



Studying the Effect of the Ferroptosis-Inducing FINO2 and Pirfenidone on Breast Tumor Growth in a Mouse Model: Focus on Iron-Dependent Cell Death

Azita Mohammadbeygi¹, Gholamreza Nikbakht Brujeni², Zohre Eftekhari³,
Negar Panahi Kazerouni⁴

¹ Graduated from the SR.c., Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

³ Biotechnology Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

⁴ Department of Basic Sciences, SR.c., Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received: 14 Feb 2026, Reviser in revised from: 11 Apr 2026, Accepted: 18 Apr 2026, Available online: 21 Jun 2026



[10.22059/jvr.2025.403028.3543](https://doi.org/10.22059/jvr.2025.403028.3543)

J Vet Res, Volume 81, Number 2, 2026, 113-122

Abstract

BACKGROUND: Breast cancer remains a leading cause of cancer-related death in women, and resistance to standard treatments highlights the need for new therapeutic strategies. FINO₂, a potent inducer of ferroptosis, and pirfenidone, an antifibrotic agent, have shown promising potential in targeting tumor survival and growth pathways.

OBJECTIVES: This study aimed to investigate the antitumor effects of FINO₂ and pirfenidone, alone and in combination, in a mouse model of breast cancer, focusing on the induction of ferroptosis, changes in oxidative stress markers, and alterations in the tumor microenvironment.

METHODS: The model was established using the 4T1 cell line in BALB/C mice. Cells were gently mixed with phosphate-buffered saline (PBS), and 100 µL of this suspension (containing 1×10⁵ 4T1 cells) was injected either subcutaneously or into the mammary fat pad of the right flank of the mice, using a G28 insulin syringe. After injection, a 14-day delay was allowed to ensure tumor development. Tumor formation was confirmed after 7 to 10 days, when the tumor reached 0.5 cm ×0.5 cm. Mice with mammary tumors were then divided into treatment groups: FINO₂, pirfenidone, doxorubicin, the combination of FINO₂ and pirfenidone, and a control disease group. Tumor volume was measured, and quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to assess Iron Regulatory Protein 2 (*IRP2*) gene expression related to ferroptosis. Histopathological analysis with trichrome staining was conducted to examine fibrosis, and oxidative stress levels were measured using the total oxidative stress (TOS) assay.

RESULTS: FINO₂ significantly induced ferroptosis, demonstrated by changes in *IRP2* and related genes, while pirfenidone reduced tumor-associated fibrosis. The combined treatment of FINO₂ and pirfenidone produced the most notable effects, including the greatest reduction in tumor volume, increased oxidative stress, and decreased fibrosis compared with individual treatments and controls.

CONCLUSIONS: The combination of FINO₂ and pirfenidone effectively triggers ferroptosis and alters the tumor microenvironment, leading to reduced tumor growth and the potential to overcome drug resistance in breast cancer. These findings emphasize the clinical potential of this combined approach.

Keywords: Breast cancer, Fibroptosis, Fenofibrate, Mice, Pirfenidone

Copyright © The Author(s).

Publisher: University of Tehran Press

Conflict of interest: The authors declared no conflict of interest.

Corresponding author: Zohre Eftekhari, Tel/Fax: +9821-66953311



How to cite this article:

Figure Legends and Table Captions

Figure 1. Effects of Treatment With Doxorubicin (DOX), FINO₂ and pirfenidone (Pirf), and 2 FINO + Pirfenidone (Pirf) in Mice With Breast Cancer.

Figure 2. Effects of Treatment With Doxorubicin (DOX), FINO₂ and Pirfenidone (Pirf) and 2 FINO + Pirfenidone (Pirf) on the mRNA Expression of Tumor Tissue *IRP2* Gene in Mice With Breast Cancer. Data are shown as mean ± standard deviation. One-way analysis of variance followed by Tukey's multiple-comparison test was used to compare groups.

Figure 3. Effects of Treatment With Doxorubicin, FINO₂, pirfenidone, and FINO₂ + Pirfenidone on Histopathological Changes in Tumor Tissue Sections (×400, stained with Masson's trichrome).

Figure 4. Grading Based on the Extent of Stained Collagen in the Model Group Reported as 4+, 3+, and 5+, in the Doxorubicin Group as 2+, 3+, and 3+, in the Pirfenidone Group as 0, 0, and 1+, in the 2 FINO group as 2+, 2+, and 3+, and in the FINO₂ + Pirfenidone Group as 0, 1+, and 0, Respectively.

Figure 5. Effects of Treatment With Doxorubicin (DOX), FINO₂, and Pirfenidone (Pirf) and 2 FINO + Pirfenidone (Pirf) on TOS Concentration (µM) in Mice With Breast Cancer. Data are shown as mean ± standard deviation. One-way analysis of variance followed by Tukey's multiple-comparison test was used to compare groups. Asterisks indicate significant differences with * for *P*<0.05, ** for *P*<0.01, *** for *P*<0.001, and **** for *P*<0.0001.



بررسی اثر القاکننده فروپتوزیس ۲ FINO و پیرفنیدون بر رشد تومور پستان در مدل موشی: تمرکز بر مرگ سلولی وابسته به آهن

آزیتا محمدبیگی^۱، غلامرضا نیکبخت بروجنی^۲، زهره افتخاری^۳، نگار پناهی کازرونی^۴

^۱ دانش آموخته واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲ گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۳ گروه بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

^۴ گروه علوم پایه، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۲۵ بهمن ۱۴۰۴، تاریخ بازنگری: ۲۲ فروردین ۱۴۰۵، تاریخ پذیرش: ۲۹ فروردین ۱۴۰۵، تاریخ انتشار: ۳۱ خرداد ۱۴۰۵

doi: [10.22059/jvr.2025.403028.3543](https://doi.org/10.22059/jvr.2025.403028.3543)

دوره ۸۱، شماره ۲، ۱۴۰۵، ۱۱۳-۱۲۲

چکیده

زمینه مطالعه: سرطان پستان همچنان یکی از علل اصلی مرگومیر ناشی از سرطان در زنان است و مقاومت به درمان‌های مرسوم، نیاز به استراتژی‌های درمانی نوین را ضروری می‌سازد. FINO ۲ یا فنوفیبرات یک القاکننده قوی فروپتوزیس و پیرفنیدون، یک عامل ضدفیروز، پتانسیل قابل توجهی در هدف‌گیری مسیرهای بقا و رشد تومور نشان داده‌اند.

