لیزر در پزشکی؛ ۱۳۹۴، دورهٔ ۱۲، شمارهٔ ۳، صفحات: ۲۵-۱۸.

مقاله پژوهشی

مقایسهٔ اثر لیزر موستانگ و لازوترونیک در بازده درمان فتودینامیکی با واسطهٔ ۵-آمینولوولینیک اسید برروی سلول‌های MDA-MB-231

مهناز هادی‌زاده [۱]
مروارید تعبدی [۲]
مریم جهانشیری مقدم [۳]

۱. *استادیار بیوشیمی، پژوهشکدهٔ بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران*

۲. *دانشجوی کارشناسی ارشد نانوبیوتکنولوژی، پژوهشکدهٔ بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران*

۳. *کارشناس شیمی، مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران*

نویسندهٔ‌مسئول: مهناز هادی‌زاده تلفن: ۰۲۱۵۶۲۷۶۶۳۶
پست‌الکترونیک: hadizadehmahnaz@gmail.com

خلاصه

مقدمه: درمان فتودینامیکی روشی با حداقل تهاجم در درمان سرطان است که از ترکیب مواد حساس‌به‌نور غیرسمی و نور مرئی برای تولید گونه‌های فعال اکسیژن و تخریب تومورها استفاده می‌کند. این مطالعه با هدف بررسی اثر دو لیزر متفاوت بر بازده درمان فتودینامیکی سلول‌های سرطان پستان انجام شد.

روش بررسی: سلول‌های MDA-MB-231 سرطان پستان با غلظت‌های مختلف ۵- آمینولوولینیک‌اسید به‌مدت ۲۴ ساعت کشت و نگهداری شدند. سپس سلول‌ها با لیزر موستانگ و یا لازوترونیک در دوزهای مختلف تحت تابش قرار گرفتند. توان زیستی سلول‌ها با استفاده از روش متیل- تترازولیوم تعیین شد.

یافته‌ها: نتایج آزمایش‌های سمّیت تاریکی نشان داد که ۵-آمینولوولینیک‌اسید در غلظت‌های کمتر از ۳ میلی‌مولار، اثر سمّیت قابل‌توجهی برروی سلول‌های سرطانی پستان نداشت. همچنین نور لیزر به‌تنهایی فاقد اثر سمّی برروی سلول‌ها بود. اما، درمان فتودینامیکی با واسطهٔ ۵- آمینولوولینیک‌اسید با هردو نوع لیزر، توان زیستی سلول‌های MDA-MB-231 را با یک روش وابسته به دوز کاهش داد. درمان فتودینامیکی با واسطهٔ ۵- آمینولوولینیک‌اسید در دوز نوری ۲۰ ژول بر سانتی‌مترمربع با استفاده از لیزر موستانگ، ۲۰-۱۰ درصد و با لیزر لازوترونیک، ۳۰-۲۷ درصد باعث کاهش توان زیستی سلول‌های MDA-MB-231 شد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که درمان فتودینامیکی با واسطهٔ ۵- آمینولوولینیک‌اسید با استفاده از لیزر لازوترونیک مؤثرتر از لیزر موستانگ در درمان سلول‌های MDA-MB-231 سرطان پستان است.

واژه‌های کلیدی: درمان فتودینامیکی، ۵- آمینولوولینیک‌اسید، لیزر لازوترونیک، لیزر موستانگ

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در بین زنان و پنجمین علت مرگ ناشی از این بیماری بعد از سرطان ریه، معده، کبد و کولون محسوب می‌شود[۱و۲]. جراحی و شیمی‌درمانی از روش‌های متداول برای درمان سرطان پستان هستند ولی متأسفانه هرکدام از این روش‌ها معایبی دارد. عمل جراحی معمولاً با عوارض گسترده‌ای همراه است. شیمی‌درمانی نیز برای بیماران بسیار تهاجمی است و اغلب بافت سالم را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد و همچنین باعث مقاومت اولیه یا ثانویهٔ سلول‌های سرطانی می‌شود[۳]. بنابراین، بررسی روش‌های درمانی دیگر با اثرات تهاجمی کمتر ضروری است.

