

مقاله پژوهشی

برتری نقش p53 نسبت به پارتانتوز در شکستگی DNA القا شده توسط محیط میکرو تومور سلول های سرطان پستان

شهزاد چیتگران^۱، شادی ربیعی^۲، محمود براتی^۳، پریسا حیات^۴، سید عبدالحمید انگجی^۱، شیمیا توکل^{۴*}

^۱ گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

^۲ گروه زیست شناسی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

^۳ گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

^۴ مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

* (نویسنده مسئول مکاتبات): shima.tavakol@yahoo.com

تاریخ پذیرش: اسفند ۱۴۰۳

تاریخ دریافت: آبان ۱۴۰۳

چکیده

هدف: سلول ها به طور مداوم در معرض تنش های سلولی مختلفی هستند. بیش از ۵۰٪ از سرطان های انسانی حامل جهش در ژن p53 هستند، بنابراین p53 به عنوان یک سرکوبگر تومور حیاتی در نظر گرفته شده است. پس از آسیب DNA، p53 از طریق تغییرات پس از ترجمه در هسته سلولی تجمع می یابد. مواد و روش ها: در این مطالعه، تأثیر محیط اسیدی و شرطی شده سرطان پستان MDA-MBA231 بر مسیرهای آپوپتوز و پارتانتوز در سلول های فیبروبلاست طبیعی بررسی شد. بیان ژن های Bax و Bcl2 و PARP1 و PARG که در آپوپتوز و پارتانتوز نقش دارند و پروتئین p53 ارزیابی شدند. الکتروفورز برای مطالعه شکستگی DNA در محیط های کشت طبیعی، اسیدی، شرطی شده و اسیدی به علاوه شرطی شده استفاده شد. نتایج: نتایج نشان داد که میزان آسیب DNA در محیط های اسیدی و شرطی شده کمتر از محیط شرطی شده و بیشتر از محیط های طبیعی و اسیدی بود. اگرچه محیط شرطی شده Bax و نسبت Bax/Bcl2 را نسبت به سایر محیط ها در فیبروبلاست ها کمتر القا کرد، اما هیچ تفاوت معنی داری بین نسبت Bax/Bcl2 در گروه های دیگر به عنوان شاخص آپوپتوز مشاهده نشد. سطح ژن های PARP1 و PARG در محیط شرطی شده به علاوه اسیدی کمترین بود و p53 در محیط شرطی شده در سطح کم بیان شده بود. نتیجه گیری: پارتانتوز و سطح Bax مسئول آسیب DNA در محیط شرطی شده نبودند، در حالی که کاهش p53 تا حدودی با ترمیم ضعیف DNA در شرایط استرس در سلول های سرطانی در فیبروبلاست های طبیعی مرتبط بود.

کلیدواژه ها: بدخیمی پستان، محیط کشت شرطی شده، پارتانتوز، آپوپتوز، شکستگی DNA، اسیدوز.

مقدمه

سرطان یک مشکل جهانی و دومین علت مرگ و میر در جهان و یک بیماری پیچیده و چند عاملی است که مقابله با آن در سطح جهانی دشوار است [۱، ۲]. برای درک بهتر مسیرهای دخیل در تومورزایی و طراحی سیستم‌های تحویل داروهای کاربردی برای هدف قرار دادن سرطان در مراحل مختلف، ضروری است که اطلاعات بیشتری در مورد مکانیسم‌های مرگ سلولی دخیل در هر مرحله از سرطان به دست آوریم. در سال ۲۰۱۴، توکل فرضیه‌ای داد که سلول‌های طبیعی مجاور سلول‌های سرطانی، دچار برنامه‌ریزی مجدد ناموفق می‌شوند و به سلول‌های سرطانی تبدیل می‌شوند. اثر محیط میکرو اسیدی مشتق شده از سلول‌های سرطانی بر سلول‌های طبیعی را مورد بحث قرار داد [۳]. به نظر می‌رسد که علاوه بر تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیکی، محیط میکرو تومور (TME) نقش مهمی در تغییر بیان ژن در سرطان و سلول‌های طبیعی مجاور سلول‌های سرطانی دارد [۳، ۴]. به منظور بررسی مطالعات reprogramming معمولاً از سلول‌های فیروبلست استفاده می‌شود که در مطالعه‌ی ما نیز علت انتخاب سلول‌های فیروبلست از انجایی که به دنبال مطالعات قبلی ما بود از این نوع سلول استفاده شد [۳، ۵]. مطالعات ما نشان داده است که فعالیت متابولیکی سلول‌ها هنگام قرار گرفتن در معرض محیط اسیدی تغییر می‌کند و منجر به انحراف از چرخه Krebs طبیعی می‌شود. با گذشت زمان، فعالیت متابولیکی میتوکندری محیط شرطی شده (TME) به تنهایی و در ترکیب با محیط اسیدی، به جز در گروه محیط اسیدی، افزایش می‌یابد. در حالی که بیشترین سطح گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در محیط شرطی شده یافت شده است، سطح آن در گروه ترکیبی به سطح محیط اسیدی کاهش یافته بود. علاوه بر این، اضافه کردن محیط اسیدی به TME پاسخ سلول‌ها را تغییر داد و باعث شد که آنها اتوفاژی را به جای آپوپتوز در اولویت قرار دهند، پدیده‌ای که در محیط شرطی شده به تنهایی رخ نمی‌داد. تجزیه و تحلیل متیلاسیون DNA نشان داد که محیط اسیدی، متیلاسیون DNA هیپومتیلاسیون به طور قابل توجهی افزایش نسبت به محیط‌های طبیعی و ترکیبی داشت. محیط اسیدی نه تنها سلول‌های تحت درمان با محیط شرطی شده را نجات داد، بلکه سطح هیپومتیلاسیون DNA و آپوپتوز را در گروه ترکیبی از طریق

تغییرات اپی ژنتیکی کاهش داد [۵]. بنابراین، نقش TME در پیشرفت سرطان غیرقابل انکار است.

TME از سلول‌های استرومایی و ماتریکس خارج سلولی (ECM) تشکیل شده است (۶). ECM سلول‌های سرطانی، یک محیط اسیدی است که با آگزوزوم‌ها، اجسام آپوپتوزی، DNA بدون سلول (cfDNA)، میکرو RNA، سیتوکین‌ها و سایر ترشحات مشتق شده از سلول‌های سرطانی که بر سلول‌های طبیعی تأثیر می‌گذارند و سیگنال‌های خود را به سلول‌های دور منتقل می‌کنند، غنی شده است [۶-۸]. اگرچه pH داخل سلولی سلول‌های سرطانی کمی قلیایی و خنثی است، اما pH خارج سلولی (pH_e) آنها ۰/۳-۰/۷ واحد کمتر از سلول‌های طبیعی متناظر است [۹]. حتی تغییر ۰/۱ در نسبت pH_e/pH_i می‌تواند بر چندین فرآیند فیزیوشیمیایی، از جمله متابولیسم، تکثیر سلولی و تهاجم تأثیر بگذارد (۱۰). تعامل بین تغییر ژنتیکی/اپی ژنتیکی و بازآرایی TME، تصمیم‌گیرنده نهایی در تشکیل، پیشرفت، حفظ و مقاومت چند دارویی (MDR) سرطان خواهد بود (۶).

