

Effect of Gold Nanoparticles Conjugated with Folic Acid on the Absorption and Radiosensitization of Cervical Cancer Cells Under 6 MV Photon Irradiation

Bahare Amini Kadijani¹,
Bijan Hashemi²,
Seied Rabi Mahdavi³,
Masoud Soleimani⁴

¹ PhD in Medical Physics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

² Associate Professor, Department of Medical Physics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

³ Associate Professor, Department of Medical Physics, Faculty of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴ Professor, Department of Hematology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

(Received April 8, 2023 ; Accepted June 7, 2023)

Abstract

Background and purpose: Radiation therapy is one of the most important methods in treatment of cancer. Targeted metal nanoparticles (NPs) play an effective role in reducing ionizing radiation side effects through increasing the effect of ionizing radiation on cancer cells and controlling the harmful effect of radiation on healthy cells. The purpose of this study was to investigate the effect of targeted folic acid gold NPs (GNPs) using linker bovine serum albumin in the absorption and sensitivity of gold NPs in HeLa cervical cancer cells compared to non-targeted gold NPs.

Materials and methods: In this study, GNPs were conjugated with folic acid by bovine serum albumin as the linker. The binding of bovine serum albumin and folic acid to GNPs was investigated by infrared (IR) spectroscopy. Toxicity was measured by the MTT method and based on the results, the GNPs' non-toxic concentration was determined. The effect of targeted synthesized GNPs on their absorption and sensitivity were evaluated on HeLa cells.

Results: The non-toxic concentration of GNPs was 12 µg/ml. Incubation of the cells with this concentration was performed for 2, 4, and 24 hours and it was observed that in 4 hours, the absorption rate of targeted GNPs was about 4 times higher than that of non-targeted GNPs. The radiosensitization ratios of targeted and non-targeted GNPs in the studied cancer cells relative to the control group (without NPs) exposed to 6 MV photon radiation were 1.32 ± 0.02 and 1.19 ± 0.02 , respectively.

Conclusion: The use of bovine serum albumin linker to target GNPs has a significant effect on increasing the absorption of GNPs and the effect of ionizing radiation on HeLa cells under 6 MV photon beams.

Keywords: radiation therapy, radiation sensitizers, targeted radiotherapy, gold nanoparticles (GNPs), cervical cancer

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 33 (222): 15-30 (Persian).

Corresponding Author: Bijan Hashemi - Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
(E-mail: bhashemi@modares.ac.ir)

تاثیر نانوذرات طلاي کانتروگه شده با اسيد فوليك بر جذب و حساس‌کنندگي پرتوي سلول‌هاي سرطاني دهانه رحم تحت تابش فوتون‌هاي 6 مگاولتي

بهاره اميني کاديچاني¹

بيژن هاشمي²

سيد ربيع مهدي³

مسعود سليماني⁴

چکیده

سابقه و هدف: پرتودرمانی یکی از مهم‌ترین روش‌های درمان سرطان است. استفاده از نانوذرات فلزی هدفمند با افزایش اثر پرتوهای یونیزان بر سلول‌های سرطانی و کنترل اثر زیانبار پرتو بر سلول‌های سالم، عاملی موثر در کاهش عوارض جانبی پرتودرمانی است. هدف این مطالعه بررسی اثر هدفمندی نانوذرات طلاي کانتروگه شده با اسيد فوليك توسط لینکر آلبومین سرم گاوی در جذب و حساس‌کنندگي نانوذرات طلا در سلول‌های سرطاني HeLa در مقایسه با نانوذرت طلاي غيرهدفمند است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، نانوذرات طلا توسط لینکر آلبومین سرم گاوی با اسيد فوليك کانتروگه شده. اتصال آلبومین سرم گاوی و اسيد فوليك به نانوذرات طلا با روش طيف سنجي فروسرخ بررسی شد. سنجش سمیت‌زایی با روش MTT انجام گرفت و بر اساس آن غلظت غیرسمی نانوذرات به دست آمد. سپس اثر نانوذرات هدفمند سنتز شده بر میزان جذب و حساس‌کنندگي آن‌ها بر روی سلول‌های HeLa ارزیابی شد.

