

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 Department of Pathobiology, SR.c., Islamic Azad University, Tehran, Iran; azita.mohammadbeygi@iru.ir

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

³ Biotechnology Department, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran; z_eftekhari@pasteur.ac.ir

⁴ Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

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, both alone and in combination, in a mouse model of breast cancer, focusing on the induction of ferroptosis, oxidative stress markers, and changes 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 1×10^5 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 \times 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 most significant reduction in tumor volume, increased oxidative stress, and decreased fibrosis compared to 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, Ferroptosis, Fenofibrate, Mice, Pirfenidone

Figures legend

Figure 1. Effects of treatment with doxorubicin (DOX), FINO 2 and pirfenidone (Pirf), and 2 FINO + pirfenidone (Pirf) in mice with breast cancer.

Figure 2. Effects of treatment with doxorubicin (DOX), FINO 2 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 \pm standard deviation. One-way analysis of variance followed by Tukey's multiple comparison test was used for comparison between groups. Asterisks indicate significant differences with * for $P < 0.05$, ** for $P < 0.01$, *** for $P < 0.001$ and **** for $P < 0.0001$.

Figure 3. Effects of treatment with doxorubicin, FINO 2, pirfenidone, and FINO 2 + pirfenidone on histopathological changes in tumor tissue sections ($\times 400$) stained with Masson's trichrome.

Figure 4. Grading based on the extent of stained collagen in the model group was 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 FINO 2+ pirfenidone group as 0, 1+, and 0, respectively.

Figure 5. Effects of treatment with doxorubicin (DOX), FINO 2, and pirfenidone (Pirf) and 2 FINO + pirfenidone (Pirf) on TOS concentration (μM) in mice with breast cancer. Data are shown as mean \pm standard deviation. One-way analysis of variance followed by Tukey's multiple comparison test was used for comparison between groups. Asterisks indicate significant differences with * for $P < 0.05$, ** for $P < 0.01$, *** for $P < 0.001$ and **** for $P < 0.0001$.

شیوع لپتوسپیروز در گربه‌های مبتلا به نارسایی کلیوی: مطالعه سرولوژیک و ارزیابی مولکولی ادرار

عنوان کوتاه: شیوع لپتوسپیروز در گربه‌های مبتلا به نارسایی کلیوی

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

^۱گروه پاتوبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

azita.mohammadbeygi@iru.ir

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

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

گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

زمینه مطالعه: سرطان پستان همچنان یکی از علل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان است و مقاومت به درمان‌های مرسوم، نیاز به استراتژی‌های درمانی نوین را ضروری می‌سازد. FINO₂ یا فنوفیبرات یک القاکننده قوی فروپتوزیس، و پیرفنیدون، یک عامل ضد فیبروز، پتانسیل قابل توجهی در هدف‌گیری مسیرهای بقا و رشد تومور نشان داده‌اند.

هدف: هدف این مطالعه بررسی اثرات ضد توموری FINO₂ و پیرفنیدون، به‌صورت منفرد و ترکیبی، در مدل موشی سرطان پستان و ارزیابی القای فروپتوزیس، نشانگرهای استرس اکسیداتیو و تغییرات ریزمحیط تومور بود.

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 100 میکرولیتر از سوسپانسیون (معادل 1×10^5 سلول) توسط سرنگ انسولین 28 G به پهلو راست موش‌ها به صورت زیرجلدی و یا در ناحیه پستان موش (mammary fat pad) تزریق شد. القای تومور پس از 10 تا 14 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 دو مرتبط با فروپتوزیس، با روش qRT-PCR ارزیابی گردید. تحلیل هیستوپاتولوژیک با رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون برای بررسی فیبروز انجام شد. میزان استرس اکسیداتیو با سنجش total oxidative stress (TOS) تعیین شد.

