

## ***Decreased Expression of Heat Shock Protein HSP90 $\alpha$ after Exposure to Doxorubicin in Breast Cancer Cell Lines (MCF-7 and MDA-MB-231)***

Fereshte Jokar<sup>1</sup>,  
 Mohammad Ali Atlasi<sup>2</sup>,  
 Morteza Salimian<sup>3</sup>,  
 Aliakbar Taherian<sup>4</sup>

<sup>1</sup> MA Student in Anatomy, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Anatomical Sciences Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Anatomical Sciences Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

<sup>4</sup> Associate Professor, Department of Pathology and Histology, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, Iran

(Received May 18, 2016 ; Accepted December 10, 2016)

### ***Abstract***

**Background and purpose:** Incidence of breast cancer is increasing day by day. Scientists are interested in the effects of inhibition of breast cancer cell on treatment of this cancer. The aim of this study was to determine IC50 of doxorubicin in 24 hours on cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 and the expression of heat shock protein HSP90 $\alpha$  as a factor in the cell before and after 24 hours exposure to doxorubicin in both breast cancer cell lines.

**Materials and methods:** A descriptive interventional study was done in two cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 after 24 hours exposure to doxorubicin. Sensitivity of cells to doxorubicin was determined using MTT Assay in excel software. HSP90 $\alpha$  heat shock protein expression were qualitatively compared in both cell lines before and after exposure to doxorubicin using immunofluorescent techniques (Immunocytochemistry).

**Results:** MTT Assay showed that IC50 value in MDA-MB-231 and MCF7 cells after 24 hours exposure to doxorubicin (the dose that kills 50% of cells) were 14.521 and 16.3315 $\mu$ M, respectively. Immunocytochemistry revealed that HSP90 $\alpha$  protein expression in both cell lines after exposure to doxorubicin decreased compared to the control group.

**Conclusion:** Cell density in cell lines (ER-) MDA-MB-231 and line MCF-7 (ER+) after exposure to doxorubicin and increasing the dose of medication, decreased indicating a dose dependent effect. Also, apoptosis occurred in both cell lines and expression of HSP90 $\alpha$  decreased but MDA-MB-231 cells were found to be more sensitive.

**Keywords:** Hsp90 $\alpha$ , HSP, doxorubicin, breast cancer

**J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 26 (145): 29-37 (Persian).**

# کاهش بیان پروتئین شوک حرارتی HSP90 $\alpha$ پس از مواجهه با داروی دوکسوروبیسین در لاین های سلولی سرطان پستان [ MDA-MB-231 و MCF-7 ]

فرشته جوکار<sup>۱</sup>  
محمدعلی اطلسی<sup>۲</sup>  
مرتضی سلیمیان<sup>۳</sup>  
علی اکبر طاهریان<sup>۴</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** آمار سرطان پستان روز به روز در حال افزایش است. دانشمندان برای مهار سرطان پستان در حال بررسی اثرفاکتورهای سلولی بر روند درمان سرطان پستان می باشند. هدف از این پژوهش تعیین IC50 داروی دوکسوروبیسین در ۲۴ ساعت بر روی رده های سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 و بررسی بیان پروتئین شوک حرارتی HSP90 $\alpha$  به عنوان یکی از فاکتورهای سلولی قبل و پس از مواجهه با دوکسوروبیسین در ۲۴ ساعت در هر دو رده سلولی سرطان پستان است.

**مواد و روش ها:** مطالعه حاضر از نوع توصیفی مداخله ای بود که بر روی دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 پس از مواجهه با دوکسوروبیسین در ۲۴ ساعت انجام شد و حساسیت سلول ها نسبت به داروی دوکسوروبیسین با استفاده از تکنیک MTT Assay با کمک نرم افزار آماری excel تجزیه و تحلیل گردید. بیان پروتئین شوک حرارتی HSP90 $\alpha$  در هر دو رده سلولی قبل و پس از مواجهه با داروی دوکسوروبیسین با تکنیک ایمنوفلورسنت (ایمنوسیتو کیمیستری) به صورت کیفی مقایسه گردید.

**یافته ها:** نتایج MTT Assay نشان داد IC50 (مقدار دوزی که باعث مرگ ۵۰ درصد سلول ها می شود) سلول های MDA-MB-231 و MCF7 پس از مواجهه با دوکسوروبیسین در ۲۴ ساعت به ترتیب برابر با ۱۴/۵۲۱ و ۱۶/۳۳۱۵ میکرومولار بود و با روش ایمنوسیتوشیمی، بیان پروتئین HSP90 $\alpha$  در هر دو رده سلولی پس از مواجهه با داروی دوکسوروبیسین نسبت به گروه کنترل کاهش یافت.

