مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره هشتم شماره سی و یکم - تابستان ۱۳۹۷

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

# القای مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده توسط آنتی‌بادی منوکلونال علیه CD44 تقویت شده با «اسید رتینوئیک» و فرمیل ایندول کاربازول در سلول‌های بیماران مبتلا به لوسمی پرومیلوسیتی حاد

امیر امان‌زاده[۱]، وحید ملا کاظمی‌ها[۱]، مهدی حبیبی انبوهی[۱]،
کیهان آزادمنش[۲]، سید اسداله موسوی[۳]، محسن ابوالحسنی[۴]، محمدعلی شکرگزار*[۱]

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-FICZبه‌واسطه افزودن آنتی‌بادی مونوکلونال علیه CD44 در تمایز و آپوپتوز سلول‌های میلوئیدی بیماران بود.

**مواد و روش‌ها:** برای تیمار، غلظت های ۵ تا ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از آنتی‌بادی علیه CD44 تهیه و همراه با غلظت ثابتی از RA-FICZ به پرومیلوسیت‌های جداشده ۳ بیمار اضافه شد. غلظت اپتیموم آنتی‌بادی تعیین و بیان CD11b و CD14 و آپوپتوز با فلوسیتومتری بررسی شدند.

**یافته‌ها:** افزودن غلظت‌های مختلف آنتی‌بادی مونوکلونال ضد CD44 باعث ارتقای توان تمایزی ترکیب RA-FICZ، بلوغ بیش‌تر پرومیلوسیت‌ها و افزایش بیان آنتی‌ژن‌های CD11b و CD14 تا بیش از ۲ برابر مشاهده شد. جمعیت سلول‌های آپوپتوز شده نیز تا ۶۶ درصد افزایش داشتند.

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

**واژه‌های کلیدی:** لوسمی پرومیلوسیتی حاد، آنتی‌بادی مونوکلونال ویژه CD44، اسید رتینوئیک، فرمیل ایندول کاربازول، مرگ برنامه‌ریزی‌شده، سینرژیستی

## مقدمه

امروزه سرطان یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر در سراسر جهان به شمار می‌رود با وجود بررسی و موفقیت‌های بسیار هنوز هم اصلی‌ترین دغدغه حوزه سلامت در قرن حاضر محسوب می‌شود. سرطان خون یا لوسمی، به‌علت توقف در تمایز سلول‌های خونی به‌وجود می‌آیند که حاصل آن تجمع سلول‌های نابالغی به نام بلاست است. تشخیص اولیه لوسمی با مشاهده بیش از ۲۰ درصدی سلول‌های پیش‌ساز نابالغ در خون محیطی و یا مغز استخوان تأیید می‌شود. در سال گذشته طبق آمار منتشر شده از سازمان جهانی بهداشت[1] 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

[1] WHO

[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-03-29 ]
[ DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.31.9.6 ]

شیوع حدود ۳۰٪ و از نظر مرگ و میر ۴۳٪ لوسمی‌ها را در آمریکا، لوسمی میلوئیدی حاد AML[2] 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 ، با توقف در مسیر بلوغ سلول‌های خونی در دومین مرحله تمایز گرانولوسیتی و تجمع نامتعارف سلول‌های به نام پرومیلوسیت ایجاد می‌شود. سلول‌های جهش یافته فوق، قادر در بلوغ ناتوان بوده ولی دارای خاصیت خود بازسازی بوده و سرعت تکثیر فوق‌العاده‌ای نیز دارند. در بیش از ٪۹۵ بیماران APL[3]، ترانس لوکیشن در کروموزوم ۱۵ با گیرنده آلفای اسیدرتینوئیک[4] از کروموزوم ۱۷ اتفاق می‌افتد و منجر به ایجاد کمپلکس انکوژنی به نام[5] PML-RAR می‌شود که نقش کلیدی در پاتوژنز بیماری دارد (۱۳،۲۰،۲۱).

