لیزر در پزشکی؛ ۱۴۰۳، دورهٔ ۲۱، شماره ۳، صفحات: ۹-۲

مقاله پژوهشی

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

مهناز هادی‌زاده

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

نویسندهٔ مسئول: مهناز هادی‌زاده
پست الکترونیک: hadizadeh@irost.ir

خلاصه

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-۲۳۱) 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 این‌حال، 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 پس‌از قرارگرفتن در معرض ۱۰ و ۲۰ J/cm^2 به‌ترتیب 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 این‌حال، 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 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)[1] 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)[2] یک روش درمانی کم‌تهاجم با واسطه اکسیژن، نور و یک ماده حساس‌به‌نور[3] 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 فعال‌کردن ماده حساس‌به‌نور قرار می‌گیرد و درنتیجه‌ی واکنش‌های فتوشیمیای 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[4] (تا ۹۰٪)، کلرین p^6[5] و پورپورین ۵[6] 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. انتخابی‌بودن 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 Chlorin e^6 به‌عنوان جزء اصلی راداکلرین جهت درمان سرطان‌های مختلف ازجمله سرطان کولون، سرطان تخمدان و سینه، ملانوما و سرطان استخوان در شرایط برون‌تنی انجام شده است. همچنین اخیرا گزارشی در مورد موفقیت PDT با واسطه Chlorin e^6 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 برروی سلول‌های سرطانی MDA-MB-231 به‌عنوال یک مدل از سرطان پستان از نوع سه‌گانه-منفی بررسی شد.

روش بررسی

کشت سلولی

سلول‌های سرطانی پستان رده MDA-MB-231 تهیه‌شده 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 درنظرگرفتن ۸۰۰۰ سلول در هر چاهک به مدت ۲۴ ساعت درشرایط 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) درنظر 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 به‌مدت ۴ ساعت تیمار شدند و سپس گروه تابش، تحت تابش لیزر دایود (ALOD-01، روسیه) با طول‌موج ۲±۶۶۲ نانومتر و توان ۳۰ میلی‌وات قرار گرفتند. آزمایشات درمان فتودینامیکی برای دو زمان پرتودهی ۹۳ ثانیه و ۱۸۷ ثانیه که به‌ترتیب باعث ایجاد شاریدگی J/cm^2 ۱۰ و J/cm^2 ۲۰ می‌شوند، اجرا شد.

بررسی درصد زنده‌مانی سلول‌ها با روش MTT[7]

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

1.Triple Negative Breast Cancer
2. Photodynamic therapy
3. Photosensitizer (PS)
4. chlorin e^6
5. chlorin p^6
6. purpurin[5]
7. [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide]

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 میلی گرم بر میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد. پلیت‌ها به‌مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکسید برای حل‌کردن بلورهای فورمازان حاصله به هر چاهک افزوده و درنهایت جذب نوری در طول‌موج 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 ± 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. بدین‌ترتیب که سلول‌های تریپسینه‌شده با بافر فسفات دو بار شستشو داده شدند. پس از سانتریفیوژ (g×۱۰۰۰، 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 موردآزمایش اضافه و لوله‌ها در تاریکی به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس سلول‌ها با استفاده از فلوسایتومتر FACscan در تحریک نور لیزر ۴۸۸ نانومتر مورد تجزیه‌وتحلیل 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 و PI مثبت نشان داده شد.

آنالیز آماری

تمام آزمایشات انجام‌شده در این مطالعه حداقل سه بار تکرارشد. تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها با استفاده نرم‌افزار GraghPad Prism ۸.۰.۱ و آزمون Student-t-test انجام شد. داده‌ها با $P < ۰.۰۵$ ازنظر 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 برروی 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. بدین‌ترتیب 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 قابل‌مشاهده 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. غیراز 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 زنده مانی سلول‌ها نشد (p=۰.۴۴۱۲)، در سایر غلظت‌های رادکلرین 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.

