بررسی مقایسه‌ای دوزیمتری PpIX تولید شده درون تومور پس از مصرف ALA در درمان فوتودینامیک به دو روش فلوئوریمتری و فلوئورسانس اسپکتروسکوپی

دکترنادیا نقویI

***دکتر محمدحسین میران‌بیگی**II

دکتر آمنه سازگارنیاIII

چکیده

زمینه و هدف: مسئله حائز اهمیت در کاربرد فوتودینامیک تراپی(Photo Dynamic Therapy-PDT) به عنوان یکی از پایه‌های اساسی درمان نوین ضایعات سرطانی، مسئله دوزیمتری بهینه است. در این راستا، لازم است اطلاعات کافی در مورد غلظت دارو درون بافت هدف حاصل شود. از طرفی با توجه به اینکه Aminolevulinic ALA Acid خود یک حساس‌کننده نوری نیست و منجر به تولید حساس‌کننده نوری پروتوپورفیرین IX (PpIX) در سلول‌های بافت هدف می‌شود، مسئله تعیین مقدار PpIX تولید شده در بافت هدف برای دوزیمتری PDT حائز اهمیت می‌باشد. در این مطالعه، دو روش فلوئوریمتری و فلوئورسانس اسپکتروسکوپی به منظور تعیین غلظت PpIX درون بافت هدف بررسی شده‌اند.

روش کار: این مطالعه کارآزمایی بالینی در فاز درون تنی بر روی رده سلولی CT26 موش Balb/c انجام شده است. برای این منظور ابتدا با تزریق زیر جلدی تعداد 10^6 سلول زنده CT26 در پهلوی راست ۱۸ موش Balb/c (۸-۶ هفته‌ای با وزن ۲۸-۲۰ گرم)، تومور کولون القاء گردید. سپس غلظت PpIX درون تومور به دو روش فلوئوریمتری و فلوئورسانس اسپکتروسکوپی تعیین گردید. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، پس از اطمینان از نرمال بودن توزیع داده‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد، با استفاده از آزمون تی توسط نرم‌افزار SPSS V. 12 انجام گرفته است.

یافته ها: بر اساس نتایج به دست آمده مناسب‌ترین طول موج تحریک فلوئورسانس PpIX طول موج ۴۰۷ نانومتر (nm) است. همچنین ۸ ساعت پس از تزریق ALA تجمع PpIX درون تومور به حداکثر خود می‌رسد و پس از آن پروسه دفع دارو شروع می‌شود. بنابراین چنانچه برای نگهداری بیمار در محلی تاریک مشکلی وجود نداشته باشد، ۸ ساعت پس از تزریق مناسب‌ترین زمان برای تابش لیزر درمانی است. از سوی دیگر در هر دو روش با اندازه‌گیری طیف فلوئورسانس بافت و بر اساس منحنی استاندارد تعیین شده برای PpIX، غلظتPpIX درون بافت تومور تعیین شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به اهمیت مسئله تعیین مقدار داروی تجمع یافته درون بافت هدف، هم در زمینه کاربردهای کلینیکی PDT و هم در زمینه مدل‌سازی دوزیمتری PDT که در واقع گامی در راستای بهینه‌سازی این روش درمانی می‌باشد، هر دو روش فلوئوریمتری و فلوئورسانس اسپکتروسکوپی مؤثر می‌باشند. البته فلوئورسانس اسپکتروسکوپی به دلیل غیرتهاجمی بودن و امکان اندازه‌گیری زمان حقیقی بر فلوئوریمتری برتری دارد.

کلید واژه ها: ۱- فوتودینامیک تراپی ۲- فلوئوریمتری ۳- فلوئورسانس اسپکتروسکوپی ۴-پروتوپورفیرین IX

تاریخ دریافت:۸۹/۳/۱۲، تاریخ پذیرش: ۸۹/۵/۳۱

مقدمه

فوتودینامیک تراپی درمانی موضعی است که با روش غیرگرمایی باعث تخریب سلولی می‌شود. این روش محاسن قابل توجهی در مقایسه با سایر روش‌ها در درمان ضایعات سرطانی دارد. این موضوع، به خصوص وقتی مورد توجه جدی قرار می‌گیرد که بسیاری از ضایعات قبل از بدخیمی (Premalignant) نیز با این روش درمان می‌شوند و از طرف دیگر با پیشرفت تکنیک‌های آندوسکوپی می‌توان به بسیاری از ضایعات دسترسی پیدا کرد. این در حالی است که در اغلب موارد، درمان جراحی این ضایعات همراه مرگ ومیر

این مقاله خلاصه‌ای است از پایان‌نامه خانم نادیا نقوی جهت دریافت درجه دکترای مهندسی پزشکی به راهنمایی دکتر محمدحسین میران بیگی و مشاوره دکتر آمنه سازگارنیا، سال۱۳۸۹.

I) دکترای مهندسی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

II) دا نشیار ومتخصص مهندسی پزشکی، دانشکده برق و کامپیوتر، تقاطع بزگراه‌های شهید چمران و آل احمد، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران (*مولف مسئول)

III) استادیار و متخصص فیزیک پزشکی، مرکز تحقیقات فیزیک پزشکی، پژوهشکده بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی مشهد، مشهد، ایران

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-29]

قابل توجهی است.[۱و۲]

جذب انتخابی مواد حساس‌کننده به نور توسط سلول هایی که سرعت تکثیر بیشتری دارند و همچنین فعال شدن دارو پس از تابش موضعی نور لیزر باعث درجاتی از تخریب انتخابی در سلول‌های سرطانی می‌شود و این موضوع ترمیم محل درمان را تسریع می‌کند و انجام مکرر این روش درمانی را در یک محل میسر می‌سازد.[۳]

اگرچه PDT در حوزه درمان تومورها قابلیت‌های خوبی از خود نشان داده است، اما روند پذیرش آن به عنوان مسیر اصلی درمان تومور سرعت زیادی نداشته است. این امر تا حدودی نتیجه ضعف در حوزه دوزیمتری PDT است.[٤] دوزیمتری دقیق برای اطمینان از نتیجه درمان ضروری است.

