

افتراق بین بیان طبیعی و بیان افزایش یافته ژن مقاومت دارویی چندگانه (MDR1) بوسیله روش RT-PCR

فاطمه نادعلی*، دکتر علی اکبر پورفتح‌اله**، دکتر کامران علی مقدم***، دکتر عبدالخالق دیزجی****، دکتر علیرضا
زمردی پور****، شهربانو رستمی*****، دکتر ابراهیم عزیزی*****، دکتر اردشیر قوامزاده****

چکیده مقاله

مقدمه. مقاومت نسبت به شیمی درمانی یکی از موانع اصلی در درمان سرطانهاست. هنگامی که مقاومت نسبت به داروهای با ترکیبات شیمیایی و مکانیسم عمل متفاوت بوجود می‌آید، اصطلاحاً مقاومت دارویی چندگانه یا (MDR Multi Drug Resistance) نامیده می‌شود. یکی از مکانیسمهای اصلی مقاومت دارویی بیان افزایش یافته ژن MDR1 است که محصول آن بنام گلیکوپروتئین P- باعث خروج دارو از سلول می‌شود. هدف از انجام این مطالعه راه اندازی RT-PCR و تشخیص بیان افزایش یافته ژن MDR1 و مقاومت دارویی ناشی از این مکانیسم در نمونه‌های بالینی مقاوم به دارو می‌باشد.

روشها. در این مطالعه گلبولهای سفید خون محیطی ۱۶ فرد طبیعی به صورت Total White blood cells, T Cell Fraction و سلولهای تک هسته‌ای غیر T cell و گرانولوسیتها برای بیان ژن MDR1 به روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفته است. همچنین سلولهای تک هسته‌ای از ۵ نمونه خون بند ناف و سلولهای تک هسته‌ای خون طبیعی ۵ نفر اهداء کننده سلولهای بنیادی که تحت درمان با GM-CSF قرار داشتند با استفاده از گرادایانت فایکول جدا شد و به همراه سلول K۵۶۲ (اریتروکوما) به عنوان سلول کنترل منفی و سلول K۵۶۲ مقاوم به داروی دوکسوروبیسین به عنوان سلول کنترل مثبت مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج. بیان ژن MDR1 در سلولهای تک هسته‌ای جدا شده از خون محیطی افراد طبیعی و در Parental K۵۶۲ در PCR با ۳۵ سیکل مشاهده ولی در ۳۰ سیکل دیده نشد. همچنین بیان ژن در لنفوسیت‌های T و سلولهای تک هسته‌ای جدا شده از خون بند ناف و سلولهای تک هسته‌ای جدا شده از خون محیطی اهداء کنندگان سلول بنیادی تحت درمان با GM-CSF در ۳۰ سیکل PCR مشاهده شد ولی بیان ژن در گرانولوسیتها تحت همین شرایط دیده نشد.

بحث. به علت حساسیت بسیار بالای روش RT-PCR و بیان ژن MDR1 در لکوسیت‌های طبیعی خون محیطی، روش RT-PCR ساده برای بررسی MDR یا مقاومت دارویی چندگانه در بدخیمیهای خونی کافی نیست و باید سیکل‌های PCR طوری تنظیم شود که ژن MDR1 با بیان طبیعی تکثیر نشود و یا این که RT-PCR به صورت نیمه کمی و یا کمی انجام شود. در ضمن در بررسی نمونه‌های بالینی، سلولهای با بیان طبیعی ژن MDR1 از جمله لنفوسیت‌های T باید از نمونه حذف شوند.

واژه‌های کلیدی. ژن MDR1، RT-PCR، گلیکوپروتئین P، مقاومت دارویی چندگانه (MDR)

چندگانه بیان ژن MDR1 و محصول آن به صورت بیان گلیکوپروتئین P بر روی غشاء سلول است (۲، ۳).

