خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۴ شماره ۲ تابستان ۹۶ (۱۳۴-۱۲۶)

مقاله پژوهشی

تاثیر سایتوتوکسیک مهارکننده PI3Kδ 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 p110δ می‌باشد. در این مطالعه بر آن شدیم تا اثر بخشی داروی Idelalisib را که یکی از مهم‌ترین مهارکننده‌های p110δ می‌باشد، در سلول‌های NB4 مشتق از APL بررسی کنیم.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، اثرات مهاری 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 فعال‌کردن مسیر آپوپتوتیک می‌باشد. هم چنین 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.

نتیجه گیری

با توجه به فعال‌بودن p110δ در بیماران APL و هم چنین 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: ۹۵/۸/۲۵
تاریخ پذیرش: ۹۶/۱/۲۱

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

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-28]

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/RARα و بیان پروتئین کایمریک PML/RARα 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(۵، ۴). لازم به ذکر است که یکی از استراتژی‌های درمانی در بیماران مقاوم به ATRA ، استفاده از آرسنیک‌تری‌اکساید(AS_2O_3) 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 تری اکساید 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 p110δ 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 p110δ 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 سایتوتوکسیک 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 ، برآن 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/RARα 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 نئوبار) استفاده شد. اساس این آزمایش

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-28]

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 شانزده‌تایی(خانه شمارش WBC) شمارش شده و میانگین گرفته شد. هم‌چنین زنده‌مانی سلول‌ها نیز با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{درصد زنده‌مانی سلول‌ها} = \frac{\text{تعداد سلول‌های زنده}}{\text{کل سلول‌ها}} \times ۱۰۰$$

ارزیابی فعالیت متابولیک سلول‌ها به روش MTT:

برای ارزیابی تاثیر دارو بر فعالیت متابولیک سلول‌ها، از آزمون MTT (Microculture Tetrazolium Test) استفاده شد. پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف دارو، تعداد ۵×۱۰^{۳} 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 (۵ mg/mL) 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 الایزا 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 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 cDNA Synthesis Kit (تاکارابیو) 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 دناتوراسیون (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. $۲^{-\Delta\Delta ct}$ = میزان بیان ژن

آنالیز آماری:

تمامی آزمایش‌ها به شکل سه آزمون مستقل انجام و مقادیر گزارش شده به شکل Mean ± 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 $p<۰/۰۵$ معنادار بوده است.

**: بیانگر این است که اختلاف میانگین گروه‌های آزمون با کنترل در سطح $p<۰/۰۱$ معنادار بوده است.

***: بیانگر این است که اختلاف میانگین گروه‌های آزمون با کنترل در سطح $p<۰/۰۰۱$ معنادار بوده است.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-28]

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

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

یافته‌ها

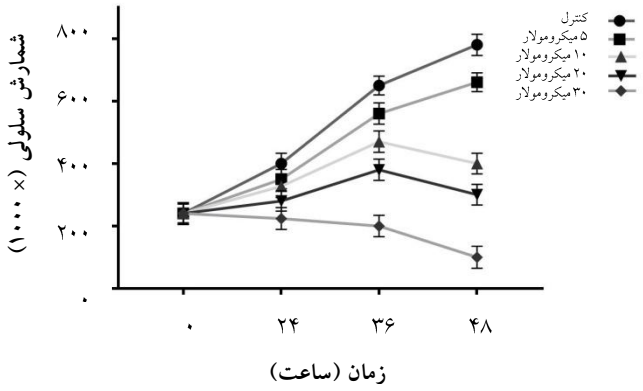
کاهش شمارش سلولی و زنده‌مانی سلول‌های NB4 پس از تیمار با Idelalisib به‌صورت وابسته به دوز و زمان:

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 مهاری 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 و۳۰ میکرومولار از Idelalisib به ترتیب به ۸۴٪، ۶۳٪، ۳۸٪ و ۲۵٪ رسیده است که نشان‌دهنده کاهش چشم‌گیر زنده مانی 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). هم چنین نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که اثر مهاری 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.

