

بهبود اثر ضدسرطانی پاکلی تاکسل بر روی رده‌های سلولی SKOV-3 و A2780s سرطان تخمدان انسان با کمک راپامایسین به عنوان یک مهارکننده کینازی

بهمن کریمی^۱، حسن بردانیا^۱، رضا محمودی^۲، مریم تجلی^۲، حسن عبیدی^۲، مهدی دهقانی^۳، محسن نیک سرشت^{۴*}

^۱ کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، ^۲ مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، ^۳ مرکز تحقیقات هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
تاریخ وصول: ۱۴۰۳/۱/۰۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: سرطان تخمدان به علت تشخیص دیر هنگام کشنده‌ترین نوع سرطان در میان بدخیمی‌های زنان محسوب می‌شود. درمان مرسوم سرطان تخمدان برداشتن توده توموری به وسیله جراحی و به دنبال آن شیمی درمانی است. پاکلی تاکسل به عنوان فاکتور درمانی متداول در شیمی درمانی سرطان تخمدان محسوب می‌شود. بررسی‌های مختلفی نشان داده است پاکلی تاکسل از طریق فعال سازی یا افزایش بیان مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT/mTOR باعث القای مقاومت دارویی می‌گردد. هدف از این مطالعه بهبود اثر ضدسرطانی پاکلی تاکسل بر روی رده‌های سلولی SKOV-3 و A2780s سرطان تخمدان انسان با کمک راپامایسین به عنوان یک مهارکننده کینازی بوده است.

روش بررسی: این یک مطالعه تجربی آزمایشگاهی می‌باشد که در سال ۱۳۹۸ انجام شد. رده‌های سلولی SKOV-3 و A2780s سرطان تخمدان در محیط کشت RPMI-1640 غنی شده با سرم جنین گاوی ۱۰ درصد، ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین تحت شرایط کنترل شده دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد و اتمسفر مرطوب حاوی دی‌اکسید کربن ۵ درصد کشت داده شدند. اثر سایتوتوکسیکیت داروهای پاکلی تاکسل و راپامایسین به وسیله آزمون MTT ارزیابی شد. نوع مرگ سلولی به وسیله فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون‌های آماری واریانس و تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از تست MTT و آنالیز فلوسایتومتری نشان داد داروهای پاکلی تاکسل و راپامایسین موجب کاهش میزان بقای سلولی و القای مرگ سلولی در رده‌های SKOV-3 و A2780s سرطان تخمدان شدند و اثرات آن‌ها وابسته به زمان و غلظت بود. نتایج ارزیابی سمیت سلولی نشان داد وقتی پاکلی تاکسل همراه با داروی راپامایسین استفاده می‌شود در مقایسه با زمانی که به تنهایی استفاده می‌شود، در غلظت کمتری باعث مرگ ۵۰ درصد سلول‌ها می‌شود و به صورت معنی‌داری اثر سمیت سلولی آن‌ها افزایش پیدا می‌کند ($p < 0.001$).

نتیجه‌گیری: داروی راپامایسین از طریق کاهش میزان بیان ژن‌های p70s6k و mTOR دخیل در مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT/mTOR که در رشد و تکثیر سلولی و بسیاری از اعمال سلول نقش دارد، باعث افزایش حساسیت سلول‌های سرطان تخمدان به داروی پاکلی تاکسل می‌شوند که می‌تواند استراتژی درمانی مفید و خوبی برای درمان سرطان تخمدان باشد.

واژه‌های کلیدی: سرطان تخمدان، پاکلی تاکسل، SKOV-3، A2780s، راپامایسین

* نویسنده مسئول: محسن نیک سرشت، یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، گروه بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی
Email: nikmohsen65@gmail.com
"نشریه علمی پژوهشی ارمغان دانش وابسته به دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یک نشریه با دسترسی آزاد است و تمامی مقالات منتشر شده در این نشریه به صورت دسترسی آزاد منتشر می‌شوند."

مقدمه

سرطان تخمدان از جمله شایع‌ترین سرطان‌های دستگاه تناسلی زنان است. تخمین زده می‌شود در سراسر جهان بیش از ۱۴۰۰۰۰ مرگ ناشی از این بیماری در هر سال اتفاق می‌افتد (۱). حدود ۵ درصد مرگ ناشی از سرطان در ایالت متحده مربوط به سرطان تخمدان می‌باشد (۲). این سرطان به دلیل تشخیص دیرنگام از جمله کشنده‌ترین نوع سرطان‌های زنان محسوب می‌شود (۳) و معمولاً در ۷۰ درصد موارد زمانی تشخیص داده می‌شود که بیماری در مراحل پیشرفته است و عمدتاً غیر قابل درمان می‌باشد (۴ و ۵). انواع مختلفی از سرطان تخمدان ممکن است به وجود آید، ولی شایع‌ترین نوع آن تومورهای بدخیم اپیتلیالی می‌باشد (۶ و ۷). سرطان اپیتلیال تخمدان دومین سرطان رایج از بدخیمی‌های زنان است و پنجمین سرطانی است که بیشترین میزان مرگ و میر را در بین زنان دارد (۷). در مطالعه‌ای نشان داده شده است که میزان ابتلا به نوع اپیتلیال سرطان تخمدان بیش از ۹۰ درصد سرطان‌های تخمدان را در بر می‌گیرد که ناشی از سلول‌های اپیتلیال پوشاننده سطح تخمدان می‌باشد و پس از یائسگی، احتمال ابتلا به این سرطان افزایش می‌یابد (۱).

