

**بیان تریجی مولکول های CD200 و ایندول آمین ۲ و ۳ دی اکسیژناز-۱ (IDO) در بیماران مبتلا به لوسمی****میلوئیدی حاد (AML) عود شده**علی معاریان<sup>۱\*</sup>، سارا عبدالملکی<sup>۲،۳</sup>

۱. مرکز تحقیقات سلولهای بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران

۲. مرکز تحقیقات تالاسمی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. گروه ایمنولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

**چکیده**

**زمینه و هدف:** یکی از عوامل اصلی پاتوژنز و پیشرفت AML به عنوان یک بدخیمی سیستمیک، نقص در پاسخ های ایمنی از طریق افزایش عملکردهای تنظیمی و مهاری است که می تواند به عنوان یکی از اهداف ایمنوترابی در درمان این بیماران مورد استفاده قرار گیرد. افزایش بیان مولکول CD200 به عنوان یک مولکول سرکوبگر ایمنی و آنزیم مهار کننده پاسخ های ایمنی به نام اندول آمین ۲ و ۳ دی اکسیژناز (IDO) در برخی از سرطان ها و بدخیمی های هماتوپویتیک در مطالعات جداگانه ای مشاهده شده و همچنین ارتباط آنها با پیشرفت و پیش آگهی بد بیماران AML نشان داده شده است. در این مطالعه به بررسی همزمان بیان و ارتباط مولکول های CD200 و IDO به عنوان دو فاکتور مهم با عملکردهای نسبتاً مشابه در سرکوب پاسخ های ایمنی، در بیماران AML تازه تشخیص و دچار عود پرداخته شده است.

**روش بررسی:** در این مطالعه از سلول های تک هسته ای نمونه های خون محیطی 48 (PBMCs) بیمار تازه تشخیص و دچار عود مبتلا به AML و همچنین ۳۲ فرد نرمال (به عنوان کنترل) استفاده شد. میزان بیان مولکول های CD200 در سطح سلول ها به روش فلوسایتومتری و بیان نسبی ژن IDO-1 در این سلول ها به کمک تکنیک Real-Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند و نهایتاً جهت انجام آنالیزهای آماری نتایج به دست آمده، از نرم افزار Spss17 استفاده شد.

**یافته ها:** نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که مولکول های CD200 ( $P=0.02$ ) و IDO-1 ( $P=0.044$ )، به طور کاملاً معنی داری در نمونه های بیماران لوسمیک و خصوصاً بیماران AML دچار عود افزایش بیان دارند. مقایسه زیرگروه های FAB این بیماران از نظر بیان CD200 اختلاف معنی داری را نشان نداد. در حالی که در مورد مولکول IDO-1 میان زیرگروه های M4 با M3 اختلاف کمی دیده شد ( $P=0.01$ ) همچنین مشاهده شد که میان بیان این دو مولکول در تمامی بیماران ( $r=0.022$ ,  $P=0.55$ ) و به ویژه گروه بیماران عود شده ( $r=0.009$ ,  $P=0.74$ ) رابطه مستقیم و همبستگی معنی داری وجود دارد، در صورتی که این ارتباط در افراد نرمال دیده نشد.

**نتیجه گیری:** در مجموع با توجه به افزایش بیان CD200 و IDO-1 و نقش و ارتباط قوی آن ها در بیماران AML عود شده و همچنین ارتباط دو طرفه این مولکول ها با لنفوسیت های T-reg در القاء و پیشرفت این بیماری، به نظر می رسد سنجش همزمان آن ها جهت بررسی دقیق تر پیش آگهی مفید بوده و مهار همزمان آن ها می تواند جهت تقویت پاسخ ایمنی اختصاصی و اثرات ایمنوترابی مشخصاً در بیماران دچار عود بسیار مؤثر باشد.

**کلمات کلیدی:** لوسمی میلوئیدی حاد AML، CD200، IDO، مهار پاسخ ایمنی، پیشرفت بیماری، عود

نویسنده مسئول: علی معاریان

آدرس: ایران، گرگان، دانشگاه علوم پزشکی گلستان

ایمیل: alimemarian@goums.ac.ir



## مقدمه

افزایش بیان با کاهش و سرکوب پاسخ های ضد توموری مرتبط باشد (۱۷ و ۱۸).

در چندین مطالعه ارتباط مستقیم و دو طرفه تولید و فعالیت آنزیم مهار کننده پاسخ های ایمنی به نام اندول آمین ۲ و ۳ دی اکسیژناز (IDO) با میزان و فعالیت سلول های T-reg نشان داده شده است (۲۱-۱۹). از طرف دیگر مشاهده شده است که میزان این آنزیم در برخی از بیماران سرطانی و همچنین AML افزایش می یابد بطوری که این حالت می تواند منجر به مهار پاسخ های ایمنی گردد (۲۳ و ۲۲ و ۱۱). از آن جایی که در مطالعه قبلی ما نیز ارتباط مستقیم میان بیان مولکول CD200 و میزان سلول های T-reg و فعالیت آن ها در بیماران AML نشان داده شد (۸)، در این مطالعه برای اولین بار به بررسی ارتباط میان بیان مولکول های CD200 و IDO به عنوان عوامل مهاری، در بیماران AML تازه تشخیص و دچار عود پرداخته شد.