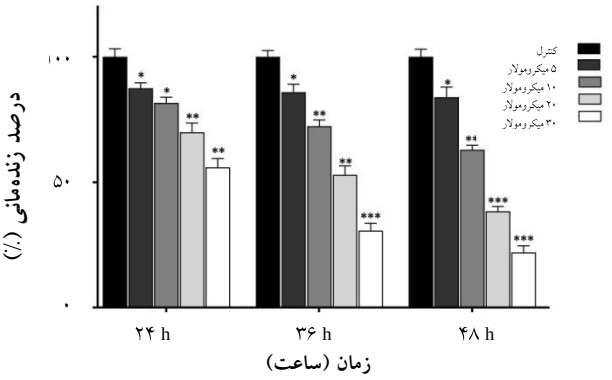


نمودار ۱ : تاثیر داروی Idelalisib بر شمارش سلولی در سلول‌های NB4 به صورت وابسته به دوز و زمان. سلول‌های NB4 در تعداد ۲۰۰/۰۰۰ در پلیت‌های ۱۶ تایی در مقادیر مختلف ۵ ، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میکرومولار تیمار و پس از گذشت ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت، شمارش سلولی با روش تریپان بلو انجام شد(۳ =n ، Mean ± SD). همان گونه که در شکل مشاهده می‌شود، Idelalisib به صورت وابسته به دوز و زمان شمارش سلولی را کاهش داده و دوز ۳۰ میکرومولار دارای بیشترین اثرات سایتوتوکسیک می‌باشد.

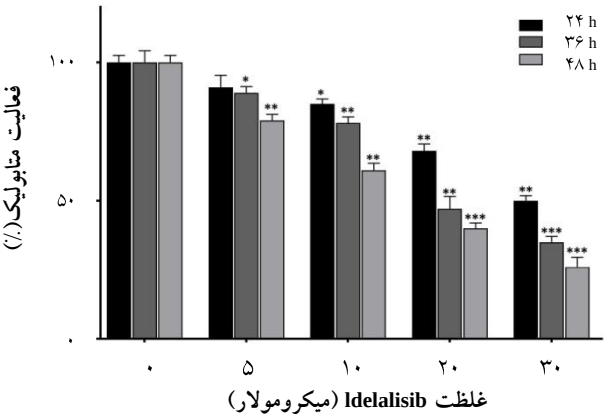
اثر پروآپوپتوتیک داروی Idelalisib در سلول‌های NB4:

۴۸ ساعت پس از تیمار سلول‌های NB4 با Idelalisib

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-28]

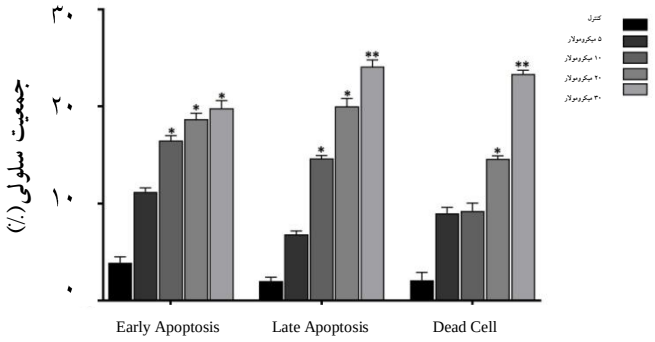


نمودار ۲: تاثیر Idelalisib در زنده‌مانی سلول‌های NB4. میزان زنده‌مانی سلول‌های NB4 پس از تیمار با غلظت‌های مختلف Idelalisib در۲۴ ، ۳۶ و ۴ ۸ ساعت، با روش تریپان‌بلو ارزیابی شد. همان طور که در شکل مشاهده می‌شود، Idelalisib به صورت وابسته به دوز و زمان زنده‌مانی سلول‌ها را کاهش می‌دهد. میانگین و انحراف از معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف محاسبه و p value به دست آمده (* ، p< ۰/۰۵ ، ** ، p< ۰/۰۱ ، *** p< ۰/۰۰۱) نشان‌دهنده معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با کنترل بود.