**استنتاج:** تراکم سلولی سلول های رده MDA-MB-231 (ER-) و رده MCF-7(ER+) پس از مواجهه با دوکسوروبیسین با افزایش دوز دارو، کاهش یافته که این اثر وابسته به دوز دارو است و هر دو رده سلولی دچار مرگ سلولی شدند. بیان HSP90 $\alpha$  کاهش یافت، اما سلول های MDA-MB-231 حساس تر بودند.

**واژه های کلیدی:** سرطان پستان، پروتئین شوک حرارتی، HSP90 $\alpha$ ، دوکسوروبیسین

## مقدمه

در سال ۲۰۱۵ در آمریکا ۲۳۴۱۹۰ نفر مبتلا به سرطان پستان شدند و حدود ۴۰۷۳۰ نفر فوت کردند (۲۰۱).

سرطان پستان از رایج ترین نئوپلاسم ها می باشد. آمار بیماران سرطان پستان در حال افزایش است، به طوری که

E-mail: fereshtehjokar@yahoo.com

**مؤلف مسئول:** علی اکبر طاهریان - کاشان: دانشگاه علوم پزشکی کاشان

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

۲. دانشیار، مرکز تحقیقات آناتومی کاشان، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

۳. استادیار، مرکز تحقیقات آناتومی کاشان، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

۴. دانشیار، گروه پاتولوژی/بافت شناسی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، کاشان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۲/۲۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۳/۳ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۹/۲۰

پیشرفت سرطان پستان به عوامل مختلفی از جمله نوع بافت تومور، سن، وضعیت هورمونی، گیرنده‌ها و عوامل ژنتیکی بستگی دارد (۳). در حال حاضر، جراحی همراه با درمان کمکی مانند شیمی درمانی و پرتودرمانی روشی است که باعث زنده ماندن بیماران سرطانی می‌شود، اما متأسفانه با توجه به مقاومت اولیه و یا ثانویه به داروهای شیمی درمانی، امکان پیشرفت سرطان پستان و شکست درمان وجود دارد که این امر مانع اصلی درمان موفقیت آمیز سرطان پستان می‌باشد (۵،۴). دو کسورویسین یک داروی شیمی درمانی است که مانع سنتز DNA و rRNA، مهار توپوایزومراز-II در نقطه کلیواژ DNA و در نتیجه باعث تجزیه لایه DNA می‌شود (۶).

خانواده پروتئین شوک حرارتی ۹۰ (HSP90) یک هدف بالقوه برای درمان سرطان است (۷). در سلول‌های یوکاریوتی، HSP90، یک چپرون مولکولی با وزن مولکولی ۹۰ کیلودالتون است که نقش مهمی را در حفاظت سلول در مقابل انواع محرک‌های استرس‌زای سلولی، تنظیم رشد سلولی و آپوپتوز دارند. این ماده حدود ۱-۲ درصد از کل پروتئین‌های سلول‌های یوکاریوتی را در شرایط بدون استرس تشکیل می‌دهد و همراه با کوچپرون‌هایش، نقش مهمی در folding حداقل ۲۰۰ پروتئین اختصاصی از مسیرهای مختلف سیگنالینگ و refolding پروتئین‌های دناچوره پس از استرس را دارند. HSP90 دارای ۴ ایزوفرم مختلف به نام‌های اختصاصی  $HSP90\alpha$ ،  $HSP90\beta$ ، GRP94 و TRAP1 می‌باشد (۸-۱۱). ایزوفرم اصلی خانواده HSP90 به نام  $HSP90\alpha$  و  $HSP90\beta$  در فرآیندهای مهم سلولی از جمله تکثیر، تمایز و آپوپتوز نقش دارند (۱۲). HSP90 نقش مهمی را در بیماری‌های خود ایمنی و واکنش‌های ایمنولوژیک از جمله ارائه آنتی‌ژن و فعال شدن لنفوسیت‌ها و ماکروفاژها و بلوغ سلول‌های دندریتیک ایفا می‌کند (۱۳،۱۴). در مطالعات قبلی پیشنهاد شده که ارتباط معنی‌داری بین بیان HSP90 و پارامترهای کلینیکی و پاتولوژیکی (Clinicopathological) در

