

اپتوژنتیک: اهمیت و محدودیت‌های کاربردی

خلاصه

اپتوژنتیک به عنوان یک فناوری جدید و زیرشاخه بیوتکنولوژی ترکیبی به کارگیری دو علم اپتیک و ژنتیک به منظور مطالعه و کنترل عملکرد انواع خاصی از سلول‌ها به ویژه سلول‌های عصبی در بافت‌های زنده را فراهم می‌آورد. این فناوری با استفاده از روش‌های دستکاری ژنتیکی و بیان اختصاصی پروتئین‌های حساس به نور (آپسین‌ها) در سلول یا سلول‌های هدف، امکان کنترل تحریکی یا مهار جمعی از سلول‌ها و رفتارهای مرتبط را با دقت مکانی و زمانی بالا فراهم می‌آورد. از آنجاکه بیان این پروتئین‌ها در سلول‌های ویژه‌ای از جمله سلول‌های عصبی انجام می‌پذیرد، بیشترین مطالعات اپتوژنتیکی در زمینه مغز و سیستم عصبی انجام گرفته و انتشار یافته است. هدف از این مقاله مروری، معرفی مفهوم اپتیک در اپتوژنتیک و اهمیت و چالش کاربرد آن در پزشکی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اپتوژنتیک، تحریک و مهار، آپسین

افشان شیرکوند^{۱،۲} شیرین فریور^۳

۱. گروه پژوهشی لیزر پزشکی، مرکز تحقیقات لیزر در پزشکی، پژوهشکده یارا، جهاد دانشگاهی واحد علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲. آزمایشگاه بیوفوتونیک، دپارتمان فوتونیک، پژوهشکده لیزر و پلاسما، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۳. ژنتیک و سلول‌های بنیادی، دپارتمان زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی و بیوتکنولوژی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

نویسنده مسئول: شیرین فریور، تلفن: ۰۲۱۶۶۴۹۴۶۴۹
پست الکترونیک: s_farivar@sbu.ac.ir

مقدمه

اپتوژنتیک^۱: تکنیک اپتوژنتیک ترکیبی از دو علم اپتیک و ژنتیک می باشد که امکان مطالعه و کنترل عملکرد سلول های خاص در بافت های زنده را فراهم می آورد. این تکنیک با استفاده از روش های دستکاری ژنتیکی و بیان اختصاصی پروتئین های حساس به نور (آپسین ها) در سلول یا سلول های هدف، امکان تحریک یا مهار جمعیت خاصی از سلول ها و رفتارهای مرتبط را با دقت مکانی و زمانی بالا فراهم می آورد [۱ و ۲].

اصول پایه ای اپتوژنتیک در مطالعات و مدل سازی ها به انتخاب صحیح آپسین، روش انتقال نور و بیان اختصاصی ژن مربوط می شود. پروتئین های حساس به نور به محققان این امکان را می دهند که نورون ها را به طور انتخابی فعال و غیرفعال (on و off) نمایند. معرفی این پروتئین ها به سلول های کشت داده شده و یا سلول های مغزی جانوران زنده سبب تسهیل بررسی های ساختاری و عملکردی شبکه های عصبی می شود. این ابزارهای اپتوژنتیک امید تازه ای در کاربردهای بالینی به همراه دارد و در عین حال پتانسیل مدوله کردن فعالیت سلول های زنده خصوصاً سلول های مدارهای مغزی را دارد که در بسیاری از ناهنجاری های نورولوژیکی یا اختلال دید نوروپاتی می تواند مؤثر واقع شود [۳]. روش های قدیمی آنالیزهای عملکردی در نورون ها بر تحریم مستقیم با الکترودهای بسیار ریز قرار داشت. اگرچه روش مؤثری بود اما، به دلیل دقت زمانی مکانی محدود، تاحدی نامطمئن تشخیص داده شد. با ظهور تکنولوژی و ابزارهای اپتوژنتیکی، سوئیچ های کدشده ژنتیکی توانایی بالاتر دقتی تری را برای on و off کردن سلول ها به وسیله کنترل نوری دارند. لذا، مطالعه عملکردی سلول ها در ساختارهای شبکه ای وسیع تر با امید به پیدایش و در دسترس قرار گرفتن پروتئین های آپسینی ویژه محتمل تر خواهد بود [۸-۵].

از نظر سابقه تاریخی، کاشف ساختار مولکول DNA اعلام کرد که روش های موجود تا آن زمان قادر به مطالعه دقیق ساختارهای شبکه ای مغز و نقش آن ها در رفتار و عملکرد موجود نیستند و این روش ها نیازمند ایجاد فناوری های جدیدی برای این منظور می باشد. وی در این مقاله به نقش نور و استفاده از این پدیده فیزیکی اشاره نمود. در سال ۱۹۷۴، مطالعه دیگری خصوصیات یک پروتئین غشایی در باکتری هالوباکتریوم انتشار یافت [۹]. در سال های بعد مشخص شد که این گروه از پروتئین های غشای میکروبی به نام آپسین به دلیل وجود ساختار قرنی در درون خود و تأثیرپذیری این مولکول در مقابل نور، ساختار مولکول پروتئینی آن ها تغییر شکل می دهد و در نهایت منجر به عبور برخی از یون ها از کانال می شود. تا سال ۲۰۰۵، آپسین های مختلفی در پروکاریوت ها و یوکاریوت ها کشف و حساسیت نوری آن ها شناسایی شد. به طوری که در این سال برای اولین بار با وارد کردن ژن بیان کننده آپسین های میکروبی به درون سلول های عصبی و بیان آن در این سلول ها، انقلاب بزرگی در عرصه علوم اعصاب رخ

داد. از این سال به بعد مطالعات بسیاری برای شناسایی نقش و عملکرد شبکه های عصبی با وارد کردن ژن انواع مختلف پروتئین های غشای آپسین میکروبی به سلول ها و شبکه های عصبی انجام شده است [۱۰ و ۱۱].

