

اثر آپوتوتیک مهار فسفاتیدیل اینوزیتول-۳ کیناز با استفاده از بوپارلیسب در رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد

محمدرضا صدری (MSc)، آوا صفراوغلی آذر (MSc)، علیرضا کاظمی (MSc)، محسن حمید پور (PhD)،
مهدی اله بخشیان (PhD)، داود بشاش (PhD)*

۱- گروه خون شناسی و بانک خون، 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 شیمی درمانی یکی از مهم ترین معضلات درمانی بیماران مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) می باشد. اختلال در مسیر فسفاتیدیل اینوزیتول-۳ کیناز (PI3K) و همچنین ارتباط آن با بروز پدیده مقاومت باعث شده که مهارکننده های این مسیر، خصوصاً Buaprlisib به عنوان یکی از امیدبخش ترین داروهای درمان سرطان معرفی شوند. هدف از این مطالعه، بررسی تاثیر مهار مسیر PI3K/Akt توسط داروی Buparlisib در کاهش بقا و همچنین القاء آپپتوز در سلول های Nalm-6 می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، جهت سنجیدن اثر Buparlisib بر فعالیت مسیر PI3K/Akt در سلول های Nalm-6، میزان فسفریلاسیون Akt توسط وسترن بلات مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت بررسی اثر سایتوتوکسیک این مهارکننده، سلول های Nalm-6 با غلظت های مختلف Buparlisib (۴-۵۰ میکرومولار) در زمان های ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت تیمار شدند و سپس فعالیت متابولیک، القاء آپپتوز و میزان تغییر بیان ژن های دخیل در آپپتوز توسط آزمون های MTT، رنگ آمیزی Annexin/PI و Rq-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج نشان می دهد که مهار مسیر PI3K/Akt توسط Buparlisib، از طریق کاهش p-Akt باعث اعمال اثر سایتوتوکسیک در سلول های Nalm-6 به صورت وابسته به دوز و زمان می شود. همچنین، نتایج بیان گر آن است که احتمالاً تاثیر ضدلوسمیک Buparlisib از طریق افزایش تقریباً ۱۷ برابری سلول های آپپتوز شده ($p \leq 0.001$)، و افزایش بیان mRNA ژن های پرو آپپتوتیک صورت می گیرد ($p \leq 0.01$).

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

واژه های کلیدی: آپپتوز، فسفاتیدیل-۳ کیناز، لوسمی لنفوبلاستیک حاد، Buparlisib، Nalm-6.

مقدمه

مسیر انتقال پیام در درمان این بدخیمی بیش از پیش اهمیت پیدا می کند. 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 برجسته ای برخوردار گشته است (۶ و ۷). Buparlisib یک داروی سنتتیک مهارکننده انتخابی PI3K است که با مهار تمامی ایزوفرم های زیر واحدهای تنظیمی و کاتالیتیکی PI3K، توانسته است اثرات ضد سرطانی خود را در انواع بدخیمی های انسانی با منشاء هیستولوژیک مختلف از تومورهای توپر گرفته تا بدخیمی های هماتولوژیک اعمال نماید (۸ و ۹). در یک مطالعه مشخص شده که داروی Buparlisib قادر است میزان بقا و پتانسیل پرولیفراتیو سلول های AML را کاهش دهد و با القاء مرگ سلولی در این رده، از شمار سلول های بدخیم بکاهد؛ این درحالی است که همین مهارکننده PI3K بر روی سلول های نرمال هیچ اثر سایتوتوکسیکی را ایجاد نکرده است (۱۰). در مطالعه ای نیز نشان داده شده است که این مهارکننده

