[DOI: 10.22102/22.6.21]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:31 +0430 on Sunday April 15th 2018

Apoptotic effect of Kyprolis on multiple myeloma KMM-1 cells through p73-mediated induction of G1 cell cycle arrest

Kazemi A., MSc[1], Sadri M.R., MSc[1], Safaroghli-Azar A., MSc[1], Pourbagheri-Sigaroodi A., MSc[2], Allahbakhshian-Farsani M., PhD[3], Vazifeh Shiran N., PhD[3], Bashash D., PhD[4]

1. Master in Hematology and Blood Banking, Department of Hematology and Blood banking, School of Allied Medicine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2. Master in Biotechnology, Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Pharmaceutical Science Branch, Islamic Azad University (IAUPS), Tehran, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Hematology and Blood banking, School of Allied Medicine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4. Assistant Professor, Department of Hematology and Blood banking, School of Allied Medicine Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran (Corresponding Author), Tel:+98-21-22721150, d.bashash@sbmu.ac.ir

Archive of SID

ABSTRACT

Background and Aim: Since proteasome is strongly considered to be involved in the development and progression of a wide variety of hematological malignancies in particular, multiple myeloma, blockage of this hemostasis system with different types of proteasome inhibitors seems to be a promising way of treatment for multiple myeloma. In this study, we investigated the effect of Kyprolis, a new irreversible proteasome inhibitor (PI), on the survival rate of multiple myeloma -derived KMM-1 cell line.

Material and Methods: To evaluate whether inhibition of proteasome using Kyprolis could exert cytotoxic effect in multiple myeloma, KMM-1 cells were cultured with different concentrations (25-150 nM) of the inhibitor for 24 and 48 hours. Then trypan blue exclusion assay, MTT assay, flocytometric cell cycle analysis were performed and we evaluated gene expression changes associated with apoptosis.

Results: The results of this study demonstrated that Kyprolis induced both cytotoxic and anti-proliferative effects on KMM-1 cells. This inhibitor is able to reduce the cell survival and metabolic activity in a dose- and also time-dependent manner ($p \leq 0.001$). Moreover, we found that Kyprolis increased cell population in G1 phase of cell cycle to 52.33% probably through up-regulation of p73 gene expression ($p \leq 0.05$). Exposing multiple myeloma cells to this proteasome inhibitor also led to induction of apoptosis probably through alterations in the gene expression of pro- and anti-apoptotic related genes ($p \leq 0.05$).

Conclusions: The results of this study clearly indicated that Kyprolis had anti-tumor activity against KMM-1 cells.

Key words: Kyprolis, Multiple Myeloma, Apoptosis, Proteasome inhibitor, KMM-1 cell line, Cell cycle.

Received: May 3, 2017 **Accepted:** Jul 1, 2017

www.SID.ir

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و دوم / بهمن و اسفند ۱۳۹۶/۳۰-۲۱

[DOI: 10.22102/22.6.21]

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:31 +0430 on Sunday April 15th 2018

اثر آپوپتوتیک کیپرولیس بر رده سلولی مالتیپل میلوما KMM-1 از طریق القاء توقف چرخه سلولی در G_1 وابسته به افزایش p73

علیرضا کاظمی[۱]، محمدرضا صدری[۱]، آوا صفراوغلی آذر[۱]، عطیه پورباقری سیگارودی[۲]، مهدی اله‌بخشیان فارسانی[۳]، نادر وظیفه شیران[۳]، داود بشاش[۴]

۱. کارشناسی ارشد خون‌شناسی و بانک خون، گروه خون‌شناسی و بانک‌خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲. کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳. استادیار، گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۴. استادیار، گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران (مولف مسوول)، تلفن ثابت:۲۲۷۲۱۱۵۰-۰۲۱،
d.bashash@sbmu.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به نقش مهمی که پروتئازوم در پرولیفراسیون و بقاء بسیاری از بدخیمی‌های خونی، بویژه مالتیپل‌میلوما، ایفا می‌کند؛ به نظر می‌رسد که سرکوب این سیستم به‌وسیله انواع مختلف مهارگرهای پروتئازوم، بتواند به‌عنوان راهکار درمانی مناسب به‌عنوان درمان‌های جدید در مالتیپل‌میلوما مطرح شود. هدف از این مطالعه، بررسی تاثیر داروی جدید و مهارگر برگشت-ناپذیر پروتئازوم، کیپرولیس، بر میزان زنده‌مانی سلول‌های KMM-1 (رده سلولی مالتیپل‌میلوما) می‌باشد.

روش‌ها بررسی: در این مطالعه به‌منظور بررسی اثر کیپرولیس، سلول‌ها در حضور غلظت‌های مختلف دارو (۱۵۰-۲۵ نانومولار) به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت کشت داده شدند و متعاقباً آزمون‌های Trypan blue exclusion assay، MTT assay، Flocytometric cell cycle analysis و اندازه‌گیری تغییرات بیان ژن‌های هدف مرتبط با آپوپتوز برای آن‌ها انجام پذیرفت.