اگر چه در دهه‌های اخیر روش‌های جراحی و شیمی درمانی برای درمان سرطان تخمدان پیشرفت

قابل توجهی داشته است، اما به دلیل پیش آگاهی ضعیف، میزان بقای بیماران در سطوح پیشرفته بیماری تقریباً ۳۰ درصد است (۸). درمان مرسوم سرطان تخمدان شامل برداشتن توده توموری به وسیله جراحی به همراه شیمی درمانی کمکی می‌باشد (۹). داروهای مختلفی در شیمی درمانی سرطان تخمدان استفاده می‌شود که هر کدام دارای معایب و امتیازاتی می‌باشند. یکی از این داروها پاکلی تاکسل (paclitaxel) است که فعالیت ضدتوموری قابل توجهی علیه سرطان‌های مختلف انسانی از جمله سرطان پستان و تخمدان دارد. پاکلی تاکسل فعالیت ضدتوموری خود را از طریق اتصال به واحدهای توبولین داخل میکروتوبول اعمال می‌کند و باعث ثبات میکروتوبول‌ها و جلوگیری از دپلیریزاسیون آن‌ها و توقف چرخه سلولی در فاز G₂/M می‌شود (۱۰). علی‌رغم اثرات مفید و کاربرد بالینی پاکلی تاکسل، مشاهده شده است که این دارو می‌تواند مقاومت دارویی را القا کند (۱۱). مقاومت شیمیایی پاکلی تاکسل به نظر می‌رسد به چندین عامل بستگی دارد از جمله فعال‌سازی آنزیم‌های کینازی در مسیرهای محافظتی مانند MAPK و AKT و افزایش بیان ژن MDR1 (multidrug resistance 1). اگرچه ارتباط بین MAPK با پاکلی تاکسل به طور کامل مشخص نیست، ولی فعال شدن این مسیر می‌تواند در مقاومت دارویی نقش داشته باشد. در حقیقت مهار مسیر MAPK باعث

افزایش حساسیت به پاکلی تاکسل در انواع مختلفی از سرطان‌ها از جمله سرطان پستان، تخمدان و ریه می‌شود (۱۲). مسیر PI3K-AKT-mTOR یکی دیگر از مسیرهای سیگنالینگ است که در پاسخ به پیام‌های خارج سلولی باعث بقا و رشد سلول‌ها می‌شود و AKT در این مسیر نقش کلیدی دارد و پاکلی تاکسل از طریق فعال کردن این مسیر تکثیر سلولی و بقا سلول را افزایش می‌دهد و منجر به توسعه و پیشرفت سرطان می‌شود (۱۳ و ۱۴). فسفو-S6 کیناز ریبوزومی که در انتقال سیگنال سلولی شرکت می‌کند در انواع مختلفی از سرطان‌ها بیش از حد بیان می‌شود و در پیشرفت تومورها نقش مهمی دارد. شواهد مختلفی وجود دارد که نشان می‌دهد که S6 کیناز نقش مهمی در رشد و انتشار سرطان تخمدان دارد. آنزیم S6 کیناز ریبوزومی هم‌چنین از طریق تقویت زیرواحد کاتالیتیکی PI3K P110a یا AKT، جهش در زیرواحد تنظیمی PI3Kp85a و کمبود PTEN فعال می‌شود که به صورت معمول در سرطان تخمدان دیده می‌شود (۱۵ و ۱۶) و این نشان‌دهنده اهمیت فعالیت این آنزیم کینازی در سرطان تخمدان است. با توجه به موارد گفته شده مهار این مسیرهای کینازی به ویژه S6 کیناز در سرطان تخمدان می‌تواند باعث افزایش حساسیت به پاکلی تاکسل شود. یکی دیگر از داروهای مورد استفاده در شیمی درمانی راپامایسین است که رشد طیف وسیعی از بدخیمی‌ها از جمله سرطان

پانکراس و لوسمی را مهار می‌کند و نشان داده شده است که راپامایسین مهار کننده قوی S6K1 می‌باشد. پژوهش‌های گذشته نشان داده است که راپامایسین ممکن است به عنوان سوبسترای برای ترانسپورتر-P-گلیکوپروتئین MDR باشد که از این طریق باعث افزایش حساسیت شیمیایی در سرطان‌های مقاوم به دارو می‌شود (۱۷ و ۱۸).

رده‌های سلولی مورد استفاده عبارتند از رده SKOV-3 سرطان تخمدان انسان که از منابع آسیتیک (ascetic) زن ۶۴ ساله قفقازی با تومور تخمدان در سال ۱۹۷۳ مشتق شده است. سلول‌های این رده به فاکتور نکروز تومور (TNF) و داروهای سیتوتوکسیک از جمله؛ سم دیفتری، سیس‌پلاتینوم و آدریامایسین مقاوم هستند (۲۰ و ۱۹). سلول‌های رده A2780 اولین بار از بیماری دارای تومور درمان نشده جدا شد. سلول‌های این رده به سیس‌پلاتین و آدریامایسین مقاوم می‌باشند و هر دو رده سلولی از نوع اپیتلیالی هستند (۲۲ و ۲۱). با توجه به موارد ذکر شده، داروهایی مثل پاکلی تاکسل اگر چه به عنوان یک داروی معمول برای مهار رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی تخمدان استفاده می‌شوند، ولی از طرف دیگر این دارو با افزایش فعالیت بعضی از کینازها به خصوص فسفو S6 کیناز می‌توانند مقاومت دارویی را القا کنند که باید این اثر را حذف نمود، لذا هدف از این مطالعه بهبود اثر ضدسرطانی پاکلی تاکسل بر روی

رده‌های سلولی SKOV-3 و A2780s سرطان تخمدان انسان با کمک راپامایسین به عنوان یک مهارکننده کینازی بوده است.

