



## بررسی پروفایل بیانی mRNA ژن ABCG2/BCRP در کودکان مبتلا به لوسمی لنفوبلاستی حاد

منصوره السادات انتظارفائم<sup>۱</sup>، سهیلا رهگذر<sup>۲\*</sup>، علیرضا معافی<sup>۳</sup>، سیدجمال مشتاقیان<sup>۴</sup>، ابوالقاسم اسماعیلی<sup>۵</sup>، مرجان عابدی<sup>۶</sup>، فاطمه منتظری<sup>۷</sup>

۱،۶،۷- کارشناس ارشد زیست‌شناسی سلولی - ملکولی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۲،۴،۵- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشیار گروه اطفال، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اصفهان، اصفهان، ایران

شماره ثبت کارآزمایی بالینی: IRCT2012092810955N1

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۶/۲۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۹/۱۴

### چکیده

مقدمه: ABCG2/BCRP، ATP، یکی از اعضای شاخص ابرخانواده انتقال‌دهنده‌های متصل‌شونده به است. عملکرد اکثر اعضاء این ابرخانواده پروتئینی، به‌عنوان یکی از عوامل مؤثر در بروز مقاومت دارویی چندگانه شناخته شده است. MDR سد اصلی در برابر درمان لوسمی لنفوبلاستی حاد (ALL) می‌باشد. هرچند شواهد فراوانی مبنی بر دخالت ABCG2 در بروز مقاومت دارویی در سلول‌های توموری مختلف وجود دارد، اما نقش این ژن در بروز MDR در بلاست‌های بیماران مبتلا به ALL همچنان مبهم است. روش بررسی: در این مطالعه با استفاده از روش Real-Time PCR نمونه خون محیطی یا مغز استخوان ۲۸ کودک مبتلا به ALL با تشخیص اولیه و ۱۵ کودک کنترل مراجعه‌کننده به بیمارستان سیدالشهداء شهر اصفهان مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی کیفیت پاسخ بیماران به شیمی‌درمانی، حداقل بیماری باقی‌مانده (MRD) پس از یک سال درمان، سنجش شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ و GraphPad Prism 5 تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج: پروفایل بیانی mRNA ژن ABCG2/BCRP در بیماران با تشخیص اولیه نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نداشت. از طرفی بررسی بیماران در دو گروه MRD<sup>+</sup> و MRD<sup>-</sup> بیانگر عدم تفاوت میزان بیان ABCG2/BCRP در این دو گروه بود. میزان بیان این ژن با ایمونوفلورسنتی ALL و یا عوامل پیش‌آگهی شناخته‌شده این بیماری، ارتباطی نشان نداد. نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش بیانگر عدم تأثیر میزان بیان ژن ABCG2/BCRP در بروز مقاومت دارویی بیماران مبتلا به ALL می‌باشد. براساس یافته‌های این تحقیق، ارزش بالینی تعیین پروفایل بیانی ژن ABCG2/BCRP به‌عنوان عامل پیش‌آگهی بیماری ALL کودکان در منطقه مورد بررسی، رد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: مقاومت دارویی چندگانه، ALL کودکان، پروتئین ABCG2، حداقل بیماری باقیمانده، پیش‌آگهی

## مقدمه

لوسمی لنفوبلاستی حاد ( ALL: Acute Lymphoblastic Leukemia)، به نوعی از لوسمی گفته می‌شود که منشأ آن پیش‌سازهای لنفوئیدی موجود در مغز استخوان می‌باشد، به نحوی که ۲۰ درصد از خون محیطی یا مغز استخوان فرد بیمار را گلبول‌های سفید نابالغ (بلاست) تشکیل می‌دهد (۱). بر اساس آمار طبقه‌بندی بین‌المللی سرطان کودکان، لوسمی‌ها با ۳۴ درصد فراوانی، شایع‌ترین نوع سرطان در میان کودکان محسوب می‌شوند (۲) و در این میان ۸۰ درصد از موارد لوسمی در کودکان، ALL می‌باشد (۳). ALL با استفاده از مارکرهای ایمونولوژیک، به ۴ زیرگونه عمده Early pre B-cell، Pre B-cell، (Mature) B-cell و T-cell تقسیم می‌شود که زیرگونه early pre B-cell شایع‌ترین نوع در میان کودکان است (۱). رویکردهای درمانی موجود برای ALL بواسطه تفاوت در مشخصات بیماران و در نتیجه تفاوت در پیش‌آگهی بیماری، بسیار متنوع و پیچیده هستند (۴).

مشکل اصلی در درمان لوسمی‌های حاد، بروز مقاومت به داروهای شیمی‌درمانی است. برخی از بیماران به شیمی‌درمانی پاسخ مطلوبی نمی‌دهند و در برخی دیگر، بیماری همراه با بروز مقاومت دارویی، عود می‌کند (۵). مقاومت دارویی چندگانه (Multidrug Resistance) (ذاتی و یا اکتسابی)، مانع اصلی در درمان سرطان محسوب می‌شود (۶). این پدیده به معنی شرایطی است که در آن سلول‌ها به اثر سیتوتوکسیک نه تنها یک دارو، بلکه گروهی از داروهای مرتبط و غیرمرتبط از نظر ساختار و عملکرد شیمیایی مقاوم می‌شوند (۷). تفاوت در کیفیت پاسخ بیماران به درمان، ناشی از تفاوت در عوامل پیش‌آگهی مؤثر بر بروز مقاومت دارویی است (۸). متغیرهای بالینی و بیولوژیکی متعددی به‌عنوان عوامل تعیین‌کننده پیش‌آگهی نامطلوب در ALL معرفی شده‌اند. از مهم‌ترین آنها می‌توان به بالا بودن سن بیمار در هنگام تشخیص بیماری (۹)، شمارش اولیه گلبول‌های سفید بالاتر از ۵۰ هزار سلول در میکرولیتر خون (۶)، ناهنجاری‌های سیتوژنتیک مانند بروز کروموزوم فیلادلفیا (۱۰)، ایمونوفنوتیپ T-cell از ALL (۱۱) و پروفایل بیان ژن‌های مختلف (۱۲) اشاره نمود.

