

اثر درمان فتودینامیکی با واسطه راداکلرین بر سلول‌های سرطانی پستان (MDA-MB-231)

خلاصه

مهناز هادی‌زاده

۱. دانشیار پژوهشکده زیست‌فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

نویسنده مسئول: مهناز هادی‌زاده
hadizadeh@irost.ir

اهداف: درمان فتودینامیکی یک رویکرد موثر برای درمان سرطان است که نور را با عوامل حساس‌کننده به نور برای تولید رادیکال‌های آزاد و آسیب به بافت سرطانی ترکیب می‌کند. این تحقیق به بررسی اثرات راداکلرین به‌عنوان یک حساس‌کننده نور در درمان فتودینامیکی بر روی رده سلولی سرطان سینه انسان MDA-MB-231، به‌طور خاص با القای آپوپتوز در این سلول‌ها می‌پردازد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، سلول‌های سرطان سینه انسان (سلول‌های MDA-MB-231) به مدت ۴ ساعت تحت تیمار راداکلرین و سپس در معرض لیزر نور قرمز (۶۶۲ نانومتر) با دو چگالی انرژی (۱۰ و ۲۰ J/cm^2) قرار گرفتند. زنده ماندن سلول‌ها با استفاده از روش MTT اندازه‌گیری شد. مکانیسم مرگ سلولی توسط فلوسایتومتری تعیین شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که راداکلرین به‌تنهایی اثرات سیتوتوکسیک کمی دارد. با این حال، به دنبال تابش نور قرمز، یک اثر سیتوتوکسیک قوی روی سلول‌های MDA-MB-231 دارد. نور (۲۰ J/cm^2) و راداکلرین (۱۰۰ $\mu g/mL$) درصد بقای سلولی را به ۳۱ درصد کاهش دادند. مقادیر IC_{50} به‌دست‌آمده برای سلول‌های MDA-MB-231، ۲۴ ساعت پس از قرار گرفتن در معرض ۱۰ و ۲۰ J/cm^2 به ترتیب ۷۳ و ۵۴ $\mu g/mL$ بود. بنابراین، اثر Radachlorin/PDT بر سلول‌های MDA-MB-231 هم به غلظت حساس‌کننده نور و هم دوز نور استفاده‌شده بستگی دارد. همچنین القای آپوپتوز در سلول‌های MDA-MB-231 به‌دنبال درمان فتودینامیکی با واسطه راداکلرین بررسی شد.

نتیجه‌گیری: این داده‌ها نشان می‌دهند که درمان فتودینامیکی با واسطه راداکلرین می‌تواند یک گزینه درمانی مؤثر برای مدیریت سرطان پستان باشد. با این حال، مطالعات برون‌تنی و درون‌تنی بیشتری در مورد ایمنی و اثربخشی این روش درمانی مورد نیاز است.

واژه‌های کلیدی: درمان فتودینامیکی؛ راداکلرین؛ رده‌ی سلولی MDA-MB-231؛ آپوپتوز

مقدمه

سرطان کولون، سرطان تخمدان و سینه، ملانوما و سرطان استخوان در شرایط برون تنی انجام شده است. همچنین اخیراً گزارشی در مورد موفقیت PDT با واسطه e^6 Chlorin در درمان یک فرد مبتلا به کارسینوم سلول بازال (BCC) وجود دارد. ولی در ارتباط با اثرات راداکلرین در PDT سرطان پستان گزارشات کمی وجود دارد. بنابراین در این مطالعه، اثرات ضدسرطانی PDT با واسطه راداکلرین بر روی سلول‌های سرطانی MDA-MB-231 به‌عنوان یک مدل از سرطان پستان از نوع سه‌گانه- منفی بررسی شد.

روش بررسی

کشت سلولی

سلول‌های سرطانی پستان رده MDA-MB-231 تهیه شده از انستیتو پاستور ایران در فلاسک با محیط کشت کامل DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کشت داده شدند و پس از پاساژدهی، در یک پلیت ۹۶ چاهکی با در نظر گرفتن ۸۰۰۰ سلول در هر چاهک به مدت ۲۴ ساعت در شرایط دمای ۳۷ درجه سلسیوس، ۵ درصد گاز CO_2 و ۹۰ درصد رطوبت، گرماخانه‌گذاری شدند.

بررسی سمیت تاریکی و نوری راداکلرین

سلول‌ها در دو پلیت با شرایط تاریکی و تابش نور لیزر آماده شدند. در گروه تاریکی دو گروه شامل گروه کنترل (بدون دارو و بدون تابش نور) و گروه دارو به‌تنهایی و در گروه تابش، ۴ گروه شامل گروه کنترل (بدون تیمار)، گروه دارو به‌تنهایی، گروه تابش نور به‌تنهایی و گروه درمان فتودینامیکی (دارو + تابش نور) در نظر گرفته شدند. ۲۴ ساعت بعد از کشت سلول‌ها در پلیت‌ها، سلول‌ها توسط داروی راداکلرین با غلظت‌های مختلف ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت ۴ ساعت تیمار شدند و سپس گروه تابش، تحت تابش لیزر دایود (ALOD-01، روسیه) با طول موج 662 ± 2 نانومتر و توان ۳۰ میلی‌وات قرار گرفتند. آزمایشات درمان فتودینامیکی برای دو زمان پرتودهی ۹۳ ثانیه و ۱۸۷ ثانیه که به ترتیب باعث ایجاد شاریدگی $10 J/cm^2$ و $20 J/cm^2$ می‌شوند، اجرا شد.

