مجلـــه‌ی علمـی، پژوهشـی دانشـــگاه علـــوم پزشـــکی زنجـــان
دوره‌ی ۲۰، شماره‌ی ۸۰ مرداد و شهریور ۱۳۹۱، صفحات ۵۱ تا ۶۳

بررسی اثر فتودینامیکی کمپلکس تتراپیریدینو پورفیرازین روی (II)، بر رده‌ی سلولی HeLa

فرزانه فاخری[۱]، دکتر حسین رستگار[۲]، دکتر محمود آل بویه[۳]، دکتر عبدالرضا اسماعیل‌زاده[٤]، سید اسماعیل بلاغی[٥]،
فاطمه حکیمیان[٦]، مینو اکبری[۷]، سید شهاب موسوی مطلق[۸]

نویسنده‌ی مسوول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده‌ی علوم، گروه زیست شناسی mhrastegar@yahoo.com

دریافت: ۹۰/۱۱/۵ پذیرش: ۹۱/۲/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: *فتودینامیک تراپی معالجه‌ای است که در آن از حساس‌گر نوری و نورمرئی شدید استفاده می‌شود. زمانی که حساس‌گر نوری در معرض طول موج خاصی از نور (ترجیحا در طیف قرمز) قرار می‌گیرد، گونه‌های فعال اکسیژن که برای سلول‌ها سمی است را تولید می‌کند. اخیراً به پورفیرین‌ها و آنالوگ‌های آن‌ها، به‌عنوان حساس‌گرهای نوری توجه شده است. کمپلکس تتراپیریدینو پورفیرازین روی (II) یک حساس‌گر نوری محلول در آب است که پتانسیل مناسبی برای کاربرد در فتودینامیک تراپی دارد. در این مطالعه، اثر سمی این کمپلکس در حضور نور شدید و در غیاب آن، بر رده‌ی سلول سرطانی هلا بررسی گردید.*

روش بررسی: *رده‌ی سلول سرطانی هلا در معرض غلظت‌های مختلف تتراپیریدینو پورفیرازین روی (II) قرار گرفت. اثر سمیت سلولی در حضور و عدم حضور نور با روش MTT مطالعه شد. منبع تابش نور، لامپ هالوژنی تنگستن ۱۵۰ واتی مجهز به فیلتر قرمز بود.*

یافته‌ها: *آزمایشات نشان دادند که اثر سمی پورفیرازین در حضور نور به شکل قابل توجهی بیش از سمیت آن در تاریکی است. آنالیز آماری میزان دوز موثر (ED_{50}) را درشرایط تاریکی و روشنایی به ترتیب $8/6\mu M$ و $4/2\mu M$ نشان داد. به علاوه، نتایج نشان داد در گستره $0-12\mu M$، افزایش غلظت کمپلکس منجر به افزایش سمیت سلولی می‌شود در حالی‌که در غلظت بالاتر، سمیت سلولی احتمالا به دلیل وقوع پدیده‌ی تجمع، کاهش می‌یابد.*

نتیجه‌گیری: *کمپلکس تتراپیریدینو پورفیرازین روی (II)، حساس‌گر نوری امید بخش در روش نوین فتودینامیک تراپی می‌باشد و پتانسیل بالایی در این رده سلولی از خود نشان داد.*

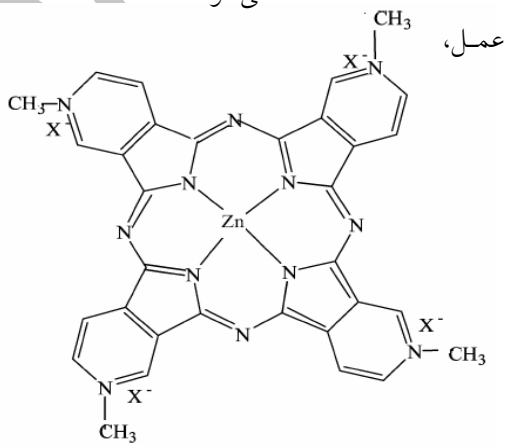
واژگان کلیدی: تتراپیریدینوپورفیرازین روی، فتودینامیک تراپی، رده‌ی سلولی سرطانی هلا، آزمون MTT

۱- کارشناسی ارشد سلولی مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران
۲- دکترای تخصصی فارماکولوژی، دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران
۳- دکترای تخصصی فارماکولوژی، استادیار مرکز تحقیقات آزمایشگاه‌های مرجع کنترل غذا و دارو (FDCL MOH)، وزارت بهداشت درمان آموزش پزشکی
٤- دکترای تخصصی ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان
٥- دانشجوی کارشناسی ارشد شیمی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان
٦- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوفیزیک، دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان
۷- کارشناسی ارشد بیوشیمی، آزمایشگاه بیوتکنولوژی مرکز تحقیقات آزمایشگاه‌های مرجع کنترل غذا و دارو (FDCL MOH)، تهران
۸- کارشناسی ارشد هماتولوژی، آزمایشگاه بیوتکنولوژی مرکز تحقیقات آزمایشگاه‌های مرجع کنترل غذا و دارو (FDCL MOH)، تهران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