به‌طوری که تابش $20\ J/cm^2$ در غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌ترتیب منجر به ۲.۸۲ ± ۱۲.۰۴ درصد ($p = ۰.۰۰۹۷$)، ۲.۴۵ ± ۸.۰۰ درصد ($p = ۰.۰۳۰۹$)، ۳.۱۱ ± ۱۱.۱۳ درصد ($p = ۰.۰۲۴۱$) و ۱.۹۴ ± ۱۱.۰۰ درصد ($p = ۰.۰۰۴۷$) کاهش بیشتری در زنده‌مانی سلول‌های MDA-MB-۲۳۱ در مقایسه با تابش $10\ J/cm^2$ شد.

تعیین IC50

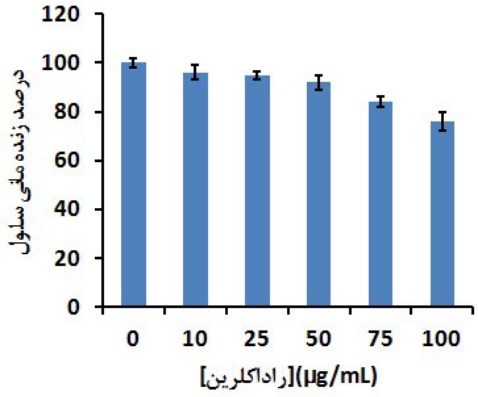
تعیین IC_{50} (حداقل غلظتی از دارو که باعث ۵۰ درصد سمیت سلولی می‌شود) برای دو گروه تحت تیمار با دو چگالی انرژی متفاوت نیز نشان داد که با افزایش چگالی انرژی نور مورد استفاده، میزان IC_{50} کاهش می‌یابد به‌طوری که مقدار IC_{50} از ۷۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر راداکلرین برای گروه تحت تابش با $10\ J/cm^2$ به ۵۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر راداکلرین برای گروه تحت تیمار با تابش $20\ J/cm^2$ می‌رسد.

تغییر مورفولوژیکی سلول‌های سرطانی MDA-MB-231

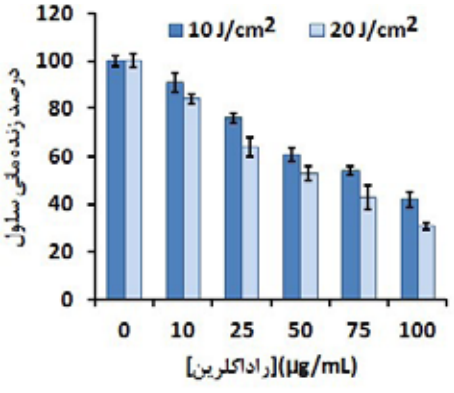
تغییرات مورفولوژی سلول‌های سرطانی MDA-MB-231 تحت تیمارهای مختلف PDT که با میکروسکوپ نوری اینورت و با بزرگ نمایی X۱۰۰ مورد بررسی قرار گرفتند در شکل ۴ نشان داده شده است. مقایسه تصاویر به‌دست‌آمده بیانگر این است که بیشترین تغییر مورفولوژی در سلول‌های تحت تیمار با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از راداکلرین و تابش نور با توان $20\ J/cm^2$ رخ داده است به‌طوری 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 $10\ J/cm^2$، به‌حالت گرد و جداشده از کف پلیت به‌همراه 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

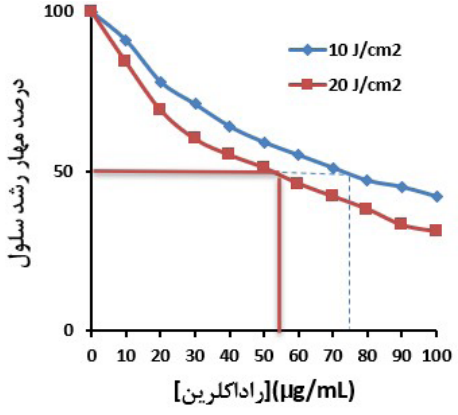
برای تعیین مکانیسم مرگ سلولی القاء شده در سلول‌های MDA-MB-231 تحت تیمار فتودینامیکی با راداکلرین، از آنالیز فلوسایتومتری استفاده شد. نتایج فلوسایتومتری نشان‌دهنده وقوع آپوپتوز یا مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده در این سلول‌ها بود. همانطور که در شکل ۵ نشان داده شده است در سلول‌های MDA-MB-231 تحت تیمار با غلظت IC_{50} (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. درمورد سلول‌های تحت تیمار با غلظت ۷۳) IC_{50} میکروگرم بر میلی‌لیتر راداکلرین) و تابش نور $20\ J/cm^2$، ۱۱.۵٪ سلول‌ها در مرحله اولیه آپوپتوز، ۲۷.۶٪ سلول‌ها در



