ORIGINAL ARTICLE

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

Ava Safaroghli-Azar[1],
Parisa Sadreazami[1],
Forouzan Bahmani[1],
Davood Bashash[2]

[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 exlussion, 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).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-05-29]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و هفتم شماره 153 مهر سال 1396 (38 -28)

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

آوا صفراوغلی آذر[1]
پریسا صدراعظمی[1]
فروزان بهمنی[1]
داود بشّاش[2]

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 به‌عنوان 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-6افزایش دهد، این سلول‌ها با ترکیبی از دو دارو به‌صورت 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 ضدتکثیری 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($P \leq 0/01$) و همچنین افزایش نسبت بیان Bax /Bcl-2 ($P \leq 0/001$) 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.

واژه های کلیدی: لوسمی لنفوبلاستیک حاد، **GS-1101**، دوکسوروبیسین، مرگ سلولی، رده سلولی Nalm-6

مقدمه

لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) به‌عنوان شایع‌ترین بدخیمی کودکان، به‌تنهایی 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 گلوکورتیکواستروئیدها، آنتی‌متابولیت‌ها، وینکا آلکالوئیدها و آنتراسایکلین‌ها در کنار یکدیگر برای درمان این بیماران تجویز می‌شوند(3 ،2). در بین این داروهای شیمی‌درمانی، دوکسوروبیسین یکی از مهم‌ترین و شناخته‌شده‌ترین داروهادر درمان ALLمی‌باشد(4). این مهارکننده آنزیم توپوایزومراز

مولف مسئول: داود بشاش - تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پیراپزشکی، گروه هماتولوژی و بانک خون Email: d.bashash@sbmu.ac.ir
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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-05-29]

IIاز طریق برهمکنش باDNA ، فرایند همانندسازی DNAرا متوقف می‌نماید و به این ترتیب منجر به القاء مرگ سلولی در سلول‌های لوسمی می گردد(5). علی‌رغم اثرات ضدسرطانی بسیار قوی و قابل‌توجه، به‌دلیل 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/Aktنقش بسیار مهمی در بروز پدیده مقاومت به داروی دوکسوروبیسین ایفا می کنند(7).

در بین مولکول‌های متعددی که در مسیر PI3K/Akt درگیر هستند؛ لیپیدکینازهای 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 هترودایمر هستند که از دو زیرواحد کاتالیتیکی و تنظیمی تشکیل شده‌اند. زیرواحد کاتالیتیکی، خود دارای ایزوفرم‌های مختلفی با نام‌های p۱۱۰ α، β p110 وδp110 می‌باشد. در بین این ایزوفرم‌ها، بیان PI3Kδتنها به سلول‌های خونساز محدود می گردد 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 مسیرPI3K/Akt ، مهارکنندگان لیپیدکیناز PI3K به علت خواص ضدسرطانی قابل توجه و هم‌چنین میزان تولرانس بالا برای بیماران به‌سرعت درحال طی کردن مراحل کارآزمایی بالینی برای انواع تومورهای توپر و هماتولوژیک می‌باشند و نسل جدید این مهارکنندگان با هدف اثرات سایتوتوکسیک بیش‌تر و تولرانس بهتر برای بیماران به‌شدت مورد توجه قرار گرفته است(14، 12).

GS-1101 یک مهارکننده انتخابی ایزوفرم PI3Kδ می‌باشد که اثر خود را با مهار رقابتی محل اتصالATP در این ایزوفرم اعمال می‌کند(15). این مهارکننده در حال حاضر به شدت برای درمان بدخیمی‌های B-cell مثل CLL، لنفوم غیر هوچکین، مالتیپل میلوما و همچنین AML مورد توجه قرار گرفته است . اثرات ضد سرطانی قدرتمند، درکنار عوارض جانبی کم باعث شده است که از این مهارکننده اختصاصی ایزوفرم p110δ در بسیاری از مطالعات سرطانی چه در سطح سل‌لاین، نمونه‌های گزنوگرفت و چه در کارآزمایی‌های بالینی استفاده شود. به‌علاوه، لازم به ذکر است که اثرات تحسین برانگیز این داروی مهارکننده مسیر PI3K تنها به تاثیرات منوتراپی آن خلاصه نمی‌شود و بسیاری از مطالعات صورت گرفته به اثرات سینرژیسم این مهارکننده با بسیاری از داروهای شیمی-درمانی 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 ضدلوسمیک یکی از مهم‌ترین داروهای مورد استفاده در رژیم درمانی ALL، دوکسوروبیسین، در رده سلولی Nalm-6 مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش ها

