

## Cytotoxic and apoptotic effects of neurokinin-1 receptor (NK1R) antagonist on multiple myeloma cells

Elham Razani<sup>1</sup>, Davood Bashash<sup>2</sup>

1. Department of Hematology and Blood Banking, School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. ORCID ID:0000-0001-5556-811x

2. Department of Hematology and Blood Banking, School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Darband St., Qods Sq., Tehran, I.R.Iran, Tel:021-2272115, Email:d.bashash@sbmu.ac.ir. ORCID ID:0000-0002-8029-4920

### ABSTRACT

**Background and Aim:** Despite therapeutic improvements in recent decades, multiple myeloma (MM) still remains as one of the leading causes of death all over the world. Previous studies have indicated role of neurokinin-1 receptor (NK1R) in the pathogenesis of cancer. Therefore, we decided to evaluate cytotoxic and apoptotic effects of aprepitant (NK1R antagonist) on MM-derived KMM-1 cell line.

**Material and Method:** In this experimental study, for assessment of cytotoxic effect of aprepitant on MM cells, KMM-1 (prepared in Tarbiat Modarres University) were exposed to different concentrations of the inhibitor (5, 15, 30 and 45  $\mu$ M) and subsequently viability, cell count, metabolic activity, and induction of apoptosis were investigated using trypan blue, MTT, and annexin/PI staining assays respectively. Moreover, in order to examine the molecular mechanism of action of aprepitant in KMM-1 cells, gene expression analysis was performed by real-time PCR.

**Results:** The results indicated that NK1R inhibition using aprepitant resulted in considerable growth suppression of KMM-1 cells. Moreover, we found that the cytotoxic effects were likely due to cell arrest in G1 phase and induction of apoptosis, as revealed by the increased percentage of annexin-V/PI double positive cells among the inhibitor-treated cells ( $P<0.05$ ). Also, RQ-PCR analysis revealed aprepitant changed the ratio of expression of pro apoptotic to anti apoptotic genes by way of alteration in the expression levels of Bax and Bcl-2 ( $P<0.05$ ).

**Conclusion:** The present study highlighted the efficiency of aprepitant in suppression of the growth of KMM-1 cells; however, further studies are needed to determine the safety and efficacy of this agent for the treatment of MM patients.

**Key words:** Multiple myeloma, NK1R, Aprepitant, KMM-1 cell line.

Received: Oct27,2018

Accept: Sep2,2019

**How to cite the article:** Elham Razani, Davood Bashash. Cytotoxic and apoptotic effects of neurokinin-1 receptor (NK1R) antagonist on multiple myeloma cells. SJKU 2019; 24 (5): 1-11

## اثرات سایتوتوکسیک و آپوپتوتیک مهارکننده نوروکینین-۱ رستپتور (NK1R) بر سلول-های مالتیپل میلوما

الهام رازانی<sup>۱</sup>، داوود بشاش<sup>۲</sup>

۱. کارشناسی ارشد خون‌شناسی و بانک خون، گروه خون‌شناسی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. ارکید: ۸۱۱X-۵۵۵۶-۰۰۰۱-۰۰۰۱

۲. دکترای تخصصی خون‌شناسی و بانک خون، دانشیار گروه خون‌شناسی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران (نویسنده مسئول)، تلفن ثابت: ۰۲۱-۲۲۷۲۱۱۵-۰۲۱، Email: d.bashash@sbmu.ac.ir، ارکید: ۴۹۲۰-۸۰۲۹-۰۰۰۲-۰۰۰۰-۰۰۰۰

### چکیده

**سابقه و هدف:** با وجود پیشرفت‌های درمانی در دهه‌های اخیر، مالتیپل میلوما (MM) همچنان یکی از دلایل مهم مرگ و میر در جهان است. بر اساس مطالعات قبلی که بیانگر نقش Neurokinin-1 Receptor (NK1R) در پاتوژنز سرطان‌ها بوده است. هدف این مطالعه تعیین اثرات سایتوتوکسیک و آپوپتوتیک Aprepitant (آنتاگونیست NK1R) را در رده سلولی KMM-1 (مشتق از MM) بود.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی، برای بررسی اثرات سایتوتوکسیک Aprepitant در مالتیپل میلوما، رده سلولی KMM-1 (تهیه‌شده از دانشگاه تربیت مدرس) با دوزهای مختلف مهارکننده (۵، ۱۵، ۳۰ و ۴۵ میکرومولار) تیمار گشته و سپس درصد زنده‌مانی، شمارش سلولی، فعالیت متابولیک و القاء آپوپتوز به ترتیب با استفاده از تریپان بلو، MTT و رنگ آمیزی Annexin/PI بررسی گردید. علاوه بر این، آنالیز بیان ژن به کمک روش Real-time PCR جهت تعیین مکانیسم مولکولی عملکرد Aprepitant در سلول‌های KMM-1 انجام شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که مهار NK1R با استفاده از Aprepitant موجب مهار رشد سلول‌های KMM-1 می‌شود. همچنین مشاهده شد؛ اثرات سایتوتوکسیک دارو ناشی از توقف سلول‌ها در فاز G1 و القاء آپوپتوز است؛ چرا که درصد سلول‌های رنگ گرفته با Annexin/PI در سلول‌های تیمار شده افزایش یافته بود ( $p < 0.05$ ). همچنین، نتایج Real-time PCR نشان داد که Aprepitant نسبت بیان ژن‌های پروآپوپتوتیک به آنتی آپوپتوتیک را از طریق تغییر بیان Bax و Bcl-2 تغییر می‌دهد.

