

تهیه نانولیپوزوم پلیمری حاوی داروی حساس کننده نوری متیلن بلو و ارزیابی پایداری، توزیع زیست‌شناختی و رهاسازی دارو با تابش امواج فراصوتی یک مگاهرتز

علی ابراهیمی نیا^۱، منیژه مختاری دیزجی^{۲*}، طیبه تولیت^۳

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
 ۲- استاد، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
 ۳- دانشیار، گروه داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه فیزیک پزشکی
 Email: mokhtarm@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۱/۰۴/۱۸

دریافت مقاله: ۹۱/۰۲/۰۹

چکیده

هدف: در این مطالعه استفاده از لیپوزوم پلیمری برای کپسوله کردن دارو و رهاسازی داروی متیلن بلو به دنبال تابش امواج فراصوتی ارزیابی شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه متیلن بلو داخل نانولیپوزوم پلیمری قرار داده شد و توزیع ذرات به روش تفرق دینامیکی نور بررسی شد. پس از بررسی میزان کپسوله شدن دارو و پایداری نانوذرات به روش فلورومتری، توزیع زیست‌شناختی دارو در بافت‌های موش با تومور آدنوکارسینوما برآورد شد. همچنین میزان رهاسازی دارو به دنبال تابش امواج فراصوتی ۱ مگاهرتز و با شدت ۲ وات بر سانتی‌متر مربع به روش فلورومتری ارزیابی شد.

نتایج: نتایج اندازه‌گیری نشان داد که قطر نانوذرات ساخته شده در حدود $66/19 \pm 4/49$ نانومتر قرار دارد و میزان داروی محبوس شده در آن $65/21 \pm 3/47$ درصد است. همچنین پایداری نانوذره محتوی دارو با گذشت زمان کاهش می‌یابد. نتایج توزیع زیست‌شناختی نشان داد که میزان داروی استخراج شده از تومور در گروه تزریق داروی محبوس شده در لیپوزوم از تزریق داروی محلول آزاد به طور معنی‌داری بیشتر است ($P < 0/05$). همچنین میزان تجمع داروی محبوس شده لیپوزومی در قلب به طور معنی‌داری کمتر از تزریق داروی آزاد محلول بود ($P < 0/05$). با تابش امواج فراصوتی به مدت ۵ دقیقه، میزان رهایش دارو از نانوذرات $51/8 \pm 8/3$ به دست آمد.

نتیجه‌گیری: نانوذرات پلیمری ساخته شده برای کپسوله کردن داروی حساس کننده متیلن بلو مناسب است. با تابش امواج فراصوتی تک فرکانس ۱ مگاهرتز، توانایی رهایش دارو افزایش می‌یابد.

کلیدواژگان: نانوحامل، حساس کننده، متیلن بلو، امواج فراصوت

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۵، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱، صفحات: ۱۱-۲۲

مقدمه

جراحی، رادیوتراپی و شیمی‌درمانی است که برای بسیاری از تومورهای عود کننده به دلیل عوارض جانبی قابل انجام نیست یا هزینه‌های بسیاری در پی دارد. همچنین در بیماران سالخورده

یکی از شایع‌ترین علت مرگ و میر در جوامع انسانی، سرطان است. درمان سرطان با روش‌های رایج کنونی شامل

زیست‌شناختی دارو توسط آنزیم‌ها اشاره کرد [۷، ۱۰]. در سال‌های اخیر با پیشرفت نانو تکنولوژی، نانوحامل‌ها به عنوان یک ابزار مناسب برای کپسوله کردن و تحویل دارو در فرآیند فتودینامیک درمانی، مورد توجه قرار گرفته‌است. نانوحامل‌ها، داروها را از تخریب آنزیمی حفظ کرده و آثار جانبی آن را نسبت به تزریق سیستمیک دارو کاهش می‌دهد [۱۱، ۱۲]. از بین سیستم‌های تحویل دارو، نانوذرات لیپوزومی بر پایه ترکیبات پلیمری به عنوان یک ابزار غیر سمی و غیر ایمونولوژیک مطرح است. به علاوه نانوحامل‌های پلیمری قابلیت باز شدن و رها سازی دارو با تابش امواج فراصوتی را دارد [۱۳، ۱۴]؛ بنابراین یک روش بالقوه برای افزایش کارایی حساس کننده‌هایی مانند متیلن بلو، کپسوله کردن آن‌ها در حامل‌های دارویی مانند نانوذرات است. برای رها سازی دارو از نانوذرات روش‌های مختلفی وجود دارد که یکی از آن‌ها تابش امواج فراصوتی است. به دنبال تابش امواج فراصوتی، حفره‌های صوتی ناپایدار (Inertial Acoustic Cavitation) در محیط تولید می‌شود که با فرآیند فروپاشی حفره‌ها (Collapse)، دما و فشار بالایی به طور موضعی ایجاد می‌شود. این پدیده می‌تواند باعث انتقال انرژی به نانوحامل‌های دارو شده و با باز شدن آن‌ها، دارو به طور کاملاً موضعی در اختیار ناحیه مورد درمان قرار می‌گیرد [۱۵]. تابش امواج فراصوتی برای رها سازی دارو دارای مزایایی است که از آن جمله می‌توان خصوصیت غیرتهاجمی آن و امکان نفوذ عمقی را نام برد [۱۶].

با توجه به قابلیت نانوذرات لیپوزومی برای حمل داروها و نیز رها سازی انتخابی و موضعی دارو تحت تابش امواج فراصوت، در مطالعه حاضر ابتدا نانوذرات لیپوزومی حامل داروی حساس کننده متیلن بلو تهیه می‌شود. پس از بررسی ابعاد، زمان پایداری، میزان بارگذاری داروی متیلن بلو در نانوذره پلیمری و توزیع زیست‌شناختی، امکان رها سازی دارو در محیط آبی تحت تابش امواج فراصوتی یک مگاهرتز و شدت ۲ وات بر سانتی متر مربع مطالعه و بررسی قرار می‌گیرد. هدف نهایی بررسی امکان رهایی دارو از نانوحامل‌ها تحت فرآیند حفره سازی و بررسی تجمع داروی کپسوله شده در