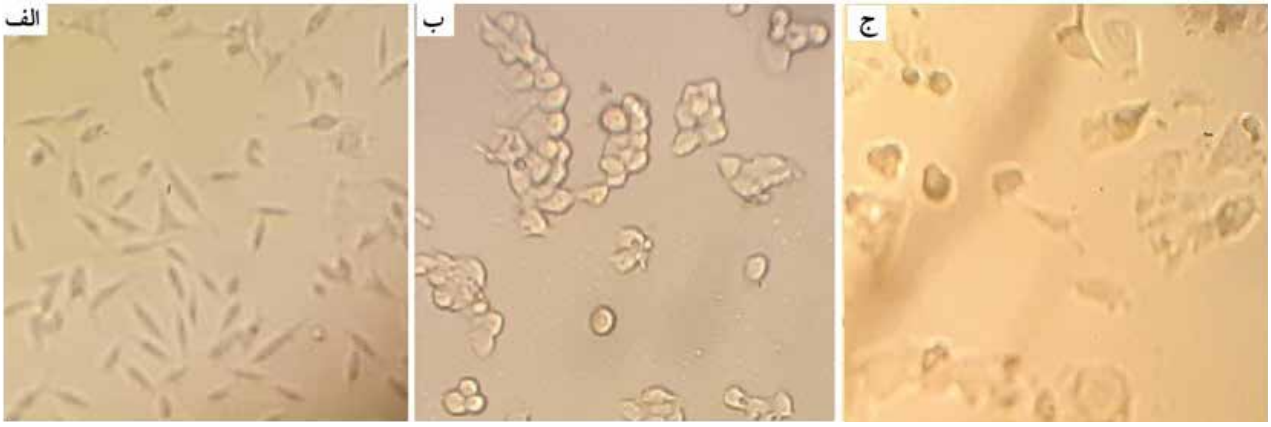
شکل ۱. اثر غلظت‌های مختلف راداکلرین بر سلول‌های MDA-MB-۲۳۱ بعد از ۴ ساعت تیمار در تاریکی



شکل ۲. اثر درمان فتودینامیکی با واسطه راداکلرین تحت تابش نور قرمز لیزری با چگالی انرژی $10\ J/cm^2$ و $20\ J/cm^2$ بر روی سلول‌های سرطانی MDA-MB-۲۳۱



