



Semnan University of Medical Sciences

# KOOMESH

Journal of Semnan University of Medical Sciences

**Volume 20, Issue 4 (Autumn 2018), 603-807**

**ISSN: 1608-7046**

**Full text of all articles indexed in:**

*Scopus, Index Copernicus, SID, CABI (UK), EMRO, Iranmedex, Magiran, ISC, Embase*

---

## القاء توقف چرخه سلولی در سلول‌های Nalm-6 متعاقب تیمار با مهارکننده تمام ایزوفرومی PI3K (Buparlisib) از طریق افزایش بیان p21 و p27

آوا صفراوغلی آذر (M.Sc)، محمدرضا صدری (M.Sc)، داود بشاش (Ph.D)\*

گروه خون‌شناسی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۸/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۲۰

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۲۲۷۱۷۵۰۴ d.bashash@sbmu.ac.ir

### چکیده

هدف: در عرصه درمان‌های هدفمند، تلاش‌های بی‌شماری معطوف شناسایی عوامل جدید با فعالیت‌های ضدتوموری گشته است تا علاوه بر آن‌که بقاء بیماران مبتلاء به بدخیمی‌ها را بهبود بخشند، عوارض جانبی رژیم‌های درمانی کنونی را نیز کاهش دهند. مطالعات ژنتیکی، نقش مهمی را برای فعالیت نابه‌جای مسیر PI3K نه تنها در پاتوژنز لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) بلکه در ایجاد فنوتیپ مقاوم به درمان در نظر می‌گیرند. هدف از این مطالعه، ارزیابی فعالیت آنتی‌پرولیفراتیو داروی تمام ایزوفرومی PI3K، Buparlisib در سلول‌های Nalm-6 بود.

مواد و روش‌ها: به‌منظور بررسی این‌که آیا مهار مسیر PI3K با استفاده از Buparlisib اثر آنتی‌پرولیفراتیو را در سلول‌های لوسمی‌ک اعمال می‌نماید، سلول‌های Nalm-6 با غلظت‌های مختلف مهارکننده تیمار شدند و متعاقباً درصد زنده‌مانی، تعداد سلول‌ها، پیشرفت چرخه سلولی و تغییر فعالیت رونویسی ژن‌های دخیل در چرخه سلولی مورد سنجش قرار گرفت. یافته‌ها: Buparlisib نه تنها تعداد سلول‌های زنده تیمار شده را به صورت وابسته به غلظت و زمان کاهش داد؛ بلکه درصد زنده‌مانی سلول‌ها را نیز پایین آورد. همچنین، ما دریافتیم که اثر آنتی‌پرولیفراتیو مهارکننده احتمالاً از طریق توقف چرخه سلولی و به علت افزایش بیان ژن‌های p21 و p27 در کنار کاهش بیان ژن c-Myc صورت می‌گیرد. نتیجه‌گیری: نتایج این بررسی نشان می‌دهد که Buparlisib از طریق کاهش میزان همانندسازی DNA، توقف چرخه سلولی و تغییر بیان ژن‌های دخیل در تکثیر سلولی می‌تواند از میزان تکثیر سلول‌های Nalm-6 بکاهد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهند که ممکن است بتوان از درمان‌های مبتنی بر مهارکنندگان PI3K به‌عنوان راه‌کار درمانی امیدبخش در درمان بیماران مبتلا به ALL استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: چرخه سلولی، لوسمی لنفوبلاستیک حاد، مسیر PI3K، Buparlisib، Nalm-6

### مقدمه

ادامه دارد و ورود داروهای جدید به عرصه درمانی این بیماران با امید فراوانی روبه‌رو می‌باشد. در دوران درمان‌های هدفمند، تحقیقات معطوف به شناسایی عوامل جدید با فعالیت‌های ضدتوموری مطلوب می‌باشند تا علاوه بر آن‌که میزان بهبودی و بقاء بیماران را افزایش دهند، عوارض جانبی کم‌تری را نیز برای آن‌ها داشته باشند [۳، ۴]. مطالعات ژنتیکی و بیولوژیک متعددی، فعالیت بیش از حد مسیر پیام‌رسانی فسفاتیدیل-۳-کیناز (PI3K) را که با افزایش پتانسیل تکثیری و فرار از آپوپتوز سلول‌های لوسمی‌ک همراه است، به عنوان یک ویژگی شایع در بین بیماران مبتلاء به لوسمی لنفوبلاستیک حاد معرفی می‌نمایند [۵-۷]. به همین دلیل، خارج از انتظار نیست که در سال‌های اخیر لیپیدکیناز PI3K به عنوان یک هدف درمانی برای بیماران ALL بسیار مورد توجه قرار گیرد [۸-۱۰].

لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) یکی از شایع‌ترین و مرگ‌آورترین بدخیمی‌های خونی شناخته شده در بین کودکان در سراسر جهان می‌باشد که با وجود پیشرفت‌های شگرف صورت گرفته در زمینه‌های درمانی و مدیریت بیماری، همچنان پاره‌ای از مبتلایان به این بیماری به دلایل مختلفی از جمله عوارض شدید و جبران‌ناپذیر برخی از داروهای شیمی‌درمانی و یا مقاومت به درمان جان خود را از دست می‌دهند [۱]. با وجود آن‌که بسیاری از مکانیسم‌های دخیل در پاتوژنز این بیماری شناسایی شده است و وجود چندین ترانس-لوکاسیون‌های ژنی از جمله دلایل اصلی بروز این لوسمی عنوان شده‌اند [۲]؛ هنوز تلاش برای یافتن مکانیسم‌های دیگر

شد. این دارو مشتق ۲ و ۶ دی مرفولینو پیریمیدین بوده و به صورت پودر می‌باشد. محلول ذخیره Buparlisib در غلظت  $50 \mu\text{M}$  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  $-20^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید. به منظور تعیین اثرات بهینه Buparlisib، سلول‌های رده Nalm-6 با غلظت‌های ۰ تا ۴ میکرومولار از دارو طی مدت زمان‌های ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. در تمامی مطالعات انجام شده، گروه‌های تیمار شده با دارو با گروه‌های کنترل که هیچ دارویی دریافت نکرده بودند و هم‌چنین سلول‌های قرار گرفته در DMSO (غلظت نهایی  $0.1\%$ )، به‌عنوان کنترل منفی، مورد مقایسه قرار گرفتند و به منظور بررسی صحت تست‌های انجام‌شده تمامی تست‌ها به صورت سه‌تایی ارزیابی شدند.

