

تأثیر سایتوتوکسیک مهارکننده PI3K δ در رده سلولی لوسمی پرومیلوسیتیک حاد

مریم داداشی^۱، داود بشاش^۲

چکیده

سابقه و هدف

مسیر PI3K/Akt که در تنظیم رشد سلولی و تکثیر نقش مهمی ایفا می‌کند، تقریباً در ۷۰٪-۵۰٪ بیماران APL فعالیت بالایی را نشان می‌دهد. مشخص شده است که در سلول‌های لوسمیک این بدخیمی، فعالیت PI3K عمدتاً ناشی از افزایش بیان ایزوفرم p110 δ می‌باشد. در این مطالعه بر آن شدیم تا اثر بخشی داروی Idelalisib را که یکی از مهم‌ترین مهارکننده‌های p110 δ می‌باشد، در سلول‌های NB4 مشتق از APL بررسی کنیم.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، اثرات مهار دارو بر فعالیت متابولیک و زنده‌مانی سلول‌های NB4 بررسی شد. هم‌چنین از روش فلوسایتومتری جهت بررسی آپوپتوز و از روش Quantitative RT-PCR جهت بررسی تغییر بیان mRNA ژن‌های دخیل در آپوپتوز استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج نشان داد که Idelalisib نه تنها باعث کاهش زنده‌مانی و فعالیت متابولیک سلول‌های NB4 به صورت وابسته به دوز و زمان شد، بلکه متوجه شدیم که اثرات سایتوتوکسیک این دارو از طریق فعال کردن مسیر آپوپتوتیک می‌باشد. هم‌چنین در بررسی مکانیسم مولکولی دخیل در القای مرگ سلولی مشخص شد که داروی Idelalisib از طریق افزایش بیان ژن‌های پروآپوپتوتیک Bax و PUMA و کاهش بیان ژن آنتی‌آپوپتوتیک Mcl-1 اثر خود را اعمال می‌کند.

نتیجه‌گیری

با توجه به فعال بودن p110 δ در بیماران APL و هم‌چنین اثر بخشی داروی Idelalisib در القای اثرات سایتوتوکسیک در سلول‌های پرومیلوسیتیک NB4، می‌توان چنین پیشنهاد کرد که این دارو می‌تواند به عنوان یک راهکار درمانی مناسب، چه به صورت منوتراپی و چه به صورت داروی مکمل همراه با داروهای متداول مورد استفاده، در بیماران APL مد نظر گرفته شود.

کلمات کلیدی: لوسمی پرومیلوسیتیک حاد، مهارکننده، آپوپتوز

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۲۵

تاریخ پذیرش: ۹۶/۱/۲۱

۱- کارشناس ارشد خون‌شناسی و بانک خون - دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - تهران - ایران
۲- مؤلف مسئول: PhD خون‌شناسی و بانک خون - استادیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - گروه هماتولوژی - میدان قدس - خیابان دربند - تهران - ایران - کدپستی: ۱۹۷۱۶۵۳۳۱۲

مقدمه

لوسمی پرومیلوسیتیک حاد (APL)، زیر گروهی از AML است که دارای مورفولوژی سیتولوژیک مشخص M3 یا M3V بر اساس طبقه‌بندی FAB می‌باشد (۱). این لوسمی، ۱۰٪-۵٪ از موارد لوسمی میلوئیدی حاد را شامل می‌شود و در مجموع می‌توان گفت بیشترین شیوع این بیماری در جوانان می‌باشد (۲، ۱). ۹۷٪ از موارد APL به علت یک جابه‌جایی بین دو کروموزوم ۱۵ و ۱۷ اتفاق می‌افتد که منجر به ایجاد ژن ترکیبی PML/RAR α و بیان پروتئین کایمریک PML/RAR α می‌شود (۳). هر چند از سال ۱۹۸۸ نقش ATRA به طور گسترده‌ای در درمان بیماران APL مشخص شده است، اما درمان با ATRA دارای محدودیت‌هایی از قبیل سندرم رتینوئیک اسید و ایجاد مقاومت در بیماران درمان شده با آن طی ۳ ماه تا ۱ سال پس از شروع درمان می‌باشد (۴، ۵). لازم به ذکر است که یکی از استراتژی‌های درمانی در بیماران مقاوم به ATRA، استفاده از آرسنیک تری‌اکساید (As₂O₃) می‌باشد؛ اما علی‌رغم اثربخشی و نتایج قابل قبول، این دارو نیز دارای اثرات سمی و عوارض جانبی زیادی است (۶). طی مطالعه‌های گذشته مشخص شده است که مسیر PI3K/Akt یکی از مهم‌ترین دلایل مقاومت به آرسنیک تری‌اکساید و دیگر عوامل درمانی مؤثر در APL است (۷). مسیر PI3K/Akt/mTOR به طور مداوم در سلول‌های لوسمیک AML فعال بوده و باعث بقا و تکثیر نامحدود و مقاومت این سلول‌ها به آپوپتوز می‌شود (۸، ۷). بر اساس مطالعه‌های گوناگون، ایزوفرم p110 δ مهم‌ترین ایزوفرم PI3K در سلول‌های لوسمیک بیماران AML می‌باشد که سطح بیان آن به طور چشم‌گیری افزایش یافته است (۸، ۷).

