مقاله پژوهشی

بررسی اثر تیمار ترکیبی تراستوزوماب و ایداروبیسین بر مهار رشد رده‌ی سلولی HER2 مثبت سرطان پستان

مسلم افراخته[۱]، مجید زینلی[۲*]، محمد علی غفاری[۱]، امین اله پورشهود[۱]، مصطفی جمالان[۱،۳]

۱- گروه بیوشیمی بالینی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران
۲- مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران
۳- دانشکده علوم پزشکی آبادان، آبادان، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۸/۰۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۳/۰۳

چکیده

زمینه و هدف: ایداروبیسین و تراستوزوماب (هرسپتین) دو عامل ضدتوموری هستند که در درمان سرطان مورداستفاده قرار می‌گیرند. ایداروبیسن یک عامل مهارکننده سنتز DNA است که در مقایسه با نسل‌های پیشین می‌تواند به شکل کاراتر جذب سلول‌های هدف شود. در این پژوهش اثر داروی ایداروبیسین به‌صورت ترکیبی همراه با تراستوزوماب بر روی مهار رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی Human epidermal growth factor receptor- 2 مثبت مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه از دو رده‌ی سلولی سرطان پستان با سطح بیان متفاوت گیرنده HER2 استفاده شد. پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون با غلظت‌های مختلف از عوامل ضد توموری، سمیت سلولی القاشده با استفاده از تست MTT ارزیابی شد.

نتایج: بر اساس یافته‌های مطالعه حاضر، نشان داده شد که استفاده از ایداروبیسین همراه با تراستوزوماب موجب مهار مؤثرتر و اختصاصی رشد سلول‌هایی با سطح بیان بالای HER2 نسبت به سلول‌های با سطح بیان طبیعی و پایین HER2 می‌شود. شکل ترکیبی تراستوزوماب و ایداروبیسین تقریباً ۱۷ درصد بیشتر بقاء سلولی رده‌ی سلولی SK-BR-3 را در مقایسه با رده‌ی سلولی MCF-7 در شرایط مشابه کاهش داده و باعث القای معنی‌دار ($p\leq ۰/۰۱$) مرگ سلول‌های SK-BR-3 در مقایسه با سلول‌های MCF-7 گردید.

نتیجه‌گیری: درنهایت به نظر می‌رسد، تیمار ترکیبی ایداروبیسین به همراه تراستوزوماب در سلول‌های سرطان پستان HER2 مثبت می‌تواند به‌عنوان درمانی اثربخش‌تر در راستای درمان اختصاصی بیماران مورد توجه و مطالعه بیشتر قرار گیرد.

کلمات کلیدی: ایداروبیسین، تراستوزوماب (هرسپتین)، سرطان پستان، درمان ترکیبی، HER2

مقدمه

گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال انسانی-۲ (HER2) یک گیرنده‌ی تیروزین کینازی با وزن مولکولی ۱۸۵ کیلودالتونی است که به خانواده‌ی گیرنده‌های فاکتور رشد اپیدرمال یا EGFR[۲] تعلق دارد (۱، ۲). در انسان خانواده‌ی HER از چهار عضو HER1، HER2، HER3 و HER4 تشکیل شده است، که ازلحاظ ساختاری مشابه یکدیگر هستند (۳). میزان بیان HER2 در سلول‌های بالغ نرمال، سطح پایینی دارد (۴) درحالی‌که در ۲۰ تا ۳۰ درصد از سرطان‌های پستان و تخمدان به شکل بیش از اندازه بیان می‌شود، به‌گونه‌ای که بیش از ۲ میلیون مولکول گیرنده در سطح سلول توموری پستان مشاهده می‌شود (۵). HER2 با عملکرد پیچیده‌ای که دارد نقش‌های مهمی در رشد، بقاء و تمایز سلولی ایفا می‌کند. مسیرهای پیام‌رسان عمده که به واسطه‌ی HER2 فعال می‌شوند شامل مسیرهای MAPK و PI3K می‌باشند (۵). این مسیرهای انتقال پیام در بقاء و تکثیر سلول‌های سرطانی نقش مهمی دارند (۶). تراستوزوماب (که بانام تجاری هرسپتین شناخته می‌شود) اولین آنتی‌بادی مونوکلونالی (mAb) است که برای درمان بیماران مبتلا به سرطان پستان (با سطح بالای بیان HER2) استفاده شده است (۷). تراستوزوماب

*نویسنده مسئول: **مجید زینلی**، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران
Email: zeinalim@ripi.ir

[1] Human Epidermal receptor 2
[2] Epidermal Growth Factor Receptor

یک آنتی‌بادی مونوکلونال مهندسی‌شده از نوع ایمونوگلوبولین G1 است که مستقیماً به بخش خارج سلولی گیرنده HER2 متصل می‌شود. پیش از این نشان داده شده است که تیمار فاز دوم و سوم درمان سرطان متاستاتیک با استفاده از این دارو می‌تواند فعالیت درمانی مشهودی را بر ضدسرطان پستان HER2 مثبت القا کند (۷).

