ارزیابی تاثیر فتودینامیک تراپی وابسته به آمینولوولنیک اسید بر سلول‌های سرطان ملانومایی تیمار شده با توکوفرول سوکسینات در شرایط آزمایشگاهی (in-vitro)

هما محسنی کوچصفهانی،[1] کاظم پریور،[2] محمد نبیونی،[1] محدثه محمدی ساردو[3]

۱. استادیار زیست‌شناسی، دانشگاه تربیت معلم تهران، دانشکده علوم
۲. استاد زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم
۳. کارشناس ارشد زیست شناسی، دانشگاه تربیت معلم تهران، دانشکده علوم

تاریخ دریافت مقاله: ۸۹/۴/۲۹
تاریخ پذیرش مقاله: ۸۹/۷/۱۳

چکیده

زمینه و هدف: فتودینامیک‌تراپی از طریق استفاده از آمینولوولنیک اسید(ALA) برای تولید یک واکنشگر نوری درون سلولی، یک مولکول پروتوپورفیرین IX که نور را جذب نموده و سلول‌ها را هدف قرار می‌دهد، درمانی نویدبخش برای سرطان می‌باشد. متاسفانه، عدم موفقیت‌های درمانی به هنگام استفاده از آمینولوولنیک اسید، هنوز یک اتفاق رایج می‌باشند. در این مطالعه به منظور تقویت تاثیر فتودینامیک‌تراپی بر پایه آمینولوولنیک اسید، اثرات فتودینامیک‌تراپی بر سلول‌های سرطان ملانوما متعاقب تیمار با توکوفرول سوکسینات مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌کار: در این مطالعه تحقیقی،سلول‌های ملانومایی به مدت ۲۴ ساعت در محیط RPMI-1640 کشت شدند و سپس تحت تیمار با توکوفرول سوکسینات (۶μg/ml) قرار گرفتند. ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد، محیط کشت در شرایط تاریکی با محیط کشت فاقد سرم و محتوی آمینولوولنیک اسید (۰/۱mg/ml) جایگزین شد و سپس سلول‌ها برای مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. پس از آن سلول‌ها تحت تابش با استفاده از لیزر Nd:YAG (طول موج ۵۳۲ نانومتر) قرار گرفتند. ۲۴ ساعت بعد، میزان بقا سلولی با روش MTT assay اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: ۲۴ ساعت بعد از فتودینامیک‌تراپی، در میان گروه‌های مورد مطالعه، کشت‌های پیش تیمار با توکوفرول سوکسینات، به‌طور معنی‌داری بقا سلولی کمتری را نسبت به کنترل نشان داد.

نتیجه‌گیری: القا تمایز با استفاده از توکوفرول سوکسینات تجمع درون سلولی پروتوپورفیرین IX را درسلول‌های B16 تیمار شده افزایش می‌دهد. بنابراین مرگ سلولی فتوتوکسیک متعاقب در معرض قرار گرفتن با نور ۵۳۲ نانومتر به طور قابل ملاحظه‌ای در سلول‌های پیش تیمار شده با این ماده افزایش می‌یابد. این مطالعه پیشنهاد می‌کند که، توکوفرول سوکسینات ممکن است به عنوان یک تقویت‌کننده بیولوژیکی فتودینامیک‌تراپی بر اساس آمینولولونیک عمل نماید.**[م ت ع پ ز، ۱۳۹۰؛ ۱۳(۸): ۷-۱]**

کلیدواژه‌ها: فتودینامیک تراپی، آمینولوولنیک اسید، توکوفرول سوکسینات (ویتامین E)، تمایز، ملانوما

مقدمه

ملانوما بدخیم‌ترین فرم سرطان پوست است، که از سلول‌های پیگمانی ملانوسیتی منشا می‌گیرد و فاکتورهای محیطی، بیوشیمیایی، مولکولی و ژنتیکی در رشد و گسترش آن دخیل می‌باشند. اگرچه شیوع ملانوما در سرتاسر جهان در حال افزایش است اما درمان موثری برای آن وجود ندارد. بنابراین توسعه استراتژی‌های جدید و موثر برای درمان این بیماری ضرورت دارد.[1] ملانوما در ۹۵ درصد موارد، تحت جراحی قرار می‌گیرد اما نرخ بازگشت بسیار بالا می‌باشد.[2] سایر روش‌ها از قبیل شیمی‌درمانی نیز اثر ضعیفی بر این تومور دارند.[3] استفاده از فتودینامیک‌تراپی (Photodynamic therapy: PDT)، چشم‌اندازهای جدیدی را برای درمان این سرطان پیش رو می‌گذارد.[2]

