

Effect of Photodynamic Therapy with 808 nm Diode Laser and Different Concentrations of Indocyanine Green on Promastigotes of *Leishmania Major*

Jalili Sh¹, Hoseini M², Sadeghi HR², Mousavi Nezhad SA³

- 1- Assistant Professor of Institute of Police Equipment and Technologies, Policing Sciences and Social Studies Research Institute, Tehran, Iran
- 2- Assistant Professor, Department of Radiology Technology, school of paramedical sciences, Torbat Heydarieh University of Medical Sciences, Torbat Heydarieh, Iran
- 3- Assistant Professor of Research Center for Life & Health Sciences & Biotechnology of the Police, Directorate of Health, Rescue & Treatment, Police Headquarter, Tehran, Iran

Abstract

Received 2024.04.02 Accepted: 2024.05.13

Purpose: Leishmaniasis is a common infectious disease affecting humans and animals, threatening more than 350 million people in 100 countries, including Iran, and there is still no effective treatment with low complications. Photodynamic therapy (PDT) is a non-invasive and repeatable method for removing leishmaniasis lesions. The aim of this study was to investigate the effects of photodynamic therapy with a near-infrared laser in the presence of indocyanine green (ICG) on leishmaniasis.

Methods: *In vitro* study was carried out after cultivation of parasites extracted from the spleen of infected mice in the presence of 6 different concentrations of ICG and exposure with the 808 nm laser. To avoid the photothermal effect, the output intensity was limited to 1 W/cm². Each study included three controls: untreated parasites, ICG-treated parasites and parasites exposed to the laser. Finally, the effectiveness of the treatments was evaluated by the MTS/PMS assay.

Results: There was no significant difference in survival among all groups containing ICG compared to the control group ($P > 0.05$). However, these groups showed a significant reduction in survival compared to the control group after laser exposure ($P < 0.05$). Additionally, in the group with only laser irradiation, cell survival did not decrease compared to the control group ($P > 0.05$).

Conclusion: The findings of this study showed that photodynamic therapy in the presence of ICG could be a new, safe and low-cost option against *L. major*.

Keywords: Leishmaniasis, Photodynamic therapy, Indocyanine green, Near-infrared laser

Corresponding Author: Seyyed Amin Mousavi Nezhad

Email: Mousavinezhad101@gmail.com

ORCID: 0000-0002-7534-2553



Copyright © 2023 Mashhad University of Medical Sciences. This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

► Please cite this article as: Jalili Sh, Hoseini M, Sadeghi HR, Mousavi Nezhad SA. Effect of Photodynamic Therapy with 808 nm Diode Laser and Different Concentrations of Indocyanine Green on Promastigotes of *Leishmania Major*. JPSR 2024; 13(2):7-16. DOI: 10.22038/JPSR.2024.78799.2610.

تأثیر درمان فتوداینامیک با لیزر دایودی ۸۰۸ نانومتر و غلظت‌های مختلف ایندوسیاین سبز

بر پروماستیگوت‌های لیثمانیا ماژور

شیرین جلیلی^۱، مهدی حسینی^۲، حمیدرضا صادقی^۲، سید امین موسوی نژاد^۳

هدف: بیماری عفونی لیثمانیوز، یک معضل عمده بهداشتی در اغلب کشورها از جمله ایران است. با وجود معرفی روش‌های متعدد برای درمان این بیماری، کماکان لیثمانیوز فاقد درمان قطعی است. از میان درمان‌های تجربی، درمان فتوداینامیک روشی غیرتهاجمی و تکرارپذیر برای از بین بردن ضایعات ناشی از لیثمانیوز است. هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر درمان فتوداینامیک با لیزر مادون قرمز نزدیک در حضور ایندوسیاین سبز بر پروماستیگوت‌های لیثمانیا ماژور می‌باشد.

روش بررسی: بررسی برون تنی پس از تکثیر انگل استخراج شده از طحال موش آلوده در حضور ۶ غلظت مختلف از ایندوسیاین سبز و نوردهی با طول موج ۸۰۸ نانومتر انجام شد. برای جلوگیری از اثر فتوترمال، شدت خروجی به 1 W/cm^2 محدود گردید. هر بررسی شامل سه کنترل انگل‌های بدون درمان، انگل‌های صرفاً تیمار شده با ایندوسیاین و انگل‌های صرفاً نوردهی شده بود. نهایتاً میزان اثرگذاری درمان‌ها با روش MTS/PMS ارزیابی گردید.

یافته‌ها: تفاوت میانگین بقا در هیچ یک از گروه‌های حاوی ایندوسیاین نسبت به گروه کنترل معنادار نبود ($p > 0.05$) اما این گروه‌ها پس از نوردهی، کاهش بقای قابل ملاحظه‌ای نسبت به گروه کنترل نشان دادند ($p < 0.05$). همچنین، نوردهی صرف در گروه بدون ایندوسیاین، کاهش معناداری در بقای سلولی نسبت به گروه کنترل ایجاد نکرد ($p > 0.05$).

نتیجه گیری: یافته‌های این پژوهش نشان داد که درمان فتوداینامیک در حضور ایندوسیاین سبز می‌تواند گزینه‌ای جدید، ایمن و کم‌هزینه علیه لیثمانیا ماژور باشد.

