



گزارش نهایی طرح

بررسی اسپکتروفتومتری برهمکنش دو حساسگر نوری متیلن بلو و کورکومین و مقایسه اثر فتودینامیک درمانی آنها بصورت تنها و نانو ذرات زوج یونی در محیط مایسلی پلی اتیلن گلیکول

کد

۳۰۱۱-۱۱

مسئول اجرای طرح

دکتر رضا حسین زاده

محل اجراء:

واحد سازمانی مجری: جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران

۱۳۹۷



گزارش نهایی طرح

بررسی اسپکتروفتومتری برهمکنش دو حساسگر نوری متیلن بلو و کورکومین و مقایسه اثر فتودینامیک درمانی آنها بصورت تنها و نانو ذرات زوج یونی در محیط مایسلی پلی اتیلن گلیکول

کد

۳۰۱۱-۱۱

مسئول اجرای طرح

دکتر رضا حسین زاده

همکاران طرح

دکتر خاطره خرسندی

دکتر محسن فاتح

فدورا خطیبی

محل اجراء:

واحد سازمانی مجری: جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران

۱۳۹۷

مشخصات مسئول و همکاران طرح

ردیف	نام و نام خانوادگی	مسئولیت در طرح	تخصص	رتبه علمی	جمع کل نفر ساعت همکاری در طرح
۱	رضا حسین زاده	مجری و مسئول	بیوفیزیک	استادیار	۶۰۰
۲	خاطره خرسندی	همکار	بیوشیمی	استادیار	۳۵۰
۳	محسن فاتح	همکار	پزشک عمومی	مربی	۸۰
۴	فدورا خطیبی شهیدی	همکار	بیوشیمی	کارشناس پژوهش	۱۶۰

Archive of SID

چکیده

هدف: هدف از مطالعه ی حاضر، استفاده از نانو ذرات زوج یونی متیلن بلو- کورکومین و تک رنگ ها به عنوان حسگر نوری برای مقایسه بهره وری فتودینامیک درمانی (PDT) بر سلول های سرطانی MDA-MB-231 است، همچنین اثر منابع نوری متنوع بر فعال سازی حسگر نوری (PS) در نظر گرفته شده است.

روش ها: نانوذرات زوج یونی با استفاده از ته نشینی یون های با بار مخالف و لیوفیلزه کردن، سنتز شده است. آزمایشات PDT طراحی شد و اثر PSs و منابع نوری (LED قرمز (630nm)؛ تراکم قدرت: 30 mW cm^{-2}) و LED آبی (465nm؛ تراکم قدرت 34 mW cm^{-2}) بر روی رده سلولی سرطان سینه انسانی مورد بررسی قرار گرفت. اثر غلظت PS ($0-75 \mu\text{g.ml}^{-1}$)، زمان انکوباسیون، زمان تابش و منابع نوری و اولویت بندی در تابش نور آبی یا قرمز بررسی گردید.

نتایج: نتایج نشان داد که جفت یونی متیلن بلو و کورکومین فعالیت فتودینامیک هر دو رنگ و سمیت نانو ذرات جفت یونی بر رده سلولی سرطان سینه MDA-231 را افزایش داده است. منابع نور LED آبی و قرمز برای فعال سازی نوری حسگر های نوری استفاده شده است. نتایج نشان می دهد که هر دو رنگ در استفاده از نور LED قرمز بهتر از نور آبی برای تولید اکسیژن یگانه فعال می گردند.

بحث: ته نشینی زوج یونی متیلن بلو- کورکومین درمقیاس نانو نفوذ پذیری سلولی و متعاقبا سمیت هر دو رنگ ها را با هم افزایش می دهد.

کلید واژه: فتودینامیک درمانی، نانوذرات، متیلن بلو، کورکومین، زوج یونی، اکسیژن یگانه، حسگر نوری

فهرست مطالب

فصل اول: ضرورت پژوهش.....	۶
۱-۱ مقدمه	۶
۲-۱ زوج یونی	۸
۱-۱-۲- استفاده از نانوذرات در درمان سلول های سرطانی	۱۲
۱-۱-۳- نورپویا درمانی (فتودینامیک درمانی)	۱۴
۱-۱-۴- متیلن بلو	۱۹
فصل دوم: پیشینه پژوهش	۲۲
۱-۲ فناوری نانو	۲۲
۳-۲ فتودینامیک درمانی	۲۲
۴-۲ متیلن بلو	۲۴
۱-۴-۲ فعالیت نوری MB در کشت سلول	۳۱
۲-۴-۲ نقش متیلن بلو در درمان های بالینی	۳۳
۵-۲ زوج یونی	۳۵
فصل سوم : اهداف پژوهش	۳۹
۱-۳ اهداف و فرضیات	۳۹
۱-۱-۳ هدف اصلی:	۳۹
۲-۱-۳ اهداف ویژه مقطع اول طرح:	۳۹
۲-۳ سوالات یا فرضیات پژوهشی مقطع اول طرح	۳۹
فصل چهارم : روش پژوهش	۴۱
۱-۴ نوع مطالعه	۴۱
۲-۴ مکان و زمان مطالعه	۴۱
۳-۴ جامعه مورد بررسی ، روش نمونه گیری و تعداد نمونه	۴۱
۴-۴ روش اجرای طرح	۴۱
۱۰ تجزیه و تحلیل آماری داده ها	۴۵
فصل ۵ یافته های پژوهش	۴۷
۱-۵ اینتراکشن کورکومین با متیلن بلو	۴۷
۲-۵ مشخصات اسپکتروفتومتر UV-vis و فلورسنس	۴۷

۵۰	۳-۵ افزایش انحلال پذیری با استفاده از PEG-400
۵۲	۴-۵ تصاویر <i>FE-SEM</i> ترکیبات جفت یونی
۵۲	۵-۵ مطالعات بقای زیستی و آزمون <i>MTT</i>
۵۷	۶-۵ تصاویر میکروسکوپ نوری معکوس
۶۱	فصل ۶: بحث و نتیجه گیری
۶۱	۱-۶ خصوصیات رنگها و نانو ذرات جفت یونی
۶۲	۲-۶ تخمین سمیت متیلن بلو و کورکومین
۶۲	۳-۶ اثر تابش <i>LED</i> نور قرمز بر بقای سلولی
۶۲	۴-۶ اثر تابش <i>LED</i> نور آبی بر بقای سلول ها
۶۳	۵-۶ اثر تابش پیوسته <i>LED</i> نور آبی و قرمز بر بقای سلولی
۶۳	۶-۶ مطالعه میکروسکوپی
۶۳	۷-۶ نتیجه گیری
۶۵	فصل هفتم: منابع
۶۸	Abstract



فصل اول

ضرورت پژوهش

فصل اول: ضرورت پژوهش

۱-۱ مقدمه

در ایالات متحده، خسارت‌های اقتصادی سرطان در دنیا در سال ۲۰۰۸ نزدیک به ۸۹۵ میلیارد دلار گزارش گردیده است که رقم بسیار بالایی بوده و اقتصاد ملی کشورهای جهان را تحت تاثیر خود قرار داده است [۱]. در ایران نیز با استناد به گزارش اداره سرطان وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی روزانه حدود ۲۰۰ نفر به سرطان مبتلا می‌شوند که با احتساب این رقم، سالانه ۸۰ هزار مورد سرطانی در کشور حادث می‌شود [۲]. علیرغم هزینه‌های بالای درمان‌های متداول سرطان (شیمی درمانی و پرتودرمانی) پاسخ به درمان ایده آل نبوده و به دلیل تحت تاثیر قرار گرفتن سلول‌های سالم و بروز عوارض درمان، نیاز به کاهش دوز درمان و به طبع آن کاهش پاسخ به درمان وجود دارد [۳، ۴]. در میان انواع سرطان‌ها، سرطان سینه یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در میان زنان ایرانی محسوب می‌شود [۵] این نوع از سرطان نه تنها مشکلات مالی و اقتصادی در پی دارد بلکه با ایجاد استرس‌های عاطفی و روانی که در خانواده‌های کشور بروز می‌نماید باعث مشکلات ثانویه دیگری می‌گردد که می‌تواند لطمات اجتماعی و بالتبع آن صرف هزینه‌های گزافی را در پی داشته باشد. متأسفانه در کشور ما اوج فراوانی سرطان پستان در بین زنان در دهه چهارم و پنجم عمرشان است که طبق گفته بسیاری از پزشکان یک دهه پایین‌تر از آمارهای جهانی است. البته ناگفته نماند خوشبختانه این سرطان از جمله سرطان‌های قابل پیشگیری و قابل تشخیص زودرس است که با ارائه راهکارهای ویژه، می‌توان به کاهش مراجعه دیر هنگام و ارائه درمان مؤثر به منظور افزایش بقاء، کاهش مرگ و ارتقاء کیفیت زندگی بیماران کمک شایانی کرد. اما در حال حاضر سرطان پستان علت اصلی منتهی به مرگ در سنین ۴۰-۷۹ سالگی در زنان است که نقشی مشابه بیماری‌های قلبی عروقی در مردان بازی می‌کند.

یکی از مهمترین موانع در سر راه درمان سرطان، تشخیص دیر هنگام آن است که متأسفانه سبب می‌شود تا فرصت کافی برای مقابله با سلول‌های سرطانی در اختیار کادر پزشکی قرار نگیرد و فرد مبتلا در مدت اندکی پس از تشخیص فوت کند. امروزه فناوری نانو به کمک تشخیص و درمان این بیماری آمده است به گونه‌ای که سبب شده تا سلول‌های سرطانی در حد نانومتر تشخیص داده شوند و با کمک فناوری نانو از بین برده شوند. تشخیص سرطان در مراحل اولیه، در بهبود روش‌های درمانی آن بسیار حائز اهمیت است، در حال حاضر تشخیص و شناسایی سرطان معمولاً بر اساس تغییرات سلول‌ها و بافت‌ها صورت می‌گیرد که این کار

با آزمایش‌های بالینی پزشکی و یا روش‌های مرسوم عکسبرداری قابل انجام است. در این میان برای تشخیص سرطان در همان مراحل اولیه، باید دانشمندان قادر به شناسایی تغییرات مولکولی (حتی اگر در درصد کمی از سلول‌ها بروز کند) باشند. این به معنای حساسیت بسیار بالای روش مورد استفاده است. در این میان قابلیت نانو ساختارها برای ورود به سلول‌ها و آنالیز آنها، نوید بخش انجام این کار است. در واقع کاربرد فناوری نانو در پزشکی در ارتباط با شناسایی به موقع و مبارزه ریشه ای با بیماری سرطان، محور فعالیت‌های پژوهشی در سطح جهان را تشکیل می‌دهد. نانوفناوری می‌تواند به پیدایش تغییرات بنیادی در نحوه برخورد با پدیده سرطان و رویکردهای مراقبت از آن کمک کند. غالب روند های زیستی، نظیر روندهایی که به سرطانی شدن سلولها منجر می‌شوند، در مقیاس نانو شکل میگیرند. برای پژوهشگران فعال در زمینه سرطان، توانائی دستیابی به دارو ها و تجهیزات در مقیاس نانو به منظور ورود به درون سلولهای زنده، امکان کسب دانشهای بی مانندی را هم برای حوزه کلینیکی و هم برای حوزه دانشهای بنیادی فراهم می‌آورد.

فناوری نانو همچنین می‌تواند امکاناتی را برای جلوگیری از پیشرفت بیشتر سرطان موجود ارائه دهد. بعنوان مثال، از دستگاههای در مقیاس نانو، می‌توان جهت جلوگیری از پیشرفت سرطانهای سینه استفاده نمود. فناوری نانو طرحی را ارائه می‌دهد که بتوان پژوهش بر روی ساختار و عملکرد پروتئینها و شیوه فعالیت و تعامل آنها در داخل سلولها را با سایر بررسیهای دیگر علمی تلفیق نموده و از این مجرا به علل بروز سرطان در سطح ملکولی پی برد. از طرفی دیگر فناوری نانو امکان شناسائی و تصویربرداری از تومورهای سرطانی بسیار کوچک (در برگیرنده صدهزار سلول سرطانی شده) را فراهم می‌آورد. روشهای فعلی از این قدرت تشخیصی برخوردار نبوده و تومورهای سرطانی که با این امکانات قابل شناسائی هستند، عموماً باید حامل چندین میلیارد سلول سرطانی بوده و در مراحل بحرانی قرار داشته باشند. با توجه به موارد ذکر شده پیش بینی شده است که طی سال های آتی، فناوری نانو پیشرفتهای چشمگیری در زمینه آشکارسازی زودرس، تصویربرداری ملکولی، ارزیابی از موثر بودن درمان، درمان هدفمند و چندمنظوره و جلوگیری و کنترل سرطان خواهد داشت.

نورپویا درمانی به عنوان یکی از روش‌های درمانی سرطان‌ها و سایر بیماری‌ها مطرح است. افزایش عملکرد سیستم های درمانی نانو ساختارها چندین سال است که در انواع روش‌های درمانی از جمله نورپویا درمانی مورد توجه قرار گرفته است. در طرح حاضر علاوه بر معرفی روش نورپویا درمانی به کاربرد نانومواد در توسعه و بهبود این روش می‌پردازیم. لازم به ذکر است که از نانوذرات بیشتر به عنوان حامل حساسگر نوری استفاده می‌شود، اما بعضی از ترکیبات نانو مانند نقاط کوانتومی به عنوان حساسگر نوری استفاده می

شوند و یا اینکه حساسگر نوری در اندازه نانوذره تهیه شده و بکار برده می‌شود. نورپویادرمانی به عنوان یک روش درمانی غیر تهاجمی، مؤثر و نوین حدود دو دهه ای است که در درمان برخی بیماریهای سرطانی و غیر سرطانی جایگاه خود را باز کرده است [۲].

صرف نظر از جنبه های سخت افزاری کاربرد نانوتکنولوژی در ساخت دستگاههای لیزر و پروب های نوری در فتودینامیک تراپی، استفاده از نانوذرات به عنوان حامل به عنوان یک استراتژی بسیار خوب مطرح است، زیرا نانو مواد پتانسیل برطرف کردن همه ی نیازهای مورد نیاز جهت PDT را دارا هستند. از این لحاظ نانوذرات را بایستی از لحاظ کارایی در بارگذاری (loading) داروها، زیست پراکندگی و کارایی درمانی، ویژه بودن برای بافتهای هدف و سایر جنبه ها بررسی کرد.

۱-۲ زوج یونی

زوج یونی یک جفت شدن یون های با بار مخالف است که با استفاده از جاذبه ی Coulomb بدون شکل گیری پیوند کووالان کنار هم نگه داشته می شوند. مشابه یک واحد یگانه رفتار می کنند. تکنیک زوج یونی هیدروفوبیک برای افزایش هیدروفوبیسیتته مولکول ها شامل گروه های یونیزه از طریق جایگزینی استوکيومتری یون های غیر قطبی با اجزای هیدروفوبیک بیشتر است (Choi and Park, 2000). تحویل زوج یونی به عنوان یک دست آورد قابل قبول برای افزایش انحلال پذیری مولکول های یونی در حلال های غیر قطبی، افزایش انتقال پروتئین و DNA و تحویل داروهای هیدروفیل با زیست سازگاری پایین استفاده می گردد.

سیستم های میکروامولسیون طی چند سال اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده اند. فرمولاسیون بر پایه ی میکروامولسیون ها نسبت به فرمولاسیون های سنتی مزایایی دارد، برای مثال: پایداری ترمودینامیکی، افزایش انحلال پذیری دارو و راحتی ساخت.

میکروامولسیون ها برای ابزارهای تحویل موضعی داروها کارآمد هستند، نتایج بدست آمده برای ۸- متوکسالن^۱ پیشنهاد می کند که این حاملین می توانند به عنوان پروموتورهای کارا برای محلی سازی دارو در پوست به کار روند.

¹ 8-methoxsalen

PDT یک روش درمانی غیر تهاجمی با فرآیند ترمیم سریع است که جای زخمی بر جای نمی گذارد. با توجه به این حقیقت که بسیاری از حسگرهای نوری ترکیبات هیدروفوب هستند بنابراین تمایل به تجمع در محیط آبی دارند. این محدودیت منجر به جذب ضعیف حسگر نوری در سلول های توموری می شود که به طور معنی داری از کارآمدی PDT می کاهد [۶]. به همین جهت روش های متنوعی برای انتقال PSs های غیر قابل انحلال در آب مثل انتقال کورکومین به سلول ها به کار گرفته شده است [۷-۱۴]. از طرف دیگر بعضی از مشکلات مرتبط با PS انحلال پذیر در آب مثل متیلن بلو است، با توجه به کاهش ساده آن که توسط ترکیبات کاهنده (مثل آسکوربیک اسید) در سلول ها و ارگان ها رخ می دهد [۱۵، ۱۶]. دایمریزاسیون برپایه ی غلظت می تواند بر کارایی PDT متیلن بلو اثر گذار باشد [۱۶-۱۸]. این یک حقیقت است که برای سلول های سرطانی و بافت ها باید در نظر گرفته شود که اطراف میکرو محیط سلولی با توجه به متابولیسم بی هوازی سلول های سرطانی pH پایین تر است. با توجه به این محدودیت ها تحقیقات متنوعی برای غلبه بر این مشکلات و افزایش نتیجه ی ثمره کوانتومی PDT انجام شده است.

جفت یونی (IP) بین هر دو یون های با بار مخالف از طریق نیروی Coulombic به عنوان پیوند فیزیکی شکل می گیرد. هر دو یون ها با هم در کمپلکس جفت یونی مشابه یک واحد یگانه رفتار می کنند. گزارش شده است IP هیدروفوبیسینی داروهای قطبی را بهبود بخشیده و متعاقبا میزان انتقال آنها را از میان غشای سلول افزایش می دهد. کاهش هیدروفیلیسیته داروهای یونی مثل متیلن بلو به وسیله ی جفت یونی با یون های با بار مخالف مناسب به منظور کاربردهای تحویل دارو و زیست سازگاری امیدوارکننده خواهد بود. همچنین زوج یونی می تواند ابزار ارزشمندی برای افزایش پایداری و زیست سازگاری داروها در سیستم بدن باشد. با استفاده از دستاوردهای جدید در ترکیب با زوج یونی، کارایی و زیست سازگاری دارو می تواند بهبود یابد. نانو حاملین یا سیستم های نانو دارویی برای تحویل حسگر نوری به سلول های تومور یکی از روش های پیشگیرانه در تحویل دارو است. اندازه نانو متری نانو ذرات PS یا حاملین PS مزیت خوبی برای تحویل PS به سلول های سرطانی و بافت ها ایجاد می کنند. با توجه به اندازه زیر سلولی، نانو ذرات می توانند در عمق بافت ها و سلول ها نفوذ کنند [۲۰-۲۳].

در مطالعه حاضر ما یک سری از آزمایشات فتودینامیک درمانی با استفاده از رنگ حسگر نوری تکی (کورکومین و متیلن بلو) و نانو ذرات جفت یونی (کورکومین- متیلن بلو) برای تشخیص کارایی PDT بر سلول های سرطانی MDA-MB-231 استفاده کردیم.

با توسعه فناوری نانو در بخش پزشکی می‌توان محصولاتی تولید کرد که به طور مستقیم و غیرمستقیم بر ارتقای سلامت انسان و بهداشت جامعه تأثیر گذارند. فناوری نانو می‌تواند از به وجود آمدن عوارض ناخواسته جلوگیری کند. سه محدوده اصلی وجود دارد که فناوری نانو می‌تواند این انقلاب را ایجاد کند: تشخیص، درمان و پیشگیری. افق آینده علم پزشکی دستیابی به فناوری‌هایی است که در نهایت سلامت بشر را تضمین می‌کنند. موضع این فناوری‌ها کاملاً پیشگیرانه است، یعنی تشخیص و توقف عوامل ایجاد بیماری در بدن، قبل از آنکه بیماری شروع به فعالیت کند. استفاده از ترکیبات و ساختارهای طبیعی در تحقیقات فناوری نانو جایگاهی ویژه دارد. نانوپزشکی حوزه کاربرد رویکردها، نظریه‌ها، دستگاه‌ها و ادوات مقیاس نانو و نانو ساختارهای ویژه به منظور شناخت، پیشگیری و یا درمان بیماری‌ها از طریق آشکارسازی، ترمیم و بازسازی بافت‌های زیستی آسیب دیده در سطوح مولکولی است. هدف فناوری نانودر پزشکی، ارائه امکانات آسیب شناسی و درمان آن‌ها در مقیاس‌های بنیادی یعنی مولکولی و یا حتی ریزمولکولی است.