PDT روشی است که در آن برای درمان بیماری‌ها از نور و واکنش‌های فتوشیمیایی استفاده می‌شود. مکانیسم اصلی این روش این گونه است که پس از تابش نور یا لیزر به واکنشگر نوری و فعل و انفعالات فتوشیمیایی بین آن‌ها، رادیکال اکسیژن آزاد می‌شود،[4] که بسیار فعال است و با تخریب ساختارهای حیاتی سلول منجر به مرگ سلولی می‌شود.[5] در این روش واکنشگر نوری ترجیحا در بافت‌های هدف تجمع می‌یابد.[6] به‌طور معمول در فتودینامیک‌تراپی واکنشگرهای نوری از پیش ساخته شده استفاده می‌شوند. اما اخیرا جای استفاده از فرم سنتتیک واکنشگر نوری یک ترکیب پیش ساز استفاده شده و متعاقبا واکنشگر نوری به‌طور موضعی در بافت توموری ساخته می‌شود. از جمله این ترکیبات می‌توان آمینولوولنیک اسید(ALA) را نام برد.[7] به‌طور طبیعی آمینولوولنیک اسید اولین ماده پیش‌ساز در مسیر بیوسنتز مولکول هم می‌باشد و از ترکیب دو مولکول گلایسین و سوکسینیل کوا در میتوکندری ساخته می‌شود. تقریبا تمام انواع سلول‌های بدن به جز سلول‌های قرمز خونی بالغ، به مکانیسم متابولیکی بیوسنتز مولکول هم مجهز شده‌اند.[8] آمینولوولنیک اسید خود یک واکنشگر نوری نمی‌باشد اما در طی این مسیر سنتزی در داخل سلول می‌تواند پروتوپورفیرین (یک تراپیرول در مسیر بیوسنتز مولکول هم که واکنشگر نوری می‌باشد) را تولید کند.[9]

امروزه پرتودرمانی دینامیکی به کمک آمینولوولنیک اسید به‌طور موفقیت آمیزی برای درمان انواعی از بیماری‌های سرطانی و غیرسرطانی به‌کار برده می‌شود. با این وجود فتودینامیک‌تراپی بر اساس آمینولوولنیک اسید (ALA-PDT) در فرم معمول خود به ندرت برای تومورهای عمقی و مقاوم یک درمان قطعی محسوب می‌شود.[10] مکانیسم‌های متعددی ممکن است

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه تربیت معلم، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی email:shokouh_1980@yahoo.com

منجر به عدم موفقیت‌های درمانی فتودینامیک تراپی وابسته به آمینولوولنیک اسید شوند.[۱۱]

یک روش امید بخش جهت افزایش کارایی نابودی سلول‌ها با کاربرد ALA-PDT، تغییر پاسخ‌های بیولوژیکی در سلول‌های سرطانی مورد نظر می‌باشد به‌طوری‌که حساسیت به فتودینامیک‌تراپی وابسته به آمینولوولنیک اسید افزایش می‌یابد. از جمله این روش‌ها تمایز درمانی کوتاه مدت است.[۱۱] تنظیم نرمال سیکل سلولی، تمایز و آپوپتوز در سلول‌های سرطانی از میان رفته است. هدف از تمایز درمانی، برگشت تمایز به سلول‌های سرطانی با استفاده از عوامل فارماکولوژیکی می‌باشد.[۱۱] یک مثال کلینیکی از این روش، استفاده از ال- ترانس رتینوئیک اسید برای درمان تمایزی سرطان پرومیلوسیتی حاد می‌باشد.[۱۲] روش به‌کار برده شده برای تمایز درمانی از دو جهت با تعریف معمول آن متفاوت است: اولا عامل تنظیم کننده‌ی تمایز برای یک دوره زمانی نسبتا کوتاه به‌کار برده می‌شود تا سلول‌ها را برای درمان ثانویه از قبیل در معرض قرار دادن با آمینولوولنیک اسید و نور آماده کند. ثانیا یک واکنشگر نوری مثل پروتوپورفیرین IX می‌تواند در مقادیر زیاد ترجیحا در سلول‌های تمایز یافته تجمع یابد.[۱۱] توکوفرول سوکسینات (ویتامین E) یک عامل ضد تکثیری بالقوه برای بسیاری از سلول‌های توموری می‌باشد. توقف سیکل سلولی توسط توکوفرول سوکسینات در بسیاری از سلول‌ها گزارش شده است. فعالیت ضد توموری این ترکیب چندین مکانیسم از جمله توقف سنتز DNA، القا تمایز و آپوپتوز را شامل می‌شود.[۱۳] از این رو در این مطالعه تحقیقی سعی شده است کارایی فتودینامیک‌تراپی وابسته به آمینولوولنیک اسید در سلول‌های سرطان ملانومایی که از طریق پیش تیمار با توکوفرول سوکسینات درجهت القا تمایز کشت داده شده‌اند، بهبود داده شود.

روش‌کار

مطالعه حاضر یک مطالعه تحقیقی بوده که پس از تصویب در شورای گروه زیست شناسی دانشگاه تربیت معلم تهران در مرکز تحقیقات سلولی تکوینی این دانشگاه انجام شد. رده سلولی ملانومایی B16 F10 موش از انستیو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640 (Gibco- USA) محتوی سرم جنینی گاو(FBS) ۱۰ درصد و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، استرپتومایسین در دمای ۳۷°C، رطوبت ۹۵ درصد و ۵ درصد CO_2 کشت شدند. این سلول‌ها دارای خاصیت چسبندگی به کف پلیت بوده و دو بار در هفته پاساژ داده شدند.