بررسی درصد زنده‌مانی سلول‌ها با روش MTT^۷

درصد زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از روش MTT (۳- (۴، ۵) - دی‌متیل‌تيازول - ۲ - ایل) - ۲، ۵ - دی‌فنیل‌تترازولیم بروماید) ارزیابی شد. این روش براساس فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده استوار است که محلول زرد رنگ MTT را به کریستال‌های

سرطان پستان عامل اصلی مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در سراسر جهان و شایع‌ترین نوع سرطان در بین زنان است. علیرغم پیشرفت در طبقه بندی و درمان مولکولی، بروز سرطان پستان و مرگ‌ومیر ناشی از آن همچنان بالاست. به‌خصوص سرطان پستان متاستاتیک از نوع سه‌گانه- منفی (TNBC)^۱ که فاقد گیرنده‌های استروژن، پروژسترون و گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی است و ۱۵ تا ۲۰ درصد انواع سرطان پستان را به خود اختصاص داده است با تهاجم بیشتر و پیش‌آگهی ضعیف‌تر در مقایسه با سایر زیرگروه‌های مولکولی سرطان پستان همراه است. این نوع سرطان اغلب در زنان جوان‌تر رخ داده و در برابر روش‌های درمانی فعلی مقاومت نشان می‌دهد. بنابراین استراتژی‌های درمانی جدید برای درمان آن مورد نیاز است. فتودینامیک‌درمانی (PDT)^۲ یک روش درمانی کم‌تهاجم با واسطه اکسیژن، نور و یک ماده حساس‌به‌نور^۳ است. پس از تجویز حساس‌کننده نوری و تجمع ترجیحی آن در تومور یا بافت آسیب‌دیده، متعاقباً بافت موردنظر تحت تابش نور با یک طول‌موج خاص برای فعال کردن ماده حساس‌به‌نور قرار می‌گیرد و در نتیجه‌ی واکنش‌های فتوشیمیایی و تولید گونه‌های فعال اکسیژن، تخریب بسیار انتخابی فتودینامیک سلول‌های تومور رخ می‌دهد. مزیت آشکار PDT نسبت به سایر درمان‌های مرسوم سرطان مانند شیمی‌درمانی و رادیوتراپی، حداقل تهاجم، هدف‌گیری انتخابی و کاهش سمیت آن است که امکان تکرار درمان را فراهم می‌کند. بهینه‌کردن شرایط انجام PDT از جمله به‌کارگیری ماده حساس‌به‌نور مناسب در غلظت کافی و همچنین دوز نوری مناسب باعث افزایش بازده این روش درمانی خواهد شد.

راداکلرین یک ماده حساس‌به‌نور طبیعی نسل دوم است که هم برای تشخیص فلورسنتی و هم PDT تومورهای بدخیم استفاده می‌شود. راداکلرین شامل نمک‌های سدیم کلرین e^6 (تا ۹۰٪)، کلرین p^6 و پورپورین ۵^۶ به‌عنوان عوامل فعال است. وجود ماکزیمم پیک جذبی شاخص در ناحیه قرمز طیف جذب (۶۶۲ نانومتر) و بازده کوانتومی بالای تولید اکسیژن منفرد هنگامی که نور در این ناحیه جذب می‌شود، سمیت نوری بالایی از راداکلرین را در داخل بدن و در شرایط آزمایشگاهی ممکن می‌سازد. انتخابی بودن تجمع راداکلرین در تومور و پاکسازی سریع آن از بدن، منجر به حساسیت کم پوستی بیماران به نور و کاهش عوارض جانبی سیستمیک پس از PDT می‌شود.

گرچه مطالعات متعددی در مورد PDT با استفاده از e^6 Chlorin به‌عنوان جزء اصلی راداکلرین جهت درمان سرطان‌های مختلف از جمله

1. Triple Negative Breast Cancer
2. Photodynamic therapy
3. Photosensitizer (PS)
4. chlorin e^6
5. chlorin p^6
6. purpurin⁵

و PI مثبت نشان داده شد.