هدف: مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات ضدتوموری FINO۲ و پیرفنیدون، به صورت منفرد و ترکیبی، در مدل موشی سرطان پستان و ارزیابی القای فروپتوزیس، نشانگرهای استرس اکسیداتیو و تغییرات ریزمحیط تومور انجام شده است.

روش کار: ایجاد القای مدل با رده سلولی 4T1 بر روی موش‌های BALB/c صورت گرفت. سلول‌ها با Phosphate-buffered saline (PBS) مخلوط شده و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون (معادل 1×10^5 سلول) توسط سرنگ انسولین ۲۸ G به پهلو راست موش‌ها به صورت زیرجلدی و یا در ناحیه پستان موش (mammary fat pad) تزریق شد. القای تومور پس از ۱۰ تا ۱۴ روز، زمانی که اندازه تومور 0.5×0.5 سانتی‌متر بود، تأیید شد. سپس موش‌های حامل تومورهای پستان به گروه‌های درمانی شامل فنوفیبرات، پیرفنیدون، دوکسوروبیسین و ترکیب فنوفیبرات و پیرفنیدون و گروه مدل بیماری تقسیم شدند. حجم تومور اندازه‌گیری شد و بیان ژن Iron regulatory protein 2 مرتبط با فروپتوزیس، با روش qRT-PCR ارزیابی گردید. تحلیل هیستوپاتولوژیک با رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون برای بررسی فیروز انجام شد. میزان استرس اکسیداتیو با سنجش total oxidative stress (TOS) تعیین شد.

نتایج: فنوفیبرات به طور قابل توجهی بیان IRP ۲ را افزایش داد که نشان‌دهنده القای فروپتوزیس بود. پیرفنیدون فیروز بافت تومور را تعدیل کرد. ترکیب فنوفیبرات و پیرفنیدون بیشترین کاهش حجم تومور، افزایش سطح TOS و کاهش میزان فیروز را نسبت به درمان‌های منفرد و گروه کنترل ایجاد کرد. نتایج نشان داد فنوفیبرات و به ویژه ترکیب آن با پیرفنیدون می‌توانند فیروز بافت تومور را مؤثرتر کاهش دهند.

نتیجه‌گیری نهایی: ترکیب فنوفیبرات و پیرفنیدون با القای فروپتوزیس و بازسازی ریزمحیط تومور، یک استراتژی مؤثر برای کاهش رشد تومور و غلبه بر مقاومت دارویی در سرطان پستان مدل موشی ارائه می‌دهند و پتانسیل بالینی قابل توجهی دارند.

کلمات کلیدی: پیرفنیدون، سرطان سینه، فروپتوزیس، فنوفیبرات، موش

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

کپی‌رایت © نویسندگان.



نویسنده مسئول: زهره افتخاری، گروه بیوتکنولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

مقدمه

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها در میان زنان جهان و همچنان یکی از علل اصلی مرگومیر ناشی از سرطان به شمار می‌رود. براساس گزارش‌های جهانی در سال ۲۰۲۲، بیش از ۲/۳ میلیون مورد جدید سرطان پستان و حدود ۶۸۵ هزار مرگومیر ناشی از آن ثبت شد (۱). پیش‌بینی‌ها برای سال ۲۰۲۴ تنها در ایالات متحده آمریکا بیانگر بروز حدود ۳۱۰۰۰۰ مورد جدید سرطان پستان تهاجمی، ۵۶۵۰۰ مورد

کارسینوم مجرای درجا (DCIS) در زنان و حدود ۲۷۰۰ مورد در مردان است. همچنین محتمل است در همین سال حدود ۴۲۰۰۰ زن و ۵۳۰ مرد در اثر این بیماری جان خود را از دست بدهند. در ۹۵ درصد کشورها، سرطان پستان علت اصلی یا دوم مرگ ناشی از سرطان در زنان محسوب می‌شود، اما اختلاف چشمگیری در میزان بقا میان کشورها وجود دارد؛ به طوری که نزدیک به ۸۰ درصد مرگ‌های ناشی از سرطان پستان و دهانه رحم در کشورهای کم‌درآمد و با درآمد متوسط رخ می‌دهد. این امر نشان می‌دهد سرطان پستان، علاوه بر اهمیت بالینی، یک مسئله جدی بهداشتی و اجتماعی در سطح جهان محسوب می‌شود (۲، ۳).

با وجود پیشرفت‌های چشمگیر در راهکارهای درمانی شامل جراحی، شیمی‌درمانی، پرتودرمانی، هورمون‌درمانی و درمان‌های هدفمند، پیش‌آگهی بیماران مبتلا به سرطان پستان همچنان نامطلوب است. دو چالش اساسی در این مسیر عبارت‌اند از: متاستاز، که موجب پیشرفت بیماری می‌شود و مقاومت دارویی، که به‌ویژه در برابر داروهای آپوپتوزمحور مشاهده می‌شود. به نظر می‌رسد یکی از دلایل اصلی شکست درمان، فرار سلول‌های سرطانی از آپوپتوز باشد، چراکه داروهای شیمی‌درمانی کلاسیک عمدتاً از طریق القای این مسیر عمل می‌کنند. از این رو جست‌وجوی مکانیسم‌های جایگزین مرگ سلولی می‌تواند رویکردی کارآمد برای غلبه بر مقاومت دارویی در سرطان پستان محسوب شود (۴).

فروپتوزیس نوعی مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده و وابسته به آهن است که مکانیسم آن با آپوپتوز، نکروز و اتوفازای تفاوت دارد. این فرایند با تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (reactive oxygen species) و پراکسیداسیون لیپیدها در غشاهای سلولی مشخص می‌شود. در واقع، آهن دوفرویتی با القای پراکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه نقشی کلیدی در فعال‌سازی فروپتوزیس ایفا می‌کند. شواهد روزافزونی وجود دارد که نشان می‌دهد فروپتوزیس می‌تواند سلول‌های سرطانی مقاوم به آپوپتوزیس را از بین ببرد و به‌عنوان رویکردی نوین در درمان سرطان‌های مقاوم، به‌ویژه سرطان پستان سه‌گانه منفی (TNBC)، مطرح شود. با این حال سلول‌های سرطانی می‌توانند از طریق مکانیسم‌های دفاعی مانند افزایش بیان SLC7A11 و GPX4 از فروپتوزیس اجتناب کنند (۵، ۶).