D- الفا توکوفرول سوکسینات اسید (Sigma- Germany) به میزان۳ میلی‌گرم در ۵ میلی‌لیتر اتانول حل شد. محلول استوک به‌دست آمده فیلتر گردید و در تاریکی (دمای ۴°C) نگهداری شد. در زمان آزمایش محلول استوک برای تهیه غلظت ۶μg/ml در محیط کشت کامل رقیق شد.

جهت انکوباسیون سلول‌های B16 با توکوفرول سوکسینات (ویتامین E)، سلول‌های مذکور در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای کشت شدند. بعد از ۲۴ ساعت محیط کشت قبلی در گروه‌های تجربی با محیط کشت کامل حاوی توکوفرول سوکسینات (۶μg/ml) جایگزین شد و گروه‌های شم با حجم یکسانی از حلال (اتانول) تیمار گردید و سلول‌ها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند. به منظور سنجش اثر توکوفرول سوکسینات بر میزان تکثیر سلولی از 3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphyniltetrazolium bromide assay (MTT) استفاده شد. سلول های زنده حلقه تترازولیوم را به مولکولی تبدیل می‌کنند که جذب آن در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. برای این منظور در پایان دوره انکوباسیون ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول MTT (۵ mg/ml PBS) به هر خانه اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۳ ساعت در ۳۷°C انکوبه شدند. به منظور لیز سلولی ۰/۰۴HCL-Isopropyl alcohol نرمال به محیط کشت اضافه گردید ۸ ساعت بعد میزان جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (spectronic 21D-USA) اندازه‌گیری شد.

آمینولوولینیک اسید از شرکت Sigma- USA خریداری شد و محلول استوک با حل کردن ۰/۰۵ گرم آمینولوولنیک اسید در ۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی (PBS) به‌دست آمد. محلول استوک در تاریکی و در دمای ۲۰°C- نگهداری می‌شد. محلول مورد نیاز آمینولوولنیک (۰/۱mg/ml) برای کار بلافاصله قبل از استفاده، با رقیق کردن محلول استوک در محیط کشت بدون سرم آماده می‌گردید.

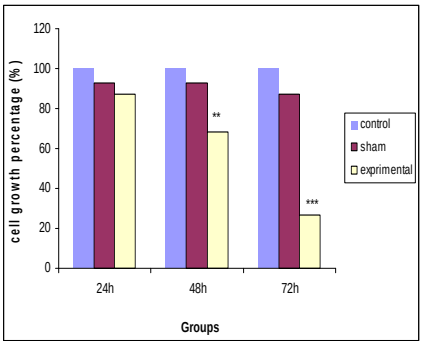
سلول‌های ملانومایی با تراکم ۲×۱۰^{۴} در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای کشت داده شد و برای ۲۴ ساعت انکوبه شدند. پس از اتمام دوره انکوباسیون محیط کشت تازه حاوی ۶μg/ml توکوفرول سوکسینات (ویتامین E) به گروه‌های مورد نظر اضافه گردید. ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد محیط کشت قبلی در شرایط تاریکی با محیط کشت فاقد سرم و حاوی آمینولوولنیک اسید (۰/۱ mg/ml) جایگزین شد و سلول‌ها برای مدت ۴ ساعت با آمینولوولنیک اسید تیمار شدند. سپس گروه‌های مورد نظر با استفاده از لیزر Nd:YAG (Germany) با طول موج ۵۳۲ نانومتر به مدت ۶۰ ثانیه تحت تابش قرار گرفتند. پس از تیمار نوری محیط کشت قبلی با محیط تازه جایگزین گردید و انکوباسیون سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت به منظور تغییرات احتمالی در غشا میتوکندری و یا غشا سلولی انجام گرفت تا اندازه‌گیری تخریب‌های برگشت ناپذیر به‌طور دقیق انجام گیرد.

سلول‌ها در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای کشت شدند. بعد از ۲۴ ساعت توکوفرول سوکسینات اضافه گردید و سلول‌ها تحت انکوباسیون ۴۸ و ۷۲ ساعته قرار گرفتند. سپس محیط کشت قبلی خارج شده و آمینولوولنیک اسید در محیط کشت جدید و فاقد سرم به سلول‌ها اضافه گردید. بعد از ۴ ساعت سلول‌ها با PBS شستشو شده و به کمک تریپسین (Gibco- USA) از کف ظرف جدا شدند. با اضافه کردن ۲ میلی لیتر SDS ۱ درصد در NaOH یک دهم نرمال سلول‌ها ورتکس و لیز شده سپس مقدار پروتوپورفیرین IX با اسپکتروفلوریمتر فلورسانس (Austria) اندازه‌گیری گردید (تحریک۴۰۰nm، تابش۷۲۰nm-۵۸۰، پیک ۶۳۰nm). تمام مراحل کار در تاریکی انجام پذیرفت و گروه‌های کنترل درکلیه مراحل آزمایش هیچ تیماری دریافت نکردند. به منظور تجزیه و تحلیل اثرات توکوفرول سوکسینات بر میزان مهار تکثیر سلولی و هم‌چنین تاثیر پیش تیمار ویتامینی بر کارایی فتودینامیک‌تراپی از آزمون

