

بررسی حساسیت‌های پرتوی و نوری ایندوسیانیل گرین روی رده‌های سلولی انسانی

DFW و MCF7

دکتر آمنه سازگارنیا^۱، دکتر سیدمحمدحسین بحرینی طوسی^۲، علیرضا منتظرآبدی^{۳*}، دکتر سیدامیر آل داوود^۴، دکتر حبیب‌الله اسماعیلی^۵

خلاصه

مقدمه: در این تحقیق با هدف بهره‌گیری از منابع غیرلیزری در درمان‌های فتوداینامیک، حساسیت نوری ایندوسیانیل گرین برای استفاده به عنوان داروی حساس به نور و همچنین حساسیت پرتوی آن برای استفاده در پرتو درمانی مورد بررسی قرار گرفته است.

روش: مطالعه بر روی رده‌های سلولی انسانی مشتق شده از سرطان‌های پستان و ملانوما بر اساس طیف‌های جذبی پهن ایندوسیانیل گرین با استفاده از نور غیرهمدوس انجام شده است. بدین منظور دوزهای متفاوتی از ایندوسیانیل گرین، نور و پرتوهای ایکس برای تعیین سمیت شیمیایی، نوری و پرتوی و نیز خواص حساس‌کنندگی نوری و پرتوی این ماده بررسی شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون سلول‌ها با ایندوسیانیل گرین گروه‌های درمانی مستقل تحت تابش ۶۰.۳۰ و ۱۰۸ ژول بر سانتی‌مترمربع نور در محدوده طول موج 730 ± 20 نانومتر یا ۲ و ۴ گری پرتوی ایکس 100 kVp واقع شدند. تأثیر عوامل درمانی بر بقای سلول‌ها بر اساس آزمون ام‌تی‌تی ارزیابی گردید.

یافته‌ها: یافته‌ها بیانگر عدم سمیت شیمیایی ایندوسیانیل گرین، حساسیت نوری آن و بازده درمانی مناسب در درمان فتوداینامیک با نور غیرهمدوس در ناحیه 730 ± 20 نانومتر و همچنین وابستگی کارایی درمان به دوز نوری است. اما اثر همیاری بین ایندوسیانیل گرین و پرتو مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج حاصل می‌توان از ایندوسیانیل گرین به عنوان یک داروی حساس به نور در ناحیه 730 ± 20 نانومتر استفاده نمود. از آنجا که تفاوت معنی‌داری در بقای سلولی بین گروه‌های دریافت‌کننده ایندوسیانیل گرین و پرتو با گروه‌هایی که تنها پرتودهی شده‌اند، در هیچ یک از رده‌های سلولی دیده نمی‌شود، نمی‌توان از ایندوسیانیل گرین به عنوان یک داروی حساس به پرتو استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: درمان فتوداینامیک، سرطان پستان، ملانوما، ایندوسیانیل گرین، حساسیت نوری، حساسیت پرتوی، نور غیرهمدوس

۱- استادیار گروه فیزیک پزشکی و مرکز تحقیقات فیزیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد ۲- استاد گروه فیزیک پزشکی و مرکز تحقیقات فیزیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۳- مربی گروه فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان ۴- استادیار گروه رادیوتراپی و مرکز تحقیقات سرطان بیمارستان امید، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۵- استادیار گروه آمار حیاتی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

* نویسنده مسؤل، آدرس: آزمایشگاه فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، کرمان • آدرس پست الکترونیک: a.abadi@kmu.ac.ir

مقدمه

کرده که ۷۹۱۰ نفر آنها جان خود را در پی ابتلا به این بیماری از دست داده‌اند (۴).

جراحی موضعی و رادیوتراپی در زمره درمان‌های متداول عود مجدد و متاستازهای سطحی ملانوما و سرطان پستان به‌شمار می‌روند (۵). اما با توجه به عوارض جانبی این درمان‌ها اندیشیدن تدابیری برای طراحی روش‌های غیرتهاجمی جدید ضروری است. در این میان درمان تکرارپذیر فتوداینامیک برای متاستازهای پوستی، روش کمکی مؤثری به‌نظر می‌رسد. هم‌چنین استفاده از حساس‌کننده‌های پرتوی در پرتو درمانی می‌تواند با کاهش دوز پرتوی موردنیاز موجبات حفظ بافت‌های سالم را فراهم آورد.

درمان فتوداینامیک که درمان فتوشیمیایی نیز خوانده شده، یک درمان غیرتهاجمی است که در راستای برطرف کردن موانع موجود در درمان تومورهای سطحی کوچک مؤثر واقع شده‌است (۶). این رویکرد جالب درمانی از همبازی دو عامل شیمیایی و فیزیکی بهره‌گیری می‌کند که عبارتند از یک حساس‌کننده نوری که در اثر تحریک نوری و انتقال انرژی به اکسیژن مولکولی، رادیکال آزاد و اکسیژن یگانه (Single Oxygen) تولید نموده، تأثیر تخریبی این محصولات سمی بر ساختمان‌های سلولی سبب مرگ سلول می‌شود و دیگری انرژی نورانی با طول موج مناسب که بتواند ماده حساس‌کننده را در بافت مورد نظر فعال کند (۷).

از جمله محدودیت‌های درمان‌های فتوداینامیک عمق نفوذ کم نورمرئی در بافت‌ها می‌باشد که این روش را تنها برای تومورهای در دسترس و با ضخامت کم ارزشمند می‌سازد. دفع آرام مولکول‌های حساس‌کننده از بدن و آثار نامطلوب آن بر سایر بافت‌ها نیز از مشکلات دیگر حساس‌کننده‌های نوری است. در سال‌های اخیر تلاش شده با طراحی داروهای جدید و هدفمند با طول موج فعال‌سازی در ناحیه فروسرخ نزدیک، گام‌هایی در جهت غلبه بر این موانع برداشته‌شود (۷).

