

## ارزیابی تأثیر فتودینامیک تراپی وابسته به آمینولولینیک اسید بر سلول های سرطان ملانومایی تیمار شده با توکوفرول سوکسینات در شرایط آزمایشگاهی (In vitro)

هما محسنی کوچصفهانی<sup>۱</sup>، کاظم پریور<sup>۲</sup>، محمد نبیونی<sup>۱</sup>، محدثه محمدی سارودی<sup>۳</sup>

۱. استادیار زیست شناسی، 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

### چکیده

**زمینه و هدف:** فتودینامیک تراپی از طریق استفاده از آمینولولینیک اسید (ALA) برای تولید یک واکنشگر نوری درون سلولی، یک مولکول پروتوپورفیرین IX که نور را جذب نموده و سلول ها را هدف قرار می دهد، درمانی نویدبخش برای سرطان می باشد. متاسفانه، عدم موفقیت های درمانی به هنگام استفاده از آمینولولینیک اسید، هنوز یک اتفاق رایج می باشد. در این مطالعه به منظور تقویت تأثیر فتودینامیک تراپی بر پایه آمینولولینیک اسید، اثرات فتودینامیک تراپی بر سلول های سرطان ملانوما متعاقب تیمار با توکوفرول سوکسینات مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش کار:** در این مطالعه تحقیقی، سلول های 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 آمینولولینیک اسید (۰/۱mg/ml) جایگزین شد و سپس سلول ها برای مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. پس از آن سلول ها تحت تابش با استفاده از لیزر Nd:YAG (طول موج ۵۳۲ نانومتر) قرار گرفتند. ۲۴ ساعت بعد، میزان بقا سلولی با روش MTT assay اندازه گیری شد.

**یافته ها:** ۲۴ ساعت بعد از فتودینامیک تراپی، در میان گروه های مورد مطالعه، کشت های پیش تیمار با توکوفرول سوکسینات، به طور معنی داری بقا سلولی کمتری را نسبت به کنترل نشان داد.

**نتیجه گیری:** القا تمایز با استفاده از توکوفرول سوکسینات تجمع درون سلولی پروتوپورفیرین IX را در سلول های B16 تیمار شده افزایش می دهد. بنابراین مرگ سلولی فتوتوکسیک متعاقب در معرض قرار گرفتن با نور ۵۳۲ نانومتر به طور قابل ملاحظه ای در سلول های پیش تیمار شده با این ماده افزایش می یابد. این مطالعه پیشنهاد می کند که، توکوفرول سوکسینات ممکن است به عنوان یک تقویت کننده بیولوژیکی فتودینامیک تراپی بر اساس آمینولولینیک عمل نماید. [م ت ع پ ز، ۱۳(۸): ۱-۷]

**کلیدواژه ها:** فتودینامیک تراپی، آمینولولینیک اسید، توکوفرول سوکسینات (ویتامین E)، تمایز، ملانوما

### مقدمه

ملانوما بدخیم ترین فرم سرطان پوست است، که از سلول های پگمانی ملانوسیتی منشأ می گیرد و فاکتورهای محیطی، بیوشیمیایی، مولکولی و ژنتیکی در رشد و گسترش آن دخیل می باشند. اگرچه شیوع ملانوما در سرتاسر جهان در حال افزایش است اما درمان موثری برای آن وجود ندارد. بنابراین توسعه استراتژی های جدید و موثر برای درمان این بیماری ضرورت دارد.<sup>۱</sup> ملانوما در ۹۵ درصد موارد، تحت جراحی قرار می گیرد اما نرخ بازگشت بسیار بالا می باشد.<sup>۲</sup> سایر روش ها از قبیل شیمی درمانی نیز اثر ضعیفی بر این تومور دارند.<sup>۳</sup> استفاده از فتودینامیک تراپی (PDT) چشم اندازهای جدیدی را برای درمان این سرطان پیش رو می گذارد.<sup>۴</sup>