آنالیز آماری

تمام آزمایشات انجام‌شده در این مطالعه حداقل سه بار تکرار شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده نرم‌افزار GraphPad Prism ۸.۰.۱ و آزمون Student-t-test انجام شد. داده‌ها با $P < ۰.۰۵$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها

اثر سمیت تاریکی راداکلرین بر درصد زنده‌مانی سلول‌ها

نتایج آزمایش‌های مربوط به بررسی اثر غلظت‌های مختلف راداکلرین به‌تنهایی و در غیاب نور بر روی رده سلول سرطانی MDA-MB-231 در شکل ۱ نشان داده شده است. راداکلرین در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث ۱.۴۵ ± ۴.۶۶ درصد کاهش در زنده‌مانی سلول‌ها شد که این کاهش در مقایسه با نمونه کنترل معنی‌دار نبود ($p = ۰.۱۲۷۰$). اما راداکلرین در غلظت‌های بالاتر سمیت ناچیزی از خود نشان داد به‌طوری که در غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌ترتیب منجر به ۴٪، ۸٪، ۱۶٪ و ۲۴٪ مرگ سلولی شد ($P < ۰.۰۵$).

درمان فتودینامیکی با واسطه راداکلرین

درمان فتودینامیکی با واسطه غلظت‌های مختلف راداکلرین و تحت تابش نور قرمز لیزر با طول‌موج ۶۶۲ نانومتر و با چگالی انرژی J/cm^2 ۱۰ و J/cm^2 ۲۰ بر روی سلول‌های سرطانی MDA-MB-231 اعمال شد. نتایج نشان داد که بازده درمان فتودینامیکی هم به غلظت راداکلرین و هم به دوز نوری اعمال‌شده وابسته است. بدین ترتیب که با افزایش غلظت راداکلرین، میزان مرگ سلولی نیز به‌تدریج افزایش یافت. همچنین در هر غلظت ثابت از راداکلرین، با افزایش دوز نوری از J/cm^2 ۱۰ به J/cm^2 ۲۰، کاهش معنی‌داری ($p < ۰.۰۵$) در میزان زنده‌مانی سلول‌ها قابل مشاهده بود.

کمترین میزان اثربخشی درمان فتودینامیکی در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر راداکلرین تحت تابش چگالی انرژی J/cm^2 ۱۰ و بیشترین میزان اثربخشی درمان فتودینامیکی در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر راداکلرین تحت تابش چگالی انرژی J/cm^2 ۲۰ مشاهده شد که به ترتیب منجر به ۲.۵۸ ± ۹.۰۰ درصد ($p = ۰.۰۲۵۲$) و ۱.۹۴ ± ۶۹.۰۴ درصد ($p = ۰.۴۰۰$) کاهش در میزان زنده‌مانی سلول‌های MDA-MB-231 شد. غیر از غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر راداکلرین که تابش نور با دوزهای مختلف J/cm^2 ۱۰ و J/cm^2 ۲۰ باعث اختلاف معنی‌داری در کاهش زنده‌مانی سلول‌ها نشد ($p = ۰.۴۴۱۲$)، در سایر غلظت‌های راداکلرین PDT با تابش J/cm^2 ۲۰ نسبت به تابش J/cm^2 ۱۰ باعث کاهش بیشتری ($p < ۰.۰۵$) در زنده‌مانی سلول‌های MDA-MB-231 شد.

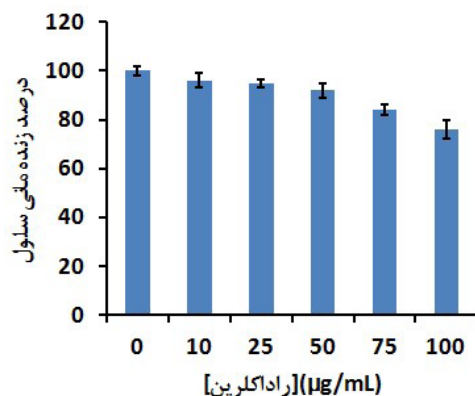
بنفش رنگ و نامحلول فورمازان تبدیل می‌کند. کریستال‌های فورمازان سپس توسط دی متیل سولفوکسید (DMSO) به‌صورت محلول درمی‌آیند که ماکزیمم جذب نوری آن در ۵۷۰ نانومتر قابل اندازه‌گیری است. سلول‌های مرده به‌دلیل عدم فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی، قادر به انجام این فرایند نیستند. برای انجام روش MTT به‌طور خلاصه، بعد از تمام‌شدن زمان انکوباسیون سلول‌ها با تیمارهای مورد نظر، محیط کشت سلولی از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ای کشت سلولی تخلیه شد و سپس ۱۸۰ میکرولیتر محیط کشت تازه به اضافه ۲۰ میکرولیتر محلول MTT آماده شده در بافر نمکی فسفات با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکسید برای حل کردن بلورهای فورمازان حاصله به هر چاهک افزوده و در نهایت جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر اندازه‌گیری شد. درصد فعالیت متابولیک سلولی با تقسیم میزان جذب نوری چاهک‌ها بر میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل (چاهک‌های حاوی سلول و بدون تیمار) تعیین شد. آزمایشات هر گروه سه‌بار تکرار شد و نتایج به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شد.