کاربرد نانوفناوری در پزشکی مسلماً در آینده بسیار نزدیک، در رسیدن به اهداف اصلی یعنی شناخت پایه بیماری‌ها و راه‌های مقابله با آنها دنیای جدیدی را پیش روی ما قرار خواهد داد. در این قسمت به نقش فناوری نانو در درمان سرطان اشاره می‌کنیم. امروزه ابتلای به سرطان یکی از موارد شایع مرگ و میر به شمار می‌آید. سرطان پرهزینه‌ترین بیماری جهان و مهم‌ترین عامل مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته و یا در حال توسعه به شمار می‌رود. یکی از مهمترین موانع در سر راه درمان سرطان، تشخیص دیرهنگام آن است که متأسفانه سبب می‌شود تا فرصت کافی برای مقابله با سلولهای سرطانی در اختیار کادر پزشکی قرار نگیرد و فرد مبتلا در مدت اندکی پس از تشخیص فوت کند. امروزه فناوری نانو به کمک تشخیص و درمان این بیماری آمده است به گونه‌ای که سبب شده تا سلولهای سرطانی در حد نانومتر تشخیص داده شوند و با کمک فناوری نانو از بین برده شوند. تشخیص سرطان در مراحل اولیه، در بهبود

روش‌های درمانی آن بسیار حائز اهمیت است، در حال حاضر تشخیص و شناسایی سرطان معمولاً بر اساس تغییرات سلول‌ها و بافت‌ها صورت می‌گیرد که این کار با آزمایش‌های بالینی پزشکی و یا روش‌های مرسوم عکسبرداری قابل انجام است. در این میان برای تشخیص سرطان در همان مراحل اولیه، باید دانشمندان قادر به شناسایی تغییرات مولکولی (حتی اگر در درصد کمی از سلول‌ها بروز کند) باشند. این به معنای حساسیت بسیار بالای روش مورد استفاده است. در این میان قابلیت نانو ساختارها برای ورود به سلول‌ها و آنالیز آنها، نوید بخش انجام این کار است. در واقع کاربرد فناوری نانو در پزشکی در ارتباط با شناسایی به موقع و مبارزه ریشه‌ای با بیماری سرطان، محور فعالیتهای پژوهشی در سطح جهان را تشکیل می‌دهد. نانوفناوری می‌تواند به پیدایش تغییرات بنیادی در نحوه برخورد با پدیده سرطان و رویکردهای مراقبت از آن کمک کند. غالب روند‌های زیستی، نظیر روندهایی که به سرطانی شدن سلولها منجر می‌شوند، در مقیاس نانو شکل می‌گیرند. برای پژوهشگران فعال در زمینه سرطان، توانایی دستیابی به دارو ها و تجهیزات در مقیاس نانو به منظور ورود به درون سلولهای زنده، امکان کسب دانشهای بی‌مانندی را هم برای حوزه کلینیکی و هم برای حوزه دانشهای بنیادی فراهم می‌آورد.

فناوریهای مقیاس نانو می‌توانند فناوری تعیین کننده‌ای باشند که امکان درمانهای شخصی سرطان را فراهم کنند، یعنی بیمار سرطانی آن داروهائی را دریافت کند که دقیقاً در ارتباط با ویژگیهای ژنتیکی و مولکولی او بوده و برای نوع مشخص سرطان وی ساخته شده‌اند.

فناوری نانو همچنین می‌تواند امکاناتی را برای جلوگیری از پیشرفت بیشتر سرطان موجود ارائه دهد. بعنوان مثال، از دستگاههای در مقیاس نانو، می‌توان جهت جلوگیری از پیشرفت سرطانهای سینه استفاده نمود. فناوری نانو طرحی را ارائه می‌دهد که بتوان پژوهش بر روی ساختار و عملکرد پروتئینها و شیوه فعالیت و تعامل آنها در داخل سلولها را با سایر بررسیهای دیگر علمی تلفیق نموده و از این مجرا به علل بروز سرطان در سطح ملکولی پی برد. از طرفی دیگر فناوری نانو امکان شناسایی و تصویربرداری از تومورهای سرطانی بسیار کوچک (در برگیرنده صدهزار سلول سرطانی شده) را فراهم می‌آورد. روشهای

فعلی از این قدرت تشخیصی برخوردار نبوده و تومورهای سرطانی که با این امکانات قابل شناسائی هستند، عموماً باید حامل چندین میلیارد سلول سرطانی بوده و در مراحل بحرانی قرار داشته باشند. با توجه به موارد ذکر شده پیش بینی شده است که طی سال های آتی، فناوری نانوپیشرفتهای چشمگیری در زمینه آشکارسازی زودرس، تصویربرداری ملکولی، ارزیابی از موثر بودن درمان، درمان هدفمند و چندمنظوره و جلوگیری و کنترل سرطان خواهد داشت.

۱-۱-۲- استفاده از نانوذرات در درمان سلول های سرطانی

نانوذرات و نانوابزارها نقشی بی نظیر و حیاتی را در تبدیل دانش به پیشرفت های مفید بالینی در زمینه تشخیص و درمان سلول های سرطانی ایفا می کنند، کاری که با انجام آن روند تشخیص و درمان و نهایتاً پیشگیری از سرطان کاملاً متحول خواهد شد. استفاده از این نانوذرات به عنوان دارو و برای درمان سلول های بدخیم سرطانی هیچ گونه تأثیر سوئی بر سلول ها و بافت های سالم بدن بر جای نمی گذارند. پس از رسیدن این نانوذرات به تومورها، داروهای درون آنها با استفاده از روشهای مختلفی از جمله توسط نور لیزر فعال می شوند. این نانوذرات همچنین قادر به مشخص نمودن میزان تأثیر درمان بر سلول های بدخیم می باشند. این ایده بزرگ که تنها با تزریق یک عامل بتوان تشخیص، درمان و گزارش در مورد میزان اثر بخشی درمان را انجام داد، امری است که فقط با کمک فناوری نانو میسر می شود. یکی از امید بخش ترین کاربردهای نانو ذرات، می تواند به بکارگیری آنها به منظور انجام هم زمان دو عمل تشخیص تومور و رساندن دارو به تومور باشد.

به گفته اندرو ون اشنباخ سرپرست انستیتو ملی سرطان آمریکا، فناوری نانو در حال جذب بزرگترین دانشمندان از سراسر دنیا در زمینه های گوناگون علمی و مهندسی می باشد و هدف آن معطوف و هماهنگ کردن استعدادها و ذهن آنها بر روی حل مسائل و مشکلاتی است که بر سر راه تحقیقات در مورد تجهیزات درمان بالینی وجود دارد. به عقیده وی نانومواد و نانوابزارها نقشی بی نظیر و حیاتی را در تبدیل دانش به پیشرفتهای مفید بالینی در زمینه تشخیص و درمان سلول های سرطانی ایفا میکنند، کاری که با

انجام آن روند تشخیص و درمان و نهایتاً پیشگیری از سرطان کاملاً متحول خواهد شد. مثالی که میتواند به منظور درک بیشتر پتانسیل وسیع فناوری نانو در زمینه تغییر روشهای تشخیص و درمان سرطان به کار رود استفاده از نانوذرات میباشد. دکتر Prasad Paras از گروه شیمی دانشگاه بوفالو و دکتر kopelman Raoul از گروه فیزیک دانشگاه میشیگان، نانوذرات کروی تولید نمودند که شکلی شبیه به توپهای تنیس، البته با ابعادی برابر با یک ده هزارم یک سر سوزن دارند. این نانوذرات به طور همزمان قادر به تشخیص تومورهای سرطانی بسیار ریز و نیز انتقال داروهای بسیار مؤثر و نابود کننده این سلولها در یک موجود زنده میباشدند. استفاده از این نانوذرات به عنوان دارو و برای درمان سلولهای بدخیم سرطانی هیچگونه تأثیر سوئی بر سلولها و بافتهای سالم بدن بر جای نمیگذارند (کتاب آشنایی با فناوری نانو (کاربردها) سلیمی، طاهری، احمدوند).

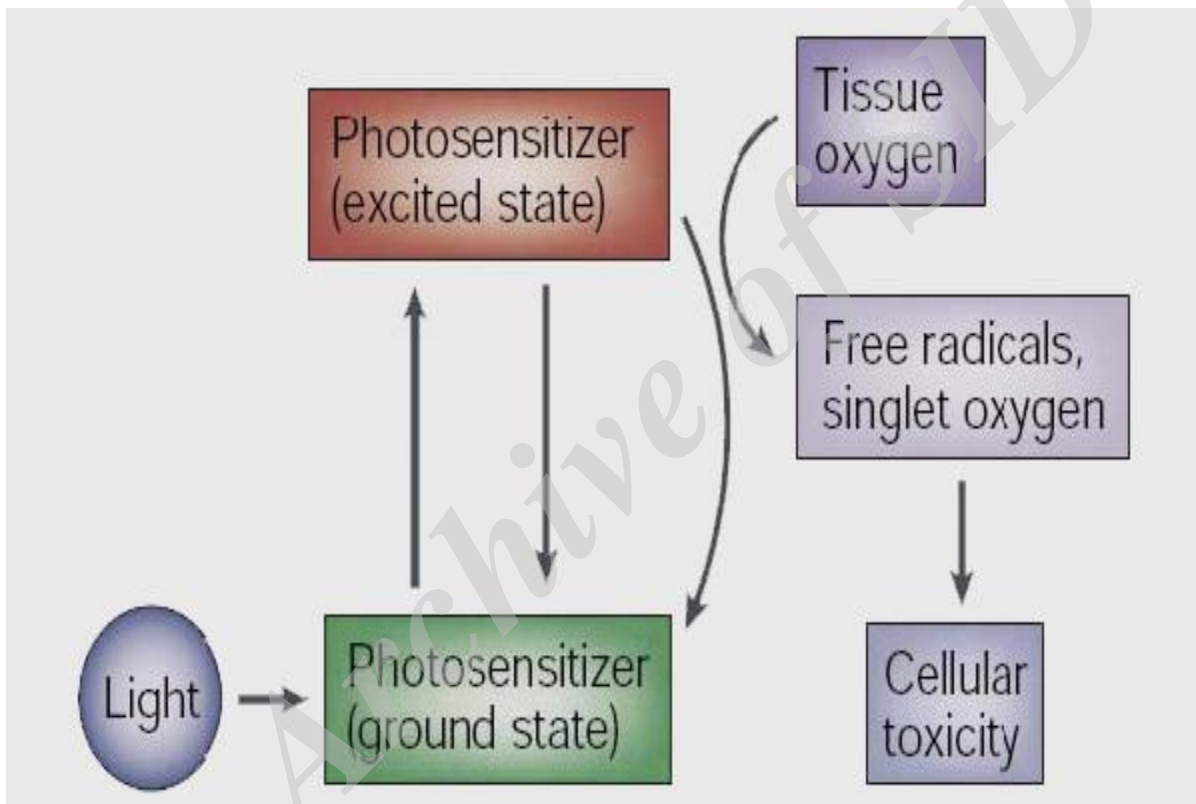
در ایالات متحده، خسارت‌های اقتصادی سرطان در دنیا در سال ۲۰۰۸ نزدیک به ۸۹۵ میلیارد دلار گزارش گردیده است که رقم بسیار بالایی بوده و اقتصاد ملی کشورهای جهان را تحت تأثیر خود قرار داده است [۱]. در ایران نیز با استناد به گزارش اداره سرطان وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی روزانه حدود ۲۰۰ نفر به سرطان مبتلا می‌شوند که با احتساب این رقم، سالانه ۸۰ هزار مورد سرطانی در کشور حادث می‌شود [۲]. علیرغم هزینه‌های بالای درمانهای متداول سرطان (شیمی درمانی و پرتودرمانی) پاسخ به درمان ایده آل نبوده و به دلیل تحت تأثیر قرار گرفتن سلولهای سالم و بروز عوارض درمان، نیاز به کاهش دوز درمان و به طبع آن کاهش پاسخ به درمان وجود دارد [۳، ۴]. در میان انواع سرطان‌ها، سرطان سینه یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در میان زنان ایرانی محسوب می‌شود [۵] این نوع از سرطان نه تنها مشکلات مالی و اقتصادی در پی دارد بلکه با ایجاد استرس‌های عاطفی و روانی که در خانواده‌های کشور بروز می‌نماید باعث مشکلات ثانویه دیگری می‌گردد که می‌تواند لطمات اجتماعی و بالتبع آن صرف هزینه‌های گزافی را در پی داشته باشد. متأسفانه در کشور ما اوج فراوانی سرطان پستان در بین زنان در دهه چهار و پنج عمرشان است که طبق گفته بسیاری از پزشکان یک دهه پایین‌تر از آمارهای

جهانی ست. البته ناگفته نماند خوشبختانه این سرطان از جمله سرطان های قابل پیشگیری و قابل تشخیص زودرس است که با ارائه راهکارهای ویژه، می توان به کاهش مراجعه دیر هنگام و ارائه درمان مؤثر به منظور افزایش بقاء، کاهش مرگ و ارتقاء کیفیت زندگی بیماران کمک شایانی کرد. اما در حال حاضر سرطان پستان علت اصلی منتهی به مرگ در سنین ۷۹-۴۰ سالگی در زنان است که نقشی مشابه بیماری های قلبی عروقی در مردان بازی می کند.

۱-۳-۱ نورپویا درمانی (فتودینامیک درمانی)

نورپویا درمانی به عنوان یکی از روش های درمانی سرطان ها و سایر بیماری ها مطرح است. افزایش عملکرد سیستم های درمانی نانوساختار ها چندین سال است که در انواع روش های درمانی از جمله نورپویا درمانی مورد توجه قرار گرفته است. در طرح حاضر علاوه بر معرفی روش نورپویا درمانی به کاربرد نانومواد در توسعه و بهبود این روش می پردازیم. لازم به ذکر است که از نانوذرات بیشتر به عنوان حامل حساسگر نوری استفاده می شود، اما بعضی از ترکیبات نانو مانند نقاط کوانتومی به عنوان حساسگر نوری استفاده می شوند و یا اینکه حساسگر نوری در اندازه نانوذره تهیه شده و بکار برده می شود. نورپویا درمانی به عنوان یک روش درمانی غیر تهاجمی، مؤثر و نوین حدود دو دهه ای است که در درمان برخی بیماریهای سرطانی و غیر سرطانی جایگاه خود را باز کرده است [۲]. این روش بر تأثیر متقابل دو فاکتور استوار است، فاکتور اول ماده حساسی به نور که دارای دو ویژگی اساسی می باشد. ویژگی اول - توانایی جذب انتخابی در سلولهای آتیپیک سرطانی (بافت تومورال) است در حالیکه در سلولهای سالم مجاور، جذب تقریباً صورت نمی گیرد (و یا آنقدر کم است که به حساب نمی آید) و ویژگی دوم ایجاد تعاملات فتوبیوشیمیایی در اثر تابش طول موج معینی (بسته به نوع ماده حساسگر) از اشعه (عمدتاً لیزر) است که اساس کار درمانی را تشکیل می دهد. بدین شکل که با تابش نور با طول موج مناسب (به عنوان فاکتور دوم) به حساسگر، مولکول نور را جذب کرده و برانگیخته شود و در ادامه با برگشت به حالت پایه یک

تابش نوری داشته باشد ولی اکثر حساسگرها فلورسانس ضعیفی دارند بنابراین با یک تبدیل الکترون اسپین به حالت سه گانه می روند و این امر باعث انتقال انرژی به اکسیژن و یا مولکولهای اطراف که بعدا با اکسیژن واکنش می دهند می شود. این واکنش ها منجر به ایجاد رادیکال آزاد و یا یونهای رادیکالی می شوند این مواد در ادامه با اکسیژن مولکولی در حالت پایه واکنش داده و تولید رادیکال های آنیون سوپراکسید هیدروژن پراکسید و هیدروکسیل می کنند. بنابراین می توان از عنصر اکسیژن به عنوان فاکتور سوم و یا شرط انجام چنین تعاملاتی نام برد که این عنصر در شرایط بافت های بدن بطور طبیعی وجود دارد (شکل ۱).



شکل ۱. مکانیسم و مراحل انجام نورپویا درمانی

۱-۱-۳-۱ مکانیسم درمان

مکانیسم درمان اساسا یک اثر فتوبیوشیمیایی است. پس از اینکه ماده به سلولهای بافت هدف (توموری) وارد شد، با تابش نور لیزری که دارای طول موج معینی می باشد، (برای خانواده داروهای پورفورین ها

۶۳۰-۶۲۸ نانومتر و برای خانواده داروهای کلرین ۶۶۲-۶۶۰ نانومتر) دو دسته تغییرات به وقوع می پیوندد.

الف) در اثر تابش نور، اکسیژن موجود در بافت به حالت برانگیخته ای بنام اکسیژن یگانه در می آید که همراه با ایجاد رادیکالهای آزاد بر روی بافت سرطانی اثر کرده و آنرا از بین می برد. در حال حاضر محققین همگی بر این موضوع اتفاق نظر دارند که اثر درمانی PDT نتیجه تولید اکسیژن یگانه تحت شرایط فعالسازی حساس کننده نوری به وسیله نور می باشد [۸]. اما بایستی مد نظر داشت که پروتکل های کلینیکی استاندارد برای PDT به جای تکیه بر محاسبه یا اندازه گیری دوز اکسیژن یگانه، بر اساس مصرف مقدار از پیش تعیین شده ای دارو و نور می باشند [۸]. تحقیقات انجام شده بر روی حیوانات نشان می دهد که استفاده از یک پروتکل کلینیکی معین که بر اساس دوز داروی مصرفی و دوز نور تابشی است، پاسخ درمانی بسیار گسترده می باشد؛ به طوری که هم شامل "پاسخ درمانی کامل" و هم "هیچ گونه پاسخ درمانی" است [۹].

ب) مکانیسم دیگر یک اثر عروقی است، بطوریکه PDT باعث افزایش فاکتورهای چون هیستامین و هیستامین و تومور نکروزیس فاکتور آلفا ($TNF(\alpha)$) می شود. بصورت ماکروسکپی این پروسه با اریتم (قرمزی غیرطبیعی پوست) و ادم همراه است و از لحاظ میکروسکوپی تخریب سلولهای اندوتلیال، انعقاد پلاکتی، و خونریزی را شاهد هستیم. علاوه بر اینها تحقیقاتی در دست انجام است که بررسی ایمینونولوژیک PDT را مد نظر دارد [۱۰].

۱-۱-۳-۲ برتریهای روش:

۱- بدلیل انتخابی بودن جذب ماده ، تخریب ضایعه بدخیم نیز بطور انتخابی صورت گرفته و بافت سالم مجاور تومور مورد تابش قرار گرفته آسیب نمی بیند، علاوه بر آن با سود جستن از روش الحاقی تشخیص PDD که بر اساس اسپکتروفوتومتری (طیف سنجی) میزان جذب ماده در بافت مزبور انجام می پذیرد،

می توان بطور عینی و دقیق مرز بافت سرطانی و سالم را بازشناسی کرد و تنها بر روی بخش سرطانی تابش داد مشابه کاری که جراحان به هنگام توده برداریهای این چینی، با برداشتن حاشیه‌ای از بافت سالم انجام می دهند و روشی نسبی و غیر دقیق است.

۲- انجام مراحل درمانی بسیار ساده بوده و تقریباً غیر تهاجمی است.

۳- در مقایسه با دیگر روشهای درمانی این دسته از بیماران یعنی جراحی، کموتراپی و رادیوتراپی از

عوارض جانبی بسیار کمتری برخوردار می باشد.

۴- به لحاظ اقتصادی چه برای سیستم درمان عمومی و چه برای بیمار مقرون به صرفه تر است.

۱-۳-۳ نانوتکنولوژی و فتودینامیک تراپی

صرف نظر از جنبه های سخت افزاری کاربرد نانوتکنولوژی در ساخت دستگاههای لیزر و پروب های

نوری در فتودینامیک تراپی، استفاده از نانوذرات به عنوان حامل به عنوان یک استراتژی بسیار خوب مطرح

است، زیرا نانو مواد پتانسیل برطرف کردن همه ی نیازهای مورد نیاز جهت PDT را دارا هستند. از این

لحاظ نانوذرات را بایستی از لحاظ کارایی در بارگذاری (loading) داروها، زیست پراکندگی و کارایی

درمانی، ویژه بودن برای بافتهای هدف و سایر جنبه ها بررسی کرد.

۱-۳-۴ چالش های فتودینامیک تراپی:

فتودینامیک تراپی در درجه ی اول

برای تومورهای سطحی مد نظر قرار می گیرد (از جمله ملانوما، مئانه، مری ...) و معمولاً از نور

غیرگرمایی (۸۰۰-۶۳۰ نانومتر) استفاده می گردد. بایستی توجه داشت که پروتئینها و اجزای بافتهای بدن

و از جمله خون جذب بالایی از نور مرئی را دارند به عنوان مثال هموگلوبین تا ۶۰۰ نانومتر را جذب می

کند [۱]. بنابراین نور مورد استفاده بایستی طول موج بالاتری داشته باشد تا بتواند نفوذ قابل توجهی در

بافت داشته باشد. ولی در طول موجهای بالای ۸۰۰ نانومتر انرژی کافی برای تولید اکسیژن یگانه در

حساس کننده های نوری معمول وجود ندارد بنابراین ظهور سیستمهای حساس به نوری که در طول

موج‌های بالا توان تولید گونه‌های فعال اکسیژن را داشته باشند از جمله امیدهایی است که ظهور نانوتکنولوژی می‌تواند به آنها جامه‌ی عمل ببوشاند.

نکته‌ی قابل ذکر دیگر آبگریز بودن اکثر فتوسنتتایزرهای نوری و تجمع آنها در محیط آبی است بنابراین سیستم‌های حامل نانوذره‌ای در این حیطة بسیار امیدوار کننده‌اند. ضمناً تجمع انتخابی در بافتهای هدف و در نتیجه کاهش اثرات جانبی نیز نقش حامل‌های نانوذره‌ای را بسیار پررنگ‌تر می‌کند.