یافته‌ها: غلظت غیر سمی نانوذرات برابر $12 \mu\text{g/ml}$ به دست آمد. انکوباسیون سلول‌ها با این غلظت نانوذرات به مدت 2، 4 و 24 ساعت انجام گرفت و مشاهده شد در 4 ساعت میزان جذب نانوذرات هدفمند به چهار برابر میزان جذب نانوذرات غیرهدفمند می‌رسد. نسبت حساس‌کنندگي نانوذرات هدفمند و غیر هدفمند در سلول‌های مورد مطالعه تحت تابش فوتون‌های 6 مگاولتي به گروه کنترل (بدون نانوذرات) به ترتیب $1/32 \pm 0/02$ و $1/19 \pm 0/02$ به دست آمد.

استنتاج: استفاده از لینکر آلبومین سرم گاوی برای هدفمند سازی نانوذرات طلا در افزایش جذب نانوذرات طلا و افزایش اثر پرتوی یونیزان بر سلول‌های HeLa تحت تابش فوتون‌های 6 مگاولتي تاثیر محسوس دارد.

واژه‌های کلیدی: پرتودرمانی، حساس‌کننده‌های پرتوی، درمان هدفمند، نانوذرات فلزی، سرطان دهانه رحم

مقدمه

می‌تواند با روش‌های جراحی، درمان سیستمیک (نظیر شیمی درمانی، سیستم ایمنی درمانی، درمان هورمونی)، پرتودرمانی، پیوند مغز استخوان، سلول درمانی و یا ترکیبی از این‌ها انجام شود.

سرطان یا تومور بدخیم به گروه بزرگی از بیماری‌ها اطلاق می‌شود که تقریباً می‌تواند از تمامی اندام‌ها و بافت‌های بدن آغاز شود و سلول‌های غیرطبیعی به صورت غیرقابل‌کنترلی رشد و تکثیر شوند. درمان سرطان

E-mail: bhashemi@modares.ac.ir

مؤلف مسئول: بیژن هاشمی - تهران بزرگراه آل احمد، کوی نصر، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی

1. دکتری تخصصی فیزیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

2. دانشیار، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

3. دانشیار، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

4. استاد، گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 1402/1/19 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1402/3/10 تاریخ تصویب: 1402/3/17

در پرتودرمانی (Radiotherapy) با تابش پرتوهای یونیزان پرتو به یک تومور یا هدف مورد نظر، سعی در درمان/کنترل سرطان می‌شود. در پرتودرمانی با تحویل دوز دقیقی از پرتوهای یونساز برای آسیب زدن/نابودی سلول‌های سرطانی یا توقف توانایی تولیدمثل و رشد و تکثیر غیرقابل کنترل آن‌ها استفاده می‌شود. محدودیت کنترل دقیق موضع تحویل دوز در داخل بدن و احتمال نفوذ پرتو به بافت‌های سالم از چالش‌های مستمر این روش درمانی بوده است. برای غلبه بر این چالش‌ها استراتژی‌های متعددی در نظر گرفته شده است. یکی از این روش‌های مورد توجه برای مقابله و رفع این چالش‌ها در سال‌های اخیر، استفاده از تصاویر عملکردی/فانکشنال برای شناسایی/تشخیص دقیق و کنترل تومورهای ناهمگن و استفاده از دوز غیریکنواخت برای درمان و کنترل بیش‌تر این نوع تومورها بوده است (2،1). هم‌چنین ترکیب پروتکل‌های متفاوت تابش‌دهی در رادیوتراپی برای انطباق بیش‌تر دوز بر بافت تومورال و حفظ و کاهش/جلوگیری از قرارگیری بافت سالم در معرض تابش یکی دیگر از راهبردهای مورد توجه و تحقیق در رادیوتراپی است (3،4). در این راستا استفاده از حساس‌کننده‌های پرتوی نظیر نانوذرات طلا در ترکیب با هایپرترمی نتایج امیدوارکننده و مثبتی به همراه داشته است (5). علاوه بر این‌ها، مطالعات اخیر سلولی در زمینه کاربرد نانوذرات اکسید هافنیوم به‌عنوان یک حساس‌کننده پرتوی جدید و آزمایش‌های پیش‌بالینی مرتبط زمینه ورود این نانوذرات را به پروتکل‌های معمول در درمان سلول‌های سرطانی در رادیوتراپی بالینی فراهم کرده است (6،7). حساس‌کننده‌های پرتوی به‌طور عام مولکول‌ها و موادی هستند که بتوانند به‌طور انتخابی جذب انرژی پرتوی یونیزان در سلول‌های سرطانی را افزایش دهند. نانو ساختارها و به‌طور خاص نانومواد فلزی با عدد اتمی بالا مانند طلا به دلیل خواص منحصر بفرد نانومواد، در سال‌های اخیر جایگاه ویژه‌ای در میان حساس‌کنندگی پرتوی یافته‌اند (8،9). نانوذرات طلا به دلیل زیست سازگاری و خواص فیزیکی