درمان فتودینامیکی (Photodynamic therapy)، روشی فتوشیمیایی و کم‌تهاجم برای درمان انواع مختلفی از بیماری‌ها ازجمله سرطان است. این روش درمانی مبتنی بر سه فاکتور نور، مادهٔ حساس‌به‌نور و اکسیژن است. هیچ‌یک از این سه فاکتور به‌تنهایی سمّی نیستند اما ترکیب آن‌ها باعث تولید گونه‌های اکسیژن منفرد یا گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) با اثر سمّیت سلولی می‌شود. انتقال مؤثر مادهٔ حساس‌به‌نور از عرض غشاء و تجمع داخل سلولی آن از مهم‌ترین عناصر در درمان فتودینامیکی است. بسته به خواص فیزیکی- شیمیایی و مکانیسم جذب، حسگرهای نوری می‌توانند با غلظت‌های مختلف در بخش‌های مختلف سلول تجمع یابند[۴و۵]. آسیب درمان فتودینامیکی به سلول‌های سرطانی از طریق القاء مرگ برنامه‌ریزی شدهٔ سلول به‌نام آپوپتوز [1] از طریق مسیر سیگنال‌دهی شامل کاسپازها[2]، اعضای خانوادهٔ Bcl-2 و فاکتور القاء آپوپتوز [3] انجام می‌شود[۶و۷]. درمان فتودینامیکی همچنین از طریق القاء نکروز [4] و اتوفاگوسیتوز [5]، مرگ سلولی را منجر می‌شود[۸]. نتایج بسیاری از تحقیقات حاکی از آن است که این روش درمانی، غشاء پایهٔ رگ‌های خونی تومور را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد[۹]. همچنین برخلاف جراحی، شیمی‌درمانی و پرتودرمانی که اغلب سبب سرکوب سیستم ایمنی می‌شوند، درمان فتودینامیکی باعث التهاب حاد، بیان پروتئین‌های شوک حرارتی، تهاجم و نفوذ لکوسیت‌ها به تومور و افزایش ارائهٔ آنتی‌ژن T می‌شود[۱۰]. درمان فتودینامیکی همچنین می‌تواند سبب تخریب DNA و RNA سلولی شود و بر مسیر استرس اکسیداتیو و تکثیر سلولی اثرگذار باشد[۱۱].

۵-آمینولوولینیک‌اسید [6] (5-ALA) دارویی است که با موفقیت برای تشخیص و درمان بافت سرطانی مورد استفاده قرار گرفته است[۱۲-۱۴]. 5-ALA به‌صورت طبیعی در بدن وجود دارد ولی ماده‌ای حساس‌به‌نور نمی‌باشد. این ماده در مسیر سنتز هِم (Heme) به‌عنوان پیش‌ساز بیولوژیکی عمل می‌کند[4]. در این مسیر بیوسنتزی، دو مرحلهٔ محدودکنندهٔ سرعت وجود دارد. اولین مرحلهٔ تولید 5-ALA از گلیسین[7] و سوکسینیل کوآ [8] است که از طریق یک مکانیسم بازخورد منفی توسط Heme تنظیم می‌شود. مرحلهٔ دوم، تبدیل پروتوپورفیرین (PpIX) [9] به Heme است که توسط یک آنزیم محدودکنندهٔ سرعت به‌نام فروشلاتاز [10] کنترل می‌شود. مطالعات نشان داده است که فروشلاتاز در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های سالم فعالیت بسیار کمتری دارد. بنابراین تجویز 5-ALA خارجی به‌عنوان دارو سبب کوتاه شدن مسیر سنتز پورفیرین [11] و تجمع بیشتر PpIX در بافت سرطانی می‌شود[۱۵-۱۸]. استفاده از 5-ALA در شرایط in vitro و in vivo برای افزایش سنتز PpIX در سلول‌های سرطانی شناخته شده است. فرانک و همکاران گزارش کرده‌اند که تجمع PpIX در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های نرمال فیبروبلاست به‌طور قابل‌توجهی بیشتر است[۱۹]. تحریک نوری PpIX تجمع‌یافته در سلول‌های سرطانی منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود که سلول‌های سرطانی را از طریق آپوپتوز و نکروز از بین می‌برند[۲۰و۲۱].

اخیراً محققان گزارش کرده‌اند که درمان فتودینامیکی با واسطهٔ 5-ALA می‌تواند به‌طور مؤثری مانع رشد سلول‌های سرطانی شود و قابلیت بقاء بیماران را افزایش دهد. نتایج این تحقیقات بیانگر افزایش شدید مرگ سلولی از طریق آپوپتوز در سلول‌های گلیومای انسانی بعداز درمان فتودینامیکی با واسطهٔ 5-ALA بوده است[۲۲]. علاوه‌براین، کارآمدی این روش درمانی برای سلول‌های ملانوما و سلول‌های سنگفرشی دهان نیز گزارش شده است[۲۳].

عوامل مختلفی همچون نوع و غلظت مادهٔ حساس‌به‌نور، مدت‌زمان تماس دارو با سلول، نوع سلول، منبع نوری مورد استفاده، طول‌موج و انرژی نور، مدت‌زمان تابش نور و غیره در میزان بازده و موفقیت روش درمان فتودینامیکی بسیار مؤثر هستند. بنابراین ضروری است که قبل از اجرای این روش درمانی، شرایط بهینه در محیط in vitro و in vivo تعیین شوند. ازاین‌رو با وجود این‌که آزمایش‌های متعددی در زمینهٔ بررسی جنبهٔ اثربخشی درمان فتودینامیکی با واسطهٔ 5-ALA برروی رده‌های سلولی مختلف ازجمله سلول‌های سرطانی پستان انجام شده است، ولی هنوز لازم است که تحقیقات بیشتری در این زمینه صورت گیرد [۲۴-۲۷]. دراین‌راستا، هدف از این مطالعه بررسی و مقایسهٔ اثر طول موج و شدت‌های مختلف نور دو لیزر متفاوت در میزان بازده درمان فتودینامیکی با واسطهٔ 5-ALA برروی یکی از رده‌های سلولی سرطان پستان انسان (MDA-MB-231) است که کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است.