۱-۳-۵ مشخصات یک فتوسینتتایزر ایده آل

یک Ps ایده آل باید براحتی سنتز شود و قابل دسترسی باشد، تمایل به خود تجمعی (Self-aggregation) حداقل را داشته باشد، ترکیب پایداری باشد، به شدت هیدروفوب نباشد و به راحتی در داخل حامل گذاشته شود، در عدم حضور نور سمی نباشد، جذب نور IR با ضریب مولی خاموشی بالایی داشته باشد، برای بافتهای هدف اختصاصی باشد (target specific) و به سرعت از بدن پاک شود (کلیرانس بالایی) داشته باشد

۱-۳-۶ نانوذرات مورد استفاده در PDT

ملاک‌های تقسیم بندی نانوذرات در PDT بسیار گوناگون است. در یک مقاله مروری که توسط Kumar نوشته شد [۱]، نانوذرات بسته به درگیر شدن در فرآیند PDT به دو نوع فعال و غیر فعال تقسیم می‌شود. حاملهای غیر فعال بنا به اجزای تشکیل دهنده به دو گروه

الف) نانوذرات پلیمری زیست تخریب پذیر

ب) نانوذرات غیرتخریب پذیر مثل نانوذرات سرامیکی و فلزی تقسیم می‌شوند.

نانوذرات فعال بنا به مکانیسم فعالسازی در پروسه فتودینامیک تراپی به ۳ گروه الف) فتوسنتتایزرها: نانوذراتی که انرژی را از نور فرودی به اکسیژن محیطی انتقال می‌دهند مثل

نانوذرات نیمه‌رسانای CdSe

ب) نانوذرات خود تابش شونده (Self-illuminating nanoparticles) این نانوذرات با تابش اشعه X فعال شده و با فلورسانس نور حساس کننده های نوری متصل شده به خود را فعال می کنند. مثل نانوذرات $\text{BafBr:Er}^+, \text{Mn}^+$

ج: Upconverting: (این نانوذرات نور با انرژی کم را به نور با انرژی بالا برای تحریک حساس کننده نوری متصل به خود، تبدیل می کنند و از جمله ی این نانوذرات $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er/Tm}$

۱-۱-۴ متیلن بلو

متیلن بلو یک رنگ حساسگر نوری فنی تیا زینومی است که دارای کاربردهای بسیاری در زمینه های مختلف از جمله در فتودینامیک درمانی است. قدمت کاربرد متیلن بلو در پزشکی به بیش از یک قرن می رسد. بیشترین کاربردهای بالینی متیلن بلو شامل درمان ایزوفسفامید، مت هموگلوبولینمی، سنگ کلیه و سمیت ناشی از سیانید می باشد [7] مکانیسم اثر متیلن بلو در مسمومیت های مت هموگلوبینمی به این صورت است که متیلن بلو در فرم احیاء شده با هموگلوبین های اکسید شده که به فرم متهموگلوبین در آمده اند واکنش اکسایش کاهش داده و آهن هم را که در حالت اکسایش (Fe^{3+}) می باشد را به حالت کاهش یافته (Fe^{2+}) احیا می کند و خود به متیلن بلو اکسید شده تبدیل شده و سپس از طریق ادرار دفع می گردد. تجویز این دارو جهت درمان متهموگلوبولینمی مورد تأیید FDA قرار گرفته است. متیلن بلو قبلاً فقط در درمان موارد متهموگلوبولینمی (مانند مسمومیت با سیانید) استفاده می شد ولیکن اخیراً در درمان آلزایمر نیز مطرح شده است. همچنین فرم خوراکی آن در دندان پزشکی برای تشخیص مناطق دارای پلاک میکروبی دندان و نیز در تشخیص فیستول در جراحی استفاده می شود [7-8].

راندمان کوانتومی بالای متیلن بلو در تولید سینگلت اکسیژن در محدوده تحریک در پنجره درمانی این حساسگر نوری (۶۰۰-۹۰۰ نانومتر) موجب گردیده تا متیلن بلو به عنوان یک حساسگر مناسب برای فتودینامیک درمانی مطرح شود [7-10]. با این حال، استفاده بالینی از متیلن بلو به دلیل خواص

الکتروشیمیایی آن و تغییرات شیمیایی سریع در سیستمهای زنده بسیار محدود شده است. متیلن بلو در بافت زنده با گرفتن الکترون از نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید (NADH) و نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید فسفات (NADPH) احیاء شده و به لوکومتیلن بلوی بی رنگ که دارای فعالیت فتودینامیک درمانی ناچیزی است، تبدیل می شود. حضور آنزیم تیازین ردوکتاز در سطح سلول معمولاً به عنوان اولین عامل کاهنده متیلن بلو شناخته شده است. پس از ورود متیلن بلو به درون سلول عوامل کاهنده درون سلولی نظیر NADH و NADPH دهیدروژنازها موجب کاتالیز احیای متیلن بلو در درون سلول می گردند.

فصل دوم

پیشینه پژوهش

فصل دوم: پیشینه پژوهش

۱-۲ فناوری نانو^۲

فناوری نانو بهره برداری از ویژگی های فیزیکی ، شیمیایی و زیستی مواد در مقیاس اندازه های کمتر از ۱۰۰ نانومتر در علوم و صنایع مختلف می باشد. مطالعات نشان داده است که اگر ذرات یک ماده خاص در حد چند نانومتر کوچک شوند، این ذرات ویژگی های متفاوتی با ذرات اولیه خواهند داشت که از جمله می توان به فضای سطحی بزرگ (بالارفتن فعالیت های فیزیکی، شیمیایی و زیستی)، انحلال پذیری و سطح تحرک بالاتر اشاره کرد. نانو تکنولوژی امروزه با سرعت یالایی در حال رشد است و نانو ذرات به عنوان اجزای اصلی این علم نیز بیشتر تولید می شوند. به عنوان مثال نانو ذرات در صنایع الکترونیکی، بیوسنسور ها ، صنایع غذایی ، رنگ رزی ، کرم های ضد آفتاب و غیره کاربرد دارند. نانو ذرات به علت اندازه فوق العاده کوچک خود به نظر می رسد با مشکل چندان برای عبور از سد های فیزیولوژیکی درون بدن مواجه نیستند و بنابراین به طور مؤثر از طریق جریان سیستم عروقی در بافت های بدن توزیع می گردند [۳۰].

۲-۳ فتودینامیک درمانی

فتودینامیک درمانی (PDT) روش امیدوار کننده ای برای تومورهای گوناگون و بیماری های غیربدخیم است، براساس ترکیب یک حساسگر که به صورت انتخابی در بافت هدف جای گرفته است و تابش با نور مرئی در نتیجه آن آسیب نوری و به دنبال آن مرگ سلولی را سبب می شود. تعداد زیادی از آزمایشات بالینی نشان می دهد که PDT روش مؤثر و ایمنی برای انواع شرایط بدخیمی است. حساسگر نوری انرژی را مستقیماً از منبع نور دریافت کرده که بعداً به مولکول اکسیژن منتقل می کند و فرم فعال اکسیژن که اکسیژن یگانه (1O_2) نامیده می شود ایجاد می کند [۱۷-۱۵]. 1O_2 به شدت الکتروفیل بوده و می تواند پیوند های دوگانه غنی از الکترون در مولکول های زیستی و ماکرومولکول ها را مستقیماً اکسید نماید و باور بر این

² Nanotechnology

است که اکسیژن یگانه، ترکیب سایتوتوکسیک مرتبط با PDT است. حساسگر نوری همچنين می تواند درگیر واکنش های انتقال الکترون که منجر به آسیب القا شده رادیکال در بیومولکول ها می شود را سبب گردد. اینکه بدون تردید اعلام کنیم که کدام یک از این فرآیند ها در Invivo آسیب زنده است، دشوار است ولی هر دو این فرآیندها میتواند منجر به مرگ سلولی گردد [۳۲].

PDT در مقایسه با سایر راهکارهای درمانی سرطان چندین مزیت دارد. اول تقریباً بر همه ی انواع سرطان ها مفید است، نیازی به شیمی درمانی و پرتودرمانی نیست. این فرآیند می تواند در صورت نیاز چندین بار اتفاق بیفتد. چرا که هیچ اثر سمی دیده نشده است و معمولاً روش سرپایی است. جراحی های همراه با PDT معمولاً روش ایمن و مؤثری برای تخریب باقی مانده های توموری هستند و از عود مجدد تومور در محل جلوگیری می کنند. PDT به عنوان یک درمان همراه با جراحی برداشت کلون به کار رفته و اثری بر ترمیم آناستوموز (پیوند بین کانال های ایجاد شده در جراحی) ندارد. وقتی با جراحی و شیمی درمانی همراه می گردد اثر درمانی آنها را افزایش داده و از متاستاز جلوگیری می کند. جلسات متعدد بسیار مفید بوده و نتایج مورد نیاز بیمار بدست می آید. از این ها گذشته به علت ریسک پایین PDT می تواند حتی برای سالمندان و کسانی که ریسک بالایی برای جراحی دارند استفاده شود [۱۵-۱۷].

محدودیت PDT این است که نمی تواند علائم بیماری های پیشرفته منتشر شده را کاهش دهد زیرا تابش نور به تمام بدن با دوزهای مناسب ممکن نیست.

آماده سازی اولیه حساسگر نوری برای PDT بر پایه ی مخلوط کمپلکس از پورفیرین^۳ ها که مشتقات همتوپورفیرین^۴ نامیده می شوند. مطالعات گسترده و تحقیقات بیولوژیکی طی ۲۰ سال گذشته برای شناسایی حساسگر نوری جدید که به دسته های مختلف ترکیبات شامل پورفیرین^۵ ها، کلورین^۵ ها،

³ porphyrin
⁴ haematoporphyrin
⁵ chlorin

فتالوسیانین^۶ها، تکسافرین^۷ها و فنوتیازینیوم^۸ها انجام شده است. داروهایی که در PDT استفاده می شوند به صورت سیستمیک تجویز می گردند اما هم به صورت تزریق داخل توموری و هم به صورت موضعی استفاده می گردند. حساسگرهای نوری که به صورت بالینی استفاده می شوند باید غیر سمی باشند، به صورت گزینشی انتخاب گردند و در بافت های درمانی باقی بمانند و با نفوذ نور فعال گردند (>600) و از نظر فتوشیمیایی کارآمد باشند.

میزان نفوذ نور در عمق تومور بستگی به مشخصات بافت تیمار شده به همراه جذب کروموفور داخلی و داروی حساسگر نوری دارد. طول موج های کمتر از 600nm معمولا به وسیله ی هموگلوبین جذب می گردد، در حالی که لکه های ارتعاشی آب و سایر مولکول ها طول موج های بیشتر از 950nm را جذب می کند. پنجره درمانی پوست محدود به بازه ی 600-950nm است. تابش بافت که با افزایش طول موج به میزان 1/4 قدرت را کاهش می دهد فاکتور دیگری (شاید مهمترین عاملی) است که مانع نفوذ نور می شود. بیشترین عمق نفوذ جذب شده در پنجره درمان در حدود 10mm است [۳۳].

۲-۴ متیلن بلو

متیلن بلو یک رنگ هیستولوژی شناخته شده است که سابقه ی استفاده از آن به سال ها قبل بر می گردد. متعلق به کلاس ترکیبات فنوتیازینیوم است. ویژگی رنگ متیلن بلو به وسیله باند جذب قوی در ناحیه ی 550-700nm با ماکسیمم جذب مولار $85000M^{-1}cm^{-1}$ در 664nm مشخص شده است. طیف جذبی MB به دلیل دایمریزاسیون وابسته به غلظت بودو در آب ثابت تعادلی $3.8 \times 10^3 M^{-1}$ دارد. دایمریزاسیون با افزایش در قدرت یونی افزایش یافته و ممکن است در حضور بار سطحی تماس بسته به نرخ رنگ و سطح تماس افزایش یا کاهش یابد. محصول کوانتوم فلورسنس آن در آب پایین است (ca.0.04) و ممکن است به

⁶ phthalocyanine
⁷ texafrin
⁸ phenothiazinium

عنوان تابعی از حلال به آرامی تغییر کند. اینتراکشن های حل شونده-حل شونده (دایمیرزاسیون و شکل گیری جفت یون) با کاهش محصول کوانتوم فلورسنس همراه است [۳۴].

منومر های MB و دایمر طیف جذبی مشخصی دارند. منومرها جذب حداکثری در طول موج 664nm و دایمرها در 590nm دارند. تفاوت در جذب بین منومرها و دایمرها تسهیل کننده محاسبه ی غلظت گونه های حاضر در محلول است. لازم به ذکر است که در محلول آبی 20 μ M تنها منومرهای MB حضور دارند.

اگرچه بعد از تزریق محلی محلول 2% MB در سلول پایه اپیدرمی تومور در بازوی بیمار، جذب حداکثری در 580nm مشاهده و پیش بینی شد که دایمرهای MB در بافت تومور حضور دارند. همان طور که گفته شد، منومرها و دایمرها ممکن است در انواع متفاوتی از واکنش های فتوشیمیایی حضور داشته باشند. که

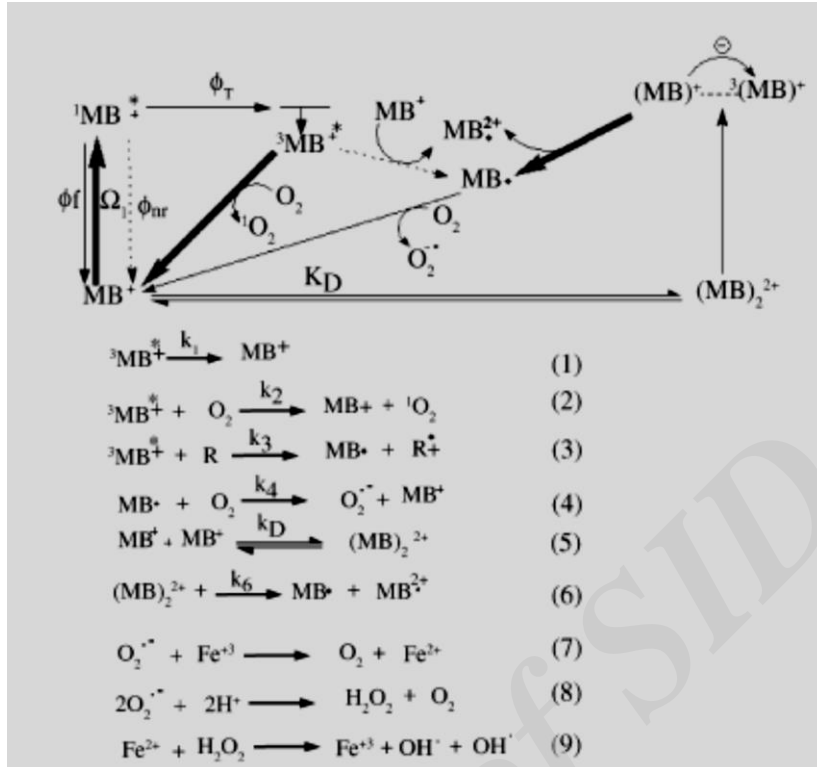
مکانیسم و بهره وری مرگ سلول را تحت تأثیر قرار دهند. MB به طور گسترده ای برای فتواکسیداسون مولکول های طبیعی و سنتزی استفاده شده و در مسیر فتوشیمیایی معمولاً مشاهده می شود: نوع II که

انرژی سه گانه به اکسیژن منتقل شده و اکسیژن یگانه را ایجاد می کند (1O_2)، واکنش (۲) شکل ۱) و نوع I که کاهنده ترکیبات چرخه یک الکترون به MB سه گانه منتقل کرده و رادیکال نیمه احیا را ایجاد می

کند (واکنش (۳) MB شکل ۱). در غلظت بالای رنگ مولکول های سطح پایه ی MB می توانند خودشان به عنوان ترکیبات کاهنده باشند (D-D*mechanism). در محلول های هموزن که دایمری حضور ندارد (

اتانول یا محلول های آبی رقیق شده) MB سه گانه تولید کرده با ثمره کوانتومی بالا ($\phi_T=0.52$)، به

عنوان 1O_2 منبع تولید نور عمل می کند ($\phi_{\Delta} \sim 0.5$). [۲۱]



شکل (۱) واکنش فتوشیمیایی متیلن بلو که 1MB^+* ، 3MB^+* ، MB^+ سطح پایه، یگانه و سطح سه گانه برانگیخته متیلن بلو هستند. $\text{MB}\cdot$ و $(\text{MB})_2^{\cdot+}$ رادیکال متیلن بلو نیمه احیا و نیمه اکسید هستند. Ω_1 جذب نور Φ_T ، Φ_{nr} ، Φ_f به ترتیب ثمره کوانتومی فلورسنس، غیر رادیواکتیو و سه گانه هستند.

در محلول های آبی کارآمدی ${}^1\text{O}_2$ بستگی به pH دارد. سه گانه های MB در سطح برانگیخته هستند، بنابراین pK_a از مقدار منفی در سطح پایه به میزان ۷٫۵ در سطح سه گانه میرسد. در pH تقریباً برابر ۴ درست بعد از پالس لیزر، MB سه گانه مشاهده می شود. اگرچه بعد از صدها نانو ثانیه گونه ی اصلی حاضر در محلول، سه گانه های MBH^{2+} هستند. سه گانه های MBH^{2+} سطح انرژی بالاتری داشته و در نتیجه آنها با اکسیژن با ثابت کمتری واکنش می دهند $k_2 \sim 3 \times 10^8 \text{ s}^{-1}$ ، $k_{\text{MBH}^{2+}} = 2.9 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ ($\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). آنها در محلول هموزن بیشتر باقی می مانند و ${}^1\text{O}_2$ کمتری در حضور سایر مسیرهای واکنش تولید می کنند. بنابراین pH محلول به طور مشخص کارآمدی مکانیسم های حساسگر نوری نوع I و II را تحت تأثیر قرار می دهد. این حقیقت وجود دارد که بافت های توموری تیمار شده با توجه به متابولیسم بی هوازی خود نسبت به حالت طبیعی pH کمتری دارند. MB به بار منفی بین سطح متصل شده و بسته به

غلظت جایگاه اتصال بین سطحی به MB، تجمعات MB مشاهده می شود (تعداد (۵) شکل ۱). با توجه به تحریک الکترونی دایمرها، واکنش های انتقال الکترون مشاهده می شود، منجر به شکل گیری رادیکال های نیمه احیا، نیمه اکسید می گردد. در شرایط غلظت بالای دایمرها، واکنش های نوع II به نوع I تغییر می کند، عملاً حذف 1O_2 (واکنش ۶). رادیکال های رنگی نیمه احیا می تواند با شکل گیری اکسیژن سوپراکسید واکنش دهد (واکنش ۴) که می تواند به چندین گونه ی اکسیژن فعال (ROS)، از جمله رادیکال هیدروکسیل به شدت فعال از طریق واکنش فنتون (واکنش های ۷-۹) بینجامد.

این یافته های مربوط به مکانیسم فعالیت MB در PDT است، چون واکنش های نوری در تماس مستقیم با غشاها، پلی الکترونیک و در حضور ترکیبات کاهنده رخ می دهد. بار غشاها و پلی الکترولیت ها می تواند متفاوت باشد از غشاهای سیتوپلاسمی کمی منفی گرفته تا بارهای به شدت منفی غشای داخلی میتوکندری و پلی الکترولیت ها (نوکلئیک اسیدها و پلی ساکاریدها). این حقیقت که MB ممکن است القا کننده شکل گیری رادیکال (نوع I) یا اکسیژن یگانه، گونه های (نوع II) باشد کاربردهای Mb برای تومور هایی که جایگاهی برای بافت های هیپوکسیک دارند جایی که مکانیسم های نوع II با کارآمدی خوبی رخ نمی دهد، گسترش می دهد.

یکی از بیوپلیمرهایی که به MB تمایل زیادی دارد ملانین است. اتصال انتخابی MB به ملانین نشان داده شده است. این قضیه به خصوص مربوط است به تمایل بالا به بافت های سرطانی رنگدانه ای شده که مشابه آن در ضایعات ملانوما دیده می شود.

واکنش های حساسگر نوری القا شده به وسیله ی تهییج MB به عنوان علتی برای آسیب به چندین بیومولکول شناخته شده است. آسیب اسیدهای نوکلئیک، پروتئین ها و لیپیدها در مقالات توضیح داده شده است. این آسیب ها در فرآیندهای نوع I و نوع II مشخص شده است. در فرآیندهای نوع II پروتئین ها درمقایسه با لیپیدها و نوکلئوتیدها فعال ترند. بیکر و کانوفسکی با استفاده از این تعداد و غلظت میانگین بیومولکول های ایزوله نیمه عمر اکسیژن یگانه داخل سیتوپلاسم سلول را بین $0.2-0.3\mu s$ تخمین زدند و

اغلب اکسیژن های یگانه توسط پروتئین محصور شده اند و تنها 0.1% در انحصار لیپیدها هستند. تابش حساسگر جاگرفته درغشاها منجر به لیز غشا می شود که در نهایت لیز سلول و اندامک ها را در پی دارد. شواهد نشان می دهد که غشاها اهداف کلیدی برای تغییرات نوری⁹ در مدل های تجربی شامل سلول های تومور، سلول های حشرات و سلول های مخمری هستند [35].