امروزه انواع مختلف سرطان‌ها که هر روز بیش از پیش قربانی می‌گیرند نیازمند ترکیبات دارویی جدیدتر و قوی‌تر و همچنین روش‌های درمانی نوین می‌باشد. در این راستا برای مقابله با بیماری‌ها، استفاده از ترکیبات شیمیایی جدیدتر با بیشترین اثرگذاری و کمترین دوز مصرفی و حداقل آسیب‌رسانی به بافت‌های غیرهدف و سالم موضوع تحقیق بسیاری از محققان می‌باشد. روش‌های رایج درمان‌های سرطان از قبیل شیمی درمانی، رادیوتراپی به طور موثر پاسخگو نبوده، به‌کارگیری روش‌های جدیدتر مورد نیاز است. یکی از روش‌های درمانی جدید که توجه زیادی را به خود معطوف نموده فتودینامیک تراپی (Photodynamic Therapy) یا به اختصار PDT می‌باشد (۱). PDT، روشی امید بخش برای درمان موضعی تومورهای حجیم می‌باشد. تاکنون بسیاری از بیماران با انواع سرطان‌ها با نتایج عالی با این روش درمان شده‌اند. در این روش به کمک الیاف فیبرنوری می‌توان نور را به سمت بسیاری از بافت‌های عمقی بدن به صورت بسیار دقیق هدایت نمود. همچنین این روش می‌تواند به عنوان روشی مکمل در کنار آندوسکوپی برای تشخیص و درمان سرطان‌ها باشد (۳و۲). در PDT از ترکیبی به نام حساس‌گر نوری (Photosensitizer) استفاده می‌شود و به آن نور مرئی (ترجیحاً در ناحیه‌ی طیف قرمز $(\lambda \geq 600nm)$) که دارای قدرت نفوذ بالا به بافت‌ها است، تابانده شده و طی این عمل، گونه‌های فعال اکسیژن یا اکسیژن سینگلت (Singlet Oxygen) تولید می‌شود. این اکسیژن مسوول ایجاد سمیت سلولی است و توده‌های سلولی سرطانی را نابود می‌کند (۲). اکسیژن تولید شده، مسوول ایجاد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (آپوپتوز) و یا نکروز است (٤و۳). تحقیقات بسیاری بر روی انواع ترکیبات، انجام شده است. بر اساس مطالعات جوارانز و همکاران (۲)، اسدی و همکاران (۳) و همچنین میلا و همکاران (٤) تعدادی از حساس‌گرهای نوری با قابلیت به‌کارگیری در حوضه‌های درمانی مورد بررسی قرار گرفته‌اند. فتوفرین یکی از ترکیبات حساسگر نوری است که مورد تایید اداره‌ی غذا و داروی آمریکا قرارگرفته و برای درمان مراحل اولیه و پیشرفته‌ی سرطان ریه، سرطان مثانه، سرطان سطحی معده، آدنوکارسینومای حلقی، سرطان گردن رحم استفاده می‌شود (۲) اما، تاکنون تحقیقی در زمینه‌ی خصلت حساس‌گری نوری پورفیرازین روی، به عنوان نسل جدیدی از حساس‌گرها، صورت نپذیرفته است. این نسل از ترکیبات، دارای خصلت‌های متمایز و مطلوبی می‌باشد که قابلیت برهم کنش با DNA، جذب نوری شدید در طول موج ٦۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر (در ناحیه‌ی مرئی نور)، وجود خصلت‌های پارامغناطیسی و عدم تمایل به ایجاد توده از آن جمله می‌باشد (۳). ساختار تتراپیریدینوپورفیرازین روی (II) در شکل ۱ مشاهده می‌شود.



شکل ۱: ساختار پورفیرازین روی (II)

Archive of SID

www.SID.ir

از آنجایی که سرطان دهانه‌ی رحم دومین سرطان رایج در زنان است (۵) و هر ساله حدود ۵۰۰ هزار زن به این بیماری مبتلا شده، از این تعداد حدود ۳۰۰ هزار نفر بر اثر این بیماری جان خود را از دست می‌دهند (٦)، مطالعات در زمینه‌ی درمان این نوع از سرطان، می‌تواند در اولویت قرار گیرد. مطالعات پژوهشگران حاکی از موفق بودن اثر ترکیبات مختلف با خاصیت حساس‌گر نوری بر روی رده‌ی سلولی هلا است. سورتینو وهمکارانش اثر تتراکیس ٤- سولفونات فنیل پورفیرین (tpps) به‌همراه یک ترکیب کاتیونی آمفی‌فیلیک با نام سیکلودکسترین را بر روی سلول‌های هلا با استفاده از روش آزمون MTT (۳-[٤،٥-Dimethylthiazol-۲-yl]-۲،٥- Diphenyl-Tetrazolium Bromide) در حضور نور سنجیدند و مثبت بودن نتایج را گزارش نمودند (۷). گوستاو و همکاران به بررسی سلول‌های هلا پس از تاثیر فتالوسیانین کلروآلومینیوم بر آن‌ها پرداختند. در این بررسی از نور دیود لیزری ٦۷۰ نانومتر برای فعال نمودن حساس‌گر نوری استفاده شد. آنالیزها نشان دهنده‌ی مرگ سلولی به علت ایجاد تغییرات مشاهده شده در پتانسیل غشا اسکلت سلولی و شبکه‌ی آندوپلاسمی بود (۸). پاوانیا و همکاران به بررسی اثر پورفیرین‌های سه بار مثبت محاط شده در وزیکول‌های باردار منفی در سلول‌های هلا به کمک نور لیزر ۵۳۲ نانومتر پرداختند و بر اساس نتایج مطلوب مشاهده شده پیشنهاد دادند رابطه‌ی مستقیم بین میزان پیوند غشایی و سمیت نوری وجود دارد (۹). اوگاوا و همکاران از بررسی اثر ایمیدازول پورفیرین بر سلول‌های سرطانی هلا، غلظت مطلوب ایجاد کننده‌ی مرگ سلولی پس از تابش با لامپ هالوژنی ۱۵۰ وات را با به کارگیری آزمون MTT به‌دست آوردند و مشخص شد میزان زنده بودن سلول‌ها با افزایش غلظت حساس‌گر نوری کاهش می‌یابد (۱۰). در بررسی صورت پذیرفته در سال ۲۰۱۰ توسط ویلانوئوا و همکاران، به‌طور همزمان از دو ماده به نام‌های فتالوسیانین روی II (ZnPc) و پورفیرین کاتیونی مزوتتراکیس N-٤ متیل پیریدیل پورفین (T٤MPyP) بر علیه سلول‌های هلا استفاده کردند و پس از تابش نور قرمز و به کار بردن آزمون MTT، مشخص شد استفاده‌ی همزمان از دو حساس‌گر نوری باعث افزایش اثربخشی فتودینامیک تراپی می‌شود (۱۱). به جز رده‌ی سلولی هلا، از سایر رده‌های سلولی نیز در بررسی‌ها استفاده شده که سلول‌های کارسینومای اپیدرمی انسان(A٤۳۱)(۱۲)، سلول‌های میلومای همستر چینی(۱۳)، سلول‌های کارسینومای انسان (SiHa Cell) (١٤)، سلول‌های سرطانی کبد Hep۲B و HepG۲ (۱۵) کارسینومای کلورکتال انسان (١٦)، سلول آدنوکارسینومای کلون انسان (HCT١١٦)(۱۷)، کارسینومای حنجره‌ی انسان (HeP-۲) (۱۸)، سلول‌های لوسمی ٦۰-HL و سلول‌های ملانوتیک A۳۷۵ (۱۹)، لوسمی میلوئید مزمن انسان (CML) KCL-۲۲ (٤)، سلول‌های اولیه اندوتلیال مویرگ انسانی (HUVEC) (۲۰). سلول‌های ملانومای انسانی (Me۳۰۰) (۲۱)، سلول‌های توموری ارلیخ زبان موش‌های سوییسی (۲۲) سلول‌های سرطان پروستات انسانی یا Pc-۳M (۲۳) از آن جمله هستند. مطالعات تمامی محققان موید اثر بخش بودن مشتقات مختلف ترکیبات پورفیرینی و فتالوسیانینی به عنوان حساس‌گر نوری بود و موردی که در آن بی اثر بودن این ترکیبات گزارش شده باشد، یافت نشد. با توجه به مطالب فوق و اینکه تا به حال اثر این ماده بر روی سلول‌های سرطانی کار نشده است و این ترکیب به عنوان نسل جدید این دسته از ترکیبات مطرح است، لذا به بررسی آن پرداختیم.