در میان مهارکنندگان انتخابی PI3K، امروزه توجه گسترده‌ای به دارویی تحت عنوان Idelalisib معطوف شده است. این دارو که به عنوان یک مهارگر اختصاصی ایزوفرم (Isoform-specific inhibitor) عمل می‌کند، در واقع مهارکننده ایزوفرم p110 δ می‌باشد. Idelalisib با مهار مسیر پیام‌رسانی PI3K منجر به کاهش فسفریلاسیون Akt و افکتورهای پایین دست آن شده و باعث افزایش پلی ADP-ریبوز پلی‌مراز، شکستن کاسپاز و القای آپوپتوز

می‌شود (۹). همچنین مشخص شده است که درمان با Idelalisib باعث توقف چرخه سلولی و آپوپتوز در سل لاین‌های لنفوم هوچکین می‌شود (۱۰). اثرات سائیتوتوکسیک این دارو در سل‌لاین‌های میلومایی INA-6 و LB نیز گزارش شده است (۱۱).

با توجه به نتایج اثربخش تیمار سل‌لاین‌های سرطانی با Idelalisib و از طرفی با در نظر گرفتن عدم موفقیت کامل راه‌کارهای درمانی معمول در APL، بر آن شدیم تا در این تحقیق اثربخشی Idelalisib بر روی سلول‌های رده NB4 مشتق شده از APL را مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

کشت سلولی و تیمار دارویی با Idelalisib:

در این مطالعه تجربی، سلول‌های NB4 (مشتق از لوسمی پرومیلوسیتی حاد) در محیط کشت RPMI 1640 همراه با ۱۰٪ FBS، ۱۰۰ U/mL پنی‌سیلین و ۱۰۰ µg/mL استرپتومایسین کشت داده شد و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار دی‌اکسیدکربن ۵٪ نگهداری شدند. به علاوه، جهت اطمینان از صحت سلول‌های NB4، mRNA ژن ترکیبی PML/RAR α با استفاده از روش RT-PCR برای این سل‌لاین مورد بررسی قرار گرفت. پودر ۱۰ میلی‌گرم Idelalisib به صورت لیوفیلیزه از شرکت سلکچم (آمریکا) خریداری شد. به منظور تهیه استوک ۵۰۰ میکرومولار، مقادیر مورد نظر از پودر دارو در DMSO حل شد و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. تیمار سلول‌های NB4 با غلظت‌های مختلف Idelalisib و در زمان‌های ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت صورت گرفت. جهت جلوگیری از اثرات حلال بر روی میزان پرولیفراسیون و بقای سل‌لاین، سلول‌ها با غلظت مشخص شده‌ای از DMSO به عنوان کنترل منفی تیمار شدند. تمامی آزمایش‌ها به منظور افزایش دقت کار به صورت تریپلیکیت انجام شد.

ارزیابی زنده‌مانی و شمارش سلولی به روش تریپان بلو:

برای شمارش سلول‌ها از رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو و لام هموسایتومتر (لام نوبار) استفاده شد. اساس این آزمایش

فلوسایتومتری آنالیز شدند.

استخراج RNA، ساخت cDNA و انجام آزمون Real-Time PCR:

برای استخراج RNA، از کیت TriPure (رُوش) طبق دستورالعمل استفاده شد. پس از تیمار سلول‌های NB4 با Idelalisib و متعاقب گذشت ۴۸ ساعت، RNA سلول‌ها استخراج و کمیت آن‌ها با روش اسپکتروفتومتری با استفاده از دستگاه نانودراپ ND-1000 اندازه‌گیری شد. برای انجام واکنش رونویسی معکوس از Revert Aid First Strand (تاکارابیو) cDNA Synthesis Kit استفاده شد. آزمون Real-Time PCR در دستگاه light cycler (رُوش) و در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. به ازاء هر واکنش، ۱۰ μL از SYBR Premix Ex Taq، ۲ μL از محصول cDNA، ۰/۵ μL از هر یک از آغازگرها (۱۰ pmol) و ۷ μL آب عاری از نوکلئاز استفاده شد (جدول ۱). شرایط دمایی مورد استفاده شامل یک مرحله فعال‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در ادامه، ۴۵ چرخه برای دنا تراسیون (۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد) و مرحله آنیلینگ/اکستنشن توام (۲۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد) می‌باشد. برای بررسی اختصاصیت محصول تکثیر شده، منحنی ذوب مورد بررسی قرار گرفت. در انتها برای محاسبه نسبی تعداد نسخه mRNA تکثیر شده از فرمول زیر استفاده شد. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ = میزان بیان ژن

آنالیز آماری:

تمامی آزمایش‌ها به شکل سه آزمون مستقل انجام و مقادیر گزارش شده به شکل $\text{Mean} \pm \text{SD}$ قید شدند. هم چنین برای محاسبات آماری از روش t-test و نرم‌افزار SPSS ۱۸ و GraphPad Prism7 استفاده شد. *: بیانگر این است که اختلاف میانگین گروه‌های آزمون با کنترل در سطح $p < 0/05$ معنادار بوده است. **: بیانگر این است که اختلاف میانگین گروه‌های آزمون با کنترل در سطح $p < 0/01$ معنادار بوده است. ***: بیانگر این است که اختلاف میانگین گروه‌های آزمون با کنترل در سطح $p < 0/001$ معنادار بوده است.

