مجله دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران (پیاورد سلامت)
دوره ۱۳ شماره ۲ خرداد و تیر ۱۳۹۸، ۱۰۹-۱۰۱

مقاله پژوهشی

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 8:01 IRST on Sunday November 29th 2020

بررسی میزان بیان STAT3 در فازهای مختلف بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن

پیمان یوسفی[۱]، شهربانو رستمی[۲]، نسرین علیزاده قندفروش[۳]، سعید محمدی[٤]، محسن نیکبخت[۲]، لعیا قدیانی نژاد[۵]، بهرام چهاردولی[٤]

دریافت مقاله : آبان ۱۳۹۷
پذیرش مقاله : اسفند ۱۳۹۷

* نویسنده مسئول :
بهرام چهاردولی؛
مرکز تحقیقات هماتولوژی انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی تهران

Email :
bchahardouli@tums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: بیماری لوسمی میلوئیدی مزمن نوعی بیماری میلوپرولیفراتیو کلونال است که با وجود ژن ادغامی BCR/ABL تشخیص داده می‌شود. با استفاده از مهارکننده‌های تیروزین کیناز مانند Imatinib، درمان این بیماری پیشرفت قابل توجهی داشته است. مقاومت دارویی علیه Imatinib همچنان به عنوان مانعی در روند درمان می‌باشد. STAT3 فاکتور رونویسی مهم مرتبط با تکثیر و بقای چندین سرطان متمایز می‌باشد. هدف این مطالعه، تعیین میزان بیان STAT3 در بیماران مبتلا به CML و تحت درمان با ایماتینیب و شناسایی نقش احتمالی این ژن در مقاومت دارویی بیماران مبتلا به CML تحت درمان با ایماتینیب بود.

روش بررسی: ۷۱ نمونه خون محیطی از بیماران CML در فازهای مختلف بیماری و ۱۰ فرد نرمال جمع‌آوری شد. پس از استخراج RNA و سنتز cDNA بیان ژن‌های STAT3 با تکنیک Real-time PCR اندازه‌گیری شد. بیان STAT3 نسبت به ژن کنترل ABL نرمالیزه شد. بیان STAT3 در بیماران نسبت به گروه کنترل مقایسه شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که بیان STAT3 در مرحله‌ی تشخیص افزایش معناداری نسبت به افراد نرمال داشت(p=۰/۰۰۰۱). میزان بیان STAT3 در بیماران فاز MMR (Major Molecular Response) تفاوت معناداری با گروه کنترل نداشت. بیماران مقاوم بدون موتاسیون و دارای موتاسیون در دومن کینازی ABL تفاوت معناداری نسبت به بیماران مرحله MMR داشتند(به ترتیب p=۰/۰۰۱٤ و p=۰/۰۰۳). این تفاوت بین دو گروه مقاوم معنادار نبود. همین‌طور بیماران در فاز بلاستیک تفاوت معناداری از نظر میزان بیان STAT3 با گروه کنترل نداشتند.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج مطالعه و نقش STAT3 در تکثیر و بقای سلولی، هدف‌گیری STAT3 در درمان بیماران مقاوم می‌تواند مطرح باشد.

واژه‌های کلیدی: لوسمی میلوئیدی مزمن (CML)، STAT3، ایماتینیب، مقاومت دارویی

۱ کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۲ دانشیار مرکز تحقیقات هماتولوژی انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۳ کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون، مرکز تحقیقات هماتولوژی انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
٤ استادیار مرکز تحقیقات هماتولوژی انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۵ دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، مرکز تحقیقات هماتولوژی انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 8:01 IRST on Sunday November 29th 2020

مقدمه

بیماری CML (Chronic Myeloid Leukemia) یک بیماری میلوپرلیفراتیو کلونال است که به‌وسیله‌ی وجود فیوژن ژن BCR-ABL تشخیص داده می‌شود. این انکوژن خود ماحصل جابجایی بین کروموزوم‌های ۹ و ۲۲ می‌باشد و کروموزوم حاصل به عنوان کروموزوم فیلادلفیا شناخته می‌شود. این بدخیمی علاوه بر سلول‌های رده میلوئید، رده‌های اریتروئید و پلاکت را نیز درگیر می‌کند(۲و۱).

TKI (Tyrosin Kinase Inhibitor) یا مهارکننده‌های تیروزین کیناز پیشرفت‌های بنیادی را در درمان CML ایجاد کرده‌اند. ایماتینیب یک درمان هدفمند مولکولی علیه تیروزین کیناز انکوژنیک BCR/ABL است. اگرچه ایماتینیب کارایی قابل‌توجهی در فاز مزمن بیماری دارد، در مراحل پیشرفته، بیماران به این دارو مقاوم می‌شوند. مقاومت به مهارکننده‌های تیروزین کینازی می‌تواند به دلیل موتاسیون در دومن کینازی BCR/ABL و یا مکانیسم‌های دیگر رخ دهد. این مکانیسم‌ها علی‌رغم مهار BCR/ABL امکان بقا را برای سلول‌ها فراهم می‌کنند و یا اصطلاحاً مقاومت مستقل از کیناز ایجاد می‌کنند(۳).

STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription3) از فاکتورهای رونویسی است که با تعدادی از فاکتورهای رشد و پروتئین‌های انکوژن فعال می‌شود. فعال‌سازی STAT3 که با فسفریلاسیون تیروزین ۷۰۵ تنظیم می‌گردد، توسط تیروزین کینازهای رسپتوری و غیررسپتوری مانند: EGFR، gp130، Ras، Src و Abl صورت می‌گیرد(٤).