سرطان‌های پستان و پوست از خطرناک‌ترین بدخیمی‌هایی هستند که بسیاری از جوامع بشری با آن دست به‌گریبانند. در حال حاضر سرطان پستان شایع‌ترین نوع سرطان در زنان است، به‌طوری‌که در هر سال بیش از یک میلیون زن مبتلا به این سرطان شناسایی می‌شوند و از این تعداد حدود ۳۷۰۰۰۰ نفر جان خود را از دست می‌دهند (۱). با این وجود ۸۰-۷۰ درصد از مبتلایان به سرطان پستان در مراحل ابتدایی قابل درمان بوده و کمک شایان شیوه‌هایی نظیر شیمی‌درمانی و هورمون‌درمانی در بهبودی این بیماران به اثبات رسیده‌است. این امر در حالی است که احتمال عود مجدد یا متاستازهای حاصل از این بیماری وجود دارد (۲). در شیوه‌های درمانی رایج سرطان پستان، جراحی، هورمون‌درمانی، شیمی‌درمانی و پرتودرمانی به چشم می‌خورد. البته در دهه‌های اخیر روش‌های درمان دستخوش تغییراتی شده و با این تفکر که بدخیمی مذکور صرفاً موضعی نیست و امکان انتشار متاستازهای میکروسکوپی آن در بدن و بافت‌های اطراف وجود دارد، درمان می‌شود. در گروه‌های خاصی از بیماران، جراحی همراه با شیمی‌درمانی یا پرتودرمانی انجام می‌شود. پرتودرمانی بعد از عمل جراحی احتمال عود موضعی را کاهش می‌دهد (۳).

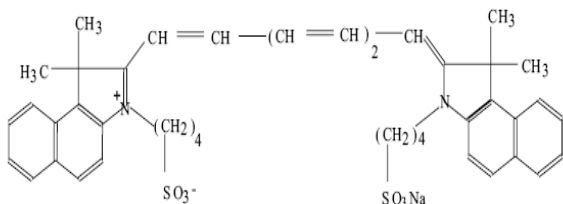
ملانوما نیز یکی از شایع‌ترین اشکال سرطان پوست و ناشی از رشد بدخیم سلول‌های ملانوسیت است. این سلول‌ها رنگدانه تیره پوست، مو، چشم و خال‌های بدن را تولید می‌کنند. از این رو تومورهای ملانوما اکثراً قهوه‌ای و یا سیاه هستند. البته در موارد معدودی نیز سرطان‌های ملانوم رنگدانه تولید نکرده و به رنگ‌های صورتی، قرمز و یا بنفش ظاهر می‌شوند. این نوع سرطان اگر در مراحل اولیه تشخیص داده شود، درمان‌پذیر است، اما چنانچه حالت تهاجمی پیدا کرده و به سایر بافت‌های بدن سرایت کند غیر قابل درمان خواهد بود. انجمن سرطان آمریکا در سال ۲۰۰۶ حدود ۶۲۱۹۰ مورد ملانوما در این کشور شناسایی

DFW نیز یک زیر رده سلولی دپیگمانته شده است که از سلول‌های انسانی DFB از سرطان ملانوما مشتق شده است (۹).

هر دو رده سلولی در محیط کشت حاوی ۲ میلی‌مولار گلوتامین، ۱۰٪ سرم جنین گاوی (F.C.S)، ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین و در حضور ۵٪ دی‌اکسید کربن در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. هر بار که سلول‌ها به فاز نمایی رشد می‌رسیدند و به صورت تک لایه سطح فلاسک را می‌پوشاندند (حدود $10^4 \times (2-5)$ سلول در هر سانتی‌متر مربع)، با استفاده از محلول ۰/۲۵ درصد تریپسین-EDTA از کف فلاسک جدا و به فلاسک‌های جدید منتقل می‌شدند. محیط کشت سلول‌ها هر ۲-۳ روز یک‌بار تعویض می‌گردید. سرم جنین گاوی و تریپسین-EDTA از شرکت بیوژن (Biogene)، محیط کشت سلولی RPMI 1640 از شرکت همیدیا (HIMEDIA)، ام‌تی‌تی از شرکت مرک (Merck)، و تریپان‌بلو از شرکت سیگما (Sigma) خریداری شدند.

مشخصات ایندوسیانین گرین

پودر ایندوسیانین گرین با شماره محصول MG25-12633 از شرکت سیگما خریداری شد. ساختار شیمیایی این رنگ دارو با جرم مولکولی ۷۴ در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱. ساختار شیمیایی ایندوسیانین گرین

غلظت‌های مورد نیاز از انحلال پودر در آب دیونیزه تهیه و پس از عبور از فیلتر ۰/۲ میکرومتر در لوله‌های استریل تقسیم و مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا بیناب جذبی

پیش‌بینی می‌شود وجود خاصیت حساس‌کنندگی پرتوی در یک حساس‌کننده نوری بتواند امکان فعال‌سازی هم‌زمان نوری و پرتوی را به منظور افزایش عمق درمان فراهم آورد. از طرف دیگر عدم دسترسی به منابع لیزری در کشورهای درحال توسعه و جهان سوم محدودیت دیگری است که بکارگیری درمان‌های فتوداینامیک را محدود ساخته است.

در این تحقیق سعی بر آن بوده که فعال‌سازی نوری حساس‌کننده‌ای که طیف جذبی پهنی در ناحیه فروسرخ داشته باشد، با استفاده از نور غیرلیزری مورد مطالعه قرار گرفته، هم‌چنین حساسیت پرتوی آن به منظور بررسی امکان فراهم‌آمدن عمق درمان بیشتر با تابش اشعه ایکس نیز بررسی شود.

در همین راستا فعال‌سازی نوری با نور غیرهمدوس و حساسیت پرتوی ایندوسیانین گرین بر روی دو رده سلولی مشتق شده از سرطان‌های پستان و ملانومای انسانی مورد تحقیق قرار گرفت. انتخاب ایندوسیانین گرین بر مبنای طیف جذبی نسبتاً پهن آن در غلظت‌های بالا در ناحیه فروسرخ نزدیک و به دنبال آن افزایش عمق درمان می‌باشد. با توجه به وابستگی ضریب جذب ایندوسیانین گرین به غلظت و عدم سمیت این دارو حتی در دوزهای بالا استفاده از آن به عنوان یک ماده حساس به نور در درمان سرطان‌های سطحی و متاستازهای موضعی کوچک مناسب به نظر می‌رسد.

