

مطالعه اثر ترکیب گیاهی Gossypol بر حساسیت سلول‌های توموری گلیوبلاستوما به پرتودرمانی به روش سنجش کلونی‌زایی

خلاصه

هدا کشمیری نقاب^۱

بهرام گلیایی^۲

علیرضا نیکوفر^۳

مقدمه: گلیوبلاستوما بدخیم‌ترین و معمول‌ترین فرم تومورهای سیستم عصبی مرکزی می‌باشد. گرچه گلیوبلاستوما به نقاط دوردست متاستاز نمی‌دهد، ولی به دلیل حساسیت مکان تومور، جراحی در بسیاری از موارد امکان‌پذیر نمی‌باشد. پرتودرمانی روشی مناسب و مفید جهت مقابله با این نوع تومور می‌باشد که می‌تواند پس از جراحی جهت از بین بردن سلول‌های باقی‌مانده یا به‌تنهایی مورد استفاده قرار گیرد ولی اغلب تومورهای گلیوبلاستوما مقاومت پرتویی بالایی از خود نشان می‌دهند. بنابراین تلاش برای یافتن ترکیبات بیولوژیکی که پاسخ سلول‌های توموری را به پرتو افزایش دهند، اثربخشی پرتودرمانی را بهبود می‌بخشد. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر ترکیب گیاهی گاسیپول بر پاسخ سلول‌های توموری گلیوما به پرتو در رده سلولی U-87 MG می‌باشد.

روش بررسی: با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از تست تریپان‌بلو و کلونی‌زایی با دارو، غلظت $1 \text{ M}\mu$ که حداقل تأثیر را بر روی Viability و کلونی‌زایی داشت، برای انجام سایر تست‌ها انتخاب گردید. پس از یافتن غلظت مناسب دارو، تست کلونی‌زایی در حضور دارو و دوزهای مختلف پرتو (۲، ۴ و ۶ گری)، هریک به‌تنهایی و تیمار ترکیبی از آن‌ها انجام گرفت. رده سلولی U-87 MG از سلول‌های آستروسیت (نوعی سلول گلیال یا پشتیبان) گلیوبلاستوما بدخیم انسانی جدا شده است. این رده سلولی از انستیتو پاستور ایران تهیه شده است.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که در تیمارهای ترکیبی (پرتو + گاسیپول) در مقایسه با تیمارهای تنها، توانایی کلونی‌زایی سلول‌های توموری گلیوبلاستوما به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است. از سوی دیگر داده‌های حاصل از منحنی بقا، واکنش میان گاسیپول و پرتو را به‌صورت سینرژیک نشان می‌دهد بدین معنی که اثر گاسیپول به‌همراه پرتو در کاهش کسر بقا از مجموع اثر هریک به‌تنهایی بیشتر است.

نتیجه‌گیری: از مهم‌ترین دلایل مقاومت پرتویی سلول‌های گلیوما می‌توان بیان بالای پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوتیک را ذکر نمود که مهار این پروتئین‌ها توسط گاسیپول سبب افزایش پاسخ این سلول‌ها به پرتو گردیده است.

واژه‌های کلیدی: گاسیپول، گلیوبلاستوما، پرتودرمانی، تست کلونی‌زایی

۱. عضو گروه پژوهشی ترمیم نوری، مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، دانشجوی دکتری بیوفیزیک، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۲. استاد گروه بیوفیزیک، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

۳. استادیار گروه رادیوتراپی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

نویسنده مسئول: بهرام گلیایی، تلفن ۶۱۱۱۳۳۵۶
پست الکترونیک: goliaei@ibb.ut.ac.ir

مقدمه

تومورهای گلیوبلاستوما مولتی فرم بدخیم‌ترین و تهاجمی‌ترین فرم گلیوما می‌باشد که با توجه به تمام پیشرفت‌هایی که در زمینه درمان این نوع تومور انجام گرفته است، میزان بقا در بیماران مبتلا بسیار پایین و حداکثر یک سال پس از تشخیص است. درمان استاندارد برای گلیوبلاستوما مولتی فرم شامل حداکثر برداشت تومور توسط جراحی و به دنبال آن رادیوتراپی بین ۲ تا ۴ هفته بعد از عمل جراحی برای از بین بردن تومور است. مطالعات انجام شده نشان داده‌اند که تومورهای گلیوبلاستوما مقاومت پرتویی بالایی از خود نشان می‌دهند [۱]. بنابراین کاربرد ترکیباتی که سبب افزایش پاسخ این تومورها به عوامل پرتودرمانی می‌شود در درمان این تومور اهمیت بسیار زیادی دارد. گاسیپول ترکیب پلی فنولیک زرد رنگی است که در غدد رنگدانه گیاه پنبه یافت می‌شود. گاسیپول در رنگیزه‌ها ترشح می‌شود و گیاه را در مقابل عوامل استرس‌زای محیط از قبیل حشرات، بیماری‌های گیاهی، شرایط نامساعد آب و هوا و اشعه ماورای بنفش خورشید محافظت می‌کند. این ترکیب دارای خواص بیولوژیکی متعددی است که از جمله آن می‌توان به فعالیت آنتی اکسیدانی، ضدسرطانی، ضدباکتریایی و ضدویروسی اشاره کرد [۲]. به دنبال ثابت شدن اثر ضد توموری گاسیپول در محدوده وسیعی از تومورها، اثرهای حساس‌کنندگی پرتویی و افزایش دهنده پاسخ پرتویی، مورد توجه محققان و به‌ویژه رادیولوژیست‌ها قرار گرفت.

