بررسی میزان بیان ژن‌های Fas و Apaf-1 در فیبروبلاست‌های پوست بیماران مبتلا به اسکلروز سیستمیک

مجید عابد خجسته[1]، فرشته آل صاحب فصول[1]، مهدی محمودی[2]، محمد باقر محمودی[3]، شایان مصطفایی[4]، مزدک گنجعلی خانی حاکمی[1]، فرهاد غریب‌دوست[2*]

۱- گروه ایمنی‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
۲- مرکز تحقیقات روماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۳- گروه ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.
٤- گروه آمار زیستی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: تهران، مرکز تحقیقات روماتولوژی، بیمارستان شریعتی.
تلفن: ۸۸۲۲۰۰۶۷-۰۲۱
E-mail: rrclab@tums.ac.ir

دریافت: ۱۳۹٤/۱۲/۰۱ ویرایش: ۱۳۹۵/۰٦/۱۵ پذیرش: ۱۳۹۵/۰٦/۱۹ آنلاین: ۱۳۹۵/۰٦/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: در اسکلروز سیستمیک، فیبروبلاست‌ها در برابر آپوپتوز مقاوم شده و با ترشح مداوم کلاژن و ماتریکس خارج سلولی، موجب تشکیل فیبروز در بافت‌ها می‌شوند. لازم است علل ثانویه بروز بیماری، از جمله عدم پاسخ فیبروبلاست‌های فعال شده به آپوپتوز به عنوان عامل اصلی در ایجاد و استقرار بیماری، مورد توجه قرار گیرد. مطالعه حاضر با هدف بررسی میزان بیان نسبی دو ژن کلیدی مسیر آپوپتوز، Fas و Apaf-1 که به ترتیب در مسیرهای خارجی و داخلی آپوپتوز نقش دارند، انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه مورد- شاهدی، نمونه‌های بیوپسی پوست از ۱۹ بیمار مبتلا به اسکلروز سیستمیک منتشر و ۱٦ فرد سالم در بازه زمانی سال ۱۳۹۳ تا ۱۳۹٤جمع‌آوری شد. گروه بیمار از درمانگاه روماتولوژی بیمارستان شریعتی و مرکز روماتیسم ایران و گروه کنترل از پرسنل بیمارستان شریعتی انتخاب شدند. پس از جداسازی و کشت فیبروبلاست‌های پوستی، RNA سلول‌ها استخراج گردید و سنتز cDNA از روی این رونوشت‌های ژنومی انجام گرفت. سپس میزان بیان ژن‌های Fas و Apaf-1 توسط واکنش Real-time PCR اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: تجزیه و تحلیل داده‌های به‌دست آمده از Real-time PCR نشان داد که در فیبروبلاست پوست بیماران مبتلا به اسکلروز سیستمیک و افراد سالم تفاوت معناداری از نظر میزان بیان ژن‌های Fas (P=۰/۸) و Apaf-1 (P=۰/۱۷) وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه تغییرات معنادار در میزان بیان ژن‌های Apaf-1 و Fas وجود نداشت و این موضوع نشان می‌دهد که حداقل در سطح mRNA این ژن‌ها در فیبروبلاست‌های بیماران اسکلروز سیستمیک فعال نشده‌اند.

کلمات کلیدی: مطالعات مورد- شاهدی، اسکلروز سیستمیک، Fas، Apaf-1، فیبروبلاست.

مقدمه

اسکلروز سیستمیک (Systemic sclerosis, SSc) یک بیماری اتوایمیون روماتیسمی می‌باشد که در این بیماری فیبروز پوست، اندام‌های داخلی و نارسایی عروق کوچک دیده می‌شود.[1و2] این بیماری از نظر کلینیکی اهمیت زیادی دارد، زیرا برخلاف بروز کم و به نسبت نادر بیماری نسبت به سایر بیماری‌های خود ایمنی، موارد مرگ و میر بالایی در آن دیده می‌شود، که می‌تواند به دلیل فیبروز و نارسایی اندام‌های حیاتی مانند دستگاه گوارش، شش‌ها، کلیه‌ها و همچنین قلب باشد.[3]