روش بررسی

این یک مطالعه تجربی آزمایشگاهی می‌باشد که در سال ۱۳۹۸ انجام شده است. در این تحقیق از رده‌های سلولی SKOV-3 و A2780s تخمدان انسانی استفاده شد، هر دو این سلول‌ها سرطانی از نوع چسبنده هستند. این سلول‌ها به صورت کشت شده و در حال رشد در فلاسک از بانک سلولی انستیتو پاستور تهران تهیه و خریداری شدند و مطالعه بر روی این سلول‌ها در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج انجام شد.

روش‌های متعددی جهت سنجش غیرمستقیم میزان تکثیر و زنده ماندن سلول‌ها وجود دارد. اغلب این روش‌ها میزان فعالیت یک آنزیم سلولی را درون سلول زنده اندازه‌گیری می‌کنند. روش MTT، آزمون آزمایشگاهی و کمی برای اندازه‌گیری میزان تکثیر سلول‌ها در مواجهه با عوامل مختلف و تعیین میزان سمیت این عوامل هنگامی که بر روی سلول‌ها اثر داده می‌شوند. اساس این روش بر پایه توانایی آنزیم سوکسینات دهیدورژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده در احیا و تبدیل حلقه‌های تترازولیوم MTT زردرنگ به کریستال‌های نامحلول و بنفش فرمازان است (۲۳). در

تست MTT، سلول‌ها (با غلظت ۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک) در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای کاشته شدند. پس از آن پلیت را به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دی‌اکسید کربن (CO₂) ۵ درصد، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گیرد تا سلول مجدداً رشد کرده و به ته چاهک‌ها بچسبند. پس از گذشت ۲۴ ساعت پلیت ۹۶ خانه‌ای از انکوباتور CO₂ خارج، محیط کشت آنها تخلیه و به جای آن ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت جدید حاوی غلظت‌های مختلف دارو که به صورت سریالی رقیق شده بود به سلول‌های چسبیده به کف چاهک اضافه شد. سلول‌ها در معرض دارو در دمای ۳۷ سانتی‌گراد در انکوباتور CO₂، برای یک دوره زمانی معین (۲۴ و ۴۸ ساعتی) قرار داده شدند. نمونه شاهد یا کنترل تنها حاوی سلول، بدون تیمار با هیچ دارویی می‌باشد. بعد از گذشت زمان‌های مورد نظر محیط رویی چاهک‌ها خارج و به هر کدام از چاهک‌های پلیت ۱۰۰ میکرولیتر محلول MTT (با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) اضافه شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۳ تا ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند تا اجازه داده شود که MTT در سلول‌هایی که از لحاظ متابولیکی فعال هستند، به فرم کریستال فورمازون درآید. بعد از گذشت این مدت زمان پلیت‌ها از انکوباتور خارج و محیط رویی سلول‌ها حذف شد. به طوری که بلورهای فورمازان تشکیل شده در کف چاهک‌ها آسیبی نرسد. سپس به هر کدام از چاهک‌های پلیت ۱۰۰ میکرولیتر دی‌متیل

یافته‌ها

سلول‌های SKOV-3 و A2780s تحت تأثیر غلظت‌های مختلف داروهای پاکلی تاکسل و راپامایسین قرار گرفتند. میزان بقا در این سلول‌ها پس از مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت از تیمار به وسیله تست MTT مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این تست نشان داد که داروهای پاکلی تاکسل و راپامایسین موجب کاهش میزان بقا سلولی و القا مرگ سلولی در رده‌های SKOV-3 و A2780s می‌شود و این امر در یک الگوی وابسته به زمان و دوز صورت گرفت.

سلول‌های رده‌های skov-3 و A2780s سرطان تخمدان با غلظت‌های مختلف پاکلی تاکسل (۱، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۵۰ و ۱۰۰ نانومولار) به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند. تاثیر دارو بر زنده‌مانی به وسیله آزمون MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمون زنده‌مانی سلول‌ها برای تعیین IC50 نشان داد که داروی پاکلی تاکسل در غلظت ۴۶ نانومولار در رده skov-3 و غلظت ۵۰ نانومولار در رده A2780s قادر به کشتن ۵۰ درصد از سلول‌های رده مورد نظر می‌شود (جدول ۱).

بعد از این که سلول‌های skov-3 و A2780s سرطان تخمدان با غلظت‌های مختلف راپامایسین (۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ نانومولار) تحت تیمار قرار گرفتند، از طریق آزمون MTT سمیت سلولی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مشخص کرد که داروی

سولفوکسید جهت حل کریستال‌های فورمازان اضافه و به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه پلیت‌ها در تاریکی قرار داده شدند. در نهایت، میزان جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر به وسیله دستگاه الیزا ریدر اندازه‌گیری و میزان زنده‌مانی سلول‌ها با فرمول زیر محاسبه گردید (۲۴).

۱۰۰× میانگین جذب نوری سلول‌های شاهد/ میانگین جذب نوری سلول‌های تیمار شده = درصد زنده‌مانی
برای تشخیص سلول‌های در حال آپوپتوزیس در یک جمعیت سلولی از کیت Annexin V-FITC/PI شرکت Elabscience استفاده شد. این کیت امکان تشخیص و تمیز سلول‌های در حال آپوپتوزیس را از سلول‌های نکروزیس میسر می‌سازد (۲۵). غلظت‌های نزدیک به IC50 ترکیبات دارویی برای تیمار سلول‌ها استفاده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار سلول‌ها، با استفاده از تریپسین سلول‌ها از کف فلاسک جدا شدند. جهت رنگ‌آمیزی سلول‌ها با استفاده از رنگ‌ها پروپیدیوم آیوداید و انکسین ۷، از دستورالعمل مشخص برای کیت خریداری شده استفاده و در نهایت آنالیز سلول‌ها با استفاده دستگاه فلو سایتومتری موجود در آزمایشگاه جامع در دانشگاه علوم پزشکی شیراز انجام شد (۲۶).