درمان فتودینامیکی (Photodynamic therapy: PDT)، روشی است که در آن برای درمان بیماری ها از نور و واکنش های فتوشیمیایی استفاده می شود. مکانیسم اصلی این روش این گونه است که پس از تابش نور یا لیزر به واکنشگر نوری و فعل و انفعالات فتوشیمیایی بین آن ها، رادیکال اکسیژن آزاد می شود،<sup>۴</sup> که بسیار فعال است و با تخریب ساختارهای حیاتی سلول منجر به مرگ سلولی می شود.<sup>۵</sup> در این روش واکنشگر نوری ترجیحا در بافت های هدف تجمع می یابد.<sup>۶</sup> به طور معمول در فتودینامیک تراپی

واکنشگرهای نوری از پیش ساخته شده استفاده می شوند. اما اخیرا جای استفاده از فرم سنتتیک واکنشگر نوری یک ترکیب پیش ساز استفاده شده و متعاقبا واکنشگر نوری به طور موضعی در بافت توموری ساخته می شود. از جمله این ترکیبات می توان آمینولولینیک اسید (ALA) را نام برد.<sup>۷</sup> به طور طبیعی آمینولولینیک اسید اولین ماده پیش ساز در مسیر بیوسنتز مولکول هم می باشد و از ترکیب دو مولکول گلاسیسین و سوکسینیل کوا در میتوکندری ساخته می شود. تقریبا تمام انواع سلول های بدن به جز سلول های قرمز خونی بالغ، به مکانیسم متابولیکی بیوسنتز مولکول هم مجهز شده اند.<sup>۸</sup> آمینولولینیک اسید خود یک واکنشگر نوری نمی باشد اما در طی این مسیر سنتزی در داخل سلول می تواند پروتوپورفیرین (یک تراپیرول در مسیر بیوسنتز مولکول هم که واکنشگر نوری می باشد) را تولید کند.<sup>۹</sup>

امروزه پروتودرمانی دینامیکی به کمک آمینولولینیک اسید به طور موفقیت آمیزی برای درمان انواعی از بیماری های سرطانی و غیرسرطانی به کار برده می شود. با این وجود فتودینامیک تراپی بر اساس آمینولولینیک اسید (ALA-PDT) در فرم معمول خود به ندرت برای تومورهای عمقی و مقاوم یک درمان قطعی محسوب می شود.<sup>۱۰</sup> مکانیسم های متعددی ممکن است

ساعت انکوبه شدند. به منظور سنجش اثر توکوفرول سوکسینات بر میزان تکثیر سلولی از 3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5- سلولی استفاده شد. سلول های زنده حلقه ترازولیوم را به مولکولی تبدیل می کنند که جذب آن در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری می شود. برای این منظور در پایان دوره انکوباسیون ۱۰۰ میکرو لیتر از محلول MTT (۵ mg/ml PBS) به هر خانه اضافه شد و سلول ها به مدت ۳ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. به منظور لیز سلولی ۴HCL-Isopropyl alcohol ۰/۱۰۰ نرمال به محیط کشت اضافه گردید ۸ ساعت بعد میزان جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (spectronic 21D-USA) اندازه گیری شد.

آمینولولینیک اسید از شرکت Sigma- USA خریداری شد و محلول استوک با حل کردن ۰/۰۵ گرم آمینولولینیک اسید در ۵ میلی لیتر سرم فیزیولوژی (PBS) به دست آمد. محلول استوک در تاریکی و در دمای ۲۰°C نگهداری می شد. محلول مورد نیاز آمینولولینیک (۰/۱mg/ml) برای کار بلافاصله قبل از استفاده، با رقیق کردن محلول استوک در محیط کشت بدون سرم آماده می گردید.

سلول های ملانومایی با تراکم  $2 \times 10^4$  در پلیت های ۲۴ خانه ای 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 گروه های مورد نظر اضافه گردید. ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد محیط کشت قبلی در شرایط تاریکی با محیط کشت فاقد سرم و حاوی آمینولولینیک اسید (۰/۱ mg/ml) جایگزین شد و سلول ها برای مدت ۴ ساعت با آمینولولینیک اسید تیمار شدند. سپس گروه های 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 سلول ها به مدت ۲۴ ساعت به منظور تغییرات احتمالی در غشا میتو کندری و یا غشا سلولی انجام گرفت تا اندازه گیری تخریب های برگشت ناپذیر به طور دقیق انجام گیرد.