## روش بررسی

## بیماران و افراد کنترل

در این مطالعه از ۴۸ بیمار مبتلا به AML مراجعه کننده به بخش خون بیمارستان های ولیعصر (امام خمینی) و شریعتی تهران (۲۹ مرد و ۱۹ زن با میانگین سنی ۴۸٫۶ و محدوده ۷۱-۱۹ سال) که بدخیمی سلول های پیش ساز مغز استخوان در آن ها به تأیید پزشک متخصص خون رسیده بود، پس از اخذ رضایت نامه، نمونه گیری خون محیطی (حدود ۱۰-۱۵ میلی لیتر) به عمل آمد. این نمونه گیری در ۳۳ مورد بلافاصله پس از تشخیص و قبل از شروع درمان و در ۱۵ مورد پس از عود بیماری صورت گرفت. در جدول ۱ مشخصات بیماران شامل سن، جنس، درصد سلول های نابالغ (بلاست) در زمان نمونه گیری و زیر نوع بیماری بر اساس سیستم نامگذاری FAB نشان داده شده است. در

لوسمی میلوئیدی حاد (AML) یک بیماری پیچیده و ناهمگن از لحاظ ژنتیپی و فنوتیپی بوده و با تکثیر و مقاومت به آپوپتوز سلول های پیش ساز خونساز رده میلوئیدی و تجمع این سلول ها در مغز استخوان و خون محیطی شناسایی می شود (۱). AML شایع ترین لوسمی رده میلوئیدی در بالغین و شایع ترین لوسمی حاد می باشد (۲). زیرگروه ها و انواع مختلف AML احتمالاً می توانند در اثر مکانیسم های بیماری زایی مختلفی ایجاد شوند که این امر بیانگر ارتباط عملکردی بین ناهنجاری های ژنتیکی و مولکولی مختلف با الگوی بیان برخی از ژن ها و همچنین با پیش آگهی بیماری باشد (۳-۵).

مطالعات صورت گرفته در ارتباط با پاسخ های ایمنی در بیماران مبتلا به AML، بطور کلی افزایش فعالیت مهاری ایمنی را در این بیماران نشان می دهد که به عنوان یکی از عوامل اصلی بیماری زایی و پیشرفت بیماری به شمار می آیند (۹-۶). همچنین مشخص شده است که حضور و فعالیت بیشتر لنفوسیت های T تنظیمی (T-reg) با ایجاد عود (relaps) و پیش آگهی بد در این بیماران مرتبط بوده و مهار و کاهش فعالیت آن ها می تواند در افزایش کارایی درمان و ایمونوتراپی بیماران AML مؤثر واقع گردد (۱۳-۸).

CD200 به عنوان یکی از مولکول های دخیل در تنظیم پاسخ های ایمنی و در نتیجه القاء تولرانس مطرح بوده و حتی از آن به عنوان یک مارکر مهم مهاری یاد می شود (۱۴-۱۶). همچنین مطالعات انجام شده نشان می دهند که مولکول CD200 در بسیاری از سرطان ها و بدخیمی های خونی بیان قابل توجهی داشته و به نظر می رسد این

پس از رنگ آمیزی برای شناسایی سلول های نشان دار شده از دستگاه فلوسایتومتری Facs Calibur BD (Becton-Dickinson, CA, USA) استفاده شد. در ابتدا برای تعیین محدوده های سلولی مورد نظر و همچنین حذف رنگ پس زمینه (background) برای هر نمونه به شکل مجزا از سلول های کنترل منفی که با آنتی بادی های ایزوتایپ کنترل مربوطه مجاور شده بودند، استفاده شد (۸).

### استخراج RNA، سنتز cDNA و آزمون realtime-PCR برای ارزیابی بیان ژن IDO-1

پس از شستشوی سلول ها با بافر فسفات (PBS)، آن ها در محلول مخصوص لیز کننده سلول کیت استخراج RNA (RNasy Mini Kit, QIAGEN, USA) در لوله های RNase-DNase free پیتاژ شدند تا تمامی سلول ها کاملاً لیز شوند. استخراج RNA طبق دستورالعمل شرکت سازنده، با استفاده از ستون های افینیتی مربوطه و طی چندین مرحله شستشو صورت گرفت. پس از به دست آوردن RNA با خلوص و کیفیت مناسب، ۱ میکروگرم از آن با استفاده از کیت کواژن QuantiTect reverse transcription) برای تهیه cDNA استفاده شد. سپس این cDNA ها جهت انجام آزمون Realtime-PCR با Master-Mix حاوی SYBR Green (PrimerDesign, Southampton, UK) و با استفاده از دستگاه (ABI, Applied Biosystems, ABI USA) و پرایمرهای اختصاصی برای ارزیابی نسبی بیان ژن IDO-1 به همراه ژن  $\beta$ -actin به عنوان کنترل داخلی، صورت گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده در آزمون PCR به صورت زیر است (۸ و ۲۵).

این مطالعه برای مقایسه نتایج بیان مولکول های CD200 و IDO-1، از تعداد ۳۲ فرد سالم داوطلب (۲۰ مرد و ۱۲ زن با میانگین سنی ۴۲/۶ و محدوده ۱۷-۶۸ سال) نیز نمونه های خون محیطی (۱۰ تا ۱۵ میلی لیتر) به عنوان کنترل اخذ شد.

