

تأثیر هایپر ترمیا در حضور نانوذرات طلا همراه با شیمی‌درمانی روی رده سلولی Saos-2

آمنه سازگاری^{۱*}، محمدحسین بحرینی طوسی^۲، فاطمه حاجی قهرمانی^۳، امید رجبی^۴، سید امیر آل داود^۵، حبیب الله اسماعیلی^۶

۱- استادیار گروه فیزیک پزشکی، مرکز تحقیقات فیزیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۲- استادیار گروه فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۳- کارشناس ارشد فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۴- دانشیار گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۵- استادیار گروه آنکولوژی، بیمارستان امید، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۶- استادیار گروه آمار زیستی، دانشکده پدانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۸۹/۷/۱۰

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۰/۱/۲۵

چکیده

مقدمه: یکی از روشهای کمکی درمان سرطان ایجاد هایپر ترمیا با استفاده از ریزموج، امواج فرسرخ و فراصوت است که همراه با شیوه‌هایی نظیر پرتودرمانی و شیمی‌درمانی می‌تواند سلولهای سرطانی را به بسیاری از درمانها حساس و اثر داروهای ضد سرطان را افزایش دهد. در تحقیق حاضر هایپر ترمیا در تلفیق با شیمی‌درمانی و با واسطه نانوذرات فلزی طلا به منظور انتقال و توزیع سریعتر حرارت در سلولها و ریزموج جهت تولید گرما مورد بررسی واقع شده‌است.

مواد و روشها: پس از کشت و تکثیر رده سلولی Saos-2 مشتق شده از استئوزنیک سارکوما اقدام به تیمار سلولها در حضور دوکسوروبیسین و نانوذرات طلای ۲۰ و ۴۰ نانومتری در دو غلظت گردید و ۴۸ ساعت پس از تابش ریزموج به نمونه‌ها تا دمای ۴۲ درجه سانتیگراد بقی آنها به روش MTT به منظور تعیین اثر هر یک از متغیرهای درمانی ارزیابی شد.

نتایج: میانگین درصد بقاء سلولی در حضور نانوذرات طلا بیش از ۹۵ درصد بود. حضور ذرات ۴۰ نانومتری، بقاء سلولی پس از شیمی‌درمانی را از ۶۲/۸ به ۳۷/۱ درصد کاهش داد. همچنین همیاری شیمی‌درمانی و هایپر ترمیا در غلظت بالاتر از نانوذرات ۲۰ و ۴۰ نانومتری، بترتیب بقاء سلولی ۱۷ و ۴/۱ درصد را بدست داد.

بحث و نتیجه‌گیری: نانوذرات طلا در اندازه و غلظتهای مورد استفاده در این تحقیق موجب بروز سمیت در سلولهای SaOs-2 نشده ولی حضور آنها حین تابش ریزموج تأثیر افزایش بر فرایند مرگ سلولی داشته، بطوریکه توانسته‌است تأثیری قابل مقایسه با دوکسوروبیسین به بار آورد. تابش ریزموج در حضور نانوذرات توانسته بازده درمانی بالاتری را نسبت به شرایط مشابه بدون آنها ایجاد کند. و افزایش غلظت و اندازه نانوذرات موجب بهبود اثر همیاری شیمی‌درمانی و هایپر ترمیا شده‌است. این یافته می‌تواند ناشی از افزایش ورود دوکسوروبیسین به سلولها در حضور نانوذرات طلا باشد. (مجله فیزیک پزشکی ایران، دوره ۸، شماره ۱، پیاپی (۳۰)، بهار ۹۰، ۲۹-۱۹)

واژگان کلیدی: هایپر ترمیا، نانوذرات طلا، شیمی‌درمانی، Saos-2، استئوسارکوما، دوکسوروبیسین

۱- مقدمه

کاهش عوارض جانبی درمانها صورت پذیرفته است. در بسیاری از این روشها می‌توان ردپای نانوفناوری را یافت. مهمترین قابلیت نانوفناوری ساخت مواد با ابعاد نانومتری است. گروهی از این ساختارها که نانوذرات نامیده می‌شوند، حداقل یکی از ابعادشان کمتر از ۱۰۰ نانومتر است و در میان آنها نانوذرات فلزی به دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به فردشان مورد توجه واقع شده [۲] و در زمینه های

سرطان دومین عامل مرگ و میر در جهان می‌باشد [۱] و در سالهای اخیر روشهای نوینی به منظور پیشگیری، درمان و تشخیص آن ابداع و کوششهای فراوانی جهت افزایش بازده و

* نویسنده مسؤول: آمنه سازگاریا

آدرس: گروه فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

sazgarniaa@mums.ac.ir

تلفن ۲۳۲۳ ۸۰۰ (۵۱۱) ۹۸+

سارکوماها جزء بدخیمی‌هایی هستند که به درمان‌های معمول انکولوژیک نسبتاً مقاوم بوده [۷] و کاندیداهای خوبی برای درمان‌های ترکیبی هایپرترمیا و شیمی‌درمانی می‌باشند [۸]. بر اساس مطالعات انجام شده به نظر می‌رسد روش‌های ایجاد هایپرترمیا که به نحوی موجب بروز آثار منفی بر سلول‌های استخوانی می‌شوند، پس از ترمیم و ریکواری سبب تغییر فعالیت مکانیکی بافت استخوانی نیز خواهند شد. در حالیکه با تابش ریزموج به منظور ایجاد هایپرترمیا و ترمیم بافت استخوانی هیچگونه تغییری در خواص مکانیکی آنها به وجود نمی‌آید [۹]. با توجه به این ویژگی در تحقیق حاضر جهت ایجاد هایپرترمیا در یک رده سلولی انسانی مشتق شده از استئوسارکوما از تابش ریزموج در حضور نانوذرات طلا و همیاری شیمی‌درمانی بهره‌گیری شده است. دوکسوروبیسین که یک داروی ضدسرطان و موثر در شیمی‌درمانی سارکوما است [۱۰] و اثر همیاری نسبی با هایپرترمیا دارد [۱۱]، به عنوان داروی شیمی‌درمانی مورد استفاده قرار گرفته است.