بررسی تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها

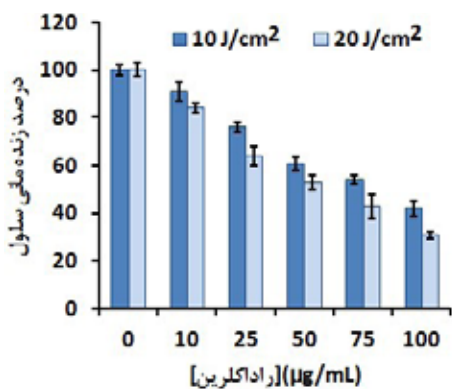
تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها، ۲۴ ساعت بعد از تیمار فتودینامیکی سلول‌ها با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر راداکلرین و تابش نور با چگالی‌های J/cm^2 ۱۰ و J/cm^2 ۲۰ در مقایسه با نمونه کنترل (بدون تیمار) با استفاده از میکروسکوپ نوری اینورت و بزرگنمایی ۱۰ X بررسی شد.

آنالیز فلوسایتومتری

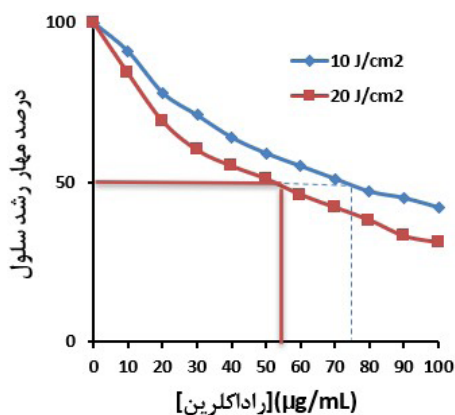
برای تعیین آپوپتوز سلول‌های MDA-MB-231 به‌دنبال تیمارهای PDT، سلول‌های MDA-MB-231 در ۲۴ ساعت پس از تمام تیمارها جمع‌آوری و سپس با PI و انکسین V-FITC رنگ‌آمیزی شدند. رنگ‌آمیزی Annexin V-FITC با کیت تشخیص آپوپتوز (کیت BD Biosciences) و طبق دستورالعمل سازنده کیت، انجام شد. بدین ترتیب که سلول‌های تریپسینه‌شده با بافر فسفات دو بار شستشو داده شدند. پس از سانتریفیوژ ($1000 \times g$ ، ۵ دقیقه)، ۵۰۰ میکرولیتر بافر اتصال (Buffer Binding) به رسوب حاصل افزوده شد. سپس ۵ میکرولیتر رنگ FITC متصل به Annexin V (۱ mg/mL) و ۵ میکرولیتر رنگ PI (۱ mg/mL) به لوله‌های مورد آزمایش اضافه و لوله‌ها در تاریکی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس سلول‌ها با استفاده از فلوسایتومتر FACScan در تحریک نور لیزر ۴۸۸ نانومتر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. جمعیت سلول‌های آپوپتوز به‌عنوان سلول‌های انکسین V مثبت و PI منفی، جمعیت سلول‌های نکروز به‌عنوان سلول‌های انکسین V منفی و PI مثبت، و جمعیت سلول‌های آپوپتوز/نکروز دیررس به‌عنوان سلول‌های انکسین V مثبت



شکل ۱. اثر غلظت‌های مختلف راداکلرین بر سلول‌های MDA-MB-231 بعد از ۴ ساعت تیمار در تاریکی



شکل ۲. اثر درمان فتودینامیکی با واسطه راداکلرین تحت تابش نور قرمز لیزری با چگالی انرژی ۱۰ J/cm² و ۲۰ J/cm² بر روی سلول‌های سرطانی MDA-MB-231



شکل ۳. تعیین IC₅₀ راداکلرین برای دو گروه تحت تیمار با دو چگالی انرژی متفاوت

به طوری که تابش 20 J/cm^2 در غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب منجر به 2.82 ± 12.04 درصد ($p = 0.0097$)، 2.45 ± 8.00 درصد ($p = 0.0309$)، 3.11 ± 11.13 درصد ($p = 0.0241$) و 1.94 ± 11.00 درصد ($p = 0.0047$) کاهش بیشتری در زنده‌مانی سلول‌های MDA-MB-231 در مقایسه با تابش 10 J/cm^2 شد.