امروزه به‌رغم پیشرفت‌های انجام شده هنوز هم شیمی‌درمانی با استفاده از ترکیب‌های آرسنیکی و شیمیایی با سمیت بالا و اثرهای جانبی گسترده در درمان مبتلایان به لوسمی به‌کار گرفته می‌شود. ترکیب‌های مانند سدیم بوتیرات، آرسنیک‌تری‌اکسید،[6] دی‌متیل سولفوکساید،[7] تترادوکانوئیل فوربل استات[8] هنوز هم در آزمایشگاه و در بالین کماکان متداول است و ناکامی در مونوتراپی با شیمی درمانی و عدم بهبودی کامل مبتلایان لوسمی به‌واسطه خروج مهاجرت سلول‌های بنیادی لوسمی و استقرار آن‌ها در شکاف‌های استخوان بوده که منجر به عدم تأثیرگذاری داروها است (۱۲،۲۶،۳۱).

در سال‌های اخیر و به‌منظور کمک به بهبودی کامل و افزایش طول عمر بیماران روش‌های درمانی هدفمند مختلفی طراحی و پیشنهاد شدند. در درمان‌های هدفمند، تمایز درمانی[9] و ایمونوتراپی و استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال نیز مطرح و به‌علت نتایج عملکرد قابل قبول مواردی از آن‌ها نیز مصارف کلینیکی پیدا کردند (۸، ۱۱، ۳۲).

دانشمندان درچند دهه اخیر، در خصوص درمان‌های هدفمند و ترکیبی این لوسمی تمایزپذیر به نتایج خوبی دست یافته‌اند. حتی برخی از این روش‌های درمانی مانند تمایزدرمانی مدتی است که برای حصول به نتیجه مطلوب و با سمیت کم‌تر به‌عنوان درمان مکمل شیمی درمانی به‌تدریج متداول شده است. در طی ۴ دهه گذشته، درمان هدفمند بیماران فوق با اسیدرتینوئیک (RA)[10] و آرسنیک‌تری‌اکسید، منجر به بهبودی کامل بیش از ۹۰ درصدی و زنده ماندن بین ۸۶ الی ۹۷ درصد بیماران APL شده است (۳،۱۱،۱۶،۲۲).

از این‌رو از اواخر قرن بیستم تمایزدرمانی به‌عنوان یک استراتژی مؤثر، جایگاه ویژه‌ای را به خود اختصاص داده و توجه بسیاری از پزشکان را به خود جلب نموده است (۲۰).

گزارش‌ها نشان دادند که در سال‌های اخیر، RA همواره به‌عنوان مؤثرترین عامل القا کننده در مراحل درمانی بوده و استفاده از آن می‌تواند به‌نحو مطلوبی به تمایز ترمینال پرومیلوسیت‌ها منجر شود. در اواخر قرن بیستم، گزارش‌هایی مبنی بر این‌که RA به تنهایی، توانایی از بین بردن سلول‌های بدخیم را نداشته و به‌منظور رسیدن به بهبودی کامل، همراه با داروهای شیمی درمانی مانند آرسنیک‌تری‌اکسید و یا به‌صورت ترکیبی با عوامل القا کننده نظیر سایتوکاین‌ها به‌کار گرفته می‌شود، منتشر شد (۴،۲۳).

گزارش‌های قبلی نشان دادند که استفاده از آنتی بادی‌های منوکلونال بر روی سلول‌های استخراج شده بیماران APL موجب بلوغ و قرار گرفتن سلول‌ها در مسیر تمایز شده و منجر به کاهش عود بیماری گردیده‌اند (۷، ۱۴،۳۰).

در سال ۲۰۱۳ طی گزارشی اعلام شد که ماده‌ای به‌نام فرمیل‌ایندول‌کاربازول یا FICZ[11] که در بدن نیز یافت می‌شود، پتانسیل افزایش خواص تمایزی RA را داراست و با میل ترکیبی بالایی با لیگاند اندوژنی رسپتور آریل‌هیدروکربن قادر به اعمال تغییر مثبت در سیگنالیگ سلولی و افزایش تمایز سلول‌های میلوئیدی است (۵).