نیز اغلب روش جراحی مقدور نبوده و درمان آن‌ها بیشتر جنبه تسکینی دارد؛ بنابراین امروزه درمان‌های غیرتهاجمی و هدفمند، مانند فتودینامیک درمانی (Photodynamic Therapy) به طور فزاینده‌ای افزایش یافته‌است. این روش درمانی از جمله روش‌های دینامیکی درمان با حضور حساس کننده‌های نوری است که با تحریک فتوشیمیایی حساس کننده انجام می‌پذیرد [۱، ۲]. در فرآیند درمان غیرتهاجمی فتودینامیک درمانی، از آنجایی که حساس کننده‌های نوری در شرایط فاقد نور بی‌ضرر است، می‌توان از پرتوی نوری کانونی شده روی تومور استفاده کرد که موجب نابودی انتخابی بافت‌های بدخیم بدون تأثیر منفی بر بافت سالم می‌شود [۳، ۴]. در فتودینامیک درمانی پس از ورود داروی حساس کننده به بدن و تجمع در ناحیه بافت تومور، ناحیه مورد نظر تحت تابش نور مرئی با طول موج مناسب قرار می‌گیرد و به دنبال تحریک نوری ماده حساس کننده و تولید رادیکال‌های آزاد، مرگ سلولی آغاز می‌شود [۱، ۵]. مکانیسم مرگ سلولی در فتودینامیک درمانی شامل آسیب مستقیم به سلول‌های توموری، تخریب شبکه عروقی تومور که موجب عوارض هایپوکسیک (Hypoxic Effect) و پیشرفت نکروز (Necrosis) در تومور خواهد شد و فعال کردن پاسخ ایمنی است [۶]. یک حساس کننده ایده‌آل باید برخی ویژگی‌ها از قبیل خلوص شیمیایی، تمرکز انتخابی در تومور، سمیت کم در شرایط عدم حضور نور، دفع سریع از بدن، فعالیت فتوشیمیایی بالا و قابلیت تحریک در طول موج‌های بلند نوری را دارا باشد. هر چند تاکنون حساس کننده ایده‌آل ساخته نشده است و مطالعات در این زمینه در حال انجام است [۷]؛ اما در بین حساس کننده‌های نوری متیلن بلو (Methylene Blue) به طور وسیعی در فتودینامیک درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرد. تولید رادیکال‌های فعال اکسیژنی، قابلیت تحریک نوری، سمیت کم و ارزان بودن آن باعث شده است که انتخاب مناسبی برای فتودینامیک درمانی باشد [۸، ۹]. با وجود مزایای حساس کننده متیلن بلو، استفاده بالینی از آن دارای محدودیت‌هایی است که از آن جمله می‌توان به عدم آثار درمانی مناسب به دنبال تزریق سیستمیک دارو به دلیل تخریب

تومور است. در این مطالعه زمان تابش فراصوتی در محدوده زیر هایپرترمی (Hyperthermia) خواهد بود.

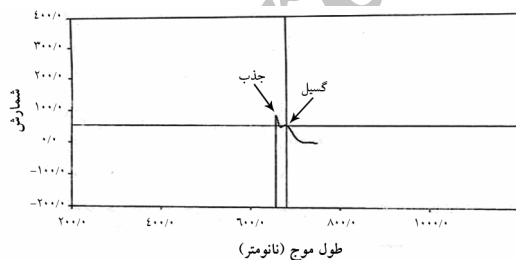
مواد و روش‌ها

برای ساخت نانوحامل‌های پلیمری محتوی حساس کننده نوری، مواد متیلن بلو، پلورونیک F68 (Pluronic F68)، کلسترو و روغن نارگیل از شرکت Sigma-Aldrich (آمریکا)، لیپوید از شرکت Avanti polar Lipids (آمریکا)، کلروفرم و متانل از شرکت Merck (آلمان) و پرفلوروکربن از شرکت Acros Organics (آمریکا) تهیه شد. در مطالعه حاضر برای تهیه نانو لیپوزوم حاوی متیلن بلو از روش هیدراته کردن لایه نازک لیپیدی استفاده شد [۱۷]. ابتدا پلورونیک F68 (۰/۸ درصد)، لیپوید (۲/۸ درصد) و کلسترو (۱/۲ درصد) در حلالی شامل کلروفرم و متانل (به نسبت ۱:۲) حل شد. مجموعه در یک بالن ته گرد به دستگاه روتاری (Buchi, Rotavapor R-124) (سوئیس) متصل شد تا حلال تبخیر شود و فیلم لیپیدی در کف ظرف تشکیل شود. در ادامه فیلم لیپیدی با افزودن ۱۰ میلی‌لیتر محلول متیلن بلو (۰/۱ درصد) هیدراته شده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه

تحت امواج فراصوتی (Sonication) (Hielscher, UP400S,) (آلمان) قرار گرفت. به دنبال آن روغن نارگیل (۱/۸ درصد) و پرفلوروکربن (۱۶/۰ درصد) به آن اضافه شد و یکنواخت کردن (Heidolph, DIAX100) (آلمان) محلول به مدت ۱۵ دقیقه صورت گرفت. در نهایت امواج فراصوتی محلول مجدداً روی آن به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. برای تعیین محدوده ابعاد نانوذرات لیپوزومی و نحوه توزیع آن‌ها از روش تفرق دینامیکی نور (Dynamic Light Scattering: DLS) از دستگاه Zetasizer (Malvern Instruments Ltd) (آمریکا) استفاده شد.

برای تعیین مقدار بارگذاری دارو در لیپوزوم‌های تهیه شده، از روش فلورومتری (Fluorometry) استفاده شد. برای این کار نمونه‌ها در سیستم اسپکتروفلورومتر (Shimadzu, RF-1500) (ژاپن) قرار داده شد و با تنظیم طول موج جذب در ناحیه ۶۵۰ نانومتر و طول موج گسیل در ۶۸۰ نانومتر، میزان نشر داری خارج از نانوذره، نشر فلورسانس کلی (با لیز کردن لیپوزم توسط تریتون ۱۰ درصد) و همچنین نشر زمینه اندازه‌گیری شد (نمودار ۱). با توجه به نشر فلورسانس متیلن بلو درصد داری محبوس در نانوحامل‌ها از رابطه زیر برآورد شد:

$$(۱): \text{داری محبوس (درصد)} = [(FI_{\text{encap}} - FI_{\text{back}}) / (FI_{\text{total}} - FI_{\text{back}})] \times 100$$



نمودار ۱ نمونه‌ای از طیف نشری متیلن بلو که توسط سیستم اسپکتروفلورومتر (Shimadzu, RF-1500) (ژاپن) ثبت شده است. طول موج جذب در ناحیه ۶۵۰ نانومتر تنظیم و طول موج گسیل در ۶۸۰ نانومتر آشکار شده است که معرف میزان نشر دارو متیلن بلوی خارج از نانوذره است.

