



Investigation of the apoptosis induction potential of synthetic sorafenib-derived compounds in breast cancer cells

Soltani N¹, Ghafouri H*²

¹Department of Biology, Faculty of Science, University Campus 2, University of Guilan, Rasht, Iran, nedasoltani1985@gmail.com

² Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran, h.ghafoori@guilan.ac.ir

Original Article

Use your device to scan and read the article online



Citation: Investigation of the apoptosis induction potential of synthetic sorafenib-derived compounds in breast cancer cells. Journal of Cell and Tissue. 13(4); (2023): 298-310

doi <https://10.52547/JCT/13.4.298>

KEYWORDS

HSP70protein,
Sorafenib,
Caspase8,
Extrinsic pathway of apoptosis

ABSTRACT

Aim: Cancer is one of the most important diseases of this century, which affects many people all over the world, and while the prevalence of this disease is increasing, no suitable treatment has been found yet. In the meantime, breast cancer is the most common cancer and the leading cause of cancer-related death in women worldwide. In the search for cancer treatment solutions, researchers synthesize numerous medicinal compounds for various cancers and study their effects. Sorafenib is a urea multikinase inhibitor which causes apoptosis and inhibits angiogenesis and cancer cell proliferation. This compound is currently used as a treatment for hepatocellular cancer, and tests have also been carried out to verify its performance in treating other cancers. Sorafenib derivatives were also synthesized and analyzed. In this research, the anticancer effect of one of the derivatives of sorafenib named (2E,2'E)-2,2'-(1,4-phenylene bis(methanylidene)bis(N-(4-chloro-3-(tri) Fluoroethyl (phenyl) hydrazine carboxamide, abbreviated as SO-D-3, was evaluated against three breast cancer cell lines.

Materials and methods: Three breast cancer cell lines including MCF7, 4T1 and MDA were prepared and cultured in RPMI culture medium. Cells were treated with concentrations of 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 and 2000 μM of SO-D-3, and their survival rates were measured using the MTT test during 24, 48 and 72 hours. The induction of apoptosis by SO-D-3 in the studied cancer cells was investigated by flow cytometry. In addition, the level of Hsp70 and Casp8 proteins as implicated in apoptosis were investigated using the western blot method. The results were statistically analyzed using SPSS software.

Results: The results of the MTT test showed that the treatment of cancer cells significantly decreases the survival of these cells compared to the control. The IC50 for MDA-MB-231 cells was significantly lower than MCF7 and 4T1 cells at 24 hours (157.4 μM for MDA-MB-231 compared to 843.8 μM for MCF7 and 1212 μM for 4T1). However, the difference decreased with increasing treatment time (77.47 μM and 23.38 μM for MDA-MB-231, 107.3 μM and 36.69 μM for MCF7, and 83.63 μM and 16.58 μM for 4T1 at 48 hours and 72 hours respectively). Flow cytometry analysis revealed that in cells treated with SO-D-3, apoptotic cells increased significantly. Examination of the

* Corresponding author. Tel.: 09125645502- 013-33367262-374 ; Fax: 013-33367262

E-mail address: h.ghafoori@guilan.ac.ir

DOI: <https://10.52547/JCT/13.4.298>

Received: Aug 31, 2022; Received in revised form: 7 Nov, 2022; Accepted: Nov 29, 2022

Original Article

© Author



protein level using the western blot technique also showed that the HSP70 protein was significantly decreased in MCF7 and 4T1 cells. On the other hand, the level of Casp8 protein was significantly increased in 4T1 and MDA cells.

Conclusion: The results of the present study showed that SO-D-3 can cause the death of breast cancer cells in a time-dependent manner. Subsequent experiments showed that SO-D-3 exerts this action through the induction of apoptosis. Therefore, according to the results of the present research, SO-D-3 can be introduced as a compound with potential anti-cancer properties that can cause cell death by reducing Hsp70 and changing the expression of Casp8 involved in the external pathway of apoptosis.



بررسی پتانسیل القای آپوپتوزیس ترکیبات سنتزی مشتق از سورافنیب در سلول‌های سرطانی پستان

ندا سلطانی^۱، حسین غفوری^{۲*}

^۱دانشجو، زیست‌شناسی، علوم پایه، گیلان، رشت، ایران، nedasoltani1985@gmail.com
^۲استادیار، زیست‌شناسی، علوم پایه، گیلان، رشت، ایران، h.ghafoori@guilan.ac.ir

واژگان کلیدی	چکیده
<p>پروتئین HSP70، سورافنیب، کاسپاز ۸، مسیر خارجی آپوپتوزیس</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۰۹ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۸/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۰۸</p>	<p>هدف: سرطان از جمله مهم‌ترین بیماری‌های قرن حاضر است که افراد بسیاری در سراسر جهان به آن مبتلا می‌باشند و ضمن افزایش شیوع این بیماری، هنوز درمان مناسبی برای آن پیدا نشده است. در این بین سرطان پستان شایع‌ترین سرطان و همچنین علت اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان در سراسر جهان است. محققان بدنبال یافتن راهکارهای درمانی سرطان، ترکیبات دارویی بسیاری را علیه سرطان‌های مختلف سنتز کرده و اثرات آنها را مورد مطالعه قرار می‌دهند. سورافنیب یک مهارکننده‌ی اوره مولتی‌کیناز است که موجب القای آپوپتوزیس و مهار آنژیوژنز و تکثیر سلول‌های سرطانی می‌گردد. همچنین آزمایشاتی جهت بررسی عملکرد آن در درمان سایر سرطان‌ها نیز انجام شده است. مشتقاتی از سورافنیب نیز سنتز شده و مورد بررسی قرار گرفته‌اند. در تحقیق حاضر اثر ضد سرطانی یکی از مشتقات سورافنیب به نام (2E,2'E)-1,4-2,2'-فنیلین بیس (متانیلیدین) بیس (N)-(4-کلرو-3-(تری‌فلورو متیل) فنیل) هیدرازین کربوکسامید که به اختصار SO-D-3 نامیده شد، علیه سه رده‌ی سلولی سرطان پستان مورد ارزیابی قرار گرفت.</p> <p>مواد و روش‌ها: سه رده‌ی سلولی سرطان پستان شامل MCF7، 4T1 و MDA تهیه شده و در محیط کشت RMPI کشت داده شدند. سلول‌ها با غلظت‌های ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکرومولار از SO-D-3 تیمار شدند و میزان زنده‌مانی آن‌ها با استفاده از تست MTT طی زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. القای آپوپتوز توسط SO-D-3 در سلول‌های سرطانی مورد مطالعه، از طریق فلوسایتومتری بررسی گردید. همچنین سطح پروتئین‌های Hsp70 و Casp8 به‌عنوان پروتئین‌های دخیل در آپوپتوز با استفاده از روش وسترن بلات مطالعه شد. نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار SPSS از نظر آماری تجزیه و تحلیل شدند.</p> <p>نتایج: نتایج حاصل از تست MTT نشان داد که تیمار سلول‌های سرطانی به‌طور معنی‌داری موجب کاهش زنده‌مانی این سلول‌ها نسبت به شاهد می‌شود. میزان IC50 برای سلول‌های MDA-MB-231 به‌طور قابل توجهی کمتر از سلول‌های MCF7 و 4T1 در ۲۴ ساعت بود (۱۵۷/۴ میکرومولار برای MDA-MB-231 در مقایسه با ۸۴۳/۸ میکرومولار برای MCF7 و ۱۲۱۲ میکرومولار برای 4T1). با این حال، تفاوت با افزایش</p>

