خطر بالا فراهم می‌آید؛ این امر می‌تواند نقش به‌سزایی در جهت افزایش بازده درمان و جلوگیری از عود در این گروه از مبتلایان به ALL ایفا نماید.

ژن MDR1 در بیمارانی که رمیسیون کامل در آنان محقق نشده، به طور قابل ملاحظه‌ای بیشتر بوده است (۳۲). نتایج به دست آمده از این پژوهش بیانگر ارتباط مستقیم افزایش بیان ژن MDR1 و بروز مقاومت دارویی در کودکان مبتلا به ALL می‌باشد و با توجه به احتمال تاثیر دیگر اعضای هم خانواده این ژن در این خصوص، از جمله ترانسپورترهای ABCG3، ABCB1 و MRP1، بررسی پروفایل بیان ژنی هر یک از این ژن‌ها، ارتباط بین این ترانسپورترها با یکدیگر، بررسی بیان ژن در سطح پروتئین و هم چنین ارزیابی سایر مکانسیم‌های مقاومت دارویی، از جمله افزایش بیان ژن‌های ضد آپوپتوزی در سلول‌های لوسمیک، نقش به‌سزایی در درک بهتر پدیده چند فاکتوری مقاومت دارویی در ALL خواهد داشت.

### References:

- 1- Beishuizen A. Immunogenetic studies in childhood acute lymphoblastic leukemia: analysis at diagnosis and relapse [dissertation]. Rotterdam: Afdeling Immunologie, Erasmus Universiteit; 1994. p. 249.
- 2- 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.
- 3- 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.
- 4- Gaynon PS. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia and Relapse. *Us S Pecial Populations Pediatrics Review* 2006; 1-7.
- 5- 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.
- 6- Ross DD. Novel mechanisms of drug resistance in leukemia. *Leukemia* 2000; 14(3): 467-73.
- 7- 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.
- 8- Bakos E, Homolya L. Portrait of multifaceted transporter, the multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1/ABCC1). *Pflugers Arch* 2007; 453(5): 621-41.
- 9- Leonard GD, Fojo T, Bates SE. The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist* 2003; 8(5): 411-24.
- 10- Ambudlkar SV, Kimchi - Sarfaty C, Sauna ZE, Gottesman MM. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 2003; 22(47): 7468-85.
- 11- Tsuruo T. Molecular cancer therapeutics: recent progress and targets in drug resistance. *Intern Med* 2003; 42(3): 237-43.
- 12- Lage H. Reversal of MDR1/P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by RNA interference. *International Congress Series* 2005; 1277: 144-53.
- 13- 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.
- 14- Abedi M, Rahgozar S. Iron deprivation effects on leukemic cells. *Iranian Journal of Pediatric Hematology & Oncology* 2012; 2(2(Supplement 1)): 57.
- 15- 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.
- 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.
- 17- 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.
- 18- Aouali N, Eddabra L, Macadré J, Morjani H. Immunosuppressors and reversion of multidrug-resistance. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 56(1): 61-70.
- 19- 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, Mäkiperna 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.<sup>1</sup>, Rahgozar S.<sup>1</sup>, Moafi A.R.<sup>2</sup>, Ghaedi K.<sup>1</sup>, Moshtaghian S.J.<sup>1</sup>,  
Entezar-e-Ghaem M.S.<sup>1</sup>, Montazeri F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran

<sup>2</sup>Faculty 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<sup>+</sup> was significantly higher than MRD<sup>-</sup> patients ( $2.29 \pm 1.22$  vs  $0.79 \pm 0.21$ )(mean  $\pm$  SEM,  $p= 0.049$ ). Most of the patients with over expression of *MDR1* gene were MRD<sup>+</sup> (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