یافته ها: نتایج نشان دادند که کیپرولیس دارای هر دو اثر کشندگی و آنتی‌پرولیفراتیوی بر رده KMM-1 می‌باشد. این دارو قادر است تا به صورت وابسته به دوز و زمان از میزان فعالیت متابولیک سلولی بکاهد ($P<۰/۰۰۱$) و بدین ترتیب میزان زنده‌مانی سلول-های KMM-1 را کاهش دهد ($P<۰/۰۰۱$). به‌علاوه، کیپرولیس از طریق افزایش بیان ژن p73 ($P<۰/۰۵$) منجر به افزایش شمار جمعیت سلول‌ها در فاز G1 از چرخه سلولی به میزان ۵۲/۳۳٪ گردید. از طرف دیگر مواجه سلول‌های میلومایی با مهارگر پروتئازوم منجر به القاء آپوپتوز گردید که ممکن است ناشی از تغییر بیان برخی از ژن‌های پرو و آنتی‌آپوپتوتیک باشد ($P<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه به طرز آشکاری نشان می‌دهد که کیپرولیس دارای فعالیت ضدتوموری در سلول‌های KMM-1 می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: کیپرولیس، مالتیپل‌میلوما، آپوپتوز، مهارگرپروتئازوم، رده سلولی KMM-1، چرخه‌سلولی

وصول مقاله:۹۶/۲/۱۳ اصلاحیه نهایی:۹۶/۳/۳۱ پذیرش:۹۶/۴/۱۰

Archive of SID

www.SID.ir

[DOI: 10.22102/22.6.21]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:31 +0430 on Sunday April 15th 2018

مقدمه

مالتیپل‌میلوما یک تومور بدخیم مربوط به سلول‌های B است که با پرولیفراسیون پلاسماسل‌ها (به بالای ۱۰٪) در مغزاستخوان شناخته می‌شود (۱). این بدخیمی که جزء دیسکرازی‌های پلاسماسل می‌باشد، حدود ۱۰ درصد از موارد مرگ و میر ناشی از بدخیمی‌های هماتولوژیک و ۲ درصد از مرگ و میرهای ناشی از همه انواع بدخیمی را شامل می‌شود (۲). برای درمان افراد مبتلا به این بیماری استفاده از داروهای شیمی‌درمانی و یا استروئیدها به‌صورت ترکیبی با عوامل دارویی جدید مانند مهارگرهای پروتئازوم و داروهای تعدیل‌کننده ایمنی مرسوم است (۴و ۳). بااینحال علی‌رغم بهبود و پیشرفت داروهای شیمی‌درمانی و معرفی داروهای جدید برای درمان این دسته از بیماران، مالتیپل-میلوما همچنان به عنوان یک بیماری غیرقابل درمان تلقی می‌شود. بنابراین، توسعه داروهای شیمی‌درمانی موثرتر و داروهای جدیدتر به منظور بهبود روند درمانی این افراد تلاش‌های بیشتری را نیازمند است.

مطالعاتی که به تازگی روی مکانیسم‌های مولکولی دخیل در پاتوژنز مالتیپل میلوما صورت گرفته است، درگیری و ناهنجاری طیف وسیعی از مولکول‌ها و پروتئین‌های داخل سلولی را در این بدخیمی شناسایی نموده است که هریک با افزایش بقاء و تحریک پرولیفراسیون سلولی، پیشرفت بیماری و پاسخ ضعیف به داروهای شیمی‌درمانی را برای بیماران به ارمغان می‌آورد. در بین پروتئین‌های متعدد شناسایی شده، NF-ƙB و مسیرهای انتقال پیام وابسته به آن به دلیل نقش گسترده‌ای که در تنظیم بسیاری از پروسه‌های درون سلولی از جمله بقاء سلولی، پرولیفراسیون، رگ‌زایی، تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با انواع سایتوکاین‌های التهابی، کموکاین‌ها و برخی از مولکول‌های چسبندگی ایفا می‌کنند؛ بسیار مورد توجه قرار گرفته است (۵و۴). همچنین وجود مطالعات بیشماری که در آن به فعالیت نابه‌جای NF-ƙB در بسیاری از بدخیمی‌های هماتولوژیک از جمله مالتیپل میلوما اشاره شده، باعث شده است تا اهمیت این فاکتور رونویسی هسته‌ای در بیماری‌زایی این بیماری بیش از پیش برجسته شود (۶). از سوی دیگر، برخی دیگر از پژوهش-های صورت گرفته روی بیماران مبتلاء به مالتیپل میلوما نیز نشان می‌دهند که در کنار درگیری‌های مربوط به NF-ƙB، بروز اختلال در روند سیستم یوبیکوئیتین-پروتئازوم که یک سیستم نظارتی داخل سلول جهت تخریب پروتئین‌های آسیب‌دیده و پروتئین‌هایی که فولدینگ آنها به درستی صورت نپذیرفته است نیز به شدت با پاتوژنز مالتیپل میلوما در ارتباط می‌باشد. به همین علت در حال حاضر استفاده از بسیاری از مهارکنندگان پروتئازوم در درمان مالتیپل میلوما به شدت مورد توجه قرار گرفته است و در طی سال‌های اخیر پاره‌ای از این مهارکنندگان نظیر بورتزومیب و ایگزازومیب برای درمان این بدخیمی مورد تایید FDA قرار گرفته‌اند. نکته قابل توجه در خصوص این مهارکنندگان پروتئازوم، توانایی آن‌ها در بلوکه نمودن پروتئین NF-ƙB و پروتئین-های زیر دست آن می‌باشد (۷). به‌رغم تمامی مزایای داروهای مهارکننده پروتئازوم، بروز عوارض جانبی متعددی از جمله آسیب‌های عصبی- محیطی، تجویز این داروها را با محدودیت روبه‌رو کرده است و هنوز تلاش‌ها برای یافتن یک داروی مهارکننده پروتئازوم با اثر ضد سرطانی مطلوب و عوراض جانبی کم‌تر ادامه دارد.

