

Evaluation of regulatory T cells (CD4⁺ / FOXP3⁺) and expression of indoleamine 2 and 3 dioxygenase (IDO) in acute leukemia by flow cytometry and Real Time PCR

Raziyeh Hakak¹, Behzad Poopak^{2*}, Ahmad Majd³, Monireh Movahedi⁴

1. Department of Biology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran

2. Islamic Azad University Tehran Medical Sciences, Tehran, Iran

3. Department of Biology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran

4. Department of Biology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran

۴۷

Abstract

Aim and Background: The level of an immune response inhibitory enzyme, called indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), and the activity of Treg cells increase in some patients with cancer and acute leukemias such that it can lead to the inhibition of immune responses. Therefore, the very aim of the present study was to evaluate the regulatory T cells (CD4⁺ / FOXP3⁺) and the level of the IDO expression in acute leukemias using flow cytometry and Real-Time PCR.

Materials and Methods: This study used bone marrow samples taken from 30 patients with acute lymphoid leukemia (ALL), and 20 healthy individuals. Then, the level of the IDO expression and the percentage of Treg cells were evaluated using flow cytometry and Real-Time PCR. The results revealed that the percentage of Treg in the total lymphocytes, T and Th in the ALL group was significantly higher than that of the normal groups the respectively (P <0.001).

Results: In addition, the level of the IDO expression in the normal group was significantly lower than that of the ALL group (P= 0.016).

Conclusion: The level of the IDO expression in the ALL groups was significantly higher than the normal group. Moreover, there was a positive and non-significant relationship between the level of the IDO expression and the percentages of Treg cells in the ALL group. Therefore, it seems necessary to conduct more studies for the behavior of this leukemia in the expression of IDO enzyme and the percentage of Treg cells and their relationship with each other.

Keywords: ALL, Flow cytometry, Real-Time PCR, Iau Science.

Corresponding author:

Islamic Azad University Tehran Medical Sciences, Tehran, Iran

Email: Poopak@gmail.com

بررسی سلول‌های T تنظیم‌کننده (CD4⁺/FOXP3⁺)

و میزان بیان ایندولامین ۲ و ۳ دی اکسیژناز

در لوسمی حاد لنفوئیدی

راضیه حکاک^۱، بهزاد پوپک^{۲*}، احمد مجد^۳، منیره موحدی^۴

۱. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

۲. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی، تهران، ایران

۳. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

۴. گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: با توجه به اینکه میزان آنزیم مهارکننده پاسخ‌های ایمنی به نام ایندول آمین ۲، ۳-دی اکسیژناز (IDO) و فعالیت سلول‌های Treg در برخی از بیماران سرطانی و همچنین لوسمی‌های حاد افزایش می‌یابد به‌طوری که این حالت می‌تواند منجر به مهار پاسخ‌های ایمنی گردد. به همین منظور این مطالعه با هدف بررسی سلول‌های T تنظیم‌کننده (CD4⁺/FOXP3⁺) و میزان بیان IDO در لوسمی حاد لنفوئیدی (ALL) به روش فلوسایتومتری و Real-Time PCR صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق از نمونه مغز استخوان ۳۰ بیمار مبتلا به ALL و ۲۰ فرد سالم استفاده شد. سپس به کمک دو روش فلوسایتومتری و Real-Time PCR به ارزیابی میزان بیان IDO و درصد سلول‌های Treg پرداخته شد.

یافته‌ها: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که درصد Treg در لنفوسیت‌های کل، T و Th در بیماران مبتلا به ALL به ترتیب به طور معناداری بیش از گروه نرمال بوده است ($P < 0.001$). علاوه بر میزان بیان IDO در گروه نرمال به‌طور معناداری کمتر از گروه ALL بوده است ($P = 0.016$).

نتیجه‌گیری: میزان بیان IDO در گروه ALL بطور معناداری بیشتر از افراد سالم بوده است. همچنین در گروه بیماران مبتلا به ALL، ارتباط مثبت و غیرمعناداری میان میزان بیان IDO با درصد‌های سلول‌های Treg وجود داشته است. لذا بنظر می‌رسد انجام مطالعات بیشتر برای رفتار این لوسمی در بیان آنزیم IDO و درصد سلول‌های Treg و ارتباط آن‌ها با یکدیگر لازم و ضروری می‌باشد.

کلمات کلیدی: ALL، فلوسایتومتری، Real-Time PCR، Iau Science

مقدمه

لوسمی لنفوسیتی حاد^۱ (ALL) نوعی سرطان خون می‌باشد که به عنوان یک بیماری ناهمگن از لحاظ ژنوتیپی و فنوتیپی

شناخته شده است (۱). این بیماری عمدتاً توسط کلون‌های بدخیم لنفوسیتی اولیه و نابالغ ایجاد می‌شود و با افزایش تکثیر سلولی، نفوذ گسترده و مهار خون‌سازی طبیعی تظاهر پیدا می‌کند (۲). با این حال، علت و پاتوژنز ALL نامشخص است (۳-۴). ۸۰٪ موارد ALL در کودکان و ۲۰٪ در بالغین اتفاق می‌افتد. اگرچه ALL در کودکان شایع است ولی شانس خوبی برای درمان دارد؛ اما شانس درمان آن در بالغین تا حد زیادی کاهش می‌یابد (۵). زیرگروه‌ها و انواع مختلف این

نویسنده مسئول:

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم پزشکی، تهران، ایران

پست الکترونیکی: Poopak@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۰۱

خاصی از جمله سرطان ریه و سرطان تخمدان گزارش شده است (۱۲،۱۷،۱۸)؛ که نشان می‌دهد اثر سرکوب‌کنندگی سلول‌های Treg بر سیستم ایمنی ارتباط نزدیکی با تومورزایی دارد. با این حال، عملکرد و وضعیت سلول‌های Treg در بیماران مبتلا به ALL هنوز به طور کامل مشخص نشده است (۱۹، ۱۱). از سوی دیگر ایندول آمین ۲، ۳- دی اکسیژناز^۲ (IDO) یک عامل سرکوب‌کننده جدید سیستم ایمنی است که در برخی از زیرمجموعه‌های سلول‌های طبیعی و نئوپلاستیک از جمله سلول‌های لوسمی‌های میلوئیدی (AML) و ALL بیان می‌شود. بیان IDO با افزایش سلول‌های $(CD4^+CD25^+Foxp3^+)$ T همراه می‌باشد. در شرایط آزمایشگاهی، سلول‌های AML، IDO⁺ تعداد سلول‌های $CD4^+CD25^+$ TCD4⁺ را افزایش می‌دهند که Foxp3 mRNA، را بیان می‌کند و این اثر به طور کامل با مهارکننده IDO، ۱- متیل‌تریپتوفان (1-MT) همراه می‌شود. ایندول آمین ۲، ۳- دی اکسیژناز (IDO) یک آنزیم کلیدی در متابولیسم تریپتوفان است که مرحله محدودکننده اولیه تجزیه تریپتوفان را در امتداد مسیر کینورنین کاتالیز می‌کند. کمبود تریپتوفان با مصرف IDO، فعالسازی سلول T را مهار می‌کند در حالی که محصولات کاتابولیسم تریپتوفان مثل مشتقات کینورنین و رادیکال‌های عاری از اکسیژن، تکثیر و بقای سلول را تنظیم می‌کنند. بنابراین IDO فعالیت سرکوب سیستم ایمنی را افزایش می‌دهد (۲۰). در چندین مطالعه ارتباط مستقیم و دوطرفه تولید و فعالیت آنزیم مهارکننده پاسخ‌های ایمنی به نام ایندول آمین ۲، ۳- دی اکسیژناز (IDO) با میزان و فعالیت سلول‌های Treg نشان داده شده‌است (۲۱-۲۴). از طرف دیگر مشاهده شده که میزان این آنزیم در برخی از بیماران سرطانی و همچنین لوسمی‌های حاد افزایش می‌یابد به‌طوری که این حالت می‌تواند منجر به مهار پاسخ‌های ایمنی گردد (۲۶-۲۴). به همین منظور این مطالعه با هدف بررسی سلول‌های T تنظیم‌کننده $(CD4^+/FOXP3^+)$ و میزان بیان ایندول آمین ۲، ۳- دی اکسیژناز (IDO) در بیماران ALL به روش فلوسایتومتری و Real-Time PCR صورت گرفته است.

سرطان‌ها احتمالاً می‌توانند در اثر مکانیسم‌های بیماری‌زایی مختلفی ایجاد شوند؛ که این امر بیانگر ارتباط عملکردی بین ناهنجاری‌های ژنتیکی و مولکولی مختلف با الگوی بیان برخی از ژن‌ها و همچنین با پیش‌آگهی بیماری باشد (۶،۷). افزایش فعالیت مهارای ایمنی در این بیماران به‌عنوان یکی از عوامل اصلی بیماری‌زایی و پیشرفت بیماری به شمار می‌آیند (۸-۱۱). در واقع مشخص شده‌است که حضور و فعالیت بیشتر لنفوسیت‌های T تنظیمی T Regulatory T cells (Treg) با ایجاد عود و پیش‌آگهی بد در این بیماران مرتبط بوده و مهار و کاهش فعالیت آن‌ها می‌تواند در افزایش کارایی درمان و ایمونوتراپی بیماران موثر واقع گردد (۹،۱۰،۱۲،۱۳). سلول‌های Treg از سلول‌های موثر در سیستم ایمنی محسوب می‌شوند که نقش مهمی در سرطان‌ها، بیماری‌های اتوایمیون و بیماری‌های عفونی دارند (۱۴). سلول‌های Treg طبیعی و سلول‌های Treg القایی دو زیرگروه اصلی این سلول‌ها می‌باشند. سلول‌های Treg طبیعی، tTreg (Natural T cells) یا nT reg سلول‌هایی هستند که در طی بلوغ تیموس ایجاد می‌شوند و فعالیت سرکوبگری آن‌ها برای استقرار و حفظ هموستاز ایمنی ضروری است. سلول‌های Treg القایی، iTreg (Induced T cells) سلول‌هایی هستند که به دنبال شناسایی آنتی‌ژن خودی در خارج از تیموس از سلول‌های T مبتدی به وجود می‌آیند. از فاکتورهای کلیدی در شناسایی این سلول‌ها عوامل نسخه برداری می‌باشند که عامل نسخه برداری Foxp3 (Forkhead box P3) نقش کلیدی در تکامل سلول Treg دارد؛ چرا که بیان آن در سلول‌های T سبب ایجاد فنوتیپی مشابه با nTreg می‌شود و عدم حضور آن و یا موتاسیون‌های غیرفعال‌کننده Foxp3 سبب ایجاد اختلالات ایمنی زیادی می‌گردد (۱۵). Foxp3 همچنین ژن‌هایی را که رمزهای مرتبط با Treg مانند CD25، CTLA-4 و GITR دارند، را فعال می‌کند و فعالیت سرکوب گرانای را به Treg ها ارائه می‌دهد، که به طور مستقیم سلول‌های غیر Treg را سرکوب می‌کند و یا عملکرد Antigen-presenting cell را برای فعال سازی سلول‌های غیر Treg تنظیم می‌کند (۱۶). بنابراین اگرچه در مطالعات قبلی تعداد و درصد غیرطبیعی سلول‌های Treg در تومورهای

² Indoleamine 2,3 Dioxygenase

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از نمونه‌ی مغز استخوان ۳۰ بیمار مبتلا به ALL در بازه سنی ۵ تا ۸۰ سال از بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه تشخیص طبی و تخصصی پیوند تهران و ۲۰ نمونه مغز استخوان از افراد نرمال، استفاده شده است. جمع آوری نمونه ها زیر نظر کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال با شناسه اخلاق IR.IAU.TNB.REC.1401.008 و رضایت بیماران صورت گرفت. پس از جمع آوری نمونه ها سن و جنس آن ها بررسی شد، سپس subtype نمونه و درصد بلاست ثبت گردید و سپس تعیین درصد Treg و بیان IDO صورت گرفت.

استخراج RNA و سنتز DNA

ابتدا مقدار معادل 1.05×5 ، گلبول سفید از نمونه مغز استخوان از هر بیمار جدا شد. 1 ml محلول GTC (سیگما، آمریکا) به آن‌ها اضافه نموده و کاملاً مخلوط کرده. پس از آن استخراج RNA از نمونه ها توسط کیت Qiagen (آلمان) انجام شد و پس از استخراج RNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری (Eppendorf, Biophotometer Pluse (Germany)) OD، نمونه‌ها در طول موج ۲۸۰/۲۶۰ nm اندازه‌گیری شد. از نمونه RNA هایی که نتایج نسبت OD ۲۸۰/۲۶۰ nm آن‌ها بین ۱/۸ - ۲ بود، جهت سنتز cDNA استفاده شد. همچنین کیفیت RNA استخراجی با استفاده از ژل آگارز ۲ درصد مورد بررسی قرار گرفت. پس از مورد تأیید بودن RNA سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA (Bio-Tech، کره) انجام گرفت.