بیان ساده از اپتوژنتیک به صورت تحریک یا مهار نوری سلول های هدف نیست، بلکه اپتوژنتیک باید دستور انجام دادن یا ندادن یک فعالیت خاص را به سلول برساند. در سطح پایه، سیستم عصبی می تواند با تغییر وضعیت پمپ یونی فعال شود یا به حالت استراحت برود. سیگنال های اکتیواسیون به عنوان مثال از حامل های نورونی، سبب جریان یون های بار مثبت به سلول از محیط خارج می شود. این فعال شدن یا نشدن سلول در اثر تغییر جریان یون های بار مثبت یا منفی به وسیله اپتوژنتیک نیز قابل اجراست [۱۶-۱۲]. انقلابی واقعی در کشف پروتئین های اختصاصی آپسینی که با کنترل تابش نور با طول موج معین (آبی یا زرد) کنترل جریان یونی غشایی و در نتیجه روشن و خاموش کردن سلول ها را برای محققان این زمینه ممکن ساخته است [۱۹-۱۷].

دستکاری های فارماکوژنتیکی می توانند بر روی هر نوع سلولی با هدف بیان پروفایل های خاص مورد نظر صورت بگیرد، اما به دلیل کمبود دقت زمانی عمدتاً این روش برای کد کردن سیگنال های سلول عصبی که در این مقیاس زمانی قرار دارد، به کار می رود. به همین دلیل این تکنولوژی را مهم ترین پیشرفت چند دهه اخیر در رشته علوم اعصاب می دانند. اگرچه ویروس ها برای کاربردهای کلینیکی و تحویل ژن و کد کردن بیان ژنی های مورد نیاز در کنترل یک سلول پیشنهاد مؤثرتری هستند، اما هنوز فرآیندها به صورت بررسی و تحقیقات آزمایشگاهی است [۲۲-۲۰].

محرك ها و سنسورهای اپتوژنتیکی مورد استفاده در کاربردهای کنترلی عملکرد سلولی انواع مختلفی دارند. از جمله این محرك ها می توان به channelrhodopsin، halorhodopsin و archaerhodopsin اشاره نمود و برای سنسور اپتوژنتیکی انواع تغییر وضعیت کلسیم (Aequorin, Cameleon, GCaMP)، کلراید (Clomeleon) یا ولتاژ غشاء (mermaid) را برشمرد. با اینکه channelrhodopsin و halorhodopsin به صورت طبیعی حساس به نور هستند، اما به نظر می رسد که دستکاری این پروتئین ها می تواند حساسیت آن ها را در پاسخ به نور به کاررفته تابیده بهتر و آن ها را تبدیل به یک سوئیچ سریع تر نماید [۲۳ و ۲۴].

طراحی مطالعه اپتوژنتیک

به طور پایه ای پنج مرحله اساسی در طراحی مطالعات و آزمایش های اپتوژنتیکی برای مطالعه رفتار مدل های بیماری و یا عملکرد نرمال وجود دارد [۲۱ و ۲۶]:

۱. انتخاب آپسین مناسب برای آزمایش
۲. انتخاب استراتژی مناسب هدف گذاری به وسیله روش های انتقال ویروسی یا وکتورهای بیان آپسین ها در هدف سلولی

1. Optogenetics

استفاده از آپسین‌ها^۲ که می‌توانند مولکول‌های ارگانیک کوچکی را در خود جا داده و به یک گیرنده نوری تبدیل شوند. آپسین‌های میکروبی قابل استفاده موجود برای مطالعه عملکرد سیستم عصبی عبارت‌اند از:

۱. channelrhodopsins (ChR1, ChR2, VChR1 and SFOs) برای تحریک نورون‌ها

۲. رودوپسین‌های میکروبی همچون halorhodopsin (NpHR, eNpHR, eNpHR3)

۳. archaerhodopsin (Arch) و باکتریورودوپسین بهبودیافته Leptosphaeria maculans fungal opsins (Mac) و (eBR) که به راحتی برای مطالعات مهار نورونهای مغزی حیوانات در حال حرکت بکار می‌روند [۲۵-۲۱].