اثر Warburg باعث می‌شود که ECM سلول‌های سرطانی از طریق تبدیل پرووات به اسید لاکتیک با استفاده از گلیکولیز، حتی در حضور اکسیژن، اسیدی شود [۱۱]. با این حال، تخلیه یون‌های H⁺ در داخل TME تا حدی به دلیل هیدراتاسیون CO₂ از طریق تنفس است [۱۲]. این تغییرات، pH محیط خارج سلولی و داخل سلولی سلول‌های سرطانی را نسبت به سلول‌های طبیعی معکوس می‌کند. در این میان، سلول‌های سرطانی از طریق مسیرهای مختلف، تلاش می‌کنند تا زنده ماندن سلول را افزایش دهند [۱۳].

همانطور که در بالا ذکر شد، سلول‌های سرطانی ترجیح می‌دهند که متابولیسم Krebs را به گلیکولیز تغییر دهند. افزایش سطح اسید چرب سنتتاز در سلول‌های سرطانی، زنجیره‌ای از واکنش‌ها را ایجاد می‌کند که منجر به آپوپتوز می‌شود. در مقابل، افزایش تولید ROS به دلیل اسیدوز، منجر به مرگ سلولی وابسته به PARP1 (پارتانتوز) می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که استرس اکسیداتیو می‌تواند کاسپاز-۳ را مهار کند و مسیر پارتانتوز را فعال کند [۱۴]. p53، ژن سرکوبگر تومور که به طور معمول در سرطان‌های انسانی جهش یافته است، مجموعه مناسبی از

شدند. سلول‌ها در فلاسک ۷۵ کشت داده شدند و با محیط کشت اصلاح شده DMEM با گلوکز بالا (GIBCO؛ USA)، ۱۰٪ سرم جنین گاوی (GIBCO؛ USA) و ۱٪ پنی سیلین/استرپتومایسین (GIBCO؛ USA) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در ۵٪ CO₂ و ۹۵٪ رطوبت غنی شدند. محیط شرطی شده از محیط کشت سلول‌های MDA-MB-231 مشتق شد که در محیط DMEM با گلوکز بالا بدون فنل رد و بدون بی کربنات سدیم با ۲٪ FBS و ۱٪ پنی سیلین/استرپتومایسین در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در ۵٪ CO₂ و ۹۵٪ رطوبت به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. سپس، محیط شرطی شده از فلاسک جمع‌آوری شد و به سلول‌های NIH/3T3 اضافه شد. سلول‌های NIH/3T3 به مدت ۷ روز با محیط‌های طبیعی، اسیدی، شرطی شده و شرطی شده به علاوه محیط، تحت درمان قرار گرفتند. pH محیط کشت به ترتیب در محیط‌های طبیعی و اسیدی به ۷/۴ (بافر بی کربنات) و ۶/۷ (بافر ۱/۳ M MES) تنظیم شد.

بررسی آسیب به DNA

این مطالعه با کد اخلاق IR.IUMS.REC.1399.393 از دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام شد. سلول‌های NIH/3T3 در پاساژ ۳ که با محیط‌های طبیعی، اسیدی، شرطی شده و شرطی شده به علاوه اسیدی تحت درمان قرار گرفتند، برای تعیین آسیب DNA پس از ۷ روز انکوبه شدن، مورد مطالعه قرار گرفتند. به طور خلاصه، DNA از سلول‌ها با استفاده از DNP-TM (شرکت سینا کلون، تهران، ایران) استخراج شد. سپس از الکتروفورز برای تشخیص آسیب DNA استفاده شد. ۲ گرم آگاروز در ۱۰۰ میلی لیتر بافر TAE 1X حل شد و در یک تانک الکتروفورز نگهداری شد. DNA در چاهک‌های ژل آگاروز ۲٪ که در بافر TAE در ولتاژ ۲۰ میلی ولت به مدت ۸ ساعت غوطه‌ور شده بود، بارگذاری شد.

بررسی ژنی

سلول‌های NIH/3T3 در پاساژ ۳ که با محیط‌های طبیعی، اسیدی، شرطی شده و شرطی شده به علاوه اسیدی تحت درمان قرار گرفتند، برای کمی سازی تغییر نسبی بیان ژن در سطح

ژن‌های هدف را برای شروع توقف چرخه سلولی و/یا آپوپتوز، که تابع درجه و نوع آسیب DNA است، فعال می‌کند. جهش در اکثر ژنوم‌های سرطانی ممکن است ناشی از آنزیم‌های ویرایش DNA یا ماشین‌های تعمیر DNA معیوب باشد [۱۵]. علاوه بر این، بر خلاف آپوپتوز، پارتانئوز باعث شکستگی DNA در مقیاس بزرگ (آپوپتوز باعث شکستگی در مقیاس کوچک می‌شود) می‌شود و اجسام آپوپتوزی را تشکیل نمی‌دهد [۱۶]. pH_e اسیدی، به طور وابسته به دوز، منجر به آسیب DNA و پارتانئوز می‌شود (۱۷). با این حال، این امر بر تکثیر سلول‌های T انسانی، بیان گیرنده [2-IL18]، مهاجم، مهاجرت [۹، ۱۹]، برش جایگزین [RNA ۲۰] و غیره تأثیر می‌گذارد. به طور خلاصه، pH اسیدی و ECM سرطان، محیط‌های حیاتی هستند که مطالعات آنها نوید درک عمیق‌تر فرایندها را می‌دهد.

تغییرات مکانیسم آپوپتوز در سرطان، منجر به عدم مرگ سلول‌های بدخیم می‌شود [۲۱ و ۲۲]. در چندین نوع سلولی، آپوپتوز با اسیدی شدن داخل سلولی و فعال شدن یک اندونوکلاز مبتنی بر pH مرتبط است [۱۷]. ثابت شده است که اکثر سلول‌های سرطانی چرخه سلولی را تغییر می‌دهند، در طی آن سلول‌های طبیعی به سلول‌های سرطانی تبدیل می‌شوند [۲۳]. علاوه بر این، محیط شرطی شده سلول‌های سرطانی، ترکیبی از ترشحات سلول‌های سرطانی است. با این حال، آنها ممکن است هنگام ترکیب با محیط اسیدی، به طور متفاوتی بر فرآیند فیزیولوژیکی تأثیر بگذارند. بنابراین، در این مطالعه، فیروبلاست‌های طبیعی با محیط‌های طبیعی، اسیدی و شرطی شده مشتق شده از سلول‌های سرطانی مهاجمی و محیط اسیدی به علاوه شرطی شده، تحت درمان قرار گرفتند. سپس، اثر محیط‌های ذکر شده در بالا بر روی برخی ژن‌های دخیل در آپوپتوز و پارتانئوز بررسی شد تا دلیل شکستگی DNA در فیروبلاست‌های طبیعی مجاور سلول‌های سرطانی مشخص شود.

مواد و روش‌ها

تیمار سلولی

سلول سرطان پستان انسانی MDA-MB-231 و سلول فیروبلاست موش NIH/3T3 از موسسه پاستور ایران خریداری

انکوبه شدن، مورد مطالعه قرار گرفتند. استخراج بر روی یخ انجام شد. ژن β -actin به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. RNA کل با استفاده از RNX-Plus (شرکت سینا کلون، ایران) استخراج شد. درمان با DNase 1 انجام شد و سنتز cDNA با آغازگر هگزامر تصادفی و oligo dt با استفاده از کیت سنتز cDNA (Takara، ژاپن) انجام شد. برای cDNA ۴۵ چرخه RT-PCR در یک آنالیزگر زمان واقعی Rotor-gene Q (Corbett، استرالیا) با استفاده از Eva Green بررسی شد. هر واکنش سه بار تکرار شد و تغییر نسبی بیان ژن با استفاده از روش DDCT کمی سازی شد. سه بار آزمایش سه گانه تکرار شد و میانگین $\pm$ انحراف معیار محاسبه شد. توالی آغازگرهای ژن‌ها به شرح زیر بود (جدول ۱).