در میان داروهای مهارگر پروتئازوم، کیپرولیس تنها دارویی است که می‌تواند با مهار برگشت‌پذیر پروتئازوم عوارض جانبی کم‌تری را برای بیماران ایجاد کند. از طرف دیگر اثرات آنتی‌توموری قدرمتند این دارو چه به صورت تک و چه در ترکیب با بسیاری از داروهای شیمی‌درمانی باعث شده است تا این مهارکننده به جایگاه ویژه‌ای برای مطالعات In vitro دست یابد (۸). با وجود آزمایشات متعدد و مشخص شدن اثر ضد تکثیری این دارو، هنوز به درستی مشخص نیست که این دارو از طریق چه مکانیسمی اثر آنتی‌پرولیفراتیو خود را در سلول‌های بدخیم اعمال می‌نماید. در این مطالعه تلاش شده است تا تاثیر داروی کیپرولیس را بر عوامل دخیل در مرگ برنامه ریزی شده سلولی مانند

Archive of SID
www.SID.ir

[DOI: 10.22102/22.6.21]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:31 +0430 on Sunday April 15th 2018

عوامل آپوپتوتیک و آنتی آپوپتوتیک مورد بررسی و ارزیابی قرار گیرد تا شناخت این مسیرها منجر به درک ما از عوامل دخیل در مکانیسم عمل این داروی مهارگر پروتئازوم شود.

روش بررسی

کشت سلولی و تیمار دارویی:

در این مطالعه تجربی، سلول‌های KMM-1 (رده‌ی سلولی مربوط به مالتیپل‌میلوما) در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۲ میلی‌مولار اِل-گلوتامین، ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، 100 U/ml پنی‌سیلین و 100 µg/ml استرپتومایسین، در اَنکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، 5% CO_2 و شرایط استاندارد، نگهداری شدند. به منظور تیمار سلول‌ها با دارو، در ابتدا داروی کیپرولیس (Selleckchem، آمریکا) بصورت پودر خریداری شده و آن را بصورت استوک‌های ۵ میلی‌مولاری در DMSO تهیه کرده و در 20^0C- ذخیره نمودیم، سپس سلول‌ها را در دوزهای مورد نیاز ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ نانومولار و در زمان‌های انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعت با دارو تیمار کردیم. در تمامی مطالعات انجام شده، گروه‌های تیمارشده با دارو با گروه‌های کنترل که هیچ دارویی دریافت نکرده بودند و همچنین سلوهای قرار گرفته در DMSO، 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 کیپرولیس بر میزان زنده‌مانی سلول‌ها، سلول‌های KMM-1 به تعداد cell/ml 1×10^5در حضور دوزهای مختلف دارو به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه شدند. سپس سلول‌های تیمار شده در زمان مقرر با نسبت ۱ به ۱ با رنگ حیاتی تریپان بلو ۰/۴ درصد مخلوط شده، به مدت ۱ الی ۲ دقیقه آن‌را انکوباسیون کرده و سپس در چاهک مربوط به لام هماسیتومتر قرار داده و در زیر میکروسکوپ شمارش می‌کنیم. سلول‌هایی که این رنگ را جذب می‌نمایند جزو سلول‌های مُرده 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:

میزان زنده‌مانی(٪) = تعداد سلول‌های زنده ÷ تعداد کل سلول‌ها × (۱۰۰)

بررسی میزان فعالیت متابولیک سلول‌ها:

به منظور ارزیابی اثر مهاری داروی کیپرولیس بر میزان فعالیت متابولیک سلول از آزمون MTT assay استفاده شد. به‌طورخلاصه، سلول‌ها در تراکم ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه قرار گرفتند و با داروی کیپرولیس برای مدت زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه شدند. سپس محلول MTT در غلظت 5mg/ml به هر چاهک افزوده شده و برای مدت زمان ۳ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. بعد از مدت زمان مذکور، پلیت مورد نظر سانتریفیوژ گردید (دور 3500 rpm برای مدت ۱۰ دقیقه) و سپس مایع رویی را خارج نموده به پلیت سلولی در هر چاهک ۱۰۰ لاندا DMSO افزودیم. پس از حل شدن کامل رسوب فورمازان در DMSO، میزان جذب نوری آن را در طول موج ۵۷۰ نانومتر (در مقابل طول موج رفرنس ۶۳۰ نانومتر) به وسیله‌ی الایزا ریدِر خواندیم.

بررسی میزان فعالیت چرخه سلولی:

به منظور شناسایی محتویات DNA سلولی و درصد سلول‌های آپوپتوزشده از رنگ‌آمیزی پروپیدیوم یداید (PI) استفاده کردیم. به‌طورخلاصه، سلول‌های KMM-1 با تراکم cell/well 1×10^6 در پلیت‌های ۶ خانه قرار گرفتند سپس با داروی کیپرولیس برای مدت زمان ۴۸ ساعت مواجه شدند. پس از انکوباسیون، سلول‌ها در دور 2000 rpm برای زمان ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و در ۵۰۰ لاندا PBS به‌صورت سوسپانسیون در آمدند. در مرحله‌ی بعد سلول‌ها در اتانل ۷۰٪ فیکس شده و در دمای 20^0c- بصورت Overnight قرار گرفتند. سپس 0.5 µg/ml از

www.SID.ir

[DOI: 10.22102/22.6.21]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:31 +0430 on Sunday April 15th 2018

محلول RNase در PBS افزوده شده و قبل از افزودن PI به مقدار 50µg/ml به آن در دمای 37^0c انکوبه نمودیم. در انتها، محتویات DNA سلولی بوسیله‌ی فلوسایتومتری مورد مطالعه قرار گرفت و آنالیز آن از طریق نمودارهای بدست آمده صورت پذیرفت.