طی دهه‌های گذشته مکانیسم‌های مختلف مقاومت دارویی سلولی، به‌طور گسترده‌ای در هر دو سطح In Vitro و In Vivo مورد پژوهش قرار گرفته‌اند (۱۳). درک بیشتر مکانیسم‌های درگیر در مقاومت دارویی سلولی طی دهه‌های اخیر منجر به تنظیم پروتکل‌های درمانی موفق‌تر شده است (۱۴). در میان این مکانیسم‌های متنوع، افزایش بیان انتقال‌دهنده‌های متصل‌شونده به ATP (انتقال‌دهنده‌های ABC: ATP-Binding Cassette Transporters) از مهم‌ترین عامل بروز MDR، بیان شده است (۱۵، ۱۶). انتقال‌دهنده‌های ABC، بزرگ‌ترین خانواده پروتئین‌های گذرنده از غشا هستند که بر اساس توالی و سازمان‌یابی دمین‌های متصل‌شونده به ATP انتقال‌دهنده، در این گروه جای گرفته‌اند (۱۷). ژن‌های ABC که در میان گونه‌های یوکاریوتی به‌میزان بالایی حفاظت شده هستند، به‌طور طبیعی در غشاء پلاسمایی و غشاء اندامک‌های داخل‌سلولی مانند گلژی، اندوزوم‌ها و میتوکندری قرار دارند (۱۸) و ملکول‌های متنوعی مانند لیپید، کلسترول و یون‌ها را از سیتوپلاسم سلول به خارج از آن و یا درون اندامک‌های داخل سلولی منتقل می‌کنند (۱۹). ژنوم انسان در حدود ۴۸ انتقال‌دهنده ABC را کد می‌کند (۲۰)، که بر اساس بررسی‌های فیلوژنتیک و هومولوژی ترادف‌های آمینواسیدی، به ۷ زیرخانواده فرعی (ABCA-ABCG) دسته‌بندی می‌شوند (۲۱). مطالعات In Vitro نشان می‌دهند که حداقل ۱۲ انتقال‌دهنده ABC در بروز MDR: Multi Drug Resistance در سلول‌های نئوپلاستی نقش دارند (۲۲). در این میان نتایج مطالعات متنوع In Vitro و بالینی حاکی از عدم توافق محققین در مورد تغییر میزان بیان یکی از اعضاء شاخص این خانواده یعنی BCRP: Breast Cancer Resistance Protein یا همان ABCG2 (دومین عضو زیرخانواده ABCG) در بیماران مبتلا به سرطان و نقش آن به‌عنوان عامل پیش‌آگهی است (۲۳). مطالعات گسترده صورت گرفته بر روی رده‌های سلول سرطانی انسانی مختلف نشان داده‌اند که داروهای شیمی‌درمانی مانند میتوزانترون، اتوپوزید، توپوتکان، متوترکسات، دوکسوروبیسین و

مغز استخوان سالم ۱۵ کودک به عنوان کنترل مورد بررسی قرار گرفت. گروه کنترل شامل کودکان مشکوک به سایر بیماری‌های خونی که دارای مغز استخوان سالم بودند و عدم وجود هر نوع سرطان با انجام آزمایشات مربوطه تأیید گردیده بود. برای کلیه بیماران و نمونه‌های کنترل پس از کسب رضایت از والدین، از آنها نمونه‌گیری به‌عمل آمد. کودکان بیمار، شامل: ۱۰ دختر و ۱۸ پسر و کودکان کنترل شامل ۶ دختر و ۹ پسر بودند. تشخیص بیماری و آزمایشات تکمیلی از طریق آزمایشات بالینی مختلف از جمله بررسی مورفولوژی با استفاده از رنگ‌آمیزی رایت-گیمسا (Merck/Germany)، فلوسیتومتری (کیت Daco/Germany و دستگاه فلوسیتومتری Partec/Germany)، شمارش کامل سلول‌های خونی (CBC: Complete Blood Counting) (دستگاه HI) و اندازه‌گیری LDH سرم خون، انجام گرفت. نمونه‌های خون (۹-۲ میلی‌لیتر) هپارینه شده (۱ میلی‌لیتر هپارین استریل ۲۰۰۰ واحدی) جهت انجام آزمایشات ملکولی به آزمایشگاه زیست‌شناسی سلولی- ملکولی دانشکده علوم دانشگاه اصفهان منتقل شدند.

جهت استخراج سلول‌های تک‌هسته‌ای (MNCs: Mononuclear Cells) نمونه‌های خونی کودکان مبتلا و سالم با استفاده از کیت Lymphoprep™ (Axis-Shield/Norway)، طبق دستورالعمل کیت و بر اساس شیب چگالی شناوری اجزاء خون، صورت گرفت. MNC‌های جداسازی شده در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد، جهت انجام آزمایشات بعدی نگهداری شدند.

