

بررسی اثر هم افزایی سس کوئی ترپن لاکتون سیناروپیکرین در ترکیب با داروی شیمی درمانی
پاکلی تاکسول بر روی سلول های سرطانی مری (KYSE30)

سولماز نصیرزاده^۱، احمدرضا بهرامی^{۱،۲}، مهرداد ایرانشاهی^{۳،۴}، سید نوید گوفتاری^۱، ابوالفضل شاکری^۳، مریم مقدم
متین^{۱،۲،۵*}

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۲. گروه تحقیقاتی بیوتکنولوژی سلولی و مولکولی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۳. گروه فارماکونوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۴. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۵. گروه تحقیقاتی سلول های بنیادی و پزشکی بازساختی، سازمان جهاد دانشگاهی خراسان رضوی، مشهد، ایران

Investigating the synergistic effects of sesquiterpene lactone cynaropicrin in combination with chemotherapy drug, paclitaxel on KYSE30 human esophageal carcinoma cells

Solmaz nasirzadeh¹, Ahmad Reza Bahrami^{1,2}, Mehrdad Iranshahi^{3,4}, Seyed Navid Goftari¹, Abolfazl Shakeri³, Maryam M. Matin^{1, 2, 5*}

1. Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2. Stem Cell and Regenerative Medicine Research Group, Iranian Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Khorasan Razavi Branch, Mashhad, Iran
3. Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
4. Biotechnology Research Center, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
5. Cell and Molecular Biotechnology Research Group, Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
Mail: matin@um.ac.ir

ABSTRACT

Drug combination is often applied to increase the effectiveness of treatment for specific and severe illnesses, such as cancer. So far various approaches have been designed to identify the effects of each drug when used in combination. Chou-Talalay method can be considered as one of the most comprehensive methods for evaluating the combination of drugs. Plant metabolites have been very much considered as therapeutic agents due to diverse benefits that they have shown in the treatment of various diseases. Sesquiterpene Lactones (SLs) are a large group of these metabolites. Cynaropicrin is a SL which has shown a high capacity for

treating some human cancers in various studies. Esophageal cancer is one of the ten most common cancers in the world, and ESCC has a high incidence in Asia and also in the northern parts of Iran. In this study, the synergistic effect of cynaropicrin with paclitaxol anticancer drug were evaluated on KYSE30 human esophageal carcinoma cells, for the first time. The results show a very strong synergistic effect of cynaropicrin on paclitaxol. Applying this combination of drugs at clinical level may enhance the effectiveness of paclitaxel and reduce the dosage of the drug used in patients. However further pre clinical studies are required to prove these effects.

Keywords: drug combination, Chou-Talalay, synergism effect, plant metabolites, Sesquiterpene Lactone, Cynaropicrin, esophageal carcinoma ,paclitaxel, KYSE30

خلاصه

در بسیاری مواقع استفاده‌ی همزمان از دو یا چند دارو، با هدف افزایش اثربخشی درمان در بیماری‌هایی مثل سرطان صورت می‌گیرد. تاکنون روش‌های زیادی برای شناسایی اثر داروها بر یکدیگر طراحی شده است، در این میان، روش چو-تالالی را می‌توان یکی از دقیق‌ترین روش‌ها در زمینه‌ی بررسی اثر ترکیب داروها دانست. از میان مواد با خاصیت دارویی، متابولیت‌های گیاهی به دلیل ویژگی‌های متنوعی که از خود در زمینه درمان بیماری‌های مختلف نشان داده‌اند بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. سس‌کوئی‌ترین‌لاکتون‌ها گروه بزرگی از این متابولیت‌ها می‌باشند. یکی از ترکیبات این گروه سیناروپیکرین می‌باشد که در پژوهش‌های مختلف، ظرفیت بالایی برای درمان برخی تومورهای انسانی از خود نشان داده است. سرطان مری یکی از ده سرطان شایع در سطح جهان می‌باشد. بروز نوع ESCC از سرطان مری در نواحی شمالی ایران بسیار بالا است. در این پژوهش اثر هم‌افزایی ترکیب سیناروپیکرین با داروی ضد سرطان پاکلی‌تاکسول بر روی سلول‌های سرطانی مری، KYSE30 مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان دهنده‌ی اثر هم‌افزایی بسیار قوی سیناروپیکرین بر داروی پاکلی‌تاکسول می‌باشد. به کار بردن هم‌زمان سیناروپیکرین با این دارو در سطح بالینی می‌تواند باعث تقویت اثر و کاهش میزان مصرف داروی شیمی درمانی پاکلی‌تاکسول شود که بررسی این اثرات نیاز به مطالعات پیش‌بالینی بیشتر دارد.

