

اثرات ضد گلیوبلاستوما ی نانومیسل کورکومین همراه با ارلوتینیب در سلول‌های

گلیوبلاستوما ی انسانی U87

علی باقریان^۱، حامد میرزائی^{۲*}، ناهید مسعودیان^۱، بستان رودی^۱

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

۲- مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری‌های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

*مسئول مکاتبات: mirzaei-h@kaums.ac.ir

DOI: 10.22034/ascij.2021.687846

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۲۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۰۸

چکیده

گلیوبلاستوما (گلیوبلاستوما) یکی از مهمترین نئوپلاسم‌های مغزی است و با مقاومت دارویی بالا همراه است. مکانیسم‌های مختلف سلولی و مولکولی، از جمله آپوپتوز، آنژیوژنز، اتوفاژی، مسیرهای NF- κ B و Wnt، نقش مهمی در پیشرفت گلیوبلاستوما ایفا می‌کنند. در این مطالعه، اثر کورکومین و نانومیسل کورکومین همراه با ارلوتینیب برای سرکوب گلیوبلاستوما در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. این سرکوب با تأثیر بر مسیرهای سیگنالینگ NF- κ B و Wnt، مهار آنژیوژنز و القای اتوفاژی و آپوپتوز انجام می‌شود. کورکومین و نانومیسل کورکومین (۵۰ میکرومولار) به تنهایی و همراه با ارلوتینیب (۵۰ میکرومولار) در سلول‌های گلیوبلاستوما U87 بررسی شد. بیان مسیرهای سیگنالینگ Wnt و NF- κ B، آپوپتوز، آنژیوژنز، ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با اتوفاژی توسط qRT-PCR و وسترن بلات بررسی شد. در مقایسه با گروه کنترل، تمام تیمارها از زیستایی سلول‌های گلیوبلاستوما ی U87 کاسته‌اند. علاوه بر این، پروتئین‌های مرتبط با آنژیوژنز، به عنوان مثال، Cox-2، VEGF، HIF-1 α و bFGF، به طرز چشمگیری کاهش یافته‌اند. همه تیمارها پروتئین‌های مرتبط با اتوفاژی و آپوپتوز، یعنی Bax، Beclin 1، LC3-I و LC3-II، Bcl-2 را تنظیم کردند. Total NF κ B (p65) و phospho NF. κ B (p65) با هر تیمار در سطح پروتئین کاهش یافتند. بیان VEGF، cyclin D1، Twist، ZEB و ژن‌های مرتبط با مسیر Wnt نیز کاهش یافت. به طور کلی، این نتایج نشان داد که کورکومین و نانومیسل کورکومین به تنهایی یا در ترکیب با ارلوتینیب از طریق تنظیم یک سری مکانیسم‌ها مانند آپوپتوز، اتوفاژی، آنژیوژنز، مسیرهای سیگنالینگ Wnt و NF. κ B، اثرات ضد گلیوبلاستوما از خود نشان می‌دهند.

کلمات کلیدی: ارلوتینیب، کورکومین، نانومیسل کورکومین، گلیوبلاستوما.

مقدمه

گلیوبلاستوما به طور قابل توجهی بهبود یافته است، متوسط بقای بیمارانی که از گلیوبلاستوما رنج می‌برند هنوز فقط ۱۵-۲۳ ماه، با بقای پنج ساله کمتر از ۶ درصد است (۲۴). بنابراین، برای درمان گلیوبلاستوما نیاز شدیدی به درمان‌های نوین وجود دارد. EGFR (گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی) یک گیرنده تراغشایی

گلیوبلاستوما (گلیوبلاستوما) شایع‌ترین سرطان بدخیم مغز بزرگسالان است که کمترین پیش‌آگهی را نشان می‌دهد (۲۱). در حال حاضر، درمان گلیوبلاستوما به برداشتن حداکثری تومور توسط جراحی و سپس شیمی‌درمانی و رادیوتراپی بعد از عمل متکی است (۱۷). در حالی که روش‌های درمانی و تشخیص

ارلوتینیب در یک روش تک عاملی را تأیید نکرده‌اند، هدف فعلی، شناسایی سایر فاکتورهای هدفگذاری شده برای بهبود خواص ضدنئوپلاستیک اربلوتینیب با چندین هدف است. کورکومین، یکی از مشتقات ریزوم زردچوبه است که از طریق خواص ضد التهابی، ضدتکثیر و آنتی اکسیدانی خود فعالیت درمانی امیدوارکننده ای را نشان می‌دهد (۱۹).

یافته‌های پیش بالینی درون تنی و برون تنی نشان داده است که کورکومین یک ماده درمانی کارآمد برای سرطان‌های مغز از جمله گلیوبلاستوما-مولتی فرم است (۱۳، ۱۴). این خصوصیات کورکومین به دلیل مشارکت آن در توقف چرخه سلولی G2/M، فعال سازی مسیرهای آپوپتوتیک (۹)، القای اتوفاژی، اختلال در سیگنالینگ مولکولی، مهار متاستاز و تهاجم باعث افزایش اثربخشی شیمی درمانی‌های فعلی می‌شود (۲۶، ۲۷).

در این مطالعه، افزایش خاصیت ضد سرطانی کورکومین و اربلوتینیب از طریق تحویل همزمان اربلوتینیب و کورکومین توسط نانومایسل کورکومین بر روی رده سلولی U87 مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر این، در این مطالعه سطح بیان ژن‌های مرتبط با مسیر Wnt (ژن‌های VEGF، سایکلین D1، Twist و ZEB1)، سطح بیان NF-kB، سطح بیان پروتئین‌های مرتبط با آپوپتوز (کاسپاز ۸، Bax و Bcl-2) و اتوفاژی (بکلین ۱، LC3-I و LC3-II) پس از تیمار رده سلولی U87 با کورکومین، نانومایسل-کورکومین، اربلوتینیب، کورکومین بعلاوه اربلوتینیب و نانومایسل کورکومین بعلاوه اربلوتینیب مورد سنجش قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و معرف‌ها: دی متیل سولفوکسید (DMSO)، کورکومین، اربلوتینیب، استرپتومایسین، پنی

تیروزین کیناز است. EGFR عضوی از گیرنده‌های خانواده HER است و شامل یک قسمت تراغشایی، یک سایت خارج سلولی برای اتصال لیگاند و یک دامین داخل سلولی تیروزین کیناز (TK) است (۳۵). بیان غیرمعمول EGFR، مهاجرت، تکثیر، هموستاز و تمایز سلول‌های سرطانی را تنظیم می‌کند (۳۶). تقریباً ۵۷ درصد از گلیوبلاستوماها دارای واریانت‌های ژنتیکی EGFR مانند بازآرایی، جهش، تکثیر و پیرایش انتخابی هستند (۶).

بر خلاف سرطان ریه، که جهش EGFR عمدتاً در دامین کیناز رخ می‌دهد، در گلیوبلاستوما جهش EGFR عمدتاً در دامین خارج سلولی روی می‌دهد (۳۳). جهش‌های EGFR به سلول‌های گلیوبلاستوما اجازه می‌دهند تا مسیرهای سیگنالینگ پایین دست RAS/ERK و PI3K/AKT را از لیگاندهای EGF جدا کنند. تحقیقات متعددی تأیید کرده‌اند که افزایش بیان و جهش EGFR باعث بهبود بقا و رشد گلیوبلاستوما می‌شود (۱۵).

خاموش کردن بیان ژن EGFR نشان داد که بقای سلول‌های G.B.M که دچار جهش EGFR شدند به این ژن وابسته است (۳۳). بنابراین، مدتهاست که EGFR به عنوان هدفی مهم برای درمان گلیوبلاستوما در نظر گرفته می‌شود (۱۸).

با اتصال لیگاندهای EGFR، برای مثال فاکتور رشد ترانسفرم کننده آلفا (TGF- α) یا فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) به محل اتصال لیگاند، TK ذاتی فعال می‌شود (۱۱). در نتیجه، عملکردهای مختلف سلولی مانند تمایز یا تکثیر تنظیم می‌شوند (۴). بازدارنده‌های تیروزین کیناز کوچک مولکول مانند اربلوتینیب یک مهار کننده ترکیبی EGFRvIII و EGFR/HER1، جدیدترین فاکتورهای هدف بالینی EGFR/HER1 هستند (۱۲). از آنجا که آزمایشات بالینی، یافته‌های دلگرم کننده حاصل از تحقیقات تجربی با استفاده از

ارزیابی تهاجم: برای آنالیز تهاجم سلولی از محفظه اصلاح شده بویدن پوشیده شده با ماتریزل استفاده شد. همان داروهایی که در بخش ۲.۴ شرح داده شدند، به مدت شش ساعت در محفظه فوقانی حاوی ۵۰۰ میکرولیتر محیط بدون سرم و $2/5 \times 10^4$ سلول HepG2 ریخته شدند. سپس ۵۰۰ میکرولیتر محیط رشد به محفظه تحتانی اضافه شد. بعد از ۶ و ۱۲ ساعت، سلول‌های غیرمهاجم با استفاده از یک سواب پنبه ای از محفظه فوقانی خارج شدند. سلول‌های محفظه تحتانی با پارافورمالدئید ۴ درصد به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق تثبیت شدند. برای رنگ آمیزی از کریستال ویوله ۰/۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. کریستال ویوله اضافی با آب مقطر شسته شد. میکروسکوپ Axioplan-2 با عدسی شیئی Zeiss Plan-Apochromat 100× (Carl Zeiss) برای بررسی سلول‌های رنگ آمیزی شده استفاده شد.

