

بررسی اثرپذیری داروی دوکسوروبیسین در رده سلول عصبی SH-SY5Y با افزایش سطح بیان کاسپاز 9

سید حسین بهشتی شوشتری¹، فرنگیس عطایی^{2*}، سامان حسینخانی³

1- کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

2- دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

3- استاد، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

نویسنده مسئول :

Ataei_f@modares.ac.ir

فکس : 82884717

شماره تلفن : 82884748

آدرس پستی و کد پستی دانشگاه: تهران - تقاطع بزرگراه جلال آل احمد و شهید چمران - دانشگاه تربیت مدرس - دانشکده علوم زیستی - گروه بیوشیمی، صندوق پستی 14115-154

پذیرش: 1402/4/6

دریافت: 1402/2/5

چکیده

SH-SY5Y رده سلولی نوروبلاستوما است که به عنوان مدل سلولی از سرطان و اختلال‌های نورودژنراتیو در مطالعات عصبی - تجربی استفاده می‌شود. یکی از عوامل ایجاد بیماری نقص در مسیر آپوپتوز است. اختلال در پروتئین‌های آپوپتوزی بر فرایند درمان و پاسخ به دارو تأثیر دارد. در سلول‌های عصبی به دلیل بیان بالای پروتئین‌های مهارکننده آپوپتوز، اثرپذیری داروها چندان نیست. درمان ترکیبی یکی از روش‌های درمان در حال توسعه است. هدف از این پژوهش، ارزیابی اثرپذیری داروی دوکسوروبیسین بر آپوپتوز در سلول SH-SY5Y در شرایط بیان بالای کاسپاز-9 است. کاسپاز-9 آنزیم کلیدی و پیش‌برنده آپوپتوز داخلی است. نخست با MTT سطح زنده‌مانی سلول تحت تأثیر غلظت‌های مختلف دارو به دست آمد. سپس در سلول ژن کاسپاز-9 ترانسفکت شد و تحت تأثیر غلظت کمتر از IC50 دارو قرار گرفت و با روش‌های مختلف، سطح انرژی و مرگ سلول بررسی شد. نتایج حاصل از سنجش ATP نشان داد با افزایش بیان کاسپاز-9 در حضور دارو، سطح ATP کاهش پیدا می‌کند. فعالیت کاسپاز 7/3 (که شاخصی از مرگ سلول است) بیانگر افزایش مرگ طی اثر دارو بر سلول دریافت‌کننده کاسپاز است. نشر حاصل از رنگ‌آمیزی پروپیدیوم به هوشمند نشان داد بیان کاسپاز-9 در ترکیب با دارو موجب القای بیشتر مرگ خواهد شد. برای اطمینان از سطوح بیانی پروتئین القاکننده مرگ سلولی، با وسترن بلات مقدار پروتئین کاسپاز-3 بررسی شد که افزایش معناداری در حالت ترکیب کاسپاز-9 و دارو نشان داد. یافته‌های این پژوهش نشان داد القای بیان کاسپاز-9 تأثیر دارو را تشدید می‌کند و درمان ترکیبی ممکن است بر پاسخ‌پذیری بیماری‌های نورونی مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: SH-SY5Y، کاسپاز-9، دارو، انرژی سلول، مرگ سلول.

1- مقدمه

آپوپتوز نوعی مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده است که در تنظیم انواع سازوکارهای زیستی نقش دارد. این نوع مرگ سلولی به عنوان فرایندی بسیار انتخابی و مهم در هر دو شرایط فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی به شمار می‌آید. آپوپتوز فرایندی وابسته به انرژی است که نقش مهمی در رشد و نمو ارگانیسم‌های چندسلولی از راه حذف سلول‌های آسیب‌دیده، پیر و یا خودایمن در جهت حفظ همئوستازی بافت ایفا می‌کند. طی این فرایند، رشد و تقسیم سلول متوقف می‌شود و وارد فرایندی می‌شود که در نهایت منجر به مرگ کنترل‌شده سلول بدون ریختن محتویات آن به محیط اطراف می‌شود. آپوپتوز همچنین به عنوان مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی (خودکشی سلولی) شناخته می‌شود [1؛ 2]. نقص در آپوپتوز منجر به بروز بیماری‌های مختلفی همچون انواع سرطان‌ها می‌شود. علاوه بر این، وجود پروتئین‌های مختلف از جمله پروتئین‌های مهارکننده آپوپتوز (IAP) در برخی از انواع سرطان‌ها می‌تواند منجر به بروز مقاومت به شیمی‌درمانی شود [3]. از این رو یکی از راهبردهای درمان سرطان، درمان ترکیبی است که در این روش چند دارو و مهارکننده به صورت همزمان استفاده می‌شود [4].

کاسپازها خانواده‌ای از پروتئازها هستند که نقش مهمی در مرگ سلولی بازی می‌کنند. اعضای خانواده کاسپازها در توالی آمینواسیدی، ساختار و سوبسترا تشابه زیادی دارند. همه آنها به صورت پیش‌آنزیم تک‌زنجیره‌ای سه‌دمینی تولید می‌شوند که پس از برش در جایگاه‌های مشخصی به فرم فعال تبدیل می‌شوند. سیستمین موجود در جایگاه فعال این آنزیم‌ها با حمله نوکلئوفیلی به آسپارتیک‌اسید موجب برش پروتئین هدف می‌شود [5].

به صورت کلی کاسپازها را می‌توان در دو گروه جای داد: دسته اول کاسپازهایی که طی آپوپتوز فعال می‌شوند شامل کاسپازهای 2، 3، 6، 7، 8، 9، 10. دسته دوم کاسپازهایی که طی التهاب فعال می‌شوند شامل کاسپازهای 5، 6، 7، 8، 9. کاسپاز 9 آنزیمی است که در انسان به وسیله ژن CASP9 رمزگذاری می‌شود. این کاسپاز آغازگر در بسیاری از بافت‌ها از جمله در میتوکندری، سیتوزول و هسته دیده می‌شود. عملکرد صحیح کاسپاز 9 برای آپوپتوز مورد نیاز است و منجر به رشد طبیعی سیستم عصبی مرکزی می‌شود. بدون عملکرد صحیح این پروتئین، ممکن است رشد غیرطبیعی بافت منجر به عملکرد غیرطبیعی، بیماری‌ها و مرگ زودرس شود [8].