کلمات کلیدی: لیثمانیوز جلدی، درمان فتوداینامیک، ایندوسیاین سبز، لیزر مادون قرمز نزدیک

نویسنده مسئول: سید امین موسوی نژاد، Mousavinezhad101@gmail.com، ORCID: 0000-0002-7534-2553

آدرس: تهران، خیابان ولیعصر، بالاتر از میرداماد، بیمارستان ولیعصر (عج) ناجا، مرکز تحقیقات علوم و فناوری‌های زیستی و سلامت پلیس

۱- استادیار بیوشیمی، پژوهشکده تجهیزات و فناوری‌های انتظامی، پژوهشگاه علوم انتظامی و مطالعات اجتماعی فراجا، تهران، ایران

۲- استادیار فیزیک پزشکی، گروه تکنولوژی پرتوشناسی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه، تربت حیدریه، ایران

۳- استادیار میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات علوم و فناوری‌های زیستی و سلامت پلیس، معاونت بهداشت، امداد و درمان، فرماندهی انتظامی، تهران، ایران

مقدمه

متأسفانه هنوز درمان بدون عارضه، منفرد و موثری برای سالک وجود ندارد و درمان این بیماری تا حدود زیادی تجربی است. اگرچه درمان‌های مرسوم با آنتیموان پنج ظرفیتی (Pentavalent Antimonials)، آمفوتریسین B (Amphotericin B) و میلترفوسین (Miltefosine) می‌توانند مؤثر باشند، اما عوارض و محدودیت‌های زیادی از جمله برای کودکان، بیماران مبتلا به کاردیومیوپاتی و زنان باردار دارند (۳، ۴). بنابراین، محدودیت‌های روش‌های مرسوم، ضرورت توسعه درمان‌های جایگزین را ایجاب می‌کند.

درمان فتوداینامیک (Photodynamic Therapy; PDT)، روشی غیرتهاجمی برای از بین بردن ضایعه‌های

لیثمانیوز (Leishmaniasis) یک بیماری عفونی است که توسط گونه‌های مختلف تک یاخته تاژکدار لیثمانیا ایجاد می‌شود و با نیش پشه خاکی ماده از گونه فلوتوموس پاپاتاسی منتقل می‌شود (۱). سازمان جهانی بهداشت (World Health Organization; WHO) تخمین زده است که ۳۵۰ میلیون نفر در ۹۸ کشور جهان از جمله ایران در معرض خطر ابتلا به لیثمانیوز قرار دارند. این بیماری عفونی به سه شکل احشائی (کالآزار)، جلدی-مخاطی و جلدی (سالک) دیده می‌شود. لیثمانیوز جلدی شایع‌ترین نوع لیثمانیوز است و می‌تواند به صورت ضایعات مرطوب یا خشک ظاهر شود (۲).

است. طی سال‌های اخیر، علاقه به استفاده از ICG به عنوان عامل فتوداینامیک هم برای درمان سرطان و هم برای کنترل عوامل میکروبی، از این واقعیت ناشی می‌شود که این رنگینه دارای باند جذب قوی در ناحیه NIR است که امکان نفوذ عمیق‌تر را فراهم می‌کند (۲۲-۱۶). مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر PDT بواسطه ICG بر فعالیت متابولیکی پروماستیگوت‌های (*Promastigotes*) لیشمانیا ماژور (*Leishmania major*; *L. major*) انجام شد.

روش بررسی

پژوهش آزمایشگاهی (Experimental) حاضر به صورت برون تنی (*In vitro*) و با مواد و روش‌های زیر انجام شد:

تهیه و کشت پروماستیگوت‌ها:

در این مرحله، از موش بلب سی آلوده به انگل‌های *L. major* سویه MRHO/IR/75/ER اهدائی مرکز تحقیقات پوست و جذام دانشگاه علوم پزشکی تهران استفاده شد. به منظور تکثیر انگل، آماستیگوت‌های استخراج شده از طحال موش آلوده، ابتدا در محیط دو فاز (Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) حاوی آگار (۴ mg/ml) و خون خرگوش دفیبرینه شده (تهیه شده از موسسه سرم سازی رازی) و محیط RPMI 1640 (Gibco آمریکا) حاوی آنتی بیوتیک (استرپتومایسین و پنی‌سیلین به ترتیب با نسبت‌های ۱۰۰ µg/ml و ۱۰۰ IU/ml) به انضمام ۲۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) محصول Gibco آمریکا که کمپلمان آن طی ۳۰ دقیقه در دمای ۵۶°C غیر فعال شده بود، به مدت ۲ هفته در انکوباتور ۲۸°C کشت داده شد. پس از تبدیل آماستیگوت‌ها به پروماستیگوت‌ها، پروماستیگوت‌های *L. major* به فلاسک ۲۵ میلی لیتری حاوی محیط RPMI 1640 دارای آنتی بیوتیک و غنی شده با ۱۰ درصد FBS، منتقل و در دمای ۲۸°C کشت شد. به منظور پاساژ دادن انگل، سوسپانسیون در سانتریفیوژ یخچال‌دار به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۵۰۰ بر دقیقه ته نشین و محیط کشت رویی آن خارج گردید. انگل‌ها بعد از ۵ روز انکوباسیون که به فاز رشد ثابت (Stationary Phase; SP) رسیدند، با استفاده از لام نئوبار در واحد حجم شمارش و محاسبه شدند (۲۴، ۲۳).

قابل دسترس با قابلیت تکرار است. در این روش پس از ورود یک داروی حساس کننده نوری (Photosensitizer) به بدن، ناحیه مورد نظر تحت تابش نور با طول موج مناسب قرار می‌گیرد و در نتیجه‌ی تحریک ماده حساس کننده در حضور اکسیژن مولکولی، با تولید رادیکال‌های آزاد، مرگ سلولی رخ می‌دهد. بنابراین لازمه‌ی وقوع درمان فتوداینامیک، وجود همزمان سه عامل نور، حساس کننده نوری و اکسیژن است. این روش در ابتدا به عنوان یک درمان جایگزین برای سرطان مورد مطالعه قرار گرفت و سپس کاربرد آن به کنترل میکروبی گسترش یافت. امکان درمان یک ناحیه محدود با تجویز موضعی حساس کننده نوری برای به حداقل رساندن عوارض جانبی، این روش را به جایگزینی برای درمان سالک تبدیل می‌کند (۵، ۶).