استخراج RNA، سنتز cDNA و Real-time PCR:

Total-RNA پس از مدت زمان انکوباسیون ۴۸ ساعته سلول‌ها با دارو بوسیله‌ی کیت استخراج RNA (Roche) بر طبق پروتکل شرکت سازنده صورت پذیرفت. سپس به منظور بررسی میزان خلوص RNA استخراج شده نسبت جذب نوری ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر توسط دستگاه نانودراپ مورد ارزیابی قرار گرفت. در مرحله بعد به منظور ساخت cDNA، از کیت سنتز cDNA (revertAid first Takara Bio) برطبق پروتکل شرکت سازنده استفاده شد. بررسی میزان بیان ژن‌های مورد نظر با تکنیک Real-time PCR توسط دستگاه Light-cycler (Roche) مورد ارزیابی قرار گرفت. شرایط مربوط به سیکل‌های حرارتی شامل: مرحله فعال‌سازی (۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه‌سانتی‌گراد)، در مرحله‌ی بعد دِناتوراسیون (۵ ثانیه در ۹۵ درجه‌سانتی‌گراد) و آنیلینگ/اِکستنشن (۲۰ ثانیه در ۶۰ درجه‌سانتی‌گراد) به تعداد ۴۰ سیکل، می‌باشد. آنالیز منحنی ذوب نیز به منظور ارزیابی میزان اختصاصیت محصولات تولید شده صورت پذیرفت و در نهایت با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ میزان نسبی نسخه‌های mRNA بیان‌کننده ژن‌های مورد نظر محاسبه گردید. لیست پرایمرهای مورد استفاده در این بررسی در جدول ۱ خلاصه شده است.

جدول۱. توالی آغازگرهای مورد استفاده در آزمون Real-time PCR

ژن	آغازگر مستقیم (5'-3')	آغازگر معکوس (5'-3')	سایز (bp)
HPRT	TGGACAGGACTGAACGTCTTG	CCAGCAGGTCAGCAAAGAATTTA	۱۱۱
Bax	CGAGAGGTCTTTTTCCGAGTG	GTGGGCGTCCCAAAGTAGG	۲۴۲
Bcl_2	CGGTGGGGTCATGTGTGTG	CGGTTCAGGTACTCAGTCATCC	۹۰
p73	GTCAAGCCGGGGGAATAATGA	CTCAGCAGATTGAACTGGGC	۱۰۸
p21	CCTGTCACTGTCTTGTACCCT	GCGTTTGGAGTGGTAGAAATCT	۱۳۰
XIAP	ATAGTGCCACGCAGTCTACAA	AGATGGCCTGTCTAAGGCAAA	۱۰۱
Survivin	CCAGATGACGACCCCATAGAG	TTGTTGGTTTCCTTTGCAATTTT	۱۵۲

آنالیز آماری:

به منظور تحلیل داده‌های بدست آمده از نسخه‌ی ۲۳ نرم افزار SPSS استفاده گردید. تمامی تست‌های انجام شده به صورت سه‌تایی صورت پذیرفت. داده‌های ارائه شده حاصل mean±SD نتایج بدست آمده از ۳ آزمون جداگانه می‌باشند. میزان اختلاف معنادار بین داده‌های بدست آمده را به‌وسیله‌ی آزمون t (t-test) مورد ارزیابی قرار دادیم. میزان اختلاف معنادار داده‌های تحلیل شده به صورت *، بیانگر P<۰/۰۵ ، **، بیانگر P<۰/۰۱ و ***، بیانگر P<۰/۰۰۱ می‌باشد.

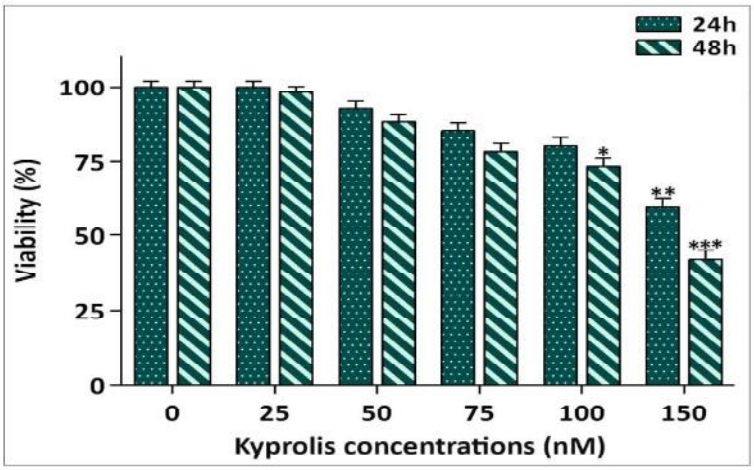
www.SID.ir
Archive of SID

[DOI: 10.22102/22.6.21]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:31 +0430 on Sunday April 15th 2018

یافته ها

کیپرولیس سبب کاهش میزان زنده‌مانی سلول‌های KMM-1 به‌صورت وابسته به دوز و زمان می‌شود

به منظور بررسی اینکه آیا تیمار سلول‌های KMM-1 با داروی کیپرولیس می‌تواند میزان بقاء سلولی را کاهش دهد؛ میزان زنده‌مانی سلول‌ها با آزمون تریپان بلو مورد سنجش و ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش دوز دارو و گذشت زمان، میزان جذب رنگ تریپان‌بلو در سلول‌های KMM-1 افزایش می‌یابد که در واقع نشان‌گر کاهش میزان زنده‌مانی سلول‌ها در مواجه با دارو است. نتایج بدست آمده مشخص کردند که علی‌رغم اینکه دوز ۲۵ نانومولار از کیپرولیس اثر چشمگیری بر میزان زنده‌مانی سلول‌های KMM-1 نمی‌گذارد؛ تیمار سلول‌ها با دوزهای بالاتر از این مهارکننده (۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۱۵۰ نانومولار) و در طی ۴۸ ساعت میزان زنده‌مانی سلول‌ها را به ترتیب به میزان ۱۲، ۲۲، ۲۷ و ۵۸ درصد کاهش می‌دهد. به طورکلی این نتیجه بیانگر تاثیر سایتوتوکسیک این دارو به صورت وابسته به دوز و زمان در سلول‌های رده‌ی KMM-1 می‌باشد (نمودار ۱).



