مجلـــه‌ی علمـــی، پژوهشـــی دانشـگاه علـــوم پزشـــکی زنجـــان
دوره‌ی ۲۶، شماره‌ی ۱۱۶، مرداد و شهریور ۱۳۹۷، صفحات ۹ تا ۱۹

بررسی بیان ژن کاسپاز 9 و القای آپوپتوز پس از فوتودینامیک تراپی با روی فتالوسیانین در رده‌ی سلولی SW872 سرطان پوست

محمد امین دوستوندی[۱]، فاطمه محمدنژاد[۱]، دکتر محمدرضا مشایخی[۲]

نویسنده‌ی مسئول: دکتر محمدرضا مشایخی، گروه ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران m.mashayekhi@iaut.ac.ir

دریافت: ۹۶/۱/۲۰ پذیرش: ۹۶/۵/۲

چکیده

زمینه و هدف: *درمان سرطان به عنوان یک چالش بزرگ در جهان به شمار می‌آید. بنابراین توسعه و تکوین روش‌های درمانی موثر با حداقل عوارض جانبی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. فوتودینامیک تراپی یک روش درمانی غیرتهاجمی و نوین برای درمان سرطان می‌باشد. از این‌رو در این مطالعه اثرات فوتودینامیکی ترکیب حساس به نور Zinc-phthalocyanine (ZnPc) بر میزان رشد و بیان ژنی کاسپاز ۹ در رده‌ی سلولی SW872 بررسی گردید.*

روش بررسی: *در این مطالعه برای بررسی اثرات سایتوتوکسیک فوتودینامیک تراپی با ZnPc تست MTT انجام شد. سپس میزان بیان ژن کاسپاز 9 با تست QRT-PCR بررسی شد. تجزیه و تحلیل آماری توسط نرم افزار GraphPad Prism 6 صورت گرفت.*

یافته‌ها: *نتایج تست MTT نشان داد که فوتودینامیک تراپی با ZnPc به‌طور معناداری منجر به کاهش رشد سلول‌های سرطانی شده است. مقدار IC50 به دست آمده برای رده‌ی سلولی SW872 برابر با ۰/۰۳۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر در شاریدگی انرژی ۲۴ ژول بر سانتی‌متر مربع منبع نور بود. تست QRT-PCR نشان داد که فوتودینامیک تراپی با ZnPc باعث افزایش بیان ژن کاسپاز ۹ در سلول‌های تیمار شده می‌گردد.*

نتیجه گیری: *فوتودینامیک تراپی با ZnPc به صورت وابسته به غلظت منجر به کاهش رشد سلولی و القای آپوپتوز در رده‌ی سلولی SW872 شد. بر اساس نتایج به دست آمده فوتودینامیک تراپی با ZnPc یک روش درمانی قدرتمند با حداقل عوارض جانبی برای درمان سرطان پوست است.*

واژگان کلیدی: فوتودینامیک تراپی، کاسپاز 9، آپوپتوز، SW872

مقدمه

سرطان رشد غیرطبیعی و کنترل نشده‌ی سلول‌های بدن و یکی از مهلک‌ترین بیماری‌ها در جوامع مدرن امروزی است (۱). بیش از ۱۰۰ نوع سرطان مختلف وجود دارد که سالانه ۱۳ میلیون مورد جدید تشخیص داده می‌شود (۲). بر اساس گزارشات WHO پیش بینی شده است که میزان مرگ‌ومیر ناشی از بیماری سرطان در کشورهای خاورمیانه در ۱۵ سال آینده ۸۰ تا ۱۰۰ درصد افزایش خواهد یافت (۳). در این میان سرطان پوست یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در جهان

۱- کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز

۲- دکترای تخصصی ژنتیک، استادیار گروه ژنتیک، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز

(٦-٤) و همچنین یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در ایران می‌باشد (۱۰-۷). یکی از اهداف بلندمدت پژوهشگران ارائه‌ی یک چارچوب کلی برای درمان سرطان با عوارض جانبی بسیار کم، اثر بخشی بالا و بهبود کیفیت زندگی بیماران بوده است (۱۱). بعد از تشخیص سرطان، درمان معمولا با تکیه بر روش‌های درمانی مرسوم مانند جراحی، شیمی درمانی، رادیوتراپی و هورمون درمانی مطرح است. مشکلات بزرگ این روش‌های درمانی سمیت بالا، عوارض جانبی شدید و طولانی مدت، تضعیف سیستم ایمنی بدن، آسیب جدی به بافت‌های سالم و قرارگیری در معرض پرتوهای یونیزه کننده می‌باشد. برای غلبه بر این مشکلات، مطالعات در زمینه دستیابی به روش‌های درمانی با حداقل تهاجم از اهمیت بالایی برخوردار است (۱۲). فوتودینامیک تراپی (PDT) به عنوان یک روش درمانی نوین با حداقل تهاجم برای درمان بیماری سرطان مطرح شده است. در این روش درمانی به سلول‌های هدف ترکیب حساس به نور به صورت موضعی و یا سیستماتیک تجویز می‌شود و سپس ناحیه‌ی موردنظر در معرض نور مرئی سازگار با طیف جذبی ترکیب حساس به نور مورد استفاده، قرار خواهد گرفت. پس از قرارگیری ترکیب حساس به نور در معرض نور مرئی، گونه‌های فعال اکسیژن و رادیکال‌های آزاد تولید خواهند شد که منجر به مرگ هدفمند سلول‌های سرطانی می‌شوند (١٤و ١٣). با توجه به مطالعات و مقالات در دسترس پیشنهاد شده است که پس از PDT تنها یک مسیری که سلول را به سمت مرگ هدایت کند وجود ندارد. در واقع بعد از PDT چندین آبشار سیگنالینگ درون سلولی به طور هم‌زمان فعال خواهند شد و اینکه در نهایت سلول کدام مسیر را برای مرگ یا بقاء انتخاب کند وابسته به شدت آسیب اکسیداتیو تحمیل شده به سلول می باشد (۱۵). آپوپتوز یک مکانیسم اصلی سرکوب تومور در بدن است. توانایی به راه انداختن آپوپتوز به واسطه روش‌های درمانی سرطان در سلول‌های توموری به عنوان یک طرح راهبردی مهم برای درمان سرطان به شمار می‌آید. از این رو در این مطالعه‌ی پژوهشی اثرات سایتوتوکسیک PDT به واسطه‌ی نانو ترکیب حساس به نور روی فتالوسیانین (ZnPc) بر روی رده‌ی سلولی SW872 مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به محدودیت عمق نفوذ نور در PDT، این روش درمانی برای درمان تومورهای جامد و سطحی کاربرد گسترده‌ای داشته و نتایج امیدار کننده‌ای به همراه داشته است. به همین جهت در این مطالعه رده‌ی سلولی SW872 سرطان پوست مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله‌ی بعد به منظور نظارت بر مکانیسم‌های سلولی و مولکولی این روش درمانی، میزان بیان ژن کاسپاز ۹ به عنوان کاسپاز آغازگر کلیدی مسیر داخلی آپوپتوز مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی

کشت سلولی: رده‌ی سلولی SW872 مربوط به سرطان پوست با منشاء انسانی از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. این رده‌ی سلولی در محیط کشت RPMI 1640 غنی شده با ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد پنی‌سیلین در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، فشار ۵ درصد از CO2 و ۹۵ درصد رطوبت در انکوباتور کشت داده شد. ترکیب حساس به نور روی فتالوسیانین از شرکت Sigma-Aldrich تهیه شد. این ماده دارای یک پیک جذبی ضعیف در ۳٤۰ نانومتر و ۹ یک پیک جذبی قوی در ٦۷۵ نانومتر می‌باشد. محلول ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر ZnPc با استفاده از حلال دی متیل سولفواکسید (DMSO) و محیط کشت که غلظت نهایی DMSO در محلول ۲ درصد می باشد، تهیه شد (١٦). سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر طیف جذبی ZnPc در حلال DMSO اندازه گیری شد. با رقیق کردن متوالی محلول در محیط کشت، غلظت‌های مختلف تا ۰/۰۰۰۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر به منظور تعیین IC50 تهیه شد. به منظور برانگیختن ترکیب حساس به نور، از لیزر دیودی با طول موج ٦۷۵ نانومتر و توان

۸۰ میلی وات به صورت پیوسته استفاده شد. سلول‌ها در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای و در هر چاهک به میزان ۱×۱۰^{٤} سلول کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور نگهداری شد. سلول‌ها در چهار گروه، گروه کنترل (فقط سلول)، گروه کنترل ترکیب حساس به نور (فقط ZnPc حل شده در DMSO)، گروه کنترل لیزر (فقط تابش لیزر) و گروه چهارم (گروه PDT) طبقه بندی شدند. پس از گذشت زمان ۲٤ ساعت، محیط کشت سلول‌های گروه‌های مورد نظر تخلیه شده و با غلظت‌های مختلف ۰/۰۰۰۰۱، ۰/۰۰۰۱، ۰/۰۰۱، ۰/۰۲۵/۰۱، ۰/۰،۰۷۵/۰۵، ۰/۰،۱/۰، ۱، ۲/۵ و ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر ZnPc در تاریکی به مدت ۲٤ ساعت انکوبه شدند. پس از گذشت ۲٤ ساعت از انکوباسیون، سلول‌ها با PBS شستشو داده شده و تحت تابش منبع نور با شاریدگی لیزر ۲٤ ژول بر سانتی‌متر مربع قرار گرفتند.

بررسی خاصیت سایتوتوکسیک PDT با روش MTT: برای بررسی اثرات سایتوتوکسیک PDT با ZnPc بر روی رده‌ی سلولی SW872 از تست MTT استفاده گردید. پس از گذشت مدت زمان ۲٤ ساعت از تابش نور لیزر، محلول MTT (۲میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تهیه شد و به چاهک‌های پلیت ۹٦ خانه‌ای اضافه گردید و به مدت ٤ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. پس از طی شدن زمان انکوباسیون، محلول رویی چاهک‌ها تخلیه گردید و ۲۰۰ میکرولیتر محلول DMSO به هر چاهک پلیت ۹٦ خانه‌ای اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در انکوباتور قرار گرفت. سپس توسط دستگاه الایزا ریدر جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA : بعد از کشت سلولی و تیمار سلول‌های SW872 با PDT، با استفاده از کیت ترایزول (Gene All, Korea) استخراج RNA طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. برای جداسازی RNA از کلروفرم و ایزوپروپانول و برای شستشوی آن از اتانول ۷۵ درصد استفاده شد. در نهایت با استفاده از دستگاه نانودراپ غلظت RNA های استخراج شده و کیفیت آنها اندازه‌گیری شد. پس از تعیین غلظت‌های RNA و انجام محاسبات مورد نظر، به‌وسیله کیت سنتز cDNA (TAKARA) و پیرو دستورالعمل شرکت سازنده cDNA نمونه‌های مورد نظر تهیه شد.