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 استرپتو مایسین در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و فشار دی اکسید کربن 5 درصد کشت داده شده‌اند.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-05-29]

داروهای مورد استفاده GS-1101 (تهیه شده از شرکت Selleckchemآمریکا) و دوکسوروبیسین می‌باشند. GS-1101 به شکل پودر بوده که به‌منظور تهیه محلول ذخیره 500 میکرومولار، آن را در DMSO استریل حل و تا زمان استفاده در دمای 20- درجه سانتی‌گراد 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) هرکدام به‌تنهایی و به‌صورت هم‌زمان به مدت 24 و 36 ساعت تیمارشدند. تمامی آزمایش‌ها به منظور افزایش دقت کار به‌صورت تریپلیکیت انجام شد.

بررسی شمارش سلولی به روش تریپان بلو

برای شمارش سلول‌ها از رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو و لام هموسایتومتر (لام نئوبار) 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 نگرفته در هر چهار سری خانه‌های شانزده‌تایی) 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 × 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 g 1000به‌مدت 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، RNAآن‌ها طبق دستورالعمل کیت high pure RNA isolation kit (Roche)استخراج شد و به‌منظور تولید cDNA مورد استفاده قرار گرفت.

ساخت cDNA

1- میکروگرم RNA برای سنتز cDNA با استفاده از کیت RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kitو 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. به‌ازای هر واکنش، 10میکرولیتر 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 سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه و در ادامه، 40 سیکل برای

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-05-29]

دناتوراسیون (5 ثانیه در 95 درجه سانتی گراد) و آنیلینگ‌اکستنشن توام (20 ثانیه در 60 درجه سانتی گراد) می‌باشد. 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 به‌کاررفته درآزمون Real Time Quantitative RT-PCR

Gene	Accession number	Forward primer (5′-3′)	Reverse primer (5′-3′)	Size (bp)
HPRT	NM_000194	TGGACAGGACTGAACGTCTTG	CCAGCAGGTCAGCAAAGAATTTA	111
Bax	NM_138761	CGAGAGGTCTTTTTCCGAGTG	GTGGGCGTCCCAAAGTAGG	242
Bcl-2	NM_000633	CGGTGGGGTCATGTGTGTG	CGGTTCAGGTACTCAGTCATCC	90

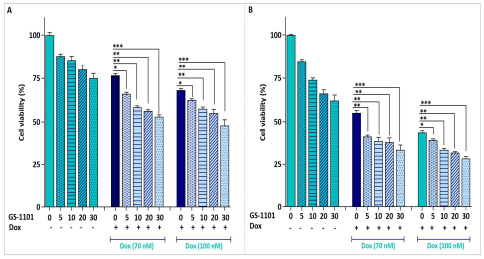
آنالیز آماری

تمامی آزمایشات به شکل سه آزمون مستقل انجام و مقادیر گزارش شده به شکل Mean ± SD قید شدند. هم‌چنین برای محاسبات آماری از روش t-test و نرم‌افزار SPSS17 و GraphPad Prism7 استفاده شد.

یافته ها

بررسی تاثیر تیمار هم‌زمان سلول‌های Nalm-6 با دو داروی GS-1101 و دوکسوروبیسین بر شاخص زنده‌مانی سلول‌ها