علیرغم پیشرفتهای قابل توجه درمانی طی دهه های اخیر، لوسمی لنفوبلاستیک حاد (Acute Lymphoblastic Leukemia) هنوز به عنوان یکی از مرگ بارترین بدخیمی های هماتولوژیک در سراسر جهان شناخته می شود (۱ و ۲). از آنجائیکه فعال شدن مسیرهای انتقال پیام یک خصوصیت شایع در بین بیماران مبتلا به ALL می باشد؛ در نتیجه به نظر می رسد که استفاده از درمان های هدفمند که این مسیرهای انتقال پیام را تحت تاثیر قرار می دهند به راهکار مناسبی برای درمان بیماران تبدیل شوند (۳ و ۴). مطالعات بالینی و ژنتیکی صورت گرفته بر روی مکانیسم های پاتوژن ALL اعلام می کنند که مسیر PI3K/Akt در بیش از ۸۰٪ از موارد لوسمی لنفوبلاستیک حاد به طور غیرطبیعی فعال می باشد (۵). نتایج به دست آمده از این بررسی ها نشان می دهند که فعالیت این مسیر انتقال پیام، نه تنها باعث تقویت پتانسیل تکثیری سلول های لوسمیک می شود؛ بلکه تاثیر بسزایی در ایجاد مقاومت نسبت به داروهای شیمی درمانی نیز می گذارد (۴). بر همین اساس، مزیت استفاده از مهارکنندگان این

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@sbm.ac.ir

گردید و ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO به هر چاهک اضافه شد. در ادامه، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

بررسی فلوسایتومتريک آپپتوز با رنگ‌آمیزی Annexin-V/PI: جهت بررسی آپپتوز 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 آپپتوز 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 Buffer 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 فلوسایتومتري مورد سنجش واقع شد و نتایج توسط نرم‌افزار Partec GmbH FloMax 2.3، Munster، آلمان) آنالیز گردید.

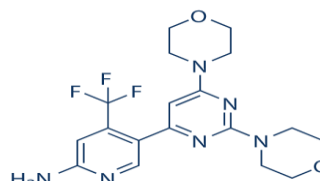
استخراج RNA و ساخت cDNA: پس از تیمار سلول‌های Nalm-6 با Buparlisib و متعاقب گذشت ۴۸ ساعت، RNA سلول‌ها استخراج (Roche) و کمیت آنها با روش اسپکتروفتومتري با استفاده از دستگاه Nanodrop ND-1000 اندازه‌گیری شد. برای انجام واکنش رونویسی معکوس و جهت ساخت cDNA از کیت (PrimeScript™ RT Takara Bio(reagen Takara Bio Inc., Otsu, Japan) استفاده شد. حجم مورد نظر برای انجام این واکنش ۲۰ 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 دمای ۲۰ °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 خانه‌ای HPRT 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 (جدول ۱). 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 (واسترشتگی)، 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.

تمام ایزوفرمی PI3K، قادر است مسیرهای آپپتوتیک 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 (Nalm-6) Pre-B ALL می‌باشد و همچنین تلاش شده تا مکانیسم عمل این دارو در القاء آپپتوز 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 دمایی ۳۷ °C و فشار ۵٪ CO₂ 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 ۵۰ μM 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 تیمار شده 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.



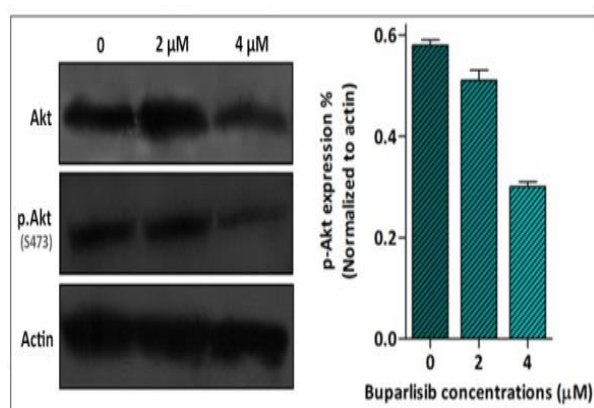
شکل ۱. ساختار شیمیایی داروی Buparlisib

بررسی فعالیت متابولیک سلول‌ها به روش MTT: به منظور سنجش اثر سایتوتوکسیک دارو در سلول‌ها و تعیین مقادیر IC₅₀ از روش MTT استفاده شد. به همین منظور، ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون حاوی ۱×۱۰^۴ 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٪ CO₂ 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

