مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی
دوره ۱٤، شماره ۱: از ٤۹-۵۷
بهار ۱۳۹۰

ارزیابی کمّی بیان ناقلین درون‌دهی و برون‌دهی ایماتیب در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن (CML)

سعید سلالی[۱]، سعید کاویانی[۲*]، علی‌اکبر مؤثق‌پور[۳]، محمدرضا علی‌پرستی[٤]، مسعود سلیمانی[۲]، مهرداد نوروزی‌نیا[۲]، سعید آبرون[۲]، زینب کاویانی[۵]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- استادیار، گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استادیار، مرکز تحقیقات هماتولوژی و انکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۴- کارشناس ارشد، گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۵- دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

دریافت مقاله: ۸۹/۰۸/۱۱ پذیرش مقاله: ۸۹/۱۱/۲۵

چکیده

هدف: در این مطالعه بیان ژن‌های MDR1 و hOCT1 در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن و افراد طبیعی با استفاده از RT-Real Time PCR مطالعه شد.

مواد و روش‌ها: برای ارزیابی بیان ژن از سیستم Real-Time PCR با Syber Green Master-Mix استفاده شد. از تعداد ۳۰ بیمار مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن و ۲۷ فرد سالم نمونه‌گیری شد. نتایج Real Time-PCR به روش سنجش نسبی ارزیابی شد.

نتایج: نتایج تحقیق حاضر نشان داد که MDR1 افزایش بیان معنی‌داری در گروه بیماران تحت درمان با ایماتیب دارد و این افزایش با پیشرفت بیماری مرتبط است و در فازهای تسریع کننده و بلاستیک در مقایسه با فاز مزمن بیماری، افزایش بیان MDR1 مشاهده می‌شود. در مقابل بیان hOCT1 تغییر معنی‌داری نسبت به گروه طبیعی نداشت.

نتیجه‌گیری: افزایش بیان MDR1 در غشای سلول سرطانی باعث کاهش غلظت داخل سلولی دارو شده و فعالیت تیروزین کیناز BCR-ABL مهار نشده و سلول به حالت سرطانی باقی مانده و دچار مرگ برنامه‌ریزی شده نمی‌شود و بیماری به طرف فاز تسریع شده و بلاستیک پیشرفت می‌کند. همچنین تغییرات در بیان hOCT1 به‌عنوان ناقل درون‌دهی داروی ایماتیب می‌تواند بر غلظت داخل سلولی دارو و در نهایت، بر نتیجه درمان تأثیرگذار باشد که در این مطالعه بیان ژن hOCT1 متغیر بود و تغییرات معنی‌داری مشاهده نشد.

کلیدواژگان: لوسمی میلوئیدی مزمن، MDR1، hOCT1، بیان ژن، Real-Time PCR

۱- مقدمه

لوسمی میلوئیدی مزمن (Chronic Myeloid Leukemia: CML) یک اختلال دودمانی سلول بنیادی چند قوه‌ای است [۱]. مشخصه این بیماری جابه‌جایی کروموزومی t(9;22) است [۲]. که نتیجه این جابه‌جایی کروموزومی منجر به شکل‌گیری

*نشانی مکاتبه: تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه هماتولوژی، کدپستی: ۱٤۱۱۷۱۳۱۱٦
Email: kavianis@modares.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

ژن الحاقی BCR-ABL می‌شود [۳]. این جابه‌جایی همچنین با نام کروموزوم فیلادلفیا نیز شناخته می‌شود که در بیش از ۹۵ درصد از بیماران مثبت است [٤، ٥] و محصول این ژن الحاقی در CML پروتئین ۲۱۰ کیلو دالتونی است که یک تیروزین کیناز با فعالیت مداوم است. جابه‌جایی کروموزومی فیلادلفیا برای ایجاد CML کافی است. در حالی‌که به‌نظر می‌رسد پیشرفت بیماری به فازهای تسریع شده (Accelerated Phase) و بلاستیک (Blastic Phase) نیازمند اختلالات ژنتیکی بیشتری است [٥]. مؤثرترین عامل برای درمان این بیماری گلیوک یا ایماتینیب (Imatinib) است که با اتصال به انکوپروتئین BCR-ABL مانع از فعالیت این تیروزین کیناز و در نتیجه موجب جلوگیری از آثار سرطان‌زایی این انکوپروتئین می‌شود. در ایران به دلیل گران بودن نوع سوئیسی دارو، بیشتر از نوع هندی این دارو تحت عنوان ایماتیب (Imatib) (Cipla Limited, Mumbai, India) استفاده می‌شود.