سلول ها در پلیت های ۲۴ خانه ای کشت شدند. بعد از ۲۴ ساعت توکوفرول سوکسینات اضافه گردید و سلول ها تحت انکوباسیون ۴۸ و ۷۲ ساعته قرار گرفتند. سپس محیط کشت قبلی خارج شده و آمینولولینیک اسید در محیط کشت جدید و فاقد سرم به سلول ها اضافه گردید. بعد از ۴ ساعت سلول ها 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 سلول ها ورتکس و لیز شده سپس مقدار پروتوپورفرین IX با اسپکتروفلوریمتر فلورسانس (Austria) اندازه گیری گردید (تحریک ۴۰۰nm، تابش ۵۸۰-۷۲۰nm، پیک ۶۳۰nm). تمام مراحل کار در تاریکی انجام پذیرفت و گروه های کنترل در کلیه 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 فتودینامیک تراپی از آزمون

منجر به عدم موفقیت های درمانی فتودینامیک تراپی وابسته به آمینولولینیک اسید شوند.<sup>۱۱</sup>

یک روش امید بخش جهت افزایش کارایی نابودی سلول ها با کاربرد ALA-PDT، تغییر پاسخ های بیولوژیکی در سلول های سرطانی مورد نظر می باشد به طوری که حساسیت به فتودینامیک تراپی وابسته به آمینولولینیک اسید افزایش می یابد. از جمله این روش ها تمایز درمانی کوتاه مدت است.<sup>۱۱</sup> تنظیم نرمال سیکل سلولی، تمایز و آپوپتوز در سلول های سرطانی از میان رفته است. هدف از تمایز درمانی، برگشت تمایز به سلول های سرطانی با استفاده از عوامل فارماکولوژیکی می باشد.<sup>۱۱</sup> یک مثال کلینیکی از این روش، استفاده از ال- ترانس رتینوئیک اسید برای درمان تمایزی سرطان پرومیلوسیتی حاد می باشد.<sup>۱۲</sup> روش به کار برده شده برای تمایز درمانی از دو جهت با تعریف معمول آن متفاوت است: اولاً عامل تنظیم کننده ی تمایز برای یک دوره زمانی نسبتاً کوتاه به کار برده می شود تا سلول ها را برای درمان ثانویه از قبیل در معرض قرار دادن با آمینولولینیک اسید و نور آماده کند. ثانیاً یک واکنشگر نوری مثل پروتوپورفرین IX می تواند در مقادیر زیاد ترجیحاً در سلول های تمایز یافته تجمع یابد.<sup>۱۱</sup> توکوفرول سوکسینات (ویتامین E) یک عامل ضد تکثیری بالقوه برای بسیاری از سلول های توموری می باشد. توقف سیکل سلولی توسط توکوفرول سوکسینات در بسیاری از سلول ها گزارش شده است. فعالیت ضد توموری این ترکیب چندین مکانیسم از جمله توقف سنتز DNA، القا تمایز و آپوپتوز را شامل می شود.<sup>۱۳</sup> از این رو در این مطالعه تحقیقی سعی شده است کارایی فتودینامیک تراپی وابسته به آمینولولینیک اسید در سلول های سرطان ملانومایی که از طریق پیش تیمار با توکوفرول سوکسینات در جهت القا تمایز کشت داده شده اند بهبود داده شود.