بعضی از ویژگی های غشای سلولی آنها را به ویژه درکشتن سلول به وسیله ی PDT خاص می کند: (1) سطح وسیع آنها (2) تمایل حساسگر نوری به محلی شدن در آنها (3) غلظت زیاد پروتئین حاضر در غشای سلول و (4) آسیب به غشای اندامک ها به راحتی می تواند سبب لیز گردد و منجر به عدم تعادل در هموستاز سلول شود.

MB تاریخچه طولانی در ارتباط با پدیده های غشا دارد. سابقا برای مدت زمان طولانی برای درمان متهموگلوبینمی¹⁰ استفاده می شد. این فعالیت های دارویی در سیستم میمتریک مدل سازی شده است و مرتبط با این حقیقت است که امکان احیا داشته که به آن اجازه می دهد در محیط بیولوژیکی احیا و اکسید شده و به این حقیقت اشاره دارد که به راحتی از غشا عبور می کند. عبور MB از غشا در سیستم های میمتریک مطالعه شده و از انتشار منومر MB از میان غشای دو لایه خبر می دهد. اولین حمله اکسیژن یگانه به لیپیدها با واکنش خاصی با پیوندهای دوگانه برای شکل گیری هیدروپروکسید های آلیک است. بهره وری این واکنش بستگی به کمترین پتانسیل یونیزاسیون آلکن ها و دسترسی هیدروژن های آلیک دارد. پروکسیداسیون لیپیدی به چندین اثر مثل افزایش نفوذ پذیری یون، کاهش سیالیت، ارتباط عرضی و غیر فعال سازی پروتئین های غشا مرتبط شده است.

تحریک نوری MB که منجر به پروکسیداسیون لیپیدی در وزیکول های لکتین تخم مرغ می شوند، شناخته شده است. مکانیسم دخیل در حمله اولیه به وسیله O_2^1 تخمین زده شده که 200 بار نسبت به

⁹ photomodification

¹⁰ Methemoglobinemia

واکنش های شروع رادیکال در القای لیز لپیوزوم کارآمدتر است. در وزیکول های ساخته شده از لیپیدهای اشباع لیزی مشاهده نشده است. Grossweiner نشان داد که نرخ لیز وزیکول های تیمار شده با MB و نور با مخلوط محلول درطول فتواکسیداسیون افزایش می یابد. این نتایج به تغییر در ویژگی های فتودینامیک غشای شکل گیری هیدروپروکسید مربوط است [۳۶].

عملکرد فتودینامیک هرکدام از حساسگرهای نوری در سیستم زیستی یک پازل است که توسط متغیرهای گوناگون شامل مکانیسم فتوشیمیایی، محلی سازی حساسگر نوری، فعالیت اهداف زیستی و شبکه پیام رسانی سلولی تحت تأثیر قرار گرفته و هرکدام از آنها بر امکان اثر دیگری مؤثر است. به عبارت دیگر محلی سازی اهداف زیستی را که مکانیسم ها را توضیح می دهد مشخص می کند و بالعکس.

هدف قرار دادن اندامک های زیستی به جای هدف قرار دادن سیستم عروقی تومور مکانیسم تایید شده ی مشتقات دارویی هماتوپورفیرین یک راهکار برای جلوگیری از رشد مجدد تومور بعد از درمان است. در حقیقت هدف قرار دادن میتوکندری موضوع مهم تحقیق در PDT است و آسیب به میتوکندری القا کننده آبشار آپوپتوز است. بار مثبت حساسگر ها با تعادل صحیح اکتانول/آب با تمرکز بر میتوکندری با پتانسیل منفی عملکرد صحیح میتوکندری جذب می گردند. در نهایت، آگاهی از مکانیسم غیرفعالسازی نوری سلول های پروکاریوت و یوکاریوت می تواند ایجاد کننده پروتوکل جدید و کارآمدی برای PDT ایجاد کند.

داروهای لیزوتی لپیوفیلیسیته کافی برای عبور از غشا و بار مثبت که به بار منفی الکتروشیمیایی محیطی ماتریکس میتوکندری جذب می گردد داشته باشند می توانند به عنوان داروی انتخابی میتوکندری را هدف قرار دهند. پتانسیل غشای پلاسمایی و غشای میتوکندری 75-180mV است.

با توجه به مطالعات Paulo Tardivo و همکاران MB یکی از داروهایی است که در چندین بخش سلولی از جمله لیزوزوم و میتوکندری توزیع شده است.

وقتی MB با سوسپانسیون میتوکندری انکوبه می گردد به صورت فعال به این اندامک متصل شده و از راه تحریک شدن به وسیله پتانسیل پروتون میتوکندری داخل ماتریکس می شود. تجمع بیشتر MB در

میتوکندری با افزایش پتانسیل پروتون یا تیمار شدن با غلظت زیاد MB منجر به تشکیل دایمر MB شده که همان طور که قبلا اشاره شد شکل گیری 1O_2 مؤثر کاهش می یابد. همچنین تجمع MB در میتوکندری منجر به احیای آن به Leuco-MB و در نهایت اکسیداسیون میتوکندریایی NAD(P)H می شود. پروتو دهی میتوکندری با پروتون بالا در حضور MB منجر به تولید تقریبی نصف مقدار 1O_2 نسبت به میتوکندری با پتانسیل پروتون پایین می شود، نصف دیگر مربوط به جایگذاری شکل گیری گونه های رادیکال است. این نتایج تغییرات در MB متصل و امکان تجمع در سوسپانسیون میتوکندریایی قویا تولید کارآمد 1O_2 را تحت تأثیر قرار داده که با مطالعات میمتریک غشا هم خوانی دارد که نشان می دهد MB ممکن است القا کننده شکل گیری هر دو رادیکال و گونه های 1O_2 باشد. این اختلافات در خواص فتوشیمی بر اثرات سایتوتوکسیک PDT در حضور MB اثر می گذارد. در واقع، NAD(P)H که در ماتریکس میتوکندری جای گرفته به وسیله ی تحریک نوری MB اکسید شده است که به عنوان حساسگر میتوکندریایی در تمایل طراحی MB است. لازم به ذکر است که رفتار MB نسبت به سایر حساسگرهای نوری PDT مثل فتوفرین¹¹، پروتوپورفیرین¹² IX، AL(III) phthalocyanine chloride و meso-tetra(4-sulfonatophenyl)porphine dihydrochloride.tetrasulfoninc acid ویزودین¹³ که نمی تواند NAD(P)H میتوکندریایی را اکسید کند، متفاوت است. با توجه به تعادل هیدروفیلیک/لیپوفیلیک و تمایل غشایی، انتظار می رود که MB به سایر اندامک های سلولی متصل گردد. اگرچه متمرکز شدن سلولی MB در کشت سلول موضوع بحث انگیزی است. معمولا لیزوزوم به طور مشخص جایگاه متمرکز و فعالیت MB است. سانتوزو همکاران نشان دادند که MB می تواند منجر به رها سازی آنزیم های لیزوزومی موش L و سلول های فیروبلست انسانی تحت تابش با نور مرئی شود. متمرکز شدن میتوکندریایی نیز مشاهده شد. بعضی از نویسندگان پیشنهاد داده اند که متمرکز سازی MB در

¹¹ photofrin

¹² Protoporphyrin IX

¹³ Visudyne

لیزوزوم و مهاجرت آن به هسته تنها بعد از فعال سازی نوری مشاهده می شود. دیگران نشان داده اند که هسته سلول جایگاه اصلی تمرکز است. گاتر و همکاران مشخص کردند که MB فتواکسیداسیون رزجیو گوانین را در DNA داخل سلولی سلول های KB انسانی القا می کند. دلایل احتمالی برای این اختلاف بسته به این حقیقت که تجربیات میکرومحیطی با MB کاربردهای آن را تحت تأثیر قرار می دهد (بهره وری انتشار) وجود دارد. برای مثال حتی اگر MB در میتوکندری رده سلولی خاصی جای گرفته باشد. به راحتی با روش های معمول فلورسنس همراه با متمرکز سازی مشخص نشده است. چراکه به راحتی فرم لوکو به وسیله ی NAD(P)H داخل میتوکندری احیا می گردد. برای حل این مشکل تدابیر مختلفی اندیشیده شده است. آنها برپایه ی رقابت بین مارکهای فلورسنس اندامک و MB برای جایگاه تمرکز سازی هستند.

سیتولوکالیزاسیون^{۱۴} میتوکندریایی مشتقات MB در بعضی از مطالعات مشخص شده است. افزایش متیلاسیون ساختار مولکولی MB مرتبط است با افزایش سایتوتوکسیسیته نوری در سلول ها. این نتایج در تقسیم بندی بزرگتر در غشاها و تمایل کوچکتر در داخل سلول کاهش یافته است [۳۷].

۲-۴-۱ فعالیت نوری MB در کشت سلول

فعالیت فتودینامیک MB در کشت سلول بستگی به متغیرهای رده سلولی دارد. فعالیت نوری MB در کراتینوسیت های انسانی تغییر یافته، سرطان فلسی شدن سلول^{۱۵}، سلول های کلیه و سلول های تومور مغز انسان بررسی شده است. با این حال سلول های اریترولوکمیا به MB همراه با تحریک نور مقاوم هستند. آگاهی از مکانیسم های القای نوری مرگ سلولی پستانداران مسیر مهمی برای تحقیق برای درمان های کارآمدتر برای بیماری های سرطان است. مطالعات کشت سلولی تخمین زده که نور پلی کروماتیک در

¹⁴ Cytolocalization

¹⁵ squamous cell carcinoma

تحریک MB مشابه نور لیزر 662nm عمل کرده و فرصت جدیدی برای اعمال PDT با منبع نوری که در مقایسه با لیزرها بیشتر در دسترس است، گشوده است.

یکی از اشکالات عمده شیمی درمانی سرطان گسترش مقاومت چندگانه دارویی¹⁶ (MDR) سلول های تومر است و مقاومت عرضی با دامنه گسترده ساختاری و عملکردی غیر مرتبط با ترکیبات، درمان این تومور ها را سخت کرده است. با تمرکز بر فنوتیپ ارائه شده در ۵ رده سلولی ، MB قادر به برگرداندن آن است. بنابراین MB این مزیت را دارد که به طور همزمان به عنوان معکوس کننده MDR ترکیب فتودینامیک استفاده شود.

استفاده از آنالوگ های MB تغییر یافته با طول زنجیره های آلکیل متفاوت توسط ملیش و همکاران فعالیت نوری MB و آنالوگ های MB با زنجیره های آلکیل بلند تر در سلول های فیبروسارکوما RIF-1 مطالعه شد. در مطالعات منتشر شده توسط Wainwright و همکاران کارآمدی بیشتری در پروپیل، پنتیل و مشتقات هگزیل که به طور عمده در میتوکندری تجمع می یابند، نشان داده شد.

مرگ سلولی القا شده ممکن است در دو مسیر مختلف رخ دهد: آپتوز یا نکروز ، آپتوز با پیام سلولی داخل و خارج سلولی (intrinsic/extrinsic pathway) به دنبال فعال سازی کاسپاز و قطعه قطعه شدن DNA. در آپتوز ، سلول جمع شده، کروماتین هسته در مقایسه با غشای هسته ضخیم و غلیظ شده و تدریجی سیتوپلاسم و هسته به اجزای آپوپتوتیک شکسته می شوند. نکروز معمولا به هموستاز یونی سلولی آسیب می زند و در نهایت منجر به از دست دادن آب و کاهش پیوستگی غشا می شود. آپتوز به چند علت به نکروز ارجحیت دارد: (۱) در دوزهای کمتر تابش نسبت به نکروز اتفاق می افتد (۲) اثرات ضد التهاب دارد (۳) سلول های مرگ آپوپتوزی سیستم ایمنی را تحریک می کنند.

القای آپتوز و نکروز از طریق مکانیسم های فتوشیمیایی (نوع I یا II) به وسیله انواع سلول و حساسگرهای نوری و دوز نور اتفاق می افتد. در القای آپتوز باید آسیب به حدی شدید باشد که سلول توانایی ترمیم

¹⁶ Multidrugresistant

نداشته باشد و در حدی ملایم باشد که انرژی برای مسیر آپوپتوز تولید کند و از طرف دیگر سلول ممکن است از طریق نکروز بمیرد. حساسگرهای میتوکندریایی به عنوان القا کننده آپوپتوز با بهره وری بالا نسبت به سایر قسمت های سلول شناخته می شوند.

نقش اصلی مکانیسم نوع I و II بعد از تحریک نوری MB داخل سلول جای بحث دارد. اگرچه به خوبی مشخص شده که MB تولید کننده 1O_2 در محلول است، تولید آن از MB داخل سلولی هنوز مشخص نیست. با توجه به توانایی کاهش MB، Tuite و Kelly مکانیسم نوع I را برای MB مهمتر می دانند. برای پاسخ به این سوال که آیا 1O_2 از منبع داخلی MB تولید می شود یا نه انتشار طیف NIR از سلول های Hela تیمار شده با MB اندازه گیری شد. کنترل هایی برای اطمینان از ورود MB به داخل سلول در نظر گرفته شد. و مطالعات تولید 1O_2 از منبع داخلی MB را تأیید کرد. تعدادی گزارش در مقالات وجود دارد که نشان می دهد مشتقات متیلن بلو القاگر آپوپتوز در چندین رده سلولی هستند. ولی مکانیسم القای مرگ سلولی به وسیله ی خود MB هنوز مشخص نشده است. به منظور بررسی اینکه آیا MB و تابش مناسب القا کننده آپوپتوز هستند یا خیر Paulo Tardivo و همکاران سلول های Hela انکوبه شده با MB تحت تابش 634nm لیزر دیود را بررسی نمودند. قطعات DNA وابسته به آپوپتوز از طریق پروپیوم دید در فلوسایتومتری سنجیده شد. ۶۰٫۵٪ سلولها دچار آپوپتوز شدند. درصد آپوپتوز وابسته به غلظت MB و زمان انکوباسیون بعد از تابش است. میزان آپوپتوز در سلول های تیمار شده با MB به همراه تابش بیشتر گزارش شد [۳۸].

۲-۴-۲ نقش متیلن بلو در درمان های بالینی

مطالعات گسترده ای در زمینه درمان بافت های توموری با استفاده از MB انجام شده است. MB به طور انتخابی در تومورهای مشخصی تجمع می یابد. ولی مکانیسم این تجمع هنوز مشخص نیست، ممکن است این تجمع مربوط به تمایل بیشتر به بار منفی سطح و ملانین باشد. با این حال نکته ی منفی که استفاده

گسترده از MB را محدود میکند این است که MB به خوبی مشتقات HPD در تزریق وریدی بافت های توموری را نشان دار نمی کند، شاید به این دلیل که به راحتی در محیط زیستی کاهش می یابد و همچنین به سرعت دفع می گردد.

جنبه درمانی جدیدی با استفاده موضعی MB در تومور و به دنبال آن تابش بعد از یک ساعت بدون حساسگر نوری پوستی توسط Orth و همکاران گزارش شده است. Paulo Tardivo و همکاران منبع نوری ارزان قیمتی به نام RL50® را توسعه دادند که ساطع کننده نوری است که محدوده ی طیف قرمز از ۶۰۰ تا ۷۵۰nm را پوشش می دهد. پرتوهای تابش شده طیف این دستگاه با طیف جذبی محلول MB هم پوشانی دارند. با استفاده از MB همراه با PDT و RL50® آزمایشی بر روی ۱۰ بیمار با ۱۷ نوع تومور سطحی که درمان سیستمی برای آنها امکان پذیر نبود و چندین شخص که عفونت های پوست داشتند، انجام گرفت. سمیتی برای MB مشاهده نشد. بسته به میزان حساسیت بیماران درد و خارش پوستی اتفاق افتاد. ورم و قرمزی بعد از تابش مشاهده شد. بعضی بیماران هنگامی که نور روشن بود، گزارش سوختگی دادند و این علائم بعد از گذشت ۱۲ ثانیه از تابش رخ داد [۳۹].

کارسینوم سلول پایه در محل های مختلف جراحی نمونه ی مناسبی برای درمان PDT با استفاده از MB و RL50® است. پاسخ کامل بیماران به درمان بعد از سه دوره PDT مشاهده می شود. در صورت استفاده از جراحی به همراه رادیوتراپی ریسک آسیب های نورولوژیکی وجود دارد در حالی که استفاده از PDT این ریسک را ندارد. با توجه با انباشت MB بعد از درمان شایع ترین مشکل hyperpigmentation است.

Bernstein و همکاران از PDT به همراه فتوفرین و رنگ لیزر برای درمان سارکوم کاپوسی استفاده کردند که با نتایج خوبی مواجه شدند (۳۲,۵٪ با نتیجه کامل و ۶۳٪ با پاسخ نسبی همراه بوده است.

Paulo Tardivo و همکاران نشان دادند که استفاده از RL50® با تزریق موضعی MB با بهره وری مناسب جراحی های بزرگ ملانوما را بهبود می بخشد. (۶۴,۷۰٪ پاسخ کامل و ۱۷,۶۴٪ پاسخ نسبی به درمان داده اند).

Kalka و همکاران در مقالات خود به استفاده از PDT در بیماری های سرطانی و غیر سرطانی پوست اشاره کرده اند. درمان پسروریاژیس، بیماری های ویروسی مثل HSV1,2، ویروس پاپیلوما ی انسانی در مقالات بررسی شده است [۴۰].

۲-۵ زوج یونی

در این تئوری تشکیل کمپلکس خنثی که به غشا اضافه می گردد و ممکن است به آزادسازی گونه های باردار منجر شود، افزایش می یابد. (Neubert, 1989; Valenta et al., 2000) شکل گیری زوج یونی می تواند نفوذ دارو از میان پوست را از طریق کاهش بار و افزایش هیدروفوبیسیته افزایش دهد. (Barry, 2001; Wang et al., 2008).

زوج یونی یک جفت شدن یون های با بار مخالف است که با استفاده از جاذبه ی Coulomb بدون شکل گیری پیوند کووالان کنار هم نگه داشته می شوند. مشابه یک واحد یگانه رفتار می کنند. تکنیک زوج یونی هیدروفوبیک برای افزایش هیدروفوبیسیته مولکول ها شامل گروه های یونیزه از طریق جایگزینی استوکومیتری یون های غیر قطبی با اجزای هیدروفوبیک بیشتر است (Choi and Park, 2000). تحویل زوج یونی به عنوان یک دست آورد قابل قبول برای افزایش انحلال پذیری مولکول های یونی در حلال های غیر قطبی، افزایش انتقال پروتئین و DNA و تحویل داروهای هیدروفیل با زیست سازگاری پایین استفاده می گردد.

مولکول های دارو باردار به راحت به پوست نفوذ نمی کنند. شکل گیری زوج یونی لیپوفیلیک می تواند نفوذ گونه های باردار را افزایش دهد. این استراتژی شامل اضافه کردن یک گونه باردار با بار مخالف به داروی باردار است، شکل گیری یک زوج یونی بارها را خنثی کرده بنابراین کمپلکس می تواند در استراتوم کورنئوم منتشر شده و نفوذ کند. سپس زوج یونی در میکرو محیط آبی اپیدرم پراکنده می گردد، داروی اصلی باردار آزاد می گردد که می تواند درون بافت های اپیدرم و درم نفوذ نماید. (Megwa et al., 2000; Valenta et al., 2000). Sarveiya et al. (2004) افزایش ۱۶ برابری خروجی سطح steady زوج یونی ایبوپروفین از میان غشای لیپوفیلیک را گزارش داده است. آنها نفوذ PH و زوج یونی بر نفوذ ایبوپروفین از میان غشای پلی دی متیل سیلوکسان را تخمین زده اند. مطالعات انتشار در PH های مختلف (۴،۵،۶،۷ و ۸) نشان داد که خروجی ایبوپروفن سدیم به طور معنی داری با افزایش PH از ۴ به ۷ بالا می رود. بالاتر از PH ۷ یک کاهش در انتشار دیده شد. ضریب نفوذ با یک افزایش در مقدار اسید غیر یونیزه افزایش یافت. ارتباط بین خواص

فیزیکو شیمیایی خروجی سالیسیلات و ضریب یونی تخمین زده شد. مدل های ریاضی برای توسعه خروجی سالیسیلیک اسید از این پارامترهای فیزیکوشیمیایی پیشرفت کرده است. (Megwa *et al.*, 2000). Nash *et al.* (1992) فرضیه جذب زوج یونی با توجه به مسیر موضعی تحویل دارو مورد آزمایش قرار داده است. این مطالعات شامل تهیه انواع زوج یونی لیدوکائین-N- آلکانوات است، بنابراین تعیین مشخصات آنها از طریق رزونانس مغناطیسی اسپکتروسکوپی، تجزیه و تحلیل عنصری و رسانایی انجام شد. Zhang و همکاران (۲۰۰۹) برای ارتقای تحویل ترانس درمال ملوکسیکام، شکل گیری جفت یونی با شش پایه ی ارگانیک، دی اتیل آمین، تری اتیل آمین، اتانول آمین، دی اتانول آمین، تری اتانول آمین و N- (۲- هیدروکسی اتانول) پیپریدین. نویسندگان ثابت کردند که شکل گیری یک جفت یونی ملوکسیکام/آمین در محلول با استفاده از C-NMR (رزونانس مغناطیسی هسته) ثابت کردند. افزایش اثر جفت یونی بر روی نفوذ پوستی Glipizide توسط Tan و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد. اسپکتروسکوپی NMR برای تشخیص شکل گیری زوج یونی بین Glipizide و ضد یون مربوطه و اثر میانکنش با آمین ها به عنوان ضد یون ها، شامل دی اتیل آمین، تری اتیل آمین، اتانول آمین، دی اتانول آمین، تری اتانول آمین، N- (۲- هیدروکسی اتانول) پیپریدین با Glipizide مشاهده شد. تمام آمین های مورد بررسی در این آزمایش افزایش اثر بر روی خروجی Glipizide را نشان دادند، و تری اتیل آمین بیشترین اثر را داشته است.

