مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی بابل
دوره نوزدهم، شماره ۵، اردیبهشت ۱۳۹۶، صفحه ۱۳-۷

مقاله تحقیقی

اثر آپوپتوتیک مهار فسفاتیدیل‌اینوزیتول-۳ کیناز با استفاده از بوپارلیسیب در رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد

محمدرضا صدری (MSc)[۱]، آوا صفراوغلی‌آذر (MSc)[۱]، علیرضا کاظمی (MSc)[۱]، محسن حمید پور (PhD)[۱]، مهدی الهبخشیان (PhD)[۱]، داود بشاش (PhD)[۱*]

۱-گروه خون‌شناسی و بانک‌خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

دریافت: ۹۵/۱۰/۲۸، اصلاح: ۹۵/۱۲/۴، پذیرش: ۹۶/۲/۱۰

خلاصه

سابقه و هدف: مقاومت به داروهای شیمی‌درمانی یکی از مهم‌ترین معضلات درمانی بیماران مبتلاء به لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) می‌باشد. اختلال در مسیر فسفاتیدیل-اینوزیتول-۳ کیناز (PI3K) و همچنین ارتباط آن با بروز پدیده مقاومت باعث شده که مهارکننده‌های این مسیر، خصوصا Buaprlisib به عنوان یکی از امیدبخش‌ترین داروهای درمان سرطان معرفی شوند. هدف از این مطالعه، بررسی تاثیر مهار مسیر PI3K/Akt توسط داروی Buparlisib در کاهش بقا و همچنین القاء آپوپتوز در سلول‌هایNalm-6 می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، جهت سنجیدن اثر Buparlisib بر فعالیت مسیر PI3K/Akt در سلول‌هایNalm-6، میزان فسفریلاسیون Akt توسط وسترن‌بلات مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت بررسی اثر سایتوتوکسیک این مهارکننده، سلول‌های Nalm-6 با غلظت‌های مختلف Buparlisib (۴-۰/۵ میکرومولار) در زمان های ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت تیمار شدند و سپس فعالیت متابولیک، القاء آپوپتوز و میزان تغییر بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز توسط آزمون‌های MTT، رنگ‌آمیزی Annexin/PI و Rq-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان می‌دهد که مهار مسیر PI3K/Akt توسط Buparlisib، از طریق کاهش p-Akt باعث اعمال اثر سایتوتوکسیک در سلول‌های Naml-6 به صورت وابسته به دوز و زمان می‌شود. همچنین، نتایج بیان‌گر آن است که احتمالاً تاثیر ضدلوسمیک Buparlisib از طریق افزایش تقریباً ۱۷ برابری سلول‌های آپوپتوز شده ($p\leq۰/۰۰۱$)، و افزایش بیان mRNA ژن‌های پروآپوپتوتیک صورت می‌گیرد ($p\leq۰/۰۱$).

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه نشان داد که Buparlisib فعالیت ضدتوموری بر روی سلول‌های Nalm-6 باشد دارد و می توان از آن به عنوان داروی امیدبخش در درمان ALL استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: آپوپتوز، فسفاتیدیل-۳ کیناز، لوسمی لنفوبلاستیک حاد، Buparlisib،Nalm-6 .

مقدمه

علیرغم پیشرفتهای قابل توجه درمانی طی دهه‌های اخیر، لوسمی لنفوبلاستیک حاد (Acute Lymphoblastic Leukemia) هنوز به عنوان یکی از مرگ‌بارترین بدخیمی‌های هماتولوژیک در سراسر جهان شناخته می‌شود (۲و۱). از آنجائیکه فعال شدن مسیرهای انتقال پیام یک خصوصیت شایع در بین بیماران مبتلاء به ALL می‌باشد؛ در نتیجه به نظر می‌رسد که استفاده از درمان‌های هدفمند که این مسیرهای انتقال پیام را تحت تاثیر قرار می‌دهند به راهکار مناسبی برای درمان بیماران تبدیل شوند (۴و۳). مطالعات بالینی و ژنتیکی صورت گرفته بر روی مکانیسم‌های پاتوژنز ALL اعلام می‌کنند که مسیر PI3K/Akt در بیش از ۸۰٪ از موارد لوسمی لنفوبلاستیک حاد به طور غیرطبیعی فعال می‌باشد (۵). نتایج به دست آمده از این بررسی‌ها نشان می‌دهند که فعالیت این مسیر انتقال پیام، نه تنها باعث تقویت پتانسیل تکثیری سلول‌های لوسمیک می‌شود؛ بلکه تاثیر بسزایی در ایجاد مقاومت نسبت به داروهای شیمی‌درمانی نیز می‌گذارد (۴). بر همین اساس، مزیت استفاده از مهارکنندگان این مسیر انتقال پیام در درمان این بدخیمی بیش از پیش اهمیت پیدا می‌کند. طراحی-های دارویی تاکنون سه خانواده از مهارکنندگان PI3K با خصوصیات فارماکولوژیک و فارماکوکینتیک مختلف سنتز نموده است که در بین آن‌ها، مهارکننده تمام ایزوفرمی PI3K، Buparlisib از جایگاه برجسته‌ای برخوردار گشته است (۷و۶). Buparlisib یک داروی سنتتیک مهارکننده انتخابی PI3K است که با مهار تمامی ایزوفرم‌های زیر واحدهای تنظیمی و کاتالیتیکی PI3K، توانسته است اثرات ضد سرطانی خود را در انواع بدخیمی‌های انسانی با منشاء هیستولوژیک مختلف از تومورهای توپر گرفته تا بدخیمی‌های هماتولوژیک اعمال نماید (۹و۸). در یک مطالعه مشخص شده که داروی Buparlisib قادر است میزان بقاء و پتانسیل پرولیفراتیو سلول‌های AML را کاهش دهد و با القاء مرگ سلولی در این رده، از شمار سلول‌های بدخیم بکاهد؛ این درحالی است که همین مهارکننده PI3K بر روی سلول‌های نرمال هیچ اثر سایتوتوکسیکی را ایجاد نکرده است (۱۰). در مطالعه ای نیز نشان داده شده است که این مهارکننده