جهت بررسی تاثیر مهار مسیر PI3K/Akt در افزایش خاصیت سایتوتوکسیک یکی از مهم‌ترین داروهای مورد استفاده در رژیم درمانی لوسمی لنفوبلاستیک حاد به نام دوکسوروبیسین، سلول‌های Nalm-6 با دوزهای افزاینده 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 سلول‌ها با کمک تست ترپیان‌بلو مورد ارزیابی قرار گرفت. همان‌طور که در شکل 1 در دو قسمت A و B نشان داده شده است، داروی GS-1101 و دوکسوروبیسین به تنهایی به‌صورت وابسته به دوز و زمان قادر به کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌های Nalm-6 می‌باشند. با این وجود، هنگامی که سلول‌ها با این دو دارو به‌صورت ترکیبی تیمار می‌شوند، میزان درصد بقاء سلول‌ها به‌طور کاملاً معناداری کاهش می‌یابد. به عبارت دیگر نتایج به دست آمده نشان می‌دهند که GS-1101 به‌صورت قابل توجهی حساسیت سلول‌های Nalm-6 را به دوکسوروبیسین در دو دوز 70 و 100 نانومولار تشدید می‌نماید (شکل 1 قسمت A و B).

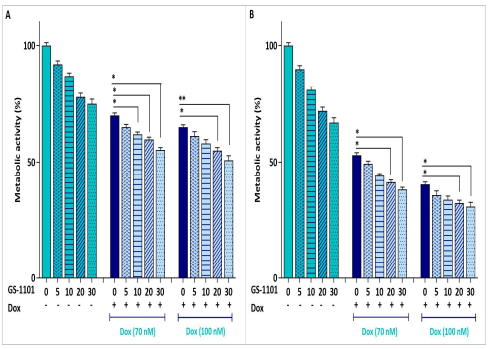


شکل شماره1: تاثیر هم‌زمان داروهای GS-1101 و دوکسوروبیسین بر زنده‌مانی سلول‌های Nalm-6. سلول‌های Nalm-6 با غلظت‌های 5، 10، 20 و 30 میکرومولار از داروی GS-1101 و غلظت‌های 70 و 100 نانومولار دوکسوروبیسین هرکدام به‌تنهایی و همچنین به‌صورت هم‌زمان تیمار و پس از گذشت 24 (A) و 36 (B) ساعت، درصد زنده‌مانی سلول‌ها با روش ترپیان‌بلو بررسی شد. همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود، تیمار هم‌زمان بادو دارو درصد زنده‌مانی سلول‌هارا به‌صورت معناداری نسبت به هرکدام از داروها به‌تنهایی کاهش می‌دهد. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean ± SD)محاسبه شد و p value به‌دست آمده(*، $P \leq 0/05$، $P \leq 0/01$ و $P \leq ۰/۰۰۱$) نشان‌گر معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه تیمار شده با داروی دوکسوروبیسین بود.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-05-29]

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) هریک 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 موید 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.



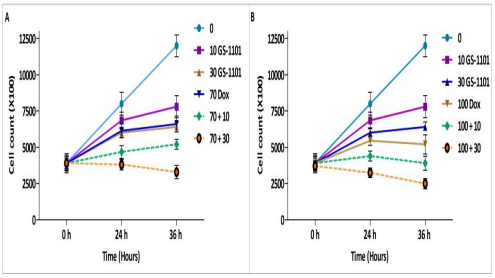
شکل شماره 2: تاثیر GS-1101 و دوکسوروبیسین بر فعالیت متابولیک سلول‌های Nalm-6 به‌طور وابسته به دوز و زمان. سلول‌ها در تعداد 5000 سلول در پلیت 96 خانه‌ای تحت تأثیر مقادیر مختلف GS-1101 و دوکسوروبیسین هر کدام به تنهایی و به‌صورت هم‌زمان قرار گرفته و به مدت 24 (A) و 36 (B) ساعت انکوبه شدند. همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود، تیمار هم‌زمان با دو دارو به‌صورت وابسته به دوز و زمان فعالیت متابولیک را کاهش داده و نسبت به تیمار با هریک به‌تنهایی دارای اثر مهاری 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 به‌دست آمده(*، $P \leq 0/05$، $P \leq 0/01$ و $P \leq ۰/۰۰۱$) نشان‌گر معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه تیمار شده با داروی دوکسوروبیسین بود.