یک مطالعه ی جامع توسط Trotta و همکاران در ۲۰۰۲ بر روی جفت یونی رتینوئیک اسید (R.A) با استفاده از میکروامولسیون ها به عنوان حاملین تحویل برای تأثیر نفوذ موضعی انجام شده است. فنیل آلانین متیل استر، فنیل آلانین اتیل استر، هیستیدین متیل استر، تریپتوفان متیل استر و والین متیل استر به عنوان ضد یون ها استفاده شدند. نتایج نشان می دهد که میکرو امولسیون حاوی یک ضد یون می تواند برای بهینه سازی هدفمندی دارو بدون افزایش جذب سیستمیک استفاده شود. توزیع آبی لیپوسفرهای جامد حاوی بیش از ۷,۵٪ پیلوکارپین به عنوان جفت یونی لیپوفیلیک توسط Cavalli و همکاران (۱۹۹۵) آماده شد. اندازه لیپوسفرها در رنج ۷۵-۸۵ nm اساسا شامل استتاریک اسید، و لکتین تخم مرغ، پایه ی پیلوکارپین است که به عنوان جفت یونی با منو- اوکتیل فسفات، منو- دسیل فسفات و منو- هگزاد-سیل فسفات گنجانده شده است.

Matschiner و همکاران یک فرمولاسیون با نفوذ بهینه زوج یونی بین اریترومایسین و اوکتادکن سولفونات

را توسعه دادند. لیوفیلیسیتهی ایترومایسین از طریق زوج یونی بهبود بخشیده شد و تخمین لیوفیلیسیتهی بر پایه ی ضرایب پراکندگی و بر پایه ی نفوذ ERY در سیستم غشای چند لایه تغییر یافته تخمین زده شد. نشان داده شد که نفوذ ایترومایسین در یک سیستم پذیرنده لیوفیلی سه برابر بیشتر از زمانی است که زوج یونی در مقایسه با نفوذ ایترومایسین به تنهایی مورد استفاده قرار گرفت.

زوج یونی یک ابزار ارزشمند به منظور افزایش انحلال پذیری و پایداری در یک حلال آلی است. کمپلکس هایی که شکل می گیرد، می تواند به ذراتی با بارگذاری بیشتر دارو فرموله گردد. این تکنیک فرصت های منحصر به فردی در تحویل پلی الکترولیت ها (مثل پپتیدها، پروتئین ها، پلی نوکلئوتیدها) در اختیار ما می گذارد، با استفاده از آنها به عنوان موتیف های زوج یونی هیدروفوبیک برای طراحی ذرات و میکروامولسیون هایی که طی فرمولاسیون نیازمند انحلال پذیری در حلال های آلی هستند. همچنین این دست آورد می تواند پایداری و نفوذ پذیری از میان غشای زیستی را بهبود بخشد. شکل گیری زوج یونی به طور طبیعی تغییری در ساختار و عملکرد دارو ندارد. بنابراین این دست آورد می تواند در طراحی شکل های بهتر دوز برای راه های جایگزین کمک کننده باشد.

بسیاری از مطالعات به اهمیت شکل گیری زوج یونی اشاره کرده است. هنگامی که نمک حاوی هم کاتیون ها و هم آنیون های ارگانیک است، ممکن است درجه ای از هیدروفوبیسیتهی با وجود ویژگی یونی داشته باشد. گزارش شده است که نمک هایی از این نوع ممکن است به عنوان زوج یونی رفتار کنند و می توانند از میان غشاهای هیدروفوب عبور کنند. از آنجایی که استرهای متیل و اتیل بعضی از اسیدهای آمینه می توانند با آنیون های ارگانیک زوج یونی تشکیل دهند.

فصل سوم

اهداف پژوهش

فصل سوم : اهداف پژوهش

۱-۳ اهداف و فرضیات

۱-۱-۳ هدف اصلی:

هدف از مطالعه ی حاضر، استفاده از نانو ذرات زوج یونی متیلن بلو- کورکومین و تک رنگ ها به عنوان حسگر نوری برای مقایسه بهره وری فتودینامیک درمانی (PDT) بر سلول های سرطانی MDA-MB-231 است، همچنین اثر منابع نوری متنوع بر فعال سازی حسگر نوری (PS) در نظر گرفته شده است.

۱-۲-۳ اهداف ویژه مقطع اول طرح:

۱. سنتز نانوذرات زوج یونی و تعیین مشخصات آنها
۲. تعیین خصوصیات اسپکتروسکوپی UV-vis رنگ ها و تعیین مشخصات نانو ذرات جفت یونی با استفاده از FE-SEM
۳. طراحی آزمایش PDT و بررسی اثر غلظت های مختلف آنالیت ها بر سلول های سرطانی
۴. بررسی اثر زمان انکوباسیون و زمان تابش های مختلف بر روی سلول های سرطانی
۵. آزمایش سنجش MTT

۲-۳ سوالات یا فرضیات پژوهشی مقطع اول طرح (Hypothesis):

۱. آیا فتودینامیک درمانی با غلظت های مختلف زوج یونی متیلن بلو-کورکومین بر بقای سلول های سرطانی سینه در مقایسه با گروه متیلن بلو تنها موثرتر است؟
۲. آیا فتودینامیک درمانی با غلظت های مختلف زوج یونی متیلن بلو-کورکومین بر بقای سلول های سرطانی سینه در مقایسه با گروه کورکومین تنها موثرتر است؟



فصل چهارم

روش پژوهش

فصل چهارم : روش پژوهش

۱-۴ نوع مطالعه

نوع این مطالعه آزمایشگاهی سلولی و در محیط *in vitro* می باشد.

۲-۴ مکان و زمان مطالعه

این مطالعه در سال ۱۳۹۵-۱۳۹۶ در گروه پژوهشی فتودینامیک جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران ، اجرا گردید.

۳-۴ جامعه مورد بررسی ، روش نمونه گیری و تعداد نمونه

مطالعه سلولی و نوع سلول : سلولهای سرطانی سینه انسانی رده MDA-MB-231 .

۴-۴ روش اجرای طرح

(۱) آماده سازی نانوذرات زوج یونی

زوج یونی متیلن بلو و کورکومین از طریق تهیه غلظت مناسب متیلن بلو و کورمین آماده سازی شد. محلول کورکومین اندکی در محلول آلكالین برای شکل گیری فرم آنیونیک کورکومین آماده شد. محلول های آماده شده فیلتر شدند. محلول متیلن بلو به صورت قطره ای به محلول کورکومین در شرایطی که مخلوط بهم زده می شد، اضافه گردید. رسوب حاصل به پوشش تفلون اتوکلاو منتقل شد به مدت ۲ ساعت در 120°C قرار گرفت و سپس در دمای اتاق سرد شد. محلول به طور همزمان با استفاده از نیتروژن مایع فریز شد و سپس با استفاده از روش های خشک کردن انجمادی لیوفلیز گردید. پودر بدست آمده در 4°C ذخیره شد و محلول ها آماده شده و و تازه مورد استفاده قرار گرفتند. خصوصیات زوج یونی با استفاده از تصاویر میکروسکوپ FE-SEM و پراکندگی نور پویا تخمین زده شد.

۲) تهیه رده سلولی

رده سلولی MDA-MB-231 سلول سرطان سینه از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه می

شود.

۳) خصوصیات اسپکتروسکوپی UV-vis رنگ ها و تعیین مشخصات نانو ذرات جفت یونی

FE-SEM

طیف جذبی UV-vis با استفاده از اسپکتروفتومتر Cary 100 UV/Vis، مجهز به سلول های کوارتز ثبت شد. طیف جذبی مرتبط با رنگهای تکی (کورکومین و متیلن بلو) و رنگ های زوج یونی اندازه گیری شد و با یکدیگر مقایسه گردید. لازم به ذکر است که پلی اتیلن گلیکول (PEG 400) به عنوان کمک حلال در آماده سازی محلول های آزمایش مورد استفاده قرار گرفت و برای بررسی اثر PEG بر قابلیت زنده ماندن سلول مجموعه ای از آزمایشات در حضور PEG 400 به عنوان نمونه ی مرجع انجام شد. در همه ی آنها PEG اثری نداشت و محیط بی اثری در تمام آزمایشات PDT نشان داد.

برای بررسی دیگر ویژگی های مشخص شده در مورد مشخصات نانو ذرات، تصویر SEM نانو ذرات ثبت گردید. میکروسکوپ الکترونی روبشی- نشر میدان (FE-SEM, Hitachi S-4160, Japan) برای تعیین مشخصات نانو ذرات استفاده گردید.

۴) کشت رده سلولی

به منظور افزایش جمعیت سلولها برای آزمایش، کشت صورت می گیرد. از رده سرطان سینه انسانی MDA-MB-231 که از انستیتو پاستور ایران خریداری شد استفاده گردید. سلول ها در محیط کشت DMEM با 10% FBS ، $100 \mu\text{g/ml}$ ، از استرپتومایسین و 100 IU/ml از پنی سیلین در

انکوباتور با ۵٪ CO_2 در 37°C انکوبه شدند. برای آزمایش سلولها با استفاده از ترپسین ۰.۲۵٪، EDTA ۰.۰۲٪ از فلاسک جدا شدند و با استفاده از PBS سلول ها شسته شدند.

۵) اثر غلظت های مختلف آنالیت ها بر سلول های سرطان پستان انسانی

برای بررسی و مقایسه اثر غلظت های متنوع MB، کورکومین و نانو ذرات IP بر روی کارآمدی فتودینامیک درمانی، یک سری از آزمایشات برای تابش های تاریکی، آبی، قرمز و قرمز/آبی طراحی شد. به طور خلاصه، سلول های MDA-MB-231 در محیط کشت تازه در پتری دیش کاشته شدند و تحت شرایط ۵٪ CO_2 در دمای 37°C برای ۲۴ ساعت قرار گرفتند. سپس سلول ها با محیط کشت تازه حاوی مقدار مشخصی از آنالیت ها (متیلن بلو، کورکومین و نانو ذرات IP) انکوبه گردید. بعد از زمان انکوباسیون مشخص، سلول ها با محلول بافری PBS شسته شدند. یکی از پلیت های تیمار شده به عنوان پلیت مرجع (بدون تابش تاریکی) در نظر گرفته شد و در سایر پلیت های تابیده شده از منبع نوری LED قرمز و آبی در نظر گرفته شد. پلیت اول تنها با نور آبی برای مدت ۳۰ ثانیه تابیده شد. برای پلیت دوم از تابش زیر نور قرمز برای ۳۰ ثانیه استفاده شد. پلیت سوم برای آزمایشات تابش ترکیبی در نظر گرفته شد (۱۵ دقیقه نور قرمز و سپس ۱۵ دقیقه نور آبی). بقای سلولی بعد از انکوباسیون اندازه گیری شد. روش اندازه گیری رنگ سنجی 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) برای سنجش بقای سلولی استفاده شد. هر آزمایش سه بار تکرار شد.

۶) اثر زمان انکوباسیون و زمان تابش های مختلف بر روی سلول های سرطانی

اثر زمان های انکوباسیون و زمان های تابش با در نظر گرفتن دوره های مختلف انکوباسیون و تابش در حضور و عدم حضور آنالیت ها بهینه سازی شد. بعد از انکوباسیون یا تابش در زمان های خاص بقای سلولی با استفاده از روش MTT سنجیده شد. تمام آزمایشات سه بار تکرار گردید.

۷) اثر اولویت تابش نور آبی یا قرمز بر بقای سلول سرطانی

برای بررسی اثر اولویت نور آبی و قرمز، سلول ها کاشته شدند و سپس به سلول ها با نور آبی و قرمز تابیده شد به عنوان: آزمایش ۱: ۳۰ دقیقه تابش نور آبی، آزمایش ۲: ۳۰ دقیقه تابش نور قرمز و آزمایش ۳: ۱۵ دقیقه تابش نور قرمز بعلاوه تابش نور آبی. بقای سلولی در انواع آزمایشات تابشی با استفاده از تست MTT بدست آمد.

۸) آزمایش فتودینامیک در Invitro

سلول های سرطانی MDA-MB-231 در محیط کشت رشد داده شدند و بعد از رسیدن به ۸۰-۹۰٪ رشد، سلول ها با PBS شسته شدند، سپس با اضافه کردن یک میلی لیتر از تریپسین ۰٫۲۵٪ به مدت ۱-۳ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد جدا شدند. سلول ها (1×10^4 cells/well) در ۵ عدد پلیت ۹۶ خانه کاشته شدند. سپس سلول ها با متیلن بلو، کورکومین و نانو ذرات IP در غلظت های مختلف تیمار شدند. بعد از یک انکوباسیون ۲۴ ساعته، یک پلیت به عنوان کنترل تاریکی در نظر گرفته شد و سایر پلیت ها همان طور که در بالا ذکر شد تابانده شدند. تست MTT برای تعیین بقای سلولی استفاده شد.

۹) آزمایش سنجش MTT

تیزولیل بلو تترازولیوم بروماید (MTT) برای تشخیص بقای سلولی به عنوان تست رنگ سنجی MTT استفاده شد. بقای سلولی می تواند به عنوان یک عملکرد پتانسیل احیای سلول ها اندازه گیری گردد. سلول های زنده ترکیب MTT را به فورمازان غیر قابل انحلال تبدیل می کنند. در نتیجه برای حل کردن فورمازان از دی متیل سولفوکساید (DMSO) استفاده شد و غلظت آن با استفاده از روش های اسپکتروسکوپی سنجیده شد. به طور خلاصه، محیط کشت سلول برداشته شد و سلول ها در محیطی حاوی ۰٫۵ mg/ml 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide برای ۴ ساعت در ۳۷°C انکوبه شدند. کریستال های بنفش

فورمازان در $100\mu\text{L}$ DMSO حل شدند و برای ۱۵ دقیقه تکان داده شد. جذب محلول ها در 540nm با الیزا ریدر اندازه گیری شد (Hyperion, Inc., FL, U.S.A.).

۱۰ تجزیه و تحلیل آماری داده ها

با استفاده از نرم افزار excel 2013 انجام خواهد شد. به منظور تعیین تفاوت معنی داری در مورد متغیرهای کمی و تبعیت از توزیع نرمال از Student's t-test استفاده خواهد شد سطح معنی داری در این مطالعه در حد $0/05$ در نظر گرفته شده است.

فصل پنجم

یافته‌های پژوهش

فصل ۵ یافته های پژوهش

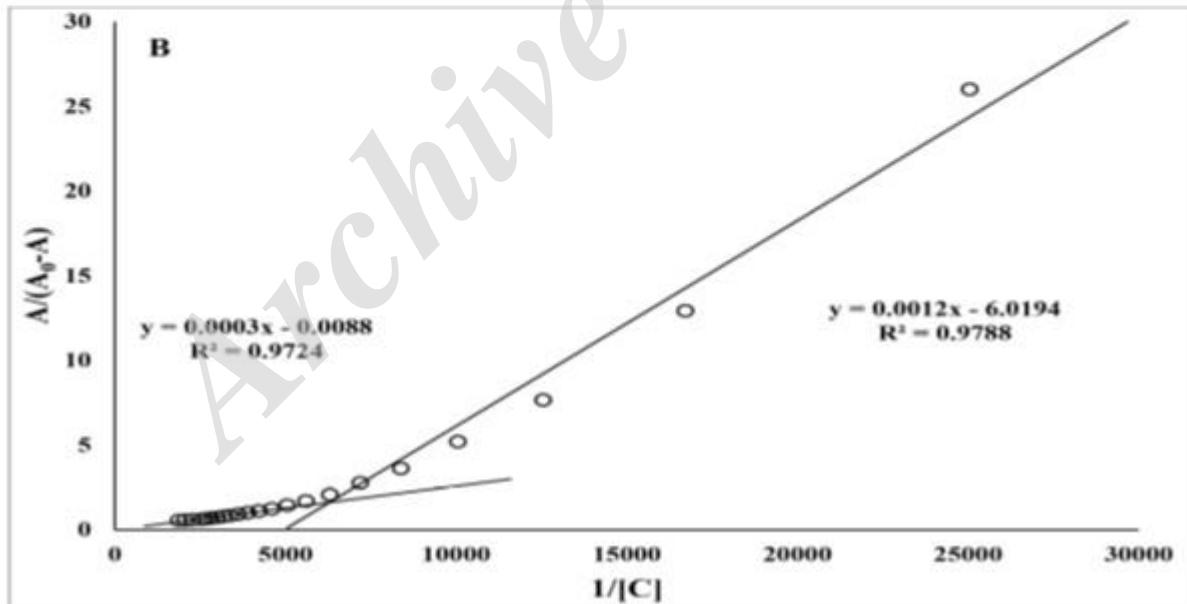
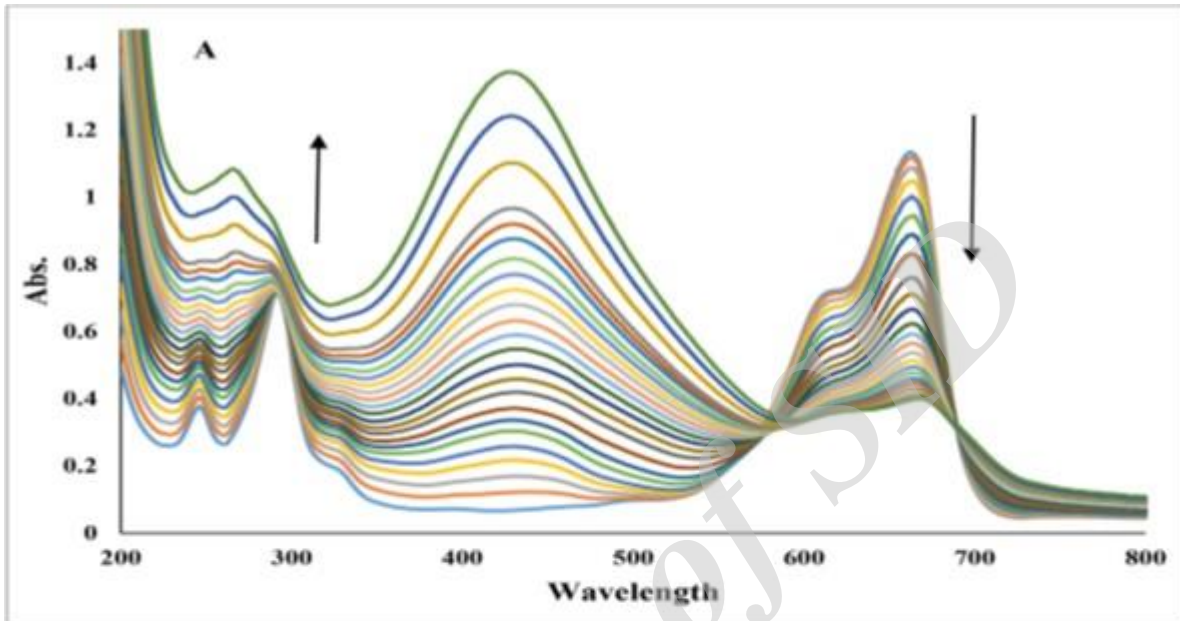
۵-۱ اینتراکشن کورکومین با متیلن بلو

تیتراسیون متیلن بلو (انحلال پذیری در آب 36mg/ml و $5667\text{nm} = \varepsilon$) محلول $(1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1})$ با استفاده از استوک محلول کورکومین (غلظت استوک کورکومین mol L^{-1} 2×10^{-2} تهیه شد) سبب باتوکرومیک شیفت طیف جذبی ماکسیمم MB می شود و کاهش در جذب با افزایش غلظت کورکومین مشاهده شد. این تغییرات طیفی نشان داد که متیلن بلو با کورکومین ارتباط دارد. شکل ۱ (A) تغییرات طیفی MB با اضافه کردن کورکومین را نشان می دهد. در شکل ۱ (B) تغییرات $(A/(A_0-A))$ در مقابل $1/[C]$ بر اساس معادله Benesi Hildebrand محاسبه شد. نمودار شامل دو منطقه خطی است، منطقه اول در غلظت پایین تر کورکومین است و منطقه دوم در غلظت بالاتر کورکومین است. بر پایه ی معادله ی Benesi-Hildebrand حالت خطی نشان می دهد که شکل گیری کمپلکس در تعادل ۱:۱ است. با محاسبه ی K_b مرتبط (ثابت اتصال) برای هر ناحیه، قدرت اینتراکشن ها قابل تخمین است. K_{b1} (ثابت اتصال برای اولین ناحیه) بدست آمده (شکل ۱(B)) برابر $5016,17$ و K_{b2} (ثابت اتصال برای ناحیه دوم (شکل ۱(B)) برابر $29,33$ است. همچنین انرژی آزاد اتصال را می توان با استفاده از ثابت های اتصال بدست آمده محاسبه کرد. $(\Delta G^0_{b1} = -21.11\text{Kj/mol}$, $\Delta G^0_{b2} = -8.37\text{Kj/mol}$)