روش بررسی

رده‌های سلولی و شرایط کشت آنها

رده‌های سلولی MCF7 و DFW از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری گردید. رده سلولی MCF7 از تومور آدنوکارسینوما انسانی پستان به دست آمده و یکی از پر کاربردترین رده‌های سلولی در زمینه تحقیقات برون‌تنی سرطان پستان به‌شمار می‌آید. این رده سلولی از بعضی جهات نظیر دارابودن گیرنده‌های استروژن به سلول‌های متمایز شده اپی‌تلایال پستانداران شباهت دارد (۸). رده سلولی

گردید.

در بخش سوم پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون سلول‌ها در غلظت‌های صفر و ۵۰ میکرومولار ایندوسیانین گرین، حساسیت پرتوی این ماده و اثر آن بر تکثیر و بقای سلولی بررسی شد. در این مرحله پس از اتمام زمان انکوباسیون و شستشوی سلول‌ها، هر نمونه به دو بخش تقسیم گردید. یکی از آنها یک جلسه تحت تابش اشعه ایکس با انرژی ۱۰۰ kVp با دوزهای ۲ یا ۴ گری قرار گرفت و دیگری بدون تابش در شرایط مشابه باقی ماند.

شرایط نوردهی

برای انجام نوردهی از پلیت‌های ۲۴ خانه استفاده گردید. به منظور جلوگیری از تابش نور پراکنده از نمونه تحت نوردهی به سایرین، هر نمونه به تنهایی نوردهی گردید. برای پیشگیری از افزایش دمای سلول‌ها نمونه‌های سلولی مورد مطالعه هنگام نوردهی، روی یخ قرار داده شدند. در تمام مدت نوردهی گروه کنترل نیز بر روی یخ در محیط تاریک نگهداری گردید.

نوردهی سلول‌ها با استفاده از منبع نورانی غیر همدوس لوماکیر (Luma-Care) مجهز به پروب‌های مشتمل بر رشته‌های نوری با قطر ۲ میلی‌متر و قطر لکه نوری ۸ میلی‌متر، در طول موج 730 ± 20 نانومتر انجام گرفت. همگنی چگالی توان خروجی این سیستم $\pm 5\%$ مجهز به تنظیم کننده زمانی، با دقت 0.5% زمان تنظیم شده می‌باشد (۱۰).

دانسیته توان خروجی پروب فیبر نوری توسط نورسنج CON-TROL-CUREIL1400 ساخت شرکت امریکایی UVPROCESS مجهز به آشکارساز نوری دارای پاسخ تخت اندازه‌گیری گردید. نوردهی سلول‌ها در دانسیته نوری ۴۵ میلی‌وات بر سانتی‌مترمربع و دوزهای ۶۰، ۳۰ و ۱۰۸ ژول بر سانتی‌مترمربع انجام شد.

شرایط پرتودهی

برای پرتودهی سلول‌ها از پلیت‌های تک‌خانه استفاده گردید. جهت پرتودهی سلول‌ها از دستگاه X-ray سطحی

محلول‌های ایندوسیانین گرین در غلظت‌های مختلف توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مرئی-ماورابنفش ساخت شرکت شیمادزو مدل UV1700 در طول موج‌های ۱۰۰۰-۲۰۰ نانومتر به دست آمد.

درمان سلول‌ها

زمانی که تراکم سلولی در کف فلاسک کشت به حدود ۸۵٪ رسید، سلول‌ها تریپسینه و از کف فلاسک جدا شدند و با استفاده از لام نئوبار و میکروسکپ نوری تعداد و درصد بقای سلولی تعیین شد. سپس سوسپانسیون سلولی با غلظت 1×10^6 سلول در هر میلی‌لیتر محیط کشت آماده و با ایندوسیانین گرین در غلظت‌های مورد نظر به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس شستشوی سلول‌ها با محیط کشت انجام گرفت تا ملکول‌های داروی اضافی باقی مانده خارج از سلول‌ها از محیط عمل خارج شود. در مرحله بعد در صورت لزوم سلول‌ها تحت نوردهی و پرتودهی با دوزهای پیش‌بینی شده واقع شدند و ۲۴ ساعت بعد درصد بقای سلولی تعیین گردید.

مراحل درمان

ابتدا سمیت ایندوسیانین گرین مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور یک گروه کنترل و ۵ گروه درمانی در نظر گرفته شد. سلول‌های MCF7 و DFW در گروه‌های درمانی با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۳۲، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار از ایندوسیانین گرین به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و پس از شستشوی سلول‌ها درصد بقا تعیین گردید.

در بخش دوم برای بررسی اثرات مداخله گر نور بر بقای سلولی، گروه‌های مستقل متشکل از سلول‌های MCF7 و DFW پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در غلظت‌های صفر، ۳۲، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار ایندوسیانین گرین به عنوان گروه‌های درمانی در نظر گرفته شد. هر یک از نمونه‌های اخیر به دو بخش تقسیم و یکی از آنها تحت تابش دوز نوری پیش‌بینی شده واقع و دیگری در شرایط مشابه در تاریکی نگهداری و ۲۴ ساعت بعد درصد بقای سلولی تعیین

استفاده از آزمون MTT پس از ۲۴ ساعت مورد تحقیق قرار گرفت. تمامی آزمایش‌ها حداقل سه بار تکرار و در هر مرحله حداقل ۸ نمونه مورد ارزیابی قرار می‌گرفت.

تحلیل‌های آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها پس از انجام آزمون نرم‌التی و اطمینان از توزیع نرمال داده‌ها، با استفاده از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست توکی با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۲ و رسم نمودارها در محیط اکسل انجام گرفته است.

نتایج

به منظور تعیین مناسب‌ترین طول موج جذب ایندوسیانین گرین و تعیین تأثیر غلظت بر طول موج قله جذب، ایندوسیانین گرین در غلظت‌های مختلف در آب حل شده و طیف جذبی آنها در طول موج‌های ۲۰۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر با گام‌های یک نانومتر تعیین گردید. طیف جذبی ایندوسیانین گرین در محدوده طول موج‌های ۱۰۰۰-۲۰۰ نانومتر در شکل ۲ نمایش داده شده است.

