

Effect of Clarithromycin on Enhancement of Doxorubicin-induced Cytotoxicity and Apoptosis in A549 Tumor-Cell Line

Mohammad Shokrzadeh¹,
Fatemeh Shaki^{2,3},
Nahid Amani⁴

¹ Professor, Department of Toxicology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Associate Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Department of Toxicology and Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ PhD in Toxicology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received March 6, 2022 ; Accepted September 13, 2022)

Abstract

Background and purpose: Nowadays, multi-drug regimens or combination therapy are new approaches in cancer treatment that combine two or several therapeutic agents. Combination therapy aims at improving the therapeutic efficacy of anticancer drugs while reducing toxicity and preventing drug resistance. The aim of this study was to determine the synergistic effect of combined clarithromycin and doxorubicin in lung cancer A549 cell line.

Materials and methods: Combined cytotoxicity of doxorubicin and clarithromycin was evaluated by MTT assay in A549 cell line. The nature of the interaction observed between doxorubicin and clarithromycin was analyzed in Compusyn software based on Chou and Talalay method. In order to clarify the molecular mechanism of the drug synergism, apoptosis was measured by Annexin V/PI double staining.

Results: Clarithromycin at 500 μ M synergistically reduced the IC₅₀ value of doxorubicin. The enhanced cytotoxicity of doxorubicin by clarithromycin was associated with increased apoptotic cell death in A549 cell line.

Conclusion: Clarithromycin is a suitable candidate when combined with other anticancer drugs in vitro. However, more investigations are needed to evaluate the application of clarithromycin in adjuvant cancer therapy.

Keywords: doxorubicin, clarithromycin, combination therapy, synergism, apoptosis

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 32 (213): 42-54 (Persian).

Corresponding Author: Nahid Amani - Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.
(E-mail: Nahid.amani1367@gmail.com)

ارزیابی اثر کلاریترومایسین در افزایش سمیت سلولی و آپاپتوز ناشی از دوکسوروبیسین در رده سلولی سرطان ریه (A549)

محمد شکرزاده¹فاطمه شکی^{2,3}ناهید امانی⁴

چکیده

سابقه و هدف: امروزه، یکی از رویکردهای جدید درمان سرطان، استفاده از رژیم‌های چند دارویی یا درمان ترکیبی است که دو یا چند عامل دارویی را ترکیب می‌کنند. هدف درمان ترکیبی، افزایش کارایی داروی ضد سرطان، و در کنار آن کاهش سمیت و جلوگیری از بروز مقاومت دارویی می‌باشد. در این مطالعه، به بررسی اثر سینرژیست ترکیب دو داروی کلاریترومایسین و دوکسوروبیسین در رده سلولی سرطان ریه سلول غیر کوچک، A549، پرداخته شد.

مواد و روش‌ها: سمیت ترکیبی کلاریترومایسین و دوکسوروبیسین در سلول‌های A549 توسط تست MTT ارزیابی شد. ماهیت برهمکنش مشاهده شده بین دوکسوروبیسین و کلاریترومایسین، با استفاده از نرم‌افزار Compusyn و بر اساس روش اصلاح شده‌ی Chou and Talalay آنالیز گردید. جهت بررسی مکانیسم مولکولی دخیل در سینرژیسم دارویی، آپاپتوز به روش رنگ آمیزی دوگانه سلول‌ها با Annexin/PI اندازه گیری شد.

یافته‌ها: بر اساس نتایج حاصل از اندازه گیری میزان بقای سلولی و آنالیز برهمکنش دارویی، کلاریترومایسین در غلظت 500 میکرومولار به طور سینرژیست موجب کاهش IC50 دوکسوروبیسین گردید. افزایش سمیت دوکسوروبیسین توسط کلاریترومایسین با افزایش مرگ آپاپتوتیک در رده سلولی A549 همراه بود.

استنتاج: کلاریترومایسین کاندید مناسبی برای ترکیب با سایر داروهای ضد سرطان در سطح مطالعات سلولی می‌باشد. هر چند که به تحقیقات بیشتری برای بررسی کاربرد کلاریترومایسین در درمان کمکی سرطان نیاز است.

واژه های کلیدی: دوکسوروبیسین، کلاریترومایسین، رژیم دارویی ترکیبی، سینرژیسم، آپاپتوز

مقدمه

از سرطان‌های ریه است که رفتار مشابهی دارند و شامل کارسینوم سلول سنگ فرشی، آدنوکارسینوما و کارسینوم سلول بزرگ هستند. آدنوکارسینوما، شایع‌ترین فرم سرطان ریه در افراد غیر سیگاری و زنان می‌باشد (3). سرطان سلول کوچک تقریباً به‌طور انحصاری در افراد

سرطان ریه دومین شایع و اولین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در بین زنان و مردان است (1). سرطان ریه به دو دسته کلی، کارسینوم سلول کوچک و کارسینوم سلول غیر کوچک طبقه‌بندی می‌شود (2). سرطان ریه سلول غیر کوچک یک اصطلاح کلی برای انواع مختلفی

E-mail: Nahid.amani1367@gmail.com

مؤلف مسئول: ناهید امانی - ساری: کیلومتر 17 جاده فرح آباد، مجمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی

1. استاد، گروه سم شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

2. دانشیار، مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

3. گروه سم شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

4. دکترای تخصصی سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: 1400/12/15 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1401/5/5 تاریخ تصویب: 1401/6/23

سیگاری رخ می‌دهد. رشد این سلول‌های سرطانی سریع‌تر از انواع قبل است و اکثر بیماران مبتلا به این نوع تومور در مرحله تشخیص، دچار متاستاز هستند (4). سیگار کشیدن، مواجهه با آزیست و گاز رادون و همچنین تماس با کروم، نیکل، هیدروکربن‌های آروماتیک پلی‌سیکلیک، ترکیبات معدنی آرسنیک و بیس-کلرومتیل‌اتر موجب افزایش ریسک ابتلا به سرطان ریه می‌شوند (5).

روش‌های مختلفی برای درمان سرطان وجود دارند که به نوع سرطان و شدت آن بستگی دارند. استفاده از داروهای ضدسرطان شامل کموتراپی، هورمون تراپی، ایمونوتراپی و هدف درمانی بخش اعظم روش‌های درمانی سرطان را تشکیل می‌دهند (6). داروهای ضدسرطان ممکن است به صورت تک‌دارویی یا رژیم چند دارویی تجویز شوند. وقتی داروها به صورت ترکیبی تجویز می‌شوند، موثرتر خواهند بود. استفاده از داروها با مکانیسم عمل متفاوت به منظور ایجاد اثرات بیش‌تر است به طوری که سمیت محدودکننده دوز ترکیبات باهم متفاوت باشد. به طور ایده‌آل، وقتی داروها با اثرات متفاوت با هم ترکیب می‌شوند، هر دارو در دوز بهینه خود، بدون بروز اثرات جانبی غیرقابل تحمل، مورد استفاده قرار می‌گیرد. بنابراین، هدف رژیم‌های دارویی ترکیبی افزایش کارایی و کاهش سمیت است (7).