فرم فعال‌شده‌ی STAT3 به صورت همودایمر درآمده، به هسته‌ی سلول انتقال پیداکرده و به اجزای DNA تنظیمی ویژه‌ای متصل می‌گردد تا رونویسی را القا کند. در شرایط فیزیولوژیک، فعال‌سازی STAT3 گذرا و سریع خواهد بود، اگرچه فعال‌سازی مداوم STAT3 با بدخیمی‌های هماتولوژیک و تومورهای جامد متعددی مرتبط است. مطالعات قبلی پیشنهاد کرده بودند که فعال‌سازی مداوم STAT3، از طریق افزایش تنظیمی ژن‌های ضدآپوپتوزی و ژن‌های مرتبط با تکثیر سلول مانند BCL-XL و CCND1 و انکوژن‌هایی از قبیل PIM1 و c-Myc منجر به دگرگونی و بدخیمی سلول می‌شوند. فعال‌سازی STAT3 از طریق افزایش تنظیمی ژن‌های VEGF و TWIST1 که در آنژیوژنز و متاستاز نقش دارند مرتبط است. این مطالعات، نشان‌دهنده‌ی رابطه‌ی مستقیم بین فعال‌سازی STAT3 و توسعه‌ی سرطان است(٦و٥).

شواهد آزمایشگاهی نشان‌دهنده‌ی نقش ضروری STAT3 در هماتوپوئز، تعدیل پاسخ ایمنی و تنظیم تمایز، تکثیر، آنژیوژنز، متاستاز و آپوپتوز از طریق تعدیل ژن‌های هدف STAT3 است. پتانسیل انکوژنیک STAT3 توسط القای تومور زایی و تبدیل تومور در موش‌هایی که از نظر STAT3، افزایش بیان داشتند نشان داده‌شده است. فعالیت مداوم STAT3، بیان ژن‌های ضدآپوپتوزی شامل BCL2، BCL-XL و MCL-1 را القا می‌کند و همچنین بیان مهارکننده‌های آپوپتوز شامل SURVIVIN و C-IAP2 را افزایش تنظیمی می‌کند. فعال شدن STAT3 با القای بیان mRNA و پروتئین Cyclin D1 می‌تواند منجر به پیشرفت سیکل سلولی شود(٦و٥).

در CML انکوپروتئین‌های ادغامی BCR-ABL منجر به فعال‌سازی مداوم تیروزین کیناز شده که منجر به بدخیم شدن سلول‌های هماتولوژیکی می‌شود. BCR-ABL منجر به فعال‌سازی مداوم مسیرهای‌سیگنالینگ Ras/Raf/MEK/ERK/PI3K/PTEN/Akt/Mtor و JAK/STAT می‌شود(۷). در بیماران مبتلا به CML، فسفریلاسیون مداوم STAT3 به‌واسطه BCR-ABL، در تکثیر سلولی، مهار آپوپتوز و مقاومت به شیمی‌درمانی نقش دارد(۸).

مطالعات قبلی افزایش سطح فسفریلاسیون STAT3 (Tyr705) را در تومور سینه تهاجمی و سطح پایین بیان آن را در بافت‌های نرمال سینه نشان داده‌اند(۹). در مطالعه‌ای که Deng و همکاران در سال ۲۰۱۰ به‌منظور بررسی ارتباط بین رشد سرطان معده و بیان STAT3 انجام داد، STAT3 از نظر میزان بیان به دو گروه بیان مثبت و منفی طبقه‌بندی شد. نسبت بیان مثبت STAT3 در بافت سرطانی معده به طور قابل توجهی بالاتر از نمونه‌های نرمال بافت معده بود(۱۰).

در مطالعه‌ی Benekli و همکاران بر روی ٦٧ بیمار بالغ مبتلا به AML، فعالیت مداوم STAT3 در بلاست‌های لوسمیک در ٤٤ درصد بیماران نشان داده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که فعالیت مداوم STAT3 یا تولید ایزوفرم های ناقص ممکن است با مقاومت دارویی بیماران AML مرتبط باشد و می‌تواند از عوامل شکست درمان در AML باشد(۱۱).

از آنجاکه مهار فعالیت STAT3 منجر به حساس شدن به دارو و مرگ سلول‌های CML می‌شود، مطالعاتی در این زمینه صورت گرفت. شواهدی از این موضوع که مهار مستقیم STAT3 منجر به مرگ سلول‌های CML می‌شود توسط Ma و همکاران در سال ۲۰۱۰ نشان داده شد. آن‌ها نشان

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 8:01 IRST on Sunday November 29th 2020

دادند که وقتی STAT3 siRNA وارد رده سلولی K562 می‌شود، باعث مهار رشد و تکثیر، بلوکه شدن چرخه سلولی و القای آپوپتوز می‌گردد(۱۲).

اخیراً Kuepper و همکاران که نشان دادند که سلول‌های بنیادی CML به‌واسطه‌ی فعال‌سازی STAT3 توسط JAK1 محافظت می‌شوند(۱۳).

نتایج مطالعه‌ای که اخیراً توسط Al-Jamal و همکاران انجام‌شده نشان دادند که افزایش بیان ژن سرکوبگر تومور پروتئوگلیکان ۲(PRG2) توسط ۵- آزاسیتیدین می‌تواند باعث سرکوب فعالیت STAT3 و القای اپوپتوز و افزایش حساسیت به ایماتینیب شود(۱٤).