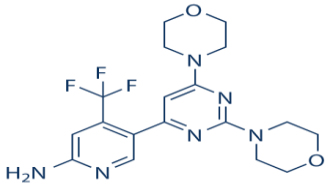
▣ این مقاله حاصل پایان نامه محمدرضا صدری دانشجوی کارشناسی ارشد خون شناسی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی می باشد.

*مسئول مقاله: دکتر داود بشاش
آدرس: تهران، میدان قدس، ابتدای خیابان دربند، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پیراپزشکی. تلفن: ۰۲۱-۲۲۷۱۷۵۰۴
E-mail: d.bashash@sbmu.ac.ir

تمام ایزوفرومی PI3K، قادر است مسیرهای آپوپتوتیک را در سلول‌های بدخیم مشتق شده از بیماران CLL فعال نماید (۸). عوارض جانبی محدود در کنار اثرات سایتوتوکسیک مطلوب این دارو باعث شده که Buparlisib به تنهایی و یا همراه با داروهای شیمی‌درمانی به خصوص در تومورهای توپر تحت بررسی قرار گیرد (۱۱). هدف از این مطالعه، بررسی اثرات سایتوتوکسیک داروی Buparlisib بر روی سلول‌های مشتق شده از Pre-B ALL (Nalm-6) می‌باشد و همچنین تلاش شده تا مکانیسم عمل این دارو در القاء آپوپتوز در رده سلولی نام برده مشخص گردد.

مواد و روش‌ها

کشت و تیمار رده سلولی Nalm-6 با Buparlisib: سلولهای Nalm-6 مورد استفاده در این مطالعه تجربی، در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ محتوی ۱۰٪ سرم (FBS)، ۱۰۰ U/ml پنی سیلین و ۱۰۰ µg/mL استرپتومایسین در شرایط دمایی۳۷°C و فشار ۵٪ CO_2 کشت داده شدند. برای تیمار دارویی سلول‌ها از داروی Buparlisib (شرکت Selleckchem آمریکا) استفاده شد. این دارو مشتق ۲ و ۶ دی مرفولینو پیریمیدین بوده و به صورت پودر می‌باشد (شکل ۱). محلول ذخیره Buparlisib در غلظت ۵۰µM به واسطه حل کردن این دارو در DMSO استریل تهیه شد و محلول ذخیره آن را در میکروتیوب‌ها تقسیم کرده و آنها را در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید. به منظور تعیین اثرات بهینه Buparlisib، سلولهای رده Nalm-6 با غلظت‌های ۰/۵ تا ۴ میکرومولار از دارو طی مدت زمان های ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. گروههای تیمارشده با دارو با گروههای کنترل که هیچ دارویی دریافت نکرده بودند و همچنین سلولهای قرار گرفته در DMSO، به‌عنوان کنترل منفی، مورد مقایسه قرار گرفتند و به منظور بررسی صحت تستهای انجام شده تمامی تستها به صورت تریپلیکیت ارزیابی شدند.