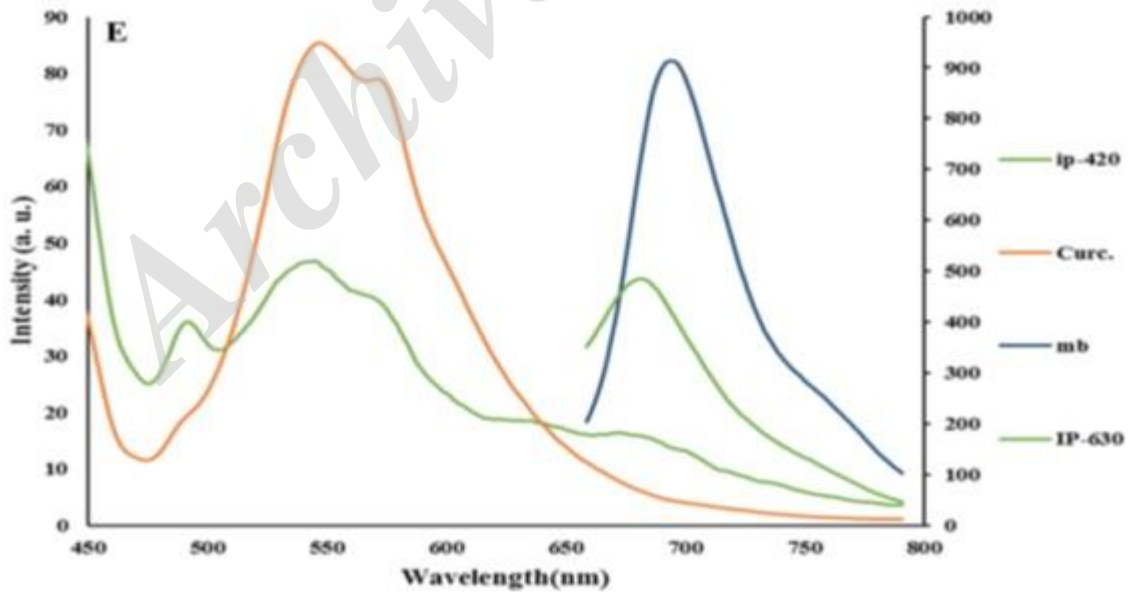
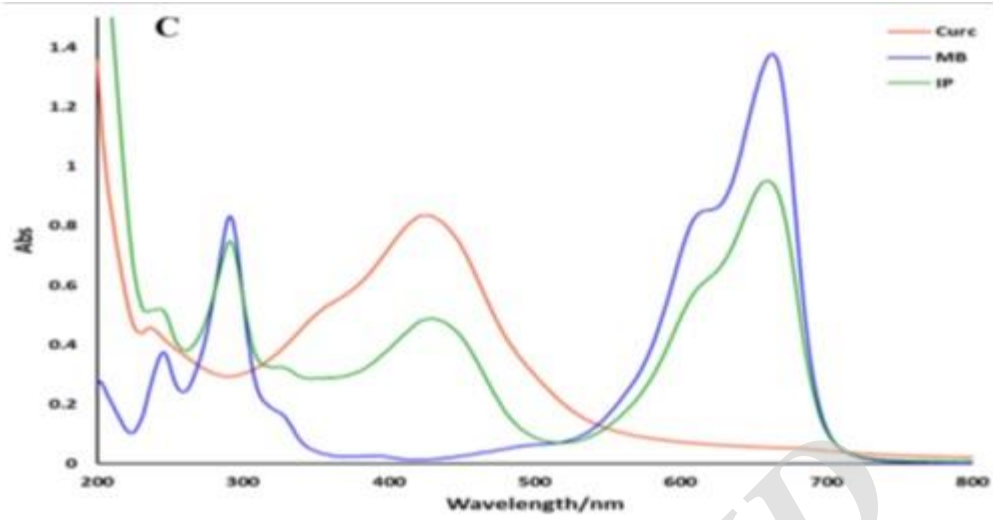
۵-۲ مشخصات اسپکتروفتومتر UV-vis و فلورسنس

شکل ۱(C)، طیف UV-vis متیلن بلو و کورکومین را در شکل آزاد و شکل مجتمع القا شده از طریق تعاملات الکتروستاتیکی نشان می دهد. مطالعات اسپکتروفتومتری فرآیندهای رایج در فهم تغییرات ساختاری در سطح مولکولی هستند. طیف متیلن بلو شامل دو منطقه ی مجزاست که می تواند به صورت ناحیه نامرئی طیف دیده شود و دیگری زیر 300 نانومتر مشابه ناحیه فرابنفش است. طیف کورکومین نیز این قله ها را در طیف مشابه دارد اما با توجه به ساختار مولکولی این ترکیبات ، این قله ها در طول موج های متفاوتی ظاهر می گردند. با این حال، طیف رنگ های حساس به نور نتیجه ی ویژگی های الکترونیکی مولکول رنگ ها است. رزونانس الکترونی در ساختار الحاقی π طیف را القا کرده است. از طریق مسدود کردن الکترون در یون های مولکولی ، رزونانس تحت تأثیر قرار گرفت و تغییر کرد. همچنین در مولکول های کاتیونی با اضافه کردن الکترون ها به علت اینتراکشن های آنیونی-کاتیونی، چگالی الکترونی در کاتیون تغییر می کند و بر رزونانس الکترونی ساختار مولکول یونی تأثیر

می گذارد که سبب تغییرات در طیف مشابه میگردد. شکل ۱ (D) یک تصویر عکاسی از محلول PEG همراه نانوذرات و حسگرهای نوری است. طیف فلورسنس مرتبط با رنگ های حساس به نور و جفت های یونی تهییج شده با استفاده از طول موج های ۴۲۰ و ۶۳۰ نانومتر در شکل ۱ (E) ارائه شده است.



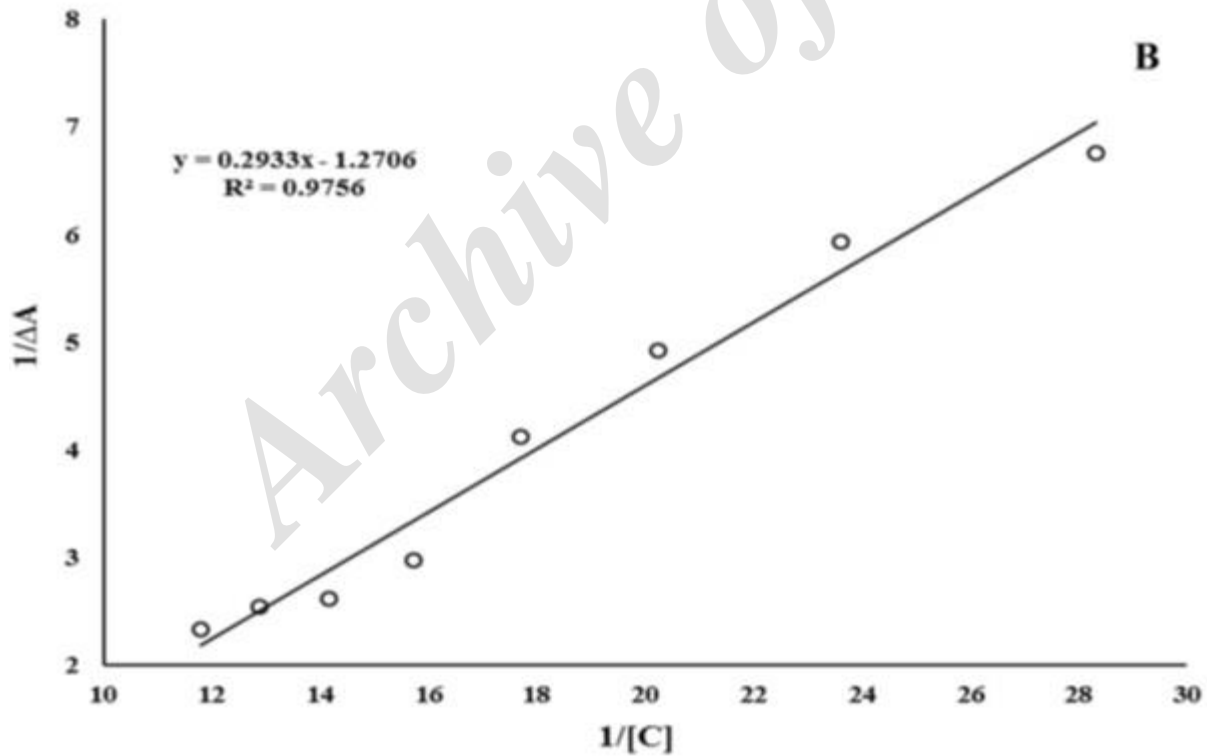
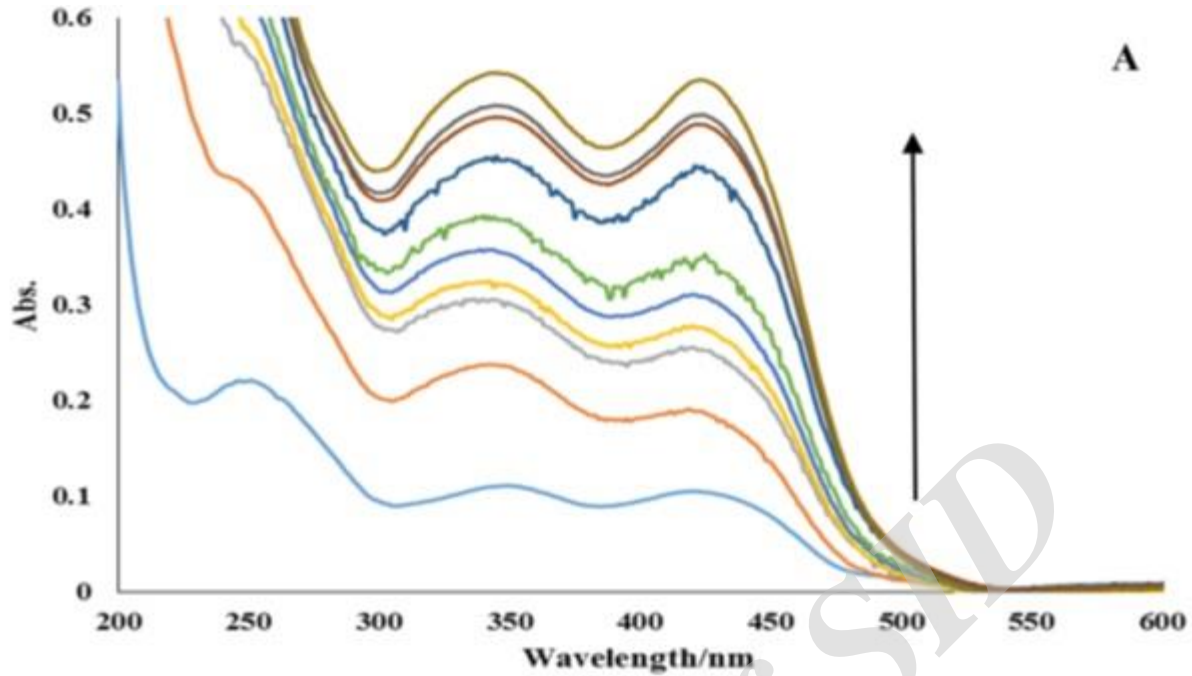
شکل ۱ (A) اتصال اسپکتروفتومتری کورکومین با متیلن بلو، (B) نمودار Benesi-Hildebrand مرتبط با میانگین کورکومین-متیلن بلو، (C) طیف جذبی UV-vis متیلن بلو، کورکومین و جفت یونی، (D) تصویر انحلال PS ها و نانوذرات IP به وسیله ی PEG-400 در محلول PBS، (E) طیف فلورسنس کورکومین (۴۲۰nm)، متیلن بلو (۶۳۰nm) و IP که با استفاده از طول موج های تحریکی ۴۲۰nm و ۶۳۰nm ثبت شده است.



شکل ۱. ادامه

۳-۵ افزایش انحلال پذیری با استفاده از PEG-400

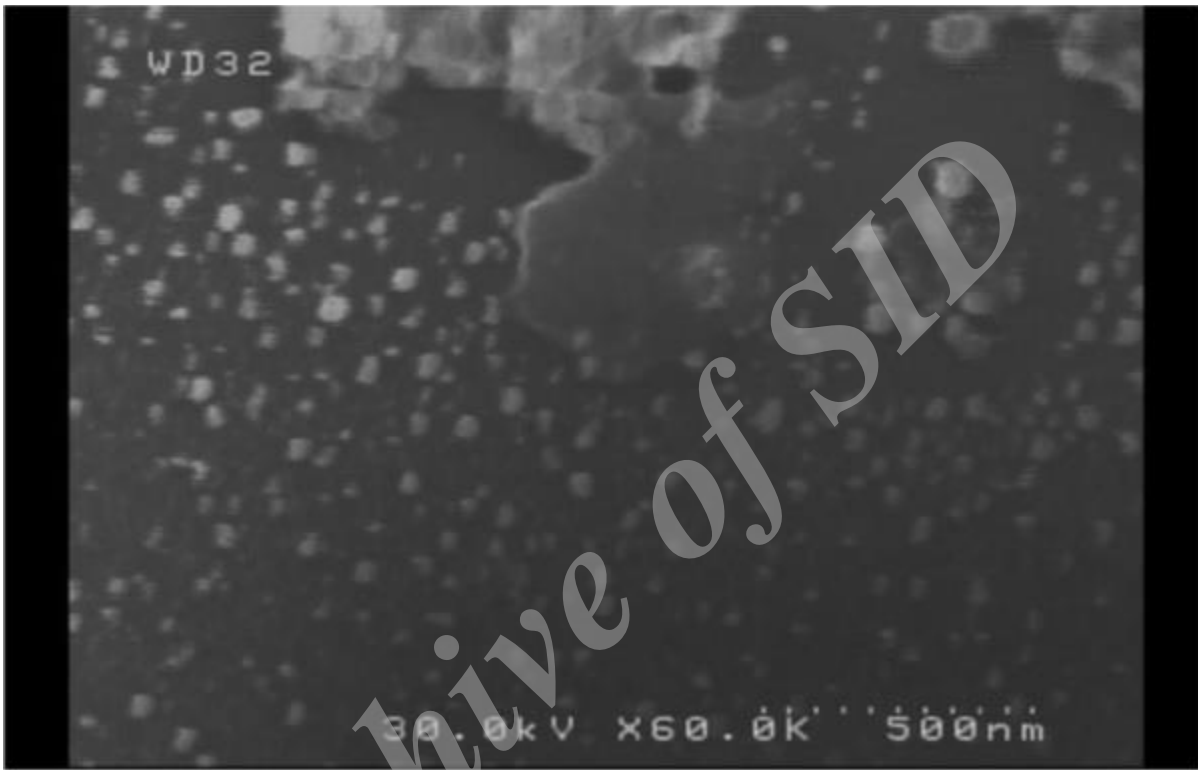
واکنشگرهای فعال سطحی به طور گسترده به عنوان دست آورد مؤثری برای افزایش انحلال پذیری در آب بسیاری از ترکیبات شیمیایی و دارویی با انحلال پذیری کم به منظور فراهم کردن دوز قابل قبولی از داروها و مواد شیمیایی در کاربردهای مختلف درمانی و صنعتی، استفاده شده اند. کورکومین به عنوان یک ترکیب نامحلول پلی فنولیک (انحلال پذیری ضعیف در آب $0.1 \text{ mg/ml} <$ و $\epsilon_{420\text{nm}}=55000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ در اتانول) انحلال پذیری پایینی در آب دارد که سبب شده استفاده از آن در غذا و فرمولاسیون دارویی محدود شود. در اینجا PEG-400 برای افزایش انحلال پذیری کورکومین استفاده شد. برای این منظور، مقدار زیادی از کورکومین وزن شد (۰,۰۱۵mg) و در ۲ml آب دوبار تقطیر حل شد. غلظت های متنوعی از PEG-400 (در رنج 0-70mM) اضافه و به خوبی مخلوط شد و بعد از سانتریفوژ (۸۰۰۰rpm برای ۵ دقیقه) محلول شفاف بالایی برای تعیین جذب کورکومین استفاده شد (شکل ۲ (A)). اثر PEG-400 بر افزایش انحلال پذیری کورکومین می تواند طبق روشی که قبلا گزارش شد، اندازه گیری شود [۲۵,۲۶]. ثابت انحلال پذیری ($K_s=4.33$) و ثابت توزیع PEG-400 / آب ($K_x=240.43$) تخمین زده شد (شکل ۲ (B)). انرژی آزاد مربوط به توزیع برای PEG-400 / کورکومین محاسبه شد ($\Delta G_x^0 = -13.58 \text{ KJ/mol}$)



شکل ۲. (A) اثر غلظت های مختلف PEG-400 (۰-۷۰ mM) بر انحلال پذیری کورکومین (B)، نوع تفاوت جذب با افزایش غلظت PEG-400.

۴-۵ تصاویر *FE-SEM* ترکیبات جفت یونی

میکروسکوپ الکترونی روبشی یکی از ابزارهای قوی در تعیین توپوگرافی ذرات، مورفولوژی و تخمین اندازه است. تصویر *FE-SEM* نانو ذرات سنتزی گرفته شد و برای تعیین مشخصات نانو ذرات مورد استفاده قرار گرفت. شکل ۳ تصاویر گرفته شده از نانو ساختارهای جفت یونی سنتزی بدست آمده را نشان می دهد.



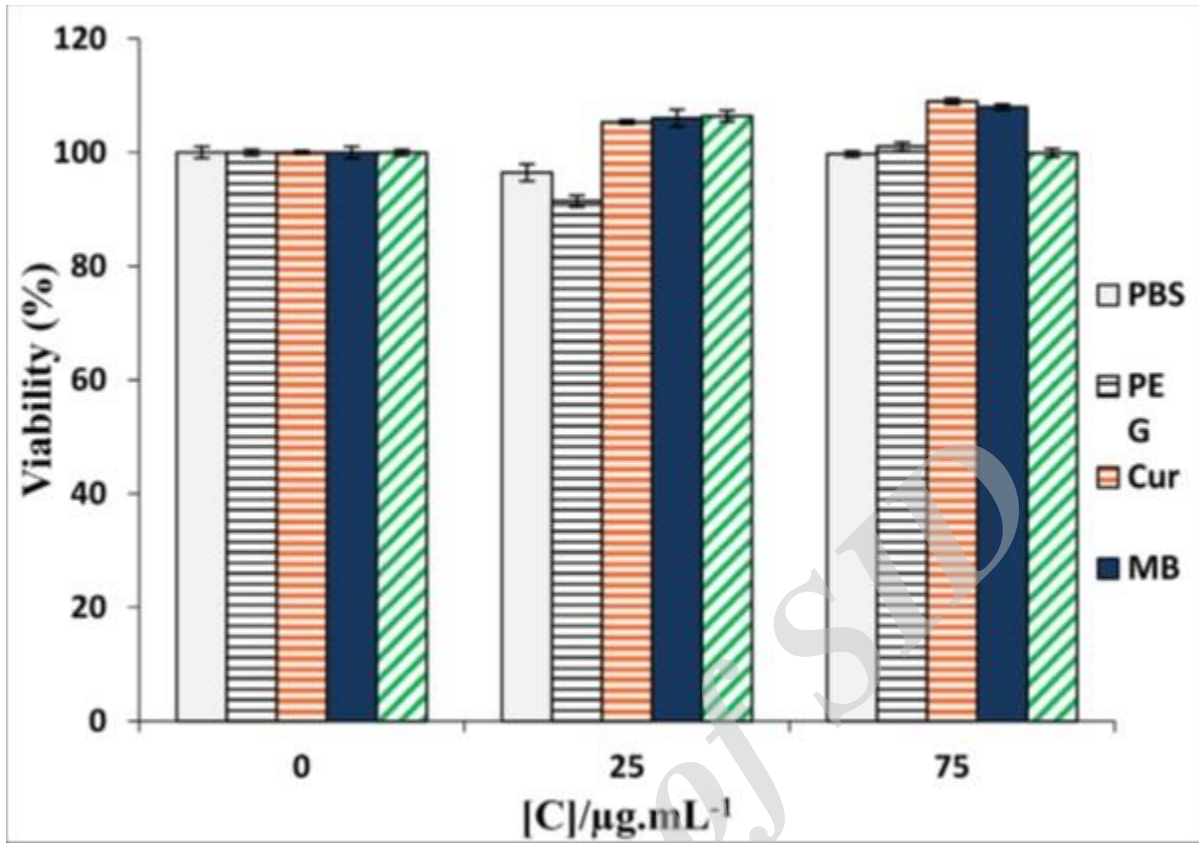
شکل ۳. تصویر *FE-SEM* نانو ذرات جفت یونی متیلن بلو-کورکومین