ارزیابی میزان مهاجرت: در یک پلیت ۶ خانه، 3×10^5 سلول HepG2 کشت داده شد. سلول‌های HepG2 تا تلاقی ۸۰ درصد کاشته شدند. تیمارها در محیط بدون FBS قرار گرفتند. سپس سلول‌ها به مدت ۶ یا ۱۲ ساعت انکوبه شدند. پس از آن، با استفاده از نوک پیت زرد، خراشی در تک لایه سلول ایجاد شد. برای ارزیابی سلول‌های رنگ آمیزی شده (بعد از ۶ و ۱۲ ساعت)، از میکروسکوپ Axioplan-2 با عدسی شیئی Zeiss Plan-Apochromat 100× (Carl Zeiss) استفاده شد. برای اندازه‌گیری ناحیه خراش، از نرم افزار ImageJ استفاده شد.

qRT-PCR: RNA کل با استفاده از معرف TRIzol بر اساس دستورالعمل سازنده از سلول‌های کشت شده استخراج شد. سپس RNA استخراج شده با DNase I فاقد RNase تیمار شد. با استفاده از کیت PrimeScript™ RT DNA مکمل تک رشته ای (cDNA) سنتز شد. سپس، cDNA توسط PCR با ۳۰

سیلین، تریپسین و ۴،۵-دی متیل تیاژول-۲-یل) - ۲،۵-دی فنیل تترازولیوم برومید (MTT). نانومیسلا کورکومین از شرکت ExirNanoSina (تهران، ایران) تهیه شد. هر بسته ژل نرم نانومیسلا-کورکومین حاوی ۸۰ میلی گرم کورکومین بود. "سینا کورکومین" عصاره‌ای متشکل از کورکومینوئیدها است و با شماره IRC 1228225765 در ایران ثبت شده است. معرف‌های Real-time PCR و master Mix PCR از شرکت آمپلیکون (دانمارک) خریداری شد. DMEM از GIBCO و سرم گاو جنین (FBS) (آلمان) خریداری شد.

کشت سلول: رده‌های سلولی گلیومای انسانی (U87) از بانک سلول آکادمی علوم چین تهیه شد. برای کشت سلول از DMEM با ۱ درصد آنتی بیوتیک و ۱۰ درصد سرم گاوی جنین (FBS) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در اتمسفر مرطوب با ۹۵ درصد هوا و ۵ درصد CO2 استفاده شد. فاصله پاساژ سلول‌ها به طور معمول ۲ تا ۳ روز بود.

اندازه‌گیری زیستایی سلول: سلول‌ها با ۲۰ یا ۴۰ میکرومولار کورکومین به مدت ۲۴ یا ۴۸ ساعت تیمار شدند. اثرات کورکومین بر زیستایی سلول با استفاده از روش Cell Counting Kit-8 (CCK-8; Dojindo Molecular Technologies, Inc., Kumamoto, Japan) اندازه گیری شد. به طور خلاصه، پس از ۲۴ یا ۴۸ ساعت انکوباسیون با ۲۰ یا ۴۰ میکرومولار کورکومین، سلول‌ها به مدت ۲ ساعت با ۵ گرم در لیتر محلول CCK-8 انکوبه شدند. برای آنالیز، سلول‌ها در یک میکروپلیت ریدر ۹۶ خانه قرار گرفتند (BioTek, Winooski, VT, USA)، و دانسیته نوری (OD) در ۴۵۰ نانومتر خوانده شد. زیستایی سلول با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد: $Cell\ viability\ (\%) = (1 - (OD\ of\ the\ samples / O.D.\ of\ the\ control)) \times 100\%$

anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; 1:800, Proteintech, 10494-1-AP) انکوبه شدند. در مرحله بعد سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های ثانویه anti-horseradish rabbit (1:4000, ZSGB, ZB-2301) peroxidase-conjugated anti-mouse (1:4000, ZSGB, ZB-2305) انکوبه شدند. باندهای پروتئینی با سیستم تصویربرداری ChemiDoc™ MP (BIO-RAD) خوانده شدند.

تحلیل آماری: آنالیز داده‌ها توسط نرم‌افزار GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA, USA) انجام شد. مطالعات آماری با استفاده از آزمون t غیر جفت شده انجام گرفت و مقدار پی کمتر از ۰/۰۵ معنی دار تلقی شد.

نتایج

با استفاده از آزمون MTT، زیستایی و تکثیر سلول‌های U87 مورد مطالعه قرار گرفت. این نتایج در شکل ۱ نشان داده شده است. زیستایی در همه تیمارها به شکل قابل توجهی کاهش یافت. ترتیب اثربخشی عبارت بود از: ۵۰ میکرومولار کورکومین > ۵۰ میکرومولار نانومیسلازکورکومین > ۵۰ میکرومولار ارلوتینیب > ۵۰ میکرومولار نانومیسلازکورکومین + ارلوتینیب و آخرین گروه ۶۰ درصد زیستایی نشان داد.

همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است، پس از انکوباسیون ۱۲ و ۶ ساعته با داروها کاهش قابل توجهی در قابلیت تهاجم سلول‌های U87 رخ داد. پس از ۶ ساعت تعداد سلول‌هایی که از Matrigel عبور کرده‌اند برای نانومیسلازکورکومین، کورکومین و ارلوتینیب به تنهایی بین ۴۲-۳۶ درصد و مقدار پی کمتر از ۰/۰۵ بود، در حالی که برای ترکیب آنها ۲۸-۲۵ درصد و مقدار پی کمتر از ۰/۰۱ بود. پس از ۱۲

سیکل و تنظیمات زیر تکثیر شد: ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، یک دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد و با اکستنشن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه ادامه یافت. در نهایت، محصولات PCR با ژل آگارز ۱.۵ درصد الکتروفورز شدند.

وسترن بلات: سطح بیان پروتئین‌های GLI1، PARP1، caspase-3 و p53 توسط وسترن بلات بررسی شد تا مکانیسم‌های مولکولی احتمالی و مسیرهای مورد نیاز در خواص ضدگلیوما مورد بررسی قرار گیرد. به طور کلی PARP1 در ترمیم آسیب DNA عمل می‌کند و توسط کاسپاز همراه با آپوپتوز به ۲ قسمت تقسیم می‌شود. در نتیجه، از کاسپاز ۳ و PARP1 معمولاً به عنوان نشانگرهای زیستی آپوپتوز استفاده می‌شود. بیست و چهار ساعت پس از ترانسفکشن و تیمار با کورکومین، سلول‌ها توسط بافر RIPA (Pierce, 89900) به علاوه مهارکننده‌های پروتئاز که تا ۱۰ درصد رقیق شده‌اند لیز می‌شوند. پس از سانتریفیوژ، پروتئین کل توسط ژل الکتروفورز پلی آکریل آمید ۱۰ درصد و سدیم دودسیل سولفات- جدا شده و از غشاهای پلی وینیلیدین فلوراید عبور داده می‌شود (Millipore, IPVH00010). در مرحله بعد، غشاها با تریس بافر سالین و توین (TBST) شسته شده و سپس با محلول 5% milk-TBST بلوک شدند. سپس یک شب در ۴ درجه سانتی گراد با آنتی بادی‌های اولیه شامل:

anti-PARP (1:600, Proteintech, 13371-1-AP), anti-human caspase-3 (1:300, Proteintech, 19677-1-AP), anti-caspase-8 (1:500, Proteintech, 13423-1-AP), anti-Bcl-XL (1:1000, Proteintech, 10783-1-AP), anti-RIP1 (1:300, Proteintech, 17519-1-AP), anti-β-actin (1:800, ZSGB, TA-09), anti-MCL1 (1:600, Proteintech, 16225-1-AP), anti-p53 (1:600, Proteintech, 10442-1-AP), anti-GLI1 (1:1000, Cell Signaling

housekeeping برای نرمال سازی مقادیر بودند. شکل 6A مجموعه ای متمایز از بلات‌ها و شکل 6B نمودارها را نشان می‌دهد. نانومیسل کورکومین و کورکومین به تنهایی منجر به افزایش اندک اما قابل توجه سطح پروتئین می‌شود. ارلوتینیب به تنهایی منجر به کاهش چشمگیرتری شد. مخلوط کورکومین و نانومیسل-کورکومین و ارلوتینیب منجر به بالاترین افزایش معنادار شد که معمولاً کمتر از ۵۰ درصد مقادیر کنترل بود. سطح بیان ۳ پروتئین مرتبط با آپوپتوز توسط وسترن بلات سنجش شد. این پروتئین‌ها شامل Caspase 8، Bcl-2، Bax و GAPDH به عنوان یک پروتئین housekeeping برای نرمال سازی مقادیر بودند. شکل 7A مجموعه ای متمایز از بلات‌ها و شکل 7B نمودارها را نشان می‌دهد.

نانومیسل کورکومین و کورکومین به تنهایی منجر به افزایش کم اما معناداری در سطح پروتئین‌های ضد سرطان (Caspase 8 و Bcl2) و کاهش قابل توجه سطح پروتئین سرطانی (Bax) شد. در حالی که ترکیبی از کورکومین و نانومیسل-کورکومین به علاوه ارلوتینیب منجر به بیشترین کاهش و افزایش معنادار شد، که معمولاً کمتر از ۵۰ درصد از مقادیر کنترل بود، ارلوتینیب به تنهایی منجر به کاهش معنادار بیشتری شد.

سطح بیان پروتئین‌های NF- κ B یعنی NF- κ B (p65) و phospho-NF- κ B (p65) توسط وسترن بلات سنجش شد. این پروتئین‌ها شامل NF- κ B به علاوه هیستون ۳ و GAPDH به عنوان پروتئین‌های housekeeping برای نرمال سازی بودند. شکل‌های 8A&C مجموعه ای متمایز از بلات‌ها و شکل‌های 8B&D نمودارهای کمی را نشان می‌دهد.