در این رابطه FI_{encap} مقدار فلورسانس داری متیلن بلو داخل نانوذره بر حسب شمارش (Count)، FI_{total} مقدار فلورسانس متیلن بلو در محیط پس از لیز کردن نانوذره حاوی دارو و FI_{back} میزان فلورسانس زمینه است. به دنبال ساخت نانوذرات محتوی دارو، الگوی پایداری نانوذرات ساخته شده به روش فلوریمتری به مدت یک ماه و در فواصل ۵ روز بررسی شد. برای این منظور میزان داری محبوس (Encapsulation) در نانوذرات در فواصل زمانی مشخص طبق رابطه (۱) محاسبه شد. کاهش میزان داری محبوس، نشان دهنده نشت آن از نانوذره و کاهش پایداری نانوذره است.

رها سازی داروی حساس کننده نوری متیلن بلو از نانولیپوزوم پلیمری با تابش امواج فراصوتی یک مگاهرتز

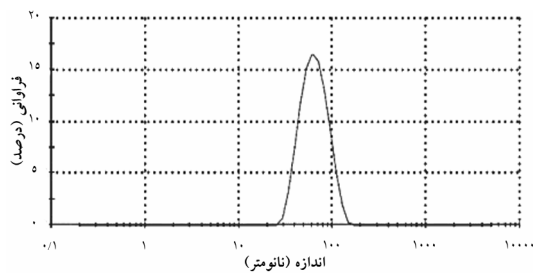
بافتی تهیه و میزان غلظت دارو در بافت‌های هر حیوان اندازه‌گیری شد. برای بررسی مدت زمان تابش امواج فراصوتی ۱ مگاهرتز در زیر حد هایپرترمی، تعداد ۳ سر موش حامل تومور (قطر ۸-۱۰ میلی‌متر) در محفظه مخصوص تابش‌دهی [۲۱] قرار داده شدند و با استفاده از ترمومتر دیجیتال دو کاناله (CHY/502A, Centenary Materials) (تایوان) قابل اتصال به کامپیوتر و با دقت ± 0.1 درجه سانتی‌گراد، دما پایش شد. یکی از ترموکوپل‌ها در داخل تومور و دیگری در محیط آبی اطراف بدن موش قرار داده شد. هر حیوان به مدت ۲۰ دقیقه تحت تابش منبع فراصوتی ۱ مگاهرتز (Sonopuls 492, Enrof Nonius Co. (هلند) در شرایط تابش‌دهی پیوسته، با شدت متوسط فضایی- زمانی ۲ وات بر سانتی‌متر مربع و با سطح تابش مؤثر ۵ سانتی‌متر مربع قرار گرفت. کالیبراسیون (Calibration) با دستگاه صداسنج پیستونی (Hydrophone, PA124, 25mm diameter, 20kHz-1MHz, Precision Acoustics Ltd (آمریکا) که در فاصله ۱ سانتی‌متری در مقابل پروب (Probe) قرار داده شد، انجام گرفت. برای پایداری سیگنال (Signal) خروجی، صداسنج به مدت یک ساعت درون محفظه آب قرار گرفت. صداسنج به یک اسیلوسکوپ دیجیتال (Digital Oscilloscope) و اسپکتروم آنالایزر (Spectrum Analyzer) متصل شد. ابتدا سیگنال زمینه در شرایط عدم تابش فراصوتی توسط هیدروفون اندازه‌گیری شد. سیگنال‌های ثبت شده حاصل از تابش فراصوت ۱ مگاهرتز است. هر سیگنال از ۳۲۷۶۸ نقطه اطلاعات که در فرکانس نمونه‌برداری حداقل ۲/۵ مگاهرتز و حداکثر ۱۰ مگاهرتز ثبت شده، تشکیل شده است. سیگنال‌های ثبت شده برای استخراج محتوای فرکانسی با استفاده از آنالیز تبدیل فوریه (Fourier Transform) در نرم‌افزار Matlab تجزیه و تحلیل شد. ثبت سیگنال در شرایط مختلف تابش‌دهی در میدان فراصوتی ۱ مگاهرتز در حالت پیوسته و در شدت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ وات بر سانتی‌متر مربع به منظور بررسی تأثیر تغییر شدت صوتی در تغییر دامنه سیگنال صورت

برای بررسی توزیع زیست‌شناختی حساس کننده متیلن بلو، ابتدا موش‌های ماده مدل BALB/c با سن ۵-۷ هفته از مؤسسه پاستور تهران خریداری شد. طی مدت نگهداری حیوانات، تغذیه، آب، فضای نگهداری، دما و سایر پارامترهای نگهداری براساس توصیه‌های مرجع نگهداری از حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد. حدود ۲-۳ میلی‌متر مکعب از بافت تومور آدنوکارسینومای پستان (Breast Adenocarcinoma) به روش کاشت در زیر پوست موش‌های گیرنده (در ناحیه شکم) و در شرایط بیهوشی پیوند شد. در ادامه پس از رسیدن قطر تومورها به ۸-۱۰ میلی‌متر، بررسی توزیع زیست‌شناختی داروی محلول و کپسوله شده در بافت‌های موش انجام شد. برای این منظور تعداد ۶ سر موش حامل تومور به دو گروه تزریق داروی متیلن بلو محلول و تزریق نانوذره محتوی دارو تقسیم شدند. با توجه به سینتیک دارو و الگوی تجمع آن در بافت [۱۸، ۱۹]، حیوان‌ها ۳ ساعت پس از تزریق ۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم دارو، کشته شدند و بافت‌های مورد نظر آن‌ها (به دلیل جذب بالا) که شامل تومور، قلب، خون، طحال، کبد و کلیه بود، استخراج شد. اندازه‌گیری میزان دارو در بافت به روش استخراج جفت یونی (Ion-pair Extraction) صورت گرفت [۲۰]. برای این کار ابتدا ۲ میلی‌لیتر آب مقطر به بافت‌ها اضافه شد و سپس بافت‌ها به وسیله دستگاه همزن (IKA, T25 Digital, Ultra-Turrax (آلمان)، به مدت ۲ دقیقه (۲۰۰۰ دور در دقیقه) یکنواخت شد. به دنبال آن مقدار ۱ میلی‌لیتر محلول هگزان سولفونات سدیم (Sodium hexanesulfonate) (Merck، آلمان) و ۲ میلی‌لیتر محلول دی کلرواتان (1,2-dichloroethane) (Merck) (آلمان) به آن اضافه و سپس ترکیب حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با ۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ (Hettich) (آلمان) شد. در نهایت فاز آلی عصاره بافتی استخراج و میزان جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر (Optizen 2120 UV Plus Spectrometer, Mecasys Co Ltd (کره) در طول موج ۶۵۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. ابتدا منحنی استاندارد دارو در بافت‌های مختلف و سپس با اندازه‌گیری میزان جذب در فاز آلی، عصاره