#### آزمون بررسی میزان جذب سلولی تریپان‌بلو

به منظور بررسی تاثیر داروی Buparlisib بر میزان زنده‌مانی سلول‌ها، سلول‌های Nalm-6 به تعداد  $5 \times 10^5$  cell/ml در حضور غلظت‌های مختلف دارو به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. سپس سلول‌های تیمار شده در زمان مقرر با نسبت ۱ به ۱ با رنگ حیاتی تریپان‌بلو  $0.4\%$  مخلوط شده، به مدت ۱ الی ۲ دقیقه آن را انکوباسیون کرده و سپس در خانه‌های مربوط به لام هماسیتومتر قرار داده و در زیر میکروسکوپ شمارش می‌کنیم. سلول‌هایی که این رنگ را جذب می‌نمایند، سلول‌های مرده و سلول‌هایی که هیچ رنگی را به خود جذب نکرده‌اند، زنده محسوب می‌شوند. سپس با استفاده از فرمول زیر میزان زنده‌مانی سلول‌ها را محاسبه می‌کنیم:

$$\text{میزان زنده‌مانی (\%)} = \frac{\text{تعداد سلول‌های زنده}}{\text{تعداد کل سلول‌ها}} \times (100)$$

#### بررسی میزان فعالیت چرخه سلولی

به منظور شناسایی محتویات DNA سلولی و درصد سلول‌های آپتوز شده از رنگ‌آمیزی پروپیدیوم یداید (PI) استفاده کردیم. به‌طور خلاصه، سلول‌های Nalm-6 به تعداد  $1 \times 10^6$  cell/well در پلیت‌های ۶ خانه قرار گرفتند سپس با داروی Buparlisib برای مدت زمان ۳۶ ساعت تیمار شدند. پس از انکوباسیون، سلول‌ها در دور  $2000 \text{ rpm}$  برای زمان ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و در  $500$  میکرولیتر PBS به‌صورت سوپانسیون درآمدند. در مرحله بعد، سلول‌ها در اتانول  $70\%$  فیکس شده و در دمای  $-20^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد به صورت Overnight قرار گرفتند. سپس  $0.5 \mu\text{g/ml}$  از محلول RNase در PBS افزوده شده و قبل از افزودن PI به مقدار  $50 \mu\text{g/ml}$  به

طراحی‌های دارویی تا کنون سه خانواده از مهارکنندگان PI3K با خصوصیات فارماکولوژیک و فارماکوکینتیک مختلف سنتز نموده‌اند که در بین آن‌ها، مهارکننده تمام ایزوفرمی PI3K، به دلیل توانایی در مهار تمامی ایزوفرم‌های PI3K از جایگاه برجسته‌ای برخوردار گشته است [۱۱، ۱۲]. یکی از این مهارکنندگان نسل جدید PI3K، دارویی تحت عنوان Buparlisib می‌باشد که قادر به مهار تمام ایزوفرم‌های زیرواحدهای کاتالپتیکی (زیرواحدهای آلفا، بتا، دلتا و گاما) با اختصاصیت ۵۰ برابری نسبت به سایر پروتئین‌کینازها می‌باشد [۱۳، ۱۴]. این مهارکننده مسیر PI3K/Akt، به علت القاء اثر سایتوتوکسیک در بسیاری از سلول‌های سرطانی به شدت مورد توجه مطالعات درمان سرطان قرار گرفته است و در حال حاضر جهت درمان بسیاری از تومورهای توپر هم‌چون سرطان سینه، گلیوبلاستوما، سرطان ریه و سرطان سر و گردن در حال طی کردن مراحل کارآزمایی بالینی می‌باشد [۱۵-۱۷]. عوارض جانبی و نامطلوب محدود این دارو و هم‌چنین اثر ضدتوموری قدرتمند آن باعث شده است که تاثیر این مهارکننده در بدخیمی‌های هماتولوژیک نیز مورد بررسی قرار گیرد. مطالعات صورت گرفته بر روی بدخیمی‌های میلوئیدی و هم‌چنین برخی از انواع لنفوم‌ها همگی از اثربخش بودن این مهارکننده تمام ایزوفرمی حکایت دارد [۱۵، ۱۸، ۱۹].

بر اساس ویژگی‌های قدرتمند داروی Buparlisib و هم‌چنین نقش مسیر PI3K در پاتوژنز ALL، در این مطالعه بر آن شدیم تا تاثیر مهارکننده تمام ایزوفرمی PI3K را بر روی سلول‌های مشتق شده از لوسمی لنفوبلاستیک حاد، Nalm-6 که به علت افزایش فسفریلاسیون پروتئین Akt، مسیر PI3K/Akt به شدت فعالی دارد؛ مورد ارزیابی قرار دهیم. هم‌چنین از آن‌جائی‌که بیش‌تر مطالعات انجام شده بر روی مکانیسم عمل و نحوه اثرگذاری داروی Buparlisib بر خصوصیت سایتوتوکسیک آن تاکید دارند، در این بررسی، تاثیر این دارو بر میزان پروليفراسیون و تکثیر سلول‌های لوسمیک و هم‌چنین چرخه سلولی مورد مطالعه قرار گرفت.