ANOVA نرم افزار SPSS-13 استفاده شد که سطوح $p<۰/۰۵$ بیان کننده اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

یافته‌ها

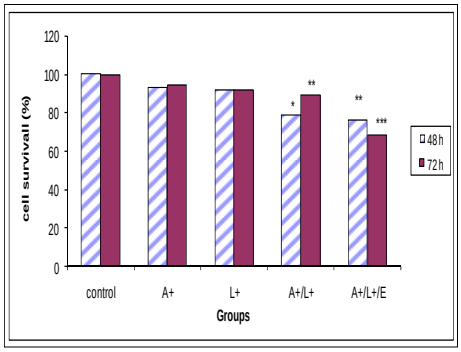
اثرات توکوفرول سوکسینات با غلظت ۶μg/ml برای دوره‌های زمانی، ۴۸ ۲۴ و ۷۲ ساعت مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل از تست MTT assay نشان داد که تیمارهای ۴۸ و ۷۲ ساعت توکوفرول سوکسینات موجب کاهش در میزان تکثیر سلول‌های ملانومایی شده و اختلاف معنی‌دار نسبت به کنترل ایجاد می‌کند (نمودار۱). هم‌چنین توکوفرول سوکسینات در تیمار ۷۲ ساعته، تعدادی از سلول‌ها را به سمت تمایز کامل پیش برد و سلول‌ها از فرم مسطح به فرم ستاره‌ای تغییر شکل پیدا کردند. علاوه بر این سلول‌ها آرایش فضایی از دست رفته در سلول‌های سرطانی را به‌دست آورده و به صورت موازی نسبت به یکدیگر جهت یابی نمودند (تصویر ۱:a, b, c). هم‌چنین پس از تیمار فتودینامیکی تغییرات مورفولوژیکی از قبیل رانده شدن هسته سلول به کناره‌ها و از بین رفتن یکپارچگی غشا سلولی مشاهده گردید (تصویر ۲).



نمودار ۱: اثر توکوفرول سوکسینات (ویتامین E) بر میزان تکثیر سلول های ملانومایی B16 F10.

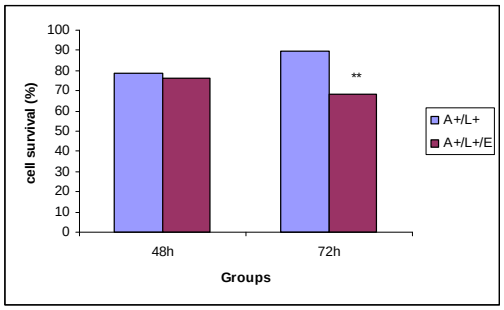
Control: بدون تیمار Sham: تیمار با ۶μg/ml اتانول (حلال ویتامین E)Experimental: تیمار با ۶μg/ml توکوفرول سوکسینات

نمودار ۳ نشان‌دهنده کاهش میزان بقای سلولی در سلول‌های ملانومایی است که متعاقب تیمار با توکوفرول سوکسینات (۴۸ و ۷۲ ساعت) تحت فتودینامیک‌تراپی قرار گرفته‌اند. این گروه از سلول‌ها در مقایسه با گروه‌هایی که فقط تحت تیمار فتودینامیکی قرار گرفتند، در میزان بقای سلولی اختلاف معنی‌داری نسبت به کنترل نشان دادند (نمودار ۲و ۳).

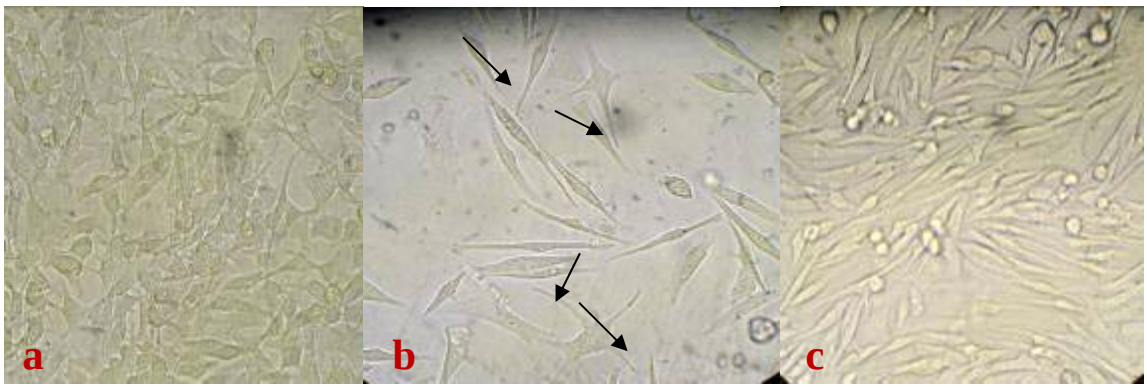


نمودار۲: درصد بقای سلولی ۲۴ ساعت بعد از تابش.