بدین ترتیب است که سلول‌های زنده نسبت به ورود رنگ نفوذناپذیر می‌باشند، حال آن که سلول‌های مرده رنگ را جذب می‌کنند. برای شمارش تعداد سلول‌های زنده، تعداد سلول‌های رنگ نگرفته در هر چهار سری خانه‌های شانزده تایی (خانه شمارش WBC) شمارش شده و میانگین گرفته شد. هم‌چنین زنده‌مانی سلول‌ها نیز با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{تعداد سلول‌های زنده} = \frac{100 \times \text{درصد زنده‌مانی سلول‌ها}}{\text{کل سلول‌ها}}$$

ارزیابی فعالیت متابولیک سلول‌ها به روش MTT:

برای ارزیابی تأثیر دارو بر فعالیت متابولیک سلول‌ها، از آزمون MTT (Microculture Tetrazolium Test) استفاده شد. پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف دارو، تعداد 5×10^3 سلول به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت در انکوباتور CO_2 دار انکوبه شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون، سلول‌ها با ۱۰۰ μL معرف تترازولیوم (mg/mL) ۵ مجاور و به مدت چهار ساعت در انکوباتور انکوبه شدند. پس از طی زمان مذکور، پلیت را به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ کرده و محلول رویی را خارج کردیم. مقدار ۱۰۰ μL از DMSO به چاهک‌ها اضافه و در نهایت جذب نوری هر چاهک توسط دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۵۷۰ nm قرائت شد.

بررسی القای آپوپتوز با استفاده از فلوسیتومتری:

به منظور بررسی اثر پروآپوپتوتیک دارو بر روی سلول‌ها از کیت Annexin/PI (رُوش) استفاده شد. در این روش، ابتدا سلول‌های تیمار شده با دارو جمع‌آوری شد، با دور ۶۰۰ g در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و سپس ۱ بار با PBS شستشو داده شد. به هر لوله ۱۰۰ μL از Binding Buffer که به آن ۱ μL از رنگ Annexin با غلظت استوک ۰/۵ mg/mL و ۱ μL از PI با غلظت استوک ۰/۱ mg/mL اضافه شده بود، افزوده و لوله‌ها به آرامی ورتکس شدند. لوله‌ها به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق انکوبه و سپس بلافاصله توسط

جدول ۱: توالی آغازگرهای به کار رفته در آزمون Real Time Quantitative RT-PCR

اندازه (bp)	آغازگر معکوس (5'-3')	آغازگر جلوبرنده (5'-3')	Accession number	ژن
۲۴۲	GTGGGCGTCCCAAAGTAGG	CGAGAGGTCTTTTCCGAGTG	NM-۱۳۸۷۶۱	Bax
۹۸	AGGAGTCCCATGATGAGATTGT	GACCTCAACGCACAGTACGAG	NM-۰۱۴۴۱۷	PUMA
۹۰	CGGTTCAGGTACTCAGTCATCC	CGGTGGGGTCATGTGTGTG	NM-۰۰۰۶۳۳	Bcl-2
۱۸۳	CCAGCTCCTACTCCAGCAAC	AGAAAGCTGCATCGAACCAT	NM-۰۲۱۹۶۰	Mcl-1

یافته‌ها

کاهش شمارش سلولی و زنده‌مانی سلول‌های NB4 پس از تیمار با Idelalisib به صورت وابسته به دوز و زمان:

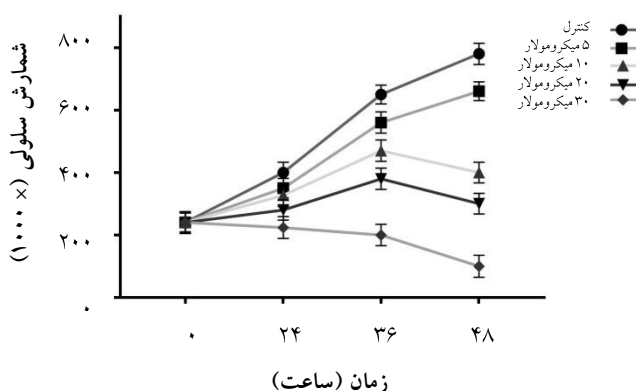
با استفاده از آزمایش تریپان‌بلو، شمارش سلولی (Cell Count) و زنده‌مانی (Viability) سلول‌های NB4 مورد مطالعه قرار گرفت. برای انجام این آزمون، سلول‌ها با دوزهای متغیر دارو (۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میکرومولار) برای مدت زمان ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. گروهی از سلول‌ها نیز به عنوان شاهد هیچ دارویی دریافت نکردند. نتایج به دست آمده نشان داد که Idelalisib می‌تواند باعث کاهش تعداد و زنده‌مانی در سلول‌های NB4 هم به صورت وابسته به دوز و هم به صورت وابسته به زمان شود. بیشترین اثر مهاري Idelalisib بر تعداد سلول‌های NB4 متعاقب تیمار آن‌ها با دوز ۳۰ μM و طی ۴۸ ساعت دیده می‌شود (نمودار ۱).