**نتیجه‌گیری:** در این پژوهش، کارآمدی Aprepitant در سلول‌های KMM-1 کاملاً مشخص شد؛ با این وجود، برای تضمین بی-خطر و مؤثر بودن این دارو در درمان بیماران MM نیاز به انجام مطالعات بیشتر در آینده است.

**کلمات کلیدی:** مالتیپل میلوما، NK1R، Aprepitant، رده سلولی KMM-1

وصول مقاله: ۹۷/۶/۵ اصلاحیه نهایی: ۹۸/۶/۲ پذیرش: ۹۸/۶/۱۱

## مقدمه

مالتیپل میلوما (MM) Multiple Myeloma) نوعی بدخیمی است که با اختلال در مراحل انتهایی تمایز پلاسماسل‌ها شناخته شده و تجمع کلونال این سلول‌ها را در مغز استخوان به دنبال دارد. بیش از ۸۰۰۰۰ نفر سالانه در سراسر جهان به عنوان مورد جدید مبتلا به مالتیپل میلوما تشخیص داده شده و این بیماری دومین بدخیمی هماتولوژیک شایع در جهان است (۱). مبتلایان به این بیماری اغلب با علائم بالینی همچون نارسایی حاد کلیوی، آنمی شدید و نشانه‌های حاکی از بیماری‌های استخوان به مراکز درمانی مراجعه می‌کنند؛ بنابراین کنترل هرچه سریع‌تر بیماری یکی از مهم‌ترین اهداف است (۲). راه کارهای درمانی در دسترس، پیوند سلول‌های بنیادی و شیمی درمانی با دوز بالا است (۳) که ریشه‌کنی سلول‌های میلومایی از طریق مصرف این داروها به ندرت امکان‌پذیر است. همچنین، بخش عظیمی از این بیماران سرانجام به ترکیبات دارویی مورد استفاده مقاوم شده و یا میزان تأثیرپذیری آن‌ها نسبت به دارو کاهش چشمگیری می‌یابد (۱). حتی پیوند سلول‌های بنیادی نیز برای MM درمان قطعی محسوب نمی‌شود، چرا که معمولاً امکان بازگشت بیماری مدتی پس از پیوند وجود دارد (۴)، بنابراین لازم است که حتی بیماران پیوند شده نیز برای افزایش طول دوره بهبودی کامل (Complete remission) تحت درمان با داروهای سرکوب‌گر تومور قرار بگیرند (۵). طبق تحقیقات صورت گرفته روی بیماران MM مشخص گردید که تنها ۶۶٪ از این بیماران با کمک درمان‌های فعلی بهبود یافتند و همچنان بخش قابل توجهی از آن‌ها غیرقابل درمان می‌باشند (۶).

شناخت‌های نوین در خصوص مکانسیم بروز و بقاء تومور توانسته است راه‌گشای امیدبخش برای دستیابی به درمان‌های جدید جهت سرکوب و کنترل تومور باشد. مشخص شده است که فعالیت بیش از حد مسیرهای پیام‌رسانی که منجر به افزایش تکثیر و ممانعت از آپوپتوز می‌شوند یکی از موارد مقاومت به شیمی درمانی و عود تومور است (۷). مسیر

پیام‌رسانی رسپتور نوروکینین-۱ (NK1R) و لیگاند آن Substance P (SP) علاوه بر تنظیم بسیاری از اعمال فیزیولوژیک مرتبط با سیستم عصبی مرکزی و محیطی، قابلیت دخالت در پاتوژنز سرطان‌ها از طریق فعال‌سازی مسیرهای زیردست خود را نیز دارا است (۸). افزایش بیان این رسپتور و لیگاند آن در برخی از تومورها به اثبات رسیده است. همچنین، بیان NK1R در لنفوسیت‌های B و T و بیان SP در بلاست‌های بیماران لوسمی لنفوبلاستیک حاد گزارش شده است (۹). یکی از مهم‌ترین آنتاگونیست‌های NK1R داروی Aprepitant است که در حال حاضر جهت درمان تهوع و استفراغ حاد و تأخیری ناشی از شیمی درمانی در بالین کاربرد دارد. علاوه بر این، Aprepitant دارای اثراتی همچون ممانعت از درد، اضطراب و همچنین حفاظت از کبد و سیستم عصبی است. در کنار تمامی این تأثیرات، نقش این آنتاگونیست در مهار تکثیر سلولی، آنژیوژنز و مهاجرت سلول‌های توموری موجب گشته است که از این دارو به عنوان یک ترکیب آنتی تومور نیز یاد شود. به عنوان مثال اثر ضدسرطانی Aprepitant در سرطان سینه (۱۰)، هپاتوبلاستوما (۱۱) و برخی لوسمی‌ها (۱۲) و اثبات گشته است. در این مطالعه تأثیر Aprepitant بر روی رده سلولی KMM-1 که مشتق از مالتیپل میلوما است مورد بررسی قرار گرفت.