موارد شیوع بیماری براساس مطالعات انجام شده در آمریکا ۱۵/۱۰۰۰۰۰-۱ نفر می‌باشد.[4] موارد بیماری مانند آنچه در بیماری‌های خود ایمنی عمومیت دارد، در خانم‌ها (با نسبت ۷:۱) بیشتر می‌باشد ولی در انواع ناشی از عوامل محیطی و شغلی در بین آقایان شایع‌تر

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-09]

است.[۵] در سال ۲۰۰۸ بر اساس بررسی‌های Jamshidi و همکاران، میزان شیوع این بیماری در ایران ۱/۱۰۰۰۰۰ برآورد شده است.[۶] از آنجا که عوامل اولیه به‌وجود آورنده‌ی اسکلروز سیستمیک بسیار پیچیده و در بیشتر موارد ناشناخته هستند، لازم است که دلایل ثانویه ایجاد بیماری از جمله آپوپتوز، به عنوان عامل اصلی در ایجاد و استقرار بیماری مورد هدف قرار گیرد.

با تنظیم و تعدیل آپوپتوز در مراحل اولیه بیماری می‌توان از پیشرفت آن جلوگیری نمود و تا حد امکان وضعیت بیمار را به حال اولیه برگرداند.[۱۰و۱۱]

فرآیند آپوپتوز طی دو مسیر عمده به نام‌های مسیر میتوکندریایی (داخلی) و مسیر گیرنده مرگ (خارجی) صورت می‌گیرد. در مسیر میتوکندریایی پروتیین‌های خانواده B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) نقش حیاتی دارند.

از دست رفتن یکپارچگی غشای میتوکندری موجب آزاد شدن سیتوکروم C شده که در ادامه موجب برانگیختن آپوپتوز از مسیر میتوکندریایی می‌شود. سیتوکروم C آزاد شده، به پروتیین موسوم به فاکتور فعال‌کننده آپوپتوز (Apaf-1) متصل می‌شود.

کمپلکس Apaf-1 و سیتوکروم C که آپوپتوزوم نیز نامیده می‌شود به پروکاسپاز ۹ متصل می‌شود و آن را فعال می‌کند و آپوپتوز راه‌اندازی می‌شود.[۱۲-۱۴]

در مسیر خارج سلولی، گیرنده ترایمری سطح سلولی از خانواده‌ی گیرنده Tumor necrosis factor (TNF) به لیگاندهای خود متصل شده و آپوپتوز را از مسیر خارجی راه‌اندازی می‌کند. گیرنده مرگ Fas، از نمونه شناخته شده گیرنده‌های TNF است که در فرآیند مرگ سلولی نقش دارند. اتصال Fas با Fas-L موجب فعال شدن کاسپاز ۸ و در پی آن برانگیختن و راه‌اندازی مسیر آپوپتوز می‌شود.[۱۲و۱۵و۱۶]

از آن‌جایی که سلول موثر در سنتز ماتریکس خارج سلولی، سلول فیبروبلاست است و فنوتیپ فیبروزی زمانی ایجاد می‌شود که این سلول‌ها به آپوپتوز مقاوم شده و به صورت پیوسته ماتریکس خارج سلولی ترشح کنند، بررسی میزان بیان ژن‌های پروآپوپتوتیک Fas و Apaf-1 در سلول‌های فیبروبلاست بیماران اسکلروز سیستمیک در مقایسه با فیبروبلاست افراد نرمال می‌تواند در شناسایی نقش ژن‌های فوق در پاتوژنز مولکولی بیماری کمک نماید.

روش بررسی

در این مطالعه مورد- شاهدی، با توجه به محدودیت گرفتن بیوپسی از بیماران مبتلا به اسکلروز سیستمیک، ضمن مشاوره با متخصصین روماتولوژی و اپیدمیولوژی و آگاهی از اینکه داوطلبین گروه کنترل فاقد هر گونه سابقه‌ای از بیماری‌های پوستی، خودایمنی، روماتولوژی، سرطان و استفاده از داروهای گلوکوکورتیکوییید باشند، نمونه‌های بیوپسی پوست (با استفاده از پانچ ویژه)، از قسمت پشت ساعد ۱۹ بیمار مبتلا به اسکلروز سیستمیک منتشر که بیماری آن‌ها بر اساس معیارهای کالج روماتولوژی آمریکا (ACR) تشخیص داده شده بود و ۱۶ داوطلب سالم که از نظر سن و جنس به صورت همسان با بیماران انتخاب شده بودند، در بازه زمانی سال ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۴ گرفته شد.