1. Apoptosis
2. Caspase
3. Apoptosis-inducing factor
4. Necrosis
5. Autophagocytosis
6. 5-aminolevulinic acid
7. Glycine
8. Succinyl-CoA
9. Protoporphyrin IX
10. Ferrochelatase
11. Porphyrin

روش بررسی

مواد

سلول‌های MDA-MB-231 از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. محیط کشت DMEM، سرم جنین گاوی (FBS)، متیل تترازولیوم، پنیسیلین و استرپتومایسین محصول شرکت سیگما بودند.

دستگاه‌ها

منبع لیزر دیودی تحت عنوان لازوترونیک (LASOTRONIC MED 131 RED) ساخت کشور سوئیس با طول موج نشری ۶۶۰ نانومتر و توان خروجی ۳۵ میلی‌وات و منبع لیزر دیودی تحت‌عنوان موستانگ (MUSTANG) ساخت کشور روسیه با حداکثر توان خروجی ۱۰ میلی‌وات و طول‌موج نشری ۶۳۳ نانومتر جهت بررسی‌های درمان فتودینامیکی مورد استفاده قرار گرفتند.

روش‌ها

بررسی سمّیت تاریکی ۵-آمینولوولینیک اسید:

برای بررسی سمّیت سلولی 5-ALA در غیاب نور (سمّیت تاریکی) در هر چاهک از پلیت‌های کشت سلولی ۹۶ خانه‌ای، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی (۱×۱۰^{۴} سلول در هر چاهک) ریخته شد و پلیت‌ها در انکوباتور (۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد) قرار گرفتند. ۲۴ ساعت بعد از کشت، سلول‌ها در تاریکی با غلظت‌های ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۳ میلی‌مولار از 5-ALA به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و میزان مرگ‌ومیر سلولی با استفاده از تست رنگ‌سنجی ۳، ۴، ۵ دی‌متیل‌تیازول ۲- ایل ۲، ۵ دی‌فنیل تترازولیوم (MTT) بررسی شد.

بررسی اثر نور بر سلول‌های MDA-MB-231:

جهت بررسی اثر سمّیت نوری ابتدا سوسپانسیون سلولی MDA-MB-231 در محیط کشت DMEM به‌همراه فسفات بافر سالین (FBS) ۱۰ درصد تهیه شد. سپس در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای، ۱۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون سلولی ریخته شد. ۲۴ ساعت بعد، سلول‌ها با محیط کشت DMEM فاقد FBS تعویض و در معرض نور لیزر لازوترونیک و یا موستانگ با انرژی‌های ۱، ۵، ۱۰ و ۲۰ J/cm^2 قرار گرفتند. سپس محیط کشت سلول‌ها با محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ FBS درصد تعویض و بعد از ۲۴ ساعت توان زیستی سلول‌ها از طریق سنجش MTT بررسی شد.

بررسی توان زیستی سلول‌ها:

سمّیت نوری القاءشده توسط درمان فتودینامیکی با استفاده از سنجش MTT بررسی شد. سنجش MTT براساس فعالیت آنزیم دهیدروژناز میتوکندری است که فقط در سلول‌های زنده فعالیت دارد و می‌تواند نمک تترازولیوم محلول در آب را به ترکیب نامحلول فورمازان بنفش‌رنگ تبدیل کند.

جهت بررسی توان زیستی سلول‌ها ۲۴ ساعت بعد از تابش لیزر، محیط رویی دور ریخته شد و سلول‌ها با PBS شستشو داده شدند. سپس به هر چاهک محلول ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر MTT افزوده شد و پلیت به‌مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس محتویات چاهک‌ها تخلیه و ۱۰۰ میکرولیتر محلول دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO) به‌عنوان حلال بلورهای فورمازان به هر چاهک اضافه شد. سنجش جذب نوری مربوط به هر چاهک در طول‌موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الایزاریدر در مقایسه با جذب نوری کنترل منفی (فاقد 5-ALA و عدم تابش نور) تعیین شد. آزمایش مربوط به هر غلظت حداقل سه بار تکرار شد.

آنالیز آماری:

در این مطالعه همهٔ آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند و نتایج به‌صورت میانگین سه بار تکرار ± خطای استاندارد نشان داده شد. تحلیل آماری داده‌ها با نرم افزار SPSS با روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و T- test انجام شد و داده‌ها با ارزش $P<۰/۰۵$ از نظر آماری معنی‌دار درنظر گرفته شد.

یافته‌ها

اثر سمّیت تاریکی ۵-آمینولوولینیک‌اسید برتوان زیستی سلول‌ها:

سلول‌های MDA-MB-231 با داروی 5-ALA با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۳ میلی‌مولار به‌مدت ۲۴ ساعت کشت و نگهداری شدند. همان‌طورکه در نمودار ۱ نشان داده شده است، سمّیت تاریکی داروی 5-ALA در غلظت های ۰/۵ تا ۲/۵ میلی‌مولار در مقایسه با گروه کنترل (بدون دارو) بسیار ناچیز و از نظر آماری معنی‌دار نبود. اما غلظت ۳ میلی‌مولار 5-ALA به‌میزان (۴ ± ۲۱) درصد توان زیستی سلول‌ها را کاهش داد.