شکل ۱. ساختار شیمیایی داروی Buparlisib

بررسی فعالیت متابولیک سلول‌ها به روش MTT: به منظور سنجش اثر سایتوتوکسیک دارو در سلول‌ها و تعیین مقادیر IC_{50} از روش MTT استفاده شد. به همین منظور، ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون حاوی ۵×۱۰^{۳} از سلولهای Nalm-6 که در فاز تصاعدی رشد بودند، به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای منتقل شد. سپس به هر چاهک، از غلظت‌های ۵/۰-۴ µM داروی Buparlisib اضافه گردید و پلیت‌های آماده شده در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵٪ CO_2 تا ۴۸ ساعت نگه‌داری شدند. پس از گذشت مدت زمان مورد نظر به سلول‌های داخل پلیت، تترازولیوم بروماید با غلظت نهایی ۵ mg/mL در محیط RPMI ۱۶۴۰ تهیه و به هر چاهک اضافه گشت و به مدت ۳ ساعت انکوبه شد. سپس محلول رویی چاهک‌ها خالی گردید و ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO به هر چاهک اضافه شد. در ادامه، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

بررسی فلوسایتومتریک آپوپتوز با رنگ‌آمیزی Annexin-V/PI: جهت بررسی آپوپتوز القاء شده توسط مهارکننده تمام ایزوفرمی PI3K، پس از تیمار کردن سلول‌های Nalm-6 با دارو Buparlisib و انکوباسیون ۳۶ ساعته سلول‌ها در پلیت ۲۴ خانه‌ای با استفاده از کیت رنگی دوگانه Annexin/PI سلول‌ها جهت بررسی میزان آپوپتوز رنگ‌آمیزی می‌شوند. پس از گذشت زمان انکوباسیون مورد نظر، سلول‌های جمع‌آوری شده و با دور ۶۰۰g به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. پس از خارج کردن مایع رویی، رسوب سلولی یک بار توسط محلول PBS 1 X شست و شو داده شد و سپس به هر میکروتیوب حاوی سلول ۱۰۰ میکرولیتر Binding Baffer که حاوی ۱ میکرولیتر رنگ Annexin با غلظت ۵/۰ mg/ml و ۱ میکرولیتر رنگ PI با غلظت ۱/۰ mg/ml می‌باشد، اضافه شد. پس از انکوباسیون ۱۰ الی ۱۵ دقیقه‌ای در تاریکی و دمای اتاق، میزان خروج فسفاتیدیل سرین در سطح سلول‌ها توسط دستگاه فلوسایتومتری مورد سنجش واقع شد و نتایج توسط نرم‌افزار FloMax 2.3 (Partec GmbH، Munster، آلمان) آنالیز گردید.

استخراج RNA و ساخت cDNA: پس از تیمار سلول های Nalm-6 با Buparlisib و متعاقب گذشت ۴۸ ساعت، RNA سلول ها استخراج (Roche) و کمیت آنها با روش اسپکتروفتومتری با استفاده از دستگاه Nanodrop ND-1000 اندازه‌گیری شد. برای انجام واکنش رونویسی معکوس و جهت ساخت cDNA از کیت (PrimeScript™ RT reagen(Takara Bio Inc., Otsu, Japan) Takara Bio) استفاده شد. حجم مورد نظر برای انجام این واکنش۲۰ µL می‌باشد و محتوی مذکور به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ °C، ۵ دقیقه در دمای ۲۵°C و ۱ ساعت در دمای ۴۲ °C انکوبه شد و در نهایت، واکنش ساخت cDNA به واسطه انکوباسیون ۵ دقیقه‌ای در دمای ۷۰°C پایان پذیرفت. cDNA ساخته شده در دمای۲۰°C- نگهداری می‌شود.

بررسی بیان ژنها توسط Real-time PCR: برای بررسی کمی بیان ژن-ها به روش، Rq-PCR از دستگاه Roter-GeneQ (Qiagen) و کیت SYBER Premix EX Taq شرکت TAKARA استفاده شد. هم زمان ژن خانه‌ایHPRT برای نرمالیزه کردن بیان ژن‌ها و نمونه تیمار نشده به عنوان نمونه مرجع استفاده شد. طراحی آغازگرها با استفاده از نرم افزار Gene Runner و تایید آنها با نرم‌افزار تحت وب Primer-BLAST انجام گرفت (جدول۱). واکنش های PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۷µL میکرولیتر میکس، ۱ µL آغازگر غلظت (۱ پیکومول)، ۲ µL از cDNA ژن‌های مربوطه انجام گرفت. چرخه دمایی شامل یک مرحله ۹۵°C به مدت ۱۰ دقیقه برای فعال سازی آنزیم و متعاقب آن ۴۰ چرخه دمایی شامل ۹۵ °C به مدت ۱۵ ثانیه (واسرشتگی)، ۶۰°C به مدت ۱۵ ثانیه (اتصال آغازگر به هدف)،۷۲ °C به مدت ۱۵ ثانیه (تکثیر) انجام شد. پس از آن، مرحله منحنی دمای ذوب (Melting Curve) انجام شد تا از تکثیر اختصاصی رشته DNA هدف، اطمینان حاصل شود. همه واکنش ها به صورت دوتایی و دو بار به صورت مستقل تکرار شد.