روش بررسی

این مطالعه به صورت تجربی انجام شد و برای بررسی فعالیت حساس‌گری پورفیرازین روی بر رده‌ی سلولی هلا، از آزمون MTT برای سنجش میزان سمیت در دو حالت سمیت در حضور نور و در غیاب آن استفاده شد. آزمایش MTT یک روش رنگ سنجی است که بر اساس احیا و شکسته

Archive of SID
www.SID.ir

شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم به‌وسیله‌ی آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و تشکیل کریستال‌های آبی نامحلول انجام می‌شود. کریستال‌های فورمازان نامحلول قبل از رنگ سنجی توسط ماده‌ی حلالی نظیر DMSO به‌حالت محلول درآمده و در نهایت جذب نوری محلول به‌دست آمده با دستگاه الایزا میکروپلیت ریدر کمپانی Tecan Infinit در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت می‌شود (۲۰). برای انجام آزمایش، رده‌ی سلولی هلا (سلول‌های یوکاریوتی سرطان رحم انسان) با کد NCBI # C۱۱۵ خریداری شد. این سلول دوکی شکل با هسته‌ی مشخص می‌باشد که به‌صورت تک لایه‌ی چسبیده به سطح رشد می‌کنند (۷). کلیه‌ی کارهای کشت سلول در شرایط کاملاً استریل و زیر هود لامینار مجهز به لامپ UV انجام شد. برای کشت سلول‌ها از محیط کشت RPMI (۱٦٤۰) (Roswell Park Memorial Institute) حاوی FBS (Fetal Bovine Serum) و محلول آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین- استرپتومایسین استفاده شد. تمامی مواد فوق ساخت کمپانی Invitrogen – GIBCO بود.

بذرافشانی سلول به داخل فلاسک‌ها: فلاسک‌های ۷۵ سانتی‌متر مربع با درب فیلتردار را در زیر هود در شرایط استریل باز کرده، ۲۵×۱۰^{٤} سلول به‌همراه ۱ میلی‌متر محیط کشت کامل در آن ریخته شد و پس از چند پاساژ متوالی سلول‌ها آماده‌ی استفاده شد (۱۰).

آماده سازی محلول پورفیرازین روی: از پودر پورفیرازین روی استوکی با غلظت ۱ میلی‌مول در RPMI فاقد FBS ساخته شد. برای تهیه‌ی محلول استوک، میزان ۰/۱۰۹۰۵۵ گرم از کمپلکس را در ۱۰۰ میلی‌مول RPMI فاقد FBS حل کرده و محلول استوک ۱ میلی‌مول به‌دست آمد. محلول مورد نظر به دور از نور و در دمای یخچال نگهداری شد و از این استوک غلظت‌های مختلف صفر، ۱، ٦، ۱۲ و ۵۰ ماکرو مولار تهیه شد.

سنجش سمیت پورفیرازین روی بر رده‌ی سلولی هلا: برای بررسی سمیت پورفیرازین روی، باید سلول‌ها با آن مجاور می‌شدند. برای این کار از سلول‌های فلاسک‌هایی که به ۷۵ درصد رشد رسیده بودند (فاز رشد لگاریتمی)، استفاده شد. سلول‌ها تریپسینه شده، پس از شستشو و سانتریفیوژ کردن، تعداد سلول‌های سوسپانسیون شمارش شده و به تعداد مناسب در میکروپلیت‌های ۹٦ خانه‌ای ریخته شد (۱۰). سنجش سمیت در دو حالت سمیت محلول پورفیرازین روی در غیاب نور و سمیت محلول پورفیرازین روی در حضور نور شدید (PDT) بررسی شد. برای بررسی از میکروپلیت‌های ۹٦ خانه‌ای استفاده شد و سمیت‌های ذکر شده به صورت مجزا مورد بررسی قرار گرفت. در هر وِل میکروپلیت‌های۹٦ خانه‌ای، تعداد ۱ سلول ریخته شد. در میکروپلیت بررسی سمیت در تاریکی، به ۱۵ چاهک نیاز بود. برای هر غلظت سه چاهک در نظر گرفته شد همچنین یک چاهک در هر ردیف مخصوص کنترل بود که فاقد محلول پورفیرازین بود و فقط سلول داشت. در میکروپلیت بررسی سمیت نوری نیز مشابه حالت تاریکی، به ۱۵ چاهک نیاز بود. هر غلظت ۳ بار تکرار شد. یک چاهک از هر ردیف مخصوص کنترل (بدون محلول پورفیرازین) بود. میکروپلیت‌های بذرافشانی شده با سلول، به مدت ۱۸ تا ۲٤ ساعت در انکوباتور $CO_۲$ دار تحت دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شدند (۱۰).

انکوباسیون سلول‌ها با محلول پورفیرازین روی: محیط کشت روی سلول‌ها تخلیه شد و ول‌ها با PBS (Phosphate Buffer Solution) در PH برابر با ۷/٤ شسته شدند. سپس محلول پورفیرازین روی با غلظت‌های مختلف به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به وِل‌ها اضافه شد. در گروه کنترل محلول پورفیرازین ریخته نشد و به جای آن از RPMI استفاده شد. سپس درب میکروپلیت‌ها گذاشته شده، سلول‌ها برای مدت نیم ساعت در انکوباتور $CO_۲$ در دمای ۳۷ درجه‌ی

Archive of SID

www.SID.ir

سانتی‌گراد در تاریکی انکوبه شدند. پس از گذشت نیم ساعت، محلول پورفیرازین ساکشن شد و به جای آن ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل در تمام ول ریخته شد (۱۰).

