

بررسی پاسخ سلول‌های سرطانی کبد به درمان فتودینامیکی با واسطه متیلن بلو

مهناز هادی‌زاده^۱

محسن فاتح^۲

مریم جهانگیری مقدم^۳

^۱استادیار پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران
^۲مربی پژوهش، گروه لیزر پزشکی، جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
^۳کارشناس شیمی گروه لیزر پزشکی، جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

نویسنده مسئول: مهناز هادی‌زاده، تلفن: ۰۹۱۲۵۲۳۶۷۴۵
 نشانی الکترونیک: hadizadehmahnaz@gmail.com

چکیده

مقدمه: درمان فتودینامیکی یک روش نسبتاً جدید برای درمان سرطان و برخی از ضایعات غیر بدخیم است. درمان فتودینامیکی برای از بین بردن سلول‌های بدخیم از نور و داروی حساس به نور استفاده می‌کند. هدف از این مطالعه بررسی اثرهای سمی ماده حساس به نور متیلن‌بلو در شکل غیر فعال و فعال (القائه شده توسط لیزر) بر روی رده سلول‌های سرطانی کبد انسان (HepG2) و فیبروبلاست‌های نرمال انسانی بود.

روش بررسی: سلول‌های HepG2 و فیبروبلاست قبل از تیمار با غلظت‌های مختلف متیلن‌بلو در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای کشت داده شدند. بعد از یک ساعت، سلول‌ها در معرض نور قرمز لیزر (طول موج ۶۶۰ نانومتر) به مدت ۲ دقیقه با دوز ۵ ژول بر سانتی‌متر مربع قرار گرفتند. پس از تابش نور، توان زیستی سلول‌ها بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون با استفاده از روش MTT اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که متیلن‌بلو در شکل غیر فعال (در تاریکی) فاقد اثر سمی و یا دارای سمیت کمی برای سلول‌های HepG2 و فیبروبلاست است. متیلن‌بلو پس از فعال شدن با نور لیزر در غلظت ۴ تا ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر توان زیستی سلول‌های HepG2 را به ۳۵ درصد و توان زیستی سلول‌های فیبروبلاست را به ۸۳ درصد کاهش داد.

بحث و نتیجه‌گیری: به‌طور کلی، نتایج ما نشان می‌دهد که درمان فتودینامیکی با واسطه متیلن‌بلو به‌طور قابل توجهی باعث القاء مرگ سلول‌های HepG2 می‌شود که حمایت‌کننده پتانسیل استفاده از این روش به‌عنوان یک درمان جایگزین با حداقل تهاجم برای کارسینومای هپاتوسلولار انسانی است.

واژه‌های کلیدی: درمان فتودینامیکی، لیزر، متیلن‌بلو، سلول‌های سرطانی کبد

مقدمه

کارسینومای هپاتوسلولار^۱ رایج‌ترین شکل سرطان کبد است که سالانه بیش از نیم‌میلیون نفر در جهان به آن مبتلا می‌شوند. عوامل اصلی ایجادکننده آن عبارت‌اند از: الکل، سیروز، هپاتیت B و C. از لحاظ پاسخ به درمان، بیماری کارسینومای هپاتوسلولار از جمله بدخیمی‌های بسیار مقاوم در برابر درمان محسوب می‌شود به‌طوری‌که درحال حاضر تنها روش درمانی مؤثر برای آن، برداشتن ناحیه توموری و یا پیوند کبد می‌باشد ولی به‌دلیل متاستاز درون کبدی و عود مجدد، این روش‌ها نیز تاکنون موفقیت‌چندانی نداشته‌اند. بنابراین کاربرد روش‌های جدید برای هدف‌قرار دادن مراحل اولیه متاستاز و جلوگیری از پخش شدن سلول‌های توموری از نواحی اولیه، می‌تواند استراتژی مؤثری برای فلج کردن متاستاز و عود مجدد این بیماری باشد [۱و ۲].

