فعالسازی الکتریکی حساس کننده های نوری در شرایط برون تنی به منظور بهینه سازی درمانهای فتوداینامیک

محمود محمودی[1]، آمنه سازگارنیا[2]*، سید محمدحسین بحرینی طوسی[3]، رضا فیضی[4]، عبدالرضا هاشمیان[5]

۱- دانشیار گروه ایمونولوژی، مرکز تحقیقات ایمونولوژی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۲- استادیار گروه فیزیک پزشکی، مرکز تحقیقات فیزیک پزشکی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۳- استاد گروه فیزیک پزشکی، مرکز تحقیقات فیزیک پزشکی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۴- کارشناس ارشد گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۵- استادیار گروه فیزیک پزشکی، مرکز تحقیقات فیزیک پزشکی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده:۸۶/۶/۲۹ **تاریخ پذیرش مقاله: ۸۶/۷/۲۷**

چکیده

مقدمه: در درمانهای فتوداینامیک، پایین بودن ضرایب خاموشی حساس کننده ها به عنوان یکی از عوامل محدودکننده کارایی درمان مطرح است. از طرف دیگر هر حساس کننده نوری در طول موج خاصی فعال می شود که عامل اصلی در محدودیت عمق درمان بشمار می‌رود. در این تحقیق فعالسازی الکتریکی دو حساس کننده نوری در شرایط برون تنی مورد بررسی قرار گرفته است تا شاید بتوان با اثر هم افزایی پالسهای الکتریکی و نور، به درمان بهینه در عمق موردنظر دست یافت.

مواد و روشها: مطالعه بر روی رده سلولی فیبروسارکومای وهی-۱۶۴ موش بالب سی در دو دوز الکتریکی، دو غلظت از دو نوع رنگدارو و دو دوز نوری انجام شده‌است. پس از ۲ ساعت انکوباسیون سلولها با ۵ آمینولوونیلیک اسید و سولفات فتالوسیانین روی، پالسهای الکتریکی مربعی با الکتروپوریتور بی‌تی ایکس و نوردهی با منبع نور غیر کوهرنت در قله های طول موج ۶۷۰ و ۶۳۰ نانومتر انجام گردید. ۲۴ ساعت بعد از درمان درصد بقای سلولی به روش ام تی‌تی[1] مورد ارزیابی و مقایسه قرارگرفت.

نتایج : در غلظت ۰/۲ میلی‌مولار ۵آمینولوونیلیک اسید، بین دوز نوری کم و زیاد، در پالسهای ۹۰۰ و۱۰۰۰ ولت بر سانتیمتر و در غلظت ۱ میلی مولار در هر سه دوز نوری (صفر، ۱۶و ۵۴ ژول بر سانتیمترمربع) تفاوت معنی‌دار به‌دست آمده است.

بین نمونه‌های پالس گرفته و بدون پالس ، در غلظت ۱ میکرومولار از فتالوسیانین روی در دوز نوری کمتر، و در غلظت ۱۰ میکرومولار از رنگ‌دارو و دوز نوری بالاتر، تفاوت معنی‌دار وجود دارد. بین نمونه‌های پالس گرفته و بدون پالس، در دوز ۱ میکرومولار از رنگ‌دارو بین دوز الکتریکی صفر و ۱۰۰۰ولت بر سانتیمتر در تاریکی و دوز نوری کمتر تفاوت معنی‌دار است. در غلظت ۱۰ میکرومولار از رنگ‌دارو بین دوز الکتریکی صفر و۸۰۰ ولت بر سانتیمتر، هم در تاریکی و هم در دوز نوردهی بیشتر تفاوت معنی‌دار به چشم می‌خورد.

بحث و نتیجه گیری: بنظر می‌رسد در غلظتهای بالا پروتوپورفیرین۹، تحت تاثیر پالس‌های الکتریکی فعال می شود. همچنین تاثیر پالس‌های الکتریکی ۱۰۰۰ ولت بر سانتیمتر در فعالسازی ۵آمینولوونیلیک اسید بیش از پالس‌های الکتریکی ۹۰۰ ولت بر سانتیمتر است. پیش بینی می‌شود دوز الکتریکی اعمال شده پس از انکوباسیون سلول‌ها با غلظت ۱ میکرومولار از فتالوسیانین روی، از طریق پالس‌های با قدرت ۱۰۰۰ ولت بر سانتیمتر توانسته است، موجبات فعال سازی فتالوسیانین روی را بدون نوردهی فراهم آورد. جمعا بنظر می رسد، افزودن دوز الکتریکی از طریق اضافه کردن قدرت پالسها بیش از افزایش پهنای زمانی آنها، منجر به بهینه سازی کارآیی فعالسازی الکتریکی رنگداروها می شود. (مجله فیزیک پزشکی ایران، دوره ۳، شماره ۱۲، پاییز۸۵ : ۸۹-۶۱)

واژگان کلیدی: الکتروپوریشن، درمان فتوداینامیک، فعالسازی الکتریکی، رده سلولی وهی-۱۶۴ ، فتالوسیانین روی، ۵آمینولوونیلیک اسید

* **نویسنده مسؤول: آمنه سازگارنیا**

آدرس: گروه فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد،

asazgarnia@yahoo.com

تلفن: ۴-۸۵۴۴۰۸۱ - (۵۱۱) ۹۸+

1- MTT
(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)

Archive of SID

www.SID.ir

۱- مقدمه

در درمانهای فتوداینامیک[1]، انتخاب مناسب عوامل درمانی(از جمله نوع حساس کننده نوری)، با توجه به طول موج فعالسازی آن برای تامین عمق درمان موردنیاز بسیار حائز اهمیت می باشد.