اثر سمّیت نوری لیزر لازوترونیک و موستانگ برتوان زیستی سلول‌های MDA-MB-231:

سلول‌ها بدون حضور مادهٔ حساس‌به‌نور در معرض تابش لیزر لازوترونیک و یا موستانگ با دوز تابشی ۱، ۵، ۱۰ و ۲۰ ژول برسانتی‌مترمربع قرار گرفتند و نتایج به‌صورت میانگین سه تکرار مستقل ± خطای استاندارد گزارش شد. نتایج به‌دست‌آمده بیانگر این است که تابش نور با دوزهای نوری ذکرشده منجر به مرگ سلولی نمی‌شود و به‌تنهایی برای سلول‌ها کشنده نیست (نمودار ۲).

بازده درمان فتودینامیکی با واسطهٔ 5-ALA با استفاده از لیزر

لازوترونیک:

نتایج آزمایش‌های مربوط به اثر درمان فتودینامیکی با استفاده از 5-ALA نشان داد که 5-ALA با غلظت ۱ میلی‌مولار تحت تابش لیزر لازوترونیک با دوزهای نوری ۱۰ و ۲۰ ژول برسانتی‌مترمربع تأثیر چندانی بر کاهش توان زیستی سلول‌های MDA-MB-231 نداشت (حدود ۱۰ درصد کاهش)، ولی در غلظت ۲ میلی‌مولار 5-ALA به‌ترتیب ۱۵ و ۲۰ درصد کاهش در توان زیستی سلول‌ها با دوز نوری ۱۰ و ۲۰ ژول برسانتی‌مترمربع مشاهده شد. در نمودار ۳ نتایج به‌صورت میانگین سه تکرار مستقل ± خطای استاندارد نمایش داده شده و $P<0/05$ معنی‌دار درنظر گرفته‌شده‌است.

بازده درمان فتودینامیکی با واسطهٔ 5-ALA با استفاده از لیزر موستانگ:

نتایج آزمایش‌های مربوط به اثر درمان فتودینامیکی با استفاده از 5-ALA در غلظت ۱ و ۲ میلی‌مولار تحت تابش لیزر موستانگ نشان داد که غلظت ۱ میلی‌مولار 5-ALA در دوز نوری ۱۰ ژول بر سانتی‌متر مربع تأثیری بر توان زیستی سلول‌ها نداشت اما با افزایش دوز نوری تا ۲۰ ژول بر سانتی‌متر مربع، توان زیستی سلول‌ها را تا ۳۰ درصد کاهش داد. استفاده از غلظت ۲ میلی‌مولار 5-ALA با دوز نوری ۱۰ و ۲۰ ژول بر سانتی‌متر مربع نیز به‌ترتیب منجر به ۲۳ و ۳۵ درصد کاهش در توان زیستی سلول‌ها شد. نتایج این بخش به‌صورت میانگین سه تکرار مستقل ± خطای استاندارد در نمودار ۴ نمایش داده شده است. $P<0/05$ معنی‌دار درنظر گرفته‌شده‌است.

بحث

در مطالعهٔ حاضر، اثر لیزرهای موستانگ و لازوترونیک بر بازده درمان فتودینامیکی سلول‌های سرطانی MDA-MB-231 به‌عنوان مدل سرطان پستان مقاوم به درمان هورمونی بررسی شد. نتایج نشان داد که داروی 5-ALA در غلظت‌های کمتر از ۳ میلی‌مولار در مقایسه با گروه کنترل (بدون دارو) سمّیت قابل توجهی را ایجاد نمی‌کند به‌طوری‌که بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها زنده ماندند. اما در غلظت ۳ میلی‌مولار 5-ALA حدود ۲۱ درصد کاهش در توان زیستی سلول‌ها مشاهده شد. تابش نور به‌تنهایی نیز توسط هر یک از لیزرهای مورد استفاده در دوزهای ۵ تا ۲۰ ژول بر سانتی‌متر مربع تأثیری بر توان زیستی سلول‌ها نداشت. در آزمایش‌های فتوتوکسیستی [12] 5-ALA، تفاوت محسوسی بین اثر دو لیزر موستانگ و لازوترونیک با دوز تابش ۱۰ ژول بر سانتی‌مترمربع مشاهده نشد. درحالیکه با دوز تابش ۲۰ ژول بر سانتی‌مترمربع، لیزر موستانگ ۳۰-۲۷ درصد و لیزر لازوترونیک ۲۰-۱۰ درصد توان زیستی سلول‌های MDA-MB-231 را کاهش داد.