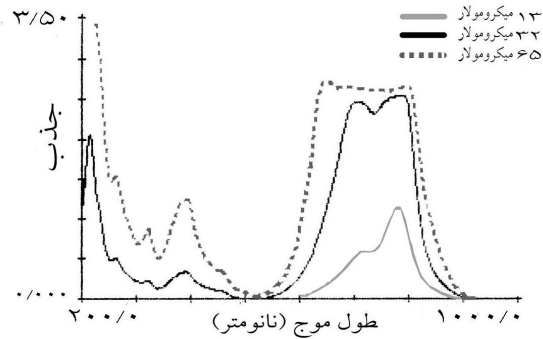
همان‌طور که مشاهده می‌شود مولکول آلی ایندوسیانین گرین دارای جذب قابل ملاحظه‌ای در ناحیه ۷۰۰-۸۰۰nm می‌باشد که میزان آن با غلظت ایندوسیانین گرین تغییر می‌کند. با توجه به امکانات موجود و وجود این قله‌های جذبی، درمان‌های فتودینامیک در قله طول موج ۷۳۰ نانومتر انجام گردید.

همان‌طور که شرح آن رفت، در بخش اول این مطالعه سمیت ایندوسیانین گرین مورد بررسی قرار گرفت. اثرات ایندوسیانین گرین در غلظت‌های مختلف بر بقای سلولی پس از ۲۴ ساعت آنکوباسیون در اشکال ۳ و ۴ نشان داده شده است. بر اساس این نتایج، ایندوسیانین گرین تا غلظت ۱۰۰ میکرومولار دارای سمیت در هیچ یک از رده‌های سلولی نیست. با نگاهی به نتایج مطالعات مشابه (۱۱) می‌توان ادعا کرد که ایندوسیانین گرین یک ماده سمی برای سلول‌ها به شمار نمی‌آید.

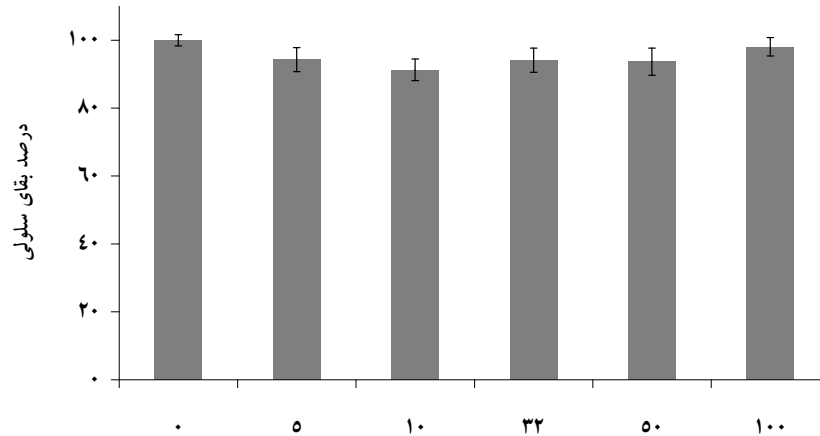
ساخت شرکت فیلیس در شرایط ۱۰۰ kV_p و ۸۰mA استفاده شد. هم‌چنین برای انجام پرتودهی از مخروط ۵ سانتی‌متر و فیلتر آلومینیومی ۱/۷mm نیز استفاده شد. نمونه‌های سلولی در دوزهای ۲، ۴، ۶ و ۸ گری با آهنگ دوز ۱۱۱۴rad/min تحت تابش قرار گرفتند. به دلیل محدودیت در شرایط انتخاب مخروط‌های دستگاه X-ray از پلیت‌های استریل تک‌خانه استفاده شد. قبل از انجام پرتودهی برای اطمینان از عدم جذب و پراکندگی پرتو در لایه‌های پلیت به‌وسیله الکترومتر فارمر ۲۵۷۰/۱ ساخت شرکت ان-ای تکنولوژی انگلستان دزیمتری انجام شد، که نتایج حاکی از عدم جذب پرتو در مقایسه دو حالت قبل و بعد از قرار دادن پلیت بود. پرتودهی تمامی نمونه‌ها در دمای صفر درجه بر روی یخ انجام گردید. با توجه به عدم جذب و پراکندگی پلیت مورد استفاده و هم‌چنین ارتفاع ۲ میلی‌متری محیط کشت داخل چاهک‌ها ناحیه بیلدآپ (Build up) نیز در همان ضخامت در نظر گرفته شد.

سنجش بقای سلولی

پس از انجام درمان‌های طراحی شده روی نمونه‌های مختلف، سلول‌ها در چاهک‌های پلیت‌های استریل ۹۶ خانه با تراکم سلولی ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک تقسیم و به مدت ۲۴ ساعت در آنکوباتور ۳۷ درجه قرار می‌گرفتند. بقای سلولی بر اساس توانایی میتوکندری در تبدیل ماده ام‌تی‌تی (MTT) به کریستال‌های فورمازان با استفاده از تست‌ام‌تی‌تی با تعیین جذب نوری محصول نهایی آزمایش ارزیابی گردید. بدین منظور محلول ام‌تی‌تی (غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به هر چاهک حاوی سلول اضافه و ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه آنکوبه و رسوب سلولی حاصل در DMSO و بافر گلایسین حل و جذب نوری بلورهای فورمازان تشکیل شده توسط دستگاه الیزاریدر ساخت کمپانی آویرنس (AWARENESS) مدل ۳۲۰۰ در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری و درصد بقای سلولی هر نمونه در مقایسه با گروه کنترل محاسبه گردید. در کلیه موارد ضمن لحاظ کردن همه کنترل‌های ممکن، درصد بقای سلول با



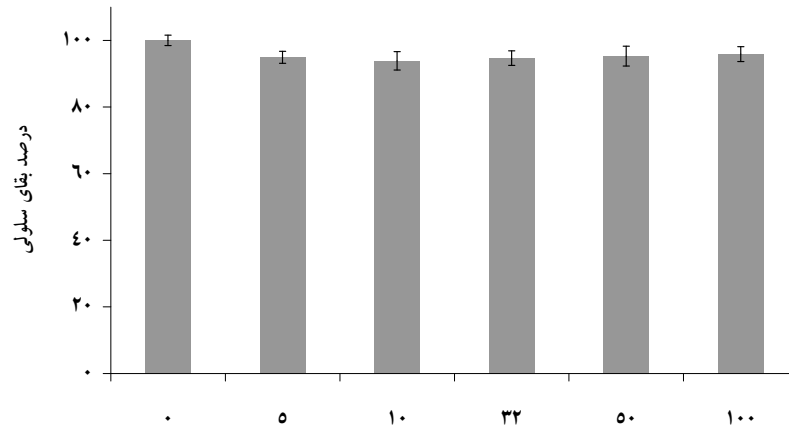
شکل ۲. منحنی طیف جذبی ایندوسیانین گرین در غلظت‌های ۱۳، ۳۲ و ۶۵ میکرومولار در آب.