اگرچه مکانیسم‌های بیوشیمیایی حساس‌کننده‌های پرتویی مانند گاسیپول کاملاً شناخته شده نیست ولی مطالعات نشان داده‌اند که این عوامل در واکنش با پروتئین‌های آنتی آپوپتوتیک مانند Bcl-2 و Bcl-XL می‌باشند. پروتئین‌های ضد آپوپتوزی که در غشای خارجی میتوکندری قرار دارند و در حفظ تمامیت غشایی میتوکندری نقش دارند به محض وارد شدن استرس اکسیداتیو از قبیل پرتو یونیزان و یا بروز سیگنال مرگ، پروتئین‌های پرو آپوپتوزی به شکاف هیدروفوب پروتئین‌های ضد آپوپتوز متصل می‌شوند، آن‌ها را غیر فعال می‌کنند و باعث القاء آپوپتوز می‌شوند. گاسیپول مهارکننده پروتئین‌های ضد آپوپتوزی و در نتیجه القاء کننده آپوپتوز می‌باشد [۳]. مطالعات انجام شده در این زمینه نشان می‌دهد که پروتئین‌های آنتی آپوپتوتیک خانواده Bcl-2 علاوه بر آپوپتوز، اتوفازی را نیز مهار می‌کنند. اتوفازی یک فرآیند چندمرحله‌ای است که به شدت توسط ژن‌های Atg و Bcl-2 کنترل می‌شود و یافته‌های اخیر نشان می‌دهد که پروتئین‌های آنتی آپوپتوتیک علاوه بر پروتئین‌های پرو آپوپتوتیک می‌توانند با پروتئین Atg 6/Bcl-2 کمپلکس تشکیل دهند و تشکیل و عدم تشکیل این کمپلکس عامل مهمی در تنظیم و تعدیل اتوفازی ناشی از پرتو می‌باشد [۴-۶].

در نتیجه گاسیپول که مهارکننده پروتئین‌های آنتی آپوپتوتیک می‌باشد،

آپوپتوز و اتوفازی را تسهیل می‌کند. در بسیاری از تومورها از جمله گلیوبلاستوما، نقص در مسیر سیگنالینگ آپوپتوز و بیان بالای پروتئین‌های آنتی آپوپتوتیک باعث مقاومت این تومورها به آپوپتوز ناشی از پرتودرمانی و شیمی‌درمانی می‌شود در نتیجه گاسیپول می‌تواند در شرایطی که آپوپتوز غیرفعال است، منجر به مرگ سلولی اتوفازی شود [۷]. از طرفی کاهش بقای کلونی‌زایی سلول‌ها تحت تأثیر عوامل مختلفی از قبیل مرگ آپوپتوزی، نکروزی و یا اتوفازی است. بدین ترتیب گاسیپول با القاء مرگ سلولی اتوفازی باعث کاهش توانایی کلونی‌زایی می‌شود. یکی از روش‌های شناخته شده و قابل اعتماد در مطالعات رادیوبیولوژیکی، روش سنجش توانایی کلونی‌زایی است. توانایی سلول برای رشد به صورت یک کلونی دلیل قابل قبولی برای حفظ قابلیت تولید مثل آن است. با توجه به اینکه بعد از تیمار سلول‌ها فقط بخشی از سلول‌های کشت داده شده توانایی تولید کلونی را در خود حفظ می‌کنند، این روش سنجش یک روش انتخابی برای تعیین مرگ تولید مثلی بعد از تیمار با پرتوهای یونیزان می‌باشد [۸]. گلیوبلاستوما مولتی فرم کشنده‌ترین نوع تومور مغزی است و در حال حاضر درمان قطعی برای آن وجود ندارد. با توجه به اینکه در مطالعات کلینیکی فاز I هیچ گونه اثر سمی و جانبی در غلظت‌های پایین این ترکیب در انسان مشاهده نشده است و همچنین با توجه به قابلیت عبور این ترکیب از سد خونی مغزی، این ترکیب می‌تواند در کاهش مقاومت پرتویی تومورهای گلیوبلاستوما مؤثر باشد. بر همین اساس هدف از مطالعه حاضر بررسی توانایی حساس‌کنندگی پرتویی یک متابولیت مهم به نام گاسیپول در رده سلولی تیپیک گلیوبلاستوما بدخیم انسانی به نام U-87 MG می‌باشد.