پژوهشگران زیادی اثر فتوداینامیک را به عنوان جایگزینی برای درمان سالک مورد بررسی قرار داده‌اند. در این میان، ترکیباتی مانند کتال‌های کرباپورفیرین (Carbaporphyrin Ketals)، متیلن بلو (Methylene Blue; MB)، مشتقات رز پنگال (Rose Bengal; RB)، آمینولولولینیک اسید (Amino Levulinic Acid; ALA)، کلروآلومینیوم فتالوسیانین (Chloroaluminum Phthalocyanine; CIAPc)، فتالوسیانین تترا سولفونات آلومینیوم (Aluminum Phthalocyanine Tetrasulfonate; AlPcS4)، کورکومین (Curcumin) و تولویدین بلو (Toluidine Blue; TBO) به عنوان حساس کننده نوری برای بهبود اثربخشی درمان استفاده شده‌اند (۷-۱۵). در این زمینه، ایندوسیانین سبز (Indocyanine Green; ICG) می‌تواند به عنوان یک جایگزین احتمالی برای PDT سالک در نظر گرفته شود.

ICG تنها رنگینه‌ای است که توسط سازمان غذا و داروی ایالات متحده (Food and Drug Administration; FDA) برای مطالعات تشخیصی پزشکی از جمله آنژیوگرافی افتالموسکوپی (Ophthalmic Angiography; OA)، بررسی عملکرد کبد (Hepatic Function; HF) و تعیین برون ده قلبی (Cardiac output) تایید شده است. از دیگر ویژگی‌های قابل توجه این حساس کننده‌ی قابل حل در آب، تولید گونه‌های فعال اکسیژنی (Reactive Oxygen Species; ROS) پس از قرار گیری در معرض نور فرورسرخ نزدیک (Near-infrared; NIR)

که در اینجا OD_T دانسیته نوری گروه‌های درمانی، OD_B دانسیته نوری چاهک حاوی محیط کشت (بلانک) و OD_C دانسیته نوری گروه کنترل است. همچنین، با استفاده از دانسیته نوری بدست آمده، غلظتی که ۵۰٪ جمعیت انگل را مهار می‌کند (inhibitory concentration; IC_{50})، محاسبه شد.

PDT

نوردهی نمونه‌ها با استفاده از یک لیزر دایودی پیوسته (Continuous Wave) مدل MDL-III-808، با کلاس ایمنی (IV) ساخت کشور چین انجام شد که طول موج تابشی آن در ۸۰۸nm (ناحیه NIR) بود. حداکثر توان خروجی و مساحت لکه نورانی این دستگاه به ترتیب 2630 mW و $5 \times 8\text{ mm}^2$ می‌باشد. همچنین این دستگاه لیزر مجهز به تنظیم کننده توان خروجی می‌باشد که از صفر تا حداکثر 2630 mW قابل تنظیم است. لازم به ذکر است که برای تعیین طیف نشری لیزر ۸۰۸ nm، از دستگاه اسپکترومتر AvaSpec ساخت کشور هلند استفاده شد (تصویر ۱).



تصویر ۱: منبع نور لیزر مدل MDL-III-808

پس از انجام مراحل فوق، PDT انجام شد. روش درمان بدین صورت بود که ابتدا به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه حاوی $100\ \mu\text{L}$ محیط کشت با ۳٪ FBS (حاوی 1×10^5 پروماستیگوت)، مقادیر مختلف ICG محلول در آب اضافه شد (حجم $10\ \mu\text{L}$) تا غلظت‌های $125\ \mu\text{g/mL}$ و $30, 60, 75$ ، از این حساس کننده تهیه شود. در ادامه، پلیت

حساس کننده نوری

ICG (شماره تولید Sigma, USA, MG-25-12633) با نام تجاری Cardio Green، فرمول مولکولی $C_{43}H_{47}N_2NaO_6S_2$ با جرم مولکولی $774/2\ \text{g/mol}$ ، به عنوان حساس کننده نوری مورد استفاده قرار گرفت. محلول استوک ICG با غلظت $5\ \text{mg/ml}$ در آب دیونیزه تهیه و در دمای 20°C - نگهداری شد. همه محلول‌های با غلظت‌های مختلف، از رقیق شدن این محلول استوک به دست آمدند. سپس طیف جذب رنگینه در غلظت $1/56\ \mu\text{g/ml}$ بوسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر فرابنفش- مرئی مدل UV-2100 ساخت شرکت UNICO چین ثبت شد.

سنجش بقای پروماستیگوت‌ها

ابتدا تعداد 1×10^6 انگل در هر میلی لیتر در ۷ فالكون شمارش شد. هر فالكون در مجموع حاوی ۱ mL محیط کشت با ۳٪ FBS و انگل بود. برای تعیین سمیت رنگینه و متعاقباً نوردهی، $100\ \mu\text{L}$ از محلول حاوی محیط کشت یک برابر غلظت با ۳٪ FBS و غلظت‌های $125\ \mu\text{g/mL}$ و $30, 60, 75$ ، از ICG به هر فالكون اضافه شد. پژوهش حاضر بر روی ۷ گروه و در دو مرحله یعنی ابتدا ارزیابی سمیت در تاریکی (Dark toxicity) حساس کننده ICG و سپس ارزیابی اثر PDT به انجام رسید.