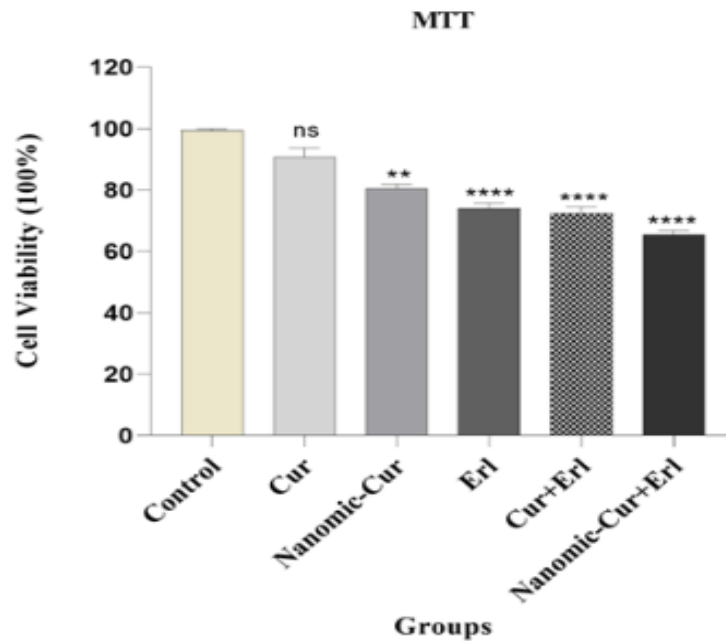
نانومیسل-کورکومین و کورکومین به تنهایی منجر به کاهش جزئی اما قابل توجه سطح پروتئین می‌شوند.

ساعت سطح مهاجم حتی از ۲۸-۱۲ درصد هم پایین‌تر آمد.

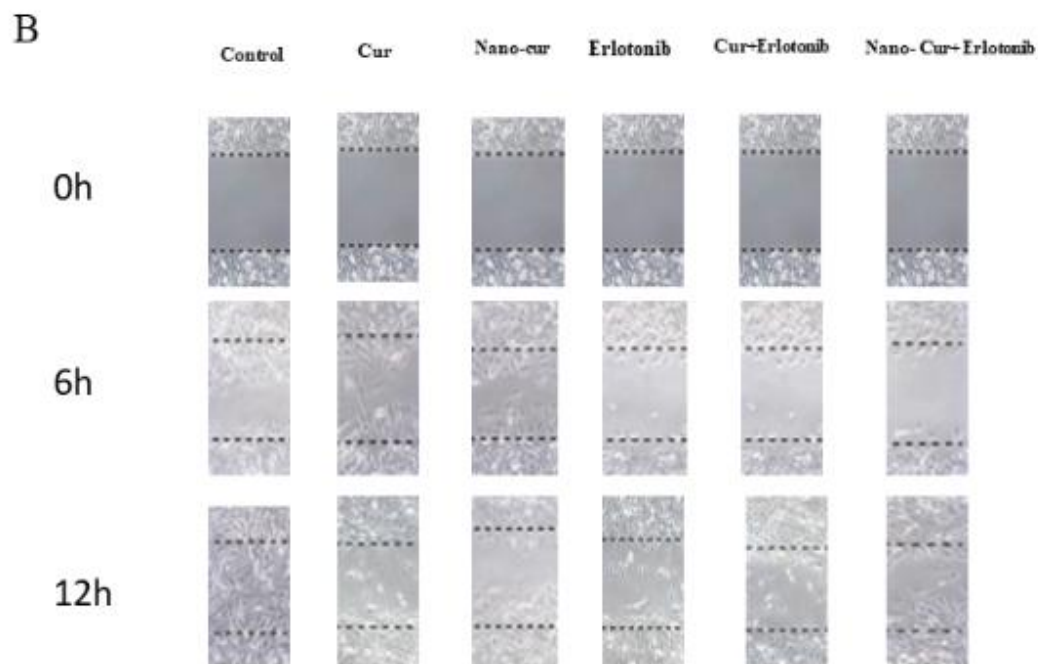
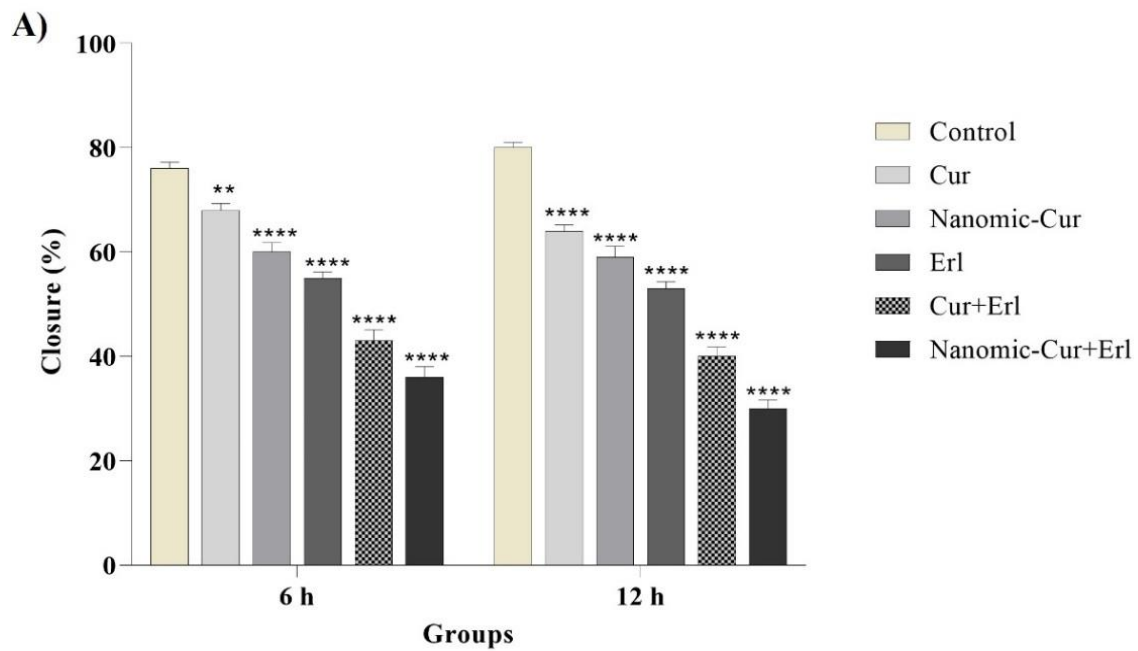
برای ارزیابی میزان مهاجرت سلول‌های U87 از تست ترمیم زخم خراش استفاده شد. همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است، درصد ترمیم شدن پس از ۶ ساعت انکوباسیون با دارو به طور قابل توجهی پایین آمد. مهاجرت ۶۰-۳۲ درصد و مقدار پی کمتر از ۰/۰۱ تا ۰/۰۵ بود. پس از انکوباسیون ۱۲ ساعته، مهاجرت برای ارلوتینیب و ترکیب آنها بین ۳۰-۲۲ درصد و مقدار پی کمتر از ۰/۰۰۱ تا ۰/۰۵ بود.

سطح بیان ژن‌های Twist، cyclin D1، VEGF و ZEB1 در RT-PCR با GAPDH نرمال سازی شد. نتایج ارائه داده شده در شکل ۴ نشان می‌دهد که نانومیسل-کورکومین و کورکومین به تنهایی تمایل به افزایش بیان هر چهار ژن دارند (۱ تا ۲ برابر افزایش)، که در بسیاری از موارد معنادار است. ارلوتینیب به تنهایی بیان هر ۴ ژن را کاهش داد، در حالی که کورکومین و نانومیسل-کورکومین بیان Twist و VEGF را کاهش دادند. سطح بیان ۴ پروتئین مرتبط با آنژیوژنز توسط وسترن بلات سنجش شد. VEGF، bFGF، Cox-2 و HIF-1 α به علاوه GAPDH به عنوان یک پروتئین housekeeping برای نرمال سازی مقادیر استفاده شد. شکل 5A مجموعه ای متمایز از لکه‌ها یا بلات‌ها و شکل 5B نمودارها را نشان می‌دهد. نانومیسل-کورکومین و کورکومین به تنهایی کاهش اندک اما معناداری در سطح پروتئین ایجاد کردند، ارلوتینیب به تنهایی منجر به کاهش محسوس تری شد، در حالی که مخلوط عصاره به همراه ارلوتینیب منجر به بیشترین کاهش شد و معمولاً کمتر از ۵۰ درصد مقادیر کنترل بود. سطح بیان ۳ پروتئین مرتبط با اتوفاژی توسط وسترن بلات سنجش شد. این پروتئین‌ها شامل LC3-I، LC3-II، Beclin1 و GAPDH به عنوان یک پروتئین