کلمات کلیدی: ترکیب دارو، چو تالالی، اثر هم‌افزایی، متابولیت گیاهی، سس‌کوئی‌ترین‌لاکتون، سیناروپیکرین، سرطان مری، پاکلی‌تاکسول، KYSE30

ترکیب داروها اغلب برای دستیابی به افزایش اثربخشی درمان در بیماری‌هایی مانند سرطان [1] عفونت‌های ویروسی، دیابت، آسم و اختلالات التهابی [2] استفاده می‌شود. عوامل مهم در تعیین اثربخشی ترکیب دارویی علاوه بر انتخاب دارو، تعیین دوز، توالی و مدت زمان مصرف آن‌ها می‌باشد. چالشی که در این مسیر وجود دارد سمیت دارویی می‌باشد که پیش‌بینی آن به دلیل پیچیدگی ذاتی شبکه‌های زیست‌شناختی دشوار است. در دهه‌های گذشته، مطالعات متعددی در این زمینه صورت گرفته که مدعی تعیین مکانیسم اثر داروها بر یکدیگر می‌باشند. با این حال، هنوز توافق قطعی در مورد معانی واژه‌هایی مثل هم‌افزایی، اثرات متقابل و یا اثر مجموع وجود ندارد. به عنوان مثال، گلدین و مانتل در سال ۱۹۵۷ [3]، هفت تعریف متفاوت از این اصطلاحات ذکر کردند. در این زمینه، مبانی نظری که امکان سنجش دقیق و کمی از اثرات ترکیبات دارویی را امکان پذیر می‌سازد، وجود نداشته است [4]. گرچه معرفی مفهوم ایزوبول توسط Loewe در سال ۱۹۲۸ [5] و مفهوم محصول کسری توسط Webb در سال ۱۹۶۳ [6]، مورد قبول واقع شد، اما جنبه‌های نظری و عملی مسئله همچنان موضوع بسیاری از مطالعات بوده است [7]. شیوه سینتیکی قبلا توسط برخی از محققان مورد استفاده قرار گرفت، اما محاسبات اغلب بسیار پیچیده یا محدود به موقعیت‌های خاصی بودند [8]. پژوهشگران در روش چو-تالالی، رویکرد سینتیکی را برای تجزیه و تحلیل مسئله انتخاب کرده‌اند. در این روش، یک طرح کلی تشخیصی برای تعیین کاربرد داده‌های تجربی پیشنهاد شده تا داروهای رقابتی از نوع غیر رقابتی تشخیص داده شوند و پارامترهایی که می‌توانند به طور مستقیم برای تجزیه و تحلیل اثر مجموع، هم‌افزایی یا اثر متقابل داروها استفاده شوند، به دست آیند [9]. در سال‌های اخیر علاقه زیادی در زمینه فعالیت‌های زیستی متابولیت‌های گیاهی ایجاد شده است. از مزایای این ترکیبات می‌توان به در دسترس بودن، ارزان بودن، اثرات جانبی کمتر و همچنین قابلیت تجزیه زیستی اشاره کرد [10]. یکی از مهم‌ترین گروه ترکیبات طبیعی سس‌کوئی‌ترین‌لاکتون‌ها (SLs) می‌باشد [11]. فعالیت‌های دارویی شناخته شده برای SLs شامل فعالیت‌های ضد میکروبی، ضد التهابی و ضد توموری می‌باشد [12]. سیناروپیکرین یک سس‌کوئی‌ترین‌لاکتون از نوع گوآنولید است که خواص دارویی بسیار عالی مانند خاصیت ضد ویروسی علیه هپاتیت C، خاصیت ضد انگلی، ضد سرطانی، خاصیت سرکوب NF- κ B و خواص ضد التهابی برای آن به اثبات رسیده است [13]. با توجه به این‌که سیناروپیکرین پتانسیل بالایی در پیشگیری و درمان برخی سرطان‌ها از خود نشان داده، توانایی خوبی در استفاده به عنوان دارو در پیشگیری یا درمان سرطان‌های انسانی می‌تواند داشته باشد [14]. سرطان مری در میان ده سرطان شایع در سراسر جهان [15] این سرطان در دو شکل اصلی با علت مشخص و ویژگی‌های پاتولوژیک متفاوت شامل: کارسینومای سلول سنگفرشی مری (ESCC) و آدنوکارسینومای مری (EAC) وجود دارد [16]. نوع ESCC در آسیا نسبت به کشورهای اروپایی رایج‌تر است. کمربند ESCC از شمال مرکزی چین به سمت آسیای مرکزی و تا شمال ایران امتداد یافته است [15]. در این پژوهش اثر هم‌افزایی دارویی این ترکیب با داروهای ضد سرطان پاکلی‌تاکسول که به صورت گسترده و در سطح بالینی برای درمان سرطان مری استفاده می‌شود با روش اثر میانه Chou-Talalay محاسبه شد.