SH-SY5Y یک رده سلولی سه بار ساب‌کلون شده است که از رده سلولی نوروبلاستوما به نام SK-N-SH مشتق شده است. این سلول‌ها علاوه بر مدلی از سرطان به عنوان مدلی برای اختلال‌های نورودژنراتیو نیز می‌باشد، زیرا می‌توانند با افزودن ترکیب‌های خاص به انواع مختلفی از نورون‌های عملکردی تبدیل شوند. علاوه بر این، رده سلولی SH-SY5Y به طور گسترده در مطالعات عصبی تجربی، از جمله تجزیه و تحلیل تمایز عصبی، متابولیسم و عملکرد مربوط به فرایندهای عصبی، سمیت عصبی، و محافظت عصبی استفاده شده است [9]. در سلول‌های عصبی به دلیل بیان به نسبت بالای پروتئین‌های مهارکننده آپوپتوز (IAP) همچون Survivin و XIAP اثرپذیری داروهای القاکننده آپوپتوز چندان نیست. هدف از این پژوهش، اثرپذیری داروی دوکسوروبیسین بر میزان نرخ آپوپتوز در رده سلولی SH-SY5Y در شرایط بیان بالای کاسپاز 9 است.

2- مواد و روش‌ها

2-1 کشت سلول‌های متعلق به رده سلولی یوکاریوتی

SH-SY5Y

سلول‌های SH-SY5Y پس از انجمادزدایی در فلاسک T25 در محیط کشت سلولی DMEM High Glucose کشت داده شدند. در کشت این رده سلولی از سرم FBS به نسبت 10 درصد حجمی استفاده شد.

2-2 ارزیابی سمیت و بررسی غلظت مؤثر داروی

دوکسوروبیسین به وسیله MTT^1 سنجش

برای به دست آوردن غلظت بهینه دارو بر سلول در شرایط آزمایشگاه، سنجش MTT^1 (که نام آن برگرفته از ترکیب شیمیایی آن است) انجام شد. MTT یک ترکیب زردرنگ تترازولیوم محلول در آب است که به وسیله میتوکندری سلول‌های زنده احیاء شده و به صورت کریستال‌های بنفش رنگ نامحلول تغییر شکل می‌دهد که فورمازان نام دارد و قابلیت حل شدن در $DMSO^2$ را دارد. پس از حل شدن در $DMSO$ بر مبنای روش اسپکتروسکوپی و میزان رنگ تولید شده می‌توان قابلیت زنده‌مانی سلول‌ها را ارزیابی کرد. به این منظور، سلول‌ها در پلیت 96 خانه سید شدند و 24 ساعت بعد غلظت‌های مختلف داروی دوکسوروبیسین به آرامی به سلول‌ها اضافه شد و به مدت 24 ساعت سلول‌ها در معرض دارو قرار گرفتند. در نهایت زنده‌مانی سلول‌ها به روش MTT در طول موج 570 نانومتر به وسیله دستگاه Cytation™ 5 سنجش شد.

2-3 استخراج پلاسمید

پلاسمیدهای استفاده شده در این پژوهش شامل -pcDNA Caspase9 و GFP-pDB2 بودند. همچنین وکتور بدون ژن pcDNA نیز به عنوان کنترل استفاده شد.

¹ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
² Dimethylsulfoxide

برای استخراج پلاسمید در حجم کم، حدود 10 میلی‌لیتر از کشت شبانه (16 ساعت) باکتری حاوی پلاسمید موردنظر را به مدت 5 دقیقه با دور 5000 g رسوب داده و محیط کشت رویی به طور کامل خارج شد. سپس براساس دستورعمل کیت استخراج پلاسمید Favorgen، استخراج انجام شد و کیفیت و کمیت آن به ترتیب با استفاده از ژل آگاروز و نانودراپ بررسی شد.

2-4 ترانسفکت سلولی

ترانسفکت سلولی ژن کاسپاز 9 و نمونه‌های کنترل با روش شیمیایی به وسیله ماده پلی اتیلن ایمین (PEI) با نسبت N/P برابر با 8 انجام شد. برای اطمینان از کیفیت ترانسفکشن، پلاسمید حاوی ژن GFP به عنوان کنترل ترانسفکت استفاده شد. بیان این پروتئین موجب نشر نور سبز در طول موج 509 نانومتر می‌شود که بسته به نوع سلول میزان ترانسفکشن ژن متفاوت خواهد بود. در اینجا، بیان این پروتئین طی 24 ساعت با فاصله‌های حدود 6 ساعت با دستگاه سایتیشن ارزیابی شد. در استفاده از GFP نیاز به جداسازی سلول از کف چاهک و تهیه عصاره سلولی نیست و سلول را می‌توان در شرایط زنده بررسی کرد.

2-5 بافر هایپوتونیک

بافر هایپوتونیک حاوی 10 میلی‌مولار HEPES-KOH، 1.5 میلی‌مولار $MgCl_2$ ، 10 میلی‌مولار KCl، 1 میلی‌مولار Na-EDTA و 6 میلی‌مولار سوکروز به همراه 1 میلی‌مولار PMSF است [10؛ 11]. این بافر برای تهیه عصاره سلولی تهیه و استفاده شد.