هدف از این مطالعه، تعیین میزان بیان STAT3 در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن و تحت درمان با ایماتینیب و شناسایی نقش احتمالی این ژن در مقاومت داروی بیماران مبتلا به CML تحت درمان با ایماتینیب بود.

روش بررسی

در این تحقیق که در مرکز تحقیقات خون و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان دکتر شریعتی انجام شد، ۷۱ بیمار که بر اساس علایم بالینی و آزمایشگاهی تشخیص CML آن‌ها قطعی شده بود و ۱۰ فرد سالم که عفونت فعالی نداشتند، مورد مطالعه قرار گرفتند. ملاک برای مقاومت به درمان، رسیدن به MMR (Major Molecular Response) بعد از ۱۸ ماه درمان با ایماتینیب می‌باشد. اساس تعریف مقاومت، دستورالعمل‌های (National Comprehensive Cancer Network) NCCN و ELN (European Leukemia Net) بود(۱۵). بیماران مورد مطالعه در پنج گروه و شامل، ۳٤ بیمار تازه تشخیص داده‌شده (New case)، ۱۱ بیمار در مرحله‌ی ۸، MMR بیمار مقاوم دارای موتاسیون دومن تیروزین کینازی ۹، ABL بیمار مقاوم فاقد موتاسیون دومن تیروزین کینازی ABL و ۹ نفر در فاز بلاستیک قرار داشتند. از هر بیمار ۵ میلی‌لیتر خون وریدی بر روی ماده ضد انعقاد EDTA گرفته شد.

RNA تام از سلول‌های تک‌هسته‌ای بیماران و ساخت cDNA به ترتیب با استفاده از TRIZOL (USA ،Sigma) و کیت (Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit) براساس دستورالعمل شرکت‌های سازنده انجام شد. آنالیز بیان ژن STAT3 بر روی نمونه‌های بیماران و گروه کنترل با تکنیک Real-time PCR انجام شد. برای این منظور در هر واکنش ۱۰ میکرولیتر SYBER® Premix Ex TaqTM (TAKARA)، ۰/٤ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای Forward و Reverse، ۷/۲ میکرولیتر dH2O و ۲ میکرولیتر cDNA در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر آماده شد. پس از دناتوراسیون اولیه، واکنش Real time PCR در ٤۰ سیکل با شرایط دمایی ۹۵°C به مدت ۱۵ ثانیه، ٦۰°C به مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲°C به مدت ۲۵ ثانیه انجام شد.

جهت نرمالیزه کردن نتایج هم‌زمان ژن ABL به‌عنوان یک House Keeping Gene استفاده و با شرایط یکسان PCR تکثیر شد. همه نمونه‌ها به‌صورت دوتایی انجام شد و در هر چرخه کاری یک میکروتیوب به‌عنوان کنترل منفی (NTC) که شامل تمامی ترکیبات موردنظر برای PCR با این تفاوت که به‌جای cDNA حاوی آب است، استفاده شد.

به‌منظور نشان دادن اختصاصی بودن محصولات PCR منحنی ذوب بعد از هر مرحله کاری برای ژن‌های STAT3 و ABL رسم شد. در هر ۷۱ نمونه برای هر دو ژن تنها یک قله در منحنی ذوب دیده شد که نشان‌دهنده‌ی اختصاصی بودن محصولات PCR است.

جهت تایید کارایی PCR سریال رقت از نمونه بیمار CML تازه تشخیص داده‌شده تهیه و ژن‌های STAT3 و ABL به روش ذکرشده در بالا تکثیر شدند و با توجه به مشابه بودن شیب هر دو منحنی استاندارد از فرمول $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ برای مقایسه‌ی بیان ژن STAT3 در گروه‌های مختلف بیماران نسبت به گروه کنترل استفاده شد.

نتایج بیان STAT3 در بیماران مبتلا به CML در پنج گروه بیماران تازه تشخیص داده‌شده، MMR، دارای موتاسیون و مقاوم، فاقد موتاسیون و مقاوم و گروه بلاستیک مقایسه شد. آنالیز داده‌ها با نرم‌افزار SPSS و تست‌های Krusal Wallis Test و Mann-Whitney تجزیه‌وتحلیل آماری گردید و داده‌های با ارزش P<۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار تلقی شدند.

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 8:01 IRST on Sunday November 29th 2020