آماده سازی منبع نور: منبع نور، لامپ هالوژنی تنگستنی ۱۵۰ وات و ۲٤ ولت، ساخت کمپانی OSRAM بود که نور آن پس از عبور از فیلتر پیرکس قرمز با طول موج عبوری ۳۵۰ تا ۸۰۰ نانومتر به سلول‌ها برخورد می‌کرد. علت استفاده از این فیلتر، قابلیت نفوذ بیشتر این طول موج به اعماق بیشتر سلول‌ها و باکتری‌ها است. همچنین بیشترین مقدار جذب پورفیرازین روی نیز در همین طول موج می باشد که یکی از مهم ترین محاسن این نوع از حساس‌گرها می‌باشد.

آزمایش سنجش سمیت در تاریکی: میکروپلیت سلول‌ها، به مدت دو ساعت به دور از تابش نور در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

آزمایش سنجش سمیت در نور شدید: میکروپلیت سلول‌ها به مدت دو ساعت تحت تابش با لامپ قرار گرفتند. نور از بالا با فاصله‌ی ۲ سانتی‌متری به پلیت ۹٦ خانه‌ای حاوی سلول، به صورت عمودی تابانیده می‌شد. فیلتر پیرکس نیز روی پلیت به صورتی که تمامی حفره‌های سلول‌دار را تحت پوشش قرار دهد، گذاشته شده بود. تمام مراحل آزمایش زیر هود لامینار تحت شرایط استریل و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انجام شد (۱۹). پس از اتمام ۲ ساعت، میکروپلیت‌ها برای ٤۸ ساعت در انکوباتور CO_2 قرار گرفتند تا پس از آن میزان زنده بودن سلول‌ها با روش آزمون MTT سنجیده شود. محلول آماده‌ی MTT به صورت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر است. این محلول باید به دور از نور در فویل نگهداری شود. در چاهک‌های میکروپلیت به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محلول MTT ریخته شد، سپس میکروپلیت‌های حاوی محلول MTT به مدت ۳ ساعت در انکوباتور CO_2 قرار گرفتند. در مرحله‌ی بعد محلول MTT ساکشن شده و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO در هر ول ریخته می‌شود. بلافاصله میزان جذب توسط الایزاریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده می‌شود (۲۰). جهت اطمینان از صحت داده‌ها، تمامی آزمایشات به صورت Triplicate انجام شد.

یافته‌ها

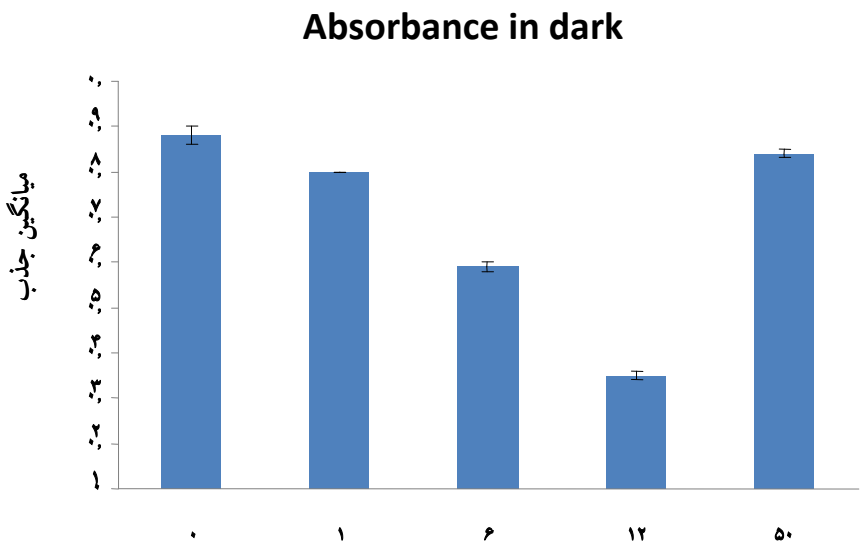
نتایج سنجش سمیت پورفیرازین روی بر سلول‌های هلا در تاریکی: همانطور که اشاره شد، آزمون MTT برای سنجش سمیت تاریکی پورفیرازین روی انجام شد. نتایج در نمودار ۲ (میزان جذب خوانده شده در دستگاه میکروپلیت الایزا در غلظت‌های مختلف کمپلکس) نشان داده شده است. با توجه به اینکه مقدار جذب نوری، نشان دهنده‌ی میزان سلول‌های زنده و فعال از نظر متابولیکی می‌باشد، سیر نزولی میزان جذب با افزایش غلظت پورفیرازین (در غلظت‌های کمتر از ۵۰ میکرومول)، نشان دهنده‌ی افزایش سمیت می‌باشد.

نتایج سنجش سمیت پورفیرازین روی بر سلول‌های هلا در نور شدید: بر اساس روش‌های بیان شده، آزمون MTT برای سنجش سمیت نوری پورفیرازین روی انجام شد. نتایج آزمون بر اساس اطلاعات حاصل از دستگاه میکروپلیت الایزا در نمودار ۳ مشخص شده است. بر اساس نمودار فوق، سمیت بیشترکمپلکس پورفیرازین، در حضور نور شدید قابل مشاهده است.