### جداسازی سلول های بلاستی و تک هسته ای

جداسازی لایه سلول های تک هسته ای خون محیطی (PBMCs) با استفاده از روش سانتریفوژ گرادیان چگالی بر روی فایکول با چگالی ۱/۰۷۷ صورت پذیرفت. پس از انجام سانتریفوژ، حلقه شیری رنگ که حاوی سلول های تک هسته ای بود، جمع آوری شده و برای مراحل بعدی مطالعه ذخیره گردید (۲۴).

### رنگ آمیزی سطح سلولی مارکر CD200 توسط آنتی بادی های منوکلونال متصل به ماده فلورسنت و ارزیابی آن ها توسط روش فلوسایتومتری

در این رنگ آمیزی از آنتی بادی منوکلونال موشی ضد CD200 انسانی که با ماده فلورسنت PE کونژوگه بود (Biolegend, San Diego, USA) استفاده شد. به این ترتیب پس از شستشوی سلول ها با بافر PBS و تقسیم سلول های مورد نظر (به تعداد حدوداً ۵۰۰ هزار در لوله های مخصوص فلوسایتومتری و با حجم ۱۰۰  $\mu$ l) میزان ۵ میکرولیتر از آنتی بادی کونژوگه (بر اساس میزان پیشنهادی شرکت تولید کننده) به هر لوله افزوده و مخلوط شد و لوله ها به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و در شرایط تاریکی نگهداری شدند. سپس یک بار با بافر PBS شستشو شده و در پایان مقدار ۰/۵ میلی لیتر از محلول فیکس کننده (پارافرمالدئید ۱ درصد در PBS) به تمامی لوله ها افزوده شد.

### آنالیزهای آماری داده ها

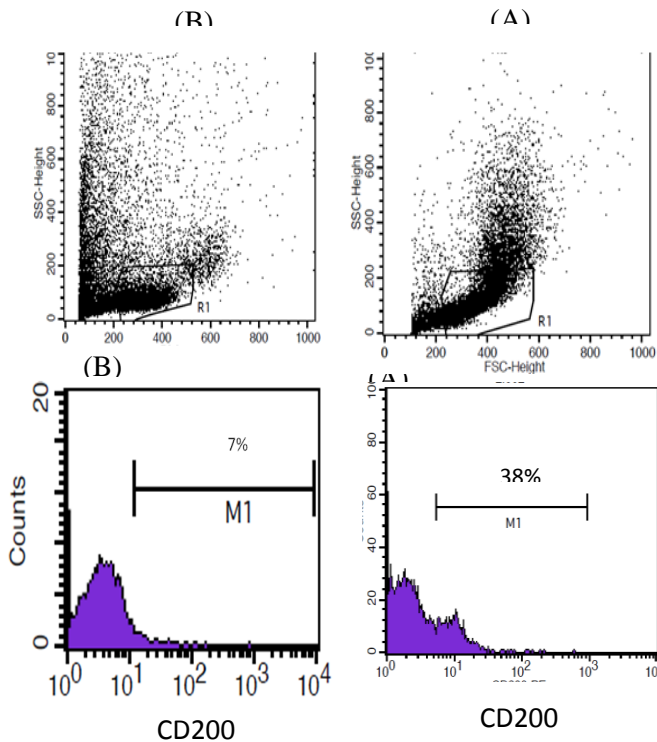
بیمار و افراد سالم هیچگونه اختلاف معنی داری را از نظر بیان CD200 نشان نداد.

جهت مقایسه داده ها و تعیین اختلافات مربوطه در گروه های مورد بررسی از تست Student's T (برای متغیرهای دارای توزیع نرمال) و تست Mann-Whitney U (برای متغیرهای دارای توزیع غیر نرمال) استفاده گردید. همچنین آزمون Spearman جهت آنالیزهای همبستگی مورد استفاده قرار گرفت. P.value کمتر از ۰/۰۵ به عنوان وجود اختلاف معنی دار در نظر گرفته شد. تمامی محاسبات و آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS 17 انجام گردید.

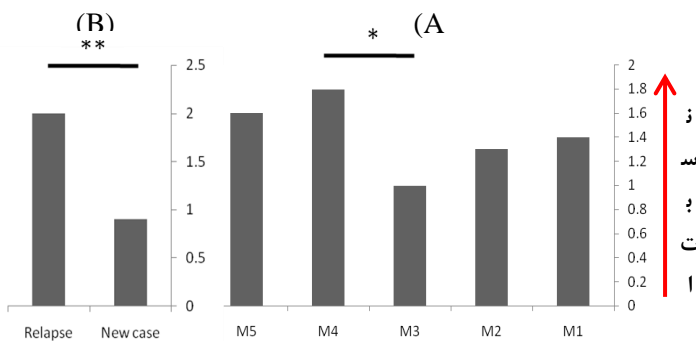
### یافته ها

ارزیابی میزان فراوانی مولکول CD200 در بیماران و افراد سالم

برای بررسی بیان مولکول CD200 در سطح سلول ها در بیماران و افراد نرمال از روش فلوسایتومتری استفاده شد که نتایج مربوط به یک نمونه بیمار و یک نمونه نرمال در شکل ۱ نشان داده شده است. بر اساس آنالیزهای صورت گرفته مشخص شد که میزان بیان مولکول CD200 در سلول های توموری بیماران در مقایسه با سلول های افراد نرمال از نظر آماری بطور معنی داری دچار افزایش بود ( $P=0.02$ ) و همچنین حدود ۵۷ درصد از بیماران از نظر بیان این مولکول (با در نظر گرفتن cut off ۱۰ درصد بیان)، مثبت بودند. مقایسه زیرگروه های بیماران موجود در این مطالعه بر اساس طبقه بندی FAB (M1-M5) اختلاف معنی داری را در مورد بیان CD200 نشان نداد (شکل ۲ A) در صورتی که گروه بیماران تازه تشخیص در مقایسه با بیماران دچار عود دارای اختلاف معنی داری بودند ( $P=0.025$ ) (شکل ۲ B). مقایسه میان خانم ها و آقایان در هر دو گروه