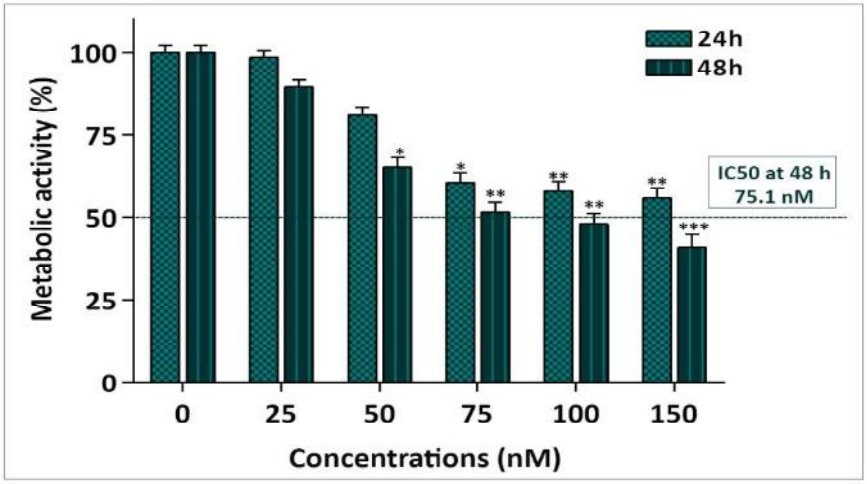
نمودار ۱. تاثیر داروی کیپرولیس بر میزان زنده‌مانی سلول‌های KMM-1. سلول‌ها با دوزهای مختلف کیپرولیس برای مدت زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند، سپس میزان زنده‌مانی سلول‌ها بوسیله‌ی آزمون تریپان بلو مورد ارزیابی قرار گرفت. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean ± SD) محاسبه و p value به دست آمده (*، بیانگر P<۰/۰۵ ، **، بیانگر P<۰/۰۱ و ***، بیانگر P<۰/۰۰۱) نشان‌گر معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

کیپرولیس فعالیت متابولیک سلول‌های KMM-1 را به‌صورت وابسته به دوز و زمان کاهش می‌دهد

نتایج بدست آمده نشان از آزمون MTT می‌دهند که مهارپروتئازوم توسط داروی کیپرولیس، منجر به کاهش وابسته به دوز و زمان فعالیت متابولیکی سلول‌های KMM-1 می‌گردد. تیمار سلول‌ها با بالاترین دوز دارو (۱۵۰ نانومولار) میزان فعالیت متابولیک را پس از گذشت ۲۴ ساعت تقریباً به میزان ۳۵٪ کاهش می‌دهد (نمودار ۲). به‌علاوه، این اثر مهاری با گذشت زمان بیش‌تر نیز می‌شود؛ به طوریکه پس از گذشت ۴۸ ساعت از تیمار سلول‌ها با دوز ۷۵ نانومولار این مهارکننده، فعالیت متابولیک سلول‌های KMM-1 بیش از ۵۰٪ کاهش می‌یابد (نمودار ۲).

www.SID.ir

[DOI: 10.22102/22.6.21]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:31 +0430 on Sunday April 15th 2018



نمودار۲. بررسی تاثیر داروی کیپرولیس بر فعالیت متابولیک سلولی رده‌ی سلولی KMM-1 به طور وابسته به دوز و زمان. سلول‌ها در محیط کامل حاوی دوزهای مختلف کیپرولیس برای مدت زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه شدند و سپس آزمون MTT برای آن‌ها انجام شد. میزان IC_{50} در مطالعه صورت پذیرفته حدود ۷۵،۱ نانومولار در طی ۴۸ ساعت تخمین زده می‌شود. 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 ***، بیانگر $p<0.001$) نشان‌گر معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

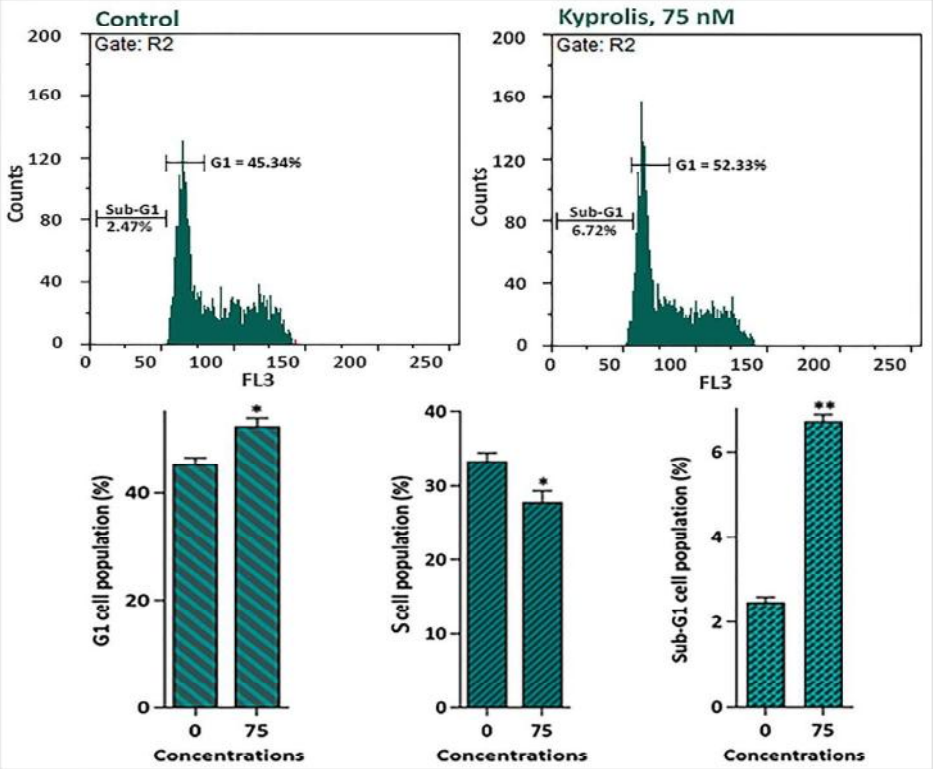
کیپرولیس سبب افزایش جمعیت سلول‌های KMM-1 در فاز G_1 چرخه‌سلولی می‌شود