به منظور استخراج RNA تام از سلول‌های تک‌هسته‌ای جدا شده از نمونه‌های خونی، از RNeasy plus Mini Kit (Qiagen/USA) استفاده شد. مقدار و کیفیت RNA استخراج شده طبق دستورالعمل کیت، با استفاده از بیوفتومتر (اپندورف) و انجام الکتروفورز، مورد بررسی قرار گرفت. ۲ نانوگرم از RNA استخراج شده، بر طبق دستورالعمل کیت cDNA Synthesis (Fermentas/USA) با استفاده از RevertAid™ M- Random Hexamer، آنزیم

دئونوروبیسین، که در پروتوکول‌های شیمی‌درمانی بیماران لوسمی که به‌طور گسترده‌ای گنجانده می‌شوند، سوبسترای پروتئین ABCG2 می‌باشند (۱۳، ۱۷، ۲۲، ۲۳) و بیان ژن این پروتئین در رده‌های سلولی سرطانی مقاوم مانند سلول‌های سرطان کولون، گاستریک، سینه و تخمدان، افزایش یافته و در بروز مقاومت به داروهای اعمال‌شده، مؤثر است (۲۴-۲۶). بررسی‌های بالینی بر روی تومورهای جامد انسانی مانند سرطان‌های تخمدان، مثانه و کولون، حاکی از افزایش بیان BCRP و دخالت آن در بروز مقاومت دارویی است (۲۷-۲۹). با این وجود نتایج تحقیقاتی دیگر برخلاف این نتایج هستند (۲۳، ۲۹). اکثر داده‌های موجود در مورد دخالت میزان بیان BCRP در مقاومت دارویی در سرطان، در زمینه لوسمی و در میان سایر لوسمی‌ها اغلب مربوط به لوسمی میلوئیدی حاد (AML: Acute Myeloblastic Leukemia) است (۲۹).

با توجه به محدودیت و تناقض در نتایج مطالعات صورت گرفته بر روی میزان بیان ژن ABCG2 و تأثیر آن بر ایجاد مقاومت دارویی در لوسمی حاد لنفوییدی، در پژوهش حاضر سعی بر آن است تا میزان بیان این ژن در سطح mRNA و ارتباط آن با بروز مقاومت دارویی (و به بیان دیگر پاسخ به درمان) در کودکان مبتلا به ALL بررسی گردد.

### روش بررسی

در این مطالعه که به‌صورت بالینی و آینده‌نگر انجام شد، کلیه بیماران تازه تشخیص لوسمی لنفوییدی حاد با سن کمتر از ۱۵ سال (در زمان تشخیص) که طی فروردین ۸۹ الی فروردین ۹۱ در بیمارستان حضرت سیدالشهدای اصفهان تحت درمان قرار داشتند، وارد مطالعه شدند. بیماران با تشخیص موارد دیگر لوسمی (مانند Mixed lineage) و یا مواردی که درمان دیگری دریافت نموده بودند و بیماران با هرگونه سابقه عود بیماری از مطالعه حذف شدند. بیمارانی که ۱ سال دوره درمانی را در مرکز فوق سپری نمودند (عدم مراجعه و یا انتقال به شهر دیگر) و نیز مواردی که با رضایت والدین برای انجام نمونه همراه نبود نیز از مطالعه حذف شدند. که در این میان نمونه خون محیطی یا مغز استخوان ۲۸ کودک مبتلا به ALL با تشخیص اولیه و نمونه

خون و استخراج DNA، برای تکثیر ناحیه بسیار متغیر ژن بازآرایی شده زنجیره سنگین ایمنوگلوبولین از تکنیک PCR با پرایمرهای اختصاصی مناطق ثابت انتهای 3' قطعات J و V استفاده می‌شود. سپس با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید، باند محصولات مورد بررسی قرار می‌گیرند. حضور یک باند به معنای مونوکلونالیتهی (واکنشی) بوده و به عنوان MRD<sup>+</sup> گزارش می‌شود. پلی‌کلونالیتهی (حالت طبیعی) نیز MRD<sup>-</sup> می‌باشد. از بین کل نمونه‌های بیمار (۲۸ فرد)، وضعیت MRD در افرادی که دوره درمانی یک ساله آنان به اتمام رسیده، و در مرحله نگهدارنده قرار داشتند (۱۴ نفر)، ارزیابی گردید. جهت انجام این آزمایش نمونه مغز استخوان افراد مورد نظر به آزمایشگاه "پیوند" شهر تهران ارسال شد.

نتایج این تحقیق به وسیله نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ و Graph Pad Prism 5 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و با استفاده از آزمون independent t-test و One Way ANOVA، وجود و میزان معنی‌داری اختلاف در نتایج حاصل مشخص شد. بررسی همبستگی (مستقیم یا غیرمستقیم) میان شاخص‌های مورد نظر از طریق محاسبه ضریب پیرسون انجام شد. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

### نتایج

توالی پرایمرهای مورد استفاده برای سنتز mRNAهای ABCG2/BCRP و GAPDH در جدول ۱ آورده شده است. نتایج آزمایشات بالینی از جمله تعداد گلبول‌های سفید خون (WBC)، پلاکت (PLT)، لاکتات دهیدروژناز (LDH) درصد CD34 و CD10 در ۴ زیر گونه ALL در جدول یک آورده شده است.

ارتباط میزان بیان mRNA می ABCG2/BCRP با سه عامل پیش‌آگهی مطلوب (میزان پلاکت خون و بیان مارکرهای CD34 و CD10 سلول‌های خونی بیماران) و سه عامل پیش‌آگهی نامطلوب (میزان گلبول‌های سفید خون، میزان LDH سرم و سن بیماران)، محاسبه شد اما هیچگونه ارتباط

MuLV Reverse Transcriptase و دستگاه PCR (Takara/Japan)، به cDNA تبدیل شد. cDNA حاصل جهت انجام مرحله بعدی آزمایشات در ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت.