مسیرهای انتقال سیگنال تحریک شده با فعالیت کینازی BCR-ABL، بقا و تکثیر سلولی را افزایش داده و مانع از مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (Apoptosis) می‌شود [٦]. در یک مطالعه بین‌المللی تصادفی که برای درمان بیماران مبتلا به CML در فاز مزمن (Chronic Phase)، که بیماری آن‌ها به تازگی تشخیص داده شده بود از ایماتینیب استفاده شد، بعد از ۷ سال میزان EFS (Event Free Survival) و OS (Overall Survival) به‌ترتیب ۸۱ درصد و ۸٦ درصد بود. بیمارانی که از ابتدا به درمان تعریف شده پاسخ ندادند، تحت عنوان مقاومت اولیه و بیمارانی که بعد از یک دوره پاسخ‌دهی در آن‌ها مقاومت ایجاد می‌شود تحت عنوان مقاومت ثانویه تعریف می‌شوند [۷]. مقاومت به شیمی‌درمانی یک رخداد شایع در درمان تمامی سرطان‌ها است. ولی درک مولکولی از مکانیسم‌های مقاومت، به‌ویژه در CML با سرعت بی‌سابقه‌ای در حال پیشرفت است [۷]. هم‌اکنون استفاده از ایماتینیب برای درمان بیماران مبتلا به CML، نسبت به سایر درمان‌ها، پاسخ‌های MCR (Major Cytogenetic Response) و CHR (Complete Hematologic Response) مطلوبی ایجاد می‌کند و به‌عنوان خط نخست درمان در CML تبدیل شده است [۸]. با این وجود با افزایش کاربرد ایماتینیب و افزایش تجربه در این مورد، تعدادی از بیماران نسبت به ایماتینیب مقاومت اولیه یا ثانویه نشان می‌دهند و پاسخ ژنتیک سلولی حاصل نمی‌شود [۹]. مقاومت به ایماتینیب بیشتر در لوسمی لنفوسیتی حاد (Acute Lymphocytic Leukemia: ALL) و فاز بلاستیک CML دیده می‌شود و موارد مقاومت عبارتند از تزاید ژنی BCR-ABL، افزایش بیان انکوژن BCR-ABL، بروز جهش در انکوژن BCR-ABL که می‌تواند مقاومت به ایماتینیب را از طریق تغییر جایگاه‌هایی که ایماتینیب از آن نواحی به پروتئین متصل می‌شود، ایجاد کند یا به‌طور غیرمستقیم موجب تعدیل عملکرد تیروزین کینازی شود [۱۰]. علاوه بر این عوامل افزایش بیان پمپ‌های برون‌دهی دارو و کاهش بیان پمپ‌های درون‌دهی منجر به کاهش غلظت داخل سلولی دارو و در نتیجه عدم تأثیر دارو بر سلول‌های هدف می‌شود. پروتئین‌های برون‌دهی تا به امروز به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته و افزایش بیان آن‌ها در موارد متعددی به‌عنوان عامل ایجاد مقاومت بیان شده است. MDR1 (Multidrug Resistance 1) یا ABCC1 یک پمپ برون‌دهی وابسته به انرژی از ابر خانواده کاست متصل شونده به ATP (ATP binding cassette) است که با مقاومت چند دارویی (Multidrug Resistance: MDR) در ارتباط است و مطالعات انجام شده نشان داده است که ایماتینیب و سایر مهار کننده‌های تیروزین کیناز، سوبسترای MDR1 است [۱۱] و نشان داده شده که سطوح داخل سلولی ایماتینیب در سلول‌های بیان کننده MDR1، کاهش می‌یابد [۱۲]. ولی سوفیا (Sophia) و همکارانش بیان نمودند که مهار MDR1 نه تنها اثر ایماتینیب بر فعالیت BCR-ABL را افزایش نمی‌دهد بلکه نمی‌تواند کارایی ایماتینیب را در از بین بردن سلول‌های سرطانی بهبود بخشد [۱۳]. علاوه بر ناقلینی که در برون‌دهی دارو نقش دارند، تعدادی از ناقلین مسئول ورود دارو به داخل سلول هستند.