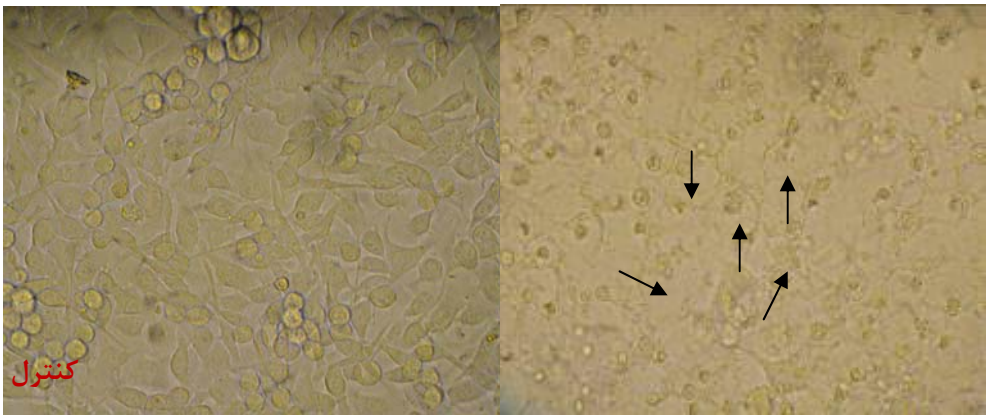
Control: بدون تیمار، A+: تیمار با واکنشگر نوری آمینولوولنیک اسید(ALA)، L+: تیمار با نور لیزر، A+/L+/E: تیمار با توکوفرول سوکسینات (E) آمینولوولنیک اسید و نور



نمودار ۳: مقایسه درصد بقا سلول های ملانومایی B16 F10 در تیمارهای فتودینامیک به تنهایی و فتودینامیک همراه با ویتامین E به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت

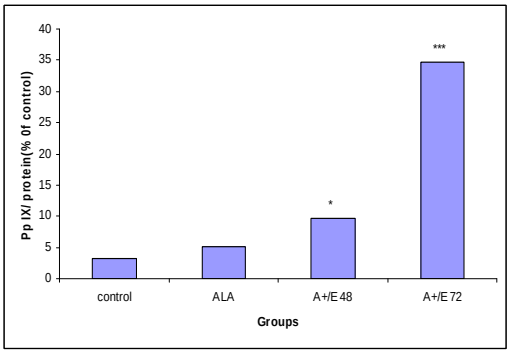


تصویر ۱: اثر توکوفرول سوکسینات بر مورفولوژی سلول های ملانومایی. a) گروه کنترل بدون تیمار ویتامینی c, b) سلول های تیمار شده با توکوفرول سوکسینات برای ۷۲ ساعت نوک پیکان ها تغییر شکل بعضی از سلول ها از حالت مسطح به فرم ستاره ای را نشان می دهند (b) آرایش فضایی موازی در میان سلول ها بعد از القا تمایز(c) (بزرگنمایی ×۴۰۰)



تصویر۲: فتومیکروگراف از سلول های B16 بعد از فتودینامیک درمانی . نوک پیکان ها رانده شدن هسته سلول ها را به کناره نشان می دهند (۴۰۰x).

بررسی‌ها نشان دادند میزان تشکیل پروتوپورفیرین IX در سلول‌های B16 پیش تیمار شده با توکوفرول سوکسینات که متعاقبا تحت تیمار با آمینولوولنیک اسید قرار گرفته‌اند در مقایسه با نمونه‌های منحصرا تیمار شده با آمینولوولنیک اسید، به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته است (نمودار۴).



نمودار ۴: تاثیر القا تمایز بر میزان تجمع پروتوپورفیرین در سلول های ملانومایی.

بحث

نتایج این بررسی نشان داد که در حضور ۶μg/ml توکوفرول سوکسینات در مقایسه با گروه کنترل میزان تکثیر سلولی به‌طور معنی‌داری کاهش یافته است. هم‌چنین در این مطالعه اثر افزودن تمایز درمانی بر فتودینامیک تراپی وابسته به آمینولوولنیک اسید در سلول‌های سرطان ملانوما مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به‌دست آمده نشان داد که درصد بقا سلولی در سلول‌های پیش تیمار شده با توکوفرول سوکسینات ۲۴ ساعت پس از تیمار فتودینامیکی در مقایسه با سایر گروه‌ها نسبت به کنترل کاهش یافته است. در سلول‌های سرطانی تنظیم تکثیر، تمایز و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی از دست می‌رود. به دلیل وابستگی این سه جنبه به یکدیگر، توقف سیکل سلولی پیش نیاز فرآیند تمایز است و تمایز سرانجام منجر به مرگ سلولی می‌شود. تمایز درمانی با بهره بردن از این ارتباط مسیرهای از دست رفته در طی فرآیند کارسینوژنزیس را بازیابی می کند.[۱۱]