برای بررسی میزان بیان mRNA می ABCG2 از روش Real-Time PCR از طریق کیت SYBR Premix Ex Taq II (Perfect Real Time) (Takara/Japan) و دستگاه Chromo 4 (Bio-Rad/USA)، استفاده شد. با انجام آزمایش سریال رقت، رقت ۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر (و حجم ۲ میکرولیتر) از cDNA سنتز شده مورد استفاده قرار گرفت. طبق دستورالعمل کیت، حجم نهایی مواد افزوده شده به تیوب Real-Time PCR (Bio-Rad, USA)، ۲۰ میکرولیتر و علاوه بر cDNA، شامل این اجزا بود: پرایمرهای رفت و برگشت هرکدام ۰/۸ میکرولیتر (غلظت ۱۰۰ نانومولار)، سایبرگرین ۱۰ میکرولیتر و ddH<sub>2</sub>O ۶/۴ میکرولیتر. برنامه Real-Time PCR شامل ۲ دقیقه Pre-Heating در ۵۰ درجه سانتی‌گراد، ۸ دقیقه Heating در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه دناتوراسیون در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه اتصال پرایمرها در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد و ۱ دقیقه گسترش محصول در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، در ۳۵ چرخه بود. ژن خانه‌گردان مورد استفاده در این پژوهش به عنوان کنترل داخلی، GAPDH: Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase بود. پرایمرهای مورد استفاده برای سنتز mRNAهای ABCG2 و GAPDH از پژوهش‌های پیشین استخراج شد (۳۰). عملکرد اختصاصی این پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار طراحی پرایمر Beacon Designer 7.5 و نیز نرم‌افزار آنلاین Primer Blast موجود در پایگاه NCBI تأیید و سنتز آنها به شرکت Invitrogen (CA) سفارش داده شد.

ارزیابی باقی‌ماندن کلونالیتهی (IgH / gamma receptor gene rearmament) پس از یک سال درمان، به عنوان معیار وجود مقاومت دارویی (پاسخ به درمان انجام‌شده) مد نظر قرار گرفت. در این روش بعد از تخلیص سلول‌های تک‌هسته‌ای

مستقیم یا غیرمستقیمی میان میزان بیان این ژن و این فاکتورها مشاهده نشد (جدول ۱).

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده برای سنتز mRNA

ژن	توالی پرایمر (۵' به ۳')	طول پرایمر (جفت باز)	طول محصول (جفت باز)
GAPDH	GCCCCAGCAAGAGCACAAGAGGAAGA : رفت	۲۶	۱۰۶
	CATGGCAACTGTGAGGAGGGGAGAT : برگشت	۲۶	
ABCG2/BCRP	CGTGGCCTTGGCTTGTATGATTGTTA : رفت	۲۶	۱۷۸
	GGCAAGGGAACAGAAAACAACAAAAA : برگشت	۲۶	

جدول ۲: مشخصات بیماران مورد بررسی با تشخیص اولیه

ایمونوفنوتیپ	WBC (۱۰ <sup>۳</sup> /ul)	PLT (۱۰ <sup>۳</sup> /ul)	LDH (IU/l)	سن (سال)	CD34 (درصد)	CD10 (درصد)
early pre-B-ALL (n=8)	۲۶/۴۷±۱۲/۹۷	۸۳/۱۲±۲۷/۷۹	۱۰۸۴/۴۰±۲۲۷/۷۹	۵/۲۵±۰/۷۹	۵۶/۱۲±۲۹/۰۲	۶۹/۰۰±۷/۶۴
pre-B-ALL (n=13)	۴۱/۱۳±۱۶/۲۳	۷۶/۲۱±۲۰/۹۲	۱۹۷۸/۳۱±۳۸۲/۰۹	۵/۳۲±۰/۹۳	۳۲/۲۸±۲۵/۲۹	۵۳/۶۵±۸/۳۰
B-ALL (n=1)	۴۰/۵۰±۰	۱۷±۰	۲۳۹۰۰±۰	۸±۰	آن.	آن.
T-ALL (n=7)	۲۸/۴۸±۱۶/۰۳	۶۲/۸۵±۲۰/۴۰	۱۵۱۸/۳۲±۸۶۷/۳۹	۷/۷۱±۲/۵۲	۴۰/۰۲±۴۱/۵۶	۲۴/۱۸±۱۳/۱۰

معنی داری با این میزان در گروه کنترل ندارد. از طرفی میزان بیان نسبی این ژن در بیماران دچار عود بیماری، به طور معنی داری نسبت به هر دو گروه کنترل و بیماران با تشخیص اولیه بالاتر بود (به ترتیب ۴/۸۳±۴/۱۲ در مقابل ۱/۳۵±۰/۳۰ و ۰/۹۴±۰/۲۰) ( $p < 0.01$ ) (نمودار ۱).

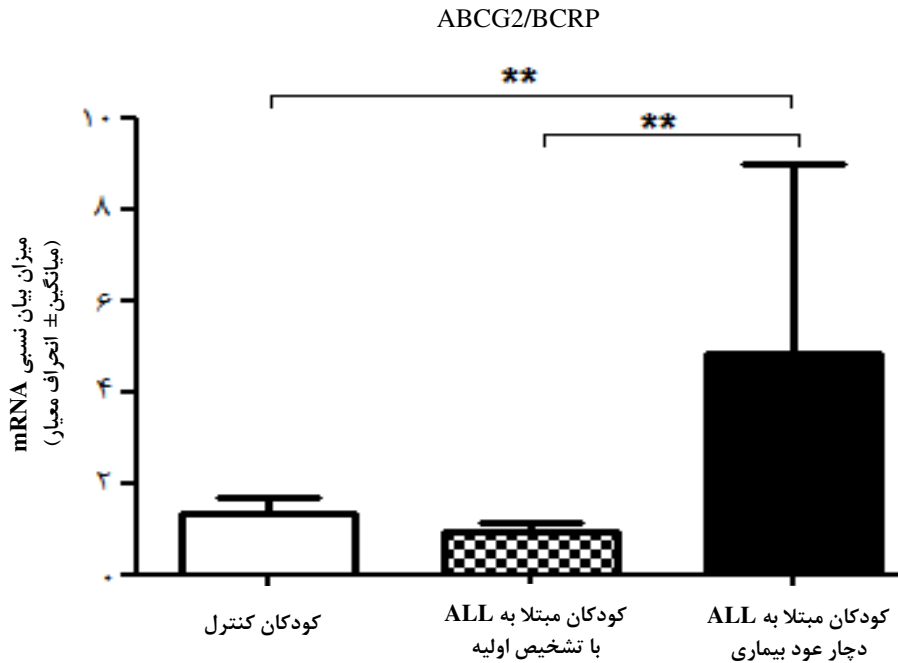
مقایسه میزان بیان mRNA ABCG2/BCRP در دو گروه بیماران مبتلا به زیرگونه B-ALL و بیماران مبتلا به زیرگونه T-ALL، با استفاده از آزمون Independent T-test، علیرغم میانگین بالاتر میزان بیان در گروه B-ALL، حاکی از عدم تفاوت معنی دار میزان بیان این ژن در سطح mRNA در دو ایمونوفنوتیپ های ALL بود (به ترتیب ۱/۵۲±۰/۵۷ و ۰/۶۹±۰/۱۳) ( $p = 0.36$ ) (نمودار ۲).