درمان فتودینامیکی^۲ به‌عنوان روش درمانی نوین جهت تخریب تومورها و سلول‌های غیرطبیعی از طریق واکنش‌های فتوشیمیایی

معرفی شده است زیرا نتایج آزمایش‌های برون‌تنی^۳، درون‌تنی^۴ و کلینیکی متعدد با استفاده از ترکیبات حساس به نور مختلف، نویدبخش نقش مؤثر این روش در درمان بدخیمی‌های مربوط به مری، نایژه، مغز، حفره دهانی، پوست، مثانه، سر و گردن و همچنین اختلالات غیر انکولوژیک مثل دژنراسیون ماکولای وابسته به سن بوده است [۷-۳].

برای انجام درمان فتودینامیکی به دو فاکتور غیر سمی شامل نور و ماده حساس به نور^۵ نیاز است. کاربرد این دو فاکتور با یکدیگر منجر به ایجاد استرس درون‌سلولی در بافت هدف می‌شود. ماده حساس به نور پس از جذب شدن توسط سلول با دریافت نور با انرژی مناسب برانگیخته می‌شود و درحضور اکسیژن مولکولی، گونه‌های فعال اکسیژن و درحضور عوامل احیاءکننده رادیکال‌های آزاد دیگری را تولید می‌کند. درنهایت، نتیجه این

^۳In vitro

^۴n vivo

^۵Photosensitizer

^۱Hepatocellular carcinoma

^۲Photodynamic therapy

سلول‌ها در محیط RPMI 1640 به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاو، پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد، CO_2 ۵ درصد و رطوبت ۹۵ درصد کشت داده شدند.

بررسی سمیت تاریکی متیلن‌بلو

برای بررسی سمیت سلولی متیلن‌بلو در غیاب نور (سمیت تاریکی) در هر چاهک از پلیت‌های کشت سلولی ۹۶ خانه‌ای، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی (1×10^4 سلول HepG2) و (6×10^2 سلول فیبروبلاست) به‌طور جداگانه ریخته شد و پلیت‌ها در انکوباتور (۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد) قرار گرفتند. ۲۴ ساعت بعد از کشت، سلول‌ها در تاریکی با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر از متیلن‌بلو به مدت یک ساعت انکوبه شدند و میزان مرگ و میر سلولی با استفاده از تست رنگ‌سنجی MTT^7 (۳، ۴، ۵ دی‌متیل‌تيازول ۲ یل ۵، ۲ دی‌فنیل ترازولیوم) بررسی شد.

بررسی سمیت نوری متیلن‌بلو

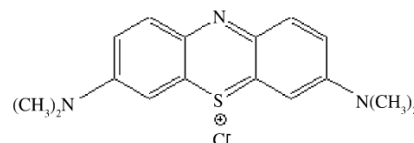
جهت بررسی اثر سمیت نوری متیلن‌بلو ابتدا سوسپانسیون سلولی از سلول‌های فیبروبلاست و HepG2 به‌طور جداگانه در محیط کشت RPMI 1640 به همراه FBS ۱۰ درصد تهیه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون سلولی در هر چاهک از پلیت‌های کشت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد. ۲۴ ساعت بعد، سلول‌ها در تاریکی با غلظت‌های مختلف متیلن‌بلو (۸-۰/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت یک ساعت در انکوباتور با شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد انکوبه شدند. سپس محیط کشت رویی تخلیه شد و چاهک‌ها دو مرتبه با PBS شستشو داده شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت بدون فنل رد^۸ به هر چاهک افزوده شد و سلول‌ها در معرض تابش نور لیزر دیودی (Lasotronic MED 131 Switzerland, power output 45 mW) با طول موج ۶۶۰ نانومتر به مدت دو دقیقه و با انرژی تابشی $5 J/cm^2$ قرار گرفتند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، میزان مرگ و میر سلول‌ها به روش MTT بررسی و درصد توان زیستی باقیمانده سلول‌ها در مقایسه با کنترل منفی تعیین شد. به‌عنوان کنترل منفی، سلول‌ها فقط در معرض تابش نور لیزر قرار

واکنش‌های فتوشیمیایی به مرگ سلولی از طریق آپوپتوزیس یا نکروز منتهی می‌شود [۸ و ۹].