جدول ۱: توالی پرایمرهای ژن‌های STAT3 و ABL

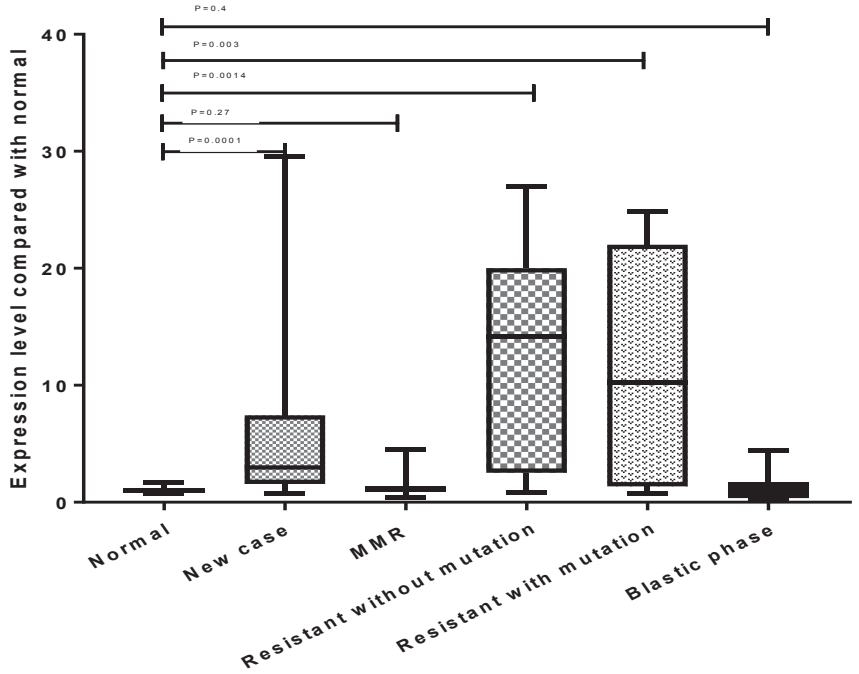
Gene symbol	Sequence (5' to 3')	TM(^{0}C)	Primer	Size	Efficacy
STAT3-F	GGGAGAGAGTTACAGGTTGGACAT	٦١/٩	Forward	١٢٦ bp	٪٩٤
STAT3-R	AGACGCCATTACAAGTGCCA	٦١/٦	Reverse		
ABL-F	TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGT	٦٢	Forward	١٢٤ bp	٪٩٣
ABL-R	GATGTAGTTGCTTGGGACCCA	٦٢	Reverse		

یافته‌ها

در این تحقیق که در مرکز تحقیقات خون و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان دکتر شریعتی انجام شد، ۷۱ بیمار که بیماری CML آن‌ها تشخیص نهایی داده شده بود و همچنین ۱۰ نفر فرد سالم که عفونت فعالی نداشتند، موردمطالعه قرار گرفتند. این بیماران در محدوده سنی ۲۱ تا ۸۲ سال قرار داشتند و ٦٢ درصد بیماران مرد و ۳۸ درصد زن بودند. بیماران مورد مطالعه در پنج گروه تازه تشخیص داده‌شده، MMR مقاوم و دارای موتاسیون، مقاوم و فاقد موتاسیون و گروه در فاز بلاستیک بیماری قرار داشتند. مدت‌زمان درمان بیماران موردمطالعه در این مقاله حداقل ۱۸ ماه و حداکثر ۵ سال بود. میانگین میزان بیان BCR/ABL در بیماران مقاوم به دارو ایماتینیب ١٤ درصد به دست آمد. این در حالی بود که حداقل میزان بیان BCR/ABL در این بیماران یک درصد و حداکثر ۵۷ درصد محاسبه شد.

جدول ۲: مقایسه ۵ گروه موردمطالعه از نظر میزان بیان STAT3 نسبت به گروه کنترل

Disease Phase at Sampling Time	STAT3 Expression level (median)	SD، max-min	P-Value
New Case	٢/٩٦	٧، ٠/٧–٠/٢٩/٥	٠/٠٠٠١
MMR	١/٢	٠/٨، ٠/٤–٤/٥	٠/٢٧
Resistant Without Mutation	١٤	٩/٧، ٠/٨–٢٧	٠/٠٠١٤
Resistant With Mutation	١٠	٩/٨، ٠/٨–٢٥	٠/٠٠٣
Blastic Phase	٠/٧	١/٣، ٠/١٢–٤/٣	٠/٤



نمودار ۱: مقایسه ۵ گروه موردمطالعه از نظر میزان بیان STAT3 نسبت به گروه کنترل

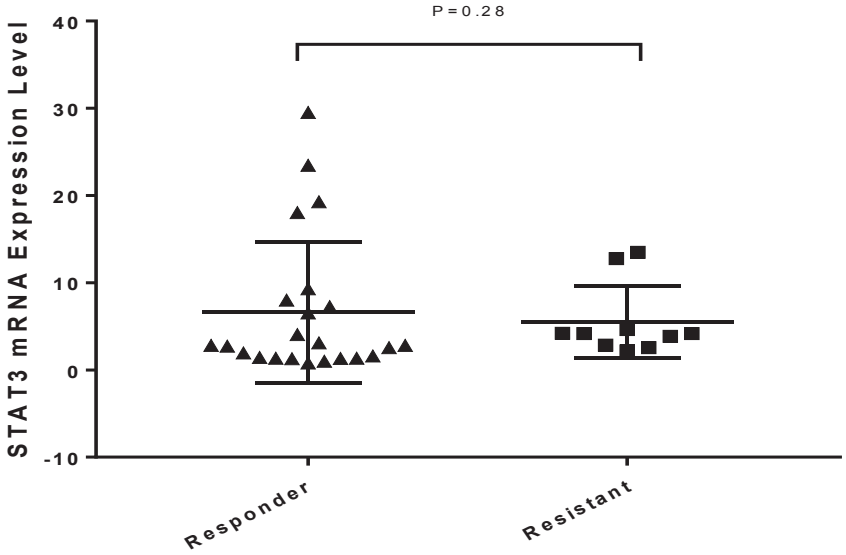
Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 8:01 IRST on Sunday November 29th 2020

