

## القای مرگ سلولی برنامه ریزی شده توسط آنتی بادی منوکلونال علیه CD44 تقویت شده با «اسید رتینوئیک» و فرمیل ایندول کاربازول در سلول های بیماران مبتلا به لوسمی پرومیلوسیتی حاد

- امیر امان زاده<sup>۱</sup>، وحید ملا کاظمی<sup>۱</sup>، مهدی حبیبی انبوهی<sup>۱</sup>،  
کیهان آزادمنش<sup>۲</sup>، سید اسداله موسوی<sup>۳</sup>، محسن ابوالحسنی<sup>۴</sup>، محمدعلی شکرگزار<sup>۱\*</sup>
۱. بانک سلولی ایران، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
  ۲. گروه ویروس شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
  ۳. مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان دکتر شریعتی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
  ۴. گروه ایمنی شناسی، آزمایشگاه هیبریدوما، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

### چکیده

**سابقه و هدف:** هدف از این بررسی، تقویت اثر سینرژیک ترکیب دوتایی RA-FICZ به واسطه افزودن آنتی بادی منوکلونال علیه CD44 در تمایز و آپوپتوز سلول های میلوئیدی بیماران بود.

**مواد و روش ها:** برای تیمار، غلظت های ۵ تا ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر از آنتی بادی علیه CD44 تهیه و همراه با غلظت ثابتی از RA-FICZ به پرومیلوسیت های جدا شده ۳ بیمار اضافه شد. غلظت اپتیوم آنتی بادی تعیین و بیان CD11b و CD14 و آپوپتوز با فلوسیتومتری بررسی شدند.

**یافته ها:** افزودن غلظت های مختلف آنتی بادی منوکلونال ضد CD44 باعث ارتقای توان تمایزی ترکیب RA-FICZ، بلوغ بیش تر پرومیلوسیت ها و افزایش بیان آنتی ژن های CD14 و CD11b تا بیش از ۲ برابر مشاهده شد. جمعیت سلول های آپوپتوز شده نیز تا ۶۶ درصد افزایش داشتند.

**نتیجه گیری:** این احتمال وجود دارد که با کار بر روی مدل های حیوانی و حتی بالینی، داروهای شیمی درمانی حذف و یا مصرف شان کاهش یافته و سبب شود تا ترکیب سه تایی فوق در آینده به عنوان کاندیدی مؤثر در درمان تمایزی بیماران لوسمی پرومیلوسیتی حاد پیشنهاد شود.

**واژه های کلیدی:** لوسمی پرومیلوسیتی حاد، آنتی بادی منوکلونال ویژه CD44، اسید رتینوئیک، فرمیل ایندول کاربازول، مرگ برنامه ریزی شده، سینرژیستی

### مقدمه

امروزه سرطان یکی از مهم ترین عوامل مرگ و میر در سراسر

جهان به شمار می رود با وجود بررسی و موفقیت های بسیار هنوز هم اصلی ترین دغدغه حوزه سلامت در قرن حاضر محسوب می شود. سرطان خون یا لوسمی، به علت توقف در تمایز سلول های خونی به وجود می آید که حاصل آن تجمع سلول های نابالغی به نام بلاست است. تشخیص اولیه لوسمی با مشاهده بیش از ۲۰ درصدی سلول های پیش ساز نابالغ در خون محیطی و یا مغز استخوان تأیید می شود. در سال گذشته طبق آمار منتشر شده از سازمان جهانی بهداشت از نظر

نویسنده مسئول:

بانک سلولی ایران، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران  
آدرس الکترونیکی: Shokrgozar1967@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۲/۱

<sup>1</sup> WHO

دانشمندان در چند دهه اخیر، در خصوص درمان های هدفمند و ترکیبی این لوسمی تمایزپذیر به نتایج خوبی دست یافته اند. حتی برخی از این روش های درمانی مانند تمایزدرمانی مدتی است که برای حصول به نتیجه مطلوب و با سمیت کم تر به - عنوان درمان مکمل شیمی درمانی به تدریج متداول شده است. در طی ۴ دهه گذشته، درمان هدفمند بیماران فوق با اسیدرتینوئیک (RA) و آرسنیک تری اکسید، منجر به بهبودی کامل بیش از ۹۰ درصدی و زنده ماندن بین ۸۶ الی ۹۷ درصد بیماران APL شده است (۲۲، ۱۶، ۱۱، ۳).

از این رو از اواخر قرن بیستم تمایزدرمانی به عنوان یک استراتژی مؤثر، جایگاه ویژه ای را به خود اختصاص داده و توجه بسیاری از پزشکان را به خود جلب نموده است (۲۰). گزارش ها نشان دادند که در سال های اخیر، RA همواره به - عنوان مؤثرترین عامل القا کننده در مراحل درمانی بوده و استفاده از آن می تواند به نحو مطلوبی به تمایز ترمینال پرومیلوسیت ها منجر شود. در اواخر قرن بیستم، گزارش هایی مبنی بر این که RA به تنهایی، توانایی از بین بردن سلول های بدخیم را نداشته و به منظور رسیدن به بهبودی کامل، همراه با داروهای شیمی درمانی مانند آرسنیک تری اکسید و یا به صورت ترکیبی با عوامل القا کننده نظیر سابتوکاین ها به کار گرفته می شود، منتشر شد (۲۳، ۴).

گزارش های قبلی نشان دادند که استفاده از آنتی بادی های منوکلونال بر روی سلول های استخراج شده بیماران APL موجب بلوغ و قرار گرفتن سلول ها در مسیر تمایز شده و منجر به کاهش عود بیماری گردیده اند (۷، ۳۰، ۱۴).