انواع مختلف سرطان وجود دارد (۱۹-۱۵) ولی تاکنون مطالعه روی بیان ایزوفرم HSP90 $\alpha$  در سلول‌های MCF-7 و MDA-MB-31 پس از مواجهه با داروی دو کسورویسین محدود بود و هنوز گزارش نشده است. به دلیل هتروژن بودن سرطان پستان، در این مطالعه تصمیم گرفته شد که به طور هدفمند از دو لاین سلولی متفاوت سرطان پستان استفاده شود لذا از دو رده سلولی MCF-7(ER<sup>+</sup>) که یکی گیرنده استرویدی را بیان می‌کند و دیگری لاین MDA-MB-231(ER<sup>-</sup>) که گیرنده استرویدی را بیان نمی‌کند، انتخاب گردید. بیان HSP90 $\alpha$  در سلول‌های MCF-7 و MDA-MB-231 قبل و پس از مواجهه با داروی دو کسورویسین در ۲۴ ساعت با روش ایمنوفلورسنت (ایمنوسیتوشیمی) بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع توصیفی مداخله‌ای بوده که بر روی دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 پس از مواجهه با داروی دو کسورویسین در ۲۴ ساعت انجام شد. در این آزمایش سلول‌هایی که در مواجهه با داروی دو کسورویسین قرار نگرفتند، به عنوان گروه کنترل منفی و سلول‌هایی که تحت درمان با داروی دو کسورویسین قرار گرفتند، گروه کنترل مثبت در نظر گرفته شد. حساسیت سلول‌ها نسبت به داروی دو کسورویسین با استفاده از تکنیک MTT Assay با کمک نرم افزار آماری excel تجزیه و تحلیل گردید. بیان HSP90 $\alpha$  در هر دو رده سلولی قبل و پس از مواجهه با داروی دو کسورویسین با تکنیک ایمنوفلورسنت (ایمنوسیتوشیمی) به صورت کیفی مقایسه گردید.

مواد: آنتی‌بادی HSP90 $\alpha$  (SC-8262) از بیوتکنولوژی سانتاکروز (Inc, texas USA) و آنتی‌بادی ثانویه متصل به FITC (SC-2988) از بیوتکنولوژی سانتاکروز (Inc, suntan cruz, CA) و داروی دو کسورویسین (D1515) و پودر MTT (M2128) از شرکت سیگما خریداری شدند.

کشت سلول: سلول‌های سرطان پستان MCF-7 (ER-) و MDA-MB-231 (ER-) از موسسه انستیتو پاستور تهیه گردید. این سلول‌ها در محیط کشت RPMI1640 همراه با FBS ۱۰ درصد، ۱۰۰ unit/ml استریتومایسین و پنی‌سیلین در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با Co2 ۵ درصد کشت داده شد.

تست MTT: نحوه انجام این آزمایش بدین صورت است که ابتدا با تریپسین کردن فلاسک‌ها، یک سوسپانسیون سلولی آماده شد. سپس در یک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای، ۱۰۰ میکرولیتر PBS در چاهک‌های اطراف ریخته شد که میزان خطا به وسیله تخییر کم تر شود. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی به تعداد ۱۰۰۰۰ سلول آماده و در هر چاهک ریخته شد. پس از ۲۴ ساعت که سلول‌ها به کف چاهک‌ها چسبیده و تکثیر پیدا کردند، با توجه به نوع آزمایش مورد نظر، غلظت‌های مختلف دارو مورد مطالعه (دوکسوروبیسین) بر روی سلول‌ها اضافه شد و پس از زمان انکوباسیون لازم، ابتدا محیط کشت محتوی دارو از چاهک‌ها خارج شد و سپس رنگ MTT به نسبت ۱ به ۱۰ با محیط کشت با درصد سرم کم (۲ تا ۳ درصد) مخلوط و ۱۰۰ میکرولیتر از آن به هر چاهک اضافه شد. ۲ تا ۴ ساعت میکروپلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس آن را از انکوباتور خارج کرده و محیط رویی آن تخلیه شد. در هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO ریخته شد و پلیت به آرامی تکان داده شد تا کریستال‌های بنفش رنگ ایجاد شده، حل شوند. جذب نوری چاهک‌ها با دستگاه قرائت‌کننده میکروپلیت در طول موج اصلی ۵۷۰ نانومتر و در طول موج افتراقی ۷۲۰ نانومتر خوانده شد.

ایمونوفلورسنت (ایمنوسیتوشیمی) (ICC)

برای انجام این آزمایش، جمعیتی حدود یک میلیون از سلول‌های سرطان پستان MCF-7 و MDA-MB-231 به صورت سوسپانسیون سلولی به‌طور

جدداً گانه در زیر هود و درون محیط استریل بشقاب سلولی ۶۰ میلی‌متری حاوی لامل کشت داده شدند. برای هر لاین سلولی، ۴ گروه در نظر گرفته شد. با این روش، برای هر گروه ۳ تکرار انجام شد و زمانی که تراکم سلولی روی لامل‌ها به ۶۰-۵۰ درصد رسید، یک گروه به عنوان گروه بدون دارو (کنترل منفی) در نظر گرفته شد که به ترتیب محیط کشت را ساکشن کرده و محیط کشت همراه دارو، به غلظت‌های ۰/۲، ۵ و ۱۰ میکرومولار، درون بشقاب‌های حاوی سلول ریخته و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. پس از شستشوی سلول‌ها با محلول PBS و پس از فیکس شدن سلول‌ها در دمای اتاق با PAF%4 به مدت ۱۵-۲۰ دقیقه، در محفظه‌ای مرطوب با آنتی‌بادی اولیه HSP90 $\alpha$  به مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و سپس به مدت یک ساعت با آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه به فلورسانس (anti goat FITC) در دمای اتاق و در محفظه تاریک قرار داده شد و پس از رنگ‌آمیزی با رنگ دپی، در زیر میکروسکوپ فلورسنت، در طول موج‌های مربوط به FITC و DAPI مورد مطالعه و مشاهده قرار گرفت.