غلظت ایندوسیانین گرین (میکرومولار)

شکل ۳. درصد بقای سلول‌های MCF7 در حضور غلظت‌های مختلف از ایندوسیانین گرین، ۲۴ ساعت پس از درمان

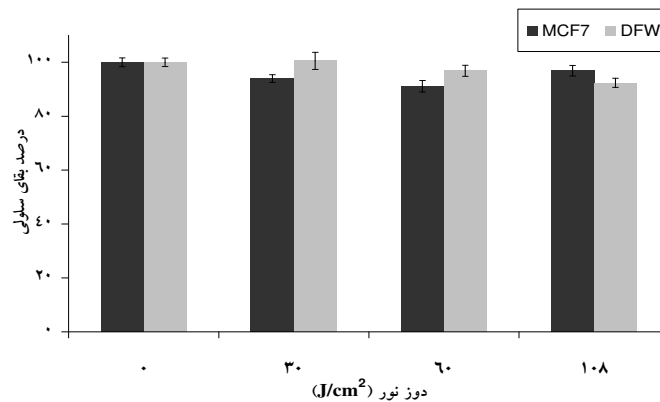
زمان آنکوباسیون سلول‌ها با دارو ۲۴ ساعت و داده‌ها میانگین در صد بقای سلولی \pm خطای استاندارد پس از سه بار تکرار می‌باشند.



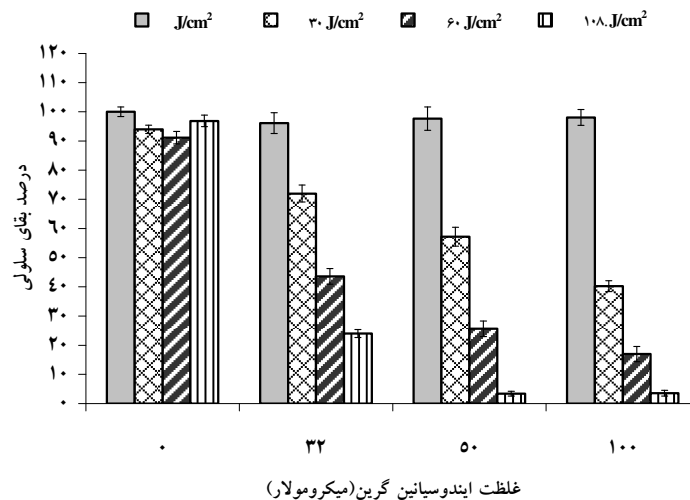
غلظت ایندوسیانین گرین (میکرومولار)

شکل ۴. درصد بقای سلول‌های DFW در حضور غلظت‌های مختلف از ایندوسیانین گرین ۲۴ ساعت پس از درمان

زمان آنکوباسیون با ایندوسیانین گرین ۲۴ ساعت و داده‌ها میانگین در صد بقای سلولی \pm خطای استاندارد پس از سه بار تکرار می‌باشند.



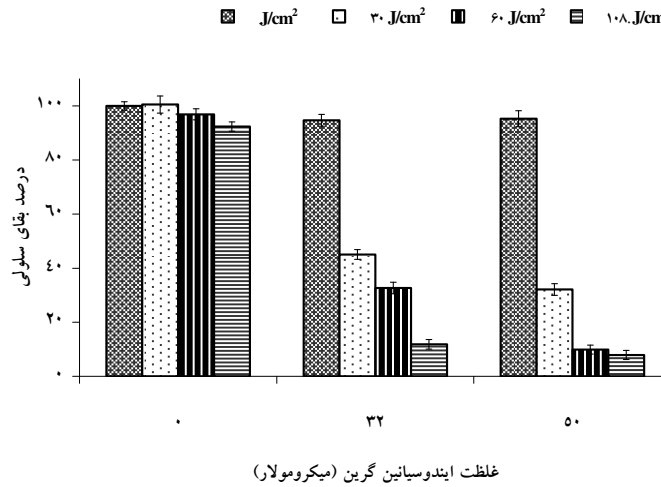
شکل ۵. درصد بقای سلول‌های MCF7 و DFW دوزهای نوری مختلف در قله طول موج ۷۳۰ نانومتر، ۲۴ ساعت بعد از نوردهی زمان انکوباسیون با ایندوسیانین گرین ۲۴ ساعت و داده‌ها بیانگر میانگین درصد بقای سلولی ±خطای استاندارد پس از سه بار تکرار می‌باشند.



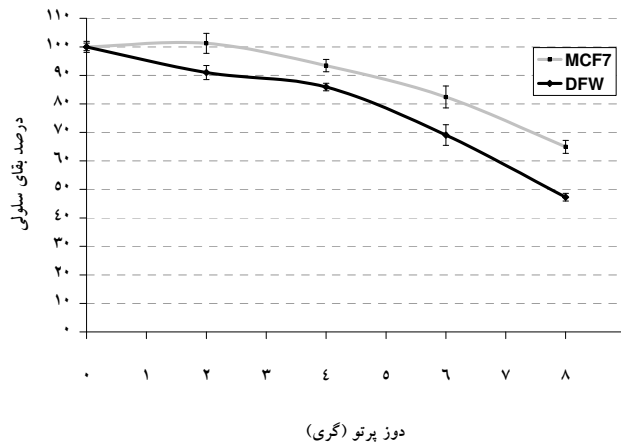
شکل ۶. تغییرات درصد بقای سلولی MCF7 پس از دریافت دوزهای نوری مختلف در قله طول موج ۷۳۰ نانومتر، ۲۴ ساعت بعد از نوردهی زمان انکوباسیون با ایندوسیانین گرین ۲۴ ساعت و داده‌ها بیانگر میانگین درصد بقای سلولی ±خطای استاندارد پس از سه بار تکرار می‌باشند.