برای تعیین بازده درمان فتودینامیکی ابتدا لازم است سمّیت سلولی مادهٔ حساس‌به‌نور به‌تنهایی (سمّیت تاریکی) مورد ارزیابی قرار گیرد. به‌همین‌دلیل در این مطالعه ابتدا سمّیت غلظت‌های مختلف 5-ALA بدون اعمال نور برروی سلول‌های MDA-MB-231 بررسی شد. ازآنجاکه در غلظت ۳ میلی‌مولار 5-ALA سمّیت سلولی مشاهده شد، مطالعات فتودینامیکی در غلظت‌های کمتر 5-ALA (۱و۲ میلی‌مولار) که در غیاب نور فاقد اثر سمی بودند، انجام شد. عدم سمّیت سلولی 5-ALA در غلظت‌های کمتر از ۳ میلی‌مولار توسط محققان دیگر نیز گزارش شده است. بررسی سمّیت تاریکی 5-ALA برروی سه ردهٔ سلولی مدولوبلاستوما توسط ریتز (Ritz) و همکاران نشان داده است که ۲ ساعت انکوباسیون این سلول‌ها با غلظت‌های کمتر از ۶ میلی‌مولار 5-ALA فاقد اثر سمّیت سلولی است[۲۸]. همچنین عدم سمّیت سلولی 5-ALA با غلظت۲ میلی‌مولار و کمتر پس از ۴ ساعت انکوباسیون سلول‌های سرطانی پوست ردهٔ سلولی A431 با این دارو گزارش شده است[۲۹].

یکی از فاکتورهای مهم در موفقیت‌آمیز بودن درمان فتودینامیکی، استفاده از منبع نوری مناسب است. از منابع نوری مختلفی مانند انواع لیزرها، لوله‌های فلورسانس نور آبی، لامپ‌های قوس گزنون یا هالوژن فیلترشده و ردیف‌های دیودی منتشرکنندهٔ نور (LED) جهت تابش نور می‌توان استفاده کرد که هر کدام مزایا و معایب خاص خود را دارند[۳۰]. استفاده از لیزرها به‌دلیل تولید نور همدوس نسبت به منابع نوری غیرهمدوس که نور با پهنای باند بیشتری را تولید می‌کنند در درمان فتودینامیکی می‌تواند ارجحیت داشته باشد. در کاربرد لیزرها بیشترین اثرگذاری زمانی مشاهده می‌شود که طول‌موج لیزر مورد استفاده بر قلهٔ جذب نوری مادهٔ حساسگر نوری منطبق باشد و علاوه‌برآن نور از شدت مناسبی برخوردار باشد[۳۱]. براین‌اساس، در این مطالعه از دو منبع نور لیزری لازوترونیک و موستانگ که دارای طول‌موج نشری و توان خروجی متفاوت هستند برای بررسی اثر طول‌موج و شدت نور در بازده درمان فتودینامیکی با واسطهٔ 5-ALA استفاده شد. لیزر لازوترونیک دارای طول‌موج نشری ۶۶۰ نانومتر و توان خروجی ۳۵ میلی‌وات و لیزر موستانگ دارای طول‌موج نشری ۶۳۳ نانومتر و توان خروجی ۱۰ میلی‌وات است. داروی 5-ALA یک مادهٔ حساس‌به‌نور محسوب نمی‌شود بلکه به‌عنوان پیش‌دارو در درمان فتودینامیکی تجویز می‌شود. این ماده در مسیر بیوسنتز هِم (Heme) به PpIX تبدیل می‌شود که در محدودهٔ قرمز نور دارای جذب نوری قوی است و قلهٔ جذب نوری آن در ۵ ± ۶۳۰ نانومتر قرار دارد[۱۸]. بدین‌ترتیب این انتظار وجود دارد که لیزر موستانگ با داشتن طول موج نشری در محدودهٔ قلهٔ جذبی PpIX ، اثر بسیار بیشتری در کاهش رشد سلول‌های کشت و نگهداری‌شده با 5-ALA داشته باشد. ولی باید توجه داشت که توان خروجی این