۵-۵ مطالعات بقای زیستی و آزمون *MTT*

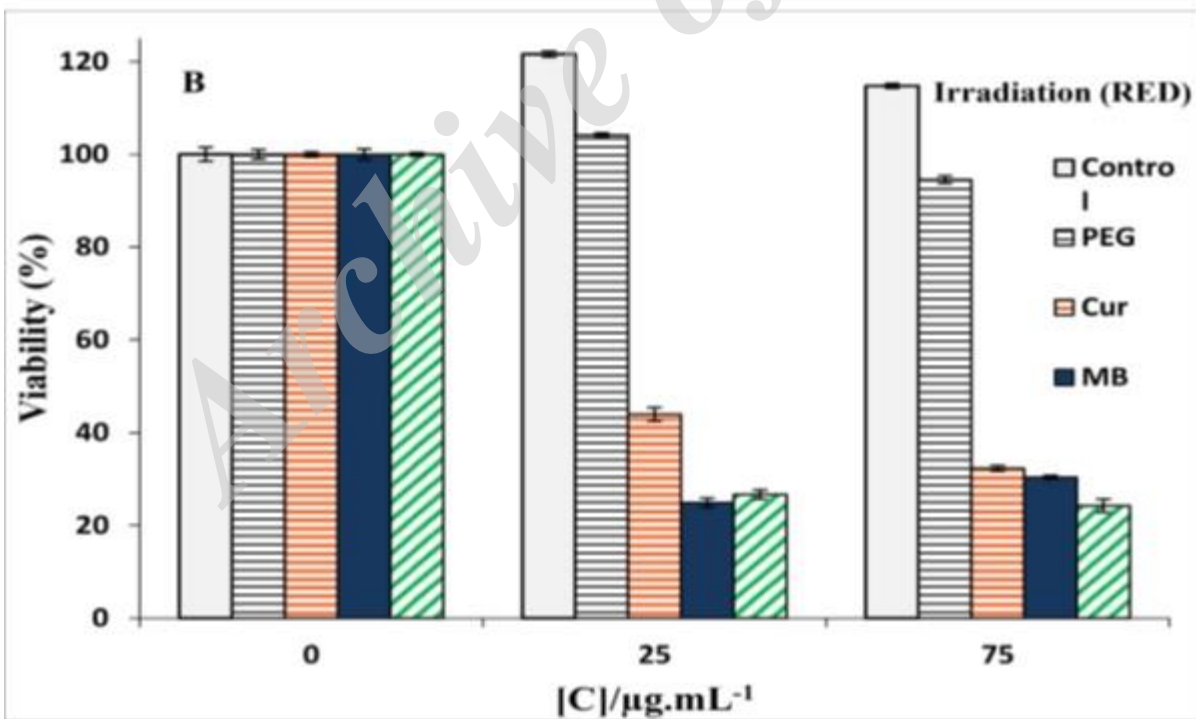
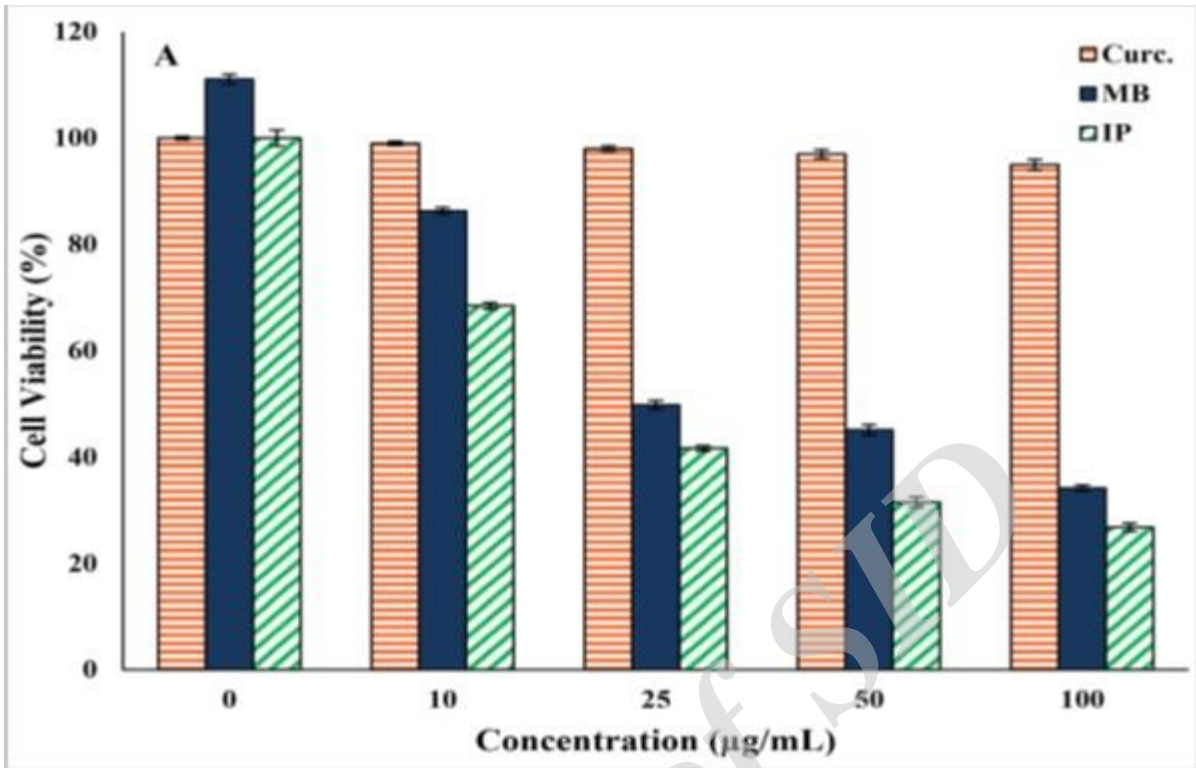
اثرات سلولی درمان های مختلف اندازه گیری شد و با استفاده از آزمون *MTT* بقای سلولی قبل و بعد از تیمار و تابش تعیین شد. در شکل ۴ اثر استفاده از ترکیبات بر بقای سلولی در تاریکی و غیاب تابش *LED* خلاصه شده است، به عبارت دیگر سمیت سلولی هر کدام از مواد مورد استفاده آزمایش شد و بدون تابش *LED* (آزمایش تاریکی) آزمایش گردید.

شکل ۵ تیمار مشابه با شکل ۴ در حضور تابش LED قرمز در حضور (شکل ۵(B)) و غیاب (شکل ۵(A)) PEG-400 را نشان می دهد. نتایج نشان می دهد که در حضور نور قرمز، بقای سلولی در نمونه بلانک حاوی PBS و PEG تغییر معنی داری ندارد بنابراین بی خطری سلولی PBS و PEG را در حضور نور تایید می کند و همچنین تایید می کند که دوز استفاده شده از نور در زمان تابش هیچ سمیت نوری را در غیاب حسگر نوری نشان نمی دهد. بر اساس نتایج اسپکتروسکوپی افزایش انحلال پذیری PEG در انحلال پذیری کورکومین مشارکت داشته و در نتیجه آن جذب و نفوذ سلولی کورکومین و به تبع آن افزایش کارایی PDT کورکومین می تواند بدست آید. همچنین اثر PEG در جذب سلولی MB و IP نیز می تواند مشاهده گردد. با مقایسه ی شکل ۵(A) و (B)، با اضافه کردن PEG اثر فتودینامیکی حسگرهای نوری با توجه به افزایش انحلال پذیری و تعادل بین هیدروفوبیسیته و هیدروفیلیسیته حسگرهای نوری افزایش یافته است. با توجه به ساختار سطح نانو IP، جذب سلولی و کارایی نفوذ سلولی IP بالاست و بنابراین اضافه کردن PEG-400 اثر بزرگی بر کارایی فتودینامیکی ندارد. با در نظر گرفتن این نتایج، ما اثر نور آبی و قرمز را بر فتودینامیک درمانی آنالیت های استفاده شده در حضور PEG-400 و مقایسه داده ها با همدیگر سنجیده ایم .

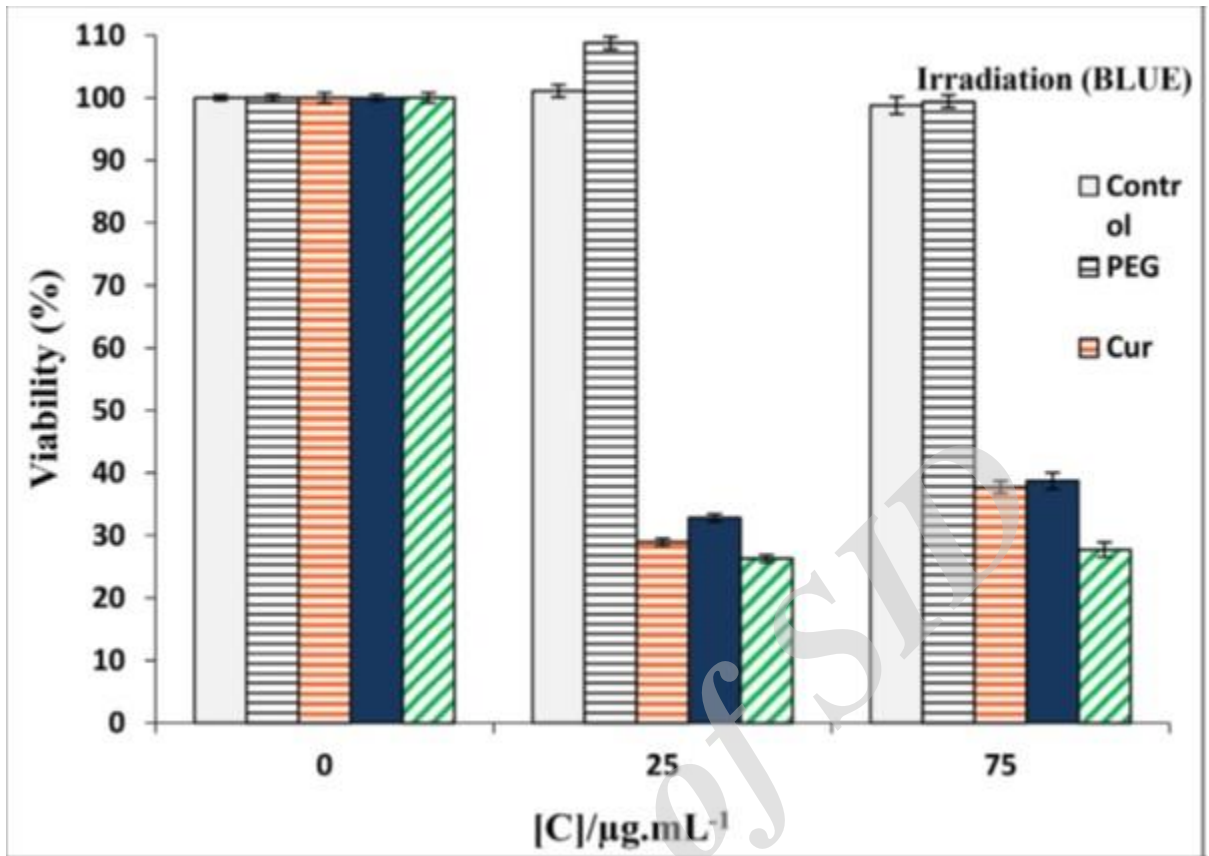
شکل ۶ نتایج مرتبط با اثر تابش نور آبی بر بقای سلولها در حضور نانوذرات و PS های مورد استفاده نشان میدهد. با توجه به طیف فلورسنس IP از طریق تهییج در 420nm طیف نشری پیکی در 650nm - 750nm نشان می دهد (شکل ۱(E)). با توجه به این نتایج، نور آبی می تواند اثر تهییجی بر IP برای اثر PDT داشته باشد که با داده های نتایج بقای سلولی تحت تابش نور آبی هم خوانی دارد. در شکل ۷، اثر تابش پیوسته با نورهای آبی و قرمز ارزیابی گردیده است و بقای سلولی بدست آمده است.



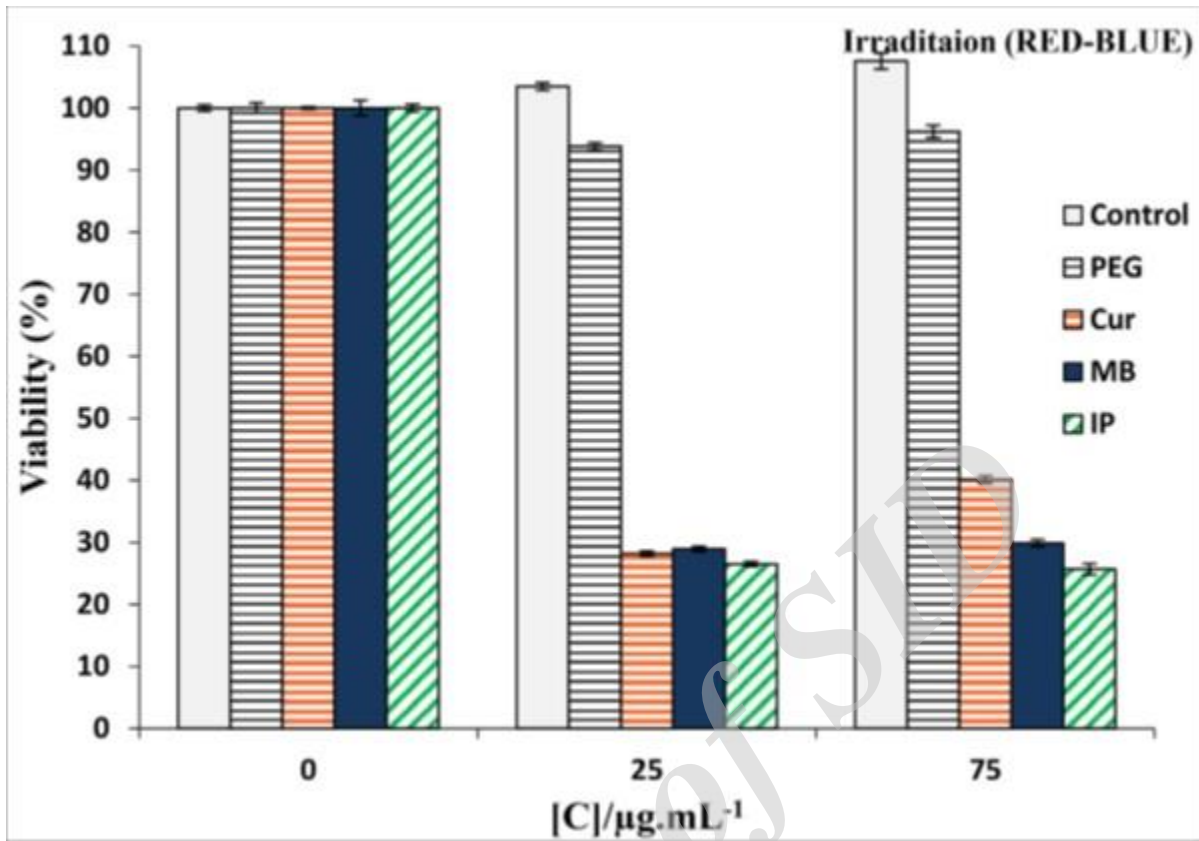
شکل ۴. بقای سلول های سرطان پستان MDA-MB 231 تیمار شده با غلظت های متنوع آنالیت ها در تاریکی. ن تایج به صورت \pm SD میانگین بیان شده است. (n=۳)



شکل ۵. بقای زیستی سلول های سرطان پستان تیمار شده با غلظت های مختلف آنالیت ها و تابش LED نور قرمز برای ۳۰ دقیقه در حضور و عدم حضور PEG-400. نتایج به صورت $\pm SD$ میانگین بیان شده است. (A). (n=۳). بدون PEG-400 (B) در غلظت ۵۰ mM از PEG-400



شکل ۶. بقای زیستی سلول های سرطان پستان تیمار شده با غلظت های مختلف آنالیت ها و تابش LED نور آبی برای ۳۰ دقیقه. نتایج به صورت $\pm SD$ میانگین بیان شده است. (n=۳).



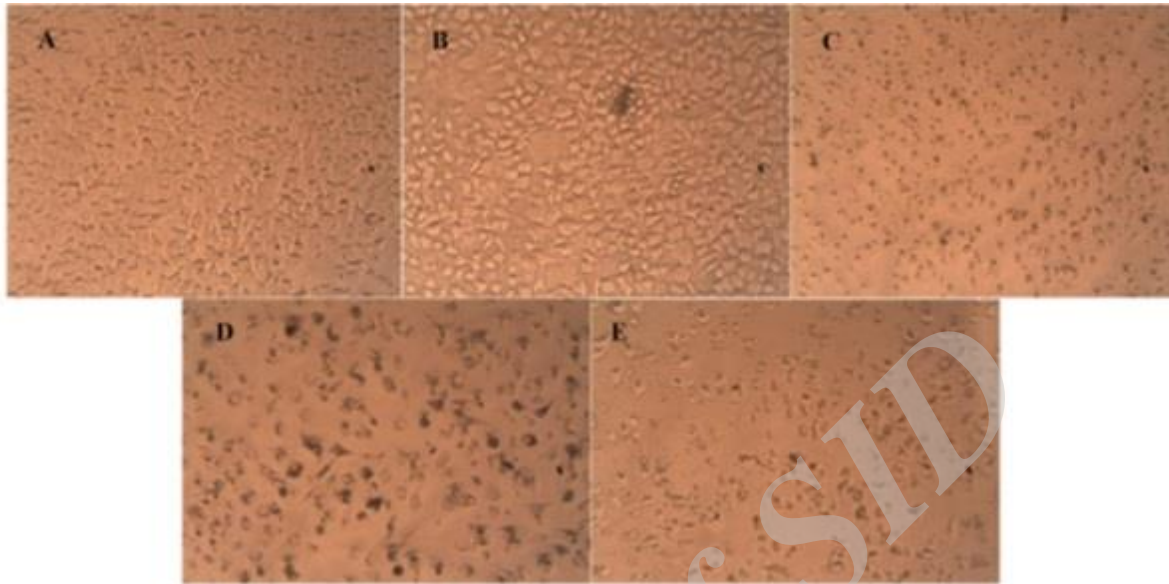
شکل ۷. بقای زیستی سلول های سرطان پستان تیمار شده با غلظت های مختلف آنالیت ها و تابش LED نور قرمز و آبی هر کدام به مدت ۱۵ دقیقه. نتایج به صورت $\pm SD$ میانگین بیان شده است. (n=۳).

۵-۶ تصاویر میکروسکوپ نوری معکوس

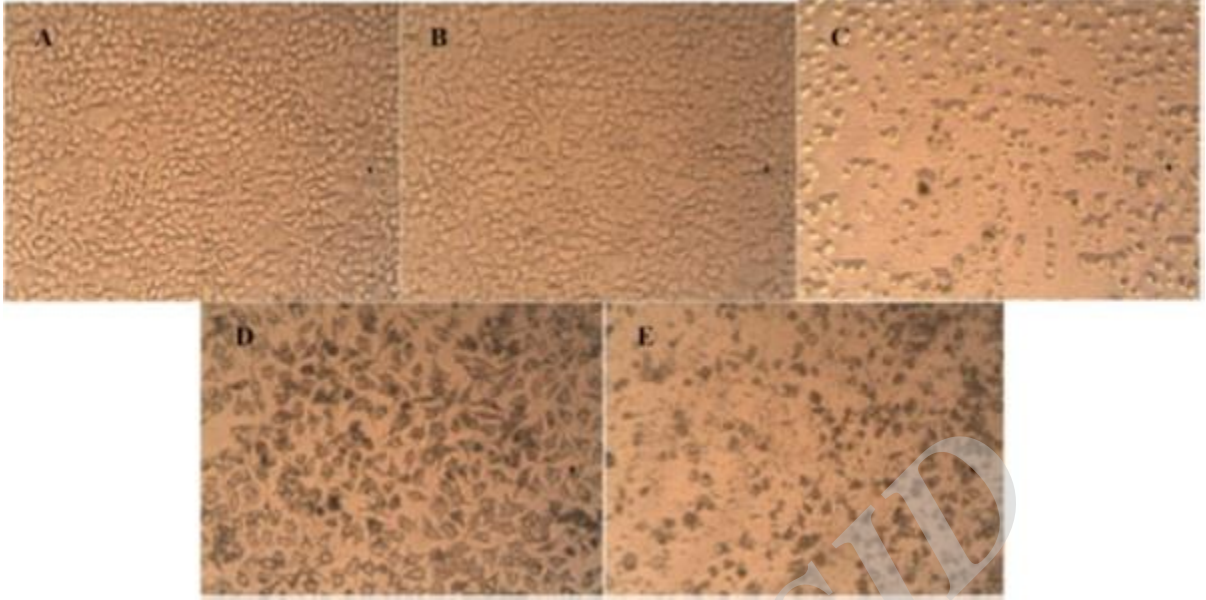
تغییرات مورفولوژی در سلول ها با استفاده از تصاویر میکروسکوپی سلول های تیمار شده بدست آمده است. شکل ۸ تغییرات مورفولوژیکی در سلول هایی که در تاریکی در معرض (A) PBS و (B) PEG که به عنوان تیمار های بلانک در نظر گرفته شده اند و همچنین در حضور کورکومین (C) متیلن بلو (D) و نانوذرات IP (E) بودند را نشان می دهد.