مطالعاتی که توسط Prasad و همکارانش صورت گرفت نشان داد که توکوفرول سوکسینات به‌طور شاخصی میزان تکثیر سلول‌های ملانومایی را در محیط کشت مهار می کند.[۱۴،۱۵] مطالعات انجام شده توسط Ni و همکاران بر رده سلولی پروستاتی[۱۳] و هم‌چنین مطالعات صورت گرفته توسط Turley بر سلول‌های سرطان سینه[۱۶] نشان دادند که توکوفرول سوکسینات موجب توقف تکثیر سلولی در این رده‌های سلولی می‌شود. این نتایج با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد. امروزه پذیرفته شده است که درمان‌های جدیدی بر اساس مکانیسم‌های مولکولی (به ویژه رژیم‌های ترکیبی) برای ریشه‌کن کردن بیماری‌های بدخیم وجود دارند.[۱۲] در این مطالعه از یک روش‌درمانی ترکیبی جدید (تمایز سلولی و فتودینامیکی‌تراپی) جهت تخریب سلول‌های سرطان ملانومایی استفاده گردید. فتودینامیک‌تراپی بر اساس پروتوپورفیرین IX القا شده توسط آمینولوولنیک اسید برای درمان نئوپلاسم-ها در اندام‌های مختلف به‌کار می‌رود.[۱۱] اما به دلیل این‌که ریشه کنی تومور با فتودینامیک تراپی بر اساس آمینولوولنیک اسید به عنوان پیش‌ساز واکنشگر نوری همیشه موفقیت‌آمیز نبوده است استفاده از یک ترکیب جدید جهت تقویت اثر فتودینامیک درمانی بسیار مفید خواهد بود. به‌طور کلی چهار پارامتر برای کارایی فتودینامیک درمانی ضروری می‌باشند:۱- واکنشگر نوری ۲- نور ۳- اکسیژن ۴- فیزیولوژی سلول.

اگرچه اکثر آزمایشگاه‌ها در جهت بهینه‌سازی سه پارامتر فیزیکی اول تلاش می‌کنند اما تعدادی از محققان به‌طور ویژه‌ای به جنبه‌های فیزیولوژیک سلول علاقه‌مندند.[۱۲] اگر بتوان مقادیر زیادی پروتوپورفیرین IX از طریق دستکاری صحیح وضعیت متابولیکی سلولی به‌دست آورد متعاقب آن کارایی فتودینامیک درمانی وابسته به آمینولوولنیک اسید بهبود می‌یابد.[۱۲]

مطالعات انجام شده نشان دادند که سلول‌های به سرعت در حال تکثیر از ظرفیت بالایی برای سنتز پروتوپورفیرین IX به دنبال تیمار با آمینولوولنیک اسید برخوردار می‌باشند. این ویژگی به‌طور وسیعی در پرتودرمانی دینامیکی (PDT) تومورها مورداستفاده قرار می گیرد.[۳] اما رابطه معکوسی بین توقف رشد ناشی از تمایز و سنتز پروتوپورفیرین مستند شده است.[۷]

Schwartz و همکاران در سال ۲۰۰۴ فوتودینامیک درمانی وابسته به تمایز را در سلول‌های ملانومایی B16 بررسی کردند. این محققان از دو ترکیب بوتیرات و هگزامتیلن بیس استامید به عنوان عامل القا کننده تمایز استفاده کرده و گزارش نمودند که، کارایی فتودینامیک تراپی با استفاده از آمینوولولنیک اسید می‌تواند با کاربرد ابعاد ترکیب درمانی افزایش یابد.[۳]

Ortel و همکاران در سال ۱۹۹۸ گزارش کردند که القا تمایز: سنتز، تجمع پروتوپورفیرین ومتعاقب آن حساسیت فتودینامیکی را در کراتینوسیت ها افزایش می‌دهد.[۱۷] هم‌چنین نتایج مطالعات Sinha و Ortel بر سلول‌های سرطانی پروستاتی (LNCaP) نشان داد که تمایز، درمان فتودینامیکی وابسته به آمینولوولنیک اسید را بر این رده سلولی بهبود می‌بخشد.[۱۱،۱۲] نتایج حاصل از مطالعه Murty و همکاران پیشنهاد می‌کنند که توکوفرول به‌عنوان تنظیم کننده در مسیر بیوسنتز مولکول هم عمل می‌کند.[۱۸] نتایج به‌دست آمده از این تحقیق مشابه نتایج مذکور می‌باشد به‌طوری‌که پیش تیمار توکوفرول سوکسینات کارایی فتودینامیک‌تراپی وابسته آمینولوولنیک اسید را در سلول‌های B16 F10 افزایش می‌دهد. این یافته‌ها یک پتانسیل را برای یک رژیم ترکیب درمانی جدید پیشنهاد می‌کنند، جایی که القا تمایز بر فتودینامیک وابسته به آمینولوولنیک مقدم است و تومور را به نور حساس‌تر می‌سازد.[۷] به عبارت دیگر ترکیب تمایزدرمانی و فتودینامیک تراپی ممکن است برای تقویت اثرات سیتوتوکسیک در سلول‌های سرطانی مفید باشد.[۱۲]