12. Phototoxicity

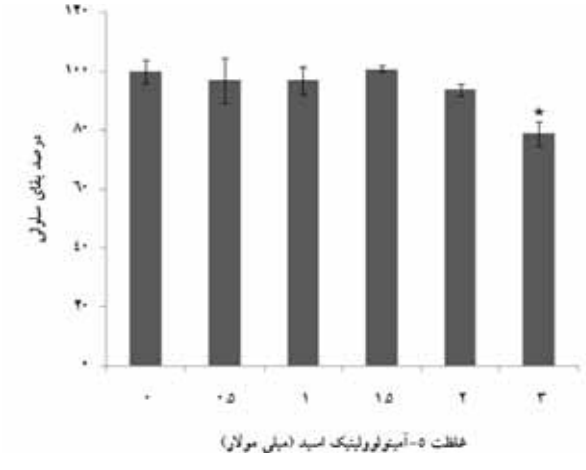
لیزر در مقایسه با لیزر لازوترونیک ۳/۵ بار کمتر است. نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد که طول‌موج نور تنها عامل مؤثر در بازده درمان فتودینامیکی نیست به‌طوری‌که در دوز تابش ۲۰ ژول بر سانتی‌متر مربع و با استفاده از دو غلظت ۱ و ۲ میلی‌مولار 5-ALA، لیزر موستانگ در مقایسه با لیزر لازوترونیک فقط باعث ۱۷ -۱۰ درصد القاء مرگ بیشتری در سلول‌های سرطانی می‌شود و در دوز ۱۰ ژول برسانتی‌مترمربع نیز تفاوت محسوسی بین اثر دو لیزر مشاهده نمی‌شود. این نتایج می‌تواند بیانگر این باشد که علاوه‌بر طول‌موج مناسب، شدت و مدت زمان مناسب تابش نور نیز برای افزایش بازده درمان فتودینامیکی باید لحاظ شود. توان خروجی کمتر لیزر موستانگ باعث می‌شود که برای رسیدن به یک شدت تابش معین توسط این لیزر در مقایسه با لیزر لازوترونیک به زمان تابش بیشتری نیاز باشد. افزایش زمان تابش نور با طول موج ۶۳۰ نانومتر باعث تخریب سایت‌های اتصال PpIX به پروتئین‌های داخل سلولی و متعاقباً تجزیهٔ درصد زیادی از PpIX می‌شود. این فرآیند نیز درنهایت کاهش بازده درمان فتودینامیکی را درپی خواهد داشت[۳۲]. بنابراین در ارتباط با اثر شدت نور در یک تحقیق مشابه با مؤلفان این مقاله، اثر بازده درمان فتودینامیکی با واسطهٔ 5-ALA در دوزهای ۱۰ و ۲۰ ژول برسانتی‌مترمربع و با طول‌موج ۶۳۰ نانومتر برروی سلول‌های سرطان پستان، ردهٔ MCF-7 بررسی شده است. نتایج این تحقیق حاکی از ۲۲ درصد کاهش در توان زیستی سلول‌ها است که تقریباً مشابه نتیجهٔ به‌دست‌آمده توسط مؤلفان این مقاله برروی ردهٔ دیگری از سلول‌های سرطانی پستان است[۳۳]. درعوض، هی (He) و همکاران گزارش کرده‌اند که تابش نور لیزر با طول‌موج ۶۳۵ نانومتر و دوز نوری ۱۰ ژول برسانتی‌مترمربع در غلظت ۲ میلی‌مولار 5-ALA به‌عنوان دوز بهینهٔ دارو، منجر به مرگ تقریباً تمام سلول‌های سرطان گردن رحم می‌شود[۳۴]. اثر قوی‌تر مشاهده‌شده در این مورد در مقایسه با تحقیق حاضر می‌تواند به تفاوت نوع سلول‌های تحت درمان مربوط باشد. بنابراین باتوجه به نتایج این مطالعه و سایر مطالعات مرتبط با این موضوع، دوز بهینهٔ 5-ALA و نور جهت درمان فتودینامیکی سلول‌های MDA-MB-231 با استفاده از منبع نوری لیزر لازوترونیک را به‌ترتیب ۲ میلی‌مولار و ۲۰ ژول بر سانتی‌متر مربع می‌توان درنظر گرفت.

نتیجه‌گیری

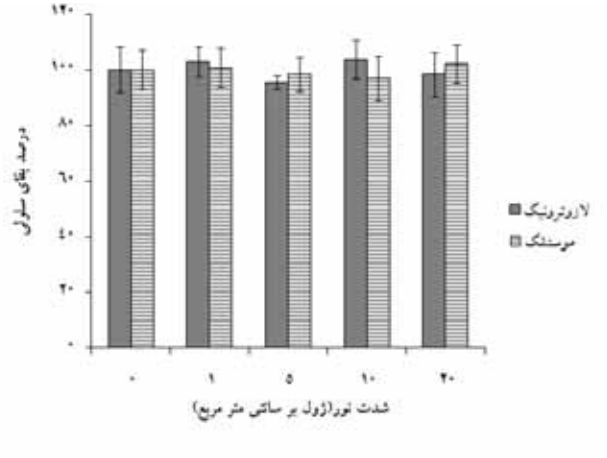
پارامترهای متعددی درمان فتودینامیکی را پیچیده می‌سازند. این موارد شامل غلظت حساسگر نوری و مدت کاربرد آن و از طرف دیگر پارامترهای مرتبط با نور نظیر طول موج، مدت و شدت تابش نور می‌باشد که با انتخاب صحیح منبع نوری میسّر می‌شود. گرچه در این مطالعه مکانیسم مولکولی مرگ سلولی القاءشده توسط درمان فتودینامیکی به‌واسطهٔ 5-ALA تعیین نشده است اما در مجموع نتایج این تحقیق بیانگر مؤثر بودن این روش درمانی در کاهش و مهار رشد سلول‌های سرطانی پستان است. لیزر موستانگ در مقایسه با لیزر لازوترونیک قابلیت بیشتری برای برانگیختن نوری 5-ALA دارد که متعاقباً مرگ بیشتر سلول‌های سرطانی را درپی خواهد داشت. دوز بهینهٔ 5-ALA و نور جهت درمان فتودینامیکی سلول‌های MDA-MB-231 با استفاده از منبع نوری لیزر لازوترونیک به‌ترتیب ۲ میلی‌مولار و ۲۰ ژول برسانتی‌مترمربع است. البته تحقیقات بیشتری در شرایط بالینی لازم است تا کارآیی و ایمنی این روش در از بین بردن سلول‌های سرطانی پستان تأیید گردد.