پس از گذشت ۲۴ ساعت از انکوباسیون ICG با پروماستیگوت‌ها، هر فالكون ۱۰ دقیقه با دور ۴۵۰۰ سانتریفیوژ شد. پس از تخلیه محلول رویه، ۱ mL محیط کشت RPMI 1640 (بدون فنل قرمز) همراه با ۳٪ FBS اضافه شد و مجدداً به انکوباتور 28°C منتقل شد. ۴۸ ساعت پس از انکوباسیون، سوسپانسیون حاوی انگل به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه شد بطوری که در هر چاهک 1×10^5 پروماستیگوت قرار گرفت. جهت بررسی بقا، $20\ \mu\text{L}$ محلول MTS (Promega, Madison) در ترکیب با PMS (با نسبت ۵ به ۱) به هر چاهک اضافه و سپس در دمای 37°C به مدت ۳ ساعت انکوبه شدند (۲۵). نهایتاً، دانسیته نوری نمونه‌ها توسط دستگاه خوانشگر میکرو پلیت فتومتر (STAT FAX 2100, USA) با طول موج $490\ \text{nm}$ خوانده شد و درصد بقای پروماستیگوت‌های مورد مطالعه، بصورت زیر محاسبه شد:

$$100 \times \frac{[OD_T - OD_B / OD_C - OD_B]}{\text{درصد زنده ماندن}}$$

موج لیزر استفاده شده در درمان‌ها است. قسمت دوم نتایج، مربوط به آزمایشات برون تنی انجام شده می‌باشد.

آنالیز طیف سنجی

طیف جذب بهنجار شده ICG (غلظت ۱/۵۶ میلی گرم بر لیتر) و طیف نشر بهنجار شده لیزر NIR مورد استفاده در این مطالعه، در نمودار ۱ نشان داده شد. بر این اساس، قله جذب حساس کننده و قله نشر لیزر NIR به ترتیب در طول موج‌های ۷۷۷ nm و ۸۰۷ nm ثبت شد.

بررسی میزان سمیت ICG بر روی پروماستیگوت‌ها:

بر اساس نتایج ارائه شده در نمودار ۲، با افزایش غلظت ICG، روندی نزولی در میانگین بقای پروماستیگوت‌های لیشمانیا ماژور مشاهده شد اما تفاوت میانگین بقا در هیچ یک از گروه‌های حاوی ICG نسبت به گروه کنترل معنادار نبود ($p > 0.05$)، حتی در بالاترین غلظت ICG یعنی $125 \mu\text{g/mL}$ نیز بقا به میزان کمتر از ۱۰ درصد کاهش یافت که بیانگر سمیت در تاریکی بسیار پایین این حساس کننده نوری است. قابل ذکر است که براساس برازش نتایج نمودار ۲ با مدل رگرسیون خطی، IC_{50} این رنگینه $969 \mu\text{g/mL}$ بدست آمد.

تاثیر نوردهی در حضور حساس کننده نوری

با توجه به نمودار ۳، گروه‌های حاوی غلظت‌های مختلف ICG پس از نوردهی، کاهش بقای قابل ملاحظه‌ای نسبت به گروه کنترل (با توجه به تست سمیت) نشان دادند ($p < 0.05$). لازم به ذکر است که در گروه بدون دارو پس از نوردهی، کاهش آماری در بقای سلولی نسبت به گروه کنترل مشاهده نشد ($p > 0.05$) که بیانگر عدم سمیت نوری طول موج 808 nm در شدت 1 W/cm^2 و دز نوری 120 J/cm^2 است. از طرفی، با توجه به مقایسه آماری دو به دوی گروه‌ها، بین گروه‌های با غلظت $30 \mu\text{g/mL}$ ، $60 \mu\text{g/mL}$ ، $75 \mu\text{g/mL}$ و $125 \mu\text{g/mL}$ اختلاف معناداری مشاهده نشد ($p > 0.05$). همچنین، مقایسه دو به دوی هر کدام از گروه‌های ICG به همراه لیزر با گروه لیزر تنها، اختلاف معناداری در میانگین بقا نشان داد ($p < 0.05$). لازم به ذکر است که این مقایسه بین تک تک گروه‌های ICG تنها با گروه