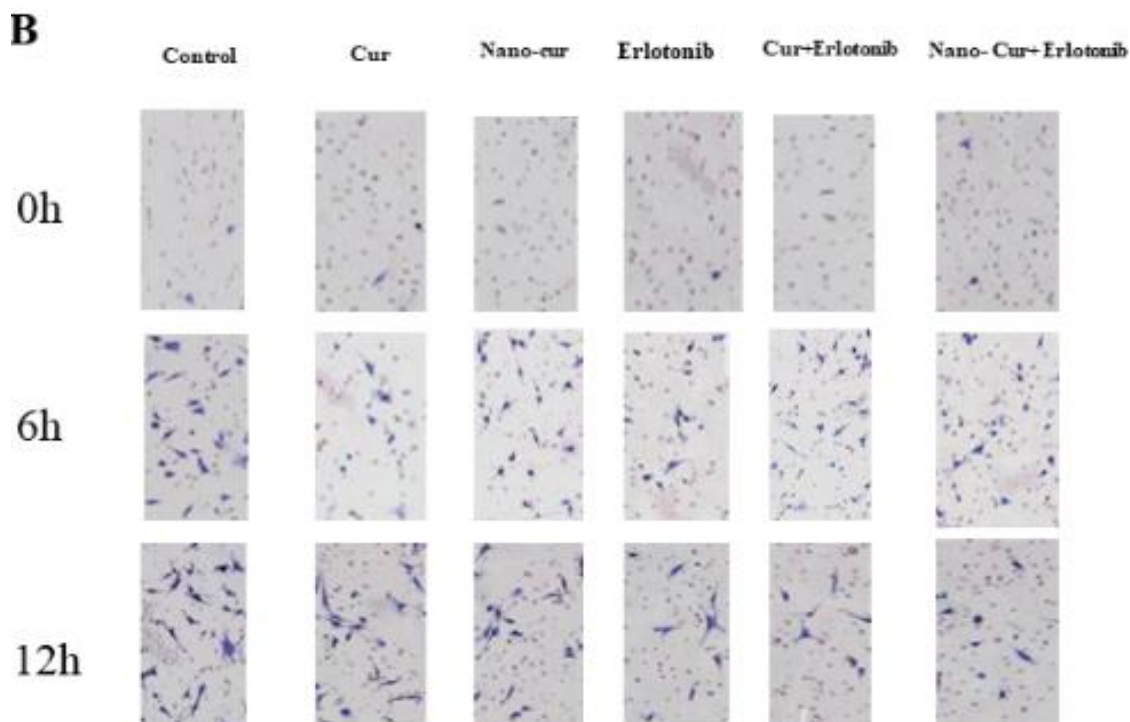
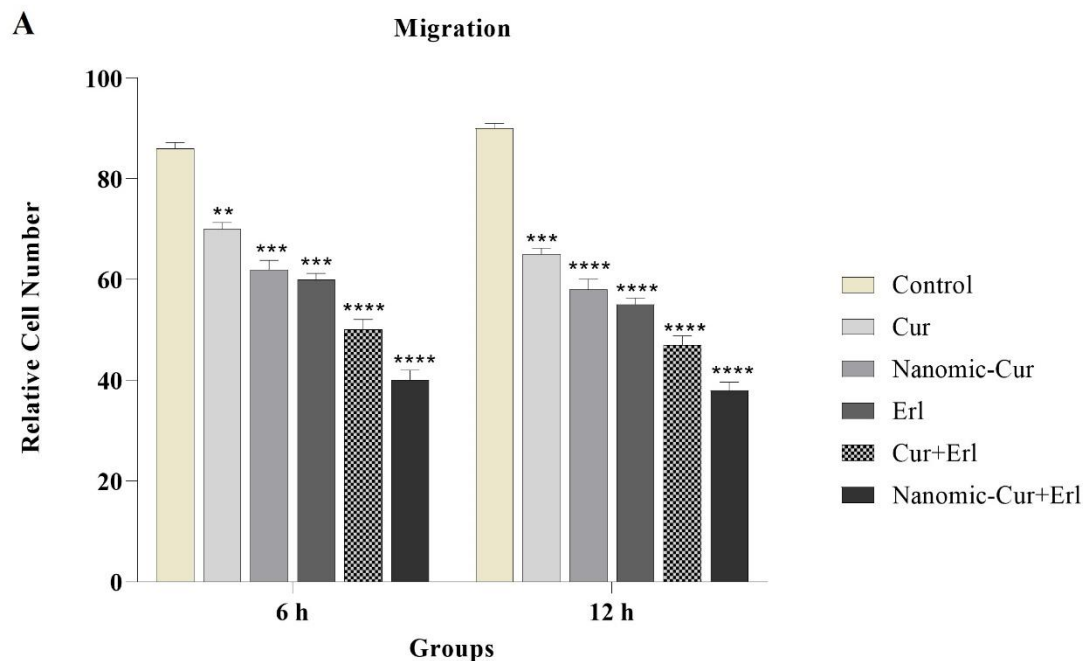
ارلوتینیب به تنهایی منجر به کاهش معنادارتری شد، در حالی که ترکیب عصاره به همراه ارلوتینیب منجر به کاهش قابل توجهی شد که معمولاً کمتر از ۵۰ درصد از سطوح کنترل بود.



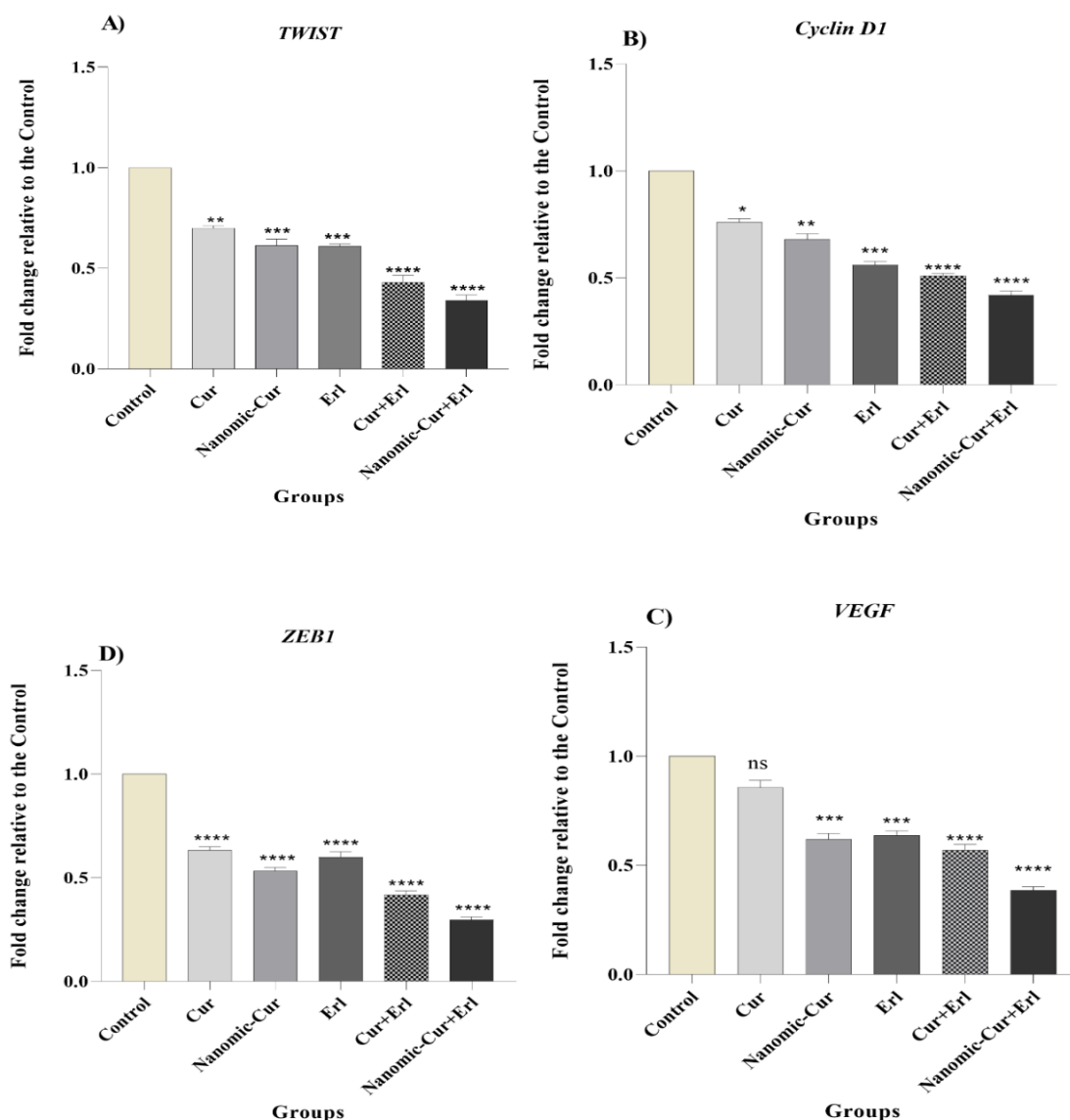
شکل ۱- زیستایی سلول. سلول‌های U87 با کنترل یا شاهد (بدون دارو)، کورکومین، نانومیسلار کورکومین، ارلوتینیب، کورکومین + ارلوتینیب و نانومیسلار کورکومین + ارلوتینیب به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. هر آزمایش سه تکرار دارد. ns: $p < 0/05$ ، $p < 0/01$: **، $p < 0/001$: ****. نانومیسل-کورکومین (Nanomic-Cur)، ارلوتینیب (Erl)، کورکومین-ارلوتینیب (Cur+Erl)، نانومیسل-کورکومین بعلاوه ارلوتینیب (Nanomic-Cur+Erl)



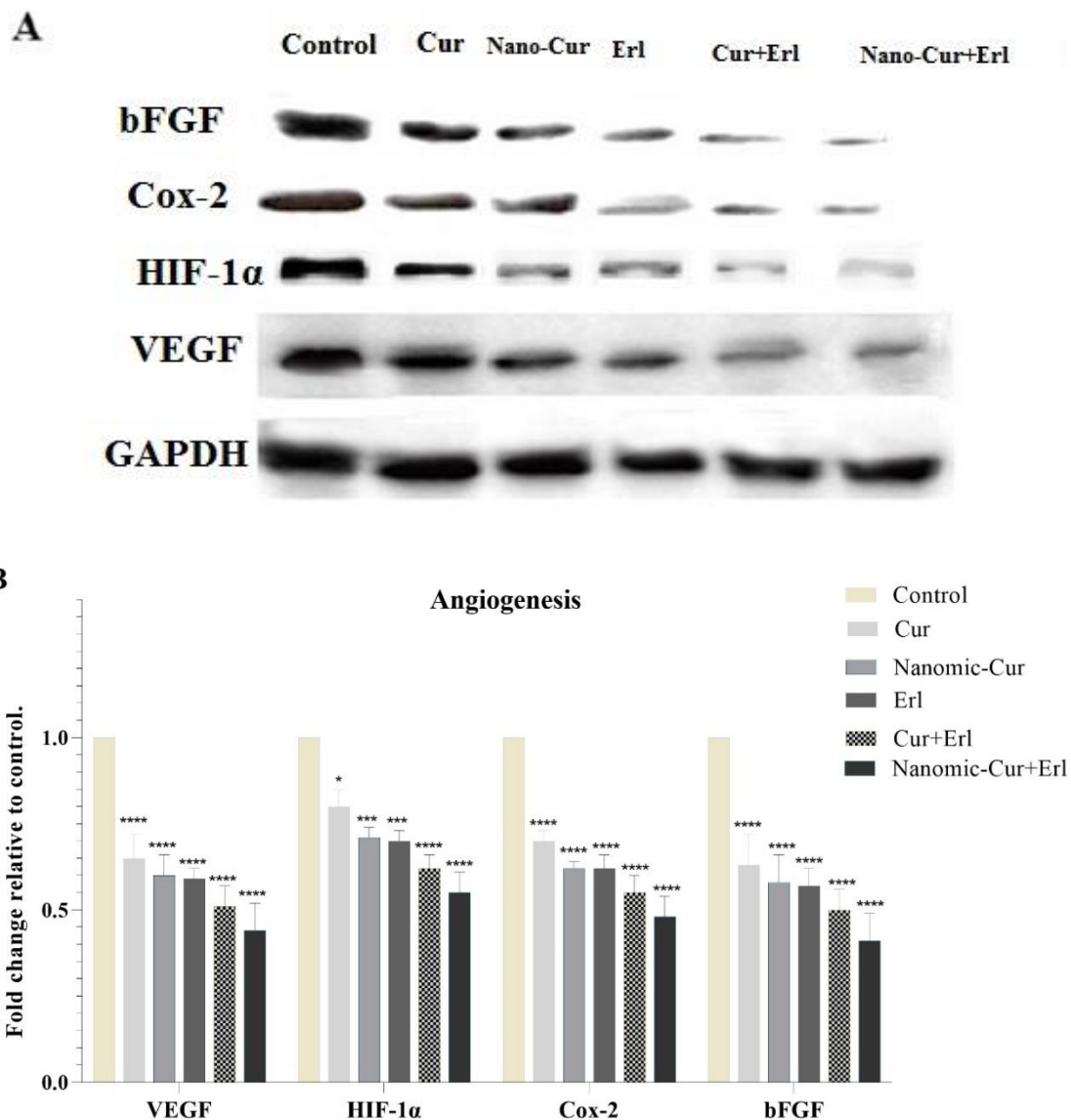
شکل ۲. مهاجم سلولی. سلول‌های U85 در یک محفظه اصلاح شده بویدن که با ماتریژل پوشانده شده، با شاهد (بدون دارو)، کورکومین، نانومیسل-کورکومین، ارلوتینیب، کورکومین + ارلوتینیب و یا نانومیسل-کورکومین + ارلوتینیب تیمار شدند. پس از ۶ ساعت و ۱۲ ساعت، همانطور که در بخش مواد و روش‌ها شرح داده شد تعداد سلول‌های مهاجم اندازه‌گیری شد. A، اندازه‌گیری؛ B، تصاویر نماینده. هر آزمایش سه تکرار دارد.