گروه بیمار شامل ۱۶ زن و سه مرد، با سن متوسط ۱۱/۲۸±۴۲/۷۶ سال و گروه کنترل نیز شامل ۱۳ زن و سه مرد، با سن متوسط ۱۰±۴۰/۶۷ سال بود. لازم به یادآوری است که تمامی نمونه‌های بیوپسی پس از دریافت رضایتنامه آگاهانه‌ی کتبی از افراد سالم و بیمار ارجاع داده شده به درمانگاه بیماران سرپایی مرکز تحقیقات روماتولوژی بیمارستان شریعتی و مرکز روماتیسم ایران، تهیه شدند. این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی تهران مورد تایید قرار گرفت. فیبروبلاست پوستی از نمونه‌های بیوپسی (٤ mm) توسط فرآیند هضم آنزیمی جدا شدند. به طور خلاصه: هر نمونه بیوپسی با بافر فسفات سالین (PBS) مورد شستشو قرار گرفت و برای جدا کردن اپیدرم از درم به مدت یک شب (Overnight) در مجاورت آنزیم دیسپاز II انکوبه شد. انکوباسیون درم در کلاژناز نوع I به مدت سه ساعت در دمای ۳۷ $^{\circ}$C، منجر به تعلیق تک‌سلولی فیبروبلاست‌های پوستی گردید. سپس فیبروبلاست‌ها در محیط کشت اصلاح شده Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, USA)، همراه با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) و ۲٪ پنی‌سیلین استرپتومایسین (Pen-strep) در دمای ۳۷ $^{\circ}$C در انکوباتور CO2 (۵٪) کشت داده شدند. برای انجام آزمایش‌ها از فیبروبلاست‌های پاساژ سه تا پنج استفاده گردید. پس از رشد سلول‌های فیبروبلاست، مورفولوژی آن‌ها با استفاده از Inverted Microscope (Nikon, Tokyo, Japan) مورد

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-09]

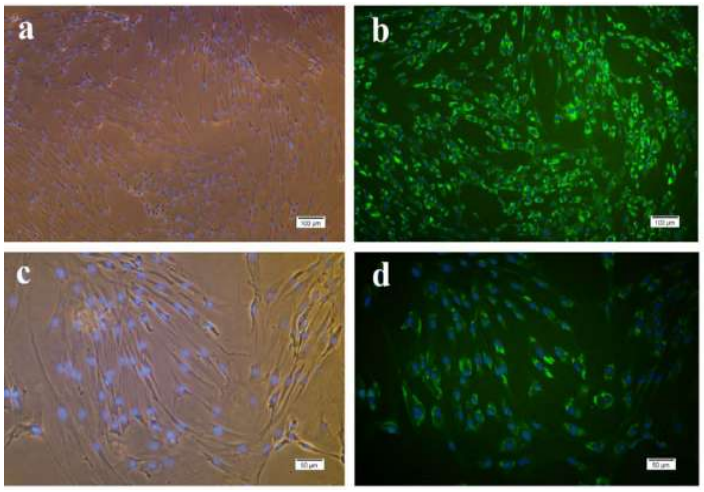
مطالعه قرار گرفت. به منظور تایید جداسازی صحیح فیبروبلاست‌ها و جلوگیری از آلودگی احتمالی با دیگر سلول‌ها از یک آنتی‌بادی اختصاصی بر علیه پروتیین سطحی سلول‌های فیبروبلاست و رنگ DAPI (رنگ مخصوص هسته) استفاده شد.