QRT-PCR: برای بررسی بیان ژن کاسپاز-۹ از تکنیک QRT-PCR استفاده شد. توالی پرایمرهای استفاده شده برای ژن کاسپاز-۹ و ژن *GAPDH* به عنوان کنترل داخلی در جدول ۱ آورده شده است. در IC50 به دست آمده، با استفاده از تکنیک QRT-PCR درصد تغییرات بیان ژن کاسپاز-۹ نسبت به گروه کنترل مشخص گردید.

جدول ۱: توالی پرایمر ژن‌های مورد بررسی

نام ژن	توالی پرایمر
GAPDH	**Forward: 5´ CCTCGTCCCGTAGACAAAA 3´** **Reverse: 5´ AATCTCCACTTTGCCACTG 3´**
Caspase 9	**Forward: 5´ CCGGAATCCTGCTTGGGTATC 3´** **Reverse: 5´ CATCGGTGCATTTGGCATGTA 3´**

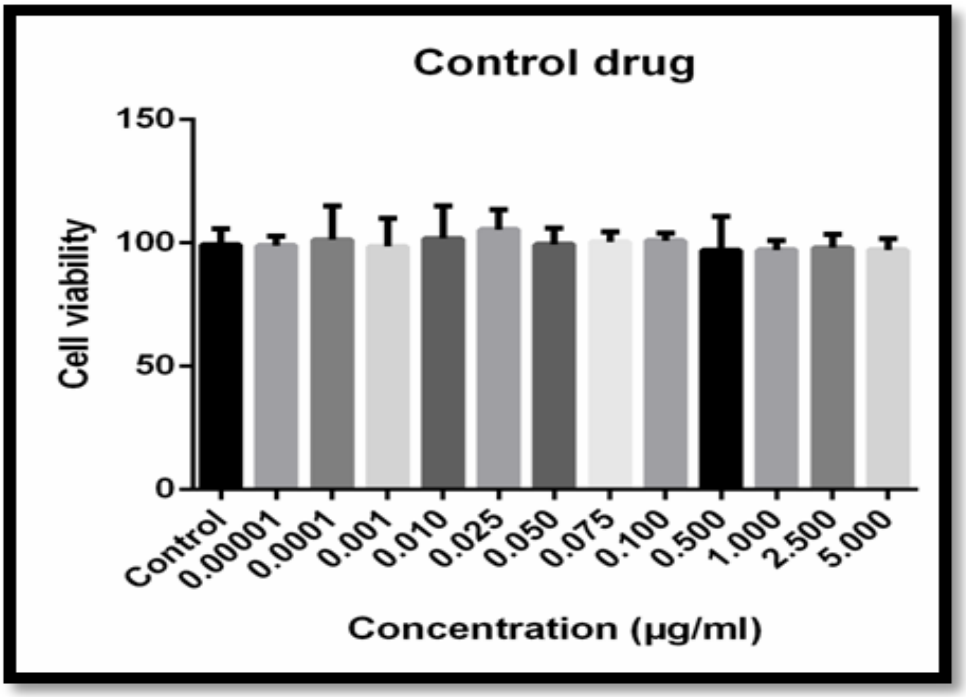
بررسی بیان ژن کاسپاز ۹ در فرآیند QRT-PCR به صورت سه گانه (Triplicate) انجام گردید و بیان نسبی ژن نسبت به گروه کنترل به وسیله‌ی $2^{-\Delta\Delta CT}$ اندازه گیری و نرمالیزه گردید.

آنالیز آماری: تمامی آنالیزهای MTT در ۳ تکرار انجام شد و با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism 6 میانگین ۳ بار تکرار و انحراف معیار آنها محاسبه

شد. با استفاده از این نرم افزار مقدار IC50 محاسبه گردید. معنادار بودن نتایج تست QRT-PCR با مقایسه‌ی گروه‌ها به کمک آزمون آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و با استفاده از نرم افزار آماری GraphPad Prism 6، با ۳ بار تکرار انجام گرفت.