۲- مواد و روشها

۲-۱- رده سلولی و شرایط کشت و تکثیر آن

ابتدا رده سلولی انسانی SaOs-2 مشتق شده از استئوسارکوما استخوان از انستیتو پاستور ایران تهیه و درون فلاسک های استریل در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰٪ FBS^۴ و آنتی بیوتیک های استرپتومایسین و پنی سیلین، در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد دی اکسید کربن مورد کشت و تکثیر قرار گرفت. بعد از دو تا سه روز سلول ها به صورت تک لایه کف فلاسک را می پوشانند. بعد از جدا کردن سلول ها از کف فلاسک توسط تریپسین-EDTA، سلول ها شمارش شده و درصد سلول‌های زنده به روش تریپان بلو و با استفاده از لام نئوبار تعیین و آزمایشات طراحی شده بر روی آنها انجام گردید.

مختلفی مورد استفاده قرار گرفته‌اند، زیرا در مقایسه با مواد همجنس خود در ابعاد بزرگ خواص اپتیکی و الکترونیکی متمایزی از خود نشان می‌دهند. نانوذرات مغناطیسی^۱ (MNPs) به عنوان ابزار توانمندی در امور بیولوژی-پزشکی^۲ مختلف بکار برده شده‌اند. در میان مطالعاتی که در آنها از سیستم‌های قابل سنجش در سطح سلولی استفاده شده است، انتقال درون سلولی نانوذرات اکسید آهن (Fe_2O_3) به میزان متوسط توانسته عملکرد سلولی را تحت تأثیر قرار دهد [۳]. خواص اپتیکی و ترموفیزیکی نانوذرات طلا که در موارد مختلف به عنوان کاتالیز، ابزارهای اپتیکی غیر خطی و محیط‌های ذخیره کننده نوری بکار برده شده‌اند، مورد بررسی و بدلیل عدم سمیت آن در پزشکی نیز مورد توجه واقع شده است [۴].

هایپرترمیا نیز به عنوان یک درمان کمکی در سرطان در چهل سال اخیر پیشرفت چشمگیری داشته است. تفاوت رفتار تومورها و بافت نرمال در برابر اعمال گرما بدانه‌ها به شبکه عروقی آنها وابسته است. دمایی که در بازه $42^{\circ}C - 41^{\circ}C$ اعمال شود برای سلول‌های تومور کشنده است در حالیکه به سلول‌های طبیعی آسیب نمی‌رساند. در حقیقت تفاوت اثر درمانی هایپرترمیا بین بافت نرمال و بدخیم اساساً به ساختار شبکه عروقی این دو بستگی دارد و اختلاف در این ساختار در تومورهای مختلف تأثیر بسزایی در رفتار و پاسخ تومورها نسبت به هایپرترمیا دارد [۵].

پیش از این اثر میدان‌های مغناطیسی متغیر و نانوذرات مغناطیسی در ایجاد هایپرترمیا بارها مورد بررسی واقع شده و تنها یک مطالعه تخریب حرارتی موفق سلول‌های سرطانی سیستم معده-روده‌ای^۳ انسانی را پس از تابش مایکروویو در حضور نانوذرات طلا گزارش کرده است [۶]. اما تا کنون ایجاد هایپرترمیا رادیوفرکانسی در حضور نانوذرات طلا و تأثیر آن بر بازده شیمی‌درمانی مورد بررسی قرار نگرفته است.

¹ Magnetic Nanoparticles

² Biomedical

³ gastrointestinal

⁴ FBS (Fetal Bovine Serum)

گروهها و شرایط آزمایشات

آزمایشات سلولی متعددی در نظر گرفته شد تا اثر کلیه متغیرهای درمانی جداگانه و به طور ترکیبی مورد ارزیابی واقع شود. همانطور که در جدول ۱ آمده است، این گروهها شامل کنترل یا شاهد بدون اعمال درمان، تابش ریزموج به سلولها تا دمای ۴۲ درجه سانتی گراد، انکوباسیون سلولها با نانوذرات طلا در دو غلظت و سایزهای ۲۰ و ۴۰ نانومتر، انکوباسیون سلولها با دوکسورویسین، اعمال شیمی درمانی و هایپرترمیا در حضور نانوذرات طلا و در غیاب آن بودند. بدین ترتیب اثر هایپرترمیا با و بدون انکوباسیون سلولها با نانوذرات طلا در هر دو اندازه در حضور و بدون حضور داروی دوکسورویسین مورد بررسی واقع شد که بدین ترتیب تعداد گروههای مورد مطالعه به ۱۹ گروه رسید.

انتخاب زمان تابش ریزموج

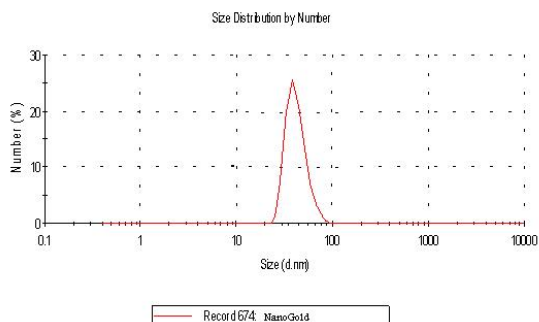
در ابتدا فلاسکهای حاوی ۱۰ میلی لیتر سوسپانسیون سلولی در محیط کشت با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد تحت تابش ریزموج با فرکانس ۲۴۵۰ مگاهرتز از طریق یک مولد ریزموج پاناسونیک مدل NN-ST565W قرار گرفتند و هر ۵ ثانیه تغییر دما توسط یک ترمومتر دیجیتال (APPA51) مجهز به ترموکوپل K-Type با حساسیت ۰/۱°C ثبت می شد با توجه به داده های به دست آمده و تغییر دمای ناشی از تابش ریزموج منحنی تغییرات دما بر حسب زمان رسم و زمان درمان برای تابش ریزموج تا رسیدن نمونه به ۴۲ درجه سانتیگراد ۵۰ ثانیه تعیین شد، لازم به ذکر است که این محدوده ای از درجه حرارت است که سلول قادر است آن را تحمل کند [۵].