عدم سمیت[2]، برداشت انتخابی و نگهداری توسط بافت تومور، تولید کافی رادیکال‌های آزاد اکسیژن با جذب طول‌موج‌هایی که به راحتی بتوانند از بافت عبور کنند، از مهمترین خواص حساس‌کننده ایده‌آل می باشد[۱]. از جمله رنگداروهایی که از طرف سازمان غذا و دارو[3] مجوز مصرف دارند، میتوان به فتوفیرین اشاره نمود. این حساس‌کننده نسل اول مخلوطی از چند پورفیرین است که با توجه به تجمع انتخابی محدود در بافت تومور، نسبت تجمع آن در بافت هدف به بافت سالم ناچیز است. طیف جذبی فتوفیرین ۵ قله دارد که بلندترین آنها در ۳۹۰ نانومتر و پایین‌ترین آنها در ۶۳۰ نانومتر است [۲]. از قلهٔ جذب ۶۳۰ نانومتر هم برای مطالعات آزمایشگاهی و هم برای مطالعات بالینی استفاده شده است[۳]. از طرف دیگر، به دلیل ضرایب خاموشی پایین، برای به‌دست آوردن پاسخ رضایت بخش در نوردرمانی، باید دوز نسبتاً زیادی از دارو تجویز شود.

از حساس‌کننده‌های نسل دوم می‌توان به مشتقات پورفیرین، فتالوسیانین ها، نفتالوسیانین ها و کلرین ها اشاره کرد. این ترکیبات جدید به طور موثرتری اکسیژن یگانه تولید می‌کنند و یک قلهٔ جذبی قوی در محدودهٔ ۸۰۰-۶۵۰ نانومتر دارند (طول موج‌هایی که می‌توانند تا عمق بیشتری در بافت نفوذ کنند). فتالوسیانین ها[4] ترکیبات خالصی بوده و ساختار شیمیایی خوبی با بهره کوانتوم بالا برای تولید اکسیژن یگانه و سه گانه، همچنین سمیت ناچیزی در غیاب نور دارند[٤] . مشخصات برخی از فتالوسیانینها ی سنتز شده عبارتند از [٤]:

نام حساس کننده	ضریب خاموشی (بر مول بر سانتیمتر)	طول موج حداکثر جذب (نانومتر)
$AlPcS_2$	۲/۱٤×۱۰^{۵}	٦٧١ و ٦٣٠ و ٦٧٥
$ZnPcS_2$	۲ × ۱۰^{۵}	٦٧٧, ٦٧٦
$ZnPcS_4$	۱/٦٩ × ۱۰^{۵}	٦٧٥, ٦٦٠
$ZnPcS_3$	۲ × ۱۰^{۵}	٦٧٧, ٦٧٦

فعال سازی نوری قوی این حساس‌کننده‌ها در طول‌موج های بلندتر، موضوع قابل ملاحظه ای است. طول موج بلندتر می‌تواند عمق نفوذ بیشتری برای نور در بافت ایجاد کند و بنابراین امکان درمان تومورهای حجیم تر و عمقی تری را فراهم خواهد کرد [۵]. اما در هر صورت پایین بودن ضرایب خاموشی حساس کننده ها همواره به عنوان عامل محدودکننده کارایی درمانهای فتوداینامیک مطرح بوده است.

۵ آمینولوونیلیک اسید رنگ دارویی است که پس از ورود به سلول تحت تأثیر آنزیمهای سلولی تبدیل به پروتوپورفیرین ۹ می‌شود. این ماده که در اثر تابش نور با طول‌موج ٦٣٠ نانومتر فعال شده و در واکنش‌های مرگ سلول، سهیم می‌گردد، در حال حاضر دارای مجوز سازمان جهانی غذا و دارو میباشد. البته مشتقات فتالوسیانین با جرم مولکولی بزرگتر از ۵ - آمینولوونیلیک اسید، هنوز مجوز مصرف ندارد، اما با توجه به طول‌موج فعال‌سازی بلندتر این مشتقات (بلندتر از ٦٧٠ نانومتر)، انتظار می‌رود عمق درمان بیشتری را فراهم نمایند. ضمناً این ترکیبات، به‌خودی‌خود، حساس‌کننده اند.

در۱۹۹۷ آثار ترکیب فعال‌سازی الکتریکی و فعال‌سازی نوری در حضور غلظت‌های مختلف از مشتق هماتوپورفیرین که یکی از حساس کننده های نسل اول است، روی سلول‌های

1- Photodynamic therapy(PDT)
2- Toxicity
3 -FDA
4- Phtalocyanines

www.SID.ir

هلا[1] مورد بررسی قرار گرفت و فعال‌سازی این رنگ دارو تحت تأثیر میدان الکتریکی تایید گردید. بر اساس نتایج این تحقیق، اگر حساس‌کننده‌ها، توأماً در معرض میدان الکتریکی و نور قرار گیرند، میزان داروی فعال افزایش می‌یابد که این وضع می‌تواند تأثیر مهمی در افزایش کارایی درمان فتوداینامیک سرطان داشته باشد [٦].

در این مطالعه امکان استفاده از اثر فعالسازی الکتریکی دو رنگ داروی نسل دوم، ٥- آمینولوونیلیک اسید و سولفات فتالوسیانین روی، به عنوان یک عامل همیار با نور، به منظور بهبود بازده درمانهای مذکور مورد بررسی قرارگرفته است.

٢- مواد و روشها

٢-١ رده ی سلولی و شرایط کشت آن

ردهٔ سلولی وهی١٦٤[2]، رده‌ای پیوسته و چسبنده می‌باشد که از نظر شکل شبیه سلول‌های اپی تلیال است. این سلول، اولین بار از تومور فیبروسارکومایی تهیه شده است که از تزریق زیر جلدی ٣- متیل کولانترن به موش بالب سی[3] به‌دست آمده است. سلول‌های وهی١٦٤در محیط آرپی‌ام‌آی ١٦٤٠[4] حاوی ٢ میلی مولارگلوتامین، ١٠٪ اف سی‌اس[5]، ١٠٠ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ١٠٠ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین و در حضور ٥٪ گاز دی اکسیدکربن و در $37\ ^{\circ}C$ کشت داده شدند. هر بار که سلول‌ها به فاز نمایی رشد می رسیدند و به‌صورت تک‌لایهٔ کامل سطح فلاسک را می‌پوشاندند (حدود سلول بر سانتیمتر مربع($10^4 \times (2-0/5)$))، با استفاده از محلول ٠/٢٥درصد تریپسین-ا د ت آ[6] سلول‌ها از کف فلاسک جدا شده و به فلاسک‌های جدید منتقل می‌شدند. محیط کشت فلاسک‌ها هر ٣-٢ روز یکبار تعویض می‌گردید.

