



بررسی اثر درمانی لیزر Nd-YAG در تیمار فتودینامیکی بر روی سلول‌های LN-CaP

همامحسینی کوچصفهانی^{۱*}، محمد نبیونی^۲، محمد حسین مجلس آرا^۳، الهه امینی^۴

چکیده

فتودینامیک‌تراپی^۱ (PDT) نوعی روش درمانی جدید و نوید دهنده در درمان سرطان و برخی از بیماریهای غیر سرطانی است. سه رکن اساسی این روش درمانی ماده حساس به نور، نور و اکسیژن است. در این روش واکنش متقابل بین نور و ماده حساس به نور القا کننده مرگ سلولهای سرطانی است. هدف از انجام این آزمایش بررسی اثر ترکیبی ماده حساس به نور آمینولولنیک اسید و پرتوی یکنواخت لیزر حالت جامد^۲-Nd-YAG با طول موج و توان خاص در القای مرگ سلولهای سرطان پروستات LN-CaP و نوع مرگ القا شده است. برای این منظور در این آزمایش آمینولولنیک اسید یا 5-ALA^۳ (پیش ساز ماده حساس به نور پروتوپورفیرین IX با غلظت 0/3mM و به مدت ۵ ساعت در تاریکی و پرتوی یکنواخت لیزر حالت جامد Nd-YAG با طول موج ۵۳۲ nm و توان ۵۰mW اثر دهی شده و میزان بقا سلولهای سرطانی LN-CaP توسط آزمون MTT، تشکیل پروتوپورفیرین IX درون سلولها توسط اسپکتروفتومتر فلورسانس و نوع مرگ سلولی القا شده بر روی سلولها توسط رنگ آمیزی هوخست ارزیابی شد.

یافته ها: ۲۴ ساعت پس از تیمار کاهش چشمگیری در تعداد سلولها در گروه تیمار فتودینامیک در مقایسه با گروه ALA بدون لیزر و گروه لیزر بدون ALA دیده می شود. اعمال 5-ALA باعث افزایش تولید ماده حساس به نور اصلی پروتوپورفیرین IX درون سلولها می شود. با استفاده از رنگ آمیزی با هوخست سلولهای تیماری گروه ALA-PDT مرگ سلولی آپوپتوتیک را نشان می دهند. نتیجه گیری کلی: تیمار فتودینامیکی سلولهای سرطان پروستاتی LN-CaP با آمینولولنیک اسید با غلظت 0/3mM و زمان انکوباسیون ۵ ساعت به همراه پرتوی یکنواخت لیزر Nd-YAG با طول موج ۵۳۲ nm و توان ۵۰mW به مدت ۳ دقیقه باعث افزایش تولید پروتوپورفیرین IX و القا چشمگیر مرگ آپوپتوتیک سلولها می گردد. کلمات کلیدی: فتودینامیک تراپی-آمینولولنیک اسید-لیزر-Nd-YAG-آپوپتوز

مقدمه

سرطان پروستات دومین عامل مرگ بر اثر سرطان در مردان است. تحقیقات بالینی روند بدخیمی این سرطان را با عواملی همانند سن، عوامل ژنتیکی، هورمونی و ... مرتبط می دانند. جهت درمان این سرطان از روشهای متعددی چون جراحی (پروستاتکتومی) شیمی‌درمانی، هورمون درمانی و رادیوتراپی استفاده می کنند. در درمان این سرطان علاج قطعی وجود ندارد. برای نمونه پس از پروسه هورمون درمانی بیماری از حالت وابسته به اندروژن به حالت غیر وابسته به اندروژن پیشروی می کند. همچنین بعد از جراحی امکان عود سرطان وجود دارد. بنابراین تحقیقات در حال انجام است تا از روشهای جانبی و کمکی در درمان این سرطان استفاده شود [۱].