Real-Time PCR

پس از سنتز cDNA با استفاده از کیت Syber Green (فرمنتاز، آلمان) و پرایمرهای اختصاصی ژن های IDO1 و Albumin برای هر نمونه آزمایش Real-time PCR انجام شد و برای هر نمونه سه بار تکرار شد. در انجام روش PCR مرحله Holding یک بار برای ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس و مراحل Denaturation، Annealing و Extention به ترتیب برای ۱۵ ثانیه در ۹۵ درجه سلسیوس، برای ۳۰ ثانیه در ۵۹ درجه سلسیوس و برای ۳۵ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس انجام شده است. مراحل ۲، ۳ و

۴ مجموعاً ۴۰ بار تکرار شد. لازم به ذکر است بیان ژن Albumin به عنوان یک House Keeping Gene باعث بهینه شدن اندازه گیری بیان ژن IDO1 می‌شود. پرایمر اختصاصی برای mRNA ژن Albumin با توالی Forward: 5'-CCGTGGTCCTGAACC - GCTAT Reverse: 5'- و 3' CTTCTCAGAAAGTGTGCATATATCTG-3' و برای mRNA ژن IDO1 با توالی Forward: 5'- و 3' TCCTGGACAATCAGTAAAGAGTACC-3' Reverse: 5'- TCAGGCAGATGTTTAGCAATGAAC-3' طراحی و توسط شرکت Gen Fanavaran ساخته شده است

فلوسایتومتری

جهت تأیید افزایش درصد سلول‌های Treg، لنفوسیت ها به کمک دستگاه فلوسایتومتری (FlowCytometry BD FACSLytic, USA) بررسی شد. پس از خوانش آنالیز سلول‌ها توسط نرم افزار دستگاه فلوسایتومتری و همچنین با نرم افزار Infinicyt، انجام گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

برای انجام تجزیه های آماری، از نرم افزار SPSS(Ver.26) استفاده شده است. داده ها به صورت انحراف معیار $\pm(SD)$ میانگین و فراوانی(درصد) نشان داده شدند. برای مقایسه‌ی توزیع فراوانی داده‌های کیفی در بین گروه‌ها از آزمون کای اسکور، برای مقایسه میانگین متغیرهای کمی در بین دو گروه از آزمون تی مستقل استفاده شد. سطح معناداری در کلیه آنالیزها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته‌شد.

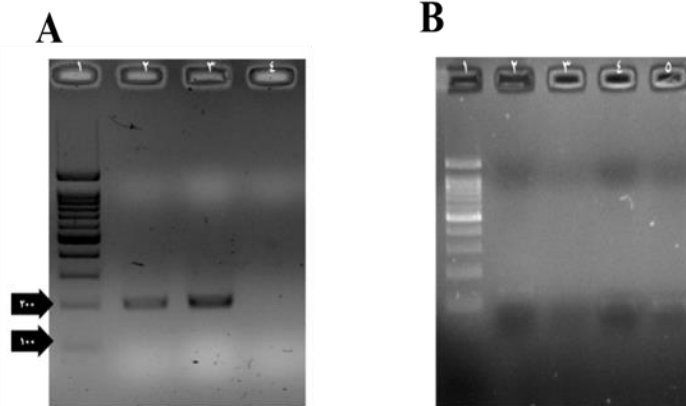
یافته‌ها

در بررسی کیفیت RNA های استخراج شده، نمایش باند پرایمر Albumin بر روی ژل آگاروز ۲٪ توسط روش RT-PCR انجام شد. در شکل ۱.A در چاهک شماره ۱ Ladder 100 bp (Fermentase)، چاهک ۲ و ۳ نمونه پرایمر Albumin و چاهک ۴ NTC می‌باشد. شکل ۱.A. گویای کیفیت قابل قبول cDNA است. همچنین در شکل ۱.B در چاهک شماره ۲، ۴ و ۵ باند پرایمر IDO1 و در چاهک شماره ۳ نمونه NTC و در چاهک شماره ۱ Ladder 100 bp

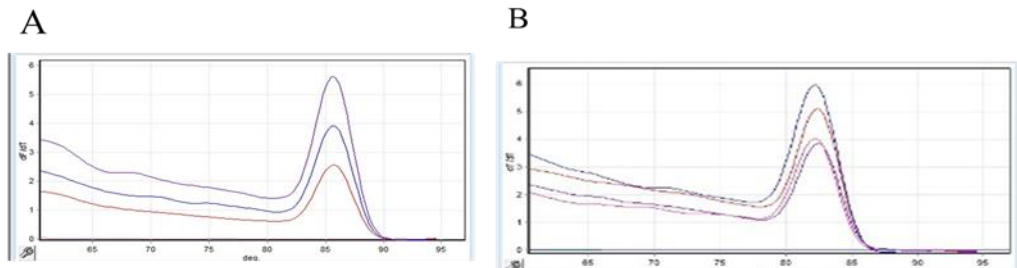
مقاله پژوهشی

اختصاصیت پرایمر طراحی شده می‌باشد (شکل ۲). و در شکل ۲A نمودار Melt curve ژن Albumin و ۲B مربوط به ژن DO1 در دستگاه Real-Time PCR نشان داده شده‌اند.