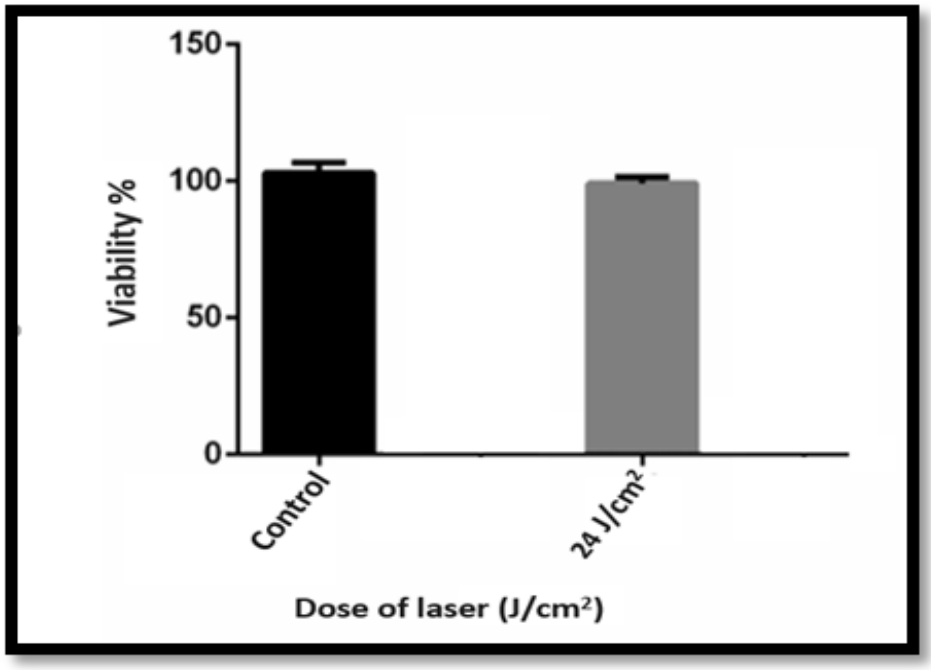
یافته ها

اثرات سایتوتوکسیک PDT با ZnPc: به منظور بررسی اثرات سایتوتوکسیک PDT با ZnPc و تعیین IC50، تست MTT صورت گرفت. نتایج حاصل از تیمار سلول‌های SW872 با غلظت‌های ۰/۰۰۰۰۱، ۰/۰۰۰۱، ۰/۰۰۱، ۰/۰۱، ۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۰۷۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۲/۵ و ۵ میکروگرم بر میلی لیتر از ZnPc به مدت ۲٤ ساعت در نمودار ۱ نشان داده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده ZnPc به تنهایی هیچ گونه اثر مهاری بر روی رشد سلول‌های SW872 ندارد.



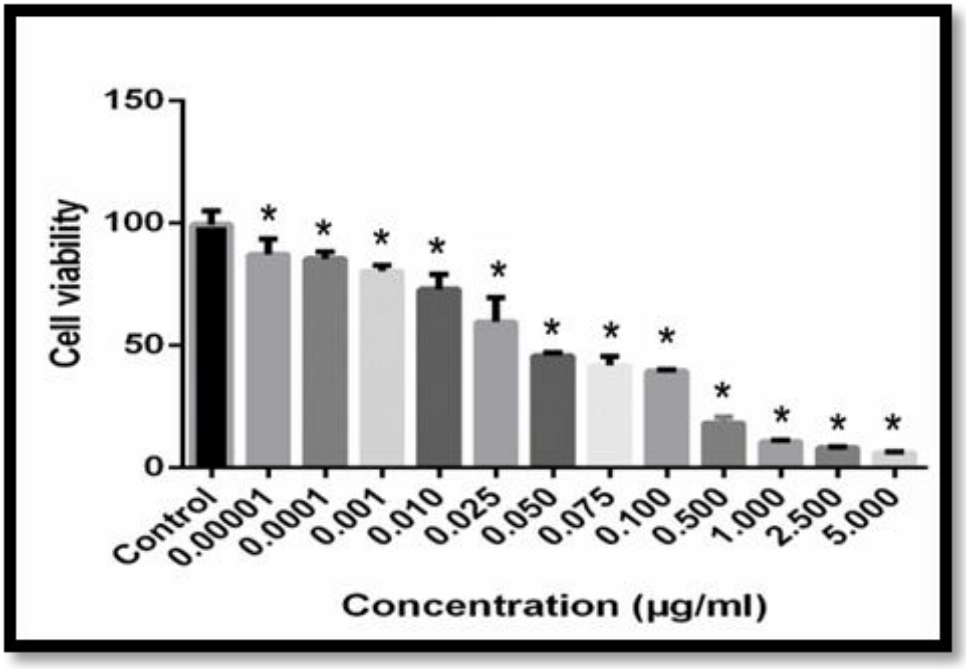
نمودار ۱: اثرات سایتوتوکسیک ZnPc بر روی سلول‌های SW872 در مدت زمان ۲٤ساعت. ترکیب حساس به نور ZnPc در تمامی غلظت‌های مورد استفاده هیچ گونه اثری بر روی زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی SW872 نداشته است.

منبع نور استفاده شده در این مطالعه لیزر دیودی با طول موج ٦٧٥ نانومتر می‌باشد. همانطور که در نمودار ۲ نشان داده شده است، منبع نور به تنهایی هیچ‌گونه اثر سمیتی بر روی سلول‌های SW872 نداشته است.



نمودار ۲: اثرات سایتوتوکسیک منبع نور با شاریدگی لیزر ۲٤ ژول بر سانتی‌متر مربع بر روی سلول‌های ***SW872*** *پس از گذشت ۲٤ساعت. دوز منبع نور استفاده شده در این مطالعه هیچ گونه اثری بر روی زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی* ***SW872*** *نداشته است.*

.