۱- استادیار گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه تربیت معلم تهران

Kouchesfehani@yahoo.com

۲- استادیار گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه تربیت معلم تهران

۳- دانشیار گروه فیزیک دانشکده علوم دانشگاه تربیت معلم تهران

۴- دانشجوی کارشناسی ارشد سلولی تکوینی جانوری دانشگاه تربیت معلم تهران



با توجه به این که لیزر در پزشکی (جراحی، چشم پزشکی و بیماریهای پوستی) مورد استفاده قرار می گیرد، اما استفاده از آن در درمان سرطان (موسوم به فتودینامیک تراپی یا درمان با تابش نور) روش جدیدی محسوب می شود [۲].

اساس این روش بکارگیری یک ماده حساس به نور است که توسط منبع نوری لیزری و یا لامپ با طول موج مناسب فعال می شود [۳]. ماده حساس به نور پس از فعال شدن می تواند تحت دو نوع واکنش قرار گیرد. در واکنش نوع ۱- ماده حساس به نور می تواند با سوبسترا واکنش داده و رادیکال آزاد تشکیل دهد که این رادیکالها ممکن است با اکسیژن واکنش داده و گونه های فعال اکسیژن را ایجاد کنند. در واکنش نوع ۲ ماده حساس به نور می تواند انرژی خود را مستقیم به اکسیژن انتقال دهد و اکسیژن یگانه تهییج شده را به وجود آورد که موجب اکسیداسیون و مرگ سلولی می شود. نسبت بین این ۲ واکنش به نوع واکنشگر، غلظت سوبسترا و اکسیژن بستگی دارد [۴ و ۵]. از مزایای این روش آن است که ماده حساس به نور پس از اعمال درون بدن بیشتر گرایش به تجمع در بافتهای بدخیم دارد و از این رو باعث از بین بردن بافتهای بدخیم می شود [۶].

آمینولولینیک اسید (5-ALA) پیش ساز طبیعی چرخه بیوسنتز هم (heme) درون سلولها است. این ماده به تنهایی ماده حساس به نور نیست، اما درون سلولها تبدیل به ماده حساس به نور پروتوپورفیرین IX می شود که از جمله واکنشگرهای نوری نسل دوم است. درون سلولهای طبیعی فیدبک منفی وجود دارد که مانع از تولید بیش از حد پروتوپورفیرین IX می شود. با اعمال اگزوزن امینولولینیک اسید فیدبک منفی از بین می رود و موجب تشکیل پروتوپورفیرین IX بیشتر درون سلولهای سرطانی می گردد. در سلولهای سرطانی به علت تغییراتی که در چرخه بیوسنتز هم به وجود می آید، تمایل بیشتری به سنتز پروتوپورفیرین IX وجود دارد [۷].

لیزر Nd-YAG از لیزرهای حالت جامد است که در جراحی و حذف تومورهای سطحی پوستی، پستانی و ریوی به کار گرفته شده است [۸ و ۹].

هدف ما در این آزمایش بررسی کارایی تیمار فتودینامیکی با استفاده از 5-ALA و لیزر Nd-YAG با پرتوی پیوسته و طول موج ۵۳۲ nm با توان ۵۰ mW بر روی سلولهای سرطان پروستاتی LN-CaP و اهمیت بکارگیری توام درمان با لیزر و ماده حساس به نور در مقایسه با لیزر به تنهایی است.

مواد و روش کار

کشت سلولی

سلولهای LN-CaP از موسسه پاستور تهیه شدند و در محیط کشت (SIGMA) RPMI1640 همراه با L گلوتامین و ۱۰ درصد FBS (Gibco) و ۱ درصد پنی سیلین- استرپتومایسین به عنوان آنتی بیوتیک درون فلاسک ۲۵mm کشت داده شده و درون انکوباتور (Binder) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد CO2 قرار گرفتند. این سلولها از نوع چسبنده هستند. پس از اینکه تراکم سلولها به ۷۰ درصد رسید برای پاساژ سلولها از (GIBCO) تریپسین-EDTA استفاده شد و هر ۴ روز یک مرتبه پاساژ صورت گرفت.

