

Synergistic effects of GS-1101 and Doxorubicin in acute lymphoblastic leukemia cell line

Ava Safaroghli-Azar¹,
Parisa Sadreazami¹,
Forouzan Bahmani¹,
Davood Bashash²

¹ MSc in Hematology and Blood banking, School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Assistant Professor, Department of Hematology and Blood Banking, School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received January 25, 2017 Accepted May 31, 2017)

Abstract

Background and purpose: Interest into targeting PI3K in cancer has increased by the recent disclosure that aberrant activity of PI3K/Akt signaling pathway is associated with disease recurrence and poor outcome in different malignancies. The aim of this study was to investigate the potentiating effect of PI3K inhibitor, GS-1101 on doxorubicin-induced cell death in acute lymphoblastic leukemia-derived, Nalm-6 cells.

Materials and methods: In this experimental study, to evaluate whether abrogating PI3K/Akt pathway using GS-1101 could enhance cytotoxic effect of doxorubicin in acute lymphoblastic leukemia, Nalm-6 pre-B ALL cells were subjected to combination treatment and subsequent cell viability. Then cell count, metabolic activity, and transcriptional alteration of apoptosis-related target genes were investigated using Trypan blue exclusion, MTT and Rq-PCR analysis, respectively.

Results: Our data delineated that GS-1101 augments doxorubicin-induced cytotoxic and its anti-proliferative effect, as evidenced by the decreased cell survival, cellular metabolic activity, and reduction in the number of inhibitor-treated viable cells. Moreover, real-time PCR analysis revealed that induction of cell death by the drug combination was associated with increased Bax transcriptional activity ($P \leq 0.01$) followed by the elevated molecular ratio of Bax/Bcl-2 ($P \leq 0.001$).

Conclusion: This study suggested that abrogation of the PI3K pathway using GS-1101 could potentiate doxorubicin-induced anti-leukemic activity.

Keywords: Acute lymphoblastic leukemia, GS-1101, Doxorubicin, cell death, Nalm-6 cells.

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 27 (153): 28- 38 (Persian).

تاثیر سینرژسم داروی GS-1101 با دوکسوروبیسین در رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد

آوا صفراوغلی آذر¹پریسا صدراعظمی¹فروزان بهمنی¹داود بشاش²

چکیده

سابقه و هدف: از آنجائی که فعالیت ناهنجار مسیر PI3K/Akt در بسیاری از بدخیمی‌ها با عود بیماری و پیش‌آگهی ضعیف همراه است، در طی سال‌های اخیر، هدف قرار دادن این مسیر به عنوان یکی از راهکارهای درمانی سرطان مورد توجه قرار گرفته است. هدف از این مطالعه، بررسی تاثیر مهارکننده PI3K در افزایش اثر سایتوتوکسیک القاء شده توسط دوکسوروبیسین در سلول‌های مشتق شده از لوسمی لنفوبلاستیک حاد، Nalm-6 می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، برای بررسی این که آیا مهار مسیر PI3K/Akt توسط GS-1101 قادر است تاثیر سایتوتوکسیک دوکسوروبیسین را در سلول‌های رده Nalm-6 افزایش دهد، این سلول‌ها با ترکیبی از دو دارو به صورت هم‌زمان تیمار شدند و سپس شمارش سلولی، میزان زنده‌مانی، فعالیت متابولیک و میزان تغییرات بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز به ترتیب توسط آزمون‌های تریپان بلو، MTT assay و Rq-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج به دست آمده بیان‌گر آن است که مهار مسیر PI3K/Akt با کمک GS-1101، اثر ضد تکثیری و سایتوتوکسیک القاء شده توسط دوکسوروبیسین را از طریق کاهش بقاء سلولی، فعالیت متابولیک و تعداد سلول‌های زنده افزایش می‌دهد. همچنین، نتایج Rq-PCR نشان می‌دهد که مرگ سلولی القاء شده در ترکیب دو دارو با یکدیگر با افزایش بیان ژن Bax (P ≤ 0/01) و همچنین افزایش نسبت بیان Bax / Bcl-2 (P ≤ 0/001) در ارتباط می‌باشد.

استنتاج: این مطالعه نشان داد که مهار نمودن مسیر PI3K توسط داروی GS-1101 می‌تواند اثرات ضد لوسمیک داروی شیمی‌درمانی دوکسوروبیسین را افزایش دهد.

واژه‌های کلیدی: لوسمی لنفوبلاستیک حاد، GS-1101، دوکسوروبیسین، مرگ سلولی، رده سلولی Nalm-6

مقدمه

لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) به عنوان شایع‌ترین بدخیمی کودکان، به تنهایی 77 درصد کل لوسمی در دوران کودکی را تشکیل می‌دهد (1). درمان ALL طولانی و بلندمدت بوده و داروهای مختلفی از خانواده‌های متفاوت از جمله گلوکوکورتیکواستروئیدها،

آنتی‌متابولیت‌ها، وینکا آلکالوئیدها و آنتراسایکلین‌ها در کنار یکدیگر برای درمان این بیماران تجویز می‌شوند (3). در بین این داروهای شیمی‌درمانی، دوکسوروبیسین یکی از مهم‌ترین و شناخته‌شده‌ترین داروهای درمان ALL می‌باشد (4). این مهارکننده آنزیم توپوایزومراز

Email: d.bashash@sbmu.ac.ir

مؤلف مسئول: داود بشاش - تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پیراپزشکی، گروه هماتولوژی و بانک خون