اپتیک در اپتوژنتیک

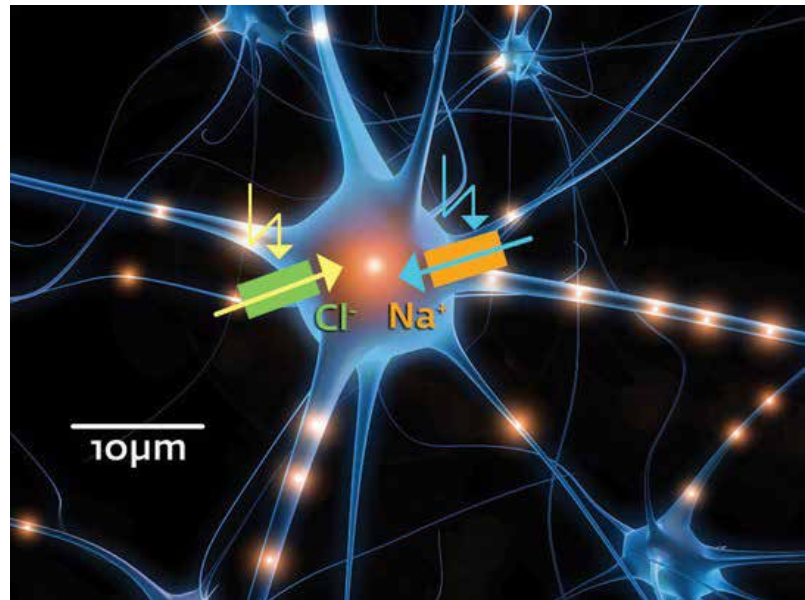
روش‌های نوری در مقایسه با روش‌های الکتریکی و دارویی به دلیل برخورداری از سرعت و دقت بالاتر و آسیب‌رسانی کمتر، ابزار مناسبی در مطالعات علوم اعصاب هستند [۱۷]. در سیستم‌های عصبی، تولید و انتقال پیام‌های عصبی با استفاده از یک سری کانال‌های یونی موجود در سلول عصبی و تغییر غلظت یون‌ها در درون و خارج سلول عصبی صورت می‌گیرد. در روش‌های معمول الکترو فیزیولوژی تحریک سیستم‌های عصبی با استفاده از الکترودهای فلزی خاص و جریان الکتریکی انجام می‌شود. در تحریک نوری سیستم عصبی این فرآیند با استفاده از تحریک کانال‌های پروتئینی حساس به نور صورت می‌گیرد به گونه‌ای که این کانال‌های پروتئینی در سلول عصبی با استفاده از تکنیک‌های ژنتیکی ایجاد شده است. لذا، برای تحریک نوری قسمت‌های متفاوت سیستم عصبی مغز نیاز است تا پروپ‌های نوری متفاوت طراحی و ساخته شود تا تحریک نوری جای‌گرفته و مکان‌یابی شده از سیستم عصبی صورت گیرد. تکنولوژی انتقال نور و منابع نوری مورد استفاده جهت رساندن نور برای فعال‌سازی آپسین‌های تعریف‌شده و تغییر در عملکرد بیولوژی سلولی از مهم‌ترین بخش فیزیک نور این فرآیند می‌باشد [۱۸-۳۲، ۲۹]. جریان نوری ناشی از یک پالس نوری در نور به عوامل مختلفی از قبیل ویژگی آپسین مورد استفاده، طول موج نور، شدت و مدت تابش نور و حتی تعداد سلول‌های حساس به نور در شروع، میانه و انتهای فرآیند بستگی دارد. به‌طور کلی خصوصیات مهم چشمه‌های نور تابشی مورد استفاده در اپتوژنتیک عبارت‌اند از: خصوصیات طول موج مورد نیاز برای کنترل آپسین مورد استفاده، کنترل زمانی تابش نور، اینکه باید نور به‌طور متمرکز یا پهن میدان تابش شود، باید چندباریکه تابیده شود یا تک‌باریکه، ارائه‌ای از منابع نوری دیدی لازم است یا خیر و چگونگی انتشار نور در بافت بیولوژیک [۱۱، ۱۶].

لیزرها و دیودهای نورگسیل^۳

دو منبع نوری مهم مورد استفاده برای تابش در بیشتر فرآیندهای نوری

2. Membrane-bound protein-bound

3. LED



شکل ۱: شماتیک بیان شدن فعالیت channelrhodopsin و halorhodopsin در سلول عصبی. اکتیواسیون با نور آبی سبب باز شدن کانال می‌شود و اجازه می‌دهد یون‌های سدیم وارد و نورون‌ها on شوند. نور زرد در عوض، یون‌های کلراید را وارد می‌نماید و سلول‌های نورونی را off می‌کند.

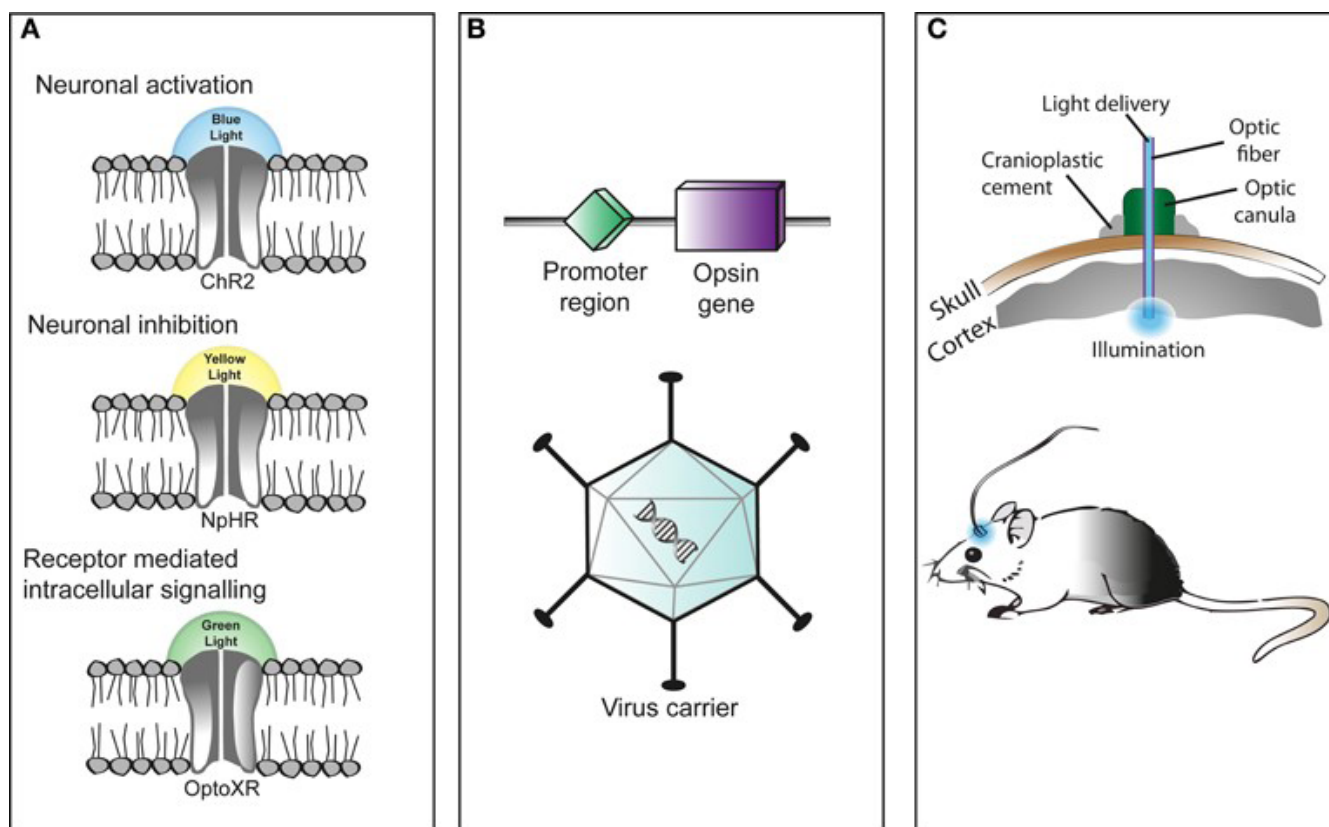
۳. انتخاب روش‌های نوررسانی بهینه برای نفوذ بهتر نور به عمق بافت مورد مطالعه