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

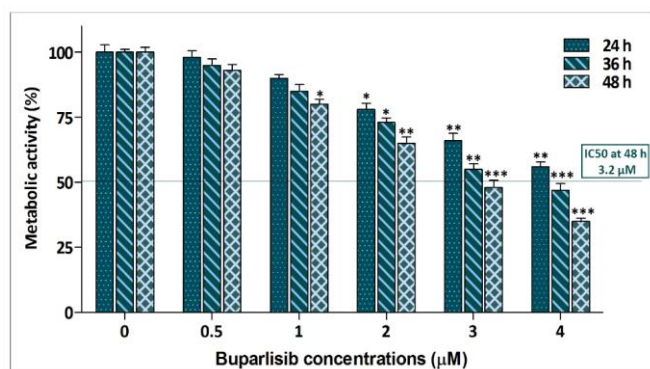
ژن	Accession number	آغازگر معکوس (5'-3')	آغازگر مستقیم (5'-3')	سایز (bp)
HPRT	NM_000194	CCAGCAGGTCAGCAAAGAATTTA	TGGACAGGACTGAACGTCTTG	۱۱۱
Bax	NM_138761	GTGGGCGTCCCAAAGTAGG	CGAGAGGTCTTTTTCCGAGTG	۲۴۲
Bad	NM_004322	CCCATCCCTTCGTCGTCCT	CCCAGAGTTTGAGCCGAGTG	۲۴۹
PUMA	NM_014417	AGGAGTCCCATGATGAGATTGT	GACCTCAACGCACAGTACGAG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

میکرومولار از Buparlisib فعالیت متابولیک سلول‌های Nalm-6 را به ترتیب ۵، ۱۰، ۲۲، ۳۴ و ۴۴٪ کاهش داد (شکل ۳). این اثر مهاري 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 ($p \leq 0.001$) (شکل ۳).



شکل ۲. بررسی میزان فسفریلاسیون Akt در سلول‌های Nalm-6

همانطور که در شکل مشخص است مسیر PI3K/Akt در سلول‌های 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 IC₅₀ در مطالعه صورت پذیرفته حدود ۲/۲ نانومولار در طی ۴۸ ساعت تخمین زده می‌شود. ($p < 0.05$), ($p < 0.01$), ($p < 0.001$) و ($p < 0.0001$) نشان‌گر معنی‌دار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل می‌باشد.

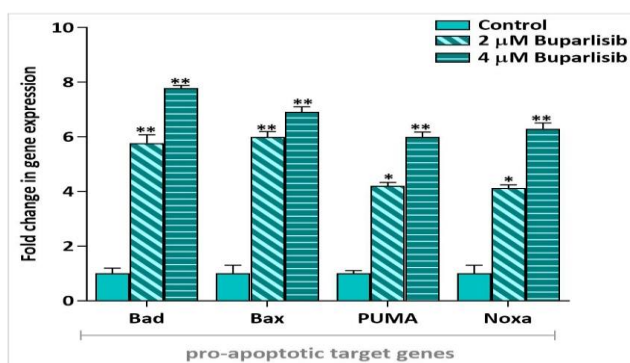
وسترین بلات: سلول‌ها ۱۲ ساعت پس از تیمار با مهارکننده سانتیفریوژ شدند و رسوب سلولی با PBC سرد شست و شو داده شد و در بافر RIPA که حاوی کوکتل مهارکنندگان پروتئاز و فسفاتاز می‌باشد (Sigma)؛ لیز شد. پس از تعیین غلظت پروتئین‌ها با روش Brad-ford میزان مشخصی از پروتئین تام درون سلولی در ژل SDS-PAGE ۱۰٪ قرار 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 $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بررسی فسفریلاسیون Akt در سلول‌های 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 وسترین 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 سیگنالیینگ 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 افزایش‌دهنده 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 ساینوتوکسیک خود را در این رده سلولی اعمال نماید. تیمار ۲۴ ساعته با دوزهای ۱/۵، ۲، ۳ و ۴