## روش بررسی

کشت و تیمار سلولی: در این مطالعه تجربی، سلول‌های KMM-1 (مشتق از مالتیپل میلوما) (تهیه‌شده از دانشگاه تربیت مدرس) در محیط کشت RPMI۱۶۴۰ همراه با ۱۰٪ FBS، ۱۰۰ U/ml پنی سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین کشت داده شد و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار دی-اکسید کربن ۵٪ نگهداری شدند. تیمار سلول‌های KMM-1 با غلظت‌های مختلف Aprepitant (۵-۴۵ میکرومولار) و در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت صورت گرفت. برای بررسی اثرات حلال روی میزان تکثیر و بقاء، سلول‌ها با غلظت مشخص از

DMSO به عنوان کنترل منفی تیمار شدند. تمامی آزمایش‌ها به منظور افزایش دقت کار به صورت سه گانه انجام شد. آزمون تریپان بلو: جهت بررسی تأثیر داروی Aprepitant بر میزان زنده‌مانی سلول‌ها، سلول‌های KMM-1 به تعداد  $5.4 \times 10^5$  cells/ml در 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 گشته، به مدت ۱ الی ۲ دقیقه انکوبه و پس از آن شمارش شد. سلول‌هایی که این رنگ را جذب می‌نمایند، جزء سلول‌های مرده و سلول‌هایی که هیچ رنگی را به خود جذب نکرده‌اند، زنده محسوب می‌شوند. سپس با استفاده از فرمول زیر میزان زنده‌مانی سلول‌ها محاسبه گردید:

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

بررسی فعالیت متابولیک سلول‌ها با MTT assay: برای ارزیابی تأثیر داروی Aprepitant بر فعالیت متابولیک سلول‌های KMM-1، تعداد ۵۰۰۰ سلول به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای حاوی و فاقد دارو اضافه و به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت در انکوباتور  $\text{CO}_2$  دار انکوبه شد. پس از گذشت مدت زمان مورد نظر، به سلول‌های داخل پلیت محلول (۵ MTT mg/ml) اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفت. سپس پلیت با دور ۱۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و پس از خالی کردن محلول رویی، ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد. جذب نوری هر چاهک توسط دستگاه ELISA reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد.

بررسی شاخص آپوپتوز با استفاده از فلوسایتومتری: به منظور بررسی تأثیر دارو بر القاء مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده، جهت سنتز cDNA مطابق با پروشور، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۵ ثانیه در ۸۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند.

$5 \times 10^5$  سلول در هر چاهک پلیت ۱۲ خانه‌ای ریخته شد و به مدت ۴۸ ساعت با غلظت‌های مختلف از داروی Aprepitant تیمار گردید. پس از شست‌وشوی سلول‌ها با بافر فسفات-سالین (PBS) و افزودن معرف‌های AnnexinV-FITC/PI (Roche، آلمان) و بافر انکوباسیون، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق انکوبه شدند. بررسی رنگ‌پذیری سلول‌ها با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری (PartecPasIII) و با طول موج تحریک ۴۸۸ نانومتر و بازتابش ۵۱۸ نانومتر انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم افزار ۶۷.۱ Flowjo صورت گرفت.

بررسی میزان فعالیت چرخه سلولی: سلول‌های KMM-1 در پلیت‌های ۶ خانه قرار گرفتند. سپس با Aprepitant برای مدت زمان ۴۸ ساعت تیمار شده و پس از گذشت زمان انکوباسیون، سلول‌ها با دور ۲۰۰۰ rpm برای زمان ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. در ادامه، سلول‌ها در اتانول ۷۰٪ فیکس شده و در دمای  $20^\circ\text{C}$  به مدت ۱۲ ساعت قرار گرفتند. سپس  $100 \mu\text{g/ml}$  RNase در PBS افزوده شده و بعد از افزودن PI به مقدار  $50 \mu\text{g/ml}$ ، محتویات DNA سلولی به وسیله فلوسایتومتری مورد مطالعه قرار گرفت و آنالیز آن از طریق نمودارهای به دست آمده صورت پذیرفت.

استخراج RNA و سنتز cDNA: پس از تیمار سلول‌ها با دوز ۵ و ۱۵ میکرومولار Aprepitant، استخراج RNA پس از گذشت ۴۸ ساعت با استفاده از ترايزول صورت گرفت. کمیت و درجه خلوص RNA استخراج شده، به روش اسپکتروفتومتری و با استفاده از دستگاه Nanodrop ۲۰۰۰ ND بررسی شد. جهت انجام واکنش رونویسی معکوس از کیت سنتز cDNA (Takara، ژاپن) استفاده شد.