جدول ۱. توالی آغاز گر های مورد استفاده در آزمایش Real-time PCR

ژن	Accession number	آغازگر معکوس('3- '5)	آغازگر مستقیم('3- '5)	سایز (bp)
HPRT	NM_000194	CCAGCAGGTCAGCAAAGAATTTA	TGGACAGGACTGAACGTCTTG	۱۱۱
Bax	NM_138761	GTGGGCGTCCCAAAGTAGG	CGAGAGGTCTTTTTCCGAGTG	۲۴۲
Bad	NM_004322	CCCATCCCTTCGTCGTCCT	CCCAGAGTTTGAGCCGAGTG	۲۴۹
PUMA	NM_014417	AGGAGTCCCATGATGAGATTGT	GACCTCAACGCACAGTACGAG	۹۸
NOXA	NM_021127	GGAAGTTCAGTTTGTCTCC	CAAGAACGCTCAACCGAG	۹۵

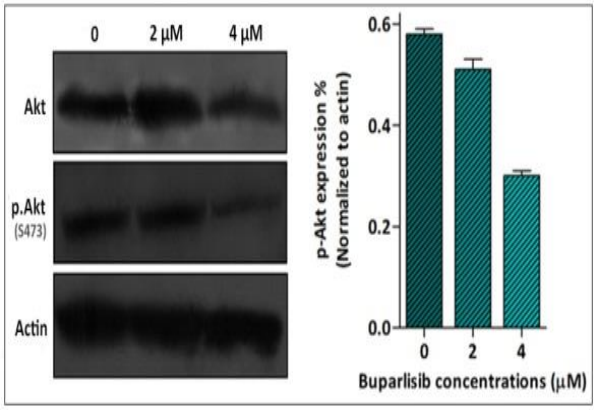
وسترن بلات: سلول‌ها ۱۲ ساعت پس از تیمار با مهارکننده سانتریفیوژ شدند و رسوب سلولی با PBC سرد شست و شو داده شد و در بافر RIPA که حاوی کوکتل مهارکنندگان پروتئاز و فسفاتاز می‌باشد (Sigma)؛ لیز شد. پس از تعیین غلظت پروتئین‌ها با روش Brad-ford میزان مشخصی از پروتئین تام درون سلولی در ژل SDS-PAGE ۱۰٪ قرار گرفتند و سپس به غشاء نیترو-سلولزی با استفاده از semidry transfer cell (Bio-Rad) منتقل گشت. پروتئین‌ها با استفاده از آنتی‌بادی اولیه و ثانویه مورد ارزیابی قرار گرفتند. شدت هر باند توسط نرم افزار ImageJ مورد محاسبه قرار گرفت و نسبت پروتئین‌ها به اکتین نرمالایز شدند.

تجزیه و تحلیل آماری: تمامی آزمایشات به شکل سه آزمون مستقل انجام شدند. برای محاسبات آماری از روش T-Test و نرم‌افزار SPSS ۲۱ و GraphPad Prism7 استفاده شد و p<۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

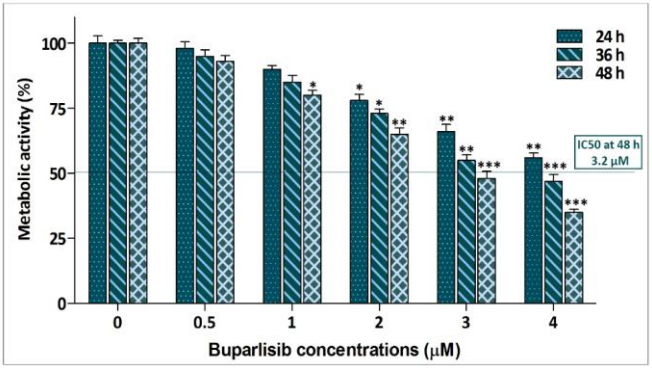
بررسی فسفریلاسیون Akt در سل لاین Nalm-6 قبل و بعد از تیمار با Buparlisib: ابتدا به منظور مشخص کردن میزان فسفریلاسیون پروتئین Akt، یکی از مهم‌ترین اجزاء مسیر انتقال پیام PI3K/Akt در سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد، سلول‌های Nalm-6 پیش از تیمار با دارو و سپس پس از مواجه شدن با دوزهای ۲ و ۴ میکرومولار از مهارکننده PI3K تحت آزمون وسترن بلات قرار گرفتند. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که سلول‌های Nalm-6 به علت سطح بالای فسفریلاسیون پروتئین Akt به خودی خود مسیر PI3K/Akt فعالی دارند (شکل ۲). تیمار سلول‌های Nalm-6 با دوزهای ذکر شده از مهارکننده به مدت ۱۲ ساعت، علیرغم آنکه تاثیری بر روی میزان بیان پروتئین Akt ندارد؛ اما به صورت وابسته به دوز میزان فسفریلاسیون پروتئین Akt را کاهش می‌دهد و با کاهش نسبت p-Akt به Akt از پیشرفت این مسیر سیگنالینگ جلوگیری می‌کند (شکل ۲).