کلاریترومایسین یکی از اعضای خانواده آنتی‌بیوتیک‌های ماکرولیدی است که به طور معمول برای درمان عفونت‌های باکتریایی، بیماری لایم و ریشه کنی عامل عفونت معده، هلیکوباکتر پیلوری، به کار می‌رود (8). به دلیل استفاده گسترده کلاریترومایسین به عنوان آنتی‌بیوتیک، این دارو پروفایل سمیت شناخته شده‌ای دارد. از معمول‌ترین عوارض جانبی کلاریترومایسین می‌توان به درد شکمی، اسهال، تهوع، استفراغ و نارسایبی چشایی، بیخوابی و راش اشاره کرد. عوارض جانبی ذکر شده معمولاً خفیف بوده و پس از درمان و یا قطع مصرف دارو برطرف می‌شود. سایر عوارض جانبی غیرمعمول و نادر است (9). مطالعات گسترده‌ای در زمینه

نقش بالقوه کلاریترومایسین در درمان انواع تومور در ترکیب با داروهای ضد سرطان معمول انجام شده است. برای مثال، کلاریترومایسین موجب افزایش اثربخشی تالیدومااید و آنالوگ‌هایش و استروئیدها در بیماران مبتلا به میلوما گردیده است. همچنین، کلاریترومایسین در ترکیب با دگزامتازون (به تنهایی یا در ترکیب با تالیدومااید) باعث افزایش پاسخ به درمان در این بیماران شده است. هرچند که مکانیسم دقیق این اثرات سینرژیک مشخص نیست ولی به نظر می‌رسد که مکانیسم‌های دخیل شامل: القای آپاپتوز، تعدیل پاسخ‌های ایمنی، کاهش سایتوکاین‌های پیش التهابی، مهار آزیوزنز و مهار اتوفازی هستند (10-14). علاوه بر این، در برخی از مطالعات سلولی نشان داده شده که کلاریترومایسین موجب سرکوب اتوفازی در سلول‌های توموری می‌گردد. فرآیند اتوفازی، در حین جدا شدن ماتریکس خارج سلولی که در متاستاز ضروری است، افزایش می‌یابد (15). مطالعات نشان داده‌اند که کلاریترومایسین یک مهارکننده قوی اتوفازی در سلول‌های میلوما و لوکمی میلوئید مزمن است (14). هم‌چنین، مطالعات نشان داده‌اند که ترکیب کلاریترومایسین با داروهای بورتومیب و داساتینیب موجب افزایش اثرات سمیت سلولی به واسطه افزایش بیان فاکتورهای پروآپتوتیک CHOP و مهار اتوفازی گردیده است (16، 17). بنابراین، با توجه به مطالعات انجام شده و با توجه به پروفایل سمی شناخته شده و عوارض جانبی کم، می‌توان از کلاریترومایسین به عنوان درمان کمکی در ترکیب با کموتراپی بهره جست.

دوکسوروبیسین یک آنتی‌بیوتیک آنتراسایکلین است که به عنوان یکی از موثرترین و پر مصرف‌ترین عوامل شیمی درمانی مورد تایید FDA در درمان سرطان‌های پستان، ریه، گاستریک، تخمدان، تیروئید، لنفوما و هوچکین و غیره‌ها چکین، مالتیپل میلوما، سارکوما و سرطان‌های کودکان به کار می‌رود (18). دوکسوروبیسین از طریق مهار RNA و DNA پلیمرز وابسته به DNA و آنزیم توپوایزومراز II موجب نتیجه مهار سنتز RNA و

دور در دقیقه به مدت 5 سانتریفیوژ شدند. رسوب سلولی در یک میلی لیتر محیط کشت به حالت سوسپانسیون تهیه شد و درصد زنده بودن سلول‌های موجود در سوسپانسیون سلولی با مخلوط کردن نسبت مساوی از تریپان بلو با استفاده از لام هموسایتومتر و بررسی با میکروسکوپ نوری تعیین گردید. پس از حصول اطمینان از عدم آلودگی سلول‌ها، از سلول‌های با درصد زنده بودن بالای 90 درصد برای انجام تست استفاده شد. سپس، در هر چاهک پلیت 96 خانه، تعداد 10^4 سلول کشت داده شد. پس از 24 ساعت انکوباسیون، غلظت‌های 5، 10، 50، 100 و 500 میکرومولار از داروی کلاریترومایسین به سلول‌ها اضافه شد و میزان زنده بودن سلول‌ها پس از 24، 48 و 72 ساعت با روش رنگ سنجی MTT مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی سمیت سلولی به روش MTT

MTT یک نمک تترازولیم محلول در آب است. در اثر آنزیم‌های دهیدروژناز میتوکندریایی که فقط در سلول‌های زنده فعال می‌باشند، در حلقه MTT شکست ایجاد شده و به بلورهای آبی رنگ فورمازان غیر محلول تبدیل می‌شود. لذا با استفاده از روش نورسنجی در طول موج 570 نانومتر میزان فورمازان که توسط دی‌متیل سولفو کساید (DMSO) به شکل محلول درآمده اندازه‌گیری و از طول موج 630 فررنس کم شده و بدین وسیله میزان سلول‌های زنده تعیین می‌گردد. پس از طی زمان انکوباسیون، 5 میلی گرم از پودر MTT (Sigma، امریکا) در 1 میلی لیتر بافر PBS (Biowest، فرانسه) حل کرده سپس توسط فیلتر 0/22 میکرون استریل گردید. برای اضافه شدن این محلول به چاهک‌ها این محلول به نسبت 1 به 10 با محیط کشت DMEM رقیق و بعد از تخلیه محیط رویی سلول‌ها 100 میکرولیتر از محیط جدید حاوی محلول MTT اضافه شد. بعد از 3-4 ساعت انکوباسیون در انکوباتور محیط رویی سلول‌ها با 200 میکرولیتر DMSO (Merck، آلمان) جایگزین و