## 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 1640 حاوی  $10\%$  سرم (FBS)،  $100 \text{ U/ml}$  پنبسی-پیلین و  $100 \mu\text{g/ml}$  استرپتومایسین در شرایط دمایی  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد و فشار  $5\%$   $\text{CO}_2$  کشت داده شدند. برای تیمار دارویی سلول‌ها از داروی Buparlisib (شرکت Selleckchem آمریکا) استفاده

نرم افزار Gene Runner و تایید آن‌ها با نرم‌افزار Primer-BLAST انجام گرفت (جدول ۱). به ازای هر واکنش ۱۰ میکرولیتر از Syber premix Ex Taq (Takara)، ۲ میکرولیتر از cDNA، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرها و ۷ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز استفاده شد. شرایط دمایی مورد استفاده شامل یک مرحله فعال‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در ادامه، ۴۰ سیکل برای دناتوراسیون (۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد) و آنیلینگ/اکستنشن توام (۲۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد) می‌باشد. برای بررسی اختصاصیت محصول تکثیر شده، منحنی ذوب مورد بررسی قرار گرفت. در انتها و برای محاسبه نسبی تعداد نسخه mRNA تکثیر شده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری. تمامی آزمایشات به شکل سه آزمون مستقل انجام و مقادیر گزارش شده به شکل  $Mean \pm SD$  قید شدند. هم‌چنین برای محاسبات آماری از روش t-test و نرم‌افزار SPSS 21 و GraphPad Prism7 استفاده شد. علامت \* بیانگر این است که اختلاف میانگین گروه آزمون با کنترل در سطح  $p \leq 0/05$ ، معنی‌دار بوده است. علامت \*\* بیانگر این است که اختلاف میانگین گروه آزمون با کنترل در سطح  $p \leq 0/01$ ، معنی‌دار بوده است و علامت \*\*\* بیانگر این است که اختلاف میانگین گروه آزمون با کنترل در سطح  $p \leq 0/001$ ، معنی‌دار بوده است.

آن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمودیم. در انتها، محتویات DNA سلولی با کمک دستگاه فلوسایتومتری مورد مطالعه قرار گرفت و آنالیز آن از طریق نمودارهای به‌دست آمده صورت پذیرفت.

### استخراج RNA و ساخت cDNA

برای استخراج RNA از محلول TriPure (Roche) Isolation Reagent طبق دستورالعمل کیت استفاده شد. پس از تیمار سلول‌های Nalm-6 با Buparlisib و متعاقب گذشت ۳۶ ساعت، RNA سلول‌ها استخراج و کمیت آن‌ها با روش اسپکتروفتومتری با استفاده از دستگاه Nanodrop ND-1000 اندازه‌گیری شد. در ادامه کار، برای انجام واکنش رونویسی معکوس و جهت سنتز cDNA از RevertAid™ (Fermentas) First Strand cDNA Synthesis Kit استفاده شد. مخلوط مذکور به مدت ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه، ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه و ۱ ساعت در دمای ۴۲ درجه انکوبه شد و در نهایت، واکنش سنتز cDNA به‌واسطه انکوباسیون ۵ دقیقه‌ای در دمای ۷۰ درجه پایان پذیرفت. cDNA سنتز شده در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد.

### بررسی بیان ژن‌ها توسط Real-time PCR

آزمایش Real-Time PCR در دستگاه light-cycler (Roche) و در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. هم‌زمان از ژن House Keeping که همان HPRT است، برای نرمالیزه کردن بیان ژن‌ها استفاده می‌کنیم. طراحی پرایمرها با استفاده از

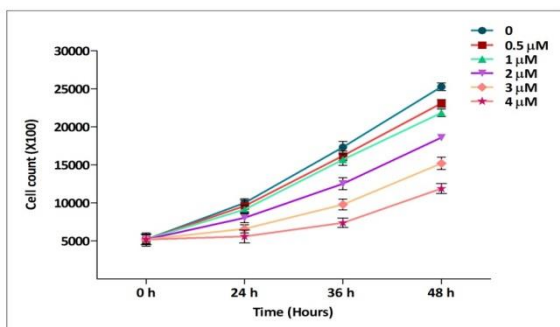
جدول ۱. توالی آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش Real-time PCR

ژن	Accession number	آغازگر معکوس (3'-5')	آغازگر مستقیم (5'-3')	اندازه محصول PCR (bp)
HPRT	NM_000194	CCAGCAGGTCAGCAAAGAATTTA	TGGACAGGACTGAACGTCTTG	۱۱۱
p27	NM_004064	CCCTCTAGGGGTTTGTGATTCT	AACGTGCGAGTGTCTAACGG	۱۳۹
p21	NM_000389	GCGTTTGGAGTGGTAGAAATCT	CGAGAGGTCTTTTTCCGAGTG	۱۳۰
c-Myc	NM_002467	GCAGGATAGTCCTTCCGAGTG	CCACAGCAAACCTCCTCACAG	۱۰۵

مشاهده می‌شود؛ تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میکرومولار طی مدت زمان ۴۸ ساعت تاثیر چندانی بر بقاء سلول‌های تیمار شده نمی‌گذارد؛ این در حالی است که تیمار سلول‌های Nalm-6 با غلظت‌های بالاتر از دارو، میزان زنده‌مانی سلول‌ها را به میزان قابل توجهی کاهش می‌دهد؛ به طوری که غلظت ۳ میکرومولار Buparlisib در زمان ۳۶ و ۴۸ ساعت قادر است درصد بقاء سلول‌ها را به ترتیب ۴۴ و ۵۳٪ کاهش دهد. لازم به ذکر است که پس از محاسبه مقدار غلظت مهارتی یا IC<sub>50</sub> (دوزی از دارو که توانایی القاء مرگ سلولی در ۵۰٪ از جمعیت سلول‌ها را دارد) این دارو مشخص شد که داروی Buparlisib در غلظت ۳ میکرومولار در زمان ۴۸

### نتایج

بررسی درصد زنده‌مانی سلول‌های Nalm-6 پس از تیمار با داروی Buparlisib به منظور پی بردن به اثرات سایتوکسیک داروی Buparlisib، سلول‌های Nalm-6 با غلظت‌های مختلف Buparlisib (۰/۵-۴ میکرومولار) تیمار شدند و سپس در بازه‌های زمانی ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت، میزان درصد زنده‌مانی این سلول‌ها با استفاده از روش رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان می‌دهد که Buparlisib به صورت وابسته به زمان و غلظت، قادر با کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌های Nalm-6 می‌باشد. همان‌طور که در شکل ۱