CD44، آنتی‌ژن سطحی سلولی است که در مراحل گرانولوپویزیس و ایجاد سلول‌های پیش‌ساز سلول‌های خونی مؤثر بوده و نقش مهم آن در بروز متاستاز و عود لوسمی این مارکر را از سایر آنتی‌ژن متمایز می‌نماید. تاکنون برای درمان هدفمند در APL ، آنتی‌بادی‌های منوکلونال مختلفی از جمله

[2] Acute myeloid leukemia
[3] Acute promyelocytic leukemia
[4] RARα
[5] Promyelocytic Leukemia-Retinoic Acid Receptor Alpha
[6] ATO
[7] DMSO
[8] TPA
[9] Differentiation therapy

[10] Retinoic acid-RA 0
[11] 6-formylindolo[3,2-b]carbazble



[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-03-29 ]
[ DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.31.9.6 ]

بر ضدآنتی‌ژن CD44 تولید شده‌اند. آنتی‌بادی علیه CD44 (α-CD44 mAb[2]) با ایجاد کم‌ترین تحریک و سمّیتی، مسیر بلوک‌شده تمایز را برگشت داده و موجب القای تمایز ترمینال، افزایش آپوپتوز و درنهایت باعث حذف LSC می‌گردد (۶،۱۹).

بررسی‌های بسیاری در خصوص استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال علیه CD44 انسانی به-تنهایی و یا همراه با RA و تأثیر مثبتی که در القای تمایز سلول‌های APL، آپوپتوز، متاستاز و کنترل مهاجرت[3]منتشر گردیده است (۱۴،۱۵، ۲۴، ۲۷، ۲۸).

خوشبختانه، درمان تمایزی با استفاده از RA با پیش‌آگهی موفقیت‌آمیزی همراه بود و تلاش‌ها 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 وتمایز سلول‌ها قادر به بیان آنتی‌ژن CD11b را در مراحل میلوسیت، متامیلوسیت، باند و مرحله بلوغ نهایی نوتروفیلی هستند، درحالی‌که درخصوص آنتی‌ژن سطحی CD14، سلول‌ها در مرحله تمایز ترمینال و با بلوغ کامل آن را بیان می‌کنند. در واقع، آنتی‌ژن‌های مورد مطالعه فقط در مرحله بلوغ سلول‌ها بیان شده و پرومیلوسیت‌ها قادر به بیان CD11b و CD14 نبوده و دو مارکر فوق نیز به‌همین دلیل انتخاب شدند (۱۰،۱۷،۲۹).

در این تحقیق، برای نخستین بار تأثیر استفاده هم‌زمان آنتی-بادی علیه CD44 انسانی، FICZ و RA به‌عنوان سه عامل مؤثر در القای تمایز نهایی[4]و آپوپتوز بر روی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بیمارهای مبتلا به لوسمی پرومیلوسیتی حاد بررسی گردید.

## مواد و روش‌ها

### جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی

از میان بیماران مراجعه کننده به مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی 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 اقدام‌های درمانی انتخاب شدند، سپس ۲ میلی‌لیتر نمونه از مغز استخوان به‌صورت استریل و با رعایت کامل اصول مصوّب کمیته اخلاق پزشکی انستیتو پاستور ایران به لوله‌های دارای EDTA منتقل شد. بعد از رقیق کردن با PBS[5]؛جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی PBMC[6] با استفاده از محلول فایکول (Pharmacia) (ρ =۱/۰۷۷ g/mL) و بر اساس گرادیان چگالی و برای مدت ۲۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰g سانتریفوژ و سلول‌های تک هسته‌ای موردنظر در بالای فایکول قرار گرفته و با آهستگی برداشته و در دو مرحله شتسشو سپس با استفاده از لام نئوبار و تریپان بلو شمارش شدند (۳۰).