## یافته‌ها

جهت محاسبه نتایج داده‌های آزمون MTT Assay سلول‌های MCF-7 در ۹ غلظت انتخابی از داروی دوکسوروبیسین نسبت به گروه کنترل (بدون مواجهه با دارو) با کمک نرم‌افزار آماری Excel، میانگین و استاندارد دارو به دست آمده (جدول شماره ۱) و نمودار خطی آن رسم و با استفاده از معادله به دست آمده (نمودار خطی شماره ۱)، IC50 لاین سلولی MCF-7 در ۲۴ ساعت محاسبه شد که برابر با ۱۶/۳۳۱۵ بود.

هم‌چنین نتایج داده‌های سلول‌های MDA-MB-231 در ۹ غلظت انتخابی از داروی دوکسوروبیسین نسبت به گروه کنترل (بدون مواجهه با دارو) با کمک نرم‌افزار آماری excel، میانگین، استاندارد دارو و استاندارد دویشن به دست آمد (جدول شماره ۲) و نمودار خطی

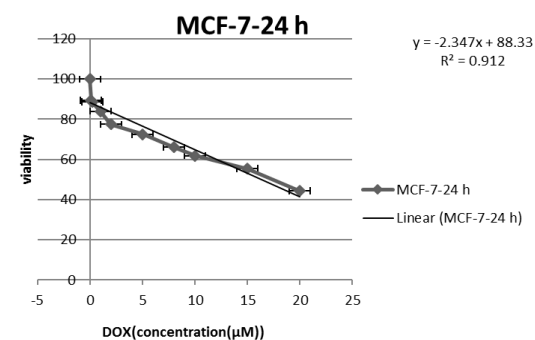
پس از تعیین IC50 هر دو رده سلولی با استفاده از آزمون MTT Assay و مشخص کردن حساسیت بیش تر سلول‌های رده MDA-MB-231 نسبت به سلول‌های رده MCF-7، با کشت سلول‌ها و مواجهه قرار دادن آن‌ها با داروی دو کسورویسین به مدت ۲۴ ساعت در ۳ غلظت انتخابی (۰/۲، ۰/۵، ۱۰ میکرومولار)، با استفاده از ایمنوسیتوشیمی، میزان بیان پروتئین HSP90 $\alpha$  در هر دو رده سلولی با استفاده از میکروسکوپ فلوروسنت (تصویر شماره ۱، ۲، ۳) در طول موج‌های FITC و DAPI عکس تهیه گردید و به صورت کیفی مورد مطالعه قرار گرفت. البته از هر دو رده سلولی، نمونه کنترل منفی (نمونه بدون مواجهه با داروی دو کسورویسین) نیز با روش ایمنوسیتوشیمی با میکروسکوپ فلوروسنت مورد مشاهده و تصویربرداری قرار گرفت (تصویر شماره ۱ و ۲ و ۳). در تصاویر فلوروسنت (تصویر شماره ۱) حاصل از تکنیک ایمنوسیتوشیمی در سلول‌های MCF-7 نمونه کنترل منفی، بیان HSP90 $\alpha$  در هسته و سیتوپلاسم سلول به صورت شفاف و پررنگ مشاهده می‌شود. اما بیان HSP90 $\alpha$  در سلول‌های MCF-7 پس از مواجهه با دو کسورویسین در غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۵ و ۱۰ میکرومولار نسبت به گروه کنترل در هسته و سیتوپلاسم کاهش یافته و این کاهش بیان پس از merge کردن تصاویر هسته‌ها و سیتوپلاسم قابل مشاهده می‌باشد، ولی با افزایش دوز داروی دو کسورویسین مشاهده می‌گردد که تراکم سلول‌ها کاهش یافت و مرگ سلولی ایجاد شد و بیان این پروتئین در هسته و سیتوپلاسم شدیداً کاهش یافته است.

اما در تصاویر فلوروسنت (تصویر شماره ۲) حاصل از تکنیک ایمنوسیتوشیمی در سلول‌های رده MDA-MB-231 تراکم سلول‌ها در نمونه کنترل منفی بیش تر و بیان HSP90 $\alpha$  در هسته و سیتوپلاسم سلول به صورت واضح مشاهده می‌شود. اما بیان HSP90 $\alpha$  در سلول‌های MDA-MB-231 پس از مواجهه با دو کسورویسین در غلظت ۰/۲ میکرومولار نسبت به

آن رسم و با استفاده از معادله به دست آمده (نمودار خطی شماره ۲)، IC50 لاین سلولی MDA-MB-231 در ۲۴ ساعت محاسبه شد که برابر با ۱۴/۵۲۱ بود.