در سال ۲۰۱۳ طی گزارشی اعلام شد که ماده ای به نام فرمیل - ایندول کاربازول یا FICZ<sup>۱</sup> که در بدن نیز یافت می شود، پتانسیل افزایش خواص تمایزی RA را داراست و با میل ترکیبی بالایی با لیگاند اندوژنی رسپتور آریل هیدروکربن قادر به اعمال تغییر مثبت در سیگنالینگ سلولی و افزایش تمایز سلول های میلوئیدی است (۵).

CD44، آنتی ژن سطحی سلولی است که در مراحل گرانولوپوئیز و ایجاد سلول های پیش ساز سلول های خونی مؤثر بوده و نقش مهم آن در بروز متاستاز و عود لوسمی این مارکر را از سایر آنتی ژن متمایز می نماید. تاکنون برای درمان هدفمند در APL، آنتی بادی های منوکلونال مختلفی از جمله

شیوع حدود ۳۰٪ و از نظر مرگ و میر ۴۳٪ لوسمی ها را در آمریکا، لوسمی میلوئیدی حاد AML<sup>۲</sup> به خود اختصاص داده است. طبق آخرین آمار منتشر شده، در ایران، لوسمی بین پنج سرطان شایع در ایران قرار گرفته است و بیشترین شیوع بیماری نیز در استان اردبیل اعلام شده است (۹، ۱۸).

لوسمی پرومیلوسیتی حاد یا AML-M3<sup>۳</sup>، با توقف در مسیر بلوغ سلول های خونی در دومین مرحله تمایز گرانولوسیتی و تجمع نامتعارف سلول های به نام پرومیلوسیت ایجاد می - شود. سلول های جهش یافته فوق، قادر در بلوغ ناتوان بوده ولی دارای خاصیت خود بازسازی بوده و سرعت تکثیر فوق العاده ای نیز دارند. در بیش از ۹۵٪ بیماران APL<sup>۴</sup>، ترانس لوکیشن در کروموزوم ۱۵ با گیرنده آلفای اسیدرتینوئیک<sup>۵</sup> از کروموزوم ۱۷ اتفاق می افتد و منجر به ایجاد کمپلکس انکوژنی به نام<sup>۶</sup> PML-RAR می شود که نقش کلیدی در پاتوژنز بیماری دارد (۲۱، ۲۰، ۱۳).

امروزه به رغم پیشرفت های انجام شده هنوز هم شیمی درمانی با استفاده از ترکیب های آرسنیک و شیمیایی با سمیت بالا و اثرهای جانبی گسترده در درمان مبتلایان به لوسمی به کار گرفته می شود. ترکیب های مانند سدیم بوتیرات، آرسنیک تری - اکسید<sup>۷</sup>، دی متیل سولفوکساید<sup>۸</sup>، تترادوکانوئیل فوربل استات<sup>۹</sup> هنوز هم در آزمایشگاه و در بالین کماکان متداول است و ناکامی در مونوتراپی با شیمی درمانی و عدم بهبودی کامل مبتلایان لوسمی به واسطه خروج مهاجرت سلول های بنیادی لوسمی و استقرار آن ها در شکاف های استخوان بوده که منجر به عدم تأثیرگذاری داروها است (۳۱، ۲۶، ۱۲).

در سال های اخیر و به منظور کمک به بهبودی کامل و افزایش طول عمر بیماران روش های درمانی هدفمند مختلفی طراحی و پیشنهاد شدند. در درمان های هدفمند، تمایز درمانی<sup>۹</sup> و ایمونوتراپی و استفاده از آنتی بادی های منوکلونال نیز مطرح و به علت نتایج عملکرد قابل قبول مواردی از آن ها نیز مصارف کلینیکی پیدا کردند (۸، ۱۱، ۳۲).

<sup>2</sup> Acute myeloid leukemia

<sup>3</sup> Acute promyelocytic leukemia

<sup>4</sup> RAR $\alpha$

<sup>5</sup> Promyelocytic Leukemia-Retinoic Acid Receptor Alpha

<sup>6</sup> ATO

<sup>7</sup> DMSO

<sup>8</sup> TPA

<sup>9</sup> Differentiation therapy

<sup>1</sup> Retinoic acid-RA <sup>0</sup>

<sup>1</sup> 6-formylindolo[3,2-b]carbazole

مغز استخوان به صورت استریل و با رعایت کامل اصول مصوب کمیته اخلاق پزشکی انستیتو پاستور ایران به لوله های دارای EDTA منتقل شد. بعد از رقیق کردن با PBS<sup>۱۵</sup> جداسازی سلول های تک هسته ای خون محیطی PBMC<sup>۱۶</sup> با استفاده از محلول فایکول (Pharmacia) ( $\rho = 1/0.77 \text{ g/mL}$ ) و بر اساس گرادپان چگالی و برای مدت ۲۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰g سانتریفوژ و سلول های تک هسته ای موردنظر در بالای فایکول قرار گرفته و با آهستگی برداشته و در دو مرحله شستشو سپس با استفاده از لام نوبار و تریپان بلو شمارش شدند (۳۰).

### تعیین غلظت اپتیموم آنتی بادی

پس از جداسازی سلول های بیماران و برای تعیین مؤثرترین غلظت آنتی بادی در افزایش توانایی تمایز "RA-FICZ"، به-عنوان گروه کنترل و به طور همزمان غلظت های آنتی بادی (A3D8) (Sigma) از ۵ تا ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر تهیه و به ترتیب RA-FICZ افزوده شد. بعد از گذشت ۵ روز تیمار، بیان مارکرهای بلوغ نوتروفیلی در سلول های میلوئیدی زمان با گروه کنترل توسط فلوسایتومتری سنجیده شد. این مرحله، با استفاده از آنتی بادی های منوکلونال علیه CD11b و CD14 هر دو مزدوج شده به فیکواریترین انجام شد. هر آزمون سه بار تکرار گردید.