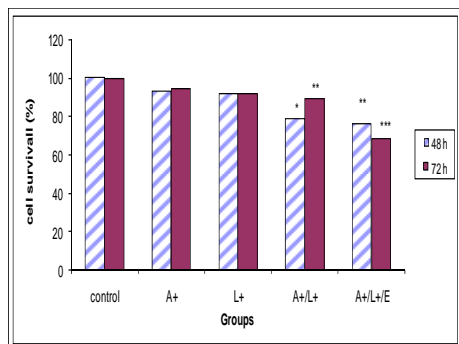
## روش کار

مطالعه حاضر یک مطالعه تحقیقی بوده که پس از تصویب در شورای گروه زیست شناسی دانشگاه تربیت معلم تهران در مرکز تحقیقات سلولی تکوینی دانشگاه فوق انجام شد. رده سلولی ملانومایی B16 F10 موش از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول ها در محیط کشت RPMI-1640 (Gibco- USA) محتوی سرم جنینی گاو (FBS) ۱۰ درصد و آنتی بیوتیک- های پنی سیلین- استرپتومایسین در دمای ۳۷°C، رطوبت ۹۵ درصد و ۵ درصد CO<sub>2</sub> کشت شدند. این سلول ها دارای خاصیت چسبندگی به کف پلیت بوده و دو بار در هفته پاساژ داده می شدند.

D- الف توکوفرول سوکسینات اسید (Sigma- Germany) به میزان ۳ میلی گرم در ۵ میلی لیتر اتانول حل شد. محلول استوک به دست 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 سلول های B16 با توکوفرول سوکسینات (ویتامین E)، سلول های مذکور در پلیت های ۲۴ خانه ای کشت شدند. بعد از ۲۴ ساعت محیط کشت قبلی در گروه های تجربی با محیط کشت کامل حاوی توکوفرول سوکسینات (۶μg/ml) جایگزین شد و گروه های شم با حجم یکسانی از حلال (اتانول) تیمار گردید و سلول ها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲

که فقط تحت تیمار فتودینامیکی قرار گرفتند، در میزان بقا سلولی اختلاف معنی داری نسبت به کنترل نشان دادند (نمودار ۲ و ۳).



نمودار ۲: اثرات فتودینامیک تراپی بر میزان بقا سلولی در سلول های ملانومایی متعاقب تیمار ۴۸ و ۷۲ ساعته با توکوفرول سوکسینات؛ درصد بقا سلولی ۲۴ ساعت بعد از تابش با روش MTT assay نسبت به کنترل اندازه گیری شد.

Control: بدون تیمار

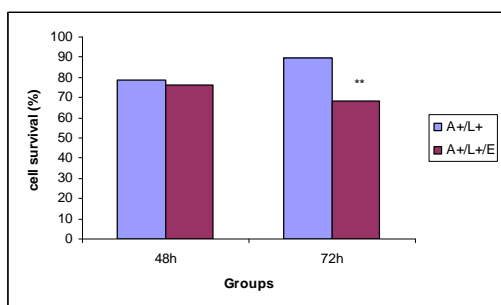
A+: تیمار با واکنشگر نوری آمینولولونیک اسید(ALA)

L+: تیمار با نور لیزر

A+/L+/E: تیمار با توکوفرول سوکسینات (E) آمینولولونیک اسید و نور

در تیمار ۴۸ ساعت به ترتیب افتلاف معنی دار بین گروه های A+/L+ و A+/L+/E نسبت به کنترل وجود دارد  $P < 0.01$  ,  $P < 0.05$

در تیمار ۷۲ ساعت نیز به ترتیب افتلاف معنی دار بین گروه های A+/L+ و A+/L+/E نسبت به کنترل وجود دارد  $P < 0.001$  ,  $P < 0.01$

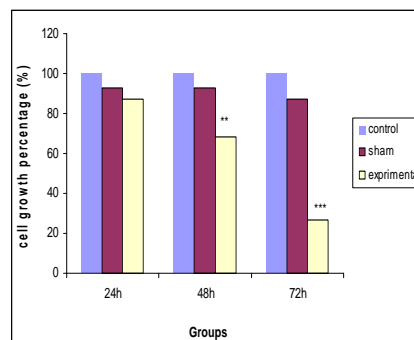


نمودار ۳: مقایسه درصد بقا سلول های ملانومایی B16 F10 در تیمارهای فتودینامیک به تنهایی و فتودینامیک همراه با ویتامین E به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت. در تیمار ۷۲ ساعت افتلاف معنی دار بین گروه های A+/L+ و A+/L+/E وجود دارد  $P < 0.01$

ANOVA نرم افزار SPSS-13 استفاده شد که سطوح  $P < 0.05$  بیان کننده اختلاف معنی دار می باشد.