در سال‌های اخیر ترکیبات متعددی به‌عنوان القاکننده‌های فروپتوزیس معرفی شده‌اند. در این میان، فنوفیبرات به‌عنوان یک اندوپراکسید ۱،۲-دی‌اکسولان، توانسته است توجه بسیاری را به خود جلب کند. این ترکیب با اکسیداسیون مستقیم آهن و مهار غیرمستقیم GPX4، موجب پراکسیداسیون گسترده لیپیدها و مرگ سلول‌های سرطانی می‌شود. از سوی دیگر، پیرفنیدون، یک مشتق پیریدون با خواص ضدفیبروتیک و ضدالتهابی که کاربرد بالینی آن در درمان فیبروز ریوی اثبات شده است، اخیراً به‌عنوان یک ترکیب تعدیل‌کننده ریزمحیط تومور مطرح شده است. گزارش‌ها نشان داده‌اند پیرفنیدون می‌تواند از طریق کاهش فیبروز و عادی‌سازی ماتریکس خارج سلولی، اثربخشی داروهای شیمی‌درمانی، مانند دوکسوروبیسین را در تومورهای پستان افزایش دهد (۷).

پروتئین تنظیم‌کننده آهن ۲ (Iron regulatory protein 2) یک عامل کلیدی در حفظ تعادل آهن درون سلولی است که بر عملکرد میتوکندری و فرایندهای فیزیولوژیکی مهمی، مانند سنتز DNA، ترمیم سلولی و تنظیم چرخه سلولی تأثیر می‌گذارد. نقش تنظیمی IRP ۲ در متابولیسم آهن میتوکندریایی آن را به یک عامل حیاتی در مقاومت سلول‌های سرطانی در برابر درمان‌هایی مانند شیمی‌درمانی و پرتودرمانی تبدیل می‌کند، زیرا فعالیت آن می‌تواند مسیرهایی را فعال کند که رشد تومور و احتمال عود بیماری را براساس نتایج برخی مطالعات افزایش می‌دهند. در حالی که در برخی مطالعات، افزایش این ژن سبب کاهش میزان عود تومور می‌شود (۸).

با وجود یافته‌های امیدوارکننده، مطالعات درون‌تنی (in vivo) درباره نقش فروپتوزیس در سرطان پستان محدود است و شکاف دانشی قابل توجهی در درک مکانیسم‌های تنظیمی آن وجود دارد؛ بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات ترکیب فنوفیبرات و پیرفنیدون بر القای فروپتوزیس در سلول‌های سرطان پستان در یک مدل موشی طراحی شد. در مطالعه حاضر، علاوه بر ارزیابی تغییرات بیان ژن کلیدی IRP ۲ مرتبط با فروپتوزیس با روش qRT-PCR، تغییرات ریزمحیط تومور و فیبروز بافتی نیز با استفاده از روش‌های بافت‌شناسی مورد بررسی قرار گرفت تا چشم‌اندازی تازه برای طراحی درمان‌های نوین در سرطان پستان در انسان فراهم شود.

مواد و روش کار

حیوانات و شرایط نگهداری: ۲۵ سر موش ماده بالغ BALB/c (وزن ۱۸ تا ۲۲ گرم، سن ۶ تا ۸ هفته) تهیه شدند. حیوانات در اتاقی با دمای کنترل شده (۳ ± ۲۳ درجه سانتی‌گراد)، رطوبت نسبی (۱۰ ± ۵۰ درصد) و چرخه روشنایی/تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. دسترسی آزاد به آب‌وغذای استاندارد فراهم بود.

ایجاد مدل تومور و پروتکل‌های درمانی: برای القای مدل سرطان پستان، سلول‌های 4T1 سلول 1×10^5 در $100 \mu\text{l}$ میکرولیتر PBS حل شده و به صورت زیرجلدی در ناحیه غده پستانی تزریق شدند. تشکیل تومور در روزهای ۱۰ تا ۱۴ پس از تزریق و رسیدن به اندازه تقریبی $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ سانتی‌متر تأیید شد. موش‌ها به طور تصادفی به پنج گروه مساوی تقسیم شدند: گروه مدل بدون درمان: فقط تزریق سلول‌های 4T1 بدون درمان.

مدل +دوکسوروبیسین: دریافت دوکسوروبیسین $2/5$ میلی‌گرم/کیلوگرم، داخل صفاقی، هر ۷۲ ساعت به مدت ۲ هفته.

مدل +فنوفیبرات: دریافت فنوفیبرات 10 میکرومول، داخل توموری، هر ۷۲ ساعت به مدت ۲ هفته.

مدل +پیرفنیدون: دریافت پیرفنیدون 200 میلی‌گرم/کیلوگرم، خوراکی، هر ۷۲ ساعت به مدت ۲ هفته.

مدل +فنوفیبرات +پیرفنیدون: دریافت هم‌زمان فنوفیبرات 10 میکرومول، داخل توموری و پیرفنیدون 200 میلی‌گرم/کیلوگرم، خوراکی، هر ۷۲ ساعت به مدت ۲ هفته.

جمع‌آوری نمونه‌ها: رشد تومور با لمس محل تزریق به طور روزانه بررسی شد و تومور در روزهای ۰، ۷ و ۱۴ با کولیس ورنیه اندازه‌گیری گردید. در پایان مطالعه، موش‌ها با تزریق کتامین 10 درصد، 100 میلی‌گرم/کیلوگرم و زایلین 2 درصد، 18 میلی‌گرم/کیلوگرم، بیهوش شدند. خون از طریق سوراخ کردن قلب جمع‌آوری شد و تومورها جدا شدند. بخشی از نمونه‌ها در فرمالین 10 درصد برای هیستوپاتولوژی تثبیت گردید و بخش دیگر در TRIzol در دمای -70 درجه سانتی‌گراد برای استخراج RNA نگهداری گردید.