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری واریانس و تی تست تجزیه و تحلیل شدند.

راپامایسین باعث کاهش میزان بقا سلولی و القای مرگ سلولی در طی یک الگوی وابسته به زمان و دوز شد (جدول ۲).

پس از این که داروهای پاکلی تاکسل و راپامایسین به صورت جداگانه بر روی سلول‌ها اثر داده شدند و مقدار IC_{50} محاسبه گردید. به منظور بررسی اثر این ترکیبات به صورت هم زمان بر روی سلول‌های A2780s و SKOV-3، این سلول‌ها تحت تأثیر غلظت‌های پایین‌تر از IC_{50} داروها قرار گرفتند. نتایج حاصل از بررسی اثر هم‌زمان غلظت ثابت ۲۰ نانومولار پاکلی تاکسل با غلظت‌های مختلف داروی راپامایسین بر روی رده‌های سلولی skov-3 و A2780s سرطان تخمدان، نشان داد که میزان سمیت سلولی داروها به صورت معنی‌داری برای هر دو ترکیب دارویی افزایش پیدا می‌کند ($p < 0.001$) و نشان از اثر هم‌افزایی آن‌ها دارد. در بررسی توأم اثر سمیت سلولی پاکلی تاکسل و راپامایسین بر روی زنده‌مانی سلول‌های رده‌های مورد مطالعه، نتایج حاصل از تست MTT نشان داد که حدود نصف غلظت

پاکلی تاکسل (۲۰ نانومولار) به همراه نصف غلظت راپامایسین (۸۳ نانومولار در رده skov-3 و ۸۶ نانومولار در رده A2780s) پس از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار موجب القای مرگ در ۵۰ درصد سلول‌ها در این رده‌های سلولی گشت و به طور قابل توجهی باعث کاهش میزان IC_{50} راپامایسین گردید (جدول ۳).

نتایج تست فلوئوسایتومتری نشان می‌دهد که پاکلی تاکسل منجر به القای آپوپتوز در سلول‌های رده skov-3 سرطان تخمدان می‌شود و در گروه تیمار با پاکلی تاکسل افزایش میزان مرگ آپوپتوزی نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (شکل ۱).

در تیمار با راپامایسین ۳۳/۳ درصد سلول‌ها دچار مرگ از نوع آپوپتوز اولیه و ۴۸/۲ درصد سلول‌ها آپوپتوز ثانویه و ۱۸/۴ درصد سلول‌ها دچار مرگ از نوع نکروزی گردیدند (شکل ۲).

در گروه استفاده هم‌زمان دو دارو، میزان بیشتری از سلول‌ها دچار آپوپتوز سلولی ثانویه (۵۸/۷ درصد) و آپوپتوز اولیه (۳۹/۲ درصد) شدند (شکل ۳).

جدول ۱: مقادیر IC_{50} پاکلی تاکسل در سلول‌های skov-3 و A2780s، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار

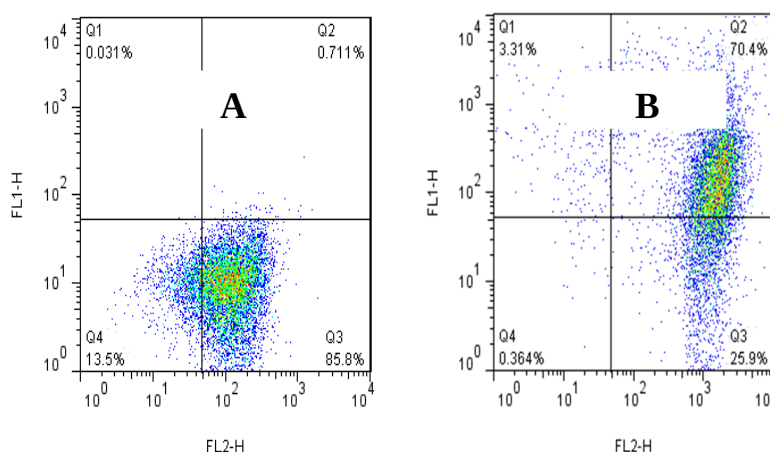
IC50 paclitaxel (nM)-48h	IC50 paclitaxel (nM)-24h	رده سلولی
۳۳/۵±۱/۶۸۴۵	۴۶/۶±۱/۶۸۹۵	Skov-3
۳۷/۳±۱/۵۸۴۴	۵۰/۵±۱/۰۴۵۳	A2780s

جدول ۲: مقادیر IC50 راپامایسین در سلول‌های skov-3 و A2780s، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار

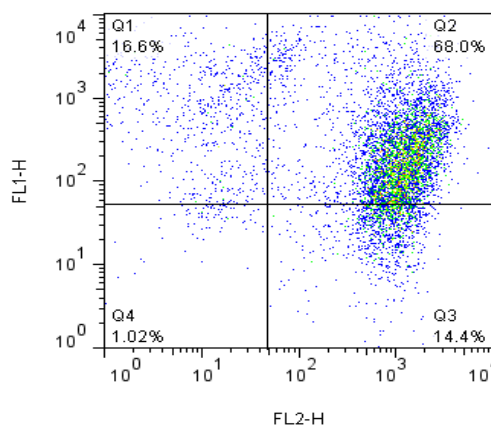
IC50 paclitaxel (nM)-48h	IC50 paclitaxel (nM)-24h	رده سلولی
$113/9 \pm 2/3516$	$0/133 \pm 1599/5$	Skov-3
$127 \pm 6/0525$	$7/6316 \pm 151/5$	A2780s

