

مقایسه اثر دو منبع نور لیزری متفاوت بر بازده درمان فتودینامیکی سرطان پستان در شرایط برون تنی

مروارید تعبدی^۱، دکتر مهناز هادی‌زاده^۲، مریم جهانشیری مقدم^۳

نویسنده‌ی مسول: تهران، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده‌ی زیست فناوری Hadizadehmahnaz@gmail.com

دریافت: ۹۳/۱۰/۳ پذیرش: ۹۴/۴/۴

چکیده

زمینه و هدف: درمان فتودینامیکی روش جدیدی برای درمان سرطان است. درمان فتودینامیکی از یک داروی غیر فعال و یک منبع نور برای فعال کردن دارو جهت تولید گونه‌های اکسیژن فعال برای از بین بردن سلول‌های سرطانی استفاده می‌کند. در مطالعه‌ی حاضر، اثر دو منبع متفاوت نور لیزری بر بازده درمان فتودینامیکی بر روی یک رده‌ی سلولی سرطان پستان مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: سلول‌های *MDA-MB-231* در پلیت‌های ۹۶ خانه رشد داده شدند. بعد از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف ۵- آمینولولینیک اسید، سلول‌ها با دوز نوری ۱۰ و یا ۲۰ ژول بر سانتی‌متر مربع توسط دو منبع نور لیزری متفاوت تحت تابش قرار گرفتند. توان زیستی سلول‌ها با استفاده از روش *MTT* اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که ۵- آمینولولینیک اسید در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌مولار در فقدان نور، اثر سینتوتوکسیک قابل توجهی بر روی سلول‌های سرطانی پستان ندارد اما تیمار سلول‌ها با ۵- آمینولولینیک اسید و دوز نوری ۲۰ ژول بر سانتی‌متر مربع با استفاده از لیزر لازوترونیک و لیزر موستانگ به ترتیب منجر به کاهش توان زیستی سلول‌ها به ۶۵ و ۸۰ درصد شد.

نتیجه‌گیری: نتیجه این مطالعه در شرایط برون تنی نشان داد که منبع نور مورد استفاده در درمان فتودینامیکی نقش مهمی در بازده این روش درمانی دارد و اینکه فعال شدن نوری ۵- آمینولولینیک اسید در یک غلظت حساس به نور توسط منبع نور لیزری مناسب، پتانسیل کشتن سلول‌های سرطانی پستان را دارد.

واژگان کلیدی: درمان فتودینامیکی، منبع نور، لیزر، سرطان پستان

مقدمه

متاسفانه هر کدام از این روش‌ها دارای معایبی هستند. عمل جراحی معمولاً با عوارض گسترده‌ای همراه است (۳). شیمی درمانی سیستمیک نیز برای بیماران بسیار تهاجمی است و اغلب بافت سالم را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد. علاوه بر این منجر به مقاومت اولیه یا ثانویه سلول‌های سرطانی

سرطان‌های زنان به‌خصوص سرطان پستان به عنوان یکی از مشکلات اصلی در زمینه‌ی سلامت زنان مطرح است. سرطان پستان دومین علت مرگ ناشی از سرطان در زنان محسوب می‌شود (۲ و ۱). جراحی و شیمی درمانی از روش‌های متداول برای درمان سرطان پستان هستند ولی

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد نانو بیوتکنولوژی، پژوهشکده‌ی زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

۲- دکترای بیوشیمی، استادیار پژوهشکده‌ی زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

۳- کارشناس شیمی، کارشناس مرکز تحقیقات لیزر پزشکی، جهاد دانشگاهی دانشگاه علوم پزشکی تهران

بدن وجود دارد ولی ماده‌ای حساس به نور نمی‌باشد. این ماده در مسیر سنتز هم (Heme) به عنوان پیش ساز بیولوژیکی عمل می‌کند. در این مسیر بیوسنتزی، دو مرحله‌ی محدود کننده‌ی سرعت وجود دارد. اولین مرحله‌ی تولید 5-ALA از گلیسین و سوکسینیل کوآ می‌باشد که از طریق یک مکانیسم بازخورد منفی توسط Heme تنظیم می‌شود. مرحله‌ی دوم، تبدیل پروتوپورفیرین ۹ (PpIX) به Heme است که توسط یک آنزیم محدود کننده‌ی سرعت به نام فروشلاتاز 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 و تجمع بیشتر PpIX در بافت سرطانی می‌شود (۱۸-۱۵). از منابع نوری مختلفی مانند انواع لیزرها، لوله‌های فلورسانس نور آبی، لامپ‌های قوس گزنون یا هالوژن فیلتر شده و ردیف‌های دیودی منتشرکننده‌ی نور (LED) جهت تابش نور در درمان فتودینامیکی استفاده می‌شود. اما گزارش شده است که لیزر به دلیل انتشار نور تک رنگ و همدوس، منبع نور ایده آل برای درمان فتودینامیکی می‌باشد. طول موج و توان خروجی لیزر مورد استفاده، دو فاکتور کلیدی و مهم در موفقیت این روش درمانی محسوب می‌شوند (۱۹). بنابراین با وجود اینکه آزمایش‌های متعددی در زمینه‌ی بررسی جنبه‌ی اثر بخشی درمان فتودینامیکی با واسطه‌ی 5-ALA و با استفاده از منابع نوری مختلف بر روی رده‌های سلولی مختلف انجام شده است ولی هنوز لازم است که تحقیقات بیشتری در این زمینه صورت گیرد (۲۳-۲۰). در این راستا هدف ما از این مطالعه بررسی و مقایسه‌ی اثر دو منبع نور لیزری لازروترونیک و موستانگ با توان خروجی متفاوت و همچنین نور قرمز با طول موج متفاوت در میزان بازده درمان فتودینامیکی با واسطه‌ی 5-ALA بر روی یکی از رده‌های سلولی سرطان پستان (MDA-MB-231) است که کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است.

