بررسی اثر درمانی لیزر Nd-YAG در تیمارفتودینامیکی بر روی سلول‌های LN-CaP

همامحسنی کوچصفهانی*[۱]، محمد نبیونی[۲]، محمد حسین مجلس آرا [۳]، الهه امینی[۴]

چکیده

فوتودینامیک‌تراپی[۱](PDT) نوعی روش درمانی جدید و نوید دهنده در درمان سرطان و برخی از بیماریهای غیر سرطانی است.سه رکن اساسی این روش درمانی ماده حساس به نور، نور و اکسیژن است.در این روش واکنش متقابل بین نور و ماده حساس به نور القا کننده مرگ سلولهای سرطانی است. هدف از انجام این آزمایش بررسی اثر ترکیبی ماده حساس به نور آمینولولنیک اسید و پرتوی یکنواخت **لیزر حالت جامد[۲]Nd-YAG با طول موج و توان خاص** درالقای مرگ سلولهای سرطان پروستاتی LN-CaP و نوع مرگ القا شده است.

برای این منظور در این آزمایش آمینولولنیک اسید یا 5-ALA[۳] (پیش ساز ماده حساس به نور **پروتوپورفیرین** IX با غلظت ۰/۳mM و به مدت ۵ساعت در تاریکی وپرتوی یکنواخت لیزر حالت جامدNd-YAG با طول موج ۵۳۲ nm و توان ۵۰mW اثر دهی شده و میزان بقا سلولهای سرطانی LN-CaP توسط آزمون MTT، تشکیل **پروتوپورفیرین** IX درون سلولها توسط اسپکتروفتومتر فلورسانس ونوع مرگ سلولی القا شده بر روی سلول‌ها توسط رنگ آمیزی هوخست ارزیابی شد.

یافته ها: ۲۴ ساعت پس از تیمار کاهش چشمگیری در تعداد سلولها در گروه تیمار فتودینامیک در مقایسه با گروه ALA بدون لیزر و گروه لیزر بدون ALA دیده می شود.

اعمال 5-ALA باعث افزایش تولیدماده حساس به نور اصلی **پروتوپورفیرین** IX درون سلولها می شود.با استفاده از رنگ آمیزی با هوخست سلولهای تیماری گروه ALA-PDT مرگ سلولی آپوپتوتیک را نشان می دهند.

نتیجه گیری کلی: تیمار فتودینامیکی سلولهای سرطان پروستاتی LN-CaP با آمینولولنیک اسید با غلظت ۰/۳mM و زمان انکوباسیون ۵ ساعت به همراه پرتوی یکنواخت لیزر Nd-YAG با طول موج ۵۳۲ nm و توان ۵۰mW به مدت ۳ دقیقه باعث افزایش تولید **پروتوپورفیرین** IX و القا چشمگیر مرگ آپوپتوتیک سلولها می گردد.

کلمات کلیدی: فتودینامیک تراپی–آمینولولنیک اسید–لیزرNd-YAG –آپوپتوز

مقدمه

سرطان پروستات دومین عامل مرگ بر اثر سرطان در مردان است.تحقیقات بالینی روند بدخیمی این سرطان را با عواملی همانند سن، عوامل ژنتیکی، هورمونی و ....مرتبط می دانند.جهت درمان این سرطان از روشهای متعددی چون جراحی (پروستاتکتومی) شیمی‌درمانی، هورمون درمانی ورادیوتراپی استفاده می کنند.در درمان این سرطان علاج قطعی وجود ندارد.برای نمونه پس از پروسه هورمون درمانی بیماری از حالت وابسته به اندروژن به حالت غیر وابسته به اندروژن پیشروی می کند.همچنین بعد از جراحی امکان عود سرطان وجود دارد.بنابراین تحقیقات در حال انجام است تا از روشهای جانبی و کمکی در درمان این سرطان استفاده شود[۱].