جدول ۳: مقادیر IC50 پاکلی تاکسل - راپامایسین در سلول‌های skov-3 و A2780s ۲۴ ساعت پس از تیمار

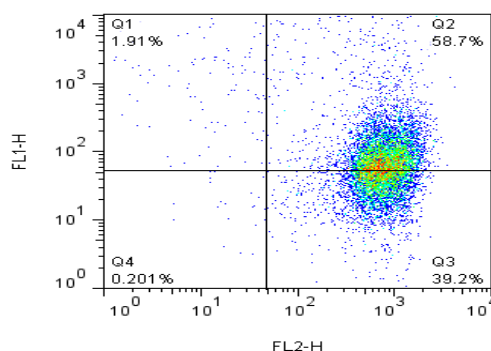
Paclitaxel(20nM)-rapamycin(nM)	رده سلولی
$83/38 \pm 1/8956$	Skov-3
$86/8 \pm 2/6538$	A2780s



شکل ۱: نتایج رنگ آمیزی Annexin v-FITC و PI سلول‌های skov-3 بدون تیمار (A) پس از تیمار با پاکلی تاکسل (B)



شکل ۲: نتایج رنگ آمیزی Annexin v-FITC و PI سلول‌های skov-3 پس از تیمار با راپامایسین



شکل ۳: نتایج رنگ آمیزی Annexin v-FITC و PI سلول‌های SKOV-3 پس از تیمار با پاکلی تاکسل - راپامایسین

بحث

پاکلی تاکسل اگر چه به عنوان یک داروی معمول برای مهار رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی تخمدان استفاده می‌شود، ولی این دارو با افزایش فعالیت بعضی از کینازها به خصوص فسفو S6 کیناز می‌تواند مقاومت دارویی را القا کند که باید این اثر را حذف نمود (۲۷)، لذا هدف از این مطالعه بهبود اثر ضد سرطانی پاکلی تاکسل بر روی رده‌های سلولی SKOV-3 و A2780s سرطان تخمدان انسان با کمک راپامایسین به عنوان یک مهارکننده کینازی بود.

نتایج حاصل از تست MTT و آنالیز فلوسایتومتری نشان داد داروهای پاکلی تاکسل و راپامایسین موجب کاهش میزان بقای سلولی و القای مرگ سلولی در رده‌های SKOV-3 و A2780s سرطان تخمدان شدند و اثرات آن‌ها وابسته به زمان و غلظت بود.

سرطان تخمدان از جمله شایع‌ترین سرطان‌های دستگاه تناسلی زنان است (۱۶ و ۱). این سرطان به دلیل تشخیص دیر هنگام از جمله کشنده‌ترین نوع سرطان‌های زنان محسوب

می‌شود (۳) و معمولاً در ۷۰ درصد موارد زمانی تشخیص داده می‌شود که بیماری در مراحل پیشرفته است و عمدتاً غیر قابل درمان می‌باشد (۴) درمان مرسوم سرطان تخمدان شامل برداشتن توده توموری به وسیله جراحی به همراه شیمی درمانی کمکی می‌باشد (۲۸) داروهای مختلفی در شیمی درمانی سرطان تخمدان استفاده می‌شود که هر کدام دارای معایب و امتیازاتی می‌باشند. یکی از این داروها پاکلی تاکسل (paclitaxel) است علی‌رغم اثرات مفید و کاربرد بالینی پاکلی تاکسل، مشاهده شده است این دارو می‌تواند مقاومت دارویی را القا کند. مقاومت شیمیایی پاکلی تاکسل به نظر می‌رسد به چندین عامل بستگی دارد، از جمله فعالسازی آنزیم‌های کینازی در مسیرهای محافظتی مانند MAPK و AKT و افزایش بیان ژن مقاومت چندگانه دارویی^(۱) (MDR1) شود (۱۸ و ۸).

مسیر PI3K-AKT-mTOR یکی دیگر از مسیرهای سیگنالیته است که در پاسخ به پیام‌های خارج

1- Multidrug Resistance 1

سلولی باعث بقا و رشد سلول‌ها می‌شود و AKT در این مسیر نقش کلیدی دارد و پاکلی تاکسل از طریق فعال کردن این مسیر تکثیر سلولی و بقا سلول را افزایش می‌دهد و منجر به توسعه و پیشرفت سرطان می‌شود (۱۳).

پروتئین S6 p70 کیناز ریبوزومی، یک پروتئین سرین تروئونین کینازی می‌باشد و نقش مهمی در تکثیر سلولی، بقا سلولی و ترجمه پروتئین‌ها دارد. این پروتئین به وسیله مسیر سیگنالینگ AKT (mTORC1) فعال می‌شود و شواهد مختلفی وجود دارد که نشان می‌دهد که S6 کیناز نقش مهمی در رشد و پیشرفت سرطان تخمدان دارد. در مقاومت سلول‌های سرطانی به داروهای شیمی درمانی و پرتو درمانی نقش دارد (۱۵). یکی دیگر از مکانیسم‌های دخیل در مقاومت شیمیایی به پاکلی تاکسل بیان بالای انتقال دهنده‌ها وابسته به ATP در سلول یا پمپ پروتئینی p-glycoprotein (محصول ژن MDR1) می‌باشد که وظیفه خروج داروها از سلول را بر عهده دارند در نهایت منجر به مقاوم شدن سلول سرطانی به دارو می‌شوند (۱۷).