**جدول شماره ۱:** میزان مرگ سلول‌های MCF-7 در غلظت‌های مختلف دو کسورویسین در طول زمانی ۲۴ ساعت در تکنیک MTT

غلظت دارو ( $\mu\text{M}$ )	۰	۰/۱	۰/۲	۱	۲	۵	۸	۱۰	۱۵	۲۰
میانگین	۱۰۰	۸۹/۴	۸۳/۹	۷۴	۶۶/۰	۶۱/۸	۵۵/۴	۴۴/۳	۳۶/۳	۲۶/۳
درصد %	۱۰۰	۸۹/۴	۸۳/۹	۷۴	۶۶/۰	۶۱/۸	۵۵/۴	۴۴/۳	۳۶/۳	۲۶/۳
ستاندارد دویشن	۰/۲۵	۰/۱۸	۰/۱۴	۰/۱۰	۰/۰۷	۰/۰۵	۰/۰۳	۰/۰۲	۰/۰۱	۰/۰۰۵
استاندارد ارور	۰/۰۱۴	۰/۰۱۰	۰/۰۰۷	۰/۰۰۵	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۸	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۱

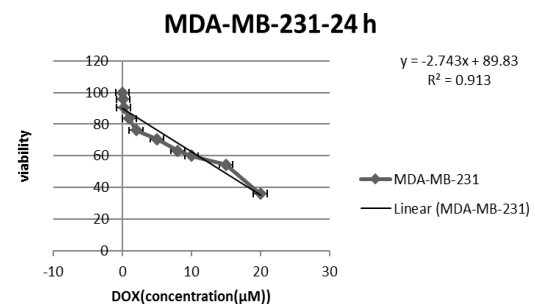


**نمودار خطی شماره ۱:** میزان مرگ سلول‌های MCF-7 پس از مواجهه با داروی دو کسورویسین

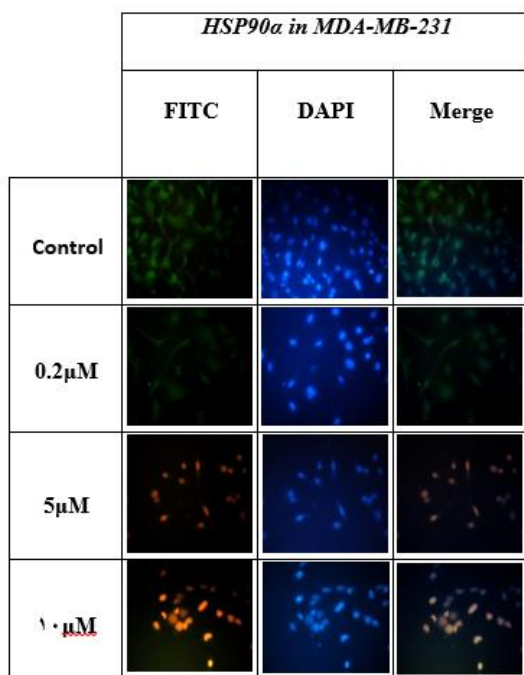
**جدول شماره ۲:** میزان مرگ سلول‌های MDA-MB-231 در غلظت‌های مختلف دو کسورویسین در طول زمانی ۲۴ ساعت در تکنیک MTT

غلظت دارو ( $\mu\text{M}$ )	۰	۰/۱	۰/۲	۱	۲	۵	۸	۱۰	۱۵	۲۰
میانگین	۱۰۰	۹۵/۷	۹۰/۵	۸۳/۴	۷۶/۱	۶۳/۲	۵۹/۹	۵۵/۴	۴۶/۳	۳۶/۳
درصد %	۱۰۰	۹۵/۷	۹۰/۵	۸۳/۴	۷۶/۱	۶۳/۲	۵۹/۹	۵۵/۴	۴۶/۳	۳۶/۳
ستاندارد دویشن	۰/۰۴	۰/۰۳	۰/۰۲	۰/۰۱	۰/۰۰۷	۰/۰۰۵	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۵
استاندارد ارور	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۷	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۰۵	۰/۰۰۰۰۲

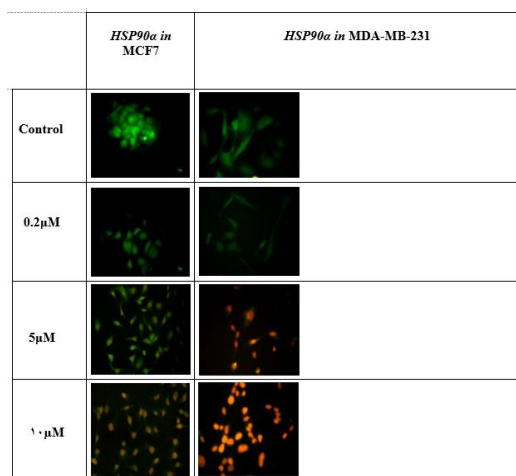
با این روش نیز حساسیت سلول‌های MCF-7 و MDA-MB-231 نسبت به یکدیگر به دست آمد.