می‌شود. از این رو، بررسی روش‌های درمانی دیگر با اثرات تهاجمی کمتر، پیش‌بینی شده است. از جمله‌ی این روش‌ها می‌توان به درمان فتودینامیک (Photodynamic Therapy) اشاره کرد. درمان فتودینامیکی، روشی با اثر تهاجمی کم و راهبرد ضد سرطانی امیدوارکننده‌ای است که مبتنی بر سه فاکتور نور، ماده‌ی حساس به نور و اکسیژن است. هر یک از این عوامل به خودی خود سمی نیستند، اما ترکیب آن‌ها باعث تولید گونه‌های اکسیژن منفرد یا گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) با اثر سمیت سلولی می‌شود. انتقال موثر ماده‌ی حساس به نور از عرض غشا و تجمع داخل سلولی آن از مهم ترین عناصر در درمان فتودینامیکی است. بسته به خواص فیزیکی - شیمیایی و مکانیسم جذب، حسگرهای نوری می‌توانند در غلظت‌های مختلف در بخش‌های مختلف سلول تجمع یابند (۴ و ۵). آسیب درمان فتودینامیکی به سلول‌های سرطانی از طریق القای مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول به نام آپوپتوز از طریق مسیر سیگنال دهی شامل کاسپازها، اعضای خانواده Bcl-2 و فاکتور القای آپوپتوز انجام می‌شود (۶ و ۷). درمان فتودینامیکی همچنین از طریق القای نکروز و اتوفاگوسیتوز، مرگ سلولی را منجر می‌شود (۸). نتایج بسیاری از تحقیقات حاکی از آن است که این روش درمانی، غشای پایه‌ی رگ‌های خونی تومور را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۹). همچنین برخلاف جراحی، شیمی درمانی و پرتو درمانی که اغلب سبب سرکوب سیستم ایمنی می‌شوند، درمان فتودینامیکی باعث التهاب حاد، بیان پروتئین‌های شوک حرارتی، تهاجم و نفوذ لکوسیت‌ها به تومور و افزایش آرایه‌ی آنتی ژن T می‌شود (۱۰). درمان فتودینامیکی همچنین می‌تواند سبب تخریب DNA و RNA سلولی شود و بر مسیر استرس اکسیداتیو و تکثیر سلولی اثر گذار باشد (۱۱). ۵-آمینولولینیک اسید (5-ALA) دارویی است که با موفقیت برای تشخیص و درمان بافت سرطانی مورد استفاده قرار گرفته است (۱۴-۱۲). 5-ALA به صورت طبیعی در

روش بررسی

کشت سلول: سلول‌های MDA-MB-231 از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. سلول‌ها (1×10^4) سلول در هر چاهک) در محیط کشت DMEM به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، در شرایط ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، CO_2 ۵ درصد و رطوبت ۹۵ درصد کشت داده شدند.

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

بررسی سمیت تاریکی ۵-آمینولولینیک اسید: برای بررسی سمیت سلولی 5-ALA در غیاب نور (سمیت تاریکی) در هر چاهک از پلیت‌های کشت سلولی ۹۶ خانه‌ای، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی ریخته شد و پلیت‌ها در انکوباتور (۳۷ درجه‌ی 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 به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و میزان مرگ و میر سلولی با استفاده از تست رنگ سنجی ۳، ۴، ۵ دی‌متیل تیازول ۲-۲ ایل ۲، ۵ دی‌فنیل تترازولیوم (MTT) بررسی شد (۲۴).

بررسی اثر نور بر سلول‌های MDA-MB-231: جهت بررسی اثر سمیت نوری لیزر لازوترونیک ابتدا سوسپانسیون سلولی MDA-MB-231 در محیط کشت DMEM به همراه 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 ژول بر سانتی متر مربع قرار گرفتند. سپس محیط کشت سلول‌ها با محیط کشت DMEM حاوی FBS ۱۰ درصد تعویض و بعد از ۲۴ ساعت توان زیستی سلول‌ها از طریق سنجش MTT بررسی شد (۲۴).