زمان تیمار کاهش یافت (۷۷/۴۷ میکرومولار و ۲۳/۳۸ میکرومولار برای MDA-MB-231، ۱۰۷/۳ میکرومولار و ۳۶/۶۹ میکرومولار برای MCF7، و ۸۳/۶۳ میکرومولار و ۱۶/۵۸ میکرومولار برای 4T1 به ترتیب در ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت). آنالیز فلوسایتومتری نشان داد که در سلول‌های تیمار شده با SO-D-3، سلول‌های آپوپتوتیک افزایش معناداری پیدا کرده بودند. بررسی سطح پروتئین‌ها با استفاده از تکنیک وسترن بلات نیز نشان داد که پروتئین HSP70 در سلول‌های MCF7 و 4T1 کاهش معناداری داشته است. از طرفی در سلول‌های 4T1 و MDA سطح پروتئین Casp8 به طور معناداری افزایش یافته بود.

نتیجه‌گیری: نتایج تحقیق حاضر نشان داد که SO-D-3 می‌تواند به‌طور وابسته به‌زمان موجب مرگ سلول‌های سرطانی پستان شود. آزمایش‌های بعدی نیز نشان داد که SO-D-3 این عمل را از طریق القای آپپتوز اعمال می‌کند. بنابراین با توجه به نتایج حاصل از تحقیق حاضر، می‌توان SO-D-3 را به‌عنوان یک ترکیب دارای خاصیت ضد سرطانی بالقوه معرفی نمود که قادر است با کاهش Hsp70 و تغییر بیان Casp8 دخیل در مسیر خارجی آپپتوزیس، موجب مرگ سلول‌های سرطانی پستان شود.

۱- مقدمه

سرطان پس از بیماری‌های قلبی-عروقی، دومین عامل شایع مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته و سومین عامل مرگ در کشورهای در حال توسعه می‌باشد. این بیماری به تنهایی بیش از بیماری‌های سل، ایدز و مالاریا، افراد را به کام مرگ می‌کشد. طبق آمار سرطان در حال حاضر عامل حدود ۱۲ درصد از مرگ و میرها در سراسر جهان است. پیش‌بینی‌ها نشان می‌دهد که تا سال ۲۰۳۰، ۱۳ میلیون مرگ ناشی از سرطان در سال گزارش خواهد شد (۱). امروزه برای درمان سرطان از روش‌های مختلفی همچون شیمی‌درمانی و رادیوتراپی استفاده می‌شود. در طی سال‌های اخیر اگرچه پیشرفت عمده‌ای در راه‌کارهای درمانی سرطان ایجاد شده است اما تاکنون درمان قطعی برای این بیماری معرفی نشده است. لذا تلاش برای یافتن راه‌کارهای درمانی و نیز ترکیبات دارویی جدید برای درمان سرطان همچنان ادامه دارد. طراحی و سنتز داروهای جدید ضد سرطان با کارایی بالا و اختصاصیت کافی الزامی به‌نظر می‌رسد (۲).

علائم سرطان در تمام سلول‌های سرطانی صرف نظر از علت یا نوع آن وجود دارد که شامل رشد کنترل نشده، رگ‌زایی و فرار از آپپتوزیس است (۳، ۴). یکی از عملکردهای اصلی آپپتوزیس، پیشگیری از سرطان است (۵). به‌طور معمول، این یک مسیر ذاتی است که در سرطان مهار می‌شود. از دست دادن کنترل آپپتوزیس به سلول‌های سرطانی اجازه می‌دهد بیشتر زنده بمانند و زمان بیشتری را برای تجمع جهش‌ها می‌دهد که می‌تواند تهاجم را در طول پیشرفت تومور افزایش دهد، رگ‌زایی را تحریک کند، تکثیر سلولی را تنظیم و در تمایز اختلال ایجاد نماید (۶). یکی از راه‌های درمان سرطان، کنترل یا احتمالاً پایان دادن به رشد کنترل نشده سلول‌های سرطانی است. استفاده از مکانیسم خود سلول برای مرگ یک روش بسیار موثر است. علاوه بر این، هدف قرار دادن آپپتوزیس موفق‌ترین درمان غیر جراحی است. هدف قرار دادن آپپتوزیس همچنین برای همه انواع سرطان موثر است، زیرا فرار از آپپتوزیس نشانه بارز سرطان است و به‌علت یا نوع سرطان ارتباطی ندارد. داروهای ضد سرطان زیادی وجود دارند که مراحل مختلف را در مسیرهای داخلی و خارجی آپپتوزیس هدف قرار می‌دهند (۷-۹). دو استراتژی متداول برای هدف‌گیری درمانی، تحریک مولکول‌های پیش آپپتوزیسی و مهار مولکول‌های ضد آپپتوزیس است

(۱۰). HSP70 یک پروتئین محافظت شده تکاملی است که بیان آن توانایی سلول را برای زنده ماندن در یک سری از شرایط کشنده افزایش می‌دهد. این پروتئین نقش مهمی در آپوپتوزیس دارد و افزایش سطح HSP70 مسیر آپوپتوتیک را در سطوح مختلف، مسدود می‌کند (۱۱). بنابراین القای آپوپتوزیس از طریق مهار HSP70 می‌تواند یک رویکرد درمانی مناسب برای انواع سرطان‌ها باشد (۱۲).

سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در میان زنان است که شیوع آن در دهه‌های اخیر رو به افزایش است. به دلیل نقش اساسی آپوپتوزیس و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در کنترل تقسیم سلول‌ها، داروهای ارائه شده‌ی جدید ترجیحاً باید بتوانند آپوپتوزیس را در سلول‌های سرطانی القا نمایند (۱۳). امروزه یکی از مهم‌ترین چالش‌های محققان، طراحی داروهای جدید با خواص بهبود یافته و اثرات جانبی کمتر برای درمان بیماری‌هایی همچون سرطان است (۱۴). در نظر گرفتن اهداف درمانی بر اساس مطالعات قبلی و ساختار داروهای قبلی که تا کنون معرفی شده و در بدن دارای فعالیت بیولوژیک هستند، روند مرسوم کشف، طراحی و کاندید شدن یک دارو می‌باشد. (۱۵). سورافنیب یک مهارکننده‌ی تیروزین کینازی است که به‌طور رایج جهت درمان کارسینوم هیپاتوسلولار استفاده می‌شود و اثربخشی آن در درمان چندین سرطان دیگر تایید شده است (۱۶-۱۸). ترکیب جدیدی به نام (E,2E)-2,2-(1,4-فنیلین بیس (متانلییدن) بیس (N)-(4-کلرو-3-تری‌فلوروم اتیل) فنیل) هیدرازین کربوکسامید) که به اختصار SO-D-3 نامیده می‌شود، بر اساس تغییرات در ساختار سورافنیب در دانشگاه گیلان طراحی و سنتز شده است که در تحقیق حاضر اثر آن بر القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفت (۱۹).

۲- مواد و روش‌ها

تهیه و کشت رده‌های سلولی: رده‌های سلولی سرطانی 4T1، MCF-7، MDA-MB-231 و همچنین رده‌ی سلولی نرمال WI-38 از انستیتو پاستور تهران خریداری شدند. رده سلولی MCF-7 دارای گیرنده‌های استروژن و EGF عملکردی است، برای رشد به استروژن و EGF وابسته است و غیر تهاجمی است، در حالی که سلول‌های MDA-MB-231 مدلی برای سرطان سینه تهاجمی‌تر و مستقل از هورمون هستند (۲۰). از طرفی 4T1 یک رده سلولی تومور قابل پیوند است که بسیار تومورزا و تهاجمی بوده و برخلاف اکثر مدل‌های تومور، می‌تواند به‌طور خود به‌خود از تومور اولیه در غده پستانی به چندین مکان دور متاستاز دهد (۲۱). WI-38 نیز یک رده سلولی دیپلوئید انسانی است که از فیبروبلاست‌های مشتق شده از بافت ریه یک جنین دختر سه ماهه تشکیل شده و به‌عنوان کنترل در آزمایش استفاده می‌شود (۲۲). سلول‌ها در محیط کشت DMEM همراه با پنی‌سیلین/استرپتومایسین کشت داده شده و در انکوباتور با ۵ درصد CO₂ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. *ارزیابی زنده‌مانی سلول‌ها:* به‌منظور بررسی اثر ترکیب SO-D-3 بر روی رده‌های سلولی مورد مطالعه، سلول‌ها با غلظت‌های مورد نظر از SO-D-3 (۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰) در محیط کشت حاوی ۲ درصد FBS تیمار شدند. یک گروه بدون تیمار نیز به‌عنوان گروه کنترل جهت مقایسه در نظر گرفته شد. سپس پلیت‌ها به‌مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شده و میزان زنده ماندن سلول‌ها پس از هر زمان به‌روش MTT assay مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از هر زمان انکوباسیون، محیط داخل هر چاهک دور ریخته شده و با ۱۰ میکرولیتر از محلول MTT (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در PBS) به‌مدت ۴ ساعت در داخل انکوباتور، قرار گرفت. سپس محلول رویی به آرامی برداشته شده به‌طوری‌که بلورهای تشکیل شده از کف پلیت جدا نشود و مقدار ۲۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه گردید و پلیت‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه روی دستگاه شیکر با دور پائین قرار داده شدند تا رسوب‌های فورمازان کاملاً حل شوند. در نهایت، جذب نوری (OD) (هر چاهک با استفاده از دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. زیست‌پذیری سلولی نسبی در هر غلظت و زمان با استفاده از رابطه زیر تعیین شد.

$$\text{درصد سلول‌های زنده} = (\text{OD}_{\text{test}} / \text{OD}_{\text{control}}) \times 100$$

بررسی القای آپوپتوزیس: در تحقیق حاضر جهت بررسی آپوپتوزیس از روش فلوسایتومتری با رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید استفاده شد. برای این منظور ابتدا سلول‌ها دفریز شده و حدود ۱۵ هزار سلول ($5.0 \mu\text{M}$) در یک پلیت ۲۴ چاهکی به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. پس از رسیدن سلول‌ها به فاز لگاریتمی، با غلظت معادل ۷۵ درصد IC_{50} از ترکیب SO-D-3 به مدت ۷۲ ساعت تیمار شدند. پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون، پس از تخلیه‌ی کامل محیط کشت و سانتریفیوژ، لایه‌ی سلولی تریپسینه شد. مایع رویی حذف شد و سلول‌ها در محیط کشت کامل حل شدند. سپس ۱۵ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی با ۲۰ میکرولیتر محلول آکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید با نسبت ۱:۱ مخلوط شد. ۱۰ میکرولیتر از محلول نهایی بر روی لام قرار داده شد و پس از پوشانده شدن با لام، با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس مشاهده و تصویربرداری شد.

آنالیز وسترن بلات: بیان دو پروتئین HSP70 و Casp8 تحت تاثیر SO-D-3 با استفاده از آنالیز وسترن بلات ارزیابی شد. سلول‌ها در پلیت‌های ۶ چاهکی کشت داده شدند و با ترکیب SO-D-3 با غلظت معادل ۷۵ درصد IC_{50} تیمار شدند. پس از ۴۸ ساعت، با ۱۲/۵ درصد تریپسین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه هضم شدند و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۲۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. علاوه بر این، آن‌ها در بافر RIPA ($50 \mu\text{M}$ میلی مولار Tris-HCl pH 7.5، ۱۵۰ میلی مولار NaCl، ۱ درصد NP-40، ۰/۵ درصد سدیم دی اکسی کولات، ۰/۱ درصد SDS) حل شده و غلظت پروتئین کل بر اساس پروتکل‌های سازنده کیت سنجش BCA شناسایی شد و ۵۰ میکروگرم از هر نمونه در حضور ۱۰ درصد SDS-PAGE تعیین وزن مولکولی شد و به یک غشای نیتروسولوزی منتقل شد. به علاوه، غشا با استفاده از ۵ درصد اسکیم میلک در طول ۱ ساعت در دمای اتاق بلاک شد، با آنتی بادی‌های اولیه (شامل Anti-Caspase-8 ab138485 و HSP70 (C92F3A-5): sc-66048) در طول شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و پس از انکوباسیون با آنتی بادی ثانویه نشاندار HRP (Horseradish Peroxidase) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد شستشو شدند. نوارهای پروتئینی با استفاده از کیت سوبسترای وسترن بلات کمی لومینسانس پیشرفته (Biovision، آمریکا) و اسکن مشاهده شدند. نرم‌افزار Quantity-One v4.6.6 برای تجزیه و تحلیل بیان پروتئین نسبی پس از اصلاح با فرنس داخلی β -اکتین (رقت ۱:۱۰۰۰، Abcam ab8227) استفاده شد.