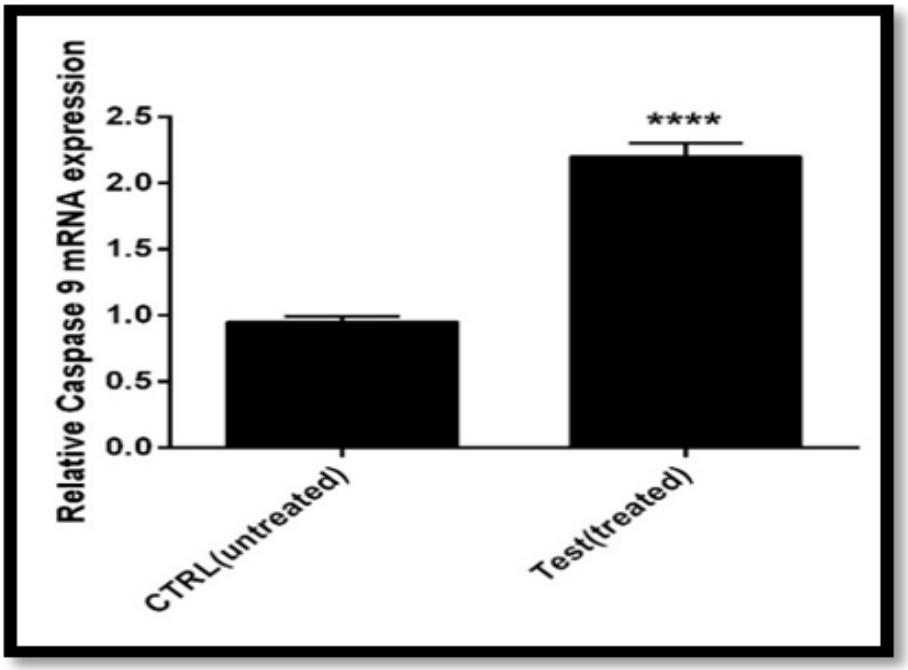


نمودار ۳: اثرات سایتوتوکسیک ***PDT*** *با* ***ZnPc*** *بر روی رده‌ی سلولی* ***SW872*** *پس از گذشت ۲٤ساعت. ستون‌هایی که با * نشان داده شده‌اند کاهش زیست‌پذیری معنادار سلول‌ها با* ***P<۰/۰۵*** *، نسبت به گروه کنترل را نشان می‌دهد.*

در مرحله‌ی بعد اثرات سایتوتوکسیک PDT با ZnPc بر روی رده‌ی سلولی SW872 تعیین شد. نتایج حاصل از تیمار سلول‌های SW872 با غلظت‌های ۰/۰۰۰۰۱، ۰/۰۰۰۱، ۰/۰۰۱، ۰/۰۰۲۵/۰۱، ۰/۰۰۷۵/۰۵، ۰/۰۱/۰، ۰/۰، ۱، ۲/۵ و ۵میکروگرم بر میلی‌لیتر از ZnPc و تابش لیزر با شاریدگی لیزر ۲۴ ژول بر سانتی‌متر مربع در نمودار ۳ آورده شده است.

همان‌طور که در نمودار مشاهده می‌شود با ثابت نگهداشتن دوز منبع نور، وابستگی معنا داری بین افزایش غلظت ZnPc و افزایش مرگ سلول‌های SW872 پس از PDT وجود دارد. به طوری که در بالاترین غلظت استفاده شده از ZnPc زیست‌پذیری سلول‌های SW872 به ٦ درصد کاهش یافت. مقدار IC50 پس از PDT با ZnPc برای سلول‌های SW872 با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism 6 محاسبه شد و برابر با ۰/۰۰۳ ± ۰/۰۳٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد.

تست QRT-PCR: میزان بیان ژن کاسپاز ۹ در IC50 به دست آمده از تست MTT، نسبت به گروه کنترل با استفاده از تست QRT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به‌دست آمده از این آزمایش میزان بیان ژن کاسپاز ۹ به صورت معناداری نسبت به گروه کنترل افزایش یافت (نمودار ٤). برای تخمین درصد تغییرات بیان ژن کاسپاز ۹ از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد که در آن ΔΔCT تفاوت سیکل آستانه ژن کاسپاز ۹ در مقایسه با ژن کنترل GAPDH در بین نمونه کنترل نسبت به نمونه‌های تیمار شده با PDT می‌باشد.



نمودار ٤: افزایش بیان ژن کاسپاز ۹ در سلول‌های SW872 تیمار شده با PDT (IC50) در مقایسه با گروه کنترل (فقط سلول) بدون تیمار پس از ٢٤ ساعت. ستونی که با * نشان داده شده است، افزایش معنادار بیان ژن کاسپاز ۹ را در سلول‌های تیمار شده به وسیله‌ی PDT با P< ۰/۰۰۱ نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد.***

بحث

PDT بیش از ۲۵ سال است که برای درمان بیماری سرطان استفاده می‌شود (۱۷) و در طول سال‌های گذشته به طور موفقیت‌آمیزی برای درمان انواع سرطان از جمله سرطان‌های اولیه ریه (۱۹و ۱۸)، تومور مغزی (۲۱و ۲۰)، سر