نتایج: فنوفیبرات به‌طور قابل توجهی بیان IRP₂ را افزایش داد، که نشان‌دهنده القای فروپتوزیس بود. پیرفنیدون فیبروز بافت تومور را تعدیل کرد. ترکیب فنوفیبرات و پیرفنیدون بیشترین کاهش حجم تومور، افزایش سطح TOS و کاهش میزان فیبروز را نسبت به درمان‌های منفرد و گروه کنترل ایجاد کرد. نتایج نشان می‌دهد که فنوفیبرات و به‌ویژه ترکیب آن با پیرفنیدون می‌توانند فیبروز بافت تومور را مؤثرتر کاهش دهند. **نتیجه‌گیری:** 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 می‌دهد و پتانسیل بالینی قابل توجهی دارد.

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

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌ها در میان زنان جهان و همچنان یکی از علل اصلی مرگ‌ومیر ناشی از سرطان به شمار می‌رود. بر اساس 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 انتظار می‌رود در همین سال حدود ۴۲۰۰۰ زن و ۵۳۰ مرد در اثر این بیماری جان خود را از دست بدهند. در بیش از 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 که 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 عبارتند از: متاستاز، که موجب پیشرفت بیماری می‌شود، و مقاومت دارویی، که به‌ویژه در برابر داروهای آپوپتوز-محور مشاهده می‌شود. به نظر می‌رسد یکی از دلایل اصلی شکست درمان، فرار سلول‌های سرطانی از آپوپتوز باشد، چرا که 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 برنامه‌ریزی‌شده و وابسته به آهن است که مکانیسم آن با آپوپتوز، نکروز و اتوفازی تفاوت دارد. این فرآیند با تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (reactive oxygen species) و پراکسیداسیون لیپیدها در غشاهای سلولی مشخص می‌شود. در واقع، آهن دو ظرفیتی 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، فنوفیرات 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 ضد فیروتیک و ضدالتهابی، که کاربرد بالینی آن در درمان فیروز ریوی اثبات شده است، اخیراً به‌عنوان یک ترکیب تعدیل‌کننده ریزمحیط تومور مطرح شده است. گزارش‌ها نشان داده‌اند که پیرفنیدون می‌تواند از طریق کاهش فیروز 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 فرآیندهای 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 بر اساس 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 درون تنی (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 فنوفیرات و پیرفنیدون بر القای فروپتوزیس در سلول‌های سرطان پستان در یک مدل موشی طراحی شد. در این پژوهش، علاوه بر ارزیابی تغییرات بیان ژن کلیدی IRP ۲ مرتبط با فروپتوزیس با روش qRT-PCR، تغییرات ریزمحیط تومور و فیروز 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: بیست و پنج سر موش ماده بالغ BALB/c (وزن ۲۲-۱۸ گرم، سن ۶-۸ هفته) تهیه شدند. حیوانات در اتاقی با دمای کنترل شده (۳ ± ۰.۲۳ °C)، رطوبت نسبی (۱۰ ± ۵۰ درصد) و چرخه روشنایی/تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. دسترسی آزاد به آب و غذای استاندارد فراهم بود.

ایجاد مدل تومور و پروتکل‌های درمانی: برای القای مدل سرطان پستان، سلول‌های ۱ T ۴ سلول $10^5 \times$ ادر ۱۰۰ میکرولیتر PBS حل شده و به صورت زیرجلدی در ناحیه غده پستانی تزریق شدند. تشکیل تومور در روزهای ۱۴-۱۰ پس از تزریق و رسیدن به اندازه تقریبی 0.5×0.5 سانتی‌متر تأیید شد. موش‌ها به‌طور تصادفی به پنج گروه مساوی تقسیم شدند:

گروه مدل بدون درمان: فقط تزریق سلول‌های 4T1 بدون درمان.