2-6 سنجش ATP

سنجش میزان ATP بیانگر سطح انرژی و زنده‌مانی سلول است. در این روش برای سنجش غلظت ATP

8-2- سنجش نسبت نشر رنگ پروپیدیوم یدید به رنگ

هوخست (PI/H)

رنگ آمیزی با رنگ پروپیدیوم یدید (PI) برای شناسایی سلول‌های مرده از سلول‌های زنده انجام شد. همچنین در کنار رنگ آمیزی با رنگ PI رنگ آمیزی به کمک رنگ **هوخست** (Hoechst) انجام گرفت. این رنگ قادر به رنگ آمیزی تمام سلول‌های مرده و زنده است. رنگ‌ها در بافر فسفات به غلظت 300 نانومولار رسانده شدند. به منظور رنگ آمیزی سلول‌ها محیط روی سلول‌ها جمع‌آوری شد و پس از شستشوی آرام به وسیله بافر فسفات، محلول رنگ به هر چاهک اضافه و به مدت 5 دقیقه انکوبه شد. سپس سلول‌ها از کف چاهک کنده و به صورت سوسپانسیون در آمد و پس از شستشو با بافر فسفات، به کمک دستگاه Cytation™ 5 نشر هر رنگ در طول موج مشخص اندازه‌گیری شد [12].

9-2- وسترن بلات

مرحله اول وسترن بلات شامل انجام الکتروفورز ژل پلی اکریل‌امید (SDS-PAGE) است. پس از جمع‌آوری و به دست آوردن عصاره سلولی نمونه‌ها با غلظت یکسان، الکتروفورز انجام شد و طی فرایند ترانسفر انتقال پروتئین از ژل به کاغذ PVDF انجام شد. فرایند انتقال با اعمال جریان 250 میلی‌آمپر به مدت حدود 80 دقیقه انجام شد. در ادامه پس از بلاکینگ کاغذ PVDF با Skim Milk کاغذ به صورت شبانه در معرض آنتی‌بادی مونوکلونال شرکت SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY قرار گرفت و پس از شستشو در معرض آنتی‌بادی ثانویه موشی شرکت abcam قرار گرفت. در نهایت پس از شستشوی دوباره، کمپلکس ECL به کاغذ افزوده شد و به وسیله دستگاه in vivo imaging از کمپانی UVITEC Cambridge خوانش

سلولی پس از تیمار و القای آپوپتوز با دارو در سلول‌های عصبی با انواع ترانسفکت‌ها، از روشی مبتنی بر سنجش فعالیت لوسیفراز استفاده شد. واکنش آنزیمی لوسیفراز وابسته به دو سوبسترای لوسیفیرین و ATP است و با مصرف این دو سوبسترا در حضور اکسیژن، نور تولید خواهد شد [10]. در این تست، سلول‌ها پس از ترانسفکت و تیمار، جمع‌آوری شده و عصاره آنها با استفاده از بافر هایپوتونیک استخراج شد. سپس با استفاده از روش بردفورد یکسان‌سازی غلظت پروتئین انجام شد. پس از رسم نمودار استاندارد ATP، خوانش ATP داخل سلولی با استفاده از کمپلکس حاوی لوسیفیرین (فاقد ATP) و آنزیم لوسیفراز به وسیله دستگاه لومینومتر Berthold انجام شد. در نهایت میزان ATP نمونه‌ها با استفاده از منحنی استاندارد به دست آمد.

7-2- سنجش فعالیت کاسپاز 7/3

برای سنجش فعالیت کاسپاز 7/3 از کیت پرومگا براساس دستورعمل استفاده شد. این کیت (که بر مبنای سنجش بیولومینسانس عمل می‌کند) مخلوطی از آنزیم لوسیفراز و سوبسترای کاسپاز 3/7 (DEVD) متصل به لوسیفیرین دارد. در حضور آنزیم کاسپاز 7/3، پیوند کوالانی بین DEVD و لوسیفیرین شکسته شده، لوسیفیرین آزاد در اختیار آنزیم لوسیفراز موجود در کیت قرار می‌گیرد و موجب نشر بیولومینسانس می‌شود. به منظور بررسی فعالیت آنزیم‌های کاسپاز 7/3 پس از کشت رده سلولی مذکور و تیمار آن با غلظت مشخصی از دارو، سلول‌ها جمع‌آوری شدند و با استفاده از بافر هایپوتونیک عصاره سلولی آنها تهیه شد. پس از یکسان‌سازی غلظت نمونه‌ها، با افزودن نسبت 1 به 3 سوبسترای کاسپاز به نمونه، فعالیت کاسپاز 7/3 به وسیله دستگاه Cytation™ 5 سنجش شد [11].

انجام شد. در تمام مراحل پس از مرحله ترانسفر از بافر PBST استفاده شد.

پس از مشاهده و ثبت باندهای به دست آمده، نخست به وسیله نرم افزار image j کمی سازی و به کمک نرم افزار graph pad prism نمودار مربوط به هر باند رسم شد.

3- نتایج

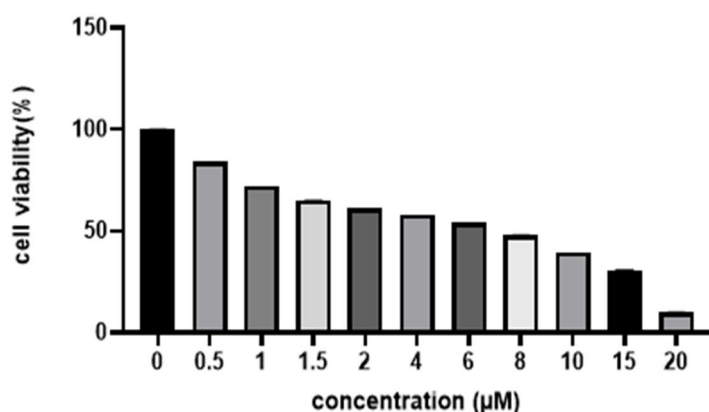
3-1 بررسی سمیت داروی دوکسوروبیسین به وسیله

سنجش MTT

برای پیدا کردن میزان کشندگی داروی دوکسوروبیسین سنجش MTT در حضور غلظت های مختلف دارو انجام شد تا غلظت مناسب دارو برای تیمار سلول مشخص شود. سنجش MTT روی سلول بدون

ترانسفکت انجام شد. نتایج به دست آمده در شکل 1 نشان داد که با افزایش غلظت دارو، میزان مرگ سلول افزایش پیدا کرده است و در غلظت حدود 7 میکرومولار دارو 50 درصد سلول دچار مرگ شده اند. به بیان دیگر IC50، این دارو در این رده سلولی در شرایط ذکر شده 7 میکرومولار است.