۴. انتخاب پارامترهای زمانی مناسب نوری مانند پهنای زمان پالس، فرکانس و شدت نور نور برحسب منبع نوری مورد استفاده

۵. اعتبارسنجی دستکاری آزمایشگاهی و تعیین عملکرد ابزار اپتوژنتیکی برحسب الکتروفیزیولوژی یا ایمونوهیستوشیمی

ژنتیک

برای اعمال این تکنیک باید ابتدا بافت مورد نظر را با استفاده از مهندسی ژنتیک به نحوی تغییر داد تا بتواند نوعی پروتئین حساس به نور بسازد. این پروتئین به‌طور طبیعی توسط نوعی جلبک ساخته می‌شود. این مجموعه از ابزار اپتوژنتیک که حاصل مهندسی مولکولی و تلاش‌های ژنومیک می‌باشد، امکان ایجاد تغییرات آزمایشگاهی برای دستیابی به اثرهای فیزیولوژیکی دلخواه، ویژگی‌های جنبشی مدولاسیون وابسته به نور و طول موج مورد نیاز، توان و گستردگی فضایی پالس نوری را می‌دهد. در اپتوژنتیک یکی از ارکان مهم هدف‌گذاری آپسین‌های مفید می‌باشد. از آنجاکه ابزارهای اپتوژنتیکی پیوسته از لحاظ ایمنی و بازدهی در حال بهینه شدن هستند، یک آزمایش عصب‌شناسی موفق نیازمند روش متناسب هدف‌گیری بافت زنده با ابزار اپتوژنتیک می‌باشد. روش‌های معمول بهره‌گیری از اپتوژنتیک در بافت زنده عبارت‌اند از: هدف‌گیری از طریق توزیع میکروبی، هدف‌گیری تصویری، هدف‌گیری حیوانات از طریق ترانس‌ژنتیک، هدف‌گیری زمانی - مکانی.

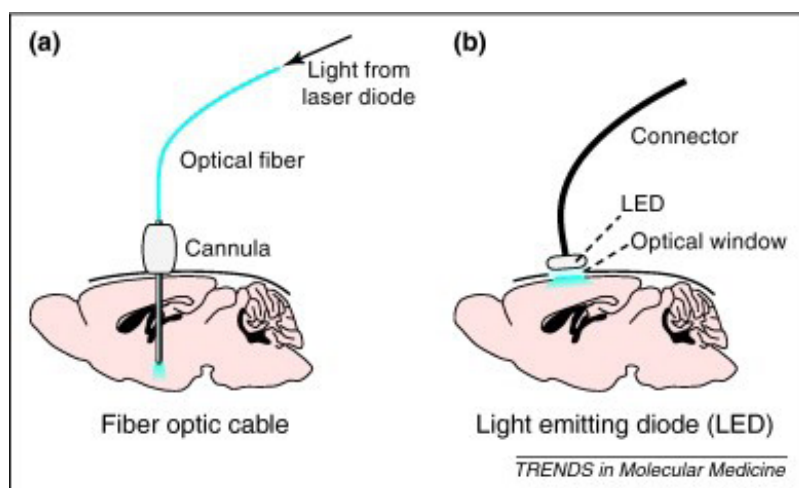


شکل ۲: ارکان مهم فرآیند اپتوژنتیک

عبارت‌انداز: لیزر و دیودهای نورگسیل.