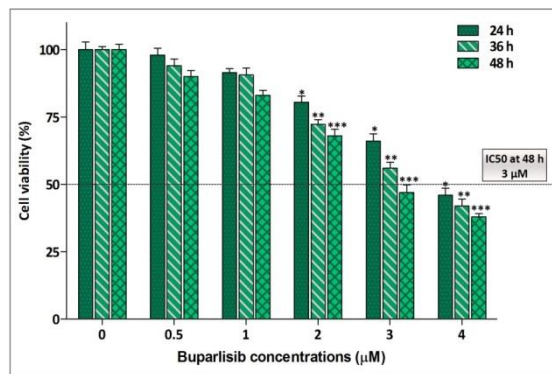
شکل ۲. شمارش سلول‌های زنده Nalm-6 پس از تیمار با Buparlisib. پس از تیمار با غلظت‌های مورد نظر با مهارکننده PI3K، نتایج مشخص می‌کند که این مهارکننده به طور قابل توجهی شمارش سلول‌های زنده را کاهش می‌دهد

### Buparlisib سبب افزایش جمعیت سلول‌های Nalm-6 در

#### فاز G1 چرخه سلولی می‌شود

مطالعات نشان می‌دهند که کاهش میزان بقای سلول‌های سرطانی پس از تیمار با عوامل ضدتوموری می‌تواند به علت توقف سلول‌ها در فازهای مختلف چرخه سلولی و یا القاء آپوپتوز صورت گیرد [۲۰]. به منظور بررسی این‌که آیا کاهش میزان زنده‌مانی سلول‌های Nalm-6 متعاقب تیمار با مهارکننده PI3K به علت تغییر در نحوه توزیع سلول‌ها در چرخه سلولی می‌باشد؛ محتوای DNA سلول‌ها پس از تیمار با غلظت‌های مختلف از Buparlisib به مدت ۳۶ ساعت توسط تکنیک فلوسایتمتری مورد ارزیابی قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ میکرومولار از مهارکننده درصد سلول‌های فاز G1 را از ۳۰/۳٪ در گروه کنترل به ترتیب به ۳۷، ۰۹، ۳۹، ۱۸، ۲۳، ۴۱ و ۴۵٪ افزایش می‌دهد و به این ترتیب مهارکننده PI3K با القاء توقف چرخه سلولی در مرحله G1، اثر ضد توموری خود را اعمال می‌نماید. هم‌چنین لازم به ذکر است که این دارو می‌تواند جمعیت سلول‌های مرحله S چرخه سلولی را نیز به صورت معناداری کاهش دهد که خود تأییدی بر خواص آنتی‌پرولیفراتیوی این مهارکننده در سلول‌های مشتق شده از لوسمی لنفوبلاستیک حاد نیز می‌باشد (شکل ۳). در ادامه، جهت بررسی تأثیر داروی Buparlisib در القاء مرگ سلولی، جمعیت سلول‌های هیپودیپلوئیدی فاز Sub-G1 نیز مورد بررسی قرار گرفت. جالب توجه است که مشابه با نتایج به دست آمده از بررسی میزان بقای سلولی، آنالیز درصد سلول‌های فاز Sub-G1 که موید سلول‌های آپوپتوز شده می‌باشند، نیز نشان می‌دهد که داروی Buparlisib با افزایش معنادار و وابسته به دوز جمعیت سلول‌های این مرحله از چرخه سلولی، اثرات سائیتوتوکسیک خود را اعمال می‌نماید.

ساعت قادر است از تکثیر و بقای ۵۰٪ از سلول‌های Nalm-6 جلوگیری نماید و اثر سائیتوتوکسیک خود را در این رده سلولی اعمال نماید (شکل ۱).



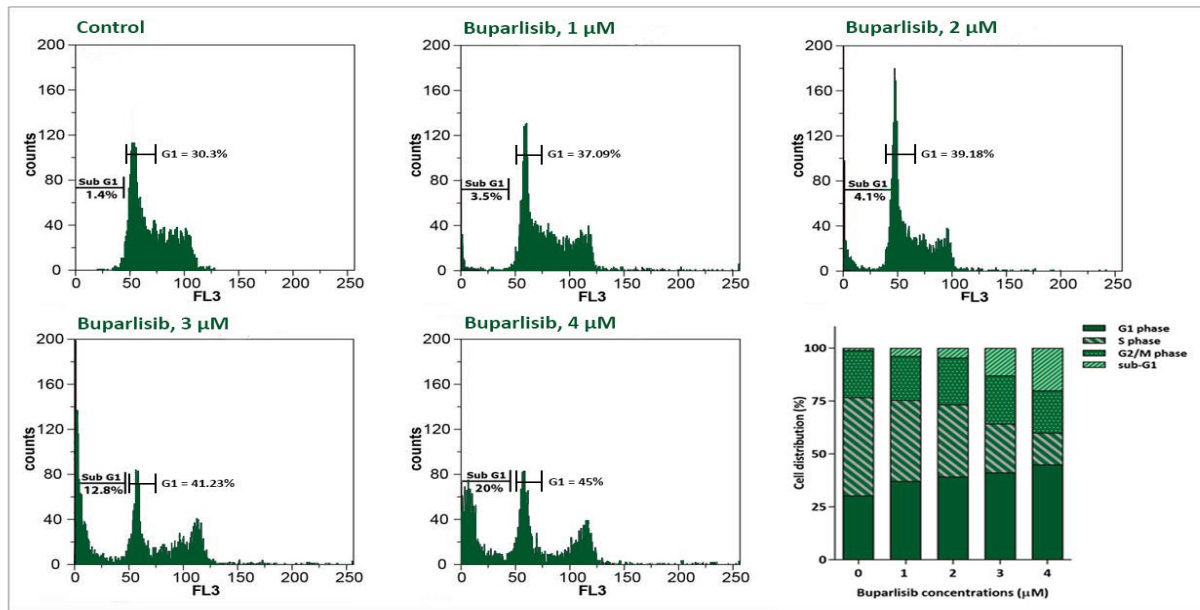
شکل ۱. بررسی درصد زنده‌مانی سلول‌های Nalm-6 پس از تیمار با داروی Buparlisib. سلول‌های Nalm-6 تا مدت ۴۸ ساعت با غلظت‌های مختلف Buparlisib تیمار شدند و درصد زنده‌مانی آن‌ها با کمک روش تریپان‌بلو محاسبه شد. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean ± SD) محاسبه و P value به دست آمده (\*، بیانگر  $P < 0.05$ ، \*\*، بیانگر  $P < 0.01$  و \*\*\*) نشان‌گر معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