باتوجه به اینکه هدف از این پژوهش، بررسی اثرپذیری داروی دوکسوروبیسین در رده سلول عصبی SH-SY5Y از راه افزایش سطح بیان کاسپاز 9 (که یک پروتئین پیش برنده آپوپتوز است) دارو در غلظت کمتر از IC50 استفاده شد که غلظت انتخاب شده داروی دوکسوروبیسین 1,5 میلی مولار است.



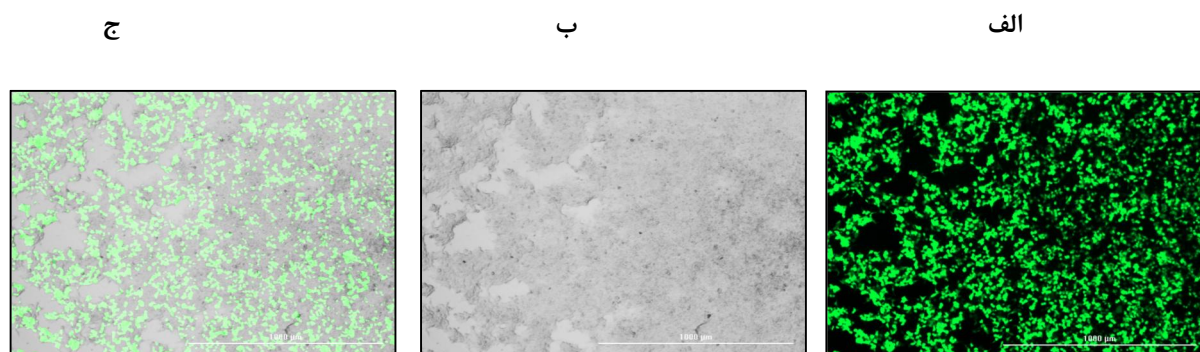
شکل 1 درصد زنده ماندن سلول SH-SY5Y در غلظت های مختلف داروی دوکسوروبیسین با روش MTT

ژن به عنوان کنترل استفاده شد. ترانسفکت ها در تراکم حدود 70 درصد و نسبت N/P معادل 8 انجام شد. پس از گذشت حدود 24 ساعت، سلول های ترانسفکت شده با غلظت انتخاب شده از دارو تیمار شدند و به مدت 24 ساعت تحت تیمار قرار گرفتند. سپس سلول ها شستشو و جمع آوری شده و پس از تهیه عصاره سلولی، آنالیزهای مورد نظر انجام شد.

3-2 ترانسفکت وکتور حامل ژن کاسپاز 9 به رده

سلولی SH-SY5Y و تیمار با دارو

نخست از ژن GFP به عنوان کنترل برای بررسی کیفیت و میزان ترانسفکت سلول مورد نظر استفاده شد که نتایج نشان داد قابلیت ترانسفکشن سلول با پلی اتیلن ایمین در شرایط انتخاب شده مناسب است و تأیید می شود (شکل 2). در ادامه، ژن کاسپاز 9 در وکتور pcDNA به عنوان عامل القا کننده هدف و وکتور pcDNA بدون



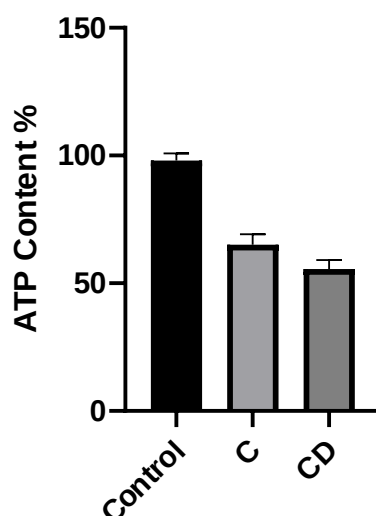
شکل 2 کیفیت ترانسفکت GFP در رده سلولی SH-SY5Y پس از 24 ساعت

الف - تصویر فلورسانس پروتئین GFP؛ ب - تصویر سلول‌ها (زمینه روشن)؛ ج - تصویر تطابق‌یافته (همپوشان) سلول‌ها و تصویر فلورسانس پروتئین GFP

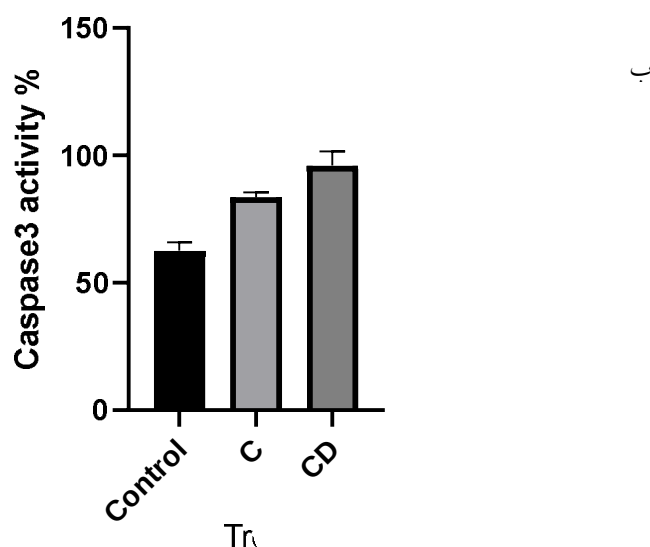
3-3 سنجش سطح ATP سلولی

آپوپتوز یک شکل مشخص از مرگ سلولی است که به انرژی نیاز دارد. این انرژی در سلول به وسیله ATP تأمین می‌شود. فعال‌سازی کاسپاز، هیدرولیز آنزیمی ماکرومولکول‌ها، تراکم کروماتین، تشکیل حباب و تشکیل اجسام آپپتوتیک همگی فرایندهایی انرژی‌خواه در فرایند آپپتوز هستند [13؛ 14]. بنابراین سنجش میزان ATP سلول می‌تواند نمایانگر میزان آپپتوز باشد. برای بررسی محتوای ATP درون سلولی نمونه‌ها، پس از گذشت 24 ساعت از تیمار سلول‌های ترانسفکت‌شده با داروی

