

ORIGINAL ARTICLE

Cytotoxic Evaluation of Low-Dose Doxorubicin in MCF-7, 4T1 and CHO Cell Lines

Raheleh Pourbafrani^{1*}, Majid Rajabiian¹, Reza Hajihossini¹

1. Departemant of Biology, Payame Noor University, Tehran.Iran.

Correspondence

Raheleh Pourbafrani

Email: rhlpbf@gmail.com

How to cite

Pourbafrani, R., Rajabiian, M., & Hajihossini, R. (2026). Investigating The Cytotoxic Effects of Doxorubicin on Breast Cancer and Normal Cells. *Experimental Animal Biology*, 14(55), 13-20.

ABSTRACT

Breast cancer is the second most common cancer in the world and of chemotherapy is one the main treatments for this disease high systemic toxicity of Doxorubicin (Dox) at conventional does limits its clinical use. This study quantitatively assesses low-dose Dox cytotoxicity on human breast cancer lines (MCF-7, 4T1) versus normal CHO cells, determining the IC₂₅. the goal is to develop targeted delivery systems that reduce adwers effects and enhance therapeutic efficacy cells were exposed to Dox (0.1-0.5μM) for 24h. MTT assay quantified viability formazan in DMSO, A₅₇₀ and A_{630nm} was measured by a microplate reader. IC₂₅ was calculated per cell line, with statistical significance assessed. Dose-depdent viability reduction observed significant difference between CHO and MCF-7 (P=0.0007) indicated selective cytotoxicity. MCF-7 showed highest sensitivity, then 4T1, with CHO more resistant. Specifically, at 0.5μMDox MCF-7 viability dropped to 75.24, 4T1 to 76.16 and CHO to 82.16 the determinate IC₂₅ values confirmed Dox's potent inhibitory activity at reduced concentrations, suggesting targeted delivery could unlock its full therapeutic potential by increasing local concentration and effectiveness. This research valieates Dox's selective targeting of cancer cells at low doses IC₂₅. finding support novel delivery systems minimizing patient toxicity and crucially, maximizing anti-cancer impact, paving the way for more effective breast cancer treatments.

KEYWORDS

Breast cancer, cell viability, Chemotherapy, Doxorubicin.

نشریه علمی

زیست‌شناسی جانوری تجربی

«مقاله پژوهشی»

ارزیابی سیتوتوکسیک دوز پایین دوکسوروبیسین در رده‌های سلولی MCF-7، 4T1 و CHO

راحله پوربافرانی^{۱*}، مجید رجیبان نقندر^۱، رضا حاجی حسینی^۱

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

چکیده

سرطان سینه دومین سرطان رایج در دنیاست و شیمی‌درمانی یکی از اصلی‌ترین درمان‌های این بیماری می‌باشد. سمیت سیستمیک بالای دوکسوروبیسین (Dox) در دوزهای درمانی، کاربرد بالینی آن را محدود می‌کند. این پژوهش، اثرات سیتوتوکسیک را به صورت کمی بر روی رده‌های سلولی سرطان سینه (MCF-7، 4T1) در مقایسه با سلول‌های نرمال CHO ارزیابی و IC_{50} را تعیین می‌نماید. هدف، توسعه سیستم‌های دارورسانی هدفمند است که عوارض جانبی را کاهش و اثربخشی درمانی را افزایش دهند. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در معرض دوزهای (۰/۱-۰/۵) میکرومولار قرار گرفتند. سنجش MTT زنده‌مانی را کمی‌سازی کرد. فورمازان در DMSO حل و جذب نوری در طول موج‌های ۵۷۰ و ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. IC_{50} برای هر رده سلولی محاسبه و اهمیت آماری آن ارزیابی شد. کاهش وابسته به دوز در زنده‌مانی سلول‌ها مشاهده شد. تفاوت معنی‌دار بین CHO و MCF-7 ($P=0/0007$) بیانگر سمیت اختصاصی بود. MCF-7 بیش‌ترین حساسیت را نشان داد، سپس 4T1، درحالی‌که CHO مقاوم‌تر بود. به طور مشخص، در دوز ۰/۵ میکرومولار درصد زنده‌مانی MCF-7 حدود ۷۵/۲۴، 4T1 ۷۶/۱۶ و CHO ۸۲/۱۶ بود. مقادیر IC_{50} تعیین شده، اثربخشی قوی دوکسوروبیسین در غلظت‌های کاهشی را تأیید کرد که نشان می‌دهد دارورسانی هدفمند می‌تواند پتانسیل درمانی آن را با افزایش غلظت موضعی و اثربخشی، آزاد سازد. این پژوهش تأیید می‌کند که دوکسوروبیسین در دوزهای پایین IC_{50} به طور اختصاصی سلول‌های سرطانی را هدف قرار می‌دهد. یافته‌ها قویاً از سیستم‌های نوین دارورسانی که سمیت بیمار را به حداقل رسانده و مهم‌تر از آن، تأثیر ضد سرطانی دارو را به حداکثر می‌رسانند، حمایت می‌کند و راه را برای درمان مؤثرتر سرطان سینه هموار می‌سازند.

واژه‌های کلیدی

درصد زنده‌مانی، دوکسوروبیسین، سرطان سینه، شیمی‌درمانی.