در حال حاضر محققین همگی بر این موضوع اتفاق نظر دارند که اثر درمانی PDT نتیجه تولید اکسیژن یگانه تحت شرایط فعال‌سازی حساس‌کننده نوری به وسیله نور می‌باشد.[٤] بنابراین هدف PDT تولید دوز کافی از اکسیژن یگانه به منظور مرگ سلولی یا کنترل رشد سلول‌های بدخیم درون تومور ضمن حفظ سلامت بافت‌های سالم اطراف تومور می‌باشد.

پروتکل‌های کلینیکی استاندارد برای PDT به جای تکیه بر محاسبه یا اندازه‌گیری دوز اکسیژن یگانه، بر اساس مصرف مقدار از پیش تعیین شده‌ای دارو و نور می‌باشند.[٤] این گونه روش‌های دوزیمتری، تفاوت در میزان جذب دارو توسط تومور، میزان اکسیژن و خواص اپتیکی بافت برای بیماران مختلف را در نظر نمی گیرند و در نتیجه همین عوامل ممکن است موجب شوند که تولید اکسیژن یگانه در حین درمان برای رسیدن به پاسخ مطلوب کافی نباشد. بنابراین در بهترین حالت، دوزیمتری PDT بهتر است بر اساس دوز تجمع یافته اکسیژن یگانه درون بافت باشد تا از نتیجه درمان اطمینان حاصل شود.

در این راستا، به منظور محاسبه دوز اکسیژن یگانه، لازم است اطلاعات کافی در مورد غلظت دارو درون بافت هدف، میزان نور جذب شده توسط دارو، میزان اکسیژن درون بافت هدف، و برهمکنش بین آن‌ها که موجب تولید اکسیژن یگانه می‌شود، حاصل شود. تحقیقات انجام شده بر روی حیوانات نشان می‌دهد که علی رغم استفاده از یک پروتکل کلینیکی معین که بر اساس دوز داروی مصرفی و دوز نور تابشی است، رنج پاسخ درمان بسیار گسترده می‌باشد؛ به طوری که هم شامل "پاسخ درمانی کامل" و هم "هیچ گونه پاسخ درمانی" است.[۵و٦]

نتایج تحقیقات انجام شده در حوزه دوزیمتری PDT بر اساس مشاهدات و تجربیات کلینیکی محدود می‌باشد و ارزیابی و مقایسه بر پایه آن‌ها ناقص خواهد بود. از سوی دیگر با توجه به اهمیت مدل‌سازی و نقش ارزنده آن در زمینه دوزیمتری، در دو دهه گذشته مسئله مدل‌سازی در حوزه PDT بسیار مورد توجه محققین این حوزه بوده است. اما در تمام مدل سازی‌های انجام شده، یکی از پارامترهای مهم به عنوان ورودی مدل غلظت، حساس‌کننده نوری درون بافت هدف در زمان درمان می‌باشد.[۷-۱۲] در واقع تعیین این پارامتر یکی از چالش‌های مدل‌های ارائه شده در زمینه دوزیمتری PDT است.

این مسئله در مورد استفاده از داروی ALA بیشتر حائز اهمیت می‌شود؛ چرا که ALA خود یک حساس‌کننده نوری نیست، بلکه پس از مصرف در مسیر سنتز بیولوژیک تبدیل به پروتوپورفیرین IX (PpIX) می‌شود و پس از آن PpIX نقش حساس‌کننده نوری را درون بافت هدف ایفاء می‌کند.[۹-۱۱]

در این تحقیق با توجه به لزوم تعیین غلظت PpIX درون بافت هدف، بر اساس ویژگی فلوئورسانس PpIX از دو روش فلوئوریمتری و فلوئورسانس اسپکتروسکوپی برای دوزیمتری PpIX درون تومور بهره جسته شده است و در نهایت بر اساس نتایج به

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-29]

دست آمده به مقایسه کارایی هر یک از این دو روش پرداخته شده است.

روش کار

کشت و تکثیر سلول‌ها

آزمایش‌ها در فاز درون تنی و بر روی تومورهای کولون زیرجلدی موش‌های Balb/c انجام گرفته است. برای این منظور، ردهٔ سلولی CT26 مشتق شده از تومور کارسینومای کولون موش Balb/c از انستیتو پاستور ایران تهیه و درون فلاسک‌های استریل در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ FCS و آنتی بیوتیک‌های استرپتومایسین و پنی سیلین، به صورت سوسپانسیون در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد ($^{\circ}C$) دارای ۵٪ دی اکسید کربن مورد کشت و تکثیر قرار گرفت. بعد از دو تا سه روز رشد و تکثیر، سلول‌ها به صورت تک لایه کف فلاسک را پوشانند. جدا کردن سلول‌ها از کف فلاسک توسط تریپسین-EDTA و در شرایط استریل در زیر هود، صورت گرفت. بعد از تریپسینه کردن، سلول‌ها شمارش شده و درصد سلول‌های زنده به‌روش تریپان بلو و با استفاده از لام نئوبار تعیین و سوسپانسیون سلولی با غلظت ۱۰۶ سلول زنده در هر میلی‌لیتر محلول PBS آماده گردید.

ایجاد مدل توموری حیوانی

مدل توموری در موش‌های Balb/c (۸-۶ هفته‌ای با وزن ۲۸-۲۰ گرم) که از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند، القاء گردید. حیوانات در شرایط استاندارد آزمایشگاهی در قفس‌های مخصوص در یک اتاق جداگانه در دمای 0C ۲±۲۳ و رطوبت ۶۵٪ و همچنین سیکل روز- شب طبیعی قرار داشتند. سپس به هر موش، تعداد ۱۰۶ سلول زنده در حجم ۱۰۰ میکرو لیتر (µl)محلول PBS تزریق شد.[۶و۸] تزریق به صورت زیر جلدی در پهلوی راست حیوانات انجام شد. بعد از ۱۶-۱۲ روز تومورها رشد کرده و قطری در حدود ۸-۶ میلی‌متر (mm) داشتند.