1. کارشناسی ارشد خون شناسی و بانک خون، گروه خون شناسی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

2. استادیار، گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 1395/11/6 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1395/11/6 تاریخ تصویب: 1396/3/10

III از طریق برهمکنش با DNA، فرایند همانندسازی DNA را متوقف می‌نماید و به این ترتیب منجر به القاء مرگ سلولی در سلول‌های لوسمی می‌گردد (5). علی‌رغم اثرات ضدسرطانی بسیار قوی و قابل توجه، به دلیل عوارض جانبی دوکسوروبیسین از جمله کاردیومیوپاتی، و هم‌چنین بروز پدیده مقاومت نسبت به دارو استفاده از آن در پروتکل‌های درمانی محدود شده است (6). شواهد زیادی نشان می‌دهند که فعال شدن نا به هنجار بسیاری از مسیرهای پیام‌رسانی از جمله مسیر PI3K/Akt نقش بسیار مهمی در بروز پدیده مقاومت به داروی دوکسوروبیسین ایفا می‌کنند (7).

در بین مولکول‌های متعددی که در مسیر PI3K/Akt درگیر هستند؛ لیپید کینازهای PI3K با قرار گرفتن در صدر و هم‌چنین با کنترل فرایندهای مهم داخل سلولی از جمله تنظیم چرخه سلولی، آپوپتوز، ترمیم DNA، پیری، رگ‌زایی و متابولیسم، بیش‌ترین نقش را در تومورزایی دارند (8، 10). این خانواده، مولکول‌هایی هتروداایمر هستند که از دو زیرواحد کاتالیتیکی و تنظیمی تشکیل شده‌اند. زیرواحد کاتالیتیکی، خود دارای ایزوفرم‌های مختلفی با نام‌های α و β ، p110 و p110 δ می‌باشد. در بین این ایزوفرم‌ها، بیان PI3K δ تنها به سلول‌های خونساز محدود می‌گردد و در بسیاری از بدخیمی‌های هماتولوژیک و به‌خصوص بدخیمی‌های رده‌ی لنفوئیدی وجود موتاسیون‌های فعال‌کننده در این زیرواحد کاتالیتیکی گزارش شده است (11). به‌همین دلیل، به نظر می‌رسد که احتمالاً مهار این ایزوفرم اختصاصی در بدخیمی‌های هماتولوژیک رده B cell بتواند به راهکار درمانی مناسب و موثری تبدیل شود. در بین مهارکنندگان مسیر PI3K/Akt، مهارکنندگان لیپید کیناز PI3K به علت خواص ضدسرطانی قابل توجه و هم‌چنین میزان توالرانس بالا برای بیماران به‌سرعت در حال طی کردن مراحل کارآزمایی بالینی برای انواع تومورهای توپر و هماتولوژیک می‌باشند و نسل جدید این مهارکنندگان

با هدف اثرات سایتوتوکسیک بیش‌تر و توالرانس بهتر برای بیماران به‌شدت مورد توجه قرار گرفته است (14) (12).

GS-1101 یک مهارکننده انتخابی ایزوفرم PI3K δ می‌باشد که اثر خود را با مهار رقابتی محل اتصال ATP در این ایزوفرم اعمال می‌کند (15). این مهارکننده در حال حاضر به شدت برای درمان بدخیمی‌های B-cell مثل CLL، لنفوم غیر هوچکین، مالتیل میلوما و هم‌چنین AML مورد توجه قرار گرفته است. اثرات ضد سرطانی قدرتمند، در کنار عوارض جانبی کم باعث شده است که از این مهارکننده اختصاصی ایزوفرم p110 δ در بسیاری از مطالعات سرطانی چه در سطح سل‌لاین، نمونه‌های گزینوگرفت و چه در کارآزمایی‌های بالینی استفاده شود. به‌علاوه، لازم به ذکر است که اثرات تحسین برانگیز این داروی مهارکننده مسیر PI3K تنها به تأثیرات منوترایی آن خلاصه نمی‌شود و بسیاری از مطالعات صورت گرفته به اثرات سینرژیسیم این مهارکننده با بسیاری از داروهای شیمی‌درمانی رایج پرداخته‌اند و مشخص شده است که GS-1101 می‌تواند فعالیت‌های سایتوتوکسیک آن‌ها را در بسیاری از انواع بدخیمی‌ها افزایش دهد. از این رو، در این مطالعه، بر آن شدیم تا اثر مهار مسیر پیام‌رسانی PI3K را در تشدید اثر ضدلوسمی یک یکی از مهم‌ترین داروهای مورد استفاده در رژیم درمانی ALL، دوکسوروبیسین، در رده سلولی Nalm-6 مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

کشت سلولی و تیمار دارویی

مطالعه انجام شده از نوع تجربی می‌باشد. سلول‌های Nalm-6 که از رده لوسمی لنفوبلاستیک حاد می‌باشند، در محیط کشت RPMI-1640 حاوی 10 درصد سرم گاوی، 100 U/ml پنی سیلین و 100g/ml لاندا استرپتومایسین در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و فشار دی اکسید کربن 5 درصد کشت داده شده‌اند.