عدم آسیب‌رسانی به سلول‌های نرمال، غیرتهاجمی بودن، عدم نیاز به بیهوشی موضعی یا عمومی، کوتاه بودن طول مدت درمان، عدم نیاز به بستری شدن در بیمارستان، عدم وابستگی به سن یا سایر بیماری‌های جانبی فرد مبتلا به سرطان و امکان تکرار در صورت عود بیماری از مزایای درمان فتودینامیکی نسبت به سایر روش‌های درمانی متداول برای کارسینومای هپاتوسلولار محسوب می‌شوند [۱۰ و ۱۱].

یکی از فاکتورهای اساسی در افزایش بازده PDT انتخاب ماده حساس‌به‌نور مناسب می‌باشد. مواد حساس‌به‌نور زیادی با ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی متفاوت شناسایی شده‌اند که هریک مزایای خاص خود را دارند. متیلن‌بلو^۶ که در مطالعه حاضر به‌عنوان ماده حساس‌به‌نور در نظر گرفته شده است، یک فنوتیازینیوم کاتیونیک (شکل ۱) آبی‌رنگ است که در صورت احیاء شدن بی‌رنگ می‌شود. از جمله مزایای متیلن‌بلو نسبت به مواد حساس‌به‌نور دیگر می‌توان به قابلیت اتصال به میتوکندری و القای آپوپتوزیس، تولید رادیکال آزاد در شرایط هیپوکسی، عدم دفع شدن توسط سلول‌های سرطانی مقاوم به دارو و امکان فعال شدن توسط منابع نوری مختلف اشاره کرد [۱۲ و ۱۳].

آزمایش‌های متعددی حاکی از آن است که کاربرد متیلن‌بلو در درمان فتودینامیکی برخی از انواع تومورها موفقیت‌آمیز بوده است [۱۴ و ۱۵]. در این مطالعه اثر درمان فتودینامیکی با استفاده از متیلن‌بلو و منبع تابش نور لیزری بر روی توان زیستی رده سلولی HepG2 به‌عنوان مدل سلولی سرطان کبد انسان و سلول‌های فیبروبلاست انسانی به‌عنوان مدل سلولی نرمال مورد بررسی قرار گرفته است.



شکل ۱: ساختار مولکولی متیلن‌بلو [۱۲]

روش بررسی

کشت سلول

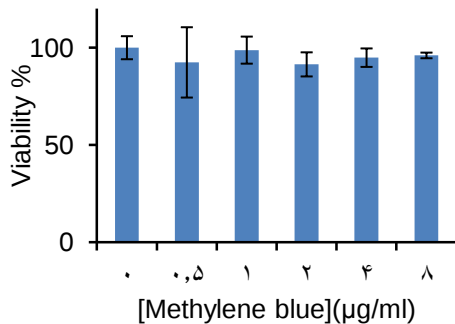
سلول‌های HepG2 از انستیتو پاستور ایران و سلول‌های فیبروبلاست انسانی از مرکز تحقیقات فناوری بن‌یاخته تهیه شدند.

⁶Methylene blue

⁷3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazoliumbromide

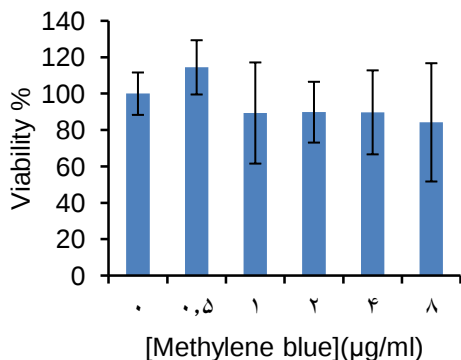
⁸Phenol red

ناچیز می‌باشد به‌طوری‌که تنها منجر به کاهش کمتر از ۲۰ درصد در توان زیستی فیبروبلاست‌ها می‌شود (شکل ۲).