تعیین IC₅₀

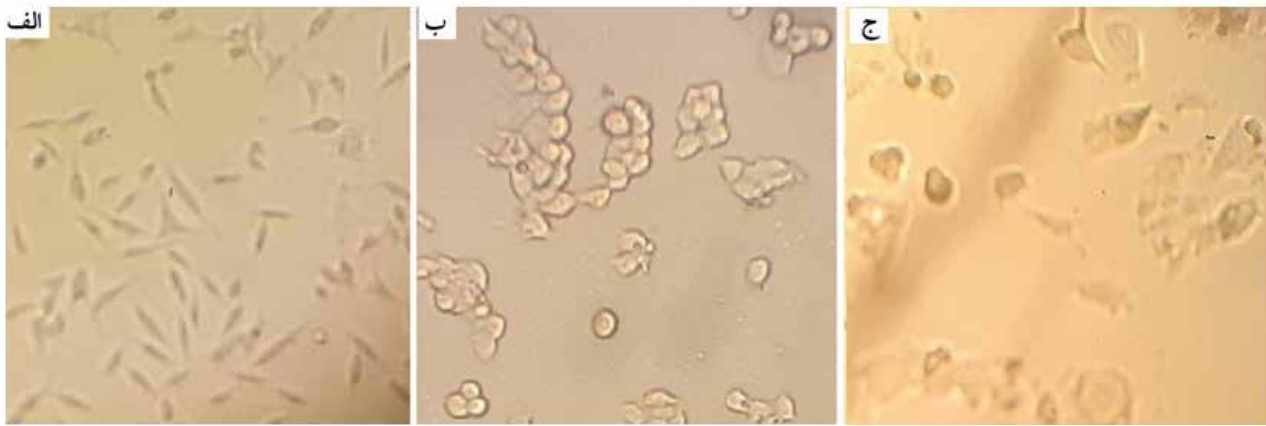
تعیین IC₅₀ (حداقل غلظتی از دارو که باعث ۵۰ درصد سمیت سلولی می‌شود) برای دو گروه تحت تیمار با دو چگالی انرژی متفاوت نیز نشان داد که با افزایش چگالی انرژی نور مورد استفاده، میزان IC₅₀ کاهش می‌یابد به طوری که مقدار IC₅₀ از ۷۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر راداکلرین برای گروه تحت تابش با 10 J/cm^2 به ۵۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر راداکلرین برای گروه تحت تیمار با تابش 20 J/cm^2 می‌رسد.

تغییر مورفولوژیکی سلول‌های سرطانی MDA-MB-231

تغییرات مورفولوژی سلول‌های سرطانی MDA-MB-231 تحت تیمارهای مختلف PDT که با میکروسکوپ نوری اینورت و با بزرگ‌نمایی $\times 100$ مورد بررسی قرار گرفتند در شکل ۴ نشان داده شده است. مقایسه تصاویر به دست آمده بیانگر این است که بیشترین تغییر مورفولوژی در سلول‌های تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از راداکلرین و تابش نور با توان 20 J/cm^2 رخ داده است به طوری که سلول‌ها از حالت دوکی شکل و چسبیده به کف فلاسک در حالت کنترل (قسمت الف شکل ۴) خارج شده و ابتدا تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از راداکلرین و تابش نور با توان 10 J/cm^2 ، به حالت گرد و جدا شده از کف پلیت به همراه اجسام آپوپتوتیک در غشای سلولی درآمده (قسمت ب شکل ۴) و در نهایت مورفولوژی آن‌ها تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از راداکلرین و تابش نور با توان 20 J/cm^2 ، مشابه سلول‌های مرده‌ای که مراحل آخر آپوپتوز را سپری می‌کنند، قابل مشاهده بود (قسمت ج شکل ۴).

تعیین مکانیسم مرگ سلولی

برای تعیین مکانیسم مرگ سلولی القاء شده در سلول‌های MDA-MB-231 تحت تیمار فتودینامیکی با راداکلرین، از آنالیز فلوسایتومتری استفاده شد. نتایج فلوسایتومتری نشان دهنده وقوع آپوپتوز یا مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در این سلول‌ها بود. همانطور که در شکل ۵ نشان داده شده است در سلول‌های MDA-MB-231 تحت تیمار با غلظت IC₅₀ (۵۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر راداکلرین) و تابش نور 10 J/cm^2 ، ۷.۱۷٪ سلول‌ها در مرحله اولیه آپوپتوز، ۲۳.۳٪ سلول‌ها در مرحله تاخیری آپوپتوز و ۱۳.۵٪ سلول‌ها در مرحله نکروز قرار داشتند. در مورد سلول‌های تحت تیمار با غلظت (۷۳) IC₅₀ میکروگرم بر میلی‌لیتر راداکلرین) و تابش نور 20 J/cm^2 ، ۱۱.۵٪ سلول‌ها در مرحله اولیه آپوپتوز، ۲۷.۶٪ سلول‌ها در



شکل ۴. تصاویر میکروسکوپی از تأثیر تیمارهای مختلف PDT با واسطه راداکلرین بر مورفولوژی سلول‌های سرطانی MDA-MB-231
الف: کنترل ب: تحت تأثیر غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از راداکلرین و تابش نور با توان 10 J/cm^2 ج: تحت تأثیر غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از راداکلرین و تابش نور با توان 20 J/cm^2