در نمودار شماره ۱، مقایسه ۵ گروه از نظر میزان بیان STAT3 با استفاده از آزمون غیر پارامتری Krusal Wallis Test انجام شد که از نظر میزان بیان STAT3 تفاوت معناداری بین گروه‌ها وجود داشت(P<۰/۰۰۰۱). میانه بیان STAT3 در پنج گروه در جدول ۲ آورده شده است. نتایج نشان داد که بیان STAT3 در مرحله‌ی تشخیص، افزایش معناداری نسبت به افراد نرمال داشت(p=۰/۰۰۰۱). زمانی که بیماران در فاز MMR بودند، میزان بیان STAT3 تفاوت معناداری با گروه کنترل نداشت. بیماران مقاوم بدون موتاسیون و دارای موتاسیون تفاوت معناداری نسبت به بیماران در مرحله MMR داشتند(به ترتیب p=۰/۰۰۱٤ و p=۰/۰۰۳). این تفاوت بین دو گروه مقاوم معنادار نبود. همین‌طور بیماران در فاز بلاستیک تفاوت معناداری از نظر میزان بیان STAT3 با گروه کنترل نداشتند.

برای مقایسه‌ی گروه‌ها به‌صورت دوتایی از آزمون Mann-Whitney استفاده شد. در مقایسه‌ی گروه MMR و New case از نظر میزان بیان STAT3 تفاوت معنی‌داری بین دو گروه وجود داشت(P=۰/۰۰۰٤). در مقایسه گروه مقاوم به ایماتینیب با موتاسیون و گروه مقاوم به ایماتینیب بدون موتاسیون نیز تفاوت معنی‌دار وجود نداشت(P=۰/٦٥).

میزان بیان STAT3 در گروه بیماران فاز بلاستیک تفاوت معنی‌داری با گروه New Case داشت(P=۰/۰۰۰۳) اما با گروه MMR تفاوت معناداری نداشت(P=۰/۲).

همچنین وضعیت پاسخ به درمان بیماران با توجه به میزان بیان STAT3 در مرحله‌ی تشخیص اولیه نیز بررسی شد. هدف از این بررسی این بود که مشخص کنیم آیا با بررسی میزان بیان STAT3 زمان تشخیص می‌توانیم بیماران دارای پاسخ مناسب و بیماران مقاوم را از هم تفکیک کنیم. نتیجه‌ی پاسخ به درمان بیماران New case در طی دوره پیگیری بدین صورت بود: از ۳٤ بیمار New case در طی دوره پیگیری ۲۳ نفر پاسخ MMR داشتند(که در دسته Responder قرارگرفتند). میزان بیان ژن BCR/ABL در این بیماران از کمتر از یک‌دهم درصد تا محدوده‌ی غیرقابل‌شناسایی متغیر بود. ۱۰ نفر در طی پیگیری مقاوم و فاقد موتاسیون بودند (Resistant). یکی از بیماران هم مقاوم و دارای موتاسیون شد.



نمودار ۲: مقایسه‌ی میزان بیان STAT3 در زمان تشخیص بین دو گروه پاسخ‌دهنده و مقاوم

در نمودار شماره ۲ میزان بیان ژن STAT3 در دو گروه Responder و Resistant مقایسه شد و تفاوت معناداری ازنظر میزان بیان STAT3 در زمان تشخیص بین دو گروه Responder و Resistant وجود نداشت.

بحث

اگرچه انکوپروتئین BCR-ABL شاه علامت تشخیصی CML است، فعال شدن مداوم چندین مسیر سیگنالینگ مانند فعال‌سازی مداوم STAT3 نیز در ارتباط با ایجاد این بیماری نقش دارد(٤). بسیاری از مطالعات in vivo و in vitro ارتباط بین فعال‌سازی STAT3 و توسعه و حفظ انواع سرطان را نشان داده‌اند(۵).

در این مطالعه که بر روی ۷۱ بیمار مبتلا به CML در ۵ گروه تازه تشخیص داده‌شده، MMR، مقاوم به ایماتینیب با موتاسیون، مقاوم

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 8:01 IRST on Sunday November 29th 2020

به ایماتینیب بدون موتاسیون و گروه بلاستیک در مرکز تحقیقات خون و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان شریعتی صورت گرفت، نتایج نشان داد که بیماران در فاز بلاستیک تفاوت معناداری از نظر میزان بیان STAT3 با گروه کنترل نداشتند.

با توجه به بیان بالاتر P-STAT3 در سلول‌های میلوئیدی نابالغ و کاهش بیان آن در سلول‌های تمایز یافته پیشنهاد شده است که بالابودن مداوم P-STAT3 در مهار تمایز نقش دارد(۱۶). همین‌طور در مطالعه‌ی Coppo و همکاران بررسی میزان بیان STAT3 بر روی سلول‌های CD34 سه بیمار در فاز بلاستیک، دو بیمار در فاز تسریع یافته و سه بیمار در فاز مزمن با استفاده از تکنیک نورترن بلات نشان دادند که میزان بیان کلی STAT3 در هر سه فاز مزمن، تسریع یافته و بلاستیک در مقایسه با کنترل نرمال افزایش‌یافته است. علت تفاوت نتایج ما با نتایج این مطالعه می‌تواند به دلیل متفاوت بودن جمعیت موردمطالعه باشد چراکه در مطالعه ما کل جمعیت WBC ارزیابی شد درحالی‌که در مطالعه Coppo و همکاران فقط بر روی جمعیت CD34+ بررسی انجام شد(۱۷).

برخلاف نتایج مطالعه‌ی قبلی و در تایید نتایج مطالعه‌ی ما، Adamaki و همکاران که بر روی سطح بیان STAT3 در بیماران مبتلابه لوسمی لنفوبلاستیک حاد مطالعاتی داشتند، کاهش سطح بیان STAT3 را در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند(۱۸).