تعیین غلظت PpIX تجمع یافته درون تومور به روش فلوئوریمتری

به منظور آماده‌سازی موش‌ها برای این تحقیق، دو هفته قبل از انجام آزمایش رژیم غذایی فاقد کلروفیل برای آن‌ها اعمال شد. این امر برای پیشگیری از تداخل احتمالی پیک فلوئورسانس PpIX با مواد حاوی کلروفورم در نظر گرفته شد. در پایان دو هفته به ۸ موش ALA با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم(mg/kg)به شکل صفاقی تزریق شد. ٤ موش نیز به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. به این ترتیب ۱۲ موش موجود در سه دسته تقسیم‌بندی شدند: G1 (٤ موش که به آن‌ها ALA تزریق شده بود و فاصله زمانی بین تزریق و استخراج تومور ۲ ساعت بود)، G2 (٤ موش که به آن‌ها ALA تزریق شده بود و فاصله زمانی بین تزریق و استخراج تومور ۳ ساعت بود) و G3 (٤ موش بدون تزریق ALA، ۲ موش به عنوان کنترل برای گروه G1 و ۲ موش برای گروه G2).

موش‌های گروه G1 به همراه ۲ موش کنترل ۲ ساعت پس از تزریق ALA به وسیله کلروفورم خفه شدند و تومورها استخراج شدند. تومور موش‌های گروه G2 نیز به همراه ۲ موش کنترل ۳ ساعت پس از تزریق ALA استخراج شدند.

در مرحله بعد به منظور استخراج PpIX موجود در بافت، به هر تومور ۲ میلی لیتر(ml) محلول شامل SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) ۱۰٪ در آب مقطر اضافه شد. هر یک از نمونه‌ها در لوله‌های آزمایش ابتدا به خوبی خرد و به تکه‌های کوچک تری تقسیم شد و سپس به وسیله همزن هموژنیزه گشت. محلول هموژنیزه به دست آمده به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۲۰- $^{\circ}C$ گذاشته شد و روز بعد پس از باز شدن انجماد

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-29]

محلول در دمای اتاق تاریک، ۲۰۰ میکرو لیتر(µl) از هر محلول برداشته و به ۳/۸ ml محلول شامل اسیدپرکلریک ۲ نرمال ($HClO_4$) و متانول (CH_3OH) اضافه گردید.[۷، ۸و۱۲] سپس محلول حاصل به مدت ۱۰دقیقه و با دور ۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. محلول شفاف به دست آمده به کووت کوارتز منتقل شد و درون اسپکتروفلوئورومتر مدل اف-پی-۶۲۰۰ ساخت شرکت جاسکو(FP-6200, Jasco Corporation, Japan) قرار گرفت. طول موج‌هایی که برای تحریک فلوئورسانس PpIX در سایر مقاله‌ها بیشتر به آن‌ها اشاره شده است، ۴۰۷ nm و ۴۲۰ nm می‌باشند.[۹، ۱۰و۱۳]

در این تحقیق به منظور انتخاب مناسب‌ترین طول موج هر دو طول موج مذکور به نمونه‌ها اعمال گشت و اثر این دو طول موج بر طیف فلوئورسانس نشری از نمونه‌ها بررسی گردید. در مرحله بعد در راستای نیل به هدف اصلی، که تعیین PpIX موجود در بافت از روی طیف فلوئورسانس می‌باشد، منحنی استاندارد PpIX تعیین گشت. برای تعیین منحنی استاندارد مقادیر تعیین شده‌ای از PpIX به بلانک آزمایش (۲۰۰ µl اس-دی-اس و ۳/۸ ml محلول استخراج) اضافه شد.

با تعیین سطح سیگنال فلوئورسانس این محلول‌ها در طول موجی که دامنه طیف فلوئورسانس حاصل از بافت‌ها حداکثر می شود، می‌توان منحنی استاندارد PpIX را که عبارت است از دامنه سیگنال فلوئورسانس بر حسب غلظت PpIX موجود در محلول تعیین نمود. با استفاده از منحنی استاندارد به دست آمده می‌توان غلظت PpIX را بر اساس دامنه سیگنال فلوئورسانس نمونه‌های بافت تومور در موش‌هایی که به آن‌ها ALA تزریق شده است تعیین نمود.

تعیین غلظت PpIX تجمع یافته درون تومور به روش فلوئورسانس اسپکتروسکوپی

در استفاده از روش فلوئورسانس اسپکتروسکوپی، مشابه روش فلوئوریمتری از موش‌هایی استفاده شد که با تزریق زیرجلدی تعداد $۱۰^۶$ سلول از ردهٔ سلولی CT26 در آن‌ها تومور القاء شده بود. ALA به طور صفاقی و با دوز ۲۰۰ mg/kg به ۳ موش از موش‌های مذکور تزریق شد و سپس هر یک ساعت طیف فلوئورسانس نشری از سطح پوست تومور به طور کاملاً غیرتهاجمی با استفاده از سیستمی که برای این منظور طراحی کرده ایم، اندازه‌گیری شد.

سیستم طراحی شده همان طور که در شکل شماره ۱ نشان داده شده است شامل فلوئورسانس اسپکتروسکوپ ساخت شرکت اوانتس (Avaspec-2048, Avantes, Netherlands)، فیبر نوری دو شاخه (FCR-UV200/600-2-IND, Avantes, Netherlands)، دیود لیزر ۴۰۵ nm برای تحریک فلوئورسانس ساخت شرکت رویتنر (RLD405, Roithner Laser Technik, Austria) و کامپیوتر برای آنالیز داده‌ها است.

پروب متصل به فیبر نوری دو شاخه شامل ۱۲ فیبر با قطر ۲۰۰ میکرومتر(µm) برای انتقال نور از منبع نور (لیزر ۴۰۵ nm برای تحریک فلوئورسانس) به بافت است که همگی حول فیبری با قطر ۶۰۰ µm قرار دارند و این فیبر مخصوص انتقال طیف نشری فلوئورسانس از سطح بافت به اسپکتروسکوپ می‌باشد.