### تعیین غلظت اپتیموم آنتی‌بادی

پس از جداسازی سلول‌های بیماران و برای تعیین مؤثرترین غلظت آنتی‌بادی در افزایش توانایی تمایز"RA-FICZ"، به-عنوان گروه کنترل و به‌طور هم‌زمان غلظت‌های آنتی‌بادی (A3D8) (Sigma) از ۵ تا ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه و به‌ترتیب RA-FICZ افزوده شد. بعد از گذشت ۵ روز تیمار، بیان مارکرهای بلوغ نوتروفیلی در سلول‌های میلوئیدی زمان با گروه کنترل توسط فلوسایتومتری سنجیده شد. این مرحله، با استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال علیه CD11b وCD14 هر دو مزدوج شده به فیکواریترین انجام شد. هر آزمون سه بار تکرار گردید.

### تیمار سلول‌های بیماران

تعداد یک میلیون سلول به هر یک از چاهک‌های پلیت محیط کشت RPMI 1640 دارای گلوتامکس[7] ۱۰۰IU/ml پنی-سیلین، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر(µg/ml) استرپتومایسین، ۱۵ میلی‌مولار HEPES به‌عنوان بافر و پس از افزودن سرم دکمپلمانه شده جنین گوساله FBS-(GIBCO BRL)[8] به میزان۱۰٪ ، یک روز قبل از تیمار، سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵٪ گاز دی‌اکسیدکربن ($Co_2$) و در رطوبت ۹۵٪ کشت قرار داده شدند. هر یک از عوامل القا کننده تمایز، ابتدا در حلال اختصاصی‌شان محلول و سپس با غلظت نهایی ذیل در محیط کشت حل و در شرایط استریل به سلول‌ها

[1] anti-CD44 monoclonal antibody (mAb)
[2]
[1] Homing [3]
[1] Terminal differentiation [4]

[1] Phosphate buffer solution [5]
[1] Peripheral Blood Mononuclear Cell [6]
[1] GlutaMAX [7]
[1] Fetal Bovine Serum [8]



[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-03-29 ]
[ DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.31.9.6 ]

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 آنتی‌ژن‌هایCD11b (BioLegend) وCD14 (BioLegend) کنژوگه شده به فلورسین ایزوتیوسیانات- FITC[19] (Biolegend) و فیکواریترین[20]جمعیت سلول‌های $CD11b^+$ و $CD14^+$ 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 ایزوتیوسیانا ت[21] (Biolegend) که به‌صورت 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[22]و انتهایی آپوپتوز[23] 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، 6.07 version- USA) 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 $p\leq ۰/۰۵$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

# نتایج

## تعیین غلظت مؤثر آنتی بادی:

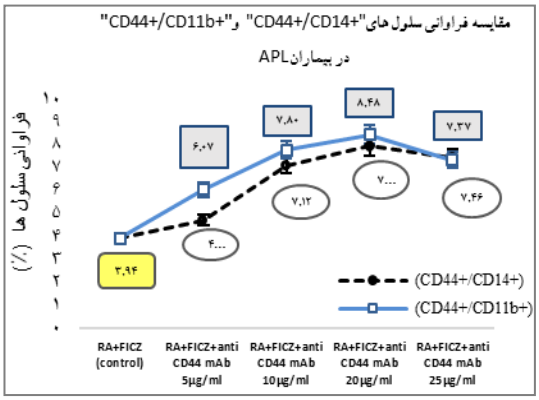
ابتدا دوز اپتیموم آنتی‌بادی منوکلونال علیه CD44 انسانی با استفاده از سنجش پروتئین سطحی CD14 و CD11b بر روی سلول‌ها تعیین گردید. نتایج به‌دست آمده از اثر بخشی آنتی-بادی CD44 با دو مارکر مورد نظر از غلظت ۲/۵ تا ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر حکایت داشتند.