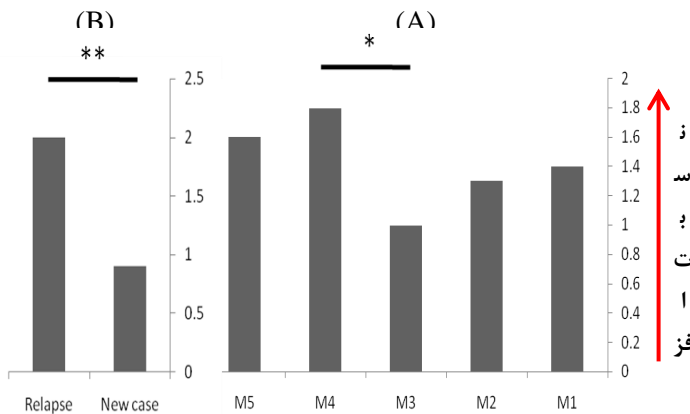
شکل ۱- بیان مارکر CD200 در سلول های خون محیطی یک نمونه (A) AML و یک فرد نرمال (B) با روش فلوسایتومتری



شکل ۲- میانگین درصد بیان CD200 در سطح سلول های خون محیطی بیماران AML در زیرگروه های FAB (A) و بیماران تازه تشخیص و عود شده (B)

بر اساس آنالیزهای آماری صورت گرفته نسبت بیان مولکول IDO-1 در بیماران AML در مقایسه با افراد نرمال اختلاف معنی داری نشان داد ( $P < 0.05$ ).

شکل ۴- میانگین بیان نسبی IDO-1 در سلول های خون محیطی بیماران AML در زیرگروه های FAB (A) و بیماران تازه تشخیص و عود شده (B)



بر اساس آنالیزهای آماری صورت گرفته نسبت بیان مولکول IDO در میان زیرگروه های FAB تنها بین بیماران M3 و M4 اختلاف معنی داری نشان داد (A) و اختلاف کاملاً معنی داری بین بیماران تازه تشخیص و عود شده نیز دیده شد ( $*=P < 0.05$ ;  $**P < 0.01$ ).

بررسی همبستگی میان متغیرهای مختلف ارزیابی شده بیماران و افراد نرمال

آزمون همبستگی صورت گرفته میان متغیرهای بررسی شده در بیماران نشان داد که ارتباط معنی داری میان بیان CD200 و IDO-1 با درصد سلول های بلاستی نابالغ بیماران دیده نشد در صورتی که این ارتباط در حالت عود بیماری معنی دار بود (جدول ۲). از طرف دیگر میان بیان مولکول CD200 با IDO-1 در حالت کلی بیماران و همچنین در تمامی زیرگروه های FAB آن ها (به تفکیک در تمامی زیرگروه های M1-M5 همبستگی کاملاً معنی

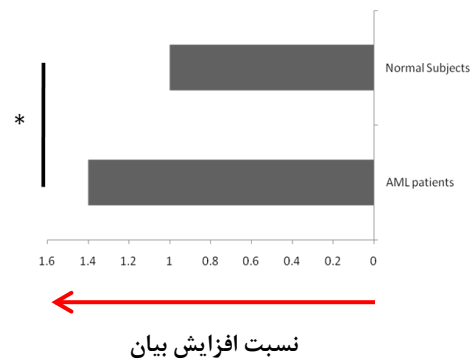
بر اساس آنالیزهای آماری صورت گرفته بیان مولکول CD200 در میان زیرگروه های FAB اختلاف معنی داری نشان نداد (A) در صورتی که بین بیماران تازه تشخیص و عود شده این اختلاف معنی دار بود ( $P < 0.05$ )

بررسی میزان بیان ژن IDO-1 در سلول های خون محیطی

سطوح کمی mRNA مولکول IDO به روش تکنیک Real-time PCR در این سلول ها اندازه گیری شد و نتایج به دست آمده افزایش نسبی معنی دار بیان این مولکول را در سلول های توموری بیماران در مقایسه با نمونه های نرمال نشان داد ( $P = 0.044$ ) (شکل ۳). مقایسه زیرگروه های بیماران بر اساس طبقه بندی FAB با یکدیگر در مورد بیان IDO-1 تنها در زیرگروه M4 در مقایسه با زیرگروه M3 اختلاف معنی داری را نشان داد ( $P = 0.01$ ) (شکل ۴ A). علاوه بر آن مشاهده شد که گروه بیماران دچار عود در مقایسه با بیماران تازه تشخیص، دارای افزایش کاملاً معنی داری از IDO-1 هستند ( $P = 0.003$ ) (شکل ۴ B). مقایسه میان زنان و مردان در هر دو گروه بیمار و افراد سالم هیچگونه اختلاف معنی داری را از نظر بیان IDO-1 نشان نداد.