## یافته‌ها

اثرات توکوفرول سوکسینات با غلظت  $6 \mu\text{g/ml}$  برای دوره‌های زمانی، ۴۸ و ۷۲ و ۲۴ 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 معنی دار نسبت به کنترل ایجاد می کند (نمودار ۱). هم چنین 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 به دست آورده و به صورت موازی نسبت به یکدیگر جهت یابی نمودند (تصویر ۱: a, b, c). هم چنین 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).



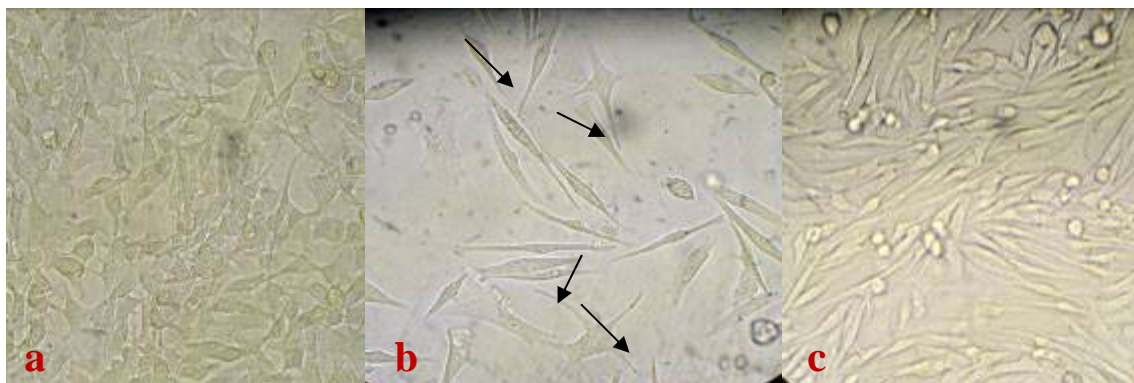
نمودار ۱: اثر توکوفرول سوکسینات (ویتامین E) بر میزان تکثیر سلول های ملانومایی B16 F10. سلول های ملانومایی برای ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت با ویتامین E انکوبه شدند و میزان تکثیر سلولی با روش MTT assay اندازه گیری شد.

Control: بدون تیمار Sham؛ تیمار با  $6 \mu\text{g/ml}$  اتانول (ملال ویتامین E) Experimental؛ تیمار با  $6 \mu\text{g/ml}$  توکوفرول سوکسینات

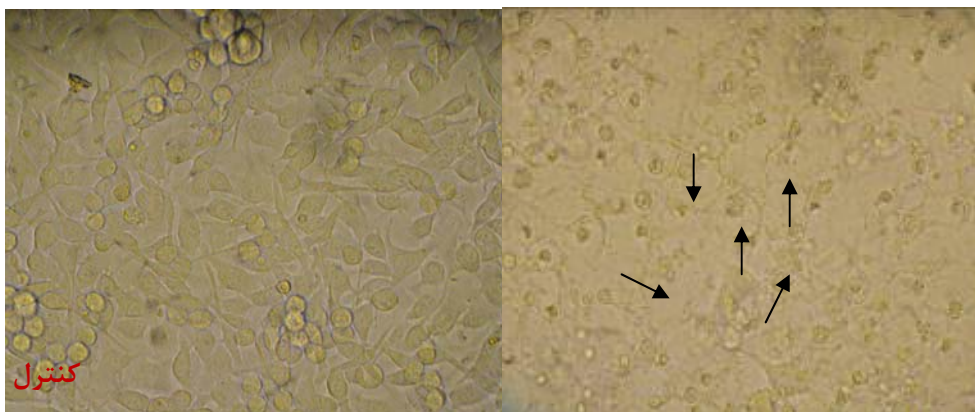
در تیمار ۴۸ ساعت افتلاف معنی دار بین گروه تجربی و گروه کنترل وجود دارد  $P < 0.01$