۱– استادیار گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه تربیت معلم تهران Kouchesfehani@yahoo.com

۲– استادیار گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه تربیت معلم تهران

۳–دانشیار گروه فیزیک دانشکده علوم دانشگاه تربیت معلم تهران

۴–دانشجوی کارشناسی ارشد سلولی تکوینی جانوری دانشگاه تربیت معلم تهران

1.Photodynamic Therapy
2.Neodymium-doped Yttrium Aaluminum Garnet
3.Amino Levoulenic Acid

Archive of SID
www.SID.ir

با توجه به این که لیزر در پزشکی (جراحی، چشم پزشکی و بیماریهای پوستی) مورد استفاده قرار می گیرد، اما استفاده از آن در درمان سرطان (موسوم به فتودینامیک تراپی یا درمان با تابش نور)روش جدیدی محسوب می شود [۲].

اساس این روش بکارگیری یک ماده حساس به نور است که توسط منبع نوری لیزری ویا لامپ با طول موج مناسب فعال می شود[۳]. ماده حساس به نورپس از فعال شدن می تواند تحت دو نوع واکنش قرار گیرد.در واکنش نوع ۱–ماده حساس به نور می تواند با سوبسترا واکنش داده و رادیکال آزاد تشکیل دهد که این رادیکالها ممکن است با اکسیژن واکنش داده و گونه های فعال اکسیژن را ایجاد کنند.در واکنش نوع ۲ ماده حساس به نور می تواند انرژی خود را مستقیم به اکسیژن انتقال دهد و اکسیژن یگانه تهییج شده را به وجود آورد که موجب اکسیداسیون و مرگ سلولی می شود.نسبت بین این ۲ واکنش به نوع واکنشگر، غلظت سوبسترا و اکسیژن بستگی دارد[۵و۴].از مزایای این روش آن است که ماده حساس به نور پس از اعمال درون بدن بیشتر گرایش به تجمع در بافتهای بدخیم دارد و از این رو باعث از بین بردن بافتهای بدخیم می شود[۶].

آمینولولنیک اسید(5-ALA)پیش ساز طبیعی چرخه بیوسنتز هم(heme) درون سلولها است.این ماده به تنهایی ماده حساس به نور نیست، اما درون سلولها تبدیل به ماده حساس به نور **پروتوپورفیرین** IX می شود که از جمله واکنشگرهای نوری نسل دوم است.درون سلولها ی طبیعی فیدبک منفی وجود دارد که مانع از تولید بیش از حد **پروتوپورفیرین** IX می شود.با اعمال اگزوژن امینولولنیک اسید فیدبک منفی از بین می رود و موجب تشکیل **پروتوپورفیرین** IX بیشتر درون سلولهای سرطانی می گردد.در سلولهای سرطانی به علت تغییراتی که در چرخه بیوسنتز هم به وجود می آید، تمایل بیشتری به سنتز **پروتوپورفیرین** IXوجود دارد[۷].

لیزر Nd-YAG از لیزرهای حالت جامد است که در جراحی و حذف تومورهای سطحی پوستی، پستانی و ریوی به کار گرفته شده است[۹و۸].

هدف ما در این آزمایش بررسی کارایی تیمار فتودینامیکی با استفاده از 5-ALA و لیزر Nd-YAG با پرتوی پیوسته و طول موج ۵۳۲ nm با توان ۵۰ mW بر روی سلولهای سرطان پروستاتی LN-CaP و اهمیت بکارگیری توام درمان با لیزر و ماده حساس به نور در مقایسه با لیزر به تنهایی است.

مواد و روش کار

کشت سلولی

سلولهای LN-CaP از موسسه پاستور تهیه شدند و در محیط کشت RPMI1640 (SIGMA) همراه با L گلوتامین و ۱۰ درصدFBS (Gibco) و ۱ درصد پنی سیلین– استرپتومایسین به عنوان آنتی بیوتیک درون فلاسک ۲۵mm کشت داده شده و درون انکوباتور(Binder) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصدCO2 قرار گرفتند. این سلولها از نوع چسبنده هستند.پس از اینکه تراکم سلولها به ۷۰ درصد رسید برای پاساژ سلولها از (GIBCO) تریپسین–EDTA استفاده شد و هر ۴ روز یک مرتبه پاساژ صورت گرفت.