Juriano و Ling این پروتئین را در سال ۱۹۷۶ تشخیص دادند (۴) و آن را به نام P نامیدند که از نفوذ دارو به داخل سلول اقتباس شده است. گلیکوپروتئین P یک عضوی از پروتئینهای ناقل از خانواده

مقدمه

مقاومت دارویی چندگانه (MDR)، شایعترین مانع در برابر موفقیت شیمی درمانی در تعدادی از سرطانهاست (۱).

اگرچه سرانجام بالینی لوسمی‌های حاد با پیشرفتهای اخیر در شیمی درمانی اصلاح شده است ولی درمان این بیماری هنوز با مشکل روبروست و مشکل اصلی این است که سلولهای لوسمیک از شیمی درمانی فرار می‌کنند و در نهایت باعث نارسایی درمان می‌شوند. مکانیسم مقاومت دارویی چندگانه (MDR)، ممکن است در اثر تغییر در هر مرحله‌ای از کشتن سلول بوجود آید. این تغییرات در انتقال دارو، متابولیسم دارو، هدف دارو، مکانیسمهای تغییر سلولی و توانایی تشخیص سلول نسبت به عوامل توکسیک و همچنین اختلالات آپوپتوز شرح داده شده است. یک علت شاخص مقاومت دارویی

* دانشجوی دکترای هماتولوژی، دانشگاه تربیت مدرس

** Ph.D. ایمینولوژی، دانشگاه تربیت مدرس

*** فوق تخصص خون و انکولوژی، دانشگاه تهران

**** Ph.D. بیوشیمی، مرکز تحقیقات ملی ژنتیک و تکنولوژی زیستی

***** Ph.D. سلولی و مولکولی، مرکز تحقیقات ملی ژنتیک و تکنولوژی زیستی

***** فوق لیسانس هماتولوژی، دانشگاه تهران

***** Ph.D. سم شناسی، دانشگاه تهران

Archive of SID

P (Dako) دارای بیان گلیکوپروتئین P بودند.

لکوسیت‌های طبیعی خون: خون محیطی ۱۶ فرد طبیعی روی ضد انعقاد EDTA گرفته شد و سپس سانتریفوژ و لایه گلبول سفید آن جدا و توسط فایکول (۱/۰۷۷) سلولهای تک هسته‌ای آن جدا گردید. همچنین سلولهای تک هسته‌ای ۵ نمونه خون بند ناف و ۵ نمونه خون محیطی افراد اهداء کننده سلولهای بنیادی که تحت درمان با GM-CSF بودند با استفاده از فایکول جدا و سپس سلولها با سالیین فسفات شستشو داده شد. سلولهای T با استفاده از روش روزت و استفاده از گلبولهای قرمز گوسفند جدا گردیدند. در نهایت چهار بخش از گلبولهای سفید شامل، کل گلبولهای سفید، سلولهای T، سلولهای تک هسته‌ای غیر T و گرانولوسیت‌ها حاصل شد.

استخراج RNA: RNA کل از ده میلیون سلول جدا گردید بدین ترتیب که ۱ ml از محصول Trizol را روی سلولها ریخته و به مدت ۵ دقیقه در حرارت اطاق قرار دادیم و سپس روی ۱ ml از کلروفرم به مدت ۵ دقیقه در حرارت اتاق انکوبه نمودیم. به منظور جدا شدن پروتئین، DNA و فاز آبی حاوی RNA به مدت ۱۵ دقیقه در ۴°C با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و سپس فاز آبی به لوله‌ای حاوی ۱ ml از ایزوپروپانول منتقل گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در ۴°C با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس رسوب RNA با ۱ ml از اتانول ۷۵٪ دارای ۰/۱ مولار سدیم استات شسته شد و به مدت ۱۰-۵ دقیقه در حرارت اتاق قرار داده شد تا خشک شود. سپس رسوب در ۵۰ میکرولیتر آب فاقد نوکلئاز حل شده و به مدت ۱۰ دقیقه در حرارت ۶۰-۵۵°C قرار گرفته و پس از آن غلظت RNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر توسط فتومتر خوانده شد و میزان RNA محاسبه گردید. سنتز cDNA و انجام PCR: سنتز cDNA با استفاده از ۱ میکروگرم از کل RNA در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از ۲۰۰ واحد آنزیم MMLV Reverse transcriptase و بـ سـا فـر X First strand، dNTPs یک میلی مولار، ۴۰ واحد از RNase out و DTT با غلظت ده میلی مولار و پرایمرهای راندم با غلظت ۵ میکرومول ساخته شد. برنامه سنتز شامل انکوباسیون به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۷°C، ۵۵ دقیقه در ۴۲°C و ۱۰ دقیقه در ۷۵°C می‌باشد و سپس cDNA تا موقع مصرف در ۲۰°C نگهداری شد.