طول‌موج‌های نوری، بسیاری از اپسین‌های موجود به آبی و زرد حساس هستند اما براساس مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۶، در مقایسه با نور آبی، نور قرمز دارای مزایای متعددی به‌ویژه با توجه به برنامه‌های کاربردی در سیستم‌های مدل برای بیماری‌ها است [۱۹]. نور قرمز می‌تواند به عمق بافت‌ها نفوذ

لیزرها عموماً به‌دلیل داشتن یک پهنای طیفی باریک ($>1\text{nm}$) می‌توانند گزینه بسیار مناسبی باشند زیرا می‌توانند بر روی طول‌موج لازم برای فعال‌سازی یک ابزار خاص تنظیم شوند و همچنین بسیاری از لیزرها می‌توانند طول‌موج‌های بلند NIR-farIR را تابش نمایند. در میان



شکل ۳: رساندن نور به بافت هدف در فرآیند اپتوژنتیک



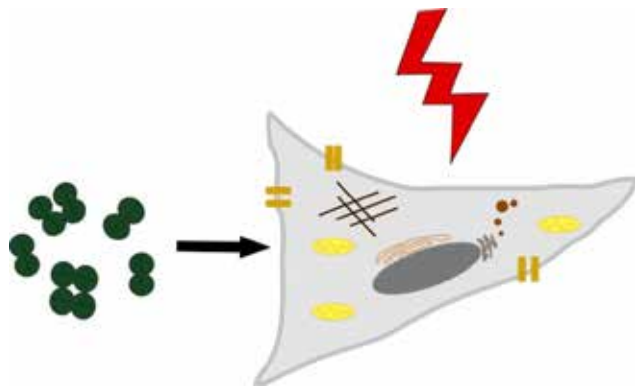
نوررسانی به مدل حیوانی آزمایش‌های اپتوژنتیک انتشار یافت. در این تحقیق یک آرایه قابل کنترل از چندین μ LED، برای کاشت مستقیم بر روی سر حیوان آزمایشگاهی با قابلیت توان نوری مستقل از زاویه تابشی ارائه گردید. این قابلیت امکان مطالعه رفتار مدل حیوانی را در شرایط آزادانه‌تر در اختیار می‌گذارد [۲].

اهمیت بالینی اپتوژنتیک

پیشرفت‌های اپتوژنتیک دریچه جدیدی را در فهم و درک علمی چگونگی عملکرد ویژه انواع سلول‌ها و بافت‌های بیولوژیک باز کرده‌است به طوری که نه تنها در عصب‌شناسی بلکه در سایر زمینه‌های زیستی همچون ماهیچه‌ها، رگ‌های شریانی، رشد سلول‌های جنینی و حتی سرطان برای تحقیقات به عنوان ابزاری قوی به کار گرفته شده است [۲۲]. به علاوه در مطالعات پیش‌بالینی، اپتوژنتیک بر روی مدل‌های حیوانی در حال انجام است همچنان که به مدل‌سازی بیماری‌هایی مانند پارکینسون، اضطراب، آسیب شبکیه، تنفس و افسردگی کمک بسیاری کرده است. دقت، زمانی که به وسیله استفاده از نور در روش اسپین میکروبی تک‌مؤلفه‌ای فراهم می‌گردد، مهم‌ترین ویژگی این روش می‌باشد. در واقع رخ دادن یک عملکرد خاص در یک سلول ویژه در میان جمعیت سلول‌ها در یک زمان مشخص بسیار مهم می‌باشد. همچنین وجود گروه بزرگی از ابزارهای اپتوژنتیکی به خواص الکتریکی و بیوشیمیایی خاص سبب پیشرفت‌های زیادی در دستیابی به اهداف مورد نظر در اپتوژنتیک گشته است. زیست عصب‌شناس دانشگاه MIT معتقد است اگر بتوان سلول مغزی را کنترل نمود، می‌توان دریافت که قدرت آن‌ها چیست و از کجا می‌آیند، چگونه بر روی ارگان‌ها و عصب‌ها تأثیر می‌گذارند و علاوه بر آن می‌توان دریافت که اگر بتوانیم کنترل مغز را به دست بگیریم، درمان‌های جدیدی را می‌توان ابداع کرد، مشکلات ناشی از عقب‌ماندگی ذهنی را درمان کرد و اختلالات عصبی و یا روانی را رفع نمود [۱۱]. چندین نمونه از کاربردهای اپتوژنتیک به صورت خلاصه عبارت‌اند از:

۱. در مطالعات رفتاری، اپتوژنتیک انقلابی به پا کرده است. اپتوژنتیک این امکان را در اختیار محقق علوم رفتاری قرار می‌دهد که بتواند رفتارهای مدل حیوانی آزاد در قفس را در حالت on و off نور و با تغییر پارامترهای تابشی نور که ابزار کنترل یا مهار سلول است [۳۰]، مقایسه کند. این آزمایش‌ها می‌تواند هم به صورت تک‌جلسه هم چندروزه پیگیری شوند.
۲. در مطالعات علوم اعصاب اپتوژنتیک برای مطالعه مدارهای عصبی در گیر در ناهنجاری‌های ترس و عصبانیت [۲۲ و ۳۱]، اعتیاد و هسته accumbens و بخش شناختی^۴ مغز در اعتیاد [۳۲-۳۵] به کار گرفته شده اس
۳. در مطالعات بیماری‌های عصبی برای بررسی بیماری افسردگی و مدار عصبی‌های آن در کورتکس مغز [۳۶]، همچنین در مدل‌های حیوانی

کند و به روشی غیرتهاجمی و بدون نیاز به عمل جراحی، حداقل خطر را برای بافت‌های انسانی و حیوانی داشته باشد، همچنین هیچ عارضه‌ای برای پروتئین‌های فلورسنت به همراه ندارد. روش‌های اپتوژنتیک اغلب دارای کاربردهای مختلف در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی است. پروتئین‌های