RNA تام با استفاده از کیت جداسازی High Pure RNA Isolation Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) و با توجه به دستورکار شرکت سازنده، از فیبروبلاست‌های موجود در محیط کشت استخراج شد و cDNA (Complementary DNA) با استفاده از ۱ µg از RNA تام استخراج شده و توسط RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit Inc., (Thermo Fisher Scientific Massachusetts, USA)، سنتز گردید. برای اندازه‌گیری غلظت cDNA از NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA) استفاده شد. میزان بیان نسبی mRNA با استفاده از SYBRGreen gene expression master mix (Takara Shuzo, Co., Ltd, Shiga, Japan) اندازه‌گیری شد. مقادیر بیان ژن‌های مورد بررسی به صورت تفاوت در مقادیر سیکل آستانه (CT) نسبت به ژن بتا –دو–میکروگلوبولین (β_2 microglobulin, B2M) در هر نمونه، نرمال شد و بیان نسبی RNA (Relative RNA expression) برای هر نمونه بر اساس فرمول ۱۰۰۰× ($۲^{-\Delta CT}$) محاسبه شد.[۱۷] توالی و مشخصات پرایمرها در جدول ۱ نشان داده شده است. آنالیز آماری با استفاده SPSS software, v22 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) انجام شد و توزیع نرمال متغیرها با استفاده از آزمون کولموگروف–اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov test) مورد بررسی قرار گرفت.

برای ارزیابی آماری از Student's t-test دو طرفه (Two-tailed Student's t-test) استفاده شد. مقدار P<۰/۰۵ معنادار در نظر گرفته شد. تمام داده‌ها به صورت میانگین±SEM نشان داده شدند.

یافته‌ها

بررسی مورفولوژی فیبروبلاست‌ها با استفاده از Inverted Microscope و همچنین رنگ‌آمیزی فیبروبلاست با آنتی‌بادی اختصاصی برای پروتیین غشای سیتوپلاسمی و استفاده رنگ 4,6- diamidino-2-phenylindole (DAPI) برای هسته سلول، تکثیر فیبروبلاست‌ها و عدم وجود هرگونه آلودگی با سایر سلول‌ها را تایید کرد (شکل ۱).



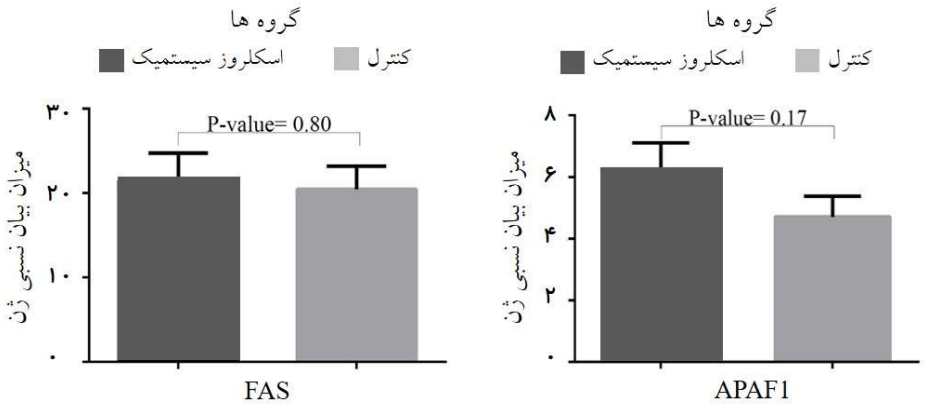
شکل ۱: رنگ‌آمیزی سلول‌های فیبروبلاست جدا شده و کشت داده شده، با آنتی‌بادی اختصاصی برای پروتیین غشایی سلول‌های فیبروبلاست.

a نمایش همزمان میکروسکوپ معکوس سلول‌های فیبروبلاست و هسته رنگ‌آمیزی شده‌ی آن‌ها با رنگ DAPI. b رنگ‌آمیزی اختصاصی سلول‌های فیبروبلاست با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی آن‌ها. c نمایش همزمان میکروسکوپ معکوس سلول‌های فیبروبلاست و هسته رنگ‌آمیزی شده‌ی آن‌ها با رنگ DAPI. d رنگ‌آمیزی اختصاصی سلول‌های فیبروبلاست با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی آن‌ها. بزرگ‌نمایی عکس a و b، 10X (مقیاس: ۱۰۰ µm) و بزرگ‌نمایی عکس c و d، 20X (مقیاس: ۵۰ µm).