مکانیسم عمل تراستوزوماب دقیقاً مشخص نشده است اما چند مکانیسم محتمل در این رابطه معرفی گردیده است که مهم‌ترین آن‌ها عبارت‌اند از: ممانعت از دیمریزاسیون گیرنده HER2، افزایش تخریب اندوسیتیک گیرنده، مهار عملکرد دومین‌های خارج سلولی HER2 و فعال‌سازی سیستم ایمنی علیه HER2 (۸، ۹). تراستوزوماب قادر به تحریک پاسخ‌های ضدتوموری است اما زمانی که با شیمی‌درمانی همراه شود می‌تواند عملکرد مؤثرتری از خود نشان دهد (۱۰). ایداروبیسین (۴-متیل دانوروبیسین) یک عامل ضدتوموری انتراسیکلین و آنالوگ دانوروبیسین است که ازنظر ساختار شیمیایی اختلاف آن‌ها در یک گروه متوکسی است. ایداروبیسین نسبت به دانوروبیسین چربی‌دوست‌تر بوده و از میان موکوس معدی-روده‌ای سریع‌تر عبور کرده و به میزان بیشتری توسط سلول‌های توموری در شرایط *in vitro* جذب می‌گردد. علاوه بر موارد ذکرشده، ایداروبیسین نسبت به دانوروبیسین سمیت قلبی کمتر و قدرت ضدتوموری پنج تا شش برابری دارد (۱۱-۱۵). مکانیسم عمل ایداروبیسین شامل قرار گرفتن بین جفت بازهای DNA و مهار آنزیم توپوایزومراز نوع ۲ است. علاوه بر این، ایداروبیسین با افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن موجب تخریب ساختار DNA و غشاء سلولی می‌شود (۱۶). این دارو در مقادیر بالا، اثرات مهاری بر روی تکثیر رده‌های سلولی توموری پستان، تخمدان، دهانه‌ی رحم و سلول‌های ملانومایی دارد (۱۷). حتی درمان‌های هدفمند در تومورهای جامد در بسیاری از موارد با عود مجدد تومور همراه می‌شوند و به دلیل مقاومت سلول‌های سرطانی پاسخ به این درمان‌ها غالباً کوتاه مدت است. یک راه‌حل اساسی برای مقابله با سلول‌های سرطانی مقاوم به درمان، استفاده از روش‌های درمان ترکیبی است (۱۸). چهار دهه تحقیق در رابطه با اولین درمان هدفمند که شامل استفاده از داروی ایماتینیب (یک مهارکننده تایروزین کیناز) علیه یک انکوژن فعال بود، سپری شده است (۱۸، ۱۹). پس از آن، درمان‌های هدفمند در بسیاری از سرطان‌ها به سرعت توسعه یافته است، از جمله درمان‌های هدفمند توسعه یافته در سرطان پستان می‌توان به استفاده از آنتی‌بادی تراستوزوماب بر ضد گیرنده‌ی HER2 و مهارکننده‌ی تایروزین کینازی لاپاتینیب اشاره کرد (۲۰). پتانسیل درمان ترکیبی به وسیله عوامل هدفمند، موفقیت داروهای شیمی‌درمانی در درمان لوکمی‌ها و سایر سرطان‌ها را تقویت می‌کند (۲۱). امروزه تراستوزوماب در ترکیب با یک عامل شیمی‌درمانی سیتوتوکسیک برای درمان بیماران با سرطان پستان HER2 مثبت به شکل معمول تجویز می‌شود (۲۲، ۲۳).

در این پژوهش، داروهای آنتی نئوپلاستیک ایداروبیسین، تراستوزوماب و ترکیبی از این دو به عنوان داروهای ضد سرطانی جهت ممانعت از رشد اختصاصی سلول‌های SK-BR-3 (HER2 مثبت) مورد استفاده قرار گرفتند و اثربخشی، اختصاصیت و هدفمندی این عوامل به‌صورت مجزا و ترکیبی علیه دو رده‌ی سلولی با سطوح بیان متفاوت HER2 ارزیابی و مقایسه شدند.

مواد و روش ها

۲-۱- مواد مورد استفاده

ماده‌ی MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)، آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و استرپتومایسین از شرکت Sigma-Aldrich (امریکا)، تراستوزوماب از شرکت Gentech (امریکا)، ایداروبیسین از شرکت Selleckchem (امریکا) و محیط کشت DMEM و FBS از شرکت Gibco (امریکا) تهیه شد. تریپسین و رنگ تریپان بلو از شرکت ایده زیست نوترکیب (ایران) خریداری شد. فلاسک کشت سلول و پلیت ۹۶ چاهکی کشت سلول از شرکت Nunc (دانمارک) تهیه شد.