وسترن بلات

سلول‌های NIH/3T3 در پاساژ ۳ که با محیط‌های طبیعی، اسیدی، شرطی شده و شرطی شده به علاوه اسیدی تحت درمان قرار گرفتند، برای بیان پروتئین p53 پس از ۷ روز انکوبه شدن، مورد مطالعه قرار گرفتند. پروتئیناز A و بافر RIPA (۲۵ میلی مولار Tris-Cl pH 7.6، ۱۵۰ میلی مولار سدیم کلراید، ۱٪ NP-40، ۱٪ سدیم دئوکسی کولات، ۱٪ سدیم دودسیل سولفات ۱ میلی مولار فنیل متیل سولفونیل فلوراید، ۱ میلی مولار سدیم اورتوانادات) برای لیز سلول‌ها و محافظت از پروتئین‌ها اضافه شد. غلظت کل پروتئین در لیزات‌ها با استفاده از کیت سنجش پروتئین BCA (شرکت DNAbiotech Co. IR، ایران) اندازه‌گیری شد. جداسازی پروتئین با استفاده از الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) انجام شد و سپس پروتئین‌های حل شده به غشاهای PVDF (Millipore)، ایالات متحده آمریکا منتقل شدند. پس از مسدود کردن به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق با ۵٪ شیر خشک بدون چربی (DIFCO، پاریس، فرانسه) در بافر Tris-buffered saline حاوی ۰/۰۱٪ Tween 20 (Sigma Aldrich USA)، غشاهای به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتیگراد با آنتی بادی‌های اولیه زیر

انکوبه شدند: CAT N p53 (R&D SYSTEMS، Mab1746؛ ۱:۵۰۰۰) و β -actin (PADZA Padtan و CAT N MB106، IRAN، Pajoooh TBS-T شسته شدند و در دمای اتاق به مدت ۱/۵ ساعت در معرض آنتی بادی‌های ثانویه قرار گرفتند. باندها با استفاده از شیمی لومینسانس تقویت شده (Clarity™ western ECL، BioRad، The substrate) شفاف شدند. سطح پروتئین‌ها با استفاده از نرم‌افزار ImageJ (NIH)، به پروتئین بتا-اکتین نرمالایز شدند. آزمایشات تکراری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و میانگین $\pm$ انحراف معیار محاسبه شد.

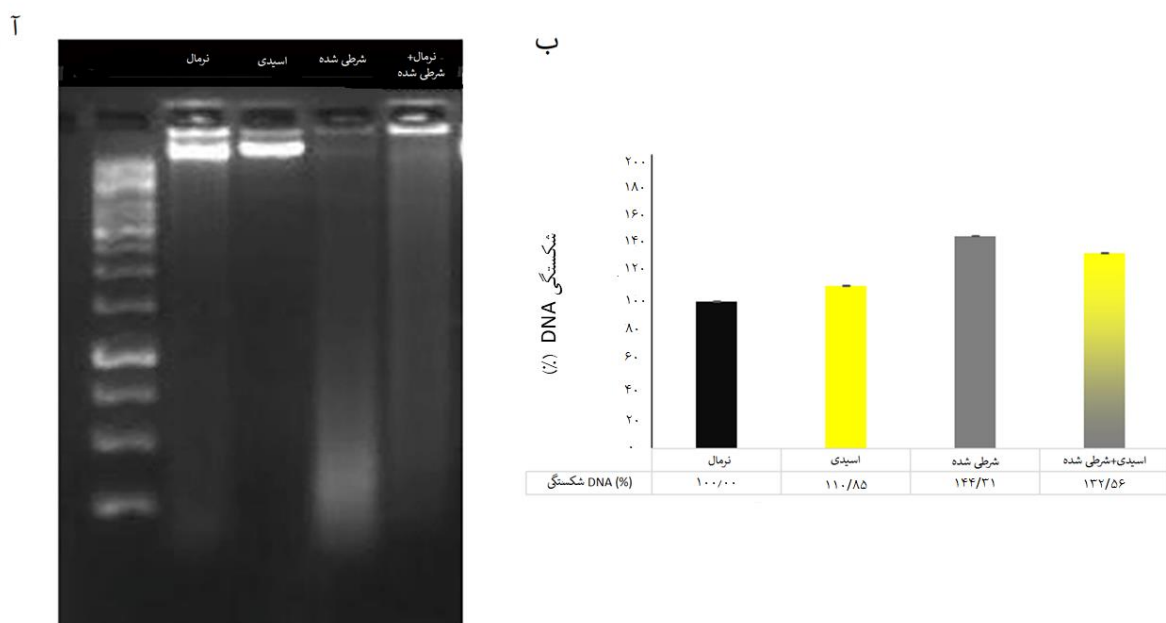
تجزیه و تحلیل آماری

از نرم‌افزار GraphPad Instat (GSL Biotech LLC) برای محاسبه و تجزیه و تحلیل آسیب DNA، تغییر نسبی بیان ژن و بیان پروتئین در سلول‌های تحت درمان با محیط کشت عادی، اسیدی، شرطی و شرطی به علاوه اسیدی استفاده شد. همه آزمایشات سه گانه سه بار تکرار شدند. آزمایشات به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار انجام شدند. از آزمون ANOVA یک طرفه و post test Tukey برای تجزیه و تحلیل آماری ۴ گروه استفاده شد. مقدار $P < 0.05$ به عنوان معنی‌دار از نظر آماری در نظر گرفته شد.

نتایج

آسیب DNA

آسیب DNA با استفاده از الکتروفورز مورد مطالعه قرار گرفت. آپتوز می‌تواند به DNA آسیب برساند و منجر به شکستن DNA دو رشته‌ای به قطعات ۱۸۰ bp شود که در ژل‌های الکتروفورز قابل تشخیص است [۲۴]. نتایج نشان داد که آسیب DNA در محیط کشت شرطی به طور قابل توجهی بیشتر از سایر گروه‌ها بود ($p < 0.01$) اگرچه آسیب DNA در محیط کشت شرطی به علاوه اسیدی بیشتر از محیط کشت اسیدی بود، اما کمتر از محیط کشت شرطی بود (شکل ۱).



شکل ۱. الف) الکتروفورز ژل DNA. ب) نمودار برش DNA برای فیرو بلاست‌های نرمال تحت درمان با محیط کشت نرمال، اسیدی، شرطی شده و اسیدی به علاوه شرطی شده.

بیان ژن Bax و Bcl2 درگیر در آپوپتوز

اختلال در مسیر میتوکندریایی آپوپتوز یکی از مهم‌ترین رویدادها در فرآیندهای سرطان‌زایی است. خانواده پروتئین Bcl2، از جمله Bcl2 ضد آپوپتوز و Bax پرو آپوپتوز، نقش اصلی را در تنظیم این مسیر ایفا می‌کنند. سطوح بیان نسبی ژن‌های Bax و Bcl2 در محیط کشت عادی، اسیدی، شرطی و شرطی به علاوه اسیدی در سلول‌های N3T3 ارزیابی شد. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk تعیین شد. نتایج نشان داد که محیط کشت اسیدی ($P < 0.05$)، شرطی ($P < 0.001$) و شرطی به علاوه اسیدی ($P < 0.001$) به طور قابل توجهی بیان ژن Bax را در مقایسه با محیط کشت عادی کاهش دادند. با این حال، تغییر نسبی در سطح بیان ژن Bax در محیط کشت شرطی به طور قابل توجهی کمتر از محیط کشت اسیدی بود ($P < 0.05$). در عین حال، هیچ تفاوت معنی‌داری بین محیط کشت شرطی به علاوه اسیدی و شرطی مشاهده نشد ($P > 0.05$).

نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk تأیید شد. داده‌های بیان ژن Bcl2 نشان داد که محیط کشت شرطی به طور قابل توجهی بیان ژن Bcl2 را در مقایسه با محیط کشت عادی کاهش داد ($P > 0.05$). هیچ تفاوت معنی‌داری بین تغییر نسبی در بیان ژن Bcl2 در محیط کشت اسیدی، شرطی به علاوه

اسیدی و عادی مشاهده نشد ($P > 0.05$). به عبارت دیگر، بیان ژن Bcl2 در سایر گروه‌ها در مقایسه با محیط کشت عادی کاهش نیافت ($P > 0.05$) (شکل ۲).
شکل ۲ ب، تغییرات نسبت Bax/Bcl2 در محیط کشت عادی، اسیدی، شرطی و شرطی به علاوه اسیدی را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که نسبت Bax/Bcl2 در محیط کشت شرطی به طور قابل توجهی در مقایسه با محیط کشت عادی ($P < 0.01$)، اسیدی ($P < 0.05$) و شرطی به علاوه اسیدی ($P < 0.05$) کاهش یافت. هیچ تفاوت معنی‌داری بین محیط کشت عادی، اسیدی و شرطی به علاوه اسیدی مشاهده نشد ($p > 0.05$).

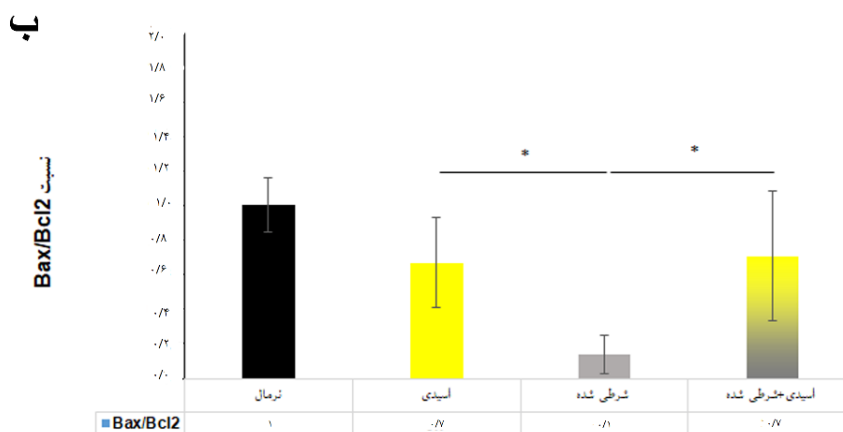
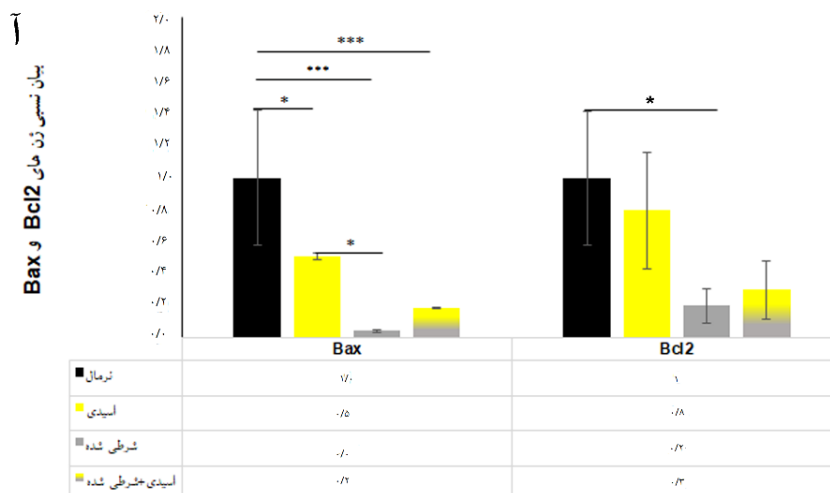
ژن‌های درگیر در پارتانتوز

PARP1، ژنی که در پارتانتوز نقش دارد، در سلول‌های NIH/N3T3 ارزیابی شد. همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است، محیط کشت شرطی کاهش قابل توجهی در بیان ژن PARP1 را در مقایسه با محیط کشت عادی ($P < 0.05$) و اسیدی ($P < 0.05$) ایجاد کرد. هیچ تفاوت معنی‌داری بین محیط کشت شرطی و شرطی به علاوه اسیدی مشاهده نشد ($P > 0.05$). علاوه بر این، هیچ تفاوت معنی‌داری بین سطوح بیان ژن PARP1 در شرایط عادی، اسیدی و اسیدی به علاوه

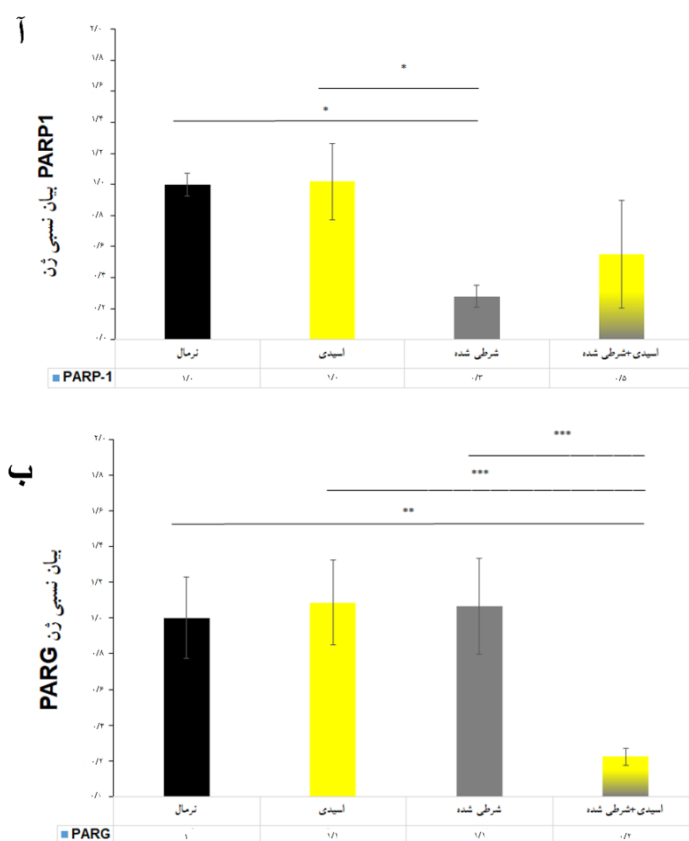
شرطی مشاهده نشد ($P > 0.05$) شکل ۳ آ. PARG یکی از مهم‌ترین ژن‌های درگیر در پاتوژنز پارتانتوز است. همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است، محیط کشت اسیدی به علاوه شرطی کاهش در بیان ژن PARG را در مقایسه با محیط کشت عادی ($P < 0.01$)، اسیدی ($P < 0.001$) و شرطی ($P < 0.001$) ایجاد کرد. با این حال، بیان نسبی ژن PARG در سایر گروه‌ها به طور قابل‌توجهی متفاوت نبود ($P > 0.05$) شکل ۳ ب.