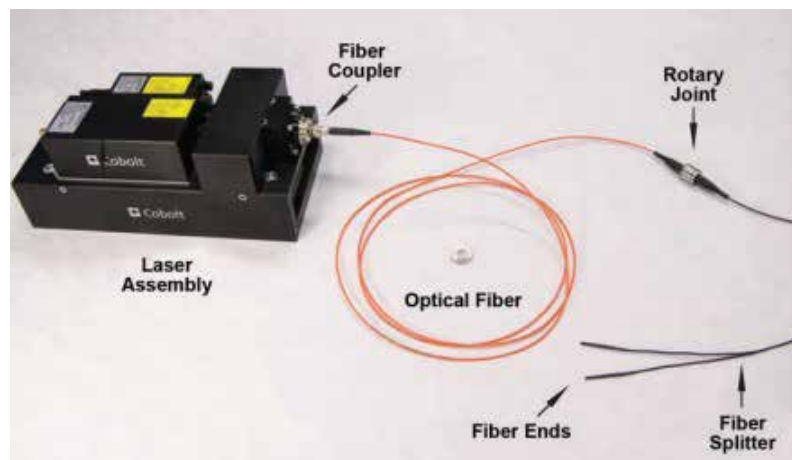


شکل ۴: فعال‌سازی یک رسپتور خاص در سلول بافتی به وسیله نور قرمز

فلورسنت تمایل به فعال شدن یا سفید شدن توسط نور آبی دارند. اگرچه نور قرمز دارای مزایای بسیار بیشتری نسبت به نور آبی است اما، در حال حاضر تعداد بسیار کمی ابزار اپتوژنتیک براساس نور قرمز عمل می‌کنند [۱۹].

دیودهای نور گسیل LED از منابع دیگری هستند که برای برخی آزمایش‌ها مناسب می‌باشند. پهنای طیفی کم مورد نظر را دارا می‌باشند، به راحتی برای فرکانس‌های مورد نیاز تنظیم می‌شوند، ساده و ارزان هستند و به ابزار الکترونیکی پیچیده برای کنترل نیاز ندارند. اما، زمانی که از آن‌ها در نزدیکی بافت‌ها استفاده می‌شود، ایجاد گرمای ثانویه در بافت باید در نظر گرفته شود. عموماً منابع نوری لیزر و یا دیودی از طریق کوپل با پروب‌های فیبر نوری برای تابش به موجود زنده استفاده می‌شوند. انتقال نقطه‌ای‌تر از نور به محل بافت هدف از این طریق امکان‌پذیر می‌شود [۳۳].

در سال ۲۰۱۸ مطالعه‌ای با توسعه میکرو LED های وایرلس برای



شکل ۵: منبع نوری کوپل شده با پروب فیبر نوری

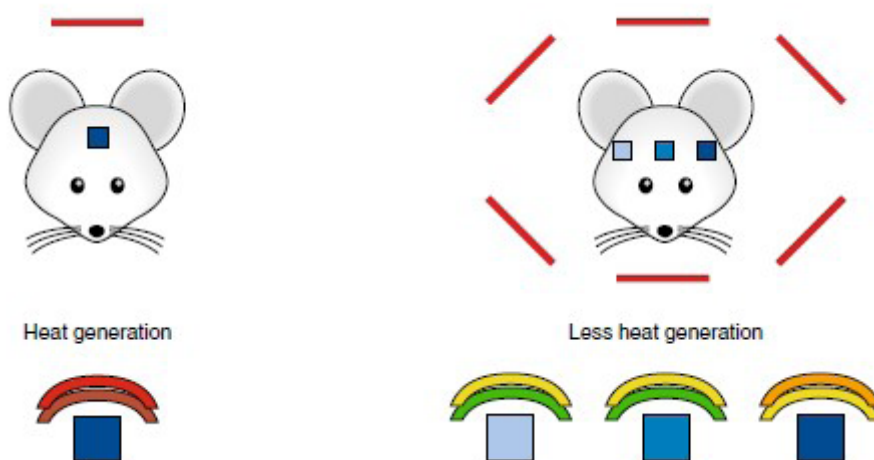
چالش دیگر در اپتوژنتیک عدم امکان انجام این آزمایش‌های اپتوژنتیکی بر روی انسان است زیرا دسترسی بدون دخالت به بافت و سلول‌ها ممکن نیست. درمورد بافت مغز استخوان سخت جمجمه مانعی جدی برای نفوذ مناسب نور به بافت می‌باشد. برای انجام آزمایش‌ها لازم است تا کابل‌های فیبر نوری وارد مغز شوند. برای همین دانشمندان در حال تفکر بر روی راه‌های غیرتهاجمی برای ورود این کابل‌ها به داخل محیط مغز هستند. یکی از بهترین راه‌های ورود کابل از طریق بینی است که هم غیرتهاجمی است و هم به اسکلت جمجمه آسیب نمی‌زند. راه‌های دیگری نیز در دست بررسی و تحلیل و تکمیل شدن است. اما، کاملاً واضح و مشخص است که پیشرفت‌ها متوقف نمی‌شوند و در آینده‌ای نزدیک تمامی ناشدنی‌ها شدنی می‌شوند. همچنین توسعه چشمه‌های نوری مناسب برای افزایش بهره‌وری رساندن نور به عمق بافت بر حسب خصوصیات آناتومیکی بافت هدف باید مدنظر قرار داشته باشد.

تشخیصی بیماری اسکیزوفرنی و اوتیسم اپتوژنتیک پارکینسون و صرع به کمک آمده است [۳۷-۴۱].