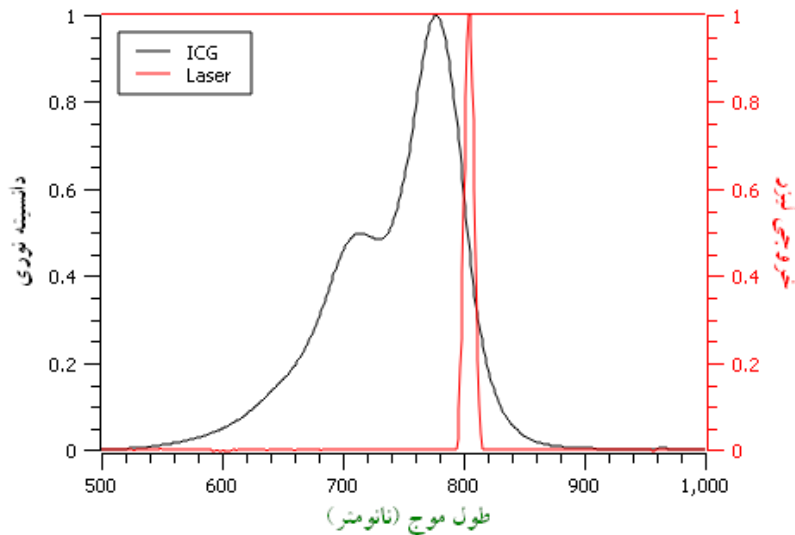
توسط فویل آلومینیومی پوشیده شد و به انکوباتور 28°C منتقل گردید. پس از ۲۴ ساعت، برای بررسی اثر فتوداینامیک، از توان نامی 0.4 W استفاده شد که با توجه به اندازه‌ی لکه‌ی باریکه 40 mm^2 ، شدت نامی 1 W/cm^2 بدست آمد. زمان نوردهی برای تمام گروه‌ها ۲ دقیقه لحاظ شد که متناظر با دز نوری 120 J/cm^2 بود. علت انتخاب این دز نوری، عدم ایجاد اثر فوتوترمال بود (۱۷، ۱۹). پس از اتمام فرایند نوردهی، پلیت مجدداً به انکوباتور 28°C برگردانده شد. ۴۸ ساعت بعد، بقای پروماستیگوت‌ها توسط تست MTS/PMS ارزیابی شد. با توجه به سازوکار پدیده فتوداینامیک، هر آزمایش شامل سه کنترل بود: کنترل اول که انگل‌های بدون درمان بود، دومی انگل‌هایی بود که با ICG تیمار شده بودند اما تحت تابش نور قرار نگرفتند و سوم، انگل‌هایی که در معرض نور قرار گرفتند اما با ICG تیمار نشدند.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و شاخص‌های مقایسه

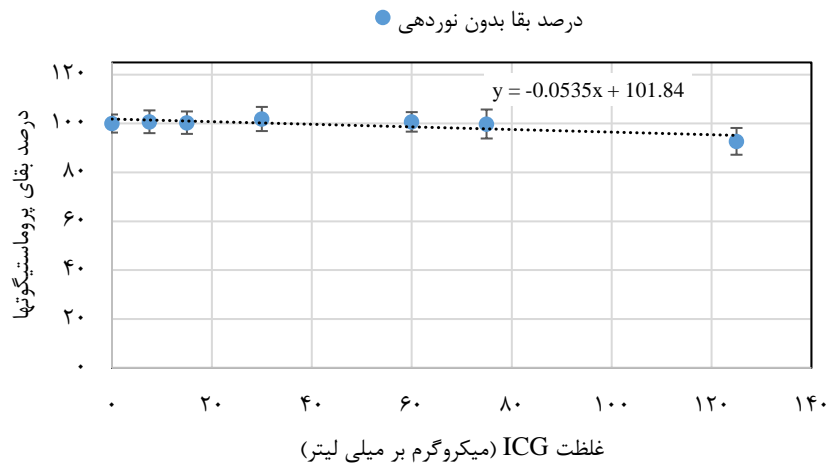
هر آزمایش حداقل سه مرتبه تکرار شد. تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۶ انجام شد. نتایج بصورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شد. ابتدا نرمال بودن توزیع داده‌ها با آزمون کولموگوروف-اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov) بررسی شد. با توجه به نرمال بودن توزیع داده‌ها، از آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) و آزمون توکی (Tukey) برای مقایسه نتایج درمانی در گروه‌های مختلف استفاده شد. همچنین، برای مقایسه دو به دوی میانگین بقا در گروه‌های مورد مطالعه، از آزمون Student T-test استفاده شد. مقادیر احتمال کوچکتر از ۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد. در ادامه، برای ارزیابی کارایی فتوداینامیک، شاخص سمیت نوری (Phototoxic index; PI) بکار گرفته شد که برابر است با "غلظت مهاری ۵۰ درصد در دز نوری صفر، تقسیم بر غلظت مهاری ۵۰ درصد در دز نوری مورد استفاده". بر این اساس، در صورتی که PI بیشتر از ۵ شود، به معنی بروز اثر سمیت نوری است. لازم به ذکر است که مقادیر IC_{50} از برازش رگرسیون خطی منحنی‌های بقا استخراج گردید (۲۶).

یافته‌ها

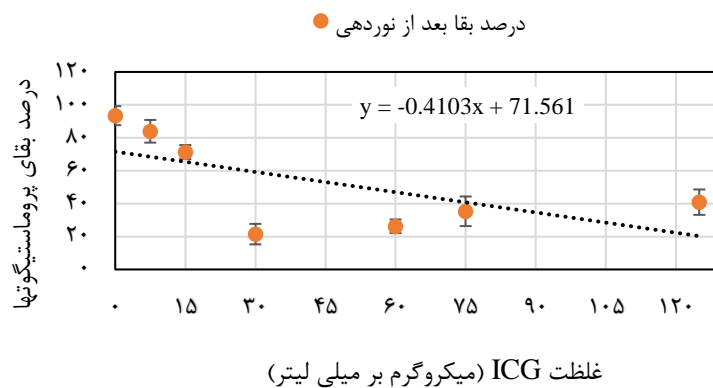
نتایج حاصل از این پژوهش در دو بخش ارائه می‌شود. قسمت اول نتایج مربوط به ویژگی‌های اپتیکی ICG و مقایسه با طول



نمودار ۱: همپوشانی جذب ICG (غلظت ۱/۵۶ میلی گرم بر لیتر) با طیف نشر لیزر ۸۰۸nm



نمودار ۲: درصد بقای انگل پس از قرارگیری در معرض غلظت‌های مختلف ICG.



نمودار ۳: درصد بقای انگل پس از قرارگیری در معرض غلظت‌های مختلف ICG و نوردهی با لیزر ۸۰۸ nm در دز نوری ۰.۱۲۰ J/cm^2 .