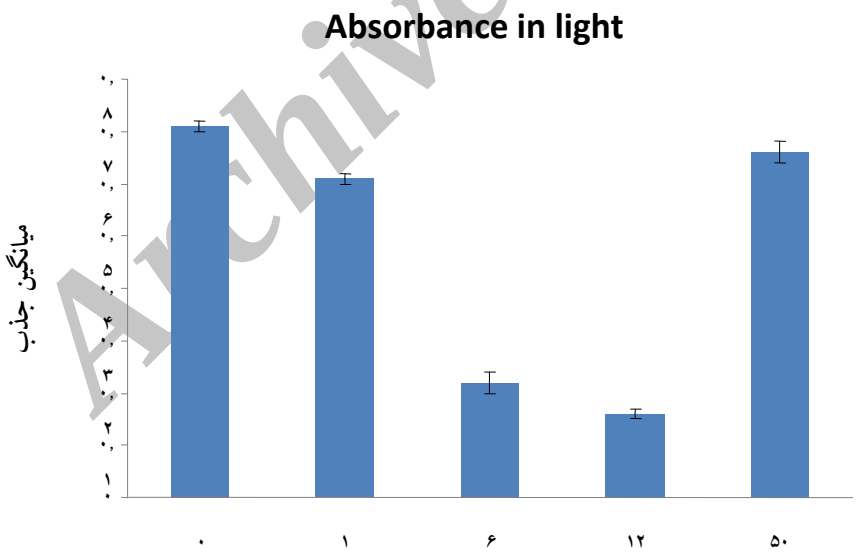
مقایسه‌ی سمیت نوری با سمیت تاریکی پورفیرازین روی بر سلول‌های هلا: بر اساس میانگین جذب‌های خوانده شده، درصد سلول‌های زنده در غلظت‌های مختلف کمپلکس در شرایط تاریکی و روشنایی به‌دست آمد. سمیت‌ها نسبت به هم مقایسه و نتایج درجدول ۱ نشان داده شده است.

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار ۲: نمودار نتایج حاصل از آزمون MTT برای سنجش سمیت تاریکی پورفیرازین روی بر سلول‌های هلا. محور x میانگین جذب حاصل از سه بار تکرار و محور y غلظت‌های مختلف کمپلکس تتراپیریدینو پورفیرازین روی می‌باشد.



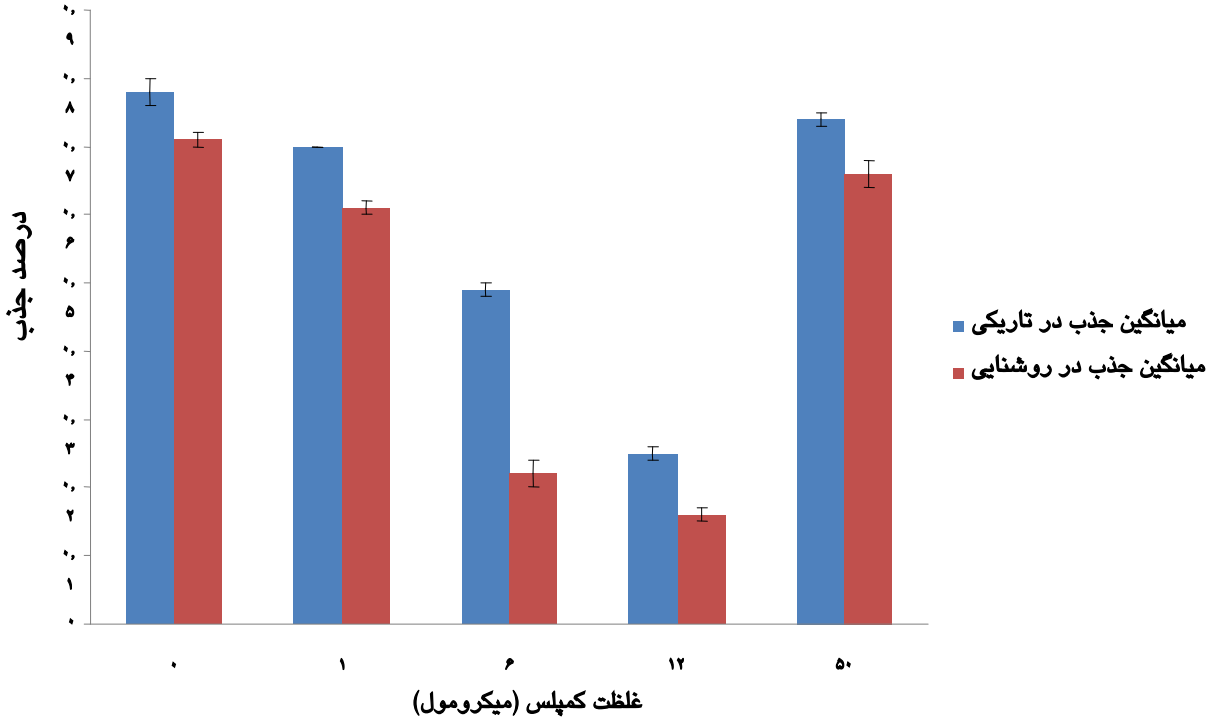
نمودار ۳: نمودار نتایج حاصل از آزمون MTT برای سنجش سمیت نوری پورفیرازین روی بر سلول‌های هلا. محور x میانگین جذب حاصل از سه بار تکرار و محور y غلظت‌های مختلف کمپلکس تتراپیریدینو پورفیرازین روی می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱: مقایسه‌ی نتایج حاصل از آزمون MTT برای سنجش سمیت در تاریکی و سمیت در نورشدید، در حضورکمپلکس تتراپیریدینو پورفیرازین روی برحسب میانگین جذب حاصل از سه بار تکرار آزمایش و درصد سلول‌های زنده‌ی مانده هلا. (در غلظت ۵۰ μM، کاهش میزان سمیت به علت رسوب کمپلکس به علت اشباع شدن در محیط RPMI می‌باشد).

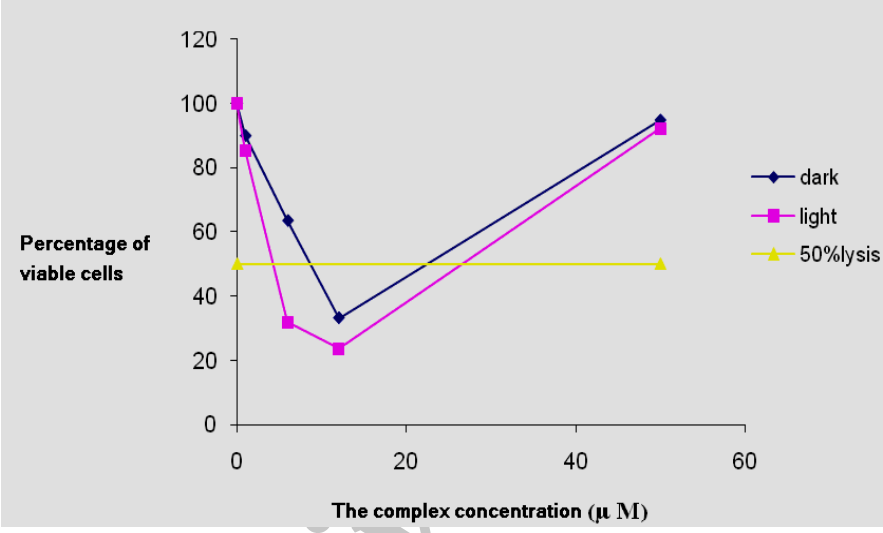
	غلظت پورفیرازین (μM)	۰	۱	٦	۱۲	۵۰
سنجش سمیت در تاریکی	میانگین جذب حاصل از سه بار تکرار	۰/۷۸	۰/۷۰	۰/٤۹	۰/۲۵	۰/۷٤
	درصد سلول‌های زنده مانده	۱۰۰±۰/۰۲	۹۰/۰۲	٦۳/۵±۰/۰۱	۳۳/۱±۰/۰۱	۹٤/۹±۰/۰۱
سنجش سمیت در نور شدید	میانگین جذب حاصل از سه بار تکرار	۰/۷۱	۰/٦۱	۰/۲۲	۰/۱٦	۰/٦٦
	درصد سلول‌های زنده مانده	۱۰۰±۰/۰۱	۸۵/۳±۰/۰۱	۳۱/۸±۰/۰۲	۲۳/٦±۰/۰۱	۹۲/۱±۰/۰۲