اسپکتروسکوپ نیز توسط کابل USB به کامپیوتر متصل شده و برای آنالیز، داده‌ها را به کامپیوتر منتقل می‌کند. به منظور افزایش دقت و یکسان بودن شرایط در سرتاسر آزمایش، پروب در فاصله ۱۰ mm از سطح تومور ثابت شده و تابش به طور عمود بر سطح بافت انجام شد.

از سوی دیگر برای جلوگیری از حرکت موش‌ها در زمان اندازه گیری، با تزریق داخل صفاقی ۱۰ mg/kg زایلازین (ساخت شرکت دارویی بهیار سامان) و ۵۰ mg/kg کتامین آن‌ها بیهوش شدند. در این روش با توجه به اینکه نیازی به استخراج تومور نیست،

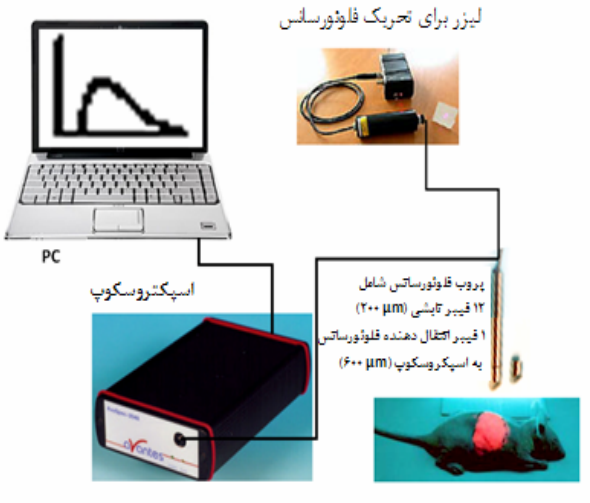
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-29]

اندازه‌گیری طیف فلوئورسانس در فاصله‌های زمانی یک ساعته امکان بررسی پروسه تجمع و دفع دارو را درون بافت تومور در بازه‌ای ۳٤ ساعته فراهم نمود.

برای تعیین غلظت PpIX بر اساس طیف فلوئورسانس به دست آمده از این سیستم اندازه گیری، منحنی استاندارد PpIX تعیین شد. برای این منظور غلظت‌های مشخصی از PpIX به بافت تومور استخراج شده از ۳ موش دیگر که به آن‌ها ALA تزریق نشده بود، اضافه گردید. هر یک از بافت‌های توموری پس از استخراج درون ٤ ml محلول ۱۰٪ SDS و آب مقطر قرار داده شدند. هر یک از نمونه‌ها به خوبی هموژنیزه شده و ۲٤ ساعت در دمای ۲۰- $^{\circ}C$ فریز شدند. روز بعد پس از یخ زدایی هریک از محلول‌ها به مدت ۱۰دقیقه با دور ۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند.

سپس به محلول شفاف حاصل غلظت‌های مشخصی از PpIX اضافه شد. برای دستیابی به منحنی استاندارد طیف فلوئورسانس محلول حاصل که درون کووت ریخته شده به وسیله سیستم طراحی شده که در شکل شماره ۱ نمایش داده شده و معرفی گردید، اندازه‌گیری شد. به منظور افزایش دقت، محلول نهایی متعلق به هر تومور پس از افزودن PpIX به سه بخش تقسیم شد و به این ترتیب از هر نمونه غلظت ۳ مرتبه اندازه‌گیری انجام شد. به این ترتیب منحنی استاندارد PpIX بر اساس فلوئورسانس اسپکتروسکوپی به دست آمد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، پس از اطمینان از نرمال بودن توزیع داده‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد، با استفاده از آزمون تی توسط نرم‌افزار SPSS V.12 انجام گرفته است.



شکل شماره ۱- سیستم طراحی شده برای اندازه‌گیری سیگنال فلوئورسانس به طور غیرتهاجمی و از روی سطح بافت.

یافته‌ها

نتایج حاصل از فلوئوریمتری

به منظور انتخاب مناسب‌ترین طول موج تحریک فلوئورسانس PpIX، طول موج‌های ٤۰۷ nm و ٤۲۰ nm با هم مقایسه شدند. نتایج این مقایسه در شکل شماره ۲ نشان داده شده است. بر اساس این نتایج مشاهده می‌شود که دامنه سیگنال فلوئورسانس برای طول موج تحریک ٤۰۷ nm بیشتر از ٤۲۰ nm است و بنابراین امکان آشکارسازی پیک فلوئورسانس با این طول موج بیشتر می‌باشد.

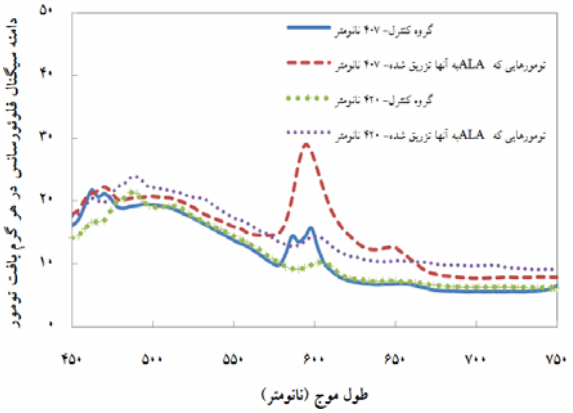
از سوی دیگر همان طور که در شکل مشخص است پیک دامنه سیگنال فلوئورسانس نشری در طول موج ٥۹۸ nm است در صورتی که پیک دامنه سیگنال فلوئورسانس نشری PpIX در حدود ٦۳٥ nm است.[۱٤و۱٥] پس از بررسی این تفاوت نتیجه‌گیری شد که شیفت مشاهده شده در طول موج، ناشی از وجود اسید کلریک در محلول استخراج به کار گرفته شده برای استخراج PpIX موجود در بافت می‌باشد.