### بررسی شمارش سلول‌های Nalm-6 پس از تیمار با

#### Buparlisib

مطالعات بی‌شمار نشان داده‌اند که مهار مسیر PI3K/Akt در سلول‌های سرطانی با کاهش میزان پرولیفراسیون آن‌ها و هم‌چنین کاهش تکثیر آن‌ها همراه بوده است. جهت بررسی این‌که آیا مهار مسیر PI3K توسط Buparlisib نیز می‌تواند از میزان تکثیر سلول‌های Nalm-6 بکاهد؛ شمار سلول‌های زنده پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های تعیین شده از مهارکننده مورد ارزیابی قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، در حالی که تعداد سلول‌های کنترل بعد از گذشت ۳۶ ساعت تقریباً ۳ برابر شده است و از  $5 \times 10^5$  سلول اولیه به  $15 \times 10^5$  سلول رسیده است؛ در همین زمان، تعداد سلول‌های Nalm-6 تیمار شده با غلظت ۴ میکرومولار Buparlisib، تنها به  $6/3 \times 10^5$  سلول رسیده است. این روند کاهشی با افزایش زمان تیمار سلول‌ها با مهارکننده PI3K محسوس‌تر نیز می‌شود. چنان‌چه، پس از گذشت ۴۸ ساعت از کشت سلول‌ها، تعداد سلول‌های Nalm-6 در گروه کنترل به ماکزیمم تعداد خود و حدوداً به  $25 \times 10^5$  سلول رسیده است. با این وجود تیمار سلول‌ها با بیش‌ترین غلظت‌های دارو (۳ و ۴ میکرومولار) به ترتیب شمارش سلول‌ها به  $15/2 \times 10^5$  و  $11/9 \times 10^5$  می‌رسد که دال بر اثر آنتی‌پرولیفراتیو داروی Buparlisib در سلول‌های Nalm-6 می‌باشد (شکل ۲).





شکل ۳. تاثیر Buparlisib بر روی نحوه توزیع سلول‌های Nalm-6 در مراحل مختلف چرخه سلولی. نتایج فلوسایتومتری بررسی نحوه توزیع سلول‌های تیمار شده با مهارکننده در مراحل مختلف چرخه سلولی نشان داد که داروی Buparlisib باعث افزایش سلول‌ها در فاز G<sub>1</sub> از چرخه سلولی می‌گردد و همچنین به علت خواص آنتی-پرولیفراتیوی خود، جمعیت سلول‌ها را نیز در مرحله S کاهش می‌دهد. همچنین مواجه کردن سلول‌های لوسمی با این مهارکننده منجر به افزایش درصد جمعیت سلول‌ها در مرحله Sub-G<sub>1</sub> نیز می‌شود که این امر نمایانگر اثر سایتوتوکسیک و القاء مرگ سلولی در این رده سلولی می‌باشد.

نشان می‌دهند که این فاکتور رونویسی پس از فعال شدن در سلول‌های سرطانی از طریق بسیاری از مسیرهای انتقال پیام از جمله PI3K/Akt، باعث مهار بیان ژن‌های تنظیم‌کننده چرخه سلولی نظیر p21 و p27 می‌شود و به این ترتیب شرایط را برای پرولیفراسیون سلول سرطانی فراهم می‌آورد [۲۱]. نتایج به دست آمده از بررسی میزان فعالیت رونویسی ژن c-Myc در سلول‌های Nalm-6 پس از تیمار ۳۶ ساعته با غلظت‌های ۲ و ۴ میکرومولار از داروی Buparlisib نشان می‌دهد که میزان بیان mRNA این ژن تحت تاثیر دارو تا حدودی کاهش می‌یابد. همان‌طور که در شکل ۵ نشان داده شده است، با وجود این‌که غلظت ۲ میکرومولار از داروی Buparlisib تقریباً تاثیری بر روی میزان بیان ژن c-Myc نمی‌گذارد؛ تیمار سلول‌ها با غلظت بالاتر (۴ میکرومولار) از مهارکننده PI3K میزان بیان این انکوژن را حدوداً ۷٪ به میزان ۰/۷ کاهش می‌دهد. در کل، نتایج به دست آمده از بررسی‌های صورت گرفته بر روی این ژن و تاثیری که Buparlisib در کاهش بیان آن گذاشته است، می‌تواند مهر تاییدی بر اثر آنتی-پرولیفراتیو دارو باشد.

### بررسی اثر Buparlisib در بیان ژن‌های تنظیم‌کننده چرخه

#### سلولی، p21 و p27

p21 و p27 دو پروتئین مهم در تنظیم چرخه سلولی، با اتصال به سایکلین‌های چرخه سلولی و جلوگیری از عملکرد آن‌ها از پیشرفت چرخه سلولی و به خصوص از انتقال سلول‌ها از مرحله G<sub>1</sub> به S جلوگیری می‌نمایند. بر همین اساس، به منظور بررسی نقش ژن‌های p21 و p27 در نحوه توزیع سلول‌های Nalm-6 در چرخه سلولی، میزان بیان mRNA ژن‌های نام‌برده پس از تیمار با دو غلظت داروی Buparlisib (۲ و ۴ میکرومولار) توسط Rq-PCR مورد بررسی و آنالیز قرار گرفت. همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود و منطبق با نتایج به دست آمده از آنالیز چرخه سلولی، در اثر تیمار سلول‌های Nalm-6 با غلظت‌های ۲ و ۴ میکرومولار از داروی Buparlisib میزان بیان mRNA هر دو ژن تنظیم‌کننده مرحله G<sub>1</sub> چرخه سلولی، افزایش پیدا کرده است. جالب توجه است که تیمار این سلول‌ها با غلظت ۴ میکرومولار از دارو باعث شده است که میزان بیان ژن p21 و p27 به ترتیب ۴/۵ و ۶/۵ برابر افزایش یابد.