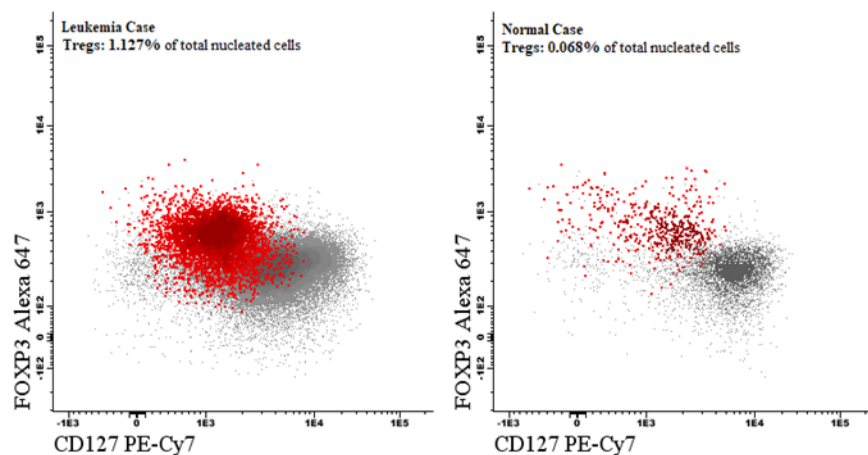
(Fermentase) استفاده شده است. یکی از چالش‌های موجود در نتایج PCR، اطمینان از اختصاصی بودن قطعات تکثیر شده است که برای بررسی آن از آنالیز منحنی ذوب یا Melt Curve استفاده شد. تک باند Melt Curve نشان دهنده



شکل ۱: A. باند پرایمر Albumin بر روی ژل آگارز ۲٪: چاهک شماره ۱ Ladder 100 bp، چاهک ۲ و ۳ نمونه پرایمر Albumin و چاهک شماره ۴ نمونه NTC. B. باند پرایمر IDO1 در جایگاه 122bp بر روی ژل آگارز ۲٪: چاهک شماره ۱ و ۵ باند پرایمر IDO1 و در چاهک شماره ۳ نمونه NTC و در چاهک شماره ۱ Ladder 100 bp



شکل ۲: A. نمودار Melt curve ژن Albumin در Real-TimePCR. B. نمودار Melt curve ژن IDO1 در Real-TimePCR



شکل ۳: نمودار نقطه‌ای فلوسایتومتری و افزایش درصد سلول‌های Treg در بیماران مبتلا به ALL در مقابل نمونه نرمال

وسیله فلوسایتومتری در شکل ۳ نشان داده شده است. در مطالعه حاضر توزیع فراوانی جنسیت در بین دو گروه اختلاف معناداری نداشته است ($P = 0/105$)؛ اما سن بیماران در گروه ALL با میانگین $6/37 \pm 4/74$ به طور معناداری کمتر از گروه نرمال با میانگین $28/90 \pm 27/33$ سال بوده است ($P = 0/001$) ($<$ جدول ۱). در بررسی درصد Treg ها مشخص شد که درصد Treg کل در گروه نرمال با میانگین $0/69 \pm 0/48$ به-طور آماری این ارتباط با هیچ یک از درصدهای مختلف Treg معنادار نبوده است ($P > 0/05$) (جدول ۲).

افزایش درصد سلول‌های Treg در بیماران مبتلا به ALL نسبت به نمونه کنترل به وسیله فلوسایتومتری در شکل ۳ نشان داده شده است. در مطالعه حاضر توزیع فراوانی جنسیت در بین دو گروه اختلاف معناداری نداشته است ($P = 0/105$)؛ اما سن بیماران در گروه ALL با میانگین $6/37 \pm 4/74$ به طور معناداری کمتر از گروه نرمال با میانگین $28/90 \pm 27/33$ سال بوده است ($P < 0/001$) (جدول ۱). در بررسی درصد Treg ها مشخص شد که درصد Treg کل در گروه نرمال با میانگین $0/69 \pm 0/48$ بطور معناداری بیش از گروه ALL با میانگین $0/25 \pm 0/16$ بوده است (P افزایش درصد سلول‌های Treg در بیماران مبتلا به ALL نسبت به نمونه کنترل به

مقاله پژوهشی

۵۳

جدول ۱: خصوصیات پایه و کلینیکالی بیماران در دو گروه مورد مطالعه

خصوصیات	گروه نرمال	گروه ALL	سطح معناداری
جنسیت	مذکر مونث	۲۰ (۶۶٪/۷) ۱۰ (۳۳٪/۳)	۰/۱۰۵
سن، سال	۲۸/۲۷±۹۰/۳۳	۶/۴±۳۷/۷۴	<۰/۰۰۱
کمتر از ۵ سال (کودک نوپا)	۴ (۲۰٪)	۱۵ (۵۰٪)	
۵-۱۳ سال (کودک)	۶ (۳۰٪)	۱۳ (۴۳٪/۳)	<۰/۰۰۱
۱۴-۱۹ سال (نوجوان)	۱ (۵٪)	۲ (۶٪/۷)	
۲۰-۵۵ سال (بزرگسال)	۳ (۱۵٪)	۰ (۰٪)	
بیش از ۵۵ سال (مسن)	۶ (۳۰٪)	۰ (۰٪)	
Subtype			
Common B	۰ (۰٪)	۲۴ (۸۰٪)	
M0	۰ (۰٪)	۰ (۰٪)	
M1	۰ (۰٪)	۰ (۰٪)	
M1/M2	۰ (۰٪)	۰ (۰٪)	
M2	۰ (۰٪)	۰ (۰٪)	
M4/M2	۰ (۰٪)	۰ (۰٪)	
M5	۰ (۰٪)	۰ (۰٪)	<۰/۰۰۱
Non-M3	۰ (۰٪)	۰ (۰٪)	
Pro B	۰ (۰٪)	۱ (۳٪/۳)	
Relapsed B	۰ (۰٪)	۱ (۳٪/۳)	
Relapsed T	۰ (۰٪)	۱ (۳٪/۳)	
T	۰ (۰٪)	۳ (۱۰٪)	
درصد بلاست	۰/۰±۸۷/۵۳	۸۲/۱۱±۷۷/۹۶	<۰/۰۰۱

جدول ۲: ضریب همبستگی میزان بیان IDO با درصد Treg ها در هر یک از دو گروه مورد مطالعه

درصد Treg	گروه نرمال	گروه ALL
-----------	------------	----------

ضریب همبستگی	سطح معناداری	ضریب همبستگی	سطح معناداری
۰/۱۸۵	۰/۳۲۸	۰/۷۲۹	۰/۰۸۳
۰/۳۰۰	۰/۱۰۸	۰/۱۳۰	۰/۳۵۰
۰/۲۹۹	۰/۱۰۷	۰/۲۸۶	۰/۲۵۱
۰/۲۰۸	۰/۲۷۰	۰/۰۰۳	۰/۶۳۷