بافر الکتروپوریشن: ٥/٥ گرم مانیتول، ٧/٤ میلی گرم $CaCl_2.2H_2O$ (C–3881; سیگما) و ٤ میلی گرم $MgCl_2.6H_2O$ (M – 0250;سیگما) و ٢٠ میکروگرم بر میلی‌لیترسرم آلبومین گاوی[7]، حجم با آب مقطر به ١٠٠ سی سی رسید. سپس pH بافر روی ٧/٤ تنظیم شد .

٥ آمینولوونیلیک اسید هیدروکلراید[8] : ای ال ای[9] با فرمول شیمیایی $C_5H_9NO_3.HCl$ و جرم مولکولی ١٦٧/٦ از محصولات شرکت دارویی سیگما [10] با خلوص ٩٨٪ تهیه و هنگام استفاده در بافر الکتروپوریشن حل شده و pH آن توسط محلول سود نرمال، در ٧/٤ تنظیم گشت. آزمایشات در دو غلظت ٠/٢ و یک میلی مولار ای الای بر روی سلولها صورت گرفت.

تتراسولفونیک فتالوسیانین روی[11] : رنگ‌داروی دیگری که اثر فعالسازی آن مورد تحقیق قرار گرفت، با فرمول $C_{32}H_{16}N_8O_{12}S_4Zn$ با جرم مولکولی ٨٩٨/١٥ و از شرکت دارویی فرانتییر ساینتیفیک[12] امریکا تهیه گردید. این ماده در pH بالاتر از ٤، در آب محلول بوده و هنگام مصرف با غلظت مورد نیاز در محلول بافر فسفات[13] حل می‌شود. آزمایشات در غلظتهای ١ و ١٠ میکرومولار از فتالوسیانین روی بر روی سلولها انجام شد.

الکتروپوریتور: تولید و اعمال پالسها به نمونه های سلولی توسط یک دستگاه مولد پالس مربعی[14] ساخت شرکت جینترونیکس[15] با استفاده از کووت ٢ میلیمتری انجام گرفت. دوزهای الکتریکی، در قالب ٨ پالس با فاصله زمانی یک ثانیه در قدرت ٩٠٠ ولت بر

1- Hela cells
2- WEHI-164 Cell Line
3- Balb/c
4- RPMI-1640
5- FCS
6- EDTA

7- BSA
8- Aminolaevulinic Acid Hydrochloride
9- ALA
10- Sigma
11- Phtalocyanine Tetrasulfonic Acid (ZnPcS)
12- Frontier Scientific Inc
13- Phosphate Buffer Solution (PBS)
14- Electro Square Porator BTX; Model ECM-830
15- Genetronics

Archive of SID
www.SID.ir

سانتیمتر با پهنای زمانی ۵۰ میکروثانیه و ۱۰۰۰ولت بـر سـانتیمتر با پهنای زمانی ۲۰ میکروثانیه، پس از انکوباسیون سـلولها بـا ای الای و در قدرت ۱۰۰۰ولـت بـر سـانتیمتر بـا پهنـای زمـانی ۵۰ میکروثانیه و قدرت ۸۰۰ ولت بر سانتیمتر با پهنـای زمـانی ۱۰۰ میکروثانیه بعـد از انکوباسـیون سـلولها بـا فتالوسـیانین روی بـه نمونه های سلولی موردنظر، اعمال گردید. علت انتخـاب پهنـای زمانی طولانی تر پالسها در این حالـت، بزرگتـر بـودن مولکـول فتالوسیانین روی در مقایسه با ای الای بود تا امکان استفاده از اثر الکتروتراوایی نیز فراهم شود.

منبع نورانی و پروبهای مربوطه: نوردهی سلولها با اسـتفاده از یک منبع نورانی غیر کوهرنت ساخت شرکت لوماکیر[1] امریکـا مدل الـسی-۱۲۲ مجهز به پروبهای مشـتمل بـر رشـته هـای نوری با قطر ۲ میلیمتر و قطر لکه نـوری ۸ میلیمتـر، در طـول موجهای ۲۵ ±۶۳۰ نانومتر و ۳۰ ±۶۷۰ نانومتر انجـام گرفـت. همگنی چگالی توان خروجی ایـن سیسـتم ۵٪ ±، مجهـز بـه تنظیم کننده زمانی[2]، با دقت ۰/۵٪ زمان تنظیم‌شـده مـی‌باشـد. همچنین به‌منظور جلوگیری از افزایش درجـه حـرارت، فیلتـر جاذب مادون قرمز نیز در سیستم تعبیه شده است، به‌طوری که افزایش دمای بافت به‌ازای خروجی مادون قرمز نزدیک لامپ، ۶-۴ درجه فارنهایت بر ساعت گزارش شده است [۷].

نورسنجی: به منظور اندازه گیری دانسیتهٔ توان خروجی پروبهای نـــوری مـــورد اســـتفاده در ایـــن تحقیـــق، از نورســـنج[3] کان-ترول-کیور آی ال ۱۴۰۰[4] ساخت شرکت امریکایی یو وی پروسس[5] مجهز به آشکارساز نوری دارای پاسخ تخـت[6] اسـتفاده شد. قبل از آغاز نوردهی پروب مناسب رنگ‌داروی مورد استفاده روی منبع نور نصب و دانسیتهٔ نوری منبع اندازه گیری شد. زمان نوردهی نیز متناسب با دوز نوری موردنظر انتخاب گردید. نمونه هایی که با ای الای درمان شدند، در طول موج ۶۳۰ نـانومتر بـا دانسیتهٔ نوری ۹۰ میلی‌وات بر سانتیمترمربع در دوزهـای ۱۶/۰ و ۵۴/۰ ژول بـر سـانتیمترمربع و نمونـه هـای درمـان شـده بـا فتالوسیانین روی در طول موج ۶۷۰ نانومتر و دانسـیته نـوری ۶۰ میلی‌وات بـر سـانتیمترمربع در دوزهـای ۱۱/۰ و ۴۳/۰ ژول بـر سانتیمترمربع نوردهی شدند.