PCR: پس از افزودن Taq polymerase و dNTPs و پرایمرها و بافر و MgCl₂ با استفاده از ترموسایکلرایندرف انجام شد. تکثیر MDR1 و B2 میکروگلوبولین (به عنوان استاندارد داخلی) در یک لوله انجام شد. برنامه PCR شامل ۵ دقیقه در ۹۵°C و ۳۵ سیکل در ۹۵°C به مدت ۱ ثانیه، ۶۰°C به مدت یک دقیقه و ۷۲°C به مدت ۱/۵ دقیقه می‌باشد. محصول PCR روی ژل آگاروز ۲٪ حاوی ۰/۰۵ درصد اتیدیوم بروماید مورد بررسی قرار گرفت. اندازه محصول تکثیر ژن B2 میکروگلوبولین ۱۳۵ bp و ژن MDR1 برابر ۱۰۲۵ bp می‌باشد.

بزرگ اتصال دهنده ATP است که دارای ۱۷۰ کیلو دالتون وزن مولکولی و دو جایگاه اتصال ATP می‌باشد. این گلیکوپروتئین روی غشاء سلولی قرار گرفته و باعث خروج تعدادی از داروهای ضد سرطان هیدروفوبیک بر خلاف گرادیانت غلظت دارو از سلول می‌شود. گلیکوپروتئین P نه تنها باعث خارج شدن دارو از سلول با صرف انرژی ATP می‌شود بلکه از ورود دارو به سلول نیز ممانعت می‌کند (۵).

ژن MDR1 روی کروموزوم شماره ۷ (۲۱۰۱ q ۷) قرار دارد و mRNA آن برابر ۴/۵ kb است و در سلولهای توموری مقاوم به دارو بیان می‌شود. بیان گلیکوپروتئین محصول این ژن همراه با مقاومت نسبت به چندین گروه از داروهای ضد سرطان مثل آنتراسیلکین (دانوروبیسین و دوکسوروبیسین)، وینکاآلکالوئیدها (وین بلاستین، وین کریستین) و اپی پودوفیلوتوکسین‌ها (اتوپوزاید) می‌باشد (۳، ۶).

گلیکوپروتئین P روی سطح سلولهای آندوتلیال سد مغزی - خونی به طور طبیعی بیان می‌شود و بیان کننده یک نقش طبیعی آن در انتقال متابولیت‌ها یا مواد خارجی است. همچنین بر روی غدد آدرنال، آندومتر، تخمدان، بیضه‌ها و روی سلولهای CD34+ مغز استخوان بیان می‌شود (۷، ۸). در خون محیطی، گلیکوپروتئین P بر روی لنفوسیت‌های T (CD8، CD4) و سلولهای کشنده طبیعی (CD56) و به مقدار جزئی روی منوسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها بیان می‌شود (۹).

در لوسمی حاد میلوئید، بیان گلیکوپروتئین P در هنگام تشخیص بیماری برابر با ۴۰-۲۰ درصد تشخیص داده شده است (۱۰، ۱۱) که در زیر گروه M4 و M5 شیوع بیشتر (۱۲) و در زیر گروه M3 (۱۳) و در لوسمی حاد لنفوبلاستیک شیوع کمتری دارد (۱۴). برای تشخیص بیان ژن MDR1 و گلیکوپروتئین P در نمونه‌های بالینی بیماران مبتلا به مقاومت دارویی چندگانه باید از یک روش حساس استفاده شود زیرا که بیان گلیکوپروتئین P در نمونه‌های بالینی نسبت به رده‌های سلولی (cell line) ضعیف‌تر است (۱۵، ۱۶). چندین روش برای تعیین، گلیکوپروتئین P و بیان ژن MDR1 وجود دارد از جمله فلوسیتومتری، ایمنوسیتوشیمی و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز معکوس (RT-PCR). روش شاخص برای تعیین میزان بیان ژن MDR1 در سطح mRNA در نمونه‌های بالینی، همان روش RT-PCR است. هدف از انجام این مطالعه تعیین افتراق بین بیان افزایش یافته ژن مقاومت دارویی چندگانه به وسیله روش RT-PCR می‌باشد.