محققان در حال توسعه روش‌های سریع‌تر و کم‌تهاجمی‌تر می‌باشند. به‌عنوان نمونه برخی از دانشمندان این روش را به‌نحوی تغییر داده‌اند که بدون نیاز به دستکاری ژنتیک هم قابل اجرا باشد. این روش برپایه این مشاهده است که سلول‌های طبیعی عصبی را می‌توان با حرارتی که در اثر تابش نور مادون قرمز ایجاد می‌شود، تحریک نمود. حال برای اینکه اشعه مادون قرمز فقط سلول‌های خاصی را تحت تأثیر قرار دهد، از نانوذرات طلا استفاده می‌شود. آن‌ها این ذرات را به درون سلول‌های هدف می‌فرستند و سپس با تاباندن نوعی لیزر سبز این ذرات را تحریک می‌کنند. حرارت ایجادشده در این تابش موجب تحریک سلول عصبی می‌شود.

محدودیت‌ها و چالش‌ها

روش‌های ترنسفکشن برپایه ساختن وکتورها و پروموتورهای ویروسی برای بیان خاصی در سلول هدف استوار است. روش وکتورهای ویروسی سریع و بهره‌ور است درحالی‌که استفاده از حیوانات ترنسژنیک سخت، هزینه و زمان‌بر می‌باشد. چالش دانشمندان در این مورد طراحی انواعی از ویروس است که فقط به سلول مورد نظر دانشمندان در مغز حمله می‌کند. برخلاف ذات اصلی ویروس‌ها مبنی بر ویران کردن سلول و جایگزین کردن DNA خود برای تکثیر، این ویروس فقط قسمتی از یک DNA را با خود حمل می‌کند و بدون تخریب سلول به بخش اصلی DNA انتقال می‌دهد و سپس خودکشی می‌کند. این DNA تزریق‌شده به سلول این قابلیت را می‌دهد که در مقابل تابش نورهای خاص عکس‌العمل نشان دهد. این عملکرد مانند سلول‌های شبکه چشم است که قادر هستند نور را تشخیص و تصاویر را شکل دهند.



شکل ۶: منبع نوری کوپل‌شده با پروپ فیبر نوری

References:

1. Kriss TC, Kriss VM. History of the operating microscope: from magnifying glass to microneurosurgery. *Neurosurgery* 1998; 42: 899–907.
2. Moore GE. Fluorescein as an agent in the differentiation of normal and malignant tissues. *Science* 1947; 106: 130–1.
3. Stummer W, Stocker S, Wagner S, Stepp H, Fritsch C, Goetz C. Intraoperative detection of malignant gliomas by 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence. *Neurosurgery* 1998; 42: 518–25.
4. Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL. Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer. *Ann Surg* 1994; 220: 391–8.
5. Skripinova S, Layfield LJ. Initial margin status for invasive ductal carcinoma of the breast and subsequent identification of carcinoma in reexcision specimens. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2010; 134(1): 109-14.
6. Möller MG, Pappas-Politis E, Zager JS, Santiago LA, Yu D, Prakash A, Kinal A, Clark GS, Zhu W, Puleo CA, Glass LF. Surgical management of melanoma-in-situ using a staged marginal and central excision technique. *Annals of surgical oncology*. 2009; 16(6): 1526-36.
7. Kunishige JH, Brodland DG, Zitelli JA. Surgical margins for melanoma in situ. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2012; 66(3): 438-44.
8. Jolesz FA, McDannold NJ. MRI-guided focused ultrasound. In *Intraoperative Imaging and Image-Guided Therapy* 2014 (pp. 403-412). Springer, New York, NY.
9. Agarwal-Antal N, Bowen GM, Gerwels JW. Histologic evaluation of lentigo maligna with permanent sections: implications regarding current guidelines. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2002; 47(5): 743-8.
10. Crane LM, Themelis G, Arts HJ, Buddingh KT, Brouwers AH, Ntziachristos V. Intraoperative nearinfrared fluorescence imaging for sentinel lymph node detection in vulvar cancer: first clinical results. *Gynecol Oncol* 2011; 120: 291–5.
11. Holm C, Mayr M, Hoftner E, Becker A, Pfeiffer UJ, Muhlbaier W. Intraoperative evaluation of skin-flap viability using laser-induced fluorescence of indocyanine green. *Br J Plast Surg* 2002; 55: 635–44.
12. Spinoglio G, Priora F, Bianchi PP, Lucido FS, Licciardello A, Maglione V. Real-time near-infrared (NIR) fluorescent cholangiography in single-site robotic cholecystectomy (SSRC): a single-institutional prospective study. *Surg Endosc* 2013; 27: 2156–62.
13. Van der Vorst JR, Schaafsma BE, Hutteman M, Verbeek FP, Liefers GJ, Hartgrink HH. Near-infrared fluorescence-guided resection of colorectal liver metastases. *Cancer* 2013; 119: 3411–8.
14. Hendabadi M, Hejazi M, Mohammad Nejad Daryani S, Kamyab Hesari K, Ebrahimi M. Implementation and Evaluation of Intraoperative Fluorescence Polarization Imaging for a Tumor Margin Delineation in: ex-vivo Experiences with GFP+ Expressing Cells. *Lasers In Medicine*. 2018; 15(2): 8-17.
15. Frangioni JV. New technologies for human cancer imaging. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4012–22.
16. Krekel NM, Haloua MH, Lopes Cardozo AM, de Wit RH, Bosch AM, de Widt-Levert LM et al. Intraoperative ultrasound guidance for palpable breast cancer excision (COBALT trial): a multicentre, randomized controlled trial. *Lancet Oncol* 2013; 14: 48–54.
17. Ntziachristos V. Fluorescence molecular imaging. *Annu Rev Biomed Eng* 2006; 8: 1–33.
18. Weissleder R, Ntziachristos V. Shedding light onto live molecular targets. *Nat Med* 2003; 9: 123–8.
19. Vinegoni C, Razansky D, Figueiredo JL, Nahrendorf M, Ntziachristos V, Weissleder R. Normalized Born ratio for fluorescence optical projection tomography. *Opt Lett* 2009; 34: 319–21.
20. Themelis G, Harlaar NJ, Kelder W, Bart J, Sarantopoulos A, van Dam GM. Enhancing surgical vision by using real-time imaging of $\alpha v \beta 3$ -integrin targeted near-infrared fluorescent agent. *Ann Surg Oncol* 2011; 18: 3506–13.
21. Kelder W, Nimura H, Takahashi N, Mitsumori N, van Dam GM, Yanaga K. Sentinel node mapping