مدل + دوکسوروبیسین: دریافت دوکسوروبیسین ۲/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم، داخل صفاقی، هر ۷۲ ساعت به مدت ۲ هفته

مدل + فنوفیبرات: دریافت فنوفیبرات ۱۰ میکرومول، داخل توموری، هر ۷۲ ساعت به مدت ۲ هفته

مدل + پیرفنیدون: دریافت پیرفنیدون ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، خوراکی، هر ۷۲ ساعت به مدت ۲ هفته

مدل + فنوفیبرات + پیرفنیدون: دریافت همزمان فنوفیبرات ۱۰ میکرومول، داخل توموری و پیرفنیدون ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، خوراکی، هر ۷۲ ساعت به مدت ۲ هفته

جمع‌آوری نمونه‌ها: رشد تومور با لمس محل تزریق به‌طور روزانه بررسی شد و اندازه تومور در روزهای ۰، ۷ و ۱۴ با کولیس ورنیه اندازه‌گیری گردید. در پایان مطالعه، موش‌ها با تزریق کتامین ۱۰ درصد، ۱۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم، و زایلازین ۲ درصد، ۱۸ میلی‌گرم/کیلوگرم، بیهوش شدند. خون از طریق سوراخ کردن قلب جمع‌آوری شد و تومورها جدا شدند. بخشی از نمونه‌ها در فرمالین ۱۰ درصد برای هیستوپاتولوژی تثبیت گردید و بخش دیگر در TRIzol در دمای 70°C - درجه ی 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 به‌عنوان ژن مرجع استفاده گردید. در نهایت میزان بیان ژن با روش کمی نسبی و تعیین $\Delta\Delta\text{Ct}$ با فرمول $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ صورت گرفت.

ارزیابی Total Oxidative Sstress: میزان TOS با کمک کیت تجاری شرکت کیازیسیت 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 به‌طور 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 شدند و توسط یک پاتولوژیست آشنا با نرم‌افزار ارزیابی شدند. تصویربرداری تحت شرایط یکسان با استفاده از میکروسکوپ نوری غیر قطبی (Olympus CX 41، شرکت Olympus، توکیو، ژاپن) مجهز به دوربین دیجیتال انجام شد. همه تصاویر با استفاده از عدسی شیئی 40× 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 10 تحلیل شدند. بیان ژن‌ها با نرم‌افزار REST ارزیابی شد. مقایسه گروه‌ها با آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون توکی انجام شد. ستاره‌ها تفاوت‌های معنی‌دار را با * برای $P < 0.05$ ، ** برای $P < 0.01$ ، *** برای $P < 0.001$ و **** برای $P < 0.0001$ ، تکرار می‌کنند.

نتایج

ارزیابی تومور: یافته‌های مربوط به حجم تومور (تصویر 1) نشان داد که درمان با دوکسوروبیسین موجب کاهش معنی‌دار اندازه تومور در مقایسه با گروه مدل بدون درمان شد. به‌طور مشابه، FINO2، پیرفنیدون و ترکیب FINO2 + پیرفنیدون نیز کاهش قابل توجهی در حجم تومور ایجاد کردند. جالب توجه اینکه، رژیم ترکیبی FINO2 + پیرفنیدون بیشترین اثر ضدتوموری 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 FINO2 و پیرفنیدون در کاهش رشد تومور پستان در مدل موشی است.

بررسی بیان ژن: همان‌طور که در تصویر 2 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 که 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 3) نشان داد که 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 2

FINO + پیرفنیدون به طور معنی داری فیروز را نسبت به دوکسوروبیسین کاهش دادند. ترکیب FINO₂ + پیرفنیدون همچنین نسبت به پیرفنیدون منفرد کاهش بیشتری در فیروز نشان داد، اما تفاوت آن با FINO₂ منفرد معنی دار نبود. این نتایج نشان می دهد که FINO₂ و به ویژه ترکیب آن با پیرفنیدون می توانند فیروز بافت تومور را مؤثرتر کاهش دهند (تصویر ۴).