آماده سازی نمونه‌های سلولی برای نـوردهی: در بررسـیها، دو دوز الکتریکی [۷] و برای سلول‌ها دو ساعت انکوباسـیون با رنگدارو، [۸] درنظر گرفته شد. کلیه نمونه‌ها و کنتـرل‌هـای ممکن پیش‌بینی گردید. پـس از تریپسـینه کـردن سـلول‌هـا و شمارش آنها به روش تریپان - بلو و اطمینان از بقای بـیش از ۹۸٪ برای سلول‌ها، سوسپانسـیون سـلولی بـا تـراکم ۶×۱۰^{۶} سلول در هـر میلـی‌لیتـر بـافر الکتروپوریشـن، آمـاده و مـورد استفاده قرار گرفـت. اعمـال پـالس در کووتهـای بـا حفـرهٔ ۲ میلیمتر حاوی ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی و نـوردهی در پلیـت‌هـای ۲۴ خانـهٔ اسـتریل انجـام شـد. دو سـاعت انکوباسیون برای نمونه ها، قبل از اعمال دوز الکتریکی لحـاظ گردید. ضمناً قبل از نـوردهی کلیـهٔ نمونـه‌هـا بـا پـی‌بـی‌اس شستشو داده شـد و داروی اضـافی از محـیط خـارج گردیـد. به‌منظـور جلـوگیری از تـابش نـور پراکنـده از نمونـهٔ تحـت نوردهی به سایر نمونه‌ها، هر نمونه به تنهایی نوردهی گردید.

بطورکلی آزمایشات برون‌تنی، بـرای هـر رنگـدارو، روی ۹ گروه، طراحی گردید. شرایط این گروه‌ها و نتایج درصد بقـای سلولی پس از درمانها در جـداول ۱ و ۲ آمـده اسـت. بـرای هریک از شـرایط، حـداقل ۴ تکـرار منظـور گردیـد. پـس از نوردهی حدود ۵۰۰۰ سلول به هریک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه منتقل و بعد از ۲۴ ساعت، به‌منظور تعیین درصـد بقـای سلول‌ها، آزمون ام‌تی‌تـی انجـام گرفـت[۹]. جـذب نـوری در

1- LumaCare
2-Timer
3- Radiometer
4- CON-TROL-CURE IL1400
5- UVPROCESS
6- Flat-Response

Archive of SID
www.SID.ir

آزمون ام‌تی‌تی، با استفاده از سیستم الایزاریدر ساخت کمپانی آویرنس[1] مدل ۳۲۰۰ در طول‌موج ۵٤۰ نانومتر تعیین شد.
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها پس از اطمینان از نرمال بودن توزیع داده ها در سطح اطمینان ۹۵درصد، با استفاده از روش آنالیز واریانس یکطرفه و تست توکی با استفاده از نرم افزاراس‌پی‌اس‌اس[2] و رسم نمودارها در محیط اکسل[3] انجام گرفته است.

۳- نتایج

نتایج درصد بقای سلولی گروههای مختلف، در نمودارهای ۱ و ۲ گزارش شده است.
همانطور که در نتایج درمان با ای ال‌ای در جدول ۱ مشهود است:
با افزایش دوز نوردهی، درصد بقای گروه‌های کنترل بدون دارو در شرایط بدون پالس، با پالس‌های الکتریکی ۹۰۰ و ۱۰۰۰ولت بر سانتیمتر افزایش می‌یابد ولی این اختلاف در مقایسه با گروه تاریکی مشابه، فقط در ارتباط با گروهی که پالس‌های ۹۰۰ را دریافت کرده‌اند، در دوز نوری بالاتر معنی‌دار است.
در غلظت کمتر ای ال‌ای (۰/۲ میلی‌مولار)، درصد بقای سلولی در تاریکی در مقایسه با نمونه دارای پالس‌های الکتریکی ۹۰۰ و ۱۰۰۰ ولت بر سانتیمتر و نوردهی ۱٦/۰ ژول بر سانتیمترمربع، معنی‌دار نیست.
مقایسه داده ها در دو دوز نوری با سایر شرایط مشابه، بجز موارد زیر، بقیه را معنی‌دار نشان داده است:
بدون دارو، بدون پالس و با پالس‌های الکتریکی ۹۰۰ و ۱۰۰۰ ولت بر سانتیمتر.
غلظت ۱ میلی‌مولار رنگ‌دارو با پالس‌های ۱۰۰۰ولت بر سانتیمتر.
در غلظت یک میلی مولار ای ال‌ای ، با اعمال پالس‌های الکتریکی ۱۰۰۰ولت بر سانتیمتر در دوز نوری ۱٦/۰ ژول بر سانتیمترمربع، و با اعمال پالس‌های الکتریکی ۹۰۰ولت بر سانتیمتر، در دوز نوری ٥٤/۰ ژول بر سانتیمترمربع، کمترین درصد بقای سلولی به دست آمده است. البته این نتیجه با درصد بقای سلولی بدست آمده در همان غلظت، در دوز نوری ٥٤/۰ ژول بر سانتیمترمربع با نمونه های بدون و با همراه با دوز الکتریکی از طریق پالس‌های ۱۰۰۰ولت بر سانتیمتر معنی‌دار نبوده است.
در غلظت ۰/۲ میلی‌مولار بین دوزهای نوری ۱٦/۰ ژول بر سانتیمترمربع و ٥٤/۰ ژول بر سانتیمترمربع، و در غلظت ۱ میلی مولار بین هر سه دوز نوری، در نمونه های پالس گرفته، تفاوت معنی‌دار به‌دست آمده است.
نتایج بررسیهای انجام شده با فتالوسیانین روی که در جدول ۲ آمده است، بیانگر موارد زیر است:
بین گروه‌هایی که دوز الکتریکی دریافت کرده‌اند، در غلظت ۱۰ میکرومولار فتالوسیانین روی و با اعمال ۸ پالس الکتریکی با قدرت ۱۰۰۰ولت بر سانتیمتر و پهنای زمانی ۵۰میکروثانیه با دوز نوری ٤۳/۰ ژول بر سانتیمترمربع، کمترین درصد بقای سلولی یعنی ۱۰/۱٪ ، و بین نمونه‌های بدون دریافت دوز الکتریکی، در همان غلظت از فتالوسیانین روی و همان دوز نوری، درصد بقای سلولی ٤۷/۸٪ بوده است. گروه اخیر نسبت به دو گروه پالس گرفته، اختلاف معنی‌دار نشان داده است.
تغییرات دوز نوردهی، چه در نمونه‌های پالس گرفته و چه بدون پالس، در غیاب فتالوسیانین روی، موجب تغییر درصد بقای سلولی به صورت معنی‌دار نشده است.
در هر دو غلظت از رنگدارو، در نمونه‌های نظیر از نظر دوزهای الکتریکی و نوری دریافتی، در مقایسه با غلظت صفر با تفاوت معنی‌دار مواجه می‌شویم، ولی در مقایسه غلظت‌های ۱ و ۱۰ میکرومولار فقط در دوز نوری ٤۳/۰ ژول بر سانتیمترمربع تفاوتها معنی‌دارند.
در غلظت ۱ میکرومولار از رنگ‌دارو، نمونه بدون دریافت پالس در مقایسه با سلولهای پالس گرفته ۱۰۰۰ولت بر سانتیمتر در