۲-۲- روش کار

۲-۲-۱- کشت سلول

دو رده‌ی سلولی SK-BR-3 و MCF-7 در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند. رده‌ی سلولی SK-BR-3 (تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستور، ایران)، یکی از رده‌های سلولی با سطح بیان بالای گیرنده‌ی HER2 است که از سرطان بدخیم پستان مشتق شده است. رده‌ی سلولی MCF-7 (تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستور، ایران) یک رده‌ی سلولی سرطان پستان با سطح بیان پایین و طبیعی گیرنده‌ی HER2 است. هر دو رده‌ی سلولی در محیط کشت DMEM با گلوکز ۴/۵ گرم در لیتر و گلوتامین، حاوی آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و استرپتومایسین و

FBS ده درصد کشت داده شدند. این سلول‌ها هر دو تا سه روز یک مرتبه پس از رسیدن به تراکم ۸۰ درصد پاساژ داده شده و در فلاسک‌های مخصوص کشت سلول با شرایط دمایی ۳۷ درجه و در اتمسفری از دی‌اکسید کربن ۵ درصد نگهداری شدند. در ابتدا غلظت‌های مختلف از نیم تا ده نانوگرم بر میلی‌لیتر از ایداروبیسین، غلظت‌های مختلف از یک تا هزار نانوگرم تراستوزوماب تهیه شد. به منظور انجام تیمار توأم[3]غلظت‌های مختلفی از ۱ تا ۱۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر از تراستوزوماب و غلظت ثابت ۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر از ایداروبیسین تهیه شد. سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت با غلظت‌های مختلف از شکل مجزای ایداروبیسین، شکل مجزای تراستوزوماب آزاد و مخلوط هرسپتین و ایداروبیسین تیمار شدند.

۲-۲-۲- سنجش سمیت سلولی

سمیت سلولی ایداروبیسین، تراستوزوماب و ترکیبی از این دو علیه سلول‌های MCF-7 و SK-BR-3 مورد بررسی قرار گرفت. سوسپانسیون سلولی در میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی با تراکم ۱۰۰۰۰ سلول بر چاهک کشت داده شد و پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت، سلول‌ها با عوامل ضد سرطانی فوق‌الذکر به مدت ۷۲ ساعت تیمار شدند. پس از آن، سلول‌ها دومرتبه با بافر فسفات شسته شده و پس از اضافه نمودن محیط تازه به چاهک‌ها، به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از آن، محیط رویی سلول‌ها دور ریخته شد و سمیت سلولی ترکیبات با اضافه کردن محلول زردرنگ MTT[4] مورد ارزیابی قرار گرفت. تغییر رنگ MTT از زرد به بنفش به واسطه فعالیت دهیدروژنازهای میتوکندریایی صورت می‌گیرد و این تغییر رنگ مقیاسی برای زنده بودن و یا تکثیر سلول‌ها است. پس از ۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و اتمسفر CO_2 پنج درصد، DMSO به چاهک‌ها اضافه شد و رنگ ایجاد شده با استفاده از دستگاه الایزا ریدر در طول‌موج ۴۹۰ نانومتر و با تصحیح پس‌زمینه در طول‌موج ۶۲۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت.

۳-۲-۲- تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های نمایش داده شده میانگینی از حداقل سه مرتبه تکرار هستند. مقادیر انحراف معیار (±SD) بر روی نمودار مربوطه نمایش داده شده است. روش آماری مورد استفاده two-way ANOVA است و ارزیابی معنی‌داری داده‌ها با P-value کمتر از ۰/۰۵ صورت گرفته است.

نتایج

سمیت سلولی عامل شیمی‌درمانی ایداروبیسین به تنهایی و به شکل ترکیبی با تراستوزوماب علیه دو رده‌ی سلولی سرطان پستان بررسی شد. این رده‌های سلولی به دلیل سطوح بیان متفاوت از HER2 مورد انتخاب قرار گرفتند. رده‌ی سلولی SK-BR-3 گیرنده HER2 را در مقادیر بسیار بالا بیان می‌کند درحالی‌که سلول‌های MCF-7 سطح بیان طبیعی HER2 را نشان می‌دهند (۱۸، ۱۹). همچنین رده‌ی سلولی MCF-7 گیرنده‌های استروژن و پروژسترون را بیان می‌کند در حالی که گیرنده‌های استروژن و پروژسترون در رده‌ی سلولی SK-BR-3 بیان نمی‌شوند.