و ضایعات گردن (۲۳و ۲۲) به کار برده شده است. PDT نسبت به روش‌های درمانی مرسوم سرطان دارای مزیت‌های بسیاری است که از جمله این مزیت‌ها، هدف‌مندی و غیرتهاجمی بودن آن می‌باشد. از سال ۱۹۷۰ مطالعات به منظور تکوین این روش درمانی گسترش یافته است (۲٤). براساس مطالعات انجام گرفته، پس از PDT ممکن است سیگنال‌های درون سلولی متفاوتی فعال شوند که در نهایت تعیین کننده‌ی مرگ و یا بقاء سلول‌های سرطانی خواهند بود (۱۵). به وضوح آگاه هستیم که امروزه تنها میزان مرگ سلول‌های سرطانی به عنوان کارآمد بودن روش درمانی مطرح نمی‌باشد، بلکه نوع مرگ سلولی ایجاد شده در پاسخ به درمان بسیار حائز اهمیت خواهد بود. مرگ سلولی آپوپتوز به طور کلی از دو مسیر مولکولی داخلی و خارجی فعال می‌شود. مشخصه‌ی اصلی مسیر داخلی از بین رفتن تمامیت غشای میتوکندری است. این مسئله منجر به آزادسازي پروتئين‌هاي فضاي بين دو غشاي ميتوكندري به درون سيتوپلاسم می‌شود که از مهم‌ترین آنها می‌توان به سیتوکروم c اشاره کرد. به طور کلی سیتوکروم c تشکیل آپوپتوزوم را القا کرده که باعث فعال شدن کاسپاز ۹ مي‌گردد. فعال شدن کاسپاز ۹ منجر به راه اندازی مرگ سلولی آپوپتوز وابسته به کاسپاز از مسیر داخلی خواهد شد (۲۵). القای آپوپتوز به عنوان یک مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده محور اصلی تمام پژوهش‌ها در زمینه درمان سرطان می‌باشد. به منظور بررسی مرگ سلولی آپوپتوز از روش‌های مختلفی شامل بررسی تغییرات مورفولوژی سلول‌های تحت درمان، تست TUNEL، فلوسایتومتری، فعال شدن کاسپازها و ژن‌های دخیل در القای آپوپتوز استفاده می‌شود.

در این مطالعه در مرحله‌ی اول برای بررسی اثرات سایتوتوکسیک PDT با ترکیب حساس به نور ZnPc بر روی رده‌ی سلولی SW872 از تست MTT استفاده شد. میزان اثرات سایتوتوکسیک القا شده با این روش درمانی در ارتباط مستقیم با غلظت ترکیب حساس به نور می‌باشد و زیست‌پذیری سلول‌ها با افزایش غلظت ترکیب حساس به نور کاهش می‌یابد. در بالاترین غلظت استفاده شده از ترکیب حساس به نور که ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بوده است، زیست‌پذیری سلول‌های سرطانی تا ٦ درصد کاهش یافته است. بر اساس این مطالعه ترکیب حساس به نور در تمامی غلظت‌های استفاده شده و همچنین منبع نور به تنهایی هیچ گونه اثر مهاری معناداری بر روی رشد سلول‌های سرطانی نداشته است. بنابراین این دو پارامتر تنها زمانی که با هم در بافت هدف ترکیب شوند، منجر به مرگ هدفمند سلول‌های سرطانی خواهند شد. این ویژگی برای به حداقل رساندن آسیب به سلول‌ها و بافت‌های سالم بدن بسیار مهم می‌باشد.

در مطالعه‌ای که توسط پدر و همکارانش انجام شد، فعالیت فوتودینامیکی روی فتالوسیانین کپسوله شده در نانو ذرات PMMA بر روی دو رده‌ی سلولی Jurkat و K562 بررسی شد. نتایج نشان‌دهنده‌ی اثر مهاری این روش درمانی بر روی رشد این سلول‌های سرطانی بود (۲٦).

در مطالعه‌ی دیگری توسط سناته و همکارانش بر روی رده‌ی سلولی HeLa با ترکیب حساس به نور ZnPc در دو زمان انکوباسیون ۱ ساعت و ۳ ساعت انجام شد، مشخص شد که این ترکیب حساس به نور به تنهایی هیچ گونه اثرات سایتوتوکسیک بر روی این رده‌ی سلولی نداشته و تنها زمانی که با منبع نور مناسب ترکیب شد، به ترتیب زیست‌پذیری سلول‌ها به ۸ درصد و ٤ درصد کاهش پیدا کرد (۲۷).

مطالعه‌ای براساس PDT با ZnPc توسط ریوارولا و همکارانش بر روی رده ی سلولی MCF-7c3 صورت گرفت. جنبه‌ی متفاوت این تحقیق ارائه‌ی تغییراتی در ساختار ZnPc بود و این ترکیب جدید علیرغم ویژگی ذاتی خود (درجه‌ی هیدروفوبی بالا) در آب حل می‌شود. نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده‌ی کاهش رشد سلول‌های سرطان پستان پس از تیمار با PDT بود. نتایج حاصل از این مطالعات