محدوده‌ی مرئی و مقداری هم در محدوده‌ی NIR دارد. این نتیجه را در مورد میتوکندری انگل‌ها هم می‌توان استفاده کرد (۲۸). بدین ترتیب، یافته‌های بدست آمده از نوردهی پروماستیگوت‌ها در طول موج ۸۰۸ nm در غیاب رنگینه قابل توجه است. از طرفی، یکی از مزیت‌های عمده ICG نسبت به پورفیرین‌ها اینست که برای تحریک ICG از طول موج در بازه ۶۰۰-۴۰۰ nm استفاده نمی‌شود که همین مسئله باعث ایجاد کمترین سمیت نوری در پوست می‌شود (۱۵).

مطالعه Onda و همکاران (۲۹) بر روی سلول‌های سرطانی HT-29 نشان داد که ICG طی ۲۴ ساعت پس از انکوباسیون، عمدتاً در لیزوزوم تجمع می‌یابد (۲۹). بنابراین، هم به دلیل طول عمر کوتاه اکسیژن یگانه و هم لوکالیزاسیون ICG داخل لیزوزوم (نه داخل هسته انگل)، احتمال آسیب DNA (سمیت هسته) از طریق ROS اندک می‌باشد (۱۲). انتظار می‌رود آپوپتوز مکانیسم اصلی نابودی انگل ناشی از اثر همیاری ICG و تابش NIR باشد (۱۸).

از طرفی، نتایج نمودار ۳ نشان می‌دهد که با افزایش غلظت ICG تا ۳۰ $\mu\text{g/mL}$ بقای پروماستیگوت‌ها روندی نزولی داشت اما با افزایش غلظت رنگینه تا ۱۲۵ $\mu\text{g/mL}$ ، میزان بقا پس از نوردهی، روندی صعودی را نشان داد. مطالعه‌ای که توسط Song و همکاران بر روی اثر فتوداینامیک حساس کننده MB بر *L. amazonensis* با نور LED در طول موج ۶۵۰ nm انجام شد، روندی نزولی در تمام غلظت‌ها پس از نوردهی را نشان داد (۳۰). Marcolino و همکاران نیز افزایش مهار رشد انگل با حساس کننده کورکومین به همراه نور LED (طول موج ۴۵۰ nm) بر روی دو گونه پروماستیگوت یعنی *L. braziliensis* و *L. major* با افزایش غلظت را نشان دادند (۱۳). نتایج مطالعه Akilov و همکاران (۳۱) بر روی اثر فتوداینامیک غلظت‌های مختلف حساس کننده فنوتیازین (Phenothiazine) بر روی پروماستیگوت‌های *L. major* با طول موج ۶۶۵ nm نشان داد که بقای انگل با افزایش غلظت ابتدا کاهش چشمگیری پیدا کرد اما سپس با افزایش غلظت از ۱۰۰ μM تا ۱ mM، بقای انگل ثابت ماند (۳۱). یافته‌های پژوهش Aureliano و همکاران بر روی اثر غلظت‌های مختلف MB به همراه طول موج ۶۴۵ nm بر روی پروماستیگوت‌های *L.*

لیزر تنها، تفاوت معناداری در میانگین بقا نشان نداد ($p > 0.05$). همچنین، براساس برازش منحنی بقای حاصل از نوردهی (نمودار ۳) با مدل رگرسیون خطی، IC_{50} حساس کننده ICG پس از نوردهی، ۵۲/۵۵ $\mu\text{g/mL}$ بدست آمد. با توجه به مقادیر IC_{50} بدست آمده از هر دو منحنی بقا، PI محاسبه گردید و عدد ۱۸/۴۴ بدست آمد. این عدد با توجه به تعریفی که پیش تر ارائه گردید، به معنی بروز اثر سمیت نوری است.

بحث و نتیجه گیری

لیشمانیوز جلدی یک معضل بهداشتی مهم در بسیاری از کشورهای جنوب غرب آسیا از جمله ایران است که تظاهرات بالینی متنوعی از ضایعات ساده و منفرد تا ضایعات گسترده دارد. درمان فتوداینامیک یک روش ایمن و موثر برای درمان سالک، با عوارض جانبی قابل تحمل و اثربخشی قابل قبول بوده و پتانسیل بالایی به عنوان یک روش درمانی جایگزین برای سالک دارد.

علیرغم اینکه قله جذب ICG با طول موج لیزر مورد استفاده حدود ۳۰ nm اختلاف داشت، با توجه به اینکه بخشی از طیف جذب ICG با طیف نشر لیزر همپوشانی دارد، از همین طول موج برای مطالعه اثر فتوداینامیک استفاده شد که مطابق با مطالعه دیگر محققان بود (۲۲، ۲۰، ۱۹، ۱۷، ۱۶).

طبق برازش نمودار ۲، IC_{50} حساس کننده ICG در این مطالعه، ۹۶۹ $\mu\text{g/mL}$ بدست آمد که نزدیک به ۸ برابر بالاترین غلظت استفاده شده در این مطالعه است. علت پایین بودن سمیت ICG می‌تواند برداشت (Uptake) اندک آن توسط انگل، به دلیل دافعه الکترواستاتیکی بین این حساس کننده و غشای انگل باشد. چرا که بار الکتریکی ICG و همینطور غشای پروماستیگوت‌ها منفی می‌باشد (۱۵). بنابراین، به نظر می‌رسد که ICG محلول در آب عمدتاً در اطراف غشای سلولی انگل تجمع می‌یابد. لازم به ذکر است این سمیت پایین ICG توسط پژوهشگران دیگر نیز گزارش شد (۲۷، ۱۷).