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

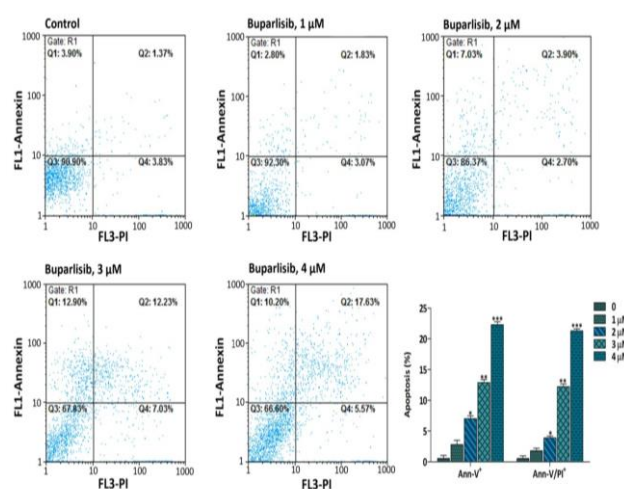
نتایج به دست آمده از Rq-PCR نشان می‌دهد که این مهارکننده PI3K به طور کاملاً معنی-داری باعث افزایش بیان mRNA ژن‌های پروآپوپتوتیک می‌گردد ($p < 0.05$ و $p < 0.01$) نشان‌گر معنی‌دار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل می‌باشد.

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 سائیتوتوکسیک خود را ایفا می‌کند و با مهار فعالیت متابولیک سلول‌های Nalm-6، میزان بقا 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 بقا 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 سل‌ل‌های سرطانی ۴ میکرومولار می‌باشد (۱۲) و در این مطالعه نیز به خوبی نشان داده شد که اثر سائیتوتوکسیک 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 تأیید بالاتر نبرده‌ایم. مشابه با نتایج به دست آمده در این مطالعه، بررسی‌های پیشین صورت گرفته بر روی پنبلی متشکل از سلول‌های رده لوسمی میلوبلاستیک حاد نیز نشان داد که داروی Buparlisib قادر است با کاهش میزان فسفریلاسیون پروتئین Akt از میزان بقا سلول‌های بدخیم میلوئیدی نیز بکاهد (۱۰).

فرار از آپوپتوز یکی از شاخصه‌های اصلی و شناخته شده سلول‌های سرطانی می‌باشد و بدیهی است که مکانسیم‌های مختلفی در بروز این پدیده درگیر باشند. در بین مکانسیم‌های گوناگون، برهم خوردن تعادل بیان پروتئین‌های پیش‌برنده آپوپتوز و پروتئین‌های 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 (۱۳ و ۱۴). 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 توموری p53 و متعاقب آن با کاهش بیان ژن‌های پروآپوپتوتیک متعلق به خانواده Bcl-2 در بروز پدیده تومورزایی تأثیرگذار می‌باشد (۱۵). در این مطالعه تیمار سلول‌های مشتق شده از لوسمی لنفوبلاستیک حاد با مهارکننده تمام ایزوفرمی PI3K

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 فلوسایتومتري مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج فلوسایتومتري 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/PI مثبت می‌شود؛ بلکه درصد سلول‌های annexin-V/PI مثبت را نیز افزایش می‌دهد ($p \leq 0.01$) (شکل ۴). این نتایج به دست آمده ثابت می‌نماید که داروی Buparlisib با القاء آپوپتوز در سلول‌های Nalm-6 میزان بقا این سلول‌ها را کاهش داده و بدینگونه اثر سائیتوتوکسیک 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 ($p < 0.05$ ، $p < 0.01$ و $p < 0.001$) نشان-گر معنی‌دار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل می‌باشد.

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 Bad, Bax, 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 پروآپوپتوتیک 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 ($p \leq 0.05$). 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، ۶/۳ و ۶/۳ برابر افزایش می‌یابد ($p \leq 0.01$) (شکل ۵).

مهارکننده و موثر بودن آن در بسیاری از بدخیمی‌های انسانی، این مطالعه Buparlisib را به‌عنوان عامل نویدبخشی در درمان ALL مطرح می‌سازد. پیشنهاد می‌شود 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 می‌گردد.

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 Bad, Bax, PUMA و Noxa، تعادل پروتئین‌های درگیر در فرایند 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

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 μ M) 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. *Pediatr 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. *Mol 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, Mirabili S, Orecchioni S, Reggiani F, et al. The pan-class I phosphatidylinositol-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.