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 (شکل۱).

[1] Fluorescein isothiocyanate
[2] Phycoerythrin
[2] amino-actinomycin D (FITC Annexin-V7-AAD)
[2] early apoptosis
[2] late apoptosi



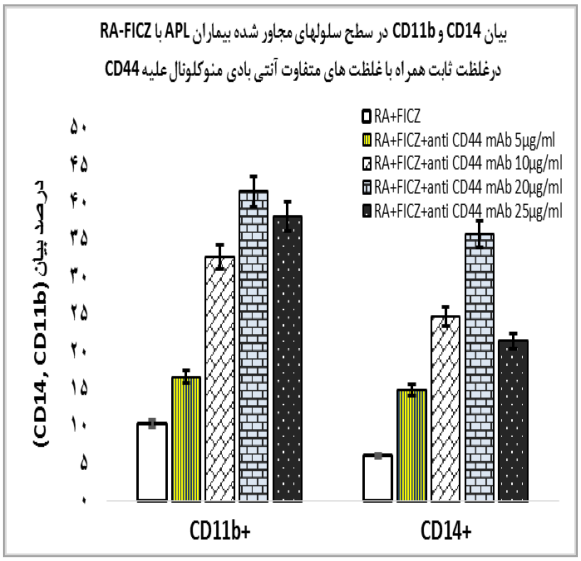
[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-03-29 ]
[ DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.31.9.6 ]




شکل ۱- مقایسه بیان آنتی‌ژن‌های سطحی CD14 و CD11b پس از تیمار سلول‌های بیماران APL با RA-FICZ در غلظت ثابت همراه با غلظت‌های متفاوت آنتی بادی منوکلونال علیه CD44

## القای تمایز در سلول های بیماران مبتلا به APL

با مقایسه اثر سینرژیستی عوامل القاکننده تمایز، با حضور آنتی‌بادی منوکونال 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 غلظت‌ها این تفاوت از نظر آماری معنی‌دار بودند. افزودن غلظت‌های ۵ الی ۲۵ میلی-گرم در میلی‌لیتر از آنتی‌بادی مونوکلونال ضد CD44 انسانی باعث ارتقای توان تمایزی ترکیب دوتایی RA-FICZ گردید.




شکل ۲- نمودار مقایسه بیان CD11b+ وCD14+ در سلول‌های بیماران مبتلا به لوسمی پرومیلوسیتی حاد پس از تیمار با RA-FICZ و ترکیب سه تایی "α-CD44 mAb+RA-FICZ"

در خصوص بیان هر دو آنتی‌ژن سطحی، در غلظت‌های بالاتر از ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از آنتی‌بادی، القای تمایز و بلوغ سلولی بیماران افزایش بیش‌تری را نشان دادند که تفاوت‌ها در خصوص آنتی‌ژن CD11b نسبت به CD14 بارزتر بود. تفاوت در پتانسیل القای تمایز در برخی غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل از نظر آماری معنی‌دار بودند. برترین اثر سینرژیستی در تیمار با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از آنتی‌بادی منوکلونال در کنار کمپلکس RA-FICZ دیده شد. نتایج این مقایسه در نمودار زیر نشان داده شده‌است. (شکل۲)

## آپوپتوز سلول‌های میلوئیدی

سلول‌های آنکسین مثبت/7-AAD منفی در مرحله اولیه آپوپتوز و سلول‌های آنکسین مثبت/7-AAD مثبت، در مرحله انتهایی آپوپتوز در نظر گرفته شدند جمعیت سلول‌های آپوپتوتیک تحت درمان با ترکیب سه تایی واجد آنتی بادی منوکلونال 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 آنتی‌بادی منوکلونال ضد CD44 مشاهده شد. آزمون برای هر بیمار سه بار انجام شد. (شکل ۳)

## بحث

تحقیق‌های انجام شده گذشته، نقش کلیدی آنتی‌بادی منوکلونال ضد CD44 را در کنترل پیشرفت بیماری که به-واسطه القای تمایز سبب حذف سلول‌های بنیادی لوسمی در بیماران APL را اثبات نموده‌اند (۱، ۷، ۱۴، ۱۵، ۱۹).