دوکسوروبیسین در غلظت انتخاب‌شده، محتوای ATP سلولی با استفاده از آنزیم لوسیفراز اندازه‌گیری شد. بر مبنای این سنجش، غلظت ATP بیشتر به معنای آپپتوز کمتر و زنده‌مانی بیشتر سلول است. نتایج حاصل نشان داد که ترانسفکت کاسپاز-9 به سلول موجب کاهش سطح ATP سلول و افزایش آپپتوز شده و در ترکیب با داروی دوکسوروبیسین، سطح ATP کاهش بیشتری دارد (شکل 3 الف). بنابراین نتایج حاصل از این آنالیز نشان داد که با افزایش سطح بیان کاسپاز-9، شدت اثر دارو در سلول عصبی SH-SY5Y افزایش پیدا می‌کند.



الف



شکل 3 الف: سنجش میزان ATP درون سلولی در حالت کنترل، در مقایسه با سلول‌های ترانسفکت شده با کاسپاز 9 در عدم حضور و حضور دوکسوروبیسین؛ ب- ارزیابی درصد فعالیت آنزیم کاسپاز 3 درون سلولی در حالت کنترل، در مقایسه با سلول‌های ترانسفکت شده با کاسپاز 9 در عدم حضور و حضور دوکسوروبیسین. Control: نمونه کنترل؛ C- سلول‌های ترانسفکت شده با کاسپاز-9؛ CD - سلول‌های ترانسفکت شده با کاسپاز -9 و تیمار شده با داروی دوکسوروبیسین

3-4 سنجش فعالیت کاسپاز 7/3 درون سلولی

کاسپازها واسطه‌های حیاتی مرگ برنامه‌ریزی شده آپوپتوز هستند. در میان آنها، کاسپاز 3 یک پروتئاز کلیدی است که اغلب در شرایط مرگ سلولی فعال می‌شود که پروتئین طی برش فعال شده و بسیاری از پروتئین‌ها و مسیرهای پایین دست را فعال می‌کند [7]؛ [15]. یکی از سنجش‌های مرتبط با آپوپتوز ارزیابی فعالیت کاسپازها است. در این آزمایش با اضافه کردن سوبسترای آنزیم کاسپاز به نمونه و انکوباسیون، با یک واکنش نشری امکان محاسبه فعالیت آنزیم وجود دارد. در اینجا فعالیت کاسپاز 7/3 روی عصاره سلولی تهیه شده انجام شد. نتایج نشان داد که کمترین فعالیت کاسپاز 7/3 مربوط به نمونه کنترل است و ترانسفکت کاسپاز 9 به خصوص در حضور داروی دوکسوروبیسین به صورت چشمگیری موجب افزایش سطح فعالیت کاسپاز 7/3 شده است (شکل 3 ب).

3-5 ارزیابی مرگ سلول با نسبت نشر رنگ پروپیدیوم

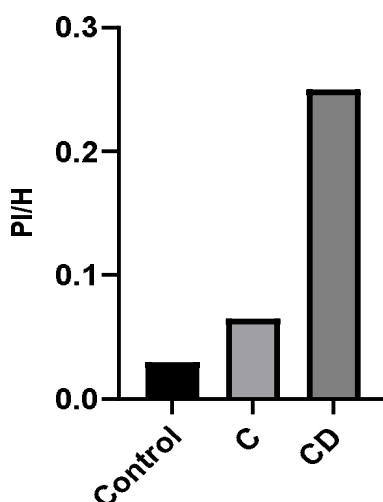
دید به هوخست

رنگ پروپیدیوم دید می‌تواند در سلول‌هایی که غشای آنها دچار آسیب شده باشند، نفوذ کند. سپس به هسته سلول راه پیدا کرده و DNA سلول آسیب دیده را رنگ آمیزی کند [16]. بنابراین می‌تواند شاخص مناسبی برای تشخیص سلول‌های مرده از سلول‌های زنده باشد. این رنگ در 535nm دارای جذب و در 617nm نشر نور دارد و موجب قرمز دیده شدن هسته سلول‌های آسیب دیده می‌شود. در نتیجه نقاط قرمز رنگ بیانگر سلول آسیب دیده است. نکته مهم درباره رنگ پروپیدیوم دید تداخل نشر این رنگ با نشر داروی دوکسوروبیسین است که نشر نمونه کنترل بررسی شد و از نشر سلول‌های هدف کسر شد. رنگ هوخست رنگی آبی از خانواده رنگ‌های فلورسنت است که قادر به اتصال به DNA است. این

رنگ می‌تواند سلول‌های غیرزنده و سلول‌های زنده را رنگ کند. رنگ هوخست در طول موج 350nm جذب داشته و دو ناحیه نشری بیشینه در 461nm و 510nm دارد که ناحیه نشری دوم مربوط به رنگ در شرایط غیرمتصل به DNA است [17] بنابراین برای مشاهده وضعیت سلول نشر رنگ یاد شده در طول موج نشر 461nm بررسی شد.

برای استانداردسازی و تعیین دقیق‌تر میزان مرگ سلولی در هر نمونه، نسبت پروپیدیوم یدید به هوخست

محاسبه شد. به این منظور، سلول پس از ترانسفکت و انتقال ژن کاسپاز 9 و تیمار با داروی دوکسوروبیسین، رنگ آمیزی شد. پس از به دست آمدن نشر هر رنگ، نسبت نشر رنگ پروپیدیوم یدید به نشر هوخست محاسبه شد که نشان‌دهنده میزان مرگ سلول است (شکل 4). نتایج نشان داد که میزان مرگ سلول پس از ترانسفکت ژن کاسپاز 9 افزایش پیدا کرد و افزودن دارو نسبت به نمونه بدون دارو به صورت چشمگیری موجب افزایش میزان مرگ سلولی شد.