نویسنده مسئول:

راحله پوربافرانی

رایانامه: rhlbpf@gmail.com

استناد به این مقاله:

پوربافرانی، راحله؛ رجیبان نقندر، مجید و حاجی حسینی، رضا (۱۴۰۴). بررسی اثرات سیتوتوکسیک دوکسوروبیسین بر روی سلول‌های سرطان سینه و نرمال. فصلنامه زیست‌شناسی جانوری تجربی، ۱۴(۵۵)، ۲۰-۱۳.

مقدمه

سرطان سینه یکی از شایع‌ترین و کشنده‌ترین انواع سرطان است و چالش‌های زیادی در درمان آن وجود دارد (کاتسورا و همکاران، ۲۰۲۲). با توجه به این که رویکردهای درمانی مدرن میزان مرگومیر ناشی از این سرطان را کاهش داده‌اند، اما همچنان میزان ابتلا به این بیماری بسیار بالاست. سرطان پستان با ترکیبی از شیمی‌درمانی، جراحی تومورهای قابل جراحی، رادیوتراپی و شیمی‌درمانی کمکی ویا با درمان غدد درون ریز درمان می‌شود (بیاتا اسمولاز و همکاران، ۲۰۲۲). آنترا سایکلین‌ها دسته‌ای از داروهای شیمی‌درمانی هستند که از باکتری استرپتومایسیس استخراج می‌شوند، در واقع آنتراسایکلین‌ها ترکیبات طبیعی هستند که تأثیر خود را از طریق تداخل در فعالیت آنزیم توپوایزومراز ایفا می‌کند. دوکسوروبیسین به این گروه تعلق دارد و اغلب با سایر ترکیبات استفاده می‌شود (توگس نوراراپ و همکاران، ۲۰۲۳). داروهای شیمی‌درمانی، به‌ویژه دوکسوروبیسین (Dox)، نقش کلیدی در کاهش تکثیر سلول‌های سرطانی دارند. با این حال، سمیت غیر اختصاصی داروها و مقاومت سلولی، از موانع مهم درمان هستند (هسپرین و همکاران، ۲۰۲۰). دوکسوروبیسین با مهار آنزیم توپوایزومراز II و تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) باعث آسیب به DNA و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود (سزپونارو همکاران، ۲۰۲۴). مطالعه‌ای نشان داد که اثرات دوکسوروبیسین می‌تواند در حضور میدان‌های الکترومغناطیسی فرکانس پایین تقویت شود و با کاهش وابسته به دوز زنده‌مانی سلول‌ها همراه باشد که به دلیل عروق نشت‌کننده تومور و اختلال در تخلیه لنفاوی منجر به افزایش نفوذپذیری و احتباس (EPR)^۱ می‌شود. به همین علت باعث افزایش اثرات سیتوتوکسیک داروهای شیمی‌درمانی می‌شود و به دنبال آن باعث عوارض جانبی زیادی می‌شود که برای کاهش عوارض این دارو مطالعاتی که بر روی ترکیب دوکسوروبیسین با ترکیباتی مانند فلزات انجام شده است نشان می‌دهد که رده سلولی 4T1 علاوه بر افزایش اثرات سیتوتوکسیک باعث مهار مهاجرت سلولی نیز می‌شود (کامینسکا و همکاران، ۲۰۲۳). در مطالعه‌ای دیگر (چنگ و همکاران، ۲۰۲۲)، گزارش کردند که نانوپارتیکل‌ها می‌توانند به‌طور خیلی انتخابی وارد ناحیه تومور شوند و براساس خواص فیزیکوشیمیایی برای مدت طولانی‌تری

در ریزمحیط تومور باقی بمانند و یا برای افزایش اختصاصیت از توالی‌های اختصاصی نظیر آپتامرها استفاده نمود، آپتامرها مولکول‌های تک‌رشته‌ای (ssDNA) یا RNA هستند که ساختار سه بعدی منحصر به فردی دارند که به آن‌ها اجازه می‌دهد با میل ترکیبی و اختصاصیت بالا به اهداف مولکولی مختلف متصل شوند (دروساو همکاران، ۲۰۲۳). رده‌های سلولی MCF-7 و 4T1 به‌عنوان مدل‌های انسانی و موشی سرطان سینه به‌ترتیب برای سرطان‌های هورمونی مثبت و سه‌گانه منفی استفاده می‌شوند، درحالی که سلول‌های CHO به‌عنوان مدل نرمال برای بررسی سمیت داروها کاربرد دارند. آزمون MTT^۲ یکی از استانداردهای رایج‌ترین روش‌ها برای اندازه‌گیری زنده‌مانی سلولی و اثرات سیتوتوکسیک داروهاست که معمولاً IC_{۵۰} محاسبه می‌گردد.