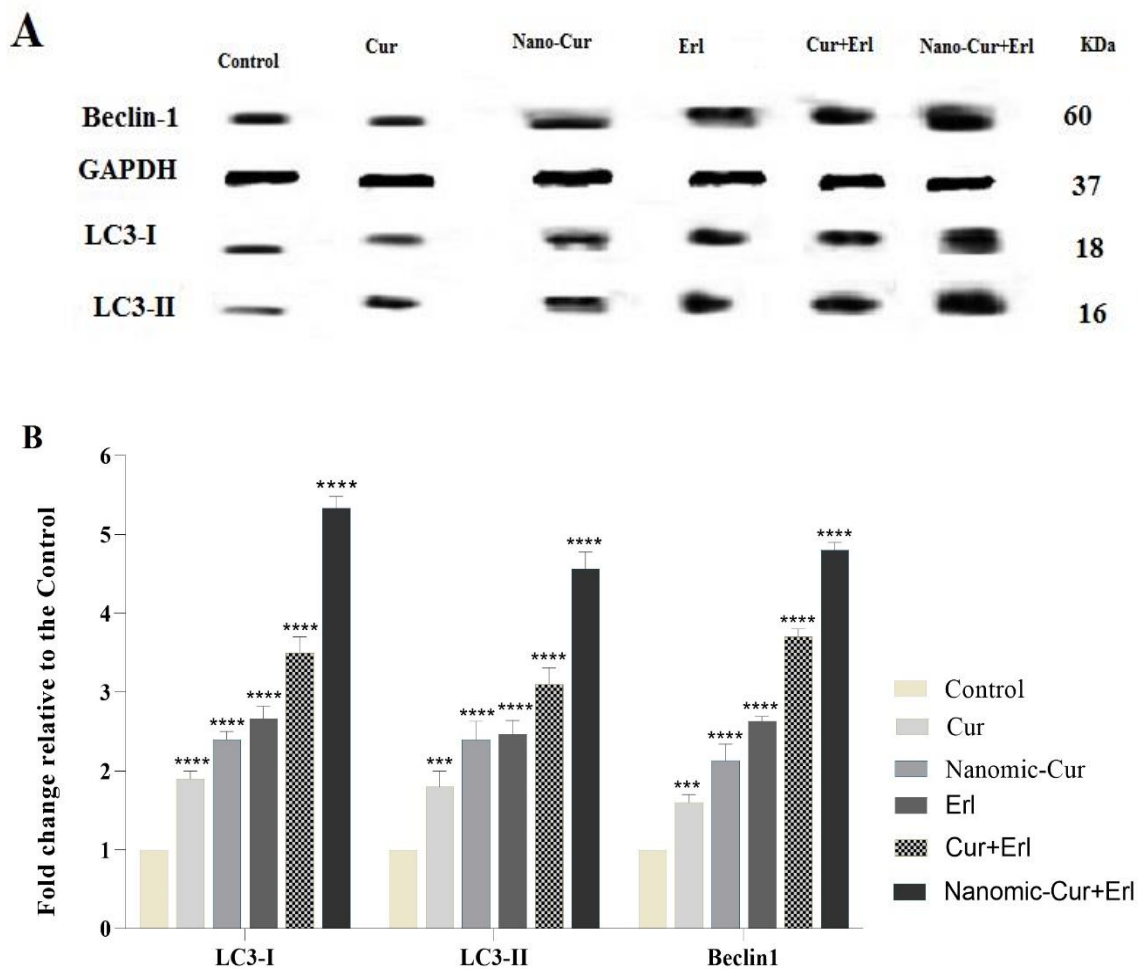
شکل ۳. مهاجرت سلول (درصد بسته شدن یا ترمیم خراش). سلول‌های HepG2 در شدت تلاقی ۸۰ درصد با نوک پیت خراشیده شدند و با شاهد یا کنترل (بدون دارو)، کورکومین (Cur)، نانومایسل-کورکومین (Nanomic-Cur)، ارلوتینیب (Erl)، کورکومین-ارلوتینیب (Cur+Erl)، نانومایسل-کورکومین بعلاوه ارلوتینیب (Nanomic-Cur+Erl) تیمار شدند. پس از ۶ ساعت و ۱۲ ساعت، سطح خراشیده همانطور که در بخش مواد و روش‌ها شرح داده شد اندازه‌گیری شد. A، اندازه‌گیری B، تصاویر نماینده. هر آزمایش سه تکرار دارد. **: مقدار پی کمتر مساوی ۰/۰۱، ***: مقدار پی کمتر مساوی ۰/۰۰۱، ****: مقدار پی کمتر مساوی ۰/۰۰۰۱.



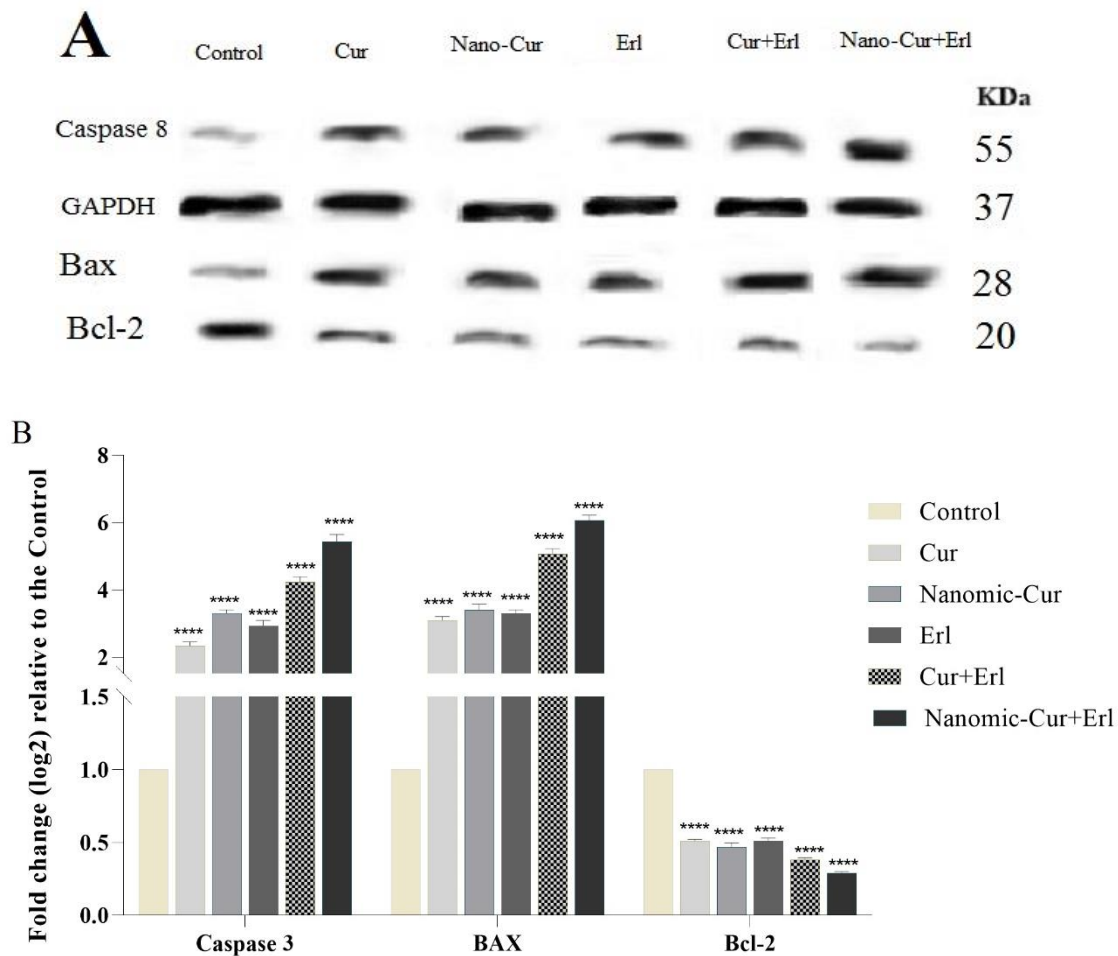
شکل ۴. مقایسه بیان ژن های *VEGF*, *cyclin D1*, *Twist* و *ZEB1* توسط qRT-PCR. گروه‌ها عبارت بود از شاهد (بدون دارو)، کورکومین، نانومیسل-کورکومین، ارلوتینیب، کورکومین + ارلوتینیب و نانومیسل-کورکومین + ارلوتینیب که به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون شدند. هر آزمایش سه تکرار دارد. ns: مقدار پی بزرگتر از ۰/۰۵، * : مقدار پی کمتر مساوی ۰/۰۵، ** : مقدار پی کمتر مساوی ۰/۰۱، *** : مقدار پی کمتر مساوی ۰/۰۰۱ و **** : مقدار پی کمتر مساوی ۰/۰۰۰۱. کورکومین (Cur)، نانومیسل-کورکومین (Nanomic-Cur)، ارلوتینیب (Erl)، کورکومین-ارلوتینیب (Cur+Erl)، نانومیسل-کورکومین بعلاوه ارلوتینیب (Nanomic-Cur+Erl).