Archive of SID
www.SID.ir

این‌ها در جذب، پخش و حذف دارو در محیط درون بدنی (In vivo) مهم هستند و به‌ویژه در ارگان‌هایی مانند کلیه و دستگاه معدی روده‌ای به‌خوبی مطالعه شده‌اند. یکی از این ناقلین درون‌دهی دارو hOCT1 (Human Organic Cation Transporter 1) است که یک عضو از ابر خانواده SLC (Solute Carrier) است که اکثر پروتئین‌های درون‌دهی متعلق به این خانواده است. hOCT1 در این ابر خانواده عضو زیر خانواده SLC22 است که شامل ناقلین چند اختصاصی کاتیون ارگانیک می‌شود [۱۱]. پروتئین‌های OCT در ارتباط با انتقال سوبستراهای درونزاد و برونزاد کاتیونی در pH فیزیولوژیک است. در مطالعات قبلی نشان داده شده است که ایماتینیب بیشتر از طریق hOCT1 وارد سلول می‌شود [۱٤]. ممکن است بیان متفاوت hOCT1 و سایر ناقلین دارویی شاخص مهمی در تعیین سطوح داخل سلولی دارو باشد و از این رو پاسخ به ایماتینیب را تحت تأثیر قرار دهد [۱۵]. تا به‌حال مطالعات اندکی در مورد نقش ناقلین درون‌دهی که در جذب دارو دخیل هستند انجام گرفته است و هدف از این مطالعه، ارزیابی مشارکت ناقلین دارویی در حمل و نقل سلولی داروست تا اطلاعات گسترده‌تری نسبت به مکانیسم‌های محتمل که از طریق آن‌ها بیماران مبتلا به CML در مقابل ایماتیب مقاوم می‌شوند، حاصل شود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- نمونه‌گیری و استخراج RNA تام سلولی

نمونه‌های مورد نیاز این مطالعه از بیمارستان قاضی طباطبایی تبریز جمع‌آوری شد. از ۳۰ بیمار و ۲۷ فرد سالم بعد از کسب رضایت، نمونه خون محیطی تهیه شد. تشخیص بیماری CML براساس یافته‌های بالینی و داده‌های ریخت‌شناختی روی نمونه‌های مغز استخوان و همچنین تأیید بیماری با روش ژنتیک سلولی برای t(9;22) و روش زنجیره‌ای پلیمراز معکوس برای نسخه‌های BCR-ABL انجام شده بود. ۱٦ بیمار در فاز مزمن، ۱۰ بیمار در فاز تسریع شده و ٤ بیمار در فاز بلاستیک قرار داشتند و کلیه بیماران مورد مطالعه در بررسی ژنتیک سلولی دارای کروموزوم فیلادلفیا بودند. جمعیت بیماران را ٤۱ درصد زنان و ۵۹ درصد مردان با میانگین سنی ۱۰/٦۲ ± ۳۸/۳۷ تشکیل می‌داد و در گروه کنترل ٤۰ درصد زنان و ٦۰ درصد مردان با میانگین سنی ۱۱/۰۱ ± ۳۸/۲۵ قرار داشتند.

۲-۲- استخراج RNA و سنتز cDNA

سلول‌های تک هسته‌ای از ۸-۱۰ میلی‌لیتر خون محیطی با روش سانتریفوژ شیب غلظتی فایکول جدا شدند. RNA تام از حدود ۵×۱۰^{٦}-٤ سلول تک هسته‌ای به‌وسیله معرف تریزول (Trizol) (Invitrogen) جدا شد. قبل از واکنش نسخه‌برداری معکوس کیفیت و کمّیت RNA استخراج شده با الکتروفورز و بیوفتومتر اندازه‌گیری شد. برای سنتز cDNA از کیت (Fermentas) RevertAid First strand cDNA synthesis استفاده شد. ۱ میکرولیتر RNA با ۱ میکرولیتر M-MLV RT (۲۰۰ واحد در هر میکرولیتر، ٤ میکرولیتر بافر ۱X، ۲ میکرو-لیتر آغازگر رندم هگزامر (۵۰۰ نانوگرم در هر میکرولیتر)، ۲ میکرولیتر مخلوط dNTP (۱۰ میلی‌مول)، ۱ میکرولیتر RNasin (٤۰ واحد در هر میکرولیتر) و ۹ میکرولیتر آب مجاور شده با DEPC مورد نسخه‌برداری معکوس قرار گرفت.