داروهای خاصی مانند سیکلوفسفاید، دوکسوروبیسین، جمستاین، ۵-فلورواسیل، سیس‌پلاتین و غیره معمولاً خاص، باعث سمیت سیستمیک شدید می‌شوند (فان و همکاران، ۲۰۲۳). علاوه بر عوامل شیمی‌درمانی متعدد مانند دوکسوروبیسین، سیکلوفسفامید درمان هورمونی با تاکسونین و آناستروزول، پرتودرمانی و جراحی، میزان بقای طولانی‌مدت این بیماران هنوز به دلیل عوارض جانبی احتمالی این درمان‌ها با استفاده از عوامل سیتوتوکسیک قوی و همچنین مقاومت مولکولی ایجادشده در طول دوره درمان کاهش یافته است (ارالپ و همکاران، ۲۰۲۴). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که دوکسوروبیسین دارای اثرات سیتوتوکسیک قوی بر روی سلول‌های سرطانی است و می‌تواند از طریق القای آپوپتوز و تولید (ROS) باعث کاهش زنده‌مانی سلول‌ها شود (کامینسکا و همکاران، ۲۰۲۳). هدف این مطالعه بررسی اثرات دوکسوروبیسین با کم‌ترین غلظت‌ها و محاسبه IC_{۲۵} بر روی رده‌های سلولی سرطان سینه و مقایسه آن با سلول‌های نرمال CHO است تا بتواند به طراحی استراتژی‌های دارورسانی هدفمند با کم‌ترین عوارض جانبی کمک کند.

روش‌شناسی پژوهش

رده سلولی آدنوکارسینومای سرطان سینه انسانی (MCF-7)، رده سلولی سرطان سینه موش که مرحله چهار سرطان سینه انسان را تقلید می‌کند (4T1) رده سلولی تخمدان همستر چینی (CHO) از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. دوکسوروبیسین - هیدروکلراید از

شرکت سینپاس فارما خریداری شد. محیط کشت ۱۶۴۰ (RPMI) Roswell park Memorial Institue، سرم جنین گاوی (FBS)، تریپسین-EDTA (۰/۲۵ درصد) پنی‌سیلین-استرپتومایسین ۱۰۰۰۰ u/ml (penstrep) از شرکت گیو آمریکا خریداری گردید. N-بوتانول-۳-۵-۴ دی‌متیل تیزول-۲-یل [۲-۵ دی‌فنیل تترازولیوم بروماید (MTT) ازیسیگما آلد ریچ خریداری و از دستگاه‌های آنالایزر اندازه ذرات (uk، Malvern) و میکروپلیت ریدر (BioTek USA synergy H4 hybrid model) استفاده شد.

کشت سلول‌های سرطانی و نرمال

در این پژوهش، به‌منظور کشت سلولی هر یک از رده‌های سلولی سرطانی MCF-7 (انسانی) و 4T1 (موشی) و CHO (همستر) به فلاسک‌های ۲۵ سانتی‌متر مربع حاوی محیط کشت ۱۶۴۰-RPMI، ۱۰ درصد FBS، ۱ درصد پنی‌سیلین استرپتومایسین اضافه شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 نگهداری و ۲۴ ساعت پس از چسبیدن سلول‌ها به کف فلاسک محیط سلول‌ها دور ریخته شد و بعد از دو بار شست و شو با PBS گرم با محیط کشت تازه تعویض شد بعد از این که کف فلاسک‌ها پر از سلول شد به‌منظور پاساژ سلولی فلاسک‌ها با PBS شست و شو داده شد و با اضافه کردن ۴۵۰ میکرو لیتر Trypsin-EDTA و تقریباً ۲ دقیقه قرار گرفتن در انکوباتور و سپس با چندین بار ضربه به فلاسک سلول‌ها از فلاسک جدا شده و به تقریباً سه برابر مقدار تریپسین معادل ۱۵۰۰ میکرو لیتر محیط کشت به فلاسک‌ها اضافه و چندین بار پیپت شدند، در نهایت با ۵ دقیقه ساترفیوژ و دور ریختن سوسپانسیون رویی سلول‌ها به‌همراه محیط کشت تازه به فلاسک‌های کشت منتقل شدند. پس از هر بار بررسی سلول‌ها در زیر میکروسکوپ در صورت نیاز (تغییر رنگ محیط فلاسک‌ها از صورتی به زرد)، محیط کشت سلول‌ها تعویض شد. به‌منظور بررسی IC_{25} بعد از سومین پاساژ سلولی (زمانی که سلول‌ها در فاز لگاریتمی بودند)، هر یک از رده‌های سلولی به‌صورت جداگانه در پلیت‌های مجزا، مقدار 5×10^3 سلول در هر چاهک ریخته شد و سپس در زمان مناسب در معرض غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین قرار گرفتند برای هر رده سلولی سه مرتبه این آزمون به‌صورت مستقل انجام شد.

ارزیابی سمیت سلولی با آزمون MTT

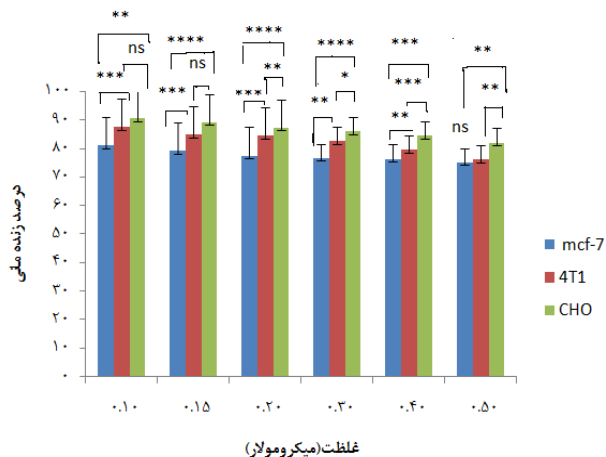
یکی از روش‌های اندازه‌گیری فعالیت سایتوتوکسیکی و سمیت سلولی مواد سمی و ترکیبات دارویی روش رنگ سنجی تست MTT