ممکن است فاکتورهایی از قبیل افزایش جذب آمینولوولنیک اسید با منشا خارجی، کاهش جریان رو به خارج پروتوپورفیرین و افزایش بیان حداقل یک آنزیم در مسیر بیوسنتز مولکول هم موجب افزایش تجمع پروتوپورفیرین در سلول‌های تمایز یافته می‌شود.[۱۷]

تمایز درمانی ممکن است باعث افزایش تولید پروتوپورفیرین در تمام سلول‌ها و تومورهای گوناگون نگردد. برای مثال تمایز القا شده توسط دی متیل سولفوکساید(DMSO) در رده سلولی پرومیلوسیتی HL-60 منجر به افزایش محتوی پروتوپورفیرین نگردید. نوع سلول همراه با ظرفیت پایه برای سنتز مولکول هم در تولید پروتوپورفیرین از آمینولوولنیک اسید با منشا خارجی متعاقب القا تمایز تعیین کننده است.[۱۲] به‌طور کلی درمان ترکیبی جدید برای فتودینامیک تراپی وابسته به آمینولوولنیک اسید مهم است زیرا فوایدی در جهت موضعی کردن این روش‌درمانی در پی دارد. آمینولوولنیک اسید در داخل بافت هدف به واکنشگر نوری پروتوپورفیرین تبدیل می‌شود. بنابراین حوادث شیمیایی فتوتوکسیک را به سلول‌های هدف محدود نموده و اثرات جانبی را کاهش می‌دهد.[۱۹] تشکیل پروتوپورفیرین IX نیاز به فعالیت چندین آنزیم دارد. اهمیت نسبی آنزیم‌های مختلف به نوع تومور و بافت بستگی دارد.[۲۰] مکانیسم‌های متقابل بین توکوفرول سوکسینات و مسیر سنتز پروتوپورفیرین IX در پوست در حال حاضر مشخص نمی‌باشد و برای این منظور انجام بررسی‌های بیشتر ضروری می‌باشد. در مجموع با توجه به نتایج به‌دست آمده به‌نظر می‌رسد که پیش تیمار با توکوفرول سوکسینات می‌تواند مرگ سلولی ناشی از پرتودرمانی دینامیکی را در سلول‌های سرطان ملانوما با القا افزایش تولید پروتوپورفیرین از ترکیب پیش ساز اولیه یعنی آمینولوولنیک اسید با منشا خارجی به‌طور معنی‌داری بهبود بخشد و یک روش فتودینامیکی ترکیبی جدید در جهت درمان سرطان فراهم نماید.

سپاسگزاری

نویسندگان این تحقیق مراتب تشکر و قدردانی خود را از همکاری مسئولین محترم دانشگاه تربیت معلم تهران جهت پیشبرد مطالعه و تحقیقات مربوط به پایان نامه دوره کارشناسی ارشد (۶۱۶/۵۸) ابراز می‌دارند.

References

1. Villanuera J, Herlyn M. Melanoma, encyclopedia of life science (ELS). Toronto, Ontario: John Wiley & Sons; 2009: 1-9.
2. Saczko J, Kulbacka J, Chwilkowska A, et al. The influence of photodynamic therapy on apoptosis in human melanoma cell line. Folia Histochem Cytobiol 2005; 43(3): 129-132.
3. Ickowicz Schwartz D, Gozlan Y, Greenbaum L, et al. Differentiation-dependent photodynamic therapy regulated by Porphobilinogen deaminase in B16 melanoma. Br J Cancer 2004; 90(9): 1833-1841.
4. Robertson CA, Evans DH, Abrahamse H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. Photochem Photobiol B 2009; 96(1): 1-8.
5. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: Part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. Photodiagn Photodyn Ther 2005; 2(1): 1-23.
6. Lopez RF, Lange N, Guy R and Bentley MV. Photodynamic therapy of skin cancer: Controlled drug delivery of 5-ALA and its esters. Adv Drug Deliv Rev 2004; 56(1): 77-94.
7. Hasan T, Ortel B, Moor ACE and Pogue BW. Photodynamic therapy of cancer. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, editors. Cancer Medicine. 6th ed. Hamilton, Ontario: BC. Decker; 2003: 605-22.
8. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. mechanisms in photodynamic therapy: Part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. Photodiagn Photodyn Ther 2004; 1(4): 297-293.
9. Juzeniene A, Moan J. The history of PDT in Norway part II. Recent advances in general PDT and ALA-PDT. Photodiagn Photodyn Ther 2007; 4(2): 80-87.
10. Peng Q, Warloe T, Berg K, et al. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges. Cancer 1997; 79(12): 2282-2308.
11. Ortel B, Sharlin D, O'Donnell D, et al. Differentiation enhanced aminolevulinic acid-dependent photodynamic treatment of LNCaP prostate cancer cells. Br J Cancer 2002; 87(11): 1321-1327.
12. Sinha AK, Anad S, Ortel B, et al. Methotrexate used in combination with aminolevulinic acid for photodynamic killing of prostate cancer cells. Br J Cancer 2006; 95(4): 485-495.
13. Ni J, Chen M, Zhang Yu, et al. Vitamin E succinate inhibits human prostate cancer cell growth via modulation cell cycle regulatory machinery. Biochem Biophysc Res Communicate 2003; 300(2): 357-363.
14. Prasad KN, Kumar B, Yan XD, et al. α- tochopheryl succinate, the most effective form of vitamin E for adjuvant cancer treatment. J Am Coll Nutr 2003; 22(2): 108-17.
15. Prasad KN, Edwards-Prasad J. Effects of tocopherol