**نمودار خطی شماره ۲:** میزان مرگ سلول‌های MDA-MB-231 پس از مواجهه با داروی دو کسورویسین



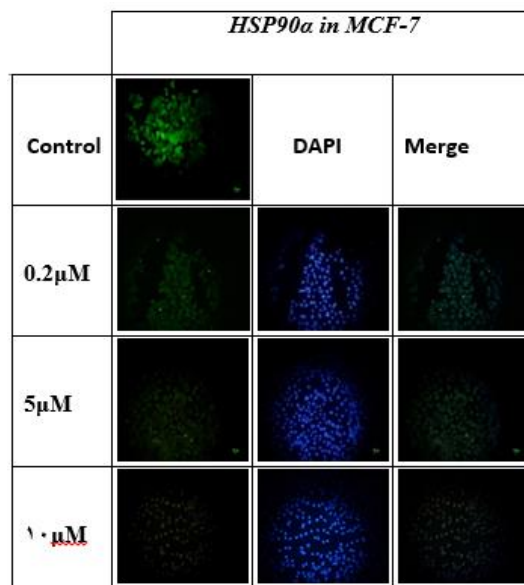
تصویر شماره ۲: بیان پروتئین HSP90 $\alpha$  در سلول های MDA-MB-231 نمونه کنترل و نمونه های پس از مواجهه با غلظت های ۰/۲، ۵ و ۱۰ میکرومولار داروی دوکسوروبیسین پس از مدت زمان ۲۴ ساعت که با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت، رنگ دپی هسته های سلول را مشخص و با آنتی بادی متصل به فلورسنت (FITC) بیان پروتئین را نشان می دهد (بزرگ نمایی 100X).



تصویر شماره ۳: بیان پروتئین HSP90 $\alpha$  در سلول های MCF-7 و MDA-MB-231، نمونه کنترل و نمونه های پس از مواجهه با غلظت های ۰/۲، ۵ و ۱۰ میکرومولار داروی دوکسوروبیسین پس از مدت زمان ۲۴ ساعت. با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت با بزرگ نمایی 100X.

گروه کنترل در هسته و سیتوپلاسم کاهش یافته و در غلظت های ۵ و ۱۰ میکرومولار تراکم سلول ها کاهش و دچار مرگ سلولی شدند و بیان HSP90 $\alpha$  در هسته و سیتوپلاسم کاهش یافت، به طوری که بیان HSP90 $\alpha$  در غلظت ۱۰ میکرومولار در هسته و سیتوپلاسم قابل مشاهده نیست؛ merge کردن تصاویر، تفکیک بهتر هسته و سیتوپلاسم را فراهم می سازد.

با مقایسه هر دو رده سلولی MCF-7 و MDA-MB-231 در تصاویر ایمونوفلورسنت (تصویر شماره ۳) با بزرگ نمایی بیش تر مشاهده می کنیم که حساسیت سلول های MDA-MB-231 در برابر داروی دوکسوروبیسین نسبت به سلول های MCF-7 بیش تر می باشد. پس با افزایش دوز داروی دوکسوروبیسین، تراکم سلول ها کاهش یافته و دچار مرگ سلولی شده اند و بیان این پروتئین در هسته و سیتوپلاسم شدیداً کاهش یافته است.



تصویر شماره ۱: بیان پروتئین HSP90 $\alpha$  در سلول های MCF-7 نمونه کنترل و نمونه های پس از مواجهه با غلظت های ۰/۲، ۵ و ۱۰ میکرومولار داروی دوکسوروبیسین پس از مدت زمان ۲۴ ساعت که با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت، رنگ دپی هسته های سلول مشخص و با آنتی بادی متصل به فلورسنت (FITC) بیان پروتئین را نشان می دهد (بزرگ نمایی 40X).