تشکر و قدردانی

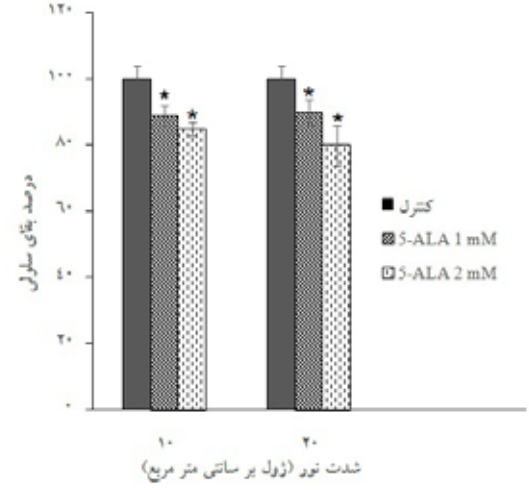
در این مقاله بخشی از نتایج حاصل از پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد نانوبیوتکنولوژی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران گزارش شده است. از مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران جهت فراهم نمودن تجهیزات لازم برای انجام کشت سلولی و آزمایش‌های مربوط به تابش نور سپاسگزاریم.



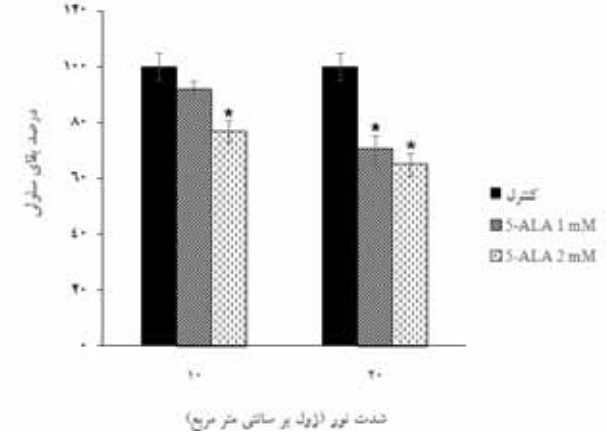
نمودار ۱: اثر سمیت تاریکی غلظت‌های مختلف ۵-آمینولوولینیک‌اسید بر توان زیستی سلول‌های MDA-MB-۲۳۱.



نمودار ۲: اثر دوزهای نوری مختلف بر توان زیستی سلول‌های MDA-MB-۲۳۱.



نمودار ۳: اثردرمان فتودینامیکی با واسطه‌ی ALA-۵ و منبع نوری لیزر لازوترونیک روی سلول‌های MDA-MB-۲۳۱.



نمودار ۴: اثر درمان فتودینامیکی با واسطه‌ی ALA-۵ و منبع نوری لیزر موستانگ روی سلول‌های MDA-MB-۲۳۱.

References

1. Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. Breast J. 2007; 13(4): 383-91.

2. Alteri R, Barnes C, Burke A. American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2013-2014. 2013.

3. Roses DF, Giuliano AE. Chapter 24 - Surgery for Breast Cancer. In: Roses DF, editor. Breast Cancer (Second Edition). Philadelphia: Churchill Livingstone, 2005; 401-59.

4. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO. Photodynamic therapy of cancer: an update. CA Cancer J Clin. 2011; 61(4): 250-81.

5. Kessel D, Oleinick NL. Photodynamic therapy and cell death pathways. Methods Mol Biol. 2010; 635: 35-46.

6. Yoo J-O, Ha K-S. 4 New Insights into the Mechanisms for Photodynamic Therapy-Induced Cancer Cell Death. Int Rev Cell Mol Biol. 2012; 295: 139.

7. Moserova I, Kralova J. Role of ER stress response in photodynamic therapy: ROS generated in different subcellular compartments trigger diverse cell death pathways. PloS one. 2012; 7(3): e32972.

8. Andrzejak M, Price M, Kessel DH. Apoptotic and autophagic responses to photodynamic therapy in 1c1c7 murine hepatoma cells. Autophagy. 2011; 7(9): 979-84.

9. Maas AL, Carter SL, Wileyto EP, Miller J, Yuan M, Yu G. Tumor vascular microenvironment determines responsiveness to photodynamic therapy. Cancer Res. 2012; 72(8): 2079-88.

10. Castano AP, Mroz P, Hamblin MR. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. Nat Rev Cancer. 2006; 6(7): 535-45.

11. Gyenge EB, Hiestand S, Graefe S, Walt H, Maake C. Cellular and molecular effects of the liposomal mTHPC derivative Foslipos in prostate carcinoma cells in vitro. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2011; 8(2): 86-96. Epub 2011/04/19.

12. Uehlinger P, Zellweger M, Wagnières G, Juillerat-Jeanneret L, van den Bergh H, Lange N. 5-Aminolevulinic acid and its derivatives: physical chemical properties and protoporphyrin IX formation in cultured cells. J Photochem Photobiol B. 2000; 54(1): 72-80.

13. Lee J, Choi J, Chun J, Yun S, Lee S, Oh J. Relationship of protoporphyrin IX synthesis to photodynamic effects by 5 aminolaevulinic acid and its esters on various cell lines derived from the skin. Br J Dermatol. 2008; 59(1): 61-7.