اندازه گیری Total Oxidative Stress: همان طور که در تصویر ۵ نشان داده شده است، درمان با دوکسوروبیسین موجب افزایش معنی دار سطح TOS در مقایسه با گروه کنترل شد. افزایش مشابهی نیز در گروه دریافت کننده FINO₂ + پیرفنیدون مشاهده شد. بیشترین افزایش در گروه ترکیبی FINO₂ + پیرفنیدون و دوکسوروبیسین رخ داد، که نشان دهنده کاهش چشمگیر استرس اکسیداتیو در اثر این درمان ترکیبی است. این نتایج تأیید می کند که TOS یک نشانگر قابل اعتماد آسیب اکسیداتیو است و درمان ترکیبی FINO₂ و پیرفنیدون مؤثرترین کاهش را در آن ایجاد می کند.

بحث

سرطان پستان یکی از شایع ترین و مرگبارترین سرطان ها در زنان سراسر جهان است و سالانه میلیون ها نفر را مبتلا می کند و باعث مرگ هزاران نفر می شود. علی رغم پیشرفت های قابل توجه در درمان های جراحی، شیمی درمانی، پرتودرمانی و درمان های هدفمند، مقاومت دارویی و عود بیماری همچنان از مهم ترین چالش ها در مدیریت سرطان پستان محسوب می شوند. به ویژه در تومورهای مقاوم به درمان، سلول های سرطانی می توانند با ایجاد مقاومت در برابر آپوپتوز، اثر داروهای ضد سرطان را کاهش دهند (۲).

در سال های اخیر، فروپتوزیس به عنوان نوعی مرگ سلولی برنامه ریزی شده وابسته به آهن شناخته شده است که با پراکسیداسیون لیپید و تجمع ROS رخ می دهد و مکانیسمی متفاوت از آپوپتوزیس، نکروز یا اتوفازی ارائه می دهد. فروپتوزیس ظرفیت ویژه ای در از بین بردن سلول های سرطانی مقاوم به آپوپتوز و سرکوب تومور دارد. این فرآیند عمدتاً توسط هموستاز آهن، تعادل ردوکس سلولی و متابولیسم لیپید کنترل می شود و عواملی مانند IRP ۲ نقش کلیدی در تنظیم آن ایفا می کنند. تجمع پراکسیدهای لیپیدی و حضور آهن دو ظرفیتی عامل اصلی آغاز فروپتوزیس است، در حالی که GSH و GPX₄ سیستم دفاعی طبیعی سلول برای خنثی سازی ROS اضافی را فراهم می کنند (۹).

در مطالعه حاضر، مشاهده شد که فنوفیرات، یک اندوپراکسید ۱،۲-دیوکسولان، می تواند با اکسیداسیون مستقیم آهن و مهار غیرمستقیم GPX₄ موجب پراکسیداسیون گسترده لیپید و القای فروپتوزیس در سلول های سرطان پستان موش شود. بر اساس نتایج ما، فنوفیرات باعث افزایش بیان ژن IRP ۲ شد، که نشان دهنده القای مؤثر فروپتوزیس و کاهش ظرفیت بقای سلول های

توموری است. گاشلر و همکارانش نشان دادند که FINO₂، یک اکسیدان، استرس اکسیداتیو را در سلول‌های HT-1080 افزایش می‌دهد. برخلاف سایر ترکیبات حاوی پراکسید، FINO₂ می‌تواند به طور انتخابی فروپتوز را به جای سایر اشکال مرگ سلولی القا کند. این انتخاب قابل توجه را می‌توان به عوامل مختلفی از جمله غیرفعال کردن GPX4 یا لیپوفیلی بودن FINO₂ نسبت داد. علاوه بر این، FINO₂ به طور غیرمستقیم فعالیت آنزیمی GPX4 را مهار می‌کند و مستقیماً آهن را اکسید می‌کند که منجر به پراکسیداسیون گسترده لیپید می‌شود. این یافته‌ها نشان می‌دهد که اندوپراکسیدهای مانند FINO₂ می‌توانند مکانیسم‌های متعددی از فروپتوز را آغاز کنند (۱۰).