روشها

رده سلولی: سلول لوسمیک انسانی میلوئیدی اریترولوکمیا (K56۲) و زیر گروه مقاوم آن نسبت به داروی دوکسوروبیسین (KD۳۰) که به صورت هدیه از خانم دکتر Selina Raguz از دانشگاه لندن گرفته شد در محیط (Gibco) RPMI-۱۶۴۰ رشد داده شد. ۸۰٪ سلولهای رده سلولی KD۳۰ با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال ضد گلیکوپروتئین

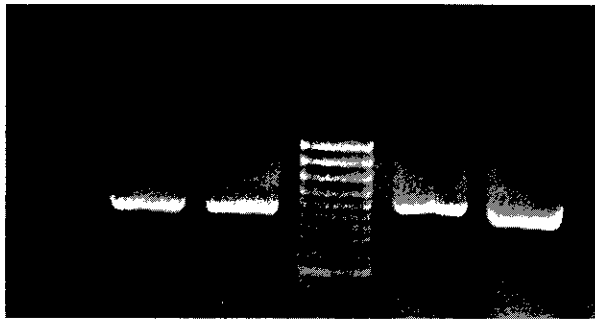
نتایج

در RT-PCR انجام شده بر روی کل گلبولهای سفید خون افراد طبیعی و Parental K562 بیان ژن MDR1 به صورت یک باند 1025 bp توسط 35 سیکل از PCR دیده شد ولی بیان آن در Parental K562 به صورت هدیه از دکتر Raguz از دانشگاه لندن گرفته شده بود دیده نشد (شکل 1 و 2).

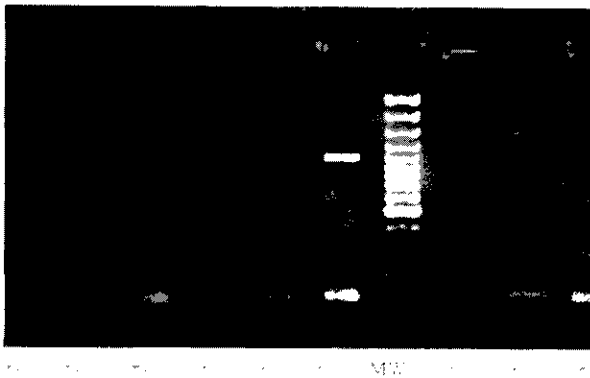
در یک بررسی برای یافتن مقدار سیکل مناسب PCR، بیان ژن MDR1 بر روی لکوسیت‌های طبیعی خون افراد طبیعی (1-3) سلول مقاوم KD35 (4-6) و Parental K562 (8-10) در 20 و 25 و 30 سیکل مورد بررسی قرار گرفته و یک بیان ضعیف در 30 سیکل در افراد طبیعی و یک بیان ضعیف در 25 سیکل برای سلول مقاوم و یک بیان قوی برای سلول مقاوم در 30 سیکل دیده شد و در Parental K562 و کنترل منفی (11) بیان دیده نشد. بر طبق این نتایج ما دریافتیم که تعداد 30 سیکل در PCR بهترین مقدار سیکل برای افتراق بین بیان طبیعی و بیان افزایش یافته ژن MDR1 است (شکل 3).