کشت سلول

در این پژوهش، سلول‌های KYSE30 در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ FBS کشت شده و در داخل انکوباتور در CO₂ جوی ۵٪ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد داده شدند. این رده سلولی از انستیتو پاستور (تهران، ایران) تهیه شده بود.

سنجش میزان کشندگی

به منظور بررسی میزان مرگ و میر سلول‌های KYSE30 بعد از تیمار با ترکیب پاکلی‌تاکسول، سلول‌ها به تعداد ۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک در ظروف ۹۶ خانه‌ای کشت شده و ۲۴ ساعت بعد غلظت‌های ۳۰، ۱۵، ۷/۵، ۳/۷۵ و ۱/۸۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر، از پاکلی‌تاکسول تهیه شده و بر سلول‌ها اثر داده شد. سپس در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار میزان مرگ سلول‌ها اندازه‌گیری شد. به این صورت که درون هر چاهک ۲۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه کرده و بعد از گذشت ۴ ساعت که ظروف در داخل انکوباتور نگهداری شدند، چاهک‌ها را تخلیه کرده و داخل هر چاهک ۱۵۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد. در نهایت جذب نوری با دستگاه ELISA reader در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد. برای تحلیل داده‌ها از نظر آماری از نرم افزار Graphpad prism6 استفاده شد. این سنجش برای ترکیب سیناروپیکرین، قبلاً در مطالعه ای توسط همین گروه در دانشگاه فردوسی مشهد انجام شده است.

بررسی اثر هم‌افزایی دارویی

پس از سنجش MTT، غلظتی از دارو که باعث مرگ ۵۰٪ سلول‌ها در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت می‌شود (IC₅₀) با نرم افزار محاسبه شد. IC₅₀، مربوط به ترکیب سیناروپیکرین در این زمینه، طی مطالعه قبلی اشار شده در بخش بالا به دست آمده بود (جدول شماره ۱). نسبت IC₅₀ محاسبه شده برای سیناروپیکرین در سه بازه زمانی بر IC₅₀ پاکلی‌تاکسول در این سه بازه (IC₅₀ سیناروپیکرین / IC₅₀ پاکلی‌تاکسول) به صورت میکرومولار محاسبه شد تا نسبت ثابت ترکیب پاکلی‌تاکسول با سیناروپیکرین مشخص گردد. سپس دو غلظت بالاتر و پایین تر از مقادیر IC₅₀ هر دو ماده، با رعایت نسبت ثابت ترکیب بر حسب میکرومولار، برای نتیجه‌گیری دقیق‌تر تعیین گردید. سپس با استفاده از نرم‌افزار (Biosoft, Cambridge, UK) ثابت ترکیب (Combinatin Index: CI) و همچنین ثابت کاهش دوز (Dose Reduction Index: DRI) محاسبه شدند که نتایج آن در جدول شماره (۲) برای ۲۴، ۴۸ و ۷۴ ساعت نشان داده شده است.

نتایج

جدول شماره (۱): IC₅₀ محاسبه شده برای سیناروپیکرین و پاکلی‌تاکسول در سه بازه زمانی بر حسب $\mu\text{g/ml}$

ترکیب	IC ₅₀ 24h	IC ₅₀ 48h	IC ₅₀ 72h
Cynaropicrin	30	19	13
Paclitaxol	8	6	4

جدول شماره (۲): CI و DRI محاسبه شده برای سیناروپیکرین و پاکلی تاکسول در سه بازه زمانی

24h	CI value	DRI cin	DRI pac	48h	CI values	DRI cin	DRI pac	72h	CI value	DRI cin	DRI pac
IC ₅₀	1.02615	1.93799	1.96020	IC ₅₀	0.70633	2.72682	2.94462	IC ₅₀	0.87937	2.53517	2.06222
IC ₇₅	0.9999	1.93567	2.06963	IC ₇₅	0.75960	2.37788	2.94937	IC ₇₅	0.95894	2.31727	1.89610
IC ₉₀	0.97487	1.93178	2.26742	IC ₉₀	0.82076	1.88920	2.95738	IC ₉₀	1.04572	1.99252	1.64658
IC ₉₅	0.95869	1.93066	2.32782	IC ₉₅	0.86746	1.76807	2.95969	IC ₉₅	1.10919	1.90772	1.58101