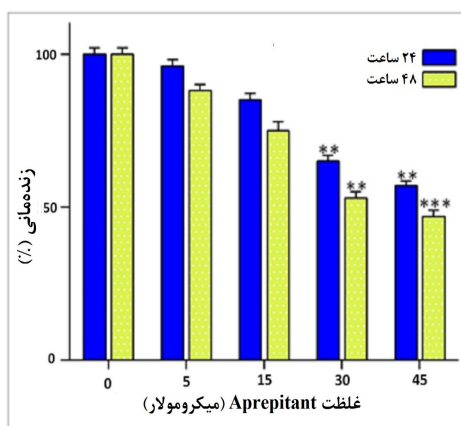
بررسی کمی بیان ژن‌های Bax و Bcl-۲: برای بررسی کمی بیان ژن‌های Bax و Bcl-۲ آزمون quantitative Real time RT-PCR انجام شد. به ازای هر واکنش، ۱۰ میکرولیتر SYBR green master mix (Amplicon)، ۲

است. به منظور بررسی اختصاصی محصول تکثیر شده، منحنی ذوب مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین محاسبه نسبی تعداد نسخه mRNA تکثیر شده با استفاده از فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  محاسبه گردید. توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام آزمون در جدول ۱ آورده شده است.

میکرولیتر cDNA، ۵/۰ میکرولیتر از هریک از پرایمرها (۱۰ پیکومولار) و ۷ میکرولیتر آب مقطر عاری از نوکلئاز استفاده شد. شرایط دمایی مورد استفاده شامل یک مرحله فعال سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در ادامه ۴۰ سیکل برای واسرشت (۵ ثانیه، ۹۵ درجه سانتی - گراد) و مرحله اتصال/بازآرایی توأم (۲۰ ثانیه، ۶۰ درجه)

جدول ۱. توالی پرایمرهای به کاررفته در آزمون Real Time Quantitative RT-PCR.

سایز (bp)	آغازگر مستقیم (5'-3')	آغازگر معکوس (5'-3')	Accession number	ژن
۱۱۱	TGGACAGGACTGAACGTCTTG	CCAGCAGGTCAGCAAAGAATTTA	NM_۰۰۰۱۹۴	HPRT
۲۴۲	CGAGAGGTCTTTTCCGAGTG	GTGGGCGTCCCAAAGTAGG	NM_۱۳۸۷۶۰	Bax
۲۴۹	CGGTGGGGTCATGTGTGTG	CGGTTTCAGGTACTCAGTCATCC	NM_۰۰۰۶۶۳	Bcl-۲



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

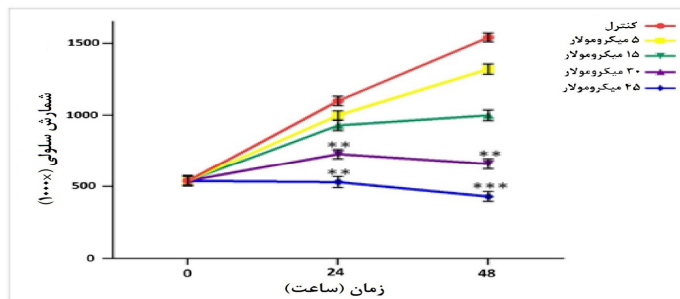
آنالیز آماری: تمامی آزمایش‌ها به شکل سه آزمون مستقل انجام و مقادیر گزارش شده به شکل Mean  $\pm$  SD قید شدند. هم‌چنین برای محاسبات آماری از روش Repeated measure ANOVA و نرم‌افزار SPSS 21 و GraphPad Prism 7 استفاده شد.

### یافته‌ها

Aprepitant سبب کاهش میزان زنده‌مانی سلول‌های KMM-1 به صورت وابسته به دوز و زمان می‌شود: نتایج حاصل از تست زنده‌مانی سلول‌های تیمار شده با دارو در کنار گروه کنترل نشان داد که میزان زنده‌مانی سلول‌ها در تیمار ۴۸ ساعته با دارو نسبت به تیمار ۲۴ ساعته کاهش شدیدتری یافته بود. همچنین مشاهده شد علی‌رغم اینکه دوز ۵ میکرومولار از Aprepitant اثر چشم‌گیری بر میزان زنده‌مانی سلول‌های KMM-1 نداشت، تیمار ۴۸ ساعته سلول‌ها با دوزهای بالاتر از این مهارکننده (۳۰ و ۴۵ میکرومولار) میزان زنده‌مانی را به ترتیب به میزان ۴۷ و ۵۳ درصد کاهش داده بود (نمودار ۱).

درحالی که این عدد برای دوزهای پایین تر شامل ۳۰، ۱۵ و ۵ میکرومولار به ترتیب دارای یک روند افزایشی بوده و در دوز ۵ میکرومولار Aprepitant به بیش از  $10^5 \times 15$  سلول رسید. اثرات آنتی پرولیفراتیو داروی Aprepitant روی سلول‌های مشتق از مالتیپل میلوما با توجه به نمودار ۲ به صورت وابسته به دوز و زمان گزارش گردید.