1- AWARENESS
2- SPSS
3- Excel

Archive of SID
www.SID.ir

تاریکی و دوز نوری ۱۱/۰ ژول بر سانتیمترمربع تفاوت معنـی‌دار نشـان داده اسـت. در همـین غلظـت از رنـگ‌دارو، بـین دو دوز الکتریکی در دو دوز نوردهی ۱۱/۰ و ۴۳/۰ ژول بر سانتیمترمربع نیز تفاوت معنی‌دار مشاهده میشود.

در غلظت۱۰ میکرومولار از رنگ‌دارو هـم در تـاریکی و هـم در دوز نوردهی ۴۳/۰ ژول بر سانتیمترمربع بین دوز الکتریکی صـفر و ۸۰۰ ولت بر سانتیمتر، تفاوت معنی‌دار به چشم می‌خورد.

جدول۱: تغییرات درصد بقاء سلولی پس از درمان بدون حضور ای ال‌ای با و بدون دریافت پالس در شرایط برون تنی (داده ها نمایانگر میانگین٤تکرار ± خطای استاندارد است).

غلظت ای ال ای (میلی مولار)	گروه	دوز الکتریکی	دوز نوردهی (ژول بر سانتیمترمربع)	خطای استاندارد± درصد بقای سلولی
صفر	۱	صفر	صفر	۱۰۰/٤ ± ۱/۵
			۱٦	۹۹/۵ ± ۳/۹
			۵٤	۱۰٦/۲ ± ۳/۵
	۲	۸ پالس ۵۰ میکروثانیه ای با قدرت ۹۰۰ولت بر سانتیمتر	صفر	۹۹/۰ ± ۱/۱
			۱٦	۱۰٤/۷ ± ۵/۳
			۵٤	۱۱۹/٤ ± ۲/۱
	۳	۸ پالس ۲۰ میکروثانیه ای با قدرت ۱۰۰۰ ولت بر سانتیمتر	صفر	۱۰۱/۱ ± ۱/۷
			۱٦	۹۹/۱ ± ۵/٦
			۵٤	۱۲۱/۸ ± ۳/۹
۰/۲	٤	صفر	صفر	۹۱/۷ ± ۲/٤
			۱٦	۷۸/٤ ± ۲/۵
			۵٤	۵۹/٦ ± ۳/۵
	۵	۸ پالس ۵۰ میکروثانیه ای با قدرت ۹۰۰ولت بر سانتیمتر	صفر	۸٤/۸ ± ۳/۷
			۱٦	۸۱/۳ ± ۳/۱
			۵٤	۵۲/٤ ± ۳/٦
	٦	۸ پالس ۲۰ میکروثانیه ای با قدرت ۱۰۰۰ولت بر سانتیمتر	صفر	۸۳/۹ ± ۳/۲
			۱٦	۷۹/۰ ± ۲/۹
۱	۷	صفر	صفر	۸۸/۵ ± ٤/۰
			۱٦	٦۵/۱ ± ۲/۲
			۵٤	۱۱/۸ ± ۱/۳
	۸	۸ پالس ۵۰ میکروثانیه ای با قدرت ۹۰۰ولت بر سانتیمتر	صفر	٦۹/۵ ± ۳/۳
			۱٦	۳۸/۷ ± ۲/٤
			۵٤	۸/۸ ± ۱/۷
	۹	۸ پالس ۲۰ میکروثانیه ای با قدرت ۱۰۰۰ولت بر سانتیمتر	صفر	۵۱/۹ ± ۳/۸
			۱٦	۱۳/۰ ± ۰/۹
			۵٤	۰/۰ ± ۰/۰