بررسی توان زیستی سلول‌ها: سمیت نوری القا شده توسط درمان فتودینامیکی با استفاده از سنجش MTT بررسی شد. سنجش MTT بر اساس فعالیت آنزیم دهیدروژناز میتوکندری است که فقط در سلول‌های زنده فعالیت دارد و می‌تواند نمک تترازولیوم محلول در آب را به ترکیب نامحلول فورمازان بنفش رنگ تبدیل کند.

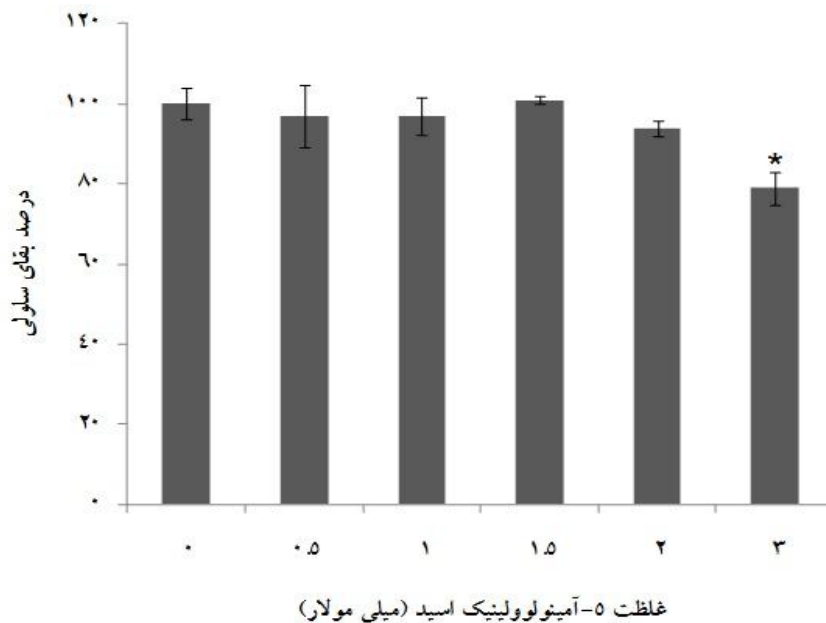
به منظور بررسی توان زیستی سلول‌ها، ۲۴ ساعت بعد از تابش لیزر، محیط رویی دور ریخته شد و سلول‌ها با PBS شستشو داده شدند. سپس به هر چاهک محلول ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر MTT افزوده شد و پلیت به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس محتویات چاهک‌ها تخلیه و ۱۰۰ میکرولیتر محلول دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) به‌عنوان حلال بلورهای فورمازان به هر چاهک اضافه شد. سنجش جذب نوری مربوط به هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الیزاریدر 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 (۲۵).

آنالیز آماری: در این مطالعه همه‌ی آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند و نتایج به‌صورت میانگین سه بار تکرار \pm خطای استاندارد نشان داده شد. تحلیل آماری داده‌ها با نرم‌افزار SPSS با روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و T-test انجام شد و داده‌ها با ارزش $P < 0/05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

اثر سمیت تاریکی ۵-آمینولولینیک اسید بر توان زیستی سلول‌ها: سلول‌های MDA-MB-231 با داروی 5-ALA با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۳ میلی‌مولار به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. همان‌طور که در نمودار ۱ نشان داده شده

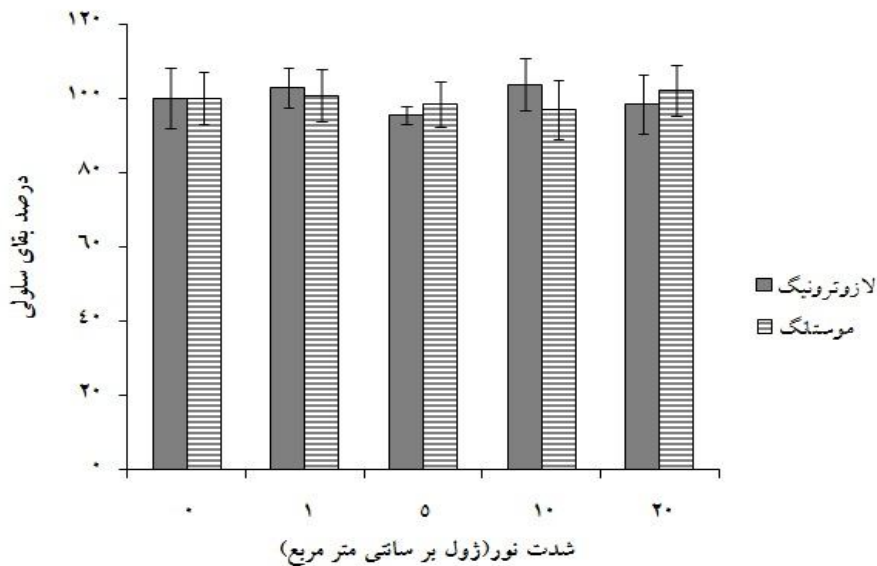
است، سمیت تاریکی داروی 5-ALA در غلظت‌های ۰/۵ تا ۲ میلی‌مولار در مقایسه با گروه کنترل (بدون دارو) بسیار ناچیز و از نظر آماری معنی‌دار نبود. اما غلظت ۳ میلی‌مولار 5-ALA به میزان (۲۱±۴) درصد، توان زیستی سلول‌ها را کاهش داد.