با نتایج به دست آمده در این مطالعه مشابه بوده است (۲۸). هدف اصلی این مطالعه بررسی مسیر داخلی آپوپتوز با تعیین تغییرات بیان ژن کاسپاز ۹ در IC50 به دست آمده نسبت به گروه کنترل به وسیله‌ی تست QRT-PCR بوده است. بر اساس نتایج به دست آمده از این تست میزان بیان ژن کاسپاز ۹ در IC50 به دست آمده به طور معناداری نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است. این افزایش بیان ژن کاسپاز ۹ نشان دهنده‌ی تاثیر این روش درمانی بر روند القای آپوپتوز از طریق مسیر داخلی در رده‌ی سلولی SW872 تیمار شده با PDT می‌باشد. مطالعه‌ای توسط جیا و همکارانش به منظور بررسی اثر فوتودینامیکی روی فتالوسیانین حل شده در حلال Cremophor EL بر روی رده‌ی سلولی HepG2 انجام شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده‌ی افزایش بیان ژن کاسپاز ۹ در این رده‌ی سلولی پس از تیمار با PDT بود(۲۹). در مطالعه‌ی حاضر تیمار سلول‌های SW872 با PDT به وسیله‌ی ترکیب حساس به نور ZnPc باعث القای آپوپتوز از طریق مسیر داخلی در این سلول‌ها شده و اثرات سایتوتوکسیک القا شده توسط فعالیت فوتودینامیکی ZnPc در ارتباط مستقیم با غلظت آن می‌باشد. به طوری که درصد زیست‌پذیری سلول‌ها با افزایش غلظت ZnPc کاهش می‌یابد. با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه PDT به وسیله‌ی ZnPc یک روش درمانی قدرتمند با کمترین تهاجم برای درمان سرطان پوست است.

نتیجه گیری

نتایج به دست آمده در این مطالعه ضمن تایید پژوهش‌های پیشین درباره‌ی PDT با ترکیب حساس به نور ZnPc به عنوان یک روش درمانی موثر برای درمان سرطان پوست، تاثیر آن را بر روی القای آپوپتوز از طریق مسیر داخلی در رده‌ی سلولی SW872 را نیز تایید کرد. لازم به ذکر است که برای تایید نتایج به دست آمده در این مطالعه می‌توان از روش‌های دیگری نظیر تست TUNEL، فلوسایتومتری و بررسی سایر ژن‌های دخیل در القای آپوپتوز استفاده کرد. همچنین بررسی اثر PDT با ZnPc در شرایط In vivo برای بررسی کاربردهای بالینی آن از ارزش بالایی برخوردار است. محدودیت اصلی این روش درمانی توانایی تحویل نور به بافت‌های تومورال غیرسطحی می‌باشد. به همین منظور مطالعات در زمینه‌ی استفاده از فیبرهای نوری در PDT گسترش یافته است. این روش درمانی تنها در زمینه درمان سرطان کاربرد ندارد و می‌توان از آن در زمینه‌هایی مانند چشم پزشکی، دندان پزشکی، درمان بیماری‌ها و ضایعه‌های پوستی و غیره استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

از جناب آقای دکتر حبیب تجلی عضو هیئت علمی پژوهشکده‌ی فیزیک کاربردی و ستاره‌شناسی دانشگاه تبریز به خاطر حمایت‌های بی‌دریغشان نهایت تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از ریاست محترم مرکز تحقیقات ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی تبریز جناب آقای دکتر بهزاد برادران و از آقای دکتر بهزاد منصوری و آقای علی محمدی و تمامی همکاران مرکز تحقیقات ایمونولوژی که در انجام این تحقیق و ارتقای کیفی آن ما را یاری کردند نهایت تشکر و قدردانی را داریم.

References

1- Lucky SS, Soo KC, Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy. *Chemical Rev.* 2015; 115: 1990-2042.

2- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000; 100: 57-70.

3- Omar S, Alieldin N, Khatib O. Cancer magnitude, challenges and control in the Eastern Mediterranean region. 2007.

4- Diepgen TL, Mahler V. The epidemiology of skin cancer. *Br J Dermatol.* 2002; 146: 1-6.

5- Marjani A, Kabir MJ. Male skin cancer incidence in Golestan province, Iran. *J Pakistan Med Assoc.* 2009; 59: 287.

6- Rigel DS, Carucci JA. Malignant melanoma: prevention, early detection, and treatment in the 21st century. CA: *Cancer J Clin.* 2000; 50: 215-36.

7- Ghoncheh M, Koohi F, Salehiniya H. Epidemiology and trend of skin cancer incidence in southern Iran. *J Dermatol Cosmet.* 2015; 6: 85-92.

8- Keyghobadi N, Rafiemanesh H, Mohammadian-Hafshejani A, Enayatrad M, Salehiniya H. Epidemiology and trend of cancers in the province of Kerman: southeast of Iran. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015; 16: 1409-13.

9- Mackie R, Quinn A. Non‐melanoma skin cancer and other epidermal skin tumours. Rook's Textbook of Dermatology, Seventh Edition. 2004: 1801-50.

10- Mirzaei M, Razi S, Ghoncheh M, Mohammadian Hafshejani A, Salehiniya H. Skin cancer incidence rate and trend in 2004-2008 in Tehran province. *J Dermatol Cosmet.* 2015; 5: 193-9.

11- Yano S, Hirohara S, Obata M, et al. Current states and future views in photodynamic therapy. *Photochem Rev.* 2011; 12: 46-67.

12- Spyratou E, Makropoulou M, Mourelatou E, Demetzos C. Biophotonic techniques for manipulation and characterization of drug delivery nanosystems in cancer therapy. *Cancer letters.* 2012; 327: 111-22.

13- Prasad PN. Introduction to biophotonics: John Wiley & Sons; 2004.