بررسی تاثیر هم زمان دو دارو GS-1101 و دوکسوروبیسین بر کاهش شمارش سلولی در سلول های Nalm-6

به‌منظور بررسی این که آیا داروی GS-1101 می‌تواند علاوه بر اثر سایتوتوکسیک، تاثیر ضدتکثیری 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 مهاری را بر سلول‌های Nalm-6 داشته است که این امر نشان‌گر این واقعیت است که ترکیب این دو دارو در کنار یکدیگر می‌تواند به

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-05-29]

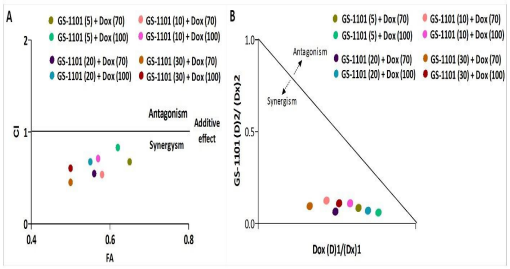
صورت وابسته به دوز و زمان سبب کاهش تعداد سلول‌های زنده گردد شود.



شکل شماره 3: تاثیر سینرژیسم داروهای GS-1101 و دوکسوروبیسین بر شمارش سلولی Nalm-6 به‌صورت 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 تکی و ترکیبی تیمار شدند. همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود، تیمار هم‌زمان با دو دارو به‌صورت وابسته به دوز و زمان، شمارش‌سلولی را کاهش داده است و نسبت به هرکدام از داروها به‌تنهایی دارای اثر ضدتکثیری بیشتری می‌باشد.

بررسی تاثیر سینرژیسم دو داروی GS-1101 و دوکسوروبیسین

در ادامه، به‌منظور بررسی این‌که آیا تاثیر ایجاد شده توسط دو داروی GS-1101 و دوکسوروبیسین از نوع سینرژیسم 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 سینرژیسم دو دارو با یکدیگر از طریق بررسی میزان درصد زنده‌مانی سلول‌ها پس از تیمار با هر یک از داروها به‌تنهایی و به‌صورت ترکیبی با یکدیگر می‌باشد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که تمامی نقاط زیر خط additive هستند که بیان‌گر تاثیر سینرژیسم دو دارو با یکدیگر می‌باشد. همان طور که در شکل 4 مشخص شده است، آنالیز هر دو شاخص CI و Isobologram نشان دهنده وجود تاثیر سینرژیسم می‌باشند. در 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، درحالی‌که 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 تاثیر سینرژیسم وجود دارد.



شکل شماره 4: بررسی تاثیر سینرژیسم بین دو داروی GS-1101 و دوکسوروبیسین در رده‌ی سلولی Nalm-6 توسط شاخص‌های CI و Isobologram. سلول‌های Nalm-6 به‌طور 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 شاخص‌هاهمگی نشانگر وجود اثر سینرژیسم می‌باشند (CI زیر 1 و Isobologram زیر خط).

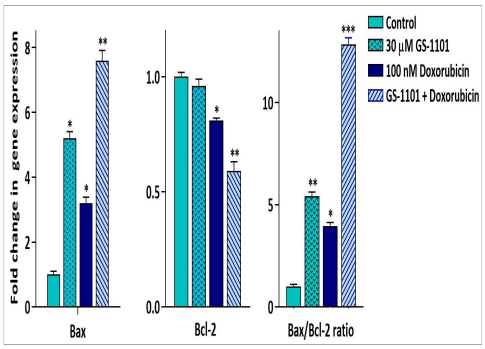
جدول شماره 2: شاخص CI و DRI برای ترکیب دو داروی GS-1101 و دوکسوروبیسین

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	۰/۶۰۷

بررسی تاثیر سینرژیسم GS-1101 و دوکسوروبیسین بر بیان ژن‌های پرو و آنتی‌آپوپتوتیک در سلول‌های Nalm-6

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-05-29]