شکل ۲: اثر غلظت‌های مختلف متیلن‌بلو بر سلول‌های فیبروبلاست انسانی بعد از ۱ ساعت انکوباسیون سلول‌ها با متیلن‌بلو در تاریکی

همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، سمیت تاریکی متیلن‌بلو در مورد سلول‌های سرطانی HepG2 نیز ناچیز می‌باشد به‌طوری‌که تا غلظت ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر منجر به حدود ۱۰ درصد و در غلظت ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر منجر به حدود ۱۷ درصد کاهش در توان زیستی این سلول‌ها می‌شود.



شکل ۳: اثر غلظت‌های مختلف متیلن‌بلو بر سلول‌های HepG2 انسانی بعد از ۱ ساعت انکوباسیون سلول‌ها با متیلن‌بلو در تاریکی

اثر سمیت نوری متیلن‌بلو بر توان زیستی سلول‌ها
نتایج آزمایش‌های مربوط به اثر غلظت‌های مختلف متیلن‌بلو پس از برانگیختگی با نور قرمز لیزری یا به‌عبارت دیگر اثر درمان فتودینامیکی به‌واسطه متیلن‌بلو بر روی سلول‌های فیبروبلاست و HepG2 نشان داد که متیلن‌بلو در غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثری بر توان زیستی سلول‌های سرطانی HepG2 ندارد ولی در غلظت‌های ۲ تا ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر منجر به حدود ۶۵ درصد کاهش در توان زیستی این سلول‌ها می‌شود

گرفتند بدون آنکه متیلن‌بلو به محیط کشت آن‌ها اضافه شده باشد. هر آزمایش حداقل سه بار تکرار شد.

بررسی توان زیستی سلول‌ها

در این مطالعه برای بررسی توان زیستی سلول‌ها از روش رنگ‌سنجی MTT استفاده شد. در روش MTT دهیدرونازهای سلول‌های زنده با فعالیت آنزیمی خود منجر به تبدیل شدن MTT به رنگ فورمازان می‌شوند بنابراین میزان فورمازان تولیدشده متناسب با تعداد سلول‌های زنده خواهد بود.

برای انجام تست MTT جهت بررسی سمیت تاریکی متیلن‌بلو به‌طور خلاصه به این ترتیب عمل شد که یک ساعت پس از اضافه کردن غلظت‌های مختلف متیلن‌بلو به سلول‌ها، محیط کشت رویی دور ریخته شد و سلول‌ها دوبار با فسفات بافر سالین (PBS) شستشو داده شدند. سپس به هر چاهک محلول ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر MTT افزوده شد و پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بعد از ۴ ساعت محتویات چاهک‌ها تخلیه و ۱۰۰ میکرولیتر محلول دی‌متیل‌سولفاکساید (DMSO)^۹ به هر چاهک افزوده شد. DMSO به‌عنوان حلال بلورهای فورمازان عمل می‌کند و باعث ایجاد محلول‌های بنفش‌رنگ با شدت رنگ مختلف می‌شود [۱۶].

درصد توان زیستی سلول‌ها با سنجش جذب نوری مربوط به هر چاهک در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه الیزاریدر در مقایسه با جذب نوری کنترل منفی تعیین شد. به‌عنوان کنترل منفی، سلول‌ها فقط با محیط کشت بدون متیلن‌بلو انکوبه شدند. آزمایش مربوط به هر غلظت متیلن‌بلو سه بار تکرار شد.

یافته‌ها

اثر سمیت تاریکی متیلن‌بلو بر توان زیستی سلول‌ها

نتایج آزمایش‌های مربوط به بررسی اثر غلظت‌های مختلف متیلن‌بلو در غیاب نور بر روی سلول‌های فیبروبلاست به‌عنوان سلول‌های نرمال و سلول‌های HepG2 به‌عنوان سلول‌های سرطانی کبد نشان داد که متیلن‌بلو تا غلظت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای سلول‌های نرمال غیر سمی است و سمیت آن در غلظت‌های بالاتر از ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز برای این سلول‌ها

^۹Dimethyl sulfoxide

است. دوز تابشی 5 J/cm^2 براساس نتایج آزمایش‌های اولیه با استفاده از چند دوز تابشی مختلف ($5, 10, 15 \text{ J/cm}^2$) انتخاب شد. این دوز تابشی در مقایسه با سایر دوزهای آزمایش شده دارای کمترین اثر سمی برروی سلول‌ها در غیاب متیلن‌بلو و سمیت نوری بالا در حضور متیلن‌بلو برای سلول‌های سرطانی HepG2 بود (داده‌ها نشان داده نشده است).