قابل ذکر است که در گروه بدون ICG، میزان بقا پس از نوردهی با لیزر اندکی کاهش یافت. پیشنهاد شده که سیتوکروم c اکسیداز (Cox) گیرنده اولیه نور در سلول‌های پستانداران است که بیشترین جذب را در

دکتر مهدی حسینی: طراحی و اجرای پژوهش، جمع آوری داده‌ها، تحلیل داده‌ها، نگارش اولیه و ویرایش نهایی مقاله. دکتر حمیدرضا صادقی: تحلیل داده‌ها، بازبینی، اصلاح و تأیید نهایی مقاله. دکتر سید امین موسوی نژاد: ویرایش نهایی و ارائه مقاله به مجله

منابع مالی

کلیه اعتبارات لازم برای اجرای این طرح توسط معاونت بهداشت فراجا تامین شده است.

تعارض منافع

نویسندگان دارای تعارض منافع نمی‌باشند.

منابع

1. Bilgic-Temel A, Murrell DF, Uzun S. Cutaneous leishmaniasis: A neglected disfiguring disease for women. *Int J Womens Dermatol* 2019; 5(3): 158-165.
2. Reithinger R, Dujardin J-C, Louzir H, Pirmez C, et al. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7(9): 581-596.
3. Severino P, Santana W, Lisboa ES, Santos VLSd, et al. Cutaneous/Mucocutaneous Leishmaniasis Treatment for Wound Healing: Classical versus New Treatment Approaches. *Microbiol Res* 2022; 13(4):-836-852.
4. Azim M, Khan SA, Ullah S, Ullah S, Anjum SI. Therapeutic advances in the topical treatment of cutaneous leishmaniasis: A review. *PLoS Negl Trop Dis* 2021; 15(3): e0009099.
5. Ozlem-Caliskan S, Ertabaklar H, Bilgin MD, Ertug S. Evaluation of photodynamic therapy against *Leishmania tropica* promastigotes using different photosensitizers. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2022; 38(4):354-364.
6. Kim H, Lee YR, Jeong H, Lee J, et al. Photodynamic and photothermal therapies for bacterial infection treatment. *Smart Molecules* 2023; 1(1): e20220010
7. Ozlem-Caliskan S, Ilicci-Sagkan R, Karakas H, Sever S, et al. Efficacy of malachite green mediated photodynamic therapy on treatment of Cutaneous Leishmaniasis: In vitro study. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2022; 40: 103111.

amazonensis بیانگر روندی صعودی در میزان بقای انگل با در غلظت $250 \mu\text{M}$ و $100 \mu\text{M}$ بیشتر از $50 \mu\text{M}$ ، پس از نوردی بود (۳۲) که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. Aureliano و همکاران (۳۲) علت این یافته را شیلدینگ نوری غلظت‌های بالای حساس کننده عنوان کردند که از نفوذ نور از میان سوسپانسیون انگل ممانعت می‌کند. اما شاید علت دقیق‌تر این پدیده این باشد که افزایش غلظت رنگینه (بویژه ICG)، باعث کاهش حلالیت رنگینه در آب و در نتیجه افزایش کلوخه شدن (Aggregation) و افزایش نسبت دایمر به مونومر می‌شود. در نتیجه، قله جذب حساس کننده افت می‌کند که متعاقباً باعث کاهش کارایی کوانتومی تولید اکسیژن یگانه می‌شود (۳۳). با توجه به اینکه تا کنون اثر فتوداینامیک ICG بر روی هیچ گونه‌ای از لیشمانیا مورد مطالعه قرار نگرفت، لذا نتایج برخی مطالعاتی که از حساس کننده‌های دیگر برای درمان لیشمانیا استفاده کردند مورد بررسی قرار گرفت.

مطالعه حاضر نشان داد که درمان فتوداینامیک بواسطه ICG می‌تواند گزینه‌ای جدید، ایمن و کم‌هزینه علیه پروماستیگوت‌های لیشمانیا *L. major* باشد و چشم‌انداز مطلوبی برای مطالعات آینده خواهد داشت. با این حال، برای تأیید اثربخشی و مکانیسم خاص PDT برای استراتژی درمان بهینه سالک، تحقیقات بیشتری بصورت برون تنی و درون تنی با حجم نمونه بزرگ و زمان‌های پیگیری طولانی مورد نیاز است.

سپاسگزاری

در پایان از کلیه ی افرادی که در اجرای پژوهش حاضر یاری رساندند، قدردانی می‌شود. همچنین از مرکز تحقیقات فیزیک پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد برای در اختیار قرار دادن آزمایشگاه، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد. این مقاله بخشی از طرح پژوهشی مصوب شماره A-10-1929-1 می‌باشد و منابع مالی آن توسط معاونت بهداشت فراجا تامین شده که بدین وسیله تقدیر و تشکر می‌شود. (کد اخلاق IR.SBMU.TEB.POLICE.REC.1402.077)

نقش نویسندگان

دکتر شیرین جلیلی: مشاوره علمی، نظارت بر طراحی و اجرای پژوهش، بازبینی و تأیید نهایی مقاله