بررسی بیان ژن با کمک qRT-PCR: RNA کل بافت تومور با استفاده از معرف TRIzol استخراج شد. سنتز cDNA و واکنش qRT-PCR برای ژن ۲ IRP انجام شد و GAPDH به عنوان ژن مرجع استفاده گردید. در نهایت میزان بیان ژن با روش کمی نسبی و تعیین $\Delta\Delta Ct$ با فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ صورت گرفت.

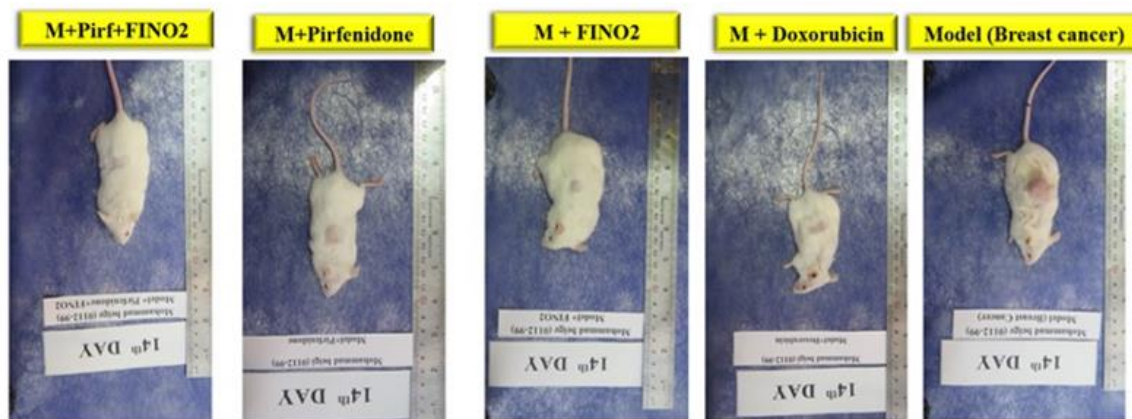
ارزیابی Total Oxidative Sstress (TOS): میزان TOS با کمک کیت تجاری شرکت کیازیس KTOS96 ارزیابی شد.

رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون: برای ارزیابی فیبروز، مقاطع بافتی با رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون بررسی شدند. نواحی آبی‌رنگ حضور کلاژن و فیبروز را نشان دادند. آنالیز بصری به طور مستقل توسط پاتولوژیست انجام شد و درجه فیبروز بینابینی با استفاده از لام‌های رنگ‌آمیزی شده با تری کروم ماسون و کلاژن III به صورت درصدی از کل ناحیه بیان شد. بافت فیبروز طبیعی اطراف شریان‌های بزرگ‌تر در نظر گرفته نشد. همان اسلایدهای مورد استفاده برای ارزیابی بصری، دیجیتالی شده و با استفاده از نرم‌افزار ImageJ تجزیه و تحلیل و توسط یک پاتولوژیست آشنا با نرم‌افزار ارزیابی شدند. تصویربرداری تحت شرایط یکسان با استفاده از میکروسکوپ نوری غیرقطبی (Olympus CX 41، شرکت Olympus، توکیو، ژاپن) مجهز به دوربین دیجیتال انجام شد. همه تصاویر با استفاده از عدسی شیئی $40 \times$ گرفته شدند. تصاویر آپلود شدند و تصحیح پس‌زمینه در ImageJ با استفاده از افزونه Calculator Plus انجام شد.

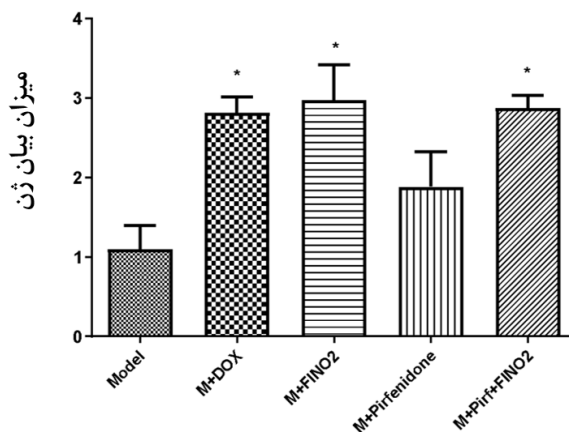
تحلیل آماری: داده‌ها با نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۱۰ تحلیل شدند. بیان ژن‌ها با نرم‌افزار REST ارزیابی شد. مقایسه گروه‌ها با آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون توکی (Tukey's Test) انجام شد.

نتایج

ارزیابی تومور: یافته‌های مربوط به حجم تومور (تصویر ۱) نشان داد درمان با دوکسوروبیسین موجب کاهش معنی‌دار اندازه تومور در مقایسه با گروه مدل بدون درمان شد. به طور مشابه FINO۲، پیرفنیدون و ترکیب FINO۲ + پیرفنیدون نیز کاهش قابل توجهی در حجم تومور ایجاد کردند. جالب توجه اینکه، رژیم ترکیبی FINO۲ + پیرفنیدون بیشترین اثر ضد توموری را نشان داد و نسبت به دوکسوروبیسین و پیرفنیدون منفرد کاهش بیشتری در اندازه تومور ایجاد کرد. این نتایج حاکی از برتری بالقوه درمان ترکیبی FINO۲ و پیرفنیدون در کاهش رشد تومور پستان در مدل موشی است.



تصویر ۱. اثرات درمان با دوکسوروبیسین (DOX)، FINO₂ و پیرفنیدون (Pirf) و FINO₂ + پیرفنیدون (Pirf) در موش‌های مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با گروه مدل.