Archive of SID

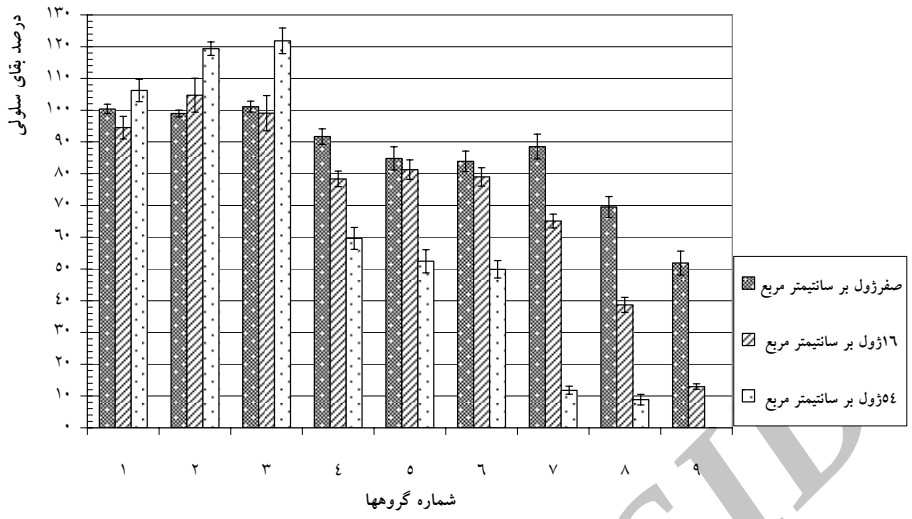
www.SID.ir

جدول۲: تغییرات درصد بقاء سلولی پس از درمان بدون حضور فتالوسیانین روی با و بدون دریافت پالس در شرایط برون تنی (داده ها نمایانگر میانگین٤تکرار ± خطای استاندارد است).

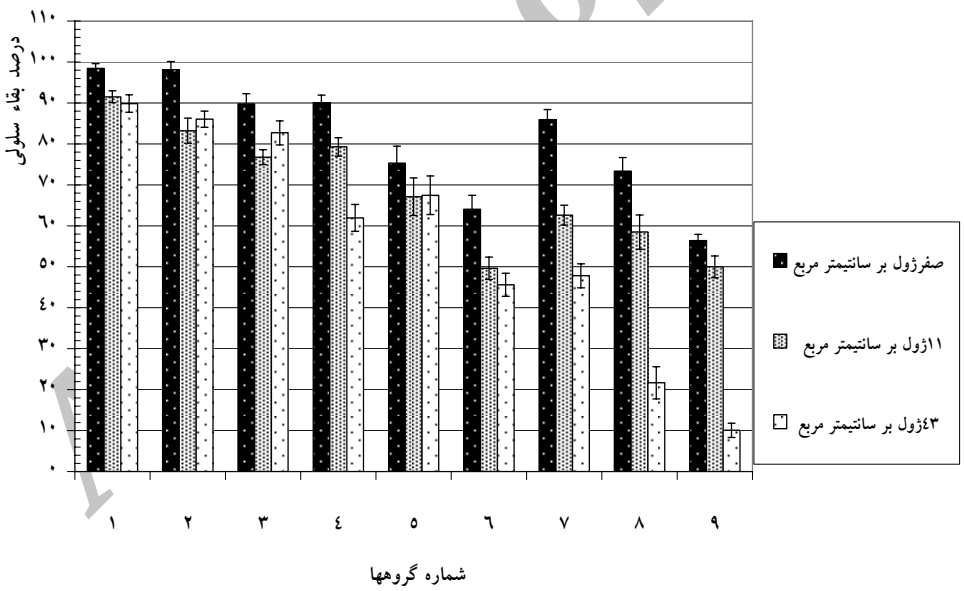
غلظت فتالوسیانین روی(میکرو مولار)	گروه	دوز الکتریکی	دوز نوردهی (ژول بر سانتیمترمربع)	خطای استاندارد± درصد بقای سلولی
صفر	۱	صفر	صفر	۹۸/٤ ± ۱ /۲
			۱۱/۰	۹۱/٥ ± ۱/٤
			٤۳/۰	۸۹/۹ ± ۲/۱
	۲	۸ پالس ۱۰۰ میکروثانیه‌ای با قدرت ۸۰۰ ولت بر سانتیمتر	صفر	۹٤/۱ ± ۲/۰
			۱۱/۰	۸۳/۲ ± ۳/۱
			٤۳/۰	۸٦/۰ ± ۲/۰
	۳	۸ پالس ٥۰ میکروثانیه‌ای با قدرت ۱۰۰۰ولت بر سانتیمتر	صفر	۸۹/۸ ± ۲/٥
			۱۱/۰	۷٦/۷ ± ۱/۸
			٤۳/۰	۸۲/۷ ± ۲/۹
۱	٤	صفر	صفر	۹۰/ ۰± ۱/۹
			۱۱/۰	۷۹/۳ ± ۲/۳
			٤۳/۰	٦۲/۰ ± ۳/۳
	٥	۸ پالس ۱۰۰ میکروثانیه‌ای با قدرت ۸۰۰ولت بر سانتیمتر	صفر	۷٥/۳ ± ٤/۱
			۱۱/۰	٦۷/۱± ٤/٦
			٤۳/۰	٦۷/٥ ± ٤/۷
	٦	۸ پالس ٥۰ میکروثانیه‌ای با قدرت ۱۰۰۰ولت بر سانتیمتر	صفر	٦٤/۱±۳/۱
			۱۱/۰	٤۹/۷ ± ۲/۸
			٤۳/۰	٤٥/٦ ± ۲/۸
۱۰	۷	صفر	صفر	۸٦/۰ ± ۲/٥
			۱۱/۰	٦۲/٦ ± ۲/٤
			٤۳/۰	٤۷/۸ ± ۲/۹
	۸	۸ پالس ۱۰۰ میکروثانیه‌ای با قدرت ۸۰۰ولت بر سانتیمتر	صفر	۷۳/۳± ۳/۳
			۱۱/۰	٥۸/٥ ± ٤/۲
			٤۳/۰	۲۱/۷ ± ۳/۹
	۹	۸ پالس ٥۰ میکروثانیه‌ای با قدرت ۱۰۰۰ولت بر سانتیمتر	صفر	٥٦/٤± ۱/٥
			۱۱/۰	٥۰/۰ ±۲/۷
			٤۳/۰	۱۰/۱ ± ۱/۸

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار ۱: تغییرات درصد بقاء سلولی در غلظت‌های ۱ و ۰/۲ میلی مولار ای ال‌ای با شرایط مختلف پالس‌های الکتریکی به سلول‌ها بعد از ۲ ساعت انکوباسیون با رنگ دارو اعمال شده ، طول موج نور ٦۳۰ نانومتر و دانسیته توان نور ۹۰ میلی وات بر سانتی‌متر مربع. (داده ها نمایانگر میانگین ± خطای استاندارد است). در کنار نمودار دوزهای نوردهی گروههای مختلف درج شده است.