هم‌چنین در ۴۸ ساعت، میزان زنده‌مانی سلول‌ها در دوزهای ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میکرومولار از Idelalisib به ترتیب به ۸۴٪، ۶۳٪، ۳۸٪ و ۲۵٪ رسیده است که نشان‌دهنده کاهش چشم‌گیر زنده‌مانی سلول‌ها به طور وابسته به دوز می‌باشد (نمودار ۲). با توجه به نتایج حاصل، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که Idelalisib باعث کاهش شمارش و زنده‌مانی سلول‌ها به صورت وابسته به دوز و زمان در سلول‌های NB4 می‌شود.

کاهش فعالیت متابولیک سلول‌های NB4 پس از تیمار با Idelalisib

در این مطالعه و به منظور بررسی اثر داروی Idelalisib در مهار فعالیت متابولیک رده سلولی NB4، آزمایش MTT انجام شد. ۲۴ ساعت پس از تیمار سلول‌های NB4 با

غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میکرومولار از Idelalisib، به ترتیب فعالیت متابولیک ۱۲٪، ۱۷٪، ۳۰٪ و ۵۰٪ کاهش می‌یابد (نمودار ۳). هم‌چنین نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که اثر مهاري دارو با گذشت زمان افزایش می‌یابد؛ به نحوی که بیشترین مهار فعالیت متابولیک را پس از ۴۸ ساعت شاهد هستیم. در مجموع و با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه‌گیری کرد که Idelalisib باعث کاهش فعالیت متابولیک سلول‌های NB4 هم به صورت وابسته به دوز و هم به صورت وابسته به زمان می‌شود.

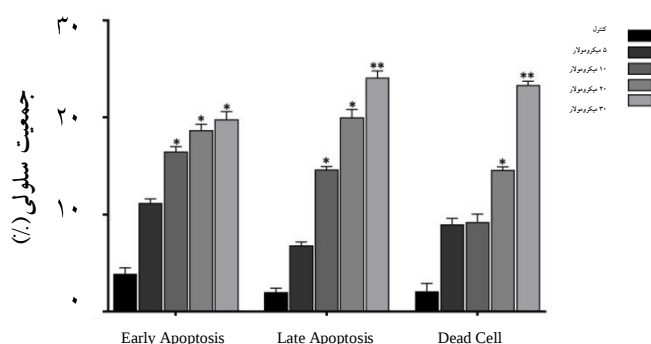


نمودار ۱: تاثیر داروی Idelalisib بر شمارش سلولی در سلول‌های NB4 به صورت وابسته به دوز و زمان. سلول‌های NB4 در تعداد ۲۰۰/۰۰۰ در پلیت‌های ۱۶ تایی در مقادیر مختلف ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میکرومولار تیمار و پس از گذشت ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت، شمارش سلولی با روش تریپان بلو انجام شد (Mean $\pm$ SD, n=3). همان گونه که در شکل مشاهده می‌شود، Idelalisib به صورت وابسته به دوز و زمان شمارش سلولی را کاهش داده و دوز ۳۰ میکرومولار دارای بیشترین اثرات سایتوتوکسیک می‌باشد.

اثر پروآپوپتوتیک داروی Idelalisib در سلول‌های NB4:

۴۸ ساعت پس از تیمار سلول‌های NB4 با Idelalisib

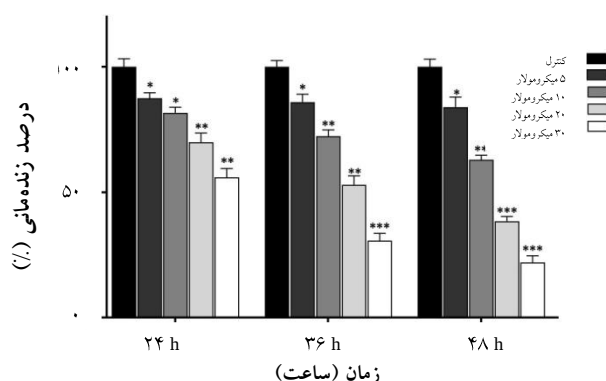
در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای، میزان آپوپتوز با استفاده از کیت رنگی دوگانه AnnexinV/PI مورد آنالیز قرار گرفت. نتایج فلوسایتومتری نشان‌دهنده این واقعیت می‌باشد که Idelalisib باعث افزایش آپوپتوز و القای مرگ سلولی در سلول‌های NB4 می‌شود. تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میکرومولار از Idelalisib باعث افزایش جمعیت سلول‌های Early Apoptosis و Late Apoptosis به صورت وابسته به دوز می‌شود (نمودار ۴).