بحث

بر طبق نتایج بدست آمده شیوع ALL در مردان بیشتر بوده؛ اما اختلاف معناداری میان مردان و زنان در این مطالعه وجود نداشت. بعلاوه سن بیماران مبتلا به ALL بطور معناداری کمتر از افراد سالم بوده است. همسو با نتایج مطالعه ما، برطبق گزارشات اپیدمیولوژیک پیشین، ۷۷٪ از لوسمی‌های کودکان از نوع ALL می‌باشد (۲۷). شیوع سنی لوسمی ALL ۲-۵ سالگی (۲۷-۲۹) و در پسرها شایع تر از دخترها گزارش شده است (۲۷، ۲۸، ۳۰). نتایج حاصل از بررسی درصد سلول‌های Treg حاکی از آن بود که درصد Treg در لنفوسیت‌های کل، T و Th در بیماران مبتلا به ALL بطور معناداری بیش از گروه نرمال بوده است. همسو با مطالعه حاضر، Idris و همکارانش دریافتند که میزان Treg در بیماران ALL به‌طور قابل توجهی نسبت به افراد سالم بیشتر بوده است (۳۱). Liu و همکاران نیز در مطالعه خود نشان دادند که فعال شدن بیش از حد سلول‌های Treg در بیماران مبتلا به ALL ممکن است با فعال شدن بیش از حد یا بیان ناکافی انواع مولکول‌های سیگنالینگ سایتوکاین‌های تنظیمی همراه باشد. فعال شدن بیش از حد IL-2/pSTAT5 و TGF-β/Smad و بیان ناکافی pSTAT3 نقش مهمی در تنظیم سلول‌های Treg در بیماران مبتلا به ALL ایفا می‌کنند. با این حال، بررسی‌های بیشتر در مورد مکانیسم مولکولی سیگنال‌دهی غیرعادی فوق‌الذکر و همچنین عوامل شرکت‌کننده در تنظیم سیگنال‌دهی IL-6 و TGF-β مورد نیاز است (۳۲).

AML بعنوان لوسمی حاد دیگر نیز مورد توجه محققان بوده، به‌طوری که Mansour و همکاران در مطالعه خود درصد Treg ها را در بیماران AML بیش از گروه کنترل گزارش نمودند (۳۳). این یافته‌ها با یافته‌های Moon و همکارانش همخوانی دارد؛ آن‌ها نیز دریافتند که جمعیت سلول‌های Treg در خون محیطی و مغز استخوان گروه‌های AML و گروه‌های MDS با درجه بالا در مقایسه با گروه‌های کنترل افزایش قابل توجهی داشته است (۳۴). این مسئله را می‌توان با مطالعات قبلی توضیح داد که نشان می‌دهند سلول‌های AML عواملی را ترشح می‌کنند که مانع فعال سازی و تکثیر سلول‌های T و باعث محدود کردن تولید سایتوکاین‌های ضد التهابی می‌شود (۳۵، ۳۶). Ivanova-Todorova و همکارانش نیز در تعداد سلول‌های $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ در حضور سلول‌های MSC در مقایسه با محیط‌های کشت کنترل مربوطه که فاقد سلول‌های MSC بودند؛ افزایش پایداری را مشاهده کردند (۳۷). نتایج مطالعه De Matteis و نیز حاکی از آن بود که میزان افزایش Treg در تمام بیماران CLL دیده شده و میزان IL10 و IL4 نیز به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد (۳۸). از سوی دیگر نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان بیان IDO در بیماران مبتلا به ALL بطور معناداری بیشتر از افراد سالم بوده است. مشابه با مطالعه حاضر، Shimauchi و همکارانش و نیز Roncador و همکارانش در مطالعات خود نشان دادند که درصد Treg و نیز میزان بیان FOXP3 در تومورهای لنفوم ATLL در

می‌دهد افزایش IDO ممکن است با افزایش فنوتیپ Treg مرتبط باشد (۲۰).

Mansour و همکاران نیز یک همبستگی مثبتی بین بیان IDO و سلول‌های Treg گزارش کردند (۳۳). این رابطه ممکن است با نقش IDO در القای تبدیل سلول‌های $CD25^-$ FOXP3 $^+$ T به $CD25^+$ foxp3 $^+$ توضیح داده شود (۴۴). درصد سلول‌های $CD4^+CD25^+$ در بیماران AML با بیان مثبت IDO در مقایسه با بیماران با بیان منفی IDO یا گروه‌های کنترل به میزان قابل توجهی افزایش یافته است (۴۵). اگرچه در مطالعه ما نیز ارتباط مثبتی بین بیان IDO و درصد سلول‌های Treg در گروه بیماران ALL یافت شد ولی این ارتباط از نظر آماری معنادار نبود. جالب است که تنها در گروه نرمال میزان بیان این پروتئین با درصد Treg در لنفوسیت-های Th ارتباط مثبت و معناداری داشت. همانطور که در قبل نیز بیان شد، در واقع سلول‌های Treg، T سل‌های سرکوب کننده سیستم ایمنی هستند. آنها مانع از تکثیر سلول‌های T و تولید سایتوکاین می‌شوند (۴۶). IDO با تقویت فنوتیپ سرکوب کننده و جلوگیری از برنامه ریزی مجدد Treg ها به سلول‌های شبه کمکی غیرسرکوبگر، نقش مهمی در تنظیم Treg ها دارد و در نتیجه باعث تثبیت Treg ها می‌شود (۲۶). جالب آنکه Wang و همکارانش نشان دادند که IDO، باعث تحریک ماکروفاژها به سمت ماکروفاژهای نوع M2 بجای M1 می‌گردد، که از ریز محیط سرکوب کننده سیستم ایمنی در بیماران مبتلا به سرطان خون حمایت کرده و باعث پیشرفت تومور و در نتیجه پیش آگهی بد می‌شود (۴۷). بنابراین IDO ممکن است به انحراف ریز محیط تومور از حالت مخالف به حالت حمایتی به سلول‌های توموری کمک کرده و ممکن است به عنوان یکی از مکانیسم‌های فرار لوسمی از کنترل ایمنی در نظر گرفته شود؛ لذا مهار IDO، می‌تواند به عنوان یک هدف بالقوه در درمان لوسمی در نظر گرفته شود (۲۲، ۲۳). براین اساس، مهار IDO ممکن است یک رویکرد امیدبخش برای غلبه بر مکانیسم‌های فرار ایمنی مرتبط با لوسمی حاد باشد. در این راستا، ممکن است بهتر باشد که علاوه بر شیمی درمانی، از درمان با مهار کننده‌های IDO نیز برای این بیماران با بیان بالای IDO استفاده گردد. از آنجا که داده‌های برخی از بیماران ناقص بود و ما به داده‌های بالینی