شکل ۳- میانگین بیان نسبی IDO-1 در سلول های خون

محیطی بیماران AML و افراد نرمال



داری میان این متغیرها با تغییرات سنی بیماران مشاهده نشد. ضمناً بررسی های صورت گرفته در مورد متغیرهای مذکور در افراد نرمال هیچگونه ارتباطی را نشان نداد.

داری وجود داشت و این ارتباط در شرایط عود بیماری بسیار قوی تر دیده شد (جدول ۲) در حالی که ارتباط معنی

جدول ۱- برخی مشخصات و یافته های آزمایشگاهی بیماران مبتلا به AML

کد بیمار	سن (سال)	جنس	سلول های نابالغ مغز استخوان (%)	گروه های FAB
R1	35	M	52	M4
ND2	51	F	80	M5
ND3	38	M	34	M3
ND4	55	M	70	M4
ND5	45	M	55	M3
ND6	55	M	70	M4
R7	58	M	76	M4
ND8	48	F	91	M5
R9	67	M	69	M2
R10	77	F	53	M5
ND11	33	F	57	M2
ND12	67	F	40	M4
ND13	27	F	60	M4
R14	46	M	98	M1
ND15	36	M	80	M3
ND16	58	M	NA	M3
ND17	60	M	90	NA
ND18	49	F	NA	M5
ND19	39	M	75	M3
R20	42	M	52	M4
ND21	45	F	65	M5
ND22	26	M	90	M4
ND23	71	F	90	M3
ND24	53	M	48	M2
R25	61	M	53	M1
ND26	32	F	76	M4
ND27	40	F	80	M3
ND28	70	M	57	M3
ND29	53	M	90	M3
R30	62	F	90	M5
R31	67	M	49	M1
ND32	55	F	83	NA
ND33	31	M	46	M1
ND34	17	M	65	M4
ND35	38	M	95	M4
ND36	47	F	55	M5
R37	55	F	63	M4
R38	42	M	75	M5
ND39	49	M	53	M4
ND40	57	F	NA	M6
ND41	68	M	90	M2
R42	86	M	91	M3
ND43	31	F	80	NA
R44	44	M	30	M5
ND45	62	F	60	M5
R46	19	M	NA	M2
ND47	28	M	70	M3
R48	47	F	67	M4

جدول ۲- میزان همبستگی متغیرهای بررسی شده بیماران AML

P.value	ضریب همبستگی (r)	
۰/۰۵۵	۰/۴۱	میزان بیان CD200 با درصد سلول های نابالغ در تمامی بیماران AML
۰/۰۲۱	۰/۶۲	میزان بیان CD200 با درصد سلول های نابالغ در بیماران AML عود شده
۰/۰۶۲	۰/۳۸	میزان بیان IDO با درصد سلول های نابالغ در تمامی بیماران AML
۰/۰۱	۰/۶۶	میزان بیان IDO با درصد سلول های نابالغ در بیماران AML عود شده
۰/۰۲۲	۰/۵۵	میزان بیان CD200 با میزان بیان IDO در تمامی بیماران AML
۰/۰۰۹	۰/۷۴	میزان بیان CD200 با میزان بیان IDO در بیماران AML عود شده

### بحث و نتیجه گیری

یکی از عوامل اصلی بیماری زایی AML به عنوان یک بدخیمی سیستمیک، نقص در پاسخ های ایمنی از طریق افزایش عملکردهای تنظیمی و مهارتی است که به عنوان فاکتور مهمی در کاهش میزان بهبودی بیماران مبتلا نیز به شمار می آید. این امر همچنین می تواند به عنوان یکی از اهداف ایمونوتراپی در درمان این بیماران مورد استفاده قرار گیرد. (۹، ۲۶) مطالعات گذشته افزایش بیان مولکول CD200 را در برخی از بدخیمی های هماتوپویتیک و همچنین ارتباط آن را با پیشرفت و پیش آگهی بد بیماران AML نشان داده اند (۱۷، ۲۷-۲۹). از طرف دیگر در مطالعه قبلی ما بر روی بیماران AML مشخص شد که افزایش میزان این مولکول با افزایش میزان لنفوسیت های T

بیماران عود شده و شدت بیماری آن‌ها منطقی و توجیه پذیر به نظر می‌رسد.

مقایسه زیرگروه‌های FAB بیماران از نظر بیان CD200 و IDO-1 (به ترتیب اشکال A<sub>2</sub> و A<sub>3</sub>) که برای اولین بار صورت گرفته است، نشان داد که IDO-1 تنها در زیرگروه M4 در مقایسه با M3 افزایش معنی داری نشان می‌دهد (شکل A<sub>4</sub>) که این اختلاف در مورد مولکول CD200 هم مشاهده شد اما معنی دار نبود (شکل A<sub>2</sub>). از آن جایی که این زیرگروه‌های FAB از نظر قرار گرفتن تعداد بیماران عود شده در آن‌ها با یکدیگر متفاوت هستند (جدول ۱)، این اختلاف بیان، صرفاً می‌تواند به علت فراوانی بیماران عود شده به میزان بیشتر در زیرگروه M4 و به میزان کمتر در زیرگروه M3 باشد (جدول ۱) که احتمالاً در صورت افزایش تعداد نمونه‌ها و توزیع متناسب‌تر آن‌ها در تمامی زیرگروه‌ها این اختلافات کمتر خواهند شد.