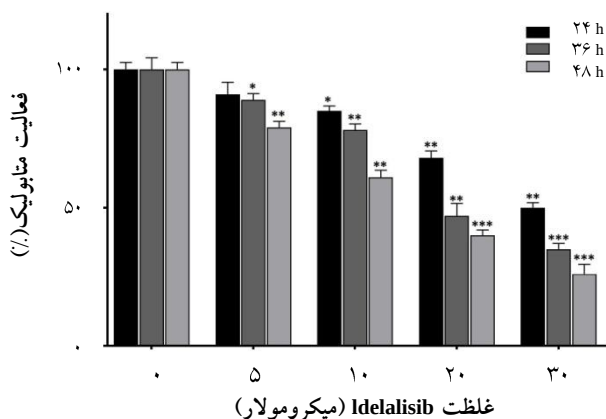
نمودار ۴: تاثیر Idelalisib در القای آپوپتوز در سلول‌های NB4. سلول‌های NB4 در تعداد 5×10^5 در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای با دوزهای مختلف Idelalisib تیمار و پس از گذشت ۴۸ ساعت میزان آپوپتوز با استفاده از کیت رنگی دوگانه AnnexinV/PI بررسی شد. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، Idelalisib باعث القای آپوپتوز به صورت وابسته به دوز می‌شود. میانگین و انحراف از معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (Mean $\pm$ SD) محاسبه و p value به دست آمده (*، $p < 0.05$ ؛ **، $p < 0.01$ ؛ ***، $p < 0.001$) نشان‌دهنده معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با کنترل می‌باشد.

تاثیر Idelalisib بر روی بیان ژن‌های *Bax*، *PUMA*، *Bcl-2* و *Mcl-1*:

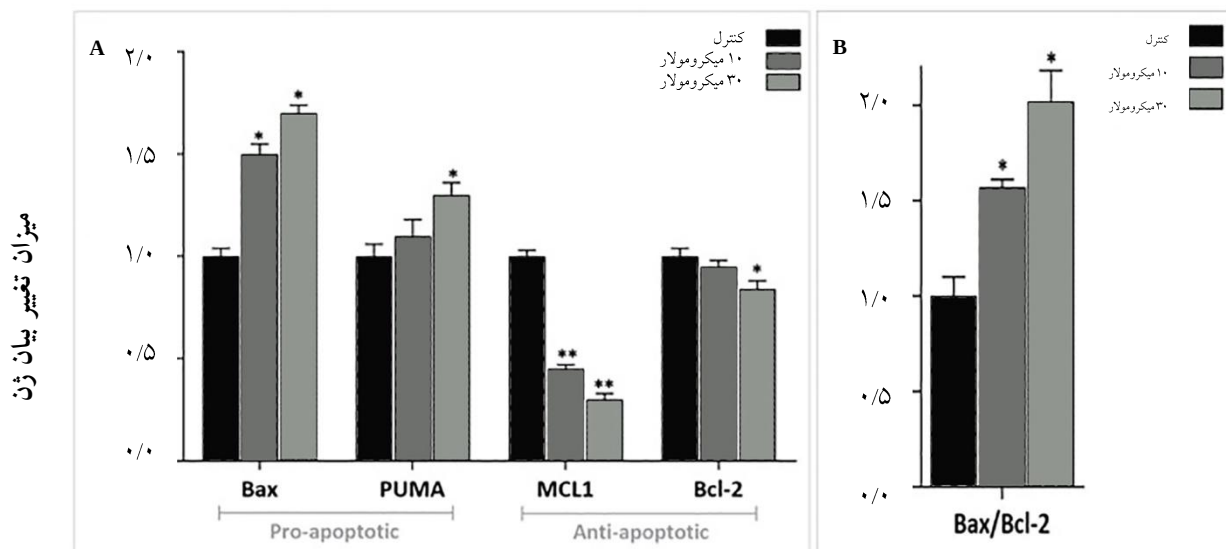
به منظور بررسی مکانیسم‌های مولکولی دخیل در القای آپوپتوز، میزان بیان mRNA ژن‌های پروآپوپتوتیک و آنتی‌آپوپتوتیک با استفاده از روش Quantitative RT-PCR مورد مطالعه قرار گرفت. میزان بیان ژن *Bax*، به عنوان یک پروتئین پروآپوپتوتیک از خانواده *Bcl2*، متعاقب تیمار سلول‌های NB4 با دوزهای ۱۰ و ۳۰ میکرومولار Idelalisib به ترتیب ۱/۵ و ۱/۷ برابر نسبت به کنترل افزایش یافته است (نمودار ۵ A).



نمودار ۲: تاثیر Idelalisib در زنده‌مانی سلول‌های NB4. میزان زنده‌مانی سلول‌های NB4 پس از تیمار با غلظت‌های مختلف Idelalisib در ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت، با روش تریپان‌بلو ارزیابی شد. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، Idelalisib به صورت وابسته به دوز و زمان زنده‌مانی سلول‌ها را کاهش می‌دهد. میانگین و انحراف از معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف محاسبه و p value به دست آمده (*، $p < 0.05$ ؛ **، $p < 0.01$ ؛ ***، $p < 0.001$) نشان‌دهنده معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با کنترل بود.