در تیمار ۷۲ ساعت نیز افتلاف معنی دار بین گروه تجربی و گروه کنترل می باشد  $P < 0.001$

نمودار ۳ نشان دهنده کاهش میزان بقا سلولی در سلول‌های ملانومایی است که متعاقب تیمار با توکوفرول سوکسینات (۴۸ و ۷۲ ساعت) تحت فتودینامیک تراپی قرار گرفته‌اند. این گروه از سلول‌ها در مقایسه با گروه‌هایی



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 پیکان‌ها تغییر شکل بعضی از سلول‌ها از حالت مسطح به فرم ستاره‌ای را نشان می دهند (b) آرایش فضایی موازی در میان سلول‌ها بعد از القا تمایز (c) (بزرگنمایی  $400\times$ )

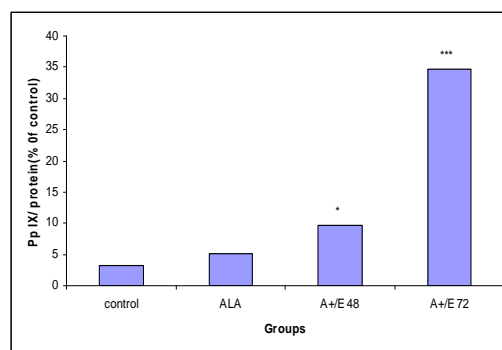


تصویر ۲: فتومیکروگراف از سلول های B16 بعد از فتودینامیک درمانی. نوک پیکان ها رانده شدن هسته سلول ها را به کناره نشان می دهند (۴۰۰x).

مطالعاتی که توسط Prasad و همکارانش صورت گرفت نشان داد که توکوفرول سوکسینات به طور شاخصی میزان تکثیر سلول های ملانومایی را در محیط کشت مهار می-کند.<sup>۱۵،۱۴</sup> مطالعات انجام شده توسط Ni و همکاران بر رده سلولی پروستاتی<sup>۱۳</sup> و هم چنین مطالعات صورت گرفته توسط Turley بر سلول های سرطان سینه<sup>۱۶</sup> نشان دادند که توکوفرول سوکسینات موجب توقف تکثیر سلولی در این رده های سلولی می شود. این نتایج با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد. امروزه پذیرفته شده است که درمان های جدیدی بر اساس مکانیسم های مولکولی (به ویژه رژیم های ترکیبی) برای ریشه کن کردن بیماری های بدخیم وجود دارند.<sup>۱۲</sup> در این مطالعه از یک روش درمانی ترکیبی جدید (تمایز سلولی و فتودینامیکی تراپی) جهت تخریب سلول های سرطان ملانومایی استفاده گردید. فتودینامیک تراپی بر اساس پروتوپورفیرین IX القا شده توسط آمینولولنیک اسید برای درمان نئوپلاسم ها در اندام های مختلف به کار می رود.<sup>۱۱</sup> اما به دلیل این که ریشه کنی تومور با فتودینامیک تراپی بر اساس آمینولولنیک اسید به عنوان پیش ساز واکنشگر نوری همیشه موفقیت آمیز نبوده است استفاده از یک ترکیب جدید جهت تقویت اثر فتودینامیک درمانی بسیار مفید خواهد بود. به طور کلی چهار پارامتر برای کارایی فتودینامیک درمانی ضروری می باشند: ۱- واکنشگر نوری ۲- نور ۳- اکسیژن ۴- فیزیولوژی سلول.

اگر چه اکثر آزمایشگاه ها در جهت بهینه سازی سه پارامتر فیزیکی اول تلاش می کنند اما تعدادی از محققان به طور ویژه ای به جنبه های فیزیولوژیک سلول علاقه مندند.<sup>۱۲</sup> اگر بتوان مقادیر زیادی پروتوپورفیرین IX از طریق دستکاری صحیح وضعیت متابولیکی سلولی به دست آورد متعاقب آن کارایی فتودینامیک درمانی وابسته به آمینولولنیک اسید بهبود می یابد.<sup>۱۲</sup> مطالعات انجام شده نشان دادند که سلول های به سرعت در حال تکثیر از ظرفیت بالایی برای سنتز پروتوپورفیرین IX به دنبال تیمار با آمینولولنیک اسید برخوردار می باشند. این ویژگی به طور وسیعی در پرتودرمانی دینامیکی (PDT) تومورها مورد استفاده قرار می گیرد.<sup>۳</sup> اما رابطه معکوسی بین توقف رشد ناشی از تمایز و سنتز پروتوپورفیرین مستند شده است.<sup>۷</sup> Schwartz و همکاران در سال ۲۰۰۴ فتودینامیک درمانی وابسته به تمایز را در سلول های ملانومایی B16 بررسی کردند. این محققان از دو