مقایسه نتایج استفاده شد. تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ (آمریکا) انجام شد.

نتایج

پس از ساخت نانولیپوزوم پلیمری با روش ذکر شده، اندازه ذرات توسط سیستم تفرق دینامیکی نور اندازه‌گیری شد. نمودار ۲ فراوانی نانوذرات محتوی دارو بر حسب اندازه آن‌ها را با سیستم تفرق نور (DLS) نشان می‌دهد. در این نمودار محور افقی نشان دهنده قطر نانوذرات محتوی دارو و محور عمودی فراوانی آن‌ها بر حسب درصد است. همان‌طور که در نمودار مشخص است، حداکثر فراوانی نانوذرات محتوی دارو در ابعاد حدود ۶۰ نانومتر قرار دارد. میانگین و انحراف معیار اندازه نانو ذرات با روش فوق روی سه سری نمونه ساخته شده $66/19 \pm 4/49$ نانومتر به دست آمد.



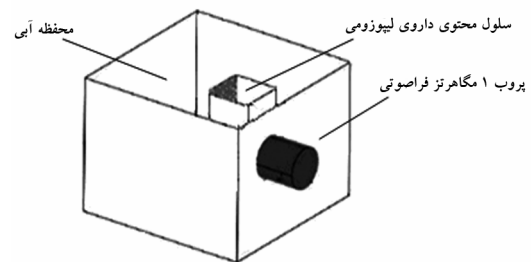
نمودار ۲ هیستوگرام فراوانی نانوذرات محتوی دارو (درصد) بر حسب اندازه آن‌ها (نانومتر) با روش تفرق دینامیکی نور

نتایج فلورومتری حاصل از سه بار اندازه‌گیری مستقل نانوحامل‌های لیپوزومی محتوی دارو نشان داد که میزان احتباس دارو در داخل لیپوزوم حدود $65/21 \pm 3/47$ درصد است. با توجه به این‌که داروی متیلن بلو محلول در آب بوده و متوسط قطر ذرات زیر ۱۰۰ نانومتر برآورد شد، بنابراین میزان محبوس شدن دارو در حد مطلوبی قرار دارد.

پس از بررسی اندازه نانوذرات و بارگذاری دارو، الگوی پایداری آن بررسی شد. به این منظور سه نمونه از نانوذره محتوی دارو در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و در

گرفت. دما در مرکز تومور و با فاصله ۱۰ میلی‌متر از سطح پروب با بازه زمانی هر ۱۵ ثانیه ثبت شد. هر اندازه‌گیری سه بار انجام شد و بدین ترتیب تغییرات دمایی در طول زمان تابش‌دهی فراصوتی اندازه‌گیری شد.

برای بررسی میزان رهائش داروی محبوس در نانوذره به دنبال تابش فراصوت، از روش فلورومتری استفاده شد. ابتدا محفظه‌ای از جنس پلی‌اکریلیک و به ابعاد $10 \times 15 \times 15$ سانتی‌متر مکعب ساخته شد. در یک وجه محفظه مکعبی سوراخ دایره‌ای به ابعاد قطر پروب فراصوتی ایجاد و پروب در آن محل ثابت شد. همچنین در مقابل محل ورودی پروب، سکویی برای قرارگیری سلول مکعبی (به حجم ۱۵ سی‌سی) حاوی داروی لیپوزومی تعبیه شد (شکل ۱). داخل محفظه قبل از تابش‌دهی تا ارتفاع معین از آب (۳۵ درجه سانتی‌گراد) پر شد. پس از ریختن داروی لیپوزومی به حجم ۱۵ سی‌سی به درون سلول مکعبی، تابش فراصوتی صورت گرفت. با خواندن میزان فلورسانس دارو در زمان قبل و بعد از تابش و همچنین اندازه‌گیری میزان گسیل تابش زمینه، درصد رهاسازی دارو به دنبال تابش امواج فراصوت محاسبه شد.



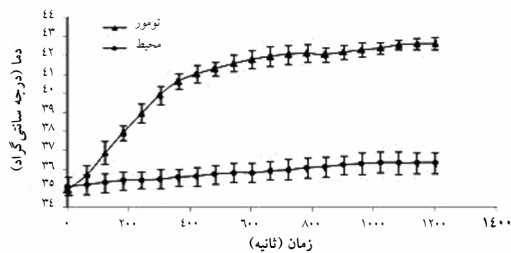
شکل ۱ نمای شماتیک سیستم تابش‌دهی فراصوتی داروی لیپوزومی

پس از سه بار اندازه‌گیری مستقل در تمام آزمایش‌ها، نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شد. به دنبال بررسی توزیع داده‌های حاصل با آزمون برازندگی کولموگروف-اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov Test) و اطمینان از نرمال (Normal) بودن داده‌ها از آزمون تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) با سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ برای

رها سازی داروی حساس کننده نوری متیلن بلو از نانولیپوزوم پلیمری با تابش امواج فراصوتی یک مگاهرتز

منحنی استاندارد مربوط به بافت‌های مختلف تهیه و سپس با استفاده از این منحنی‌ها، میزان داروی موجود در هر بافت اندازه‌گیری و نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار ارایه شد (نمودار ۴).