از سویی دیگر در درمان این گروه از بیماران، اسیدرتینوئیک به‌عنوان پیشتاز در «تمایز درمانی» خوش درخشیده است و حتی مدت‌هاست که کاربردی بالینی پیدا کرده است (۳، ۱۶، ۲۰، ۲۵، ۲۶).

[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-03-29 ]

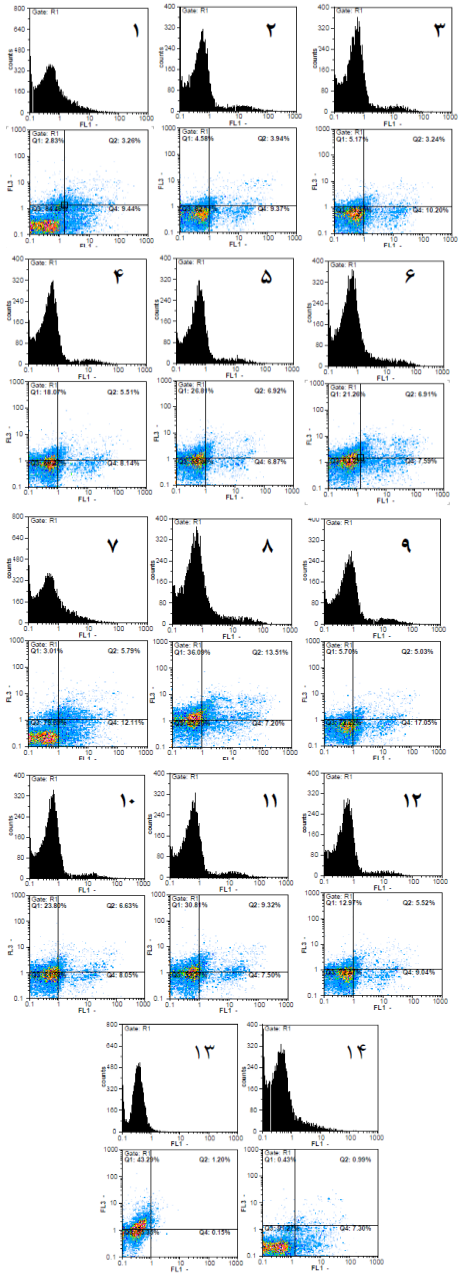
[ DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.31.9.6 ]

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 CD14 و CD11b 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+/CD14 و +CD44+/CD11b تحت بررسی قرار گرفت و فراوانی سلول‌هایی که تمایز یافته و بودند، مشخص شد. نتایج تأیید نمودند که همراهی α-CD44 mAb با "RA-FICZ" به‌صورت سینرژیستی، توان القای تمایز ترکیب"RA-FICZ" را افزایش و جمعیت بیش‌تری از سلول-های نابالغ را در مسیر بلوغ طبیعی قرار می‌دهد. درخصوص مارکر CD11b و با افزودن ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از آنتی-بادی به «ترکیب دوتایی» بررسی‌ها، تا دو برابر افزایش در تمایز پرومیلیوسیت‌های 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، به‌صورتی‌که در خصوص آپوپتوز اولیه تا ۶۶٪ و در مجموع دو آپوپتوز اولیه و انتهایی رشدی معادل ۱۴۴٪ مشاهده شد.