داروهای مورد استفاده GS-1101 (تهیه شده از شرکت Selleckchem آمریکا) و دوکسوروبیسین می‌باشند. GS-1101 به شکل پودر بوده که به منظور تهیه محلول ذخیره 500 میکرومولار، آن را در DMSO استریل حل و تا زمان استفاده در دمای 20- درجه سانتی گراد نگهداری کردیم. جهت جلوگیری از اثرات حلال بر روی میزان پرولیفراسیون و بقاء رده سلولی، سلول‌ها با غلظت مشخص شده‌ای از DMSO به عنوان کنترل منفی تیمار شدند. سلول Nalm-6 با غلظت‌های 10 و 30 میکرومولار GS-1101 (16) و 70 و 100 نانومولار دوکسوروبیسین (17) هر کدام به تنهایی و به صورت هم‌زمان به مدت 24 و 36 ساعت تیمار شدند. تمامی آزمایش‌ها به منظور افزایش دقت کار به صورت تریپلیکیت انجام شد.

بررسی شمارش سلولی به روش تریپان بلو

برای شمارش سلول‌ها از رنگ آمیزی تریپان بلو و لام هموسایتومتر (لام تئوبار) استفاده شد. اساس این آزمایش بدین ترتیب است که سلول‌های زنده نسبت به ورود رنگ نفوذناپذیر می‌باشند، حال آنکه سلول‌های مرده رنگ را جذب می‌نمایند. برای شمارش تعداد سلول‌های زنده، تعداد سلول‌های رنگ ننگرفته در هر چهار سری خانه‌های شانزده تایی (خانه شمارش WBC) شمارش شده و میانگین گرفته شد. میزان درصد زنده‌مانی سلول‌ها به این صورت محاسبه شد: زنده‌مانی (%) = تعداد سلول‌های زنده / تعداد کل سلول‌ها $\times 100$.

اندازه‌گیری فعالیت متابولیک سلولی به روش MTT assay

برای ارزیابی تاثیر سینرژی GS-1101 و دوکسوروبیسین بر فعالیت متابولیک سلول‌های Nalm-6، تعداد 5000 سلول به هر چاهک پلیت 96 خانه‌ای حاوی و فاقد دارو (داروها) اضافه و به مدت زمان 24 و 36 ساعت در انکوباتور CO₂ دار انکوبه شد.

پس از گذشت مدت زمان مورد نظر به سلول‌های داخل پلیت محلول MTT 5mg/ml اضافه گردید و به مدت 3 ساعت در انکوباتور 37 درجه قرار گرفت. سپس پلیت با دور 1000 به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ شد و پس از خالی کردن محلول رویی 100 میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد. جذب نوری هر چاهک توسط دستگاه plate Eliza reader در طول موج 570 نانومتر قرائت شد.

استخراج RNA

پس از تیمار سلول‌ها با GS-1101، دوکسوروبیسین و هر دو دارو باهم به مدت 36 ساعت، RNA آن‌ها طبق دستورالعمل کیت high pure RNA isolation kit (Roche) استخراج شد و به منظور تولید cDNA مورد استفاده قرار گرفت.

ساخت cDNA

1- میکروگرم RNA برای سنتز cDNA با استفاده از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit و براساس دستورالعمل کیت، مورد استفاده قرار گرفت. محلول‌های نهایی به مدت 5 دقیقه در 65 درجه، 5 دقیقه در 25 درجه و یک ساعت در دمای 42 درجه انکوبه شدند و در نهایت، واکنش سنتز cDNA با 5 دقیقه انکوباسیون در 70 درجه خاتمه یافت.

Rq-PCR

آزمایش Real-Time PCR در دستگاه light-cycler (Roche) و در حجم 20 میکرولیتر انجام شد. به ازای هر واکنش، 10 میکرولیتر از Syber premix Ex Taq (Takara)، 2 میکرولیتر از cDNA، 0/5 میکرولیتر از هریک از پرایمرها و 7 میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز استفاده شد. شرایط دمایی مورد استفاده شامل یک مرحله فعال‌سازی اولیه در دمای 95 درجه سانتی گراد به مدت 30 ثانیه و در ادامه، 40 سیکل برای

دنا تورا سیون (5 ثانیه در 95 درجه سانتی گراد) و آنیلینگ اکستنشن توام (20 ثانیه در 60 درجه سانتی گراد) می باشد. برای بررسی اختصاصیت محصول

تکثیر شده، منحنی ذوب (Melting curve) مورد بررسی قرار گرفت. در انتها و برای محاسبه نسبی تعداد نسخه mRNA تکثیر شده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده شد.

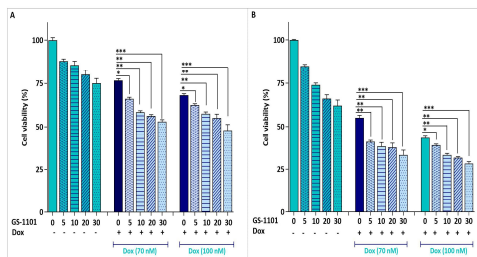
جدول شماره 1: توالی پرایمرهای به کار رفته در آزمون Real Time Quantitative RT-PCR

Gene	Accession number	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Size (bp)
HPRT	NM_000194	TGGACAGGACTGAACGCTCTTG	CCAGCAGGTCAGCAAAGAATTTA	111
Bax	NM_138761	CGAGAGGTCTTTTCCGAGTG	GTGGGCGTCCCAAAGTAGG	242
Bcl-2	NM_000633	CGGTGGGGTCATGTGTGTG	CGGTTCAAGTACTCAGTCATCC	90

آنالیز آماری

تمامی آزمایشات به شکل سه آزمون مستقل انجام و مقادیر گزارش شده به شکل $\text{Mean} \pm \text{SD}$ قید شدند. هم چنین برای محاسبات آماری از روش t-test و نرم افزار SPSS17 و GraphPad Prism7 استفاده شد.