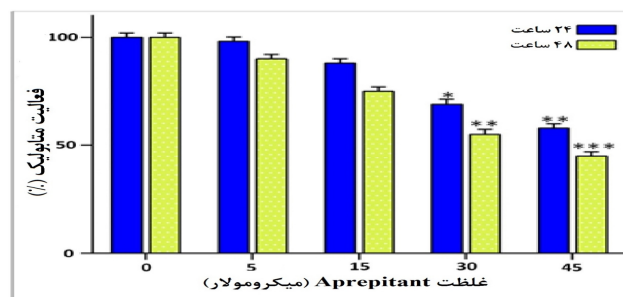
تیمار سلول‌های KMM-1 با داروی Aprepitant منجر به کاهش میزان تکثیر سلول‌ها به صورت وابسته به دوز و زمان می‌شود. نتایج حاصل از شمارش سلول‌های زنده بعد از مواجهه با داروی Aprepitant با انکوباسیون به مدت زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت نشان داد که میزان شمارش سلولی در مواجهه با دوز ۴۵ میکرومولار از دارو کمتر از  $10^5 \times 5$  است.



نمودار ۲. تأثیر وابسته به دوز و زمان داروی Aprepitant بر شمارش سلولی در سلول‌های KMM-1. سلول‌های KMM-1 به تعداد  $5.4 \times 10^5$  با غلظت‌های ۵ تا ۴۵ میکرومولار از Aprepitant تیمار شدند. همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود، تیمار با Aprepitant به صورت وابسته به دوز و زمان شمارش سلولی را کاهش داده است. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean  $\pm$  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.

را پس از گذشت ۲۴ ساعت تقریباً به میزان ۴۲٪ کاهش داد(نمودار ۳). به علاوه، اثر مهاري با گذشت زمان بیش‌تر نیز شد؛ به طوری که پس از گذشت ۴۸ ساعت از تیمار سلول‌ها با دوز ۴۵ میکرومولار، فعالیت متابولیک سلول‌های KMM-1 به میزان ۵۳٪ کاهش یافت(نمودار ۳).

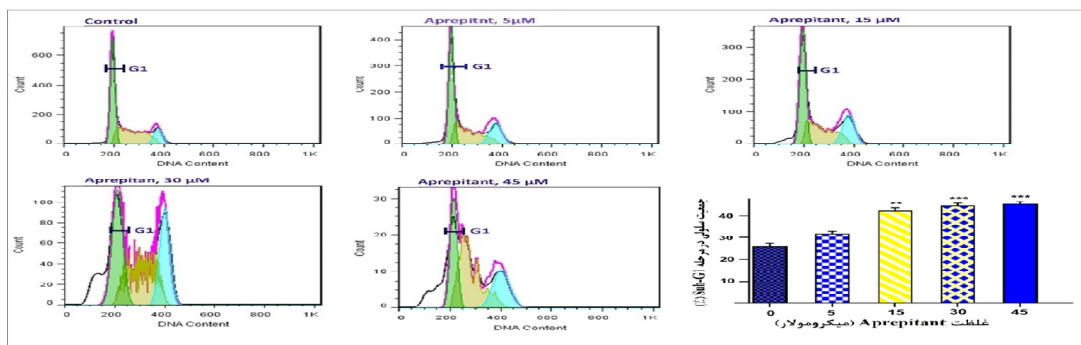
Aprepitant فعالیت متابولیک سلول‌های KMM-1 را کاهش می‌دهد: فعالیت متابولیک سلول‌های میلومایی که با تست MTT ارزیابی گردید، به صورت وابسته به دوز و زمان در مواجهه با دارو کاهش یافت. تیمار سلول‌ها با بالاترین دوز دارو (۴۵ میکرومولار) میزان فعالیت متابولیک



نمودار ۳. بررسی تأثیر داروی Aprepitant بر فعالیت متابولیک سلولی KMM-1. سلول‌ها در محیط حاوی دوزهای مختلف Aprepitant 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 ۴۵ میکرومولار در طی ۴۸ ساعت تخمین زده می‌شود. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean  $\pm$  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.

Aprepitant سبب افزایش جمعیت سلول‌های KMM-1 در فاز G1 چرخه سلولی می‌شود: در این مطالعه نشان داده شد که مهار NK1R در سلول‌ها توموری KMM-1 موجب توقف پیشروی چرخه سلولی و در نتیجه تجمع جمعیت سلول‌ها در فاز G1 چرخه می‌شود (نمودار ۴). همچنین بررسی محتوای DNA سلولی آشکار ساخت که داروی

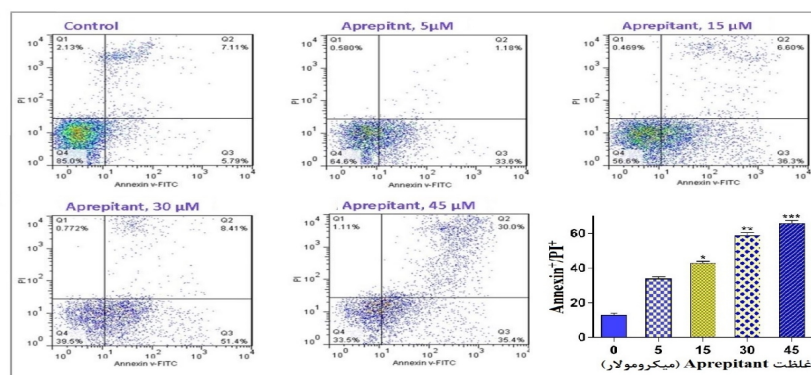
Aprepitant قادر است موجب افزایش تعداد سلول‌های حاضر در فاز Sub-G1 چرخه سلولی (بیانگر سلول‌های در حال مرگ) گردد. به طوری که درصد این جمعیت سلولی در دوز ۴۵ میکرومولار دارو در مقایسه با گروه کنترل از ۵/۹٪ به حدود ۱۴٪ افزایش یافته بود