تیمار فتودینامیکی

سلولها به تعداد ۲×۱۰^{۴} درون پلیت ۲۴خانه ای کشت داده شدند.پس از گذشت ۲۴ ساعت ۴ گروه برای انجام آزمایش تعیین گردید و برای هر گروه حداقل ۳ خانه از پلیت ۲۴ خانه ای در نظر گرفته شد.گروه اول–گروه کنترل که تحت تاثیر 5-ALA(SIGMA) ولیزر قرار نگرفت.گروه دوم–در این گروه سلولها تنها تحت تاثیر 5-ALA با غلظت ۰/۳mMو به مدت ۵ساعت در تاریکی قرار می گرفتند.گروه سوم–در این گروه در هر خانه از پلیت سلولها بدون تاثیر 5-ALA کف پلیت در معرض پرتوی یکنواخت لیزر Nd-YAG با طول موج ۵۳۲ nm وتوان ۵۰ mW به مدت ۳دقیقه قرار گرفتند.گروه چهارم (گروه تیماری فتودینامیک) است که در این گروه سلولها در ابتدا تحت تاثیر 5-ALA در تاریکی با غلظت ۰/۳mM و زمان ۵ ساعت قرار گرفته و سپس تحت تاثیرپرتوی یکنواخت لیزر Nd-YAG با طول موج ۵۳۲ nm وتوان ۵۰ mW قرار گرفتند.

Archive of SID

www.SID.ir

ارزیابی میزان بقاءسلولها به روش MTT assay

آزمون MTT بیانگر فعالیت هیدروژنازهای میتوکندریایی است.۲۴ساعت پس از تیمار ۱۰۰ µl از معرف دی متیل تیازول دی فنیل تترازولیوم بروماید (MTT) از (SIGMA)با غلظت ۰/۵ µg/ml به هر خانه از پلیت ۲۴ خانه ای افزوده شد و به مدت ۴-۳ساعت در دمای ۳۷درجه سانتیگراد درون انکوباتور قرار گرفتند.پس از انجام تیمار MTT نهایتا جذب نوری کریستالهای فورمازان که نشان دهنده سلول‌های زنده هستند ، توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۷۰ nmتعیین شد.

اندازه گیری سنتز پروتوپورفیرین IX

برای این منظور ۲ گروه کنترل و تیمار با 5-ALA را در نظرگرفته شد.در هر دو گروه سلولها به تعداد ۲×۱۰^{۴}درون پلیت ۲۴خانه ای کشت داده شدند.پس از گذشت ۲۴ ساعت گروه ALA با ۰/۳mMاز آمینولولنیک اسید و به مدت ۵ساعت تیمارشد.پس از طی زمان انکوباسیون سلولهای هر دو گروه توسط تریپسین-EDTA از کف پلیت جدا شده داخل اپندورف ریخته و در ۲۰۰۰ rpmسانتریفیوژ شدند.به لیز سلولی ۵۰۰µl از $SDS^{۴}$ ۱ ٪ حاویN ۰/۱ از NaoH افزوده و به آرامی تکان داده شدند.سپس نمونه ها توسط اسپکتروفتومتر فلورسانس بررسی شدند.(پیک جذبی**پروتوپورفیرین** IX=۶۲۰nm ،طول موج تهییجی=۴۰۰nm ،طیف جذبی= ۵۰۰-۷۰۰ nm)

مطالعات مورفولوژیک

سلولهای گروه کنترل ،تیمار با ALA ،تیمار با لیزر و تیمار فتودینامیک(تیمار با ALA و لیزر)۲۴ ساعت پس از تیمار فتودینامیک در زیر میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفتند.

تعیین نوع مرگ سلولی

در این مرحله سلولها به تعداد $۱۰^{۴}$بر روی لامل های شیشه ای پوشیده شده با پلی‌دی‌لیزین (GIBCO) کشت داده شدند.پس از تعیین ۴ گروه ذکر شده و۲۴ ساعت پس از تیمارها سلولها را توسط رنگ هوخست ۳۳۴۳۲ (SIGMA) با غلظت ۰/۵ µg/mlرنگ آمیزی شد.توسط این رنگ می توان سلولهای زنده و آپوپتوتیک را به رنگ سبز مشاهده کرد.و از روی بررسی مورفولوژی هسته و سیتوپلاسم آپوپتوز را توسط میکروسکوپ فلورسانس تشخیص داد.