تجزیه و تحلیل پروتئین p53 با استفاده از وسترن بلائینگ

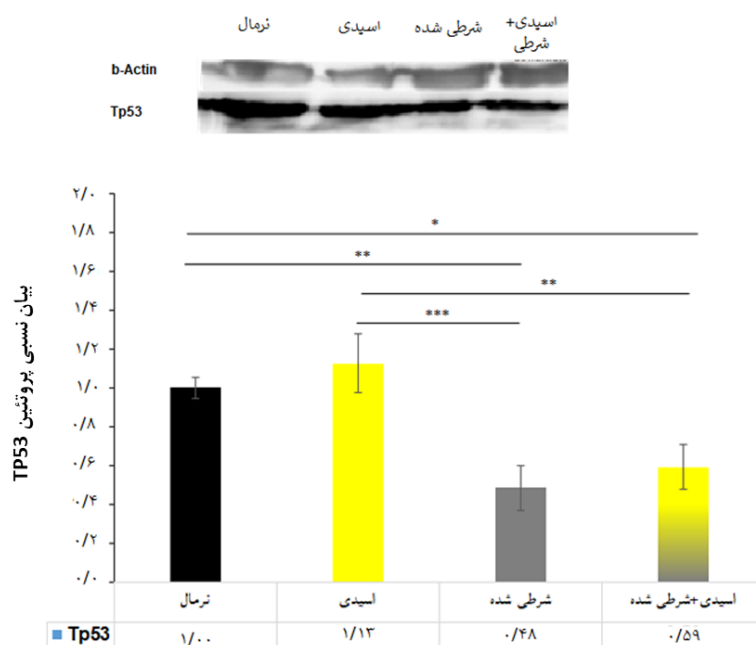
p53 یک سرکوبگر تومور است که از تقسیم و رشد غیرطبیعی سلول جلوگیری می‌کند. بیان پروتئین p53 در سلول‌های تحت درمان با محیط کشت عادی، اسیدی، شرطی و اسیدی به علاوه شرطی ارزیابی شد. نتایج نشان داد که پروتئین p53 در محیط کشت شرطی در مقایسه با محیط کشت عادی ($p > 0.001$) و اسیدی ($P < 0.01$) پایین بیان شده است. هیچ تفاوت معنی‌داری بین سطح p53 در محیط کشت شرطی و اسیدی به علاوه شرطی مشاهده نشد ($p > 0.05$). علاوه بر این، در محیط کشت اسیدی به علاوه شرطی در مقایسه با اسیدی ($P > 0.01$) و عادی ($P < 0.001$) کم بیان شد (شکل ۴).



شکل ۲. الف) بیان نسبی ژن‌های Bax و Bcl2 در سلول‌های NIH/3T3 پس از ۷ روز درمان با محیط کشت نرمال، اسیدی، شرطی شده و اسیدی به علاوه شرطی شده. بیان Bax در همه محیط‌ها در مقایسه با محیط کشت نرمال به طور قابل‌توجهی کاهش یافت. ($P = 0.0002$) کاهش بیان ژن Bcl2 در محیط کشت شرطی شده در مقایسه با محیط کشت نرمال مشاهده شد. ($P = 0.0246$) ب) نتایج مربوط به تغییرات نسبت Bax/Bcl2 در سلول‌های NIH/3T3 پس از ۷ روز درمان با محیط کشت نرمال، اسیدی، شرطی شده و اسیدی به علاوه شرطی شده. همانطور که مشاهده می‌شود، نسبت Bax/Bcl2 در محیط کشت شرطی شده در مقایسه با سایر گروه‌ها کاهش یافت. * نشان دهنده $p < 0.05$ ، ** نشان دهنده $p < 0.01$ و *** نشان دهنده $p < 0.001$ است.



شکل ۳. الف) تغییرات نسبی در بیان ژن PARP1 در سلول‌های NIH/3T3 پس از ۷ روز درمان با محیط کشت نرمال، اسیدی، شرطی شده و اسیدی به علاوه شرطی شده. محیط کشت شرطی شده بیان ژن PARP1 را در مقایسه با محیط کشت اسیدی و نرمال کاهش داد. ب) بیان ژن PARG در سلول‌های NIH/3T3 پس از ۷ روز درمان با محیط کشت نرمال، اسیدی، شرطی شده و اسیدی به علاوه شرطی شده. بیان ژن PARG در محیط کشت اسیدی به علاوه شرطی شده در مقایسه با سایر گروه‌ها کاهش یافت. * نشان دهنده $p < 0.05$ ، ** نشان دهنده $p < 0.01$ و *** نشان دهنده $p < 0.001$ است.



شکل ۴. بیان نسبی پروتئین p53 در مقابل اکتین در سلول‌های تحت درمان با محیط کشت نرمال و اسیدی، شرطی شده و اسیدی به علاوه شرطی شده پس از ۷ روز درمان. * نشان دهنده $p < 0.05$ ، ** نشان دهنده $p < 0.01$ و *** نشان دهنده $p < 0.001$ است.

جدول ۱. سکانس‌های پرایمر مربوط به ژن‌های مورد مطالعه

ژن‌ها	سکانس
Parp1	F: 5'-GGAAAGGGATCTACTTTGCCG- 3' R: 5'-TCGGGTCTCCCTGAGATGTG- 3'
BCL2	F: 5'-CCCTTGCGTGTCTCTCTCTG- 3' R: 5'-TCCTGTGATTCTCCCTTCTTCT- 3'
BAX	F: 5'-GCAGCGGCAGTGATGGAC- 3' R: 5'-TCCTGGATGAAACCCTGTAGC- 3'
PARG	F: 5'-GAGATCGTTGCCATTGACGC- 3' R: 5'-AGAAGGAACCTCAGGACGGA- 3'
β-Actin	F: 5'-TGAAGATCAAGATCATTGCTCCTC- 3' R: 5'-TCAGTAACAGTCCGCCTAGAAG- 3'

بحث و نتیجه‌گیری

سرطان یک معضل بین‌المللی مهم است که بر تمام مسیرهای زیربنایی ژنوتیپ و فنوتیپ سلولی، از جمله ژنتیک سلولی، اپی‌ژنتیک سلول‌های سرطانی و سلول‌های طبیعی مجاور سلول‌های سرطانی تأثیر می‌گذارد [۱، ۳، ۲۵]. سلول‌های سرطانی و زیکول‌های خارج سلولی مانند آگروم‌ها و اجسام آپوتوتیک را ترشح می‌کنند که در متاستاز و آنژیوژنز نقش دارند. بیومولکول‌های ترشح شده با فعال کردن پروتئین‌های پیش‌سرطانی، عملکرد سلول‌های هدف را تغییر می‌دهند. آنها همچنین با سلول‌های سرطانی و اندوتلیال تداخل می‌کنند و می‌توانند با فیروبلاست‌ها ارتباط برقرار کنند که می‌تواند باعث برنامه‌ریزی سلول‌ها به سلول‌های سرطانی یا شبیه به سرطان شود [۲۶]. یکی دیگر از شکاف‌های علمی مهم در طراحی یک سیستم موثر تحویل دارو هدفمند، این است که کدام مکانیسم‌های مرگ سلولی بیشتر در هر مرحله از سرطان دخیل هستند. برای دستیابی به این هدف، شکستگی DNA در سلول‌های تحت درمان با محیط کشت عادی، اسیدی، شرطی و اسیدی به علاوه شرطی ارزیابی شد. نتایج نشان داد که محیط کشت شرطی شکستگی DNA بیشتری نسبت به محیط کشت اسیدی به علاوه شرطی و اسیدی ایجاد می‌کند. به عبارت دیگر، سطح شکستگی DNA در سلول‌های تحت درمان با محیط کشت اسیدی به علاوه شرطی کمتر از محیط کشت شرطی و بیشتر از محیط کشت اسیدی بود. سطح پروتئین p53 و چهار ژن مهم دیگر درگیر در آپوتوز، پارتانتوز، برای تعیین دلیل این پدیده ارزیابی شد. نتایج نشان داد که نسبت Bax/Bcl2 به عنوان

شاخص آپتوز [۲۷] در محیط کشت شرطی کاهش یافت؛ با این حال، هیچ تفاوت معنی‌داری در این نسبت بین سایر گروه‌ها مشاهده نشد.