نمودار ۴. تأثیر Aprepitant بر نحوه توزیع سلول‌های KMM-1 در مراحل مختلف چرخه سلولی: نتایج فلوسایتومتریکی بررسی نحوه توزیع سلول‌های تیمار شده با مهارکننده نشان داد که داروی Aprepitant باعث افزایش سلول‌ها در فاز G1 و Sub-G1 چرخه سلولی می‌گردد. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean  $\pm$  SD) محاسبه و P value به دست آمده (\*، \*\*، \*\*\* بیانگر  $P < 0.01$ ،  $P < 0.001$ ) نشان‌گر معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

دارو ۵، ۱۵، ۳۰ و ۴۵ به ترتیب ۳۴/۷۸٪، ۴۲/۹٪، ۵۹/۹٪ و ۶۵/۴٪ گزارش گردید. همان‌طور که در نمودار ۵ نشان داده شده است، داروی Aprepitant در القاء آپوپتوز در سلول‌های مشتق از مالتیپل میلوما دارای روند وابسته به دوز است.

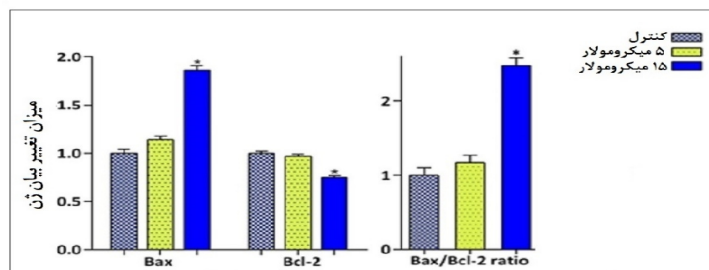
داروی Aprepitant منجر به القاء آپوپتوز در سلول‌های KMM-1 می‌شود: بررسی میزان اکسترنالیزه شدن فسفاتیدیل سرین بر سطح سلول‌های تیمار شده با دارو و مقایسه آن‌ها با گروه کنترل نشان داد که این دارو قادر به القاء آپوپتوز در رده سلولی KMM-1 است. در گروه کنترل (عدم مواجهه با دارو درصد سلول‌هایی که دچار آپوپتوز شده بودند تنها کمتر از ۱۴٪ محاسبه شد. این رقم برای دوزهای مختلف



نمودار ۵. بررسی درصد جمعیت سلول‌های آپپتوز شده پس از تیمار با دوزهای مختلف Aprepitant. تیمار سلول‌های KMM-1 با مهارکننده NK1R باعث افزایش درصد جمعیت هر دو سلول‌های  $Ann-V^+$  و  $Ann-V/PI^+$  می‌شود. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean  $\pm$  SD) محاسبه و  $P$  value به دست آمده (\*، بیانگر  $P < 0.01$  و \*\*\*، بیانگر  $P < 0.001$ ) نشان‌گر معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

همراه است. به دلیل افزایش بیان ژن Bax و کاهش بیان Bcl-2، نسبت Bax/Bcl-2 در سلول‌های مواجهه شده با دوزهای ۵ و ۱۵ میکرومولار نسبت به سلول‌های کنترل با افزایش همراه بوده است که خود را با افزایش میزان آپپتوز نشان داده است (نمودار ۶).

افزایش بیان Bax و کاهش بیان Bcl-2 به دنبال تیمار رده سلولی KMM-1 با Aprepitant: نتایج حاصل از آزمون quantitative Real time RT-PCR حاکی از آن است که تیمار سلول‌های KMM-1 با Aprepitant با افزایش بیان ژن پروآپپتوتیک Bax و کاهش بیان ژن آنتی‌آپپتوتیک Bcl-2



نمودار ۶. افزایش میزان رونویسی از ژن پروآپپتوتیک Bax و کاهش سطح mRNA ژن آنتی‌آپپتوتیک Bcl-2 طی تیمار ۴۸ ساعته سلول‌های KMM-1. سلول‌ها با دوزهای ۵ و ۱۵ میکرومولار Aprepitant برای مدت زمان 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  $\pm$  SD) محاسبه و  $P$  value به دست آمده (\*، بیانگر  $P < 0.05$ ) نشان‌گر معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

## بحث

کاهش فعالیت متابولیک و تعداد سلول‌های زنده شده بود. همچنین دوز ۴۵ میکرومولار آنتاگونیست NK1R با گذشت زمان از ۲۴ ساعت به ۴۸ ساعت میزان فعالیت متابولیک را از ۵۸٪ به ۴۵٪ کاهش داد. همان‌طور که بررسی‌های انجام شده در گذشته نشان می‌دهند اتصال SP به گیرنده خود یعنی NK1R می‌تواند موجب تحریک تکثیر سلولی، آنژیوژنز و مهاجرت سلول‌های توموری می‌گردد (۱۳). علاوه بر این، افزایش بیان NK1R بر سطح سلول‌های توموری نسبت به سلول‌های نرمال نیز یکی دیگر از یافته‌های مهم در این رابطه است (۱۴). در مطالعات