نتیجه دیگر به دست آمده در مورد فاصله زمانی بین تزریق دارو و انجام درمان (تابش لیزر درمانی) است.

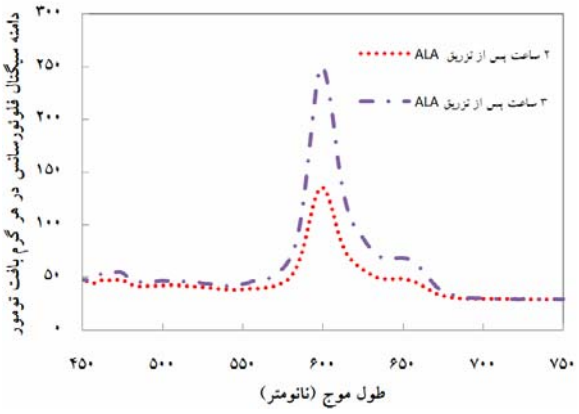
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-29]

مطمئناً در زمان درمان PDT که طول موج درمانی ۶۳۰nm تابش می‌شود هرچه تجمع دارو درون تومور بیشتر باشد، احتمال تولید تعداد مولکول‌های اکسیژن یگانه افزایش می‌یابد و به تبع آن نتیجه درمان نیز بهتر خواهد بود. در کاربردهای کلینیکی فاصله زمانی ۲ ساعت و ۳ ساعت پیشنهاد شده است.[۱۶]

با توجه به گروه‌بندی موش‌ها در دو دسته G1 و G2 که بر اساس استخراج تومور و اندازه‌گیری طیف فلوئورسانس به ترتیب ۲ ساعت و ۳ ساعت پس از تزریق ALA بود، نتایج نشان داده شده در شکل شماره ۳ گویای این مسئله است که در فاصله زمانی ۳ ساعت پس از تزریق ALA، به مراتب تجمع PpIX درون تومور بیشتر از ۲ ساعت است.

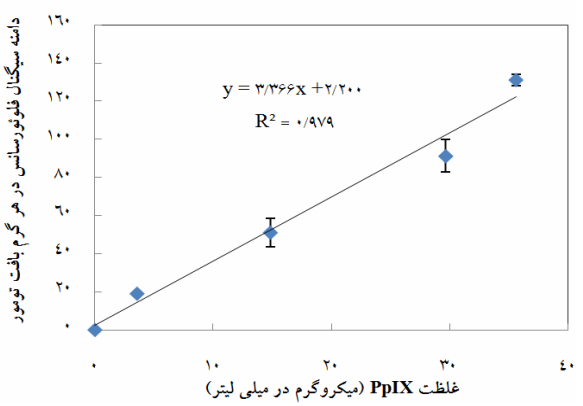


شکل شماره ۲- مقایسه دو طول موج ۴۰۷ nm و ۴۲۰ nm برای تحریک فلوئورسانس PpIX.

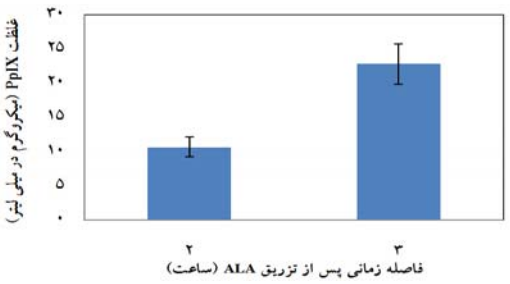


شکل شماره ۳- بررسی تأثیر فاصله زمانی بین تزریق ALA و اخذ طیف فلوئورسانس بر تجمع PpIX درون تومور

منحنی استاندارد به دست آمده بر اساس روش فلوئوریمتری در شکل شماره ٤ نمایش داده شده است. با توجه به نتایج اشکال شماره ۲ و ۳ که معرف پیک فلوئورسانس نشری در حدود ٦۰۰ nm است، منحنی استاندارد بر اساس دامنه سیگنال فلوئورسانس نشری در طول موج ٦۰۰ nm است. بر اساس منحنی استاندارد به دست آمده و نتایج شکل شماره ۳، غلظت PpIX درون تومور در زمان‌های ۲ hr و ۳ hr پس از تزریق ALA تعیین گردید (شکل شماره ٥).



شکل شماره ۴- منحنی استاندارد PpIX. (داده‌ها نمایانگر میانگین سه بار اندازه‌گیری ± خطای استاندارد است) سیگنال نشری به روش فلوئوریمتری و در طول موج نشری ٦۰۰ nm و طول موج تحریک ٤۰۷ nm تعیین شده است.



شکل شماره ۵- نمودار غلظت PpIX درون بافت تومور پس از تزریق ALA به میزان ٥۰۰ mg/kg و در زمان‌های ۲ ساعت و ۳ ساعت پس از تزریق (داده‌ها نمایانگر سه بار اندازه‌گیری ± خطای استاندارد است).

نتایج حاصل از فلوئورسانس اسپکتروسکوپی

در استفاده از سیستم طراحی شده بر اساس روش فلوئورسانس اسپکتروسکوپی با توجه به اینکه

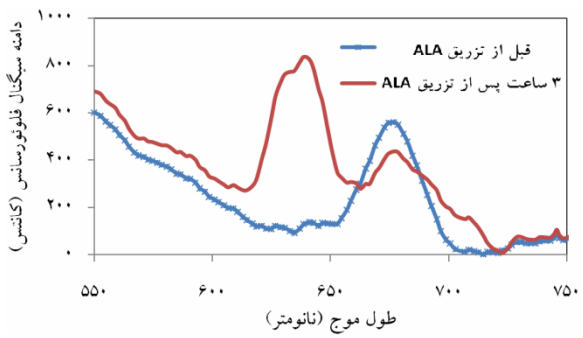
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-29]

طیف‌سنجی به طور غیرتهاجمی با استفاده از فیبر نوری و از روی تومور انجام می‌شود و مشابه فلوئوریمتری نیازی به استفاده از محلول‌های شیمیایی برای استخراج PpIX موجود در بافت نیست، جابجایی در پیک فلوئورسانس نشری PpIX ظاهر نشد و همان طور که انتظار می‌رفت پیک در طول موج ۶۳۵ nm آشکار گردید.