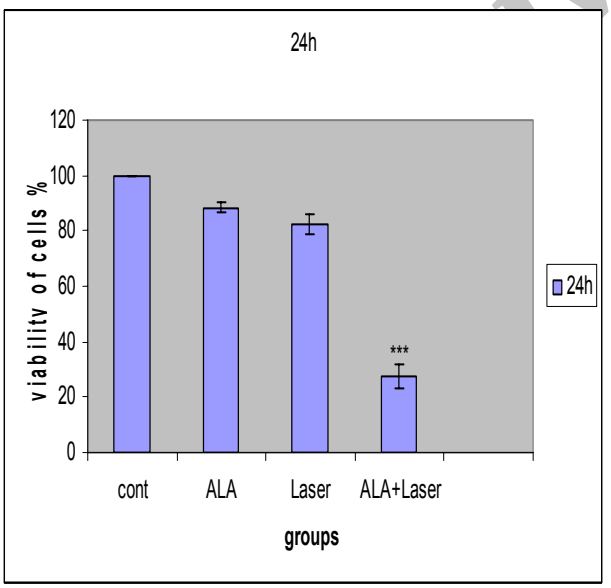
روش تجزیه و تحلیل داده ها

به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده ها ازآزمونANOVA ،نرم افزار SPSS استفاده شد.**P<0.05*** معنی دار تلقی گردید. هر آزمایش حداقل ۳ مرتبه تکرار شد و نمودارها از طریق نرم افزار EXCEL رسم شدند.

نتایج

۱- تیمار فتودینامیک باعث افزایش چشمگیر سمیت نوری(کاهش چشمگیر تعداد سلولها)می شود.

داده های آزمون MTT نشان می دهند که در گروه تیماری فتودینامیک یعنی گروهی که در معرض 5-ALA با غلظت ۰/۳ mM و پرتوی یکنواخت لیزر Nd-YAG قرار گرفتند ۲۴ ساعت پس از تیمار بیشترین میزان مرگ ومیر سلولها مشاهده می گردد و با ***P<0.001 اختلاف معنی دار است ،این در حالی است که اختلاف معنی داری در دو گروه دیگر نسبت به گروه کنترل مشاهده نمی شود .(شکل۱)

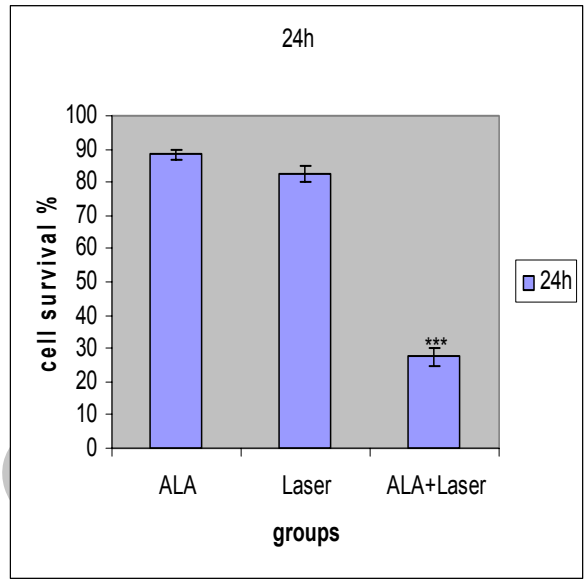


شکل۱- **مقایسه درصد بقا(viability) سلول‌هایLN-CaP بعد از تابش پرتوی لیزر با روش MTT assay.که افزایش معنی داری را در نمونه های تیمار شده با ALA و لیزر در مقایسه با نمونه کنترل نشان می دهد.**(Mean±S.E ***P<0.001)، ALA: تیمار با آمینولولنیک اسید، L: تیمار با پرتوی یکنواخت لیزرNd-YAG