بقاء سلول ها به طور کاملاً معناداری کاهش می یابد. به عبارت دیگر نتایج به دست آمده نشان می دهند که GS-1101 به صورت قابل توجهی حساسیت سلول های Nalm-6 را به دوکسوروبیسین در دو دوز 70 و 100 نانومولار تشدید می نماید (شکل 1 قسمت A و B).



یافته ها

بررسی تاثیر تیمار هم زمان سلول های Nalm-6 با دو داروی GS-1101 و دوکسوروبیسین بر شاخص زنده ماندنی سلول ها

جهت بررسی تاثیر مهار مسیر PI3K/Akt در افزایش خاصیت سایتوتوکسیک یکی از مهم ترین داروهای مورد استفاده در رژیم درمانی لوسمی لنفوبلاستیک حاد به نام دوکسوروبیسین، سلول های Nalm با دوزهای افزایشنده GS-1101 (5 تا 30 میکرومولار) و دوکسوروبیسین (70 و 100 نانومولار) به صورت تکی و در ترکیب با یکدیگر تیمار شدند و سپس درصد بقاء سلول ها با کمک تست تریپان بلو مورد ارزیابی قرار گرفت. همان طور که در شکل 1 در دو قسمت A و B نشان داده شده است، داروی GS-1101 و دوکسوروبیسین به تنهایی به صورت وابسته به دوز و زمان قادر به کاهش درصد زنده ماندنی سلول های Nalm می باشند. با این وجود، هنگامی که سلول ها با این دو دارو به صورت ترکیبی تیمار می شوند، میزان درصد

شکل شماره 1: تاثیر هم زمان داروهای GS-1101 و دوکسوروبیسین بر زنده ماندنی سلول های Nalm-6. سلول های Nalm با غلظت های 5، 10، 20 و 30 میکرومولار از داروی GS-1101 و غلظت های 70 و 100 نانومولار دوکسوروبیسین هر کدام به تنهایی و همچنین به صورت هم زمان تیمار و پس از گذشت 24 (A) و 36 (B) ساعت، درصد زنده ماندنی سلول ها با روش تریپان بلو بررسی شد. همان گونه که در شکل مشاهده می شود، تیمار هم زمان با دو دارو درصد زنده ماندنی سلول ها را به صورت معناداری نسبت به هر کدام از داروها به تنهایی کاهش می دهد. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف ($\text{mean} \pm \text{SD}$) محاسبه شد و p value به دست آمده ($P \leq 0/05$ ، *)، $P \leq 0/01$ و $P \leq 0/001$ نشان گر معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه تیمار شده با داروی دوکسوروبیسین بود.

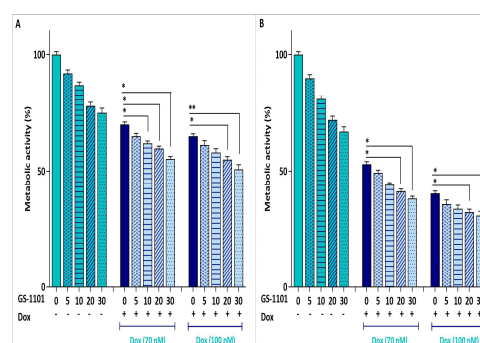
GS-1101 اثر دوکسوروبیسین را در کاهش فعالیت متابولیک سلول‌های Nalm-6 به صورت وابسته به دوز و زمان تشدید می‌کند

جهت بررسی آنکه GS-1101 تا چه حدی قادر به تشدید اثرات سایتوتوکسیک دوکسوروبیسین می‌باشد، بر آن شدیم تا تاثیر این دو دارو را چه به صورت تکی و چه در ترکیب با یکدیگر بر روی فعالیت متابولیک سلول‌های Nalm-6 مورد مطالعه قرار دهیم. برای این منظور، سلول‌های Nalm-6 با دوزهای 5، 10، 20 و 30 میکرومولار مهارکننده PI3Kδ و دوزهای 70 و 100 نانومولار دوکسوروبیسین به مدت 24 و 36 ساعت تیمار شدند و میزان فعالیت متابولیک آن‌ها توسط تست MTT assay بررسی شد. نتایج به دست آمده حاکی از آن است که در ترکیب دو دارو در کنار یکدیگر، فعالیت متابولیک سلول‌ها در مقایسه به هر کدام از دو دارو به تنهایی به صورت قابل توجه‌تری کاهش می‌یابد. همان طور که در شکل 2 نشان داده شده است، در حالی که GS-1101 (30 میکرومولار) و دوکسوروبیسین (100 نانومولار) هر یک به تنهایی میزان فعالیت متابولیک سلول‌ها را پس از گذشت 36 ساعت به ترتیب 44 و 60% مهار کرده است، ترکیب این دو دارو در کنار یکدیگر این درصد را به میزان 70% کاهش می‌دهد که خود می‌تواند موبد این موضوع باشد که مهار مسیر PI3K/Akt با کمک مهارکننده آن قادر به تشدید اثر سایتوتوکسیک داروی دوکسوروبیسین به صورت وابسته به دوز و زمان در رده سلولی Nalm-6 می‌باشد.