تیمار فتودینامیکی

سلولها به تعداد 2×10^4 درون پلیت ۲۴ خانه ای کشت داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت ۴ گروه برای انجام آزمایش تعیین گردید و برای هر گروه حداقل ۳ خانه از پلیت ۲۴ خانه ای در نظر گرفته شد. گروه اول- گروه کنترل که تحت تاثیر 5-ALA (SIGMA) و لیزر قرار نگرفت. گروه دوم- در این گروه سلولها تنها تحت تاثیر 5-ALA با غلظت ۰/۳mM و به مدت ۵ ساعت در تاریکی قرار می گرفتند. گروه سوم- در این گروه در هر خانه از پلیت سلولها بدون تاثیر 5-ALA کف پلیت در معرض پرتوی یکنواخت لیزر Nd-YAG با طول موج ۵۳۲ nm و توان ۵۰ mW به مدت ۳ دقیقه قرار گرفتند. گروه چهارم (گروه تیماری فتودینامیک) است که در این گروه سلولها در ابتدا تحت تاثیر 5-ALA در تاریکی با غلظت ۰/۳mM و زمان ۵ ساعت قرار گرفته و سپس تحت تاثیر پرتوی یکنواخت لیزر Nd-YAG با طول موج ۵۳۲ nm و توان ۵۰ mW قرار گرفتند.



۰/۵ $\mu\text{g/ml}$ رنگ آمیزی شد. توسط این رنگ می‌توان سلولهای زنده و آپتوتیک را به رنگ سبز مشاهده کرد. و از روی بررسی مورفولوژی هسته و سیتوپلاسم آپتوتوز را توسط میکروسکوپ فلورسانس تشخیص داد.

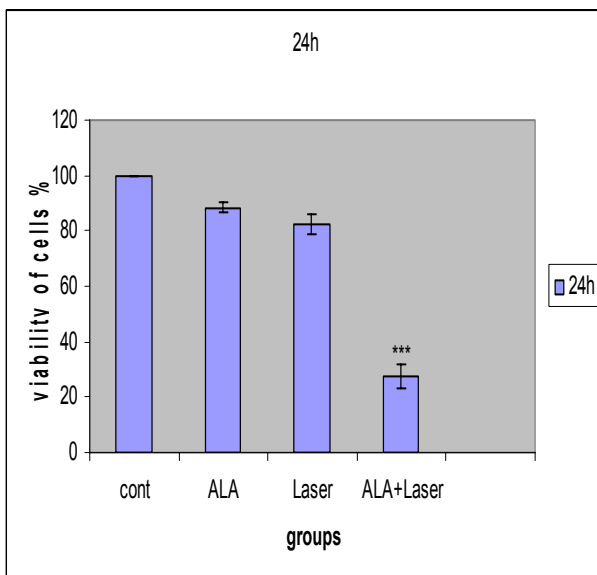
روش تجزیه و تحلیل داده ها

به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده ها از آزمون ANOVA، نرم افزار SPSS استفاده شد. $P < 0.05$ * معنی دار تلقی گردید. هر آزمایش حداقل ۳ مرتبه تکرار شد و نمودارها از طریق نرم افزار EXCEL رسم شدند.

نتایج

۱- تیمار فتودینامیک باعث افزایش چشمگیر سمیت نوری (کاهش چشمگیر تعداد سلولها) می‌شود.

داده های آزمون MTT نشان می‌دهند که در گروه تیماری فتودینامیک یعنی گروهی که در معرض 5-ALA با غلظت ۰/۳ mM و پرتوی یکنواخت لیزر Nd-YAG قرار گرفتند ۲۴ ساعت پس از تیمار بیشترین میزان مرگ و میر سلولها مشاهده می‌گردد و با $P < 0.001$ *** اختلاف معنی دار است، این در حالی است که اختلاف معنی داری در دو گروه دیگر نسبت به گروه کنترل مشاهده نمی‌شود. (شکل ۱)



شکل ۱- مقایسه درصد بقا (viability) سلولهای LN-CaP بعد از تابش پرتوی لیزر با روش MTT assay. که افزایش معنی داری را در نمونه های تیمار شده با ALA و لیزر در مقایسه با نمونه کنترل نشان می‌دهد. (Mean \pm S.E ***P < 0.001). تیمار با آمینولونیک اسید، L: تیمار با پرتوی یکنواخت لیزر Nd-YAG