و شیمیایی منحصر بفرد خود بسیار مورد توجه قرار دارند. فرآیند تاثیر نانوذرات طلا بر افزایش اثر پرتو بر سیستم‌های بیولوژیکی به طور کلی از سه جنبه فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی مورد بررسی قرار گرفته است (10،11). مشخصات و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نانوذرات به کار گرفته شده بر پاسخ بیولوژیکی سلول‌ها، جذب سلولی و برهم‌کنش نانوذرات با پرتوهای یونیزان موثر است. از بین ویژگی‌های مختلف، نوع پوشش نانوذرات می‌تواند برای هدف قرار دادن انتخابی سلول‌های تومور در بدن استفاده شود. استراتژی‌های هدفمندسازی که برای فراهم آوردن غلظتی کافی از نانوذرات در سلول‌های تومور به کار گرفته می‌شوند به دو دسته تقسیم می‌شوند: هدفمندسازی منفعل و فعال. در هدفمندسازی منفعل، نانوذرات از جذب اندوسیتیک بالاتر سلول‌های سرطانی و عروق نشستی اطراف تومورها سود می‌برند و این ویژگی باعث جذب بیش‌تر نانوذرات در سلول‌های سرطانی نسبت به بافت‌ها و سلول‌های سالم می‌شود (12)، در حالی که در هدفمندسازی فعال، نانوذرات را با استفاده از مولکول‌های ویژه‌ای دارای عملکردی اختصاصی می‌کنند تا با گیرنده‌های شناخته شده‌ای برهم‌کنش کنند که در سطح سلول‌های سرطانی به‌صورت انتخابی حضور دارند (13). به عبارت دیگر هدفمندسازی فعال مستلزم اتصال مولکول‌های دیگری به سطح نانوذرات است که وابستگی خاصی برای تعامل با بافت‌های سرطانی داشته باشند. انگیزه اصلی چنین فرآیندی استفاده از پتانسیل هدفمندسازی فعال نانوذرات برای افزایش تجمع نانوذرات در سلول و بافت هدف و عدم اتکای صرف به جذب منفعل از طریق اثر EPR (Enhanced Permeability and Retention effect) است (14). این امر توسط مولکول‌هایی مثل آنتی‌بادی‌ها، پپتیدها، فولات، آپتامر، هورمون‌ها و مولکول‌های گلوکز انجام پذیرفته است (15،16). از میان این مولکول‌ها، فولات عامل هدفمند ساز مناسبی به‌دلیل پایداری، عدم ایمنی‌زایی، اختصاصی بودن برای سلول سرطانی و

است. هم‌چنین اثر حساس‌کنندگی آن نسبت به نانوذرات غیرهدفمند مطالعه نشده است. Gao و همکاران (20)، اثر حساس‌کننده‌های نانومیله‌های طلائی هدفمند شده با اسید فولیک به واسطه لینکرسیلیس را بر روی سلول‌های HepG2 تحت تابش I-125 نشان دادند. Huang و همکاران (21) برای هدفمند نمودن نانومیله‌های طلا با اسید فولیک از لینکر سیلیس استفاده نمودند. آن‌ها اثر حساس‌کنندگی پرتوی نانومیله‌های طلا را بر روی سلول‌های MGC803 تحت تابش پرتوی الکترونی بررسی کردند.