روش بررسی

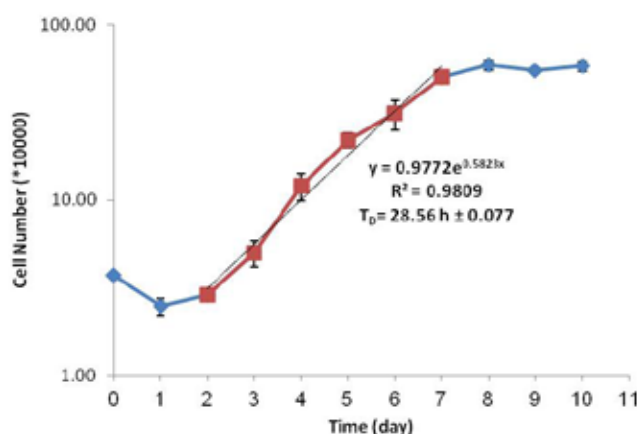
کشت تک لایه: رده سلولی مورد استفاده در این مطالعه U-87 MG از سلول‌های آستروسیت (نوعی سلول گلیال یا پشتیبان) گلیوبلاستوما بدخیم انسانی جدا شده و از انستیتو پاستور ایران تهیه شده است که در محیط کشت (RPMI (Gibco) حاوی پنی سیلین (۵۰۰ u/mL) (Sigma)، استرپتومایسین (۲۰۰ ug/mL) (جابرین حیان، تهران)، ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Gibco) و ۰/۲۲ گرم NaHCO_3 (Merck) کشت داده شده است. سلول‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO_2 و اشباع از رطوبت نگهداری شدند. جهت ترپسینه کردن سلول‌ها از محلول ۰/۲۵ درصد ترپسین و ۰/۰۳ درصد EDTA در بافر نمکی فسفات استفاده شد.

تعیین غلظت بهینه گاسیپول با استفاده از تست تریپان بلو: سلول‌های U-87 MG با چگالی Cell/well ۶۰۰۰ در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شدند. تیمارهای گاسیپول (با داشتن کنترل بدون تیمار و کنترل DMSO) با غلظت‌های نهایی ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرومولار اعمال شدند. لذا پس از ۴۸ ساعت تیمار با گاسیپول،

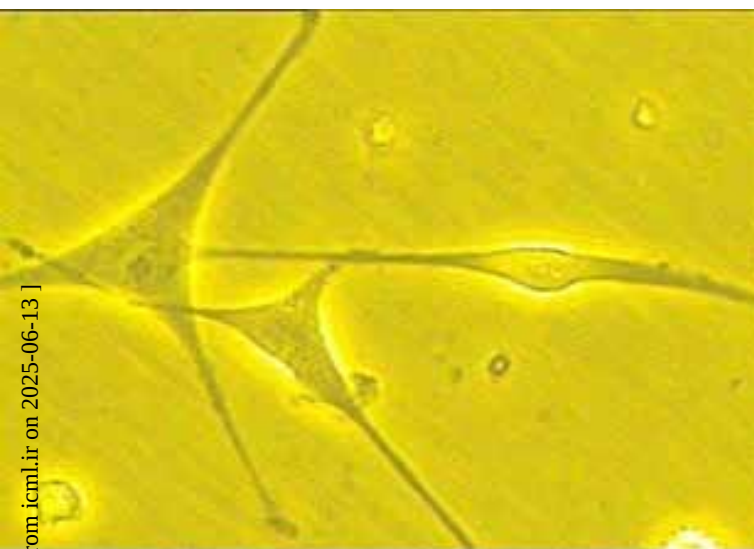
تحلیل واریانس) و تست Post Hoc Multiple Comparison استفاده شد.

یافته‌ها

رسم منحنی رشد و تعیین زمان دو برابر شدن سلول‌های U-87 MG برای بررسی نرخ رشد و بازه زمانی مؤثر انجام تیمارها منحنی رشد سلول‌های U-87 MG در مقیاس نیمه‌لگاریتمی به صورت تعداد سلول‌ها بر حسب زمان رسم شد. پس از رسم بهترین خط مماس بر فاز لگاریتمی منحنی و محاسبه شیب این خط، زمان دو برابر شدن سلول‌ها که معادل ۲۸/۵۶ ساعت می‌باشد، محاسبه گردید. شکل شماره ۱ منحنی رشد سلول‌های U-87 MG و شکل شماره ۲ مرفولوژی طبیعی این رده سلولی را نشان می‌دهد.



شکل ۱: منحنی رشد سلول‌های U-87 MG. زمان دو برابر شدن سلول‌ها از شیب خط فاز رشد لگاریتمی (خط قرمز رنگ) محاسبه شد. در این مرحله سلول‌ها به طور فعال در حال تکثیر می‌باشند و تعداد سلول‌ها به صورت لگاریتمی افزایش می‌یابد.