نمودار ٤: نمودار حاصل از درصد سلول‌های زنده نسبت به غلظت‌های مختلف پورفیرازین روی مشاهده می‌شود

www.SID.ir

نمودار (٤) نمودار مقایسه‌ی سمیت کمپلکس تتراپیریدینو پورفیرازین روی در نور شدید و سمیت آن درتاریکی، براساس میانگین جذب در سلول‌های هلا. محورx میانگین جذب حاصل از سه بار تکرار و محور y غلظت‌های مختلف کمپلکس تتراپیریدینو پورفیرازین روی می‌باشد. به کمک پارامتر $ED_{۵۰}$ (Effective Dose) یا دوز موثر، غلظتی از پورفیرازین روی، که در آن ۵۰ درصد سلول‌ها زنده مانده‌اند تعیین شده و $ED_{۵۰}$ غلظت‌های مختلف پورفیرازین روی با هم مقایسه می‌شود. به کمک این پارامتر همچنین می‌توان $ED_{۵۰}$ سمیت در تاریکی و سمیت در نور شدید را نیز با هم مقایسه نمود. مقادیر این پارامتر در شکل ۵ مشاهده می‌شود.



شکل ۵: نمودار درصد سلول‌های زنده نسبت به‌غلظت‌های مختلف پورفیرازین روی در سلول‌های هلا

مقدار این پارامتر در حالت تاریکی ۸/٦ میکرومول و در حالت روشنایی ٤/۲ میکرومول محاسبه شد که نشان دهنده‌ی سمیت دو برابر روشنایی نسبت به سمیت در تاریکی است.

بحث

در تحقیق حاضر، اثر سمیت کمپلکس تتراپیرید ینوپورفیرازین روی (II) بر سلول‌های سرطانی هلا بررسی شد و نتایج آن نشان داد با افزایش غلظت پورفیرازین (مقادیر کمتر از ۵۰ میکرو مول) و همچنین در حضور نور شدید، اثر سمیت کمپلکس، افزایش یافته، میزان بقای سلولی کاهش می‌یابد. این یافته‌ها با نتایج به‌دست آمده توسط سایر گروه‌های تحقیقاتی از قبیل کوستا و همکاران، بر روی فتالوسیانین کلروآلومینیوم (۸)، اوگاوا و همکارانش بر روی پورفیرین ایمیدازول (۱۰)، هایوود و همکاران بر روی فتالوسیانین (١٤)، گروه تحقیقاتی لای و همکاران بر روی فتالوسیانین BAM-Si (۱۵)، و تائو و همکارانش بر روی مشتقات فلزی فتالوسیانین‌ها (۱۹) مطابقت دارد. بیشترین تاثیر ایجاد شده در غلظت ۱۲ میکرومول مشاهده شد که در آن ۳۳/۱ درصد سلول‌ها در تاریکی و ۲۳/٦ درصد سلول‌ها در حضور نور شدید زنده باقی ماندند (جدول ۱). در غلظت ۵۰ میکرومول که انتظار می‌رفت بیشترین میزان مرگ در سلول‌ها مشاهد شود، کمپلکس پورفیرازین روی در RPMI