شکل ۵. وسترن بلات و سنجش پروتئین‌های مرتبط با آنژیوژنز. تیمار سلول‌های U87 با کنترل (بدون دارو)، کورکومین، نانومیسل-کورکومین، ارلوتینیب، کورکومین + ارلوتینیب و نانومیسل-کورکومین + ارلوتینیب با انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت (A-B). هر آزمایش سه تکرار دارد. *: مقدار پی کمتر مساوی ۰/۰۵ و ****: مقدار پی کمتر مساوی ۰/۰۰۰۱. کورکومین (Cur)، نانومیسل-کورکومین (Nanomic-Cur)، ارلوتینیب (Erl)، کورکومین-ارلوتینیب (Cur+Erl)، نانومیسل-کورکومین بعلاوه ارلوتینیب (Nanomic-Cur+Erl).

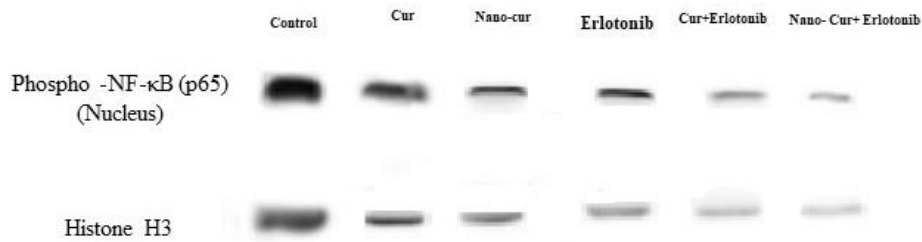


شکل ۶. وسترن بلات و سنجش پروتئین‌های مرتبط با اتوفاژی. تیمار سلول‌های U87 با کنترل (بدون دارو)، کورکومین، نانومیسل-کورکومین، ارلوتینیب، کورکومین + ارلوتینیب و نانومیسل-کورکومین + ارلوتینیب که به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند (A-B). هر آزمایش سه تکرار دارد. ***: مقدار پی کمتر مساوی ۰/۰۰۱ و ****: مقدار پی کمتر مساوی ۰/۰۰۰۱. کورکومین (Cur)، نانومیسل-کورکومین (Nanomic-Cur)، ارلوتینیب (Erl)، کورکومین-ارلوتینیب (Cur+Erl)، نانومیسل-کورکومین بعلاوه ارلوتینیب (Nanomic-Cur+Erl).

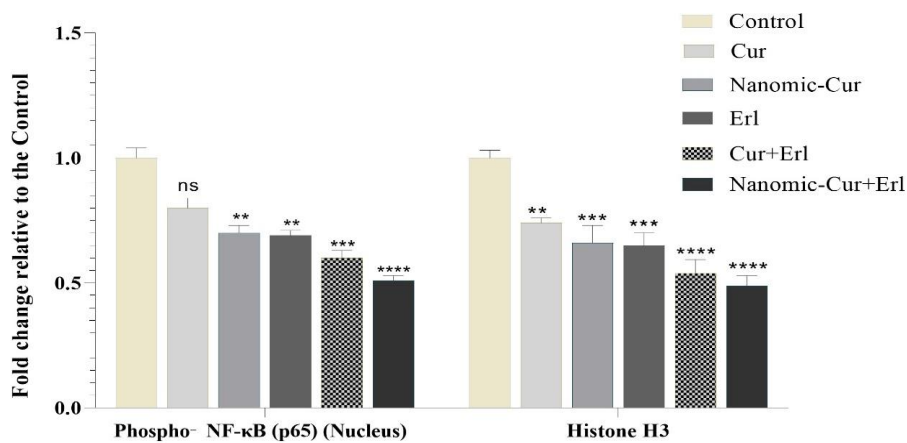


شکل ۷. وسترن بلات و سنجش پروتئین‌های مرتبط با آپوپتوز. تیمار سلول‌های U87 با کنترل (بدون دارو)، کورکومین، نانومیسل-کورکومین، ارلوتینیب، کورکومین + ارلوتینیب و نانومیسل-کورکومین + ارلوتینیب همراه با ۲۴ ساعت انکوباسیون. هر آزمایش سه تکرار دارد. ****: مقدار پی کمتر مساوی ۰/۰۰۰۱. کورکومین (Cur)، نانومیسل-کورکومین (Nanomic-Cur)، ارلوتینیب (Erl)، کورکومین-ارلوتینیب (Cur+Erl)، نانومیسل-کورکومین بعلاوه ارلوتینیب (Nanomic-Cur+Erl).

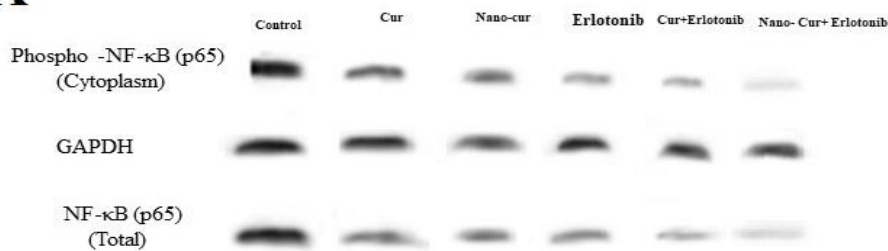
C



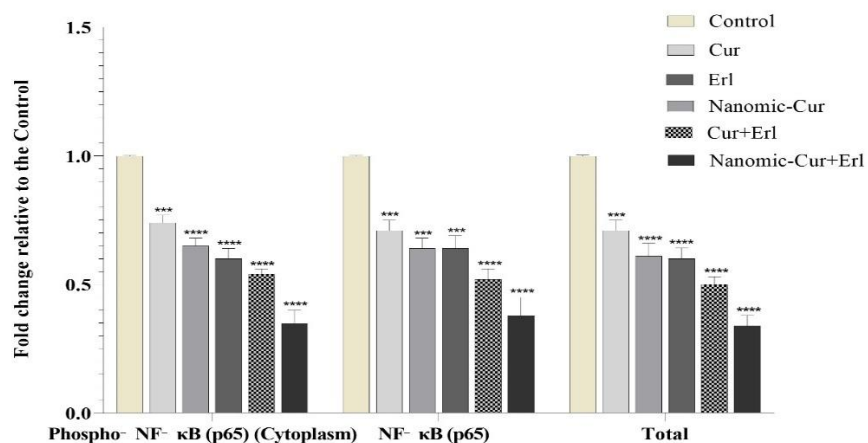
D



A



B



شکل ۸. بررسی سطح پروتئین‌های مرتبط با NF-κB با total NF-κB (p65) و phospho-NF-κB (p65) با استفاده از وسترن بلات. تیمار سلول‌های U87 با کنترل (بدون دارو)، کورکومین، نانومیسل-کورکومین، ارلوتینیب، کورکومین + ارلوتینیب و

نانومیسل-کورکومین + ارلوتینیب همراه با ۲۴ ساعت انکوباسیون. وسترن بلات و سنجش پروتئین‌ها. هر آزمایش سه تکرار دارد. ns. مقدار پی بزرگتر از ۰/۰۵، مقدار پی کمتر مساوی ۰/۰۵، مقدار پی کمتر مساوی ۰/۰۱، مقدار پی کمتر مساوی ۰/۰۰۱ و *** مقدار پی کمتر مساوی ۰/۰۰۱. کورکومین (Cur)، نانومیسل-کورکومین (Nanomic-Cur)، ارلوتینیب (Erl)، کورکومین-ارلوتینیب (Cur+Erl)، نانومیسل-کورکومین بعلاوه ارلوتینیب (Nanomic-Cur+Erl).

بحث

بیان HER-2 mRNA، و تا ۳۰ درصد از بیان سایکلین‌های A، B1، D1 و E جلوگیری می‌کند، در حالیکه بیان پروتئین p21 را افزایش می‌دهد (۳۲). اما سلول‌های سرطانی که در آنها بیان HER-2 افزایش می‌یابد، به طور کلی واکنش انطباقی با مهار کننده‌های HER-2 کیناز را افزایش می‌دهند (۲۰).

مطالعات فعلی نشان داده است که تغییرات ژنتیکی سلول‌های سرطانی و فعال شدن ریزمحیط تومور (۱۳)، مانند انتقال اپیتلیال-مزانشیمی (EMT)، می‌تواند در برابر EGFR TKIها مقاومت ایجاد کند (۲۹-۳۱). EMT با فعال شدن مسیر فاکتور رشد تبدیل کننده بتا (TGF-β) پیش می‌رود، که با افزایش مستقیم مهاجرت و یا تحرک سرطان‌های مختلف مانند سرطان ریه، نقشی اساسی در تهاجم تومور و متاستاز دارد (۲۲). اتصال TGF-β به لیگاند‌هایش منجر به فعال شدن کمپلکس گیرنده TGF-β، از جمله زیر واحدهای نوع یک (TGF-βRI) و نوع دو (TGF-βRII) می‌شود، سپس Smad2 و Smad3 را از طریق فسفوریلاسیون فعال می‌کند. فسفریله و فعال شدن Smad2/3، کمپلکس‌های رونویسی را همراه با Smad4 و سایر عوامل رونویسی ایجاد می‌کند. این کمپلکس‌ها رونویسی ژن را تنظیم می‌کنند، که واسطه خصوصیات تقویت کننده تومور است (۲۲). عوامل درمانی بسیاری برای سرطان پیشنهاد شده است (۸)، که برخی از آنها عبارتند از TKI، برای مسدود کردن اتوفاژی، تسهیل مرگ سلولی و فعال سازی اتوفاژی مربوط به بقا (pro-survival) (۳۳-۳۴).