نمودار ۲: تغییرات درصد بقاء سلولی در غلظت‌های ۱ و۱۰ میکرومولار فتالوسیانین روی با شرایط مختلف پالس‌های الکتریکی به سلول‌ها بعد از۲ ساعت انکوباسیون با رنگ دارو اعمال شده است، طول موج نور٦۷۰ نانومتر وچگالی توان نور٦۰ میلی وات برسانتی‌متر مربع. (داده ها نمایانگر میانگین ± خطای استاندارد است). در کنار نمودار دوزهای نوردهی گروههای مختلف درج شده است.

www.SID.ir

٤- بحث و نتیجه گیری

هدف مطالعه انجام شده بررسی همیاری فعالسازی الکتریکی دو رنگ داروی نسل دوم، ٥- آمینولوونیلیک اسید و سولفات فتالوسیانین روی، با نوردر درمانهای فتوداینامیک بوده است. بر اساس نتایجی که شرح آن گذشت، موارد زیر قابل بحث می باشد. در غیاب حساس‌کننده، پالس‌های الکتریکی به تنهایی و با شرایط و دوزهای بکار گرفته شده در این تحقیق، سبب مرگ سلول و افت معنی‌دار درصد بقای سلولی نشده‌اند. می توان پیش‌بینی نمود که نوردهی سلول‌ها در دوزها و محدوده طول موج ٦٧٠ نانومتر، به تنهایی موجب تحریک تکثیر و بقای سلول‌ها نخواهد شد. همچنین محدوده پرتوهای با قله طول موج ٦٣٠ نانومتر، تا دوز ٥٤/٠ ژول بر سانتیمترمربع با دانسیته توان ٩٠ میلی‌وات بر سانتیمترمربع به تنهایی موجب تحریک تکثیر یا بقای سلول‌های وهی١٦٤ نشده است. اما از آنجا که پالس‌های ٩٠٠ ولت بر سانتیمتر با همراهی دوز نوری کافی در طول موج ٦٣٠ نانومتر به بقای بیشتر سلول‌ها کمک کرده است، دو فرضیه محتمل بنظر می رسد:

- با افزایش دوز نوری میتوان اثر تحریک زیستی طول موج ٦٣٠نانومتر را اثبات نمود.
- چنانچه پالسهای الکتریکی بقا و تکثیر سلولی را مختل نکنند، می توانند آثار زیستی را تحریک نمایند.

بر اساس نتایج بدست آمده با رنگ داروی ای ال‌ای بنظر می رسد که:

ای ال‌ای در غلظت‌های بکاررفته در این تحقیق، در تاریکی بدون اعمال پالس‌های الکتریکی سمیت ایجاد نکرده است. بعد از دو ساعت انکوباسیون سلول‌ها با ای ال‌ای در غلظت ١ میلی مولار، با اعمال پالس‌های الکتریکی ٩٠٠ و ١٠٠٠ولت بر سانتیمترحتی در تاریکی سمیت ایجاد شده است. بنظر می‌رسد علت این پدیده، فعال شدن پروتوپورفیرین٩، تحت تاثیر پالس‌های الکتریکی بوده باشد. این اثر در غلظت پایین ای ال‌ای مشاهده نشده است. پیش‌بینی می‌شود برای مشاهده اثر فعال سازی الکتریکی، می بایست غلظت رنگ‌دارو از حد معینی بیشتر باشد. در غلظت یک میلی مولار و دوز نوری کمتر، بین نمونه‌های پالس گرفته و بدون پالس، همچنین بین دو دوز الکتریکی بررسی شده، تفاوت معنی‌دار در درصد بقای سلولی وجود دارد. در حالی که با افزایش دوز نور، تاثیر پالس‌های الکتریکی کمتر قابل آشکارسازی بوده است. با توجه به وجود تفاوت معنی دار بین نمونه های بدون دریافت پالس و نور با نمونه هایی که در غلظت بالاتر رنگ دارو در غیاب نور، پالس دریافت کرده اند، پیش‌بینی می‌شود در صورت اعمال دوز الکتریکی پس از انکوباسیون سلول‌ها با ای ال‌ای، با افزایش دوز رنگ‌دارو تاثیر پالس بر فعال سازی رنگ‌دارو در تاریکی، بهتر خودنمایی کند. همچنین بنظر می‌رسد تاثیر پالس‌های الکتریکی١٠٠٠ ولت بر سانتیمتر در فعالسازی ای ال‌ای بیش از پالس‌های الکتریکی٩٠٠ ولت بر سانتیمتر باشد. با توجه به آنکه اختلاف معنی‌دار بین دوزهای نوری ١٦ و ٥٤ ژول بر سانتیمترمربع در گروه ٩ وجود ندارد، بنظر می‌رسد اعمال دوز نوری کمتر از٥٤ ژول بر سانتیمترمربع با همراهی پالس‌های الکتریکی١٠٠٠ ولت بر سانتیمتر بعد از انکوباسیون دو ساعته سلول‌ها با ای ال‌ای، نیز بتواند منجر به مرگ تمام سلول‌ها شود.