جمع‌بندی پیشینه پژوهش و بررسی مطالعات مختلف نشان می‌دهد که هدفمند نمودن نانوذرات طلا با شکل‌های هندسی متفاوت و از طریق کانژوگاسیون با فولیک اسید توسط لینکرهای مختلف انجام شده و در پرتودرمانی استفاده شده است، اما اثر استفاده از غلظت ایمن نانوذرات هدفمند شده به واسطه لینکر BSA که پروتئین در دسترس، زیست‌سازگار و فراوانی است، بر افزایش جذب نانوذرات هدفمند نسبت به غیر هدفمند و حساس‌کنندگی پرتوی این نانوذرات در سلول‌های HeLa تحت تابش فوتون‌های 6MV تاکنون بررسی نشده که جنبه برجسته‌ای از نوآوری مطالعه حاضر است. همان‌طور که بیان شد سلول‌های سرطانی HeLa سطح بالایی از گیرنده‌های اسید فولیک دارند. این ویژگی سلول‌های HeLa آن‌ها را قادر می‌سازد تا از مزیت جذب بیش‌تر نانوذرات هدفمند شده با اسید فولیک برخوردار شوند. بنابراین هدف عمده این مطالعه کانژوگاسیون نانوذرات طلا با اسید فولیک توسط ماده BSA، تعیین غلظت غیر سمی IC_{10} (10 درصد Inhibitory Concentration) آن و مقایسه با غلظت غیر سمی نانوذرات طلائی غیرهدفمند بوده است. هم‌چنین بررسی اثر نانوذرات هدفمند شده مذکور با اسید فولیک به واسطه لینکر BSA در افزایش جذب نانوذرات در سلول و افزایش اثر حساس‌کنندگی پرتویی سلول‌های HeLa تحت تابش پرتوهای 6 MV هدف دیگر مطالعه ما بود، که می‌تواند در پرتودرمانی سرطان دهانه رحم مورد استفاده قرار گیرد.

ترکیب شیمیایی ساده آن است. برخی از سلول‌های سرطانی که به سرعت تقسیم می‌شوند، سطوح گیرنده‌های فولات را افزایش می‌دهند تا نیاز افزایش یافته فولات برای سنتز DNA و رشد سریع سلول‌ها را برآورده کنند، که اساس استراتژی‌های هدف‌گیری آن‌ها فولات است. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که تومورهای سر و گردن، دهانه رحم و تخمدان، مدل‌های مناسبی برای مطالعات هدف‌گیری فولات هستند (17). روی غشای سلولی سلول‌های HeLa در سرطان دهانه رحم گیرنده‌های فراوانی برای اسید فولیک وجود دارد. با پیوند زدن نانوذرات یا هر عامل درمانی دیگر به اسید فولیک می‌توان از مزایای درمان هدفمند سلول‌های سرطانی HeLa بهره برد. استفاده از نانوذرات طلائی کانژوگه شده با اسید فولیک در چندین مطالعه بر روی سلول‌های سرطانی بررسی شده است. در یک مطالعه برای اتصال اسید فولیک به نانوذرات طلا لینکر 4-Aminophenol به کار گرفته شده است (18). در این مطالعه غلظت غیرسمی نانوذرات هدفمند سنتز شده بر روی سلول‌های HeLa در حدود $50\mu\text{M}$ گزارش شده، در حالی که غلظت غیرسمی نانوذرات هدفمند نشده که به همان روش سنتز شده‌اند حداقل برابر $100\mu\text{g/ml}$ بوده و هدفمند نمودن نانوذرات طلا به روش انجام شده در مطالعه مذکور سمیت نانوذرات را به مقدار زیادی بالا برده است. ولی اثر حساس‌کنندگی این نانوذرات در دوزهای مختلف تحت تابش فوتون‌های 6MV معمول در پرتودرمانی سرطان دهانه رحم بررسی نشده است. در یک مطالعه دیگر نانو کلاسترهای طلا توسط لینکر آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin:BSA) کانژوگه شده‌اند (19). در این مطالعه از غلظت غیر ایمن $160\mu\text{g/ml}$ نانوذرات در سلول‌های C6 استفاده شده و ضریب افزایش دوز پرتویی در مجاورت سلول‌های مورد مطالعه بدست آمده است. اما اثر این لینکر در میزان تغییر در غلظت غیرسمی نانوذرات هدفمند و اثر آن در افزایش جذب توسط سلول نسبت به نانوذرات غیر هدفمند مورد بررسی قرار نگرفته