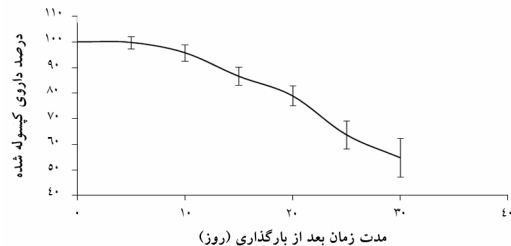
برای مقایسه میزان داروی استخراج شده از بافت، از آزمون تجزیه و تحلیل واریانس با سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. نتایج نشان داد که میزان داروی استخراج شده از تومور در گروه تزریق داروی لیپوزومی نسبت به گروه تزریق داروی محلول به طور معنی‌داری بیشتر است ($P < 0/05$). همچنین میزان تجمع داروی لیپوزومی در قلب به طور معنی‌داری کمتر از تزریق دارو به صورت محلول بود ($P < 0/05$) و در سایر بافت‌ها نیز اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد ($P > 0/05$). با توجه به نمودار ۴ ملاحظه می‌شود که تزریق دارو به شکل لیپوزومی، سبب افزایش ۲/۵ برابر برداشت دارو توسط بافت تومور می‌شود.



نمودار ۵ میانگین و انحراف معیار افزایش دمای تومور (Tumor) و محیط آبی اطراف حیوان (Environment) بر حسب درجه سانتی‌گراد در مدت ۲۰ دقیقه تابش دهی فراصوتی

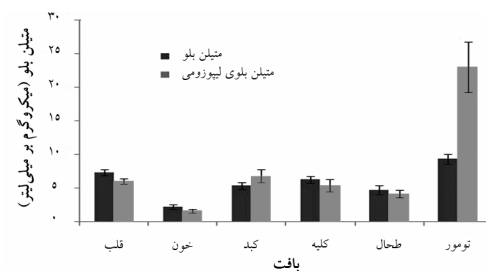
در نمودار ۵ پایش دمایی تومور و محیط آبی اطراف بدن موش بر حسب درجه سانتی‌گراد نشان داده شده است. از آنجایی که به‌کارگیری تابش فراصوتی پیوسته با فرکانس ۱ مگاهرتز و شدت ۲ وات بر سانتی‌متر مربع، توأم با تولید گرما می‌باشد و افزایش دما در حد هایپرترمی (بیش از ۴۱ درجه سانتی‌گراد) می‌تواند آثار زیست‌شناختی ناشی از هایپرترمی در سلول و بافت ایجاد کند [۲۲]، لذا انتخاب مدت زمان تابش فراصوتی برای بررسی میزان رها سازی دارو از نانوذرات، باید به

زمان‌های مختلف پس از ساخت، به مدت یک ماه پایداری آن به روش فلوریمتری بررسی شد. نتایج پایداری دارو در نمودار ۳ ارایه شده است.



نمودار ۳ نمودار پایداری نانولیپوزوم محتوی دارو با گذشت زمان تا یک ماه پس از ساخت

همان‌طور که در نمودار ۳ مشخص است پایداری نانوذره محتوی دارو با گذشت زمان کاهش می‌یابد، هر چند تا پنج روز پس از ساخته شدن پایدار می‌ماند. با توجه به الگوی پایداری، تزریق نانوذرات محتوی دارو به حیوان‌ها برای بررسی توزیع زیست‌شناختی دارو، در روز بعد از ساخته شدن نانوذرات انجام شد.



نمودار ۴ میانگین و انحراف معیار مقدار داروی متیلن بلو بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر استخراج شده از بافت‌های مورد بررسی حیوان‌های مورد آزمون با دو نوع تزریق داروی محلول متیلن بلو و داروی متیلن بلوی کپسوله شده

برای بررسی توزیع زیست‌شناختی داروی محلول متیلن بلو و داروی متیلن بلوی کپسوله شده (Liposomal Drug) در بافت‌های مختلف به دنبال استخراج فاز آلی عصاره بافتی، ابتدا

تغییری در رهاسازی دارو ملاحظه نشد (کمتر از ۱ درصد). نتایج نشان داد که نانوذرات پلیمری ساخته شده برای کپسوله کردن داروی حساس کننده متیلن بلو، قابلیت رهاسازی دارو به دنبال تابش فراصوتی را با سطح اطمینان بیش از ۹۵ درصد داراست.

بحث

فتودینامیک درمانی برای درمان انواع مختلف سرطان شامل پستان، پوست، پروستات و تخمدان استفاده شده است [۲۳]. در این روش درمانی بعد از جذب فوتون‌های نور، حساس کننده ابتدا به حالت برانگیخته منتقل می‌شود و در بازگشت به حالت پایه رادیکال‌های آزاد تولید می‌کند که بسیار فعال بوده و باعث اکسیداسیون سلول و نکروزه شدن آن می‌شود [۲۴]. حساس کننده‌ها ترکیباتی است که می‌تواند انرژی طول موج خاصی از نور را جذب کرده و آن را به انرژی مفید تبدیل نماید؛ از جمله آن‌ها می‌توان فوتوفرین (Photoferin)، فوسکان (Foscan)، مشتقات هماتوپورفیری (Hematoporphyrin)، مشتقات بنزوپورفیرین (Benzoporphyrin)، کلرین‌ها (Chlorines) و متیلن بلو را نام برد. نور لازم برای تحریک متیلن بلو دارای طول موج نسبتاً بلند بوده، همچنین این دارو دارای جذب انتخابی در میتوکندری سلول‌های کارسینوما است [۲۵] و برای درمان بیماری‌های لته و همچنین در بیماری‌های بدخیم از جمله کارسینومای بازال سل (Basal Cell Carcinoma)، سارکوما (Sarcoma) و ملانوما (Melanoma) در انسان استفاده شده است [۱۰]. توزیع حساس کننده‌های نوری اصولاً بر پایه ویژگی فیزیکوشیمیایی آن‌ها پایه‌گذاری شده که به نظر می‌رسد کاملاً در بافت هدف متمرکز نمی‌شوند و همچنین علاوه بر تخریب زیست‌شناختی توسط آنزیم‌ها، دارای آثار جانبی روی بافت‌های سالم هستند بنابراین برای بهبود کارایی و ایمنی در فتودینامیک درمانی، نانوذرات پلیمری با توجه به ظرفیت بالای بارگذاری دارو و انعطاف‌پذیری آن‌ها برای ذخیره حساس کننده‌های نوری با خصوصیات متفاوت به عنوان یک