1.Sodium Dodecyl Sulfate

www.SID.ir

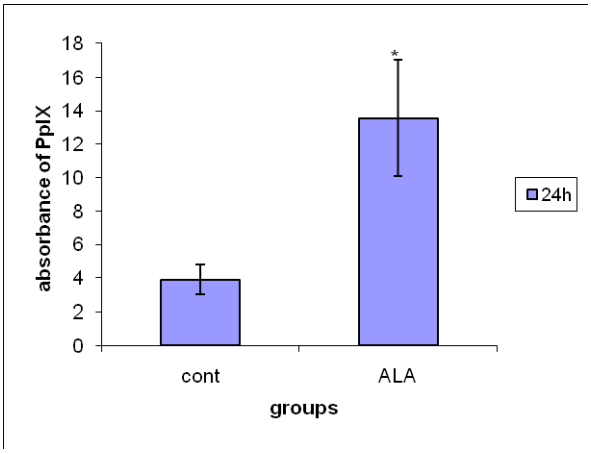
مقایسه درصد بقای سلولهای گروه تیماری فتودینامیک با دو گروه دیگر یعنی گروهی که ALA بدون لیزر دریافت کرده و گروهی که در معرض پرتوی لیزر بدون ALA بوده اند، میزان مرگ و میر بیشتری را نشان می دهد که در $P<0.001$ **معنی دار می** باشد(شکل۲).



شکل۲- **مقایسه درصد بقا(viability) سلول های LN-CaP بعد از تابش پرتوی لیزر با روش MTT assay.که افزایش معنی داری را در نمونه های تیمار شده با ALA و لیزر در مقایسه با نمونه ALA تنها و لیزر تنها نشان می دهد.**(Mean±S.E ***P<0.001)

۲- اعمال 5-ALA با غلظت ۰/۳ mM و۵ ساعت انکوباسیون موجب افزایش سنتز پروتوپورفیرین IX می شود.

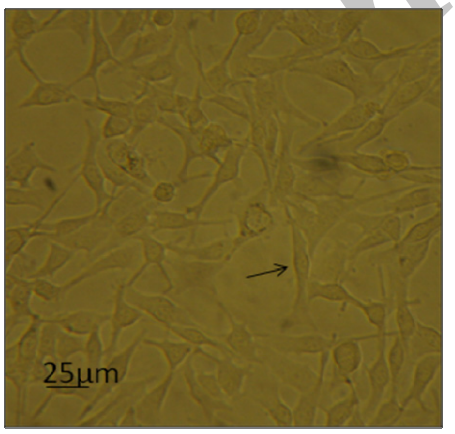
بررسی نمونه هایی که تحت تاثیر آمینولولنیک اسید قرار گرفتند در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی داری ($P<0.05$) را در سنتز پروتوپورفیرین IX نشان میدهد(شکل۳).



شکل۳- **مقایسه غلظت پروتوپورفیرین IX در سلول های LN-CaP پس از ۲۴ساعت تیمار نسبت به کنترل با استفاده از اسپکتروفتومتر فلورسانس که افزایش معنی داری را در نمونه های تیمار شده با ALA نشان میدهد.**(Mean±S.E *P<0.05)

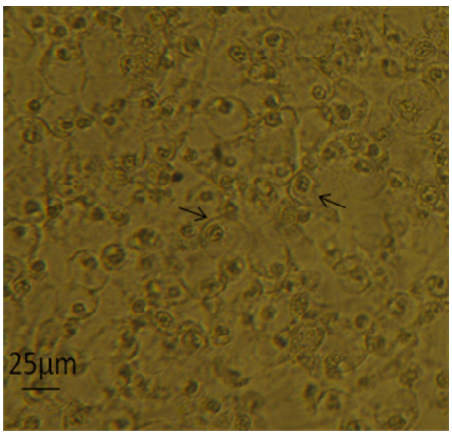
۳- گروه ALA-PDT در مقایسه با سایر گروهها تغییر مورفولوژیک فاحشی را نشان می دهد.

با مطالعه سلولها در زیر میکروسکوپ معکوس تغییرات چشمگیری در مورفولوژی(تغییر در شکل سیتوپلاسم و هسته) سلولهای گروه تیماری فتودینامیک ۲۴ ساعت پس از تیمار نسبت به گروه کنترل مشاهده شد(اشکال ۳و۴).