نمودار۳: 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. همان طور 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 ران‌کاری مختلف (Mean ± SD) محاسبه و p. value به دست‌آمده (*، p < ۰/۰۵؛ **،p< ۰/۰۱؛ *، p<۰/۰۰۱) نشان‌دهنده معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با کنترل بود.**

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 در جمعیت سلول‌های Early Apoptosis و Late Apoptosis به صورت وابسته به دوز می‌شود(نمودار ۴).

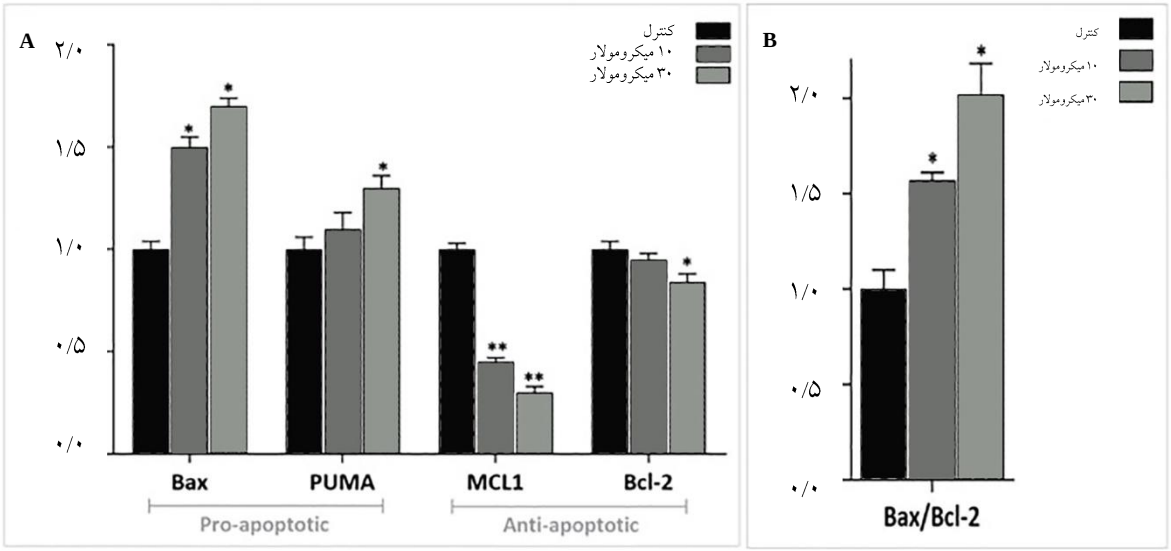


نمودار ۴: تاثیر Idelalisib در القای آپوپتوز در سلول‌های NB4. سلول‌های NB4 در تعداد $10^5 \times 5$ در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای با دوزهای مختلف Idelalisib تیمار و پس از گذشت ۴۸ ساعت میزان آپوپتوز با استفاده از کیت رنگی دوگانه AnnexinV/PI بررسی شد. همان طور که در شکل مشاهده می‌شود، Idelalisib باعث القای آپوپتوز به صورت وابسته به دوز می‌شود. میانگین و انحراف از معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (Mean ± SD) محاسبه و p value به دست آمده (*، p < ۰/۰۵ ؛ **،p< ۰/۰۱) 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 A ۵).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-28]



نمودار ۵ : تاثیر Idelalisib بر سطح mRNA ژن‌های پروآپوپتوتیک و آنتی‌آپوپتوتیک در سلول‌های NB4. سلول‌های NB4 در تعداد ۲×۱۰^{۶} با غلظت‌های ۱۰ و ۳۰ میکرومولار از Idelalisib به مدت ۴۸ ساعت تیمار و پس از ساخت cDNA میزان بیان ژن‌ها با استفاده از روش Quantitative RT-PCR محاسبه شد. A) Idelalisib باعث افزایش بیان ژن‌های پروآپوپتوتیک و کاهش در بیان *Mcl-1* می‌شود. B) تیمار سلول‌های NB4 با Idelalisib باعث افزایش نسبت ژن‌های *Bax/Bcl-2* در غلظت‌های ۱۰ و ۳۰ میکرومولار می‌شود. میانگین و انحراف از معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (Mean ± SD) محاسبه و p.value به دست آمده (*، $p < ۰/۰۵$؛ **، $p < ۰/۰۱$) نشان‌دهنده معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با کنترل می‌باشد.