۳- آنالیز آماری

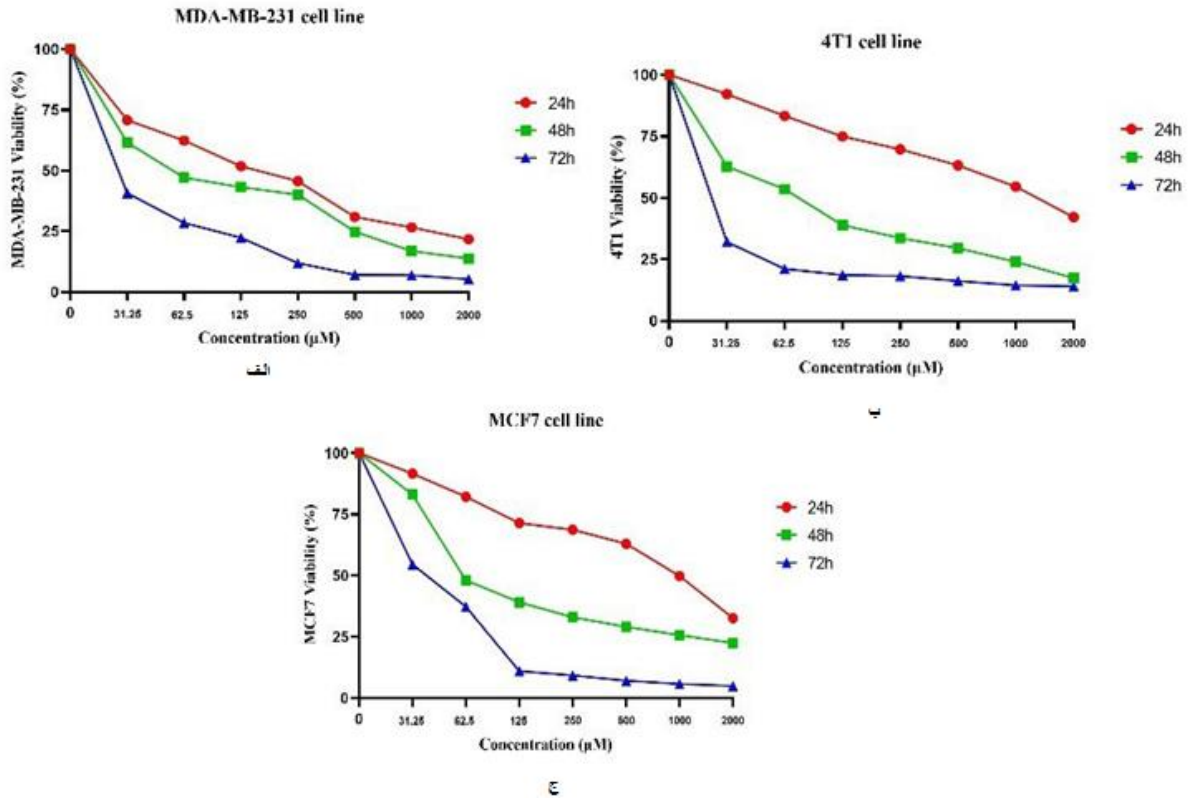
داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS ورژن ۷.25 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. با توجه به نرمال بودن توزیع داده‌ها، مقایسه گروه تیمار و گروه کنترل با استفاده از روش One Way Anova آنالیز شد و p-value محاسبه شد. حداقل سطح معنی‌داری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد. از روش Tukey به عنوان آزمون تعقیبی استفاده شد.

۴- نتایج

نتایج تست زنده‌مانی سلولی‌ها

نتایج حاصل نشان داد که تیمار سلول‌های MCF7، 4T1 و MDA-MB-231 به‌طور معنی‌داری موجب کاهش زنده‌مانی سلول‌ها می‌شود. سمیت سلولی SO-D-3 برای این سلول‌ها وابسته به زمان بوده و با گذشت زمان زنده‌مانی سلول‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است (شکل ۱، الف). آنالیز آماری نشان داد که همه غلظت‌ها نسبت به گروه کنترل (غلظت صفر) با

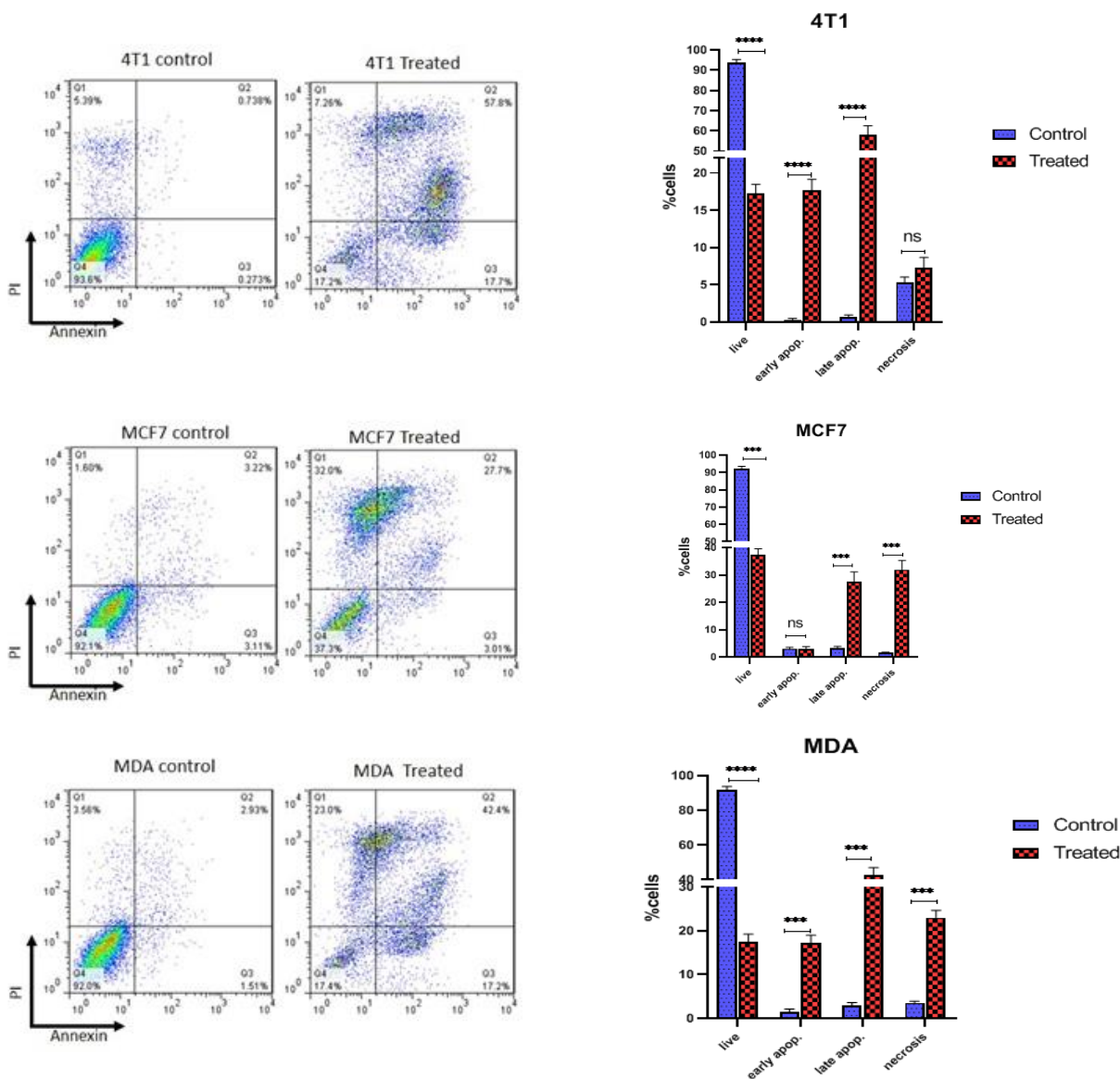
مقدار $p < 0.001$ اختلاف معنی‌داری دارند (شکل ۱). علاوه بر این، IC_{50} برای سلول‌های MDA-MB-231 به‌طور قابل توجهی کمتر از سلول‌های MCF7 و 4T1 در ۲۴ ساعت بود (۱۵۷/۴ میکرومولار برای MDA-MB-231 در مقایسه با ۸۴۳/۸ میکرومولار برای MCF7 و ۱۲۱۲ میکرومولار برای 4T1). باین‌حال، تفاوت با افزایش زمان تیمار کاهش یافت (۷۷/۴۷ میکرومولار و ۲۳/۳۸ میکرومولار برای MDA-MB-231، ۱۰۷/۳ میکرومولار و ۳۶/۶۹ میکرومولار برای MCF7، و ۸۳/۶۳ میکرومولار و ۱۶/۵۸ میکرومولار برای 4T1 به‌ترتیب در ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت).