مسیر NF-κB عمدتاً به دلیل عملکرد آن در موقعیت‌های التهابی مزمن، که باعث افزایش سرطان-زایی شده، هدفی جدید برای مقاصد درمانی محسوب می‌شود (۷، ۱۱). علاوه بر این، مطالعات همبستگی و مطالعات تجربی مزایای جلوگیری از التهاب مزمن در کاهش بروز سرطان را نشان داده اند (۲۱، ۲۴، ۳۵). مطالعات اخیر نشان داده است که فعال سازی NF-κB در مقاومت اکتسابی EGFR-TKI نقش دارد. علاوه بر این، NF-κB می‌تواند یک بیومارکر درمانی بالقوه در بیماران مقاوم به EGFR-TKI باشد (۲۸-۲۹). همچنین، مهار کننده‌های اختصاصی NF-κB، آپوتوز سلولی با واسطه EGFR-TKI را در سلول‌های جهش یافته EGFR افزایش دادند (۲۵).

گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال (EGFR) با اتصال لیگاند‌های اختصاصی مانند فاکتور رشد تبدیل کننده -آلفا (TGFα) و فاکتور رشد اپیدرمی بر روی سطح سلول فعال می‌شود. EGFR عضوی از خانواده‌های RTK، از جمله HER-2 / erbB2، HER-4 / erbB4 و HER-3 / erbB3 است (۲۳-۲۴).

کورکومین همچنین می‌تواند مسیرهای سیگنالینگ، به عنوان مثال، مسیر MAPK و تأثیر آن را بر روی یکی از فاکتورهای مهم رونویسی یعنی NF-κβ تنظیم کند. پس از تیمار دو رده سلولی سرطان پستان BT-474 و SK-BR-3، کورکومین فقط باعث کاهش فسفوریلاسیون MAPK و Akt و کاهش بیان فاکتور NFκβ شد. مطالعات دیگر نشان داده‌اند که تیمار سلول‌های SK-BR-3 با کورکومین تا ۷۰ درصد از

اگرچه هنوز مکانیسم‌های دقیق اثرات هم افزایی مهار اتوفاژی و EGFR-TKI روشن نشده است.

مطالعات بیوانفورماتیک با ابزار جستجو برای بازیابی ژنها / پروتئینهای متقابل (STRING) حاکی از آن است که β -کاتین با چندین ژن از جمله CCND1، Akt1، JUN، مهارکننده‌های تومور در p53 و VEGFA ارتباط دارد (۳۷). علاوه بر این، چندین مسیر سیگنالینگ، از جمله انسولین، پروتئین کیناز فعال شده با میتوزن، محل اتصال چسبنده‌ها، چسبندگی کانونی و مسیرهای ErbB، به عنوان مسیرهای مرتبط با β -کاتین پیشنهاد شده‌اند. با توجه به این آنالیزها، بسیاری از مطالعات سعی در شناسایی ارتباط بین مسیرهای WNT و EGFR داشتند. نشان داده شده است که مهار β -کاتین در رده‌های سلولی گلیوبلاستوما (U87MG and LN229) منجر به کاهش بیان STAT3، EGFR، Akt1، MMP9، MMP2، c-MYC و FRA-1 می‌شود.

افزایش بیان ژن، تکثیر لوکوس و جهش‌های ژنتیکی EGFR از ویژگی‌های بارز گلیوبلاستوما است که به صورت نابجا می‌تواند آبشارهای پایین دست سیگنالینگ سرطانزایی مانند مسیر PI3K/mTOR/Akt را فعال کند (۲۳). مطمئناً، دستکاری این مسیر ضروری در تنظیم اتوفاژی، می‌تواند مقاومت رادیویی را در سلول‌های گلیوبلاستوما افزایش دهد و فنوتیپ تهاجمی تومور را تقویت کند. همچنین گزارش شده است، پروفایل بیان EGFR درون‌زاد و اتوفاژی طوری تنظیم می‌شود که به افزایش حساسیت به اشعه در سلول‌های U373MG و T98G گلیوبلاستوما انسانی منجر گردد (۲۳). یافته‌های آنها در درجه اول حاکی از آن است که EGFR بر اساس توانایی کاهش کلونوزنیک سلول‌های مورد مطالعه و کاهش واقعی خصوصیات مهاجرت در شرایط آزمایشگاهی، باعث ایجاد حساسیت به اشعه می‌شود. علاوه بر این،

دخالتهای EGFR منجر به افزایش سمیت سلولی تموزولومید (TMZ) در سلول‌های T98G مقاوم به TMZ شد (۲۳). در سلول‌های تیمار شده با EGFR، برای روشن کردن نقش اتوفاژی مربوط به بقا یا مرگ (pro-survival or pro-death)، ژن کلیدی اتوفاژی یعنی ATG7 تخریب شد و یک فرآیند بلوک‌سازی گذرای اتوفاژی ایجاد شد. این پیشگیری از اتوفاژی توانایی کلونوزنیک سلول‌های T98G با EGFR خاموش شده و اشعه دیده را حفظ کرد، که نشانگر درگیری اتوفاژی pro-death است. برای تأیید بیشتر تعامل عملکردی بین مسیرهای اتوفاژی و EGFR، اتوفاژی ناشی از راپامایسین در هنگام تنظیم EGFR باعث افزایش ناتوانی مهاجرت سلول‌های اشعه دیده و توانایی‌های کلونوزنیک آنها می‌شود. به طور کلی، این یافته‌ها ترکیبی جدید از استراتژی‌های تنظیم اتوفاژی توسط EGFR برای کنترل مقاومت ذاتی به رادیواکتیو در گلیوبلاستوما را نشان می‌دهد، که باعث بهبود اثربخشی درمان‌های استاندارد می‌شود (۲۳).

آیمر و همکارانش مهار تکثیر سلولی و القای آپوپتوز توسط ارلوتینیب را در U87-MG و DBTRG-05MG دو رده سلولی گلیوبلاستوما انسانی مطالعه کردند (۵). بیان چندین پروتئین مربوط به آپوپتوز در این دو رده سلولی بررسی شد. مشخص شد بافت توموری از گلیوبلاستوما نشات می‌گرفت. هر دو رده سلولی بیان EGFR وحشی را نشان داد اما فاقد PTEN بودند. ارلوتینیب باعث تجمع قابل توجه پروتئین BIM شد، اما صرف نظر از کاهش XIAP، فعال سازی کاسپاز ۳ از بین رفت. علاوه بر این، در U87-MG، ارلوتینیب باعث افزایش تجمع α -B-cry در یک پروتئین شوک حرارتی کوچک شد که می‌تواند مانع فعال شدن کاسپاز شود. DBTRG-05 MG فاقد پروکاسپاز ۳ است و به طور مداوم و شدید α -کریستالین را بیان می‌کند. به همین ترتیب، نبود

factor and cyclooxygenase-inhibitions as likely mechanisms behind the acetaminophen- and NSAID-prevention of the ovarian cancer. *Neoplasma*, 51(4): 239-247.

2. Bagherian A., Mardani R., Roudi B., Taghizadeh M., Banfshe H.R., Ghaderi A., Davoodvandi A., Shamollaghamsari S., Hamblin MR., Mirzaei H. 2020. Combination Therapy with Nanomicellar-Curcumin and Temozolomide for In Vitro Therapy of Glioblastoma Multiforme via Wnt Signaling Pathways. *Journal of Molecular Neuroscience*, 70(10): 1471-1483.

3. Chiu Ch., Chang Y., Kuo K., Shen Y., Liu Ch., Yu Y., Cheng Ch., Lee K., Chen F., Hsu M., Kuo T., Ma J., Su J. 2016. NF- κ B-driven suppression of FOXO3a contributes to EGFR mutation-independent gefitinib resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(18): 2526-2535.

4. Coghil A E., Phipps AI., Bavry A., Wactawski-Wende J., Lane S., LaCroix A., Newcomb P. 2012. The association between NSAID use and colorectal cancer mortality: results from the women's health initiative. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 21(11): 1966-1973.

5. Eimer S., Belaud-Rotureau M., Airiau K., Jeanneteau M., Laharanne E., Véron N., Vital A., Loiseau H., Merlio J., Belloc F. 2011. Autophagy inhibition cooperates with Erlotinib to induce glioblastoma cell death. *Cancer Biology and Therapy*, 11(12): 1017-1027.

6. Eskilsson E., Røslund G.V., Solecki G., Wang Q., Harter P.N., Graziani G., Verhaak R.G.W., Winkler F., Bjerkvig R., Miletic H. 2018. EGFR heterogeneity and implications for therapeutic intervention in glioblastoma. *Neuro-Oncology*, 20(6): 743-752.

7. Greten F.R., Eckmann L., Greten T.F., Park J.M., Li Zh., Egan L.J., Kagnoff M.F., Karin M. 2004, IKKbeta links

پروکاسپاز ۳ و PTEN به طور مداوم در نمونه‌های گلیوبلاستوما مشاهده شد، در حالی که α B-crystallin بیان متناقضی نشان داد. غلظت‌های بالاتر ارلوتینیب از طریق مکانیسم مستقل از کاسپاز، منجر به مرگ سلول شد و یک عامل اتوفازیک در رده‌های سلولی U87-MG گزارش شده است. مهار اتوفازی منجر به افزایش قابل توجهی در خواص کشندگی ارلوتینیب می‌شود. این یافته‌ها تأیید کرد که رده‌های سلولی گلیوبلاستوما فعالیت‌های مختلف ضدآپوپتوزی را نشان می‌دهد، و تأکید می‌کنند که برای دستیابی به خاصیت ضد توموری، درمان هدفمند EGFR باید با سایر داروهای مهار کننده همراه باشد (۳۶).