با توجه به این که پاکلی تاکسل به عنوان یک داروی معمول برای مهار رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی تخمدان محسوب می‌شود، ولی از طرف دیگر این دارو علاوه بر داشتن عوارض جانبی، با افزایش فعالیت بعضی از کینازها به خصوص فسفو S6 کیناز می‌تواند مقاومت دارویی را القا کنند و برای تاثیر بهتر دارو باید این اثر را حذف نمود. در این تحقیق به

این موضوع پرداخته شد و به بررسی اثر مهارکننده کینازی راپامایسین در جهت افزایش اثر ضد توموری پاکلی تاکسل در سلول‌های skov-3 و A2780s سرطان اپیتلیال تخمدان پرداخته شد.

نتایج حاصل از تست MTT و آنالیز فلوسایتومتری تأیید کرد هرکدام از داروهای پاکلی تاکسل و راپامایسین به تنهایی موجب کاهش میزان بقای سلولی و القای مرگ سلولی در رده‌های SKOV-3 و A2780s سرطان تخمدان شدند و اثرات آنها وابسته به زمان و غلظت بود.

هم‌چنین نتایج فلوسایتومتری نشان داد راپامایسین باعث القای مرگ سلولی می‌شود و با نتایج مطالعه PETER و همکاران انجام شد، هم‌خوانی دارد. آن‌ها نشان دادند داروی راپامایسین به تنهایی خود و هم‌چنین در ترکیب با کاربوپلاتین رشد سلول‌های سرطان تخمدان را از طریق کاهش بیان پروتئین‌های مسیر سیگنالینگ PI3K مهار می‌کند (۲۹).

در بررسی اثر هم‌زمان پاکلی تاکسل و راپامایسین بر روی زنده‌مانی سلول‌های رده‌های مورد مطالعه مشخص شد راپامایسین و پاکلی تاکسل در غلظت پایین‌تری نسبت به داروی تنها باعث مرگ ۵۰ درصد سلول‌های skov-3 و A2780s می‌شوند. نتایج تست فلوسایتومتری نشان داد که استفاده هم‌زمان پاکلی تاکسل با راپامایسین منجر به افزایش مرگ سلولی در گروه بیش‌تری از سلول‌های skov-3 و A2780s در مقایسه با تیمار سلول‌ها با داروی پاکلی تاکسل به تنهایی می‌شود. بنابراین نتایج نشان

می‌دهد راپامایسین از طریق مهار بیان ژن‌های مسیر سیگنالینگ PI3K/AKT/mTOR باعث افزایش کارایی پاکلی‌تاکسل در درمان سلول‌های سرطان تخمدان می‌گردد. جوسیمار و همکاران در بررسی‌های خود نشان دادند دو داروی پاکلی‌تاکسل و راپامایسین به صورت آزاد و به صورت بارگذاری شده در نانولیپوزوم‌ها اثر سمیت سلولی هم‌افزایی بر علیه سلول‌های رده 4T1 سرطان سینه دارند که با پژوهش‌های حاضر هم‌خوانی دارد (۳۰). هم‌چنین یافته‌های این مطالعه با پژوهش‌هایی که به وسیله جیان می‌شرا و همکاران انجام گرفت در یک راستا می‌باشد نتایج پژوهش جیان می‌شرا و همکاران نشان داد که انتقال هم‌زمان پاکلی‌تاکسل و راپامایسین به وسیله میسل‌های پلیمری به سلول‌های اندوتلیال بندناف انسان (HUVEC) اثر ضدتوموری بیشتری نشان داد (۳۱).

با توجه به در دسترس نبودن کیت‌های اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کیناز این موضوع می‌تواند یک محدودیت باشد، لذا پیشنهاد می‌شود که در پژوهش‌های تکمیلی با اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کینازی و هم‌چنین اندازه‌گیری مقدار پروتئین‌های مهم دخیل در این مسیر پیام‌رسانی، مکانیزم اثر این داروها بهتر شناسایی و روشن شود.

نتیجه‌گیری

داروی راپامایسین از طریق کاهش میزان بیان ژن‌های p70s6k و mTOR دخیل در مسیر سیگنالینگ

PI3K/AKT/mTOR که در رشد و تکثیر سلولی و بسیاری از اعمال سلول نقش دارد باعث مهار رشد و تکثیر سلولی و القای مرگ سلولی در سلول‌های skov-3 و A2780s سرطان اپیتلیال تخمدان می‌شود. نتایج آزمایش‌های سمیت سلولی و آپوپتوز سلولی نشان داد که استفاده هم‌زمان از پاکلی‌تاکسل به همراه داروی راپامایسین برای درمان سلول‌های skov-3 و A2780s سرطان اپیتلیال تخمدان منجر به القای مرگ در جمعیت بیشتری از سلول‌ها شد و در نتیجه باعث افزایش حساسیت سلول‌های سرطان تخمدان به داروی پاکلی‌تاکسل می‌شوند که می‌تواند استراتژی درمانی مفید و خوبی برای درمان سرطان تخمدان باشد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی یاسوج بابت حمایت‌های مالی تشکر به عمل می‌آید.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منفعی در خصوص این مقاله وجود ندارد.

حمایت مالی

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج به انجام رسیده است.

ملاحظات اخلاقی

این مقاله برگرفته از پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی بالینی از دانشگاه علوم پزشکی یاسوج با کد اخلاق IR.YUMS.REC.1397.120 می‌باشد.