بر اساس آزمایشات برون‌تنی که با استفاده از فتالوسیانین روی به عنوان حساس‌کننده نوری با انجام دوساعت انکوباسیون قبل از تحمیل دوز الکتریکی به سلول‌ها ترتیب داده شد، می‌توان موارد زیر را تحلیل نمود:

دوز الکتریکی اعمال شده پس از انکوباسیون سلول‌ها در هر دو غلظت فتالوسیانین روی ، از طریق پالس‌های با قدرت١٠٠٠ ولت بر سانتیمتر توانسته است، موجبات فعال سازی فتالوسیانین روی را بدون نوردهی فراهم آورد. بدین ترتیب پیش‌بینی می‌شود این نتیجه ناشی از ورود رنگ‌دارو به

Archive of SID
www.SID.ir

درون سلول‌ها طی زمان انکوباسیون و فعال شدن رنگ‌دارو تحت تاثیر پالس‌های الکتریکی ۱۰۰۰ ولت بر سانتیمتر باشد. در دوز نوری پایین تر و در غلظت کمتر رنگ‌دارو، تفاوت اثردوز الکتریکی ۱۰۰۰ولت بر سانتیمتر نسبت به نمونه‌های بدون پالس و پالس گرفته با قدرت۸۰۰ ولت بر سانتیمتر، محسوس است. اما با افزایش دوز نور، این تفاوت فقط بین نمونه‌های پالس گرفته خود را نشان داده است. ضمناً در دوز ۸۰۰ ولت بر سانتیمتر با افزایش دوز نوردهی، تغییر محسوسی در بقای سلول‌ها ثبت نشده است. شاید بتوان چنین استدلال کرد که پالس‌های ۸۰۰ ولت بر سانتیمتر کمتر از پالس‌های ۱۰۰۰ولت بر سانتیمتر قدرت فعال سازی رنگ‌دارو را داشته و دوز ۱۰۰۰ ولت بر سانتیمتر در فعال کردن فتالوسیانین روی موفق تر عمل کرده است. در دوز نوری بالاتر و در غلظت بالاتر رنگ‌دارو، تفاوت اثردوز الکتریکی ۸۰۰ و۱۰۰۰ ولت بر سانتیمتر نسبت به نمونه پالس نگرفته، محسوس است. ولی بین خود آنها تفاوت قابل بحثی دیده نشده است. ناگفته نماند که در این موارد به‌ازای دوز نور بکاررفته، درصد بقای سلولی صفر به دست نیامده است و دوز نوری بالاتری برای مرگ کامل سلول‌ها پیش‌بینی می گردد. شاید در این مورد نیز افزایش دوز نور بتواند راهگشای استدلالهای جدیدی باشد. از آنجا که با افزایش دوز نوردهی، تفاوت درصد بقای سلولی در شرایط نوری مشابه، در دو دوز الکتریکی حفظ شده است، بار دیگر فرضیه تاثیر بیشتر دوز الکتریکی ۱۰۰۰ولت بر سانتیمتر در مقایسه با قدرت ۸۰۰ ولت بر سانتیمتر در فعال سازی رنگ‌دارو، قوت می گیرد. به هر حال با استناد به مباحث فوق، به طور کلی کاهش درصد بقای سلولی با افزایش غلظت فتالوسیانین روی، افزایش دوز نور و اعمال پالس‌های الکتریکی ۱۰۰۰ولت بر سانتیمتر بعد از ۲ ساعت انکوباسیون سلول‌ها با رنگ‌دارو، همچنین افزایش سمیت رنگ‌دارو با بالا رفتن غلظت آن در سلول پیش‌بینی می گردد. جمعا" بنظر می رسد، افزودن دوز الکتریکی از طریق اضافه کردن قدرت پالسها بیش از افزایش پهنای زمانی آنها، منجر به بهینه سازی کارآیی فعالسازی الکتریکی رنگ‌داروها میشود. پیشنهاد می‌شود اثر پالسهای الکتریکی در ایجاد تراوایی در سلولها و افزایش نفوذ رنگ‌دارو به درون سلول نیز تحت مطالعه واقع و نتایج مقایسه شوند تا مشخص گردد، اعمال دوز الکتریکی قبل از انکوباسیون با ایجاد تراوایی در کاهش بقای سلولی موثرتر است یا بعد از انکوباسیون با اثر فعالسازی رنگ‌دارو.

٤- تشکر و قدردانی

از سرکار خانم اعظم عباسی و آقای مهندس سعید ابراهیم زاده که در امور کشت سلولی و تجزیه و تحلیل آماری اطلاعات همکاری داشته اند، صمیمانه قدردانی می شود.

منابع

1. Lucroy MD. Photodynamic therapy for companion animals with cancer. Vet Clin Small Anim 2002; 32: 693-702.

2. Schmidt MH, Dawn B, Kenneth W, Todd M, Glenn M, Harry W. Light-emitting Diodes as a Light Source for Intraoperative Photodynamic Therapy. Neurosurgery1996; 38(3): 552-557.

www.SID.ir

3. Hahn SM, Putt ME, Metz J, Shin DB, Rickter E, Menon C, Smith D, Glatstein E, Fraker DL, Busch TM.; Photofrin Uptake in the Tumor and Normal Tissues of Patients Receiving Intraperitoneal Photodynamic Therapy; Clin Cancer Res 2006. 12: 5464-5470.

4. Uzdensky AB, Derkachevab VM, Dergacheva OY, Zhavoronkova AA. A single neuron response to photodynamic effect of various aluminum and zinc phthalocyanines. Life Sciences 2000; 68: 547-555.

5. Wilson BC 2, Patterson MS. The physics of photodynamic therapy. Phys Med Biol 1986; 31(4): 327-360.

6. Ward T, Mooney D, Flynn G, McHalea AP. Electric field-enhanced activation of hematoporphyrin derivative: effects on a human tumour cell line. Cancer Lett 1997; 113: 145-151.

7. LumaCare Company publication; Catalogue of LumaCare system 2002.

۸. آمنه سازگارنیا، کاربرد درمان فتودینامیک در ترکیب با الکتروپوریشن روی سلولهای فیبروسارکوما، پایان‌نامه جهت دریافت درجهٔ .Ph.D در رشتهٔ فیزیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکدهٔ پزشکی، بهمن ماه ۱۳۸۳.

9. Rezzoug H, Bezdetnaya L, A'amar O, Merlin JL, Guillemin F. Parameters Affecting Photodynamic Activity of Foscan® or Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC) In Vitro and In Vivo. Lasers Med So 1998; 13:119-125.

Archive of SID

www.SID.ir