نتایج نشان می دهد که مورفولوژی سلول ها در غیاب تابش LED تغییر معنی داری نشان نمی دهد. شکل ۹ تغییر مورفولوژی سلول های تیمار شده با PS ها و نانوذرات را نشان می دهد. نتایج نشان می دهد که PBS و PEG در حضور LED قرمز هیچ اثر سمی نوری نشان نمی دهد. تغییرات واضح در مورفولوژی سلول ها می تواند در حضور تابش LED قرمز که با نانوذرات IP تیمار شده است مشاهده گردد.

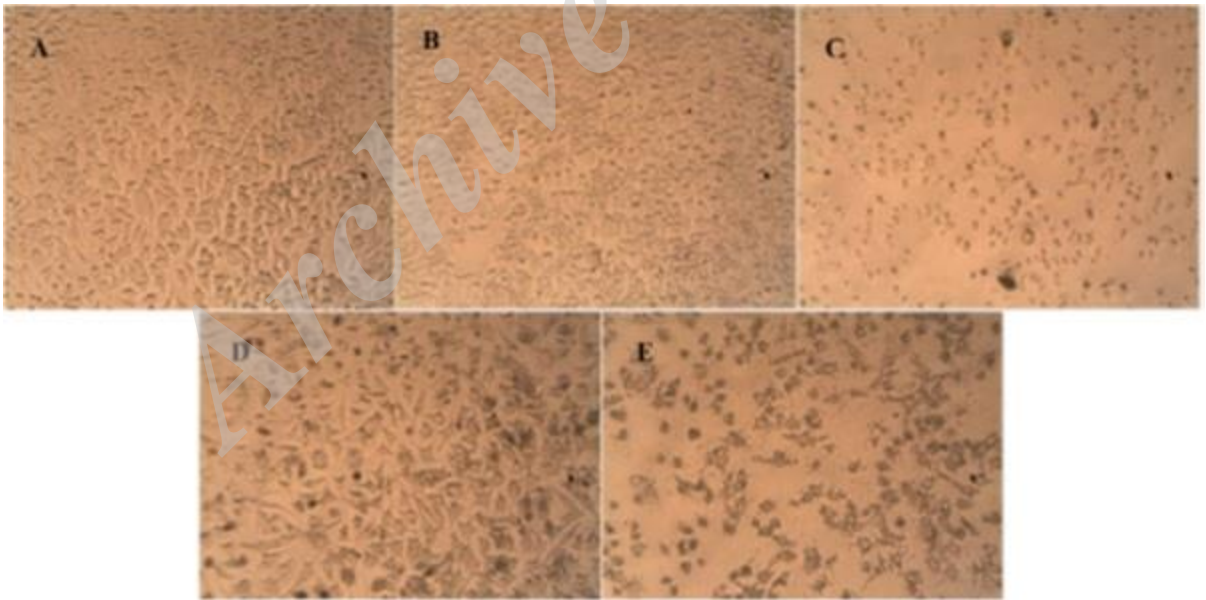
شکل ۱۰ اثر تابش LED آبی در شرایط مشابه شکل ۹ بر روی موفولوژی سلول ها را نشان می دهد. نتایج تغییرات واضحی را در سلول های تیمار شده با نانوذرات نشان میدهد.



شکل ۸. تصاویر میکروسکوپ معکوس (۴۰X) سلول های سرطان پستان تیمار شده با PEG-400، کورکومین، متیلن بلو و نانو ذرات IP بدون تابش: (A) بلانک، (B) PEG-400، (C) کورکومین، (D) متیلن بلو و (E) نانو ذرات IP.



شکل ۹. تصاویر میکروسکوپ معکوس ($40\times$) سلول های سرطان سینه تیمار شده با PEG-400، کورکومین، متیلن بلو و نانوذرات IP و تابش LED نور قرمز: (A) بلانک، (B) PEG-400، (C) کورکومین، (D) متیلن بلو و (E) نانوذرات IP.



شکل ۱۰. تصاویر میکروسکوپ معکوس ($40\times$) سلول های سرطانی تیمار شده با PEG، کورکومین، متیلن بلو و نانوذرات IP و تابش نور LED آبی: (A) بلانک، (B) PEG-400، (C) کورکومین، (D) متیلن بلو و (E) نانوذرات IP.

فصل ششم

بحث و نتیجه گیری

فصل ۶: بحث و نتیجه گیری

۶-۱ خصوصیات رنگها و نانو ذرات جفت یونی

محلول های متیلن بلو، کورکومین و نانو ذرات جفت یونی آماده شدند و برای ثبت طیف جذبی UV-vis در نظر گرفته شدند. با توجه به شکل ۱ طیف متیلن بلو و کورکومین طبیعی است با این حال از طریق جفت یونی تغییری در طول موج ماکسیمم برای هر دو رنگ اتفاق می افتد. انتقال قرمز (تغییر طول موج به سمت طول موجهای بلندتر) (۲-۴nm) در طیف کورکومین نشان می دهد که بار منفی سطح کورکومین به صورت الکتروستاتیکی اثر می نماید و آبدوستی ترکیبات را کاهش می دهد. طیف متیلن بلو انتقال آبی (تغییر طول موج به سمت طول موجهای کوتاه تر) (۸-۱۰nm) را نشان می دهد و مشخص شده است که متیلن بلو کاتیونی با کورکومین با بار منفی با توجه به نیروهای الکتروستاتیک میانکنش می دهد و کمپلکس جفت یونی را می سازد. بنابراین زوج یونی آبدوستی متیلن بلو و آبگریزی کورکومین را کاهش می دهد. آبگریزی کورکومین باعث محدودیت در استفاده و جذب آن می شود، همچنین آبدوستی متیلن بلو در استفاده از آن به خصوص در کاربرد آن در PDT مضراتی را نشان می دهد [۱۶]. با توجه به نتایج بدست آمده کورکومین با متیلن بلو در دو ناحیه ی مشخص تعامل دارد. در نواحی اولیه که در غلظت های پایین کورکومین رخ می دهد، ثابت اتصال مرتبط با میانکنش کورکومین- متیلن بلو بالاست و با توجه به میانکنش های الکتروستاتیک بین رنگ های آنیونی و کاتیونی رخ می دهد. انرژی آزاد مرتبط منفی و بالاست. این نتایج پیشنهاد می کند که در این ناحیه شکل گیری جفت-یونی بین رنگ ها رخ می دهد. در غلظت های بالاتر کورکومین، مقادیر اضافه ی کورکومین در تعاملات هیدروفوب با IP تولید شده با توجه به ویژگی های ساختار هیدروفوب کورکومین درگیر شده اند. ثابت اتصال مرتبط با این نواحی از ناحیه اولیه کمتر است. با توجه به این نتایج یون ها پتانسیل مناسب و کافی برای شکل گیری جفت یونی در غلظت مولار مشابه رنگ ها را دارند. خصوصیات بیشتر با استفاده از تصاویر FE-SEM نانو ذرات جفت یونی بدست آمد. (شکل ۳). ساختار در اندازه نانو کمپلکس می تواند منجر به جذب بهتر هر دو رنگ های جفت یونی با همدیگر در سلول ها شود. امروزه نانوفناوری به کارآمدی تحویل داروی مناسب در جذب داروها در بدن کمک می کند به خصوص برای داروهای آبدوست. تصاویر SEM نانو ذرات نشان می دهد که اندازه نانوذرات جفت یونی تقریباً برابر ۴۰-۶۰ nm است.

۲-۶ تخمین سمیت متیلن بلو و کورکومین

به منظور مقایسه ی سمیت متیلن بلو و کورکومین در شکل های مولکولی و جفت-یونی، اثر این ترکیبات بر بقای سلولی تخمین زده شد. بقای سلول های تیمار شده با غلظت های مختلف متیلن بلو و کورکومین (۲۴ ساعت انکوباسیون در غلظت های $0,25,75 \mu\text{g/ml}$) در تاریکی تخمین زده شد. با توجه به نتایج بدست آمده (شکل ۴)، واضح است که سمیت ترکیبات مورد بررسی در آزمایشات بدون نور (تاریکی) بسیار ناچیز است.

۳-۶ اثر تابش LED نور قرمز بر بقای سلولی

همان طور که می دانیم سه پارامتر مهم و ضروری در فتودینامیک درمانی شامل حساسگر نوری (PS)، مولکول اکسیژن و نور با طول موج مناسب وجود دارد. تحریک حسگر نوری با استفاده از طول موج نوری مناسب می تواند نقش ضروری در تهییج و تولید اکسیژن یگانه یا گونه های اکسیژن فعال داشته باشد. تحریک حسگر نوری می تواند با استفاده از سایر طول موج ها با ثمره کوانتومی پایین تر بدست آید. با توجه به این حقیقت که نانوذرات جفت یونی کمپلکسی از دو تا حسگر نوری هستند بنابراین اثر هر دو دیویدهای تابشی نور قرمز و آبی در کارایی فتودینامیک درمانی نانوذرات برای آزمایش در نظر گرفته شد. شکل ۵ اثر تابش منبع نور قرمز LED را بر روی بقای سلول های سرطان پستان MDA-MB-231 تیمار شده با کورکومین، متیلن بلو و نانو ذرات IP نشان می دهد. اثر بالاتر PDT (۲۴,۲۵٪ بقای سلولی) با استفاده از نانوذرات IP ($75 \mu\text{g/ml}$) تحت تابش LED نور قرمز بدست آمده است. به دلیل اینکه نانوذرات جفت یونی سنتز شده استوکیومتری رسوب هر دو رنگ ها است، بنابراین محلول مولار نانوذرات جفت یونی حاوی نصف دوز متیلن بلو یا کورکومین در مقایسه با محلول های MB به تنهایی یا کورکومین به تنهایی است. بنابراین کارایی PDT باید پایین تر از هر رنگ در نور تحریکی مرتبط باشد. رادیکال های تولید شده می توانند با سایر قسمت های زوج یونی برای تولید رادیکال های بیشتر واکنش دهند و همچنین بار مبادله شده بین هر دو حسگر نوری می تواند به تولید اکسیژن یگانه با استفاده از هر دو حسگر نوری در زوج یونی منجر شود که باعث افزایش غلظت ROS یا اکسیژن یگانه در فرآیند PDT می گردد.

۴-۶ اثر تابش LED نور آبی بر بقای سلول ها

در یک آزمایش دیگر ما منبع LED آبی را به عنوان نور تحریکی برای سنجش کارایی PDT در نظر گرفتیم. نتایج (شکل ۶) نشان می دهد که اثربخشی عملکرد PDT برای کورکومین با استفاده از LED آبی افزایش یافته است. متیلن بلو تفاوت معنی داری با نتایج قبلی نشان نمی دهد و یک کاهش جزئی در بقای زیستی قابل مشاهده است. نانو ذرات IP $27,7 \mu\text{g/ml}$ بقا را القا می کنند که نسبت به نتایج بدست آمده برای LED قرمز بیشتر است. با مقایسه نتایج بدست آمده برای اثرات نور آبی و قرمز، می توان نتیجه گرفت که

کارآیی نور قرمز بالاتراز نور آبی است. نورهای با طول موج پایین تر میانکنش زیادی با سیستم بدن دارند که منجر به اثر فیلتری بیشتری بیشتر بدن و کاهش نفوذ نوری در ارگان های بدن شده است. با کاهش دوز نوری با توجه به اثر فیلتری بدن، کارآیی PDT کاهش یافته و نتیجه PDT را تحت تأثیر قرار می دهد. با در نظر گرفتن این فاکتورها، طول موج های بالاتر اثر PDT بهتری در مقایسه با طول موج های پایین تر دارند.

۵-۶ اثر تابش پیوسته LED نور آبی و قرمز بر بقای سلولی

برای این منظور، ما هر دو تابش نور قرمز و آبی را برای دو زمان ۱۵ دقیقه تابش (اولین تابش ۱۵ دقیقه ای با LED قرمز و دومین ۱۵ دقیقه تابش با استفاده از نور LED آبی) در نظر گرفته شد. نتایج در شکل ۷ آمده است. همان طور که می توان دید، اثر IP بر کارایی PDT در غلظت های بالاتر بهتر از متیلن بلو و کورکومین است. ($75 \mu\text{g/ml}$ و 25.64% بقای سلولی). با مقایسه ی نتایج بدست آمده، اثر نور قرمز بر بقای زیستی سلول های سرطان با استفاده از نانوذرات IP بهتر از سایرین است.

۶-۶ مطالعه میکروسکوپی

تصاویر سلول های تیمار شده با PEG-400، کورکومین، متیلن بلو و نانوذرات IP با و بدون تابش نور LED قرمز و آبی برای آشکارسازی اثرات سمی نوری به وسیله ی میکروسکوپ معکوس بررسی شد. همان طور که در شکل ۸-۱۰ دیده می شود تفاوت موفولوژی بین سلول های تیمار شده با نانوذرات IP با تست دیگر به طور واضح قابل ارزیابی است.

۷-۶ نتیجه گیری

نتایج نشان می دهد که اثر نور قرمز بر بقای سلولی در حضور نانوذرات IP نسبت به نور آبی در مقایسه با رنگ ها به تنهایی بهتر است. توزیع و انتشارنانو ذرات در سلول ها با توجه به ویژگی های نانساختاری و همچنین تعادل خواص آبدوستی و آبگریزی هر رنگ نتیجه واکنش فتوشیمیایی را در فتودینامیک درمانی بر رده سلول سرطان پستان MDA-MB-231 افزایش می دهد.

فصل هفتم

منابع

فصل هفتم : منابع

1. *Jemal, A., et al., Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers, 2010. 19(8): p. 1893-1907.*
2. پزشکی, پ.خ. - ا. ر. و. ب. د. و. آ., وضعیت بروز و شیوع سرطان در ایران
3. *Ploquin, N.P. and P.B. Dunscombe, The cost of radiation therapy. Radiotherapy and oncology, 2008. 86(2): p. 217-223.*
4. *Sher, D.J., Cost-effectiveness studies in radiation therapy. Expert review of pharmacoeconomics & outcomes research, 2010. 10(5): p. 567-582.*
5. *Boyle, P. and J. Ferlay, Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. Annals of oncology, 2005. 16(3): p. 481-488.*
6. *Nakano, A., et al., Treatment efficiency of combining photodynamic therapy and ionizing radiation for Bowen's disease. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2011. 25(4): p. 475-478.*
7. *Saito, H., et al., Radiation therapy and photodynamic therapy for biliary tract and ampullary carcinomas. Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences, 2008. 15(1): p. 63-68.*
8. *Montazerabadi, A.R., et al., The effects of combined treatment with ionizing radiation and indocyanine green-mediated photodynamic therapy on breast cancer cells. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2012. 109: p. 42-49.*
9. *Huilgol, N.G., S. Gupta, and C. Sridhar, Hyperthermia with radiation in the treatment of locally advanced head and neck cancer: a report of randomized trial. Journal of cancer research and therapeutics, 2010. 6(4): p. 492.*
10. *Hurwitz, M.D., et al., Hyperthermia combined with radiation for the treatment of locally advanced prostate cancer. Cancer, 2011. 117(3): p. 510-516.*
11. *Qin, X., et al., Folic acid-conjugated graphene oxide for cancer targeted chemophotothermal therapy. Journal of photochemistry and photobiology B: Biology, 2013. 120: p. 156-162.*
12. *Choi, K.C., et al., Antitumor effect of adriamycin-encapsulated nanoparticles of poly (DL-lactide-co-glycolide)-grafted dextran. Journal of pharmaceutical sciences, 2009. 98(6): p. 2104-2112.*
13. *Tao, Y., et al., Immunostimulatory oligonucleotides-loaded cationic graphene oxide with photothermally enhanced immunogenicity for photothermal/immune cancer therapy. Biomaterials, 2014. 35(37): p. 9963-9971.*
14. *Chabot, V., et al., A review of graphene and graphene oxide sponge: material synthesis and applications to energy and the environment. Energy & Environmental Science, 2014. 7(5): p. 1564-1596.*
15. *Chang, Y., et al., In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. Toxicology letters, 2011. 200(3): p. 201-210.*
16. *Yang, K., et al., Behavior and toxicity of graphene and its functionalized derivatives in biological systems. Small, 2013. 9(9-10): p. 1492-1503.*
17. *Wang, G., et al., Facile synthesis and characterization of graphene nanosheets. The Journal of Physical Chemistry C, 2008. 112(22): p. 8192-8195.*

18. Liu, Y., et al., *Understanding the toxicity of carbon nanotubes. Accounts of Chemical Research*, 2012. **46**(3): p. 702-713.
19. Rahmanian, N., et al., *Nano graphene oxide: a novel carrier for oral delivery of flavonoids. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014. **123**: p. 331-338.
20. Bozkurt, E., et al., *Rhodamine 101-graphene oxide composites in aqueous solution: the fluorescence quenching process of rhodamine 101. Physical Chemistry Chemical Physics*, 2014. **16**(34): p. 18276-18281.
21. Agostinis, P., et al., *Photodynamic therapy of cancer: an update. CA: a cancer journal for clinicians*, 2011. **61**(4): p. 250-281.
22. Juarranz, Á., et al., *Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. Clinical and Translational Oncology*, 2008. **10**(3): p. 148-154.
23. Colunga, A., et al., *Graphene oxide as electron shuttle for increased redox conversion of contaminants under methanogenic and sulfate-reducing conditions. Bioresource technology*, 2015. **175**: p. 309-314.
24. Xu, J., et al., *Dual-targeting nanosystem for enhancing photodynamic therapy efficiency. ACS applied materials & interfaces*, 2015. **7**(17): p. 9287-9296.
25. Luksiene, Z., *Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 2003. **39**(12): p. 1137-1150.
26. Ge, J., et al., *A graphene quantum dot photodynamic therapy agent with high singlet oxygen generation. Nature communications*, 2014. **5**.
27. MEGWA, S.A., et al., *Ion-pair Formation as a Strategy to Enhance Topical Delivery of Salicylic Acid. Journal of pharmacy and pharmacology*, 2000. **52**(8): p. 919-928.
28. Li, Y., et al., *Graphene-based nanovehicles for photodynamic medical therapy. International journal of nanomedicine*, 2015. **10**: p. 2451.
29. Hosseinzadeh, R., K. Khorsandi, and M. Jahanshiri, *Combination photodynamic therapy of human breast cancer using salicylic acid and methylene blue. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2017. **184**: p. 198-203.
30. Wu, W., et al., *Targeted delivery of amphotericin B to cells by using functionalized carbon nanotubes. Angewandte Chemie International Edition*, 2005. **44**(39): p. 6358-6362.
31. Zhang, J., Y. Chen, and X. Wang, *Two-dimensional covalent carbon nitride nanosheets: synthesis, functionalization, and applications. Energy & Environmental Science*, 2015. **8**(11): p. 3092-3108.
32. Ochsner, M., *Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1997. **39**(1): p. 1-18.
33. Allison, R.R., et al., *Photosensitizers in clinical PDT. Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 2004. **1**(1): p. 27-42.
34. Tuite, E.M. and J.M. Kelly, *New trends in photobiology: photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1993. **21**(2-3): p. 103-124.
35. Bonneau, R., et al., *pH dependence of singlet oxygen production in aqueous solutions using thiazine dyes as photosensitizers. Photochemistry and photobiology*, 1975. **21**(3): p. 159-163.

36. Muller-Runkel, R., J. Blais, and L. Grossweiner, *Photodynamic damage to egg lecithin liposomes. Photochemistry and photobiology*, 1981. **33**(5): p. 683-687.
37. Tardivo, J.P., et al., *Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications. Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 2005. **2**(3): p. 175-191.
38. Trindade, G.S., et al., *Methylene blue reverts multidrug resistance: sensitivity of multidrug resistant cells to this dye and its photodynamic action. Cancer letters*, 2000. **151**(2): p. 161-167.
39. Wainwright, M., *Non-porphyrin photosensitizers in biomedicine. Chemical Society Reviews*, 1996. **25**(5): p. 351-359.
40. Kalka, K., H. Merk, and H. Mukhtar, *Photodynamic therapy in dermatology. Journal of the American Academy of Dermatology*, 2000. **42**(3): p. 389-413.

Archive of SID

Abstract

Purpose: The aim of current study was to use methylene blue-curcumin ion pair nanoparticles and singledyes as photosensitizer for comparison of photodynamic therapy (PDT) efficacy on MDA-MB-231 cancer cells, also various light sources effect on activation of photosensitizer (PS) was considered.

Method: Ion pair nanoparticles were synthesized using opposite charge ions precipitation and lyophilized. The PDT experiments were designed and the effect of PSs and light sources (Red LED (630 nm; power density: 30 mW cm⁻²) and blue LED (465 nm; power density: 34 mW cm⁻²)) on the human breast cancer cell line were examined. The effect of PS concentration (0–75 μ g. mL⁻¹), incubation time, irradiation time and light sources, and priority in irradiation of blue or red lights were determined.

Results: The results show that the ion pairing of methylene blue and curcumin enhance the photodynamic activity of both dyes and the cytotoxicity of ion pair nanoparticles on the MDA-231 breast cancer cell line. Blue and red LED light sources were used for photo activation of photosensitizers. The results demonstrated that both dyes can activate using red light LED better than blue light LED for singlet oxygen producing.

Conclusion: Nano scale ion pair precipitating of methylene blue-curcumin enhanced the cell penetrating and subsequently cytotoxicity of both dyes together.

Keywords: Photodynamic therapy, Nanoparticle, Methylene blue, Curcumin, Ion pairing, Singlet oxygen, Photosensitizer