است. MTT یک نمک تترازول زرد رنگ است که بعد از احیا در سلول‌ها توسط آنزیم‌های اکسیدوردوکتاز (به‌ویژه سوکسینات دهیدروژناز) به فورمازان بنفش رنگ تبدیل می‌شود و تنها در حضور آنزیم‌های ردوکتاز فعال موجود در میتوکندری سلول‌های زنده فرایند احیا و تبدیل MTT به فورمازان ارغوانی انجام می‌شود. بر این اساس روشی مناسب برای تعیین میزان سلول‌های زنده محسوب می‌شود. به‌منظور بررسی سمیت سلولی دوکسوروبیسین بر روی رده‌های سلولی سرطان سینه و رده سلولی نرمال به‌عنوان گروه کنترل تست MTT انجام شد. دوکسوروبیسین هیدروکلراید در غلظت‌های مختلف تهیه و سلول‌ها در معرض دارو قرار گرفتند. به‌منظور ارزیابی تفاوت در میزان جذب رنگ فورمازان ایجاد شده در هر سه گروه مورد آزمایش، محاسبات آماری با استفاده از آزمون واریانس دوطرفه (Tow away ANOVA) و سپس آزمون تعقیبی Tukey انجام شد و به‌منظور استنباط منطقی نتایج آماری $P < 0.05$ در نظر گرفته شد.

روش انجام کار

در سومین پاساژ سلول‌ها بعد از تریپسینه‌شدن در پلیت‌های ۹۶ خانه به تعداد ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک قرار داده شدند. برای هریک از رده‌های سلولی یک پلیت جداگانه در نظر گرفته شد، بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون سلول‌ها در معرض غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین (۰/۵، ۰/۴، ۰/۳، ۰/۲، ۰/۱۵، ۰/۱، میکرومولار) قرار گرفتند و بعد از سه ساعت محیط کشت سلول‌ها با محیط تازه تعویض شد پس از ۲۴ ساعت دیگر، ۱۰ میکرو لیتر محلول MTT به هر چاهک اضافه شد (غلظت MTT داخل هر چاهک معادل ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و بعد از سه ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 ، محیط حاوی MTT از چاهک‌ها تخلیه و با ۱۰۰ میکرو لیتر DMSO^۱ برای حل کردن کریستال‌های فورمازان اضافه شد پس از ۲۰-۱۵ دقیقه پلیت‌ها به آرامی شیک شدند. رنگ ایجاد شده در چاهک‌های پلیت در طول موج‌های ۵۷۰ و ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر خوانش شد و این تست برای هر یک از غلظت‌های یاد شده سه بار (سه آزمون مستقل هر بار برای هر غلظت در شش چاهک مجزا) تکرار شد. داده‌های حاصل از آزمون MTT به‌صورت درصد زنده‌مانی سلولی نسبت به گروه کنترل بیان شدند. برای بررسی اثر غلظت دوکسوروبیسین، نوع رده سلولی و اثر متقابل این دو عامل بر زنده‌مانی سلول‌ها، از آزمون (Tow way ANOVA) استفاده شد. در این تحلیل،

۶۱، ۸۲ درصد از کل تغییرات را توضیح داد و اثر آن از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0.0001$).



نمودار ۱. بررسی درصد زنده‌مانی رده‌های سلولی در غلظت‌های (۰/۱) تا (۰/۵ میکرومولار)، عدم قطعیت (error bar) برای غلظت‌های کمتر از ۰/۲۵ میکرومولار ۱۰ درصد و برای غلظت‌های بیش‌تر از ۰/۲۵ میکرومولار ۵ درصد در نظر گرفته شد. تحلیل آماری با استفاده از آزمون Tow way ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey انجام شد. ($p < 0.05$), ($p < 0.01$), ($p < 0.001$) و ($p < 0.0001$) ns معنی‌دار نبود.

همچنین اثر اصلی غلظت دوکسوروبیسین نیز معنی‌دار بود و ۳۲، ۶۶ درصد از تغییرات کل را توضیح داد ($P < 0.0001$). این یافته نشان می‌دهد که افزایش غلظت دوکسوروبیسین به‌طور معنی‌داری با کاهش زنده‌مانی سلولی همراه بوده است. علاوه بر این، اثر متقابل بین غلظت دوکسوروبیسین و نوع رده سلولی نیز معنی‌دار بود ($P < 0.0001$) و ۳، ۷۰ درصد از تغییرات کل را توضیح داد. معنی‌دار بودن این اثر متقابل نشان می‌دهد که پاسخ رده‌های سلولی مختلف به افزایش غلظت دوکسوروبیسین یکسان نبوده و میزان حساسیت به دارو به نوع رده سلولی وابسته است.