بحث و نتیجه‌گیری

در دو دهه اخیر درمان انواع مختلف سرطان به روش فتودینامیکی که روشی ایمن و غیرتهاجمی است، مورد توجه قرار گرفته است. این روش درمانی مبتنی بر سه فاکتور اصلی شامل نور، اکسیژن و ماده حساس‌به‌نور است که هر کدام به‌نوبه خود نقش مهمی را در بازده نهایی آن ایفا می‌کنند [۱۰].

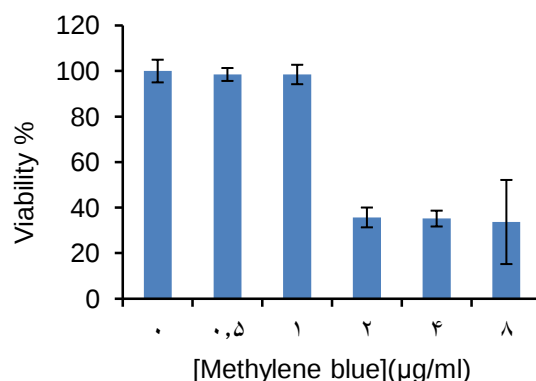
استفاده از ماده حساس‌به‌نور متیلن‌بلو که یک ماده شیمیایی از خانواده فنوتیازینیوم است در مهار رشد انواع مختلفی از رده‌های سلول‌های توموری همچون سلول‌های سرطان مثانه [۱۵]، دهانه رحم [۱۷] و آدنوکارسینوما [۱۸] موفقیت‌آمیز بوده است اما، درمورد بازده درمان فتودینامیکی با واسطه متیلن‌بلو برروی رده سلولی HepG2 که یک رده سلولی سرطان کبد انسانی است، اطلاعات زیادی موجود نیست بنابراین در مطالعه حاضر ما اثر درمان فتودینامیکی با واسطه متیلن‌بلو را برروی مهار رشد این رده سلولی در شرایط برون‌تنی بررسی کردیم.

نتایج ما نشان داد که متیلن‌بلو در غلظت ۴ تا ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر ($4/3$ تا $13/3$ میکرومولار) پس از برانگیخته شدن با نور قرمز لیزری با طول موج ۶۶۰ نانومتر و انرژی تابشی 5 J/cm^2 می‌تواند توان زیستی سلول‌های HepG2 را به میزان ۶۵ درصد کاهش دهد درحالی که تحت همین شرایط اثر چندانی بر توان زیستی سلول‌های نرمال فیبروبلاستی ندارد.

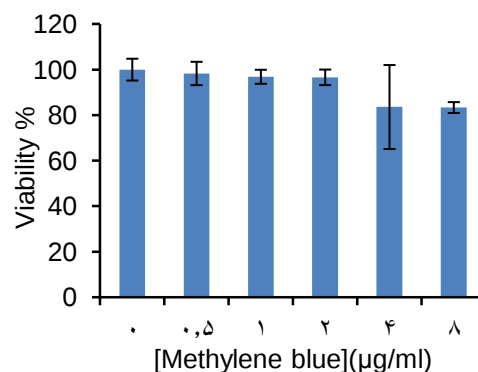
سکمیدت^{۱۰} و همکاران گزارش کرده‌اند که متیلن‌بلو در غلظت ۵ میکرومولار تشکیل کولنی در سلول‌های هلا را از ۸۶ درصد به ۱۷ درصد کاهش می‌دهد [۱۷]. اثربخشی درمان فتودینامیکی با واسطه متیلن‌بلو در کاهش بیش از ۷۰ درصد توان زیستی سلول‌های کلیه و سلول‌های سرطانی خون (K562) و همچنین برگشت تقریبی فنوتیپ مقاوم به داروی این سلول‌ها به فنوتیپ طبیعی نیز گزارش شده است [۱۹].