در بیماران AML فعالیت مداوم STAT3 در بلاست‌های لوسمیک ٤٤ درصد از بیماران نشان داده‌شده است. فعالیت مداوم STAT3 با تولید ایزوفرم‌های ناقص ممکن است با مقاومت دارویی بیماران AML مرتبط باشد و می‌تواند از عوامل شکست درمان در AML باشد. در بررسی‌های انجام‌شده بقای عاری از بیماری در بیماران با فعالیت مداوم STAT3 نسبت به گروه دارای فعالیت نرمال به‌طور قابل‌توجهی کوتاه‌تر بود. احتمال بقای عاری از بیماری ۱۲ ماهه در بیماران با فعالیت مداوم STAT3، ٢٤ درصد و در بیماران با فعالیت در حد نرمال ٥٦ درصد بود(۱۱).

در مطالعه‌ی Bewry و همکاران نشان داده شد که مقاومت دارویی در سلول‌های K562 همراه با افزایش pTyrStat3 می‌باشد. همین‌طور مقاومت دارویی با افزایش بیان ژن‌های هدف STAT3 شامل Bcl-xl، Mcl-1 و survivin همراه بود. در این مطالعه آزمایشگاهی STAT3 به عنوان یکی از مکانیسم‌های مقاومت دارویی به Imatinib مستقل از BCR/ABL مطرح شد(۱۹).

برای بررسی نقش STAT3 در مقاومت دارویی در بیماران CML، Mencalla و همکاران میزان بیان STAT3 را در بیماران مقاوم بدون موتاسیون نسبت به بیماران پاسخ‌دهنده بررسی کردند. نتایج این مطالعه نشان دهنده‌ی افزایش میزان بیان STAT3 در بیماران فاقد موتاسیون بود(۲۰). در مطالعه‌ی ما نیز در نمونه‌های مقاوم چه بدون موتاسیون و چه دارای موتاسیون افزایش معناداری در میزان STAT3 مشاهده شد. مطالعه‌ی Mencalha و همکاران محدود به بیمارانی شده بود که مقاوم و فاقد موتاسیون بودند. درحالی‌که در مطالعه‌ی حاضر بیماران مقاوم دارای موتاسیون هم از نظر میزان بیان STAT3 بررسی شدند که افزایش بیان STAT3 در آن‌ها تایید شد. با توجه به این نتایج به نظر می‌رسد که افزایش بیان STAT3 مکانیسمی مشترک در جهت ایجاد مقاومت در بیماران مقاوم دارا و یا فاقد موتاسیون می‌باشد.

در مطالعه‌ای که Wang و همکاران انجام دادند، دریافتند که افزایش معنی‌داری در بیان پروتئین STAT3 و RPS27a در نمونه‌های BM در بیماران CML در فازهای AP و BP در مقایسه با CP وجود دارد. سلول‌های K562 مقاوم در فاز G0 بیان بالاتری از STAT3 و RPS27a را در مقایسه با سلول‌های K562 نشان می‌دهند. این نتایج پیشنهاد می‌کند که داروهایی که STAT، P-STAT3 و RPS27a را هدف قرار می‌دهند در ترکیب با TKI ممکن است به‌عنوان استراتژی درمانی جدید برای بیماران CML مقاوم به درمان در نظر گرفته شود(۲۱).

در مطالعه‌ی Sayed و همکاران بر روی مغز استخوان ۵۰ بیمار CML و ۲۰ فرد نرمال، کاهش بیان P-STAT3 به دنبال درمان با ایماتینیب مشاهده شد. یافته‌ای که در مطالعه‌ی ما نیز مشاهده شد؛ به‌طوری‌که پس از درمان تفاوت معناداری بین میزان بیان STAT3 در گروه MMR و کنترل مشاهده گردید. در مطالعه‌ی Sayed میزان بیان P-STAT3 در بیماران مقاوم به درمان در مقایسه با بیماران پاسخ‌دهنده به درمان، افزایش بیان نشان داد و بر همین اساس پیشنهاد کردند که P-STAT3 به عنوان مارکری برای پیگیری کلینیکی و پاسخ به درمان استفاده شود(۲۲). همسو با نتایج این مطالعه در مطالعه‌ی حاضر نیز میزان بیان STAT3 در بیماران مقاوم چه دارای موتاسیون و چه فاقد

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 8:01 IRST on Sunday November 29th 2020

موتاسیون نسبت به بیماران پاسخ‌دهنده به ایماتینیب که در فاز MMR بودند، افزایش معناداری را نشان داد.

ارتباط بین تغییرات سطح بیان STAT3 و پلی مورفیسم‌های موجود در این ژن در مطالعه‌ی Kreil و همکاران در سال ۲۰۱۰ بررسی شد. این مطالعه بر روی پلی مرفیسم‌های مرتبط با بیان STAT3 و پاسخ بیماران مبتلا به CML به داروی اینترفرون آلفا انجام شد. ۱۷٤ بیمار مبتلابه CML درمان شده با اینترفرون آلفا مورد بررسی قرارگرفتند که از این میان ۷۹ بیمار responder بودند و کمتر از ۳۵ درصد کروموزوم فیلادلفیا داشتند و ۹۵ بیمار non responder بوده و هیچ پاسخ سایتوژنتیکی مشاهده نشد(بیشتر از ۹۵ درصد کروموزوم فیلادلفیا). در مطالعه‌ی ایشان بیان ژن STAT3 با ژنوتایپ SNP rs6503691 با تکنیک real time quantitative PCR بررسی شد و نتیجه این بود که SNP rs6503691 با بیان STAT3 و پاسخ بیماران CML به اینترفرون آلفا مرتبط است. نتایج نشان‌دهنده‌ی این بود که تفاوت‌های پلی مرفیک در سطوح بیان STAT3 ممکن است تعیین‌کننده‌ی پاسخ به اینترفرون آلفا در بیماران مبتلابه CML باشد(۲۳).