بررسی ها نشان دادند میزان تشکیل پروتوپورفیرین IX در سلول های B16 پیش تیمار شده با توکوفرول سوکسینات که متعاقباً تحت تیمار با آمینولولنیک اسید قرار گرفته اند در مقایسه با نمونه های منحصر ا تیمار شده با آمینولولنیک اسید، به طور قابل ملاحظه ای افزایش یافته است (نمودار ۴).



نمودار ۴: تأثیر القا تمایز بر میزان تجمع پروتوپورفیرین در سلول های ملانومایی. در تیمار ۴۸ ساعته بین دو گروه کنترل و ALA+E معنی دار وجود دارد (P<0/05)\* همچنین در تیمار ۷۲ ساعته بین دو گروه فوق اختلاف معنی دار (P<0/001)\*\*\* وجود دارد.

## بحث

نتایج این بررسی نشان داد که در حضور ۶ μg/ml توکوفرول سوکسینات در مقایسه با گروه کنترل میزان تکثیر سلولی به طور معنی داری کاهش یافته است. هم چنین در این مطالعه اثر افزودن تمایز درمانی بر فتودینامیک تراپی وابسته به آمینولولنیک اسید در سلول های سرطان ملانوما مورد بررسی قرار گرفت و نتایج به دست آمده نشان داد که درصد بقا سلولی در سلول های پیش تیمار شده با توکوفرول سوکسینات ۲۴ ساعت پس از تیمار فتودینامیکی در مقایسه با سایر گروه ها نسبت به کنترل کاهش یافته است. در سلول های سرطانی تنظیم تکثیر، تمایز و مرگ برنامه ریزی شده سلولی از دست می رود. به دلیل وابستگی این سه جنبه به یکدیگر، توقف سیکل سلولی پیش نیاز فرایند تمایز است و تمایز سرانجام منجر به مرگ سلولی می شود. تمایز درمانی با بهره بردن از این ارتباط مسیرهای از دست رفته در طی فرایند کارسینوژنیز را بازیابی می کند.<sup>۱۱</sup>

متیل سولفو کساید (DMSO) در رده سلولی پرومیلوسیتی HL-60 منجر به افزایش محتوی پروتوپورفیرین نگرددید. نوع سلول همراه با ظرفیت پایه برای سنتز مولکول هم در تولید پروتوپورفیرین از آمینولولینیک اسید با منشا خارجی متعاقب القا تمایز تعیین کننده است.<sup>۱۲</sup> به طور کلی درمان ترکیبی جدید برای فتودینامیک تراپی وابسته به آمینولولینیک اسید مهم است زیرا فوایدی در جهت موضعی کردن این روش درمانی در پی دارد. آمینولولینیک اسید در داخل بافت هدف به واکنشگر نوری پروتوپورفیرین تبدیل می شود. بنابراین حوادث شیمیایی فتوتوکسیک را به سلول های هدف محدود نموده و اثرات جانبی را کاهش می دهد.<sup>۱۹</sup> تشکیل پروتوپورفیرین IX نیاز به فعالیت چندین آنزیم دارد. اهمیت نسبی آنزیم های مختلف به نوع تومور و بافت بستگی دارد.<sup>۲۰</sup> مکانیسم های متقابل بین توکوفرول سوکسینات و مسیر سنتز پروتوپورفیرین IX در پوست در حال حاضر مشخص نمی باشد و برای این منظور انجام بررسی های بیشتر ضروری می باشد. در مجموع با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می رسد که پیش تیمار با توکوفرول سوکسینات می تواند مرگ سلولی ناشی از پرتودرمانی دینامیکی را در سلول های سرطان ملائوما با القا افزایش تولید پروتوپورفیرین از ترکیب پیش ساز اولیه یعنی آمینولولینیک اسید با منشا خارجی به طور معنی داری 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 می دارند.