از سوی دیگر، پیرفنیدون، داروی ضد فیروز و ضد التهاب، با اثر بر ریز محیط تومور و افزایش فیروز، می‌تواند جریان خون در تومور را کاهش دهد و اثرات FINO₂ را تقویت کند (۱۱). درمان با دوکسوروبیسین موجب افزایش معنی‌دار سطح TOS در مقایسه با گروه کنترل شد. بیشترین افزایش در گروه ترکیبی FINO₂ + 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 قابل اعتماد آسیب اکسیداتیو است و درمان ترکیبی FINO₂ و پیرفنیدون مؤثرترین کاهش را در آن ایجاد می‌کند. یافته‌های هیستوپاتولوژیک بافت تومور رنگ‌آمیزی شده با تری کروم ماسون نشان داد که درمان با دوکسوروبیسین موجب کاهش قابل توجه مساحت فیروز نسبت به گروه کنترل شد. کاهش بیشتری در درصد فیروز در گروه‌های دریافت‌کننده FINO₂، پیرفنیدون و ترکیب FINO₂ + پیرفنیدون مشاهده شد. ترکیب FINO₂ + پیرفنیدون همچنین نسبت به پیرفنیدون منفرد کاهش بیشتری در فیروز نشان داد، اما تفاوت آن با FINO₂ منفرد معنی‌دار نبود. این نتایج نشان می‌دهد که FINO₂ و به ویژه ترکیب آن با پیرفنیدون می‌توانند فیروز بافت تومور را مؤثرتر کاهش دهند. نتایج حجم تومور و هیستوپاتولوژی نیز نشان داد که ترکیب FINO₂ و پیرفنیدون مؤثرتر از هر داروی منفرد در کاهش رشد تومور و فیروز بافت تومور عمل می‌کند. کاهش حجم تومور و فیروز با افزایش بیان ژن IRP₂ همراه بود، که تأکید بر نقش این مسیرها در مهار رشد تومور و القای فروپتوز دارد. این نتایج نشان می‌دهد که FINO₂ و به ویژه ترکیب آن با پیرفنیدون می‌توانند فیروز بافت تومور را مؤثرتر کاهش دهند.

علاوه بر این، یافته‌های ما نشان می‌دهد که القاکننده‌های فروپتوز 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 ضد فروپتوز مشخص می‌شوند، اهمیت دارد و ممکن است به بازگشت پاسخ به درمان‌های چنددارویی کمک کند.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ترکیب ۲ FINO 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 که 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 که FINO۲ و پیرفنیدون اثرات هم‌افزایانه بر سلول‌های سرطانی دارند و می‌توانند به عنوان 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 که درمان با FINO۲ و پیرفنیدون، به ویژه در ترکیب، موجب کاهش فیبروز بافت تومور شد. در مطالعه‌ی حاضر بر عکس مطالعات قبلی، افزایش بیان ژن IRP۲ نیز با افزایش فروپتوزیس و کاهش بقای سلول‌های توموری هماهنگ بود.

هدف قرار دادن متابولیسم آهن به عنوان یک رویکرد درمانی در سرطان، به دلیل 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 IRP ۲ به عنوان یک ابزار تخصصی، مزیت قابل توجهی ارائه می‌دهند. IRP ۲ به طور 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 ما و برخی مطالعات نشان می‌دهد که سطح بیان ژن IRP ۲ با حساسیت سلول‌ها به مهارکننده‌ها همبستگی دارد و می‌تواند به عنوان یک نشانگر زیستی پیش‌بینی کننده مورد استفاده قرار گیرد (۸،۱۳،۱۴).

در برخی مطالعات نشان داده شده است که 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 IRP₂ به همراه 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 2 و پیرفنیدون بر فروپتوزیس در سلول‌های سرطان پستان موش را ارائه می‌دهد و نشان می‌دهد که استفاده ترکیبی از این دو دارو می‌تواند یک راهبرد نوین و مؤثر برای مقابله با سرطان پستان، به ویژه 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.