## بحث

MDA-MB-231 در محیط *in vivo* هیپوکسی انجام شد، مشاهده کردند که با مهار مستقیم  $HSP90\alpha$  با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال 1G6-D7، مرگ سلول‌های توموری افزایش یافت. بنابراین بیان  $HSP90\alpha$  ترشح شده یک فاکتور برای بقاء سلول‌های توموری دچار هیپوکسی شده هستند (۳۱). در مطالعه‌ای در حضور لئوسیت‌های B در یک ارتشاح التهابی، رسپتورهای استروژن و پروژسترون از بین رفتند و باعث تجمع  $HSP90$  در سلول و کمک به تثبیت رسپتورهای HER2/neu و بیش‌تر پروتئین‌ها شدند که باعث پیشرفت تومور شد (۳۲). در مطالعه حاضر مشاهده کردیم که  $IC_{50}$  سلول‌های  $MDA-MB-231(ER^-)$  در مواجهه با دوکسوروبیسین کم‌تر و در نتیجه حساس‌تر از سلول‌های  $MCF-7(ER^+)$  بوده است که با توجه به نتایج ایمنوسیتوشیمی، بیان  $HSP90\alpha$  در سلول‌های  $MCF-7(ER^+)$  و  $MDA-MB-231(ER^-)$  پس از مواجهه با دوکسوروبیسین به عنوان یک داروی شیمی درمانی کاهش یافت. بیان  $HSP90\alpha$  با افزایش دوز دوکسوروبیسین (دوز ۵ و ۱۰ میکرومولار)، رابطه غیرمستقیم داشت. تراکم سلولی سلول‌های رده  $MDA-MB-231(ER^-)$  و رده  $MCF-7(ER^+)$  پس از مواجهه با دوکسوروبیسین با افزایش دوز دارو، کاهش یافت و هر دو رده سلولی دچار مرگ سلولی شدند. هم‌چنین بیان  $HSP90\alpha$  کاهش یافت. اما سلول‌های  $MDA-MB-231$  حساس‌تر بودند.

## سپاسگزاری

این پروژه با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کاشان و مرکز تحقیقات علوم تشریح کاشان انجام شد. نویسندگان از همکاران مربوطه در معاونت پژوهشی و مرکز تحقیقات علوم تشریح دانشکده علوم پزشکی کاشان، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

## References

1. Tao Z, Shi A, Lu C, Song T, Zhang Z, Zhao J. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology.

سرطان پستان یکی از علل مرگ و میر در زنان در سراسر جهان می‌باشد (۲۰). دوکسوروبیسین یک آنتی‌بیوتیک از دسته آنتراسیکلین است که دارای فعالیت آنتی‌نئوپلاستیک بوده و در درمان سرطان پستان یکی از فعال‌ترین عوامل ضد سرطان در شیمی درمانی است (۲۱). با این حال، کاربرد کلینیکی دوکسوروبیسین پر عارضه بوده که عارضه اصلی آن قلبی عروقی و اختلال در سرکوب کردن مغز استخوان و افزایش مقاومت دارویی می‌باشد (۲۲). با شناسایی مکانیسم‌های مقاومت و درمان به عنوان فاکتورهای موثر می‌توان از عوارض جانبی درمان جلوگیری کرد (۲۳).  $HSP90$  در همه سلول‌های طبیعی بدن بیان می‌شود و شامل دو ایزوفرم عمده سیتوزولی  $HSP90\alpha$  و  $HSP90\beta$  است (۲۴). خانواده  $HSP90$  در تثبیت یکسری از محرک‌های مربوط به رشد سلول از جمله کینازهای مختلف در ترانسفورمسیون بدخیمی مانند Met, Abl, Src, ErbB2, Akt, Raf, tyrosine kinases و کینازهای سرین وابسته به سیکلین شرکت دارد. علاوه بر این در بلوغ چندین فاکتور رونویسی مانند هورمون‌های هسته‌ای و فاکتور القا هیپوکسی-۱ نقش مهمی دارد. هم‌چنین پروتئین‌های کلاینت  $HSP90$  در رشد و تکثیر و بقاء چندین نوع از سرطان مهم هستند و اخیراً پس از کشف ساختار  $HSP90$  از جمله قسمت دومین C-terminal، امکانات جدیدی را برای مهار تومورها مورد بررسی قرار می‌دهد (۲۵، ۲۶).

17-AAG (17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin), Ganetespiib, Tanespimycin نمونه‌هایی از مهارکننده‌های  $HSP90$  برای درمان سرطان‌هایی مانند میلوما چندگانه، سرطان ریه، آدنوکارسینوما، فنوکروموسیتوم و لوکمی لنفوبلاستیک هستند (۲۷-۳۰). در مطالعه Dong و همکاران که در سال ۲۰۱۵ بر روی سلول‌های سرطان پستان

- Cell Biochem Biophys 2014; 72(2): 333-338.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer

- statistics, 2015. CA: a Cancer Journal for Clinicians 2015; 65(1): 5-29.
3. Reeder JG, Vogel VG. Breast cancer prevention. *Cancer Treat Res* 2008; 141: 149-164.
  4. Shi Z, Tiwari AK, Patel AS, Fu LW, Chen ZS. Roles of sildenafil in enhancing drug sensitivity in cancer. *Cancer Res* 2011; 71(11): 3735-3738.
  5. Meads MB, Gatenby RA, Dalton WS. Environment-mediated drug resistance: a major contributor to minimal residual disease. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(9): 665-674.
  6. Safra T1, Borgato L, Nicoletto MO, Rolnitzky L, Pelles-Avraham S, Geva R, et al. BRCA mutation status and determinant of outcome in women with recurrent epithelial ovarian cancer treated with pegylated liposomal doxorubicin. *Mol Cancer Ther* 2011; 10(10): 2000-2007.
  7. Dubey A, Prajapati KS, Swamy M, Pachauri V. Heat shock proteins: a therapeutic target worth to consider. *Vet World* 2015; 8(1): 46-51.
  8. Lee JH, Kang KW, Kim JE, Hwang SW, Park JH, Kim SH, et al. Differential expression of heat shock protein 90 isoforms in small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8(8): 9487-9493.
  9. Garcia-Carbonero R, Carnero A, Paz-Ares L. Inhibition of HSP90 molecular chaperones: moving into the clinic. *Lancet Oncol* 2013; 14(9): 358-369.
  10. Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohászka Z, Nardai G. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther* 1998; 79(2): 129-168.
  11. Csermely P, Agoston V, Pongor S. The efficiency of multi-target drugs: the network approach might help drug design. *Trends Pharmacol Sci* 2005; 26(4): 178-182.
  12. Sreedhar AS, Kalmár E, Csermely P, Shen YF. Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett* 2004; 562(1-3): 11-15.
  13. Shukla HD, Pitha PM. Role of hsp90 in systemic lupus erythematosus and its clinical relevance. *Autoimmune Dis* 2012; 2012: 728605.
  14. Dhillon VB, McCallum S, Norton P, Twomey BM, Erkeller-Yuksel F, Lydyard P, et al. Differential heat shock protein overexpression and its clinical relevance in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1993; 52(6): 436-442.
  15. Wang J, Cui S, Zhang X, Wu Y, Tang H. High expression of heat shock protein 90 is associated with tumor aggressiveness and poor prognosis in patients with advanced gastric cancer. *PLoS One* 2013; 8(4): e62876.
  16. Zheng HC, Takahashi H, Li XH, Hara T, Masuda S, Guan YF, Takano Y. Overexpression of GRP78 and GRP94 are markers for aggressive behavior and poor prognosis in gastric carcinomas. *Hum Pathol* 2008; 39(7): 1042-1049.
  17. Milicevic Z, Bogojevic D, Mihailovic M, Petrovic M, Krivokapic Z. Molecular characterization of hsp90 isoforms in colorectal cancer cells and its association with tumour progression. *Int J Oncol* 2008; 32(6): 1169-1178.
  18. Diehl MC, Idowu MO, Kimmelshue K, York TP, Elmore LW, Holt SE. Elevated expression of nuclear Hsp90 in invasive breast tumors. *Cancer Biol Ther* 2009; 8(20): 1952-1961.
  19. Kang GH, Lee EJ, Jang KT, Kim KM, Park CK, Lee CS, et al. Expression of HSP90 in gastrointestinal stromal tumours and mesenchymal tumours. *Histopathology* 2010;



- 56(6): 694-701.
20. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2): 69-90.
  21. Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, Correia S, Oliveira PJ, Santos MS, et al. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Curr Med Chem* 2009; 16(25): 3267-3285.
  22. Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J Pharm Pharmacol* 2013; 65(2): 157-170.
  23. Osborne CK, Schiff R. Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer. *Annu Rev Med* 2011; 62: 233-247.
  24. Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohászka Z, Nardai G. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther* 1998; 79(2): 129-168.
  25. Garnier C, Lafitte D, Tsvetkov PO, Barbier P, Leclerc-Devin J, Millot JM, et al. Binding of ATP to heat shock protein 90: evidence for an ATP-binding site in the C-terminal domain. *J Biol Chem* 2002; 277(14): 12208-12214.
  26. Jego G, Hazoumé A, Seigneuric R, Garrido C. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett* 2013; 332(2): 275-285.
  27. Tavernier E, Flandrin-Gresta P, Solly F, Rigollet L, Cornillon J, Augeul-Meunier K, et al. HSP90 inhibition results in apoptosis of Philadelphia acute lymphoblastic leukaemia cells: an attractive prospect of new targeted agents. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012; 138(10): 1753-1758.
  28. Tosti G, Cocorocchio E, Pennacchioli E, Ferrucci PF, Testori A, Martinoli C. Heat-shock proteins-based immunotherapy for advanced melanoma in the era of target therapies and immunomodulating agents. *Expert Opin Biol Ther* 2014; 14(7): 955-967.
  29. Giubellino A, Sourbier C, Lee MJ, Scroggins B, Bullova P, Landau M, et al. Targeting heat shock protein 90 for the treatment of malignant pheochromocytoma. *PLoS One* 2013; 8(2): e56083.
  30. Dong H, Zou M, Bhatia A, Jayaprakash P, Hofman F, Ying Q, et al. Breast Cancer MDA-MB-231 Cells Use Secreted Heat Shock Protein-90alpha (Hsp90α) to Survive a Hostile Hypoxic Environment. *Sci Rep* 2016; 6: 20605.
  31. Romaniuk A, Lyndin M. Immune microenvironment as a factor of breast cancer progression. *Diagn Pathol* 2015; 10(1): 79.