۲-۳- Syber-Green Real-Time RT-PCR

برای این منظور از کیت Fast Start Syber Green Master (Roche) و سیستم Corbett-rotor (gene-6000) استفاده شد. برای رسم منحنی استاندارد ۵ رقت مختلف از RNA استاندارد تهیه شد. بر طبق دستورالعمل کیت، واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد که شامل ۱۰ میکرولیتر از مخلوط اصلی (Master Mix)، ۳۰۰ نانومولار از هر آغازگر، ٦/٤ میکرولیتر از آب مجاور شده با DEPC و ۲ میکرولیتر از cDNA بود. واکنش Real-Time PCR با

Archive of SID

www.SID.ir

الگوی دمایی زیر انجام شد؛ ۱۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای فعال‌سازی آنزیم پلیمراز *Taq* شروع داغ (Hot-start *Taq*-Polymerase) سپس ۳۵ چرخه شامل؛ ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای واسرشتگی (Denaturation)، ۳۰ ثانیه در ۵۷ درجه برای اتصال (Anneling) و ۶۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای بسط (Extension) و همچنین در پایان چرخه‌ها برای بررسی اختصاصی بودن قطعه تکثیر یافته منحنی ذوب (Melting Curve) با افزایش ۱ درجه‌ای از ۶۰ تا ۹۵ درجه با ۲۰ ثانیه ماندن در هر درجه (Holding)، در نظر گرفته شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده از مقالات قبلی استخراج و عبارتند از [۱۶]:

B-actin جلویی (Forward):
5′- GCTGTGCTACGTCGCCCTG -3′
B-actin برگشتی (Reverse):
5′- GGAGGAGCTGGAAGCAGCC -3′
MDR1 جلویی:
5′- TCCTCAGTCAAGTTCAGAGTCTTCA -3′
MDR1 برگشتی:
5′- TCTCCACTTGATGATGTCTCTCACT -3′
hOCT1 جلویی:
5′- GGGCAGCCTGCCTCGTCATG -3′
hOCT1 برگشتی:
5′- ACCTCCCTCAGCCTGAAGAC -3′

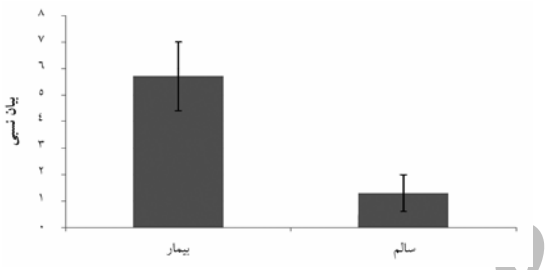
۳- نتایج

۳-۱- بیان متمایز hOCT1 و MDR1 در گروه بیماران و افراد سالم

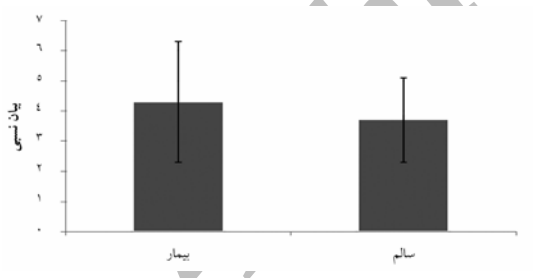
مقدار RNA به‌کار رفته برای سنتز cDNA و شرایط انجام RT-PCR برای تمامی نمونه‌ها یکسان بود. در انجام Real-Time PCR از B-Actin به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد که بیان آن در تمامی نمونه‌های بیماران و افراد سالم مشاهده شد؛ در حالی‌که بیان hOCT1 در ۵۸/۶ درصد از بیماران و ۵۵/۵ درصد از افراد سالم قابل ارزیابی بود. بیان MDR1 در ۱۰۰ درصد از بیماران و ۵۹ درصد از افراد سالم مشاهده شد.

۳-۲- بررسی سطح بیان hOCT1 و MDR1 در بین بیماران و گروه کنترل

ارتباط سطح بیان hOCT1 و MDR1 در بین بیماران و گروه کنترل با استفاده از آزمون آماری t-test تجزیه و تحلیل شد که بیان MDR1 با مقدار ارزشی P=۰/۰۰۱ معنی‌دار بود (نمودار ۱). اختلاف بیان hOCT1 با مقدار ارزشی P=۰/۶۳، معنی‌دار نبود (نمودار ۲).



نمودار ۱ بیان نسبی MDR1 در دو گروه بیمار و سالم، که اختلاف معنی‌داری وجود دارد (P<۰/۰۵).



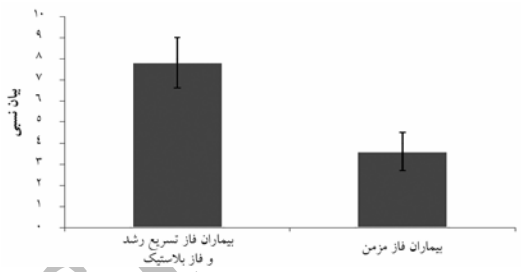
نمودار ۲ بیان نسبی hOCT1 در دو گروه بیمار و سالم، اختلاف معنی‌داری در بین دو گروه وجود ندارد (P>۰/۰۵).