در شکل 4 یک بیان قوی ژن MDR1 در سلول مقاوم KD30، سلولهای T و سلولهای تک هسته‌ای غیر T و سلولهای تک هسته‌ای جدا شده از خون محیطی افراد تحت داروی GM-CSF و سلولهای K562 تحت داروی دوکسوروبیسین در PCR با 30 سیکل دیده شد. در حالی که بیان ژن MDR1 در گلبولهای سفید افراد طبیعی، گرانولوسیت‌ها و سلولهای Parental K562 در 30 سیکل PCR دیده نشد (شکل 4).

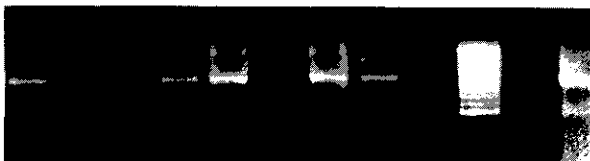
در شکل 5، بیان ژن MDR1 در سلولهای تک هسته‌ای خون بند ناف و خون محیطی افراد تحت داروی GM-CSF در 30 سیکل PCR دیده شد ولی این بیان در سلولهای Parental K562 مشاهده نگردید. همچنین مشخص شد که بیان ژن MDR1 در سلولهای مقاوم (KD30) قوی‌تر از سلولهای تک هسته‌ای خون بند ناف و خون محیطی افراد تحت درمان با داروی GM-CSF می‌باشد (شکل 5).



شکل 2. Parental K562 تهیه شده از دکتر Raguz (1)، KD30 تهیه شده از دکتر Raguz (2)، Parental K562 تهیه شده از سازمان انتقال خون ایران (3)، گلبولهای سفید افراد طبیعی (4)، Parental K562 تهیه شده از مرکز تحقیقات ژنتیک و تکنولوژی زیستی که روی 20 ng/ml داروی دوکسوروبیسین بوده است (5)، کنترل منفی (7)، شناساگر مولکولی (MW)



شکل 3. گلبولهای سفید افراد طبیعی (1-3)، KD30 (4-6)، شناساگر مولکولی (MW)، Parental K562 تهیه شده از دکتر Raguz (7-9)، کنترل منفی (10).



شکل 4. KD30 (1)، Parental K562 (2 و 11)، گلبولهای سفید افراد طبیعی (3 و 9)، سلولهای تک هسته‌ای غیر T Cell (4)، سلولهای T (5)، گرانولوسیت‌ها (6)، سلولهای تک هسته‌ای در گردش خون اهداء کننده تحت داروی GM-CSF (7 و 8)، شناساگر مولکولی (MW)، K562 تحت داروی دوکسوروبیسین (12)، کنترل منفی (13)



شکل 5. افراد طبیعی (1-6)، Parental K562 تهیه شده از مرکز ملی تحقیقات ژنتیک و تکنولوژی زیستی (7)، Parental K562 تهیه شده از سازمان انتقال خون ایران (8)، شناساگر مولکولی (MW)، کنترل منفی (9)

Archive of SID

است (۱۷).

با استفاده از سلول K562 مقاوم به دارو در این مطالعه (KD30) ما دریافتیم که در بررسیهای چند پارامتری باید از رده سلولی مقاوم به دارو به عنوان کنترل و به عنوان یک استاندارد طلایی استفاده شود که دیگر محققین نیز قبلاً بر لزوم استفاده از آن تأکید کرده‌اند (۱۵).

در مطالعه حاضر نشان داده شد که بیان ژن MDR1 در سلولهای تک هسته‌ای خون محیطی و سلولهای T قوی‌تر از سلولهای تک هسته‌ای غیر T است. همچنین بیان ژن MDR1 در سلولهای تک هسته‌ای جدا شده از خون محیطی افراد تحت داروی GM-CSF و سلولهای تک هسته‌ای خون بند ناف مشاهده شد (شکل ۵). این بیان ممکن است به علت وجود سلولهای T و سلولهای CD34+ که تحت تأثیر داروی GM-CSF از مغز استخوان وارد خون محیطی شده‌اند باشند. دو نفر محقق به نامهای Chaudhary و Roninson قبلاً در مطالعه خود بیان گلیکوپروتئین P را در سلولهای CD34+ مغز استخوان نشان داده‌اند (۱۸).