گونه‌ای باشد که افزایش دمایی در زیر حد هاپیرترمی قرار گیرد. با توجه به نتایج به‌دست آمده، زمان تابش دهی برای رهاسازی دارو از نانوذرات، ۵ دقیقه انتخاب گردید تا رهاسازی دارو، تنها به اثرات غیر گرمایی امواج فراصوت محدود گردد. بررسی میزان رهایش داروی محبوس در نانوحامل‌ها در گروه‌های کنترل و تحت تابش انجام شد. گروه کنترل شامل نمونه‌هایی بود که فقط به مدت ۵ دقیقه در محیط آبی با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. نتایج فلورومتری حاصله از سه بار اندازه‌گیری مستقل، به صورت میانگین و انحراف معیار در جدول ۱ نشان داده شده است. درصد رهاسازی دارو به دنبال تابش فراصوتی از رابطه زیر به‌دست آمد:

$$100 \times \frac{(FI_{\text{after US}} - FI_{\text{before US}})}{(FI_{\text{total}} - FI_{\text{before US}})} = \text{رهاسازی (درصد)}$$

در این رابطه $FI_{\text{after US}}$ مقدار فلورسانس داروی متیلن بلوی آزاد شده پس از تابش فراصوتی برحسب شمارش، $FI_{\text{before US}}$ مقدار فلورسانس متیلن بلو در محیط قبل از تابش فراصوتی و FI_{total} مقدار فلورسانس متیلن بلو پس از لیز کردن نانوذره حاوی دارو است.

جدول ۱ مقدار نشر فلورسانس (Count) در روش اندازه‌گیری میزان رهایش دارو به دنبال تابش فراصوتی

زمان (دقیقه)	$FI_{\text{before US}}$	FI_{total}	$FI_{\text{after US}}$
۲/۵	۵۸/۸۶±۲/۰۱	۱۴۰/۳۳±۳/۲۱	۸۰/۹۳±۶/۸۶
۵/۰	۵۳/۹۰±۱/۲۱	۱۴۳/۱۶±۲/۰۲	۱۰۰/۱۳±۷/۳۸

نتایج نشان داد که میزان رهاسازی دارو در گروه تحت تابش فراصوتی حالت پیوسته ۲ وات بر سانتی‌متر مربع با فرکانس ۱ مگاهرتز برای مدت زمان تابش ۲/۵ دقیقه، در حدود $27/09 \pm 8/42$ درصد و برای مدت زمان تابش ۵ دقیقه در حدود $51/8 \pm 8/26$ درصد افزایش می‌یابد اما در گروه کنترل پس از بررسی در دو بازه زمانی ۵ دقیقه و ۲/۵ دقیقه هیچ‌گونه

رهایسازی داروی حساس کننده نوری متیلن بلو از نانولیپوزوم پلیمری با تابش امواج فراصوتی یک مگاهرتز

نظر به این که یک حفره به عنوان یک بسته انرژی عمل می کند و این بسته انرژی می تواند موارد استفاده متنوعی داشته باشد بنابراین پدیده فوق در حوزه های مختلف هم در ابعاد نظری و هم در ابعاد کاربردی مورد توجه است. درهم شدگی حباب ها به دنبال پدیده حفره سازی منجر به ایجاد موج شوک، دما و فشار بالا و در نتیجه باعث تخریب غشای سلولی و بافت ها می شود؛ همچنین رهایش دارو از نانوذرات را تشدید می کند [۱۵، ۳۱]. در این مطالعه از در هم شدگی حفره ها برای رهایسازی داروی حساس کننده از نانوذرات برای به کارگیری در فرآیند درمانی فتودینامیک درمانی استفاده خواهد شد.

بچت (Bechet) و همکارانش در سال ۲۰۰۸ در مطالعه ای مروری به بررسی نقش نانوذرات برای تحویل عامل های فتودینامیک درمانی پرداختند و استفاده از نانومواد به عنوان وسیله ای ایده آل و ایمن برای انتقال عوامل فتودینامیک درمانی مطرح شد و همچنین پایداری، تجزیه پذیری زیست شناختی و کارایی درمانی انواع نانوحامل های پلیمری، سرامیکی و فلزی مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه به کارگیری نانوذرات به عنوان نقطه امید در فتودینامیک درمانی بیماری های بدخیم مطرح شد [۳۲]. یان (Yan) و همکارانش در سال ۲۰۱۰ در مطالعه ای به بررسی داروی حساس کننده متیلن بلوی کپسوله شده برای درمان آدنوکارسینوم پستان در شرایط برون تنی (In vitro) به روش فتودینامیک درمانی پرداختند. داروی متیلن بلو در داخل نانوذره پروتئینی به ابعاد ۱۲ نانومتر قرار داده شد و تابش نوری به وسیله لیزر هلیوم-نئون (He-Ne) در طول موج ۶۳۳ نانومتر با توان ۲۰ میلی وات به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. این مطالعه نشان دهنده اثر فتودینامیکی متیلن بلوی کپسوله شده در شرایط برون تنی بود [۹].

مطالعه حاضر نشان داد که نانوذرات پلیمری ساخته شده برای کپسوله کردن داروی حساس کننده متیلن بلو مناسب است و نیز قابلیت رهایسازی دارو را داراست. اندازه لیپوزوم های ساخته شده در این مطالعه $66/19 \pm 4/49$ نانومتر و میزان بارگذاری داروی متیلن بلو در آن ها $65/21 \pm 3/47$ درصد بود. با وجود این که میزان داروی محبوس شده در نانوذره برای

سیستم تحویل داروی مناسب کانون توجه قرار گرفته است [۱۱]. به کارگیری نانوحامل ها شامل میسل (Micelle)، لیپوزوم، نانوامولسیون (Nanoemulsion)، کریستال و غیره می تواند شرایط انتقال به صورت هدفمند، جلوگیری از آسیب به بافت های سالم و افزایش غلظت دارو در مکان هدف را فراهم آورد [۱۵، ۲۱، ۲۶].