در این مطالعه، کاهش میزان زنده‌مانی سلول‌های KMM-1 متعاقب تیمار با مهارکننده پروتئازوم به علت تغییر در نحوه توزیع سلول‌ها در چرخه سلولی توسط تکنیک فلوسایتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. تیمار سلول‌ها با کیپرولیس درصد سلول‌های فاز G_1 را از ۴۵/۳۴٪ در گروه کنترل به ۵۲/۳۳٪ در گروه تیمار شده با دوز ۷۵ نانومولار افزایش می‌دهد و به این ترتیب با القاء توقف چرخه سلولی در مرحله G_1، اثر ضد توموری خود را اعمال می‌نماید (نمودار ۳). همچنین، لازم به ذکر است که این دارو می‌تواند جمعیت سلول‌های مرحله S چرخه سلولی را نیز به صورت معناداری کاهش دهد که خود تائیدی بر خواص آنتی‌پرولیفراتیوی این مهارکننده در سلول‌های مشتق شده از مالیتپل‌میلوما می‌باشد (نمودار ۳). در ادامه، جهت بررسی تاثیر داروی کیپرولیس در القاء مرگ سلولی، جمعیت سلول‌های هیپودیپلوئیدی فاز $Sub\text{-}G_1$ نیز مورد بررسی قرار گرفت. جالب توجه است که مشابه با نتایج به دست آمده از بررسی فعالیت متابولیک و میزان بقاء سلولی، بررسی درصد سلول‌های فاز $Sub\text{-}G_1$ که موید سلول‌های آپوپتوز شده می‌باشند، نیز نشان می‌دهد که داروی کیپرولیس با افزایش معنادار و قابل توجه جمعیت سلول‌های این مرحله از چرخه سلولی، اثرات سایتوتوکسیک خود را اعمال می‌نماید.

Archive of SID

www.SID.ir

[DOI: 10.22102/22.6.21]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:31 +0430 on Sunday April 15th 2018



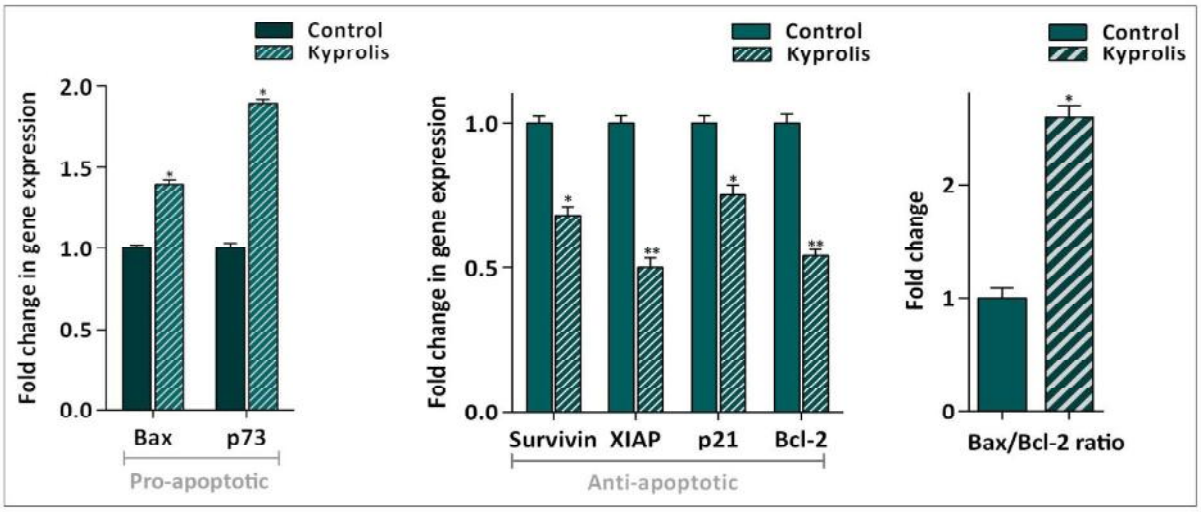
نمودار۳. تاثیر کیپرولیس روی نحوه توزیع سلول‌های KMM-1 در مراحل مختلف چرخه سلولی. نتایج فلوسایتومتری بررسی نحوه توزیع سلول‌های تیمار شده با مهارکننده در مراحل مختلف چرخه سلولی نشان داد که داروی کیپرولیس باعث افزایش سلول‌ها در فاز G_1 از چرخه سلولی می‌گردد و همچنین به علت خواص آنتی‌پرولیفراتیوی خود، جمعیت سلول‌ها را نیز در مرحله S کاهش می‌دهد. همچنین مواجه کردن سلول‌های میلومایی با این مهارکننده منجر به افزایش درصد جمعیت سلول‌ها در مرحله $Sub\text{-}G_1$ نیز می‌شود که این امر نمایان‌گر اثر سایتوتوکسیک و القاء مرگ سلولی در این رده سلولی می‌باشد. 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.