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-09]

جدول ۱: توالی پرایمرهای ژن‌های Fas و Apaf-1.

Primers	Accession No	Gene name
TATCACCACTATTGCTGGAGTCA	NM_000043.4	**Fas-F**
GCTGTGTCTTGGACATTGTCA	NM_000043.4	**Fas-R**
ACAATGCTCTACTACATGAAGGATATAAAGA	NM_001160.2	**Apaf-1-F**
CACTGGAAGAAGAGACAACAGGAA	NM_001160.2	**Apaf-1-R**



نمودار ۱: مقایسه‌ی میزان بیان ژن‌های Fas، Apaf-1 در فیبروبلاست‌های پوست افراد بیمار (تعداد=۱۹) نسبت به فیبروبلاست‌های پوست افراد سالم (تعداد=۱۶). (a, b): با استفاده از روش Real-time PCR بر پایه سایبرگرین (SYBR green based real-time PCR) میزان بیان ژن‌های Fas و Apaf-1 در فیبروبلاست‌های اسکلروز سیستمیک در مقایسه با گروه شاهد تفاوت معناداری را نشان نداد. تمام داده‌ها به صورت ±SEM میانگین نشان داده شدند.

اندازه‌گیری سطح بیان ژن‌های Fas و Apaf-1 در فیبروبلاست‌های پوست بیماران مبتلا به اسکلروز سیستمیک و افراد سالم تفاوت معناداری را نشان نداد (به ترتیب P=۰/۸ و P=۰/۱۷) (نمودار ۱).

بحث

گزارش‌های محدودی در مورد رویداد پدیده آپوپتوز در فیبروبلاست‌های اسکلروز سیستمیک وجود دارد.[۲۱] در سال ۲۰۰۰، Jelaska و همکارانش نشان دادند که فیبروبلاست‌های اسکلروز سیستمیک (در مقایسه با فیبروبلاست‌های طبیعی) به آپوپتوز راه‌اندازی شده از مسیر Fas مقاومت بیشتری از خود نشان می‌دهند و این سلول‌ها در مجاورت طولانی مدت با TGFβ1، در برابر آپوپتوز تحریک شده توسط آنتی‌بادی ضد رسپتور Fas، مقاومت می‌کنند.[۲۲] Santiago و همکارانش برای تعیین اینکه آیا آپوپتوز از تنظیم خارج‌شده فیبروبلاست‌های اسکلروز سیستمیک تاثیری در فیبروز پیشرفته این بیماری دارد یا خیر، الگوی تکثیر و آپوپتوز فیبروبلاست‌ها را در ضایعات پوستی اسکلروز سیستمیک و همچنین حساسیت این فیبروبلاست‌ها را نسبت به آپوپتوز مورد مطالعه قرار دادند. آن‌ها در این مطالعه به این نتیجه رسیدند که در فیبروبلاست‌های جدا شده از زخم‌های پوستی در مقایسه با فیبروبلاست‌های به‌دست آمده از نواحی پوستی افراد سالم، آپوپتوز و مرگ سلولی به نسبت کمتری مشاهده می‌شود و این فیبروبلاست‌ها به‌ویژه در برابر آپوپتوز راه‌اندازی شده از مسیر Fas مقاوم هستند.[۲۱] فاکتور یک فعال‌کننده پروتئازهای مسیر آپوپتوز (Apoptotic protease

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-09]

(activating factor 1، با عنوان Apaf-1 شناخته می‌شود و معادل انسانی ژن CED-4 الگانس است. این ژن یک پروتیین سیتوپلاسمی را کد می‌کند که یکی از مراکز اصلی تنظیم مسیر آپوپتوز می‌باشد. این پروتیین یک دومن N-terminal دارد که موجب فراخوانی کاسپازهای اجرایی (Caspase recruitment domain) می‌شود.[۲۳]