۳-۳- بررسی ارتباط سطح بیان hOCT1 و MDR1 در دو گروه بیماران

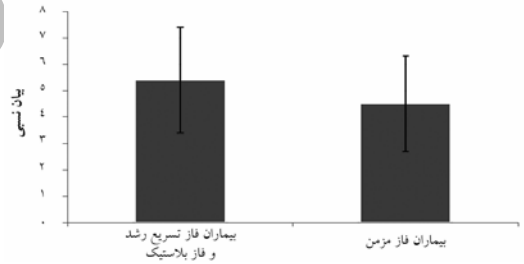
اختلاف سطح بیان این دو ژن در دو گروه بیماران فاز مزمن و فاز پیشرفته بدون تفکیک جنس با استفاده از آزمون

Archive of SID
www.SID.ir

آماری من‌ویتنی U (Mann-Whitney U) انجام گرفت. اختلاف سطح بیان MDR1 با مقدار ارزشی P=۰/۰٤ معنی‌دار بود (نمودار ۳) و در مورد hOCT1 مقدار P برابر ۰/٤۷ بود که معنی‌دار نیست (نمودار ٤).



نمودار ۳ بیان نسبی MDR1 در گروه بیماران فاز تسریع رشد، فاز بلاستیک و گروه بیماران فاز مزمن نشان داده شده است که اختلاف معنی‌داری در بین دو گروه وجود دارد (P<۰/۰۵).



نمودار ٤ بیان نسبی hOCT1 در دو گروه بیمار فازهای تسریع رشد، بلاستیک و فاز مزمن نشان داده شده است. اختلاف معنی‌داری بین دو گروه وجود ندارد (P>۰/۰۵).

۳-٤- بررسی همبستگی بیان hOCT1 و MDR1 در بیماران و گروه سالم

بررسی همبستگی میان این دو ژن در جمعیت بیمار با مقدار ارزشی P=۰/۰۲ و r_s=۰/۳٦ معنی‌دار بوده و همبستگی از نوع مستقیم است. بررسی همبستگی بیان hOCT1 و MDR1 در جمعیت کنترل با مقدار ارزشی P=۰/۰۰۲ و r_s=۰/٥٤ معنی‌دار و از نوع همبستگی مستقیم است. همچنین شدت همبستگی در گروه سالم بیشتر از گروه بیمار بود.

۳-٥- تغییرات بیان hOCT1 و MDR1 با طول مدت درمان

برای بررسی ارتباط بین سابقه بیماری (مدت زمان درمان) و بیان hOCT1 و MDR1، این ارتباط مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و این فرض که با افزایش دوره بیماری بیان MDR1 نیز افزایش خواهد یافت، مشاهده نشد و از لحاظ آماری ارتباط معنی‌داری بین این فاکتورها وجود نداشت.

۳-٦- پاسخ به درمان بیماران

در این مطالعه پاسخ هماتولوژیک بیماران بررسی شد که میزان پاسخ هماتولوژیک در بیماران فاز مزمن بیشتر از بیماران فاز پیشرفته بود. به‌طوری که ۷٥ درصد از بیماران فاز تسریع شده و بلاستیک پاسخ هماتولوژیک نداشتند و در بیماران فاز مزمن ۱۰ درصد از بیماران پاسخ هماتولوژیک نداشتند.

٤- بحث

در درمان CML بهترین گزینه درمانی استفاده از ایماتیب. این دارو یک مهار کننده تیروزین کیناز است که با مهار تیروزین کیناز BCR-ABL، رشد سرطانی سلول‌ها را مهار می‌کند [۱۷]. نتایج مطالعات بالینی در بیماران تحت درمان با ایماتینیب (Complete Hematologic Response) CHR را در حدود ۸۰ درصد از بیماران نشان داد و با وجود این‌که این پاسخ به درمان در مقایسه با درمان‌های قبلی افزایش چشمگیری نشان می‌دهد، اما هنوز در حدود ۲۰ درصد از بیماران تحت درمان با ایماتینیب پاسخ مطلوب ایجاد نمی‌شود [۷]. بعضی از بیماران در شروع درمان با ایماتینیب، مقاومت نشان می‌دهند و بعضی بعد از یک دوره پاسخ اولیه مقاومت نشان می‌دهند [٤]. تا به‌حال نقش ناقلین دارویی در القای مقاومت به شیمی درمانی گزارش شده است که این ناقلین دارویی یکی از مکانیسم‌های القای مقاومت به‌خوبی شناخته شده در تعدادی از سایر بیماری‌های بدخیم هستند [۸، ۱٤]. در

Archive of SID
www.SID.ir

این مطالعه نقش دو ناقل عمده برون‌دهی و درون‌دهی ایماتینیب در بیماران مبتلا به CML بررسی شده است.