شکل۳- فتومیکروگراف از سلولهای گروه کنترل که در آن سلولها به صورت طبیعی، کشیده و طویل قرار دارند.نوک پیکان نشاندهنده حالت کشیده سلولها است.بزرگنمایی ×۴۰۰

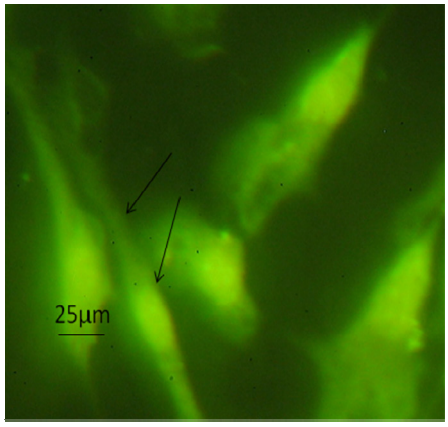
www.SID.ir



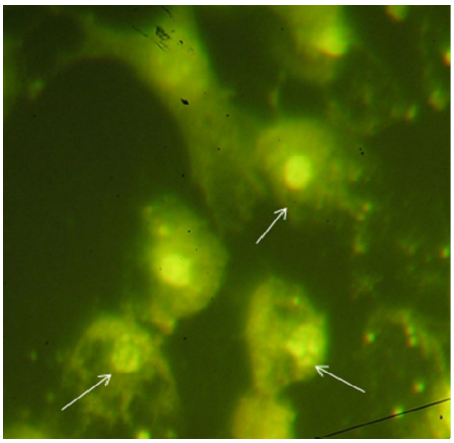
شکل ۴- فتومیکروگراف از سلول‌های گروه تیماری فتودینامیک که در آن سلولها ۲۴ ساعت پس از تیمار دفرمه می شوند.همانگونه که در شکل مشاهده می شود سیتوپلاسم و هسته حالت طبیعی ندارند. نوک پیکان نشان‌دهنده سلول‌های دفرمه است. بزرگنمایی ×۴۰۰

۴- در طی تیمار فتودینامیک سلولهای سرطانی LN-CaP بر اثر آپوپتوز از بین می روند.

بررسی سلول‌ها در زیر میکروسکوپ فلورسانس با استفاده از رنگ آمیزی هوخست نشان می‌دهد که ۲۴ ساعت پس از تیمار مرگ سلولی آپوپتوتیک باعث از بین رفتن سلولها می شود.در بررسی مورفولوژیکی سلولهای آپوپتوتیک در مقایسه باسلولهای سالم، سیتوپلاسم متراکم و هسته قطعه قطعه شده به خوبی مشخص است.(اشکال ۵و۶)



شکل۵- فتومیکروگراف از سلول‌های LN-CaP گروه کنترل با رنگ آمیزی هوخست ، فلش‌ها دست نخوردگی هسته را نشان می دهد.



شکل۶- فتومیکروگراف از سلول‌های LN-CaP گروه-ALA PDT با رنگ آمیزی هوخست ، فلشها قطعه قطعه شدن هسته و دفرمه شدن سیتوپلاسم را نشان می دهد.

بحث

لیزرNd-YAG متداول ترین نوع لیزر مورد استفاده در پزشکی است که کاربردهای بسیاری دارد. در این لیزر نئودیمیوم یونیزه شده به عنوان ماده فعال جایگزین ایتریوم در ساختار کریستالی ایتریوم آلومینیوم گارنت می شود. این لیزر غالبا نوری با طول موج ۱۰۶۴ در ناحیه مادون قرمز ازخود ساطع می‌کند[۱۰].

گزارش‌های تحقیقاتی نشان می دهد لیزر Nd-YAG درجراحی و حذف تومورهای ریوی، پستانی و....عملکرد خوبی داشته است. از مزایای استفاده از آن می توان به قدرت تبخیر بالای تومور و نفوذ بافتی بالا در حدود ۵-۱۰mm با خروجی انرژی زیاد اشاره کرد[۱۱].

نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان می دهد که تیمار فتودینامیکی با بکارگیری آمینولولنیک اسید با غلظت ۰/۳mM و زمان انکوباسیون ۵ ساعت همراه با ۳ دقیقه در معرض بودن با پرتوی یکنواخت لیزر Nd-YAG با طول موج ۵۳۲nm وتوان ۵۰mW می تواند اثرات سیتوتوکسیک را در سلولهای سرطانی افزایش داده و درصد بالایی از مرگ و میر را در گروه تیماری فتودینامیک نسبت به گروه کنترل،گروه در معرض ماده حساس به نور بدون لیزر و گروه در معرض لیزر

Archive of SID
www.SID.ir

بدون ماده حساس به نور ایجاد کند، که با داده های Peng و همکارانش که نشان دادند با انتخاب ماده حساس به نور و منبع نوری مناسب می‌توان سمیت نوری را در طی تیمار فتودینامیکی افزایش داد مطابقت دارد[۱۲]. Wyld و همکارانش گزارش کردند که نوع مر گ سلولی القا شده پس از تیمار فتودینامیک می تواند آپوپتوز یا نکروز باشد که بستگی به نوع سلول دوز نوری و نوع ماده حساس به نوردارد[۱۳].مطالعات ما نشان می دهد که استفاده از ماده حساس به نور آمینولولنیک اسید با غلظت mM **۰/۳و** دوز نوری ۳ دقیقه با طول موج nm ۵۳۲ وتوان mW ۵۰ بر روی دودمان سلولی LN-CaP موجب القا مرگ سلولی شدیدی می شود. بررسی‌های مورفولوژیکی صورت گرفته با رنگ آمیزی هوخست نوع مرگ سلولی ایجاد شده را آپوپتوز نشان می‌دهد چرا که از نشانه های مرگ سلولی آپوپتوتیک می توان به از هم گسیختگی و دفرمه شدن سیتوپلاسم و قطعه قطعه شدن هسته سلولها اشاره کرد .با توجه به اینکه که سلول‌های سرطانی به سرعت تکثیر می‌شوند و کمتر تحت مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (آپوپتوز) قرار می‌گیرند یافتن روش‌هایی که بتوان به طور انتخابی آپوپتوز را در سلولها ایجاد کرد مدنظر بوده است.

Buchczyk و همکاران در سال ۲۰۰۱ توسط فتودینامیک درمانی با ALA و پرتوی UV با طول موج nm۴۰۰-۳۲۰ توانستند سلول‌های فیبروبلاست پوست را به میزان زیادی از بین ببرند[۱۴]. Sporri و همکاران اثرات 5-ALA و پرتوی لیزر آرگون با طول موج nm۴۰۰،شدت نوری J/cm2 ۸ را بر سلولهای سرطان تخمدانی TEC و سلولهای اندوتلیال عروقی HUVEC در شرایط in vitro بررسی کردند و نتایج بالینی خوبی را به دست آوردند و اعمال مستقیم ماده حساس به نور را در بهبود نتایج موثر دانستند[۱۵].Ortel و همکاران در سال ۲۰۰۲ اثرات 5-ALA و پرتوی لیزر آرگون با طول موج nm ۵۱۲ و شدت ۰/۰۶ تا ۰/۰۷۵ را همراه با تمایز درمانی با ویتامین A و D بر سلولهای LN-CaP بررسی کرده و درصد بالایی از مرگ سلولها را گزارش کردند [۱۶]. Sinha و همکاران نیز در سال ۲۰۰۶ اثر تیمار ترکیبی تمایز درمانی با متوتروکسات و تیمار فتودینامیکی با 5-ALA و پرتوی لیزر آرگون بررسی کرده و ضمن سنجش محتوای **پروتوپورفیرین** IX درون سلول‌های LN-CaP درصد مرگ و میر بالای سلول‌ها را در این تیمار ترکیبی گزارش نمودند [۱۷]. **نتایج تحقیق ما نشان می دهد که آمینولولنیک اسید با دوز مورد استفاده موجب** سنتز ماده حساس به نور اندوژن **پروتوپورفیرین** IX در سلولهای سرطان پروستاتی LN-CaP شده است که مقایسه غلظت **پروتوپورفیرین** IX پس از ۲۴ ساعت تیمار در این سلولها نسبت به کنترل افزایش معنی داری در سطح $P<0.05$ را نشان داده است که سبب افزودن سمیت نوری سلولها می شود.