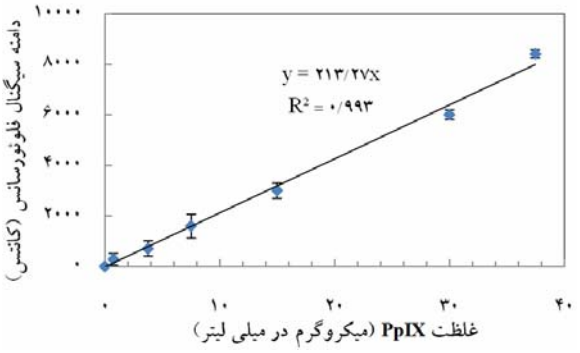
البته همان طور که در شکل شماره ٦ نشان داده شده است، یک پیک دیگر در طول موج ۶۷۵ nm نیز وجود دارد که با توجه به اینکه این پیک هم قبل از تزریق ALA و هم پس از آن وجود دارد، ناشی از ترکیبات کلروفیلی موجود در بافت می‌باشد.

بر اساس شدت سیگنال فلوئورسانس نشری از محلول‌های بافت تومور که PpIX با غلظت‌های مشخصی به آن‌ها اضافه شده است، منحنی استاندارد PpIX بر اساس روش فلوئورسانس اسپکتروسکوپی و سیستم معرفی شده، در شکل شماره ۷ نمایش داده شده است. منحنی استاندارد بر اساس دامنه سیگنال فلوئورسانس نشری در طول موج ۶۳۵ nm است. در به دست آوردن این منحنی، به منظور حذف اثر فلوئورسانس ذاتی بافت که ناشی از مواد فلوئورسانس بافت می‌باشد، دامنه سیگنال فلوئورسانس بلانک از تمام نمونه‌ها کم شده است.

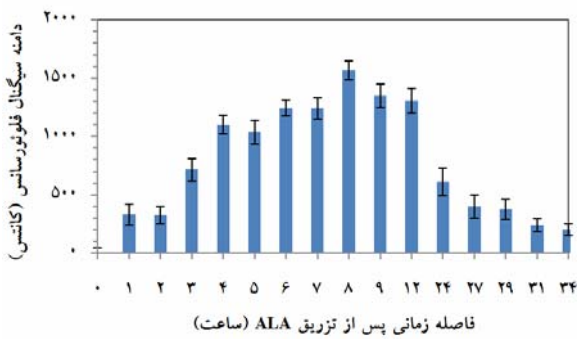
با توجه به اینکه در این روش نیازی به کشتن موش‌ها و استخراج تومور نیست و تنها با بیهوش کردن موقت موش طیف فلوئورسانس اخذ می‌شود، این امکان فراهم بود تا پروسه تجمع و دفع PpIX نیز بررسی شود. این کار در فواصل زمانی یک ساعته و به مدت ۳٤ ساعت انجام شد که نتایج آن در شکل شماره ۸ نشان داده شده است.



شکل شماره ۶- طیف فلوئورسانس از سطح بافت تومور قبل و پس از تزریق ALA.



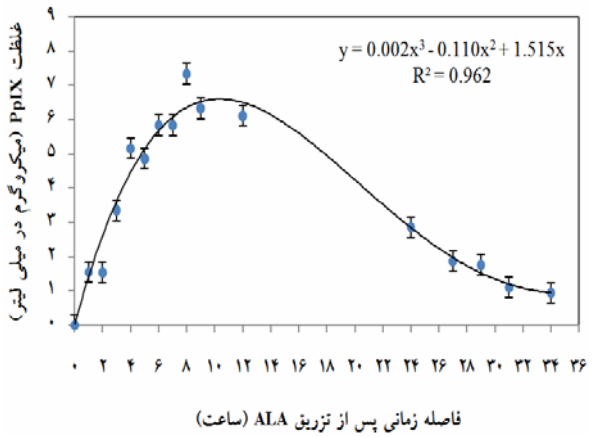
شکل شماره ۷- منحنی استاندارد PpIX تعیین شده به روش فلوئورسانس اسپکتروسکوپی. (داده‌ها نماینگر میانگین سه بار اندازه‌گیری ± خطای استاندارد است) نتایج در طول موج نشری ۶۳۵ nm و طول موج تحریک ٤٠٥ nm اخذ شده است.



شکل شماره ۸- هیستوگرام شدت سیگنال فلوئورسانس از سطح بافت تومور بر حسب فاصله زمانی پس از تزریق ALA به میزان ۲۰۰ mg/kg. داده‌ها نماینگر میانگین سه بار اندازه‌گیری از هر یک از ۳ موش ± خطای استاندارد است. میانگین فلوئورسانس ذاتی بافت قبل از تزریق ALA از تمام داده‌ها کم شده است.

بر اساس نتایج شکل شماره ۸ و منحنی استاندارد به دست آمده در شکل شماره ۷، غلظت PpIX موجود در بافت بر حسب زمان تعیین گردید که نتایج آن در شکل شماره ۹ نمایش داده شده است. در راستای نیل به هدف اصلی این تحقیق که تعیین غلظت PpIX درون بافت تومور می‌باشد و همچنین تعیین تابع زمانی توزیع پذیری PpIX، پس از عبور دادن نمودار با درجات مختلف از داده‌ها، نمودار درجه ۳ بهترین همخوانی را با داده‌های موجود داشت و به این ترتیب معادله $y = 0.002x^3 - 0.110x^2 + 1.515x$ ($R^2 = 0.962$) که توصیف‌کننده غلظت PpIX درون بافت هدف به عنوان تابعی از زمان است، به دست آمد.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-29]