### تیمار سلول های بیماران

تعداد یک میلیون سلول به هر یک از چاهک های پلیت محیط کشت RPMI 1640 دارای گلوتامکس<sup>۱۷</sup> ۱۰۰IU/ml پنی-سیلین، ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر ( $\mu\text{g/ml}$ ) استرپتومایسین، ۱۵ میلی مولار HEPES به عنوان بافر و پس از افزودن سرم دکمپلمانه شده جنین گوساله FBS<sup>۱۸</sup> (GIBCO BRL) به میزان ۱۰٪، یک روز قبل از تیمار، سلول ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد حاوی ۵٪ گاز دی اکسید کربن ( $\text{CO}_2$ ) و در رطوبت ۹۵٪ کشت قرار داده شدند. هر یک از عوامل القا کننده تمایز، ابتدا در حلال اختصاصی شان محلول و سپس با غلظت نهایی ذیل در محیط کشت حل و در شرایط استریل به سلول ها

بر ضد آنتی ژن CD44 تولید شده اند. آنتی بادی علیه CD44 ( $\alpha$ -CD44 mAb) با ایجاد کمترین تحریک و سمیتی، مسیر بلوک شده تمایز را برگشت داده و موجب القای تمایز ترمینال، افزایش آپوپتوز و در نهایت باعث حذف LSC می گردد (۶، ۱۹). بررسی های بسیاری در خصوص استفاده از آنتی بادی منوکلونال علیه CD44 انسانی به-تنهایی و یا همراه با RA و تأثیر مثبتی که در القای تمایز سلول های APL، آپوپتوز، متاستاز و کنترل مهاجرت<sup>۱۹</sup> منتشر گردیده است (۱۴، ۱۵، ۲۴، ۲۷، ۲۸).

خوشبختانه، درمان تمایزی با استفاده از RA با پیش آگهی موفقیت آمیزی همراه بود و تلاش ها جهت شناسایی و بررسی عوامل با پتانسیل مشابه جهت ارتقا عملکرد تمایزدهندگی اسید رتینوئیک همچنان ادامه دارد. لازم به ذکر است که در ادامه مسیر بلوغ و تمایز سلول ها قادر به بیان آنتی ژن CD11b را در مراحل میلوئوسیت، تمامیلوسیت، باند و مرحله بلوغ نهایی نوتروفیلی هستند، در حالی که در خصوص آنتی ژن سطحی CD14، سلول ها در مرحله تمایز ترمینال و با بلوغ کامل آن را بیان می کنند. در واقع، آنتی ژن های مورد مطالعه فقط در مرحله بلوغ سلول ها بیان شده و پرومیلوسیت ها قادر به بیان CD14 و CD11b نبوده و دو مارکر فوق نیز به همین دلیل انتخاب شدند (۱۰، ۱۷، ۲۹).

در این تحقیق، برای نخستین بار تأثیر استفاده همزمان آنتی-بادی علیه CD44 انسانی، FICZ و RA به عنوان سه عامل مؤثر در القای تمایز نهایی<sup>۱۴</sup> و آپوپتوز بر روی سلول های تک هسته ای خون محیطی بیماران مبتلا به لوسمی پرومیلوسیتی حاد بررسی گردید.

### مواد و روش ها

#### جداسازی سلول های تک هسته ای خون محیطی

از میان بیماران مراجعه کننده به مرکز تحقیقات هماتولوژی، آنکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان دکتر شریعتی دانشگاه علوم پزشکی تهران، ۳ بیمار مرد در محدوده سنی ۳۰-۲۵ سال انتخاب و در نخستین مرحله تشخیص و پیش از اقدام های درمانی انتخاب شدند، سپس ۲ میلی لیتر نمونه از

<sup>1</sup> Phosphate buffer solution <sup>5</sup>

<sup>1</sup> Peripheral Blood Mononuclear Cell

<sup>1</sup> GlutaMAX <sup>7</sup>

<sup>1</sup> Fetal Bovine Serum <sup>8</sup>

<sup>1</sup> anti-CD44 monoclonal antibody (mAb)

<sup>1</sup> Homing <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Terminal differentiation <sup>4</sup>

اختصاصی برای شناسایی سلول‌های آپوپتوز و نکروتیک طراحی شده مطابق پروتکل شرکت تولیدکننده استفاده گردید. ابتدا، ۵۰۰/۰۰۰ سلول تحت درمان شستشو شده و سپس در بافر اتصال (Binding buffer) شناور و رنگ‌های FITC-V و 7-AAD اضافه و برای مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی و دمای ۲۵ درجه انکوباسیون شدند. در خاتمه فراوانی سلول‌ها در مراحل اولیه<sup>۲</sup> و انتهایی<sup>۲۳</sup> آپوپتوز نمونه‌های تحت تیمار نسبت به گروه کنترل RA-FICZ و سلول‌های تیمار نشده توسط دستگاه FACS Calibur مشخص گردید. لازم به ذکر است که هر آزمایش حداقل سه بار تکرار و در خاتمه نتایج با نرم‌افزار FlowMax تحلیل شدند.

### تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار GraphPad (Prism 6 software Inc, La Jolla, CA, USA -version 6.07) انجام شد. میانگین گروه‌های مورد بررسی، با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه One-way ANOVA و با آزمون post-hoc بونفرونی مورد ارزیابی قرار گرفتند. در تمامی آنالیزهای آماری، تفاوت بین گروه‌ها و  $p \leq 0.05$  از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

### نتایج

#### تعیین غلظت مؤثر آنتی بادی:

ابتدا دوز ایتیموم آنتی‌بادی منوکلونال علیه CD44 انسانی با استفاده از سنجش پروتئین سطحی CD14 و CD11b بر روی سلول‌ها تعیین گردید. نتایج به‌دست آمده از اثر بخشی آنتی-بادی CD44 با دو مارکر مورد نظر از غلظت ۲/۵ تا ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر حکایت داشتند. بیش‌ترین بیان هر دو مارکر بلوغ، توسط پرومیلوسیت‌های تیمار و تمایز یافته بیماران با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی-لیتر از آنتی‌بادی ضد CD44 در کنار ترکیب RA-FICZ به-عنوان کنترل ثبت شد (شکل ۱).

افزوده شدند و به مدت ۵ روز در انکوباتور با شرایطی قبلی قرار داده شدند.

RA: با غلظت ۱ میکرومول در میلی‌لیتر (Sigma)، محلول در اتانل در شرایط تاریک (۲).  
 FICZ: با غلظت ۱۰۰ نانومول در میلی‌لیتر (Abcam) محلول در دی‌متیل‌سولفوکسید (۶).  
 آنتی‌بادی منوکلونال ضد CD44 (Sigma) با غلظت ۵، ۱۰، ۲۰ و ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر (۲۸).  
 چاهک‌های حاوی سلول بیماران فاقد هرگونه تیمار به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد.

### بررسی تمایز سلولی

برای بررسی تمایز ناشی از افزودن آنتی بادی منوکلونال ضد CD44، از آنتی بادی‌های منوکلونال علیه آنتی‌ژن‌های CD11b (BioLegend) و CD14 (BioLegend) کنژوگه شده به فلورسین ایزوتیوسیانات-<sup>۱۹</sup>FITC (BioLegend) و فیکواریترین<sup>۲۰</sup> جمعیت سلول‌های CD11b<sup>+</sup> و CD14<sup>+</sup> تعیین شد. از آنتی‌بادی موشی IgG1 متصل به FITC و PE به‌عنوان یک کنترل منفی استفاده شد.

به‌طور خلاصه، به‌منظور بررسی تأثیرگذاری عوامل القا کننده، تعداد ۵۰۰،۰۰۰ سلول شمارش و پس از افزودن آنتی‌بادی‌های فوق، به‌مدت یک ساعت در دمای ۴ درجه انکوباسیون شدند و به موازات استفاده از کنترل ایزوتایپ موشی به‌عنوان کنترل منفی، اندازه‌گیری آنتی‌ژن‌های سطحی با استفاده از دستگاه FACS Calibur (Partec, Germany) صورت پذیرفت (۲۹).

در خاتمه نیز داده‌ها با نرم‌افزار FlowMax تجزیه و تحلیل شدند. برای حصول اطمینان مرحله مذکور سه بار تکرار و میانگین تعیین گردید.

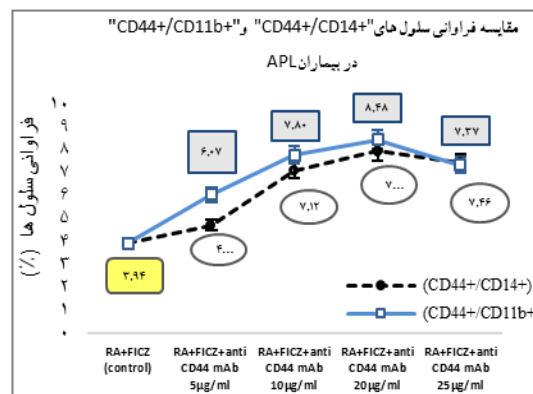
### بررسی القای آپوپتوز

برای اطمینان از تمایز ترمینال و بلوغ در پرومیلوسیت‌ها، فراوانی سلول‌های آپوپتوتیک بررسی شد. برای این منظور از کیت تشخیصی آپوپتوز آنکسین متصل به فلورسین ایزوتیوسیانات<sup>۲۱</sup> (Biolegend) که به‌صورت

<sup>۱</sup> Fluorescein isothiocyanate <sup>۹</sup>  
<sup>۲</sup> Phycoerythrin <sup>۰</sup>  
<sup>۲</sup> amino-actinomycin D (FITC<sup>۱</sup>Annexin-V7-AAD)

<sup>۲</sup> early apoptosis <sup>۲</sup>  
<sup>۲</sup> late apoptosi <sup>۳</sup>

در خصوص بیان هر دو آنتی ژن سطحی، در غلظت های بالاتر از ۵ میکروگرم در میلی لیتر از آنتی بادی، القای تمایز و بلوغ سلولی بیماران افزایش بیش تری را نشان دادند که تفاوت ها در خصوص آنتی ژن CD11b نسبت به CD14 بارزتر بود. تفاوت در پتانسیل القای تمایز در برخی غلظت ها نسبت به گروه کنترل از نظر آماری معنی دار بودند. برترین اثر سینرژیستی در تیمار با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر از آنتی بادی مونوکلونال در کنار کمپلکس RA-FICZ دیده شد. نتایج این مقایسه در نمودار زیر نشان داده شده است. (شکل ۲)



شکل ۱- مقایسه بیان آنتی ژن های سطحی CD14 و CD11b پس از تیمار سلول های بیماران APL با RA-FICZ در غلظت ثابت همراه با غلظت های متفاوت آنتی بادی مونوکلونال علیه CD44