تمامی نتایج به دست آمده از این بررسی، تأییدکننده تأثیرگذاری داروی Aprepitant (که نوعی مهارکننده NK1R است) به عنوان یک داروی سایتوتوکسیک و آنتی‌پرولیفراتیو برای سلول‌های KMM-1 مشتق از مالتیل میلوما است. به طوری که نتایج حاصل از تست‌های تریپان‌بلو و MTT نشان دادند، با افزایش دوز و زمان تیمار سلول‌ها با دارو، تکثیر سلولی و فعالیت متابولیک به شکل معناداری کاهش می‌یافت؛ چنانچه دوز ۴۵ میکرومولار Aprepitant، ۲-۳ برابر دوز ۵ میکرومولار از همین دارو موجب



تکثیر سلولی موجب فعال شدن مکانیسم‌های آپوپتوز در این رده سلولی شود. تعداد زیادی از پروتئین‌ها در پروسه آپوپتوز دخیل هستند که دو پروتئین Bax و Bcl-2 از جمله مهم‌ترین آن‌ها می‌باشند. برخلاف Bax که پروتئینی پروآپوپتوتیک است، Bcl-2 آنتی آپوپتوتیک بوده و کاهش آن سبب راه‌اندازی مسیر آپوپتوز می‌گردد (۲۱). در نتیجه برهم خوردن توازن بین این دو پروتئین، یعنی افزایش Bax نسبت به Bcl-2 انتظار می‌رود که سلول به سمت آپوپتوز پیش‌روی نماید. با توجه به آنکه در این مطالعه پس از تیمار سلول‌های توموری KMM-1 با دوز ۱۵ میکرومولار میزان بیان Bax معادل ۲/۴۸ برابر میزان بیان Bcl-2 گشت، احتمال می‌رود که داروی Aprepitant از طریق تغییر بیان این ژن‌ها سلول‌های رده مالتیپل میلوما را به‌سوی مرگ سلولی سوق داده باشد.

### نتیجه گیری

می‌توان نتیجه گرفت؛ مهار NK1R با استفاده از داروی Aprepitant می‌تواند منجر به القاء آپوپتوز در سلول‌های توموری KMM-1 شده و به دنبال آن از میزان تکثیر و بقای این سلول‌ها بکاهد. شاید با وجود عوارض جانبی بسیار اندک، بتوان از Aprepitant به عنوان دارویی جدید در عرصه درمان بیماران مبتلا به مالتیپل میلوما استفاده کرد. ضمناً بررسی‌های بیشتر در رابطه با چگونگی عملکرد و تأثیرات بالینی این دارو در درمان این بدخیمی توصیه می‌شود.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به جهت تأمین بودجه تحقیق مطالعه حاضر تشکر و قدردانی می‌گردد.

قبلی نیز آشکار شده است که داروی Aprepitant، دارای اثرات ذکر شده در مواردی همچون ملانوما (۱۵)، سرطان کلون (۱۶)، سرطان سینه (۱۷)، لوسمی پرومیلوسیتیک حاد (۱۸) بسیاری دیگر از تومورها است. در مطالعه‌ای که توسط Munoz و همکاران صورت گرفته نیز گزارش شد که Aprepitant در غلظت‌های بیش از ۹۰ میکرومولار قادر به کاهش میزان بقای سلول‌های نرمال امبریونیک کلیوی (HEK cells) می‌شود (۱۹). از نتایج این مطالعه می‌توان این گونه استنباط کرد که غلظت Aprepitant به کاررفته در این پژوهش هیچ اثر کشندگی برای سلول‌های سالم ندارد. Berger و همکاران نیز نشان دادند که علی‌رغم آنکه غلظت‌های بالا Aprepitant قادر به القاء اثرات کشندگی در سلول‌های بدخیم هستند، این دارو تا غلظت ۴۰ میکرومولار قادر به القاء مرگ سلولی در سلول‌های فیروبلاست نیست (۱۱).

فرار از مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، یکی از راه‌های بقای سلول‌های توموری و ایجاد مقاومت دارویی در بیماران است (۲۰). از جمله نشانه‌های سلول آپوپتوز شده می‌توان به جوانه زدن غشاء، کوچک شدن سلول، قطعه قطعه شدن هسته، فشرده شدن کروموزوم، تکه تکه شدن DNA (۲۰) و همچنین افزایش بروز فسفاتیدیل سرین بر سطح خارجی سلول اشاره کرد (۲۱). برای ارزیابی میزان القاء آپوپتوز به واسطه تیمار سلول‌ها با Aprepitant، بروز سطحی فسفاتیدیل سرین با فلوسایتومتری بررسی شد که نتایج حاصله تأییدکننده این مطلب بود. به‌طوری که میزان سلول‌های آپوپتوز شده در دوز ۴۵ میکرومولار از دارو به ۶۵٪ رسید. با توجه به مرتبط بودن مسیر NK1R در پیشبرد تکثیر و چرخه سلولی، انتظار می‌رود مهار آن موجب تغییراتی در این فرایندها گردد. نتایج حاصل نشان داد که داروی Aprepitant می‌تواند با مهار فعالیت متابولیک سلول‌ها و نگه داشتن آن‌ها در مرحله Sub-G1 چرخه سلولی، علاوه بر کاهش