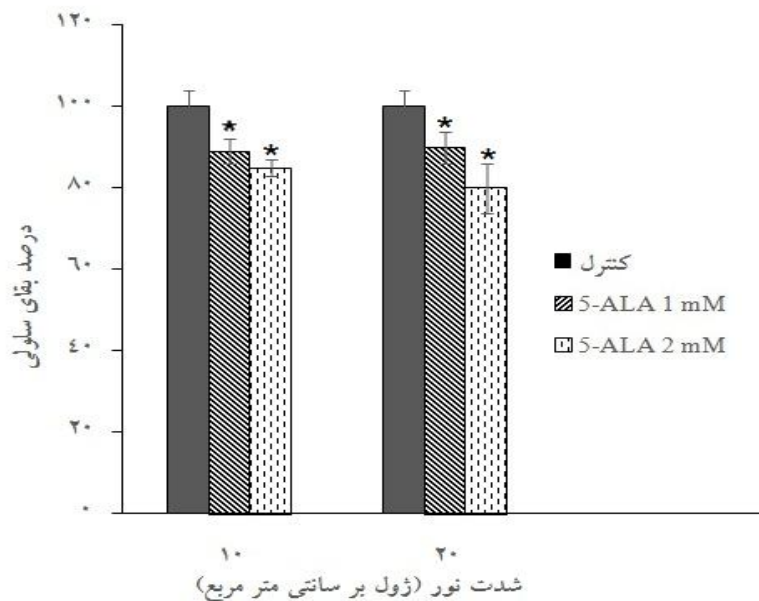
نمودار ۱: اثر سمیت تاریکی غلظت‌های مختلف ۵-آمینولولینیک اسید بر توان زیستی سلول‌های MDA-MB-231. توان زیستی سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف ۵-آمینولولینیک اسید با استفاده از آزمون *MTT* مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج به صورت میانگین سه تکرار مستقل ± خطای استاندارد نمایش داده شده است. * $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

لیزر لازرترونیک: نتایج آزمایش‌های مربوط به اثر درمان فتودینامیکی با استفاده از 5-ALA نشان داد که 5-ALA با غلظت ۱ میلی‌مولار تحت تابش لیزر لازرترونیک با دوزهای نوری ۱۰ و ۲۰ ژول بر سانتی‌متر مربع تاثیر چندانی بر کاهش توان زیستی سلول‌های MDA-MB-231 نداشت (حدود ۱۰ درصد کاهش)، ولی در غلظت ۲ میلی‌مولار 5-ALA به ترتیب ۱۵ و ۲۰ درصد کاهش در توان زیستی سلول‌ها با دوز نوری ۱۰ و ۲۰ ژول بر سانتی‌متر مربع مشاهده شد (نمودار ۳).

اثر سمیت نوری لیزر لازرترونیک و موستانگ بر توان زیستی سلول‌های MDA-MB-231: سلول‌ها بدون حضور ماده ی حساس به نور در معرض تابش لیزر لازرترونیک و موستانگ با دوز تابشی ۱، ۵، ۱۰ و ۲۰ ژول بر سانتی‌متر مربع قرار گرفتند. نتایج به دست آمده بیانگر این است که تابش نور با دوزهای نوری ذکر شده منجر به مرگ سلولی نشده و به تنهایی برای سلول‌ها کشنده نیست (نمودار ۲). بازده درمان فتودینامیکی با واسطه‌ی 5-ALA با استفاده از



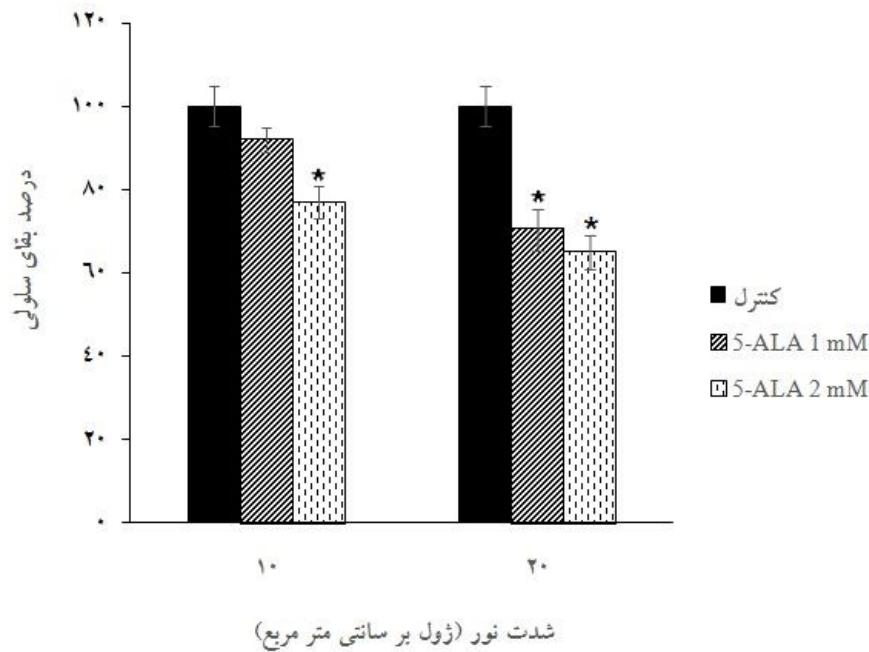
نمودار ۲. اثر دوزهای نوری مختلف بر توان زیستی سلول‌های *MDA-MB-231*. دوزهای مختلف نور از ۱ تا ۲۰ ژول بر سانتی‌متر مربع با استفاده از لیزر لائوترونیک و موسنانگ مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج به صورت میانگین سه تکرار مستقل \pm خطای استاندارد نمایش داده شده است.