دوکسورویسین (آدریامایسین)

در این تحقیق از دوکسورویسین (EBEWE Pharma) Ges.m.b.h.Nfg.KG A- 4866 Unterach (AUSTRIA) با وزن مولکولی ۵۴۳/۵۲ g/M و فرمول شیمیایی C₂₇H₂₉NO₁₁.HCl استفاده شد.

تولید نانوذرات طلا

ابتدا H_{AuCl} در آب با غلظت مولی 0.01 محلول گردید و قدرت یونی و pH آن به ترتیب روی ۰/۰۰۵ مولار و ۷/۸ توسط سیستم بافری فسفات تنظیم شد. یک فاز غیر آبی (تولون C₆H₅CH₃)^۲ حاوی سدیم تترا پرو هیدراید^۳ با غلظت ۰/۰۲ مولار نیز جداگانه آماده گردید. در مرحله بعد هر دو فاز به یکدیگر اضافه و به شدت تکان داده شد. پس از جداسازی فاز آلی، در دمای ۵۰ درجه و تحت فشار کم توسط دستگاه روتاری^۴ حذف حلال گردید و بالاخره ذرات نانوی طلا که در کف ظرف جمع شده بودند در محلول بافر فسفات با قدرت یونی و pH به ترتیب ۰/۰۰۵ مولار و ۷/۶ پراکنده و محلول هموزنی بدست آمد. خصوصیات محلول کلوئیدی فوق شفافیت و رنگ قرمز آن است. در مرحله بعد طیف جذبی نانوذرات طلا تهیه شد. همچنین توزیع فراوانی آنها بر حسب اندازه مشخص گردید [۵]. منحنی توزیع نانوذرات بر حسب اندازه آنها برای ذرات ۴۰ نانومتری برای نمونه در نمودار ۱ مشاهده می شود.



نمودار ۱- منحنی توزیع نانو ذرات بر حسب اندازه آنها (قطر متوسط: ۴۰ نانومتر)

¹ Product Number: 254169
² Product Number: 650579
³ (NabH₄) Sodium borohydride
⁴ Rotary

جدول ۱- شرایط درمان گروههای مورد آزمایش

گروه درمانی	سایز و غلظت نانوذرات طلا				زمان تابش ریزموج (ثانیه)	دوکسوروبیسین (۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر)
	۶۷ میکرومولار	۱۳۴ میکرومولار	۲۰ نانومتر	۴۰ نانومتر		
کنترل	-	-	-	-	-	-
۱	+	-	-	-	-	-
۲	-	+	-	-	-	-
۳	-	-	+	-	-	-
۴	-	-	-	+	-	-
۵	-	-	-	-	۵۰	-
۶	-	-	-	-	-	+
۷	+	-	-	-	-	-
۸	-	+	-	-	۵۰	-
۹	-	-	+	-	-	-
۱۰	-	-	-	+	-	-
۱۱	-	-	-	-	۵۰	+
۱۲	+	-	-	-	-	-
۱۳	-	+	-	-	-	+
۱۴	-	-	+	-	-	-
۱۵	-	-	-	+	-	-
۱۶	+	-	-	-	-	-
۱۷	-	+	-	-	۵۰	+
۱۸	-	-	+	-	-	-
۱۹	-	-	-	+	-	-

روش کار: پس از تریپسینه و شمارش سلولها به روش تریپان - بلو و اطمینان از بقای سلولی بیش از ۹۸٪، سوسپانسیون سلولی با تراکم 6×10^6 cells/ml در محیط کشت آماده و مورد استفاده قرار گرفت. زمان انکوباسیون سلولها با نانوذرات طلا در سایزهای ۲۰ و ۴۰ نانومتر در غلظت ۱۳۴ میکرومولار، ۴۰ دقیقه و با دوکسوروبیسین در غلظت ۲/۵ $\mu\text{g/ml}$ ، ۳۰ دقیقه در نظر گرفته شد [۱۳]. بطوریکه طی ۳۰ دقیقه درمان سلولها با دوکسوروبیسین، نانوذرات طلا نیز در محیط حضور داشتند. سپس کلیه نمونهها با PBS شستشو داده شد. در این مرحله سلولها مجدداً در ۱۰ میلی لیتر محیط کشت کامل سوسپانسیون و پس از رسیدن به دمای ۳۷ درجه سانتی گراد تحت تابش ریزموج در دز تعیین شده قرار گرفت. تابش ریزموج در

فلاسکهای استریل پس از انجام محاسبات مربوط به زمان درمان در گروههای مربوطه انجام گردید. **سنجش بقای سلولی:** پس از انجام درمانهای طراحی شده روی نمونههای مختلف، سلولها در چاهکهای پلیتهای استریل ۹۶ خانه با تراکم سلولی ۵۰۰۰ سلول در هر چاهک تقسیم و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار می گرفت. بقای سلولی و پروليفراسیون آنها بر اساس توانایی میتوکندری در تبدیل MTT^۱ به کریستالهای فورمازان با استفاده از تست ام تی تی ارزیابی گردید. بدین منظور ام تی تی (غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) به هر چاهک حاوی سلول اضافه و پس از ۴ ساعت رسوب سلولی حاصل در DMSO^۲ و بافر گلایسین

^۱ MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a yellow tetrazole)
^۲ DMSO (Dimethyl sulfoxide)

RLS بزرگتر از یک، بیانگر وجود اثر همیاری بین عوامل درمانی و کوچکتر از یک، نشان‌دهنده اثر بازدارندگی در درمان ترکیبی در مقایسه با مجموع آثار انفرادی عوامل درمانی خواهد بود. نسبت فوق در ارتباط با اثر حضور نانوذرات طلا در هایپرترمیا، اثر حضور نانوذرات طلا در شیمی‌درمانی و اثر اعمال هایپرترمیا با نانوذرات طلا در شیمی‌درمانی مورد محاسبه و مقایسه قرار گرفت.

۳- نتایج

در بررسی سمیت نانوذرات طلا آزمایشاتی با استفاده از نانوذرات طلای ۲۰ و ۴۰ نانومتری در غلظتهای ۶۷ و ۱۳۴ میکرومولار و زمان انکوباسیون ۴۰ دقیقه روی رده سلولی SaOs-2 در گروههای ۱ تا ۴ صورت پذیرفت. همانطور که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود میانگین درصد بقاء سلولی در این گروهها بیش از ۹۵ درصد بوده است. سمیت نانوذرات در شرایط بالا در مقایسه با یکدیگر و گروه کنترل معنی‌دار نبوده است.