14- Sharifi M, Moosavi M, Naji T. Effect of nitrogen-nano doped of titanium dioxide in human A-375 melanoma cancer cell line. 2017.

15- Mroz P, Yaroslavsky A, Kharkwal GB, Hamblin MR. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers.* 2011; 3: 2516-39.

16- Navaeipour F, Afsharan H, Tajalli H, et al. Effects of continuous wave and fractionated diode laser on human fibroblast cancer and dermal normal cells by zinc phthalocyanine in photodynamic therapy: A comparative study. *J Photochem Photobiol.* 2016; 161: 456-62.

17- Deda DK, Araki K. Nanotechnology, Light and chemical action: an effective combination to kill cancer cells. *J Brazil Chem Soc.* 2015; 26: 2448-70.

18- Cortese DA, Kinsey JH. Hematoporphyrin derivative phototherapy in the treatment

of bronchogenic carcinoma. *Chest.* 1984; 86: 8-13.

19- Hayata Y, Kato H, Konaka C, Ono J, Takizawa N. Hematoporphyrin derivative and laser photoradiation in the treatment of lung cancer. *Chest.* 1982; 81: 269-77.

20- Hill JS, Kaye AH, Sawyer WH, Morstyn G, Megison PD, Stylli SS. Selective uptake of hematoporphyrin derivative into human cerebral glioma. *Neurosurgery.* 1990; 26: 248-54.

21- Laws Jr ER, Cortese DA, Kinsey JH, Lagan RT, Anderson RL. Photoradiation therapy in the treatment of malignant brain tumors: a Phase I (feasibility) study. *Neurosurgery.* 1981; 9: 672-8.

22- Schweitzer VG. Photodynamic therapy for treatment of head and neck cancer. *Otolaryngology Surg.* 1990; 102: 225-32.

23- Wenig BL, Kurtzman DM, Grossweiner LI, et al. Photodynamic therapy in the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. 1990; 116: 1267-70.

24- Barnes LD, Giuliano EA, Ota J, Cohn LA, Moore CP. The effect of photodynamic therapy on squamous cell carcinoma in a murine model: evaluation of time between intralesional injection to laser irradiation. *Veterinary J.* 2009; 180: 60-5.

25- Debele TA, Peng S, Tsai H-C. Drug carrier for photodynamic cancer therapy. *Int J Molec Sci.* 2015; 16: 22094-136.

26- Feuser PE, Gaspar PC, Jacques AV, et al. Synthesis of ZnPc loaded poly (methyl methacrylate) nanoparticles via miniemulsion polymerization for photodynamic therapy in leukemic cells. *Material Sci Engin:* C. 2016; 60: 458-66.

27- Soriano J, Villanueva A, Stockert JC, Cañete M. Regulated necrosis in HeLa cells induced by ZnPc photodynamic treatment: A new nuclear morphology. *Int J Molec Sci.* 2014; 15: 22772-85.

28- Vittar NBR, Awruch J, Azizuddin K, Rivarola V. Caspase-independent apoptosis, in human MCF-7c3 breast cancer cells, following photodynamic therapy, with a novel water-soluble phthalocyanine. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010; 42: 1123-31.

29- Shao J, Dai Y, Zhao W, et al. Intracellular distribution and mechanisms of actions of photosensitizer Zinc (II)-phthalocyanine solubilized in Cremophor EL against human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Cancer letters*. 2013; 330: 49-56.

Investigation of Caspase 9 Gene Expression and Apoptosis Induction after Photodynamic Therapy with Zinc Phthalocyanine in SW872 Skin Cancer Cell Line

Doustvandi MA[1], Mohammadnejad F[1], Mashayekhi M[1]

[1]Dept. of Genetics, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Tabriz, Iran

Corresponding Author: Mashayekhi M, Dept. of Genetics, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Tabriz, Iran

E-mail: m.mashayekhi@iaut.ac.ir

Received: 9 Apr 2017 **Accepted:** 24 Jul 2017

Background and Objective: The treatment of cancer comes as a great challenge worldwide. Thus the development of effective therapies with minimal side effects is important. Photodynamic therapy is a non-invasive and new therapeutic approach for the treatment of cancer. Therefore, in this study, we evaluated the photodynamic effects of a light-sensitive compound, Zinc-phthalocyanine (ZnPc), on cell growth and the expression of caspase-9 in SW872 cell line.

Materials and Methods: For cytotoxic effects of photodynamic therapy with ZnPc, MTT assay was conducted. Quantifying the level of caspase-9 gene expression was carried out with qRT-PCR. The statistical analysis was done by GraphPad Prism 6 software.

Results: MTT assay results showed that photodynamic therapy with ZnPc significantly reduced cancer cell growth. The IC50 for cell line SW872 was 0/034 µg/ml in a 24 J/cm2 light source. qRT-PCR results showed that photodynamic therapy with ZnPc increased the gene expression of caspase-9 in the treated group.

Conclusion: Photodynamic therapy with ZnPc resulted in decreased cell growth and induced apoptosis in a concentration-dependent manner in SW872 cell lines. Based on the results, photodynamic therapy with ZnPc can be a powerful therapeutic approach for the treatment of skin cancer with minimal side effect**s**.

Key Words: Photodynamic therapy, Caspase 9, Apoptosis, SW872