نمودار ۳. اثر درمان فتودینامیکی با واسطه‌ی 5-ALA و منبع نوری لیزر لائوترونیک بر توان زیستی سلول‌های *MDA-MB-231*. از دو دوز ۱۰ و ۲۰ ژول بر سانتی‌متر مربع با طول موج ۶۶۰ نانومتر برای برانگیختگی نوری 5-ALA استفاده شد. نتایج به صورت میانگین سه تکرار مستقل \pm خطای استاندارد نمایش داده شده است. $P < 0.05^*$ معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

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 به ترتیب منجر به ۲۳ و ۳۵ درصد کاهش در توان زیستی سلول‌ها شد (نمودار ۴).

بازده درمان فتودینامیکی با واسطه‌ی 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 تاثیری بر توان زیستی سلول‌ها نداشت اما با افزایش دوز



نمودار ۴. اثر درمان فتودینامیکی با واسطه‌ی 5-ALA و منبع نوری لیزر موستانگ بر توان زیستی سلول‌های MDA-MB-231 از دو دوز ۱۰ و ۲۰ ژول بر سانتی‌متر مربع با طول موج ۶۳۳ نانومتر برای برانگیختگی نوری 5-ALA استفاده شد. نتایج به صورت میانگین سه تکرار مستقل \pm خطای استاندارد نمایش داده شده است. * $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

نوری متعاقب آن منجر به تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود. این رادیکال‌های آزاد در نهایت باعث القای مرگ در سلول‌های سرطانی از طریق آپوپتوزیس و یا نکروز می‌شوند (۲۶). در درمان فتودینامیکی از منابع نوری مختلفی مانند انواع لیزرها، لوله‌های فلورسانس نور آبی، لامپ‌های قوس گزنون یا هالوژن فیلتر شده و ردیف‌های دیودی منتشرکننده‌ی نور (LED) جهت تابش نور استفاده می‌شود که هر کدام مزایا و

بحث

اخیراً استفاده از روش‌های ایمن و غیر تهاجمی همچون روش فتودینامیکی در درمان سرطان بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در درمان فتودینامیکی پس از تجویز یک ماده‌ی حساس به نور و تجمع کافی آن در بافت مورد نظر، نور با طول موج و انرژی مناسب به محل هدف تابانده می‌شود. برانگیختگی ماده‌ی حساس به نور و یک سری واکنش‌های

گزارشات متعددی درباره افزایش رشد و بقای سلول‌های مختلف توسط نور لیزر وجود دارد. در واقع اثر تحریکی یا مهاری نور بر روی رشد سلول به طول موج و شدت آن و نوع سلول مورد مطالعه بستگی دارد (۳۰ و ۲۹). با توجه به عدم سمیت 5-ALA و عدم سمیت نور بر روی سلول‌های مذکور، می‌توان نتیجه گرفت که هرگونه کاهش در رشد و توان زیستی این سلول‌ها ناشی از اثر درمان فتودینامیکی یا به عبارت دیگر ناشی از تبدیل 5-ALA به PpIX و فعال شدن نوری آن می‌باشد.

استفاده از 5-ALA در شرایط برون تنی و درون تنی برای افزایش سنتز PpIX در سلول‌های سرطانی شناخته شده است. فرانک و همکارانش گزارش کرده‌اند که تجمع PpIX در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های نرمال فیبروبلاست به‌طور قابل توجهی بیشتر است (۳۱). تحریک نوری PpIX تجمع یافته در سلول‌های سرطانی منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن شده که سلول‌های سرطانی را از طریق آپوپتوزیس و نکروز از بین می‌برند (۳۲ و ۳۳).

اخیرا محققان گزارش کرده‌اند که درمان فتودینامیکی با واسطه 5-ALA می‌تواند به‌صورت موثری مانع رشد سلول‌های سرطانی شده و قابلیت بقای بیماران را افزایش دهد. نتایج این تحقیقات بیانگر افزایش شدید مرگ سلولی از طریق آپوپتوزیس در سلول‌های گلیومای انسانی به دنبال درمان فتودینامیکی با واسطه 5-ALA بوده است (۳۴). علاوه بر این، کار آمدی این روش درمانی برای سلول‌های ملانوما و سلول‌های سنگفرشی دهان نیز گزارش شده است (۳۵).