شکل ۳. تعیین IC_{50} راداکلرین برای دو گروه تحت تیمار با دو چگالی انرژی متفاوت



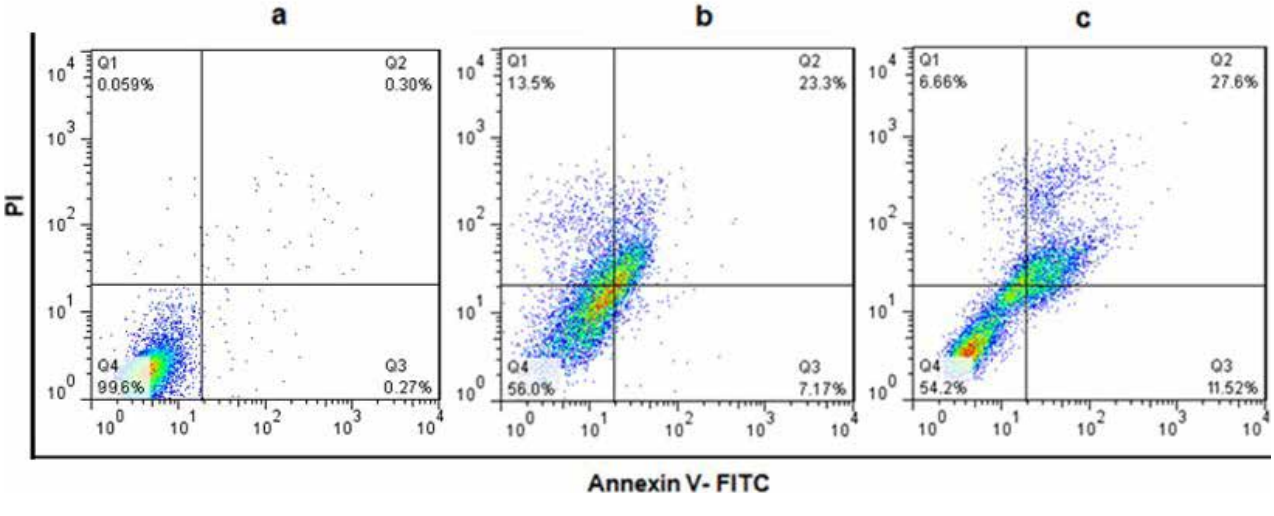
شکل ۴. تصاویر میکروسکوپی از تأثیر تیمارهای مختلف PDT با واسطه راداکلرین بر مورفولوژی سلول‌های سرطانی MDA-MB-۲۳۱
الف: کنترل ب: تحت‌تأثیر غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از راداکلرین و تابش نور با توان J/cm^2 ۱۰ ج: تحت‌تأثیر غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از راداکلرین و تابش نور با توان J/cm^2 ۲۰

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

بحث و نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر اثر فتودینامیک‌درمانی با استفاده از ماده حساس‌به‌نور راداکلرین را برروی 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 درمورد 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 رشد اپیدرمی به‌عنوان یک مدل برای TNBC درنظر گرفته شدند.

سمیت تاریکی کم یک حساس‌کننده نوری، عوارض جانبی نامطلوب را برروی بافت‌های طبیعی درطول درمان PDT به حداقل می‌رساند. برای این منظور، ما اثر راداکلرین را بدون تابش نور برروی سلول‌های MDA-MB-231 بررسی کردیم. نتایج نشان داد که راداکلرین در غلظت‌های ۱۰ و ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تاثیری بر زنده مانی سلول‌های MDA-MB-231 ندارد. در غلظت‌های بالاتر راداکلرین (۵۰-۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، کاهش کمی (۸ تا ۲۴ درصد) در زنده‌مانی 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 سلول های TC-1 نداشت. همچنین میرزایی و همکاران (۱۸)



شکل ۵. B) آنالیز فلوسایتومتری برای بررسی آپوپتوز در سلول‌های MDA-MB-۲۳۱ a) کنترل (سلول‌های تیمارنشده) b) سلول‌های MDA-MB-۲۳۱ تیمارشده با راداکلرین (۵۴ میکرولیتر در میلی‌لیتر) و دوز نوری J/cm^2 ۱۰ c) سلول‌های MDA-MB-۲۳۱ تیمار شده با راداکلرین (۷۳ میکرولیتر در میلی‌لیتر) و دوز نوری J/cm^2 ۲۰

گزارش کردند که راداکلرین به‌تنهایی در غلظت‌های ۲.۵ و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر فاقد اثر سمی بر روی سلول‌های $HepG^2$ و $HFLF\text{-}PI^4$ است.