۳-۱- تیمار سلول‌های MCF-7 و SK-BR-3 با غلظت‌های مختلف ایداروبیسین

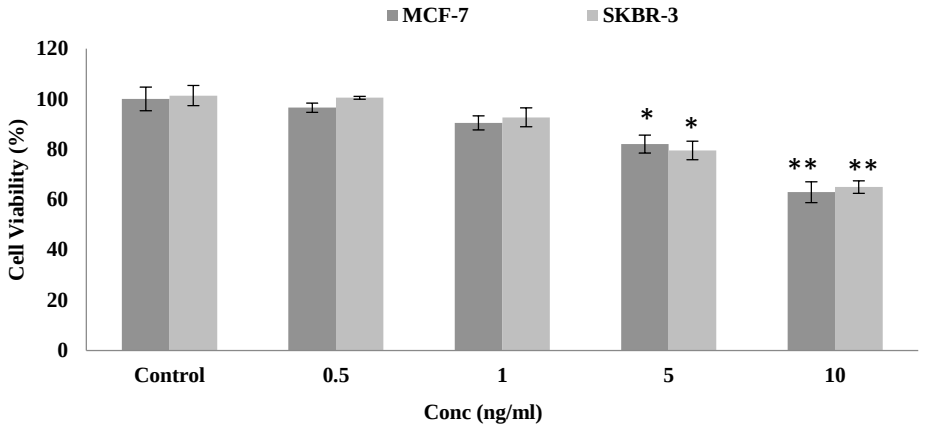
اثر سمیت سلولی ایداروبیسین بر روی هر دو رده‌ی سلولی تقریباً یکسان و مشابه بود (نمودار ۱). نتایج حاصل از مطالعات ما نشان داد که ایداروبیسین علاوه بر رده‌ی سلولی MCF-7، رشد رده‌ی سلولی SK-BR-3 را نیز به طریقی مشابه و وابسته به غلظت مهار می‌نماید. غلظت ۱۰ نانوگرم از ایداروبیسن، بیشترین اثر در مهار رشد این دو رده‌ی سلولی را نشان داد.

۳-۲- تیمار سلول‌های MCF-7 و SK-BR-3 با غلظت‌های مختلف تراستوزوماب

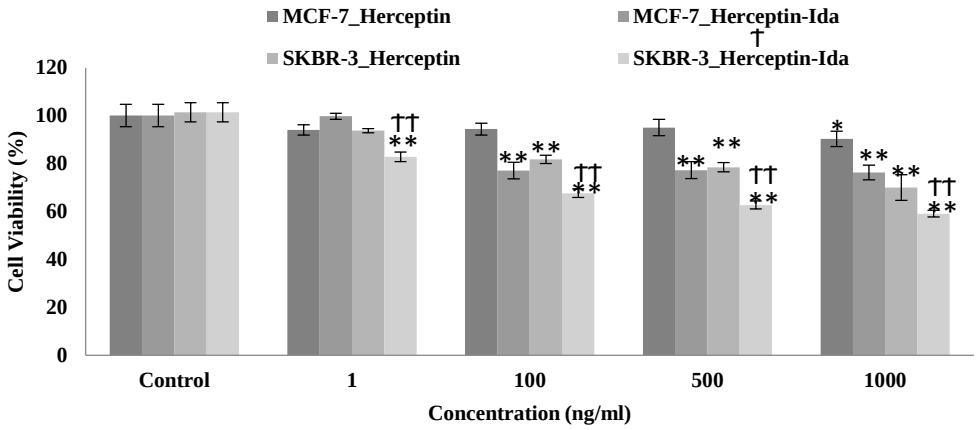
نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که اثر تراستوزوماب بر روی رده‌ی سلولی MCF-7 در غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر تقریباً ثابت بوده و رشد سلولی حداکثر به میزان ۱۰ درصد در غلظت ۱۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر کاهش یافته است. تفاوت معناداری بین غلظت‌های مختلف تراستوزوماب در کاهش تکثیر سلول‌های MCF-7 مشاهده نشد اما در رده‌ی سلولی SK-BR-3 با افزایش غلظت هرسپتین، رشد سلولی به شکلی معنی‌دار و تقریباً متناسب با غلظت کاهش یافت، به‌طوری‌که تراستوزوماب در غلظت ۱۰۰۰ نانوگرم به میزان ۳۰ درصد رشد سلول‌ها را مهار کرد (نمودار ۲). نتایج حاصل از مطالعات ما نشان داد که مطابق انتظار اثر تراستوزوماب در مهار رشد رده‌ی سلولی SK-BR-3 نسبت به MCF-7 چشمگیرتر است (نمودار ۲).

[3]Combination therapy

[4]3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide



نمودار ۱- اندازه‌گیری میزان سمیت سلولی القاشده توسط ایداروبیسین در رده‌های سلولی MCF-7 و SK-BR-3 برحسب غلظت‌های مختلف ایداروبیسین، دو رده‌ی سلولی SK-BR-3 و MCF-7 به مدت ۷۲ ساعت در معرض ایداروبیسین (غلظت‌های نیم تا ده نانوگرم بر میلی‌لیتر) قرار گرفتند. با افزایش غلظت ایداروبیسین، مرگ سلولی در هر دو رده‌ی سلولی به شکل معنی‌داری افزایش یافت (p≤۰/۰۵) (*نشان‌دهنده p≤۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل و ** نشان‌دهنده p≤۰/۰۱ در مقایسه با گروه کنترل است).