در جدول ANOVA، اثر متقابل غلظت و رده سلولی با $F(30, 10) = 11.75$ معنی‌دار بود. اثر غلظت نیز با $F(16, 18) = 20.74$ ، $F(2, 6) = 112.8$ و اثر نوع رده سلولی با $F(2, 6) = 112.8$ معنی‌دار گزارش شد. همچنین اثر subject نیز معنی‌دار بود ($p = 0.0019$)، اگرچه سهم آن از تغییرات کل نسبتاً محدود بود (نمودار ۲). همچنین فاصله اطمینان بین گروه‌ها با آزمون تعقیبی Tukey چندگانه مقایسه شد (نمودار ۳).

غلظت دوکسوروبیسین و نوع رده سلولی به‌عنوان عوامل مستقل در نظر گرفته شدند. در مواردی که اختلاف معنی‌داری مشاهده شد، مقایسه‌های چندگانه با استفاده از آزمون پس آزمون Tukey انجام گرفت. سطح معنی‌داری آماری برابر با ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار Graphpad prism (نسخه ۹/۵) انجام شد.

یافته‌های پژوهش

نتایج آزمون MTT نشان داد که دوکسوروبیسین موجب کاهش زنده‌مانی سلولی در هر سه رده سلولی 4T1، MCF-7 و CHO شد. این کاهش به‌صورت وابسته به غلظت مشاهده گردید. به‌طوری‌که با افزایش غلظت دوکسوروبیسین از ۰/۱ تا ۰/۵ میکرومولار، درصد زنده‌مانی سلولی در هر سه رده کاهش یافت (جدول ۱).

در رده سلولی MCF-7، زنده‌مانی سلولی از ۸۱/۲۷ درصد در غلظت ۰/۱ میکرومولار به ۷۵/۲۴ درصد در غلظت ۰/۵ میکرومولار کاهش یافت. در رده 4T1 نیز درصد زنده‌مانی از ۸۷/۶۱ درصد در غلظت ۰/۱ میکرومولار به ۷۶/۱۶ درصد در غلظت ۰/۵ میکرومولار رسید. در رده سلولی CHO، زنده‌مانی از ۹۰/۷۸ درصد در غلظت ۰/۱ میکرومولار به ۸۲/۱۶ درصد در غلظت ۰/۵ میکرومولار کاهش یافت. این نتایج نشان می‌دهد که هر سه رده سلولی نسبت به دوکسوروبیسین پاسخ کاهشی نشان دادند، اما شدت این پاسخ در بین رده‌ها متفاوت بود (نمودار ۱).

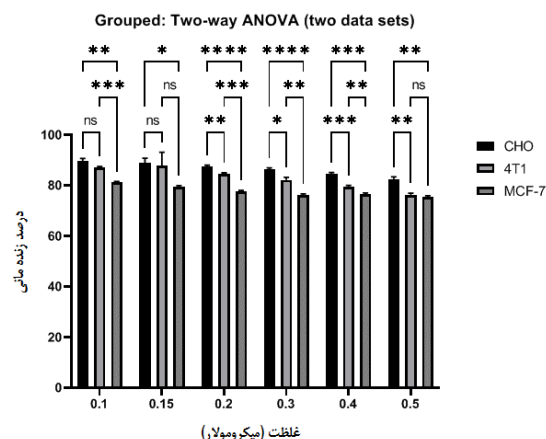
در مجموع، سلول‌های MCF-7 بیش‌ترین حساسیت رو نسبت به دوکسوروبیسین نشان دادند، درحالی‌که سلول‌های CHO در محدوده غلظت‌های بررسی شده مقاومت نسبی بیش‌تری داشتند. مقدار IC_{25} برای رده MCF-7 به‌صورت برآوردی حدود ۰/۵۲ میکرومولار و برای رده 4T1 حدود ۰/۵۴ میکرومولار محاسبه شد. در مقابل، رده CHO در محدوده غلظت‌های ۰/۱ تا ۰/۵ میکرومولار به مهار ۲۵ درصدی نرسید و بنابراین مقدار IC_{25} آن بالاتر از ۰/۵ میکرومولار در نظر گرفته شد.

برای بررسی دقیق‌تر اثرات غلظت دوکسوروبیسین و نوع رده سلولی بر زنده‌مانی، داده‌ها با استفاده از آزمون (Tow way ANOVA) تحلیل شدند. نتایج این تحلیل نشان داد که اثر اصلی نوع رده سلولی بر زنده‌مانی معنی‌دار بود و بیش‌ترین سهم را در تغییرات مشاهده شده به خود اختصاص داد. نوع رده سلولی

جدول ۱. مقادیر برآوردی IC_{۲۵} دوکسوروبیسین در رده‌های سلولی مختلف

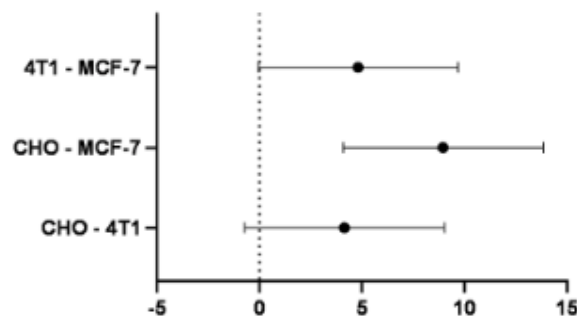
رده سلولی	مقدار IC _{۲۵} برآوردی دوکسوروبیسین (میکرومولار)	تفسیر
MCF-7	~۰/۵۲	بیش‌ترین حساسیت نسبت به دارو
4T1	~۰/۵۴	حساسیت متوسط نسبت به دارو
CHO	>۰/۵	عدم دستیابی در محدوده غلظت‌های بررسی شده