DNA و آسیب به سازوکارهای تعمیر DNA می‌گردد. هم‌چنین، دوکسوروبیسین باعث تولید رادیکال‌های آزاد و در نتیجه لیپید پراکسیداسیون و آسیب غشایی، آسیب به DNA، استرس اکسیداتیو و فعال شدن مسیرهای آپاپتوز می‌گردند. متأسفانه، استفاده از دوکسوروبیسین به دلیل عوارض جانبی خطرناک از جمله سمیت قلبی وابسته به دوز، محدود شده است. به همین دلیل، تجویز دوکسوروبیسین محدود به دوز است که به نوبه خود باعث ناکارآمدی درمان و بروز مقاومت دارویی می‌شود (19). در مطالعه حاضر، به بررسی اثر ترکیب همزمان دو داروی دوکسوروبیسین و کلاریترومایسین در افزایش سمیت سلولی و القای آپاپتوز در رده سلولی سرطان ریه سلول غیر کوچک، A549، پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

کشت سلول

در مطالعه تجربی حاضر، رده سلولی A549 (آدنو کارسینوما اپیتلیالی ریه) از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران به صورت سلول فریز خریداری شد و در محیط کشت DMEM high glucose (Biowest، فرانسه) با افزودن 10 درصد سرم جنین گاوی (FBS) (Gibco، امریکا) و 1 درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین (Sigma، امریکا) کشت داده و در انکوباتور در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و رطوبت کافی و میزان 5 درصد دی‌اکسید کربن نگهداری شدند.

بررسی اثر وابسته به دوز و زمان کلاریترومایسین در مهار رشد سلول‌های A549

به منظور بررسی اثر کلاریترومایسین بر افزایش سمیت دوکسوروبیسین، ابتدا نیاز بود که سمیت غلظت‌های مختلف کلاریترومایسین در سلول‌ها ارزیابی گردد. برای این منظور، زمانی که سلول‌ها حداقل به 70 درصد رشد سلولی رسیدند توسط تریپسین-EDTA (Sigma، امریکا) از ته فلاسک جدا و در دور 1500

برای 10 دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد. بعد از حل شدن کامل رنگ‌های تولید شده، جذب آن به وسیله دستگاه الیزاریدر (Shimadzu، ژاپن) خوانده شد (20).

بررسی اثر تیمار همزمان کلاریترومایسین و دوکسوروبیسین در مهار رشد سلول‌های A549

پس از ارزیابی سمیت کلاریترومایسین در سلول‌های A549، برای یافتن بهترین غلظت برای ترکیب با دوکسوروبیسین، سه غلظت کلاریترومایسین، 5، 100 و 500 میکرومولار در ترکیب با غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین (5، 10، 20، 50، 100 و 200 نانومولار) با سلول‌ها مواجه شدند. پس از 48 ساعت، میزان زنده بودن سلول‌ها با روش MTT اندازه‌گیری و میزان IC50 دوکسوروبیسین به تنهایی و همراه با کلاریترومایسین محاسبه و مقایسه گردید.

آنالیز برهمکنش دارویی بین دوکسوروبیسین و کلاریترومایسین در سلول‌های A549
برای آنالیز برهمکنش مشاهده شده بین دوکسوروبیسین و کلاریترومایسین، از نرم‌افزار Compusyn و بر اساس متد اصلاح شده Chou and Talalay استفاده شد (21).
نرم‌افزار از فرمول $D_{1-FA} = D_x [FA / (1-FA)]^{1/m}$ برای محاسبه دوز مورد نیاز داروها که به صورت جداگانه و ترکیبی برای القای سطوح مختلف سمیت نیاز است، استفاده می‌کند. برای هر سطح از سمیت سلولی، یک ایندکس ترکیب (Combination Index) با استفاده از فرمول زیر توسط نرم‌افزار محاسبه می‌شود.

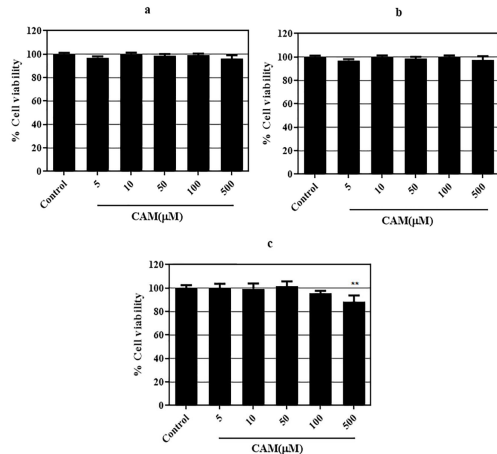
$$CI = \frac{(D)1}{(D1-FA)1} + \frac{(D)2}{(D1-FA)2} + \alpha \frac{(D)1}{(D)2} \frac{(D1-FA)1}{(D1-FA)2}$$

در نرم‌افزار Compusyn از دو روش برای آنالیز اثر ترکیبی دو دارو می‌توان استفاده کرد. اگر هر دو دارو دارای منحنی مهار رشد یکسان باشند یعنی سمیت هر دو ترکیب به هم نزدیک باشد، از روش Fixed ratio و اگر یکی از دو دارو سمی تر باشد یا یکی از ترکیبات دارای سمیت تاخیری باشد، از روش Non-fixed ratio استفاده

می‌شود. در روش Non-fixed ratio غلظت‌های مختلف از داروی سمی تر در ترکیب با غلظت ثابت از داروی دیگر مورد بررسی قرار می‌گیرد. با توجه به نتایج حاصل از تست‌های MTT، دوکسوروبیسین سمی تر از کلاریترومایسین است، بنابراین از روش Non-fixed ratio استفاده شد. در سلول‌های A549 از غلظت 500 میکرومولار کلاریترومایسین همراه با غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین برای آنالیز برهمکنش دارویی استفاده شد. از معیار Combination Index (CI) برای تعیین برهمکنش دو دارو استفاده شد. معیار $CI < 1$ نشان‌دهنده اثر سینرژیستی می‌باشد.

بررسی آپاپتوز به روش فلوسایتومتری

به منظور تعیین سلول‌های آپاپتوتیک در جمعیت سلولی، از کیت تشخیص آپاپتوز Annexin V-FITC (Sigma، امریکا) استفاده گردید. به این صورت که، 24 ساعت پس از کشت سلول‌های A549 در پلیت 6 خانه‌ای (10^6 سلول در هر چاهک)، تیمار موردنظر انجام شد. بعد از تیمار کردن سلول‌ها و 48 ساعت انکوباسیون، سلول‌ها توسط Trypsin-EDTA از کف پلیت جدا شدند. پس از دوبار شستشو با بافر PBS استریل، نمونه‌ها به مدت 5 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد با سرعت 1500 دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. به رسوب حاصل از سانتریفیوژ سلول‌ها، یک میلی‌لیتر Binding buffer اضافه شد. بعد از این مرحله، سلول‌ها در رک حاوی یخ جهت ادامه آزمایش به بیمارستان امام خمینی ساری انتقال یافتند. در آزمایشگاه ایمونولوژی بیمارستان، به هر یک از لوله‌ها مقادیر 10 میکرو لیتر از رنگ پروپید یوم دیدید و 5 میکرو لیتر از رنگ آنکسین اضافه شد. نمونه‌ها در دمای اتاق (25 درجه سانتی‌گراد) به مدت زمان 10 دقیقه در تاریکی انکوبه شدند و در نهایت آنالیز سلولی توسط دستگاه فلوسایتومتری انجام گرفت. برای تهیه گراف‌های فلوسایتومتری از نرم‌افزار 10 FlowJo™ استفاده شد.