شکل ۱: زنده‌مانی سلول‌های MCF7 (الف)، 4T1 (ب) و MDA-MB-231 (ج) تیمار شده با غلظت‌های مختلف SO-D-3 در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت (نمودار فوق بر اساس میانگین \pm انحراف معیار ترسیم شده است)

نتایج ارزیابی القای آپوپتوزیس

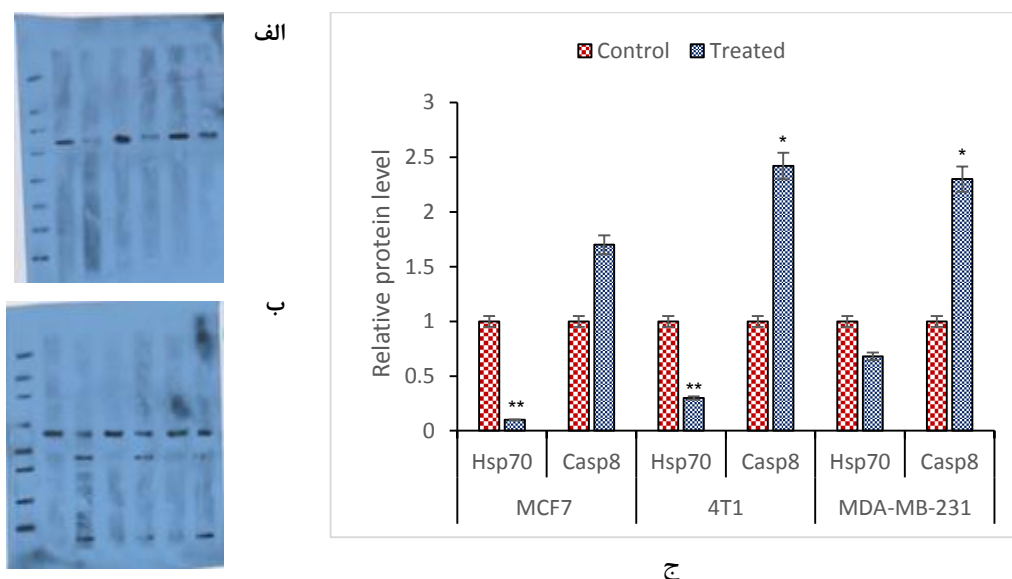
جهت بررسی آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی تحت تیمار با SO-D-3 از تکنیک فلوسایتومتری استفاده شد که نتایج آن در شکل ۲ نشان داده شده است. در سلول‌های MCF7 تیمار شده با SO-D-3، تعداد سلول‌های زنده نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش داشته و در مقابل تعداد سلول‌های آپوپتوتیک تاخیری و نکروتیک، به‌طور معنی‌داری افزایش یافته بود. بررسی آپوپتوزیس در سلول‌های 4T1 نشان داد که تعداد سلول‌های زنده تحت اثر SO-D-3 کاهش معنی‌داری می‌یابد و در مقابل تعداد سلول‌های آپوپتوتیک اولیه و تاخیری افزایش معنی‌داری پیدا کرده بود. از سوی دیگر ترکیب SO-D-3 موجب کاهش معنی‌داری سلول‌های زنده MDA-MB-231 و افزایش معنی‌دار سلول‌های آپوپتوتیک اولیه و تاخیری و همچنین سلول‌های نکروتیک نسبت به گروه کنترل شده بود.



شکل ۲: سیتوگرام فلوسایتومتری و وضعیت آپوپتوزی سلول‌های 4T1 (ردیف اول)، MCF7 (ردیف دوم) و MDA-MB-231 (ردیف سوم) تیمار شده با SO-D-3، با استفاده از نرم افزار FlowJo درصد سلول‌ها محاسبه شده است.

نتایج آنالیز وسترن بلات

بررسی سطح پروتئین‌ها با استفاده از تکنیک وسترن بلات نشان داد که پروتئین HSP70 در سلول‌های MCF7 و 4T1 تیمار شده با SO-D-3 نسبت به سلول‌های کنترل کاهش معنی‌داری داشته است ($p < 0.01$) در سلول‌های MDA-MB-231 تیمار شده نیز سطح این پروتئین کاهش نشان داد با این حال از نظر آماری معنی‌دار نبود. سطح پروتئین Casp8 نیز در هر سه رده‌ی سلولی مورد مطالعه تحت اثر SO-D-3 افزایش یافته بود که در دو رده‌ی 4T1 و MDA-MB-231 این افزایش از نظر آماری معنادار بود ($p < 0.05$) (شکل ۳).