(vitamin E)acid succinate on morphological alterations and growth inhibition in melanoma cells in culture. Cancer Res 1982; 42(2): 550-555.

16. Turley JM, Ruscetti FW, Kim SJ, et al. Vitami E succinate inhibits proliferation of BT-20 human breast cancer cells: increased binding of cyclin A negatively regulates E2F transactivation activity. Cancer Res 1997; 57(13): 2668-2675.
17. Ortel B, Chen N, Brissette J, et al. Differentiation – specific increase in ALA-induced protoporphyrin IX accumulation in primary mouse keratinocytes. Br J Cancer 1998; 77(11): 1744-1751.
18. Murty HS, Caasi PI, Brooks SK and Nair PP. Biosynthesis of heme in the vitamin E-deficient rat. J Biol Chem 1970; 245(20): 5498-5504.
19. Linoma S, Farshi SS, Ortel B, et al. A mechanistich study of cellular photodestruction with 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin. Br J Cancer 1994; 70(1): 21-28.
20. Pourzand C, Reelfs O, Kvam E and Tyrrell RM. The iron regulatory protein can determine the effectiveness of 5-aminolevulinic acid in inducing protoporphyrin IX in human primary skin fibroblasts. J Invest Dermatol 1999; 112(4): 419-25.

Evaluation of the efficacy of aminolevulinic acid-dependent photodynamic therapy on melanoma cancer cells treated with tocopherol succinate (in-vitro)

Homa Kouchesfahani, [1] Kazem Parivar, [2] Mohammad Nabiuni, [1] Mohaddese Mohammadi-Sardoo[3]

Received: 20/July/2010
Accepted: 5/Oct/2010

Background: Photodynamic therapy (PDT) using 5-aminolevulinic acid (ALA) to produce an intracellular photo-sensitizer, a protoporphyrin molecule IX (PPIX) which absorbs light and targets cells, is a promising cancer treatment. Unfortunately, treatment failures are still a common occurrence when ALA is used. In this study, in order to enhance the efficacy of ALA-dependent photodynamic therapy, the effects of photodynamic therapy on melanoma cancer cells were studied after treating them with tocopherol succinate.

Materials and Methods: In this experimental study melanoma cells were cultured in RPMI 1640 medium for 24 h. then, cells were treated with tocopherol succinate (6µm/ml). After 48 and 72 hours, the mediums were replaced by serum-free medium in the darkness, with ALA, 0.1mg/ml and then cells incubated for 4h. After that, cells were irradiated by using Nd: YAG laser (532 nm). After 24h, cell survival was measured by the MTT assay.

Results: Twenty-four hours after PDT, among compared groups, pretreated cells with tocopherol succinate showed significant lower cell viability than control group.

Conclusion: Induction of differentiation by using tocopherol succinate augmented intracellular PPIX accumulation in cells treated with ALA. Therefore phototoxic cell death after exposure to 532nm light enhances significantly in tocopherol succinate-pretreated cells. This study suggests that tocopherol succinate may act as a biological enhancer of ALA based photodynamic therapy. [ZJRMS, 2012; 13(8): 1-7]

Keywords: Photodynamic therapy, aminolevulinic acid, tocopherol succinate, melanoma

1. **Assistant Professor of Biology, School of Science, Tarbiat Moallem University, Tehran, Iran.**
2. **Professor of Biology, School of Science, Islamic Azad University, Tehran Science and Research Branch, Tehran, Iran.**
3. **MSc of Biology, School of Science, Tarbiat Moallem University, Tehran, Iran.**

Please cite this article as: Kouchesfahani H, Parivar K, Nabiuni M, Mohammadi-Sardoo M. Evaluation of the efficacyof aminolevulinic acid-dependent photodynamic therapy on melanoma cancer cells treated with tocopherol succinate (in-vitro). Zahedan J Res Med Sci (ZJRMS) 2012; 13(8): 1-7.