نتیجه گیری نهایی: این تحقیق مکانیسم FINO 2 را روشن می‌کند و دیدگاه‌های تازه‌ای در مورد شروع فروپتوزیس ارائه می‌دهد. تجزیه و تحلیل FINO 2 و مشتقات آن نشان می‌دهد که این دسته نوظهور از القاکننده‌های فروپتوزیس را می‌توان با حفظ اثربخشی بیولوژیکی آنها، بسته به وجود سر اندوپراکسید و آبدوست، اصلاح کرد. علاوه بر این، برخلاف القاکننده‌های قبلی فروپتوز که سیستم جمع‌آوری لیپید-پراکسید درون‌زا را در سلول‌ها مختل می‌کردند، FINO 2 با اکسیداسیون مستقیم سوپستراهای مربوطه، فروپتوز را القا می‌کند. علاوه بر این، مشخص شده است که عامل ضد فیبروتیک پیرفنیدون تأثیر مستقیمی بر سلول‌های تومور دارد که پتانسیل آن را به عنوان یک درمان ضد سرطان با تأثیر بر فیبروبلاست‌های مرتبط با سرطان (CAFs) و القای مرگ سلول‌های تومور نشان می‌دهد. این نشان دهنده یک استراتژی درمانی جدید است که دارو را برای هدف قرار دادن CAF‌های محرک تومور در کنار سلول‌های تومور تغییر می‌دهد و به طور بالقوه نتایج بالینی بهتری را در مقایسه با شیمی‌درمانی سنتی ارائه می‌دهد. این یافته‌ها پتانسیل این درمان ترکیبی را به عنوان 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/63/2010 اتحادیه اروپا برای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی انجام شد. پروتکل‌های مطالعه توسط کمیته اخلاق (IR.IAU.SRB.REC.1402.138) تأیید شدند.

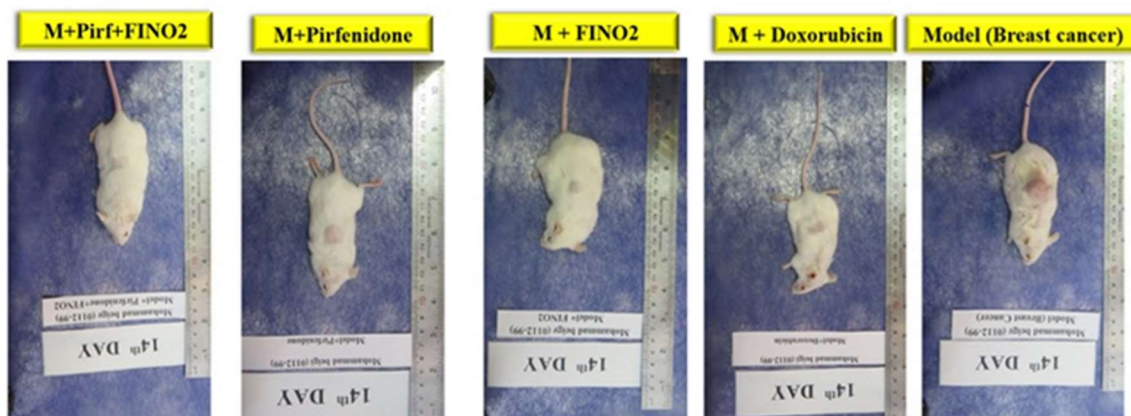
سپاسگزاری

نویسندگان میلند 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 کنند.