### References

- Villanueva J, Herlyn M. Melanoma. Encyclopedia of life science (ELS). Toronto, Ontario: John Wiley & Sons; 2009: 1-9.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Hasan T, Ortel B, Moor ACE and Pogue BW. Photodynamic therapy of cancer. In: Kufe DW, Pollock

ترکیب بوتیرات و هگزامتیلن بیس استامید به عنوان عامل القا کننده تمایز استفاده کرده و گزارش نمودند که، کارایی فتودینامیک تراپی با استفاده از آمینولولینیک اسید می تواند با کاربرد ابعاد ترکیب درمانی افزایش یابد.<sup>۳</sup>

Ortel و همکاران در سال ۱۹۹۸ گزارش کردند که القا تمایز: سنتز، تجمع پروتوپورفیرین و متعاقب آن حساسیت فتودینامیکی را در کراتینوسیت ها افزایش می دهد.<sup>۱۷</sup> هم چنین نتایج مطالعات Ortel و Sinha بر سلول های سرطانی پروستاتی (LNCaP) نشان داد که تمایز، درمان فتودینامیکی وابسته به آمینولولینیک اسید را بر این رده سلولی بهبود می بخشد.<sup>۱۲، ۱۳</sup> نتایج حاصل از مطالعه Murty و همکاران پیشنهاد می کنند که توکوفرول به عنوان تنظیم کننده در مسیر بیوسنتز مولکول هم عمل می کند.<sup>۱۸</sup> نتایج به دست آمده از این تحقیق مشابه نتایج مذکور می باشد به طوری که پیش تیمار توکوفرول سوکسینات کارایی فتودینامیک تراپی وابسته آمینولولینیک اسید را در سلول های B16 F10 افزایش می دهد. این یافته ها یک پتانسیل را برای یک رژیم ترکیب درمانی جدید پیشنهاد می - کنند، جایی که القا تمایز بر فتودینامیک وابسته به آمینولولینیک مقدم است و تومور را به نور حساس تر می سازد.<sup>۷</sup> به عبارت دیگر ترکیب تمایز درمانی و فتودینامیک تراپی ممکن است برای تقویت اثرات سیتوتوکسیک در سلول های سرطانی مفید باشد.<sup>۱۲</sup>

ممکن است فاکتورهایی از قبیل افزایش جذب آمینولولینیک 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 سلول های تمایز یافته می شود.<sup>۱۷</sup>

تمایز درمانی ممکن است باعث افزایش تولید پروتوپورفیرین در تمام سلول ها و تومورهای گوناگون نگردد. برای مثال تمایز القا شده توسط دی

- RE, Weichselbaum RR, editors. *Cancer Medicine*. 6<sup>th</sup> ed. Hamilton, Ontario: BC. Decker; 2003: 605-22.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Ni J, Chen M, Zhang Yu, et al. Vitamin E succinate inhibits human prostate cancer cell growth via modulation cell cycle regulatory machinery. *Biochem Biophys Res Communications* 2003; 300(2): 357-363.
- Prasad KN, kumar B, Yan XD, et al.  $\alpha$ - tocopheryl succinate, the most effective form of vitamin E for

- adjuvant cancer treatment. *J Am Coll Nutr* 2003; 22(2): 108-117.
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. Vitamin 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 mechanistic 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,<sup>1</sup> Kazem Parivar,<sup>2</sup> Mohammad Nabiuni,<sup>1</sup> Mohaddese Mohammadi-Sardoo<sup>3</sup>

**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, 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 efficacy of aminolevulinic acid-dependent photodynamic therapy on melanoma cancer cells treated with tocopherol succinate in-vitro. Zahedan J Res Med Sci (ZJRMS) 2011; 13(8): 1-7.