نمودار ۳: تاثیر داروی Idelalisib بر فعالیت متابولیک بر روی سلول‌های NB4 به صورت وابسته به دوز و زمان. سلول‌های NB4 در تعداد ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک با غلظت‌های مختلف Idelalisib در زمان‌های ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت تیمار و سپس فعالیت متابولیک با روش MTT ارزیابی شد. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، Idelalisib به صورت وابسته به دوز و زمان فعالیت متابولیک را کاهش می‌دهد. میانگین و انحراف از معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (Mean $\pm$ SD) محاسبه و p value به دست آمده (*، $p < 0.05$ ؛ **، $p < 0.01$ ؛ ***، $p < 0.001$) نشان‌دهنده معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با کنترل بود.



نمودار ۵: تاثیر Idelalisib بر سطح mRNA ژنهای پروآپتوتیک و آنتی آپتوتیک در سلولهای NB4. سلولهای NB4 در تعداد 2×10^6 با غلظت های ۱۰ و ۳۰ میکرومولار از Idelalisib به مدت ۴۸ ساعت تیمار و پس از ساخت cDNA میزان بیان ژن ها با استفاده از روش Quantitative RT-PCR محاسبه شد. (A) Idelalisib باعث افزایش بیان ژنهای پروآپتوتیک و کاهش در بیان *Mcl-1* می شود. (B) تیمار سلولهای NB4 با Idelalisib باعث افزایش نسبت ژنهای *Bax/Bcl-2* در غلظت های ۱۰ و ۳۰ میکرومولار می شود. میانگین و انحراف از معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (Mean $\pm$ SD) محاسبه و p-value به دست آمده (*، $p < 0.05$; **، $p < 0.01$) نشان دهنده معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با کنترل می باشد.

بحث

مسیر PI3K/Akt/mTOR مسیری است که به طور مداوم در سلولهای پرومیلوسیت غیر طبیعی در APL فعال می باشد و باعث بقا و تکثیر نامحدود این سلول ها می شود. این مسیر در پروسه های مختلف سلولی از قبیل متابولیسم، تمایز، التهاب، بقا و آپتوز نقش به سزایی را ایفا می کند (۱۲). مطالعه های گذشته نشان می دهد که ایزوفریم p110 δ آنزیم PI3K، مهم ترین ایزوفریم در سلول های لوسمیک APL است که دارای افزایش بیان بالایی می باشد (۱۳). بنابراین مهارکننده های مسیر PI3K/Akt در درمان بسیاری از بدخیمی ها از جمله لوسمی های میلویدی مورد توجه ویژه قرار گرفته است (۷). مهارکننده های PI3K به طور کلی شامل دو دسته Pan-PI3K inhibitor و Isoform-specific inhibitor می باشد که Idelalisib به عنوان یک Isoform-specific inhibitor، در واقع مهارکننده ایزوفریم p110 δ بوده و با مهار انتقال پیام PI3K باعث کاهش در فسفریلاسیون Akt و افکتورهای زیردست آن می شود (۹). نکته قابل توجه

هم چنین نتایج به دست آمده نشان داد که بیان ژن *PUMA* به عنوان یکی دیگر از اعضاء پروآپتوتیک خانواده *Bcl2* نیز متعاقب تیمار با دوز ۳۰ μ M از Idelalisib به میزان ۱/۳ برابر نسبت به کنترل افزایش داشت. در بررسی میزان تغییر بیان ژنهای آنتی آپتوتیک خانواده *Bcl2* نیز نتایج نشان داد که بیان ژن *Mcl-1* متعاقب تیمار با Idelalisib به ترتیب به میزان ۰/۶ و ۰/۸ با استفاده از دوزهای ۱۰ و ۳۰ میکرومولار کاهش یافت. هم چنین همان طور که در این نمودار مشخص است، میزان بیان *Bcl-2* متعاقب تیمار دارویی با کاهش معنادار همراه نبود. از آن جایی که در واقع نسبت *Bax/Bcl-2*، به جای تغییرات هر کدام از این ژن ها به تنهایی، تعیین کننده سرنوشت سلول در پاسخ به دارو است، به همین دلیل میزان تغییر این دو ژن نسبت به یکدیگر نیز بررسی شد. نسبت *Bax/Bcl-2* در دوزهای ۱۰ و ۳۰ میکرومولار از Idelalisib به ترتیب افزایش ۱/۵ و ۲ برابری نسبت به کنترل داشت (نمودار B). (۵)

این است که این دارو در سال ۲۰۱۴ توسط آمریکا و اتحادیه اروپا در درمان سه نئوپلاسم indolent B-Cell تأییدیه گرفته است (۱۴). Idelalisib به عنوان یک منوترایی در درمان بیماران CLL و indolent non-Hodgkin lymphoma مؤثر بوده و با مهار مسیر انتقال پیام PI3K/Akt/mTOR در سلول‌های مختلف، باعث کاهش بقا و تکثیر سلول‌های بدخیم، توقف چرخه سلولی و هم چنین القای آپوپتوز می‌شود (۱۷-۱۵، ۱۰).

نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان‌دهنده آن بود که Idelalisib در سلول‌های NB4 باعث کاهش شمارش سلولی، زنده‌مانی و فعالیت متابولیک سلول‌ها به طور وابسته به دوز و زمان می‌شود. در مطالعه انجام شده در سال ۲۰۱۰ توسط هیروشی ایکدا و همکارانش نتایجی مشابه در مالتیپل میلوما به دست آمده است؛ مطالعه‌ای که در آن مشخص شد که Idelalisib باعث کاهش ساخت DNA و کاهش تکثیر در دو سلول‌لاین میلومایی LB و INA-6 می‌شود (۱۱). به منظور بررسی این که آیا کاهش زنده‌مانی سلول‌ها از طریق مسیر آپوپتوتیک در سلول‌های NB4 صورت گرفته است، القای آپوپتوز در سلول‌های NB4 پس از تیمار با Idelalisib بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان داد که پس از تیمار سلول‌های NB4 با Idelalisib، تعداد جمعیت سلول‌های Annexin V+ و هم چنین Annexin V+/PI+ نسبت به کنترل افزایش داشت. در مطالعه انجام شده در سال ۲۰۱۲ توسط میدوسا و همکارانش مشخص شد که این مهارکننده PI3K در سلول‌های لنفوم هوچکین نیز باعث افزایش ۵-۲ برابری سلول‌های Annexin V+ نسبت به کنترل می‌شود (۱۰).

در ادامه و به منظور بررسی مکانیسم مولکولی دخیل در القای آپوپتوز، میزان بیان mRNA ژن‌های پروآپوپتوتیک و آنتی‌آپوپتوتیک مورد بررسی قرار گرفت. سه کلاس از پروتئین‌های خانواده Bcl-2 وجود دارد که باعث تنظیم

آپوپتوز می‌شود: مهارکننده‌های آپوپتوز هم‌چون Mcl-1 و Bcl-2؛ پیش برنده‌های آپوپتوز هم‌چون Bax و PUMA؛ و پروتئین‌های تنظیمی که ممکن است به عنوان فعال‌کننده و یا مهارکننده عمل کنند (۱۸). PUMA یک پروتئین پروآپوپتوتیک می‌باشد که می‌تواند از هر دو مسیر وابسته به p53 و غیر وابسته به p53 باعث افزایش آپوپتوز شود. فعالیت این پروتئین به گونه‌ای است که با لوکالیزاسیون در میتوکندری و ایجاد تداخل با Bcl-2 باعث القاء مرگ در سلول‌ها می‌شود (۲۰، ۱۹). شواهد اخیر نشان می‌دهد که Bax به عنوان یک مدیاتور اصلی در آپوپتوز ایجاد شده توسط PUMA می‌باشد (۲۱). در مطالعه دیگری مشخص شده است که نقص در ژن Bax از آپوپتوز ایجاد شده توسط PUMA جلوگیری می‌کند (۲۲). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که Idelalisib نه تنها از طریق افزایش بیان پروتئین‌های پروآپوپتوتیک Bax و PUMA سبب القای مرگ در سلول‌های NB4 می‌شود، بلکه کاهش بیان mRNA ژن Mcl-1 نیز می‌تواند به عنوان مکانیسم دخیل دیگر در سایتوتوکسیسیته این دارو مطرح باشد. در مطالعه انجام شده در سال ۲۰۱۱ توسط لانوتی و همکارانش، مشخص شد که Idelalisib در سلول‌های CLL از طریق کاهش بیان ژن Mcl-1 سبب القای مرگ می‌شود (۹).

نتیجه‌گیری

در مجموع، با توجه به فعال بودن p110δ در بیماران APL و هم چنین اثربخشی داروی Idelalisib در القای اثرات سایتوتوکسیک در سلول‌های پرومیلوسیتیک NB4، می‌توان چنین پیشنهاد کرد که این دارو می‌تواند به عنوان یک راهکار درمانی مناسب، چه به صورت منوترایی و چه به صورت داروی مکمل همراه با داروهای متداول مورد استفاده، در بیماران APL مد نظر گرفته شود.

References :