نمودار شماره 1: سمیت غلظت‌های مختلف کلاریترومایسین در سلول‌های A549، بعد از 24 (a)، 48 (b) و 72 ساعت (c). نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ نشان داده شده است. در گروه کنترل، سلول‌ها با 0/01 درصد استون مواجه شدند. * : اختلاف معنادار با گروه کنترل است ($P < 0/01$).

مقادیر IC_{50} دو کسورویسین در رده سلولی A549، در حضور و عدم حضور کلاریترومایسین محاسبه گردید. همان‌طور که در نمودار شماره 2 نشان داده شده، در سلول‌های A549، غلظت 5 میکرومولار کلاریترومایسین اثری بر سمیت سلولی دو کسورویسین نداشت. غلظت 100 میکرومولار کلاریترومایسین باعث افزایش سمیت 20 نانومولار دو کسورویسین شد و غلظت 500 میکرومولار کلاریترومایسین، به‌طور معنی‌دار توانست سمیت غلظت‌های 10 و 20 نانومولار دو کسورویسین را افزایش دهد. مقایسه مقادیر IC_{50} دو کسورویسین در سلول‌های A549، در حضور و عدم حضور کلاریترومایسین نشان داد که فقط غلظت 500 میکرومولار کلاریترومایسین باعث کاهش معنادار IC_{50} دو کسورویسین می‌گردد (جدول شماره 1)، بنابراین در سایر تست‌ها از غلظت 500 میکرومولار کلاریترومایسین در سلول‌های A549 استفاده شد.

جدول شماره 1: مقادیر IC_{50} دو کسورویسین (نانومولار) در سلول‌های A549 در حضور و عدم حضور کلاریترومایسین

| | |
|-------------|--------------|
| CAM (-) | 95.29±5.35 |
| CAM (5μM) | 91.42±5.66 |
| CAM (100μM) | 39.84±6.54 * |
| CAM (500μM) | 30.45±5.67 * |

* اختلاف معنی‌دار بر اساس آنالیز Extra sum of squares F test

آنالیز آماری

تمام تست‌ها در مطالعه حاضر به صورت سه بار تکرار انجام شدند و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش گردید. میانگین‌ها از طریق آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) با مقایسه دو به دو (Post hoc) با معیار Tukey در نرم‌افزار GraphPad Prism ورژن 8 انجام گردید. حد معناداری $P < 0/05$ تعریف شده است. مقایسه داده‌های IC_{50} توسط آزمون Extra sum of squares F test انجام گرفت. برای آنالیز برهمکنش دارویی از نرم‌افزار Compusyn استفاده شد.

یافته‌ها

اثر وابسته به دوز و زمان کلاریترومایسین در مهار رشد سلول‌های A549

به منظور بررسی اثر وابسته به دوز و وابسته به زمان کلاریترومایسین بر روی سلول‌های A549، غلظت‌های مختلف کلاریترومایسین (5، 10، 50، 100 و 500 میکرومولار) در زمان‌های 24، 48 و 72 ساعت با سلول‌ها مواجه شدند. همان‌طور که در نمودار شماره 1 نشان داده شده است، در سلول‌های A549 در 24 و 48 ساعت هیچ سمیتی دیده نشد. در 72 ساعت، غلظت 500 میکرومولار کلاریترومایسین باعث 12 درصد کاهش بقای سلولی شد. در هیچ غلظتی از کلاریترومایسین، مهار 50 درصد بقای سلولی (IC_{50}) مشاهده نشد.

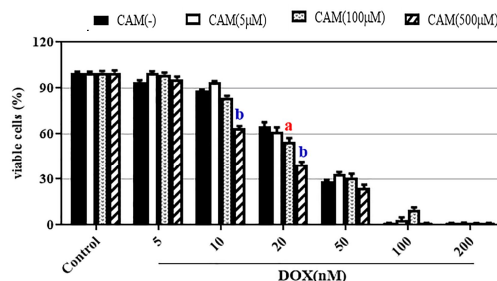
اثر تیمار همزمان کلاریترومایسین و دو کسورویسین در مهار رشد سلول‌های A549

در این مرحله، برای بررسی اثر کلاریترومایسین بر سمیت سلولی دو کسورویسین در سلول‌های A549، از سه غلظت 5، 100 و 500 میکرومولار کلاریترومایسین در ترکیب با غلظت‌های مختلف دو کسورویسین استفاده شد و اثر ترکیب کلاریترومایسین با دو کسورویسین بر مهار رشد سلول‌ها بعد از 48 ساعت مورد بررسی قرار گرفت.

غلظت تمام سلول‌ها را از بین برده، نمی‌توان از این دو غلظت برای تعیین برهمکنش استفاده کرد. بنابراین، بهترین ترکیب در سلول‌های A549، غلظت 500 میکرومولار کلاریترومایسین به همراه غلظت 20 نانومولار دوکسوروبیسین است.

جدول شماره 2: مقادیر Combination Index بین داروی کلاریترومایسین و دوکسوروبیسین در سلول‌های A549 توسط نرم‌افزار Compusyn

| Combination Index | Effect | CAM concentration (μM) | DOX concentration (nM) |
|-------------------|--------|-------------------------------------|------------------------|
| 7/730 | 0/58 | 500 | 5 |
| 1/158 | 0/54 | 500 | 10 |
| 0/91 | 0/22 | 500 | 20 |
| 1/268 | 0/17 | 500 | 50 |
| 0/488 | 0/008 | 500 | 100 |
| 0/977 | 0/008 | 500 | 200 |



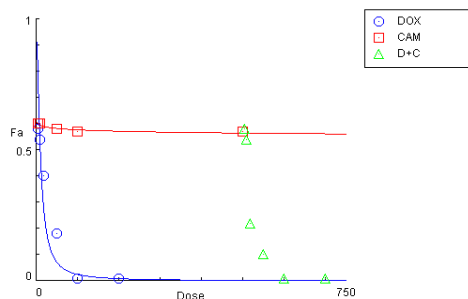
نمودار شماره 2: میزان بقای سلول‌های A549 پس از مواجهه با دوکسوروبیسین (DOX) در حضور غلظت‌های 5، 100 و 500 میکرومولار کلاریترومایسین (CAM) پس از 48 ساعت. نتایج به صورت Mean \pm SEM گزارش شده است. a و b اختلاف معنادار با گروه کنترل. (b: P < 0/001 و a: P < 0/01)