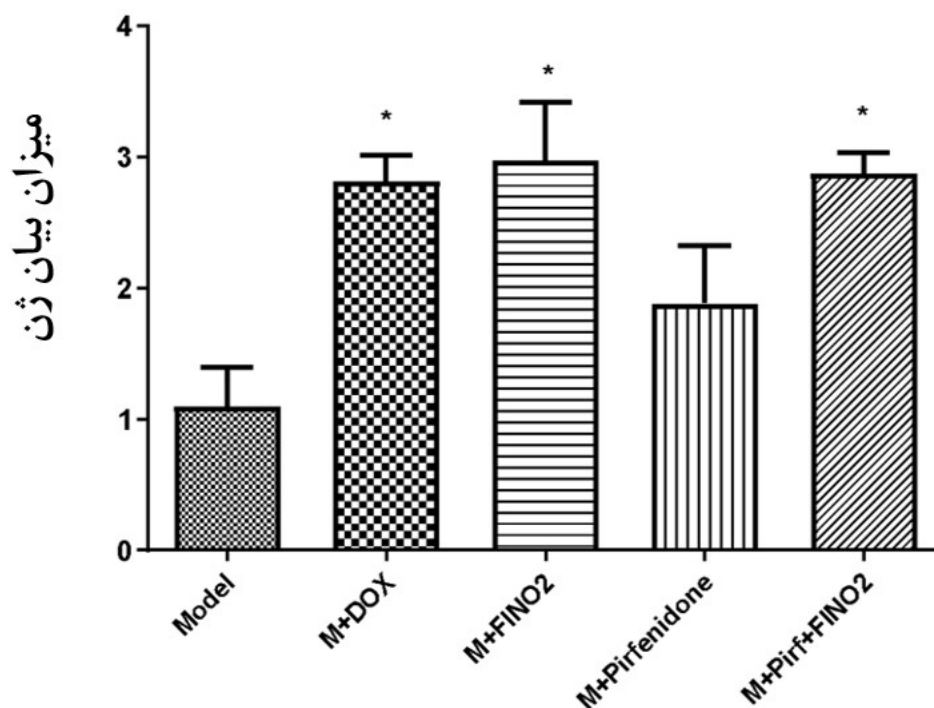
1. Giaquinto AN, Sung H, Miller KD, Kramer JL, Newman LA, Minihan A, et al. Breast cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin.* 2022;72(6):524–41. DOI: 10.3322/caac.21754 PMID: 36190501.
2. Keshavarz S, Wall JR, Keshavarz S, Vojoudi E, Jafari-Shakib R. Breast cancer immunotherapy: a comprehensive review. *Clin Exp Med.* 2023;23(8):4431–47. DOI: 10.1007/s10238-023-01177-z 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 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. P DOI: 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 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 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 PMID: 33256060
8. Khiroya 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 nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J.* 2017;49(4). DOI: 10.1183/13993003.00711-2016 PMID: 28404645

DOI: 10.22059/jvr.2025.403028.3543

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 PMID: PMC10920854.
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 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 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 Jun;40(1):206. DOI: 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 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 PMID: 39180081

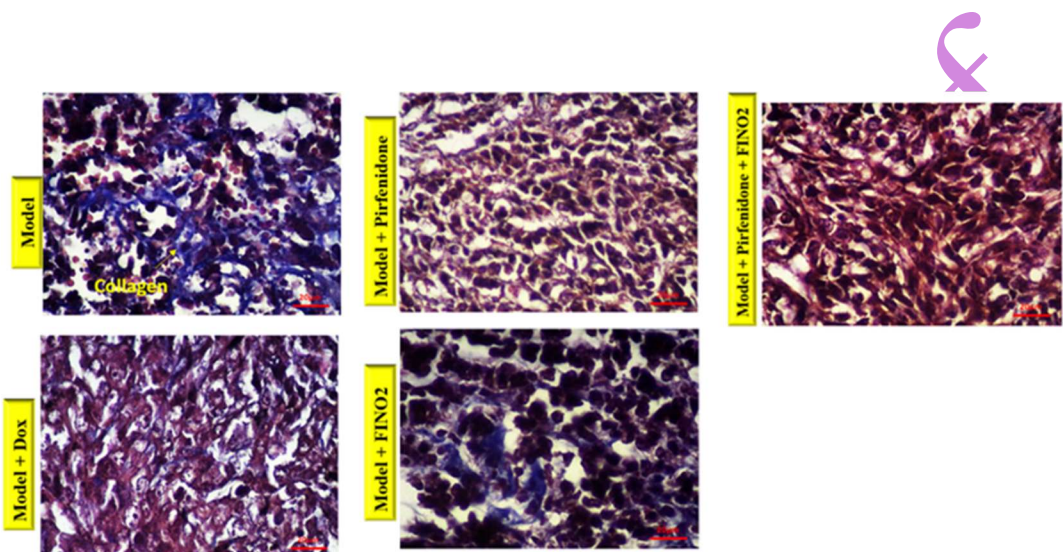


تصویر ۱: اثرات درمان با دوکسوروبیسین (DOX)، FINO ۲ و پیرفنیدون (Pirf) و FINO ۲ + پیرفنیدون (Pirf) در موش‌های مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با گروه مدل.