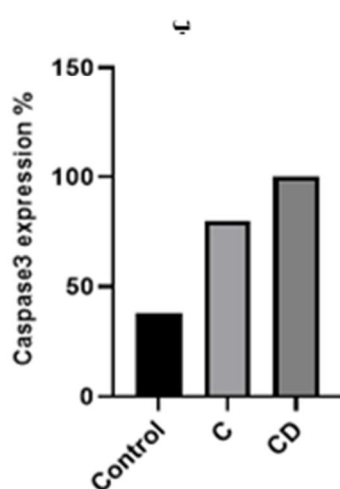
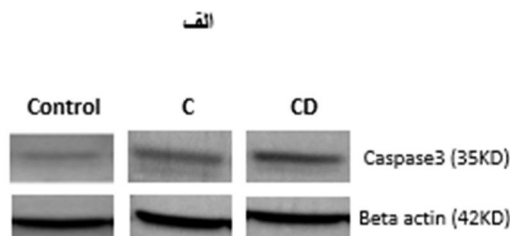
شکل 4 نسبت نشر رنگ PI/H (پروپیدیوم یدید به هوخست) در حالت کنترل، در مقایسه با سلول‌های ترانسفکت شده با کاسپاز 9 در عدم حضور و حضور دوکسوروبیسین. Control: نمونه کنترل؛ C = سلول‌های ترانسفکت شده با کاسپاز 9؛ CD = سلول‌های ترانسفکت شده با کاسپاز 9 و تیمار شده با داروی دوکسوروبیسین

3-6 بررسی سطح بیان پروتئین با وسترن بلات

یکی از معتبرترین سنجش‌های زیستی وسترن بلات است که نشان‌دهنده میزان بیان پروتئین هدف در شرایط و تیمارهای مختلف است. این سنجش برخلاف سنجش‌های آنزیمی و سیتیکی به علت مستقل بودن از فعالیت و غیرفعال شدن آنزیم‌ها، پروتئین‌ها و مصرف مولکول‌های قابل اندازه‌گیری، نرخ خطای پایین‌تری دارد. کاسپاز 3 یکی از پروتئین‌های رایج برای بررسی میزان مرگ سلولی

و القای مرگ است. بررسی میزان این پروتئین تحت تأثیر فاکتورهای متفاوت می‌تواند گزارش‌دهنده میزان آپوپتوز باشد. نتایج حاصل از وسترن بلات نشان داد که میزان بیان پروتئین کاسپاز 3 در ترانسفکت ژن کاسپاز 9 به صورت چشمگیری نسبت به نمونه کنترل بیشتر است (شکل 5) که نشان می‌دهد ترانسفکت کاسپاز 9 توانسته است مسیر پایین دست آپوپتوز را فعال کند. افزودن داروی دوکسوروبیسین موجب افزایش بیشتر میزان کاسپاز 3

نسبت به نمونه بدون ترانسفکت کاسپاز 9 شده است که نشان‌دهنده اثر هم‌افزایی ترانسفکت کاسپاز 9 و داروی دوکسوروبیسین است.



شکل 5 الف - باندهای مربوط به وسترن بلات کاسپاز 3 و بتا-اکتین در حالت کنترل و در مقایسه با سلول‌های ترانسفکت شده با کاسپاز 9 در عدم حضور و حضور دوکسوروبیسین؛ ب - درصد کمی‌سازی سطح بیان پروتئین کاسپاز 3 حاصل از وسترن بلات. Control: نمونه کنترل؛ C - سلول‌های ترانسفکت شده با کاسپاز 9؛ CD - سلول‌های ترانسفکت شده با کاسپاز 9- و تیمار شده با داروی دوکسوروبیسین

4- بحث و نتیجه‌گیری

یکی از روش‌های درمان استفاده از درمان ترکیبی است. این روش شامل دو یا چند عامل درمانی است. ادغام داروهای ضدسرطان کارایی را در مقایسه با رویکرد تک درمانی افزایش می‌دهد، زیرا مسیرهای کلیدی را به‌طور مشخص به روش هم‌افزایی مورد هدف قرار می‌دهد. علاوه بر ترکیب داروها به استفاده همزمان از ژن درمانی و دارو نیز توجه زیادی شده است [4]. رویکرد درمان ترکیبی به‌طور بالقوه مقاومت دارویی را کاهش می‌دهد. در حالی که به‌طور همزمان مزایای ضدسرطانی درمانی مانند

کاهش رشد تومور و پتانسیل متاستاتیک، توقف سلول‌های فعال میتوزی، کاهش جمعیت سلول‌های بنیادی سرطانی و القای آپوپتوز را ارائه می‌دهد [4]. یکی از عوامل کلیدی در آپوپتوز کاسپاز 9 است. مطالعات نشان می‌دهد می‌دهد افزایش سطح بیان کاسپاز 9 موجب القای آپوپتوز و افزایش مرگ سلولی خواهد شد. همچنین برخی از ترکیب‌های طبیعی مانند امودین، فن اتیل ایزوتیوسیانات و فوکوسترول گزارش شده است که کاسپاز 9 را تنظیم می‌کند که در صورت وجود القاگر در محیط سطح بیان کاسپاز 9 افزایش پیدا کرده و منجر حذف

سلول می‌شود [18-23]. علاوه بر این، یکی از روش‌های در حال توسعه و بررسی، استفاده از iCasp9 یا کاسپاز 9 القایی است (که یک ژن خودکشی سلولی است) که اجازه حذف سلول را می‌دهد [23-25]. البته یکی از چالش‌های این نوع درمان، عدم از بین بردن تمامی سلول‌های هدف و گاهی اوقات مقاومت به دارو و درمان است. همچنین مطالعات نشان داده‌اند که تعدادی از پروتئین‌های مداخله کننده در آپوپتوز همچون انواعی از IAPها می‌توانند عامل مقاومت به درمان باشند.