مشارکت نویسندگان

نویسندگان این مقاله در تمامی مراحل همکاری و مشارکت داشته‌اند. بهمن کریمی دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی و انجام دهنده تست‌های آزمایشگاهی. حسن بردانیا مشاور علمی و کمک در انجام تست‌های مربوطه. رضا محمودی مشاور علمی در کشت سلولی. مریم تجلی کارشناس مرکز تحقیقات و کمک در انجام تست‌ها. حسن عبیدی مشاور متدولوژی و آمار. مهدی دهقانی پزشک آنکولوژیست و مشاوره علمی و کمک در تهیه داروهای مورد نیاز. محسن نیک سرشت استاد راهنما و طراح کلی تحقیق و هدایت انجام تحقیق.

REFERENCES

1. Pashaei-Asl F, Pashaiasl M. Anti-Cancer Effect of Silibinin on Epithelial Ovarian Cancer Cell Line and P21 Gene Expression. *Journal of Ardabil University of Medical Sciences* 2016; 16(3): 300-8.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics. *CA: A cancer Journal for Clinicians* 2016; 66(1): 7-30.
3. Gao Y, Shen J, Choy E, Mankin H, Hornicek F, Duan Z. Inhibition of CDK4 sensitizes multidrug resistant ovarian cancer cells to paclitaxel by increasing apoptosis. *Cellular Oncology* 2017; 40(3): 209-18.
4. Burges A, Schmalfeldt B. Ovarian cancer: diagnosis and treatment. *Deutsches Ärzteblatt International* 2011; 108(38): 635.
5. Cho KR, Shih IM. Ovarian cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 2009; 4(1): 287-313.
6. Hennessy BT, Coleman RL, Markman M. Ovarian cancer. *The Lancet* 2009; 374(9698): 1371-82.
7. Sereni MI, Baldelli E, Gambarà G, Ravaggi A, Hodge KA, Alberts DS, et al. Kinase-driven metabolic signalling as a predictor of response to carboplatin-paclitaxel adjuvant treatment in advanced ovarian cancers. *British Journal of Cancer* 2017; 117(4): 494.
8. Nakamura K, Sawada K, Yoshimura A, Nakatsuka E, Kinose Y, Mabuchi S, et al. MiR-194 modulates paclitaxel resistance in ovarian cancer cells through the regulation of MDM-2 expression. *Cancer Research* 2017; 77(13_Supplement): 3436.
9. Ali AY, Farrand L, Kim JY, Byun S, Suh JY, Lee HJ, et al. Molecular determinants of ovarian cancer chemoresistance: new insights into an old conundrum. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2012; 1271(1): 58-67.
10. Tossetta G. Metformin improves ovarian cancer sensitivity to paclitaxel and platinum-based drugs: a review of in vitro findings. *International Journal of Molecular Sciences* 2022; 23(21): 12893.
11. Zhao L, Yang H, Wang Y, Yang S, Jiang Q, Tan J, et al. STUB1 suppresses paclitaxel resistance in ovarian cancer through mediating HOXB3 ubiquitination to inhibit PARK7 expression. *Communications Biology* 2024; 7(1): 1439.
12. Ma YT, Li C, Shen Y, You WH, Han MX, Mu YF, et al. Mechanisms of the JNK/p38 MAPK signaling pathway in drug resistance in ovarian cancer. *Frontiers in Oncology* 2025; 15: 1533352.
13. Huang S, Wang D, Zhang S, Huang X, Wang D, Ijaz M, et al. Tunicamycin potentiates paclitaxel-induced apoptosis through inhibition of PI3K/Akt and MAPK pathways in breast cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2017; 80(4): 685-96.
14. Zi D, Li Q, Xu C-x, Zhou Z-W, Song GB, Hu CB, et al. CXCR4 knockdown enhances sensitivity of paclitaxel via the PI3K/Akt/mTOR pathway in ovarian carcinoma. *Aging (Albany NY)* 2022; 14(11): 4673.
15. Choi JI, Park SH, Lee H-J, Lee DW, Lee HN. Inhibition of Phospho-s6 kinase, a protein involved in the compensatory adaptive response, increases the efficacy of paclitaxel in reducing the viability of matrix-attached ovarian cancer cells. *PloS one* 2016; 11(5): e0155052.
16. Yi YW, You KS, Park JS, Lee SG, Seong YS. Ribosomal protein S6: a potential therapeutic target against cancer? *International Journal of Molecular Sciences* 2021; 23(1): 48.
17. Foster H, Coley HM, Goumenou A, Pados G, Harvey A, Karteris E. Differential expression of mTOR signalling components in drug resistance in ovarian cancer. *Anticancer Research* 2010; 30(9): 3529-34.
18. Jiang Q, Yang M, Qu Z, Zhou J, Zhang Q. Resveratrol enhances anticancer effects of paclitaxel in HepG2 human liver cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2017; 17(1): 477.
19. Wiechen K, Karaaslan S, Turzynski A, Dietel M. Suppression of the c-erbB-2 gene product decreases transformation abilities but not the proliferation and secretion of proteases of SK-OV-3 ovarian cancer cells. *British Journal of Cancer* 1999; 81(5): 790-5.
20. Suh KS, Park SW, Castro A, Patel H, Blake P, Liang M, et al. Ovarian cancer biomarkers for molecular biosensors and translational medicine. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 2010; 10(8): 1069-83.
21. Alizadehnohi M, Nabiuni M, Nazari Z, Safaeinejad Z, Irian S. The synergistic cytotoxic effect of cisplatin and honey bee venom on human ovarian cancer cell line A2780cp. *Journal of Venom Research* 2012; 3: 22.