نتایج PDT با راداکلرین در غلظت‌های مختلف و تحت تابش با دو دوز نوری متفاوت نشـــان داد که بازده PDT هم به غلظت دارو و هم به دوز نوری وابســـته است و با افزایش هر کدام از این دو فاکتور، بهبود می‌یابد. به‌طوری که بـــا افزایش غلظت راداکلریـــن از ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بـــه ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به همـــراه تابش نور با توان J/cm^2 ۱۰، میزان مرگ ســـلول‌های MDA-MB-231 از ۹٪ به ۵۸٪ در مقایسه با گروه کنترل رسید. از طرف دیگر با زیادشدن دوز نوری از J/cm^2 ۱۰ به J/cm^2 ۲۰ نیـــز در هر غلظـــت ثابت از راداکلرین میزان مرگ ســـلولی به‌صـــورت معنـــی داری ($p < ۰/۰۵$) افزایش نشـــان داد. به‌طوری‌که در غلظـــت ۱۰۰ میکروگرم بـــر میلی‌لیتر راداکلرین بـــا افزایش دوز نوری از J/cm^2 ۱۰ بـــه J/cm^2 ۲۰، میـــزان مرگ‌ومیر ســـلولی از ۵۸٪ به ۶۹٪ افزایـــش یافت. ایـــن روش درمانی تاکنون برروی رده ســـلولی MDA-MB-231 مطالعه نشـــده است ولی برروی رده‌های سلولی دیگر بررسی شـــده اســـت. نتایج این مطالعات، اثر مهاری راداکلرین فعال‌شده با نور را برروی سلول‌های آدنوکارسینومای کولون (HT29)، رده سلولی سرطان ریه (A549) و ســـلول‌های ســـرطان دهانه رحم (TC-1) نشان داده‌اند. علاوه‌برایـــن، تجربیاتـــی در کاربرد بالینـــی راداکلریـــن در PDT برای کارسینوم سلول بازال پوست (۲۱) و تک سلولی عصبی وجود دارد.

تکثیر ســـلول‌های ســـرطانی پس از PDT را می‌توان با مکانیسم‌های مختلفی مانند اتوفاژی، نکروز و آپوپتوز سرکوب کرد (۲۳، ۲۴). تحقیقات نشان داده اســـت که کلرین e^6، یک جزء مهم راداکلرین، پتانسیل ایجاد آپوپتوز در ســـلول‌های ســـرطانی را دارد (۲۵). بنابراین در این مطالعه ما برای بررســـی القاء آپوپتوز در اثر فرایند PDT با راداکلرین در سلول‌های MDA-MB-231 از آنالیـــز فلوســـایتومتری اســـتفاده کردیم. حدود ۳۹٪ ســـلول‌های MDA-MB-231 تحت درمان فتودینامیکی با ۷۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر راداکلرین (IC_{50}) و دوز نور J/cm^2 ۲۰ در مرحله آپوپتـــوز و حدود ۷٪ آن‌هـــا در مرحله نکروز ظاهر شـــدند. این داده‌ها با یافته‌های ســـنجش سمیت سلولی که در آن سطح بقای سلولی درصورت تیمار تحت همین شـــرایط، حدود ۵۰ درصد بود، مطابقت داشـــت. القای آپوپتوز در ســـلول‌های MDA-MB-231 پس از PDT با راداکلرین، یک مزیت برای این درمان اســـت زیرا فرار سلول‌های سرطانی از آپوپتوز یکی از دلایل اصلی رشد و تکثیر کنترل‌نشده آن‌ها است.

به‌طورخلاصـــه، این مطالعه آزمایشـــگاهی نشـــان می‌دهـــد که درمان فتودینامیکی با واســـطه راداکلرین درکاهش ســـلول‌های سرطانی پستان (سلول‌های MDA-MB-231) با القای آپوپتوز مؤثر است. درکل، نتایج این تحقیق نشان داد که PDT با واسطه راداکلرین می‌تواند یک رویکرد ارزشمند برای درمان TNBC باشد. اگرچه تحقیقات بیشتر هم در شرایط آزمایشگاهی با اعمال دوزهای تابش بیشتر، زمان‌های انکوباسیون مختلف و هم در شـــرایط برون‌تنـــی (کار با حیوانات آزمایشـــگاهی) و کارآزمایی بالینی برای اثبات آن موردنیاز است.

تشکر و قدردانی

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

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. Radeśtock 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. Ostanska E, Aebisher D, Bartusik-Aebisher 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, Djavid JE, Shirkavand A. Systemic photodynamic therapy with chlorine 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. Ghoodarzi 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, Esmaeeli Djavid 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 mediatedphotodynamic 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. Photodiagn 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.