تیمار سلول‌های KMM-1 با کیپرولیس باعث افزایش بیان ژن‌های پروآپوپتوتیک و کاهش بیان ژن‌های آنتی-آپوپتوتیک می‌شود

در این مطالعه، به منظور بررسی اینکه آیا مرگ سلولی القاء شده توسط مهار پروتئازوم در رده سلولی KMM-1 با تغییر در فعالیت رونویسی ژن‌های مهم دخیل در آپوپتوز همراه می‌باشد؛ سطح بیان برخی از ژن‌های آنتی‌آپوپتوتیک (Bcl-2، p21، XIAP و Survivin) و پروآپوپتوتیک (p73 و Bax) بوسیله تکنیک Real-time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان می‌دهند که تیمار سلول‌های KMM-1 با داروی کیپرولیس با افزایش بیان p73 و Bax و کاهش بیان p21، Bcl-2، XIAP و Survivin همراه می‌باشد (نمودار ۴). به دلیل افزایش بیان ژن Bax و کاهش بیان Bcl-2، نسبت Bax/Bcl-2 در سلول‌های مواجه‌شده با دوز ۷۵ نانومولار نسبت به سلول-های کنترل با افزایش همراه بوده که این مسئله نیز با افزایش میزان آپوپتوز خود را نشان داده است (نمودار ۴).

www.SID.ir

[DOI: 10.22102/22.6.21]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:31 +0430 on Sunday April 15th 2018



نمودار ۴. افزایش میزان فعالیت رونویسی از ژن‌های پروآپوپتوتیک p73 و Bax و همچنین کاهش سطح mRNA ژن‌های آنتی‌آپوپتوتیک Bcl-2، p21، XIAP و Survivin در طی تیمار ۴۸ ساعته سلول‌های KMM-1 با دوز ۷۵ نانومولار کیپرولیس. سلول‌ها با دوز ۷۵ نانومولار کیپرولیس برای ۴۸ ساعت تیمار شدند و پس از استخراج RNA و سنتز cDNA به منظور بررسی بیان ژن‌های مورد نظر تحت آزمون Real-time PCR قرار گرفتند. 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.

بحث

نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان می‌دهند که علی‌رغم عدم وجود اثرات سایتوتوکسیک قابل توجه در دوزهای پایین و بازه‌ی زمانی کوتاه، با افزایش دوز و زمان مواجه سلول‌ها با دارو کیپرولیس، اثر کشندگی دارو به میزان چشمگیری افزایش می‌یابد. همچنین در این مطالعه ما دریافتیم که داروی کیپرولیس در دوز اپتیموم خود (۷۵ نانومولار) به طرز قابل توجهی با مهار فعالیت متابولیک سلول‌ها و همچنین وارد نمودن آن‌ها به مرحله $Sub\text{-}G_1$ از چرخه سلولی باعث فعال شدن مکانیسم‌های مرگ سلولی در این رده سلولی می‌شود و به این ترتیب میزان بقاء این سلول‌ها را کاهش می‌دهد. مشابه با نتایج به دست آمده، مطالعه‌ای که توسط دِبورا جِی کوهن و همکارانش صورت پذیرفت نیز مشخص کرده‌است که این مهارکننده پروتئازوم قادر است با تحریک مکانیسم‌های آپوپتوتیک در رده‌های سلولی مختلف مالتیپل میلوما همچون RPMI-8226، U266 و همچنین در سلول‌های مشتق شده از بیماران، درصد زنده‌مانی سلول‌ها را به‌صورت وابسته به دوز و زمان کاهش دهد (۹). لازم به ذکر است که بررسی‌های بیش‌تر چرخه سلولی در این مطالعه همچنین نشان داد که کیپرولیس با جلوگیری از پیشرفت چرخه سلولی از مرحله G_1 و ورود سلول‌ها به مرحله S نیز از تکثیر سلول‌های KMM-1 ممانعت به عمل آورده است. فاکتور رونویسی p73 که به عنوان یک جایگزین برای پروتئین p53 نیز در نظر گرفته می‌شود، می‌تواند با تاثیر گذاشتن روی بسیاری از مولکول-های کنترل‌کننده چرخه سلولی از جمله انواع سایکلین‌ها و پروتئین‌های مدیاتور، مراحل مختلف چرخه سلولی را تنظیم نماید (۱۰). بررسی که اخیراً روی سلول‌های مشتق شده از لوسمی لنفوبلاستیک حاد صورت گرفته است نشان داده که مهار مسیر PI3K/Akt توسط مهارکننده اختصاصی آن می‌تواند با افزایش بیان ژن p73 و متعاقب آن فعال کردن پاره‌ای از پروتئین‌های پایین دست، منجر به القاء توقف چرخه سلولی در مرحله G1 گردد (۱۱). مطابق با این پژوهش‌ها و القاء G1 arrest در سلول‌های KMM-1 متعاقب تیمار با کیپرولیس، نتایج ما نیز نشان داد که میزان فعالیت رونویسی ژن p73 در این رده سلولی افزایش یافته است و می‌توان احتمال داد که مهار پروتئازوم در سلول‌های

Archive of SID
www.SID.ir

[DOI: 10.22102/22.6.21]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:31 +0430 on Sunday April 15th 2018

میلومایی نیز می‌تواند با افزایش بیان فاکتور رونویسی p73 منجر به توقف چرخه سلولی در فاز G1 گردد و به این ترتیب این داروی قدرتمند اثرات سایتوتوکسیک خود را اعمال نماید.