ارزیابی میزان بقاء سلولها به روش MTT assay

آزمون MTT بیانگر فعالیت هیدروژنازهای میتوکندریایی است. ۲۴ ساعت پس از تیمار ۱۰۰ μl از معرف دی متیل تiazول دی فنیل تترازولیوم بروماید (MTT) از (SIGMA) با غلظت ۰/۵ $\mu\text{g/ml}$ به هر خانه از پلیت ۲۴ خانه ای افزوده شد و به مدت ۳-۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد درون انکوباتور قرار گرفتند. پس از انجام تیمار MTT نهایتاً جذب نوری کریستالهای فورمازان که نشان دهنده سلولهای زنده هستند، توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۷۰ nm تعیین شد.

اندازه گیری سنتز پروتوپورفیرین IX

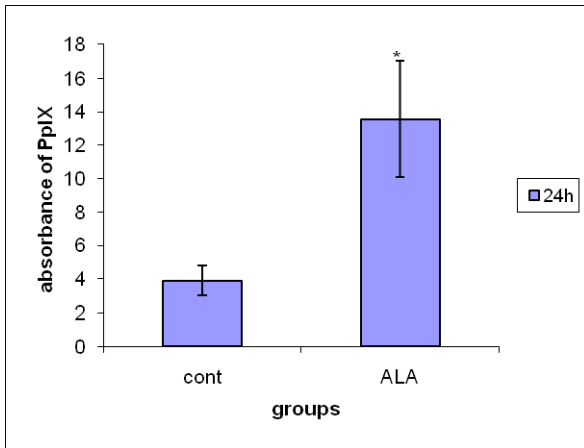
برای این منظور ۲ گروه کنترل و تیمار با 5-ALA را در نظر گرفته شد. در هر دو گروه سلولها به تعداد $10^4 \times 2$ درون پلیت ۲۴ خانه ای کشت داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت گروه ALA با ۰/۳ mM از آمینولونیک اسید و به مدت ۵ ساعت تیمار شد. پس از طی زمان انکوباسیون سلولهای هر دو گروه توسط تریپسین-EDTA از کف پلیت جدا شده داخل اپندورف ریخته و در ۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. به لیز سلولی ۵۰۰ μl از SDS ۱٪ حاوی ۰/۱ N NaOH افزوده و به آرامی تکان داده شدند. سپس نمونه ها توسط اسپکتروفتومتر فلورسانس بررسی شدند. (پیک جذب پروتوپورفیرین IX = ۶۲۰ nm، طول موج تهییجی = ۴۰۰ nm، طیف جذبی = ۵۰۰-۷۰۰ nm)

مطالعات مورفولوژیک

سلولهای گروه کنترل، تیمار با ALA، تیمار با لیزر و تیمار فتودینامیک (تیمار با ALA و لیزر) ۲۴ ساعت پس از تیمار فتودینامیک در زیر میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قرار گرفتند.

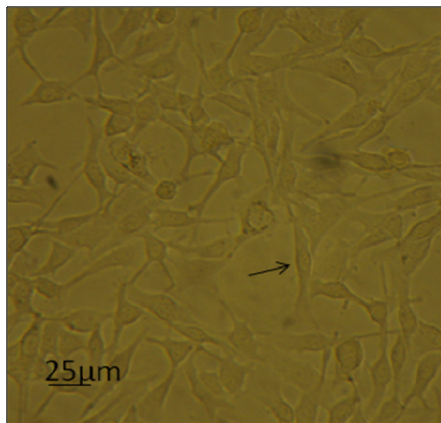
تعیین نوع مرگ سلولی

در این مرحله سلولها به تعداد 10^4 بر روی لامل های شیشه ای پوشیده شده با پلی دی لیزین (GIBCO) کشت داده شدند. پس از تعیین ۴ گروه ذکر شده و ۲۴ ساعت پس از تیمارها سلولها را توسط رنگ هوخست ۳۳۴۳۲ (SIGMA) با غلظت