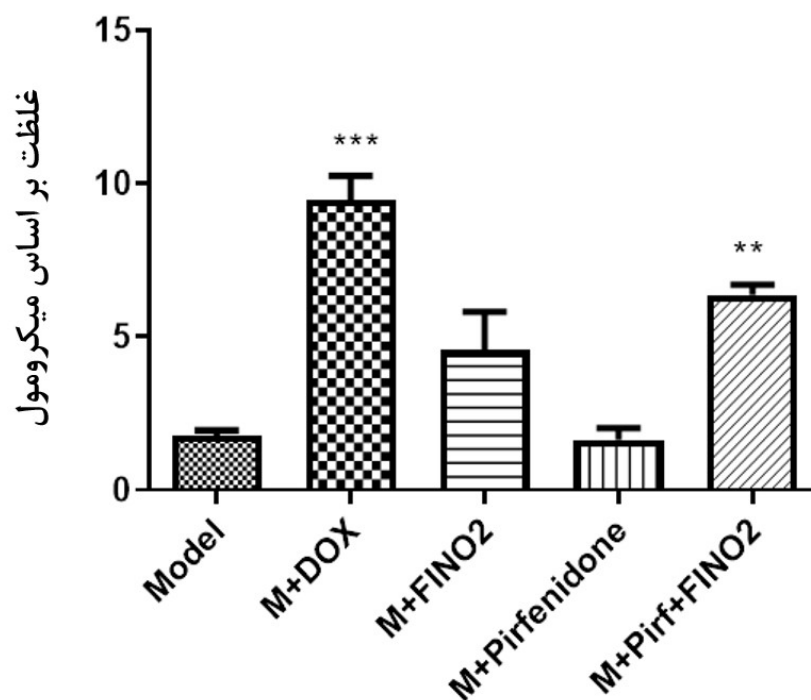


تصویر ۲: اثرات درمان با دوکسوروبیسین (DOX)، FINO ۲ و پیرفنیدون (Pirf) و FINO ۲ + پیرفنیدون (Pirf) بر میزان بیان mRNA بافت تومور ژن IRP2 در موش‌های مبتلا به سرطان پستان. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده‌اند. برای مقایسه بین گروه‌های مختلف از آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن آزمون مقایسه چندگانه توکی استفاده شد.

ستاره‌ها تفاوت‌های معنی‌دار را با * برای $P < 0.05$ ، ** برای $P < 0.01$ ، *** برای $P < 0.001$ ، و **** برای $P < 0.0001$ ، تکرار می‌کنند.



تصویر ۳: اثرات درمان با دوکسوروبیسین، FINO ۲، پیرفنیدون و FINO ۲ + پیرفنیدون بر تغییرات هیستوپاتولوژیک مقاطع بافت تومور ($400\times$) رنگ‌آمیزی شده با رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون.



تصویر ۵: اثرات درمان با دوکسوروبیسین (DOX)، FINO 2 و پیرفنیدون (Pirf) و FINO 2 + پیرفنیدون (Pirf) بر غلظت TOS بر اساس میکرومول در موش‌های مبتلا به سرطان پستان. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده‌اند. برای مقایسه بین گروه‌های مختلف از آنالیز واریانس یک‌طرفه و به دنبال آن آزمون مقایسه چندگانه توکی استفاده شد. ستاره‌ها تفاوت‌های معنی‌دار را با * برای $P < 0.05$ ، ** برای $P < 0.01$ ، *** برای $P < 0.001$ و **** برای $P < 0.0001$ تکرار می‌کنند.