22. Korch C, Spillman MA, Jackson TA, Jacobsen BM, Murphy SK, Lessey BA, et al. DNA profiling analysis of endometrial and ovarian cell lines reveals misidentification, redundancy and contamination. *Gynecologic Oncology* 2012; 7(1): 241-8.
23. Bardania H, Baneshi M, Mahmoudi R, Khosravani F, Safari F, Khalvati B, et al. Synergistic breast cancer therapy with RGD-decorated liposomes co-delivering mir-34a and cisplatin. *Cancer Nanotechnology* 2024; 15(1): 60.
24. Pashaei-Asl F, Pashaei-Asl R, Khodadadi K, Akbarzadeh A, Ebrahimie E, Pashaiasl M. Enhancement of anticancer activity by silibinin and paclitaxel combination on the ovarian cancer. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 2018; 46(7): 1483-7.
25. Lecoeur H. Nuclear apoptosis detection by flow cytometry: influence of endogenous endonucleases. *Experimental Cell Research* 2002; 277(1): 1-14.
26. Han ES, Wen W, Dellinger TH, Wu J, Lu SA, Jove R, et al. Ruxolitinib synergistically enhances the anti-tumor activity of paclitaxel in human ovarian cancer. *Oncotarget* 2018; 9(36): 24304.
27. Milošević Z, Banković J, Dinić J, Tsimplouli C, Sereti E, Dragoj M, et al. Potential of the dual mTOR kinase inhibitor AZD2014 to overcome paclitaxel resistance in anaplastic thyroid carcinoma. *Cellular Oncology* 2018; 41(4): 409-26.
28. Ali AY, Farrand L, Kim JY, Byun S, Suh JY, Lee HJ, et al. Molecular determinants of ovarian cancer chemoresistance: new insights into an old conundrum. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2012; 58(1): 1271.
29. Schlosshauer PW, Li W, Lin K-T, Chan JLK, Wang LH. Rapamycin by itself and additively in combination with carboplatin inhibits the growth of ovarian cancer cells. *Gynecologic Oncology* 2009; 114(3): 516-22.
30. Eloy JO, Petrilli R, Topan JF, Antonio HMR, Barcellos JPA, Chesca DL, et al. Co-loaded paclitaxel/rapamycin liposomes: development, characterization and in vitro and in vivo evaluation for breast cancer therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2016; 141: 74-82.
31. Mishra GP, Nguyen D, Alani AW. Inhibitory effect of paclitaxel and rapamycin individual and dual drug-loaded polymeric micelles in the angiogenic cascade. *Molecular Pharmaceutics* 2013; 10(5): 2071-8.

Enhancement of the Anticancer Effect of Paclitaxel on Human Ovarian Cancer SKOV-3 and A2780s Cell Lines with the Help of Rapamycin as a Kinase Inhibitor

Karimi B¹, Bardania H², Mahmoudi R², Tajali M², Abidi H², Dehghani M³, Nikseresht M^{2*}

¹Student Research Committee, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, ²Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, ³Hematology Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Received Date: 20 Jan 2025 Accepted Date: 20 May 2025

Abstract

Background & aim: Ovarian cancer is considered the most lethal type of cancer among female malignancies due to late diagnosis. Conventional treatment of ovarian cancer is surgical removal of the tumor mass followed by chemotherapy. Paclitaxel is considered a common therapeutic factor in ovarian cancer chemotherapy. Various studies have shown that paclitaxel induces drug resistance by activating or increasing the expression of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. Therefore, the aim of the present study was to improve the anticancer effect of paclitaxel on human ovarian cancer cell lines SKOV-3 and A2780s with the help of rapamycin as a kinase inhibitor.

Methods: The present experimental in-vitro study was conducted in 2019. The ovarian cancer cell lines SKOV-3 and A2780s were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 µg/mL streptomycin, and 100 units/mL penicillin under controlled conditions of 37°C and a humidified atmosphere containing 5% carbon dioxide. The cytotoxic effect of paclitaxel and rapamycin was evaluated by MTT assay. The type of cell death was examined by flow cytometry. The collected data were analyzed using variance and t-test statistical tests using SPSS version 20 software.

Results: The results of MTT assay and flow cytometry analysis indicated that paclitaxel and rapamycin drugs reduced cell survival and induced cell death in SKOV-3 and A2780s ovarian cancer lines, and their effects were time and concentration dependent. The results of cytotoxicity assessment showed that when paclitaxel is used together with rapamycin, it causes 50% cell death at a lower concentration compared to when it is used alone, and their cytotoxic effect is significantly increased ($p < 0.001$).

Conclusion: Rapamycin increased the sensitivity of ovarian cancer cells to paclitaxel by reducing the expression of p70s6k and mTOR genes involved in the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway, which was involved in cell growth and proliferation and many cell functions. This could be a useful and good therapeutic strategy for the treatment of ovarian cancer.

Keywords: Ovarian cancer, Paclitaxel, SKOV-3, A2780s, Rapamycin

***Corresponding author:** Nikseresht M, Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine, Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran.
Email: nikmohsen65@gmail.com

Please cite this article as follows: Karimi B, Bardania H, Mahmoudi R, Tajali M, Abidi H, Dehghani M, Nikseresht M. Enhancement of the Anticancer Effect of Paclitaxel on Human Ovarian Cancer SKOV-3 and A2780s Cell Lines with the Help of Rapamycin as a Kinase Inhibitor. *Armaghane-danesh* 2025; 30(2):203-216.

The scientific research journal *Armaghan Danesh*, affiliated with Yasuj University of Medical Sciences, is an open-access publication. All articles published in this journal