شکل شماره ۹- غلظت PpIX درون تومور به عنوان تابعی از فاصله زمانی پس از تزریق ALA

بحث و نتیجه‌گیری

همان طور که از نمودار شکل شماره ۲ مشاهده می‌شود مناسب‌ترین طول موج برای تحریک فلوئورسانس PpIX طول موج ۴۰۷ nm است و بر این اساس در پیاده‌سازی سیستم فلوئورسانس اسپکتروسکوپی از نزدیک‌ترین لیزر موجود به این طول موج که ۴۰۵ nm است، استفاده شد. از سوی دیگر بر اساس نتایج به دست آمده به روش فلوئوریمتری که در شکل شماره ۵ نمایش داده شده است، با گذشت ۳ ساعت از تزریق ALA تجمع PpIX درون تومور بیشتر از ۲ ساعت است. این نتیجه توسط داده‌های حاصل از فلوئورسانس اسپکتروسکوپی نیز تایید می‌شود و علاوه بر این با توجه به غیرتهاجمی بودن فلوئورسانس اسپکتروسکوپی از سطح بافت تومور، امکان بررسی سایر زمان‌ها نیز میسر شد.

با توجه به نتایج نشان داده شده در شکل شماره ۹ بیشترین تجمع PpIX درون بافت ۸ ساعت پس از تزریق ALA می‌باشد و پس از آن پروسه دفع PpIX از بافت تومور شروع می‌شود که بر اساس روند نزولی نمودار شکل شماره ۹ پیش بینی می‌شود ۴۸ ساعت پس از تزریق ALA اثری از PpIX القایی باقی نماند. بحث تعیین زمانی که حداکثر تجمع PpIX درون بافت تومور رخ می‌دهد از نظر به حداکثر رساندن اثربخشی درمان با حداقل تابش نور درمان حائز اهمیت می‌باشد. از سوی دیگر، تعیین مدت زمان لازم برای دفع دارو از بافت نیز به ویژه در کاربردهای کلینیکی این روش درمانی، از نقطه نظر دور نگهداشتن بیمار از نورهای شدید پس از درمان ارزشمند است.

علاوه بر این، مهم‌ترین دستاورد این تحقیق دستیابی به روشی است که بتوان غلظت PpIX را درون بافت هدف تعیین نمود. چرا که تحقیقات انجام شده بر روی حیوانات نشان می‌دهد که علی رغم استفاده از یک پروتکل کلینیکی معین که بر اساس دوز داروی مصرفی و دوز نور تابشی است، رنج پاسخ درمان فتوداینامیک بسیار گسترده می‌باشد؛ به طوری که هم شامل پاسخ درمانی کامل و هم هیچ گونه پاسخ درمانی است.[۵و۶]

اگرچه بخشی از تغییرات در پاسخ به درمان مربوط به تفاوت در شرایط بیولوژیک هر بیمار است اما مسئله مقدار داروی حساس‌کننده نوری درون بافت هدف، یکی از فاکتورهای تعیین‌کننده در نتیجه درمان می‌باشد. این امر ناشی از ارتباط مستقیم دوز اکسیژن یگانه تولید شده درون بافت هدف با حاصل ضرب دوز دارو و دوز نور تابشی است.[۱۷و۱۸] بنابراین چنانچه بتوان در زمان درمان غلظت دارو درون بافت هدف را به درستی تعیین نمود در این صورت می‌توان با افزایش یا کاهش چگالی انرژی تابشی به دوز کافی از اکسیژن یگانه دست یافت و به این ترتیب احتمال موفقیت درمان افزایش می‌یابد.

پیشرفت‌های اخیر در زمینه تکنیک‌های آشکارسازی سیگنال فلوئورسانس، تعیین دوز دارو در زمان درمان را میسر ساخته است. نتایج به دست آمده در این تحقیق بیانگر آن است که تعیین غلظت PpIX تجمع یافته درون تومور به هر دو روش فلوئوریمتری و فلوئورسانس اسپکتروسکوپی میسر می‌باشد؛ با این تفاوت که فلوئوریمتری نیاز به نمونه برداری از بافت تومور دارد و از این نظر روشی تهاجمی محسوب می‌شود.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-29]

از سوی دیگر، دوزیمتری دارو با این روش زمان‌بر می‌باشد و بنابراین نمی توان به شکل زمان حقیقی (Real time) از نتایج استفاده نمود. در مقابل، در فلوئورسانس اسپکتروسکوپی طیف فلوئورسانس نشری از سطح بافت به وسیله پروب فیبر نوری جمع‌آوری شده و به اسپکتروسکوپ منتقل می‌شود. بنابراین این روش غیرتهاجمی بوده و همچنین می‌توان به شکل زمان حقیقی و در زمان درمان از نتایج استفاده نمود.

با توجه به اهمیت مسئله تعیین مقدار داروی تجمع یافته درون بافت هدف، هم در زمینه کاربردهای کلینیکی PDT و هم در زمینه مدل‌سازی دوزیمتری PDT که در واقع گامی در راستای بهینه‌سازی این روش درمانی می‌باشد، هر دو روش فلوئوریمتری و فلوئورسانس اسپکتروسکوپی مؤثر می‌باشند. البته فلوئورسانس اسپکتروسکوپی به دلیل غیرتهاجمی بودن و امکان اندازه‌گیری زمان حقیقی بر فلوئوریمتری برتری دارد.

فهرست منابع

1- Brown SB, Brown EA, Walker I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. Lancet Oncol; 2004. 5: 497-508.

2- Marcus SL. Photodynamic therapy of human cancer. Proceedings of the IEEE; 1992. 80(6): 869-89.

3- Bown SG, Millson CE. Photodynamic therapy in gastroenterology. Gut; 1997. 41: 5-7.

4- Wilson BC, Patterson MS. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. Phys Med Biol; 2008. 53: R61–R109.

5- Peng Q, Warloe T, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Giercksky KE, et al. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy, clinical research and future challenges. Cancer; 1997. 79: 2282-308.