در مطالعه‌ی ما هم در بین بیماران در گروه‌های مختلف تفاوت قابل‌توجهی در سطح بیان STAT3 وجود داشت(جدول ۳)، اما ارتباطی از نظر میزان بیان STAT3 در زمان تشخیص و نحوه‌ی پاسخ به درمان شناسایی نشد. علت این اختلاف در نتایج، تفاوت در نحوه‌ی طبقه‌بندی بیماران به Responder و Non responder و یا به دلیل درمان متفاوت بیماران در دو مطالعه می‌تواند باشد. در مطالعه‌ی ما کلیه بیماران با Imatininb درمان شده بودند؛ درحالی‌که در مطالعه Kreil با اینترفرون درمان شده بودند. از محدودیت‌های این طرح عدم بررسی پلی مورفیسم‌های مؤثر در میزان بیان ژن STAT3 و نیز عدم بررسی سطح پروتئینی آن بود.

نتیجه‌گیری

ایماتینیب یک درمان هدفمند مولکولی علیه تیروزین کیناز انکوژنیک BCR/ABL است. اگرچه ایماتینیب کارایی قابل‌توجهی در فاز مزمن بیماری دارد، در مراحل پیشرفته، بیماران به این دارو مقاوم می‌شوند. مقاومت به مهارکننده‌های تیروزین کینازی می‌تواند به دلیل موتاسیون در دومن کینازی BCR/ABL و یا مکانیسم‌های دیگر رخ دهد. این مکانیسم‌ها علی‌رغم مهار BCR/ABL، امکان بقا را برای سلول‌ها فراهم می‌کنند و یا اصطلاحاً مقاومت مستقل ازکیناز ایجاد می‌کنند. با توجه به افزایش بیان STAT3 مستقل از وجود یا فقدان موتاسیون در دومن تیروزین کینازی BCR/ABL، مهارکننده‌های STAT3 ممکن است بتوانند در درمان بیماران مقاوم مفید باشند. پیشنهاد می‌شود که برای نتیجه‌گیری کامل‌تر سطح فسفریلاسیون و بیان پروتئین STAT3 در بیماران در فازهای مختلف بررسی شود. همین‌طور تأثیر مهارکننده‌های STAT3 در نمونه‌های بیماران مقاوم بررسی گردد.

تشکر و قدردانی

یاد استاد فقید، زنده‌یاد دکتر فاطمه نادعلی را گرامی داریم. روحشان شاد و قرین رحمت الهی باد. این تحقیق قسمتی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته هماتولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران با شماره ۳۵۱۶۳-۳۱-۰۰۲-۹٦ می‌باشد.

منابع

1. Druker BJ. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. Blood 2008; 112(13): 4808-17.

2. Hehlmann R, Hochhaus A & Baccarani M. Chronic myeloid Leukaemia. Lancet 2007; 370(9584): 342-50.

3. Melo JV & Barnes DJ. Chronic myeloid Leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. Nature Reviews Cancer 2007; 7(6): 441-53.

4. Garcia R & Jove R. Activation of STAT transcription factors in oncogenic tyrosine kinase signaling. Journal of Biomedical Science 1998; 5(2): 79-85.

5. Hirano T, Ishihara K & Hibi M. Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors. Oncogene 2000; 19(21): 2548-56.

6. Kiuchi N, Nakajima K, Ichiba M, Fukada T, Narimastu M, Mizuno K, et al. STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene. The Journal of Experimental Medicine 1999; 189(1): 63-73.

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 8:01 IRST on Sunday November 29th 2020

7. Steelman LS, Abrams SL, Whelan J, Bertrand FE, Ludwig DE, Basecke J, et al. Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to Leukemia. Leukemia 2008; 22(4): 686-707.

8. Bromberg J & Darnell JE Jr. The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. Oncogene 2000; 19(21): 2468-73.

9. Hsieh FC, Cheng G & Lin J. Evaluation of potential Stat3-regulated genes in human Breast cancer. Biochemical and Biophysical Research Communications 2005; 335(2): 292-9.

10. Deng JY, Sun D, Liu XY, Pan Y & Liang H. STAT-3 correlates with lymph node metastasis and cell survival in Gastric cancer. World Journal of Gastroenterology 2010; 16(42): 5380-7.

11. Benekli M, Xia Z, Donohue KA, Ford LA, Pixley LA, Baer MR, et al. Constitutive activity of signal transducer and activator of transcription 3 protein in acute myeloid Leukemia blasts is associated with short disease-free survival. Blood 2002; 99(1): 252-7.

12. Ma LD, Zhou M, Wen SH, Ni C, Jiang LJ, Fan J, et al. Effects of STAT3 silencing on fate of chronic myelogenous Leukemia K562 cells. Leukemia & lymphoma 2010; 51(7): 1326-36.

13. Kuepper MK, Bütow M, Herrmann O, Ziemons J, Chatain N, Maurer A, et al. Stem cell persistence in CML is mediated by extrinsically activated JAK1-STAT3 signaling. Available at: https://app.dimensions.ai/details/publication/pub.1112582632. 2019.