### آپوپتوز سلول های میلوئیدی

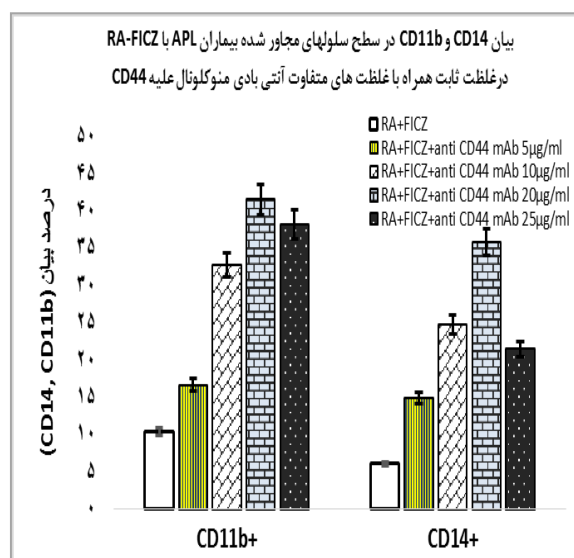
سلول های آنکسین مثبت/7-AAD منفی در مرحله اولیه آپوپتوز و سلول های آنکسین مثبت/7-AAD مثبت، در مرحله انتهایی آپوپتوز در نظر گرفته شدند جمعیت سلول های آپوپتوتیک تحت درمان با ترکیب سه تایی واجد آنتی بادی مونوکلونال ضد CD44، در تمامی موارد افزایش نشان دادند. این افزایش از ۲/۵ برابر در آپوپتوز اولیه تا ۱۳/۵ برابر آپوپتوز مرحله انتهایی نسبت به گروه کنترل تحت تیمار با ترکیب (RA-FICZ) را نشان دادند. بیشترین مقدار در تیمار با غلظت ۲۰ میکروگرم آنتی بادی مونوکلونال ضد CD44 مشاهده شد. آزمون برای هر بیمار سه بار انجام شد. (شکل ۳)

### بحث

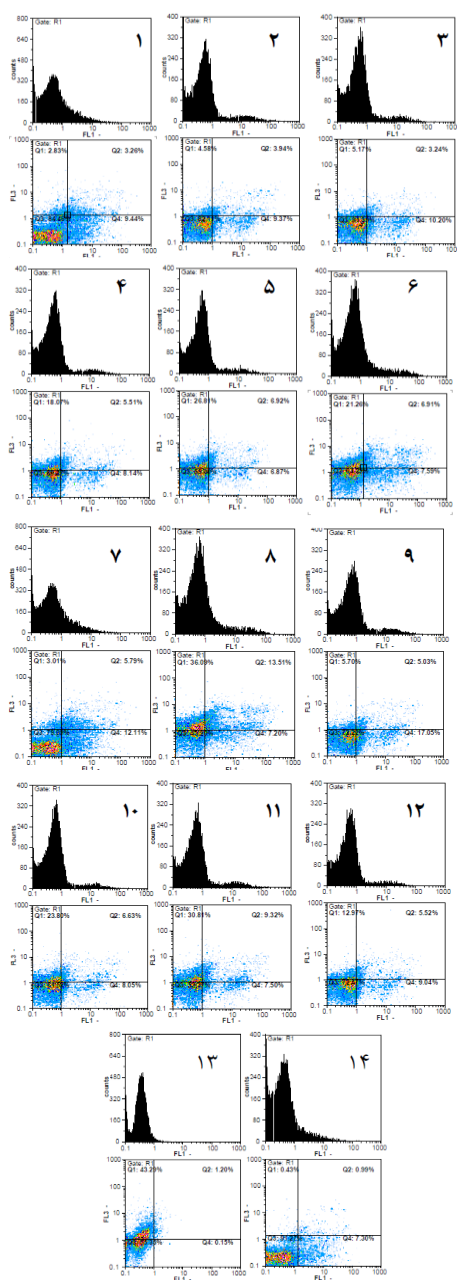
تحقیق های انجام شده گذشته، نقش کلیدی آنتی بادی مونوکلونال ضد CD44 را در کنترل پیشرفت بیماری که به واسطه القای تمایز سبب حذف سلول های بنیادی لوسمی در بیماران APL را اثبات نموده اند (۱، ۷، ۱۴، ۱۵، ۱۹). از سویی دیگر در درمان این گروه از بیماران، اسیدرتینوئیک به عنوان پیش تاز در «تمایز درمانی» خوش درخشیده است و حتی مدت هاست که کاربرد بالینی پیدا کرده است (۳، ۱۶، ۲۰، ۲۵، ۲۶).

### القای تمایز در سلول های بیماران مبتلا به APL

با مقایسه اثر سینرژیستی عوامل القاکننده تمایز، با حضور آنتی بادی مونوکلونال در کنار کمپلکس دوتایی RA-FICZ تفاوتی در بیان دو مارکر مورد مطالعه نسبت به گروه کنترل (RA-FICZ) مشاهده شد و در برخی از غلظت ها این تفاوت از نظر آماری معنی دار بودند. افزودن غلظت های ۵ الی ۲۵ میلی گرم در میلی لیتر از آنتی بادی مونوکلونال ضد CD44 انسانی باعث ارتقای توان تمایزی ترکیب دوتایی RA-FICZ گردید.



شکل ۲- نمودار مقایسه بیان CD11b+ و CD14+ در سلول های بیماران مبتلا به لوسمی پرومیلوسیتی حاد پس از تیمار با RA-FICZ و ترکیب سه تایی "α-CD44 mAb+RA-FICZ"



شکل ۳- آپوپتوز در سلول‌های بیماران پس از تیمار ۵ روزه با غلظت‌های متفاوت آنتی‌بادی منوکلونال ویژه CD44 در ترکیب سه‌تایی همراه با RA-FICZ در غلظت‌های ثابت. شماره ۱-۳: غلظت ۵  $\mu\text{g/ml}$  آنتی‌بادی منوکلونال ضد CD44، شماره ۴-۶: غلظت ۱۰  $\mu\text{g/ml}$  آنتی‌بادی منوکلونال ضد CD44، شماره ۷-۹: غلظت ۲۰  $\mu\text{g/ml}$  آنتی‌بادی منوکلونال ضد CD44، شماره ۱۰-۱۲: غلظت ۲۵  $\mu\text{g/ml}$  آنتی‌بادی منوکلونال ضد CD44، شماره ۱۳- کنترل (تیمار نشده) و شماره ۱۴- RA-FICZ.