وضعیت MRD بیمارانی که دوره یک ساله درمانی آنها تکمیل شده و در مرحله نگهداری قرار داشتند در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۳: گروه بندی ۱۴ بیمار دارای نتیجه بررسی MRD

ایمونوفنوتیپ		وضعیت MRD
T-ALL	B-ALL	
۲	۷	MRD <sup>-</sup>
۲	۳	MRD <sup>+</sup>

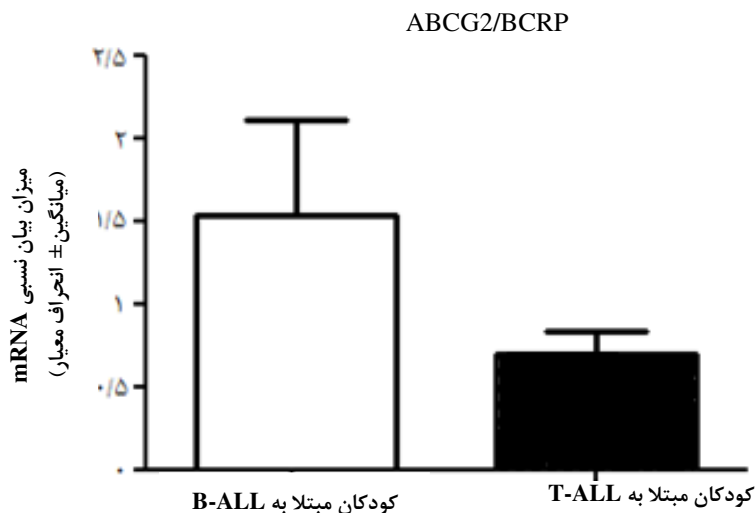
مقایسه میزان بیان نسبی mRNA ABCG2 در کودکان کنترل و کودکان با تشخیص اولیه نشان داد که میزان بیان متوسط این ژن در گروه بیماران با تشخیص اولیه تفاوت



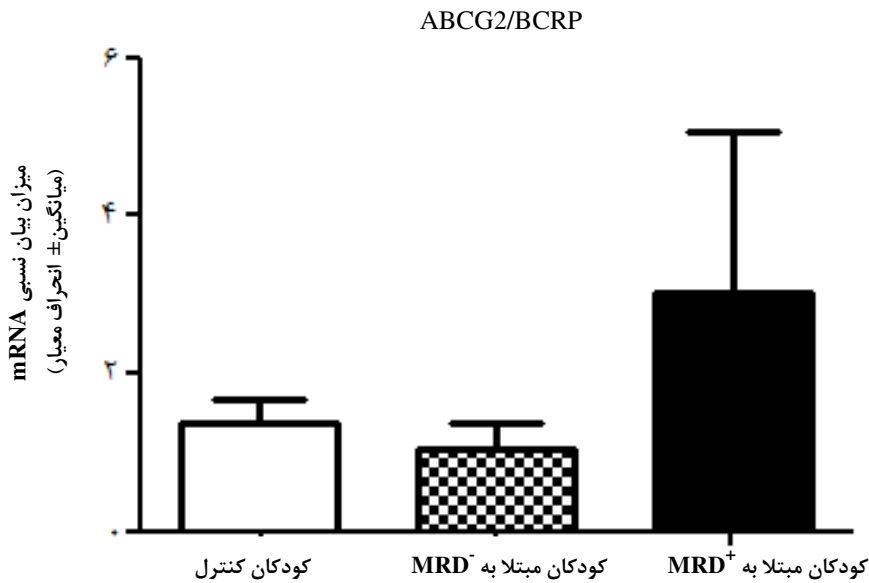
نمودار ۱: میزان بیان نسبی ژن ABCG2/BCRP در سه گروه کودکان کنترل، کودکان مبتلا به ALL با تشخیص اولیه و کودکان مبتلا به ALL دچار عود بیماری ( $p < 0.01$  (\*\*))

تعمیقی Tukey انجام شد. با وجود میزان بالاتر میانگین بیان این ژن در گروه  $MRD^+$  نسبت به هر دو گروه  $MRD^-$  و کنترل، این میزان از نظر آماری، معنی دار نبود (به ترتیب  $3/02 \pm 2/02$ ،  $1/05 \pm 0/31$  و  $1/35 \pm 0/30$ ) ( $p = 0/29$ ) (نمودار ۳).