MCF7 می‌باشد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، دوز نوری مورد نیاز برای مرگ بیش از ۵۰ درصد از سلول‌های MCF7 در غلظت ۳۲ میکرومولار از دارو، ۶۰ ژول بر سانتی‌متر مربع تعیین شده و این در حالی است که برای رسیدن به چنین نتیجه‌ای در غلظت ۱۰۰ میکرومولار، ۳۰ ژول بر سانتی‌متر مربع نوردهی کفایت کرده است. این نتیجه بیانگر تأثیر وابستگی غلظت دارو با دوز نوردهی بر بقای سلولی است.

موضوع دوم مورد بررسی، اثر نور در دوزهای مختلف بوده که نتایج آن در شکل ۵ برای هر دو رده سلولی نشان داده شده است. با توجه به این داده‌ها می‌توان مشاهده کرد که نور نیز به تنهایی تأثیر معنی‌داری بر درصد بقای هیچ یک از رده‌های سلولی نداشته است. شکل ۶ نشان‌دهنده اثرات نور غیرهمدوس با شار انرژی ۳۰، ۶۰ و ۱۰۸ ژول بر سانتی‌متر مربع در حضور ایندوسیانین گرین با غلظت‌های مختلف بر بقای سلول‌های



شکل ۷. تغییرات درصد بقای سلولی DFW در دوزهای نوری مختلف و طول موج ۷۳۰ نانومتر مدت زمان انکوباسیون ۲۴ ساعت و داده‌ها بیانگر میانگین درصد بقای سلولی بخطای استاندارد پس از سه بار تکرار می‌باشند.



شکل ۸. تغییرات درصد بقای سلولی با دوز پرتو روی رده‌های سلولی DFW و MCF7

سلول‌ها می‌باشند و این در حالی است که در مقایسه با گروه کنترل هیچ کدام از عوامل یاد شده به تنهایی تأثیری بر بقای سلول نداشته‌است. با توجه به این نتایج دوز نوری مورد نیاز برای مرگ بیش از نیمی از سلول‌های DFW نیز ۳۰ ژول بر سانتی‌متر مربع تعیین شده‌است.

با توجه به شکل ۵ بدون حضور ایندوسیانین گرین تابش نور با شار انرژی ۳۰، ۶۰ و ۱۰۸ ژول بر سانتی‌متر مربع تأثیر

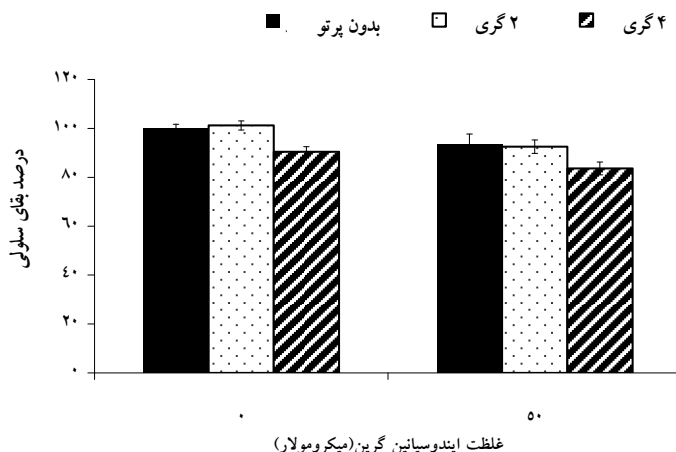
در هر دو رده سلولی در غلظت‌های مورد استفاده از ایندوسیانین گرین تفاوت معنی‌داری بین گروه‌هایی که دوز نوری گوناگون دریافت کرده‌اند، دیده می‌شود. ($P \leq 0.004$)

شکل ۷ نیز بیانگر تأثیر همیاری دارو با نور روی درصد بقای سلول‌های DFW می‌باشد. بار دیگر دیده می‌شود که غلظت حساس‌کننده و دوز نور دو عامل مؤثر در مرگ

۴، ۶ و ۸ گری پرتوی ایکس در دو رده سلولی MCF7 و DFW که در شکل ۸ گزارش شده بررسی می‌شود. بر اساس این یافته‌ها دوز پرتوی مورد نیاز برای کشتن نیمی از سلول‌ها (LD₅₀) در رده سلولی MCF7 بیش از ۸ گری و برای رده‌ی DFW، ۸ گری می‌باشد.

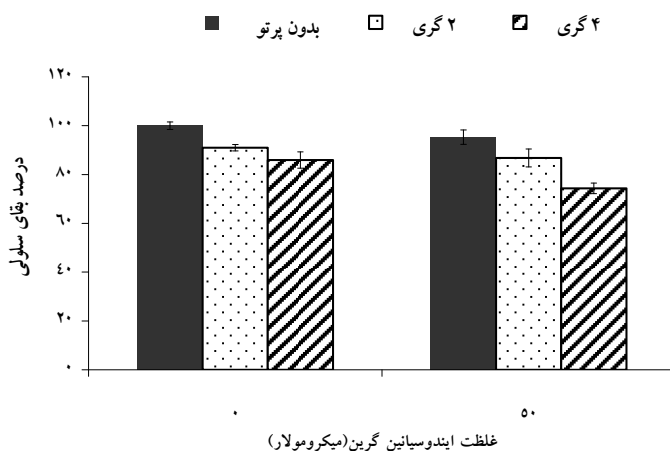
معنی‌داری بر بقای سلولی نداشته‌است. در حالی که همیاری ایندوسیانین گرین و انرژی نورانی موجبات مرگ سلولی را فراهم کرده است. در واقع ترکیب نور و ایندوسیانین گرین می‌تواند برای رده‌های سلولی مورد مطالعه، مخرب و مهاجم محسوب شود.

در ادامه نتایج حاصل از پرتودهی سلول‌ها با دوزهای ۲،



شکل ۹. تغییرات درصد بقای سلولی MCF7 در دوزهای پرتوی مختلف

زمان انکوباسیون با ایندوسیانین گرین ۲۴ ساعت و داده‌ها میانگین \pm خطای استاندارد پس از سه بار تکرار می‌باشند.