بررسی فعالیت متابولیک سلول‌های Nalm-6 پس از تیمار با Buparlisib: برای بررسی اینکه آیا مهار مسیر PI3K/Akt در سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد، می‌تواند منجر به کاهش فعالیت متابولیک و متعاقب آن کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌ها شود؛ سلول‌های Nalm-6 با دوزهای افزاینده داروی Buparlisib تیمار شدند و سپس میزان فعالیت متابولیک آنها توسط تست MTT assay مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که Buparlisib قادر است میزان فعالیت متابولیک سلول‌های Nalm-6 را به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش دهد و به این ترتیب اثر سایتوتوکسیک خود را در این رده سلولی اعمال نماید. تیمار ۲۴ ساعته با دوزهای ۰/۵، ۱، ۲، ۳ و ۴ میکرومولار از Buparlisib فعالیت متابولیک سلول‌های Nalm-6 را به ترتیب ۵، ۱۰، ۲۲، ۳۴ و ۴۴٪ کاهش داد (شکل ۳). این اثر مهاری با گذشت زمان بیشتر نیز می‌شود؛ به طوریکه پس از گذشت ۴۸ ساعت از تیمار سلول‌ها با دوز ۳ میکرومولار مهارکننده، فعالیت متابولیک سلول‌های Nalm-6 حدود ۵۰٪ کاهش می‌یابد (p≤۰/۰۰۱) (شکل ۳).



شکل ۲. بررسی میزان فسفریلاسیون Akt در سلول های Nalm-6

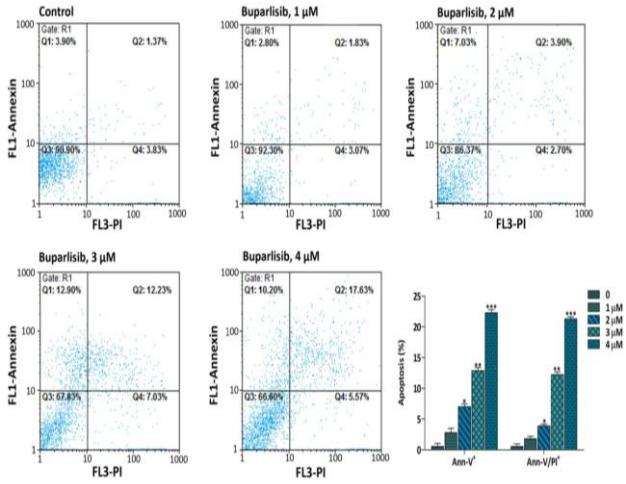
همانطور که در شکل مشخص است مسیر PI3K/Akt در سل لاین Nalm-6 به صورت غیرطبیعی فعال می‌باشد. همچنین نتایج موجود در این شکل نشان می‌دهد که با تیمار سلول‌های Nalm-6 با Buparlisib میزان فسفریلاسیون پروتئین Akt به صورت وابسته به دوز کاهش پیدا می‌کند.



شکل ۳. بررسی فعالیت متابولیک سلول‌های Nalm-6 پس از تیمار با Buparlisib.

تیمار سلول‌های Nalm-6 با دوزهای مشخص شده از Buparlisib فعالیت متابولیک سلول‌ها را به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش می‌دهد. میزان IC_{50} در مطالعه صورت پذیرفته حدود۳/۲ نانومولار در طی ۴۸ ساعت تخمین زده می‌شود. (*=p<۰/۰۵، **=p<۰/۰۱ و ***=p<۰/۰۰۱) نشان‌گر معنی‌دار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل می باشد.

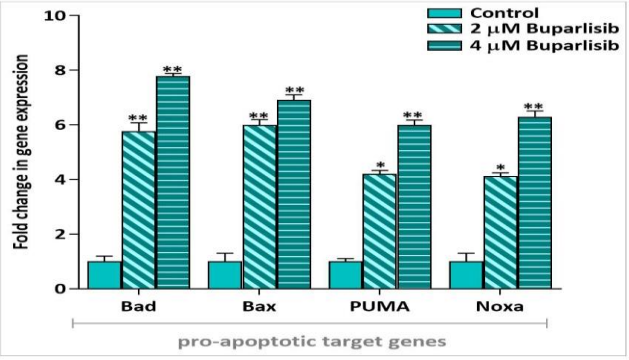
داروی Buparlisib منجر به القاء آپوپتوز در سلول‌های Nalm-6 می‌شود: برای بررسی آنکه آیا مهار مسیر PI3K/Akt در سلول Nalm-6 با فعال شدن مسیرهای آپوپتوزی نیز همراه است؛ پس از تیمار ۳۶ ساعته سلولها با دوزهای مختلف Buparlisib، میزان اکسترنالیزه شده فسفاتیدیل سرین با روش فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج فلوسایتومتری حاکی از آن است که داروی Buparlisib به طور قابل ملاحظه‌ای سبب القاء آپوپتوز در سلولهای Nalm-6 می‌شود. این دارو نه تنها باعث افزایش درصد سلولهای annexin-V مثبت می‌شود؛ بلکه درصد سلول‌های annexin-V/PI مثبت را نیز افزایش می‌دهد (p≤۰/۰۰۱) (شکل ۴). این نتایج به دست آمده ثابت می‌نماید که داروی Buparlisib با القاء آپوپتوز در سلول‌های Nalm-6 میزان بقاء این سلولها را کاهش داده و بدینگونه اثر سایتوتوکسیک خود را اعمال می‌نماید.