www.SID.ir

ایجاد رسوب نمود و از محیط واکنش حذف شد و نتوانست اثرگذاری مناسبی برروی سلول‌ها داشته باشد. میلا و همکارانش علت احتمالی رسوب ترکیبات کاتیونی از این دست را، بزرگی و پیچیده بودن ساختار کمپلکس‌ها، اشباع محیط واکنش و برهم‌کنش بارهای مثبت کمپلکس با بارهای منفی موجود درترکیبات RPMI می‌دانند (٤). مطالعات پاوانیا و همکاران نشان داد، هر چه بار مثبت ترکیب بیشتر باشد، میزان نفوذ ترکیب به درون سلول‌های هلا بیشتر می‌شود و رابطه ای مستقیم بین میزان پیوند غشایی و سمیت در حضور نور شدید وجود دارد (۹). با توجه به وجود چهار بار مثبت این کمپلکس، سمیت نوری مشاهده شده می‌تواند دال بر پیوند غشایی موثر این کمپلکس با سلول‌های هلا باشد. جهت اطمینان بیشتر از این موضوع می‌توان در مطالعات آینده پیوند غشایی و نیروهای دخیل در میان‌کنش این کمپلکس با غشای سلول‌های هلا را بررسی نمود. به کمک بررسی‌های آماری مشخص شد میزان $ED_{۵۰}$ سمیت در تاریکی، غلظت ۸/٦ میکرومول و $ED_{۵۰}$ سمیت در نور شدید، غلظت ٤/۲ میکرومول می‌باشد. بر این اساس میانگین فعالیت در روشنایی نسبت به تاریکی ۲/۱ به‌دست آمد، به عبارت دیگر فعالیت کشندگی پورفیرازین روی در حضور نور دو برابر بیشتر می‌شود. در تایید این بخش از مطالعات ما، نتایج سایر محققان نیز نشان دهنده‌ی اثر افزایشی نور بر روی سمیت ترکیباتی است که دارای خصلت حساس‌گری نوری هستند (۲۳-۷) به عنوان نمونه، می‌توان به بررسی‌های گروه تحقیقاتی سورتینا بر روی پورفیرین‌های آنیونی محاط شده با نانو پارتیکل‌های سیکلودکسترین به عنوان حامل (۷) و همچنین به بررسی یسلا و گروهش بر تتراکیس فتالوسیانین روی (۱۸) و بررسی گروه تحقیقاتی سهگال و همکاران در مورد درمان سرطان پروستات به کمک پورفیرین‌ها (۲۳) اشاره کرد. تنها در یک بررسی که بر روی ترکیب پیریدینوپورفیرین نقره انجام شده است، مشخص شد این ترکیب در غیاب نور فاقد سمیت است و اثر سمیت آن صرفاً در حضور نور شدید بروز می‌یابد (٤). نتایج تحقیقات صورت پذیرفته توسط واسکوئز و همکاران با حساس‌گر نوری انتخابی فتالوسیانین روی مشخص نموده هر چه میزان انحلال پذیری ترکیب بیشتر باشد، تجمع درون سلولی نیز بیشتر شده، سمیت ترکیب بیشتر بروز خواهد یافت (۲٤). با توجه به قابلیت انحلال‌پذیری بالای پورفیرازین روی (۲۵)، این فرضیه مطرح است که تجمع درون سلولی مناسبی از کمپلکس در درون سلول‌های هلا ایجاد شده باشد. در مجموع، به جز یک مورد (٤) نتایج به‌دست آمده در تحقیقات ما همسو با نتایج به‌دست آمده توسط سایر محققین با بررسی بر روی سلول‌های هلا است (۱٦-۱٤،۱۰). نتایج گزارش شده توسط محققین در به کارگیری ترکیبات مختلف با پتانسیل‌های متفاوت حساس‌گری در حضور نور شدید، از قبیل پورفیرین‌های سه بار مثبت توسط پاوانیا و همکاران (۹) ایمیدازول پورفیرین توسط اوگاوا و همکاران (۱۰) فتالوسیانین تتراتری فلورو اتوکسیل روی به دست گائو و همکارانش (۱۳) و فتالوسیانین‌های تتراسولفونیک‌اسید روی انتخاب شده توسط هایوود و گروه‌اش (۱٤) نشان داد میزان سمیت، رابطه‌ای مستقیم با افزایش غلظت، تعداد بار مثبت ترکیب و حضور نور دارد؛ اما با توجه به اینکه تحقیق حاضر اولین گزارش در مورد بررسی خاصیت حساس‌گری نوری و سمیت سلولی کمپلکس پورفیرازین روی می‌باشد، امکان مقایسه‌ی دقیق این نتایج با سایر مطالعات مشابه از نظر نوع کمپلکس و نوع رده‌ی سلولی وجود نداشت. همان‌گونه که اشاره شد، برتری این ترکیب نسبت به سایر ترکیبات از این دست، جدیدتر بودن ترکیبات پورفیرازینی نسبت به پورفیرین‌ها و فتالوسیانین‌ها و همچنین در وجود خصلت‌های مطلوبی از قبیل قابلیت برهم‌کنش با DNA، پارامغناطیسی بودن کمپلکس، وجود جذب نوری شدید در طول موج ٦۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر (در ناحیه‌ی مریی نور با قابلیت نفوذ بیشتر به

www.SID.ir
Archive of SID

بافت‌ها) و عدم تمایل به ایجاد توده (در غلظت‌های کمتراز ۵۰ میکرو مول) می‌باشد (۳).

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق ما نشان داد که، پورفیرازین روی به عنوان یک حساس‌گر نوری مطلوب، در آینده قابلیت کاربرد در PDT را می‌تواند داشته باشد. همچنین با توجه به سنتز ترکیباتی از این دست در آزمایشگاه‌های شیمی، این گونه تحقیقات که می‌تواند باعث ایجاد پیوند بین علوم مختلف شوند، ارزشمند بوده، باعث گشوده شدن دریچه‌هایی نوین، به سمت کاربردهای جدیدی از مواد و ترکیبات خواهد شد. با توجه به اهمیت موضوع برای حصول به نتایج بیشتر، انجام مطالعات وسیع تر بر روی سایر رده‌های سلولی، طول موج‌های مختلف تابشی و همینطور آزمایش در شرایط *In vivo* پیشنهاد می‌شود.

References

1- Plaetzer K, Krammer B, Berlanda J, Berr F, Kiesslich T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med Sci*. 2009; 24: 259-68.

2- Juarranz A, Jaén P, Sanz-Rodríguez F, Cuevas J, González S. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications.*Clin Transl Oncol*. 2008; 10: 148-54.

3- Asadi M, Safaei E, Ranjbar B and Hasani L. A study on the binding of two water-soluble tetrapyridinoporphyrazinato copper(II) complexes to DNA. *J Molecular Structure*. 2005; 754: 116-23.

4- Milla LN, Yslas EI, Cabral A, et al. Pharmacokinetic, toxicological and phototherapeutic studies of phthalocyanine ZnPcCF3.*Biomedicine Pharmacotherapy*. 2009; 63: 209-15.

5- Anttila A, Ronco G. Description of the national situation of cervical cancer screening in the member states of the European Union. *Eur J Cancer*. 2009; 45: 2685-708.

6- Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3: 380-7.

7- Sortino S, Mazzaqlia A, Scolaro LM, Merlo FM, Valveri V, Sciortino MT. Nanoparticles of cationic amphiphilic cyclodextrins entangling anionic porphyrins as carrier-sensitizer system in photodynamic cancer therapy. *Biomaterials*. 2006; 27: 4256-65.

8- Gostav MM, Naves KT, LimaAL, et al. Mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filament behavior afterPDT with chloroaluminum phthalocyanine liposomal in HeLa cells. *Cell Biology International*. 2008; 32: 1024-8.

9- Pavania C, Uchoab AF, Oliveirab CS, Iamamoto Y, Baptista MS. Effect of zinc insertion and hydrophobicity on the membrane interactions and PDT activity of porphyrin photosensitizers. *Photochem Photobiol Sci*. 2008; 8: 233-40.

10- Ogawa K, Hasegawa H, Inaba Y, et al. Water-soluble bis (imidazolylporphyrin) self-assemblies with large two-photon absorption cross sections as potential agents for

Archive of SID

www.SID.ir

photodynamic therapy. *J Med Chem*. 2006; 6: 49: 2276-83.