نتایج حاصل از آنالیز برهمکنش دارویی بین دوکسوروبیسین و کلاریترومایسین در سلول‌های A549

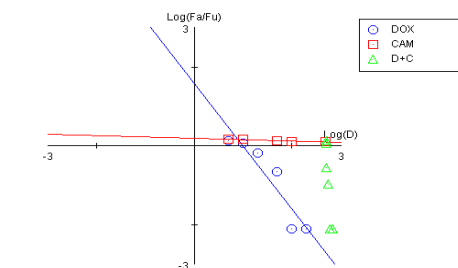
همانطور که مشاهده شد، کلاریترومایسین می‌تواند باعث افزایش سمیت سلولی دوکسوروبیسین در سلول‌های A549 شود. برای آنالیز برهمکنش مشاهده شده بین این دو دارو، از نرم‌افزار Compusyn که در قسمت روش‌ها توضیح داده شد، استفاده کردیم.

در سلول‌های A549، با توجه به نتایج به دست آمده از مقایسه IC50 دوکسوروبیسین، فقط غلظت 500 میکرومولار کلاریترومایسین توانست باعث کاهش معنادار IC50 شود. بنابراین، برهمکنش غلظت 500 میکرومولار کلاریترومایسین در ترکیب با غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین مورد آنالیز قرار گرفت. نتایج حاصل از آنالیز نرم‌افزار Compusyn در سلول‌های A549 در تصویر شماره 1 نشان داده شده است. مقادیر CI در جدول شماره 2 گزارش شده است. با توجه به مقادیر CI، کلاریترومایسین فقط در ترکیب با غلظت 20 نانومولار دوکسوروبیسین به صورت سینرژیک اثر دارد (CI=0/91). در غلظت‌های 10 و 50 نانومولار دوکسوروبیسین، کلاریترومایسین اثر افزایشی (Additive) دارد (CI به ترتیب برابر 1/15 و 1/2). هم‌چنین، در غلظت‌های 100 و 200 نانومولار دوکسوروبیسین، مقادیر CI اثر سینرژیک را نشان می‌دهند، ولی چون دوکسوروبیسین در این دو

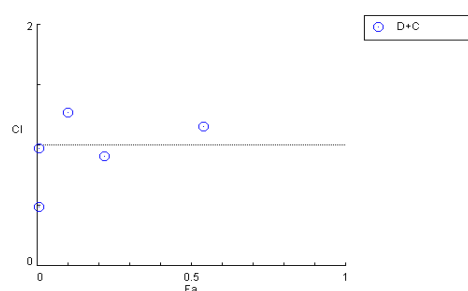
Dose-Effect Curve



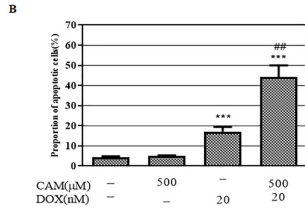
Median-Effect Plot



Combination Index Plot



تصویر شماره 1: پلات‌های مختلف حاصل از آنالیز برهمکنش دارویی بین کلاریترومایسین و دوکسوروبیسین در سلول‌های A549 با استفاده از نرم‌افزار Compusyn



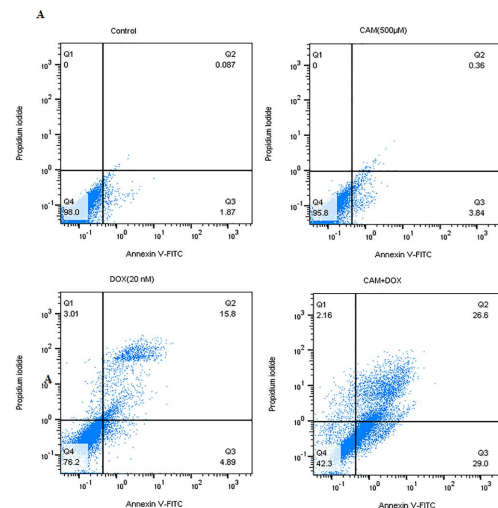
تصویر شماره 2: اثر ترکیب کلاریترومایسین و دوکسوروبیسین در آپاپتوز سلول‌های A549 بعد از 48 ساعت (A) نمودار دات پلات شدت Annexin V/PI نشان می‌دهد که ترکیب کلاریترومایسین و دوکسوروبیسین باعث افزایش تراکم سلولی در ناحیه Q3 (آپاپتوز اولیه) و Q2 (آپاپتوز ثانویه) نسبت به دوکسوروبیسین به تنهایی شده است. (B) نمودار مقایسه درصد مرگ آپاپتوتیک (اولیه+ثانویه) ناشی از تیمار با کلاریترومایسین و دوکسوروبیسین به تنهایی و در ترکیب باهم. *: اختلاف معنادار با گروه کنترل، #: اختلاف معنادار با گروه دوکسوروبیسین، (***) $P < 0/001$ و (##) $P < 0/01$

بحث

سرطان یکی از علل مهم مرگ و میر در جهان است و هزینه‌های اقتصادی و مالی برای تحقیقات در زمینه سرطان رو به افزایش است. توسعه داروهای ضد سرطان جدید بسیار دشوار و پرهزینه است و نیازمند آزمایشات گسترده *in vitro* و *in vivo* و سپس مطالعات *clinical trial*، قبل از تایید شدن از طرف FDA، است. اینطور برآورد شده که ورود یک داروی جدید به بازار دارویی، به حداقل 15 سال زمان نیاز دارد (22). بنابراین، پیدا کردن روش‌ها و دستاوردهای موثرتر که از لحاظ اقتصادی نیز به صرفه باشند، در این زمینه ضروری است. روش‌های جدیدی که منحصراً به پروفایل سمیت سلولی یک داروی متداول ضدسرطان متکی نیستند، جهت فراهم کردن درمان هدف‌دار، موثرتر و بهبود یافته‌تر سرطان نیاز است. برای مثال، استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال به همراه ترکیبات طبیعی پیشگیری‌کننده از سرطان، یکی از استراتژی‌های جدید در پیشگیری یا درمان سرطان می‌باشد (23، 24). هسته مرکزی درمان سرطان، ترکیب دو یا تعداد بیش تری از ترکیبات درمانی به منظور هدف قرار دادن اختصاصی مسیرهای سیگنالینگ

نتایج حاصل از بررسی اثر کلاریترومایسین در آپاپتوز القا شده توسط دوکسوروبیسین در سلول‌های A549 همان‌طور که نشان داده شد، کلاریترومایسین به صورت سینرژیک باعث افزایش سمیت سلولی دوکسوروبیسین در سلول‌های A549 می‌شود. برای بررسی این نکته که کلاریترومایسین از طریق چه مکانیسمی باعث افزایش سمیت دوکسوروبیسین می‌شود، مرگ آپاپتوتیک ناشی از دوکسوروبیسین، در حضور و عدم حضور کلاریترومایسین توسط کیت Annexin V/PI مورد ارزیابی قرار گرفت.