آنالیزهای همبستگی در ارتباط با مولکول‌های IDO-1 و CD200 نشان می‌دهند که میان بیان ژن‌های آن‌ها در افراد نرمال ارتباطی دیده نمی‌شود اما در بیماران AML بیان آن‌ها با هم ارتباط مستقیمی دارد (جدول ۲) به طوری که ارتباط بیانی آن‌ها در همه زیرگروه‌های FAB بیماران به صورت جداگانه نیز مشاهده شد که این امر بیان‌گر پیوستگی بیانی آن‌ها در تمامی بیماران AML می‌باشد. نکته جالب توجه این که این ارتباط مستقیم بیانی در حالت‌های عود بیماری بسیار قوی‌تر و معنی‌دارتر است (جدول ۲). بر اساس تنها دو مطالعه هم‌راستای صورت گرفته به شکل invitro توسط Fallarino و همکاران در مورد ارتباط آنزیم IDO پس از اتصال CD200-CD200R، نشان داده شد که انتقال سیگنال ناشی از این اتصال در سلول‌های DC موشی می‌تواند تولید این آنزیم را دچار افزایش کند (۳۴ و ۳۵). از طرف دیگر بیان هر دو مولکول،

تنظیمی و فعالیت آن‌ها مرتبط می‌باشد (۸). با توجه به وجود ارتباط میان پاسخ‌های تنظیمی، لنفوسیت‌های T-reg و فعالیت آنزیم IDO-1 با یکدیگر و همچنین نقش و ارتباط IDO-1 در پیش‌آگهی بد این بیماران (۱۹-۲۳)، در این مطالعه به بررسی همزمان بیان و ارتباط مولکول‌های CD200 و IDO-1 به عنوان دو فاکتور مهم با عملکردهای نسبتاً مشابه در تنظیم پاسخ‌های ایمنی، در بیماران AML تازه تشخیص و دچار عود (relapse) برای اولین بار پرداخته شده است.

پاسخ مؤثر لنفوسیت‌های T به آنتی‌ژن‌های توموری قوی به میزان تریپتوفان وابسته بوده و متابولیت‌های واسطه تجزیه آن تحت فعالیت آنزیم IDO منجر به کاهش فعالیت و بقای این سلول‌ها می‌گردند (۳۰). افزایش میزان IDO-1 که در مطالعه حاضر در بیماران AML و خصوصاً بیماران AML دچار عود (اشکال ۳ و B<sub>4</sub>) و همچنین مطالعات قبلی نشان داده شده است، از طریق مذکور می‌تواند در سرکوب پاسخ‌های ایمنی پیش‌آگهی بد بیماران AML نقش مهمی ایفا کند (۲۵ و ۲۱). از طرف دیگر همان طوری که در مطالعات قبلی نیز مشخص شده است، افزایش بیان مولکول CD200 به عنوان یک عامل سرکوب‌گر پاسخ‌های ایمنی در بیماران AML وجود دارد (۲۹ و ۸) به طوری که علاوه بر افزایش بیان معنی‌دار آن در بیماران ما، بیش از نیمی از کل بیماران (۵۷ درصد) این مولکول را در سطح سلول‌های لوسمیک خود بیان نموده‌اند که به طور جالب توجهی اکثر این بیماران در گروه عود شده می‌باشند (شکل B<sub>2</sub>). مطالعات مرتبط با انتقال سیگنال مسیر ERK در بیماران AML، نشان داده است که افزایش فعالیت و ارتباط این مسیر با پیش‌آگهی بد بیماران مرتبط است (۳۱-۳۲) که این موضوع با توجه به ارتباط بیان CD200 با فعالیت این مسیر انتقال سیگنال (۳۳) و پیش‌آگهی بد

توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر و ارتباط دوطرفه این مولکول‌ها با لنفوسیت‌های T-reg و همچنین نقش مهم آن‌ها در القاء و پیشرفت لوسمی AML، به نظر می‌رسد سنجش همزمان آن‌ها جهت بررسی دقیق‌تر پیش‌آگهی مفید بوده و مهار همزمان آن‌ها می‌تواند جهت افزایش تقویت پاسخ ایمنی و اثرات ایمونوتراپی و همچنین کاهش حداقل سلول‌های لوسمیک باقیمانده (MRD)، خصوصاً در بیماران دچار عود بسیار مؤثر باشد.

### تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه علوم پزشکی تهران با کد ۱۰۹۰۱ و همکاری پژوهشگاه ابن‌سینا بوده است. بدین وسیله از سرکار خانم دکتر ماهرو میراحمدیان و جناب آقای دکتر محمود جدی‌تهرانی قدردانی می‌نمایم.

فقط در شرایط عود بیماران ما با میزان سلول‌های نابالغ بدخیم مرتبط می‌باشد (جدول ۲). از آن جایی که هر دو مولکول در پاسخ‌های تنظیم‌ایمنی نقش مهمی ایفا می‌کنند و عکس‌العمل‌های مناسب سیستم ایمنی برای حفظ حالت‌های بهبودی بیماران درمان‌شده (فاز remission) بسیار حائز اهمیت می‌باشد (۹)، لذا به نظر می‌رسد افزایش بیش از حد CD200 و IDO-1 احتمالاً می‌تواند به عنوان یکی از عوامل توجیه‌کننده اختلال پاسخ‌های ایمنی مؤثر و مهار فعالیت‌های ضد توموری لنفوسیت‌های T خاطره‌ای و NK (۳۶ و ۳۷) در این بیماران و در نتیجه تکثیر بیشتر سلول‌های بدخیم و عود بیماری به شمار آید.