همان‌طور که قبلاً در نتایج ذکر شد افزایش بیان MDR1 در گروه بیماران نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌داری داشت. همچنین بیان این ژن در بیماران فاز پیشرفته در مقایسه با بیماران فاز مزمن افزایش معنی‌داری داشت. افزایش بیان MDR1 به‌عنوان یک مکانیسم احتمالی مقاومت به ایماتینیب نخست به‌وسیله ماهون (Mahon) و همکارانش تشخیص داده شد [۱۸]. آن‌ها رده سلولی مقاوم، LAMA-84R، را با مواجهه تدریجی با غلظت‌های افزایشی ایماتینیب توسعه دادند در این رده سلولی بیان BCR-ABL و MDR1 نسبت به رده والد اولیه افزایش یافته بود و کشت این رده مقاوم در حضور ورامپامیل (Verapamil)، یک مهار کننده MDR1، موجب بازگشت حساسیت به ایماتینیب شد [۱۸]. در خانواده ناقلین ABC، ABCC1 یا MRP1 (Multidrug Resistance-associated Protein) نیز در مواردی با القای مقاومت در ارتباط بوده اما در القای مقاومت به ایماتینیب دخالتی ندارد؛ در نتیجه ایماتینیب سوبسترای MRP1 نیست [۱۹]. وایت (White) و همکارانش درگیری MDR1 در القای مقاومت و تغییرات غلظت داخل سلولی دارو را در دو رده سلولی اثبات کردند [۲۰]. ملو (Melo) و همکارانش در سال ۲۰۰۷ افزایش بیان MDR1 را در سلول‌های سرطانی نشان دادند که با ایجاد مقاومت مرتبط بود [۳]. بنابراین افزایش بیان MDR1 می‌تواند عاملی در القای مقاومت باشد که باعث عود و پیشرفت بیماری به فاز تسریع شده و فاز بلاستیک باشد. علاوه بر درگیری خانواده ABC در برون‌دهی و کاستن غلظت داخل سلولی دارو در بدخیمی‌ها که تا به امروز بیشتر از این دیدگاه بررسی شده‌اند، اخیراً نقش این ناقلین در انتقال عوامل لیپیدی از جمله پروستاگلندین‌ها، لکوترین‌ها، SP1 (Sphingosine-1-Phosphate) و PAF (Platelet Activating Factor) به خارج از سلول به اثبات رسیده است. حضور این عوامل در خارج از سلول موجب فعال شدن مسیرهای سیگنال رسانی مختلفی شده که منتهی به تکثیر سلولی، بقا، جابه‌جایی، فعال شدن رگ‌زایی، تحریک متاستاز و فرار از سیستم ایمنی می‌شود [۲۱]. در این بین MDR1 در انتقال PAF به خارج از سلول نقش دارد. این مولکول در عملکردهای وابسته به تومور مختلفی نقش دارد. PAF، گیرنده متصل به پروتئین G (GPCR) خود را فعال می‌کند و افزایش پروتئین‌های ضد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی BCL-2 (B-cell Lemphoma 2) و $BCL\text{-}X_L$ را القا می‌کند که این عوامل می‌توانند مانع از مرگ برنامه‌ریزی شده سلول شده و نتیجه سلول‌های مقاوم گسترش می‌یابند [۲۲].