شکل ۴. بررسی درصد جمعیت سلول‌های آپوپتوز شده پس از تیمار با دوزهای مختلف Buparlisib

تیمار سلول‌های Nalm-6 با این مهار کننده PI3K باعث افزایش درصد جمعیت هر دو سلول‌های Ann-V + و Ann-V/PI + می‌شود. (*=p<۰/۰۵، **=p<۰/۰۱ و ***=p<۰/۰۰۱) نشان‌گر معنی‌دار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل می باشد.

داروی Buparlisib فعالیت رونویسی ژنهای پروآپتوتیک دخیل در فرآیند آپوپتوز را در سلول‌های Nalm-6 افزایش می‌دهد: از آنجائیکه مسیر PI3K/Akt نقش بسزایی را در تنظیم بیان بسیاری از ژن‌های پروآپوپتوتیک همچون Bax، Bad، PUMA و Noxa ایفا می‌نماید، در این مطالعه بر آن شدیم تا تاثیر مهار این مسیر پیام‌رسانی را در میزان تغییر بیان mRNA ژن‌های ذکر شده بسنجیم. نتایج آنالیز Rq-PCR نشان داد که تیمار سلول‌ها به مدت ۳۶ ساعت با دوزهای ۲ و ۴ میکرومولار از Buparlisib منجر به افزایش وابسته به دوز فعالیت رونویسی ژن‌های پروآپوتوتیک خانواده Bcl-2 می‌گردد. Buparlisib در غلظت ۲ میکرومولار میزان بیان ژن‌های Bad، Bax، PUMA و Noxa را به ترتیب ۵/۷ ، ۵/۹۹، ۴/۲ و ۴/۱ برابر افزایش می‌دهد (p≤۰/۰۵). این تاثیر القائی با تیمار سلول‌ها با غلظت ۴ میکرومولار بیشتر هم می‌شود و میزان بیان ژن‌های Bad، Bax، PUMA و Noxa به ترتیب ۷/۷۸، ۶/۹۱، ۶ و ۶/۳ برابر افزایش می‌یابد (p≤۰/۰۰۱) (شکل ۵).



شکل ۵. بررسی تاثیر داروی Buparlisib در بیان ژن‌های پرو آپوپتوتیک در سلول های Nalm-6.

نتایج به دست آمده از Rq-PCR نشان می‌دهد که این مهارکننده PI3K به طور کاملاً معنی-داری باعث افزایش بیان mRNA ژن‌های پروآپوپتوتیک می‌گردد. (*=p<۰/۰۵ و **=p<۰/۰۱) نشان‌گر معنی‌دار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل می باشد.

بحث و نتیجه گیری

نتایج به دست آمده در این بررسی نشان داد که Buparlisib احتمالاً با مهار مسیر PI3K/Akt و با جلوگیری از فسفریلاسیون پروتئین Akt اثرات سایتوتوکسیک خود را ایفا می‌کند و با مهار فعالیت متابولیک سلول‌های Nalm-6، میزان بقاء و زنده‌مانی این سلول‌ها را به صورت وابسته به دوز و زمان کاهش می‌دهد. همچنین تیمار ۴۸ ساعته با دوز ۳ میکرومولار از این مهارکننده قادر است میزان بقاء سلول‌های Nalm-6 را بیش از ۵۰٪ کاهش دهد. لازم به ذکر است که مطالعات کارآزمایی بالینی در فاز I عنوان نموده‌اند که به منظور جلوگیری از بروز عوارض جانبی، دوز مجاز برای استفاده از داروی Buparlisib در مطالعات پره‌کلینیکال و بر روی سل‌لاین‌های سرطانی ۴ میکرومولار می‌باشد (۱۲) و در این مطالعه نیز به خوبی نشان داده شد که اثر سایتوتوکسیک این مهارکننده در محدوده قابل قبول قرار دارد و در این مطالعه نیز جهت بررسی تاثیر دارو در Nalm-6 دوز مصرفی را از محدوده مورد تائید بالاتر نبرده‌ایم. مشابه با نتایج به دست آمده در این مطالعه، بررسی‌های پیشین صورت گرفته بر روی پنلی متشکل از سلول‌های رده لوسمی میلوبلاستیک حاد نیز نشان داد که داروی Buparlisib قادر است با کاهش میزان فسفریلاسیون پروتئین Akt از میزان بقاء سلول‌های بدخیم میلوئیدی نیز بکاهد (۱۰).