یکی از فاکتورهای مهم در موفقیت آمیز بودن درمان فتودینامیکی، استفاده از منبع نوری مناسب می‌باشد. استفاده از لیزرها در درمان فتودینامیکی به دلیل تولید نور هم‌دوس نسبت به منابع نوری غیر هم‌دوس که نور با پهنای باند بیشتری را تولید می‌کنند می‌تواند ارجحیت داشته باشد. در کاربرد لیزرها، بیشترین اثرگذاری، زمانی می‌تواند مشاهده شود که طول موج

معایب خاص خود را دارند (۲۷). در مطالعه‌ی حاضر، اثر دو منبع نور لیزری، لیزر لازرترونیک و لیزر موستانگ در میزان بازده درمان فتودینامیکی با واسطه‌ی ماده حساس به نور 5-ALA بر روی رده‌ی سلولی (MDA-MB-231) به‌عنوان مدل سرطان پستان مقاوم به درمان هورمونی، مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین بازده درمان فتودینامیکی ابتدا لازم است سمیت سلولی ماده‌ی حساس به نور به تنهایی و همچنین سمیت نور به تنهایی مورد ارزیابی قرار گیرد. سمیت غلظت‌های مختلف 5-ALA بدون اعمال نور بر روی سلول‌های MDA-MB-231 بررسی شد. نتایج نشان داد که داروی 5-ALA در غلظت‌های کمتر از ۳ میلی‌مولار در مقایسه با گروه کنترل (بدون دارو) سمیت قابل توجهی را ایجاد نمی‌کند به طوری که بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها زنده می‌مانند در حالی که غلظت ۳ میلی‌مولار 5-ALA منجر به یک کاهش ۲۱ درصدی در توان زیستی سلول‌ها می‌شود. از این رو ما آزمایشات خود را در غلظت‌های پایین‌تر از ۳ میلی‌مولار 5-ALA انجام دادیم. تحقیقات محققین دیگر نیز بیانگر عدم سمیت سلولی 5-ALA در غلظت‌های کمتر از ۳ میلی‌مولار است. بررسی سمیت تاریکی 5-ALA بر روی سه رده‌ی سلولی مدولوبلاستوما نشان داده است که ۲ ساعت انکوباسیون این سلول‌ها با غلظت‌های کمتر از ۶ میلی‌مولار 5-ALA، اثر سمی بر روی سلول‌ها ندارد (۲۴). عدم سمیت تاریکی 5-ALA در غلظت ۲ میلی‌مولار و کمتر، پس از ۴ ساعت تماس با سلول‌های سرطانی پوست رده سلولی A431 نیز گزارش شده است (۲۸).

نتایج آزمایشات ما همچنین نشان داد که تابش نور به تنهایی توسط هر یک از لیزرهای مورد استفاده در دوزهای ۵ تا ۲۰ ژول بر سانتی‌متر مربع، کاهشی در توان زیستی سلول‌های MDA-MB-231 ایجاد نمی‌کند. تابش نور با لیزر لازرترونیک با دوز نوری ۱۰ ژول بر سانتی‌متر مربع، باعث افزایش کمی در حد ۳ درصد در بقای سلول‌ها می‌شود.

لیزر مورد استفاده بر قله‌ی جذب نوری ماده‌ی حساسگر نوری منطبق باشد (۱۹). بر این اساس در این مطالعه ما اثر دو منبع نور لیزری لازوترونیک و موستانگ را که دارای طول موج نشری متفاوت هستند بر روی بازده درمان فتودینامیکی با یکدیگر مقایسه کردیم. لیزر لازوترونیک با طول موج نشری ۶۶۰ نانومتر و توان خروجی ۳۵ میلی‌وات است و لیزر موستانگ با طول موج نشری ۶۳۳ نانومتر و توان خروجی ۱۰ میلی‌وات می‌باشد.

داروی 5-ALA یک ماده‌ی حساس به نور محسوب نمی‌شود بلکه به‌عنوان پیش‌دارو در درمان فتودینامیکی تجویز می‌شود. این ماده در مسیر بیوسنتز هم (Heme) به PpIX تبدیل می‌شود. PpIX در محدوده‌ی قرمز نور دارای جذب نوری قوی است. قله جذب نوری آن در 630 ± 5 نانومتر قرار دارد (۱۸). بنابراین این انتظار وجود دارد که لیزر موستانگ با داشتن طول موج نشری در محدوده‌ی قله جذبی PpIX، اثر بیشتری در کاهش رشد سلول‌های تیمار شده با 5-ALA داشته باشد. نتایج ما نیز این فرضیه را ثابت کرد. چرا که در هر دو غلظت ۱ و ۲ میلی‌مولار 5-ALA و با استفاده از دوز تابش ۲۰ ژول بر سانتی‌متر مربع، لیزر موستانگ در مقایسه با لیزر لازوترونیک باعث القای مرگ بیشتری در سلول‌های سرطانی شد. لیزر موستانگ منجر به ۲۷-۳۰ درصد در حالی که لیزر لازوترونیک منجر به ۱۰-۲۰ درصد کاهش در توان زیستی سلول‌های MDA-MB-231 شد. این در حالی بود که تفاوت محسوسی بین اثر دو لیزر با دوز تابش کمتر (۱۰ ژول بر سانتی‌متر مربع) مشاهده نشد. از این مشاهدات می‌توان چنین نتیجه گرفت که علاوه بر طول موج مناسب، توان مناسب نور نیز باید برای افزایش بازده درمان فتودینامیکی لحاظ شود. در یک تحقیق مشابه با کار ما، اثر بازده درمان فتودینامیکی با واسطه‌ی 5-ALA در دوز نوری ۱۰ و ۲۰ ژول بر سانتی‌متر مربع با طول موج ۶۳۰ نانومتر بر روی سلول‌های سرطان پستان، رده‌ی MCF-7 بررسی شده است.