در سلول‌های A549، غلظت 500 میکرومولار کلاریترومایسین اثر سینرژیک روی غلظت 20 نانومولار دوکسوروبیسین داشت. مقدار IC20 دوکسوروبیسین در سلول‌های A549، 14/1 نانومولار محاسبه شد. برای بررسی اثر کلاریترومایسین بر آپاپتوز ناشی از دوکسوروبیسین، ترکیب غلظت 500 میکرومولار کلاریترومایسین به همراه غلظت 20 نانومولار دوکسوروبیسین به مدت 48 ساعت با سلول‌های A549 مواجه شدند و سپس میزان آپاپتوز توسط فلوسایتومتری ارزیابی شد (تصویر شماره 2). همان‌طور که در شکل مشخص است، کلاریترومایسین به‌طور قابل توجهی باعث افزایش آپاپتوز اولیه و ثانویه ناشی از دوکسوروبیسین در سلول‌های A549 شده است. (##) $P < 0/01$ در مقایسه با گروه دوکسوروبیسین به تنهایی.



است، چرا که داروهای مورد تایید FDA، پروتکل‌های امنیت دارویی را گذرانده و پروفایل فارماکوکینتیک و توکسیکوکینتیک شناخته شده‌ای دارند (32). نشان داده شده که در شرایطی که مونوتراپی با داروهای معمول ضدسرطان، در درمان ایمن و قابل تحمل بیماران سرطانی شکست می‌خورد، روش Drug re-purposing می‌تواند مفید واقع شود. برای مثال، رژیم ترکیبی می‌تواند شامل یک عامل محافظت‌کننده‌ی repurposed (مانند یک داروی سایتواستاتیک که از طریق توقف رشد سلولی، از سلول‌های نرمال محافظت می‌کند) و یک یا چند داروی کشنده سلول‌های سرطانی باشد (33). بنابراین، استفاده از روش Drug re-purposing می‌تواند موجب افزایش کارایی و تاثیر داروهای ضد سرطان، کاهش مقاومت دارویی، کاهش سمیت سلولی در سلول‌های نرمال و همچنین کاهش هزینه‌های مالی مربوط به کشف داروهای جدید در تحقیقات سرطان مفید واقع شود. به منظور شناسایی کاندیدهای دارویی برای استفاده در روش Drug re-purposing، پروژه‌ای تحت عنوان ReDO (Repurposing drugs in Oncology) راه‌اندازی شده است. شش ترکیب دارویی که نخستین بار توسط پروژه ReDO برای تحقیقات بیش‌تر انتخاب شدند شامل: مبندازول (ضد کرم)، نیتروگلیسرین (گشادکننده عروق)، سایمتیدین (مهارکننده رسپتورهای H_2)، کلاریترومایسین (آنتی‌بیوتیک)، دیکلوفناک (ضد التهاب غیراستروئیدی) و ایتراکونازول (ضدقارچ) بود که پیش از این در درمان سرطان استفاده نمی‌شدند (34) که در مطالعه حاضر از آنتی‌بیوتیک کلاریترومایسین استفاده شد.

به منظور بررسی اثر کلاریترومایسین بر تقویت اثر سمیت سلولی دوکسوروبیسین در سلول‌های A549، نیاز بود که در ابتدا اثر وابسته به دوز و زمان کلاریترومایسین در مهار رشد سلولی ارزیابی شود. نتایج حاصل از اندازه‌گیری درصد بقای سلولی در سلول‌های A549 نشان دادند که در هیچ غلظتی از کلاریترومایسین مهار 50 درصد بقای سلولی مشاهده نشد و بنابراین،

دخیل در سرطان است (25). هرچند که هنوز هم درمان مونوتراپی به عنوان یک روش درمانی معمول و رایج در بسیاری از انواع سرطان‌هاست، ولی به نظر می‌رسد که این روش در مقایسه با درمان ترکیبی (Combination therapy) از اثربخشی کم‌تری برخوردار است. تکنیک‌های مونوتراپی رایج به طور غیرانتخابی، سلول‌های در حال تکثیر را مورد حمله قرار می‌دهند که در نهایت منجر به تخریب سلول‌های سرطانی و هم‌چنین سلول‌های سالم می‌شود. کموتراپی به علت بروز عوارض جانبی متعدد می‌تواند توکسیک باشد و هم‌چنین به علت سرکوب شدید سیستم ایمنی از طریق اثر روی سلول‌های مغز استخوان، موجب افزایش حساسیت به بیماری‌ها گردد (25-27). در عوض، احتمال بروز سمیت در روش درمان ترکیبی کم‌تر است، زیرا استفاده از چند ترکیب مسیره‌های سیگنالینگ مختلف را مورد هدف قرار می‌دهد که این امر موجب اثرات سینرژیک یا افزایشی می‌شود و در نتیجه، به دوزاژ کم‌تری از داروی کموتراپی سمی‌تر نیاز است. علاوه بر این، درمان ترکیبی ممکن است موجب پیشگیری از اثرات سمی روی سلول‌های نرمال شود، در حالی که، همزمان می‌تواند باعث بروز سمیت روی سلول‌های سرطانی گردد (28). هم‌چنین، احتمال بروز مقاومت دارویی طی درمان مونوتراپی بسیار بیش‌تر است زیرا، درمان ثابت و مداوم با یک دارو موجب به کارگیری مسیره‌های نجات جایگزین توسط سلول‌های سرطانی می‌گردد (29). در نهایت، داروهای کموتراپی، به دلیل عملکرد غیرانتخابی، سلول‌های بنیادی تومور را به‌طور کامل از بین نمی‌برند که این یکی از بزرگترین معایب درمان مونوتراپی است زیرا، سلول‌های بنیادی تومور پتانسیل self-renewal، تمایز و مهاجم را برای نوپلاسم فراهم می‌کنند (30).

یک روش درمانی جدید که در تحقیقات سرطان مورد توجه قرار گرفته، Drug re-purposing است. در روش Drug re-purposing، از داروهای موجود برای درمان سایر بیماری‌ها (به غیر از سرطان)، برای درمان سرطان استفاده می‌شود (31). این روش بسیار کارآمد

دادند که در سلول‌های A549 کلاریترومایسین در غلظت 500 میکرومولار اثر سینرژیک بر سمیت دوکسوروبیسین دارد.