چندین مطالعات به شکل جداگانه نقش مهار مولکول‌های CD200 و IDO-1 را در افزایش پاسخ‌های مؤثر ضد توموری نشان داده‌اند به طوری که حتی مهارکننده‌های اختصاصی این مولکول‌ها به عنوان عوامل مکمل درمانی در برخی از سرطان‌ها، پیشنهاد شده است (۴۱-۳۸ و ۱۷). با



## References

1. Stone, R.M., M.R. O'Donnell, and M.A. Sekeres, Acute myeloid leukemia. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2004: p. 98-117.
2. Deschler, B. and M. Lubbert, Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. Cancer, 2006. 107(9): p. 2099-107.
3. McKenzie, S.B., Advances in understanding the biology and genetics of acute myelocytic leukemia. Clin Lab Sci, 2005. 18(1): p. 28-37.
4. Wouters, B.J., C. Koss, and R. Delwel, Gene expression profiling for improved dissection of acute leukemia: a recently identified immature myeloid/T-lymphoid subgroup as an example. Blood Cells Mol Dis, 2008. 40(3): p. 395-400.
5. de la Bletiere, D.R., et al., 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 Med Genomics, 2012. 5: p. 6.
6. Szczepanski, M.J., et al., Increased frequency and suppression by regulatory T cells in patients with acute myelogenous leukemia. Clin Cancer Res, 2009. 15(10): p. 3325-32.
7. Wu, H., et al., Aberrant expression of Treg-associated cytokine IL-35 along with IL-10 and TGF-beta in acute myeloid leukemia. Oncol Lett, 2012. 3(5): p. 1119-1123.
8. Memarian, A., et al., Upregulation of CD200 is associated with Foxp3+ regulatory T cell expansion and disease progression in acute myeloid leukemia. Tumour Biol, 2013. 34(1): p. 531-42.
9. Teague, R.M. and J. Kline, Immune evasion in acute myeloid leukemia: current concepts and future directions. J Immunother Cancer, 2013. 1(13).
10. Delluc, S., et al., Dramatic efficacy improvement of a DC-based vaccine against AML by CD25 T cell depletion allowing the induction of a long-lasting T cell response. Cancer Immunol Immunother, 2009. 58(10): p. 1669-77.
11. Curti, A., et al., Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing leukemic dendritic cells impair a leukemia-specific immune response by inducing potent T regulatory cells. Haematologica, 2010. 95(12): p. 2022-30.
12. Shenghui, Z., et al., Elevated frequencies of CD4(+) CD25(+) CD127lo regulatory T cells is associated to poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. Int J Cancer, 2011. 129(6): p. 1373-81.
13. Maury, S., et al., CD4+CD25+ regulatory T cell depletion improves the graft-versus-tumor effect of donor lymphocytes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Sci Transl Med, 2010. 2(41): p. 41ra52.
14. Barclay, A.N., et al., CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. Trends Immunol, 2002. 23(6): p. 285-90.
15. Gorczynski, R., et al., CD200 is a ligand for all members of the CD200R family of immunoregulatory molecules. J Immunol, 2004. 172(12): p. 7744-9.
16. Holmannova, D., et al., CD200/CD200R paired potent inhibitory molecules regulating immune and inflammatory responses; Part II: CD200/CD200R potential clinical applications. Acta Medica (Hradec Kralove), 2012. 55(2): p. 59-65.
17. Kretz-Rommel, A., et al., CD200 expression on tumor cells suppresses antitumor immunity: new approaches to cancer immunotherapy. J Immunol, 2007. 178(9): p. 5595-605.
18. Rygiel, T.P. and L. Meyaard, CD200R signaling in tumor tolerance and inflammation: A tricky balance. Curr Opin Immunol, 2012. 24(2): p. 233-8.
19. Johnson, B.A., 3rd, B. Baban, and A.L. Mellor, Targeting the immunoregulatory indoleamine 2,3 dioxygenase pathway in immunotherapy. Immunotherapy, 2009. 1(4): p. 645-61.