شکل ۱۰. تغییرات درصد بقای سلولی DFW در دوزهای پرتوی مختلف

زمان انکوباسیون با ایندوسیانین گرین ۲۴ ساعت و داده‌ها میانگین \pm خطای استاندارد پس از سه بار تکرار می‌باشند.

بهینه‌سازی درمان‌های فتوداینامیک و طراحی درمان‌های ترکیبی آن با سایر شیوه‌ها نظیر شیمی‌درمانی بتواند دوز مورد نیاز داروهای سمی را در این درمان‌ها کاهش داده و با بروز همبازی یا آثار افزایشنده در شیمی‌درمانی موجبات کاهش عوارض جانبی داروها را فراهم آورد (۱۳).

در این مطالعه نشان داده شد که ایندوسیانین گرین حتی در غلظت‌های پایین نظیر ۵۰ میکرومولار، می‌تواند ماده حساس‌کننده نوری قابل توجهی در درمان فتوداینامیک به نور غیرهمدوس با قله جذب ۷۳۰ نانومتر باشد. با توجه به نتایج حاصله می‌توان گفت تقریباً سه برابر شدن دوز ایندوسیانین گرین توانسته‌است دوز نوری مورد نیاز برای کشتن نیمی از سلول‌ها را به نصف کاهش دهد. همچنین در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار با دوز نوری ۱۰۸ ژول بر سانتی‌متر مربع بقای سلولی نزدیک به صفر حاصل شده‌است. در مقایسه با مطالعات مشابه (۱۴) می‌توان نتیجه گرفت که درمان فتوداینامیک با استفاده از ایندوسیانین گرین می‌تواند به عنوان یک درمان مؤثر برای سرطان پستان و ملانوما مطرح شود. در مطالعه‌ای حاضر با وجود استفاده از غلظت‌های پایین‌تر و استفاده از نور غیرهمدوس با طول موج جذب ۷۳۰ نانومتر نسبت به مطالعه مشابه (۱۴) که بر روی سلول‌های ملانومای انسانی و موشی با استفاده از رنگ‌داروی ایندوسیانین گرین و لیزر انجام شده‌است، دیده می‌شود که نتایج هر دو مطالعه بیانگر حساسیت نوری ایندوسیانین گرین می‌باشد که این نشان‌دهنده تحریک مناسب رنگ‌داروی ایندوسیانین گرین در طول موج ۷۳۰ نانومتر می‌باشد.

البته برای تجویز یک پروتکل درمانی مناسب در این زمینه مطالعات درون تنی روی تومورهای انسانی مورد نیاز است. از آنجا که در تاریکی، سمیتی حتی در غلظت‌های

شکل‌های ۹ و ۱۰ داده‌های حاصل از پرتودهی سلول‌های انکوبه شده با ایندوسیانین گرین را با اشعه ایکس نشان می‌دهد. از آنجا که تفاوت معنی‌داری در بقای سلولی بین گروه‌های دریافت‌کننده ایندوسیانین گرین و پرتو با گروه‌هایی که تنها پرتودهی شده‌اند، در هیچیک از رده‌های سلولی دیده نمی‌شود ($P \geq 0.007$)، به نظر نمی‌رسد ایندوسیانین گرین بتواند در زمره مواد حساس‌کننده به پرتو قرار گیرد.

بحث

درمان فتوداینامیک که متکی بر تجمع مولکول‌های حساس به نور در سلول‌های سرطانی و تابش نور با طول موج مناسب به آنها می‌باشد، در اثر ایجاد اکسیژن یگانه و رادیکال‌های آزاد باعث از بین رفتن بافت‌ها و سلول‌های سرطانی می‌شود. یافتن حساس‌کننده‌های با حداقل سمیت سلولی در تاریکی و طول موج حساس‌سازی در ناحیه ۶۵۰-۸۵۰، از جمله راه‌های کاهش عوارض جانبی و افزایش عمق درمان‌های فتوداینامیک است. با توجه به وقوع پدیده فوتوبلیچینگ در شدت‌های بالای نوردهی، تابش نور در دانسیته و توان کمتر می‌تواند پاسخ درمانی مناسب‌تری فراهم نماید. از طرف دیگر استفاده از منابع لیزری نظیر دای‌لیزر، لیزر بخار مس و آرایه‌های دیودی توانسته‌است عمق نکرور مشابهی با نور فیلترشده لامپ‌ها ببار آورد (۱۲). شاید بتوان یکی از مزایای عمده درمان فتوداینامیک را موضعی بودن درمان و رسیدن کمترین آسیب ممکن به سلول‌های سالم و طبیعی بیان کرد. این در حالی است که در روش‌های تهاجمی معمول برای درمان سرطان علاوه بر سلول‌های سرطانی به سلول‌های سالم نیز آسیب قابل ملاحظه‌ای وارد می‌شود. امید می‌رود توسعه و

می‌باشد (۱۵).

ایندوسیاین‌گرین در غلظت‌ها و دوزهای پرتوی به کار گرفته شده در این تحقیق پس از پرتوگیری نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری نشان نداده‌است. هم‌چنین حضور ایندوسیاین‌گرین ضمن پرتودهی اثر افتراقی نسبت به گروهی که دارو دریافت نکرده ایجاد نموده‌است. بنابراین می‌تواند بیانگر عدم حساسیت پرتوی ایندوسیاین‌گرین باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد که هزینه انجام این تحقیق را فراهم نمودند تشکر و سپاسگزاری نمایند. هم‌چنین از همکاری‌های صمیمانه آقای دکتر سمیعی دانشجوی دستیاری تخصصی ایمونولوژی، خانم عباسی کارشناس آزمایشگاه و آقای لایق کارشناس ارشد فیزیک پزشکی و کارکنان محترم بخش پرتو درمانی بیمارستان امید مشهد قدردانی می‌شود.