نانوذرات پلیمری برای تحویل داروهای آب دوست و آب گریز مناسب بوده و نیز می تواند به آنتی بادی ها متصل شده و باعث رهایسازی انتخابی دارو در بافت های خاص شود. به علاوه با افزایش تجمع دارو در محل ضایعه و کم کردن آثار جانبی داروهای شیمیایی، می تواند آثار درمانی را افزایش دهد. همچنین نانوذرات پلیمری قابلیت باز شدن و رهایسازی دارو با تابش امواج فراصوت را دارد [۱۳، ۱۵]. روش های مختلفی برای رهایسازی دارو از نانوذرات مورد بررسی قرار گرفته است که برخی از روش های رهایسازی سریع دارو شامل میدان های الکتریکی، میدان های مغناطیسی، دما، نور مرئی و امواج فراصوتی است. امواج فراصوتی یکی از بهترین روش ها برای کاربرد کنترل شده رهایش دارو است زیرا غیر تهاجمی بوده و می تواند به اعماق بافت نفوذ کند. این امواج مکانیکی قابلیت کانونی شدن روی بافت هدف را داراست و همچنین نفوذپذیری سد خونی بافتی و غشای سلول ها را افزایش می دهد [۱۶]. مکانیسم اعمالی توسط امواج فراصوتی در محیط به دو دسته حرارتی و غیر حرارتی (مکانیکی) تقسیم می شود. استرس حرارتی از جذب انرژی تابشی به وسیله محیط ناشی می شود که موجب افزایش دما می شود. استرس مکانیکی می تواند به صورت حفره سازی باشد [۲۷]. حفره سازی شامل تشکیل هسته، رشد و حرکت نوسانی حباب در میدان صوتی است و به دو دسته کلی حفره سازی پایدار و ناپایدار تقسیم می شود [۲۸]. در حفره سازی ناپایدار حباب های ایجاد شده در محیط طی چند چرخه به سرعت رشد می کند و دامنه نوسان آن ها افزایش می یابد به طوری که در مدت کوتاهی حباب فرو می ریزد. این فرآیند منجر به تولید فشار بسیار بالا (مگاپاسکال) و درجه حرارت زیاد (هزاران درجه کلونین) می شود [۲۹، ۳۰].

فرم لیپوزومی دارو باعث افزایش برداشت دارو در بافت توموری نسبت به تزریق داروی محلول می‌شود. مکانیسم دقیق تجمع ماده حساس کننده در تومور هنوز مورد تردید است اما گمان می‌رود چگونگی انتقال دارو، خصوصیات داروی حساس کننده و ویژگی تومور در این امر نقش دارد که برخی از آن‌ها شامل حجم بزرگ آب میان بافتی، pH اسیدی، محتوای لیپید بالا، عروق خونی نشت کننده، حجم زیاد کلاژن تازه تولید شده، حضور ماکروفاژها و تعداد زیاد گیرنده‌های لیپوپروتئین کم چگالی در بافت‌های توموری است [۲۱، ۳۳، ۳۴]. به نظر می‌رسد با تابش امواج فراصوتی می‌توان نانوذرات حامل دارو را به صورت بسیار موضعی‌تر در یک محل تحریک و محتوای دارویی بیشتری را آزاد نمود و از آثار سوء دارو روی سایر قسمت‌ها جلوگیری کرد؛ سپس با تابش نور لیزر و تحریک ماده حساس کننده به درمان تومور به روش فتودینامیک درمانی پرداخت.

به‌کارگیری نانولیپوزوم پلیمری می‌تواند روشی مناسب برای کپسوله کردن داروی حساس کننده متیلن بلو باشد. همچنین نانوذرات پلیمری ساخته شده قابلیت رهاسازی دارو در طول تابش امواج فراصوتی را داراست؛ به طوری که تابش امواج پیوسته فراصوتی ۱ مگاهرتز در دمای زیر حد هایپرترمی (۵ دقیقه) می‌تواند منجر به رهاسازی داروی حساس کننده از نانوذرات لیپوزومی به میزان $51/8 \pm 8/26$ درصد شود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق قسمتی از رساله دکتری رشته فیزیک پزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس است که با حمایت مالی این دانشگاه به انجام رسیده است.

انجام مطالعات آزمایشگاهی در حد مطلوبی قرار دارد، می‌توان با تغییر بهینه در نسبت مواد سازنده لیپوزوم، میزان کپسوله شدن داروی لیپوزومی را افزایش داد. خدیر (Khdair) و همکارانش در سال ۲۰۰۹ از نانوذرات AOT-آلجینات (Aerosol OT- Alginate) با قطر ۶۲ نانومتر برای کپسوله کردن داروی متیلن بلو استفاده کردند و نشان دادند که میزان کپسوله شدن دارو در محدوده ۶۹ درصد قرار دارد که نزدیک به مطالعه حاضر است [۲۳]. فنگ (Fang) و همکارانش در سال ۲۰۰۷ در مطالعه‌ای از روش هیدراته کردن لایه پلیمری که در تحقیق حاضر استفاده شد، برای ساختن لیپوزوم استفاده کردند که میزان کپسوله شدن داروی رسوراترول (Resveratrol) در آن‌ها در حدود ۹۵ درصد گزارش شد [۱۷]. از آنجایی که نوع داروی کپسوله شده در آن مطالعه، محلول در چربی و اندازه لیپوزوم‌ها در حدود ۲۵۰ نانومتر است، می‌تواند توجیه کننده میزان تفاوت کپسوله شدن داروی متیلن بلو نسبت به آن باشد. هوآنگ (Huang) و همکارانش در سال ۲۰۰۴ در مطالعه‌ای به بررسی میزان رهاسازی ماده فلورسانس کالسین (Calcein) از لیپوزوم حساس به صوت پرداختند. تابش فراصوتی با فرکانس ۱ مگاهرتز و زمان تابش ۱ دقیقه منجر به آزادسازی حدود ۶۰ درصد از داروی کپسوله شده شد [۱۶]. نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که تابش امواج فراصوتی ۱ مگاهرتز با مدت زمان ۵ دقیقه می‌تواند منجر به آزادسازی حدود $51/8$ درصدی دارو از نانوذرات لیپوزومی از طریق تولید و درهم شدگی حفره‌های صوتی شود که نتایج مطالعه مشابه را تأیید می‌کند ولی علت اختلاف در میزان رهاسازی به نوع دارو، فرمولاسیون استفاده شده برای ساخت نانوذره و روش کپسوله کردن دارو در این تحقیق وابسته است. نتایج این مطالعه نشان داد که به‌کارگیری

منابع

- [1] Sharman WM, Allen CM, van Lier JE. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discov Today* 1999; 4(11): 507-517.
- [2] Castano AP, Mroz P, Hamblin MR. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(7): 535-45.
- [3] Henderson BW, Dougherty TJ. How does

- photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol* 1992; 55(1): 145-57.
- [4] Nakaseko H, Kobayashi M, Akita Y, Tamada Y, Matsumoto Y. Histological changes and involvement of apoptosis after photodynamic therapy for actinic keratoses. *Br J Dermatol* 2003; 148(1): 122-7.
- [5] Plaetzer K, Kiesslich T, Oberdanner CB, Krammer B. Apoptosis following photodynamic tumor therapy: induction, mechanisms and detection. *Curr Pharm Des* 2005; 11(9): 1151-65.
- [6] Huang Z. A review of progress in clinical photodynamic therapy. *Technol Cancer Res Treat* 2005; 4(3): 283-93.
- [7] Khdair A, Gerard B, Handa H, Mao G, Shekhar MP, Panyam J. Surfactant-polymer nanoparticles enhance the effectiveness of anticancer photodynamic therapy. *Mol Pharm* 2008; 5(5): 795-807.
- [8] Tang W, Xu H, Park EJ, Philbert MA, Kopelman R. Encapsulation of methylene blue in polyacrylamide nanoparticle platforms protects its photodynamic effectiveness. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 369(2): 579-83.
- [9] Yan F, Zhang Y, Kim KS, Yuan HK, Vo-Dinh T. Cellular uptake and photodynamic activity of protein nanocages containing methylene blue photosensitizing drug. *Photochem Photobiol* 2010; 86(3): 662-6.
- [10] Tardivo JP, Giglio AD, de Oliveira CS, Gabrielli DS, Junqueira HC, Tada DB, Severino D, Turchiello RF, Baptista MS. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiag Photodyn Ther* 2005; 2(3): 175-91.
- [11] Derycke AS, de Witte PA. Liposomes for photodynamic therapy. *Adv Drug Deliv Rev* 2004; 56(1): 17-30.
- [12] Chatterjee DK, Fong LS, Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: an emerging paradigm. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60(15): 1627-37.
- [13] Huang SL. Liposomes in ultrasonic drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60(10): 1167-76.
- [14] Schroeder A, Honen R, Turjeman K, Gabizon A, Kost J, Barenholz Y. Ultrasound triggered release of cisplatin from liposomes in murine tumors. *J Control Release* 2009; 137(1): 63-8.
- [15] Hussein GA, Pitt WG. Micelles and nanoparticles for ultrasonic drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60(10): 1137-52.
- [16] Huang SL, MacDonald RC. Acoustically active liposomes for drug encapsulation and ultrasound-triggered release. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1665(1-2): 134-41.
- [17] Fang JY, Hung CF, Liao MH, Chien CC. A study of the formulation design of acoustically active lipospheres as carriers for drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2007; 67(1): 67-75.
- [18] Peng Q, Brown SB, Moan J, Nesland JM, Wainwright M, Griffiths J, Dixon B, Cruse-Sawyer J, Vernon D. Biodistribution of a methylene blue derivative in tumor and normal tissues of rats. *J Photochem Photobiol B* 1993; 20(1): 63-71.
- [19] Peter C, Hongwan D, K pfer A, Lauterburg BH. Pharmacokinetics and organ distribution of intravenous and oral methylene blue. *Eur J*

- Clin Pharmacol 2000; 56(3): 247-50.
- [20] Belaz N, Decosterd L, Appenzeller M, Ruetsch Y, Chiolero A, Buclin T, Biollaz J. Spectrophotometric determination of methylene blue in biological fluids after ion-pair extraction and evidence of its adsorption on plastic polymers. Eur J Pharmaceu Sci 1997; 5(5): 335-45.
- [21] Hasanzadeh H, Mokhtari-Dizaji M, Bathaie SZ, Hassan ZM. Effect of local dual frequency sonication on drug distribution from polymeric nanomicelles. Ultrason Sonochem 2011; 18(5): 1165-71.
- [22] Kumar CS, Mohammad F. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. Adv Drug Deliv Rev 2011; 63(9): 789-808.
- [23] Khdair A, Handa H, Mao G, Panyam J. Nanoparticle-mediated combination chemotherapy and photodynamic therapy overcomes tumor drug resistance in vitro. Eur J Pharm Biopharm 2009; 71(2): 214-22.
- [24] Kolarova H, Bajgar R, Tomankova K, Nevrelva P, Mosinger J. Comparison of sensitizers by detecting reactive oxygen species after photodynamic reaction in vitro. Toxicol In Vitro 2007; 21(7): 1287-91.
- [25] Orth K, Beck G, Genze F, Rück A. Methylene blue mediated photodynamic therapy in experimental colorectal tumors in mice. J Photochem Photobiol B 2000; 57(2-3): 186-92.
- [26] Ferrara KW. Driving delivery vehicles with ultrasound. Adv Drug Deliv Rev 2008; 60(10): 1097-102.
- [27] Buldakov MA, Hassan MA, Zhao QL, Feril LB Jr, Kudo N, Kondo T, Litvyakov NV, Bolshakov MA, Rostov VV, Cherdyntseva NV, Riesz P. Influence of changing pulse repetition frequency on chemical and biological effects induced by low-intensity ultrasound in vitro. Ultrason Sonochem 2009; 16(3): 392-7.
- [28] Pitt WG, Husseini GA, Staples BJ. Ultrasonic Drug Delivery – A General Review. Expert Opin Drug Deliv 2004; 1(1): 37-56.
- [29] Barnett S. Ultrasound. Nonthermal issues: cavitation—its nature, detection and measurement. Ultrasound Med Biol 1998; 24 Suppl 1: S11-21.
- [30] Kolarova H, Tomankova K, Bajgar R, Kolar P, Kubinek R. Photodynamic and sonodynamic treatment by phthalocyanine on cancer cell lines. Ultrasound Med Biol 2009; 35(8): 1397-404.
- [31] ter Haar G. Therapeutic applications of ultrasound. Prog Biophys Mol Biol 2007; 93(1-3): 111-29.
- [32] Bechet D, Couleaud P, Frochot C, Viriot ML, Guillemin F, Barberi-Heyob M. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. Trends Biotechnol 2008; 26(11): 612-21.
- [33] Lucroy MD. Photodynamic therapy for companion animals with cancer. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2002; 32(3): 693-702.
- [34] Kalka K, Merk H, Mukhtar H. Photodynamic therapy in dermatology. J Am Acad Dermatol 2000; 42: 389-413.