پروتئین پروآپوپتوتیک Bax یک پروتئین کلیدی در مسیر آپوپتوز می‌باشد، که با اتصال به غشا میتوکندری منجر به خروج سیتوکروم c و اجزا پروآپوپتوتیک دیگر از میتوکندری می‌شود. مطالعات نشان می‌دهند که پروتئین آنتی‌آپوپتوتیک Bcl-2 با اتصال به Bax و مهار آن، از بروز پدیده آپوپتوز جلوگیری می‌کند(18). برای بررسی اثر سینرژیسم GS-1101 و دوکسوروبیسین بر بیان ژن‌های Bax و Bcl-2 میزان بیان mRNA این دو ژن توسط روش Real-Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. همان‌طور که در شکل 5 مشاهده می‌شود، تیمار هم‌زمان با دوز 30 میکرومولار GS-1101 و دوز 100 نانومولار دوکسوروبیسین منجر به افزایش تقریبا 7 برابری بیان ژن Bax نسبت به کنترل و افزایش معنادار آن نسبت به هرکدام از داروها به‌تنهایی می‌شود. لازم به ذکر است؛ اگرچه GS-1101 به تنهایی قادر به کاهش میزان بیان mRNA ژن Bcl-2 نمی‌باشد، تیمار با دو دارو به‌صورت هم‌زمان تاثیر معناداری بر روی کاهش بیان ژن Bcl-2 دارد و در نتیجه نسبت Bax/Bcl-2 را به صورت معناداری افزایش می‌بخشد.



شکل شماره 5: تاثیر سینرژیسم GS-1101 و دوکسوروبیسین بر بیان ژن‌های Bax و Bcl-2. تیمار سلول‌ها به‌طور هم‌زمان با دوزهای 30 میکرومولار از GS-1101 و 100 نانومولار دوکسوروبیسین باعث افزایش بیان mRNA ژن پروتئین پروآپوپتوتیک Bax و کاهش بیان mRNA ژن آنتی‌آپوپتوتیک Bcl-2 نسبت به تیمار با هر کدام از داروها به تنهایی می‌گردد. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean ± SD) محاسبه شد و p value به‌دست آمده(*، $P \leq 0/05$ و $P \leq 0/01$) نشان‌گر معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه تیمار شده با داروی دوکسوروبیسین بود.

بحث

داروی دوکسوروبیسین، یکی از رایج‌ترین و شناخته شده‌ترین اعضای خانواده آنتراسایکلین، که به صورت گسترده در رژیم درمانی بسیاری از انواع سرطان‌ها کاربرد دارد، به‌عنوان داروی خط اول درمان لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) نیز بسیار مورد توجه می‌باشد(19). با وجود مزایای غیرقابل انکار این دارو، عوارض جانبی وابسته به دوز و از همه مهم‌تر، عارضه قلبی - عروقی، استفاده از این دارو را در بسیاری از پروتکل‌های درمانی محدود نموده‌است (20). به‌علاوه، شواهد و بررسی‌هایی که به تازگی انجام شده است، نشان می‌دهند که بروز مقاومت به داروی دوکسوروبیسین یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین مشکلات درمانی بیماران مبتلاء به ALL می‌باشد(21). کسب توانایی تکثیر غیرطبیعی سلولی و فرار از آپوپتوز که عمدتاً به دلیل فعال شدن مسیرهای انتقال پیامی هم‌چون PI3K/Akt صورت می‌گیرد میزان حساسیت به طیف وسیعی از داروهای شیمی‌درمانی از جمله دوکسوروبیسین را کاهش داده است(22). بنابراین در حال حاضر، تلاش‌های تحقیقاتی بی‌شماری با هدف بررسی تاثیر مهار مسیرهای پیام‌رسانی PI3K/Akt در افزایش اثرات سایتوتوکسیک بسیاری از داروهای شیمی‌درمانی در حال شکل گرفتن می‌باشد(22). مطالعات پیشین نشان داده‌اند که مهار PI3K/Akt توسط مهارکننده برجسته آن،داروی GS-1101 به شدت باعث القاء مرگ سلولی در بسیاری از سرطان‌ها از جمله بدخیمی‌های هماتولوژیک می‌شود(16). به همین دلیل، بر آن شدیم تا ارزش درمانی یک مهارکننده PI3K/Akt را در تشدید اثرات سایتوتوکسیک و

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-05-29]