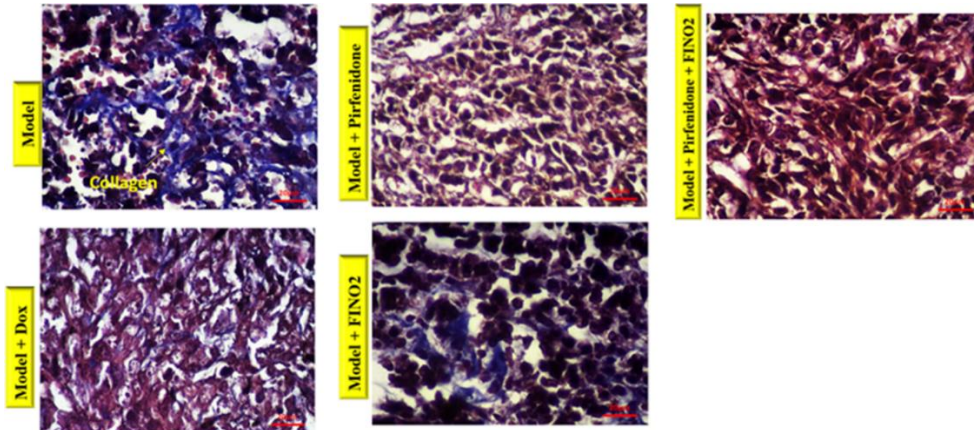
تصویر ۲. اثرات درمان با دوکسوروبیسین (DOX)، FINO₂ و پیرفنیدون (Pirf) و FINO₂ + پیرفنیدون (Pirf) بر میزان بیان mRNA بافت تومور ژن IRP2 در موش‌های مبتلا به سرطان پستان.

بررسی بیان ژن: همان‌طور که در تصویر ۲ نشان داده شده است، سطح بیان mRNA ژن IRP2 در بافت تومور گروه دریافت‌کننده دوکسوروبیسین به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه کنترل تومور بود. به‌طور مشابه، بررسی گروه‌های دریافت‌کننده FINO₂، پیرفنیدون و ترکیب فنوفیبرات و پیرفنیدون نشان داد بیان IRP2 در گروه‌های FINO₂ و FINO₂ + پیرفنیدون نسبت به گروه کنترل به‌طور قابل توجهی افزایش یافته است. این در حالی بود که گروه پیرفنیدون تنها افزایش خفیف‌تری در بیان IRP2 نشان داد و این تغییر نسبت به گروه مدل معنی‌دار نبود.

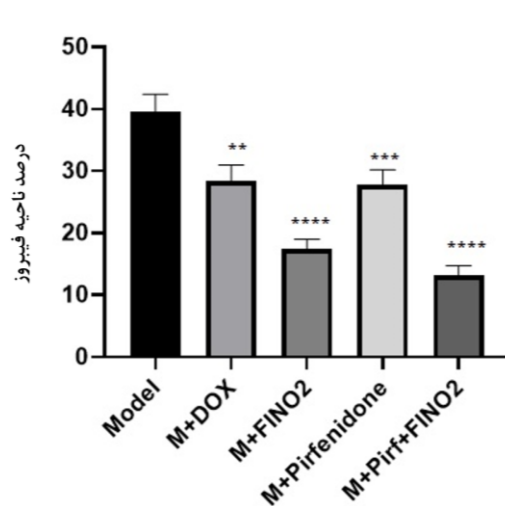
رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون: یافته‌های هیستوپاتولوژیک بافت تومور رنگ‌آمیزی شده با تری کروم ماسون (تصویر ۳) نشان داد درمان با دوکسوروبیسین موجب کاهش قابل توجه درصد مساحت فیبروز نسبت به گروه کنترل شد. کاهش بیشتری در درصد فیبروز در گروه‌های دریافت‌کننده FINO₂، پیرفنیدون و ترکیب FINO₂ + پیرفنیدون مشاهده شد. همچنین FINO₂ و ترکیب FINO₂ + پیرفنیدون به‌طور معنی‌داری فیبروز را نسبت به دوکسوروبیسین کاهش دادند. ترکیب FINO₂ + پیرفنیدون همچنین نسبت به پیرفنیدون منفرد کاهش بیشتری در فیبروز نشان داد، اما تفاوت آن با FINO₂ منفرد معنی‌دار نبود. این نتایج نشان می‌دهد FINO₂ و به‌ویژه ترکیب آن با پیرفنیدون می‌توانند فیبروز بافت تومور را مؤثرتر کاهش دهند (تصویر ۴).

اندازه‌گیری Total Oxidative Stress: همان‌طور که در تصویر ۵ نشان داده شده است، درمان با دوکسوروبیسین موجب افزایش معنی‌دار سطح TOS در مقایسه با گروه کنترل شد. افزایش مشابهی نیز در گروه دریافت‌کننده FINO₂ + پیرفنیدون مشاهده

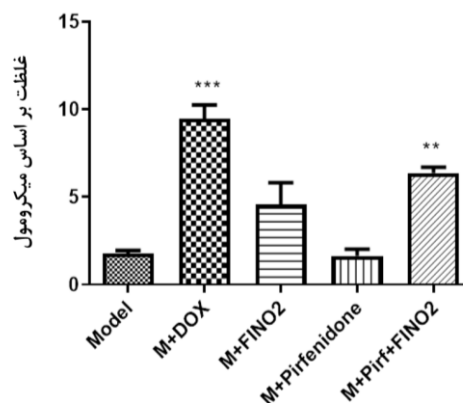
شد. بیشترین افزایش در گروه ترکیبی FINO۲ + پیرفنیدون و دوکسوروبیسین رخ داد که نشان‌دهنده کاهش چشمگیر استرس اکسیداتیو در اثر این درمان ترکیبی است. این نتایج تأیید می‌کند TOS یک نشانگر قابل اعتماد آسیب اکسیداتیو است و درمان ترکیبی FINO۲ و پیرفنیدون مؤثرترین کاهش را در آن ایجاد می‌کند.



تصویر ۳. اثرات درمان با دوکسوروبیسین، FINO ۲، پیرفنیدون و FINO ۲ + پیرفنیدون بر تغییرات هیستوپاتولوژیک مقاطع بافت تومور (۴۰۰x) رنگ‌آمیزی شده با رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون.



تصویر ۴. درجه‌بندی براساس میزان کلاژن رنگ‌آمیزی شده در گروه مدل به ترتیب ۴، ۳، ۵، در گروه دوکسوروبیسین ۲، ۳، ۳، در گروه پیرفنیدون ۰، ۰ و ۱، در گروه FINO ۲، ۲، ۳ و ۳، در گروه FINO ۲ + پیرفنیدون ۰، ۱ و ۰ گزارش شد. * $P < 0.05$ ، ** $P < 0.01$ ، *** $P < 0.001$ ، **** $P < 0.0001$.