بحث

خاصیت ضدسرطانی سیناروپیکرین با پژوهش‌های چو و همکاران در سال ۲۰۰۰ به اثبات رسید. پس از چو مطالعات برای نشان دادن اثر درمانی سیناروپیکرین بر انواع سرطان‌های دیگر توسط افرادی چون سالوادور، زونگ، ها و همکاران انجام شد که نتایج بسیار عالی و مثبت بود. با توجه به بروز بالای سرطان مری در ایران و مطالعه اثر درمانی چشمگیر سیناروپیکرین در سرطان، در این پژوهش اثر سیناروپیکرین در ترکیب با داروی ضد سرطان پاکلی تاکسول که در درمان سرطان مری استفاده می‌شود با روش بسیار دقیق چو-تالالی بررسی شد. CI کمتر از یک، نشان دهنده‌ی اثر هم‌افزایی می‌باشد، که هرچه میزان آن پایین‌تر بیانگر هم‌افزایی قوی‌تر می‌باشد. در ۴۸ ساعت قوی‌ترین اثر هم‌افزایی مشاهده شد. بیشترین میزان تقویت اثر (DRI) نیز برای هر دو ترکیب در حدود ۳ برابر به دست آمد. نتایج این پژوهش و تحقیقات دیگری که در زمینه‌ی ترکیب داروها انجام شده است، نشان می‌دهد که استفاده ترکیبی از داروهای موثر موجود می‌تواند زمینه ساز درمان موفق‌تر بیماری‌هایی چون سرطان باشد. از عوامل تاثیرگذار در این زمینه که می‌توانند نتایج بسیار متفاوتی ایجاد کنند، در درجه اول می‌توان به استفاده از روش‌های معتبر برای ترکیب و در درجه دوم به وارد کردن متابولیت‌های گیاهی در طرح‌های ترکیبی اشاره کرد؛ چرا که مزیت این متابولیت‌ها نسبت به داروهای سنتزی در زمینه‌های متعدد به اثبات رسیده است. بنابراین می‌توان با اختصاص بخشی از هزینه‌های هنگفت در زمینه کشف دارو به پژوهش‌های ترکیب داروها، به ویژه داروهای گیاهی، باعث صرفه جویی اقتصادی و همچنین دستیابی به درمان موثرتر همراه با اثرات جانبی کمتر شد.

1. Sawyers, C. L. (2007). Cancer: mixing cocktails. *Nature*, 449(7165), 993-996.
2. Lindsay, M. A. (2003). Target discovery. *Nature reviews. Drug discovery*, 2(10), 831.
3. Goldin, A., & Mantel, N. (1957). The employment of combinations of drugs in the chemotherapy of neoplasia: a review. *Cancer Research*, 17(7), 635-654.

4. Berenbaum, M. C. (1977). Synergy, additivism and antagonism in immunosuppression. A critical review. *Clinical and experimental immunology*, 28(1), 1.
5. Loewe, S. (1953). The problem of synergism and antagonism of combined drugs. *Arzneimittelforschung*, 3, 285-290.
6. Webb, J. L. (1963). Effect of more than one inhibitor. *Enzyme and metabolic inhibitors*, 1, 66-79.
7. Veldstra, H. (1956). Synergism and potentiation. *Pharmacological reviews*, 8(3), 339-387.
8. Johnson, F. H., Eyring, H., Steblay, R., Chaplin, H., Huber, C., & Gherardi, G. (1945). The nature and control of reactions in bioluminescence. *The Journal of general physiology*, 28(5), 463-537.
9. Chou, T. C., & Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in enzyme regulation*, 22, 27-55.
10. Sokovic, M., Ciric, A., Glamoclija, J., & Skaltsa, H. (2017). Biological activities of sesquiterpene lactones isolated from the genus *Centaurea* L.(Asteraceae). *Current Pharmaceutical Design* 23, 2767-2786.
11. Budesinsky, M., & Saman, D. (1995). Carbon-13 NMR spectra of sesquiterpene lactones. *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, 30, 231-475.(1-12)
12. Zhang, S., Won, Y. K., Ong, C. N., & Shen, H. M. (2005). Anti-cancer potential of sesquiterpene lactones: bioactivity and molecular mechanisms. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 5(3), 239-249.
13. Elsebai, M. F., Mocan, A., & Atanasov, A. G. (2016). Cynaropicrin: A comprehensive research review and therapeutic potential as an anti-hepatitis C virus agent. *Frontiers in Pharmacology*, 7.
14. Kang, K., Lee, H. J., Kim, C. Y., Lee, S. B., Tunsag, J., Batsuren, D., & Nho, C. W. (2007). The chemopreventive effects of *Saussurea salicifolia* through induction of apoptosis and phase II detoxification enzyme. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(12), 2352-2359.
15. Akbari, M. R., Malekzadeh, R., Nasrollahzadeh, D., Amanian, D. & Sun, P. (2006). Familial risks of esophageal cancer among the Turkmen population of the Caspian littoral of Iran. *International Journal of Cancer* 119: 1047-1051.
16. Stoner, G. D. & Gupta A (2001) Etiology and chemoprevention of esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 22: 1737-1746.