### References

1. Seckinger A, Delgado JA, Moser S, Moreno L, Neuber B, Grab A, et al. Target expression, generation, preclinical activity, and pharmacokinetics of the BCMA-T cell bispecific antibody EM801 for multiple myeloma treatment. *Cancer cell*. 2017;31(3):396-410.
2. Steinbach M, Richards T, Faiman B, editors. *Strategies for Selecting the Optimal Treatment in Newly Diagnosed Multiple Myeloma Patients*. *Seminars in Oncology Nursing*; 2017: Elsevier.

3. Attal M, Harousseau J-L, Leyvraz S, Doyen C, Hulin C, Benboubker L, et al. Maintenance therapy with thalidomide improves survival in patients with multiple myeloma. *Blood*. 2006;108(10):3289-94.
4. Spencer A, Prince HM, Roberts AW, Prosser IW, Bradstock KF, Coyle L, et al. Consolidation therapy with low-dose thalidomide and prednisolone prolongs the survival of multiple myeloma patients undergoing a single autologous stem-cell transplantation procedure. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(11):1788-93.
5. Mihelic R, Kaufman J, Lonial S. Maintenance therapy in multiple myeloma. *Leukemia*. 2007;21(6):1150.
6. Kumar SK, Dispenzieri A, Lacy MQ, Gertz MA, Buadi FK, Pandey S, et al. Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia*. 2014;28(5):1122.
7. Esteban F, Munoz M, Gonzalez-Moles M, Rosso M. A role for substance P in cancer promotion and progression: a mechanism to counteract intracellular death signals following oncogene activation or DNA damage. *Cancer and metastasis reviews*. 2006;25(1):137-45.
8. DeFea K, Zalevsky J, Thoma M, Dery O, Mullins R, Bunnett N.  $\beta$ -Arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *The Journal of cell biology*. 2000;148(6):1267-82.
9. Luo W, Sharif TR, Sharif M. Substance P-induced mitogenesis in human astrocytoma cells correlates with activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Cancer Research*. 1996;56(21):4983-91.
10. Muñoz M, Berger M, Rosso M, Gonzalez-Ortega A, Carranza A, Coveñas R. Antitumor activity of neurokinin-1 receptor antagonists in MG-63 human osteosarcoma xenografts. *International Journal of oncology*. 2014;44(1):137-46.
11. Berger M, Neth O, Ilmer M, Garnier A, Salinas-Martín MV, de Agustín Asencio JC, et al. Hepatoblastoma cells express truncated neurokinin-1 receptor and can be growth inhibited by aprepitant in vitro and in vivo. *Journal of hepatology*. 2014;60(5):985-94.
12. Razani E, Bayati S, Safaroghli Azar A, Bashash D, Ghafari A. Anti-cancer effect of aprepitant on Nb4 leukemic cells. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2017;19(10):28-34.
13. Rosso M, Munoz M, Berger M. The role of neurokinin-1 receptor in the microenvironment of inflammation and cancer. *The Scientific World Journal*. 2012;2012.
14. Zhou J, Ling J, Song H, Lv B, Wang L, Shang J, et al. Neurokinin-1 receptor is a novel positive regulator of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in melanogenesis. *Oncotarget*. 2016;7(49):81268.
15. Muñoz M, Pérez A, Rosso M, Zamarriego C, Rosso R. Antitumoral action of the neurokinin-1 receptor antagonist L-733 060 on human melanoma cell lines. *Melanoma research*. 2004;14(3):183-8.
16. Gillespie E, Leeman SE, Watts LA, Coukos JA, O'Brien MJ, Cerda SR, et al. Truncated neurokinin-1 receptor is increased in colonic epithelial cells from patients with colitis-associated cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(42):17420-5.
17. Ramkissoon SH, Patel PS, Taborga M, Rameshwar P. Nuclear factor- $\kappa$ B is central to the expression of truncated neurokinin-1 receptor in breast cancer: implication for breast cancer cell quiescence within bone marrow stroma. *Cancer research*. 2007;67(4):1653-9.
18. Bayati S, Razani E, Bashash D, Safaroghli-Azar A, Safa M, Ghaffari SH. Antileukemic effects of neurokinin-1 receptor inhibition on hematologic malignant cells: a novel therapeutic potential for aprepitant. *Anti-cancer drugs*. 2018;29(3):243-52.

19. Muñoz M, Rosso M. The NK-1 receptor antagonist aprepitant as a broad spectrum antitumor drug. *Investigational new drugs*. 2010;28(2):187-93.
20. Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. *Molecular cancer*. 2015;14(1):48.
21. Bayati S, Bashash D, Ahmadian S, Safaroghli-Azar A, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A, et al. Inhibition of tachykinin NK 1 receptor using aprepitant induces apoptotic cell death and G1 arrest through Akt/p53 axis in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells. *European journal of pharmacology*. 2016;791:274-83.