بیماران مبتلا به ATL بطور معناداری بیش از نمونه‌های نرمال بوده است (۳۹، ۴۰). به علاوه Arandi و همکاران نیز در بیماران AML نسبت به گروه نرمال بیشترین میزان بیان IDO گزارش شده است (۲۰). همچنین نتایج مطالعه Mansour و همکاران نیز افزایش قابل توجهی در بیان IDO در MSC بیماران AML در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند. افزایش بیان IDO در بیماران AML در مقایسه با گروه کنترل را می‌توان با توانایی سلول‌های لوسمیک در ایجاد تغییرات در سلول‌های MSC توضیح داد (۳۳). اگر چه در مطالعه ما بیماران مبتلا به ALL مورد بررسی قرار گرفته اند؛ اما می‌توان همسو بودن مطالعات فوق را با مطالعه خود پذیرفت، چرا که ALL و AML دو لوسمی حاد می‌باشند. با توجه به اینکه IDO آنزیمی است که تجزیه اسید آمینه ضروری تریپتوفان را به متابولیت‌های سمیکاتالیز می‌کند. اثر تعدیل کنندگی آن بر سیستم ایمنی بدن به دلیل ظرفیت آن در کاهش غلظت موضعی تریپتوفان و ترویج تجمع متابولیت‌های سمی می‌باشد؛ که هر دو مورد در جلوگیری از تکثیر سلول‌های T که به سطوح محیطی تریپتوفان بسیار حساس هستند، دخیل می‌باشد (۴۱). همچنین Fukuno و همکارانش، Chamuleau و همکارانش و Folgiero و همکارانش، بیان داشتند که افزایش بیان IDO در بلاست‌های لوسمیک مغز استخوان با پیش آگهی بد در بیماران AML همراه است (۲۴، ۴۲، ۴۳).

در نهایت ارتباط میزان بیان IDO با درصد‌های سلول‌های Treg در گروه بیماران مبتلا به ALL مثبت و ضعیف بوده و در گروه نرمال نیز تنها میزان بیان IDO با درصد Treg در لنفوسیت‌های Th ارتباط مستقیم و معناداری داشته است. در مطالعه Arandi و همکاران بیان IDO در لکوسیت‌های خون محیطی بیماران با لوسمی میلوئیدی حادی که از نظر سینوزنتیک طبیعی بوده (CN-AML) و ارتباط آن با بیان FOXP3 (بعنوان نشانگر Tregs) و همچنین پارامترهای بالینی و آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آن‌ها نشان داد که هم mRNA IDO و هم mRNA FOXP3، در بیماران AML افزایش بسیاری یافته بود. علاوه بر این، رابطه ای مثبتی بین بیان IDO و FOXP3 مشاهده شد که نشان

آنها دسترسی نداشتیم، پیگیری نتیجه بالینی این بیماران از نظر پیشرفت بیماری یا بقای بیمار یا تعیین اهمیت پیش آگهی این تغییرات در بیان IDO/FOXP3 برای ما مسئله آسانی نبود. با مطالعه جمعیتی بزرگتر با بیمارانی که داده‌های در دسترس و کامل دارند؛ می‌توان این محدودیت را برطرف کرد. این امر ممکن است برای درک بهتر اهمیت پیش آگهی IDO و مدیریت نتایج بالینی این بیماران مفید باشد. علاوه بر این، ارتباط مستقیم IDO و Treg در بیماران نشان داده شد که می‌تواند برای روشن شدن جنبه‌های مختلف اختلال در تنظیم ایمنی بیماران مفید باشد.

نتیجه‌گیری

برطبق نتایج مطالعه حاضر درصد Treg کل در گروه ALL بطور معناداری کمتر از گروه نرمال بوده است. در مقابل درصد Treg در لنفوسیت‌های کل، T و Th در گروه ALL بطور معناداری بیش از گروه نرمال بوده است. بعلاوه میزان بیان IDO در گروه ALL بطور معناداری بیشتر از افراد سالم بوده است. همچنین در گروه بیماران مبتلا به ALL، ارتباط مثبت و غیرمعناداری میان میزان بیان IDO با درصد‌های سلول‌های Treg وجود داشته است. این ارتباط ممکن است بتواند مسئول پاسخ ضعیف ایمنی این بیماران و پیشرفت بیماری در مراحل بعدی و پیش آگهی بد باشد. بنابراین به نظر می‌رسد مهار IDO در این بیماران با تمرکز بر استفاده از داروهای جدید مهارکننده IDO، به همراه شیمی درمانی، می‌تواند یک رویکرد امیدوار کننده برای غلبه بر مکانیسم‌های فرار ایمنی در این بیماران که دارای سطح افزایش یافته بیان IDO هستند، باشد.

سپاسگزاری

از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال و آزمایشگاه تشخیص طبی و تخصصی پیوند و تمامی بیمارانی که نمونه خود را در اختیار این مطالعه قرار داده اند کمال تشکر را داریم.