with indocyanine green (ICG) and infrared ray detection in early gastric cancer: an accurate method that enables a limited lymphadenectomy. *Eur J Surg Oncol* 2010; 36: 552–8.

22.Liu DZ, Mathes DW, Zenn MR, Neligan PC. The application of indocyanine green fluorescence angiography in plastic surgery. *J Reconstr Microsurg* 2011; 27: 355–64.

23.Schaafsma BE, Mieog JS, Hutteman M, van der Vorst JR, Kuppen PJ, Lowik CW. The clinical use of indocyanine green as a near-infrared fluorescent contrast agent for image-guided oncologic surgery. *J Surg Oncol* 2011; 104: 323–32.

24.Ishizawa T, Fukushima N, Shibahara J, Masuda K, Tamura S, Aoki T. Real-time identification of liver cancers by using indocyanine green fluorescent imaging. *Cancer* 2009; 115: 2491–504.

25.Weissleder R, Pittet MJ. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature*. 2008; 452(7187): 580.

26.Vahrmeijer AL, Hutteman M, Van Der Vorst JR, Van De Velde CJ, Frangioni JV. Image-guided cancer surgery using near-infrared fluorescence. *Nature reviews Clinical oncology*. 2013; 10(9): 507.

27.Demicheli R, Valagussa P, Bonadonna G. Does surgery modify growth kinetics of breast cancer micrometastases ? . *British journal of cancer*. 2001; 85(4): 490.

28.Arii S, Tanaka S, Mitsunori Y, Nakamura N, Kudo A, Noguchi N, Irie T. Surgical strategies for hepatocellular carcinoma with special reference to anatomical hepatic resection and intraoperative contrast-enhanced ultrasonography. *Oncology*. 2010; 78(Suppl. 1): 125-30.

29.Van Vledder MG, Torbenson MS, Pawlik TM, Boctor EM, Hamper UM, Olino K, Choti MA. The effect of steatosis on echogenicity of colorectal liver metastases on intraoperative ultrasonography. *Archives of Surgery*. 2010; 145(7): 661-7.

30.Ukimura O, Okihara K, Kamoi K, Naya Y, Ochiai A, Miki T. Intraoperative ultrasonography in an era of minimally invasive urology. *International journal of urology*. 2008; 15(8): 673-80.

31.Sahani DV, Kalva SP, Tanabe KK, Hayat

SM, O'Neill MJ, Halpern EF, Saini S, Mueller PR. Intraoperative US in patients undergoing surgery for liver neoplasms: comparison with MR imaging. *Radiology*. 2004; 232(3): 810-4.

32.Kubben PL, ter Meulen KJ, Schijns OE, ter Laak-Poort MP, van Overbeeke JJ, van Santbrink H. Intraoperative MRI-guided resection of glioblastoma multiforme: a systematic review. *The lancet oncology*. 2011; 12(11): 1062-70.

33.Mondal SB, Gao S, Zhu N, Liang R, Gruev V, Achilefu S. Real-time fluorescence image-guided oncologic surgery. In *Advances in cancer research* 2014; 124: 171-211. Academic Press.

34.Kim T, O'Brien C, Choi HS, Jeong MY. Fluorescence molecular imaging systems for intraoperative image-guided surgery. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2018; 53(2-4): 349-59.

35.Hosseini A, Baker JL, Tokin CA, Qin Z, Hall DJ, Stupak DG, Hayashi T, Wallace AM, Vera DR. Fluorescent-tilmanoept for tumor margin analysis in the mouse model. *journal of surgical research*. 2014; 190(2): 528-34.

36.Park JY, Murakami T, Lee JY, Zhang Y, Hoffman RM, Bouvet M. Fluorescent-antibody targeting of insulin-like growth factor-1 receptor visualizes metastatic human colon cancer in orthotopic mouse models. *PloS one*. 2011; 11(1): e0146504.

37.Schols RM, Connell NJ, Stassen LP. Near-infrared fluorescence imaging for real-time intraoperative anatomical guidance in minimally invasive surgery: a systematic review of the literature. *World journal of surgery*. 2015; 39(5): 1069-79.

38.Mieog JS, Hutteman M, van der Vorst JR, Kuppen PJ, Que I, Dijkstra J, Kaijzel EL, Prins F, Löwik CW, Smit VT, van de Velde CJ. Image-guided tumor resection using real-time near-infrared fluorescence in a syngeneic rat model of primary breast cancer. *Breast cancer research and treatment*. 2011; 128(3): 679-89