سلول‌های تیمار شده بیماران از نظر آپوپتوز نیز ارزیابی شدند تا تمایز ترمینال ناشی از تیمار تأیید شوند. افزایش مرگ

گزارش‌های قبلی، کمپلکس دوتایی RA-FICZ به‌عنوان دو القاکننده موفق با اثر هم‌افزایی مثبت در «درمان تمایزی ترکیبی» اعلام نموده‌اند به‌همین دلیل در این تحقیق از ترکیب دوتایی "RA-FICZ" به‌عنوان کنترل استفاده شد و با اضافه شدن آنتی‌بادی فوق عدم و یا بروز اثر سینرژیستی «ترکیب سه تایی جدید» مورد ارزیابی قرار گرفت (۵، ۲۵). در این مطالعه برای نخستین بار، اثر سینرژیستی القای تمایز و آپوپتوز بر روی سلول‌های جدا شده از بیماران APL به واسطه افزودن «آنتی‌بادی منوکلونال ضد CD44» به ترکیب RA-FICZ مورد بررسی قرار گرفت.

در مرحله بعد، برای تعیین مؤثرترین غلظت از آنتی‌بادی منوکلونال ضد CD44 در القا نمودن تمایز سلول‌های جدا شده از بیماران APL، طیفی از غلظت‌ها از آنتی‌بادی تهیه و به "RA-FICZ" با غلظت ثابت مشخص اضافه گردید. بررسی وضعیت بلوغ پرومیلوسیت‌ها و سنجش دو مارکر نوتروفیلی CD11b و CD14 نشان داد که با تیمار با ترکیب سه تایی این مطالعه، بین بیان هر دو مارکر مذکور و غلظت آنتی‌بادی رابطه خطی بالا رونده‌ای (تا غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) وجود دارد.

در مرحله بعدی، با استفاده از رنگ‌آمیزی دوتایی، درصد سلول‌های CD44+/CD11b+ و CD44+/CD14+ تحت بررسی قرار گرفت و فراوانی سلول‌هایی که تمایز یافته و بودند، مشخص شد. نتایج تأیید نمودند که همراهی  $\alpha\text{-CD44 mAb}$  با "RA-FICZ" به‌صورت سینرژیستی، توان القای تمایز ترکیب "RA-FICZ" را افزایش و جمعیت بیشتری از سلول‌های نابالغ را در مسیر بلوغ طبیعی قرار می‌دهد. درخصوص مارکر CD11b و با افزودن ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از آنتی‌بادی به «ترکیب دوتایی» بررسی‌ها، تا دو برابر افزایش در تمایز پرومیلوسیت‌های تحت تیمار را نشان دادند که قابل توجه است. به‌همین صورت در خصوص مارکر CD14، با اضافه نمودن دوز اپتیموم آنتی‌بادی به ترکیب "RA-FICZ" توان تمایز نسبت به گروه کنترل حتی بیش از ۲ برابر ارتقاء یافت. افزایش در بیان هر دو آنتی‌ژن نسبت به گروه کنترل با غلظت اپتیموم آنتی‌بادی، از نظر آماری نیز معنی‌دار بودند. افزایش جمعیت سلول‌های آپوپتوتیک نیز در گروه‌های تحت تیمار به مقدار چشم‌گیری افزایش یافت، به‌صورتی که در خصوص آپوپتوز اولیه تا ۶۶٪ و در مجموع دو آپوپتوز اولیه و انتهایی رشدی معادل ۱۴۴٪ مشاهده شد.

وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی نیز پروژه مذکور را مورد حمایت مالی خود قرار داد. بدین وسیله از مساعدت های پرسنل بانک سلولی ایران به ویژه خانم ها طاهره بیرامی و مرضیه مکرمی، همچنین همکاران گروه ویروس شناسی انستیتو پاستور ایران و پرسنل مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان دکتر شریعتی برای همکاری صمیمانه شان سپاسگزاری می شود.

برنامه ریزی سلول های تحت تیمار، القای تمایز ترمینال، بلوغ کامل و بروز اثرهای «سینرژیستی» ناشی از استفاده هم زمان از سه القا کننده به صورت ترکیبی را در کنار هم تأیید نمود.

## نتیجه گیری

همراهی آنتی بادی ضد CD44 در کنار ترکیب دوتایی RA-FICZ، حائز اهمیت است چرا که آنتی بادی با مکانیسمی هدفمند باعث القای تمایز و بروز آپوپتوز شده و این تأثیرگذاری را با حداقل عوارض جانبی و سمیت سبب می شود. به عبارتی مشابه آن چه که در بدن در حالت سلامت اتفاق می افتد، این ترکیب، منجر به هدایت پرومیلوسیت ها به مسیر طبیعی بلوغ و سپس مرگ برنامه ریزی شده و حذف سلول های LSC را سبب می گردد و بدین گونه ترکیب فوق، در درمان این نوع لوسمی مؤثرتر عمل می کند. در سال های اخیر، روش «درمان تمایزی» و بهره گیری از ترکیب های غیرشیمیایی مکمل همراه و یا پس از شیمی درمانی رایج شده است و اثر مطلوب و طولانی مدت ترکیب های القا کننده و عدم ایجاد سمیت در بیماران APL، توجه زیادی را معطوف خود نموده است. از این رو هنوز هم محققان برای افزایش طول عمر، بهبودی کامل ۲۴٪ کاهش عوارض جانبی و احتمال بازگشت بیماری در حال تلاش گسترده هستند.