در مطالعه‌ای که توسط Santamaria و همکارانش بر روی نوعی از بیماری التهابی حفره‌ی صفاقی (Peritonitis که با آسیب و آپوپتوز سلول‌های مزوتلیال همراه بود) انجام شد، مشاهده گردید که سلول‌های مزوتلیال صفاقی در مجاورت دو سایتوکین التهابی TNF-α و IFN-γ، به میزان دو تا سه برابر نمونه‌ی کنترل، دچار آپوپتوز می‌شوند. آن‌ها توانستند توسط یک پلیمر نانوکونژوگه که بر پایه ترکیبات پلی‌گلوتامیک اسید ساخته شده بود، با مهار فاکتور پروآپوپتیک Apaf-1 از آپوپتوز سلول‌های مزوتلیال جلوگیری کنند.[۲۴] بررسی‌ها نشان می‌دهد که FasL به‌طور مستقیم موجب افزایش آپوپتوز در سلول‌های مزوتلیال می‌شود.[۲۵]

مهار شیمیایی Apaf-1 توسط یک مولکول نانوکونژوگه،[۲۶] که مانع از آپوپتوز (در شرایط داخل بدن و در محیط آزمایشگاهی) شد، نشان داد که فاکتور Apaf-1 برای آپوپتوز سلول‌های مزوتلیال ضروری است.

همچنین درگیر شدن و دخالت میتوکندری در آپوپتوز راه‌اندازی شده توسط فاکتور نکروز کننده تومور (یا همان مسیر Fas) ضروری می‌باشد. در نتیجه با توجه به مشارکت میتوکندری در پاسخ آپوپتوزی سلول‌های مزوتلیال از طریق تحریک گیرنده مرگ سلولی، این سلول باید از رده دوم مسیر خارجی آپوپتوز باشد.[۲۷و۲۸] گزارشات اخیر مهار تشکیل آپوپتوزوم را به عنوان یک هدف قابل توجه برای مهار مسیر آپوپتوز مطرح نموده‌اند.[۲۹و۳۰]

به‌طوری‌که Haga و همکارانش در بررسی تاثیر Autocrine motility factor (AMF) که به طور عمده از سلول‌های توموری آزاد می‌شود، بر بیان Apaf-1 و کاسپاز ۹ مشاهده کردند که این سایتوکین توسط یک مسیر پیچیده سیگنال‌دهی موجب کاهش بیان Apaf-1 و کاسپاز ۹ شده و به صورت غیرمستقیم از تشکیل آپوپتوزوم در بیماران مبتلا به بیماری‌های خودایمنی (آرتریت روماتویید) و تومورها (مانند متاستاتیک ملانوما) جلوگیری می‌کند. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود سیگنالینگ MAF و MAF-R از طریق کاهش بیان Apaf-1 و کاسپاز ۹ در ایجاد سلول‌های مقاوم به آپوپتوز نقش دارد.[۳۱]

در پژوهش حاضر تغییرات معنادار در میزان بیان رونوشت ژن‌های Fas و Apaf-1 وجود نداشت. با توجه به شباهت بسیار زیاد پاتوژنز مولکولی بیماری اسکلروز سیستمیک با فرایند ناقص ترمیم زخم در اسکارهای هایپرتروفیک، در این مرحله درست مانند فرایند ترمیم زخم طبیعی انتظار آغاز فرایند آپوپتوز در فیبروبلاست‌های ترشح‌کننده ماتریکس خارج سلولی می‌رود. در پژوهش حاضر فعال‌سازی این ژن‌ها را در سطح رونویسی مشاهده نشد، به ویژه برای Apaf-1 که هدف نسخه‌برداری مهمی برای ژن‌های P53 و E2F می‌باشد و قسمت مهمی از فعالیت ضد آپوپتوزی و افزایش رشدش را از طریق فعال‌شدن در سطح رونوشت دارد.[۳۲] پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده سایر ژن‌های این مسیر مورد بررسی قرار گرفته و نتایج حاضر نیز از طریق مطالعات سطح پروتیین و فعالیت آن‌ها مورد بررسی بیشتر قرار گیرند.

سپاسگزاری: هزینه این طرح توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران (با کد: ۲٤٦٥۱-٤۱-۰۳-۹۲) و معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان (با کد: ۱۹۲۱۱۸) تامین شده است.