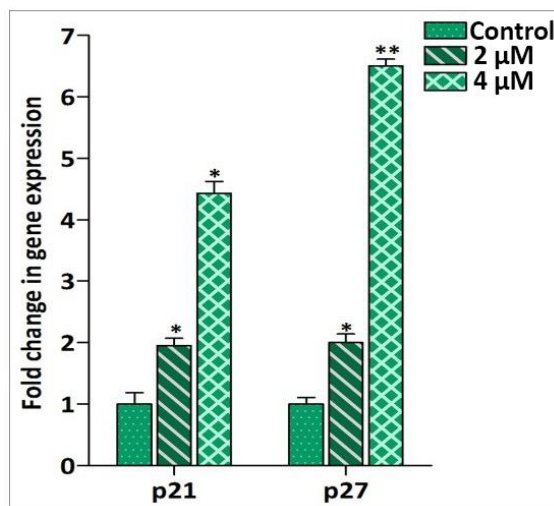
#### بررسی اثر Buparlisib در بیان ژن c-Myc در سلول‌های

#### Nalm-6

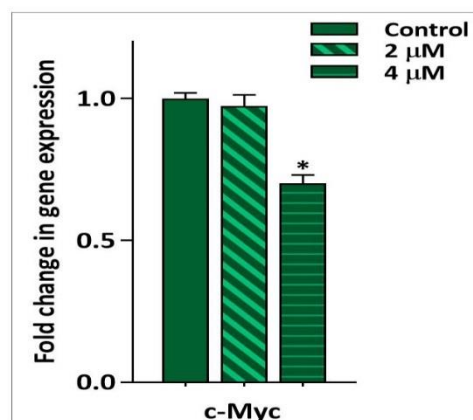
یکی از شناخته شده‌ترین پروتئین‌کوژنی که در تنظیم چرخه سلولی و از همه مهم‌تر بیان ژن‌های مهارکننده سایکلین‌ها نقش دارد، c-Myc می‌باشد. مطالعات صورت گرفته بر روی c-Myc

داروهای هدفمند و در بین مهارکنندگانی که تاکنون علیه مسیر PI3K طراحی شده‌اند، آن دسته از عواملی که قادر به مهار کردن تمام ایزوفرم‌های PI3K هستند، به دلیل خواص ضدسرطانی و از همه مهم‌تر ضدتکثیری مطلوب از ارزش بالایی برخوردار هستند. در این میان، داروی Buparlisib که یک مشتق خوراکی ۲ و ۶ دی‌مورفلینو پیریمیدین است؛ با برهمکنش با جایگاه اتصال ATP بر روی لیبیدکیناز PI3K، تمامی ایزوفرم‌های آن را مهار می‌نماید و بدین ترتیب از فعال شدن مسیر PI3K/Akt جلوگیری می‌نماید [۱۱]. اثر سایتوتوکسیک این مهارکننده PI3K در بسیاری از تومورهای انسانی با منشاء هیستولوژیک مختلف از جمله گلیوبلاستوما، سرطان ریه و سینه مورد مطالعه قرار گرفته است [۱۵-۱۷]. با این وجود تاثیر آنتی‌پرولیفراتیوی این دارو تاکنون در بدخیمی‌های هماتولوژیک نظیر انواع لوسمی‌های حاد بررسی نشده است. بر همین اساس، هدف از این مطالعه، بررسی اثر آنتی‌پرولیفراتیو داروی Buparlisib در سلول‌های مشتق شده از لوسمی لنفوبلاستیک حاد، Nalm-6 می‌باشد که یافته‌های پیشین نشان داده‌اند این رده سلولی از نظر فعالیت مسیر PI3K/Akt به علت فسفسریلاسیون غیرطبیعی پروتئین Akt، فعال می‌باشد [۲۳].

نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهند که تیمار سلول‌های Nalm-6 با غلظت‌های افزایش‌دهنده مهارکننده PI3K نه تنها منجر به کاهش درصد زنده‌مانی و بقاء سلول‌های Nalm-6 و جمعیت سلول‌ها را در مرحله Sub-G1 (مرحله مربوط به سلول‌های نکروز شده) می‌گردد؛ بلکه قادر است به صورت کاملاً معناداری با کاهش تعداد سلول‌های زنده، از تکثیر سلول‌های بدخیم نیز جلوگیری نماید. به عبارت دیگر، نتایج به دست آمده بیانگر آن است که این دارو علی‌رغم خواص سایتوتوکسیک، دارای اثر آنتی‌پرولیفراتیو نیز می‌باشد، به طوری که نیمی از سلول‌های Nalm-6 در اثر تیمار با غلظت ۳ میکرومولار از این مهارکننده طی ۴۸ ساعت از بین می‌روند. 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 [۲۴] و در این مطالعه نیز به خوبی نشان داده شد که اثر سایتوتوکسیک این مهارکننده در رنج قابل قبول قرار دارد و ما جهت بررسی تاثیر دارو در رده سلولی Nalm-6 غلظت مصرفی را از محدوده مورد تأیید بالاتر نبرده‌ایم. مطابق با یافته‌های این مطالعه، Kim و همکارانش نیز نشان داده‌اند که مهار مسیر PI3K/Akt توسط یک مهارکننده دوگانه PI3K و



شکل ۴. میزان بیان ژن‌های p21 و p27 در سلول‌های Nalm-6 پس از تیمار با Buparlisib. تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۲ و ۴ میکرومولار از Buparlisib باعث افزایش بیان mRNA ژن‌های p21 و p27 می‌گردد. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean ± SD) محاسبه و P value به دست آمده (\*، بیانگر  $P < 0.05$  و \*\*، بیانگر  $P < 0.01$ ) نشان‌گر معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.



شکل ۵. بررسی میزان بیان ژن c-Myc در سلول‌های Nalm-6 پس از تیمار با Buparlisib. نتایج حاصل از Rq-PCR نشان می‌دهد که متعاقب تیمار سلول‌های Nalm-6 با غلظت‌های ۲ و ۴ میکرومولار مهارکننده میزان بیان ژن c-Myc کاهش می‌یابد. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean ± SD) محاسبه و P value به دست آمده (\*، بیانگر  $P < 0.05$ ) نشان‌گر معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

## بحث و نتیجه‌گیری

اهمیت مسیر PI3K/Akt در بدخیمی‌های هماتولوژیک از جمله انواع لوسمی، لنفوم و مالتیپل میلوما با توجه به نقش مهم و تنظیمی آن در پاتوژنز و بروز مقاومت نسبت به داروهای شیمی‌درمانی بیش‌تر از پیش شده است [۳، ۵، ۶]. شواهد بسیاری ثابت نموده‌اند که فعالیت نابه‌جای مسیر PI3K/Akt در لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) یک مرحله ضروری برای شروع و حفظ لکومورنز است و درک صحیح از این مسیر پیام‌رسانی می‌تواند دورنمای درمان این لوسمی شایع دوران کودکی را به صورت تاثیرگذاری تغییر دهد [۲۲]. در عرصه

لنفوبلاستیک حاد پیشنهاد شود. هر چند که بررسی‌های آزمایشگاهی و کارآزمایی‌های بالینی بعدی نیز باید کارایی و سلامت این دارو را مشخص نمایند و مکانیسم عمل مشخص این دارو در القاء اثرات سایتوتوکسیک را به درستی مشخص نمایند.