نتایج این تحقیق نشان می دهد که افزودن  $\alpha$ -CD44 mAb به ترکیب "RA-FICZ" می تواند به صورت اختصاصی و هدفمند موجب تمایز و حذف سلول های LSC شود. بدیهی است با مطالعه بر روی نمونه های بیش تر و حتی در بالین بیماران مکمل با «ترکیب سه تایی» مورد مطالعه این امکان میسر شود تا گام هایی مؤثرتر در حوزه درمان های هدفمند مولکولی برداشته شود. بدون شک بررسی و تمرکز بیش تر بر درمان تمایزی این بیماری و حتی سایر انواع لوسمی یک ضرورت بوده و شاید بتواند در آینده نیاز به شیمی درمانی اولیه را تا حد قابل توجهی کاهش و حتی به صورت کامل رفع و روزنه امیدی در ارتقای کیفیت زندگی بیماران و منسوخ شدن روش های سنتی گشوده شود.

## سپاسگزاری

این مقاله نتیجه بخشی از پایان نامه دکتری تخصصی (Ph.D) است که هزینه آن توسط اداره آموزش انستیتو پاستور ایران پشتیبانی و تأمین شد. همچنین معاونت تحقیقات و فن آوری،

## منابع:

1. Amanzadeh, A., Heidarnejad, F., Abdollahpour-Alitappeh, M., Kazemiha, V. M., Yari, S., Tasbiti, A. R., Anbouhi, M. H., Abolhassani, M. & Shokrgozar, M. A., Development Of High-Affinity Monoclonal Antibody Using Cd44 Overexpressed Cells As A Candidate For Targeted Immunotherapy And Diagnosis Of Acute Myeloid Leukemia. *Hum Antibodies*, 2017. 1, 7-15.
2. Barber, N., Belov, L. & Christopherson, R. I., All-Trans Retinoic Acid Induces Different Immunophenotypic Changes On Human HL60 And NB4 Myeloid Leukaemias. *Leuk Res*, 2008. 32, 315-22.
3. Brandwein, J. M., Zhu, N., Kumar, R., Leber, B., Sabloff, M., Sandhu, I., Kassis, J., Olney, H. J., Elemery, M. & Schuh, A. C., Treatment Of Older Patients With Acute Myeloid Leukemia (Aml): Revised Canadian Consensus Guidelines. *Am J Blood Res*, 2017. 7, 30-40.
4. Bruserud, O. & Gjertsen, B. T., New Strategies For The Treatment Of Acute Myelogenous Leukemia: Differentiation Induction--Present Use And Future Possibilities. *Stem Cells*, 2000. 18, 157-65.
5. Bunaciu, R. P., Jensen, H. A., Macdonald, R. J., Latocha, D. H., Varner, J. D. & Yen, A., 6-Formylindolo(3,2-B)Carbazole (FICZ) Modulates The Signalsome Responsible For Ra-Induced Differentiation Of HL-60 Myeloblastic Leukemia Cells. *Plos One*, 2015. 10, E0135668.
6. Bunaciu, R. P. & Yen, A., 6-Formylindolo (3,2-B)Carbazole (Ficz) Enhances Retinoic Acid (Ra)-Induced Differentiation Of HL-60 Myeloblastic Leukemia Cells. *Mol Cancer*, 2013. 12, 39.
7. Charrad, R. S., Gadhoun, Z., Qi, J., Glachant, A., Allouche, M., Jasmin, C., Chomienne, C. & Smadja-Joffe, F., Effects Of Anti-Cd44 Monoclonal Antibodies On Differentiation And Apoptosis Of Human Myeloid Leukemia Cell Lines. *Blood*, 2002. 99, 290-9.
8. Chen, S. J. & Zhou, G. B., Targeted Therapy: The New Lease On Life For Acute Promyelocytic Leukemia, And Beyond. *Iubmb Life*, 2012. 64, 671-5.
9. Dastgiri, S., Fozounkhah, S., Shokrgozar, S., Taghavinia, M. & Asvadi Kermani, A., Incidence Of Leukemia In The Northwest Of Iran. *Health Promot Perspect*, 2011. 1, 50-3.
10. Davey, F. R., Erber, W. N., Gatter, K. C. & Mason, D. Y., Immunophenotyping Of Acute Myeloid Leukemia By Immuno-Alkaline Phosphatase (Apaap) Labeling With A Panel Of Antibodies. *Am J Hematol*, 1987. 26, 157-66.
11. De The, H., Differentiation Therapy Revisited. *Nat Rev Cancer*, 2018. 18, 117-127.
12. De The, H., Pandolfi, P. P. & Chen, Z., Acute Promyelocytic Leukemia: A Paradigm For Oncoprotein-Targeted Cure. *Cancer Cell*, 2017. 32, 552-560.
13. Dong, S., Geng, J. P., Tong, J. H., Wu, Y., Cai, J. R., Sun, G. L., Chen, S. R., Wang, Z. Y., Larsen, C. J., Berger, R. & Et Al., Breakpoint Clusters Of The Pml Gene In Acute Promyelocytic Leukemia: Primary Structure Of The Reciprocal Products Of The Pml-Rara Gene In A Patient With T(15;17). *Genes Chromosomes Cancer*, 1993. 6, 133-9.
14. Gadhoun, Z., Delaunay, J., Maquarre, E., Durand, L., Lancereaux, V., Qi, J., Robert-Lezenes, J., Chomienne, C. & Smadja-Joffe, F., The Effect Of Anti-Cd44 Monoclonal Antibodies On Differentiation And Proliferation Of Human Acute Myeloid Leukemia Cells. *Leuk Lymphoma*, 2004. 45, 1501-10.
15. Gadhoun, Z., Leibovitch, M. P., Qi, J., Dumenil, D., Durand, L., Leibovitch, S. & Smadja-Joffe, F., Cd44: A New Means To Inhibit Acute Myeloid Leukemia Cell Proliferation Via P27kip1. *Blood*, 2004. 103, 1059-68.
16. Ghavamzadeh, A., Jalili, M., Rostami, S., Yaghmaie, M., Aliabadi, L. S., Mousavi, S. A., Vaezi, M., Fumani, H. K., Jahani, M. & Alimoghaddam, K., Comparison Of Induction Therapy In Non-High Risk Acute Promyelocytic Leukemia With Arsenic Trioxide Or In Combination With Atra. *Leuk Res*, 2018. 66, 85-88.