شکل ۲: شکل ظاهری سلول‌های U-87 MG در محیط کشت سلولی

تریپان‌بلو افزوده شد و سلول‌های زنده در ۲۰۰ سلول شمارش شدند. سنجش توانایی کلونی‌زایی سلول‌های U-87 MG در حضور گاسپول: پس از تعیین غلظت مناسب از دارو با تست تریپان‌بلو، در این مرحله توانایی کلونی‌زایی سلول‌ها در حضور غلظت‌های متفاوت دارو (۱/۵، ۱، ۵ و ۱۰ میکرومولار) بررسی می‌شود. بدین منظور تعداد ۱۰۰۰ سلول در هر سانتی‌متر مربع در فلاسک یا پتری کاشته می‌شود و پس از اینکه سلول‌ها به فاز لگاریتمی رسیدند محیط رویی سلول‌ها دور ریخته شدند و با غلظت‌های متفاوت دارو به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. سپس سلول‌ها تریپسینه و شمارش می‌شوند و بعد از آن تعداد متفاوتی از سلول‌ها در پلیت‌های ۶۰ میلی‌متری کشت داده شد و پس از ۹ روز انکوباسیون تعداد کلونی‌ها و راندمان کشت محاسبه گردید.

تعداد سلول‌های کشت داده شده / تعداد کلونی‌های به دست آمده = راندمان کشت

پرتودهی: در این مطالعه از دوزهای ۲، ۴ و ۶ گری دستگاه تولیدکننده اشعه ایکس واقع در بیمارستان پارس، مدل Primus ساخت شرکت زیمنس آلمان استفاده شد. لازم به ذکر است که انرژی پرتوی مورد استفاده ۶ Mev و آهنگ دوز ۲۰۰ cGy/min می‌باشد.

تعیین منحنی بقا به روش In vitro: برای انجام این آزمون و مقایسه توانایی کلونی‌زایی سلول‌های پرتو دیده در حضور و عدم حضور گاسپول، تعداد ۱۰۰۰۰ CELL/CM² در فلاسک‌ها کاشته شدند و پس از اینکه سلول‌ها در فاز لگاریتمی قرار گرفتند آماده پرتودهی شدند و تحت دوزهای مختلف پرتو قرار گرفتند و یک تعدادی از آن‌ها پس از پرتودهی با دارو نیز تیمار شدند. پس از آن سلول‌ها تریپسینه و شمارش شدند و تعداد معینی از آن‌ها در پلیت‌های ۶۰ میلی‌متری کشت داده شد. بعد از ۹ روز انکوباسیون تعداد کلونی‌ها شمارش و کسر بقا محاسبه می‌شود.

کسر بقا = راندمان کشت نمونه تیمار شده / راندمان کشت نمونه کنترل

پس از محاسبه کسر بقا منحنی دوز- پاسخ رسم گردید. سپس با استفاده از نرم افزار MATLAB این داده‌ها بر مدل خطی- درجه دو منطبق شد و پارامترهای α و β تعیین گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

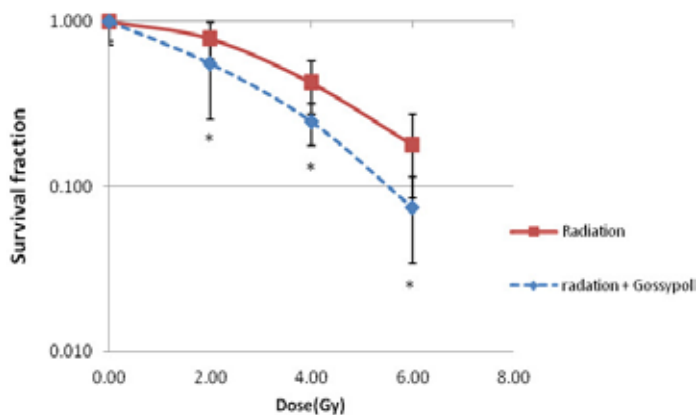
برای بررسی متغیرهای کمی از نرم افزار Excel استفاده شد. جهت بررسی معنی داری اختلاف میان میانگین‌های دو گروه تیمار پرتویی و تیمار ترکیبی در یک دوز مشخص، از نرم افزار SPSS نسخه ۱۷ و روش T-Test استفاده شد و برای سنجش معنی داری اختلاف میان میانگین‌های کلیه تیمارهای موجود در آزمایش از روش ANOVA

کلنی زایی دارد. لذا دوز تا حد $1 \mu\text{M}$ کاهش داده شد. بنابراین غلظت $1 \mu\text{M}$ که حداقل تأثیر را بر روی *viability* و کلونی‌زایی داشت، برای انجام سایر تست‌ها انتخاب گردید.