علاوه بر این، ژن‌های PARP-1 و PARG که در پارتانتوز نقش دارند [۲۸]، افزایش نیافتند PARG. در محیط کشت اسیدی به علاوه شرطی کاهش یافت، در حالی که PARP-1 در سلول‌های تحت درمان با محیط کشت شرطی کاهش یافت. با وجود این، p53، پروتئینی مهم درگیر در ترمیم DNA، در محیط کشت شرطی و اسیدی به علاوه شرطی کاهش یافت.

بیومولکول‌های ترشح شده از سلول‌های سرطانی، میکرو محیط تومور را تغییر می‌دهند و ارگان هدف را برای پیشرفت تومور مناسب می‌کنند. این بیومولکول‌ها در حال حاضر به عنوان یک جزء اساسی میکرو محیط بین سلولی در نظر گرفته می‌شوند و می‌توانند به عنوان کنترل‌کننده‌های ارتباط بین سلولی عمل کنند [۲۹]. آنها می‌توانند بیان ژن‌های Bax و Bcl2 را تغییر دهند [۲۵]. این موضوع برای مطالعه بیشتر پدیده‌های پشت تغییر بیان ژن درگیر در آپتوز مورد بحث قرار خواهد گرفت.

Park و همکارانش نشان دادند که محیط کشت اسیدی در طول ۲-۶ ساعت باعث تولید ROS، بیان بیش از حد Bax، شکافت PARP و قطعه قطعه شدن DNA می‌شود. آنها نشان دادند که بیان ژن Bcl2 در حضور محیط کشت اسیدی بدون تغییر باقی می‌ماند (۳۰). یافته‌های ما نیز تأیید کرد که محیط کشت اسیدی بیان ژن Bcl2 را تغییر نداد. این مطالعه نشان داد که ژن‌های Bax و Bcl2 در سلول‌های تحت درمان با محیط کشت شرطی، علی‌رغم افزایش شکستگی DNA، کاهش یافتند.

که محیط کشت اسیدی باعث شکافت PARP به طور وابسته به pH می شود. آنها نشان دادند که بالاترین سطح شکافت PARP در محدوده pH از ۶/۲ تا ۶/۶، ۶/۴ بود [۳۰]. به عبارت دیگر، بیش فعالی PARP-1 منجر به تجمع پلیمر PAR، پلیمرهای PAR و آسیب DNA می شود که در آن PAR با استفاده از PARG تجزیه می شود [۲۸، ۳۱]. PARG علاوه بر این با واکنش های سلولی به استرس اکسیداتیو مرتبط است و یک جزء ضروری از مسیر پارثاناتوز است (32). عدم تعادل در PARG از رشد سلول های سرطانی جلوگیری می کند. با این حال، مطالعه ما هیچ ارتباطی بین شکستگی DNA و بیان بیش از حد PARP-1 و PARG نشان نداد.

سپس، سطح پروتئین p53 به عنوان ژنی درگیر در سرطان و ترمیم DNA ارزیابی شد. توقف چرخه سلولی توسط p53 به سلول ها اجازه می دهد تا DNA آسیب دیده را ترمیم کنند. این پروتئین یک فعال کننده شناخته شده آپوپتوز و توقف چرخه سلولی در پاسخ به استرس سلولی یا آسیب DNA است. "دیدگاه کوپرنیکی" از p53 آن را در مرکز علائم تجاری سرطان قرار می دهد، که ثابت ژنومی را پیش می برد، اثرات ضد آنژیوژن را اعمال می کند، کنترل تشدید تومور و پاسخ ایمن را کنترل می کند و از متاستاز جلوگیری می کند. بیش از ۵۰٪ از سرطان های انسانی دارای تغییرات از دست دادن عملکرد در ژن p53 هستند و ۲۰٪-۳۰٪ از سرطان های پستان، با بیش از ۱۵۰۰۰ جهش متنوع گزارش شده است [۳۳]. هنگامی که ترمیم DNA کامل شد، سلول ها دوباره وارد چرخه سلولی منظم می شوند. هنگامی که سلول ها دارای آسیب DNA شدید هستند، p53 کار پرو آپوپتوتیک خود را برای از بین بردن سلول هایی با آسیب DNA واقعی انجام می دهد. در ادامه از تبادل DNA آسیب دیده با سلول های دختر برای حفظ یکپارچگی ژنومی جلوگیری می کند (34، 35). نتایج نشان داد که محیط کشت شرطی و اسیدی به علاوه شرطی، پروتئین p53 را در سلول ها پایین تنظیم کردند. بنابراین، شکستگی DNA در محیط کشت شرطی و اسیدی به علاوه شرطی بیشتر به کاهش بیان پروتئین p53 به عنوان پروتئینی درگیر در ترمیم DNA نسبت به مسیر PARP مرتبط بود. به عبارت دیگر، نتایج نشان داد که محیط کشت شرطی باعث آسیب DNA می شود، که با اثرات p53 مطابقت دارد. چندین مکانیسم

مطالعات قبلی ما نشان داد که محیط کشت اسیدی بقای سلولی را کاهش می دهد در حالی که سطح تولید ROS را در سلول های طبیعی تغییر نمی دهد (اطلاعات نشان داده نشده است). این داده ها با داده های Bax مطابقت دارند. بنابراین، به نظر می رسد که سطح ROS در محیط کشت اسیدی موازی با ژن Bax بود، در حالی که این داستان در مورد محیط کشت شرطی صدق نمی کند. به عبارت دیگر، تولید ROS داخل سلولی بدون تغییر در سلول های اسیدی ممکن است دلیل بیان ژن Bax و آپوپتوز بدون تغییر باشد. محیط کشت شرطی باعث تولید ROS داخل سلولی و شکستگی DNA بیشتر از سلول های طبیعی شد (اطلاعات نشان داده نشده است). بنابراین، انتظار می رفت که محیط کشت شرطی باعث افزایش بیان ژن Bax شود در حالی که باعث کاهش بیان ژن Bax می شود. ممکن است گفته شود که محیط کشت شرطی، از طریق القای ROS داخل سلولی، به DNA آسیب می رساند. با این حال، مشخص نیست که چرا بیان ژن Bax کاهش یافته است و کدام مکانیسم ها در کاهش بیان ژن Bax علی رغم آسیب DNA و تولید ROS نقش داشته اند. با این حال، ممکن است فرض شود که تولید ROS احتمالاً در طول ۷ روز کاهش یافته است، در حالی که داده های ROS ما مربوط به ۳ روز بود. توصیه می شود که این موضوع بررسی شود. رنگ آمیزی آنکسین-PI - نشان داد که سلول های تحت درمان با محیط کشت شرطی باعث آپوپتوز می شوند (اطلاعات نشان داده نشده است)، در حالی که بیان ژن Bax کاهش یافت. بنابراین، ژن های دیگری مهم تر از Bax و Bcl2 در آپوپتوز سلول های طبیعی مجاور سلول های سرطانی نقش دارند. توصیه می شود که این موضوع بررسی شود.