فرار از آپوپتوز یکی از شاخصه‌های اصلی و شناخته شده سلول‌های سرطانی می‌باشد و بدیهی است که مکانیسم‌های مختلفی در بروز این پدیده درگیر باشند. در بین مکانیسم‌های گوناگون، برهم خوردن تعادل بیان پروتئین‌های پیش‌برنده آپوپتوز و پروتیئن‌های مهارکننده این پدیده از طریق افزایش بیان ژن‌های آنتی آپوپتوتیک به ژن‌های پروآپوپتوتیک به عنوان یکی از مهم‌ترین و اساسی‌ترین راه کارهای فرار از آپوپتوز معرفی شده است (۱۴و۱۳). در طی سالهای اخیر، تلاشهای بیشماری جهت شناسایی مسیرهای درگیر در آپوپتوز صورت گرفته است و در بین مسیرهای مختلف، مسیر PI3K/Akt با مهار بیان ژن سرکوب‌گر تومور p53 و متعاقب آن با کاهش بیان ژن‌های پروآپوپتوتیک متعلق به خانواده Bcl-2 در بروز پدیده تومورزایی تاثیرگذار می‌باشد (۱۵). در این مطالعه تیمار سلول‌های مشتق شده از لوسمی لنفوبلاستیک حاد با مهارکننده تمام ایزوفرمی PI3K،

Buparlisib نه تنها منجر به القاء قابل توجه آپوپتوز در این رده سلولی شد؛ بلکه این دارو با افزایش میزان فعالیت رونویسی ژن‌های پروآپوپتوتیک خانواده Bcl-2 و مورد هدف p53 همچون Bax، Bad، PUMA و Noxa، تعادل پروتئین‌های درگیر در فرآیند آپوپتوز را به نفع پروتئین‌های پروآپوپتوتیک تغییر داد و به این ترتیب اثر سایتوتوکسیک خود را در سلول‌های Nalm-6 اعمال نمود. در همین راستا، مطالعه دیگری که توسط Koul و همکارانش نیز صورت گرفته، نیز نشان داد که مهار مسیر PI3K/Akt توسط مهارکننده تمام ایزوفرومی PI3K، منجر به القاء آپوپتوز وابسته به مسیر p53 در سلول‌های بدخیم گلیوبلاستوما می‌شود (۱۶). در کل، این مطالعه کارآیی داروی Buparlisib را در سلول‌های Nalm-6 نشان می‌دهد. با توجه به تحمل‌پذیری بالای این مهارکننده و موثر بودن آن در بسیاری از بدخیمی‌های انسانی، این مطالعه Buparlisib را به‌عنوان عامل نویدبخشی در درمان ALL مطرح می‌سازد. پیشنهاد می شود تحقیقات بیشتر و دقیقتری جهت بررسی مکانیسم عملکرد دارو به‌جهت انتخاب این مهارکننده PI3K برای درمان بیماران مبتلا به ALL انجام شود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به جهت تامین بودجه تحقیق تشکر و قدردانی می گردد.

Apoptotic Effect of Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibition on Acute Lymphoblastic Leukemia Cells Using Buparlisib

M.R. Sadri (MSc)[1], A. Safaroghli-Azar (MSc)[1], A. Kazemi (MSc)[1], M. Hamidpour (PhD)[1], M. Allahbakhshian-Farsani (PhD)[1], D. Bashash (PhD)[*1]

1. Department of Hematology and Blood banking, Faculty of Allied Medicine sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, I.R.Iran

J Babol Univ Med Sci; 19(5); May 2017; PP: 7-13
Received: Jan 17th 2017, Revised: Feb 28th 2017, Accepted: Apr 30th 2017

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Resistance to chemotherapy is one of the most important problems in treatment of patients diagnosed with acute lymphoblastic leukemia (ALL). Pathway interruption of the phosphatidylinositol -3 kinase (PI3K) and its relation to resistance phenomena cause the inhibitors of this pathway, particularly buparlisib are introduced as one of the most promising cancer drugs. The aim of this study was to evaluate the effect of PI3K pathway inhibition on reducing the survival and induction of apoptosis in Nalm-6 cells using buparlisib.

METHODS: In this experimental study, the phosphorylation level of Akt was evaluated using western blot to measure the effect of buparlisib on PI3K/Akt pathway in Nalm-6 cells. Nalm-6 cells were treated with different concentrations of buparlisib (0.5-4 µM) for 24, 36 and 48 hours to study the cytotoxic effect of this inhibitor and then, the metabolic activity, induction of apoptosis and changes in expression of genes involved in apoptosis were evaluated using MTT assay, Annexin/PI staining and Rq-PCR, respectively.