20. Curti, A., et al., Acute myeloid leukemia cells constitutively express the immunoregulatory enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase. *Leukemia*, 2007. 21(2): p. 353-5.
21. Chamuleau, M.E., et al., High INDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) mRNA level in blasts of acute myeloid leukemic patients predicts poor clinical outcome. *Haematologica*, 2008. 93(12): p. 1894-8.
22. Prendergast, G.C., et al., Indoleamine 2,3-dioxygenase pathways of pathogenic inflammation and immune escape in cancer. *Cancer Immunol Immunother*, 2014. 63(7): p. 721-35.
23. Bonanno, G., et al., Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) activity correlates with immune system abnormalities in multiple myeloma. *J Transl Med*, 2012. 10: p. 247.
24. Nourizadeh, M., et al., In vitro induction of potent tumor-specific cytotoxic T lymphocytes using TLR agonist-activated AML-DC. *Target Oncol*, 2014. 9(3): p. 225-37.
25. Folgiero, V., et al., Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) activity in leukemia blasts correlates with poor outcome in childhood acute myeloid leukemia. *Oncotarget*, 2014. 5(8): p. 2052-64.
26. Ustun, C., et al., Regulatory T cells in acute myelogenous leukemia: is it time for immunomodulation? *Blood*, 2011. 118(19): p. 5084-95.
27. Norde, W.J., et al., Coinhibitory molecules in hematologic malignancies: targets for therapeutic intervention. *Blood*, 2012. 120(4): p. 728-36.
28. Talebian, F. and X.F. Bai, The role of tumor expression of CD200 in tumor formation, metastasis and susceptibility to T lymphocyte adoptive transfer therapy. *Oncoimmunology*, 2012. 1(6): p. 971-973.
29. Tonks, A., et al., CD200 as a prognostic factor in acute myeloid leukaemia. *Leukemia*, 2007. 21(3): p. 566-8.
30. Frumento, G., et al., Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med*, 2002. 196(4): p. 459-68.
31. Kornblau, S.M., et al., Simultaneous activation of multiple signal transduction pathways confers poor prognosis in acute myelogenous leukemia. *Blood*, 2006. 108(7): p. 2358-65.
32. Ricciardi, M.R., et al., Quantitative single cell determination of ERK phosphorylation and regulation in relapsed and refractory primary acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2005. 19(9): p. 1543-9.
33. Petermann, K.B., et al., CD200 is induced by ERK and is a potential therapeutic target in melanoma. *J Clin Invest*, 2007. 117(12): p. 3922-9.
34. Fallarino, F., et al., Murine plasmacytoid dendritic cells initiate the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in response to CD200 receptor engagement. *J Immunol*, 2004. 173(6): p. 3748-54.
35. Fallarino, F., et al., Ligand and cytokine dependence of the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in plasmacytoid dendritic cells. *Int Immunol*, 2005. 17(11): p. 1429-38.
36. Coles, S.J., et al., Expression of CD200 on AML blasts directly suppresses memory T-cell function. *Leukemia*, 2012. 26(9): p. 2148-51.
37. Coles, S.J., et al., CD200 expression suppresses natural killer cell function and directly inhibits patient anti-tumor response in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 2011. 25(5): p. 792-9.
38. Pallasch, C.P., et al., Disruption of T cell suppression in chronic lymphocytic leukemia by CD200 blockade. *Leuk Res*, 2009. 33(3): p. 460-4.
39. Kretz-Rommel, A. and K.S. Bowdsh, Rationale for anti-CD200 immunotherapy in B-CLL and other hematologic malignancies: new



concepts in blocking immune suppression.  
Expert Opin Biol Ther, 2008. 8(1): p. 5-15.

40.Kretz-Rommel, A., et al., Blockade of CD200  
in the presence or absence of antibody effector  
function: implications for anti-CD200 therapy. J  
Immunol, 2008. 180(2): p. 699-705.

41.Liu, X., et al., Selective inhibition of IDO1  
effectively regulates mediators of antitumor  
immunity. Blood, 2010. 115(17): p. 3520-30.



## Preferential expression of CD200 and Indoleamine 2, 3-dioxygenase-1 (IDO-1) in Acute Myeloid Leukemia Patients with Relapse

Ali Memarian<sup>1\*</sup>, Sara Abdolmaleki<sup>2,3</sup>

1. Stem Cell Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran
2. Thalassemia Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
3. Immunology Department, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

### Abstract

**Background & Objective:** Defect in Immune responses, such as immunosuppression is one of the major causes of AML pathogenesis and progression which could be targeted for immunotherapy of these patients. *CD200* and *IDO* are immunoregulatory factors which are overexpressed in some solid tumors and hematological malignancies. Distinct researches have shown that *CD200* and *IDO* expressions are associated with AML progression. In the current study, we simultaneously examined the expression of these molecules, as the two important factors including in immunosuppression, in the newly diagnosed and relapse AML patients to investigate their correlation with each other.

**Method:** In this study, 48 *Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs)* samples of newly diagnosed and relapsed AML patients were tested and also 32 *PBMCs* of normal subjects were employed as normal controls. *CD200* expression level was examined on the cells by Flowcytometry and quantitative real time RT-PCR was used to determine the *IDO-1* gene expression. Finally data were analyzed statistically by Spss 17 software.

**Results:** Our data showed that *CD200* ( $P=0.02$ ) and *IDO-1* ( $P=0.44$ ) were overexpressed in AML samples especially in relapsed patients. Comparison between FAB AML subgroups demonstrated no statistical differences regarding *CD200* level but expression of *IDO-1* was slightly increased only in M4 subgroup in comparison to M3 ( $P=0.01$ ). Correlation analyses showed strong association between the expressions of *CD200* and *IDO-1* in all patients particularly in relapsed AML, whereas no significant correlation was found in normal subjects.

**Conclusion:** According to the role and overexpression of *CD200* and *IDO-1* in AML patients and also their two-way correlation with T-reg lymphocytes in disease induction and progression, simultaneous assessment of these parameters are so valuable for more exact prognosis detection. Also inhibition of all these immunoregulatory pathways could be so useful for immunotherapy outcome, especially in relapsed AML.

**Key words:** Acute Myeloid Leukemia, *CD200*, *IDO*, Immunosuppression, Disease Progression, Relapse

---

**Corresponding Author:** Ali Memarian

**Address:** Stem Cell Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.

**E-mail:** alimemarian@goums.ac.ir