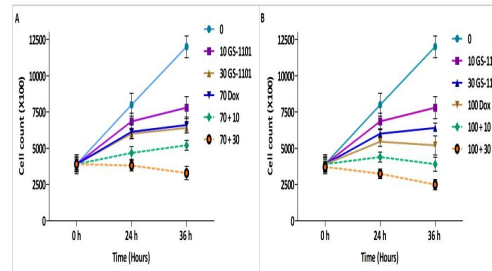
شکل شماره 2: تاثیر GS-1101 و دوکسوروبیسین بر فعالیت متابولیک سلول‌های Nalm-6 به طور وابسته به دوز و زمان. سلول‌ها در تعداد 5000 سلول در پلیت 96 خانه‌ای تحت تاثیر مقادیر مختلف GS-1101 و دوکسوروبیسین هر کدام به تنهایی و به صورت هم‌زمان قرار گرفته و به مدت 24 (A) و 36 (B) ساعت انکوبه شدند. همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود، تیمار هم‌زمان با دو دارو به صورت وابسته به دوز و زمان فعالیت متابولیک را کاهش داده و نسبت به تیمار با هریک به تنهایی دارای اثر مهاري بیش‌تری بر فعالیت متابولیک سلول‌های تیمار شده می‌باشد. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean ± SD) محاسبه شد و p value به دست آمده (*، P ≤ 0/05، P ≤ 0/01 و P ≤ 0/001) نشان‌گر معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه تیمار شده با داروی دوکسوروبیسین بود.

بررسی تاثیر هم‌زمان دو دارو GS-1101 و دوکسوروبیسین بر کاهش شمارش سلولی در سلول‌های Nalm-6

به منظور بررسی این که آیا داروی GS-1101 می‌تواند علاوه بر اثر سایتوتوکسیک، تاثیر ضد تکثیری داروی دوکسوروبیسین را نیز در سلول‌های Nalm-6 تشدید نماید، پس از تیمار سلول‌ها با موثرترین دوزها از داروها که بیش‌ترین تاثیر را اعمال نموده بودند، تعداد سلول‌های زنده در دو بازه زمانی 24 و 36 ساعت مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که در شکل 3 مشخص است؛ در مقایسه با تیمار Nalm-6 به تنهایی با هر یک از داروها، تیمار هم‌زمان با GS-1101 و دوکسوروبیسین باعث شده است تا شمار سلول‌های زنده به صورت کاملاً معناداری کاهش یابد. لازم به ذکر است که GS-1101 در دوز 30 میکرومولار همراه با دوکسوروبیسین در دوز 100 نانومولار در مدت زمان 36 ساعت بیش‌ترین اثر مهاري را بر سلول‌های Nalm-6 داشته است که این امر نشان‌گر این واقعیت است که ترکیب این دو دارو در کنار یکدیگر می‌تواند به



صورت وابسته به دوز و زمان سبب کاهش تعداد سلول‌های زنده گردد شود.

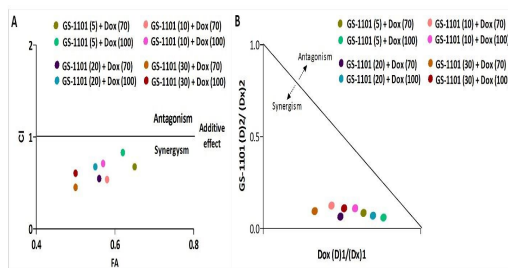


شکل شماره 3: تأثیر سینرژیسیم داروهای GS-1101 و دوکسوروبیسین بر شمارش سلولی Nalm-6 به صورت وابسته به دوز و زمان. سلول‌های Nalm-6 به تعداد 39 هزار سلول با غلظت‌های 10 و 30 میکرومولار از GS-1101 و همچنین 70 (A) و 100 (B) نانومولار از دوکسوروبیسین به صورت ترکیبی تیمار شدند. همان گونه که در شکل مشاهده می‌شود، تیمار هم‌زمان با دو دارو به صورت وابسته به دوز و زمان، شمارش سلولی را کاهش داده است و نسبت به هر کدام از داروها به تنهایی دارای اثر ضدتکثیری بیشتری می‌باشد.

بررسی تأثیر سینرژیسیم دو داروی GS-1101 و دوکسوروبیسین

در ادامه، به منظور بررسی این که آیا تأثیر ایجاد شده توسط دو داروی GS-1101 و دوکسوروبیسین از نوع سینرژیسیم تلقی می‌شود، سه آنالیز با هدف محاسبه شاخص CI (Combination Index) و Isobologram و DRI (Dose Reduction Index) انجام گرفت. این سه پارامتر، شاخص‌هایی برای بررسی و محاسبه اثر سینرژیسیم دو دارو با یکدیگر از طریق بررسی میزان درصد زنده‌مانی سلول‌ها پس از تیمار با هر یک از داروها به تنهایی و به صورت ترکیبی با یکدیگر می‌باشد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که تمامی نقاط زیر خط additive هستند که بیان‌گر تأثیر سینرژیسیم دو دارو با یکدیگر می‌باشد. همان طور که در شکل 4 مشخص شده است، آنالیز هر دو شاخص CI و Isobologram نشان دهنده وجود تأثیر سینرژیسیم می‌باشند.

ادامه از شاخص CI برای محاسبه DRI نیز استفاده شد. DRI به همان پتانسیل دو دارو برای کاهش مقدار استفاده از آنها در سینرژی، نسبت به حالت تکی داروها، درحالی که همان اثرگذاری را داشته باشد؛ گفته می‌شود. همان طور که در جدول 2 نیز به صورت خلاصه نشان داده شده است، محاسبه DRI این دو دارو نیز موید آن بود که بین این دو دارو تأثیر سینرژیسیم وجود دارد.