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله از دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به جهت حمایت از این طرح قدردانی می‌شود.

## منابع

- [1] Robak T. Acute lymphoblastic leukaemia in elderly patients. *Drugs Aging* 2004; 21: 779-791.
- [2] Hoelzer D, Gökbuget N, Ottmann O, Pui C, Relling M, Appelbaum F, et al. Acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2002; 162-192.
- [3] Barrett D, Brown VI, Grupp SA, Teachey DT. Targeting the PI3K/AKT/mTOR signaling axis in children with hematologic malignancies. *Pediatr Drugs* 2012; 14: 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: 1064-1079.
- [5] Bressanin D, Evangelisti C, Ricci F, Tabellini G, Chiarini F, Tazzari PL, et al. Harnessing the PI3K/Akt/mTOR pathway in T-cell acute lymphoblastic leukemia: eliminating activity by targeting at different levels. *Oncotarget* 2012; 3: 811-823.
- [6] Martelli AM, Evangelisti C, Chiarini F, McCubrey JA. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR signaling network as a therapeutic target in acute myelogenous leukemia patients. *Oncotarget* 2010; 1: 89.
- [7] Burris HA. Overcoming acquired resistance to anticancer therapy: focus on the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013; 71: 829-842.
- [8] Huang C-H, Mandelker D, Schmidt-Kittler O, Samuels Y, Velculescu VE, Kinzler KW, et al. The structure of a human p110 $\alpha$ /p85 $\alpha$  complex elucidates the effects of oncogenic PI3K $\alpha$  mutations. *Science* 2007; 318: 1744-1748.
- [9] Zhao L, Vogt PK. Helical domain and kinase domain mutations in p110 $\alpha$  of phosphatidylinositol 3-kinase induce gain of function by different mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 2652-2657.
- [10] Kok K, Geering B, Vanhaesebroeck B. Regulation of phosphoinositide 3-kinase expression in health and disease. *Trends Biochem Sci* 2009; 34: 115-127.
- [11] 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 Ther* 2012; 11: 317-328.
- [12] Engelman JA. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 550-562.
- [13] Brachmann SM, Kleylein-Sohn J, Gaulis S, Kauffmann A, Blommers MJ, Kazic-Legueux M, et al. Characterization of the mechanism of action of the pan class I PI3K inhibitor NVP-BKM120 across a broad range of concentrations. *Mol Cancer Ther* 2012; 11: 1747-1757.
- [14] Burger MT, Pecchi S, Wagman A, Ni ZJ, Knapp M, Hendrickson T, et al. Identification of NVP-BKM120 as a potent, selective, orally bioavailable class I PI3 kinase inhibitor for treating cancer. *ACS Med Chem Lett* 2011; 2: 774-779.
- [15] Shih KC, Acs P, Burris HA, Hart LL, Kosloff RA, Lamar RE, et al. Phase I study of the combination of BKM120 and bevacizumab in patients with relapsed/refractory glioblastoma multiforme (GBM) or other refractory solid tumors. *J Clin Oncol* 2018.
- [16] Mayer IA, Abramson VG, Balko JM, Isakoff SJ, Kuba MG, Sanders M, et al. SU2C phase Ib study of pan-PI3K inhibitor

mTORC نیز می‌تواند منجر به مهار پرولیفراسیون سلول‌های لنفوم منتل سل شود [۲۵].

پژوهش‌های صورت گرفته در عرصه مکانیسم عمل داروها و عوامل ضدسرطانی به صراحت اعلام نموده‌اند که اثرات کشندگی داروها بر روی سلول‌های سرطانی یا از طریق فعال شدن مسیرهای آپوپتوتیک و یا با واسطه اثرگذاری بر روی ژن‌های دخیل در فرآیند تکثیر و جلوگیری از پیشرفت چرخه سلولی اعمال می‌گردد [۲۰]. نتایج بعدی این مطالعه نیز مشخص نمودند که اثر آنتی‌پرولیفراتیو این دارو در سلول Nalm-6 تا حدودی از طریق مهار چرخه سلولی در مرحله G1، کاهش درصد سلول‌های مرحله S و افزایش بیان mRNA p21 و p27 صورت می‌گیرد. p27 و p21، دو ژن درگیر در مهار چرخه سلولی در مرحله G1، توسط مسیرهای وابسته به p53 فعال می‌شوند و با تجمع سلول‌ها در مرحله G1 از چرخه سلولی، باعث القاء مرگ سلولی می‌شوند [۲۷،۲۶]. از دیگر ژن‌هایی که در تنظیم چرخه سلولی نقش مهمی را ایفا می‌نماید، فاکتور رونویسی c-Myc می‌باشد که توسط بسیاری از مسیرهای انتقال پیام و از همه مهم‌تر مسیر PI3K/Akt فعال می‌شود و با مهار ژن‌های p21 و p27 باعث پیشرفت چرخه سلولی در سلول‌های سرطانی می‌گردد [۲۱]. در راستا با نتایج به دست آمده از بررسی میزان بیان ژن‌های p21 و p27 در سلول‌های Nalm-6 پس از تیمار با Buparlisib، مشخص شد که مهار مسیر PI3K در این رده سلولی با کاهش بیان c-Myc نیز همراه بوده است. بنابراین یکی از تفسیرهایی که می‌توان از نتایج به دست آمده انجام داد این است که داروی Buparlisib اثرات آنتی‌پرولیفراتیو خود را از طریق مهار چرخه سلولی در مرحله G1 و آن هم با واسطه مهار ژن c-Myc و افزایش بیان ژن‌های p21 و p27 اعمال می‌نماید. مشابهاً، آزمایشات صورت گرفته بر روی چندین رده سلولی سلول‌های میلومایی نیز نشان می‌دهند که مهارکننده تمام ایزوفرمی PI3K، Buparlisib قادر به مهار چرخه سلولی در مرحله G1 و کاهش درصد سلول‌ها در مرحله S نیز می‌باشد [۲۸].