(۲۰۲۲) هر روش حساسیت‌ها و محدودیت‌های خاص خود را دارد و تأثیر زمان تیمار بر IC_{۵۰} داده‌های رده سلولی 4T1 به‌وضوح نشان می‌دهد که با افزایش زمان تیمار، مقدار IC_{۵۰} کاهش می‌یابد بعد از ۲۴ ساعت در غلظت‌های ۸/۰۵ میکرومولار و بعد از ۴۸ ساعت تیمار غلظت دارو برابر ۵/۸۳ میکرومولار می‌باشد و باتوجه به این نکته که سنجش MTT با دوکسوروبیسین، به دلیل رنگ قرمز ذاتی دوکسوروبیسین و فلورسانس، مقدار زیاد این دارو می‌تواند در خوانش جذبی MTT اختلال ایجاد کند و از طرف دیگر چون در IC_{۵۰} حدود ۰/۱ میکرومولار شکست DNA مشاهده نمی‌شود، مکانیسم مهار رشد احتمالاً از طریق تداخل با بازشدن DNA است و این مسئله که در غلظت IC_{۵۰}، اکثر سلول‌ها وارد آپوپتوز تأخیری می‌شوند (رافعی و همکاران، ۲۰۲۲). در مطالعه حاضر، اثرسیتوتوکسیک دوکسوروبیسین بر سه رده سلولی MCF-7، 4T1 و CHO با استفاده از آزمون MTT بررسی شد. نتایج نشان داد که دوکسوروبیسین موجب کاهش زنده‌مانی در هر سه رده مورد بررسی می‌شود این کاهش با افزایش غلظت دارو تشدید می‌گردد. با این حال، شدت پاسخ به دوکسوروبیسین در بین رده‌های سلولی یکسان نبود و تفاوت قابل‌توجهی میان سلول‌های توموری و غیر توموری مشاهده شد. تحلیل Tow way ANOVA نشان داد که نوع رده سلولی مهم‌ترین عامل مؤثر بر تغییرات زنده‌مانی سلولی بود و بیش‌ترین سهم را در واریانس کل داده‌ها داشت. این یافته‌ها نشان می‌دهد که ویژگی‌های زیستی هر رده سلولی، از جمله منشأ سلولی، ظرفیت متابولیکی، وضعیت چرخه سلولی و احتمالاً تفاوت در مسیرهای پاسخ به استرس می‌تواند در میزان حساسیت به دوکسوروبیسین نقش مهمی داشته باشد. علاوه بر این، اثر معنی‌دار غلظت دوکسوروبیسین تأیید می‌کند که پاسخ سلول‌ها به دارو ماهیتی وابسته به دوز دارد. معنی داربودن اثر متقابل غلظت و نوع رده سلولی نیز نشان می‌دهد که الگوی کاهش زنده‌مانی در رده‌های مختلف یکسان نیست و حساسیت به دوکسوروبیسین به زمینه سلولی وابسته است.



نمودار ۲. داده‌ها به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (Mean $\pm$ SD) سه تکرار مستقل ارائه شده‌اند. تحلیل آماری با استفاده از آزمون Tow way ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey انجام شد. ($p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$, $p<0.0001^{***}$ و ns معنی‌دار نبود).

۹۵ درصد فاصله اطمینان



تفاوت معنی‌دار بین گروه‌ها

نمودار ۳. فاصله اطمینان بین گروه‌ها رو با آزمون تعقیبی Tukey چندگانه مقایسه می‌کند که تفاوت معنادار ($P=۰/۰۰۷$) بین رده‌های MCF-7 و CHO مشاهده می‌شود.

با توجه به این که در مطالعات مختلف روش‌های سنجش سمیت و بررسی IC_{۵۰} از روش‌های مختلفی، بیش‌تر MTT استفاده شده است (ایرانپور و همکاران، ۲۰۲۱a). با این حال، در برخی مطالعات از روش‌های جایگزین مانند Alamar blue (resazurin) نیز استفاده می‌شود (رافعی و همکاران،