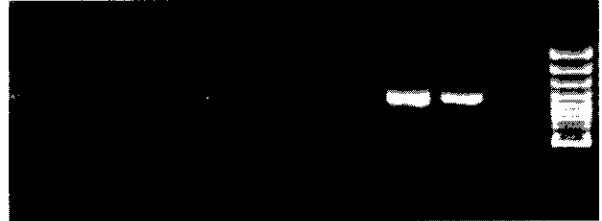
محققین شیوع بیان گلیکوپروتئین P را در سلولهای طبیعی خون محیطی بسیار متغیر گزارش کرده‌اند و در یک مطالعه ده نفری هر ده نفر بیان داشته‌اند و در مطالعه‌ای دیگر از ۲۰ نفر در هیچکدام بیان دیده نشده است (۱۹، ۲۰).

ما بیان ژن MDR1 را در خون محیطی تمام افراد طبیعی در ۳۵ سیکل PCR مشاهده کردیم ولی در ۳۰ سیکل PCR مشاهده نشد. بنابراین تعداد سیکل PCR در جستجوی بیان ژن MDR1 بسیار مهم است.

تقدیر و تشکر

از خانم دکتر Selina Raguz مسئول مرکز علوم بالینی امپریال کالج دانشگاه لندن به دلیل قرار دادن Parental K562، K562 مقاوم به داروی دوکسوروبیسین (KD30) تشکر و قدردانی می‌شود.

1. Yage F, Armesilla AI, Harrison G, Elliott J, Sardini A, Higgins CF, and Raguz S. P-glycoprotein (MDR1) Expression in leukemic cells is regulated at two distinct steps, mRNA stabilization and translational initiation. *J. Biol. Chem.*, March 21, 2003 ; 278(12): 10344-10352.
2. Campos L, Guyotat D, Archimbaud F, Calmard- Oriol P, Tsuruo J, Treille D, Fiere D. Clinical significance of multidrug resistance P-glycoprotein expression on acute nonlymphoblastic leukemia cells at diagnosis. *Blood*. 1992 Jan 15; 79(2) : 473-6.



شکل ۵. خون بند ناف (۱-۳)، سلولهای تک هسته‌ای اهداء کننده تحت درمان GM-SCF (۴-۶) Parental K562 (۷)، KD30 (۸-۹)، بدون dDNA (۱۰)، شناساگر مولکولی (MW)

بحث

در این مطالعه بیان ژن MDR1 در گلبولهای سفید خون محیطی در همه افراد طبیعی و سلولهای Parental K562 که از منابع بانک سلولی ایرانی تهیه شده بود در ۳۵ سیکل PCR دیده شد (شکل ۱) در حالی که این بیان در سلول K562 که از دانشگاه لندن تهیه گردیده بود با ۳۵ سیکل PCR مشاهده نشد (شکل ۲). علت این اختلاف ممکن است به علت پاساژهای زیادی که روی سلول K562 گرفته شده از منابع ایرانی انجام شده است باشد که باعث تغییر در کاربوتیپ و رفتار سلولی در طول زمان می‌شود بنابراین برای تحقیقات حساس باید از original cell line استفاده شود.

در بخش دیگری از این تحقیق ما دریافتیم که تعداد سیکلهای PCR در افتراق بین بیان طبیعی و بیان افزایش یافته ژن MDR1 مهم است و ۳۰ سیکل برای این منظور بهترین است و در ۲۵ سیکل هیچگونه بیانی دیده نشد (شکل ۳). یافته ما شبیه به مطالعه‌ای است که در آن بررسی ۱۲ نمونه از خون محیطی و مغز استخوان با استفاده از ۲۵ سیکل در PCR هیچ گونه بیانی از ژن MDR1 مشاهده نشده

منابع

3. Motoji T, Motomura S, Wang YH. Multidrug resistance of acute leukemia and a strategy to overcome it. *Int J Hematol*. 2000 Dec; 72(4) : 418-24.
4. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biophys Acta*. 1976 Nov 11; 455(1): 152-625.
5. Gemann UA. Molecular analysis of the multidrug transporter. In: Clynes M, ed. *Multidrug resistance in cancer*. Dordrecht, Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic, 1994, 33-62.