نمودار ۲- میزان سمیت سلولی رده‌های سلولی MCF-7 و SK-BR-3 برحسب غلظت‌های مختلف تراستوزوماب و غلظت ثابت ایداروبیسین، دو رده‌ی سلولی SK-BR-3 و MCF-7 به مدت ۷۲ ساعت با استفاده از تراستوزوماب و ترکیب تراستوزماب و ایداروبیسین تیمار شدند. تیمار توأم هرسپتین و ایداروبیسین باعث القای معنی‌دار (p≤۰/۰۱) مرگ سلول‌های SK-BR-3 در مقایسه با سلول‌های MCF-7 گردید.(* نشان‌دهنده p≤۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل و ** نشان‌دهنده p≤۰/۰۱ در مقایسه با گروه کنترل است. †نشان‌دهنده p≤۰/۰۵ در مقایسه با دیگر رده سلولی تیمار شده با غلظت‌های برابر و †† نشان‌دهنده p≤۰/۰۱ در مقایسه با دیگر رده سلولی تیمار شده با غلظت برابر است).

۳-۳- تیمار سلول‌های MCF-7 و SK-BR-3 با ترکیبی از ایداروبیسین و تراستوزوماب

ترکیب دو عامل آنتی نئوپلاستیک ایداروبیسین و تراستوزوماب باعث افزایش اثر سمیت سلولی قابل ملاحظه‌ای بر روی رده‌ی سلولی SK-BR-3 نسبت به MCF-7 شد. نتایج حاصل شده نشان داد که با افزایش غلظت تراستوزوماب از ۱ نانوگرم به ۱۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر در حضور غلظت ثابت ۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر از ایداروبیسین، بقای سلول‌های SK-BR-3 به‌طور چشمگیری کاهش می‌یابد. تراستوزوماب در بیشترین غلظت مورد استفاده در این مطالعه (۱۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر) همراه با غلظت ثابتی از ایداروبیسین (۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر) اثر چشمگیری بر روی بقای رده‌ی سلولی MCF-7 در مقایسه با

رده‌ی سلولی SK-BR-3 نداشت. شکل ترکیبی این دو عامل بر روی رده‌ی سلولی SK-BR-3 نسبت به شکل‌های آزاد تراستوزوماب و ایداروبیسین باعث القای معنی‌دار ($p\leq ۰/۰۱$) مرگ در سلول‌های SK-BR-3 در مقایسه با سلول‌های MCF-7 در شرایط مشابه گردید (نمودار ۲).

بحث و نتیجه گیری

در روند این مطالعه ظرفیت ضد سرطانی ایداروبیسین و تراستوزوماب به صورت مجزا و ترکیبی بر روی دو رده‌ی سلولی سرطان پستان بررسی شد. گیرنده‌ی تیروزین کینازی خانواده‌ی ErbB یا گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال موجب فعال شدن مسیرهای انتقال پیام[5]نابه جا در بسیاری از تومورهای جامد می‌شوند (۲۴). این گیرنده‌های گذرنده از غشا شامل چهار عضو EGFR(ErbB1)، HER2(ErbB2)، HER3(ErbB3) و HER4(ErbB4) می‌باشند که در تنظیم، تکثیر، تمایز و مهاجرت سلولی نقش دارند (۲۵). برای هرکدام از گیرنده‌ها لیگاندهایی وجود دارد که به دومین خارج سلولی آن‌ها متصل می‌شوند درحالی‌که هنوز لیگاندی برای HER2 شناخته نشده است. همچنین این گیرنده‌ها به‌جز HER3 دارای خواص تیروزین کینازی سیتوپلاسمی هستند که مسیر سیگنالینگ رشد سلول را فراهم می‌کنند (۲۶، ۲۷). در این میان HER2 شریک اتصالی EGFR است و هترودیمر EGFR/HER2 قدرت انتقال پیام بیشتری نسبت به همودیمر HER2/HER2 دارد. HER2 می‌تواند به‌صورت همودیمر به یک HER2 دیگر و یا به‌صورت هترودیمر به یکی از گیرنده‌های EGFR متصل گردد (۲۸). اتصال فاکتور رشد اپیدرمال (EGF) به گیرنده‌ی خود در سطح سلول‌های توموری پستان رده‌ی SK-BR-3 موجب فسفریله شدن سریع پروتئین ErbB2 (HER2) و فعال شدن مسیر انتقال پیام می‌شود (۲۹). آنتی‌بادی ضد HER2 انسانی یا تراستوزوماب (هرسپتین) امروزه برای درمان سرطان پستان استفاده می‌شود. این آنتی‌بادی تکثیر رده‌ی سلولی SK-BR-3 با سطح بیان بالای HER2 را مهارمی‌کند (۲۶). نتایج مطالعات ما نشان داد که مطابق با پژوهش‌های پیشین، تراستوزوماب در مهار رشد رده‌ی سلولی SK-BR-3 نسبت به MCF-7 به‌طور چشمگیری مؤثرتر است (نمودار ۲). نتایج یک مطالعه‌ی بر روی بیماران مبتلا به سرطان متاستاتیک پستان نشان داده است که در بیماران با افزایش سطح بیان پروتئین HER2، تراستوزوماب به‌خوبی می‌تواند اثر مهاری خود را اعمال کند و همچنین استفاده از این آنتی‌بادی به همراه شیمی‌درمانی موجب اثربخشی بیشتر نسبت به مصرف تراستوزوماب به شکل مجزا می‌گردد (۳۰).