17. Gorczyca, W., Sun, Z. Y., Cronin, W., Li, X., Mau, S. & Tugulea, S., Immunophenotypic Pattern Of Myeloid Populations By Flow Cytometry Analysis. *Methods Cell Biol*, 2011. 103, 221-66.
18. Howlander, N., Noone, A., Krapcho, M., Neyman, N., Aminou, R., Altekruse, S., Kosary, C., Ruhl, J., Tatalovich, Z. & Cho, H., Seer Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations), National Cancer Institute. Bethesda, Md. *Md, Usa*, 2012.
19. Jin, L., Hope, K. J., Zhai, Q., Smadja-Joffe, F. & Dick, J. E., Targeting Of Cd44 Eradicates Human Acute Myeloid Leukemic Stem Cells. *Nat Med*, 2006. 12, 1167-74.
20. Jurcic, J. G., Soignet, S. L. & Maslak, A. P., Diagnosis And Treatment Of Acute Promyelocytic Leukemia. *Curr Oncol Rep*, 2007. 9, 337-44.
21. Kamimura, T., Miyamoto, T., Harada, M. & Akashi, K., Advances In Therapies For Acute Promyelocytic Leukemia. *Cancer Sci*, 2011. 102, 1929-37.
22. Kayser, S., Levis, M. J. & Schlenk, R. F., Midostaurin Treatment In Flt3-Mutated Acute Myeloid Leukemia And Systemic Mastocytosis. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2017. 10, 1177-1189.
23. Kojima, M., Ogiya, D., Ichiki, A., Hara, R., Amaki, J., Kawai, H., Numata, H., Sato, A., Miyamoto, M., Suzuki, R., Machida, S., Matsushita, H., Ogawa, Y., Kawada, H. & Ando, K., Refractory Acute Promyelocytic Leukemia Successfully Treated With Combination Therapy Of Arsenic Trioxide And Tamibarotene: A Case Report. *Leuk Res Rep*, 2016. 5, 11-3.
24. Maquarre, E., Artus, C., Gadhoum, Z., Jasmin, C., Smadja-Joffe, F. & Robert-Lezenez, J., Cd44 Ligation Induces Apoptosis Via Caspase- And Serine Protease-Dependent Pathways In Acute Promyelocytic Leukemia Cells. *Leukemia*, 2005. 19, 2296-303.
25. Mcculloch, D., Brown, C. & Iland, H., Retinoic Acid And Arsenic Trioxide In The Treatment Of Acute Promyelocytic Leukemia: Current Perspectives. *Onco Targets Ther*, 2017. 10, 1585-1601.
26. Nowak, D., Stewart, D. & Koefler, H. P., Differentiation Therapy Of Leukemia: 3 Decades Of Development. *Blood*, 2009. 113, 3655-65.
27. Ponta, H., Sherman, L. & Herrlich, P. A., Cd44: From Adhesion Molecules To Signalling Regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. 4, 33-45.
28. Qian, H., Xia, L., Ling, P., Waxman, S. & Jing, Y., Cd44 Ligation With A3d8 Antibody Induces Apoptosis In Acute Myeloid Leukemia Cells Through Binding To Cd44s And Clustering Lipid Rafts. *Cancer Biol Ther*, 2012. 13, 1276-83.
29. Scott, C. S., Richards, S. J., Master, P. S., Kendall, J., Limbert, H. J. & Roberts, B. E., Flow Cytometric Analysis Of Membrane Cd11b, Cd11c And Cd14 Expression In Acute Myeloid Leukaemia: Relationships With Monocytic Subtypes And The Concept Of Relative Antigen Expression. *Eur J Haematol*, 1990. 44, 24-9.
30. Song, G., Liao, X., Zhou, L., Wu, L., Feng, Y. & Han, Z. C., Hi44a, An Anti-Cd44 Monoclonal Antibody, Induces Differentiation And Apoptosis Of Human Acute Myeloid Leukemia Cells. *Leuk Res*, 2004. 28, 1089-96.
31. Ying, M., Zhou, X., Zhong, L., Lin, N., Jing, H., Luo, P., Yang, X., Song, H., Yang, B. & He, Q., Bortezomib Sensitizes Human Acute Myeloid Leukemia Cells To All-Trans-Retinoic Acid-Induced Differentiation By Modifying The Raralpha/Stat1 Axis. *Mol Cancer Ther*, 2013. 12, 195-206.
32. Yu, M. G. & Zheng, H. Y., Acute Myeloid Leukemia: Advancements In Diagnosis And Treatment. *Chin Med J (Engl)*, 2017. 130, 211-218.