در یک تحقیق، ما نشان دادیم که کورکومین (۵۰ میکرومولار)، نانومیسلار کورکومین به تنهایی و همراه با TMZ به طور چشمگیری مهاجرت و تهاجم سلول‌های U87 را کاهش داد (۱۷). پروتئین‌های مرتبط با اتوفازی (Beclin 1, LC3-II, LC3-I) به طور معناداری افزایش یافتند. پروتئین‌های مرتبط با آپوپتوز (کاسپاز ۸ و Bcl-2) نیز به طرز چشمگیری افزایش یافتند، در حالی که پروتئین Bax به طور معناداری کاهش یافت. سطح بیان ژن مربوط به مسیر Wnt (ZEB1, β -catenin, Twist, and cyclin D1) به شدت کاهش یافت (۱۰، ۱۱).

نتیجه‌گیری

به طور کلی، این نتایج نشان داد که کورکومین و نانومیسل کورکومین به تنهایی یا در ترکیب با ارلوتینیب از طریق تنظیم یک سری مکانیسم‌ها مانند آپوپتوز، اتوفازی، آنژیوژنز، مسیرهای سیگنالینگ Wnt و NF- κ B، اثرات ضدگلیوبلاستوما از خود نشان می‌دهند.

منابع

1. Altinoz, M.A., Korkmaz R. 2004. NF-kappaB, macrophage migration inhibitory

15. Li L., Puliappadamba V.T., Chakraborty S., Rehman A., Vemireddy V., Saha D., Souza R F., Hatanpaa K J., Koduru P., Burma S., Boothman D A., Habib A.A. 2015. EGFR wild type antagonizes EGFRvIII-mediated activation of Met in glioblastoma. *Oncogene*, 34(1): 129-134.
16. Li X., Fan Z. 2010. The epidermal growth factor receptor antibody cetuximab induces autophagy in cancer cells by downregulating HIF-1alpha and Bcl-2 and activating the beclin 1/hVps34 complex. *Cancer Research*, 70(14): 5942-5952.
17. Liu X., Chong Y., Tu Y., Liu N., Yue Ch., Qi Zh., Liu H., Yao Y., Liu H., Gao Sh., Niu M., Yu R. 2016. CRM1/XPO1 is associated with clinical outcome in glioma and represents a therapeutic target by perturbing multiple core pathways. *Journal of Hematology and Oncology*, 9(1): 108.
18. Liu X., Chen X., Shi L., Shan Q., Cao Q., Yue Ch., Li H., Li Sh., Wang J., Gao Sh., Niu M., Yu R. 2019. The third-generation EGFR inhibitor AZD9291 overcomes primary resistance by continuously blocking ERK signaling in glioblastoma. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 38(1): 219.
19. Mardani R., Hamblin M.R., Taghizadeh M., Banafshe HR., Nejadi M., Mokhtari M., Borran S., Davoodvandi A., Khan H., Jaafari MR., Mirzaei H. 2020. Nanomicellar-curcumin exerts its therapeutic effects via affecting angiogenesis, apoptosis, and T cells in a mouse model of melanoma lung metastasis. *Pathology - Research and Practice*, 216(9): 153082.
20. Matkar S., Sharma P., Gao Sh., Gurung B., Katona B W., Liao J., Muhammad A B., Kong X.C.H., Wang L., Jin G., Dang Ch, Hua X. 2015. An Epigenetic Pathway Regulates Sensitivity of Breast Cancer Cells to HER2 Inhibition via FOXO/c-Myc Axis. *Cancer Cell*, 28(4): 472-485.
- inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*, 118(3): 285-296.
8. Han W., Pan H., Chen Y., Sun J., Wang Y., Li J., Ge W., Feng L., Lin X., Wang X., Wang X., Jin H. 2011. EGFR tyrosine kinase inhibitors activate autophagy as a cytoprotective response in human lung cancer cells. *PLoS One*, 6(6): e18691.
9. Hesari A.R., Azizian M., Sheikhi A., Nesaei A., Sanaei S., Mahinparvar N., Derakhshani M., Hedayat P., Ghasemi F., Mirzaei H. 2019. Chemopreventive and therapeutic potential of curcumin in esophageal cancer: Current and future status. *International Journal of Cancer*, 144(6): 1215-1226.
10. Karin M. 2006. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*, 441(7092): 431-6.
11. Karpel-Massler G., Halatsch M.E. 2014. Erlotinib in Glioblastoma—A Current Clinical Perspective. *Tumors of the Central Nervous System: Primary and Secondary*, DOI: 10.5772/58296.
12. Karpel-Massler G., Schmidt U., Unterberg A., Halatsch M. 2009. Therapeutic inhibition of the epidermal growth factor receptor in high-grade gliomas: where do we stand? *Molecular Cancer Research*, 7(7): 1000-1012.
13. Kobayashi S., Boggon T.J., Dayaram T., Jänne P.A, Kocher O., Meyerson M., Johnson B.E., Eck M.J, Tenen D G, Halmos B. 2005. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *The New England Journal of Medicine*, 352(8): 786-792.
14. Lai H.W., Chien S.Y., Kuo S.J., Tseng L M., Lin H Y., Chi Ch W., Chen D.R. 2012. The Potential Utility of Curcumin in the Treatment of HER-2-Overexpressed Breast Cancer: An In Vitro and In Vivo Comparison Study with Herceptin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012: 486568.

Trends in Molecular Medicine: Cell Press, 21(6): 385-393.

29. Sos M.L., Koker M., Weir B.A., Heynck S., Rabinovsky R., Zander T., Kashkar H., Pao W., Meyerson M., Thomas R.K. 2009. PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of Akt and EGFR. *Cancer Research*, 69(8): 3256-3261.

30. Suda K., Tomizawa K., Fujii M., Murakami H., Osada H., Maehara Y., Yatabe Y., Sekido Y., Mitsudomi T. 2011. Epithelial to mesenchymal transition in an epidermal growth factor receptor-mutant lung cancer cell line with acquired resistance to Erlotinib. *Journal of Thoracic Oncology*, 6(7): 1152-1161.

31. Thomson S., Buck E., Petti F., Griffin G., Brown E., Ramnarine N., Iwata K.K., Gibson N., Haley J.D. 2005. Epithelial to mesenchymal transition is a determinant of sensitivity of non-small-cell lung carcinoma cell lines and xenografts to epidermal growth factor receptor inhibition. *Cancer Research*, 65(20): 9455-9462.

32. Venkiteswaran S., Hsu H.C., Yang P., Thomas T., Thomas T.J. 2014. curcumin interferes with HER-2 signaling in a redox-dependent manner in SK-BR-3 human breast cancer cells. *Journal of Human Nutrition and Food Science*, 2: 1-8.

33. Vivanco I., Robins H.I., Rohle D., Campos C., Grommes C.H., Nghiemphu Ph L., Kubek S., Oldrini B., Chheda M G., Mellinghoff I.K. 2012. Differential sensitivity of glioma- versus lung cancer-specific EGFR mutations to EGFR kinase inhibitors. *Cancer Discovery*, 2(5): 458-471.

34. Wang Zh., Du T., Dong X., Li Zh., Wu G., Zhang R. 2016. Autophagy inhibition facilitates erlotinib cytotoxicity in lung cancer cells through modulation of endoplasmic reticulum stress. *International Journal of Oncology*, 48(6): 2558-2566.

21. Nduom E.K., Wei J., Yaghi N.K., Huang N., Kong L.Y., Gabrusiewicz K., Ling X., Heimberger A.B. 2016. PD-L1 expression and prognostic impact in glioblastoma. *Neuro-Oncology*, 18(2): 195-205.

22. Padua D., Massagué J. 2009. Roles of TGF β in metastasis. *Cell Research*, 19(1): 89-102.

23. Palumbo S., Tini P., Toscano M., Allavena G., Angeletti F., Manai F., Miracco C., Comincini S., Pirtoli L. 2014. Combined EGFR and autophagy modulation impairs cell migration and enhances radiosensitivity in human glioblastoma cells. *Journal of Cellular Physiology*, 229(11): 1863-1873.

24. Prados M D., Byron S A., Tran N L., Phillips J L., Molinaro N M., Ligon K L., Wen P Y., Kuhn J., Trent J.M. 2015. Toward precision medicine in glioblastoma: the promise and the challenges. *Neuro-Oncology*, 17(8): 1051-1063.

25. Sakuma Y., Yamazaki Y., Nakamura Y., Yoshihara M., Matsukuma Sh., Koizume Sh., Miyagi Y. 2012. NF- κ B signaling is activated and confers resistance to apoptosis in three-dimensionally cultured EGFR-mutant lung adenocarcinoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 423(4): 667-671.

26. Scaltriti, M., Baselga J. 2006. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clinical Cancer Research*, 12(18): 5268-5272.

27. Shabaninejad Z., Pourhanifeh M.H., Movahedpour A., Mottaghi R., Nickdasti A., Mortezapour E., Shafiee A., Hajighadimi S., Moradizarmehri S., Sadeghian M., Mousavi S.M., Mirzaei H. 2020. Therapeutic potentials of curcumin in the treatment of glioblastoma. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 188: 112040.

28. Shostak, K. and A. Chariot, 2015. EGFR and NF- κ B: partners in cancer.

37. Yue X., Lan FM., Yang W., Yang Y., Han L., Zhang A., Liu J., Zeng H., Tao Jiang, Pu P., Kang Ch S.H. 2010. Interruption of β -catenin suppresses the EGFR pathway by blocking multiple oncogenic targets in human glioma cells. *Brain Research*, 1366: 27-37.
35. Wells, A. (1999), EGF receptor. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31(6): 637-643.
36. Westover D., Zugazagoitia J., Cho B.C., Lovly C.M., Paz-Ares L. 2018. Mechanisms of acquired resistance to first- and second-generation EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Annals of Oncology*, 29(suppl-1): i10-i19.