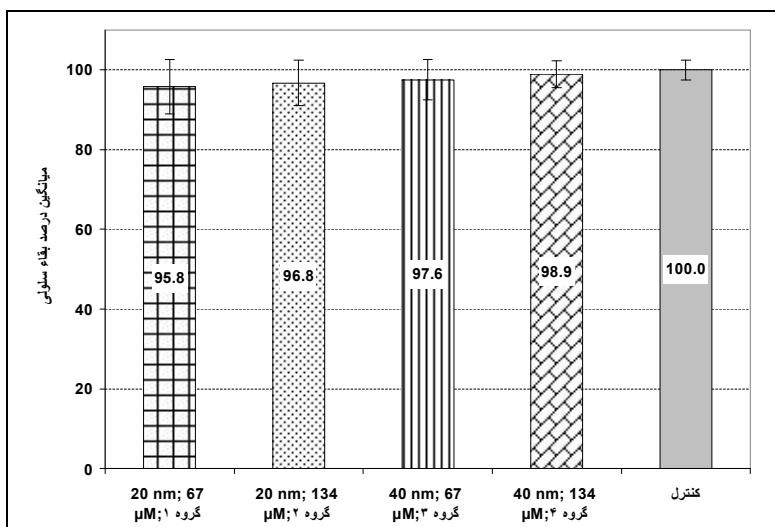
تابش ریزموج در غیاب نانوذرات طلا در گروه ۵ انجام شد (نمودار ۳) و پس از ۴۸ ساعت میانگین بقای سلولی ۸۱/۵ درصد بدست آمد. این گروه نسبت به گروه کنترل اختلاف معنی‌دار نشان داده است ($P < 0/001$).

حل و جذب نوری بلورهای فورمازان تشکیل شده توسط دستگاه الیزاریدر ساخت کمپانی آویرنس مدل ۳۲۰۰ در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری و درصد بقای سلولی هر نمونه در مقایسه با گروه کنترل محاسبه شد. محیط کشت مورد استفاده در این مرحله و انکوباسیون نهایی سلولها حاوی ۱۰ درصد افبی‌اس بود، تا شرایط مناسب برای رشد، بقا و تکثیر سلولها فراهم آید. تمامی آزمایشات با سه بار تکرار و در هر تکرار با ۸ چاهک حاوی نمونه انجام شد.

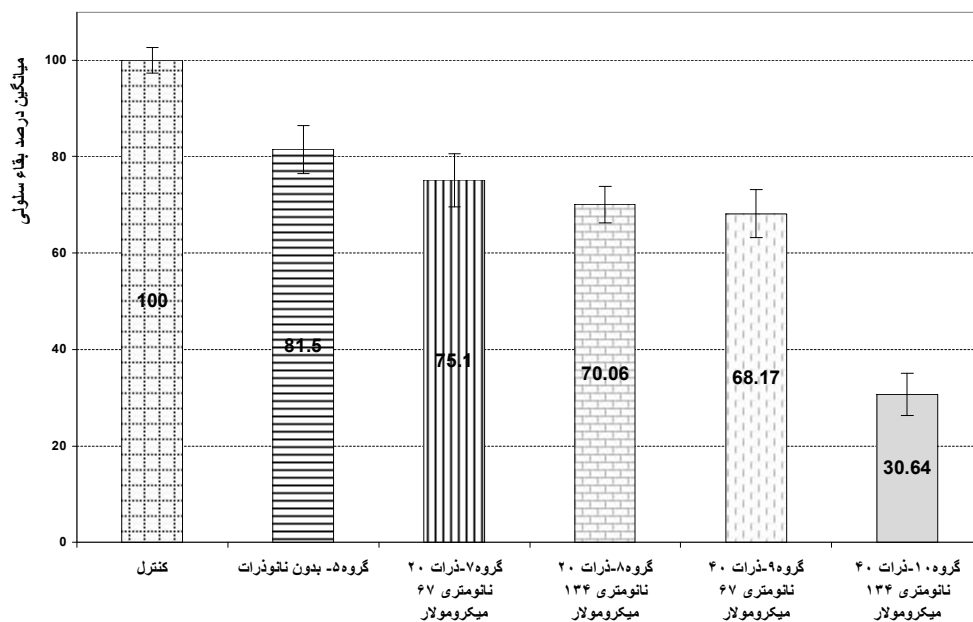
داده‌ها و بررسی کارایی عوامل درمانی: تعیین اثر شرایط درمانی در گروههای مختلف بر مبنای داده‌های درصد بقای سلولی پس از انجام آزمایشات صورت گرفت. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها پس از انجام آزمون نرمالیتی و اطمینان از توزیع نرمال داده‌ها، با استفاده از روش آنالیز واریانس یکطرفه و تست توکی در سطح اطمینان ۹۵ درصد با استفاده از نرم افزار اس پی اس ۱۶ و رسم نمودارها در محیط اکسل ۲۰۰۷ انجام گرفته است. همچنین به منظور تفکیک تاثیر عوامل درمانی و بررسی میزان همیاری آنها با درمانی دیگر، کسری به نام "همیاری کشنده نسبی" به صورت زیر پیشنهاد گردید:

مجموع درصد مرگ سلولی ناشی از تاثیر انفرادی هر یک از عوامل

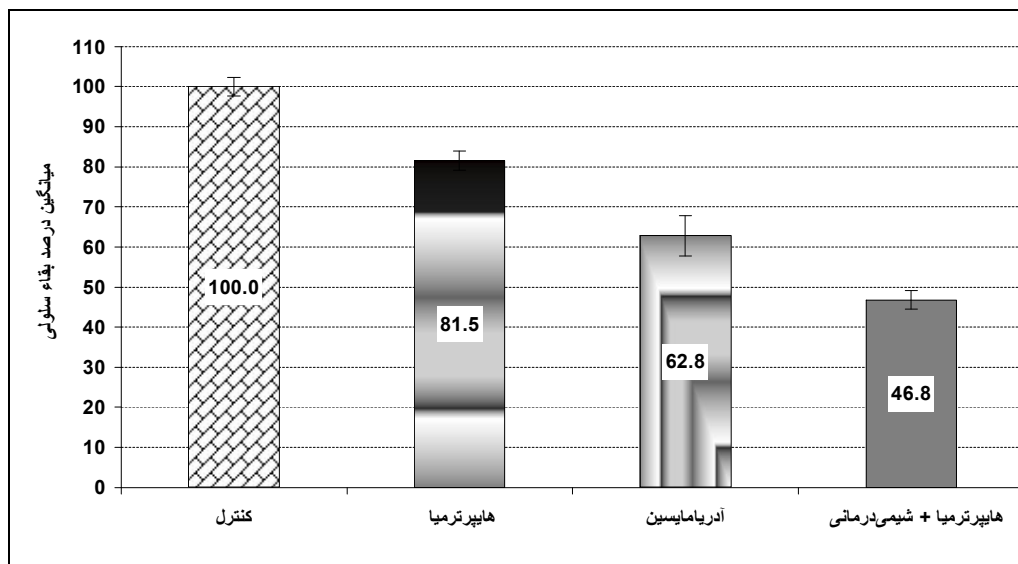
درمانی/درصد مرگ سلولی ناشی از درمان ترکیبی = RLS



نمودار ۲- درصد بقاء سلولی ۴۸ ساعت پس از درمان در گروههای کنترل و دریافت‌کننده نانوذرات طلا (گروههای ۱ تا ۴) - زمان انکوباسیون سلولها با نانوذرات ۴۰ دقیقه - داده‌ها بیانگر میانگین درصد بقای سلولی پس از سه بار تکرار \pm انحراف معیار روی میانگین می‌باشد.



نمودار ۳- درصد بقای سلولی حاصل از سه مرتبه تکرار آزمایشات ۴۸ ساعت پس از درمان هایپرترمیا در حضور و غیاب نانوذرات طلای ۲۰ و ۴۰ نانومتر و غلظت ۶۷ و ۱۳۴ میکرومولار - زمان انکوباسیون سلولها و نانوذرات طلا ۴۰ دقیقه- دادهها بیانگر میانگین درصد بقای سلولی پس از سه بار تکرار \pm انحراف- معیار روی میانگین است.

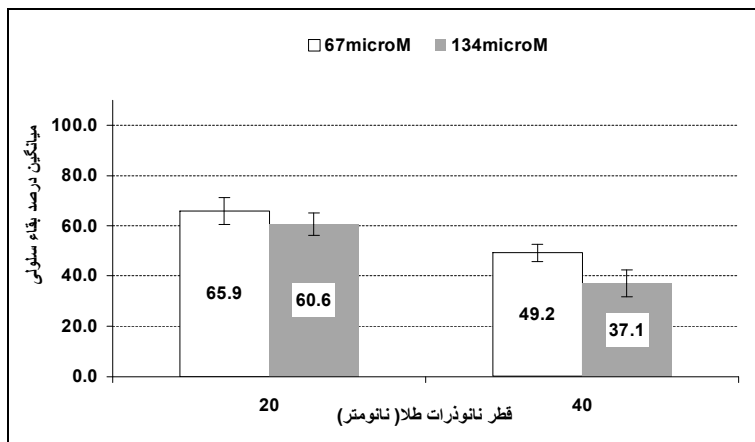


نمودار ۴- درصد بقای سلولی حاصل از سه مرتبه تکرار آزمایشات ۴۸ ساعت پس از هایپرترمیا، شیمی‌درمانی، همیاری هایپرترمیا و شیمی‌درمانی- زمان انکوباسیون با دوکسوروبیسین ۳۰ دقیقه- دادهها بیانگر میانگین درصد بقای سلولی پس از سه بار تکرار \pm انحراف معیار روی میانگین است.

همیاری هایپرترمیا و شیمی‌درمانی در گروه ۱۱ بدون حضور نانوذرات طلا مورد مطالعه قرار گرفت. مقایسه میانگین درصد بقای سلولی در این گروه که نتایج آن نیز در نمودار ۴ درج شده، نسبت به گروه‌هایی که فقط هایپرترمیا یا شیمی‌درمانی شده‌بودند، اختلاف معنی‌داری نشان داده‌است.

داده‌های حاصل از شیمی‌درمانی در حضور نانوذرات طلای ۲۰ نانومتری در دو غلظت مربوط به گروه‌های ۱۲ و ۱۳ در نمودار ۵ نشان داده شده‌است. تفاوت بین گروه‌های ۱۲ با ۱۳ معنی‌دار می‌باشد. ($P = 0/049$) و هر دو گروه نسبت به کنترل ($P < 0/001$)

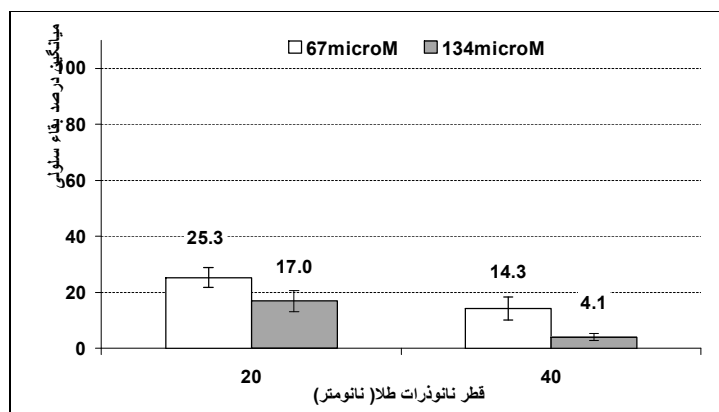
میانگین درصد بقای سلولی بر اساس آزمون MTT، ۴۸ ساعت پس از شیمی‌درمانی در حضور نانوذرات طلای ۲۰ و ۴۰ نانومتر در غلظت‌های ۶۷ و ۱۳۴ میکرومولار-انکوباسیون ۳۰ دقیقه‌ای با دوکسوروبیسین و ۴۰ دقیقه‌ای با نانوذرات طلا- داده‌ها بیانگر میانگین درصد بقای سلولی پس از سه بار تکرار \pm انحراف معیار روی میانگین است.