برای بررسی بیشتر دلایل پشت شکستگی DNA ناشی از محیط کشت شرطی، ژن های PARG و PARP-1 ارزیابی شدند. PARG یک آنزیم مهم در کاتابولیسم پلی-ADP-ریبوز است و ممکن است با پروتئولیز آشکار شود. این آنزیم در بسیاری از سرطان ها نقش دارد و سطح آن بیان ژن PARP1 را کنترل می کند (۲۸). با توجه به شکستگی DNA در سلول های تحت درمان با محیط کشت شرطی و اسیدی به علاوه شرطی، انتظار می رفت که ژن های PARP و PARG افزایش یابند، در حالی که این ژن ها بیان بیش از حد نداشتند Park و همکارانش نشان دادند

خارج از مسیر PARP بر شکافت DNA تأثیر می‌گذارند، که ترمیم DNA را حفظ می‌کند. بر اساس این اثرات، ثابت شد که آسیب DNA بیشتر با کاهش پروتئین p53 در محیط کشت شرطی و اسیدی به علاوه شرطی مرتبط است. در نتیجه، سلول‌ها به طور مداوم در معرض استرس‌های سلولی مختلف مانند آسیب DNA قرار دارند. از آنجایی که بیش از ۵۰٪ از سرطان‌های انسانی دارای جهش در ژن p53 هستند، p53 به عنوان یک سرکوبگر تومور مهم در نظر گرفته شده است. پس از آسیب DNA، p53 از طریق اصلاحات پس از ترجمه در هسته سلولی تجمع می‌یابد. یافته‌ها نشان داد که اگرچه هیچ تفاوت معنی‌داری بین نسبت بیان پروتئین Bax/Bcl2 در سلول‌های تحت درمان با چهار محیط کشت وجود نداشت، رنگ‌آمیزی آنکسین-PI نشان داد که تعداد سلول‌های آپوپتوتیک به ترتیب $\text{conditioned} > \text{acidic} > \text{conditioned-acidic} > \text{normal media}$ بیشتر بود. نتایج نشان دهنده نقش مهم‌تر ژن‌های دیگر به جز Bax و Bcl2 در آپوتوز سلول‌های طبیعی مجاور سلول‌های سرطانی است. با تفکر گذشته که TME باعث ایجاد تومور می‌شود، و ابشارهای سیگنالینگ سلولی در سلول‌های سرطانی باید از سلول‌های غیر سرطانی متفاوت باشد، موافق است. یکی دیگر از یافته‌های مهم این بود که ترکیب هر دو محیط کشت اسیدی و شرطی برای ارزیابی اثر TME بر سرطان ضروری است.

بطور خلاصه نتایج این مطالعه، تأثیر محیط اسیدی و محیط کشت شرطی‌شده سلول‌های سرطان پستان MDA-MB-231 بر روی سلول‌های فیروبلاست طبیعی بررسی شد و نشان داده شد که محیط کشت شرطی‌شده باعث افزایش قابل توجه آسیب DNA در سلول‌های فیروبلاست طبیعی می‌شود، اما این آسیب کمتر از محیط کشت شرطی‌شده به علاوه اسیدی بود. در حالیکه محیط کشت شرطی‌شده باعث کاهش بیان ژن Bax (پیش آپوتوزی) و نسبت Bax/Bcl2 شد، اما تفاوت معنی‌داری در نسبت Bax/Bcl2 در سایر گروه‌ها مشاهده نشد. سطوح بیان ژن‌های PARP1 و PARG در محیط کشت شرطی‌شده به علاوه اسیدی کمترین مقدار را داشت. همچنین پروتئین p53 در محیط کشت شرطی‌شده کاهش یافت. در نهایت می‌توان نتیجه گرفت که پارتانتوز و سطح Bax مسئول آسیب DNA در

محیط کشت شرطی‌شده نیستند و کاهش p53 تا حدودی با ترمیم ضعیف DNA در شرایط استرس در سلول‌های سرطانی مرتبط بود. در مجموع، محیط میکرو تومور نقش مهمی در پیشرفت سرطان دارد و می‌تواند بر پاسخ سلول‌های طبیعی مجاور تأثیر بگذارد و ترکیب محیط اسیدی و محیط کشت شرطی‌شده برای ارزیابی کامل اثر محیط میکرو تومور بر سرطان ضروری است. محدودیت‌های مطالعه شامل بررسی ژن‌ها در سطح پروتئین بود که بهتر است انجام پذیرد و اینکه در مدت زمان‌های مختلف تیمارها انجام شود و ژن‌ها و پروتئین‌ها دیگری نیز که در مسیر پارتانتوز و شکستگی و ترمیم DNA نقش دارند بررسی گردند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی از سوی معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری (صندوق ملی علوم ایران) (شماره گرت: ۹۷۰۰۷۶۶۸) و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران (شماره گرت: ۹۷-۰۳-۱۱۷-۳۲۷۲۸) انجام شده است. از دانشگاه علوم پزشکی ایران و معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری (صندوق ملی علوم ایران) برای حمایت مالی تشکر و قدردانی می‌کنیم.

مشارکت و نقش نویسندگان

شهزاد چیتگران در کشت سلولی و تحلیل ژن، جمع آوری و تحلیل داده‌ها مشارکت داشت؛ شادی ربیعی و پریسا حیات وسترن بلائینگ را انجام دادند؛ محمد براتی بررسی بیان ژنی را انجام دادند؛ سید عبدالحمید انگجی داده‌ها را تحلیل کردند؛ شیما توکل طراحی مطالعه، آنالیز آماری، تحلیل نتایج، نگارش مقاله، پاسخ به نظرات داور. همه نویسندگان نسخه نهایی مقاله را خوانده و تایید کرده اند.

منابع

- [1] Rabiee S, Tavakol S, Barati M, Joghataei MT. Autophagic, apoptotic, and necrotic cancer cell fates triggered by acidic pH microenvironment. *Journal of cellular physiology*. 2019; 234(7): 12061-9.
- [2] Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell*. 2007; 128(4): 683-92.