دوکسوروبیسین، امکان ارزیابی اثرات تحت کشنده و انتخاب‌پذیری دارو را فراهم نمود. نتایج نشان داد که در هر شش غلظت موردبررسی، رده‌های سلولی سرطان سینه MCF-7 و 4T1 کاهش زنده‌مانی بیش‌تری نسبت به سلول‌های نرمال CHO نشان می‌دهند. این اختلاف پاسخ می‌تواند نشان‌دهنده وجود یک پنجره درمانی بالقوه باشد که در آن دوکسوروبیسین قادر است رشد سلول‌های سرطانی را با حداقل سمیت برای سلول‌های نرمال مهار نماید. از سوی دیگر، تفاوت پاسخ بین رده‌های MCF-7 و 4T1 قابل توجه است، به گونه‌ای که MCF-7 در هر شش غلظت حساسیت بیش‌تری نسبت به دارو نشان داد. این یافته‌ها می‌تواند به تفاوت‌های زیستی و مولکولی این دو رده سلولی از جمله وضعیت گیرنده‌های هورمونی، نرخ تکثیر و مسیرهای فعال مرگ سلولی مرتبط باشد. همچنین، الگوی کاهش تدریجی زنده‌مانی سلولی در دوزهای پایین، حاکی از آن است که اثرات دوکسوروبیسین در این محدوده غلظتی احتمالاً از طریق مهار تکثیر سلولی، توقف چرخه سلولی و آغاز مسیرهای آپوپتیک اعمال می‌شود، نه القای مرگ حاد سلولی. با این حال، تأیید قطعی این مکانیسم‌ها مستلزم انجام آزمون مولکولی تکمیلی می‌باشد. نوآوری این پژوهش در تمرکز بر تحلیل اثرات سایتوتوکسیک دوکسوروبیسین در دوزهای تحت کشنده و نزدیک به IC_{25} و مقایسه پاسخ رده‌های سلولی سرطان سینه با سلول‌های نرمال CHO می‌باشد. برخلاف بسیاری از مطالعات که بیش‌تر به IC_{50} محدود شده‌اند، نتایج حاضر نشان می‌دهد که بررسی دوزهای پایین‌تر می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در خصوص انتخاب‌پذیری دارو و پیش‌بینی پنجره درمانی ایمن را فراهم نماید. این رویکرد می‌تواند در طراحی راهبردهای درمانی با هدف کاهش عوارض جانبی و افزایش اثربخشی داروهای شیمی‌درمانی مؤثر باشد.

محدودیت‌های مطالعه

با وجود نتایج قابل توجه این پژوهش، برخی محدودیت‌ها نیز وجود دارد. در مطالعه حاضر، اثرات سایتوتوکسیک دوکسوروبیسین تنها براساس آزمون MTT ارزیابی شد و بررسی مستقیم مکانیسم‌های مولکولی دخیل در مرگ سلولی، از جمله تولید گونه‌های فعال اکسیژن، آسیب DNA و القای آپوپتوز انجام نشد. همچنین محدوده غلظت‌های موردبررسی محدود به 0.1 تا 0.5 میکرومولار

در میان رده‌های بررسی‌شده، سلول‌های MCF-7 حساسیت بیش‌تری نسبت به دوکسوروبیسین نشان دادند. مقدار زنده‌مانی این رده در بالاترین غلظت مورد بررسی به حدود ۷۵ درصد کاهش یافت و مقدار IC_{25} آن به صورت برآوردی 0.52 میکرومولار تعیین شد. رده 4T1 نیز کاهش وابسته به دوز نشان داد، اما مقدار IC_{25} برآوردی آن کمی بالاتر از MCF-7 بود. در مقابل، سلول‌های CHO مقاومت نسبی بیش‌تری نشان دادند و در محدوده غلظت‌های بررسی‌شده به مهار ۲۵ درصدی نرسیدند. این یافته می‌تواند بیانگر تفاوت در حساسیت ذاتی رده‌های سلولی نسبت به دوکسوروبیسین باشد.

دوکسوروبیسین یکی از داروهای شیمی درمانی شناخته شده است که اثرات ضدسرطانی خود را از طریق مکانیسم‌های مختلفی اعمال می‌کند. از جمله مکانیسم اصلی این دارو می‌توان درج در ساختار DNA، مهار آنزیم توپوایزومراز II، افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و القای آسیب DNA اشاره کرد. این فرایندها می‌توانند موجب توقف چرخه سلولی، اختلال در تکثیر و در نهایت القای مرگ سلولی شوند. بنابراین کاهش زنده‌مانی مشاهده‌شده در آزمون MTT با مکانیسم‌های شناخته‌شده اثر دوکسوروبیسین همخوانی دارد. با این وجود، باید توجه داشت که آزمون MTT به طور مستقیم مسیرهای مرگ سلولی یا مکانیسم‌های مولکولی را اندازه‌گیری نمی‌کند، بلکه به طور عمده شاخصی از فعالیت متابولیکی و زنده‌مانی سلول‌ها را ارائه می‌دهد. بنابراین، اگرچه نتایج حاضر نشان‌دهنده اثر سایتوتوکسیک دوکسوروبیسین هستند، اما نمی‌توان براساس این داده‌ها به تنهایی درباره نقش مستقیم مسیرهایی مانند آپوپتوز، تولید ROS یا آسیب DNA نتیجه‌گیری قطعی کرد. برای تأیید این مکانیسم‌ها، انجام آزمون‌های تکمیلی ضروری است.