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 ۳-۱: غلظت ۵ µg/ml آنتی‌بادی منوکلونال ضد CD44، شماره ۶-۴: غلظت ۱۰µg/ml آنتی‌بادی منوکلونال ضد CD44، شماره ۹-۷: غلظت ۲۰µg/ml آنتی‌بادی منوکلونال ضد CD44، شماره ۱۲-۱۰: غلظت ۲۵ µg/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



[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-03-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.31.9.6 ]

برنامه‌ریزی سلول‌های تحت تیمار، القای تمایز ترمینال، بلوغ کامل و بروز اثرهای «سینرژیستی» ناشی از استفاده هم‌زمان از سه القا کننده به‌صورت ترکیبی را در کنار هم تأیید نمود.

## نتیجه‌گیری

همراهی آنتی‌بادی ضد CD44 در کنار ترکیب دوتایی RA-FICZ، حائز اهمیت است چرا که آنتی‌بادی با مکانیسمی هدفمند باعث القای تمایز و بروز آپوپتوز شده و این تأثیرگذاری را با حداقل عوارض جانبی و سمیّت سبب می‌شود. به‌عبارتی مشابه آن‌چه که در بدن در حالت سلامت اتفاق می‌افتد، این ترکیب، منجر به هدایت پرومیلوسیت‌ها به مسیر طبیعی بلوغ و سپس مرگ برنامه‌ریزی شده و حذف سلول‌های LSC را سبب می‌گردد و بدین گونه ترکیب فوق، در درمان این نوع لوسمی مؤثرتر عمل می‌کند. در سال‌های اخیر، روش«درمان تمایزی» و بهره‌گیری از ترکیب‌های غیرشیمیایی مکمل همراه و یا پس از شیمی‌درمانی رایج شده است و اثر مطلوب و طولانی مدت ترکیب‌های القا کننده و عدم ایجاد سمیّت در بیماران APL، توجه زیادی را معطوف خود نموده است. از این‌رو هنوز هم محققان برای افزایش طول عمر، بهبودی کامل[۲،۴] کاهش عوارض جانبی و احتمال بازگشت بیماری در حال تلاش گسترده هستند.

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که افزودنα-CD44 mAb به ترکیب "RA-FICZ" می‌تواند به‌صورت اختصاصی و هدفمند موجب تمایز و حذف سلول‌های LSC شود. بدیهی است با مطالعه بر روی نمونه‌های بیش‌تر و حتی در بالین بیماران مکمل با «ترکیب سه تایی» مورد مطالعه این امکان میسر شود تا گام‌هایی مؤثرتر در حوزه درمان‌های هدفمند مولکولی برداشته شود. بدون شک بررسی و تمرکز بیش‌تر 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 به‌صورت کامل رفع و روزنه امیدی در ارتقای کیفیت زندگی بیماران و منسوخ شدن روش‌های سنتی گشوده شود.

## سپاسگزاری

این مقاله نتیجه بخشی از پایان‌نامه دکتری تخصصی(Ph.D) است که هزینه آن توسط اداره آموزش انستیتو پاستور ایران پشتیبانی و تأمین شد. هم‌چنین معاونت تحقیقات و فن‌آوری، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی نیز پروژه مذکور را مورد حمایت مالی خود قرار داد. بدین‌وسیله از مساعدت‌های پرسنل بانک سلولی ایران به‌ویژه خانم‌ها طاهره بیرامی و مرضیه مکرمی، هم‌چنین همکاران گروه ویروس‌شناسی انستیتو پاستور ایران و پرسنل مرکز تحقیقات هماتولوژی، انکولوژی و پیوند مغز استخوان بیمارستان دکتر شریعتی برای همکاری صمیمانه‌شان سپاسگزاری می‌شود.

[2] Copmplete Remission

[4]



[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-03-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.31.9.6 ]

## 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., Elemary, 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., Gadhoum, 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. Gadhoum, 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. Gadhoum, 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.


[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-03-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.31.9.6 ]

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. Howlader, 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-Lezenes, 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. & Koeffler, 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.

[ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-03-29 ]

[ DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.31.9.6 ]

[ DOR: 20.1001.1.22285458.1397.8.31.9.6 ] [ Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-03-29 ]