8. Linares IAP, Uría MS, Graminha MAS, Iglesias BA, et al. Antileishmanial activity of tetra-cationic porphyrins with peripheral Pt(II) and Pd(II) complexes mediated by photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2023; 42: 103641.
9. Pinto JG, Fontana LC, de Oliveira MA, Kurachi C, et al. In vitro evaluation of photodynamic therapy using curcumin on *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis*. *Lasers Med Sci* 2016; 31(5): 883-890.
10. de Oliveira de Siqueira LB, da Silva Cardoso V, Rodrigues IA, Vazquez-Villa AL, et al. Development and evaluation of zinc phthalocyanine nanoemulsions for use in photodynamic therapy for *Leishmania* spp. *Nanotechnology* 2017; 28(6): 065101.
11. Navasconi TR, Dos Reis VN, Freitas CF, Pereira PCS, et al. Photodynamic Therapy with Bengal Rose and Derivatives Against *Leishmania amazonensis*. *J Lasers Med Sci* 2017; 8(1): 46-50
12. Escobar P, Vera AM, Neira LF, Velásquez AO, Carreno H. Photodynamic therapy using ultradeformable liposomes loaded with chlorine aluminum phthalocyanine against *L. (V.) braziliensis* experimental models. *Exp Parasitol* 2018; 194: 45-52
13. Marcolino LMC, Pereira AHC, Pinto JG, Mamone LA, Strixino JF. Cellular and Metabolic Changes after Photodynamic Therapy in *Leishmania* Promastigotes. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2021; 35: 102403.
14. Najm M, Pourhajibagher M, Badirzadeh A, Razmjou E, et al. Photodynamic Therapy Using Toluidine Blue O (TBO) Dye as a Photosensitizer against *Leishmania major*. *Iran J Public Health* 2021; 50(10): 2111-2120.
15. Vital-Fujii DG, Baptista MS. Progress in the photodynamic therapy treatment of Leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 2021; 54(12): e11570.
16. Ghorbani F, Attaran-Kakhki N, Sazgarnia A. The synergistic effect of photodynamic therapy and photothermal therapy in the presence of gold-gold sulfide nanoshells conjugated Indocyanine green on HeLa cells. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2017; 17: 48-55.
17. El-Daly SM, Gamal-Eldeen AM, Abo-Zeid MA, Borai IH, et al. Photodynamic therapeutic activity of indocyanine green entrapped in polymeric nanoparticles. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2013; 10(2): 173-185.
18. Shirata C, Kaneko J, Inagaki Y, Kokudo T, et al. Near-infrared photothermal/photodynamic therapy with indocyanine green induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through oxidative stress. *Sci Rep* 2017; 7(1): 13958.
19. Ting C-W, Chou Y-H, Huang S-Y, Chiang W-H. Indocyanine green-carrying polymeric nanoparticles with acid-triggered detachable PEG coating and drug release for boosting cancer photothermal therapy. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2021; 208: 112048.
20. Yan L, Qiu L. Indocyanine green targeted micelles with improved stability for near-infrared image-guided photothermal tumor therapy. *Nanomedicine (Lond)* 2015; 10(3): 361-373.
21. Ara ES, Noghreiyani AV, Sazgarnia A. Evaluation of photodynamic effect of Indocyanine green (ICG) on the colon and glioblastoma cancer cell lines pretreated by cold atmospheric plasma. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2021; 35: 102408.
22. Bilici K, Atac N, Muti A, Baylam I, et al, Sennaroglu A, et al. Broad spectrum antibacterial photodynamic and photothermal therapy achieved with indocyanine green loaded SPIONs under near infrared irradiation. *Biomater Sci* 2020; 8(16): 4616-4625.
23. Mohebbali M, Rezayat M, Gilani K, Sarkar S, et al. Nanosilver in the treatment of localized cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* (MRHO/IR/γΔ/ER): an in vitro and in vivo study. *DARU J Pharm Sci* 2015; 17(4):285-289
24. Sazgarnia A, Zabolinejad N, Layegh P, Rajabi O, et al. Antileishmanial Activity of Liposomal Clarithromycin against *Leishmania Major* Promastigotes. *Iran J Basic Med Sci* 2012; 15(6): 1210-1214.
25. Dolat E, Rajabi O, Salarabadi SS, Yadegari-Dehkordi S, Sazgarnia A. Silver nanoparticles and electroporation: their combinational effect on *Leishmania major*. *Bioelectromagnetics* 2015; 36(8): 586-596.
26. Kim K, Park H, Lim KM. Phototoxicity: Its Mechanism and Animal Alternative Test Methods. *Toxicol Res.* 2015;31:97-104.
27. Hao Y, Chung CK, Gu Z, Schomann T, et al. Combinatorial therapeutic approaches of

- photodynamic therapy and immune checkpoint blockade for colon cancer treatment. *Mol Biomed* 2022; 3(1):26.
28. Huang YY, Chen AC, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose Response* 2009; 7(4): 358-383.
29. Onda N, Kimura M, Yoshida T, Shibutani M. Preferential tumor cellular uptake and retention of indocyanine green for in vivo tumor imaging. *Int J Cancer* 2016; 139(3): 673-682.
30. Song D, Lindoso JA, Oyafuso LK, Kanashiro EH, et al. Photodynamic therapy using methylene blue to treat cutaneous leishmaniasis. *Photomed Laser Surg* 2011; 29(10): 711-715.
31. Akilov OE, Kosaka S, O'Riordan K, Hasan T. Photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis: the effectiveness of topical phenothiaziniums in parasite eradication and Th 1 immune response stimulation. *Photochem Photobiol Sci* 2007; 6(10): 1067-1075.
32. Aureliano DP, Lindoso JAL, de Castro Soares SR, Takakura CFH, et al. Cell death mechanisms in *Leishmania amazonensis* triggered by methylene blue-mediated antiparasitic photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2018; 23: 1-8.
33. Kirchherr A-K, Briel A, Mäder K. Stabilization of Indocyanine Green by Encapsulation within Micellar Systems. *Mol Pharm* 2009; 6(2): 480-491.