شکل ۳: نتایج حاصل از وسترن بلات برای پروتئین‌های Hsp70 (الف) و Casp8 (ب) در سلول‌های تیمار شده با SO-D-3 و سطح پروتئین‌های مذکور (ج) (باند‌ها از سمت چپ به ترتیب مربوط به لدر، سلول 4T1 کنترل، سلول 4T1 تیمار شده، سلول MCF7 کنترل، سلول MCF7 تیمار شده، سلول MDA-MB-231 کنترل و سلول MDA-MB-231 تیمار شده می‌باشند) ($p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **)

۵- بحث

در تحقیق حاضر تلاش شده تغییر بیان دو پروتئین مهم و تاثیرگذار مسیر آپوپتوزیس در سه رده سلولی سرطان پستان در نتیجه القای آپوپتوزیس توسط یک مشتق سورافنیب به نام SO-D-3 که تاکنون گزارشی مبنی بر بررسی اثر این مشتق، بر رده‌های سرطانی گزارش نشده، صورت بگیرد و نتایج حاصل نشان داد که این ترکیب احتمالاً از طریق کاهش بیان HSP70 و افزایش سطح پروتئین Casp8، موجب القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی پستان می‌شود. طبق نتایج، SO-D-3 موجب کاهش معنی‌دار زنده‌مانی سلول‌های سرطانی در یک حالت وابسته به زمان می‌شود. بررسی روند آپوپتوزیس نشان دهنده‌ی افزایش آپوپتوزیس اولیه و تاخیری در سلول‌های تحت تیمار با SO-D-3 بود که با تغییر بیان پروتئین‌های Casp8 و HSP70 همخوانی داشته و تایید کننده‌ی القای مسیر خارجی آپوپتوزیس در SO-D-3 می‌باشد. در واقع کاهش بیان HSP70 را می‌توان به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های عمل احتمالی SO-D-3 جهت القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی معرفی نمود.

Wang و همکاران (۲۳) مشتقات سورافنیب سنتز و فعالیت‌های سیتوتوکسیک آنها در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند و اذعان داشتند که سورافنیب باعث اختلال اولیه در عملکرد میتوکندری و دپلاریزاسیون عمیق غشای میتوکندری می‌شود که با کاهش سطح ATP داخل سلولی و افزایش تولید ROS همراه است. Wang و همکاران (۲۴) اثرات سمی چندین مشتق سورافنیب را بر روی رده‌های سلولی A549، ACHN، و MDA-MB-231 گزارش کردند. همچنین چهار مشتق سورافنیب که دارای داربست پیرازولی بودند سنتز شده و اثر آنها بر روی چند رده‌ی سلولی سنجیده شد. نتایج آنها نشان داد که این مشتقات از طریق اثر بر کینازهای EGFR، VEGFR2/KDR، Flt-3، c-Met، CRAF و BRAF موجب مرگ سلول‌های سرطانی مورد مطالعه از جمله MCF-7 می‌شوند. Yao و همکاران (۲۵) تعدادی مشتقات سورافنیب را طراحی و سنتز کرده و اثرات آن‌ها را بر تکثیر سلول‌های HCT116، PC-3، و MDA-MB-231 ارزیابی کردند. نتایج حاصل نشان داد که همه‌ی ترکیبات سنتز شده قادر به مهار تکثیر سلول‌های مورد مطالعه بودند. در پژوهش Cheng و همکاران (۲۶) نشان داده شد که برخی مشتقات سورافنیب با مهار STAT3 مستقل از Raf، موجب القای آپوپتوزیس در سلول‌های هیپاتوسلولار می‌شوند. سورافنیب به‌عنوان

مهار کننده‌های Raf-کیناز، STAT3 را کاهش داده و مرگ سلولی را القا می‌کند. در حالی که برخی از مشتقات سورافنیب از طریق مسیرهای مستقل از Raf می‌توانند STAT3 را مهار کنند. در تحقیق آن‌ها نشان داده شد که بیان Raf تغییر نکرده است. مکانیسم احتمالی درگیر در مهار STAT3 بهبود فعالیت SHP-1 فسفاتاز توسط مشتقات سورافنیب گزارش شد (۲۷).

امروزه یکی از استراتژی‌های جالب توجه که در شیمی درمانی سرطان مورد توجه قرار گرفته است، مداخلات دارویی است که بتوانند مرگ سلول‌های بدخیم را از طریق القای آپوپتوزیس وساطت کنند (۲۸). همان‌طور که اشاره شد در تحقیقات بسیاری به سنتز ترکیبات مشتق از سورافنیب پرداخته شده و نشان داده شده است که برخی از این ترکیبات قابلیت القای آپوپتوزیس را دارند. در تحقیق حاضر نیز هم‌راستا با گزارش‌ها مذکور، نشان داده شد که SO-D-3 با القای آپوپتوزیس موجب مرگ سلول‌های سرطانی پستان می‌شود.

HSP70 یک چاپرون است که در پی تنش‌های مختلف در سلول‌ها تجمع می‌یابد و در پاسخ به شرایط نامطلوب، بقای سلول را تقویت می‌کند. در طول درمان ضد سرطان، سلول‌های سرطانی برخلاف سلول‌های طبیعی، به‌وفور HSP70 را برای مقاومت در برابر تهدیدهای مختلف در مراحل مختلف تومورزایی بیان می‌کنند. تلاش زیادی در سال‌های گذشته برای جستجوی مهارکننده‌های HSP70 انجام شده است (۱۲). یکی از مهم‌ترین عملکردهای HSP70 در بقای سلول‌های سرطانی، مهار آپوپتوزیس می‌باشد (۲۹). در مسیر خارجی آپوپتوزیس، سیگنال‌های مرگ سلولی که به‌عنوان لیگاند‌های مرگ نیز شناخته می‌شوند، به گیرنده‌های مرگ خانواده فاکتور نکروز تومور (TNF) متصل می‌شوند (۳۰). برخی از لیگاند‌های مرگ عبارت از لیگاند Fas (Fas-L)، لیگاند القاکننده آپوپتوزیس مرتبط با TNF (TRAIL) و فاکتور نکروز تومور (TNF) می‌باشند. از طرفی پروتئین‌های آداپتور شامل دومین مرگ مرتبط با Fas (FADD) و دومین مرگ مرتبط با گیرنده TNF (TRADD) هستند (۳۱). پروکاسپازهای آغازگر ۸ و ۱۰ به پروتئین آداپتور متصل شده و کمپلکس سیگنال‌دهی القاکننده مرگ (DISC) را تشکیل می‌دهند (۳۲). پروکاسپازها یک دومین عامل مرگ (DED) دارند که از طریق آن به پروتئین آداپتور متصل می‌شوند (۳۱). پروکاسپازهای ۸ و ۱۰ توسط DISC فعال می‌شوند. سپس کاسپازهای ۳، ۶ و ۷ فعال شده و جداسازی پروتئین‌ها و اسکلت سلولی را آغاز می‌کنند که نهایتاً منجر به مرگ سلولی می‌شود. DISC توسط بازدارنده C-FLIP تنظیم می‌شود که با کاسپاز-۸ همولوگ است اما فاقد فعالیت کاسپازی است (۱۰).