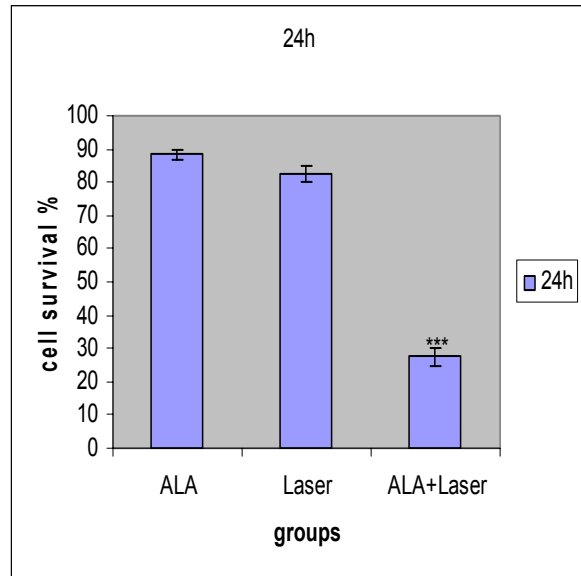
شکل ۳- مقایسه غلظت پروتوپورفیرین IX در سلول های LN-CaP پس از ۲۴ ساعت تیمار نسبت به کنترل با استفاده از اسپکتروفوتومتر فلورسانس که افزایش معنی داری را در نمونه های تیمار شده با ALA نشان میدهد. (Mean±S.E *P<0.05)

۳- گروه ALA-PDT در مقایسه با سایر گروهها تغییر مورفولوژیک فاحشی را نشان می دهد. با مطالعه سلولها در زیر میکروسکوپ معکوس تغییرات چشمگیری در مورفولوژی (تغییر در شکل سیتوپلاسم و هسته) سلولهای گروه تیماری فتودینامیک ۲۴ ساعت پس از تیمار نسبت به گروه کنترل مشاهده شد (اشکال ۳ و ۴).



شکل ۳- فتومیکروگراف از سلولهای گروه کنترل که در آن سلولها به صورت طبیعی، کشیده و طویل قرار دارند. نوک پیکان نشاندهنده حالت کشیده سلولها است. بزرگنمایی ۴۰۰×

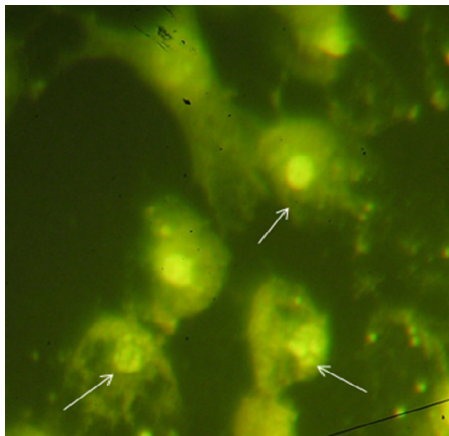
مقایسه درصد بقای سلولهای گروه تیماری فتودینامیک با دو گروه دیگر یعنی گروهی که ALA بدون لیزر دریافت کرده و گروهی که در معرض پرتوی لیزر بدون ALA بوده اند، میزان مرگ و میر بیشتری را نشان می دهد که در $P < 0.001$ معنی دار می باشد (شکل ۲).



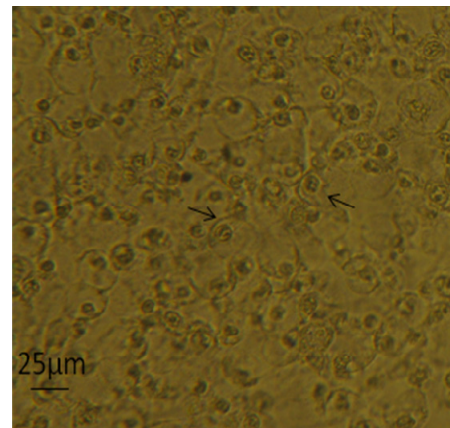
شکل ۲- مقایسه درصد بقا (viability) سلول های LN-CaP بعد از تابش پرتوی لیزر با روش MTT assay که افزایش معنی داری را در نمونه های تیمار شده با ALA و لیزر در مقایسه با نمونه ALA تنها و لیزر تنها نشان می دهد. (Mean±S.E ***P<0.001)

۲- اعمال 5-ALA با غلظت ۰/۳ mM و ۵ ساعت انکوباسیون موجب افزایش سنتز پروتوپورفیرین IX می شود.