شکل شماره 4: بررسی تأثیر سینرژیسیم بین دو داروی GS-1101 و دوکسوروبیسین در رده‌ی سلولی Nalm-6 توسط شاخص‌های CI و Isobologram. سلول‌های Nalm-6 به طور هم‌زمان با دو داروی GS-1101 (غلظت‌های 5، 10، 20 و 30 میکرومولار) و دوکسوروبیسین (دوزهای 70 و 100 نانومولار) تیمار شدند و شاخص‌های CI (A) و Isobologram (B) برای آن‌ها محاسبه شد. این شاخص‌ها همگی نشانگر وجود اثر سینرژیسیم می‌باشند (CI زیر 1 و Isobologram زیر خط).

جدول شماره 2: شاخص CI و DRI برای ترکیب دو داروی GS-1101 و دوکسوروبیسین

GS-1101		Doxorubicine		CI
Concentration	DRI	Concentration	DRI	
۵ میکرومولار	۱۷/۵۲۵	۷۰ نانومولار	۱/۶۱۱	۰/۶۷۸
۵ میکرومولار	۲۲/۷۹۳	۱۰۰ نانومولار	۱/۲۶۶	۰/۸۳۳
۱۰ میکرومولار	۱۵/۹۸۸	۷۰ نانومولار	۲/۱۰۰	۰/۵۳۹
۱۰ میکرومولار	۱۷/۳۷۳	۱۰۰ نانومولار	۱/۵۲۵	۰/۷۱۳
۲۰ میکرومولار	۹/۴۳۴	۷۰ نانومولار	۲/۲۵۹	۰/۵۴۹
۲۰ میکرومولار	۱۱/۱۱۶	۱۰۰ نانومولار	۱/۷۰۰	۰/۶۷۸
۳۰ میکرومولار	۱۰/۲۶۲	۷۰ نانومولار	۲/۸۰۳	۰/۴۵۴
۳۰ میکرومولار	۱۰/۲۶۲	۱۰۰ نانومولار	۱/۹۶۲	۰/۸۰۷

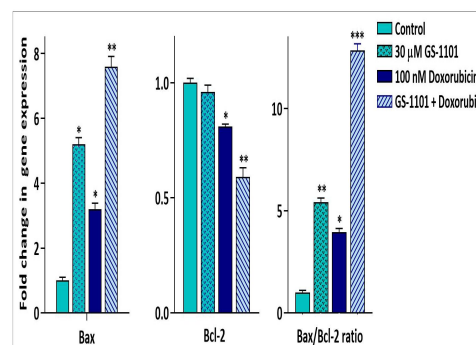
بررسی تأثیر سینرژیسیم GS-1101 و دوکسوروبیسین بر بیان ژن‌های پرو و آنتی آپوپتوتیک در سلول‌های Nalm-6

نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه تیمار شده با داروی دوکسوروبیسین بود.

بحث

داروی دوکسوروبیسین، یکی از رایج ترین و شناخته شده ترین اعضای خانواده آنتراسایکلین، که به صورت گسترده در رژیم درمانی بسیاری از انواع سرطان ها کاربرد دارد، به عنوان داروی خط اول درمان لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) نیز بسیار مورد توجه می باشد (19). با وجود مزایای غیرقابل انکار این دارو، عوارض جانبی وابسته به دوز و از همه مهم تر، عارضه قلبی - عروقی، استفاده از این دارو را در بسیاری از پروتکل های درمانی محدود نموده است (20). به علاوه، شواهد و بررسی هایی که به تازگی انجام شده است، نشان می دهند که بروز مقاومت به داروی دوکسوروبیسین یکی از مهم ترین و شایع ترین مشکلات درمانی بیماران مبتلاء به ALL می باشد (21). کسب توانایی تکثیر غیرطبیعی سلولی و فرار از آپوپتوز که عمدتاً به دلیل فعال شدن مسیرهای انتقال پیامی هم چون PI3K/Akt صورت می گیرد میزان حساسیت به طیف وسیعی از داروهای شیمی درمانی از جمله دوکسوروبیسین را کاهش داده است (22). بنابراین در حال حاضر، تلاش های تحقیقاتی بی شماری با هدف بررسی تاثیر مهار مسیرهای پیام رسانی PI3K/Akt در افزایش اثرات سایتوتوکسیک بسیاری از داروهای شیمی درمانی در حال شکل گرفتن می باشد (22). مطالعات پیشین نشان داده اند که مهار PI3K/Akt توسط مهارکننده برجسته آن، داروی GS-1101 به شدت باعث القاء مرگ سلولی در بسیاری از سرطان ها از جمله بدخیمی های هماتولوژیک می شود (16). به همین دلیل، بر آن شدیم تا ارزش درمانی یک مهارکننده PI3K/Akt را در تشدید اثرات سایتوتوکسیک و