رده سلولی SH-SY5Y (که نوعی سلول نوروبلاستومایی است) بیان به نسبت بالایی از پروتئین survivin و همچنین پروتئین XIAP دارد که می‌تواند از عوامل مؤثر بر کاهش آثار دارویی بر روند درمان بیماری‌های نرونی باشد [26]. داروی دوکسوروبیسین به عنوان یک داروی ضدسرطان عمومی است که در درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده می‌شود [27]. همچنین مطالعات نشان می‌دهد این دارو تا حدودی موجب افزایش بیان پروتئین کاسپاز 9 و القای مسیر داخلی آپوپتوز می‌شود درحالی‌که تأثیری روی مسیر خارجی آپوپتوز و بیان پروتئین کاسپاز 8 ندارد [28].

با توجه به تلاش برای بهبود درمان بیماری‌های نرونی از جمله نوروبلاستومایی، هدف از این پژوهش، بررسی اثرپذیری دوکسوروبیسین در شرایط بیان بالای کاسپاز 9 در رده سلولی SH-SY5Y است. در این پژوهش پس از کشت سلول‌های SH-SY5Y، غلظت بهینه داروی دوکسوروبیسین به وسیله سنجش MTT به دست آمد. سپس ترانسفکت ژن کاسپاز 9 در شرایط مناسب انجام شد و به وسیله انواع سنجش‌های مرگ سلولی میزان حساسیت سلول‌ها نسبت به افزایش بیان پروتئین کاسپاز 9 به تنهایی و در ترکیب با داروی دوکسوروبیسین سنجش شد. کاهش میزان انرژی ATP در نمونه‌های تیمار نسبت به نمونه کنترل نشان داد که در حالتی که کاسپاز 9 ترانسفکت شده

است، سطح ATP کاهش پیدا کرده، اما با تیمار دارو میزان انرژی سلول کاهش بیشتری نشان می‌دهد. افزایش میزان فعالیت آنزیم کاسپاز 3 نیز در حالتی که کاسپاز به‌تنهایی بیان شده است، افزایش در آن دیده می‌شود ولی در حضور دارو به مراتب فعالیت آن بیشتر شده است. نسبت نشر PI/H که نمایانگر میزان سلول‌های مرده به کل سلول‌ها است، نیز افزایش مرگ سلول در حضور کاسپاز 9 و دارو به صورت ترکیبی نشان داده شد. وسترن بلات نشان داد که سطح بیان پروتئین کاسپاز 3 (که پروتئین اجراکننده مرگ سلولی و پایین دست پروتئین کاسپاز 9 است) در حالتی که تیمار دارو در حضور کاسپاز 9 انجام شده است، افزایش پیدا کرده است. نتایج سنجش ATP، کاسپاز 7/3، نسبت نشر PI/H و وسترن بلات همگی تأییدکننده یکدیگر و نمایانگر افزایش نرخ قابل توجه مرگ در حضور پروتئین کاسپاز 9 است. در مجموع نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که القای بیان کاسپاز 9 تأثیر دارو را در این نوع سلول افزایش می‌دهد و درمان ترکیبی ممکن است بر پاسخ‌پذیری بیماری‌های نوروبلاستومایی، سرطانی و نورودجنریتو مؤثر باشد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از رقیه حمیدی که

همکاری داشته است، تشکر و قدردانی می‌کنند.

تأییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان ذکر نشده است.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان:

سید حسین بهشتی (نویسنده اول)، پژوهشگر اصلی /

نگارنده مقدمه / روش شناس / نگارنده بحث (40%)

فرنگیس عطائی (نویسنده دوم)، روش شناس /

پژوهشگر اصلی / تحلیل گر آماری / نگارنده بحث (40%)

سامان حسینخانی (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی /

روش شناس / تحلیلگر آماری (20%)

Hosseinkhani, "Effects of doxorubicin and docetaxel on susceptibility to apoptosis in high expression level of survivin in HEK and HEK-S cell lines as in vitro models," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 532, no. 1, pp. 139–144, 2020.

[13] M. Tiwari et al., "Apoptosis in mammalian oocytes: a review," *Apoptosis*, vol. 20, pp. 1019–1025, 2015.

[14] S. Mukhopadhyay, P. K. Panda, N. Sinha, D. N. Das, and S. K. Bhutia, "Autophagy and apoptosis: where do they meet?," *Apoptosis*, vol. 19, pp. 555–566, 2014.

[15] T.-J. Fan, L.-H. Han, R.-S. Cong, and J. Liang, "Caspase family proteases and apoptosis," *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, vol. 37, no. 11, pp. 719–727, 2005.

[16] C. Riccardi and I. Nicoletti, "Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry," *Nat. Protoc.*, vol. 1, no. 3, pp. 1458–1461, 2006.

[17] S. A. Latt, G. Stetten, L. A. Juergens, H. F. Willard, and C. D. Scher, "Recent developments in the detection of deoxyribonucleic acid synthesis by 33258 Hoechst fluorescence," *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 23, no. 7, pp. 493–505, 1975.

[18] W. Yaoxian, Y. Hui, Z. Yunyan, L. Yanqin, G. Xin, and W. Xiaoke, "Emodin induces apoptosis of human cervical cancer hela cells via intrinsic mitochondrial and extrinsic death receptor pathway," *Cancer Cell Int.*, vol. 13, no. 1, pp. 1–8, 2013.

[19] S. Kumar, A. S. Pathania, A. K. Saxena, R. A. Vishwakarma, A. Ali, and S. Bhushan, "The anticancer potential of flavonoids isolated from the stem bark of *Erythrina suberosa* through induction of apoptosis and inhibition of STAT signaling pathway in human leukemia HL-60 cells," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 205, no. 2, pp. 128–137, 2013.

[20] A. M. Alabsi et al., "Induction of caspase-9, biochemical assessment and morphological changes caused by apoptosis in cancer cells treated with goniothalamin extracted from *Goniothalamus macrophyllus*," *Asian Pacific J. Cancer Prev.*, vol. 14, no. 11, pp. 6273–6280, 2013.

[21] J. Pham, B. Brownlow, and T. Elbayoumi, "Mitochondria-specific pro-apoptotic activity of genistein lipidic nanocarriers," *Mol. Pharm.*, vol. 10, no. 10, pp. 3789–3800, 2013.