تصویر ۵. اثرات درمان با دوکسوروبیسین (DOX)، FINO ۲ و پیرفنیدون (Pirf) و FINO ۲ + پیرفنیدون (Pirf) بر غلظت TOS براساس میکرومول در موش‌های مبتلا به سرطان پستان. * $P < 0.05$ ، ** $P < 0.01$ ، *** $P < 0.001$ ، **** $P < 0.0001$.

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین و مرگ‌بارترین سرطان‌ها در زنان سراسر جهان است و سالانه میلیون‌ها نفر را مبتلا می‌کند و باعث مرگ هزاران نفر می‌شود. علی‌رغم پیشرفت‌های قابل‌توجه در درمان‌های جراحی، شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و درمان‌های هدفمند، مقاومت دارویی و عود بیماری همچنان از مهم‌ترین چالش‌ها در مدیریت سرطان پستان محسوب می‌شوند. به‌ویژه در تومورهای مقاوم به درمان، سلول‌های سرطانی می‌توانند با ایجاد مقاومت در برابر آپوپتوز، اثر داروهای ضدسرطان را کاهش دهند (۲).

در سال‌های اخیر، فروپتوزیس به‌عنوان نوعی مرگ سلولی برنامه‌ریزی‌شده وابسته به آهن شناخته شده است که با پراکسیداسیون لیپید و تجمع ROS رخ می‌دهد و مکانیسمی متفاوت از آپوپتوزیس، نکروز یا اتوفازای ارائه می‌دهد. فروپتوزیس ظرفیت ویژه‌ای در از بین بردن سلول‌های سرطانی مقاوم به آپوپتوز و سرکوب تومور دارد. این فرایند عمدتاً توسط هموستاز آهن، تعادل ردوکس سلولی و متابولیسم لیپید کنترل می‌شود و عواملی مانند IRP۲ نقش کلیدی در تنظیم آن ایفا می‌کنند. تجمع پراکسیدهای لیپیدی و حضور آهن دوظرفیتی عامل اصلی آغاز فروپتوزیس است. درحالی‌که GSH و GPX۴ سیستم دفاعی طبیعی سلول برای خنثی‌سازی ROS اضافی را فراهم می‌کنند (۹).

در مطالعه حاضر مشاهده شد فنوفیبرات، یک اندوپراکسید ۱،۲-دیوکسولان، می‌تواند با اکسیداسیون مستقیم آهن و مهار غیرمستقیم GPX۴ موجب پراکسیداسیون گسترده لیپید و القای فروپتوزیس در سلول‌های سرطان پستان موش شود. براساس نتایج مطالعه حاضر، فنوفیبرات باعث افزایش بیان ژن IRP۲ شد که نشان‌دهنده القای مؤثر فروپتوزیس و کاهش ظرفیت بقای سلول‌های توموری است. Gaschler و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان دادند FINO۲، یک اکسیدان، استرس اکسیداتیو را در سلول‌های HT-1080 افزایش می‌دهد. برخلاف سایر ترکیبات حاوی پراکسید، FINO۲ می‌تواند به‌طور انتخابی فروپتوز را به‌جای سایر اشکال مرگ سلولی القا کند. این انتخاب قابل‌توجه را می‌توان به عوامل مختلفی، از جمله غیرفعال کردن GPX۴ یا لیپوفیلی بودن FINO۲ نسبت داد. علاوه‌براین FINO۲ به‌طور غیرمستقیم فعالیت آنزیمی GPX۴ را مهار می‌کند و مستقیماً آهن را اکسید می‌کند که به پراکسیداسیون گسترده لیپید منجر می‌شود. این یافته‌ها نشان می‌دهد اندوپراکسیدهایی مانند FINO۲ می‌توانند مکانیسم‌های متعددی از فروپتوز را آغاز کنند (۱۰).

ازسوی دیگر، پیرفنیدون، داروی ضدفیبروز و ضدالتهاب، با اثر بر ریزمحیط تومور و افزایش فیبروز، می‌تواند جریان خون در تومور را کاهش دهد و اثرات FINO۲ را تقویت کند (۱۱). درمان با دوکسوروبیسین موجب افزایش معنی‌دار سطح TOS در مقایسه با گروه کنترل شد. بیشترین افزایش در گروه ترکیبی FINO۲ + پیرفنیدون و دوکسوروبیسین رخ داد که نشان‌دهنده کاهش چشمگیر استرس اکسیداتیو در اثر این درمان ترکیبی است. این نتایج تأیید می‌کند که TOS یک نشانگر قابل‌اعتماد آسیب اکسیداتیو است و درمان ترکیبی FINO۲ و پیرفنیدون مؤثرترین کاهش را در آن ایجاد می‌کند. یافته‌های هیستوپاتولوژیک بافت تومور رنگ‌آمیزی شده با تری کروم ماسون نشان داد درمان با دوکسوروبیسین موجب کاهش قابل‌توجه درصد مساحت فیبروز نسبت به گروه کنترل شد. کاهش بیشتری در درصد فیبروز در گروه‌های دریافت‌کننده FINO۲، پیرفنیدون و ترکیب FINO۲ + پیرفنیدون مشاهده شد. ترکیب FINO۲ + پیرفنیدون همچنین نسبت به پیرفنیدون منفرد کاهش بیشتری در فیبروز نشان داد، اما تفاوت آن با FINO۲ منفرد معنی‌دار نبود. این نتایج نشان داد FINO۲ و به‌ویژه ترکیب آن با پیرفنیدون می‌تواند فیبروز بافت تومور را مؤثرتر کاهش دهند. نتایج حجم تومور و هیستوپاتولوژی نیز نشان داد ترکیب FINO۲ و پیرفنیدون مؤثرتر از هر داروی منفرد در کاهش رشد تومور و فیبروز بافت تومور عمل می‌کند. کاهش حجم تومور و فیبروز با افزایش بیان ژن IRP۲ همراه بود که تأکید بر نقش این مسیرها در مهار رشد تومور و القای فروپتوزیس دارد. این نتایج نشان می‌دهد FINO۲ و به‌ویژه ترکیب آن با پیرفنیدون می‌تواند فیبروز بافت تومور را مؤثرتر کاهش دهند.