محققان حاضر همچنین بیان hOCT1 را نیز در این مطالعه بررسی کردند. پروتئین‌های OCT مسئول جذب سلولی و دفع تعدادی از سوبستراهای برونزاد و درونزاد کاتیونی بی‌بار است. اما در مقایسه با خانواده ABC، نقش پروتئین‌های OCT در القای مقاومت چند دارویی، کمتر بررسی شده است. به دلیل این‌که hOCT1 بیشتر از آن که در برون‌دهی دخیل باشد در جذب نقش دارد ممکن است که کاهش آن پاسخ به شیمی درمانی را تحت تأثیر قرار دهد. توماس (Thomas) و همکارانش در مطالعه خود دریافتند که جذب ایماتینیب به داخل سلول تماماً یک فرایند فعال بوده و درون‌دهی ایماتینیب به‌واسطه hOCT1 صورت می‌گیرد و دیگر اعضای خانواده OCT با درون‌دهی ایماتینیب در ارتباط نیست [۱٤]. همان‌طور که وایت و همکارانش نشان دادند در بیمارانی که سطح بیان hOCT1 زیاد است، در درمان با ایماتینیب، افزایش چشمگیری در پاسخ مولکولی نسبت به بیماران با بیان کم hOCT1 دارند [۲۰]. توماس و همکارانش سطوح متفاوت بیان hOCT1 را در بیماران مشاهده کردند اما نتوانستند ارتباط معنی‌داری در بین سطح بیان این ژن با شرایط بالینی بیماران نشان دهند [۱٤]. همچنین لوسی (Lucy) و همکارانش بیان چند ژن از جمله hOCT1 را در دو گروه بیمار پاسخ‌دهنده و غیرپاسخ‌دهنده به درمان بررسی کردند و مشاهده کردند که بیان پایه hOCT1 در بیماران متغییر است و تفاوت قابل توجهی با گروه سالم ندارد [۱۵]. محققان حاضر نیز افزایش بیان hOCT1 را در بیماران

Archive of SID
www.SID.ir

مبتلا به CML در مقایسه با افراد سالم مشاهده کردند ولی این اختلاف معنی‌دار نبود و بیان این ژن در بیماران متغیر بود. این نتایج سازگار با یافته‌های لوسی و توماس هستند و همدیگر را تأیید می‌کنند. با توجه به این‌که hOCT1 به‌طور فعال ایماتیب را وارد سلول می‌کند، ممکن است در بیماران با سطح بیان کم hOCT1، غلظت داخل سلولی کافی از ایماتیب حاصل نشود و از این‌رو پاسخ مطلوب ایجاد نشود. باید یادآور شویم که این مطالعات تنها در حد بررسی بیان ژن در سطح mRNA بوده و این امکان وجود دارد که ارتباط مستقیمی بین سطح mRNA و ترجمه آن به پروتئین وجود نداشته باشد و در نتیجه منجر به عدم هم‌خوانی سطح بیان ژن با پاسخ مولکولی شود.

همچنین در این مطالعه بیان این دو ژن در ۵ نفر بیمار مورد جدید (New Case)، مطالعه شد که بیان hOCT1 متغیر بود ولی در مورد بیان MDR1 در دو مورد از بیماران افزایش بیان چندین برابری مشاهده شد که این می‌تواند به دلیل زیاد بودن جمعیت سلول‌های بدخیم باشد؛ زیرا در این بیماران هنوز از هیچ نوع درمانی استفاده نشده است و میزان کلی شمارش سلولی بالا است. بعد از شروع درمان، مهار انکوپروتئین رشد سلول‌های سرطانی را متوقف کرده و این جمعیت کاهش می‌یابد. لازم به ذکر است که تعداد بیماران مورد جدید در این مطالعه کم بود و بررسی باید در جمعیت بیشتری انجام گیرد. همچنین مشاهده شد که میزان CHR در بیماران فاز مزمن نسبت به بیماران فاز پیشرفته بیشتر است. شدت همبستگی hOCT1 و MDR1 در گروه کنترل نسبت به گروه بیماران بیشتر بوده ولی در هر دو گروه معنی‌دار بود و این ارتباط مستقیم ممکن است ناشی از فعالیت hOCT1 در نتیجه افزایش فعالیت فیزیولوژیک حاصل از افزایش بیان و عملکرد MDR1 باشد.

۵- تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد است که با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس و بخش هماتولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز انجام شده است که نویسندگان بدین‌وسیله مراتب سپاس و قدردانی خود را از دانشگاه‌های مذکور ابراز می‌دارند. همچنین از مدیر محترم گروه ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز جناب آقای دکتر مجیدی که امکان انجام این تحقیق را در آن گروه فراهم کردند، تقدیر و تشکر به‌عمل می‌آید. در ضمن از پرسنل واحد نمونه‌گیری بیمارستان قاضی طباطبایی تبریز، سرکار خانم نوبری و سرکار خانم نعمتی تشکر و قدردانی می‌شود.

٦- منابع

[1] Chu S, Xu H, Shah NP, Snyder DS, Forman SJ, Sawyers CL, Bhatia R. Detection of BCR-ABL kinase mutations in CD34+ cells from chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission on imatinib mesylate treatment. Blood 2005; 105(5): 2093-8.