تقدیر و تشکر

از راهنمایی های جناب آقای دکتر مجلس آرا در رابطه با مسائل مرتبط با لیزر و همکاری و همراهی ریاست دانشکده علوم، مدیر محترم گروه زیست شناسی و مرکز پرورش و تکثیر حیوانات دانشگاه تربیت معلم کمال تشکر را داریم.

منابع

1.Uzgare AR,Isaacs JT.2005.Prostate cancer : potential targets of anti-proliferativeand apoptotic signaling pathways,The International Journal of Biochemistry & Cell Biology,37:707-714

۲.یلسون جی(۱۳۸۵).اصول لیزر و کاربردهای آن.ترجمه عباس بهجت،انتشارات دانشگاه یزد، صفحات ۱۸۵-۱۸۳

3. Dougherty T.J., Gomer C.J.,Henderson B.W.,et al .1998. photodynamic therapy .J Natl Cancer Inst .90(12):89-905.

4. Luksienė Z.2003.Photodynamic therapy : mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment,MEDICINA,39: 1137-1150

5. Castano Ana P, Demidova Tatiana N, Hamblin Michael R.2004.Mechanisms in photodynamic therapy:part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.1:279-293.

6. Christian S .Jin-Ping L,Wei X,Janda P,Heinrich P,Herbert S,Baumgartn er Rand Leunig A .2002.In vitro photodynamic therapy of

Archive of SID

www.SID.ir

nasopharyngeal carcinoma using 5–aminolevulinic acid,Photochem . Photobiol.Science,1: 315–319

7. Sporii S, Chopra V, Egger N, Hawkins H , Motamedi M ,Dreher E, Schneider H .2001.Effects of 5-aminolaevulinic acid on human ovarian cancer cells and human vascular endothelial cells in vitro,journal of photochemistery and photobiology,64: 8-20

8. Wilson J, Hanwakes J.F.B, Behjat A .2006 . Laser principles and Applications. Yazd University. p.235

9. Konaka C, Furukawa K,Okunaka T, Yamamot and Kato H, Tsuchida T, Usuda J, KumasakaH,Ishida J. 1999. Effectiveness of Photodynamic Therapy and Nd-YAG Laser Treatment for obstructed Tracheobranchial Malignancies,Hindwai Publishing 5,161-166

10. Geusic JE,Marcos HM,Van Uitrert LG.Laser oscillation in Nd-doped yttrium aluminium, yttrium gallium and gadolinium garnet,*Applied Physics Letters*.1964;10:182-184

11. نایمر مارکوف (۱۳۸۱).برهمکنش لیزر- بافت.ترجمه پرویز پروین، مرکز نشر دانشگاه صنعتی امیر کبیر، صفحات ۲۳۹-۲۳۶

12. Peng Q ,Warloe T ,Berg K ,Moan J,Kongshaug M,Giercksky ,Nesland J.2002.5-Aminolevulinic Acid–Based Photodynamic Therapy,Cancer,97: 2282-2307

13. Wyld L, Reed MWR and Brown NJ.2001.Differential cell death response to photodynamic therapy is dependent on dose and cell type,British Journal of Cancer,89: 1384-1

14. Buchczyk P, Klotz L, Lang K, Fritsch C, Sies H. High efficiency of 5-aminolevulinate - photodynamic treatment using UVA irradiation,*Carcinogenesis,*2001*;*22:879-883.

15. Sporri Stefan , Chopra Vimlarani, Egger Norman , Hawkinsd Hal K, Motamedie Massoud, Dreher Ekkehard, Schneider Henning ,Effects of 5-aminolaevulinic acid on human ovarian cancer cells and human vascular endothelial cells in vitro.*Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*.2001;64:8-20

16. Ortel B, Sharlin D, Odonell D, Sinha AK, Hassan T, Differentiation enhances aminolevulinic acid-dependent photodynamic treatment of LNCaP prostate cancer cells, *British Journal of Cancer*.2002;87:1321-1327.

17. Sinha A.K, Anad S, Ortel B,Chang Y, Hasan T and Maytin EV. Methortrexate used in combination with aminolevulinic acid for photodynamic killing of prostate cancer cells. *Br J Cancer* 2006; 95:485-495

Archive of SID

www.SID.ir