برای بررسی این که کلاریترومایسین از طریق چه مکانیسمی باعث افزایش سمیت دوکسوروبیسین می‌شود، مرگ آپاپتوتیک ناشی از دوکسوروبیسین، در حضور و عدم حضور کلاریترومایسین مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که کلاریترومایسین می‌تواند موجب افزایش مرگ آپاپتوتیک در سلول‌های A549 گردد. کلاریترومایسین به‌طور سینرژیک موجب افزایش آپاپتوز ناشی از سیس پلاتین در دو رده سلول سرطانی تخمدان، SKOV3 و C13، گردید. در این مطالعه نشان داده شد که ترکیب کلاریترومایسین و سیس پلاتین موجب افزایش قابل توجه سطح ROS و کاهش بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان داخل سلولی و در نتیجه افزایش آپاپتوز گردید (39). در مطالعه دیگری که توسط Miki Nakamura و همکاران انجام شد، نشان داده شد که کلاریترومایسین از طریق تضعیف اتوفازای موجب افزایش اثر ضد توموری تالیدوماید در سلول‌های مالتیپل میلوما می‌گردد (14).

در مطالعه دیگری در رت‌های مبتلا به آدنوکارسینوما پستان، تجویز کلاریترومایسین همراه با کربوپلاتین یا سیکلوفسفامید موجب کاهش میزان مرگ و میر گردید. مطالعات *in vitro* روی سلول‌های آدنوکارسینوما پستان رت‌ها نشان داد که بعد از تجویز کلاریترومایسین، میزان بیان MMP-9، TGF- β و TGF- α در این سلول‌ها کاهش یافته بود. نتایج این تحقیق نشان داد که ممکن است کلاریترومایسین موجب تعدیل microenvironment تومور شود و روی پتانسیل متاستاتیک تومور اثر بگذارد (37). بنابراین، کلاریترومایسین از طریق مکانیسم‌های مختلف می‌تواند باعث افزایش کارایی داروهای ضد سرطان شود. در مطالعه حاضر، مشاهده شد که کلاریترومایسین باعث افزایش آپاپتوز ناشی از دوکسوروبیسین در سلول‌های A549 می‌گردد. بنابراین، کلاریترومایسین

کلاریترومایسین به تنهایی سمیتی در این سلول‌ها ندارد. با توجه به اطلاعات حاصل از مطالعات بالینی و آزمایشات پره-کلینیکال، کلاریترومایسین اثرات ضد سرطانی مستقیم دارد که این اثر به نوع تومور بستگی دارد. برای مثال، در رده سلولی لنفوما Cell b، کلاریترومایسین باعث افزایش آپاپتوز گردید که با ظهور اجسام آپاپتوتیک، قطعه قطعه شدن DNA، دژنراسیون و تفکیک سلول‌ها از هم مشخص شد. بیان رسپتور TNFR1 و کاسپازهای 3-8-9 نشان‌دهنده القای آپاپتوز از طریق سیستم TNF (فاکتور نکروز توموری) بود (35).

در مطالعه‌ای که توسط Qiao Ai-Min و همکاران بر روی سلول‌های سرطانی Hela انجام شد، کلاریترومایسین موجب القای آپاپتوز از طریق مسیر آپاپتوتیک وابسته به میتوکندری و فعال شدن کاسپازهای 3 و 9 گردید (36). از طرف دیگر، در مطالعه‌ای که توسط Mizushima و همکاران بر روی آدنوکارسینوما پستان در رت انجام شد، کلاریترومایسین به تنهایی اثری روی میزان مرگ و میر نداشت (37). در مطالعه دیگری که بر روی اثر کلاریترومایسین در افزایش سمیت سلولی bortezomib انجام شد، نشان داد که کلاریترومایسین به تنهایی سمیت قابل توجهی روی سلول‌های سرطانی پستان، MDA-MB-231، ندارد (38). بنابراین، این‌طور به نظر می‌رسد که اثر ضد سرطانی کلاریترومایسین وابسته به نوع تومور می‌باشد. در مرحله بعد، اثر ترکیب همزمان کلاریترومایسین و دوکسوروبیسین بر مرگ سلول‌های A549 ارزیابی شد. با توجه به نتایج حاصل از اندازه‌گیری درصد بقا در سلول‌های A549، کلاریترومایسین در غلظت 500 میکرومولار به‌طور قابل توجه موجب کاهش IC50 دوکسوروبیسین گردید. بنابراین، کلاریترومایسین می‌تواند باعث افزایش سمیت دوکسوروبیسین در رده سلولی A549 شود. برای آنالیز برهمکنش مشاهده شده بین دو داروی کلاریترومایسین و دوکسوروبیسین در سلول‌های A549 از نرم‌افزار Compusyn استفاده شد و نتایج نشان

سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه دکترای تخصصی سم‌شناسی خانم ناهید امانی با کد اخلاق IR.NIMAD.REC.1396.019 می‌باشد. منابع مالی این مطالعه توسط موسسه ملی توسعه تحقیقات علوم پزشکی ایران با کد 957628 تامین شده است که بدین‌وسیله تشکر و قدردانی می‌شود.

کاندید مناسبی برای ترکیب با سایر داروهای ضد سرطان در سطح مطالعات سلولی می‌باشد. هرچند که به تحقیقات بیش‌تری برای بررسی کاربرد کلاریترومایسین در درمان ادجوانت سرطان، شناخت تاثیرات این دارو بر فیزیولوژی سلول‌های سرطانی و مکانیسم‌های مولکولی دخیل نیاز است.