14. Al-Jamal HA, Johan MF, Jusoh SA, Ismail I & Taib WR. Re-expression of bone marrow proteoglycan-2 by 5-azacytidine is associated with STAT3 inactivation and sSensitivity response to imatinib in resistant CML cells. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 2018; 19(6): 1585-90.

15. Rizzieri D & Moore JO. Implementation of management guidelines for chronic Myeloid Leukemia perspectives in the United States. Pharmacy and Therapeutics 2012; 37(11): 640.

16. Hevehan DL, Miller WM & Papoutsakis ET. Differential expression and phosphorylation of distinct STAT3 proteins during granulocytic differentiation. Blood 2002; 99(5): 1627-37.

17. Coppo P, Flamant S, De Mas V, Jarrier P, Guillier M, Bonnet ML, et al. BCR–ABL activates STAT3 via JAK and MEK pathways in human cells. British Journal of Haematology 2006; 134(2): 171-9.

18. Adamaki M, Tsotra M, Vlahopoulos S, Zampogiannis A, Papavassiliou AG & Moachovi M. STAT transcript levels in childhood acute lymphoblastic leukemia: STAT1 and STAT3 transcript correlations. Leukemia Research 2015; 39(11): 1285-91.

19. Bewry NN, Nair RR, Emmons MF, Boulware D, Pinilla-lbarz J & Hazlehurst LA. Stat3 contributes to resistance toward BCR-ABL inhibitors in a bone marrow microenvironment model of drug resistance. Molecular Cancer Therapeutics 2008; 7(10): 3169-75.

20. Mencalha AL, Correa S, Salles D, Du Rocher B, Santiago MF & Abdelhay E. Inhibition of STAT3-interacting protein 1 (STATIP1) promotes STAT3 transcriptional up-regulation and imatinib mesylate resistance in the chronic myeloid leukemia. BMC Cancer 2014; 14(1): 866.

21. Wang H, Xie B, Kong Y, Tao Y, Yang G, Gao M, et al. Overexpression of RPS27a contributes to enhanced chemoresistance of CML cells to imatinib by the transactivated STAT3. Oncotarget 2016; 7(14): 18638-50.

22. Sayed D, Badrawy H, Gaber N & Khalaf MR. P-Stat3 and bcr/abl gene expression in chronic Myeloid Leukemia and their relation to imatinib therapy. Leukemia Research Reports 2014; 38(2): 243-50.

23. Kreil S, Waghorn K, Ernst T, Chase A, White H, Hehlmann R, et al. A polymorphism associated with STAT3 expression and response of Chronic myeloid Leukemia to interferon α. Haematologica 2010; 95(1): 148-52.

Downloaded from payavard.tums.ac.ir at 8:01 IRST on Sunday November 29th 2020

Study of STAT3 Expression in Different Phases of Patients with Chronic Myeloid Leukemia

Peyman Yousefi[1] (M.S.) - Shahrbano Rostami[2] (Ph.D.) - Nasrin Alizadeh Ghandfurosh[3] (M.S.) - Saeed Mohammadi[4] (Ph.D.) - Mohsen Nikbakht[2] (Ph.D.) - Laya Ghadyaninejhad[5] (B.S.) - Bahram Chahardouli[4] (Ph.D.)

1 Master of Science in Hematology and Blood Banking, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2 Associate Professor, Hematology, Oncology and Stem Cell Transplantation Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3 Master of Science in Hematology and Blood Banking, Hematology, Oncology and Stem Cell Transplantation Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4 Assistant Professor, Hematology, Oncology and Stem Cell Transplantation Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

5 Master of Sciences Student in Genetics, Hematology, Oncology and Stem Cell Transplantation Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Received: Oct 2018

Accepted: Feb 2019

Background and Aim: Chronic myeloid leukemia(CML) is a clonal myeloproliferative disease, characterized by BCR/ABL translocation. Using tyrosine kinase inhibitors such as Imatinib, treatment for this disease has progressed remarkably. However, resistance to tyrosine kinase inhibitor is a major obstacle. Signal transducer and activator of transcription 3(STAT3) is an important transcription factor in proliferation and survival of several cancers. The aim of this study was to determine the expression of STAT3 and its role in drug resistant CML patients treated with Imatinib.

Materials and Methods: Peripheral blood was collected from 71 CML patients in different phases of the disease and 10 healthy individuals. After extracting RNA and synthesizing cDNA, expression of STAT3 gene was measured using Real-Time PCR technique. The expression of STAT3 was normalized to ABL control gene. Then expression levels were compared with the control group.

Results: The results showed that expression of STAT3 in the diagnostic stage was significantly higher than healthy individuals(p=0.0001). STAT3 expression was not significantly different from MMR(Major Molecular Response) and the control group. STAT3 expression was significantly higher in non-mutated and mutated ABL kinase domain Imatinib resistant patients as compared to patients in MMR stage(p=0.0014 & p=0.003). This difference was not significant between the two resistant groups. Blastic phase patients had no significant difference in the expression of STAT3 with the control group.

Conclusion: Considering the results of this study and the role of STAT3 in cell proliferation and survival, the targeting of STAT3 seems to be an effective option in the treatment of resistant patients.

Keywords: Chronic Myeloid Leukemia(CML), STAT3, Imatinib, Drug Resistance

*** Corresponding Author:**
Chahardouli B
Email:
bchahardouli@tums.ac.ir