References

1. Denton CP, Black CM. Scleroderma: Clinical and pathological advances. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2004;18(3):271-90.
2. Jun JB, Kuechle M, Harlan JM, Elkon KB. Fibroblast and endothelial apoptosis in systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15(6):756-60.
3. Ranque B, Mouthon L. Geoepidemiology of systemic sclerosis. *Autoimmun Rev* 2010;9(5):A311-8.
4. Mora GF. Systemic sclerosis: environmental factors. *J Rheumatol* 2009;36(11):2383-96.
5. Zimmermann AF, Pizzichini MMM. Atualização na etiopatogênese da esclerose sistêmica. *Rev Bras Reumatol* 2013;53(6):516–24.
6. Davatchi F, Jamshidi AR, Banihashemi AT. WHO-ILAR COPCORD pilot study in Tehran, Iran. *J Rheumatol* 2006;33(8):1714.
7. Varga J, Abraham D. Systemic sclerosis: a prototypic multisystem fibrotic disorder. *J Clin Invest* 2007;117(3):557-67.
8. Wei J, Bhattacharyya S, Tourtellotte WG, Varga J. Fibrosis in systemic sclerosis: emerging concepts and implications for targeted therapy. *Autoimmun Rev* 2011;10(5):267-75.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-09]

9. Fleischer A, Ghadiri A, Dessauge F, Duhamel M, Rebollo MP, Alvarez-Franco F, et al. Modulating apoptosis as a target for effective therapy. *Mol Immunol* 2006;43(8):1065-79.
10. Chabaud S, Moulin VJ. Apoptosis modulation as a promising target for treatment of systemic sclerosis. *Int J Rheumatol* 2011;2011.
11. Barisić K, Petrik J, Rumora L. Biochemistry of apoptotic cell death. *Acta Pharm* 2003;53(3):151-64.
12. Thannickal VJ, Horowitz JC. Evolving concepts of apoptosis in idiopathic pulmonary fibrosis. Proceedings of the American Thoracic Society. 2006;3(4):350-6.
13. Reed JC. Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 2000;157(5):1415-30.
14. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281(5381):1309-12.
15. Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med* 2005;258(6):479-517.
16. Lawen A. Apoptosis-an introduction. *Bioessays* 2003;25(9):888-96.
17. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008;3(6):1101-8.
18. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* 2006;13(9):1423-33.
19. Kroemer G. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;304(3):433-5.
20. Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 2002;296(5573):1635-6.
21. Santiago B, Galindo M, Rivero M, Pablos JL. Decreased susceptibility to Fas-induced apoptosis of systemic sclerosis dermal fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2001;44(7):1667-76.
22. Jelaska A, Korn JH. Role of apoptosis and transforming growth factor beta1 in fibroblast selection and activation in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000;43(10):2230-9.
23. Shi Y. A structural view of mitochondria-mediated apoptosis. *Nat Struct Biol* 2001;8(5):394-401.
24. Santamaría B, Benito-Martin A, Ucero AC, Aroeira LS, Reyero A, Vicent MJ, et al. A nanoconjugate Apaf-1 inhibitor protects mesothelial cells from cytokine-induced injury. *PLoS One* 2009;4(8):e6634.
25. Catalan MP, Subirá D, Reyero A, Selgas R, Ortiz-Gonzalez A, Egido J, et al. Regulation of apoptosis by lethal cytokines in human mesothelial cells. *Kidney Int* 2003;64(1):321-30.
26. Vicent MJ, Pérez-Payá E. Poly-L-glutamic acid (PGA) aided inhibitors of apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1): an antiapoptotic polymeric nanomedicine. *J Med Chem* 2006;49(13):3763-5.
27. Chen X, Ding WX, Ni HM, Gao W, Shi YH, Gambotto AA, et al. Bid-independent mitochondrial activation in tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis and liver injury. *Mol Cell Biol* 2007;27(2):541-53.
28. Pei Y, Xing D, Gao X, Liu L, Chen T. Real-time monitoring full length bid interacting with Bax during TNF-alpha-induced apoptosis. *Apoptosis* 2007;12(9):1681-90.
29. Li J, Brieher WM, Scimone ML, Kang SJ, Zhu H, Yin H, et al. Caspase-11 regulates cell migration by promoting Aip1-Cofilin-mediated actin depolymerization. *Nat Cell Biol* 2007;9(3):276-86.
30. Ben Moshe T, Barash H, Kang TB, Kim JC, Kovalenko A, Gross E, et al. Role of caspase-8 in hepatocyte response to infection and injury in mice. *Hepatology* 2007;45(4):1014-24.
31. Haga A, Funasaka T, Niinaka Y, Raz A, Nagase H. Autocrine motility factor signaling induces tumor apoptotic resistance by regulations Apaf-1 and Caspase-9 apoptosome expression. *Int J Cancer* 2003;107(5):707-14.
32. Moroni MC, Hickman ES, Lazzerini Denchi E, Caprara G, Colli E, Cecconi F, et al. Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat Cell Biol* 2001;3(6):552-8.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-09]