پروتئین پرو آپوپتوتیک Bax یک پروتئین کلیدی در مسیر آپوپتوز می باشد، که با اتصال به غشا میتوکنندری منجر به خروج سیتوکروم c و اجزا پرو آپوپتوتیک دیگر از میتوکنندری می شود. مطالعات نشان می دهند که پروتئین آنتی آپوپتوتیک Bcl-2 با اتصال به Bax و مهار آن، از بروز پدیده آپوپتوز جلوگیری می کند (18). برای بررسی اثر سینرژسم GS-1101 و دوکسوروبیسین بر بیان ژن های Bax و Bcl-2 میزان بیان mRNA این دو ژن توسط روش Real-Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. همان طور که در شکل 5 مشاهده می شود، تیمار هم زمان با دوز 30 میکرومولار GS-1101 و دوز 100 نانومولار دوکسوروبیسین منجر به افزایش تقریباً 7 برابری بیان ژن Bax نسبت به کنترل و افزایش معنادار آن نسبت به هر کدام از داروها به تنهایی می شود. لازم به ذکر است؛ اگرچه GS-1101 به تنهایی قادر به کاهش میزان بیان mRNA ژن Bcl-2 نمی باشد، تیمار با دو دارو به صورت هم زمان تاثیر معناداری بر روی کاهش بیان ژن Bcl-2 دارد و در نتیجه نسبت Bax/Bcl-2 را به صورت معناداری افزایش می بخشد.



شکل شماره 5: تاثیر سینرژسم GS-1101 و دوکسوروبیسین بر بیان ژن های Bax و Bcl-2. تیمار سلول ها به طور هم زمان با دوزهای 30 میکرومولار از GS-1101 و 100 نانومولار دوکسوروبیسین باعث افزایش بیان mRNA ژن پروتئین پرو آپوپتوتیک Bax و کاهش بیان mRNA ژن آنتی آپوپتوتیک Bcl-2 نسبت به تیمار با هر کدام از داروها به تنهایی می گردد. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean $\pm$ SD) محاسبه شد و p value به دست آمده (*، $P \leq 0/05$ و $P \leq 0/01$) نشان گر معنادار بودن

ضد تکثری دوکسوروبیسین در رده سلولی Nalm-6 مورد بررسی قرار دهیم.

نتایج به دست آمده در این بررسی نشان می دهد که مهار مسیر PI3K/Akt توسط مهارکننده اختصاصی ایزوفرمد p110δ، اثرات سایتوتوکسیک و ضد تکثری داروی دوکسوروبیسین را به صورت قابل توجهی افزایش می دهد. این نتایج بیان گر این واقعیت هستند که ترکیب دو داروی GS-1101 و دوکسوروبیسین نه تنها میزان بقاء و فعالیت متابولیک سلولهای Nalm-6 را به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش می دهد؛ بلکه قادر است تا از تکثیر سلولها نیز جلوگیری نماید و شمار سلولهای زنده را به طور قابل توجهی کاهش دهد. در همین راستا، آنالیزهایی با هدف بررسی نوع برهمکنش بین این دو دارو نیز ثابت کردند که GS-1101 و دوکسوروبیسین دارای اثر سینرژیسیم با یکدیگر می باشند. نتایج به دست آمده در این مطالعه، همگام با مطالعات پیشین است که وجود تأثیر سینرژیسیم داروی GS-1101 با بسیاری از داروهای شیمی درمانی هم چون ریتوکسی ماب و عوامل آلکیل کننده را گزارش نموده اند (23، 24). هم چنین در سال 2014، Wagner و همکارانش نیز نشان دادند که مهار مسیر PI3K/Akt توسط GS-1101 می تواند اثرات سایتوتوکسیک آنتی بادی های منوکلونال را در بیماران مقاوم به درمان مبتلاء به لنفوم غیر هوچکین، افزایش دهد (25).

بررسی های بی شماری نشان داده اند که افزایش فعالیت مسیر PI3K/Akt در پاسخ به استفاده از داروهای روتین نظیر دوکسوروبیسین منجر به اختلال در تعادل بین بیان ژن های پرو و آنتی آپوپتوتیک و در نتیجه کاهش آپوپتوز می شود، که این موضوع علت مقاومت به درمان می باشد (26، 27). بررسی که در سال 2010 توسط Jeffery J. Wallin بر روی تأثیر سینرژیسیم دوکسوروبیسین و مهارکننده PI3K در رده سلولی MCF-7 انجام شد، نشان داد که تیمار هم زمان با

دوکسوروبیسین و مهارکننده PI3K باعث افزایش چشم گیر اثر ضد توموری دوکسوروبیسین می شود (8). نتایج به دست آمده در این مطالعه با هدف بررسی مکانیسم ملکولی که می تواند در کاهش میزان بقاء و تکثیر سلول های Nalm-6 موثر باشد، نیز نشان داد که پس از تیمار سلول ها با ترکیب دو دارو، میزان بیان ژن Bax به عنوان مهم ترین مولکول پرو آپوپتوتیک و همچنین ژن آنتی آپوپتوتیک Bcl-2 دچار تغییر می گردد. پس از تیمار 24 ساعته سلول ها با GS-1101 و دوکسوروبیسین میزان بیان ژن Bax نسبت به ژن Bcl-2 افزایش می یابد که این امر با برهم زدن تعادل بین ژن های پرو و آنتی آپوپتوتیک سبب ایجاد اختلال در پتانسیل غشاء میتوکندری شده و به این ترتیب بروز مرگ سلولی را برای سلول های Nalm-6 رقم می زند.

در کل، به نظر می رسد که مهار کردن مسیر پیام رسانی PI3K/Akt توسط مهارکننده اختصاصی PI3K منجر به افزایش اثرات ضد سرطانی داروی دوکسوروبیسین می گردد و همچنین باعث می شود تا این داروی رایج شیمی درمانی بتواند در دوزهای کم تر اثرات آپوپتوتیک و ضد تکثری خود را اعمال نماید. از این رو می توان امیدوار بود با استفاده هم زمان این دو دارو، بیماران مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد با بازده بیش تری درمان شوند و هم چنین با کاهش دوز دوکسوروبیسین عوارض جانبی و مقاومت به درمان کاهش یابد که این موضوع نیاز به مطالعات و بررسی های بیشتری به خصوص در سطح انسانی دارد.