ازطرف دیگر نتایج برخی تحقیقات بیانگر سمیت متیلن‌بلو به شکل غیر فعال و قبل از برانگیخته شدن با نور قرمز است. به‌عنوان

(شکل ۴) درحالی که در همین محدوده غلظتی، متیلن‌بلو تا غلظت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر فاقد اثر سمیت نوری برروی سلول‌های نرمال فیبروبلاست می‌باشد و در غلظت‌های بالاتر، ۴ و ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز تنها منجر به ۱۷ درصد کاهش در توان زیستی این سلول‌ها می‌شود (شکل ۵). به عبارت دیگر سمیت نوری متیلن‌بلو در غلظت‌های ۴ و ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای سلول‌های سرطانی HepG2 تقریباً ۴ برابر سلول‌های نرمال فیبروبلاستی است.



شکل ۴: اثر درمان فتودینامیکی با واسطه متیلن‌بلو و تابش نور قرمز لیزری با توان انرژی 5 J/cm^2 برروی سلول‌های HepG2



شکل ۵: اثر درمان فتودینامیکی با واسطه متیلن‌بلو و تابش نور قرمز لیزری با توان انرژی 5 J/cm^2 برروی سلول‌های فیبروبلاست انسانی

بررسی اثر تابش نور به‌تنهایی برروی هر دو رده سلولی فیبروبلاست و HepG2 نیز نشان داد که نور لیزری با طول موج ۶۶۰ نانومتر و انرژی 5 J/cm^2 فاقد اثر سمی برروی این سلول‌ها

¹⁰Schmidt

می‌شود و از ایجاد تومورهای جدید در رت‌ها^{۱۴} جلوگیری می‌کند [۱۵].

القاء مرگ سلولی به دنبال اعمال درمان فتودینامیکی می‌تواند به روش‌های مختلفی همچون آپوپتوز، نکروز، اتوفاژی و یا ترکیبی از آن‌ها رخ دهد [۲۲ و ۲۳]. تحقیقات انجام‌شده توسط لو^{۱۵} و همکاران نشان داده است که درمان فتودینامیکی با واسطه متیلن‌بلو سبب القاء آپوپتوز شدید در سلول‌های هلا در یک روش وابسته به غلظت دارو می‌شود. این محققان تولید گونه‌های فعال اکسیژن به دلیل فعال شدن نوری متیلن‌بلو جمع‌یافته در میتوکندری سلول‌های هلا را عامل اصلی القاء آپوپتوز معرفی کرده‌اند. گونه‌های فعال اکسیژن با آسیب رساندن به غشاء میتوکندری باعث رها شدن سیتوکروم C از میتوکندری به سیتوزول و شروع فرآیند آپوپتوز می‌شوند [۱۴ و ۲۴]. تجمع مواد حساس‌به‌نور با بار الکتریکی مثبت همچون متیلن‌بلو در میتوکندری سلول‌ها توسط محققان دیگر نیز گزارش شده است. از آنجا که ماتریکس میتوکندری نسبت به غشاء سلول و سیتوپلاسم دارای پتانسیل منفی بیشتری است، بنابراین روشن است که موادی همچون متیلن‌بلو با بار الکتریکی منفی، بیشتر تمایل دارند در این اندامک سلولی تجمع یابند و پس از فعال شدن نوری با آسیب رساندن به غشاء میتوکندری باعث شروع فرآیند آپوپتوز شوند [۱۲ و ۲۵].