تفاوت کار این محققان با کار ما در استفاده از منبع نوری غیر لیزری است. نتایج این تحقیق حاکی از ۲۲ درصد کاهش در توان زیستی سلول‌ها است که تقریباً مشابه نتیجه‌ی به دست آمده توسط ما بر روی رده‌ی دیگری از سلول‌های سرطانی پستان است، با این تفاوت که منبع نوری مورد استفاده‌ی این محققان، لامپ هالوژنی فیلتردار به جای لیزر می‌باشد (۳۶). در عوض، هی و همکارانش گزارش کرده‌اند که تابش نور لیزر با طول موج ۶۳۵ نانومتر و دوز نوری ۱۰ ژول بر سانتی‌متر مربع در غلظت ۲ میلی‌مولار 5-ALA به‌عنوان دوز بهینه‌ی دارو، منجر به مرگ تقریباً تمام سلول‌های سرطان گردن رحم می‌شود (۳۷). اثر قویتر مشاهده شده در این مورد در مقایسه با تحقیق حاضر می‌تواند به تفاوت نوع سلول‌های تحت درمان مربوط باشد. مطالعات متعدد ثابت کرده است که علاوه بر دوز تابش نور، نوع سلول نیز تاثیر بسزایی در بازده درمان فتودینامیکی دارد.

نتیجه گیری

کاربرد درمان فتودینامیکی برای درمان بیماری‌ها و اختلالاتی که سیستم‌های مختلف بدن را درگیر می‌کنند به‌طور گسترده‌ای در حال افزایش است. اما پارامترهای متعددی در درمان فتودینامیکی را پیچیده می‌سازند و تحقیقات بیشتری برای تعیین پارامترهای مناسب و دقیق برای درمان هر بیماری ضروری است. 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 میسر می‌شود. گرچه در این مطالعه مکانیسم مولکولی مرگ سلولی القا شده توسط درمان فتودینامیکی به واسطه‌ی 5-ALA تعیین نشده است اما در مجموع، نتایج ما بیانگر موثر بودن این روش درمانی در کاهش و مهار رشد سلول‌های سرطانی پستان می‌باشد و اینکه لیزر موستانگ در مقایسه با لیزر لازوترونیک قابلیت بیشتری

مروارید تعبدی دانشجوی کارشناسی ارشد نانویوتکنولوژی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران گزارش شده است. از مرکز لیزر پزشکی جهاد دانشگاهی دانشگاه علوم پزشکی تهران جهت فراهم نمودن تجهیزات لازم برای انجام کشت سلولی و آزمایشات مربوط به تابش نور، سپاس گزاریم.

برای برانگیختن نوری 5-ALA دارد که متعاقبا مرگ بیشتر سلول‌های سرطانی را در پی خواهد داشت. امید است که تحقیقات بیشتر در شرایط بالینی بتواند کارایی و ایمنی این روش را در از بین بردن سلول‌های سرطانی پستان تایید نماید.

تقدیر و تشکر

در این مقاله بخشی از نتایج حاصل از پایان نامه خانم

References

- 1- Boon H, Olaunde F, Zick SM. Trends in complementary alternative medicine used by breast cancer survivors: comparing survey data from 1998 to 2005. *BMC women's Health*. 2007; 7: 4-11.
- 2- Shahrokhbabadi KH, Baharara J, Zafar Balanejad S, Hesami Z. The effect of atorvastatin on progress and proliferation of MCF7 breast cancer cell line. *J Zanjan Univ Med Sci*. 2013; 88: 1-11.
- 3- Roses DF, Giuliano AE. Surgery for Breast Cancer. In: Roses DF, ed. *Breast Cancer*. 2nd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2005; 401-59.
- 4- Agostinis P, Berg K, Cengel KA, et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin*. 2011; 61: 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. New insights into the mechanisms for photodynamic therapy-induced cancer cell death. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2012; 295: 139-74.
- 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: 1-16.
- 8- Andrzejak M, Price M, Kessel DH. Apoptotic and autophagic responses to photodynamic therapy in 1c1c7 murine hepatoma cells. *Autophagy*. 2011; 7: 979-84.
- 9- Maas AL, Carter SL, Wileyto EP, et al. Tumor vascular microenvironment determines responsiveness to photodynamic therapy. *Cancer Res*. 2012; 72: 2079-88.
- 10- Castano AP, Mroz P, Hamblin MR. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6: 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: 86-96.