سپاسگزاری

با تشکر از دانشگاه شهید بهشتی جهت فراهم آوردن شرایط انجام این پژوهش.

References

1. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*. 2013;381(9881):1943-1955.
2. Faderl S, O'Brien S, Pui CH, Stock W, Wetzler M, Hoelzer D, et al. Adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2010;116(5):1165-1176.
3. Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2006;354(2):166-178.
4. Arcamone F, Cassinelli G, Franceschi G, Penco S, Pol C, Redaelli S, et al., editors. Structure and physicochemical properties of adriamycin (doxorubicin). International symposium on adriamycin; 1972: Springer.
5. Keizer H, Pinedo H, Schuurhuis G, Joenje H. Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacol Ther*. 1990;47(2):219-231.
6. Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, Correia S, Oliveira PJ, Santos MS, et al. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem*. 2009;16(25):3267-3285.
7. Ross D. Novel mechanisms of drug resistance in leukemia. *Leukemia*. 2000;14(3):467-473.
8. Huang C-H, Mandelker D, Schmidt-Kittler O, Samuels Y, Velculescu VE, Kinzler KW, et al. The structure of a human p110 α /p85 α complex elucidates the effects of oncogenic PI3K α mutations. *Science*. 2007;318(5857):1744-1748.
9. Zhao L, Vogt PK. Helical domain and kinase domain mutations in p110 α of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by different mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(7):2652-2657.
10. Kok K, Geering B, Vanhaesebroeck B. Regulation of phosphoinositide 3-kinase expression in health and disease. *Trends Biochem Sci*. 2009;34(3):115-127.
11. Neri L, Cani A, Martelli A, Simioni C, Junghanss C, Tabellini G, et al. Targeting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in B-precursor acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic potential. *Leukemia*. 2014;28(4):739-748.
12. Fruman DA, Rommel C. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nature reviews Drug discovery*. 2014;13(2):140-156.
13. Rodon J, Dienstmann R, Serra V, Tabernero J. Development of PI3K inhibitors: lessons learned from early clinical trials. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013;10(3):143-153.
14. Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(8):550-562.
15. Castillo JJ, Furman M, Winer ES. CAL-101: a phosphatidylinositol-3-kinase p110-delta inhibitor for the treatment of lymphoid malignancies. *Expert Opin Investig Drugs*. 2012;21(1):15-22.
16. Bashash D, Safaroghli-Azar A, Dadashi M, Safa M, Momeny M, Ghaffari SH. Anti-tumor activity of

- PI3K- δ inhibitor in hematologic malignant cells: Shedding new light on resistance to Idelalisib. *Int. J Biochem Cell Biol.* 2017;85:149-158.
17. Safa M, Tavasoli B, Manafi R, Kiani F, Kashiri M, Ebrahimi S, et al. Indole-3-carbinol suppresses NF- κ B activity and stimulates the p53 pathway in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells. *Tumor Biol.* 2015;36(5):3919-3930.
 18. Roos WP, Thomas AD, Kaina B. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology. *Nat Rev Cancer.* 2015.
 19. Krischer JP, Epstein S, Cuthbertson DD, Goorin AM, Epstein ML, Lipshultz SE. Clinical cardiotoxicity following anthracycline treatment for childhood cancer: the Pediatric Oncology Group experience. *J Clin Oncol.* 1997;15(4):1544-1552.
 20. Lefrak EA, Pit'ha J, Rosenheim S, Gottlieb JA. A clinicopathologic analysis of adriamycin cardiotoxicity. *Cancer.* 1973;32(2):302-314.
 21. Marie JP, Zittoun R, Sikic BI. Multidrug resistance (mdr1) gene expression in adult acute leukemias: correlations with treatment outcome and in vitro drug sensitivity. *Blood.* 1991;78(3):586-592.
 22. West KA, Castillo SS, Dennis PA. Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resist Updat.* 2002;5(6):234-248.
 23. Coutre SE, Leonard JP, Furman RR, Barrientos JC, de Vos S, Flinn IW, et al. Combinations of the selective phosphatidylinositol 3-kinase-delta (PI3Kdelta) inhibitor GS-1101 (CAL-101) with rituximab and/or bendamustine are tolerable and highly active in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): results from a phase I study. *Blood.* 2012;120(21):191.
 24. Khan M, Saif A, Sandler S, Mirrakhimov AE. Idelalisib for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *ISRN Oncol.* 2014;2014: 931858.
 25. Gopal AK, Kahl BS, de Vos S, Wagner-Johnston ND, Schuster SJ, Jurczak WJ, et al. PI3K δ inhibition by idelalisib in patients with relapsed indolent lymphoma. *N Engl J Med.* 2014 ;370(11):1008-1018.
 26. Grünwald V, DeGraffenried L, Russel D, Friedrichs WE, Ray RB, Hidalgo M. Inhibitors of mTOR reverse doxorubicin resistance conferred by PTEN status in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2002;62(21):6141-6145.
 27. McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, Lee JT, Chang F, Bertrand FE, et al. Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Adv Enzyme Regul.* 2006;46(1):249-279.