در مجموع، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که دوکسوروبیسین اثر سایتوتوکسیک وابسته به غلظت بر رده‌های سلولی MCF-7، 4T1 و CHO دارد و شدت این اثر به نوع رده سلولی وابسته است. یافته‌ها همچنین نشان می‌دهد که MCF-7 حساس‌ترین دره و CHO مقاوم‌ترین رده در محدوده غلظت‌های بررسی‌شده بوده است. این نتایج می‌تواند به عنوان مبنایی برای طراحی مطالعات تکمیلی با تمرکز بر مکانیسم‌های مولکولی اثر دوکسوروبیسین مورد استفاده قرار گیرد.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

تمرکز این مطالعه بر دوزهای پایین و نزدیک به IC_{25}

سنجش γ -H2AX و همچنین مطالعه دامنه گسترده‌تری از غلظت‌های دوکسوروبیسین پیشنهاد می‌شود. انجام این بررسی‌ها می‌تواند به تخمین دقیق‌تر شاخص‌های مهارى مانند IC_{50} و IC_{25} و نیز درک بهتر مکانیسم‌های مولکولی دخیل در پاسخ رده‌های سلولی مختلف به دوکسوروبیسین کمک کند.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

بود و در رده CHO مقدار دقیق IC_{25} در این محدوده به‌دست نیامد. بنابراین، تفسیر مکانیسم‌های دقیق اثر دوکسوروبیسین براساس داده‌های این مطالعه باید با احتیاط انجام شود.

چشم‌انداز آینده

در مطالعات آینده، استفاده از آزمون‌های تکمیلی مانند سنجش ROS، بررسی آپوپتوز با روش Annexin V/PI، ارزیابی فعالیت کاسپازها، بررسی آسیب DNA با روش‌هایی مانند comet assay یا

منابع

- Akbaba, M., Gökmen, G. G., Kışla, D., & Nalbantsoy, A. (2023). In vivo investigation of supportive immunotherapeutic combination of *Bifidobacterium infantis* 35624 and doxorubicin in murine breast cancer. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 15(4), 880–888. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09899-w>
- Baneshi, M., Dadfarnia, S., Haji Shabani, A. M., Sabbagh, S. K., Haghighi, S., & Bardania, H. (2019). A novel theranostic system of AS1411 aptamer-functionalized albumin nanoparticles loaded on iron oxide and gold nanoparticles for doxorubicin delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 564, 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.04.025>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Cheng, Z., Li, M., Dey, R., & Chen, Y. (2021). Nanomaterials for cancer therapy: Current progress and perspectives. *Journal of Hematology & Oncology*, 14, 85. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01096-0>
- DeRosa, M. C., Lin, A., Mallikaratchy, P., McConnell, E. M., McKeague, M., Patel, R., & Shigdar, S. (2023). In vitro selection of aptamers and their applications. *Nature Reviews Methods Primers*, 3, 55. <https://doi.org/10.1038/s43586-023-00247-6>
- Eralp, T. N., Sevinc, A., & Mansuroglu, B. (2024). Combination therapy application of abemaciclib with doxorubicin in triple-negative breast cancer cell line MDA-MB-231: Synergistic effect of doxorubicin and abemaciclib. *Cellular and Molecular Biology*, 70(2), 169–177. <https://doi.org/10.14715/cmb/2024.70.2.24>
- Fan, R., Tao, X., Zhai, X., Zhu, Y., Li, Y., Chen, Y., Dong, D., Yang, S., & Lv, L. (2023). Application of aptamer-drug delivery system in the therapy of breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 161, 114444. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114444>
- Fisusi, F. A., & Akala, E. O. (2019). Drug combinations in breast cancer therapy. *Pharmaceutical Nanotechnology*, 7(1), 3–23. <https://doi.org/10.2174/2211738507666190122111224>
- Hazeri, Y., Samie, A., Ramezani, M., Aliboland, M., Yaghoobi, E., Dehghani, S., Zolfaghari, R., Khatami, F., Zavvar, T. S., Alinezhad Nameghi, M., Abnous, K., & Taghdisi, S. M. (2022). Dual-targeted delivery of doxorubicin by mesoporous silica nanoparticle coated with AS1411 aptamer and RGDK-R peptide to breast cancer in vitro and in vivo. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 71, 103285. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103285>
- Iranpour, S., Bahrami, A. R., Saljooghi, A. S., & Matin, M. M. (2021a). Application of smart nanoparticles as a potential platform for effective colorectal cancer therapy. *Coordination Chemistry Reviews*, 442, 213949. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.213949>
- Iranpour, S., Bahrami, A. R., Nekooei, S., Saljooghi, A. S., & Matin, M. M. (2021b). Improving anti-cancer drug delivery performance of magnetic mesoporous silica nanocarriers for more efficient colorectal cancer therapy. *Journal of Nanobiotechnology*, 19, 314. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-01056-3>
- Jabłońska-Trypuć, A., Świdorski, G., Krętowski, R., & Lewandowski, W. (2017). Newly synthesized doxorubicin complexes with selected metals—Synthesis, structure and anti-breast cancer activity. *Molecules*, 22(7), 1106. <https://doi.org/10.3390/molecules22071106>
- Javid, A., Ahmadian, S., Saboury, A. A., Kalantar, S. M., & Rezaei-Zarchi, S. (2013). Chitosan-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for doxorubicin delivery: Synthesis and anticancer effect against human ovarian cancer cells. *Chemical Biology & Drug Design*, 82(3), 296–306. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12145>
- Rus, I., Tertiş, M., Paşcalău, V., Pavel, C., Melean, B., Suciu, M., Moldovan, C., Topală, T., Popa, C., Săndulescu, R., & Cristea, C. (2021). Simple and fast analytical method for the evaluation of the encapsulation and release profile of doxorubicin from drug delivery systems.