بررسی نمونه هایی که تحت تاثیر آمینولولینیک اسید قرار گرفتند در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی داری ($P < 0.05$) را در سنتز پروتوپورفیرین IX نشان میدهد (شکل ۳).



شکل ۶- فتومیکروگراف از سلول‌های LN-CaP گروه-ALA PDT با رنگ آمیزی هوخست، فلشها قطعه قطعه شدن هسته و دفرمه شدن سیتوپلاسم را نشان می‌دهد.



شکل ۴- فتومیکروگراف از سلول‌های گروه تیماری فتودینامیک که در آن سلولها ۲۴ ساعت پس از تیمار دفرمه می‌شوند. همانگونه که در شکل مشاهده می‌شود سیتوپلاسم و هسته حالت طبیعی ندارند. نوک پیکان نشان‌دهنده سلول‌های دفرمه است. بزرگنمایی $\times 400$

بحث

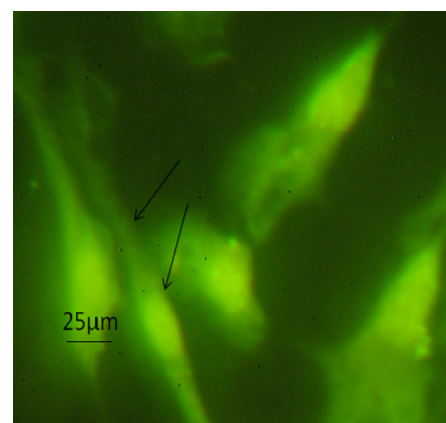
لیزر Nd-YAG متداول ترین نوع لیزر مورد استفاده در پزشکی است که کاربردهای بسیاری دارد. در این لیزر نئودیمیوم یونیزه شده به عنوان ماده فعال جایگزین ایتريوم در ساختار کریستالی ایتريوم آلومینیوم گارنت می‌شود. این لیزر غالباً نوری با طول موج ۱۰۶۴ در ناحیه مادون قرمز از خود ساطع می‌کند [۱۰].

گزارش‌های تحقیقاتی نشان می‌دهد لیزر Nd-YAG در جراحی و حذف تومورهای ریوی، پستانی و... عملکرد خوبی داشته است. از مزایای استفاده از آن می‌توان به قدرت تبخیر بالای تومور و نفوذ بافتی بالا در حدود ۵-۱۰mm با خروجی انرژی زیاد اشاره کرد [۱۱].

نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد که تیمار فتودینامیکی با بکارگیری آمینولولنیک اسید با غلظت ۰/۳mM و زمان انکوباسیون ۵ ساعت همراه با ۳ دقیقه در معرض بودن با پرتوی یکنواخت لیزر Nd-YAG با طول موج ۵۳۲nm و توان ۵۰mW می‌تواند اثرات سیتوتوکسیک را در سلول‌های سرطانی افزایش داده و درصد بالایی از مرگ و میر را در گروه تیماری فتودینامیک نسبت به گروه کنترل، گروه در معرض ماده حساس به نور بدون لیزر و گروه در معرض لیزر

۴- در طی تیمار فتودینامیک سلول‌های سرطانی LN-CaP بر اثر آپتوز از بین می‌روند.