مقایسه توانایی کلونی‌زایی سلول‌های پرتودیده در حضور و عدم حضور گاسیپول: شکل شماره ۵ نمودار مدل Linear-Quadratic منحنی بقاء حاصل از این آزمایش را نشان می‌دهد. با توجه به شکل شماره ۵ و آنالیز آماری انجام‌شده در این زمینه در دوز صفر، $P.\text{value} > 0.05$ می‌باشد که بیانگر این است که بین میانگین کسر بقاء در حالت کنترل (فاقد هرگونه تیمار) و کنترل دارو (فقط تیمار با دارو) اختلاف معنی‌داری وجود ندارد اما، در دوزهای ۲، ۴ و ۶ گری، $P.\text{value} < 0.05$ می‌باشد که نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین کسر بقاها در دو گروه تیمار پرتویی و گروه تیمار ترکیبی می‌باشد. نتایج حاصل از تست کلونی‌زایی، کاهش توانایی کلونی‌زایی سلول‌ها را در مقابل پرتو و در حضور دارو نشان می‌دهد ضمن این‌که سمیت غلظت گاسیپول استفاده‌شده که موجب کاهش توانایی کلونی‌زایی سلول‌ها در تیمارهای ترکیبی (گاسیپول و پرتو) می‌شود، در بدن بسیار کم و ناچیز بوده است. جدول شماره ۱ مقادیر پارامترهای مربوط به منحنی‌های بقاء را نشان می‌دهد. شکل شماره ۶ وضعیت کلونی‌ها را در پرتی‌ها و در تیمارهای مختلف نشان می‌دهد.

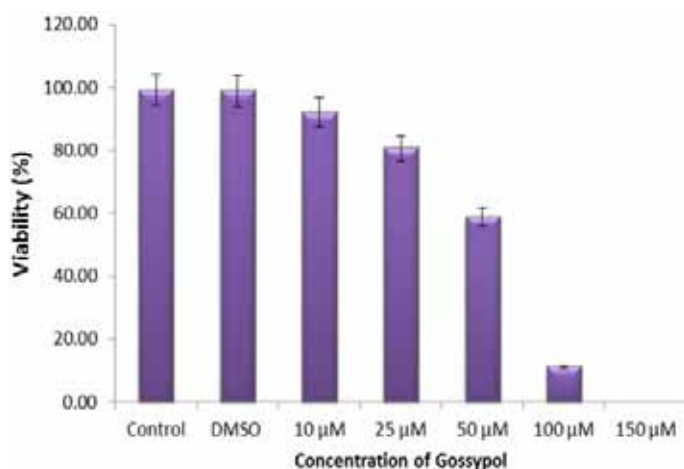
جدول ۱: مقایسه پارامترهای مدل خطی - درجه دو سلول‌های تیمار شده با پرتو به تنهایی و پرتو به همراه گاسیپول

Treatment	α value	β value
پرتو	۰۵۲/۰	۰۴۲/۰
پرتو + گاسیپول	۲۲۹/۰	۰۳۱/۰

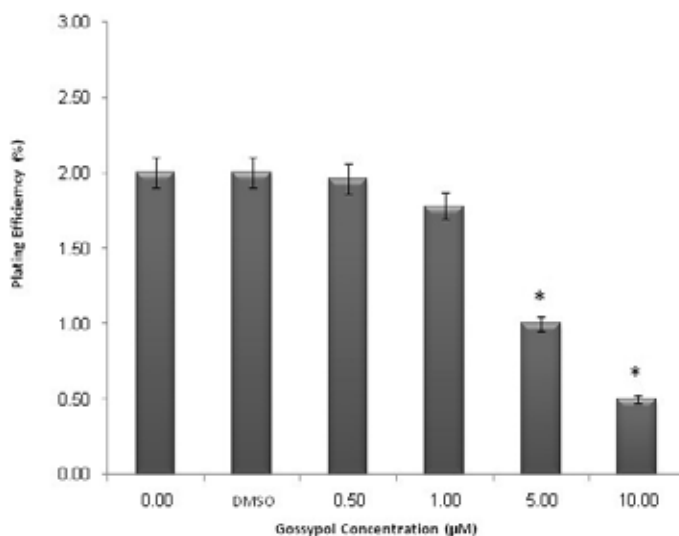


شکل ۵: بقای سلول‌های تیمار شده با پرتو در مقایسه با منحنی بقای سلول‌های تیمار شده با پرتو به همراه دارو