TUMJ Tehran University Medical Journal, July 2016; Vol. 74, No. 4: 282-288 Original Article

Comparison of the expression levels of Fas and Apaf-1 genes in systemic sclerosis dermal fibroblasts

Majid Abed Khojasteh M.Sc.[1]
Fereshteh Alsahebfosoul Ph.D.[1]
Mahdi Mahmoudi Ph.D.[2]
Mohammad Bagher Mahmoudi M.Sc.[3]
Shayan Mostafaei Ph.D. Student[4]
Mazdak Ganjalikhani-hakemi Ph.D.[1]
Farhad Gharibdoost M.D.[2*]

1-Department of Immunology, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.
2- Rheumatology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
3- Department of Genetics, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.
4- Department of Biostatistics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

[*] Corresponding author: Rheumatology Research Center, Shariati Hospital, Kargar Ave., Tehran, Iran.
P.O. BOX: 1411713137
Tel: +98- 21- 88220067
E-mail: rrclab@tums.ac.ir

Abstract

Received: 20 Feb. 2016 Revised: 05 Sep 2016 Accepted: 09 Sep 2016 Available online: 10 Sep 2016

***Background*:** Systemic sclerosis (SSc) is an autoimmune rheumatic connective tissue disease. In normal wound healing process, fibroblasts are activated, proliferated and involved in tissue repair, and then removed by apoptosis. In systemic sclerosis, patient's fibrosis occurs when fibroblasts become resistant to apoptosis and secrete a large amount of collagen and other extracellular matrixes. As the primary causes the disease are very complex and often unknown, it is necessary to consider or target the secondary causes of disease, such as the unresponsiveness of activated fibroblasts to apoptosis as the major factor in the creation and deployment of illness. In this study, we examined the expression levels of two key pro-apoptotic genes, Fas and Apaf-1, which are respectively involved in external and internal pathway of apoptosis.

***Methods*:** In a case-control study skin biopsy samples were obtained from 19 patients with diffuse SSc, and 16 healthy controls. Dermal fibroblasts were cultured and total RNA was isolated from cell populations using High Pure RNA Isolation Kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), followed by cDNA synthesis using RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA). Real-time PCR was performed using SYBRGreen gene expression master mix (Takara Shuzo, Co., Ltd, Shiga, Japan) and specific primers for Fas and Apaf-1. Real-time data were analyzed using the $(2^{-\Delta CT})\times 1000$ method. Statistical analysis was accomplished by using the SPSS software, v22 (IBM, Armonk, NY, USA). The P value less than 0.05 were recognized as a significant threshold. All data are represented as the mean ± SEM.

***Results*:** Our results showed no significant difference in Fas (P=0.8) and Apaf-1 (P=0.17) mRNA expression levels between skin fibroblasts of systemic sclerosis patients and healthy controls.

Conclusion: In this study we observed no significant change in Apaf-1 and Fas mRNA levels in systemic sclerosis fibroblasts compared to control group. Hence, Apaf-1 and Fas are not transcriptionally activated in SSc fibroblasts. Further studies need to take place on protein levels and function of these proteins to confirm the mRNA transcription results.

Keywords: Apaf-1, case-control studies, Fas, fibroblast, systemic sclerosis.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-09]