گوویرتز و همکاران اثر سمیت سلولی ایداروبیسین بر روی رده‌ی سلولی MCF-7 را بررسی کرده و نشان داده بودند که رشد این رده‌ی سلولی در غلظت تقریباً ۵ نانوگرم از ایداروبیسین در حدود پنجاه درصد مهار می‌شود. ایداروبیسین رشد سلولی و سنتز DNA را در رده‌ی سلولی MCF-7 از طریق اثر بر توپوایزومرازها مهار می‌نماید (۳۱). اورلاندی و همکاران نشان دادند که ایداروبیسین و ایداروبیسینول فعالیت سمیت سلولی قابل‌ملاحظه‌ای بر روی سلول‌های MCF-7 multicellular Spheroid نسبت به سلول‌های MCF-7 Monolayer داشته است (۳۲). در مطالعه‌ی حاضر با ارزیابی اثرسمیت سلولی ایداروبیسین بر روی دو رده‌ی سلولی MCF-7 و SK-BR-3 مشاهده شد که ایداروبیسین بر روی هر دو رده‌ی سلولی اثر سمیت سلولی تقریباً یکسانی دارد. کارلوس اسودو گادیا و همکاران در مطالعات بالینی نشان دادند که ترکیب تراستوزوماب با سیرولموس موجب افزایش فعالیت ضد توموری تراستوزوماب می‌گردد. آن‌ها درنهایت به این نتیجه دست یافتند که این نوع درمان ترکیبی موجب بهبود تحمل بیماران مبتلا به سرطان پستان متاستاتیک (که دوره‌ی درمان با تراستوزوماب را طی کرده بودند) به روند درمان می‌شود (۳۳). درمان ترکیبی تراستوزوماب با داروی شیمی‌درمانی وینورلبین در زنان با سرطان پستان پیشرفته HER2 مثبت موجب می‌شود که کشندگی سلول سرطانی و تحمل دارو در این بیماران بیشتر گردد. نتایج حاصل از این بررسی‌ها نشان داد که درمان ترکیبی در بیماران با سرطان پستان HER2 مثبت، فرآیندی عملی و امکان‌پذیر است (۳۴). در همین راستا در سال ۲۰۱۶ فادی فرهات و همکاران اثر درمان ترکیبی تراستوزوماب به همراه وینورلبین به شکل خوراکی را بررسی نمودند. نتایج به‌دست‌آمده اثربخشی و تحمل‌پذیری بیماران با سرطان پستان HER2 مثبت به این نوع درمان را تأیید نمود (۳۵). در مطالعه‌ی حاضر تراستوزوماب به شکل ترکیبی با عامل سیتوتوکسیک ایداروبیسین مورد استفاده قرار گرفت و میزان اثربخشی بهتری در مقایسه با شکل مجزای تراستوزوماب در مهار رشد رده‌ی سلولی SK-BR-3 نشان داده شد. لوئیس فلیپس و همکاران یک روش درمان ترکیبی گزارش کردند که

[5]Signal Transduction

تراستوزوماب توسط یک پیوند کووالانت به عامل سیتوتوکسیک مایتانسینوئید متصل می‌گردد. شکل کونژوگه تراستوزوماب و مایتانسینوئید (T-DM1) فعالیت ضد تکثیری بیشتری در مقایسه با شکل مجزای تراستوزوماب بر روی رده‌ی سلولی HER2 مثبت نشان داد (۳۶). علاوه بر این، ترکیب آنتی‌بادی پرتوزوماب با T-DM1 در موش‌های مدل زنوگرافت و محیط کشت سلول افزایش فعالیت ضدتوموری آن‌ها را در مقایسه با شکل آزاد پرتوزوماب نشان داده است (۳۷).