درصد بقای سلولی ناشی از اعمال شیمی‌درمانی در حضور نانوذرات طلای ۴۰ نانومتری نیز در دو غلظت ۶۷ و ۱۳۴ میکرومولار در گروه‌های ۱۴ و ۱۵ به ترتیب ۴۹/۲ و ۱۷/۱ درصد بدست آمد (نمودار ۵) که در مقایسه با گروه کنترل و گروه‌های مشابه دریافت کننده نانوذرات ۲۰ نانومتری و همچنین گروه دریافت کننده دوکسوروبیسین به تنهایی معنی‌دار ثبت شده‌است ($P < 0/001$).

درمان اصلی که همیاری شیمی‌درمانی و هایپر ترمیا می‌باشد در حضور نانوذرات طلا در دو سایز ۲۰ و ۴۰ و در دو غلظت ۶۷ و ۱۳۴ میکرومولار همراه با دوکسوروبیسین با غلظت ۲/۵ $\mu\text{g/ml}$ همراه با دز تایشی ریزموج در گروه‌های ۱۶ تا ۱۹ مورد بررسی قرار گرفت. در گروه‌های ۱۶ و ۱۷ سلول‌ها هایپر ترمیا با نانوذرات طلای ۲۰ نانومتری را در دو غلظت همراه با شیمی‌درمانی تجربه کردند. داده‌های حاصل از میانگین درصد بقای سلولی در این دو گروه به ترتیب ۲۵/۳ و ۱۷/۰ درصد بوده‌است (نمودار ۶).

نمودار ۶- میانگین درصد بقای سلولی بر اساس نتایج آزمون MTT، ۴۸ ساعت پس از اثر همیاری هایپر ترمیا و شیمی‌درمانی در حضور نانوذرات طلا ۲۰ و ۴۰ نانومتری در غلظت‌های ۶۷ و ۱۳۴ میکرومولار- زمان تابش ریزموج ۵۰ ثانیه -انکوباسیون ۳۰ دقیقه با دوکسوروبیسین و ۴۰ دقیقه با نانوذرات طلا- داده‌ها بیانگر میانگین درصد بقای سلولی پس از سه بار تکرار \pm انحراف معیار روی میانگین است.



۲۵ / مجله فیزیکی پزشکی ایران، دوره ۸، شماره ۱، پیاپی (۳۰)، بهار ۹۰

سلولی ۱/۴ درصد نسبت به گروه‌های کنترل، ۱۰، ۱۱ و ۱۵ اختلاف معنی‌داری نشان داده‌اند ($P < 0/001$). بطوریکه در جدول ۲ مشاهده می‌شود با در نظر گرفتن میزان مرگ سلولی ناشی از هر یک از عوامل دوکسوروبیسین، تابش ریزموج و سمیت نانوذرات طلا درصد مرگ سلولی ناشی از درمان‌های هایپرترمیا، شیمی‌درمانی و درمان ترکیبی هایپرترمیا و شیمی‌درمانی در حضور نانوذرات طلا برآورد شده‌است و نتایج حاصل در کنار داده‌های واقعی قرار گرفته‌اند.

گروه ۱۶ نسبت به گروه‌های کنترل، ۷، ۱۱ و ۱۲، و گروه ۱۷ در مقایسه با گروه‌های کنترل، ۸، ۱۱ و ۱۳ اختلاف معنی‌داری نشان داده‌اند ($P < 0/001$). دو گروه ۱۸ و ۱۹ پس از انکوباسیون با نانوذرات طلای ۴۰ نانومتری در دو غلظت و دوکسوروبیسین با غلظت $2/5 \mu\text{g/ml}$ تحت تابش ریزموج قرار گرفتند. میانگین درصد بقای سلولی در این دو گروه نیز در نمودار ۶ آمده‌است. گروه ۱۸ با درصد بقای ۱۴/۳ در مقایسه با گروه‌های کنترل، ۹، ۱۱، ۱۴ و گروه ۱۹ با بقای

جدول ۲- میزان مرگ سلولی واقعی و پیش‌بینی‌شده درمان‌های ترکیبی در حضور نانوذرات طلا ۲۰ و ۴۰ نانومتری در غلظتهای ۶۷ و ۱۳۴ میکرومولار- زمان تابش ریزموج ۵۰ ثانیه -انکوباسیون ۳۰ دقیقه با دوکسوروبیسین و ۴۰ انکوباسیون ۴۰ دقیقه با نانوذرات طلا

مشخصات نانوذرات طلا	درصد مرگ سلولی برآوردشده براساس تاثیر هر عامل درمانی	درصد مرگ سلولی واقعی	همیاری کشنده نسبی (RLS)
۲۰ نانومتر- ۶۷ میکرومولار	۱۹/۶	۲۴/۹	۱/۲۷
۲۰ نانومتر- ۱۳۴ میکرومولار	۲۰/۹	۲۹/۹	۱/۴۳
۴۰ نانومتر- ۶۷ میکرومولار	۲۱/۷	۳۱/۸	۱/۴۷
۴۰ نانومتر- ۱۳۴ میکرومولار	۲۲/۷	۶۹/۴	۳/۰۶
۲۰ نانومتر- ۶۷ میکرومولار	۳۸/۳	۳۴/۱	۰/۸۹
۲۰ نانومتر- ۱۳۴ میکرومولار	۳۹/۶	۳۹/۱	۰/۹۹
۴۰ نانومتر- ۶۷ میکرومولار	۴۰/۴	۵۰/۸	۱/۲۶
۴۰ نانومتر- ۱۳۴ میکرومولار	۴۱/۴	۶۲/۹	۱/۵۲
۲۰ نانومتر- ۶۷ میکرومولار	۵۶/۸	۷۴/۷	۱/۳۲
۲۰ نانومتر- ۱۳۴ میکرومولار	۵۸/۱	۸۳/۰	۱/۴۳
۴۰ نانومتر- ۶۷ میکرومولار	۵۸/۹	۸۵/۷	۱/۴۶
۴۰ نانومتر- ۱۳۴ میکرومولار	۵۹/۹	۹۵/۹	۱/۶۰

درمان‌های هایپرترمیا، هایپرترمیا در ترکیب با شیمی‌درمانی و شیمی‌درمانی بدست آمده‌است.