- [3] Tavakol S. Acidic pH derived from cancer cells may induce failed reprogramming of normal differentiated cells adjacent tumor cells and turn them into cancer cells. *Medical hypotheses* 2014; 83 (6), 668-672.
- [4] Baxter E, Windloch K, Gannon F, Lee JS. Epigenetic regulation in cancer progression. *Cell & bioscience*. 2014; 4(1): 1-11.
- [5] Rabiee S, Hoveizi E, Barati M, Salehzadeh A, Joghataei MT, Tavakol SJPo. Cancer cells same as zombies reprogram normal cells via the secreted microenvironment. 2023; 18(7): e0288003.
- [6] Baghban R, Roshangar L, Jahanban-Esfahlan R, Seidi K, Ebrahimi-Kalan A, Jaymand M, et al. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Communication and Signaling*. 2020; 18(1): 1-19.
- [7] Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer cell*. 2012; 21(3): 309-22.
- [8] Wojtkowiak JW, Verduzco D, Schramm KJ, Gillies RJ. Drug resistance and cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironment. *Molecular pharmaceutics*. 2011; 8(6): 2032-8.
- [9] Hao G, Xu ZP, Li L. Manipulating extracellular tumour pH: an effective target for cancer therapy. *RSC advances*. 2018; 8(39): 22182-92.
- [10] Fang JS, Gillies RD, Gatenby RA, editors. Adaptation to hypoxia and acidosis in carcinogenesis and tumor progression. *Seminars in cancer biology*; 2008: Elsevier.
- [11] Kato Y, Maeda T, Suzuki A, Baba Y. Cancer metabolism: new insights into classic characteristics. *Japanese Dental Science Review*. 2018; 54(1): 8-21.
- [12] Corbet C, Feron O. Tumour acidosis: from the passenger to the driver's seat. *Nature Reviews Cancer*. 2017; 17(10): 577-93.
- [13] Som A, Bloch S, Ippolito JE, Achilefu S. Acidic extracellular pH of tumors induces octamer-binding transcription factor 4 expression in murine fibroblasts in vitro and in vivo. *Scientific reports*. 2016; 6(1): 1-6.
- [14] Yang D, Shu T, Zhao H, Sun Y, Xu W, Tu G. Knockdown of macrophage migration inhibitory factor (MIF), a novel target to protect neurons from parthanatos induced by simulated post-spinal cord injury oxidative stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2020; 523(3): 719-25.
- [15] Sanchez-vega F. Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Article Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. 2018.
- [16] Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*. 2018; 25(3): 486-541.
- [17] CZENE S, TIBÄCK M, HARMS-RINGDAHL M. pH-dependent DNA cleavage in permeabilized human fibroblasts. *Biochemical Journal*. 1997; 323(2): 337-41.
- [18] Carswell KS, Papoutsakis ET. Extracellular pH affects the proliferation of cultured human T cells and their expression of the interleukin-2 receptor. *Journal of immunotherapy*. 2000; 23(6): 669-74.
- [19] Martínez-Zaguilán R, Seftor EA, Seftor RE, Chu Y-W, Gillies RJ, Hendrix MJ. Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clinical & experimental metastasis*. 1996; 14(2): 176-86.
- [20] Borsi L, Balza E, Gaggero B, Allemanni G, Zardi L. The Alternative Splicing Pattern of the Tenascin-C Pre-mRNA Is Controlled by the Extracellular pH (*). *Journal of Biological Chemistry*. 1995; 270(11): 6243-5.
- [21] Skenderi F, Vranic S, Damjanov I. Regulated cell death in diagnostic histopathology. *International Journal of Developmental Biology*. 2015; 59(1-2-3): 149-58.
- [22] Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of experimental & clinical cancer research*. 2011; 30(1): 1-14.
- [23] Venkatadri R, Muni T, Iyer A, Yakisich J, Azad N. Role of apoptosis-related miRNAs in resveratrol-induced breast cancer cell death. *Cell death & disease*. 2016; 7(2): e2104-e.
- [24] Hassab El-Nabi S, Elhassaneen Y. Detection of DNA damage, molecular apoptosis and production of home-made ladder by using simple techniques. *Biotechnology*. 2008; 7(3): 514-22.
- [25] Rabiee Motmaen S, Tavakol S, Joghataei MT, Barati M. Acidic pH derived from cancer cells as a double-edged knife modulates wound healing through DNA repair genes and autophagy. *International Wound Journal*. 2020; 17(1): 137-48.
- [26] Akoto T, Saini S. Role of exosomes in prostate cancer metastasis. *International journal of molecular sciences*. 2021; 22(7): 3528.
- [27] Hadi F, Tavakkol S, Laurent S, Pirhajati V, Mahdavi SR, Neshastehriz A, et al. Combinatorial effects of radiofrequency hyperthermia and radiotherapy in the presence of magneto-plasmonic nanoparticles on MCF-7 breast cancer cells. *Journal of cellular physiology*. 2019; 234(11): 20028-35.

- [28] Zhou Y, Liu L, Tao S, Yao Y, Wang Y, Wei Q, et al. Parthanatos and its associated components: promising therapeutic targets for cancer. *Pharmacological Research*. 2021; 163: 105299.
- [29] Arneth B. Tumor microenvironment. *Medicina*. 2019; 56(1): 15.
- [30] Park H, Lyons J, Ohtsubo T, Song C. Acidic environment causes apoptosis by increasing caspase activity. *British journal of cancer*. 1999; 80(12): 1892-7.
- [31] Andrabi SA, Dawson TM, Dawson VL. Mitochondrial and nuclear cross talk in cell death: parthanatos. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008; 1147(1): 233-41.
- [32] Gao P, Wang D, Liu M, Chen S, Yang Z, Zhang J, et al. DNA methylation-mediated repression of exosomal miR-652-5p expression promotes oesophageal squamous cell carcinoma aggressiveness by targeting PARG and VEGF pathways. *PLoS genetics*. 2020; 16(4): e1008592.
- [33] Bertheau P, Lehmann-Che J, Varna M, Dumay A, Poirrot B, Porcher R, et al. p53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy. *The Breast*. 2013; 22: S27-S9.
- [34] Marei HE, Althani A, Afifi N, Hasan A, Caceci T, Pozzoli G, et al. p53 signaling in cancer progression and therapy. *Cancer cell international*. 2021; 21(1): 1-15.
- [35] Huang J. Current developments of targeting the p53 signaling pathway for cancer treatment. *Pharmacology & Therapeutics*. 2021; 220: 107720.

Superior role for p53 in DNA breakage compared with parthanatos by tumor microenvironment of breast cancer cells

Chitgaran S.¹, Rabiee S.², Barati M.³, Hayat P.⁴, Angaji S. A.¹, Tavakol Sh.⁴

¹ Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Science, Kharazmi University, Tehran, Iran

² Department of Biology, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

³ Department of Medical Biotechnology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

^{4*} Cellular and Molecular Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

* (Corresponding author): shima.tavakol@yahoo.com

Received: October 2024

Accepted: March 2025

Abstract

Background: Cells are continuously exposed to various cellular stresses. Over 50% of human cancers carry mutations in the p53 gene, therefore p53 has been considered a critical tumor suppressor. Upon DNA damage, p53 accumulates in the cellular nucleus through post-translational modifications.

Method and materials: In this study, the impact of an acidic and conditioned MDA-MBA231 breast cancer environment on the pathways of apoptosis and parthanatos in normal fibroblast cells was examined. The expression of Bcl2, Bax genes involved in apoptosis, PARP1, PARG genes involved in parthanatos, and p53 protein was evaluated. Moreover, the electrophoresis method was used to study DNA breakage in normal, acidic, conditioned, and acidic plus conditioned media.

Results: The results showed that the level of DNA damage in acidic and conditioned media was less than that in conditioned media and higher than that in normal and acidic media. Although conditioned media induced less Bax and Bax/Bcl2 ratio than other media in fibroblasts, there was no significant difference between the Bax/Bcl2 ratio in other groups as the apoptosis index. PARP1 and PARG gene levels were the lowest in conditioned plus acidic media, and p53 was downregulated in conditioned media.

Conclusion: Parthanatos and the level of Bax were not responsible for DNA damage in conditioned media, whereas a decrease in p53 was partly associated with poor DNA repair under stress conditions in cancer cells in normal fibroblasts. Knowing the contribution of each type of cell death at every cancer stage is effective in designing an effective targeted treatment strategy.

Keywords: Breast Neoplasms; Conditioned Culture Media; Parthanatos; Apoptosis; DNA Damage; Acidosis.