در حال حاضر درمان ترکیبی از روش‌های نتیجه بخشی است که در درمان سرطان‌های پیشرفته و بدخیم مورد استفاده قرار می‌گیرد. در سرطان پستان این درمان به شکل استفاده‌ی یک داروی سیتوتوکسیک همراه با آنتی‌بادی تراستوزوماب مورد استفاده قرار می‌گیرد به گونه‌ای که سبب مهار بهتر و اختصاصی‌تر رشد سلولی و از بین رفتن سلول‌های سرطانی می‌شود. نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه‌ی حاضر نشان داد که استفاده‌ی ترکیبی از ایداروبیسین همراه با تراستوزوماب موجب سمیت سلولی بیشتر و افزایش مهار رشد رده‌ی سلولی SK-BR-3 نسبت به MCF-7 می‌گردد. با توجه به نتایج مثبت و مؤثر به‌دست‌آمده در طی این پژوهش در محیط *in vitro* به نظر می‌رسد که بررسی دقیق‌تر روش درمانی پیشنهاد شده در محیط *in vivo* می‌تواند مورد توجه قرار بگیرد و در صورت تکرار نتایج مثبت به دست آمده می‌توان این روش درمانی ترکیبی را به‌عنوان یک پروتکل درمانی جدید جهت درمان سرطان‌های HER2 مثبت مورد توجه و مطالعه بیشتر قرار داد.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر حاصل طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی (با شماره CMRC-113) از دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز است.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T, Semba K, Nomura N, Miyajima N, et al. Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor. Nature. 1986;319(6050):230-4.
2. Bargmann CI, Hung M-C, Weinberg RA. The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. Nature. 1986;319(6050):226-30.
3. Tai W, Mahato R, Cheng K. The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. Journal of Controlled Release. 2010;146(3):264-75.
4. Pressl MF, Cordon-Cardo C, Slamon DJ. Expression of the HER-Z/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. Liver. 1990;7:7.
5. Venter D, Kumar S, Tuzi N, Gullick W. Overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein in human breast carcinomas: immunohistological assessment correlates with gene amplification. The Lancet. 1987;330(8550):69-72.
6. Valabrega G, Montemurro F, Aglietta M. Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. Annals of oncology. 2007;18(6):977-84.
7. Montemurro F, Aglietta M. Incorporating trastuzumab into the neoadjuvant treatment of HER2-overexpressing breast cancer. Clinical breast cancer. 2005;6(1):77-80.
8. Hudis CA. Trastuzumab—mechanism of action and use in clinical practice. New England Journal of Medicine. 2007;357(1):39-51.
9. Sliwkowski MX, Lofgren JA, Lewis GD, Hotaling TE, Fendly BM, Fox JA, et al. Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). Seminars in oncology; 1999.
10. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. New England Journal of Medicine. 2001;344(11):783-92.
11. Arcamone F, Bernardi L, Giardino P, Patelli B, Marco A, Casazza AM, et al. Synthesis and antitumor activity of 4-demethoxydaunorubicin, 4-demethoxy-7, 9-diepidaunorubicin, and their beta anomers. Cancer treatment reports. 1976;60(7):829-34.
12. Banning JW, Abramson HN, Wormser HC, Wu J, Corbett TH. Relative cardiotoxicity and cytotoxicity of anthraquinonyl glucosaminosides. Cancer chemotherapy and pharmacology. 1987;19(3):207-12.
13. Casazza A, Di Marco A, Bonadonna G, Bonfante V, Bertazzoli C, Bellini O, et al. Effects of modifications in position 4 of the chromophore or in position 4′ of the aminosugar, on the antitumor activity and toxicity of daunorubicin and doxorubicin. Anthracyclines: current status and new developments: Academic Press, New York; 1980. p. 403-30.
14. Di Marco A, Casazza A, Pratesi G. Antitumor activity of 4-demethoxydaunorubicin administered orally. Cancer treatment reports. 1977;61(5):893.