6- Theodossiou T, MacRobert AJ. Comparison of the photodynamic effet of exogenous photoprotoporphyrin and protoporphyrin IX on PAM 212 murine keratinocytes. Photochem Photobiol; 2002. 76: 530-37.

7- Stringer MR, Kelty CJ, Ackroyd R, Brown SB. Light dosimetry measurements during ALA-PDT of Barrett's oesophagus. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy; 2006. 3: 19-26.

8- Juzenas P, Juzeniene A, Stakland S, Iani V, Moan J. Photosensitizing effect of protoporphyrin IX in pigmented melanoma of mice. Biochem Biophys Res Cummun; 2002. 297(3): 468-72.

9- Peng Q, Moan J, Warloe T, Nesland JM, Rimington C. Distribution and photosensitizing efficiency of porphyrins induced by application of exogenous 5-aminolevulinic acid in mice bearing mammary carcinoma. Int J Cancer; 1992. 52: 433-43.

10- Sheng C, Hoopes PJ, Hasan T, Pogue BW. Photobleaching-based dosimetry predicts deposited dose in ALA-PpIX PDT of rodent esophagus. Photochem Photobiol; 2007. 83: 738-48.

11- Boere IA, Robinson DJ, de Bruijn HS. Monitoring in situ dosimetry and protoporphyrin IX fluorescence photobleaching in the normal rat esophagus during 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy. Photochem Photobiol; 2003. 78(3): 271-77.

12- Naghavi N, Miran Baygi MH. Modeling of laser-photosensitizer interaction in photodynamic therapy for determining the optimal laser radiation time. IJMP; 2006. 3(11): 69-78.

13- Otake M, Nishiwaki M, Kobayashi Y, Baba S, Kohno E, Kawasaki T, et al. Selective accumulation of ALA-induced PpIX and photodynamic effect in chemically induced hepatocellular carcinoma. BJC; 2003. 89: 730-36.

14- Robinson DJ, de Bruijn HS, de Wolf WJ, Sterenborg HJCM, Star WM. Topical 5-aminolevulinic acid-photodynamic therapy of hairless mouse skin using two-fold illumination schemes: PpIX fluorescence kinetics, photobleaching and biological effect. Photochem Photobiol; 2000. 72: 794-802.

15- Kruijt B, de Bruijn HS, van der Ploeg den Heuvel A, de Bruin RWF, Sterenborg HJCM, Amelink A, et al. Monitoring ALA-induced PpIX photodynamic therapy in the rat esophagus using fluorescence and reflectance spectroscopy. Photochem Photobiol; 2008. 84: 1515-527.

16- AAPM Report No. 88, Photodynamic therapy dosimetry. Published for the American Association of Physicists in Medicine by Medical Physics Publishing. 2005.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-29]

17- Zhou X, Pogue BW, Chen B, Demidenko E, Joshi R, Hoopes J, et al. Pretreatment photosensitizer dosimetry reduces variation in tumor response. Int J Radiation Oncology Biol; 2006. 64: 1211-219.

18- Mang TS. Dosimetric concepts for PDT. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy; 2008. 5: 217-23.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-29]

A Comparative Study of PpIX Dosimetry Produced within the Tumor after ALA Administration in Photodynamic Therapy By Fluorometry and Fluorescence Spectroscopy Methods

N. Naghavi, PhD[I] *M.H. Miran Baygi, PhD[II]
A. Sazgarnia, PhD[III]

Abstract

Background: The important issue in the application of Photodynamic Therapy (PDT), as one of the fundamental basis of new treatment for cancerous lesions, is optimal dosimetry. In this context, it is necessary to obtain enough information about the drug concentration within the target tissue. On the other hand, the fact that ALA itself is not a photosensitizer and causes the production of Protoporphyrin IX (PpIX) in target tissue, determining the amount of PpIX produced in the target tissue is important for PDT dosimetry. Thus, in this study fluorometry and fluorescence spectroscopy have been investigated to determine the concentration of PpIX within the target tissue.

Methods: This study was carried out in vivo on CT26 cell line of Balb/c mouse. In this context, first by subcutaneous injection of 10^6 CT26 cells into right side of 18 Balb/c mice (6-8 weeks old, weighting 20-28 gr), colon carcinoma tumors were induced. Then, tissue concentration of PpIX was determined by using two methods: fluorometry and fluorescence spectroscopy. Statistical analysis of data, after ensuring normal distribution of data in the 95% confidence, was conducted using student's t-test in SPSS V.12 software.

Results: Based on the results, appropriate PpIX fluorescence excitation wavelength is 407 nm. Also, 8 hours after injection of ALA, PpIX accumulation reaches its maximum and then the process of drug discharge begins. Thus if there is no problem to keep the patient in the dark room, the best time for radiation of treatment laser is 8 hours after ALA injection. On the other hand, in both methods by measuring the fluorescence spectrum of tissue and based on the standard curve determined for PpIX, the concentration of PpIX within the tumor tissue was determined.

Conclusion: Considering the importance of determining the amount of drug accumulated within the tissue, both in clinical applications of PDT and modeling of PDT dosimetry which is a step in order to optimize this therapy, both methods; fluorometry and fluorescence spectroscopy; are effective. However fluorescence spectroscopy, as being noninvasive and allowing real time measurement, is preferd to fluorometry.

Keywords: 1) Photodynamic therapy 2) Fluorometry
3) Fluorescence spectroscopy 4) Protoporphyrin IX

This article is a summary of the thesis by N. Naghavi for the degree of Ph.D in Biomedical Engineering under supervision of M.H. Miran Baygi, Ph.D and consultation with A. Sazgarnia, Ph.D (2010).
I) PhD in Biomedical Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
*II) Associate Professor of Biomedical Engineering, Department of Biomedical Engineering, Computer and Electrical School, Crossing of Jalal Al-Ahmad and Shahid Chamran Expressways, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran (*Corresponding Author)*
III) Assistant Professor of Medical Physics, Research Center of Medical Physics, Research Institute of Avicenna, Mashhad University of Medical Sciences and Health Services, Mashhad, Iran

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-29]