- 1- Tallman MS, Altman JK. How I treat acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2009; 114(25): 5126-35.
- 2- Ferrara F, Schiffer CA. Acute myeloid leukaemia in adults. *Lancet* 2013; 381(9865): 484-95.
- 3- Rowley JD, Golomb HM, Dougherty C. 15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukaemia. *Lancet* 1977; 1(8010): 549-50.
- 4- Thirman MJ, Larson RA. Therapy-related myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 1996; 10(2): 293-320.
- 5- Pedersen-Bjergaard J, Andersen MK, Christiansen DH, Nerlov C. Genetic pathways in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Blood* 2002; 99(6): 1909-12.
- 6- Antman KH. Introduction: the history of arsenic trioxide in cancer therapy. *Oncologist* 2001; 6 Suppl 2: 1-2.
- 7- Martelli AM, Nyåkern M, Tabellini G, Bortul R, Tazzari PL, Evangelisti C, *et al* . Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2006; 20(6): 911-28.
- 8- Tzenaki N, Papakonstanti EA. p110 δ PI3 kinase pathway :emerging roles in cancer. *Front Oncol* 2013; 3: 40.
- 9- Lannutti BJ, Meadows SA, Herman SE, Kashishian A, Steiner B, Johnson AJ, *et al* . CAL-101, a p110 δ selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability. *Blood* 2011; 117(2): 591-4.
- 10- Meadows SA, Vega F, Kashishian A, Johnson D, Diehl V, Miller LL, *et al* . PI3K δ inhibitor, GS-1101 (CAL-101), attenuates pathway signaling, induces apoptosis, and overcomes signals from the microenvironment in cellular models of Hodgkin lymphoma. *Blood* 2012; 119(8): 1897-900.
- 11- Ikeda H, Hideshima T, Fulciniti M, Perrone G, Miura N, Yasui H, *et al* . PI3K/p110 δ is a novel therapeutic target in multiple myeloma. *Blood* 2010; 116(9): 1460-8.
- 12- Badura S, Tesanovic T, Pfeifer H, Wystub S, Nijmeijer BA, Liebermann M, *et al* . Differential Effects of Selective Inhibitors Targeting the PI3K/AKT/mTOR Pathway in Acute Lymphoblastic Leukemia. *PLoS One* 2013; 8(11): e80070.
- 13- LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, Dennis PA.. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Updat* 2008; 11(1-2): 32-50.
- 14- Yang Q, Modi P, Newcomb T, Quéva C, Gandhi V. Idelalisib: First-in-Class PI3K Delta Inhibitor for the Treatment of Chronic Lymphocytic Leukemia, Small Lymphocytic Leukemia, and Follicular Lymphoma. *Clin Cancer Res* 2015; 21(7): 1537-42
- 15- Fransecky L, Mochmann LH, Baldus CD. Outlook on PI3K/AKT/mTOR inhibition in acute leukemia. *Mol Cell Ther* 2015; 3: 2.
- 16- Rosin NY, Koehrer S, Kim E, O'Brien S, Wierda WG, Thomas DA, *et al* . *In Vitro* Effects of PI3K δ Inhibitor GS-1101 (Cal-101) in Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). *Blood* 2012; 120(21): 3534.
- 17- Majchrzak A, Witkowska M, Smolewski P. Inhibition of the PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway in Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Current Knowledge and Clinical Significance. *Molecules* 2014; 19(9): 14304-15.
- 18- Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(1): 47-59.
- 19- Yu J, Zhang L. PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene* 2009; 27: 71-83.
- 20- Hofseth LJ, Hussain SP, Harris CC. p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol Sci* 2004; 25(4): 177-81.
- 21- Luo X, He Q, Huang Y, Sheikh MS. Transcriptional upregulation of PUMA modulates endoplasmic reticulum calcium pool depletion-induced apoptosis via Bax activation. *Cell Death Differ* 2005; 12(10): 1310-8.
- 22- Yu J, Wang Z, Kinzler KW, Vogelstein B, Zhang L. PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(4): 1931-6.

Original Article

Cytotoxic effect of PI3K δ inhibitor in acute promyelocytic leukemia cells

Dadashi M.¹, Bashash D.¹

¹Hematology Department, Faculty of Allied Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

PI3K/Akt pathway plays a key role in cell growth and proliferation. Constitutive activation of this pathway is detectable in 50-70% of patients with acute promyelocytic leukemia (APL). Previous studies showed that PI3K activity in APL cells is mainly due to overexpression of p110 δ isoform. In an effort to investigate the effect of PI3K inhibition in acute promyelocytic leukemia, APL-derived NB4 cells were subjected to different concentrations of Idelalisib, as a potent p110 δ -specific inhibitor.

Materials and Methods

In this experimental study, we examined the effect of Idelalisib on the viability and metabolic activity of NB4 cells. Moreover, flowcytometry and quantitative RQ-PCR were applied to investigate both induction of apoptosis and transcriptional activity of apoptosis-related genes, respectively.

Results

The results revealed that Idelalisib not only decreased cell viability and metabolic activity in a dose- and time-dependent manner, but also induced cell death through the apoptotic pathway in NB4 cells. Our data also delineated that Idelalisib-induced apoptosis was mediated through induction of Bax and PUMA coupled with decreased expression of *Mcl-1*.

Conclusions

Based on P110 δ activity in APL patients and the potent efficacy of Idelalisib in NB4 cells, it is tempting to suggest this inhibitor, as either single agent or in combination with common medications, for the treatment of patients with APL.

Key words: Acute Promyelocytic Leukemia, Inhibition, Apoptosis

Received: 15 Nov 2016

Accepted: 10 Apr 2017

Correspondence: Bashash D., PhD of Hematology & Blood Banking. Assistant Professor of Hematology Department, Faculty of Allied Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences.
Postal Code: 1971653312, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 22721150; Fax: (+9821) 22721150
E-mail: david_5980@yahoo.com