15. Penco S, Casazza A, Franchi G, Barbieri B, Bellini O, Podesta A, et al. Synthesis, antitumor activity, and cardiac toxicity of new 4-demethoxyanthracyclines. Cancer treatment reports. 1982;67(7-8):665-73.
16. Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. Pharmacological reviews. 2004;56(2):185-229.
17. Berens ME, Saito T, Welander CE, Modest EJ. Antitumor activity of new anthracycline analogues in combination with interferon alfa. Cancer chemotherapy and pharmacology. 1987;19(4):301-6.
18. Bozic I, Reiter JG, Allen B, Antal T, Chatterjee K, Shah P, et al. Evolutionary dynamics of cancer in response to targeted combination therapy. Elife. 2013;2:e00747.
19. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. New England Journal of Medicine. 2006;355(23):2408-17.
20. Higgins MJ, Baselga J. Targeted therapies for breast cancer. The Journal of clinical investigation. 2011;121(10):3797-803.
21. Devita VT, Young RC, Canellos GP. Combination versus single agent chemotherapy: a review of the basis for selection of drug treatment of cancer. Cancer. 1975;35(1):98-110.
22. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. New England Journal of Medicine. 2005;353(16):1659-72.
23. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer Jr CE, Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. New England Journal of Medicine. 2005;353(16):1673-84.
24. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. Nature reviews Molecular cell biology. 2001;2(2):127-37.
25. Schlessinger J. Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors. Science. 2004;306(5701):1506-7.
26. Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway J, Henner D, Wong W, et al. Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1992;89(10):4285-9.
27. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. Science. 1989;244(4905):707-12.
28. Lenferink AE, Pinkas-Kramarski R, van de Poll ML, van Vugt MJ, Klapper LN, Tzahar E, et al. Differential endocytic routing of homo-and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers. The EMBO journal. 1998;17(12):3385-97.
29. King CR, Borrello I, Bellot F, Comoglio P, Schlessinger J. Egf binding to its receptor triggers a rapid tyrosine phosphorylation of the erbB-2 protein in the mammary tumor cell line SK-BR-3. The EMBO journal. 1988;7(6):1647.
30. Goldenberg MM. Trastuzumab, a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody, a novel agent for the treatment of metastatic breast cancer. Clinical therapeutics. 1999;21(2):309-18.
31. Gewirtz DA, Randolph JK, Chawla J, Orr MS, Fornari FA. Induction of DNA damage, inhibition of DNA synthesis and suppression of c-myc expression by the anthracycline analog, idarubicin (4-demethoxy-daunorubicin) in the MCF-7 breast tumor cell line. Cancer chemotherapy and pharmacology. 1998;41(5):361-9.
32. Orlandi P, Barbara C, Bocci G, Fioravanti A, Di Paolo A, Del Tacca M, et al. Idarubicin and idarubicinol effects on breast cancer multicellular spheroids. Journal of chemotherapy. 2005;17(6):663-7.
33. Acevedo-Gadea C, Hatzis C, Chung G, Fishbach N, Lezon-Geyda K, Zelterman D, et al. Sirolimus and trastuzumab combination therapy for HER2-positive metastatic breast cancer after progression on prior trastuzumab therapy. Breast cancer research and treatment. 2015;150(1):157-67.
34. Burstein HJ, Kuter I, Campos SM, Gelman RS, Tribou L, Parker LM, et al. Clinical activity of trastuzumab and vinorelbine in women with HER2-overexpressing metastatic breast cancer. Journal of Clinical Oncology. 2001;19(10):2722-30.
35. Farhat F, Kattan JG, Ghosn M. Oral vinorelbine in combination with trastuzumab as a first-line therapy of metastatic or locally advanced HER2-positive breast cancer. Cancer chemotherapy and pharmacology. 2016;77(5):1069-77.
36. Phillips GDL, Li G, Dugger DL, Crocker LM, Parsons KL, Mai E, et al. Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody–cytotoxic drug conjugate. Cancer research. 2008;68(22):9280-90.
37. Phillips GDL, Fields CT, Li G, Dowbenko D, Schaefer G, Miller K, et al. Dual targeting of HER2-positive cancer with trastuzumab emtansine and pertuzumab: critical role for neuregulin blockade in antitumor response to combination therapy. Clinical Cancer Research. 2014;20(2):456-68.

Original Article

Investigating the Combination therapy effect of Trastuzumab and Idarubicin on Growth Inhibition of HER2-Positive Breast Cancer Cells Line (SK-BR-3)

Afrakhteh M[1], Zeinali M[2*], Ghaffari MA[1], Pourshohod A[1], Jamalan M[1, 3]

1. Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Cellular and Molecular Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
2. Biotechnology Research Center, Research Institute of Petroleum Industry (RIPI), Tehran, Iran
3. Abadan School of Medical Sciences, Abadan, Iran

Received: 30 Oct 2016 Accepted: 24 May 2017

Abstract

Background & Objectives: Trastuzumab and Idarubicin (4-methyl-daunorubicin) are two anti-neoplasmic agents that are widely used in cancer therapy. Idarubicin is more lipophilic than its parent drugs such as daunorubicin, therefore it is absorbed more efficiently by the target cells. The main aim of this study was to Investigate the combinational effect of Trastuzumab (as anti-HER2 monoclonal antibody) and Idarubicin on growth inhibition of HER2 positive breast cancer cells.

Material & Methods: In this study, SK-BR-3 cell line as HER2-positive and MCF-7 as cell line with low-level of expression of HER2 were used for treatment process. After 72 hours incubation treatment with various concentrations of indicated agents, induced cytotoxicity of various concentrations of idarubicin, trastuzumab, and idarubicin-trastuzumab as combination was assessed by MTT assay.

Results: the results showed that Idarubicin discretely induced similar effect on both cell lines but trastuzumab as it expected induced its effect based on the level of HER2 expression and thus inhibited SK-BR-3 cell line growth in a more potent manner. Between all of treatment methods, idarubicin-trastuzumab therapy was the most efficient and specific treatment for the reduction of cell viability of SK-BR-3 cells as HER2-positive cell line compared to CMF-7 cell line. Indicated combination therapy, reduced viability of SK-BR-3 cells to 17% in comparison with MCF-7 cell line in similar conditions, and induced a significant ($p \leq 0.01$) SK-BR-3 cell death compared to MCF-7 cells.

Conclusion: It seems that idarubicin combination therapy with trastuzumab in HER2-positive breast cancer cells can be used as an alternative effective treatment.

Keywords: Idarubicin, Trastuzumab (Herceptin), Breast Cancer, Combinational Therapy, HER2

***Corresponding Author: Majid Zeinali,** Biotechnology Research Center, Research Institute of Petroleum Industry (RIPI), Tehran, Iran. Email: zeinalim@ripi.ir

Journal of Fasa University of Medical Sciences 7 (2017): 353-360