منابع

1. Pan L, Liu G, Lin F, Zhong S, Xia H, Sun X, Liang H. Machine learning applications for prediction of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Scientific reports*. 2017 Aug 7;7(1):1-9.
2. Onciu M. Acute lymphoblastic leukemia. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2009 Aug 1;23(4):655-74.
3. Chiarini F, Lonetti A, Evangelisti C, Buontempo F, Orsini E, Evangelisti C, Cappellini A, Neri LM, McCubrey JA, Martelli AM. Advances in understanding the acute lymphoblastic leukemia bone marrow microenvironment: From biology to therapeutic targeting. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2016 Mar 1;1863(3):449-63.
4. Woo JS, Alberti MO, Tirado CA. Childhood B-acute lymphoblastic leukemia: a genetic update. *Experimental hematology & oncology*. 2014 Dec;3(1):1-4.
5. Paul S, Kantarjian H, Jabbour EJ. Adult acute lymphoblastic leukemia. In *Mayo Clinic Proceedings* 2016 Nov 1 (Vol. 91, No. 11, pp. 1645-1666). Elsevier.
6. Wouters BJ, Koss C, Delwel R. Gene expression profiling for improved dissection of acute leukemia: a recently identified immature myeloid/T-lymphoid subgroup as an example. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2008 May 1;40(3):395-400.
7. De La Bl ti re DR, Blanchet O, Cornillet-Lef bvre P, Coutolleau A, Baranger L, Genevi ve F, Luquet I, Hunault-Berger M, Beucher A, Schmidt-Tanguy A, Zandecki M. Routine use of microarray-based gene expression profiling to identify patients with low cytogenetic risk acute myeloid leukemia: accurate results can be obtained even with suboptimal samples. *BMC medical genomics*. 2012 Dec;5(1):1-2.
8. Szczepanski MJ, Szajnik M, Czystowska M, Mandapathil M, Strauss L, Welsh A, Foon KA, Whiteside TL, Boyiadzis M. Increased frequency and suppression by regulatory T cells in patients with acute myelogenous leukemia. *Clinical cancer research*. 2009 May 15;15(10):3325-32.
9. Teague RM, Kline J. Immune evasion in acute myeloid leukemia: current concepts and future directions. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2013 Dec;1(1):1-1.
10. Memarian A, Nourizadeh M, Masoumi F, Tabrizi M, Emami AH, Alimoghaddam K, Hadjati J, Mirahmadian M, Jeddi-Tehrani M. Upregulation of CD200 is associated with Foxp3+ regulatory T cell expansion and disease progression in acute myeloid leukemia. *Tumor Biology*. 2013 Feb;34(1):531-42.
11. Wu CP, Qing X, Wu CY, Zhu H, Zhou HY. Immunophenotype and increased presence of CD4+ CD25+ regulatory T cells in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Oncology Letters*. 2012 Feb 1;3(2):421-4.
12. Shenghui Z, Yixiang H, Jianbo W, Kang Y, Laixi B, Yan Z, Xi X. Elevated frequencies of CD4+ CD25+ CD127lo regulatory T cells is associated to poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *International journal of cancer*. 2011 Sep 15;129(6):1373-81.
13. Maury S, Lemoine FM, Hicheri Y, Rosenzweig M, Badoual C, Cherai M, Beaumont JL, Azar N, Dhedin N, Sirvent A, Buzyn A. CD4+ CD25+ regulatory T cell depletion improves the graft-versus-tumor effect of donor lymphocytes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Science translational medicine*. 2010 Jul 21;2(41):41ra52-.
14. Kwon HK, Lee CG, So JS, Chae CS, Hwang JS, Sahoo A, Nam JH, Rhee JH, Hwang KC, Im SH. Generation of regulatory dendritic cells and CD4+ Foxp3+ T cells by probiotics administration suppresses immune disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010 Feb 2;107(5):2159-64.
15. Togashi Y, Shitara K, Nishikawa H. Regulatory T cells in cancer immunosuppression—implications for anticancer therapy. *Nature reviews Clinical oncology*. 2019 Jun;16(6):356-71.
16. Yoshida T, Malherbe CJ, Okon K, Miura Y, Hattori M, Matsuda H, Muller CJ, Joubert E. Enhanced production of Th1-and Th2-type antibodies and induction of regulatory T cells in mice by oral administration of Cyclopia extracts with similar phenolic composition to honeybush herbal tea. *Journal of Functional Foods*. 2020 Jan 1;64:103704.

17. Beyer M, Classen S, Endl E, Kochanek M, Weihrauch MR, Debey-Pascher S, Knolle PA, Schultze JL. Comparative approach to define increased regulatory T cells in different cancer subtypes by combined assessment of CD127 and FOXP3. *Clinical and Developmental Immunology*. 2011 Oct;2011.
18. Yamamoto T, Yanagimoto H, Satoi S, Toyokawa H, Hirooka S, Yamaki S, Yui R, Yamao J, Kim S, Kwon AH. Circulating CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in patients with pancreatic cancer. *Pancreas*. 2012 Apr 1;41(3):409-15.
19. Li AH, Qiu GQ, Gu WY, Ling Y, Weng KZ, Tan Q, Cao XS. Expression of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in the patients with acute lymphocytic leukemia. *Xi bao yu fen zi Mian yi xue za zhi= Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*. 2007 May 1;23(5):439-42.
20. Arandi N, Ramzi M, Safaei F, Monabati A. Overexpression of indoleamine 2, 3-dioxygenase correlates with regulatory T cell phenotype in acute myeloid leukemia patients with normal karyotype. *Blood research*. 2018 Dec;53(4):294.
21. Johnson 3Rd BA, Baban B, Mellor AL. Targeting the immunoregulatory indoleamine 2, 3 dioxygenase pathway in immunotherapy. *Immunotherapy*. 2009 Jul;1(4):645-61.
22. Baban B, Chandler PR, Sharma MD, Pihkala J, Koni PA, Munn DH, Mellor AL. IDO activates regulatory T cells and blocks their conversion into Th17-like T cells. *The Journal of Immunology*. 2009 Aug 15;183(4):2475-83.
23. Curti A, Aluigi M, Pandolfi S, Ferri E, Isidori A, Salvestrini V, Durelli I, Horenstein AL, Fiore F, Massaia M, Piccioli M. Acute myeloid leukemia cells constitutively express the immunoregulatory enzyme indoleamine 2, 3-dioxygenase. *Leukemia*. 2007 Feb;21(2):353-5.
24. Chamuleau M, van de Loosdrecht A, Hess C, Janssen J, Zevenbergen A, Delwel R, Valk P, Löwenberg B, Ossenkoppele G. High INDO (indoleamine 2, 3-dioxygenase) mRNA level in blasts of acute myeloid leukemic patients predicts poor clinical outcome. *haematologica*. 2008 Dec 1;93(12):1894-8.
25. Curti A, Trabanelli S, Onofri C, Aluigi M, Salvestrini V, Ocadlikova D, Evangelisti C, Rutella S, De Cristofaro R, Ottaviani E, Baccarani M. Indoleamine 2, 3-dioxygenase-expressing leukemic dendritic cells impair a leukemia-specific immune response by inducing potent T regulatory cells. *haematologica*. 2010 Dec;95(12):2022.
26. Galon J, Marincola FM, Angell HK, Thurin M, Lugli A, Zlobec I, Berger A, Bifulco C, Botti G, Tatangelo F, Britten CM. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *Journal of translational medicine*. 2012 Dec;10(1):1-0.
27. Behrman K. Jenson. Nelson textbook of pediatrics. by J Barbara, Stoll, RM Kleigman, 17th ed, USA, Saunders. 2004:590-1.
28. Hjalgrim LL, Rostgaard K, Schmiegelow K, Söderhäll S, Kolmannskog S, Vettenranta K, Kristinsson J, Clausen N, Melbye M, Hjalgrim H, Gustafsson G. Age-and sex-specific incidence of childhood leukemia by immunophenotype in the Nordic countries. *Journal of the National Cancer Institute*. 2003 Oct 15;95(20):1539-44.
29. McNally RJ, Rowland D, Roman E, Cartwright RA. Age and sex distributions of hematological malignancies in the UK. *Hematological oncology*. 1997 Nov;15(4):173-89.
30. Miller KD, Fidler-Benaoudia M, Keegan TH, Hipp HS, Jemal A, Siegel RL. Cancer statistics for adolescents and young adults, 2020. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2020 Nov;70(6):443-59.
31. Idris SZ, Hassan N, Lee LJ, Md Noor S, Osman R, Abdul-Jalil M, Nordin AJ, Abdullah M. Increased regulatory T cells in acute lymphoblastic leukaemia patients. *Hematology*. 2016 Apr 20;21(4):206-12.
32. Liu SX, Xiao HR, Wang GB, Chen XW, Li CG, Mai HR, Yuan XL, Liu GS, Wen FQ. Preliminary investigation on the abnormal mechanism of CD4⁺ FOXP3⁺ CD25^{high} regulatory T cells in pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2018 Aug 1;16(2):1433-41.
33. Mansour I, Zayed RA, Said F, Latif LA. Indoleamine 2, 3-dioxygenase and regulatory T cells in acute myeloid leukemia. *Hematology*. 2016 Sep 13;21(8):447-53.