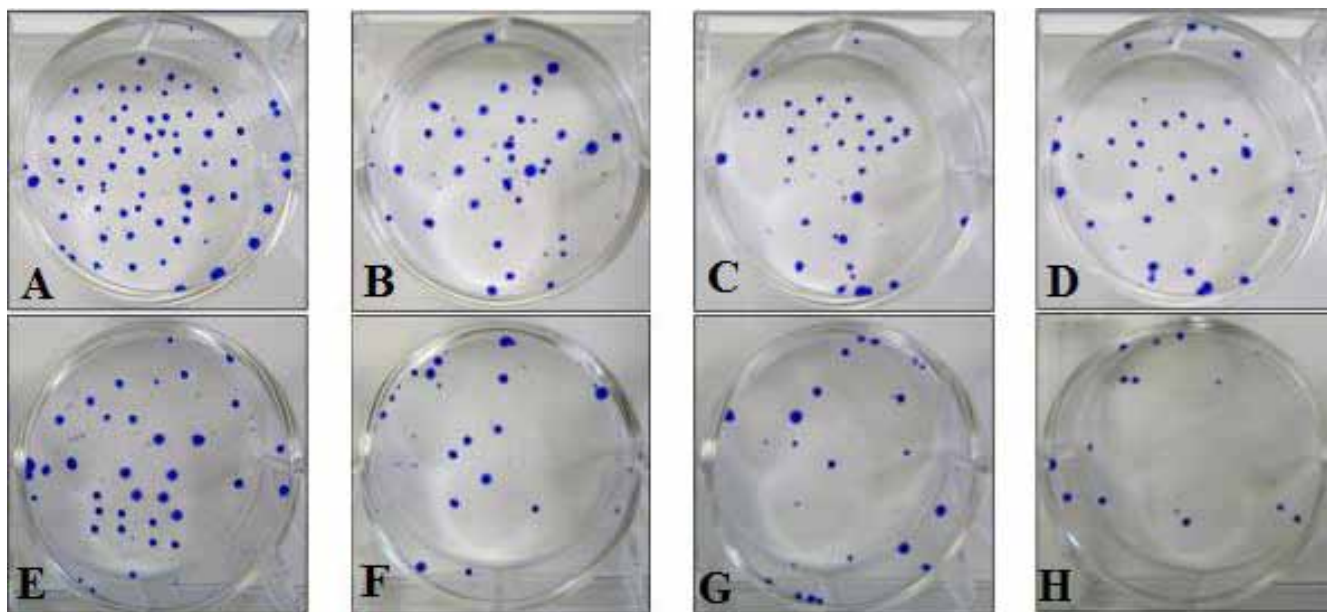
تعیین غلظت بهینه گاسیپول: براساس نتایج نشان داده شده در شکل شماره ۳ و ۴، غلظتی از دارو به عنوان غلظت بهینه برای انجام بقیه مراحل آزمایش انتخاب می‌شود که روی *viability* و کلونی‌زایی سلول‌ها تأثیر زیادی نداشته باشد. چون هدف بررسی حساس‌کنندگی پرتویی است پس خود دارو به تنهایی نباید سمیت قابل ملاحظه‌ای داشته باشد. با انجام تست تریپان‌بلو، غلظتی انتخاب شد که کمترین سمیت را داشته باشد و با سنجش کلونی‌زایی نیز غلظتی انتخاب می‌شود که حداقل تأثیر را بر روی کلونی‌زایی داشته باشد. بدین ترتیب فقط اثر حساس‌کنندگی را بررسی کرده و تأثیر دارو به تنهایی را حذف نموده و می‌توان با اطمینان بیشتر تأثیر مشاهده شده را به حساس‌کنندگی پرتویی نسبت داد. با توجه به نتایج به دست آمده از تست تریپان‌بلو (شکل ۳) و کلونی‌زایی با دارو (شکل ۴)، غلظت $1 \mu\text{M}$ هرچند روی *viability* اثر سوء ندارد ولی روی



شکل ۳: بقای سلول‌های U-87 MG در غلظت‌های مختلف گاسیپول با استفاده از تست تریپان بلو



شکل ۴: سنجش توانایی کلونی‌زایی سلول‌های U-87 MG پس از تیمار با گاسیپول. *بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار میان راندمان کشت نسبت به گروه کنترل می‌باشد.



شکل ۶: تصویر کلونی‌ها بعد از تثبیت و رنگ آمیزی در پتری. A نمونه کنترل، B دوز ۲ گری، C دوز ۴ گری، D دوز ۴ گری + گاسیپول، E دوز ۲ گری + گاسیپول، F دوز ۲ گری + گاسیپول، G دوز ۴ گری + گاسیپول، H دوز ۴ گری + گاسیپول

بحث و نتیجه‌گیری

اهمیت ویژه‌ای در پرتودرمانی تومورها دارد. به سلول بازمانده‌ای که ضمن حفظ قابلیت تولید مثل خود بتواند با تکثیر نامحدود یک کلون بزرگ یا کلونی (Colony) را تشکیل دهد، کلونوژنیک (Colonogenic) یا کلونی‌زا گفته می‌شود. برای بیشتر سلول‌ها که برای تقسیم تلاش می‌کنند، مرگ میتوزی (Mitotic Death) روند غالبی پس از پرتوگیری است. در برخی موارد سلول مجبور به طی کردن روند مرگی برنامه‌ریزی‌شده آپوپتوز می‌شود. در هر حال نتیجه تمامی روندهای گفته‌شده، از دست رفتن توانایی تقسیم نامحدود، یعنی قابلیت تولید مثل سلول است. برای ایجاد مرگ در سلول‌های متمایز که دچار مرگ عملکردی می‌شوند، دوزی حدود ۱۰۰ گری ولی برای ایجاد مرگ میتوزی در سلول‌های نامتمایز کمتر از ۲ گری کافی است [۷ و ۸].