در مجموع، این مطالعه اثرات سایتوتوکسیک و آنتی‌پرولیفراتیو Buparlisib را به صورت وابسته به غلظت و زمان در سلول‌های Nalm-6 نشان داد. هم‌چنین نتایج به دست آمده از این مطالعه مشخص می‌کنند که احتمالاً توقف چرخه سلولی در مرحله G1، کاهش بیان ژن c-Myc و افزایش بیان ژن‌های p21 و p27 نقش بسزایی در جلوگیری از تکثیر و پرولیفراسیون سلول‌های Nalm-6 دارد. بنابراین گمان می‌رود که این مهارگر PI3K می‌تواند به عنوان یک داروی مناسب برای درمان بدخیمی‌های هماتولوژیک علی‌الخصوص لوسمی



network for treatment of leukemia. *Cell Mol Life Sci* 2015; 72: 2337-2347.

[23] Bayati S, Bashash D, Ahmadian S, Safaroghli-Azar A, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A, et al. Inhibition of tachykinin NK 1 receptor using aprepitant induces apoptotic cell death and G1 arrest through Akt/p53 axis in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells. *Eur J Pharmacol* 2016; 791: 274-283.

[24] 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: 1196-1206.

[25] Kim A, Park S, Lee JE, Jang WS, Lee SJ, Kang HJ, et al. The dual PI3K and mTOR inhibitor NVP-BEZ235 exhibits anti-proliferative activity and overcomes bortezomib resistance in mantle cell lymphoma cells. *Leukemia Res* 2012; 36: 912-920.

[26] Macleod KF, Sherry N, Hannon G, Beach D, Tokino T, Kinzler K, et al. p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev* 1995; 9: 935-944.

[27] Toyoshima H, Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 1994; 78: 67-74.

[28] Zheng Y, Yang J, Qian J, Zhang L, Lu Y, Li H, et al. Novel phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor NVP-BKM120 induces apoptosis in myeloma cells and shows synergistic anti-myeloma activity with dexamethasone. *J Mol Med* 2012; 90: 695-706.

BKM120 with letrozole in ER+/HER2-metastatic breast cancer (MBC). *J Clin Oncol* 2012.

[17] Tan DS-W, Lim KH, Tai WM, Ahmad A, Pan S, Ng QS, et al. A phase Ib safety and tolerability study of a pan class I PI3K inhibitor buparlisib (BKM120) and gefitinib (gef) in EGFR TKI-resistant NSCLC. *J Clin Oncol* 2013.

[18] 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: 1739-1747.

[19] Bashash D, Delshad M, Safaroghli-Azar A, Safa M, Momeny M, Ghaffari SH. Novel pan PI3K inhibitor-induced apoptosis in APL cells correlates with suppression of telomerase: An emerging mechanism of action of BKM120. *Int J Biochem Cell Biol* 2017; 91: 1-8.

[20] Safa M, Tavasoli B, Manafi R, Kiani F, Kashiri M, Ebrahimi S, et al. Indole-3-carbinol suppresses NF-κB activity and stimulates the p53 pathway in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells. *Tumour Biol* 2015; 36: 3919-3930.

[21] Mitchell KO, El-Deiry WS. Overexpression of c-Myc inhibits p21WAF1/CIP1 expression and induces S-phase entry in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-sensitive human cancer cells. *Cell Growth Differ* 1999; 10: 223-230.

[22] Bertacchini J, Heidari N, Mediani L, Capitani S, Shahjahani M, Ahmadzadeh A, et al. Targeting PI3K/AKT/mTOR

## Induction of p21- and p27-mediated cell cycle arrest in Nalm-6 cells using pan-PI3K inhibitor (Buparlisib)

Ava Safaroghli-Azar (M.Sc), Mohammadreza Sadri (M.Sc), Davood Bashash (Ph.D)\*

Department of Hematology and Blood Banking, School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

\* Corresponding author. +98 2122717504 d.bashash@sbmu.ac.ir

Received: 8 Nov 2017; Accepted: 11 Mar 2018

**Introduction:** In the era of targeted therapies, efforts are being made to identify the novel agents with strong anti-tumor activity in order to improve cure rates of human malignancies while reducing the toxic side effects of intensive regimens. Increasing number of genetic and cancer biology studies indicated a prominent role for the aberrant activation of PI3K/Akt pathway in not only the pathogenesis of acute lymphoblastic leukemia (ALL), but also in acquisition of chemo-resistant phenotype. In this study we aimed to assess the anti-proliferative effect of pan class I PI3K inhibitor, Buparlisib, on Nalm-6 cells.

**Materials and Methods:** To evaluate whether inhibition of PI3K using Buparlisib could exert anti-proliferative effect in leukemic cells, Nalm-6 were subjected to different concentrations of the inhibitor and subsequent cell viability, cell count, cell cycle progression and transcriptional alteration of cell cycle-related genes were investigated.

**Results:** Buparlisib not only decreased the number of viable inhibitor-treated cells in a concentration and time-dependent manner, but also reduced the survival rate of Nalm-6 cells. Furthermore, we found that the anti-proliferative effect of this inhibitor is mediated, at least partially, through induction of G1 arrest as a result of up-regulated p21 and p27 and down-regulated c.Myc expression level.

**Conclusion:** The present study showed that Buparlisib decreased the proliferative capacity of Nalm-6 cells probably via reduction in DNA synthesise rate, induction of cell cycle arrest and alteration in the expression level of proliferative-related genes. The results suggest that PI3K inhibitors may be used as a promising therapeutic strategy for the treatment of ALL patients.

**Keywords:** Cell cycle, Acute Lymphoblastic Leukemia, PI3K Pathway, Buparlisib, Nalm-6.