گرچه در مطالعه حاضر مکانیسم مولکولی مرگ سلولی القاء‌شده در سلول‌های سرطانی کبد از نوع HepG2 توسط درمان فتودینامیکی با واسطه متیلن‌بلو تعیین نشده است، نتایج ما در مجموع نشان می‌دهد که این نوع درمان می‌تواند روشی مؤثر در کاهش و مهار رشد این سلول‌ها باشد. امید است که تحقیقات بیشتر در این زمینه در شرایط مختلف برون‌تنی، درون‌تنی و بالینی، تأییدکننده کارایی و ایمنی این روش در از بین بردن سلول‌های سرطانی کبد و درمان کارسینومای هیپاتوسلولار باشد.

مثال کیرسزبرگ^{۱۱} و همکاران سمیت متیلن‌بلو در شکل غیر فعال را برای سلول‌های اریترولوئوسی گزارش کرده‌اند [۲۰] همچنین تریندد^{۱۲} و همکاران نشان داده‌اند که متیلن‌بلو به تنهایی در غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌تواند منجر به ۸۰ درصد کاهش در توان زیستی سلول‌های کلیه شود [۱۹]. بنابراین ما برای اطمینان از اینکه اثربخشی متیلن‌بلو در کاهش توان زیستی سلول‌های سرطانی HepG2 مربوط به شکل فعال‌شده آن توسط نور است و همچنین اطمینان از عدم سمیت آن برای سلول‌های نرمال، اثر غلظت‌های مختلف متیلن‌بلو در غیاب نور را بر روی رده سلولی سرطانی HepG2 و سلول‌های نرمال فیروبلاست آزمایش کردیم. نتایج ما نشان داد که متیلن‌بلو به تنهایی در غلظت‌های کم (کمتر از ۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر) فاقد اثر سمی برای سلول‌های HepG2 و فیروبلاست است و سمیت آن در غلظت‌های ۴ و ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز برای این سلول‌ها ناچیز است بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که القاء مرگ سلول‌های HepG2 در این مطالعه به دلیل واکنش‌های فتوشیمیایی صورت‌گرفته متعاقب فعال شدن نوری متیلن‌بلو بوده است و نه به دلیل سمیت آن.

درمان فتودینامیکی با واسطه ماده حساس‌به‌نور متیلن‌بلو می‌تواند منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن و یا سایر رادیکال‌های آزاد از طریق دو نوع واکنش فتوشیمیایی نوع I و II شود. در واکنش نوع II انرژی از حالت برانگیخته تریپلت متیلن‌بلو به اکسیژن منتقل می‌شود و باعث تولید اکسیژن منفرد و یا سایر گونه‌های فعال اکسیژن می‌گردد درحالی‌که در واکنش نوع I حضور عوامل احیاءکننده در مجاورت متیلن‌بلو باعث انتقال الکترون به متیلن‌بلو در حالت برانگیخته و در نتیجه تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود. گونه‌های فعال اکسیژن و سایر رادیکال‌های آزاد تولیدشده در اثر چنین واکنش‌های فتوشیمیایی می‌توانند باعث تخریب مولکول‌های زیستی و حیاتی همچون اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها، آنزیم‌ها، لیپیدها و در نتیجه منجر به آسیب شدید سلولی و یا مرگ سلولی شوند [۱۲ و ۲۱]. مطالعات جیل^{۱۳} و همکاران نشان داده است که درمان فتودینامیکی با واسطه متیلن‌بلو منجر به غیر فعال شدن آنزیم‌های گلوکز ۶ فسفات دهیدروژناز و لاکتات دهیدروژناز در سلول‌های تومور مثانه