بررسی سلول‌ها در زیر میکروسکوپ فلورسانس با استفاده از رنگ آمیزی هوخست نشان می‌دهد که ۲۴ ساعت پس از تیمار مرگ سلولی آپتوتیک باعث از بین رفتن سلولها می‌شود. در بررسی مورفولوژیکی سلول‌های آپتوتیک در مقایسه با سلول‌های سالم، سیتوپلاسم متراکم و هسته قطعه قطعه شده به خوبی مشخص است. (اشکال ۵و۶)



شکل ۵- فتومیکروگراف از سلول‌های LN-CaP گروه کنترل با رنگ آمیزی هوخست، فلش‌ها دست نخوردگی هسته را نشان می‌دهد.



محتوای پروتوپورفیرین IX درون سلولهای LN-CaP درصد مرگ و میر بالای سلولها را در این تیمار ترکیبی گزارش نمودند [۱۷]. نتایج تحقیق ما نشان می دهد که آمینولولینیک اسید با دوز مورد استفاده موجب سنتز ماده حساس به نور اندوژن پروتوپورفیرین IX در سلولهای سرطان پرستاتی LN-CaP شده است که مقایسه غلظت پروتوپورفیرین IX پس از ۲۴ ساعت تیمار در این سلولها نسبت به کنترل افزایش معنی داری در سطح $P < 0.05$ را نشان داده است که سبب افزودن سمیت نوری سلولها می شود.

تقدیر و تشکر

از راهنمایی های جناب آقای دکتر مجلس آرا در رابطه با مسائل مرتبط با لیزر و همکاری و همراهی ریاست دانشکده علوم، مدیر محترم گروه زیست شناسی و مرکز پرورش و تکثیر حیوانات دانشگاه تربیت معلم کمال تشکر را داریم.

منابع

1. Uzgare AR, Isaacs JT. 2005. Prostate cancer: potential targets of anti-proliferative and apoptotic signaling pathways, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37:707-714
۲. یلسون جی (۱۳۸۵). اصول لیزر و کاربردهای آن. ترجمه عباس بهجت، انتشارات دانشگاه یزد، صفحات ۱۸۵-۱۸۳
3. Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., et al. 1998. photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst*. 90(12):89-905.
4. Luksiené Z. 2003. Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment, *MEDICINA*, 39: 1137-1150
5. Castano Ana P, Demidova Tatiana N, Hamblin Michael R. 2004. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 1:279-293.
6. Christian S, Jin-Ping L, Wei X, Janda P, Heinrich P, Herbert S, Baumgartner Rand Leunig A. 2002. In vitro photodynamic therapy of

بدون ماده حساس به نور ایجاد کند، که با داده های Peng و همکارانش که نشان دادند با انتخاب ماده حساس به نور و منبع نوری مناسب می توان سمیت نوری را در طی تیمار فتودینامیکی افزایش داد مطابقت دارد [۱۲]. Wyld و همکارانش گزارش کردند که نوع مرگ سلولی القا شده پس از تیمار فتودینامیک می تواند آپوپتوز یا نکروز باشد که بستگی به نوع سلول دوز نوری و نوع ماده حساس به نور دارد [۱۳]. مطالعات ما نشان می دهد که استفاده از ماده حساس به نور آمینولولینیک اسید با غلظت $0.3/0$ mM و دوز نوری ۳ دقیقه با طول موج 532 nm و توان 50 mW بر روی دودمان سلولی LN-CaP موجب القا مرگ سلولی شدیدی می شود. بررسی های مورفولوژیکی صورت گرفته با رنگ آمیزی هوخست نوع مرگ سلولی ایجاد شده را آپوپتوز نشان می دهد چرا که از نشانه های مرگ سلولی آپوپتوتیک می توان به از هم گسیختگی و دفرمه شدن سیتوپلاسم و قطعه قطعه شدن هسته سلولها اشاره کرد. با توجه به اینکه که سلولهای سرطانی به سرعت تکثیر می شوند و کمتر تحت مرگ سلولی برنامه ریزی شده (آپوپتوز) قرار می گیرند یافتن روش هایی که بتوان به طور انتخابی آپوپتوز را در سلولها ایجاد کرد مدنظر بوده است.