هم چنین نتایج به دست آمده نشان داد که بیان ژن *PUMA* به عنوان یکی دیگر از اعضاء پروآپوپتوتیک خانواده *Bcl2* نیز متعاقب تیمار با دوز ۳۰ µM از Idelalisib به میزان ۱/۳ برابر نسبت به کنترل افزایش داشت.

در بررسی میزان تغییر بیان ژن‌های آنتی‌آپوپتوتیک خانواده *Bcl2* نیز نتایج نشان داد که بیان ژن *Mcl-1* متعاقب تیمار با Idelalisib به‌ترتیب 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 ژن‌ها به تنهایی، تعیین‌کننده 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).

بحث

مسیر PI3K/Akt/mTOR مسیری است که به طور مداوم در سلول‌های پرومیلوسیت غیر طبیعی در APL فعال می‌باشد و باعث بقا و تکثیر نامحدود این سلول‌ها می‌شود. این مسیر در پروسه‌های مختلف سلولی از قبیل متابولیسم، تمایز، التهاب، بقا و آپوپتوز نقش به سزایی را ایفا می‌کند (۱۲). مطالعه‌های گذشته نشان می‌دهد که ایزوفرم p110δ آنزیم PI3K ، مهم‌ترین ایزوفرم در سلول‌های لوسمیک APL است که دارای افزایش بیان بالایی می‌باشد(۱۳). بنابراین مهارکننده‌های مسیر PI3K/Akt در درمان بسیاری از بدخیمی‌ها از جمله لوسمی‌های میلوییدی مورد توجه ویژه قرار گرفته است(۷). مهارکننده‌های PI3K به طور کلی شامل دو دسته Pan-PI3K inhibitor و Isoform-specific inhibitor می‌باشد که Idelalisib به عنوان یک Isoform-specific inhibitor ، در واقع مهارکننده ایزوفرم p110δ بوده و با مهار انتقال پیام PI3K باعث کاهش در فسفریلاسیون Akt و افکتورهای زیردست آن می‌شود(۹). نکته قابل توجه

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-28]

این است که این دارو در سال ۲۰۱۴ توسط آمریکا و اتحادیه اروپا در درمان سه نئوپلاسم indolent B-Cell تائیدیه گرفته است(۱۴). Idelalisib به عنوان یک منوتراپی در درمان بیماران CLL و indolent non-Hodgkin lymphoma مؤثر بوده و با مهار مسیر انتقال پیام PI3K/Akt/mTOR در سل‌لاین‌های 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 سل‌لاین 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 Idelaliisb بررسی شد. نتایج به دست‌آمده نشان داد که پس از تیمار سلول‌های NB4 با Idelalisib ، تعداد جمعیت سلول‌های Annexin V+ و هم چنین AnnexinV+/PI+ نسبت به کنترل افزایش داشت. در مطالعه انجام شده در سال ۲۰۱۲ توسط میدوسا و همکارانش مشخص شد که این مهار کننده PI3K در سل‌لاین‌های لنفوم هوچکین نیز باعث افزایش ۵–۲ برابری سلول‌های AnnexinV+ 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 هم چون 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 انجام‌شده در سال ۲۰۱۱ توسط لانوتی و همکارانش، مشخص شد که Idelalisib در سلول‌های CLL از طریق کاهش بیان ژن *Mcl-1* سبب القا 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 منوتراپی و چه به صورت داروی مکمل همراه با داروهای متداول مورد استفاده، در بیماران APL مد نظر گرفته شود.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-28]

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. p110δ 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 p110δ 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*. PI3Kδ 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/p110δ 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 PI3Kδ 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.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-28]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2017; 14(2):126-134

Original Article

Cytotoxic effect of PI3Kδ inhibitor in acute promyelocytic leukemia cells

***Dadashi M.*[1]*, Bashash D.*[1]

[1]*Hematology 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 p110δ 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 p110δ-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, flowcytometery 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 P110δ 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. Assiatant 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*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-06-28]