References

- Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* 2001; 51(1): 15-36.
- Cooper WA, Lam DC, O'Toole SA, Minna JD. Molecular biology of lung cancer. *J Thorac Dis* 2013; 5(Suppl 5): S479-490.
- Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res* 2016; 5(3): 288-300.
- Tsoukalas N, Aravantinou-Fatorou E, Baxevanos P, Tolia M, Tsapakidis K, Galanopoulos M, et al. Advanced small cell lung cancer (SCLC): new challenges and new expectations. *Ann Transl Med* 2018; 6(8): 145.
- Malhotra J, Malvezzi M, Negri E, La Vecchia C, Boffetta P. Risk factors for lung cancer worldwide. *Eur Respir J* 2016; 48(3): 626-627.
- Urruticoechea A, Alemany R, Balart J, Villanueva A, Vinals F, Capella G. Recent advances in cancer therapy: an overview. *Curr Pharm Des* 2010; 16(1): 3-10.
- Jafarzadeh E, Montazeri V, Aliebrahimi S, Sezavar AH, Ghahremani MH, Ostad SN. Combined regimens of cisplatin and metformin in cancer therapy: A systematic review and meta-analysis. *Life Sciences* 2022; 120680.
- Browning DJ. Hydroxychloroquine and chloroquine retinopathy: screening for drug toxicity. *Am J Ophthalmol* 2002; 133(5): 649-656.
- Van Nuffel AM, Sukhatme V, Pantziarka P, Meheus L, Sukhatme VP, Bouche G. Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)—clarithromycin as an anti-cancer agent. *Ecancermedicalscience* 2015; 9: 513.
- Hamada K, Mikasa K, Yunou Y, Kurioka T, Majima T, Narita N, et al. Adjuvant effect of clarithromycin on chemotherapy for murine lung cancer. *Chemotherapy* 2000; 46(1): 49-61.
- Yatsunami J, Turuta N, Wakamatsu K, Hara N, Hayashi S-i. Clarithromycin is a potent inhibitor of tumor-induced angiogenesis. *Res Exp Med (Berl)* 1997; 197(4): 189-197.
- Yatsunami J, Fukuno Y, Nagata M, Tominaga M, Aoki S, Tsuruta N, et al. Antiangiogenic and antitumor effects of 14-membered ring macrolides on mouse B16 melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 1999; 17(4): 359-365.
- Yatsunami J, Fukuno Y, Nagata M, Tsuruta N, Aoki S, Tominaga M, et al. Roxithromycin and clarithromycin, 14-membered ring macrolides, potentiate the antitumor activity of cytotoxic agents against mouse B16 melanoma cells. *Cancer Lett* 1999; 147(1-2): 17-24.
- Nakamura M, Kikukawa Y, Takeya M, Mitsuya H, Hata H. Clarithromycin attenuates autophagy

- in myeloma cells. *Int J Oncol* 2010; 37(4): 815-820.
15. Fung C, Lock R, Gao S, Salas E, Debnath J. Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival. *Mol Biol Cell* 2008; 19(3): 797-806.
 16. Moriya S, Che X-F, Komatsu S, Abe A, Kawaguchi T, Gotoh A, et al. Macrolide antibiotics block autophagy flux and sensitize to bortezomib via endoplasmic reticulum stress-mediated CHOP induction in myeloma cells. *Int J Oncol* 2013; 42(5): 1541-1550.
 17. Schafranek L, Leclercq TM, White DL, Hughes TP. Clarithromycin enhances dasatinib-induced cell death in chronic myeloid leukemia cells, by inhibition of late stage autophagy. *Leuk Lymphoma* 2013; 54(1): 198-201.
 18. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, Hernandez-Boussard T, McLeod H, Klein TE, et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet Genomics* 2011; 21(7): 440-446.
 19. Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol* 2013; 65(2): 157-170.
 20. Amani N, Shokrzadeh M, Shaki F. Clarithromycin effectively enhances doxorubicin-induced cytotoxicity and apoptosis in MCF7 cells through dysregulation of autophagy. *Adv Med Sci* 2020; 65(2): 235-243.
 21. Bijnsdorp IV, Giovannetti E, Peters GJ. Analysis of drug interactions. *Methods Mol Biol* 2011; 731: 421-434.
 22. DiMasi JA, Hansen RW, Grabowski HG. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J Health Econ* 2003; 22(2): 151-185.
 23. White CA, Weaver RL, Grillo-López AJ. Antibody-targeted immunotherapy for treatment of malignancy. *Annu Rev Med* 2001; 52(1): 125-145.
 24. Alberts D, Colvin O, Conney A, Ernster V, Garber J, Greenwald P, et al. Prevention of cancer in the next millennium: report of the Chemoprevention Working Group to the American Association for Cancer Research. *Cancer Res* 1999; 59(19): 4743-4758.
 25. Yap TA, Omlin A, De Bono JS. Development of therapeutic combinations targeting major cancer signaling pathways. *J Clin Oncol* 2013; 31(12): 1592-1605.
 26. Blagosklonny MV. Analysis of FDA approved anticancer drugs reveals the future of cancer therapy. *Cell Cycle* 2004; 3(8): 1035-1042.
 27. Partridge AH, Burstein HJ, Winer EP. Side effects of chemotherapy and combined chemohormonal therapy in women with early-stage breast cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2001; 2001(30): 135-142.
 28. Blagosklonny MV. Overcoming limitations of natural anticancer drugs by combining with artificial agents. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26(2): 77-81.
 29. Khdair A, Chen D, Patil Y, Ma L, Dou QP, Shekhar MP, et al. Nanoparticle-mediated combination chemotherapy and photodynamic therapy overcomes tumor drug resistance. *J Control Release* 2010; 141(2): 137-144.
 30. Chen K, Huang Y-h, Chen J-l. Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacol Sin* 2013; 34(6): 732-740.
 31. Chong CR, Sullivan DJ. New uses for old drugs. *Nature* 2007; 448(7154): 645-646.
 32. Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3(8): 673-683.

33. Blagosklonny MV. A new science–business paradigm in anticancer drug development. *Trends Biotechnol* 2003; 21(3): 103-106.
34. Mudduluru G, Walther W, Kobelt D, Dahlmann M, Treese C, Assaraf YG, et al. Repositioning of drugs for intervention in tumor progression and metastasis: Old drugs for new targets. *Drug Resist Updat* 2016; 26: 10-27.
35. Ohara T, Morishita T, Suzuki H, Masaoka T, Ishii H, Hibi T. Antibiotics directly induce apoptosis in B cell lymphoma cells derived from BALB/c mice. *Anticancer Res* 2004; 24(6): 3723-3730.
36. Qiao A-m, Ikejima T, Tashiro S-i, Onodera S, Zhang W-g, Wu Y-l. Involvement of mitochondria and caspase pathways in N-demethyl-clarithromycin-induced apoptosis in human cervical cancer HeLa cell. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27(12): 1622-1629.
37. Sassa K, Mizushima Y, Fujishita T, Oosaki R, Kobayashi M. Therapeutic effect of clarithromycin on a transplanted tumor in rats. *Antimicrob Agents Chemothe* 1999; 43(1): 67-72.
38. Komatsu S, Miyazawa K, Moriya S, Takase A, Naito M, Inazu M, et al. Clarithromycin enhances bortezomib-induced cytotoxicity via endoplasmic reticulum stress-mediated CHOP (GADD153) induction and autophagy in breast cancer cells. *Int J Oncol* 2012; 40(4): 1029-1039.
39. Zhou B, Xia M, Wang B, Thapa N, Gan L, Sun C, et al. Clarithromycin synergizes with cisplatin to inhibit ovarian cancer growth in vitro and in vivo. *J Ovarian Res* 2019; 12(1): 1-10.