مسیر خارجی آپوپتوزیس (مسیر گیرنده مرگ) توسط پروتئین‌های مرتبط با غشای پلاسمایی خانواده گیرنده‌های TNF ایجاد می‌شود که منجر به فعال شدن کاسپاز ۱۰/۸ در کمپلکس سیگنال‌دهی مرگ (DISC) می‌شوند (۳۳). کاسپاز-۸ یا مستقیماً کاسپازهای ۷/۶/۳ را فعال می‌کند یا Bid را به Bid-t می‌شکند که مسیرهای آپوپتوزیس بیرونی و درونی را به هم متصل می‌نماید (۳۴). در سیگنال‌دهی آپوپتوزیس، Hsp70 با بیان بسیار بالا در چندین نقطه، از جمله آزادسازی سیتوکروم c، فعال شدن کاسپازها، تجمع پروتئین‌های اشتباه تا شده، تولید گونه‌های اکسیژن فعال و تکه تکه شدن DNA دخالت می‌کند (۳۵). علاوه‌براین، مهار HSP70 حساسیت سلول‌ها را به آپوپتوزیس افزایش می‌دهد (۳۶، ۳۷). HSP70 به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم فعالیت کاسپاز ۸ را مهار می‌کند، در نتیجه مسیرهای آپوپتوزیس درونی و بیرونی را از طریق تعامل با پروتئین‌های آپوپتوزی کلیدی مسدود می‌کند. یافته‌های تحقیق حاضر نیز نشان داد که ترکیب SO-D-3 علاوه بر کاهش سطح HSP70، منجر به افزایش کاسپاز ۸ در سلول‌های سرطانی پستان می‌شود. از طرفی میزان آپوپتوز تحت تاثیر SO-D-3 در سلول‌های مذکور افزایش یافته بود. این نتایج نشان می‌دهد که SO-D-3 قادر به القای مسیر خارجی آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی پستان می‌باشد.

کاهش سطح بیان HSP70 می‌تواند با القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی تیمار شده با داروهای ضد سرطان در ارتباط باشد (۳۸, ۳۹). Kong و همکاران (۴۰) اثر داروهای ضد سرطانی را بر بیان HSP70 در سلول‌های سرطان انسانی بررسی کرده و مشاهده کردند که در سلول‌های آپوپتوتیک بیان این سلول‌ها کاهش می‌یابد. در مطالعه‌ی حاضر مشاهده شد که SO-D-3 موجب کاهش معنی‌دار بیان HSP70 در سلول‌های MCF7 و 4T1 می‌شود. بر همین اساس می‌توان نتیجه گرفت که SO-D-3 با مهار بیان HSP70 اثر ضد سرطانی خود را علیه سلول‌های سرطان پستان اعمال می‌کند. نشان داده شده است که داروهای همچون دوکسوروبیسین (۴۱)، دوستاکسل (۴۲)، اتوپوزید (۴۳)، بورتزومیب (۴۴) و میتوکسانترون (۴۵) نیز موجب کاهش بیان HSP70 در سلول‌های سرطانی می‌شوند.

۶- نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر اثر SO-D-3 بر سلول‌های سرطانی پستان رده‌ی MCF7، 4T1 و MDA-MB-231 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تست MTT نشان دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار سیتوتوکسیته غلظت‌های مختلف SO-D-3 نسبت به کنترل بود. بر اساس نتایج آنالیز فلوسایتومتری سلول‌های سرطانی آپوپتوتیک در گروه تیمار افزایش معنی‌داری داشتند. علاوه بر این آنالیز وسترن بلات نیز نشان داد که SO-D-3 از بیان HSP70 در سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌نماید و سطح کاسپاز ۸ را افزایش می‌دهد. با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان بیان کرد که SO-D-3 از طریق مهار HSP70 بر روی مسیر خارجی آپوپتوزیس تأثیر می‌گذارد. با توجه به نتایج حاصل می‌توان SO-D-3 را به‌عنوان یک ترکیب دارای خاصیت ضد سرطانی بالقوه معرفی نمود که استفاده از آن در درمان سرطان نیازمند بررسی‌های بیشتر می‌باشد. امید است که با انجام آزمایشات همه‌جانبه بر روی این ترکیب، بتوان از آن در درمان سرطان پستان و سایر سرطان‌ها استفاده نمود.

۷- تشکر و قدردانی

نویسندگان از شورای پژوهشی دانشگاه گیلان برای حمایت مالی از این مطالعه تشکر می‌نمایند.

۸- منابع

1. Mattiuzzi C, Lippi G. Current cancer epidemiology. *Journal of epidemiology and global health*. 2019;9(4):217.
2. Sun Y-S, Zhao Z, Yang Z-N, Xu F, Lu H-J, Zhu Z-Y, et al. Risk factors and preventions of breast cancer. *International journal of biological sciences*. 2017;13(11):1387.
3. Xu W, Jing L, Wang Q, Lin C-C, Chen X, Diao J, et al. Bax-PGAM5L-Drp1 complex is required for intrinsic apoptosis execution. *Oncotarget*. 2015;6(30):30017.
4. Arbiser JL, Bonner MY, Gilbert LC. Targeting the duality of cancer. *NPJ precision oncology*. 2017;1(1):1-7.
5. Lopez J, Tait S. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within. *British journal of cancer*. 2015;112(6):957-62.
6. Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed research international*. 2014;2014.
7. Bao H, Zhang Q, Zhu Z, Xu H, Ding F, Wang M, et al. BHX, a novel pyrazoline derivative, inhibits breast cancer cell invasion by reversing the epithelial-mesenchymal transition and down-regulating Wnt/ β -catenin signalling. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-10.
8. Villa-Pulgarín JA, Gajate C, Botet J, Jimenez A, Justies N, Varela-M RE, et al. Mitochondria and lipid raft-located FOF1-ATP synthase as major therapeutic targets in the antileishmanial and anticancer activities of ether lipid edelfosine. *PLoS neglected tropical diseases*. 2017;11(8):e0005805.
9. Liu Y, Zhu X. Endoplasmic reticulum-mitochondria tethering in neurodegenerative diseases. *Translational neurodegeneration*. 2017;6(1):1-8.