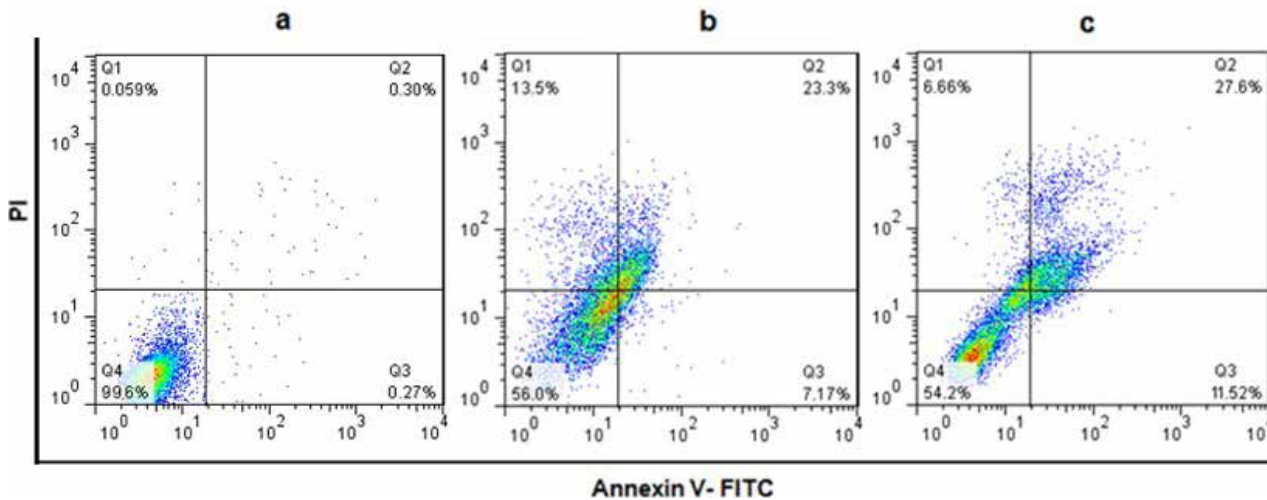
مرحله آپوپتوز تاخیری و ۶.۶٪ سلول‌ها در مرحله نکروز هستند.

رشد اپیدرمی به‌عنوان یک مدل برای TNBC در نظر گرفته شدند.

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر اثر فتودینامیک‌درمانی با استفاده از ماده حساس‌به‌نور راداکلرین را بر روی رده سلولی سرطان پستان (MDA-MB-231) نشان داده است. اثرات ضدتوموری PDT با استفاده از راداکلرین به‌عنوان حساس‌کننده نور در برخی از انواع سرطان در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی گزارش شده است (۱۳، ۱۶ و ۱۷). با این حال، اطلاعات کمی در مورد پتانسیل PDT با واسطه راداکلرین برای درمان TNBC، شکل مقاوم به درمان هورمونی سرطان پستان وجود دارد. هدف اصلی این مطالعه پرکردن این شکاف و ارزیابی اثربخشی PDT با واسطه راداکلرین بر TNBC انسانی است. بنابراین سلول‌های سرطانی پستان رده MDA-MB-231 به‌دلیل نداشتن گیرنده‌های استروژن، پروژسترون و فاکتور

سمیت تاریکی کم یک حساس‌کننده نوری، عوارض جانبی نامطلوب را بر روی بافت‌های طبیعی در طول درمان PDT به حداقل می‌رساند. برای این منظور، ما اثر راداکلرین را بدون تابش نور بر روی سلول‌های MDA-MB-231 بررسی کردیم. نتایج نشان داد که راداکلرین در غلظت‌های ۱۰ و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تأثیری بر زنده ماندن سلول‌های MDA-MB-231 ندارد. در غلظت‌های بالاتر راداکلرین (۵۰-۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، کاهش کمی (۸ تا ۲۴ درصد) در زنده ماندن سلول‌های سرطانی MDA-MB-231 مشاهده شد که نشان‌دهنده سطح پایین سمیت راداکلرین به‌تنهایی است. سمیت تاریکی کم راداکلرین توسط محققان دیگر نیز گزارش شده است. بائه و همکاران (۱۷) گزارش کردند که راداکلرین (۲.۵-۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بدون تابش لیزر هیچ اثر جانبی سمی روی سلول‌های TC-1 نداشت. همچنین میرزایی و همکاران (۱۸)



شکل ۵. (B) آنالیز فلوسایتومتری برای بررسی آپوپتوز در سلول‌های MDA-MB-231 (a) کنترل (سلول‌های تیمارنشده) (b) سلول‌های MDA-MB-231 تیمار شده با راداکلرین (۵۴ میکرولیتر در میلی‌لیتر) و دوز نوری 10 J/cm^2 (c) سلول‌های MDA-MB-231 تیمار شده با راداکلرین (۷۳ میکرولیتر در میلی‌لیتر) و دوز نوری 20 J/cm^2

آزمایشگاهی با اعمال دوزهای تابش بیشتر، زمان‌های انکوباسیون مختلف و هم در شرایط برون تنسی (کار با حیوانات آزمایشگاهی) و کارآزمایی بالینی برای اثبات آن مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران برای حمایت مادی و معنوی از تحقیق حاضر در قالب پژوهانه سال ۱۴۰۳ (صورتجلسه شماره ۳۵۹ مورخ ۳ / ۲ / ۱۴۰۳) تقدیر و تشکر می‌نمایند.