علاوه‌براین، یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد القاکننده‌های فروپتوزیس می‌توانند با روش‌های درمانی دیگر، از جمله ایمونوتراپی و پرتودرمانی، ترکیب شوند تا حساسیت تومور به درمان‌های مرسوم افزایش یابد. این رویکرد، به‌ویژه برای تومورهایی که با سطوح بالای بیان ژن‌های ضدفروپتوز مشخص می‌شوند، اهمیت دارد و ممکن است به بازگشت پاسخ به درمان‌های چنددارویی کمک کند.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد ترکیب FINO ۲ و پیرفنیدون قادر است به طور مؤثر فروپتوزیس را در سلول‌های سرطان پستان موش القا کند و رشد تومور را کاهش دهد. ارزیابی حجم تومور نشان داد درمان ترکیبی این دو دارو بیشترین کاهش حجم تومور را در مقایسه با گروه‌های درمانی منفرد و گروه کنترل ایجاد کرد. این یافته‌ها نشان می‌دهد FINO ۲ و پیرفنیدون اثرات هم‌افزایانه بر سلول‌های سرطانی دارند و می‌توانند به‌عنوان یک رویکرد درمانی نوین برای سرطان‌های مقاوم به درمان‌های مرسوم مورد استفاده قرار گیرند.

تحلیل هیستوپاتولوژیک با استفاده از رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون نشان داد درمان با FINO ۲ و پیرفنیدون، به‌ویژه در ترکیب، موجب کاهش فیبروز بافت تومور شد. در مطالعه حاضر برعکس مطالعات قبلی، افزایش بیان ژن IRP ۲ نیز با افزایش فروپتوزیس و کاهش بقای سلول‌های توموری هماهنگ بود.

هدف قرار دادن متابولیسم آهن به‌عنوان یک رویکرد درمانی در سرطان، به‌دلیل نقش حیاتی آهن در تکثیر سلول‌های توموری و حفظ عملکرد میتوکندری، توجه ویژه‌ای یافته است. با این حال، شلاتورهای غیرانتخابی آهن، مانند دفروکسامین و دفراسیروکس، با محدودیت‌هایی، از جمله نفوذپذیری کم غشایی، سمیت سیستمیک و تولید گونه‌های فعال اکسیژن مواجه‌اند. این محدودیت‌ها مانع از استفاده بالینی گسترده آن‌ها شده است و نیاز به راهکارهای دقیق‌تر و هدفمند را آشکار می‌کند (۱۲). در این راستا، مهارکننده‌های ۲ IRP به‌عنوان یک ابزار تخصصی، مزیت قابل توجهی ارائه می‌دهند. IRP ۲ به‌طور مستقیم تعادل آهن درون سلولی و عملکرد میتوکندری را تنظیم می‌کند و مسیرهای حیاتی مانند سنتز DNA، ترمیم سلولی و چرخه سلولی را کنترل می‌نماید. مهار IRP ۲ موجب اختلال در تعامل آن با عناصر پاسخ به آهن (IRE) شده و باعث القای آپوپتوز و مهار تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود. در حالی که متابولیسم سیستمیک آهن کمتر تحت تأثیر قرار می‌گیرد. یافته‌های مطالعه حاضر و برخی مطالعات نشان می‌دهد سطح بیان ژن IRP ۲ با حساسیت سلول‌ها به مهارکننده‌ها همبستگی دارد و می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر زیستی پیش‌بینی‌کننده مورد استفاده قرار گیرد (۸، ۱۳، ۱۴).

در برخی مطالعات نشان داده شده است مهار IRP ۲ نه تنها موجب اختلال در هموستاز آهن می‌شود، بلکه مسیرهای وابسته به استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد و ظرفیت القای فروپتوزیس را در سلول‌های توموری افزایش می‌دهد. ترکیب این رویکرد با عوامل ضد فیبروز مانند پیرفنیدون، می‌تواند ریزمحیط تومور را بازسازی کرده و دسترسی آهن و ROS را برای سلول‌های سرطانی محدود کند، در حالی که تجمع پراکسیدهای لیپیدی افزایش یافته و مرگ سلولی تسهیل می‌شود (۱۴).

در مجموع، تغییرات بیان IRP ۲ همراه با القاکننده‌های فروپتوزیس و تعدیل‌کننده‌های ریزمحیط تومور، یک استراتژی درمانی چندوجهی ارائه می‌دهد که می‌تواند رشد تومور، مقاومت دارویی و بازسازی ریزمحیط تومور را هم‌زمان هدف قرار دهد و پتانسیل بالینی قابل توجهی در درمان سرطان پستان مقاوم به دارو داشته باشد.

در مجموع، مطالعه حاضر اولین گزارش از اثرات هم‌زمان FINO ۲ و پیرفنیدون بر فروپتوزیس در سلول‌های سرطان پستان موش را ارائه می‌دهد و نشان می‌دهد استفاده ترکیبی از این دو دارو می‌تواند یک راهبرد نوین و مؤثر برای مقابله با سرطان پستان، به‌ویژه در تومورهای مقاوم به درمان‌های مرسوم، باشد. یافته‌ها اهمیت فروپتوزیس، تنظیم ژن‌های کلیدی و نقش ریزمحیط تومور در درمان سرطان پستان را برجسته می‌کند و زمینه را برای مطالعات بالینی آینده فراهم می‌سازد.

نتیجه‌گیری نهایی: مطالعه حاضر مکانیسم FINO ۲ را روشن می‌کند و دیدگاه‌های تازه‌ای در مورد شروع فروپتوزیس ارائه می‌دهد. تجزیه و تحلیل FINO ۲ و مشتقات آن نشان می‌دهد این دسته نوظهور از القاکننده‌های فروپتوزیس را می‌توان با حفظ اثربخشی بیولوژیکی آن‌ها، بسته به وجود سراندوپراکسید و آبدوست، اصلاح کرد. علاوه بر این برخلاف القاکننده‌های قبلی فروپتوز که سیستم جمع‌آوری لیپید - پراکسید درون‌زا را در سلول‌ها مختل می‌کردند، FINO ۲ با اکسیداسیون مستقیم سوبستراهای مربوطه، فروپتوز را القا می‌کند. همچنین مشخص شده است عامل ضد فیبروتیک پیرفنیدون تأثیر مستقیمی بر سلول‌های تومور دارد که پتانسیل آن را به‌عنوان یک درمان ضد سرطان با تأثیر بر فیبروبلاست‌های مرتبط با سرطان (CAFs) و القای مرگ سلول‌های تومور نشان می‌دهد. این نشان‌دهنده یک استراتژی درمانی جدید است که دارو را برای هدف قرار دادن CAF‌های محرک تومور در کنار سلول‌های تومور تغییر می‌دهد و به‌طور بالقوه نتایج بالینی بهتری را در مقایسه با شیمی‌درمانی سنتی ارائه می‌دهد. این یافته‌ها پتانسیل این درمان ترکیبی را به‌عنوان یک استراتژی امیدوارکننده برای درمان سرطان پستان در مدل موشی برجسته می‌کنند.