10. Pfeffer CM, Singh AT. Apoptosis: a target for anticancer therapy. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(2):448.
11. Roufayel R, Kadry S. Molecular chaperone HSP70 and key regulators of apoptosis-a review. *Current molecular medicine*. 2019;19(5):315-25.
12. Goloudina AR, Demidov ON, Garrido C. Inhibition of HSP70: a challenging anti-cancer strategy. *Cancer letters*. 2012;325(2):117-24.
13. Waks AG, Winer EP. Breast cancer treatment: a review. *Jama*. 2019;321(3):288-300.
14. Liang G, Fan W, Luo H, Zhu X. The emerging roles of artificial intelligence in cancer drug development and precision therapy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020;128:110255.
15. Waaijer SJ, Kok IC, Eisses B, Schröder CP, Jalving M, Brouwers AH, et al. Molecular imaging in cancer drug development. *Journal of Nuclear Medicine*. 2018;59(5):726-32.
16. Rodríguez- Hernández MA, González R, de la Rosa AJ, Gallego P, Ordóñez R, Navarro- Villarán E, et al. Molecular characterization of autophagic and apoptotic signaling induced by sorafenib in liver cancer cells. *Journal of cellular physiology*. 2019;234(1):692-708.
17. Li Y, Yan H, Xu X, Liu H, Wu C, Zhao L. Erastin/sorafenib induces cisplatin- resistant non- small cell lung cancer cell ferroptosis through inhibition of the Nrf2/xCT pathway. *Oncology letters*. 2020;19(1):323-33.
18. Bronte G, Andreis D, Bravaccini S, Maltoni R, Ceconetto L, Schirone A, et al. Sorafenib for the treatment of breast cancer. *Expert opinion on pharmacotherapy*. 2017;18(6):621-30.
19. Shoja S, Mahmoodi NO, Ghafouri H, Rassa M, Sharafshah A, Panahi Kokhdan E. Design, in silico, one-pot synthesis, and biological evaluations of novel bis-urea analogs. *Research on Chemical Intermediates*. 2020;46(7):3327-39.
20. Nohara K, Wang F, Spiegel S. Glycosphingolipid composition of MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cell lines. *Breast cancer research and treatment*. 1998;48(2):149-57.
21. Pulaski BA, Ostrand- Rosenberg S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Current protocols in immunology*. 2000;39(1):20.2. 1-2. 16.
22. Olshansky S, Hayflick L. The role of the WI-38 cell strain in saving lives and reducing morbidity. *AIMS public health*. 2017;4(2):127.
23. Wang K, Li Y, Zhang L-J, Chen X-G, Feng Z-Q. Synthesis and in vitro cytotoxic activities of sorafenib derivatives. *Chinese Chemical Letters*. 2014;25(5):702-4.
24. Wang M, Xu S, Lei H, Wang C, Xiao Z, Jia S, et al. Design, synthesis and antitumor activity of Novel Sorafenib derivatives bearing pyrazole scaffold. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2017;25(20):5754-63.
25. Yao J, He Z, Chen J, Sun W, Fang H, Xu W. Design, synthesis and biological activities of sorafenib derivatives as antitumor agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2012;22(21):6549-53.
26. Chen K-F, Tai W-T, Huang J-W, Hsu C-Y, Chen W-L, Cheng A-L, et al. Sorafenib derivatives induce apoptosis through inhibition of STAT3 independent of Raf. *European journal of medicinal chemistry*. 2011;46(7):2845-51.
27. Chen K-F, Tai W-T, Hsu C-Y, Huang J-W, Liu C-Y, Chen P-J, et al. Blockade of STAT3 activation by sorafenib derivatives through enhancing SHP-1 phosphatase activity. *European journal of medicinal chemistry*. 2012;55:220-7.
28. Jan R. Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. *Advanced pharmaceutical bulletin*. 2019;9(2):205.
29. Rérole A-L, Jego G, Garrido C. Hsp70: anti-apoptotic and tumorigenic protein. *Molecular Chaperones: Springer*; 2011. p. 205-30.
30. Zaman S, Wang R, Gandhi V. Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies. *Leukemia & lymphoma*. 2014;55(9):1980-92.
31. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pacific journal of cancer prevention*. 2015;16(6):2129-44.
32. Liu H, Su D, Zhang J, Ge S, Li Y, Wang F, et al. Improvement of pharmacokinetic profile of TRAIL via trimer-tag enhances its antitumor activity in vivo. *Scientific Reports*. 2017;7(1):1-11.
33. Guo F, Sigua C, Bali P, George P, Fiskus W, Scuto A, et al. Mechanistic role of heat shock protein 70 in Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis in human acute leukemia cells. *Blood*. 2005;105(3):1246-55.

34. Kumar S, Stokes III J, Singh UP, Gunn KS, Acharya A, Manne U, et al. Targeting Hsp70: A possible therapy for cancer. *Cancer letters*. 2016;374(1):156-66.
35. Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell cycle*. 2006;5(22):2592-601.
36. Aghdassi A, Phillips P, Dudeja V, Dhaulakhandi D, Sharif R, Dawra R, et al. Heat shock protein 70 increases tumorigenicity and inhibits apoptosis in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer research*. 2007;67(2):616-25.
37. Gurbuxani S, Bruet J-M, Fromentin A, Larmonier N, Parcellier A, Jäättelä M, et al. Selective depletion of inducible HSP70 enhances immunogenicity of rat colon cancer cells. *Oncogene*. 2001;20(51):7478-85.
38. Klein SD, Brüne B. Heat-shock protein 70 attenuates nitric oxide-induced apoptosis in RAW macrophages by preventing cytochrome c release. *Biochemical Journal*. 2002;362(3):635-41.
39. Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CP, Radicioni SM, Mosser DD. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(46):38729-39.
40. Kong J, Li SS, Ma Q, Liu L, Zheng LJ. Effects of dihydroartemisinin on HSP70 expression in human prostate cancer PC-3 cells. *Andrologia*. 2019;51(6):e13280.
41. Lazarev VF, Sverchinsky DV, Mikhaylova ER, Semenyuk PI, Komarova EY, Niskanen SA, et al. Sensitizing tumor cells to conventional drugs: HSP70 chaperone inhibitors, their selection and application in cancer models. *Cell death & disease*. 2018;9(2):1-11.
42. Lv F, Yu Y, Zhang B, Liang D, Li Z-m, You W. Inhibitory effects of mild hyperthermia plus docetaxel therapy on ER (+/-) breast cancer cells and action mechanisms. *Journal of Huazhong University of Science and Technology [Medical Sciences]*. 2013;33(6):870-6.
43. Sverchinsky DV, Nikotina AD, Komarova EY, Mikhaylova ER, Aksenov ND, Lazarev VF, et al. Etoposide-induced apoptosis in cancer cells can be reinforced by an uncoupled link between Hsp70 and caspase-3. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(9):2519.
44. Yerlikaya A, Okur E, Şeker S, Erin N. Combined effects of the proteasome inhibitor bortezomib and Hsp70 inhibitors on the B16F10 melanoma cell line. *Molecular medicine reports*. 2010;3(2):333-9.
45. Carlisi D, De Blasio A, Drago-Ferrante R, Di Fiore R, Buttitta G, Morreale M, et al. Parthenolide prevents resistance of MDA-MB231 cells to doxorubicin and mitoxantrone: the role of Nrf2. *Cell death discovery*. 2017;3(1):1-12.