34. Moon HW, Kim BH, Park CM, Hur M, Yun YM, Kim SY, Lee MH. CD4⁺ CD25^{high}FoxP3⁺ regulatory T-cells in hematologic diseases. *The Korean Journal of Laboratory Medicine*. 2011 Oct;31(4):231.
35. Buggins AG, Milojkovic D, Arno MJ, Lea NC, Mufti GJ, Thomas NS, Hirst WJ. Microenvironment produced by acute myeloid leukemia cells prevents T cell activation and proliferation by inhibition of NF- κ B, c-Myc, and pRb pathways. *The Journal of Immunology*. 2001 Nov 15;167(10):6021-30.
36. Orleans-Lindsay JK, Barber LD, Prentice HG, Lowdell MW. Acute myeloid leukaemia cells secrete a soluble factor that inhibits T and NK cell proliferation but not cytolytic function—implications for the adoptive immunotherapy of leukaemia. *Clinical & Experimental Immunology*. 2001 Dec;126(3):403-11.
37. Ivanova-Todorova E, Bochev I, Dimitrov R, Belemezova K, Mourdjeva M, Kyurkchiev S, Kinov P, Altankova I, Kyurkchiev D. Conditioned medium from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induces CD4⁺ FOXP3⁺ cells and increases IL-10 secretion. *Journal of Biomedicine and biotechnology*. 2012 Oct;2012.
38. De Matteis S, Molinari C, Abbati G, Rossi T, Napolitano R, Ghetti M, Rorà D, Luserna AG, Musuraca G, Lucchesi A, Rigolin GM. Immunosuppressive Treg cells acquire the phenotype of effector-T cells in chronic lymphocytic leukemia patients. *Journal of translational medicine*. 2018 Dec;16(1):1-9.
39. Shimauchi T, Kabashima K, Tokura Y. Adult T-cell leukemia/lymphoma cells from blood and skin tumors express cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4 and Foxp3 but lack suppressor activity toward autologous CD8⁺ T cells. *Cancer science*. 2008 Jan;99(1):98-106.
40. Roncador G, Garcia JF, Maestre L, Lucas E, Menarguez J, Ohshima K, Nakamura S, Banham AH, Piris MA. FOXP3, a selective marker for a subset of adult T-cell leukaemia/lymphoma. *Leukemia*. 2005 Dec;19(12):2247-53.
41. Corm S, Berthon C, Imbenotte M, Biggio V, Lhermitte M, Dupont C, Briche I, Quesnel B. Indoleamine 2, 3-dioxygenase activity of acute myeloid leukemia cells can be measured from patients' sera by HPLC and is inducible by IFN- γ . *Leukemia research*. 2009 Mar 1;33(3):490-4.
42. Folgiero V, Goffredo BM, Filippini P, Masetti R, Bonanno G, Caruso R, Bertaina V, Mastronuzzi A, Gaspari S, Zecca M, Torelli GF. Indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 (IDO1) activity in leukemia blasts correlates with poor outcome in childhood acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2014 Apr 4;5(8):2052.
43. Fukuno K, Hara T, Tsurumi H, Shibata Y, Mabuchi R, Nakamura N, Kitagawa J, Shimizu M, Ito H, Saito K, Moriwaki H. Expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase in leukemic cells indicates an unfavorable prognosis in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics. *Leukemia & lymphoma*. 2015 May 4;56(5):1398-405.
44. Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C, Orabona C, Bianchi R, Belladonna ML, Volpi C, Fioretti MC. Tryptophan catabolism generates autoimmune-preventive regulatory T cells. *Transplant immunology*. 2006 Dec 1;17(1):58-60.
45. Curti A, Isidori A, Ferri E, Terragna C, Neyroz P, Cellini C, Ratta M, Baccarani M, Lemoli RM. Generation of dendritic cells from positively selected CD14⁺ monocytes for anti-tumor immunotherapy. *Leukemia & lymphoma*. 2004 Jul 1;45(7):1419-28.
46. Kondelkova K, Vokurková D, Krejsek J, Borská L, Fiala Z, Ctírad A. Regulatory T cells (TREG) and their roles in immune system with respect to immunopathological disorders. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2010 Jan 1;53(2):73.
47. Wang XF, Wang HS, Wang H, Zhang F, Wang KF, Guo Q, Zhang G, Cai SH, Du J. The role of indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) in immune tolerance: focus on macrophage polarization of THP-1 cells. *Cellular immunology*. 2014 May 1;289(1-2):42.