[22] B. Kim, S. K. Srivastava, and S.-H. Kim, "Caspase-9 as a therapeutic target for treating cancer," *Expert Opin. Ther. Targets*, vol. 19, no. 1,

منابع مالی: مطالعه حاضر با پشتیبانی مالی معاونت

پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است.

منابع

[1] S. Elmore, "Apoptosis: a review of programmed cell death," *Toxicol. Pathol.*, vol. 35, no. 4, pp. 495–516, 2007.

[2] A. Lawen, "Apoptosis—an introduction," *Bioessays*, vol. 25, no. 9, pp. 888–896, 2003.

[3] N. E. Crook, R. J. Clem, and L. K. Miller, "An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif," *J. Virol.*, vol. 67, no. 4, pp. 2168–2174, 1993.

[4] B. M. Reza et al., "Combination therapy in combating cancer," *Oncotarget*, vol. 8, no. 3, pp. 3822–3843, 2017.

[5] M. Asadi et al., "Caspase-3: structure, function, and biotechnological aspects," *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 69, no. 4, pp. 1633–1645, 2022.

[6] W. C. Earnshaw, L. M. Martins, and S. H. Kaufmann, "Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 68, no. 1, pp. 383–424, 1999.

[7] G. M. Cohen, "Caspases: the executioners of apoptosis," *Biochem. J.*, vol. 326, no. 1, pp. 1–16, 1997.

[8] N. Van Opdenbosch and M. Lamkanfi, "Caspases in cell death, inflammation, and disease," *Immunity*, vol. 50, no. 6, pp. 1352–1364, 2019.

[9] M. M. Shipley, C. A. Mangold, and M. L. Szpara, "Differentiation of the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line," *JoVE (Journal Vis. Exp.)*, no. 108, p. e53193, 2016.

[10] K. Mehdizadeh, F. Ataei, and S. Hosseinkhani, "Treating MCF7 breast cancer cell with proteasome inhibitor Bortezomib restores apoptotic factors and sensitizes cell to Docetaxel," *Med. Oncol.*, vol. 38, no. 6, p. 64, 2021.

[11] M. Torkzadeh-Mahani, F. Ataei, M. Nikkhah, and S. Hosseinkhani, "Design and development of a whole-cell luminescent biosensor for detection of early-stage of apoptosis," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 38, no. 1, pp. 362–368, 2012.

[12] K. Mehdizadeh, F. Ataei, and S.

neuroblastoma cell line SH-SY5Y and its mechanisms 1," *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 29, no. 7, pp. 861–869, 2008.

[27] A. J. Primeau, A. Rendon, D. Hedley, L. Lilge, and I. F. Tannock, "The distribution of the anticancer drug Doxorubicin in relation to blood vessels in solid tumors," *Clin. Cancer Res.*, vol. 11, no. 24, pp. 8782–8788, 2005.

[28] S. Sharifi, J. Barar, M. S. Hejazi, and N. Samadi, "Doxorubicin changes Bax/Bcl-xL ratio, caspase-8 and 9 in breast cancer cells," *Adv. Pharm. Bull.*, vol. 5, no. 3, p. 351, 2015.

pp. 113–127, 2015.

[23] U. Fischer and K. Schulze-Osthoff, "Apoptosis-based therapies and drug targets," *Cell Death Differ.*, vol. 12, no. 1, pp. 942–961, 2005.

[24] X. Zhou, A. Di Stasi, and M. K. Brenner, "iCaspase 9 suicide gene system," *Gene Ther. Solid Cancers Methods Protoc.*, pp. 87–105, 2015.

[25] J. D. Iuliucci et al., "Intravenous safety and pharmacokinetics of a novel dimerizer drug, AP1903, in healthy volunteers," *J. Clin. Pharmacol.*, vol. 41, no. 8, pp. 870–879, 2001.

[26] Q. TONG et al., "Natural jasmonates of different structures suppress the growth of human

Investigation of the efficacy of doxorubicin combined with 9 on SH-SY5Y -increased expression of caspase neuroblastoma cell line

Seyed-Hossein Beheshti Shoushtari, Farangis Ataei*, Saman Hosseinkhani

- 1.MSc, Biochemistry Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 2.Associate Professor, Biochemistry Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3. professor, Biochemistry Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Ataei_f@modares.ac.ir

Post Address & Postal Code:

Tarbiat Modares University, Jalal Ale Ahmad Highway, Tehran, Iran

P.O.Box: 14511-154

Received:2023/4/25

Accepted: 2023/6/27

Abstract

SH-SY5Y is a neuroblastoma cell line which used as a cancer and neurodegenerative disorders model and its neuro-experimental studies. The different diseases cause by a defect in apoptosis pathway. Disruption of apoptotic proteins has an effect on the treatment process and response to drugs. In nerve cells, due to the high expression of apoptosis inhibitory proteins, the efficacy of drugs is low. Combination therapy is one of the developing treatment methods. The aim of this research is to evaluate the effectiveness of doxorubicin drug on apoptosis in SH-SY5Y cells under the conditions of high expression of caspase9. Caspase9 is a key enzyme in intrinsic apoptosis. First, cell viability was obtained through MTT assay under the different drug concentrations. Then, caspase-9 gene was transfected in cells and affected by the concentration lower than IC50 of drug, and cell energy level and cell death were checked by different methods. ATP assay showed that the expression of caspase-9 with drug lead to ATP decreases. Caspase-3/7 activity indicated an increase in cell death by drug and caspase. Propidium staining to hoechst showed that the expression of caspase-9 in combination with doxorubicin induce more death. To ensure the expression levels of protein that induces cell death, the amount of caspase-3 protein was checked by western blotting, which showed a significant increase in combination of caspase-9 and drug. Our findings showed that the induction of caspase-9 expression intensifies the effect of drug and the combined treatment may be effective on the responsiveness of neuronal diseases.

Keyword: SH-SY5Y, caspase-9, cell death, drug, cell energy