FINDINGS: Results showed that PI3K pathway inhibition using buparlisib causes the cytotoxic effect on Nalm-6 cells in a dose- and time-dependent manner through reducing p-Akt. These findings suggested that probably, the anti-leukemic effect of buparlisib is mediated through almost 17-fold increase in apoptotic cells ($p \leq 0.001$) and rising the mRNA expression level of pro-apoptotic genes ($p \leq 0.01$).

CONCLUSION: The results indicated that buparlisib has anti-tumor activity against Nalm-6 cells so this inhibitor can be used as a promising agent for the treatment of ALL.

KEY WORDS: *Apoptosis, phosphatidylinositol 3-kinase, Acute lymphoblastic leukemia, Buparlisib, Nalm-6.*

Please cite this article as follows:

Sadri MR, Safaroghli-Azar A, Kazemi A, Hamidpour M, Allahbakhshian-Farsani M, Bashash D. Apoptotic Effect of Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibition on Acute Lymphoblastic Leukemia Cells Using Buparlisib. J Babol Univ Med Sci. 2017;19(1):7-13.

[*]Corresponding author: D. Bashash(PhD)
Address: Faculty of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Darband St., Qods Sq., Tehran, I.R.Iran
Tel: +98 21 22717504
E-mail: d.bashash@sbmu.ac.ir

References

1.Zhou Y, You MJ, Young KH, Lin P, Lu G, Medeiros LJ, et al. Advances in the molecular pathobiology of B-lymphoblastic leukemia. Hum pathol. 2012;43(9):1347-62.

2.Robak T. Acute lymphoblastic leukaemia in elderly patients. Drug Ag. 2004;21(12):779-91.

3.Barrett D, Brown VI, Grupp SA, Teachey DT. Targeting the PI3K/AKT/mTOR signaling axis in children with hematologic malignancies. Pediat Drug. 2012;14(5):299-316.

4.Martelli A, Evangelisti C, Chappell W, Abrams S, Bäsecke J, Stivala F, et al. Targeting the translational apparatus to improve leukemia therapy: roles of the PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathway. Leukemia. 2011;25(7):1064-79.

5.Hoelzer D, Gokbuget N, Ottmann O, Pui C-H, Relling MV, Appelbaum FR, et al. Acute lymphoblastic leukemia. Hematology. 2002;2002(1):162-92.

6.Maira S-M, Pecchi S, Huang A, Burger M, Knapp M, Sterker D, et al. Identification and characterization of NVP-BKM120, an orally available pan-class I PI3-kinase inhibitor. Molecul Cancer Therapeut. 2012;11(2):317-28.

7.Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. Nat Rev Cancer. 2009;9(8):550-62.

8.Rosich L, Saborit-Villarroya I, López-Guerra M, Xargay-Torrent S, Montraveta A, Aymerich M, et al. The phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor NVP-BKM120 overcomes resistance signals derived from microenvironment by regulating the Akt/FoxO3a/Bim axis in chronic lymphocytic leukemia cells. Haematologica. 2013;98(11):1739-47.

9.Anisuzzaman ASM, Haque A, Wang D, Rahman MA, Zhang C, Chen Z, et al. In vitro and in vivo synergistic antitumor activity of the combination of BKM120 and erlotinib in head and neck cancer: Mechanism of apoptosis and resistance. Mol Cancer Ther. 2017;16(4):729-38.

10.Allegretti M, Ricciardi MR, Licchetta R, Mirabilii S, Orecchioni S, Reggiani F, et al. The pan-class I phosphatidyl-inositol-3 kinase inhibitor NVP-BKM120 demonstrates anti-leukemic activity in acute myeloid leukemia. Sci Rep. 2015;5(1):205.

11.Di Leo A, Germa C, Weber D, Di Tomaso E, Dharan B, Massacesi C, et al. Abstract OT2-3-08: Phase III randomized study of the oral pan-PI3K inhibitor BKM120 with fulvestrant in postmenopausal women with HR+/HER2– locally advanced or metastatic breast cancer, treated with aromatase inhibitor, and progressed on or after mTOR inhibitor-based treatment – BELLE-3. Cancer Research. 2014; 72(24 Suppl):OT2-3-08-OT2-3-08

12.Lonetti A, Antunes IL, Chiarini F, Orsini E, Buontempo F, Ricci F, et al. Activity of the pan-class I phosphoinositide 3-kinase inhibitor NVP-BKM120 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. Leukemia. 2014;28(6):1196-206.

13.Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Sci. 1995;267(5203):1456.

14.Jäättelä M. Escaping cell death: survival proteins in cancer. Experiment Cell Res. 1999;248(1):30-43.

15.Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase–AKT pathway in human cancer. Nat Rev Cancer. 2002;2(7):489-501.

16.Koul D, Fu J ,Shen R, LaFortune TA, Wang S, Tiao N, et al. Antitumor activity of NVP-BKM120-a selective pan class I PI3 kinase inhibitor showed differential forms of cell death based on p53 status of glioma cells. Clin Cancer Res. 2012;18(1):184-95.