۴- بحث و نتیجه گیری

بطور کلی در این تحقیق می‌توان چند محور اصلی را به منظور بحث روی نتایج بدست آمده در نظر گرفت که شامل سمیت یا عدم سمیت نانوذرات طلا بر رده سلولی SaOs-2، تاثیر حضور نانوذرات در ایجاد هایپرترمیای کشنده پس از تابش ریزموج، اثر همیاری نانوذرات طلا با شیمی‌درمانی

بر اساس این نتایج همواره داده‌های واقعی بزرگتر از داده‌های پیش‌بینی‌شده است بجز در مورد نانوذرات ۲۰ نانومتری در غلظت ۶۷ میکرومولار. این امر بیانگر وجود یک اثر همیاری بین این عوامل درمانی می‌باشد که جهت مقایسه آن می‌توان از نسبت RLS استفاده کرد. مقادیر کسر اخیر نیز در جدول ۲ درج شده‌است. بیشترین اثر همیاری در حضور نانوذرات طلای ۴۰ نانومتری با غلظت ۱۳۴ میکرومولار بترتیب در

تأثیر در مورد نانوذرات طلا^{۴۰} نانومتری مشهودتر است. به هر حال می توان گفت افزایش قطر و غلظت نانوذرات موجب بهینه شدن اثر هایپر ترمیا بر روی رده سلولی SaOs-2 می شود، ولی اثر مذکور با افزایش اندازه نانوذرات بیشتر به چشم می خورد. تشدید اثر هایپر ترمیا در حضور نانوذرات طلا و امواج رادیوفرکانسی در غلظت ۶۷ میکرومولار توسط گانون و همکارانش در سال ۲۰۰۷ روی بدخیمی های معدی-روده ای انسانی نیز تایید شده است [۶].

مقایسه نتایج حاصل از تلفیق هایپر ترمیا با شیمی درمانی نشان می دهد که ایجاد هایپر ترمیا در حضور نانوذرات طلا توانسته است بازده درمانی بالاتری را نسبت به شرایط مشابه بدون نانوذرات به بار آورد و افزایش غلظت و اندازه نانوذرات موجب بهبود اثر همیاری شیمی درمانی و هایپر ترمیا شده است. پیش بینی می شود این یافته ناشی از ورود بیشتر دوکسوروبیسین به سلولها باشد که با حضور نانوذرات طلا تسهیل شده است. همچنین تاثیر افزایشده هایپر ترمیا می تواند به دلیل حضور نانوذرات فلزی در سلول حین تابش ریزموج و بالارفتن دما و تشدید فرایند مرگ سلولی باشد.

نتیجه اخیر در شرایطی ثبت شده که اثر هایپر ترمیا کمک مشهودی به افزایش بازده شیمی درمانی در غیاب نانوذرات نکرده است. این نتیجه در مقایسه با گزارشات هان و همکارانش در سال ۱۹۷۵ مغایرت دارد [۱۹]. دلیل این تفاوت را می توان مربوط به اختلاف در پروتکل درمانی دانست. از آنجاکه در مطالعه حاضر تابش ریزموج زمانی انجام شده که داروی شیمی درمانی از محیط کشت سلولها شسته شده بوده- است، در نتیجه هایپر ترمیا نمی توانسته تاثیری در حساس سازی غشاء و افزایش تراوایی آن جهت نفوذ بیشتر دارو به درون سلولها ایجاد کند.

موضوع قابل بحث دیگر، کاهش RLS است در نمونه هایی که در حضور نانوذرات، شیمی درمانی و هایپر ترمیا را تجربه کرده اند در مقایسه با آنهایی که با حضور نانوذرات فقط هایپر ترمیا یا شیمی درمانی شده اند. اگر فرضیه تسهیل ورود دوکسوروبیسین به سلولها در حضور نانوذرات را بپذیریم

توسط دوکسوروبیسین و همیاری شیمی درمانی و هایپر ترمیای ریزموج و تاثیر حضور نانوذرات طلا در این همیاری می باشد. از آنجا که بیش از ۹۵ درصد از سلولهای SaOs-2 در حضور نانوذرات طلا بقای خود را حفظ کرده اند، عدم سمیت نانوذرات طلا در اندازه و غلظتهای مورد استفاده در این تحقیق تایید شده و می توان گفت افزایش اندازه و غلظت نانوذرات موجب بروز سمیت سلولی در رده سلولی SaOs-2 نشده است. این نتیجه با گزارشات هینفیلد^۱ و همکاران در سال ۲۰۰۴، مطالعه موخر جی^۲ و همکاران با نانوذرات ۵ نانومتری در سال ۲۰۰۵ و گزارش گانون و همکارانش در سال ۲۰۰۷ مطابقت دارد [۱۶-۱۴]. در تحقیق مشابه دیگری نیز از نانوذرات طلا به عنوان نانوذراتی امن و بدون خطر در درمان یاد شده است [۱۷].

مشاهده می شود انکوباسیون همزمان دوکسوروبیسین و ذرات طلا^{۴۰} نانومتری توانسته است موجبات مرگ سلولی بیشتری را در مقایسه با شیمی درمانی به تنهایی فراهم نماید. چنانچه این اثر ناشی از تسهیل ورود دوکسوروبیسین با حضور نانوذرات طلا باشد، به نظر نمی رسد نانوذرات ۲۰ نانومتری نقش چندانی در ورود بیشتر دوکسوروبیسین به درون سلول داشته باشند. بیشترین تأثیر در ورود دوکسوروبیسین به سلولها در حضور ذرات طلا^{۴۰} نانومتری در غلظت بالاتر ثبت شده است. اهمیت یافته اخیر در آنست که دویکا چیدرانی^۳ و همکارانش بیشترین جذب^۴ نانوذرات طلا^{۱۰} تا ۱۰۰ نانومتر را در سلولهای پستانداران در سایز ۴۰ نانومتر ثبت کرده اند [۱۸].