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

نتایج به‌دست آمده در این بررسی نشان می‌دهد که مهار مسیر PI3K/Akt توسط مهارکننده اختصاصی ایزوفرمp110δ، اثرات سایتوتوکسیک و ضدتکثیری داروی دوکسوروبیسین را به صورت قابل توجهی افزایش می‌دهد. این نتایج بیان‌گر این واقعیت هستند که ترکیب دو داروی GS-1101 دوکسوروبیسین نه‌تنها میزان بقاء و فعالیت متابولیک سلولهای Nalm-6 را به‌صورت وابسته به دوز و زمان کاهش می‌دهد؛ 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 1101-GS و دوکسوروبیسین دارای اثر سینرژیسم با یکدیگر می‌باشند. نتایج به دست آمده در این مطالعه، همگام با مطالعات پیشین است که وجود تاثیر سینرژیسم داروی GS-1101 با بسیاری از داروهای شیمی‌درمانی هم‌چون ریتوکسی‌ماب و عوامل آلکیله‌کننده را گزارش نموده‌اند(24 ،23). هم‌چنین در سال 2014، Wagnerو همکارانش نیز نشان دادند که مهار مسیر PI3K/Akt توسط GS-1101 می‌تواند اثرات سایتوتوکسیک آنتی‌بادی‌های منوکلونال را در بیماران مقاوم به درمان مبتلاء به لنفوم غیرهوچکین، افزایش دهد(25).

بررسی‌های بی‌شماری نشان داده‌اند که افزایش فعالیت مسیر PI3K/Akt در پاسخ به استفاده از داروهای روتین نظیر دوکسوروبیسین منجر به اختلال در تعادل بین بیان ژن‌های پرو و آنتی‌آپوپتوتیک و در نتیجه کاهش آپوپتوز می‌شود، که این موضوع علت مقاومت به درمان می‌باشد(27 ،26). بررسی که در سال 2010 توسط Jeffery J.Wallin بر روی تاثیر سینرژیسم دوکسوروبیسین و مهارکننده PI3K در رده‌ی سلولی 7-MCFانجام شد، نشان داد که تیمار هم‌زمان با دوکسوروبیسین و مهارکننده PI3K باعث افزایش چشم‌گیر اثر ضدتوموری دوکسوروبیسین می‌شود(8). نتایج به دست آمده در این مطالعه با هدف بررسی مکانیسم ملکولی که می‌تواند در کاهش میزان بقاء و تکثیر سلول‌های Nalm-6 موثر باشد، نیز نشان داد که پس از تیمار سلول‌ها با ترکیب دو دارو، میزان بیان ژن Baxبه عنوان مهم‌ترین مولکول پروآپوپتوتیک و همچنین ژن آنتی‌آپوپتوتیک Bcl-2 دچار تغییر می‌گردد. پس از تیمار 24 ساعته سلول‌ها با GS-1101 و دوکسوروبیسین میزان بیان ژن Bax نسبت به ژن Bcl-2 افزایش می‌یابد که این امر با برهم زدن تعادل بین ژن‌های پرو و آنتی‌آپوپتوتیک سبب ایجاد اختلال در پتانسیل غشاء میتوکندری شده و به این ترتیب بروز مرگ سلولی را برای سلول‌های Nalm-6 رقم می‌زند.

درکل، به نظر می‌رسدکه مهار کردن مسیر پیام‌رسانی PI3K/Akt توسط مهارکننده اختصاصی PI3K منجر به افزایش اثرات ضد سرطانی داروی دوکسوروبیسین می‌گردد و همچنین باعث می‌شود تا این داروی رایج شیمی‌درمانی بتواند در دوزهای کم‌تر اثرات آپوپتوتیک و ضد تکثیری خود را اعمال نماید. از این رو می‌توان امیدوار بود با استفاده هم‌زمان این دو دارو، بیماران مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد با بازده بیش‌تری درمان شوند و هم‌چنین با کاهش دوز دوکسوروبیسین عوارض جانبی و مقاومت به درمان کاهش یابد که این موضوع نیاز به مطالعات و بررسی‌های بیشتری به‌خصوص در سطح انسانی دارد.

سپاسگزاری

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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-05-29]

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 p110α/p85α complex elucidates the effects of oncogenic PI3Kα mutations. Science. 2007;318(5857):1744-1748.
9. Zhao L, Vogt PK. Helical domain and kinase domain mutations in p110α 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

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-05-29]

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-κB 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,etal. PI3Kδ 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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2025-05-29]