ملاحظات اخلاقی

تمام آزمایش‌های حیوانی مطابق با دستورالعمل‌های ARRIVE و در چارچوب دستورالعمل EU/۶۳/۲۰۱۰ اتحادیه اروپا برای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد. پروتکل‌های مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی (IR.IAU.SRB.REC.1402.138) تأیید شدند.

سپاسگزاری

نویسندگان از مشارکت تیم تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران، آزمایشگاه زکریای رازی (دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران) و تیم‌های تحقیقاتی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تشکر می‌کنند.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافی در ارتباط با این مطالعه وجود ندارد.

References

1. Giaquinto AN, Sung H, Miller KD, Kramer JL, Newman LA, Minihan A, et al. Breast cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin.* 2022;72(6):524–41. [doi: 10.3322/caac.21754](https://doi.org/10.3322/caac.21754) PMID: 36190501
2. Keshavarz S, Wall JR, Keshavarz S, Vojoudi E, Jafari-Shakib R. Breast cancer immunotherapy: a comprehensive review. *Clin Exp Med.* 2023;23(8):4431–47. [doi: 10.1007/s10238-023-01177-z](https://doi.org/10.1007/s10238-023-01177-z) PMID: 37658246
3. Giaquinto AN, Sung H, Newman LA, Freedman RA, Smith RA, Star J, et al. Breast cancer statistics 2024. *CA Cancer J Clin.* 2024;74(6):477–95. [doi: 10.3322/caac.21863](https://doi.org/10.3322/caac.21863) PMID: 39352042
4. Arnold M, Morgan E, Rungay H, Mafra A, Singh D, Laversanne M, et al. Current and future burden of breast cancer: Global statistics for 2020 and 2040. *The Breast.* 2022;66:15–23. [doi: 10.1016/j.breast.2022.08.010](https://doi.org/10.1016/j.breast.2022.08.010) PMID: 36084384
5. Xie Y, Kang R, Klionsky DJ, Tang D. GPX4 in cell death, autophagy, and disease. *Autophagy.* 2023;19(10):2621–38. [doi: 10.1080/15548627.2023.2218764](https://doi.org/10.1080/15548627.2023.2218764) PMID: 37272058
6. Li Z, Chen L, Chen C, Zhou Y, Hu D, Yang J, et al. Targeting ferroptosis in breast cancer. *Biomark Res.* 2020;8:1–27. [doi: 10.1186/s40364-020-00230-3](https://doi.org/10.1186/s40364-020-00230-3) PMID: 33292585
7. Lungu II, Nistorescu S, Badea MA, Petre AM, Udrea AM, Banici AM, et al. Doxorubicin-conjugated iron oxide nanoparticles synthesized by laser pyrolysis: In vitro study on human breast cancer cells. *Polymers (Basel).* 2020;12(12). [doi: 10.3390/polym12122799](https://doi.org/10.3390/polym12122799) PMID: 33256060
8. Khirya H, Moore JS, Ahmad N, Kay J, Woolnough K, Langman G, et al. IRP2 as a potential modulator of cell proliferation, apoptosis and prognosis in non-small cell lung cancer. *Eur Respir J.* 2017;49(4). [doi: 10.1183/13993003.00711-2016](https://doi.org/10.1183/13993003.00711-2016) PMID: 28404645
9. Zhou Q, Meng Y, Li D, Yao L, Le J, Liu Y, Sun Y, Zeng F, Chen X, Deng G. Ferroptosis in cancer: from molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Signal transduction and targeted therapy.* 2024;8;9(1):55. [doi: 10.1038/s41392-024-01769-5](https://doi.org/10.1038/s41392-024-01769-5)
10. Gaschler MM, Andia AA, Liu H, Csuka JM, Hurlocker B, Vaiana CA, et al. 2 FINO initiates ferroptosis through GPX4 inactivation and iron oxidation. *Nat Chem Biol.* 2018;14(5):507–15. [doi: 10.1038/s41589-018-0031-6](https://doi.org/10.1038/s41589-018-0031-6) PMID: 29610484

11. Fois AG, Sotgiu E, Scano V, Negri S, Mellino S, Zinellu E, et al. Effects of pirfenidone and nintedanib on markers of systemic oxidative stress and inflammation in patients with idiopathic pulmonary fibrosis: a preliminary report. *Antioxidants*. 2020;9(11):1064. [doi: 10.3390/antiox9111064](https://doi.org/10.3390/antiox9111064) PMID: 33143144
12. Yang J, Zhou Y, Xie S, Wang J, Li Z, Chen L, et al. Metformin induces Ferroptosis by inhibiting UFMylation of SLC7A11 in breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2021;40(1):206. [doi: 10.1186/s13046-021-02012-7](https://doi.org/10.1186/s13046-021-02012-7) PMID: 34162423
13. Jeong YY, Hwang J, Park A, Cho S, Cho I, Won S, et al. Targeting iron regulatory protein 2 (IRP2) to disrupt iron metabolism enhances radiosensitivity through mitochondrial dysfunction in breast cancer cells. *Cell Death Discov*. 2025;11(1):357. [doi: 10.1038/s41420-025-02653-z](https://doi.org/10.1038/s41420-025-02653-z) PMID: 40745071
14. Hwang J, Park A, Kim C, Kim CG, Kwak J, Kim B, et al. Inhibition of IRP2-dependent reprogramming of iron metabolism suppresses tumor growth in colorectal cancer. *Cell Commun Signal*. 2024;22(1):412. [doi: 10.1186/s12964-024-01769-6](https://doi.org/10.1186/s12964-024-01769-6) PMID: 39180081