¹⁴ Rat

¹⁵ Lu

¹¹Kirszberg

¹²Trindade

¹³ Gill

References

1. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2008. (<http://globocan.iarc.fr>.)
2. Tinkle CL, Haas-Kogan D. Hepatocellular carcinoma: natural history, current management, and emerging tools. *Biologics* 2012; 6: 207-19.
3. Colussi VC, Feyes DK, Mulvihill JW. Phthalocyanine 4 (Pc 4) photodynamic therapy of human OVCAR-3 tumor xenografts. *Photochem Photobiol* 1999; 69: 236-41.
4. Kato H, Kawate N, Kinoshita K, Yamamoto H, Furukawa K, Hayata Y. Photodynamic therapy of early-stage lung cancer. *Ciba Found Symp* 1989; 146: 183-97.
5. Fritsch C, Goerz G, Ruzicka T. Photodynamic therapy in dermatology. *Arch Dermatol* 1998; 134: 207-14.
6. Mimura S, Ito Y, Nagayo T, Ichii M, Kato H, Sakai H, Goto K, Noguchi Y, Tanimura H, Nagai Y, Suzuki S, Hiki Y, Hayata Y. Cooperative clinical trial of photodynamic therapy with photofrin II and excimer dye laser for early gastric cancer. *Lasers Surg Med* 1996; 192: 168-72.
7. Muroya T, Suehiro Y, Umayahara K, Akiya T, Iwabuchi H, Sakunaga H, Sakamoto M, Sugishita T, Tenjin Y. Photodynamic therapy (PDT) for early cervical cancer. *Gan To Kagaku Ryoho* 1996; 23(1): 47-56.
8. Robertson C, Evans DH, Abrahamse H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2009; 96(1): 1-8.
9. Sharman WM, Allen CM, van Lier JE. [35] Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. *Methods in enzymology* 2000; 319: 376-400.
10. Brown SB, Brown EA, Walker I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *The lancet oncology* 2004; 5(8): 497-508.
11. Dougherty TJ, Gomer CJ, Jori G, Kessel D, Korbek M, Moan J. Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute* 1998; 90(12): 889-905.
12. Tardivo JP, Del Giglio A, de Oliveira CS, Gabrielli DS, Junqueira HC, Tada DB. Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2005; 2(3): 175-91.
13. Gabrielli D, Belisle E, Severino D, Kowaltowski AJ, Baptista MS. Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions. *Photochem Photobiol* 2004; 79: 227-32.
14. Lu Y, Jiao R, Chen X, Zhong J, Ji J, Shen P. Methylene blue-mediated photodynamic therapy induces mitochondria-dependent apoptosis in HeLa Cell. *Journal of cellular biochemistry* 2008; 105(6): 1451-60.
15. Gill WB, Taja A, Chadbourne DM, Roma M, Vermeulen CW. Inactivation of bladder tumor cells and enzymes by methylene blue plus light. *J Urol* 1987; 138: 1318-20.
16. Merlin J-L, Azzi S, Lignon D, Ramacci C, Zeghari N, Guillemin F. MTT assays allow quick and reliable measurement of the response of human tumour cells to photodynamic therapy. *Eur J Cancer* 1992; 28(8): 1452-8. PubMed PMID:1387543.
17. Schmidt S, Schultes B, Wagner U, Oehr P, Decler W, Lubaschowski H, Biersack HJ, Krebs D. Photodynamic laser therapy of carcinomas— Effects of five different photosensitizers in the colony-forming assay. *Arch Gynecol Obstet* 1991; 249: 9-14.
18. Bellin JS, Mohos SC, Oster G. Dye-sensitized photoinactivation of tumor cells in vitro. *Cancer Res* 1961; 21: 1365-71.
19. Trindade GS, Farias SLdA, Rumjanek V, Capella MAM. Methylene blue reverts multidrug resistance: sensitivity of multidrug resistant cells to this dye and its photodynamic action. *Cancer letters* 2000; 151(2): 161-7.
20. Kirszenberg C, Rumjanek V, Capella M. Methylene blue is more toxic to erythroleukemic cells than to normal peripheral blood mononuclear cells: a possible use in chemotherapy. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 2005; 56(6): 659-65.
21. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2004; 1(4): 279-93.

22. Almeida RD, Manadas BJ, Carvalho AP, Duarte CB. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer* 2004; 1704(2): 59-86.
23. Kessel D, Vicente MGH, Reiners JJ. Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy. *Lasers in surgery and medicine* 2006; 38(5): 482-8.
24. Jori G. Tumour photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 1996; 36(2): 87-93.
25. Kessel D, Luo Y. Photodynamic therapy: a mitochondrial inducer of apoptosis. *Cell death and differentiation* 1999; 6(1): 28-35.