بر اساس نتایج تست تریپان‌بلو در این بررسی نشان داده شد که تیمار با گاسیپول به صورت وابسته به دوز (Dose Dependent) به مدت ۴۸ ساعت قادر است مانع از رشد و تکثیر این رده سلولی شود. با استفاده از تست کلونی‌زایی مشاهده شد که این کاهش در بقاء سلول‌ها در نتیجه کاهش توان کلونی‌زایی رخ داده است. توانایی کلونی‌زایی یک دودمان سلولی در *in vitro* به عنوان مقیاسی برای تکثیر و متاستازی بودن آن در محیط *in vivo* است و یکی از مهم‌ترین و اصلی‌ترین پیامدها شده توسط پرتو یونیزان است. نتایج حاصل از تست کلونی‌زایی پس از تیمار با گاسیپول و پرتو دهی نشان داد که گاسیپول همچنین قادر است این رده سلولی مقاوم به پرتو را به اثرهای کشنده پرتو حساس کند. به علاوه

گلیوبلاستوما مولتی‌فرم کشنده‌ترین نوع تومور مغزی است. حتی زمانی که تهاجمی‌ترین نوع درمان که شامل رادیوتراپی، شیمی‌درمانی و جراحی است، استفاده می‌شود. متوسط بقاء بین ۶ تا ۱۲ ماه می‌باشد. پرتودرمانی روشی کارآمد و مؤثر در درمان انواع سرطان به شمار می‌رود. اما، استفاده از آن محدودیت‌های زیادی دارد. یکی از مهم‌ترین این محدودیت‌ها استفاده از پرتو در درمان سرطان، وجود سلول‌های توموری مقاوم به پرتو است. این سلول‌ها به گونه‌ای تغییر پیدا کرده‌اند و مسیرهای سلولی را در خود فعال می‌کنند که آن‌ها را قادر می‌سازد در برابر تابش دوزهای درمانی پرتوها مقاومت کنند و دچار مرگ سلولی و تولید مثلی نشوند. لذا، وجود این سلول‌ها (که پس از پایان درمان نیز باقی می‌مانند) خود موجب بازگشت مجدد سرطان می‌شود. از این رو، یکی از رویکردهای مؤثر در کاهش این محدودیت‌ها می‌تواند استفاده از ترکیباتی باشد که در صورت استفاده همزمان با پرتودرمانی، مرگ‌ومیر سلول‌های سرطانی را افزایش دهند و همچنین سلول‌های مقاوم به پرتو را مجدداً حساس کنند.

در رادیوبیولوژی دو نوع مرگ سلولی تعریف می‌شود: مرگ تولید مثلی (Reproductive Death) که به صورت از دست دادن توانایی تولید مثل سلول‌های بنیادین سیستم خونساز یا پوشش روده‌ای تعریف می‌شود و مرگ عملکردی (Functional Death) که برای سلول‌های متمایز عصبی یا عضلانی یا بسیاری از سلول‌های ترشحی که تکثیر نمی‌شوند به صورت از دست دادن عملکرد اختصاصی تعریف می‌شود. در رادیوبیولوژی تعریف مرگ متفاوت از تعریف متعارف آن است. این تعریف

نتایج تست تریپان بلو همچنین تأیید می‌کند که سمیت دوز استفاده‌شده جهت حساس کردن این سلول‌ها به پرتو (۱ میکرومولار) زیاد نیست و در حد قابل کنترل می‌باشد. در این بررسی برای تفسیر نتایج حاصل از پرتودهی از مدل خطی - درجه دو استفاده شد. اساس مدل خطی - درجه دو بر این فرض است که آسیب‌کشنده می‌تواند با برخورد یک ذره و یا با میانکنش آسیب‌های حاصل از برخورد چندین ذره حاصل شود. با مقایسه پارامترهای مدل خطی - درجه دو مشاهده می‌کنیم که پارامتر α در صورت به‌کاربردن گاسپیول، افزایش معنی‌داری یافته است. α بیانگر آسیب‌های غیر قابل ترمیم و کشنده می‌باشد و افزایش این ضریب نشان می‌دهد که حضور گاسپیول در سلول، آسیب‌های غیر قابل ترمیم و بالطبع آسیب‌های کشنده و بالقوه کشنده را افزایش می‌دهد. از طرف دیگر پارامتر β بیانگر آسیب‌های قابل ترمیم و غیر کشنده می‌باشد و کاهش این پارامتر بیانگر این است که آسیب‌های قابل ترمیم در صورت تیمار با گاسپیول کاهش می‌یابد.