مقایسه سطح بیان mRNA ژن ABCG2/BCRP در سه گروه کودکان کنترل، کودکان مبتلا به ALL با نتیجه مثبت  $MRD$  ( $MRD^+$ ) و کودکان مبتلا به ALL با نتیجه منفی  $MRD$  ( $MRD^-$ ) با استفاده از آزمون One Way ANOVA و آزمون



نمودار ۲: میزان بیان نسبی ژن ABCG2/BCRP در کودکان مبتلا به ALL در دو ایمونوفنوتیپ B-cell و T-cell



نمودار ۳: میزان بیان نسبی ژن ABCG2/BCRP در کودکان مبتلا به ALL در سه گروه MRD<sup>+</sup>، MRD<sup>-</sup> و کنترل

### بحث و نتیجه گیری

افزایش بیان ABCG2 در لوسمی میلو بلاستیک حاد (AML) گزارش شده است (۳۱). با وجود اینکه برخی مطالعات انجام شده در این خصوص، نتایجی متناقض را نشان می دهد، اما از مجموع پژوهش های صورت گرفته تا به امروز می توان چنین نتیجه گرفت که بیان ABCG2 با پیش آگهی ضعیف در بالغین و کودکان مبتلا به AML و نیز بالغین مبتلا به ALL مرتبط است (۳۲-۳۶). با نگاهی بر مطالعات انجام شده بر میزان بیان این ژن در کودکان مبتلا به ALL می توان متوجه شد که تناقض های موجود به حدی زیاد است که ابراز هرگونه نتیجه گیری قطعی را در این زمینه غیرممکن می سازد. در حالی که برخی از پژوهشگران تفاوت معنی داری را در میزان بیان ABCG2 در کودکان مبتلا به ALL نسبت به کودکان کنترل، گزارش کرده اند (۲۵)، سایرین چنین تفاوتی را مشاهده ننموده اند (۳۷). Fedasenka و همکاران نشان دادند که میزان بیان ژن ABCG2 هیچگونه تأثیری بر پیش آگهی بیماری ندارد. مبنای اندازه گیری پاسخ به درمان در این مطالعه نیز، مانند پژوهش پیش رو، میزان MRD بوده است (۳۸). بررسی سایر عوامل بقاء بیماران در پژوهش های مختلف، نتایج متناقضی

داشته است. در حالی که Korti و همکاران ارتباطی میان میزان بیان mRNAی BCRP و بقاء مشاهده نکردند (۲۵). Cortez و همکاران ارتباط مستقیمی را بین بیان ABCG2 و بقاء بدون حادثه (EFS: Event-free Survival) بیمار، گزارش نموده اند (۱۶).

در این پژوهش، تحقیقات اولیه مشخص نمود که بیان ABCG2 در بیماران دچار عود بیماری نسبت به هر دو گروه کنترل و بیماران با تشخیص اولیه افزایش دارد. اما بررسی های بعدی بر روی بیماران با تشخیص اولیه که پس از ۱ سال درمان از نظر MRD مورد بررسی قرار گرفته بودند، این فرضیه را که داروهای شیمی درمانی به نوعی با ایجاد مقاومت دارویی در ارتباط هستند، رد نمود. افزایش بیان ABCG2 در بیماران MRD<sup>+</sup> نسبت به گروه کنترل معنی دار نبود. حتی تعیین نقطه Cut-off و بررسی ارتباط بیان ژن در بالاتر از این میزان نیز ارتباطی را با کیفیت پاسخ به درمان نشان نداد. برخی محققین معتقدند که وجود تنها یک داروی سوبسترای پروتئین ABCG2 در پروتکل درمانی (مشابه آنچه که در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت)، مقاومت دارویی اندکی ایجاد می نماید که می تواند توسط سایر مکانیسم های سیتو استاتیک مهار شده

استفاده از تعداد بیشتر نمونه، می‌تواند تصویر روشنی از تأثیر میزان بیان انتقال‌دهنده‌های ابرخانواده مهم ABC بر بروز مقاومت دارویی در کودکان مبتلا به ALL ارائه دهد.

یکی از پیچیدگی‌های موجود بر سر راه بررسی تأثیر میزان بیان یک ژن بر پدیده بالینی موردنظر، وجود سطوح بیانی، تنظیمی و عملکردی مختلف برای ژن‌ها در سلول‌های پستانداران می‌باشد. پروتئین‌های انتقال‌دهنده ABC نیز از این قاعده مستثنی نیستند. یک فرضیه مبنی بر ارتباط بیان این ژن‌ها با پدیده‌ای هم‌چون افزایش به‌دام‌اندازی داروها و بروز مقاومت دارویی، زمانی می‌تواند تأیید شود که بتواند ژن موردنظر را تا سطح یک پروتئین کامل و عملکردی، پیگیری نماید. به‌عنوان نمونه، Suvannasankha و همکاران به بررسی میزان بیان ABCG2 در دو سطح mRNA و پروتئین پرداختند و مشاهده کردند که این دو سطح بیانی بایکدیگر ارتباطی ندارند (۴۰). بنابراین در بررسی‌های بیان ژنی، پرداختن به سطوح بیانی پایین ژن‌ها، لازم است اما به‌هیچ‌وجه برای نتیجه‌گیری قطعی، کافی نیست و تأیید ارتباط بیان ژن با پدیده موردنظر، به بررسی سطوح بالاتر بیانی نیاز دارد.

#### سیاسگزاری

تحقیق حاضر با استفاده از بودجه در نظر گرفته‌شده برای طرح شماره ۷۲۷۶۳ / ۸۹ مصوب شورای پژوهشی دانشگاه اصفهان که به مجری طرح دکتر سهیلا رهگذر اختصاص یافته، انجام گرفته‌است. نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از پرسنل بیمارستان سیدالشهداء شهر اصفهان اعلام می‌دارند.

و تأثیری بر بقاء سلول توموری ایجاد نکند (۳۷). محدودیت تعداد نمونه در این مطالعه از جمله مواردی است که می‌تواند نتایج به دست آمده را تحت‌الشعاع قرار دهد. انجام مطالعات بعدی با تعداد بیشتر نمونه، به‌ویژه در مورد بیماران که از نظر MRD مورد بررسی قرار گرفته‌اند، دقت نتایج را به‌مراتب افزایش خواهد داد. درخصوص عدم ارتباط میزان بیان ABCG2/BCRP با ایمونوفنوتیپ ALL، نتایج به‌دست‌آمده با مطالعات Cortez و همکاران، و Korti و همکاران همخوانی دارد (۱۶، ۲۵). از طرفی مشاهده عدم ارتباط بیان این ژن با عوامل پیش‌آگهی شناخته‌شده نیز توسط داده‌های پیشین تأیید می‌شود (۳۷، ۳۹).