14. Kim CH, Chung C-W, Choi KH, Yoo J-J, Kim DH, Jeong Y-I. Effect of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy via reactive oxygen species in human cholangiocarcinoma cells. Int J Nanomedicine. 2011; 6: 1357.

15. Krammer B, Malik Z, Pottier R, Stepp H. Photodynamic Therapy with ALA: A Clinical Handbook. London, UK: Royal Society of Chemistry; 2006.

16. Peng Q, Warloe T, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Giercksky KE. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Cancer. 1997; 79(12): 2282-308.

17. Allison RR, Downie GH, Cuenca R, Hu X-H, Childs CJ, Sibata CH. Photosensitizers in clinical PDT. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2004; 1(1): 27-42.

18. Wachowska M, Muchowicz A, Firczuk M, Gabrysiak M, Winiarska M, Wańczyk M. Aminolevulinic acid (ALA) as a prodrug in photodynamic therapy of cancer. Molecules. 2011; 6(5): 4140-64.

19. Frank J, Lornejad-Schafer M, Schoffl H, Flaccus A, Lambert C, Biesalski HK. Inhibition of heme oxygenase-1 increases responsiveness of melanoma cells to ALA-based photodynamic therapy. Int J Oncol. 2007; 31(6): 539-46.

20. Chen R, Huang Z, Chen G, Li Y, Chen X, Chen J. Kinetics and subcellular localization of 5-ALA-induced

PpIX in DHL cells via two-photon excitation fluorescence microscopy. Int J Oncol. 2008; 32(4): 861-7.

21. Ito S, Miyoshi N, Degraff WG, Nagashima K, Kirschenbaum LJ, Riesz P. Enhancement of 5-aminolevulinic acid-induced oxidative stress on two cancer cell lines by gold nanoparticles. Free Radic Res. 2009; 43(12): 214-24.

22. Inoue H, Kajimoto Y, Shibata M-A, Miyoshi N, Ogawa N, Miyatake S-I. Massive apoptotic cell death of human glioma cells via a mitochondrial pathway following 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. J Neurooncol. 2007; 83(3): 223-31.

23. Moon YH, Park JH, Kim SA, Lee JB, Ahn SG, Yoon JH. Anticancer effect of photodynamic therapy with hexenyl ester of 5 aminolevulinic acid in oral squamous cell carcinoma. Head Neck. 2010; 32(9): 136-42.

24. Golding J, Wardhaugh T, Patrick L, Turner M, Phillips J, Bruce J. Targeting tumour energy metabolism potentiates the cytotoxicity of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. Br J Cancer. 2013; 109(4): 976-82.

25. Tsai T, Hong RL, Tsai JC, Lou PJ, Ling I, Chen CT. Effect of 5 aminolevulinic acid mediated photodynamic therapy on MCF 7 and MCF 7/ADR cells. Lasers Surg Med. 2004; 34(1): 62-72.

26. Wo niak M, Hotowy K, Czapi ska Eb, Du -Szachniewicz K, Szczuka I, Gamian Eb. Early induction of stress-associated Src activator/Homo sapiens chromosome 9 open reading frame 10 protein following photodynamic therapy. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2014; 11(1): 27-33.

27. Zakaria S, Gamal-Eldeen AM, El-Daly SM, Saleh S. Synergistic apoptotic effect of Doxil® and aminolevulinic acid-based photodynamic therapy on human breast adenocarcinoma cells. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2014; 11(2): 227-38.

28. Ritz R, Scheidle C, Noell S, Roser F, Schenk M, Dietz K. In vitro comparison of hypericin and 5-aminolevulinic acid-derived protoporphyrin IX for photodynamic inactivation of medulloblastoma cells. PloS One. 2012; 7(12): e51974.

29. Hadizadeh M, Fateh M. Synergistic Cytotoxic Effect of Gold Nanoparticles and 5-Aminolevulinic Acid-Mediated Photodynamic Therapy against Skin Cancer Cells. Iran J Med Sci. 2014; 39(5): 452.

30. Juzeniene A, Juzenas P, Ma L-W, Iani V, Moan J. Effectiveness of different light sources for 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. Lasers Med Sci. 2004; 19(3): 139-49.

31. Brancaleon L, Moseley H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. Lasers Med Sci. 2002; 17(3): 173-86.

32. Moan J, Streckyte G, Bagdonas S, Bech Ø, Berg K. Photobleaching of protoporphyrin IX in cells incubated with 5-aminolevulinic acid. International journal of cancer. 1997; 70(1): 90-7.

33. Hotowy K, Woźniak M, Duś K, Czapińska E, Osiecka B, Krzystek-Korpacka M. Immunocytochemical studies on the nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases substrate following 5-aminolevulinicacid-mediated photodynamic therapy on MCF-7 cells. Photodiagnosis Photodyn Ther. 10(4): 518-25.

34. He G-F, Bian M-L, Zhao Y-W, Xiang Q, Li H-Y, Xiao C. A study on the mechanism of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy in vitro and in vivo in cervical cancer. Oncol Rep. 2009; 21(4): 861.

35. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2004; 1(4): 279-93.