اما، نکته مهم دیگری که وجود دارد این است که اثر توأم پرتو و گاسپیول به‌صورت سینرژیسم است بدین معنی که تعامل دو تیمار موجب اثری بزرگ‌تر از مجموع اثر آن‌ها می‌شود. این درحالی است که Chalmers و همکاران اثر پرتو و تموزولوماید که در حال حاضر مؤثرترین و سایتوتوکسیک‌ترین عامل آلکیله‌کننده در مقابله با گلیوبلاستوما می‌بدخیم می‌باشد را به‌صورت Additive یافتند [۱۰]. از این لحاظ، گاسپیول می‌تواند قابل رقابت با داروهایی از قبیل تموزولوماید باشد.

اثر مشاهده‌شده در کاهش کلونی‌زایی در تیمار ترکیبی با گاسپیول در مقایسه با تیمار پرتویی را می‌توان این‌گونه توجیه کرد که سلول‌های توموری گلیوما به‌دلیل نقص در مسیر سیگنالینگ آپوپتوز و بیان بالای پروتئین‌های ضد آپوپتوز، در برابر القای آپوپتوز ناشی از پرتو مقاومت بالایی را نشان می‌دهند. دلایل ژنتیکی این مقاومت کاملاً شناخته نشده است ولی مطالعات انجام‌شده دلایلی را جهت این مقاومت ذاتی بیان می‌کنند که شامل میزان بالای فاکتور رونویسی NF- κ B، افزایش بیان گیرنده EGFR، جهش در ژن PTEN، افزایش فعالیت مسیرهای علامت‌رسانی Akt و مسیر MAPK و همچنین بیان غیرعادی MMPs می‌باشد [۱۱]. در بررسی‌های متوالی که پاسخ سلول‌های گلیوما به انواع روش‌های درمانی را مورد مطالعه و ارزیابی قرار دادند، دریافتند که گلیوبلاستوما مولتی‌فرم به اتوافازی یا مرگ برنامه‌ریزی شده نوع ۲ نسبت به آپوپتوز مقاومت کمتری نشان می‌دهند [۱۴-۱۲]. به‌هر حال استفاده از ترکیباتی که مسیرهای علامت‌رسانی داخل سلولی را تحت تأثیر قرار می‌دهند و پاسخ سلول‌های توموری را به پرتو افزایش می‌دهند از نظر بالینی اهمیت بسیار زیادی دارد و امکان کاهش دوز پرتو یونیزان برای حصول اثر به‌دست آمده از پرتودرمانی را به تنهایی فراهم می‌کند.

References:

1. Scott CB, Scarantino C, Urtasun R, Movsas B, Jones CU, Simpson JR, Fischbach AJ, Curran WJ. Validation and predictive power of Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) recursive partitioning analysis classes for malignant glioma patients: a report using RTOG 90-06. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 40: 51–5.
2. Keshmiri-Neghab H, Goliaei B. Therapeutic potential of gossypol: An overview. *Pharm Biol* 2014; 52(1): 124-8.
3. Liang Xu. Gossypol enhances response to radiation therapy and results in tumor regression of human prostate cancer. *Mol Cancer Ther* 2005; 4: 197-205.
4. Oberstein A, Jeffrey PD, Shi Y. Crystal structure of the Bcl-XL-Bcl-1 peptide complex: Bcl-1 is a novel BH3-only protein. *J Biol Chem* 2007; 282: 13123-32.
5. Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P, Tasdemir E, Pierron G, Troulinaki K, Tavernarakis N, Hickman JA, Geneste O, Kroemer G. Functional and physical interaction between Bcl-X (L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J* 2007; 26: 2527-39.
6. Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB, Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in a non- apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* 2004; 6:1221-8.
7. Voss V, Senft C, Lang V, Ronellenfitch MW, Steinbach JP, Seifert V, Kögel D. The pan-Bcl-2 inhibitor (–)-Gossypol triggers autophagic cell death in malignant glioma. *Mol Cancer Res* 2010; 8: 1002-16.
8. Hall EJ, Giaccia AJ. *Radiobiology for the radiologist*, 6th ed, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
9. Alpen EL. *Radiation biophysics*. Second edition, Academic press, 1990.
10. Chalmers AJ. Cytotoxic effects of temozolomide and radiation are additive and schedule-dependent. *Inter J of Rad Oncol Bio Phys* 2009; 75 (5): 1511-9.
11. Krakstad C, Chekenya M. Survival ignaling and apoptosis resistance in glioblastomas: opportunities for targeted therapeutics. *Mol Can* 2010; 9: 135-40.
12. Lefranc F, Facchini V, Kiss R. Proautophagic drugs: A novel means to combat apoptosis-resistant cancers, with a special emphasis on glioblastomas. *Oncologist* 2007; 12: 1395–403.
13. Ito H. Autophagic cell death of malignant glioma cells induced by a conditionally replicating adenovirus. *J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 625–36.
14. Jiang H. Examination of the therapeutic potential of Delta-24-RGD in brain tumor stem cells: Role of autophagic cell death. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 1410–4.