Buchczyk و همکاران در سال ۲۰۰۱ توسط فتودینامیک درمانی با ALA و پرتوی UV با طول موج $320-400$ nm توانستند سلولهای فیبروبلاست پوست را به میزان زیادی از بین ببرند [۱۴]. Sporri و همکاران اثرات 5-ALA و پرتوی لیزر آرگون با طول موج 400 nm، شدت نوری 8 J/cm² را بر سلولهای سرطان تخمدانی TEC و سلولهای اندوتلیال عروقی HUVEC در شرایط *in vitro* بررسی کردند و نتایج بالینی خوبی را به دست آوردند و اعمال مستقیم ماده حساس به نور را در بهبود نتایج موثر دانستند [۱۵]. Ortel و همکاران در سال ۲۰۰۲ اثرات 5-ALA و پرتوی لیزر آرگون با طول موج 512 nm و شدت 0.06 تا 0.075 را همراه با تمایز درمانی با ویتامین A و D بر سلولهای LN-CaP بررسی کرده و درصد بالایی از مرگ سلولها را گزارش کردند [۱۶]. Sinha و همکاران نیز در سال ۲۰۰۶ اثر تیمار ترکیبی تمایز درمانی با متوترکسات و تیمار فتودینامیکی با 5-ALA و پرتوی لیزر آرگون بررسی کرده و ضمن سنجش



16. Ortel B, Sharlin D, Odonell D, Sinha AK, Hassan T, Differentiation enhances aminolevulinic acid-dependent photodynamic treatment of LNCaP prostate cancer cells, *British Journal of Cancer*.2002;87:1321-1327.
17. Sinha A.K, Anad S, Ortel B,Chang Y, Hasan T and Maytin EV. Methortrexate used in combination with aminolevulinic acid for photodynamic killing of prostate cancer cells. *Br J Cancer* 2006; 95:485-495
- nasopharyngeal carcinoma using 5-aminolevulinic acid, *Photochem. Photobiol.Science*,1: 315-319
7. Sporii S, Chopra V, Egger N, Hawkins H , Motamedi M ,Dreher E, Schneider H .2001.Effects of 5-aminolaevulinic acid on human ovarian cancer cells and human vascular endothelial cells in vitro, *journal of photochemistry and photobiology*,64: 8-20
8. Wilson J, Hanwakes J.F.B, Behjat A .2006 . *Laser principles and Applications*. Yazd University. p.235
9. Konaka C, Furukawa K, Okunaka T, Yamamoto and Kato H, Tsuchida T, Usuda J, Kumasaka H, Ishida J. 1999. Effectiveness of Photodynamic Therapy and Nd-YAG Laser Treatment for obstructed Tracheobronchial Malignancies, *Hindwai Publishing* 5,161-166
10. Geusic JE, Marcos HM, Van Uitert LG. Laser oscillation in Nd-doped yttrium aluminium, yttrium gallium and gadolinium garnet, *Applied Physics Letters*.1964;10:182-184
11. نایمر مارکوف (۱۳۸۱). برهمکنش لیزر- بافت. ترجمه پرویز پروین، مرکز نشر دانشگاه صنعتی امیر کبیر، صفحات ۲۳۹-۲۳۶
12. Peng Q ,Warloe T ,Berg K ,Moan J, Kongshaug M, Giercksky ,Nesland J.2002.5-Aminolevulinic Acid-Based Photodynamic Therapy, *Cancer*,97: 2282-2307
13. Wyld L, Reed MWR and Brown NJ.2001.Differential cell death response to photodynamic therapy is dependent on dose and cell type, *British Journal of Cancer*,89: 1384-1
14. Buchczyk P, Klotz L, Lang K, Fritsch C, Sies H. High efficiency of 5-aminolevulinic acid - photodynamic treatment using UVA irradiation, *Carcinogenesis*,2001;22:879-883.
15. Sporri Stefan , Chopra Vimlarani, Egger Norman , Hawkins Hal K, Motamedi Massoud, Dreher Ekkehard, Schneider Henning ,Effects of 5-aminolaevulinic acid on human ovarian cancer cells and human vascular endothelial cells in vitro. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*.2001;64:8-20