در مجموع، نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش حاکی از عدم وجود ارتباط معنی‌دار پروفایل بیانی mRNA ژن ABCG2/BCRP با پاسخ به درمان در کودکان مبتلا به ALL می‌باشد. به تعبیری دیگر، این مطالعه هرگونه افزایش یا کاهش میزان رونویسی ژن مورد مطالعه را در ایجاد مقاومت دارویی، بی‌اثر می‌داند. این نتایج که اولین گزارش در ایران بر روی تأثیر میزان بیان ABCG2/BCRP در ایجاد مقاومت دارویی در ALL کودکان می‌باشد، تأییدی بر پژوهش‌های است که بر روی جمعیت‌های غیرایرانی انجام شده است و میزان بیان ABCG2/BCRP را در بیماری ALL، فاقد ارزش پیش‌آگهی دانسته‌اند (۳۷، ۳۸). انجام بررسی‌های گسترده‌تر بر روی سطوح بیانی بالاتر ژن ABCG2/BCRP و نیز بیان سایر انتقال‌دهنده‌های ABC، تعمیم جمعیت مورد بررسی به سایر نقاط ایران، بررسی سایر پروتکل‌های درمانی مورد استفاده در مورد ALL کودکان در مراکز شیمی‌درمانی ایران و به‌ویژه

#### References:

- Hoffbrand AV, Moss PAH, Pettit J. *Essential hematology*. 5th ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2006.p.157-68.
- Kaatsch P. *Epidemiology of childhood cancer*. Cancer Treat Rev 2010; 36(4): 277-85.



- 3- 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.
- 4- Bassan R, Hoelzer D. *Modern therapy of acute lymphoblastic leukemia.* J Clin Oncol 2011; 29(5): 532-43.
- 5- Steinbach D, Legrand O. *ABC transporters and drug resistance in leukemia: was P-gp nothing but the first head of the Hydra?* Leukemia 2007; 21(6): 1172-6.
- 6- Lund B, Asberg A, Heyman M, Kanerva J, Harila-Saari A, Hasle H, et al. *Risk factors for treatment related mortality in childhood acute lymphoblastic leukaemia.* Pediatr Blood Cancer 2011; 56(4): 551-9.
- 7- Norgaard JM, Hokland P. *Biology of multiple drug resistance in acute leukemia.* Int J Hematol 2000; 72(3): 290-7.
- 8- Ramakers-van Woerden NL, Pieters R, Loonen AH, Hubeek I, van Drunen E, Beverloo HB, et al. *TEL/AML1 gene fusion is related to in vitro drug sensitivity for L-asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia.* Blood 2000; 96(3): 1094-9.
- 9- Pui CH, Relling MV, Downing JR. *Acute lymphoblastic leukemia.* N Engl J Med 2004; 350: 1535-48.
- 10- Lee HJ, Thompson JE, Wang ES, Wetzler M. *Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: current treatment and future perspectives.* Cancer 2011; 117(8): 1583-94.
- 11- Styczynski J, Wysocki M. *In vitro drug resistance profiles of adult acute lymphoblastic leukemia: possible explanation for difference in outcome to similar therapeutic regimens.* Leuk Lymphoma 2002; 43(2): 301-7.
- 12- Swerts K, De Moerloose B, Dhooge C, Laureys G, Benoit Y, Philippe J. *Prognostic significance of multidrug resistance-related proteins in childhood acute lymphoblastic leukaemia.* Eur J Cancer 2006; 42(3): 295-309.
- 13- Filipits M. *Mechanisms of cancer: multidrug resistance.* Drug Discovery Today: Disease Mechanisms. 2004; 1(2): 229-34.
- 14- Pui CH. *Acute lymphoblastic leukemia: introduction.* Semin Hematol 2009; 46(1): 1-2.
- 15- 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.
- 16- 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.
- 17- Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. *The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily.* Genome Res 2001; 11(7): 1156-66.

- 18- Cavelier C, Lorenzi I, Rohrer L, von Eckardstein A. *Lipid efflux by the ATP-binding cassette transporters ABCA1 and ABCG1*. Biochim Biophys Acta 2006; 1761(7): 655-66.
- 19- Rees DC, Johnson E, Lewinson O. *ABC transporters: the power to change*. Nat Rev Mol Cell Biol 2009; 10(3): 218-27.
- 20- Locher KP. *Review. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2009; 364(1514): 239-45.
- 21- Moustafa MA, Ogino D, Nishimura M, Ueda N, Naito S, Furukawa M, et al. *Comparative analysis of ATP-binding cassette (ABC) transporter gene expression levels in peripheral blood leukocytes and in liver with hepatocellular carcinoma*. Cancer Sci 2004; 95(6): 530-6.
- 22- Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. *Targeting multidrug resistance in cancer*. Nat Rev Drug Discov 2006; 5(3): 219-34.
- 23- Gandhi YA, Morris ME. *Structure-activity relationships and quantitative structure-activity relationships for breast cancer resistance protein (ABCG2)*. AAPS J 2009; 11(3): 541-52.
- 24- Burger H, van Tol H, Brok M, Wiemer EA, de Bruijn EA, Guetens G, et al. *Chronic imatinib mesylate exposure leads to reduced intracellular drug accumulation by induction of the ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) drug transport pumps*. Cancer Biol Ther 2005; 4(7): 747-52.
- 25- 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.
- 26- Litman T, Brangi M, Hudson E, Fetsch P, Abati A, Ross DD, et al. *The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2)*. J Cell Sci 2000; 113 (Pt 11): 2011-21.
- 27- Candeil L, Gourdiere I, Peyron D, Vezzio N, Copois V, Bibeau F, et al. *ABCG2 overexpression in colon cancer cells resistant to SN38 and in irinotecan-treated metastases*. Int J Cancer 2004; 109(6): 848-54.
- 28- Diestra JE, Scheffer GL, Catala I, Maliepaard M, Schellens JH, Scheper RJ, et al. *Frequent expression of the multi-drug resistance-associated protein BCRP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material*. J Pathol 2002; 198(2): 213-9.
- 29- Nakanishi T, Ross DD. *Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its role in multidrug resistance and regulation of its gene expression*. Chin J Cancer 2012; 31(2): 73-99.
- 30- Warren MS, Zerangue N, Woodford K, Roberts LM, Tate EL, Feng B, et al. *Comparative gene expression profiles of ABC transporters in brain microvessel endothelial cells and brain in five species including human*. Pharmacol Res 2009; 59(6): 404-13.