بالای ایندوسیاین‌گرین مشاهده نشده‌است، شاید بتوان از این دارو و طول موج جذب ۷۳۰ نانومتر آن برای درمان‌های سطحی و سرطان‌های متاستاتیک با استفاده از لامپ‌های غیرهمدوس که منطقه وسیعی را تحت تابش قرار می‌دهند، بهره‌برداری نمود. به‌ویژه سمی نبودن ایندوسیاین‌گرین در غیاب نور آن را به عنوان یک حساس‌کننده نوری ایده‌آل در درمان برخی بیماری‌های چشمی مطرح می‌سازد (۱۱). هم‌چنین طول موج جذب آن در ناحیه فروسرخ این امکان را فراهم می‌سازد که در درمان بدخیمی‌های نسبتاً عمقی نیز مورد استفاده واقع شود.

با توجه به پرتودهی سلول‌ها به طور جداگانه بدون حضور ایندوسیاین‌گرین و LD50 مورد نیاز برای هر سلول به‌نظر می‌رسد رده سلولی MCF7 در مقایسه با DFW در برابر دوزهای بالای پرتوهای ایکس از مقاومت پرتوی بیشتری برخوردار است. در مطالعه‌ای که بر روی سلول‌های پروستات انجام شده‌است، اثر حساس به پرتو بودن ایندوسیاین‌گرین مورد بررسی قرار گرفته است که نتایج حاصل از آن نیز مشابه نتایج به‌دست آمده از این تحقیق

Photosensitivity and Radiosensitivity of Indocyanine Green on Human Cell Lines MCF7 and DFW

Sazgarnia A., Ph.D.¹, Bahreini Toosi S.M.H., Ph.D.², Montazerabadi A.R., M.Sc.^{*3}, Al.Davood S.A., Ph.D.⁴,
Esmaeili H.A., Ph.D.⁵

1. Assistant Professor of Medical Physics, Medical Physics Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
2. Professor of Medical Physics, Medical Physics Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
3. Instructor of Medical Physics, School of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
4. Assistant Professor of Radiotherapy, Cancer Research Center, Omid Hospital, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
5. Assistant Professor of Biostatistics, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

* Corresponding author, e-mail: a.abadi@kmu.ac.ir

(Received 30 Oct. 2008 Accepted 13 May 2009)

Abstract

Background & Aims: In this study with the aim of benefiting from non-laser sources in photodynamic therapy, photo and radio sensitivity of indocyanine green as a sensitizer in photodynamic and radiation therapies were investigated.

Methods: Based on the broad absorption peak of indocyanine green and using non-coherent light, the experiments were performed on human cells derived from breast cancer and melanoma. To investigate chemical, optical and radiational cytotoxicity and also photosensitivity and radiosensitivity of indocyanine green, different dozes of this material were examined. After 24 h of incubation of cells with indocyanine green, independent treatment groups were exposed to 730 ± 20 nm light with power densities of 30, 60, and 108 J/cm^2 and 100 kV_p x-ray (2 and 4 Gy). The effect of therapy on cells was determined by MTT test.

Results: Indocyanine green showed no significant cytotoxicity. It had a good efficiency for photodynamic therapy using non-coherent sources in the wavelength of 730 ± 20 nm, and the efficiency of treatment was dependent on the dosage of light. No significant relation between indocyanine green and radiation was observed.

Conclusion: According to the findings, indocyanine green can be used as a photosensitizer in the range of 730 ± 20 nm. Since there was no significant difference between groups which received both radiation and drug and those which received only radiation, indocyanine green cannot be considered as a radiosensitizer.

Keywords: Photodynamic therapy, Breast Neoplasms, Melanoma, Indocyanine Green, Radio sensitivity
Non-coherent

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2009; 16(4): 319-331

References

1. Cheah PS, Ling KH, Crouse KA, Rosli R. Characterization of the S-benzylidithiocarbamate effects on cell proliferation and oncogene expression in human breast cancer cells. *J Med Biol Sci* 2007; 1: 1-7.
2. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. 1998;

- 351: 1451-67.
3. Lavz S. Causes, diagnosis and ways to prevent breast cancer. Farsi translation by Nazeri T, Tehran, Peyman publication, 1998. [In Persian]
 4. Melanoma. 2008. Available at: <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/melanoma>. Accessed Apr. 3rd 2008.
 5. Taber S.W, Fingar V.H, Wieman T.J. Photodynamic therapy for palliation of chest wall recurrence in patients with breast cancer. *J Surg Oncol* 1998; 68(4): 209-14.
 6. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *Photochem Photobiol B* 1997; 39(1): 1-18.
 7. Sazgarnia A, Khoie A, Behreyni M.H., Mahmoudi M, Faizi R. *In Vitro* and *In Vivo* studies on enhanced effects of electrical pulses in photodynamic therapy with 5ALA. *J Med Phys* 2006; 3(11): 37-51 [In Persian].
 8. Brooks SC, Locke ER, Soule HD. Estrogen receptor in human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. *J Biol Chem* 1973; 248(17): 6251-3.
 9. Cell Line Collections. Available at: <http://ncbi.pasteur.ac.ir/Collections.htm> Accessed Apr. 3rd 2008.
 10. LumaCare company publication. Catalogue of LumaCare system, 2002.
 11. Sawa M, Awazu K, Takahashi T, Sakaguchi H, Horiike H, Ohji M, et al. Application of femtosecond ultrashort pulse laser to photodynamic therapy mediated by indocyanine green. *Br J Ophthalmol* 2004; 88(6): 826-31.
 12. Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbek M, et al. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 1998, 90(12): 889-905.
 13. Crescenzi E, Chiaviello A, Canti G, Reddi E, Veneziani BM, Palumbo G. Low doses of cisplatin or gemcitabine plus Photofrin/photodynamic therapy: Disjointed cell cycle phase-related activity accounts for synergistic outcome in metastatic non-small cell lung cancer cells (H1299). *Mol Cancer Ther* 2006; 5(3): 776-85.
 14. Urbanska K, Romanowska-Dixon B, Matuszak Z, Oszajca J, Nowak-Sliwinski P, Stochel G. Indocyanine green as a prospective sensitizer for photodynamic therapy of melanomas. *Acta Biochim Pol* 2002; 49(2): 387-91.
 15. Colasanti A, Kisslinger A, Quarto M, Riccio P. Combined effects of radiotherapy and photodynamic therapy on an in vitro human prostate model. *Acta Biochim Pol* 2004; 51(4): 1039-46.