- 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: 72-80.
- 13- Lee J, Choi J, Chun J, et al. 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; 159: 61-7.
- 14- Kim CH, Chung C-W, Choi KH, et al. Effect of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy via reactive oxygen species in human cholangiocarcinoma cells. *Int J Nanomedicine*. 2011; 6: 1357-63.
- 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, et al. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. *Cancer*. 1997; 79: 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: 27-42.
- 18- Wachowska M, Muchowicz A, Firczuk M, et al. Aminolevulinic acid (ALA) as a prodrug in photodynamic therapy of cancer. *Molecules*. 2011; 16: 4140-64.
- 19- Brancalion, L, Moseley H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med Sci*. 2002; 17: 173-86.
- 20- Golding J, Wardhaugh T, Patrick L, et al. Targeting tumour energy metabolism potentiates the cytotoxicity of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. *Br J Cancer*. 2013; 109: 976-82.
- 21- 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: 62-72.
- 22- Wo niak M, Hotowy K, Czapi ska Eb, et al. Early induction of stress-associated Src activator/Homo sapiens chromosome 9 open reading frame 10 protein following photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2014; 11: 27-33.
- 23- 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: 227-38.
- 24- Ritz R, Scheidle C, Noell S, et al. In vitro comparison of hypericin and 5-aminolevulinic acid-derived protoporphyrin IX for photodynamic inactivation of medulloblastoma cells. *PLoS One*. 2012; 7: e51974.
- 25- van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Cancer Cell Culture: Springer: Springer*; 2011: 237-45.

- 26- Wyld L, Reed M, Brown N. Differential cell death response to photodynamic therapy is dependent on dose and cell type. *Br J Cancer*. 2001; 84: 1384-86.
- 27- 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: 139-49.
- 28- 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: 452-58.
- 29- Barboza CA, Ginani F, Soares DM, Henriques AC, Freitas Rde A. Low-level laser irradiation induces in vitro proliferation of mesenchymal stem cells. *Einstein*. 2014; 12: 75-81.
- 30- Pereira AN, Eduardo Cde P, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg Med*. 2002; 31: 263-7.
- 31- 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: 1539-46.
- 32- Chen R, Huang Z, Chen G, et al. Kinetics and subcellular localization of 5-ALA-induced PpIX in DHL cells via two-photon excitation fluorescence microscopy. *Int J Oncol*. 2008; 32: 861-7.
- 33- 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: 1214-24.
- 34- Inoue H, Kajimoto Y, Shibata M-A, et al. Massive apoptotic cell death of human glioma cells via a mitochondrial pathway following 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. *J Neurooncol*. 2007; 83: 223-31.
- 35- 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: 1136-42.
- 36- Hotowy K, Woźniak M, Duś K, et al. Immunocytochemical studies on the nuclear ubiquitous casein and cyclin-dependent kinases substrate following 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy on MCF-7 cells. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2013; 10: 518-25.
- 37- 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: 861-8.

Evaluation of Two Different Light Sources on the Efficiency of Photodynamic Therapy of Breast Cancer: An in vitro Study

Tabbodi M¹, Hadizadeh M¹, Jahanshiri- Moghadam M²

¹Institute of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran.

²Medical Laser Research Center, Academic Center for Education, Culture & Research (ACECR), Tehran, Iran.

Corresponding Author: Hadizadeh M, Institute of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran.

E-mail: Hadizadehmahnaz@gmail.com

Received: 24 Dec 2014 **Accepted:** 25 Jun 2015

Background and Objective: Photodynamic therapy is a new therapeutic modality for the treatment of cancer. Photodynamic therapy uses an inactive drug and a light source to activate the drug to produce reactive oxygen species that destroy the cancer cells. In the present study, the effect of two different laser light sources on the efficiency of photodynamic therapy was evaluated using a breast cancer cell line.

Materials and Methods: MDA-MB-231 cells were grown on 96-well plates. After the treatment with different concentrations of 5-aminolevulinic acid, cells were irradiated with a light dose of 10 and/ or 20 Jcm⁻² by two different laser light sources. Cell viability was measured by MTT assay.

Results: Results showed that 5-aminolevulinic acid at concentrations of 0.5, 1 and 2 mM had no significant cytotoxic effect on the breast cancer cells in the absence of laser activation. However, the treatment of cells with 5-aminolevulinic acid and light dose of 20 Jcm⁻² using Lasotronic laser and Mustang laser, decreased cell viability of the breast cancer cells to 80% and 65%, respectively.

Conclusion: Light source used in photodynamic therapy plays an important role in the efficiency of this therapeutic modality and light activation of 5-aminolevulinic acid at a photosensitizing concentration using a proper laser light source may potentially be lethal for breast cancer cells.

Keywords: Photodynamic therapy, Light source, Laser, Breast cancer