همچنین مرگ سلولی ناشی از تابش ریزموج با حضور نانوذرات تشدید شده و افزایش قطر یا غلظت نانوذرات، مرگ سلولی حاصل از هایپر ترمیا را افزایش داده است. اگر چه نانوذرات ۲۰ نانومتری با غلظت بالاتر باعث افزایش مرگ سلولی و در نتیجه افزایش بازده هایپر ترمیا شده اند، اما این

¹ Hainfeld et al.

² Mukherjee et al.

³ Devika Chithrani

⁴ Uptake

بیشتر شده باشد. به هر حال قبول یا رد فرضیه اخیر و تعیین مکانیسم مرگ سلولی در حضور عوامل فوق موضوع مطالعات بعدی ما خواهد بود.

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان از حوزه معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد که حمایت مالی این تحقیق را پذیرفتند، قدردانی و تشکر می‌نمایند. این مقاله حاصل پایان‌نامه دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیک پزشکی می‌باشد.

شاید این تسهیل ناشی از چسبیدن نانوذرات به مولکولهای دوکسوروبیسین بوده باشد. به عبارت دیگر اتصال مذکور - توانسته از طرفی موجب افزایش ورود دوکسوروبیسین و از طرف دیگر کاهش غلظت نانوذرات طلای آزاد در محیط و در نتیجه کاهش تراکم نانوذرات طلا در درون سلولها شده - باشد. بدین ترتیب در هیچیک از گروههایی که در حضور نانوذرات، شیمی درمانی و هایپرترمیآ شده‌اند، در مقایسه با گروههای مشابه دریافت‌کننده یکی از دو درمان، افزایش RLS ثبت نشده است. با توجه به کاهش چشمگیر تر RLS در حضور ذرات ۴۰ نانومتری در غلظت بالاتر، بنظر می‌رسد با افزایش قطر و غلظت نانوذرات میزان اتصال پیش‌بینی شده

منابع

1. ACS: Statistics for 2008. 2008. Available at: http://www.cancer.org/docroot/STT/STT_0.asp. Accessed June 24, 2008.
2. Shuford K, Schatz G. Optical Properties of Gold Nanospheres. *Nanoscape*. 2005 Spring; 2(1):27-33.
3. Sumer B, Gao J. Theranostic nanomedicine for Cancer. *Nanomedicine (Lond)*. 2008 Apr; 3(2):137-40.
4. Ortega MA, Rodriguez L, Castillo J, Piscitelli V, Fernandez A, Echevarria L. Thermo-optical properties of gold nanoparticles in colloidal systems. 2008; *J Opt A: Pure Appl Opt*. 2008; 10(10):104024. doi:10.1088/1464-4258/10/10/104024.
5. Hall EJ, Giaccia AJ. *Radiobiology for the Radiologist*. 6nd ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
6. Gannon CJ, Patra CR, Bhattacharya R, Mukherjee P, Curley SA. Intracellular gold nanoparticles enhance non-invasive radiofrequency thermal destruction of human gastrointestinal cancer cells. *J Nanobiotechnology*. 2008 Jan 30; 6:2.
7. Kawai H, Minamiya Y, Kitamura M, Matsuzaki I, Hashimoto M, Suzuki H, et al. Direct Measurement of Doxorubicin Concentration in the Intact, Living Single Cancer Cell during Hyperthermia. *Cancer*. 1997 Jan; 79(2):214-9.
8. Tsukiyama I, Ogino T, Egawa S. Hyperthermia for bone and soft tissue sarcoma: relationship between computerized tomographic and histological findings. *Radiat Med*. 1994 Sep-Oct; 12(5):231-6.
9. Liebergall M, Abu-Sneineh CH, Eylon S, Mendelson S, Segal D, Simkin A. Effect of microwave oven induced mild hyperthermia on bone viability and strength. *Clin Orthop Relat Res*. 2000 Mar ;(372):272-9.
10. Nielsen OS, Dombernowsky P, Mouridsen H, Daugaard S, Van Glabbeke M, Kirkpatrick A, Verweij J. Epirubicin is not superior to Dox in the treatment of advanced soft tissue sarcomas. The experience of the EORTC soft tissue and bone sarcoma group. *Sarcoma*. 2000 March; 4(1-2): 31-35.
11. Sakaguchi Y., Maehara Y., Emi Y., Kohnoe S., Sugimachi K. Adriamycin Combined with Hyperthermia and Dipyridamole Is Cytotoxic both in vitro and in vivo. *Eur Surg Res*. 1992; 24(4): 249-56.
12. Wieder ME, Hone DC, Cook MJ, Handsley MM, Gavrilovic J, Russell DA. Intracellular photodynamic therapy with photosensitizer- nanoparticles conjugates: cancer therapy using a Trojan horse. *Photochem. Photobiol. Sci*. 2006 Aug; 5(8): 727-34.

13. Sazgarnia A, Bahreyni-Toosi MH, Valizadeh M, Homaei F, Esmaily H. Relative Electroporability and Electric Pulse Effectiveness in Human Breast Adenocarcinoma: An in vitro Study. *Iranian J of Medical Sciences*. 2008; 11(2): 97-103.
14. Hainfeld JF, Slatkin DN, Smilowitz HM. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Phys Med Biol*. 2004; Sep 21; 49(18):309.
15. Jordan A, Scholz R, Maier-Hauff K, van Landeghem FK, Waldoefner N, Teichgraeber U, Pinkernelle J, Bruhn H, Neumann F, Thiesen B, von Deimling A, Felix R. The effect of thermotherapy using magnetic nanoparticles on rat malignant glioma. *J Neurooncol*. 2006 May; 78(1):7-14.
16. Mukherjee P, Bhattacharya R, Wang P, Wang L, Basu S, Nagy JA, Atala A, Mukhopadhyay D, Soker S. Antiangiogenic properties of gold nanoparticles. *Clin Cancer Res*. 2005 May; 11(9):3530-4.
17. Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy CJ, Wyatt MD. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small*. 2005 Mar; 1(3):325-7.
18. Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WC. Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Lett*. 2006 Apr; 6(4):662-8.
19. Hahn GM, Braun J, Har-Kedar I. Thermochemotherapy: Synergism between Hyperthermia (42-43°C) and Adriamycin (or Bleomycin) in Mammalian Cell Inactivation. *Proc Nat Acad Sci U S A*. 1975 March; 72(3):937-40.