گزارش کردند که راداکلرین به‌تنهایی در غلظت‌های ۲.۵ و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر فاقد اثر سمی بر روی سلول‌های HepG² و HFLF-PI⁴ است. نتایج PDT با راداکلرین در غلظت‌های مختلف و تحت تابش با دو دوز نوری متفاوت نشان داد که بازده PDT هم به غلظت دارو و هم به دوز نوری وابسته است و با افزایش هر کدام از این دو فاکتور، بهبود می‌یابد. به‌طوری که با افزایش غلظت راداکلرین از ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به همراه تابش نور با توان 10 J/cm^2 ، میزان مرگ سلول‌های MDA-MB-231 از ۹٪ به ۵۸٪ در مقایسه با گروه کنترل رسید. از طرف دیگر با زیاد شدن دوز نوری از 10 J/cm^2 به 20 J/cm^2 نیز در هر غلظت ثابت از راداکلرین میزان مرگ سلولی به‌صورت معنی‌داری ($p < 0.05$) افزایش نشان داد. به‌طوری که در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر راداکلرین با افزایش دوز نوری از 10 J/cm^2 به 20 J/cm^2 ، میزان مرگ‌ومیر سلولی از ۵۸٪ به ۶۹٪ افزایش یافت. این روش درمانی تاکنون بر روی رده سلولی MDA-MB-231 مطالعه نشده است ولی بر روی رده‌های سلولی دیگر بررسی شده است. نتایج این مطالعات، اثر مهار راداکلرین فعال شده با نور را بر روی سلول‌های آدنوکارسینومای کولون (HT29)، رده سلولی سرطان ریه (A549) و سلول‌های سرطان دهانه رحم (TC-1) نشان داده‌اند. علاوه بر این، تجربیاتی در کاربرد بالینی راداکلرین در PDT برای کارسینوم سلول بازال پوست (۲۱) و تک سلولی عصبی وجود دارد.

تکثیر سلول‌های سرطانی پس از PDT را می‌توان با مکانیسم‌های مختلفی مانند اتوفازی، نکروز و آپوپتوز سرکوب کرد (۲۳، ۲۴). تحقیقات نشان داده است که کلرین^۶، یک جزء مهم راداکلرین، پتانسیل ایجاد آپوپتوز در سلول‌های سرطانی را دارد (۲۵). بنابراین در این مطالعه ما برای بررسی القاء آپوپتوز در اثر فرایند PDT با راداکلرین در سلول‌های MDA-MB-231 از آنالیز فلوسایتومتری استفاده کردیم. حدود ۳۹٪ سلول‌های MDA-MB-231 تحت درمان فتودینامیکی با 73 J/cm^2 میکروگرم بر میلی‌لیتر راداکلرین (IC_{50}) و دوز نور 20 J/cm^2 در مرحله آپوپتوز و حدود ۷٪ آن‌ها در مرحله نکروز ظاهر شدند. این داده‌ها با یافته‌های سنجش سمیت سلولی که در آن سطح بقای سلولی در صورت تیمار تحت همین شرایط، حدود ۵۰ درصد بود، مطابقت داشت. القای آپوپتوز در سلول‌های MDA-MB-231 پس از PDT با راداکلرین، یک مزیت برای این درمان است زیرا فرار سلول‌های سرطانی از آپوپتوز یکی از دلایل اصلی رشد و تکثیر کنترل نشده آن‌ها است.

به‌طور خلاصه، این مطالعه آزمایشگاهی نشان می‌دهد که درمان فتودینامیکی با واسطه راداکلرین در کاهش سلول‌های سرطانی پستان (سلول‌های MDA-MB-231) با القای آپوپتوز مؤثر است. در کل، نتایج این تحقیق نشان داد که PDT با واسطه راداکلرین می‌تواند یک رویکرد ارزشمند برای درمان TNBC باشد. اگرچه تحقیقات بیشتر هم در شرایط

23. Yan X, Li Z, Chen H, Yang F, Tian Q, Zhang Y. Photodynamic therapy inhibits cancer progression and induces ferroptosis and apoptosis by targeting P53/GPX4/SLC7A11 signaling pathways in cholangiocarcinoma. *Photodiagn Photodyn Ther* 2024; 47: 104104.
24. He C, Xia J, Gao Y, Chen Z, Wan X. Chlorin a-mediated photodynamic therapy induced apoptosis in human cholangiocarcinoma cells via impaired autophagy flux. *Am J Transl Res* 2020; 12: 5080–5094.
25. Radeštok A, Elsner P, Gitter B, Hipler UC. Induction of apoptosis in HaCa T cells by photodynamic therapy with chlorin e6 or pheophorbide a. *Skin Pharmacol Physiol* 2007; 20: 3–9.
26. Papa V, Furci F, Minciullo PL, Casciaro M, Allegra A, Gangemi S. Photodynamic therapy in cancer: insights into cellular and molecular pathways. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2025; 47(2): 69. <https://doi.org/10.3390/cimb47020069>

References:

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin* 2020; 70: 7–30.
2. Zhang F, Ren C, Zhao H, Yang L, Su F, Zhou MM, et al. Identification of novel prognostic indicators for triple-negative breast cancer patients through integrative analysis of cancer genomics data and protein interactome data. *Oncotarget* 2016; 7 (44): 71620–71634.
3. Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, Saczko J, Kędzierska E, Knap-Czop K, et al. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed Pharmacother* 2018; 106: 1098–1107.
4. Oštanska E, Aebischer D, Bartusik-Aebischer D. The potential of photodynamic therapy in current breast cancer treatment methodologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2021; 137: 111302.
5. Juzeniene A. Chlorin e6-based photosensitizers for photodynamic therapy and photodiagnosis. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2009; 6(2): 94-96.
6. Krechetov SP, Miroshkina AM, Yakovtseva MN, Mochalova EN, Babenyshev AV, Maslov IV, et al. Radachlorin-containing microparticles for photodynamic therapy. *Adv Pharm Bull* 2021; 11(3): 458-468.
7. Belashov AV, Zhikhoreva AA, Gorbunova IA, Sasin ME, Shayakhmedov SS, Semenova. IV. Photophysical properties of Radachlorin photosensitizer in solutions of different pH, viscosity and polarity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2024; 305: 123480.
8. Chung CW, Choi, CW, Jeong YI, Kang DH. Nano-self assembled photosensitizer composed of methoxy poly(ethylene glycol)-conjugated chlorin e6 for enhanced photosensing of HCT116 Cells. *J. Nanosci Nanotechnol* 2016; 16 (2): 1379–1383.
9. Adimoolam MG, Vigayalakshmi A, Nalam, MR, Sunkara MV. Chlorin e6 loaded lactoferrin nanoparticles for enhanced photodynamic therapy. *Journal of Materials Chemistry B* 2017; 5 (46): 9189–9196.
10. Lee CH, Lai PS, Lu YP, Chen HY, Chai CY, Tsai RK, et al. Real-Time vascular imaging and photodynamic therapy efficacy with micelle-nanocarrier delivery of chlorin e6 to the microenvironment of melanoma. *J. Dermatol Sci.* 2015; 80 (2):124–132.
11. Baradaran Mohsenian N, Shanei A, Alavi SJ, Kheirollahi M, Hashem Nia A, Tavakoli MB. Mn-doped ZnS quantum dots-chlorin e6 shows potential as a treatment for chondrosarcoma: an in vitro study. *IET Nanobiotechnol* 2019;13(4):387-391. doi: 10.1049/iet-nbt.2018.5387.
12. Mansuri P, Tabaie SM, Naderi MS, Kebriti K, Djavaid JE, Shirkavand A. Systemic photodynamic therapy with chlorin e6 as a photosensitizer for the treatment of nodular BCC: A case report. *J Lasers Med Sci* 2022; 13: e44. doi: 10.34172/jlms.2022.44
13. Ghoadarzi R, Changizi V, Montazerabadi AR, Eyvazzadaeh N. Assessing of integration of ionizing radiation with Radachlorin-PDT on MCF-7 breast cancer cell treatment. *Lasers Med Sci.* 2016; 31(2):213-219.
14. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55–63.
15. Yang S, Li X, Dou H, Hu Y, Che C, Xu D. Sesamin induces A549 cell mitophagy and mitochondrial apoptosis via a reactive oxygen species-mediated reduction in mitochondrial membrane potential. *Korean J Physiol Pharmacol* 2020; 24: 223–232.
16. Jain R, Pradhan R, Hejmady S, Singhvi G, Dubey SK. Fluorescence-based method for sensitive and rapid estimation of chlorin e6 in stealth liposomes for photodynamic therapy against cancer. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 2021; 244: 118823.
17. Bae SM, Kim YW, Lee JM, Han SJ, Kim JK, Lee CH, et al. Photodynamic effects of Radachlorin on cervical cancer cells. *Cancer Res Treat* 2004; 36: 389–394.
18. Mirzaei H, Esmaceli Djavaid G, Hadizadeh M, Jahanshiri-Moghadam M, Hajian p. The efficacy of Radachlorin-mediated photodynamic therapy in human hepatocellular carcinoma cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2015; 142: 86–91.
19. Douillard S, Lhommeau I, Olivier D, Patrice T. In vitro evaluation of Radachlorin® sensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B Biol* 2010; 98(2):128–137.
20. Kim YW, Bae SM, Liu HB, Kim IW, Chun HJ, Ahn WS. Selenium enhances the efficacy of Radachlorin mediated photodynamic therapy in TC-1 tumor development. *Oncol Rep* 2012; 28(2): 576–584.
21. Kochneva EV, Filonenko EV, Vakulovskaya EG, Scherbakova EG, Seliverstov OV, Markichev NA, et al. Photosensitizer Radachlorin: skin cancer PDT phase II clinical trials. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2010; 7(4): 258–267.
22. Uzdensky A, Dergacheva O, Zhavoronkova A, Reshetnikov A, Ponomarev G. Photodynamic effect of novel chlorin e6 derivatives on a single nerve cell. *Life Sci* 2004; 74(17): 2185–2197.