11- Villanueva A, Stockertab JC, Cañetea M, Acedoa P.A new protocol in photodynamic therapy: enhanced tumour cell death by combining two different photosensitizers. *Photochem. Photobiol Sci*. 2010; 9: 295-7.

12- Ahmad N, GuptaS, Feyse DK, Mukhtar H. Involvment of fas(APO-1/CD95) during photodynamic therapy- mediated apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *J Investigative Dermatology*. 2000; 6: 1041-6.

13- Gao L, Qianb X, Zhangc L, Zhang Y. Tetra-trifluoroethoxyl zinc hthalocyanine: potential photosensitizer for use in the photodynamic therapy of cancer. *J Photochemistry Photobiol B*. 2001; 65: 35-8.

14- Haywood SL, Vernon DI, Griffiths J, Schofield J, Brown SB. Phthalocyanine-mediated photodynamic therapy induces cell death and a G0/G1 cell cycle arrest in cervical cancer cells. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 2006; 339: 569-76.

15- Lai JC, Lo PC, Dennis KP, Hung Ko W, Fong WP, Stanley CH. BAM-SiPc, a Novel Agent for Photodynamic Therapy, Induces Apoptosis in Human Hepatocarcinoma HepG2 Cells by a Direct Mitochondrial Action.*Cancer Biology Therapy*. 2006; 5: 413-8.

16- Stukavec J, Horak L, Duchac V, et al. Comparison of photodynamic therapy with phthalocyanine and photofrin in human colorectal carcinoma. *Neoplasma*. 2007; 55: 2-11.

17- Banfi S, Caruso E, Buccafurni L, Ravizza R, Gariboldi M, Monti E. Zinc phthalocyanines-mediated photodynamic therapy induces cell death in adenocarcinoma cells. *J Organometallic Chemistry*. 2007; 692: 1269-76.

18- Yslas EI, Durantini EN, Rivarola VA. Zinc-(II) 2,9,16,23-tetrakis (methoxy) phthalocyanine: potential photosensitizer for use in photodynamic therapy in vitro. *Bioorg Med Chem*. 2007; 15: 4651-60.

19- Tao Q, Xiaoyong X, Jianwen L, Xuhong Q. Novel perfluoroalkyl phthalocyanine metal derivatives: Synthesis and photodynamic activities. *Dyes and Pigments*.2008; 83: 127-33.

20- Maioli E, Torricelli C, Fortino V, Carlucci F, Tommassini V, Pacini A. Critical appraisal of the MTT assay in the presence of rottlerin and uncouplers. *Biological Procedures Online*. 2009; 11: 227-9.

21- Schmitt F, Govindaswamy P, Süss-Fink G, Ang WH, Dyson PJ, Juillerat-Jeanneret L. Ruthenium porphyrin compounds for photodynamic therapy of cancer. *B J Med Chem*. 2008; 27; 51: 1811-6.

22- Longo JPF, Lozzi SP, Simioni AR, Morais PC, Tedesco AC, Azevedo RB. Photodynamic therapy with aluminum-chloro-phtalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors. *J Photochem Photobiol*. 2009; 94: 143-6.

23- Sehgal I, Sibrian-Vazquez M, Grac H, Vicente A. Photoinduced cytotoxicity and biodistribution of prostate cancer cell-targeted

Archive of SID

www.SID.ir

porphyrins. *M J Med Chem*. 2008; 51: 6014-20.
24- Vazquez MS, Ortiz J, Nesterova IV, et al. Synthesis and properties of cell-targeted Zn(II)- phthalocyanine-peptide conjugates. *Vicente Bioconjugate Chem.* 2007; 18: 410-20.
25- Asadi M, Safaei E, Ranjbarb B, Hasani L. Thermodynamic and spectroscopic study on the binding of cationic Zn(II) and Co(II) tetrapyridinoporphyrazines to calf thymus DNA: the role of the central metal in binding parameters. *New J Chem*. 2004; 28: 1227-34.

Archive of SID

www.SID.ir

Study of Photodynamic Effect of Zn(II)Tetrapyridinoporphyrazine Complex on HeLa Cell Line

Fakheri F[1], Rastegar H[1], Alebouyeh M[2], Esmaeilzadeh AR[3], Balaghi SE[4], Hakimian F[5], Akbari M[2], Mousavi Motlagh SS[2]

[1]Dept. of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

[2]Food and Drug Control Research Center, FDCL MOH, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran.

[3]Dept. of Immunology, Medical Faculty, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

[4]Dept. of Chemistry, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences (IASBS), Zanjan, Iran.

[5]Dept. of Biological sciences, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences (IASBS), Zanjan, Iran.

Corresponding Author: Rastegar H, Dept. of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

E-mail: mhrastegar@yahoo.com

Received: 25 Jan 2012 **Accepted:** 7 May 2012

Background and Objective: Photodynamic therapy is a treatment that uses photosensitizer and intense visible light. When photosensitizers get exposed to a specific light wavelength (preferentially in the red region), they produce reactive oxygen species that are toxic to cells. Recently, attention has been focused on porphyrins and their analogs as photosensitizers. Zn (II) tetrapyridinoporphyrazin complex is a water-soluble photosensitizer that has a good potential for application in photodynamic therapy. In this study, phototoxic effect of this complex on HeLa cancer cell line has been investigated.

Materials and Methods: HeLa cell cultures were treated with different concentrations of Zn (II) tetrapyridinoporphyrazin. The cytotoxic effects were measured both in the presence and absence of light using the MTT assay. The light source was a 150W tungsten halogen lamp equipped with a red filter.

Results: Our data indicate that porphyrazine's photocytotoxicity is remarkably more significant than its cytotoxycity in the dark. Statistical analysis showed the effective dose (ED_{50}) values in the dark and light conditions were 8.6 and 4.2 μM, respectively. In addition, the results imply that in the range of 0-12 μM, the increase in the complex concentration correlates with the increase in the cytotoxicity effect. However, the cytotoxicity decreases at the higher concentration (50μM), which is likely due to aggregation of the complex.

Conclusion: Our results show that Zn (II) tetrapyridinoporphyrazin complex may be a promising photosensitizer for innovative photodynamic therapy and may have a high potential application in cancer treatment. Furthermore, it seems to have more benefits compared to other known photosensitizers.

Keywords: Zn(II)tetrapyridinoporphyrazin, Photodynamic therapy, Photosensitizer, HeLa cell line, MTT assay

Archive of SID

www.SID.ir