Archive of SID

6. Paietta E. Classical multidrug resistance in acute myeloid leukemia. *Med Oncol.* 1997 Mar ; 14(1) : 53-60.
7. Drach D, Zhao S, Srach J, Mahadevia R, Gattringer C, Huber H, Andreeff M. Subpopulations of normal peripheral blood and bone marrow cells express a functional multidrug resistant phenotype. *Blood.* 1992 Dec 1; 80(11) : 2729-34.
8. Takeshita A, Shinjo K, Ohnishi K, Ohno R. Expression of multidrug resistance P-glycoprotein in myeloid progenitor cells of different phenotype: comparison between normal bone marrow cells and leukaemia cells. *Br Haematol.* 1996 Apr; 93(1): 18-21.
9. Klimecki WT, Futscher BW, Grogan TM, and Datton WS. P-glycoprotein expression and function in circulating blood cells from normal volunteers. *Blood.* 1994 ; 83 : 2451-2458.
10. Hunault M, Zhou D, Delmer A, Ramond S, viguie F, Cadiou M, Perrot JY, Levy V, Rio B, Cymbalista F, Zittoun R, Marie IP. Multidrug resistance gene expression in acute myeloid leukemia : major prognosis significance for in vivo drug resistance to induction treatment. *Ann Hematol.* 1997 Feb; 74(2) : 65-71.
11. Del Poeta G, Stasi R, Aronica G, Venditti A, Cox MC, Bruno A, Buccisano F, Masi M, Tribalto M, Amadori S, Papa G. Clinical relevance of P-glycoprotein expression in de novo acute myeloid leukemia. *Blood* 1996 Mar 1; 87(5) : 1997-2004.
12. Nussler V, Pelka-Fleischer R, Zwuerzina H, Nerl C, Beckert B, Gieseler F, Diem H, Ledderose G, Gullis E, Saure H, Wilmanns W, P-glycoprotein expression in patients with acute leukemia- clinical relevance. *Leukemia.* 1996 Jul; 10 Suppl 3: S23-S31.
13. Paietta F, Anderson J, Racerskis J. Significantly lower P-glycoprotein expression in acute promyelocytic leukemia than in other types of acute myeloid leukemia. Immunological molecular and functional assays. *Leukemia* 1994, 8, 968-973.
14. Ludescher C, Eisterer W, Hilbe W, Gotwald M, Hofmann J, Zabernigg A, Cianfriglia M, Thaler J. Low frequency of activity of P-glycoprotein (P-170) in acute lymphoblastic leukemia compared to acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 1995 Feb ; 9(2) : 350-6.
15. Beck WT, Grogan TM, Willman CL, et al. Methods to detect P-glycoprotein- associated multidrug resistance in patients' tumors: consensus recommendations. *Cancer Res.* 1996 Jul 1; 56(13) : 3010-20.
16. Nørgaard JM, Hokland P. Biology of multiple drug resistance in acute leukemia. *Int J Hematol.* 2000 ; 72 : 290-297.
17. Gurbuxani S, Singh Arya I, Raina V, Sazawal S, Khattar A, Magrath I, Marie J, Bhargava M. Significance of MDR1, MRP1, GSTpi and GSTmu mRNA expression in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Lett.* 2001 Jun 10; 167(1) : 73-83.
18. Chaudhary PM, Roninson IB. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cell. *Cell* 1991 Jul 12; 66(1) : 85-94.
19. Holmes JA, Jacobs A, Carter G, Whittaker JA, Bentley DP, Padua RA. Is the mdrl gene relevant in chronic lymphoblastic leukemia? *Leukemia.* 1990 Mar ; 4(3) : 216-8.
20. Weide R, Dowding C, Paulsen W, Goldman J. The role of the MDR1 / P-170 mechanism in the development of multidrug resistance in chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 1990 Oct ; 4(10) : 695-9.