شواهد متعددی نشان می‌دهند که در پاسخ فعال شدن مکانیسم‌های مرگ سلولی، تعادل بین دو پروتئین مهم درون سلولی p53 و NF-ƙB نقش بسیار مهمی را ایفا می‌نماید (۱۲). درحالیکه NF-ƙB با افزایش رونویسی و بیان ژن‌های آنتی‌آپوپتوتیک از فعال شدن آپوپتوز در سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌نماید؛ مولکول سرکوب‌گر تومور، p53 با فعال نمودن طیف وسیعی از ژن‌های پروآپوپتوتیک مرگ سلولی را در سلول‌های توموری فعال می‌کند (۱۴و۱۳). جالب توجه است که p73 می‌تواند به عنوان یک فاکتور رونویسی در هر دو مسیر وابسته به p53 و NF-ƙB ایفای عمل کند و میزان بیان ژن‌های مورد هدف هر یک از این دو پروتئین مهم درون سلولی را تنظیم نماید (۱۵). از سوی دیگر برخی دیگر از مطالعات نشان داده‌اند که مهار بیان ژن p21 توسط داروهای شیمی‌درمانی می‌تواند منجر به القاء آپوپتوز در رده‌های سلولی شود (۱۶). در این مطالعه نیز ما دریافتیم که افزایش فعالیت رونویسی ژن p73 متعاقب مهار پروتئازوم در سلول‌های KMM-1 می‌تواند روی بیان ژن-های مورد هدف p53 و NF-ƙB نیز تاثیرگذار باشد. نتایج به دست آمده نشان داد که این مهارکننده می‌تواند در عین حالی که بیان ژن پروآپوپتوتیک Bax را افزایش دهد؛ از رونویسی از روی ژن‌های آنتی‌آپوپتوتیک مورد هدف NF-ƙB همچون Bcl-2، p21، XIAP و Survivin بکاهد و به این ترتیب منجر به فعال شدن مکانیسم‌های آپوپتوتیک در سلول‌های مالتیپل میلومایی شود.

نتیجه‌گیری

در کل، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که مهارکننده برگشت‌پذیر پروتئازوم، کیپرولیس، احتمالاً با فعال نمودن فعالیت رونویسی p73 نه تنها می‌تواند از تکثیر سلول‌های میلومایی KMM-1 و پیشرفت چرخه سلولی در این رده جلوگیری نماید؛ بلکه با راه‌اندازی پروسه آپوپتوز و همچنین با تاثیرگذاری بر ژن‌های مورد هدف دو پروتئین مهم درون سلولی p53 و NF-ƙB می‌تواند از میزان بقاء و زنده‌مانی سلول‌های نیز بکاهد. با توجه به اثرات ضد سرطانی مطلوب و مهم‌تر از آن عوارض جانبی کم‌تر داروی کیپرولیس، امید می‌رود از این دارو در درمان بیماران مبتلاء به مالتیپل میلوما بهره برده شود؛ هرچند که هنوز مطالعات بیش‌تر در زمینه مکانیسم عمل این دارو و همچنین بررسی‌های بالینی در خصوص کم‌خطر بودن آن برای این دسته از بیماران مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به جهت تـامین بودجه طرح، قدردانی می شود.

Reference

1. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. N Engl J Med 2004;35:1860-73.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. CA Cancer J Clin 2009;59:225-49.
3. Dimopoulos MA, San-Miguel JF, Anderson KC. Emerging therapies for the treatment of relapsed or refractory multiple myeloma. Eur J Haematol 2011;86:1-15.
4. Herndon TM, Deisseroth A, Kaminskas E, Kane RC, Koti KM, Rothmann MD, et al. U.S. Food and drug administration approval: carfilzomib for the treatment of multiple myeloma. Clin Cancer Res 2013;19:4559-63.
5. May MJ, Ghosh S. Signal transduction through NF-kappa B. Immunol Today 1998;19:80-8.

Archive of SID
www.SID.ir

[DOI: 10.22102/22.6.21]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 11:31 +0430 on Sunday April 15th 2018

6. Demchenko YN, Glebov OK, Zingone A, Keats JJ, Bergsagel PL, Kuehl WM. Classical and/or alternative NF-κB pathway activation in multiple myeloma. Blood 2010;115:3541-52.
7. Kisselev AF, Van Der Linden WA, Overkleeft HS. Proteasome inhibitors: an expanding army attacking a unique target. Chem Biol 2012;19:99-115.
8. Fostier K, De Becker A, Schots R. Carfilzomib: a novel treatment in relapsed and refractory multiple myeloma. Onco Targets Ther 2012;5:237-44.
9. Kuhn DJ, Chen Q, Voorhees PM, Strader JS, Shenk KD, Sun CM, et al. Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. Blood 2007;110:3281-90.
10. Tomasini R, Seux M, Nowak J, Bontemps C, Carrier A, Dagorn J-C, et al. TP53INP1 is a novel p73 target gene that induces cell cycle arrest and cell death by modulating p73 transcriptional activity. Oncogene 2005;24:8093-104.
11. Bashash D, Safaroghli-Azar A, Delshad M, Bayati S, Nooshinfar E, Ghaffari SH. Inhibitor of pan class-I PI3K induces differentially apoptotic pathways in acute leukemia cells: Shedding new light on NVP-BKM120 mechanism of action. Int J Biochem Cell Biol 2016;79:308-17.
12. Yang C-R, Wilson-Van Patten C, Planchon Sm, Wuerzberger-Davis Sm, Davis Tw, Cuthill S, et al. Coordinate modulation of Sp1, NF-kappa B, and p53 in confluent human malignant melanoma cells after ionizing radiation. FASEB J 2000;14:379-90.
13. Colman MS, Afshari CA, Barrett JC. Regulation of p53 stability and activity in response to genotoxic stress. Mutat Res 2000;462:179-88.
14. Luo J-L, Kamata H, Karin M. IKK/NF-κB signaling: balancing life and death–a new approach to cancer therapy. J Clin Invest 2005;115:2625-32.
15. Melino G, Bernassola F, Ranalli M, Yee K, Zong WX, Corazzari M, et al. P73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. J Biol Chem 2004;279:8076-83.
16. Chen A, Huang X, Xue Z, Cao D, Huang K, Chen J, et al. The role of p21 in apoptosis, proliferation, cell cycle arrest, and antioxidant activity in UVB-irradiated human HaCaT keratinocytes. Med Sci Monit 2015;21:86-95.

Archive of SID

www.SID.ir