[2] Stromskaya TP, Rybalkina EY, Kruglov SS, Zabotina TN, Mechetner EB, Turkina AG, Stavrovskaya AA. Role of P-glycoprotein in evolution of populations of chronic myeloid leukemia cells treated with imatinib. Biochemistry (Mosc) 2008; 73(1): 29-37.

[3] Melo JV, Chuah C. Resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukaemia. Cancer Lett 2007; 249(2): 121-32.

[4] Apperley JF. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. Lancet Oncol 2007; 8(11): 1018-29.

[5] Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, La Rosée P, Müller MC, Lahaye T, Hanfstein B, Schoch C, Cross NC, Berger U, Gschaidmeier H, Druker BJ, Hehlmann R. Molecular and chromosomal

Archive of SID

www.SID.ir

mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. Leukemia 2002; 16(11): 2190-6.

[6] Hochhaus A, Schenk T, Erben P, Ernst T, La Rosée P, Müller MC. Cause and management of therapy resistance. Best Pract Res Clin Haematol 2009; 22(3): 367-79.

[7] Bixby D, Talpaz M. Mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and recent therapeutic strategies to overcome resistance. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2009; 13: 461-76.

[8] Huang Y, Sadée W. Membrane transporters and channels in chemoresistance and sensitivity of tumor cells. Cancer lett 2006; 239(2): 168-82.

[9] Shikata E, Yamamoto R, Takane H, Shigemasa C, Ikeda T, Otsubo K, Ieiri I. Human organic cation transporter (OCT1 and OCT2) gene polymorphisms and therapeutic effects of metformin. J Hum Genet. 2007; 52(2):117-22.

[10] Ferrao PT, Frost MJ, Siah SP, Ashman LK. Overexpression of P-glycoprotein in K562 cells does not confer resistance to the growth inhibitory effects of imatinib (STI571) in vitro. Blood 2003; 102(13): 4499-503.

[11] White DL, Saunders VA, Dang P, Engler J, Zannettino AC, Cambareri AC, Quinn SR, Manley PW, Hughes TP. OCT-1-mediated influx is a key determinant of the intracellular uptake of imatinib but not nilotinib (AMN107): reduced OCT-1 activity is the cause of low in vitro sensitivity to imatinib. Blood 2006; 108(2): 697-704.

[12] Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. Nat Rev Cancer 2002; 2(1): 48-58.

[13] Hatziieremia S, Jordanides NE, Holyoake TL, Mountford JC, Jørgensen HG. Inhibition of MDR1 does not sensitize primitive chronic myeloid leukemia CD34+ cells to imatinib. Exp Hematol 2009; 37(6): 692-700.

[14] Thomas J, Wang L, Clark RE, Pirmohamed M. Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. Blood 2004; 104(12): 3739-45.

[15] Crossman LC, Druker BJ, Deininger MW, Pirmohamed M, Wang L, Clark RE. hOCT 1 and resistance to imatinib. Blood 2005; 106(3): 1133-4.

[16] 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.

[17] Walz C, Sattler M. Novel targeted therapies to overcome imatinib mesylate resistance in chronic myeloid leukemia (CML). Crit Rev Oncol Hematol 2006; 57(2): 145-64.

[18] Mahon FX, Deininger MW, Schultheis B, Chabrol J, Reiffers J, Goldman JM, Melo JV. SSelection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. Blood 2000; 96(3): 1070-9.

[19] Mukai M, Che XF, Furukawa T, Sumizawa T, Aoki S, Ren XQ, Haraguchi M, Sugimoto Y, Kobayashi M, Takamatsu H, Akiyama S. Reversal of the resistance to STI571 in human chronic myelogenous leukemia K562 cells. Cancer Sci 2003; 94(6): 557-63.

Archive of SID
www.SID.ir

[20] White DL, Saunders VA, Dang P, Engler J, Venables A, Zrim S, Zannettino A, Lynch K, Manley PW, Hughes T. Most CML patients who have a suboptimal response to imatinib have low OCT-1 activity: higher doses of imatinib may overcome the negative impact of low OCT-1 activity. Blood 2007; 110(12): 4064-72.

[21] Fletcher JI, Haber M, Henderson MJ, Norris MD. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. Nat Rev Cancer 2010; 10(2): 147-56.

[22] Raggers RJ, Vogels I, van Meer G. Multidrug-resistance P-glycoprotein (MDR1) secretes platelet-activating factor. Biochem J 2001; 357(Pt 3): 859-65.

Archive of SID

www.SID.ir