- 31- Natarajan K, Xie Y, Baer MR, Ross DD. *Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance*. Biochem Pharmacol 2012; 83(8): 1084-103.
- 32- Abbott BL, Colapietro AM, Barnes Y, Marini F, Andreeff M, Sorrentino BP. *Low levels of ABCG2 expression in adult AML blast samples*. Blood 2002; 100(13): 4594-601.
- 33- Benderra Z, Faussat AM, Sayada L, Perrot JY, Chaoui D, Marie JP, et al. *Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein in 149 adult acute myeloid leukemias*. Clin Cancer Res 2004; 10(23): 7896-902.
- 34- Ho MM, Hogge DE, Ling V. *MDR1 and BCRP1 expression in leukemic progenitors correlates with chemotherapy response in acute myeloid leukemia*. Exp Hematol 2008; 36(4): 433-42.
- 35- Steinbach D, Sell W, Voigt A, Hermann J, Zintl F, Sauerbrey A. *BCRP gene expression is associated with a poor response to remission induction therapy in childhood acute myeloid leukemia*. Leukemia 2002; 16(8): 1443-7.
- 36- Suvannasankha A, Minderman H, O'Loughlin KL, Nakanishi T, Ford LA, Greco WR, et al. *Breast cancer resistance protein (BCRP/MXR/ABCG2) in adult acute lymphoblastic leukaemia: frequent expression and possible correlation with shorter disease-free survival*. Br J Haematol 2004; 127(4): 392-8.
- 37- Sauerbrey A, Sell W, Steinbach D, Voigt A, Zintl F. *Expression of the BCRP gene (ABCG2/MXR/ABCP) in childhood acute lymphoblastic leukaemia*. Br J Haematol 2002; 118(1): 147-50.
- 38- Fedasenka UU, Shman TV, Savitski VP, Belevcev MV. *Expression of MDR1, LRP, BCRP and Bcl-2 genes at diagnosis of childhood all: comparison with MRD status after induction therapy*. Exp Oncol 2008; 30(3): 248-52.
- 39- Plasschaert SL, van der Kolk DM, de Bont ES, Kamps WA, Morisaki K, Bates SE, et al. *The role of breast cancer resistance protein in acute lymphoblastic leukemia*. Clin Cancer Res 2003; 9(14): 5171-7.
- 40- Suvannasankha A, Minderman H, O'Loughlin KL, Nakanishi T, Greco WR, Ross DD, et al. *Breast cancer resistance protein (BCRP/MXR/ABCG2) in acute myeloid leukemia: discordance between expression and function*. Leukemia 2004; 18(7): 1252-7.

## *Evaluation of mRNA Expression Profile of ABCG2/BCRP in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia*

*Entezar-e-Ghaem M(MSc)<sup>1</sup>, Rahgozar S(PhD)<sup>\*2</sup>, Moafi AR(MD)<sup>3</sup>, Moshtaghian J(PhD)<sup>4</sup>, Esmaeli A(PhD)<sup>5</sup>, Abedi M(MSc)<sup>6</sup>, Montazeri F(MSc)<sup>7</sup>*

<sup>1,2,4-7</sup>Department of Biology, University of Isfahan, Esfahan, Iran

<sup>3</sup>Department of Pediatrics, Isfahan University of Medical Sciences, Esfahan, Iran

**Received:** 4 Dec 2012

**Accepted:** 12 Sep 2013

### **Abstract**

**Introduction:** Multidrug resistance (MDR) is the main obstacle against treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL). ATP-binding cassette transporters function is mentioned as one of the most effective factors on MDR development. Though, there are many evidences on interference of ABCG2/BCRP, one of the outstanding members of this superfamily, in MDR occurrence, the expression effect of this gene on blasts of ALL patients is unknown yet.

**Methods:** In this study, we used Real-Time PCR technique in order to investigate the relative expression of ABCG2/BCRP mRNA in 1-17 year old children with ALL. Peripheral or bone marrow blood samples from 28 new case leukemic and 15 control children were investigated with cooperation of Seyyedo-Shohada hospital in Isfahan,. Minimal Residual Disease (MRD) was evaluated as quality of patient response to chemotherapy.

**Results:** Profile of ABCG2/BCRP mRNA expression did not have any significant difference in new case ALL patients in comparison with control children. On the other hand, comparison of two groups of MRD<sup>+</sup> and MRD<sup>-</sup> patients showed no difference in ABCG2/BCRP expression level. The level of ABCG2 expression was not associated with immunophenotype of ALL or known prognosis factors for this type of leukemia.

**Conclusion:** Results of this study showed no effect of ABCG2/BCRP expression level on MDR development in ALL. Accordingly, clinical value of ABCG2/BCRP expression profile determination was rejected as the prognosis value for childhood ALL in our geographical area.

**Keywords:** ABCG2 Protein; ALL; Minimal Residual Disease; Multidrug Resistance; Prognosis

#### **This paper should be cited as:**

Entezar-e-Ghaem M, Rahgozar S, Moafi AR, Moshtaghian J, Esmaeli A, Abedi M, Montazeri F. *Evaluation of mRNA expression profile of ABCG2/BCRP in childhood acute lymphoblastic leukemia*. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2013; 21(5): 575-86.

**\*Corresponding author: Tel: +98 3117932455, Email: rahgozar@sci.ui.ac.ir**