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ابتدا غلظت غیرسمی (IC_{10}) دو نوع نانوذرات طلا تعیین شد. سپس برای بررسی و مقایسه میزان جذب نانوذرات هدفمند و غیرهدفمند با یک غلظت مساوی غیرسمی از هر دو نوع برای انکوباسیون سلولی استفاده شد. با این روش توانستیم پی ببریم که کدام یک از انواع نانوذرات در جذب آن‌ها توسط سلول‌های مورد نظر بر دیگری برتری دارد. در نهایت نسبت حساس‌کنندگی پرتوی نانوذرات هدفمند با نانوذرات غیرهدفمند با همان غلظت انکوباسیون یکسان از طریق تعیین کمیت SER (Sensitizing Enhancement Ratio) مقایسه شد. این کمیت (نسبت افزایش حساسیت) از متوسط دوز غیرفعال کننده منحنی بقای سلولی بدون نانوذره به متوسط دوز غیر فعال کننده منحنی بقای سلولی با نانوذره به دست آمد.

نحوه کشت سلول

ابتدا سلول‌های فریز شده را به آرامی از انجماد خارج کردیم. سپس یک میلی‌لیتر از سلول‌های دفریز شده را در فالكون حاوی 3 میلی‌لیتر محیط کشت کامل (بر پایه DMEM و شامل 10 درصد FBS) ریختیم و به مدت 5 دقیقه با شتاب 300 سانتیفریوژ کردیم. پس از سانتیفریوژ که سلول‌ها در پایین لوله فالكون ته نشین می‌شوند، محیط رویی را دور ریختیم و 3 میلی‌لیتر محیط کشت تازه به سلول‌های باقیمانده در فالكون افزودیم و با کمک پیپتاژ، سلول‌ها را به‌طور همگن در محیط کشت پخش کردیم. در انتها محتویات فالكون را به داخل فلاسک منتقل نمودیم و 3 میلی‌لیتر محیط کشت به فلاسک اضافه کردیم. فلاسک را داخل انکوباتور $37^{\circ}C$ و دی‌اکسید کربن 5 درصد و رطوبت 98 درصد قرار دادیم تا سلول‌ها شروع به رشد و تولید مثل کنند. پس از این که سلول‌ها 80 درصد کف ظرف را پر کردند، فلاسک از انکوباتور خارج و محیط رویی دور ریخته شد. سپس کف فلاسک با محلول PBS شسته و محلول تریپسین

(EDTA) به آن اضافه شد. فلاسک به مدت 2 تا 3 دقیقه در انکوباتور قرار داده شد تا سلول‌ها از کف کنده شوند. برای خنثی‌سازی تریپسین، به فلاسک حاوی سلول‌های کنده شده، محیط کشت کامل اضافه می‌شد. محتویات فلاسک را به یک فالكون 15 میلی‌لیتری منتقل کردیم و به مدت 5 دقیقه تحت سانتیفریوژ با نیروی 300g قرار دادیم. سپس محیط رویی سلول‌ها از فالكون خارج و محیط کشت جدید به فالكون افزوده شد و با پیپتاژ کردن محلول به صورت سوسپانسیون سلولی در آمد و به فلاسک یا پلیت منتقل شد (22).

روش تهیه نانوذرات طلای کائزوگه شده با PVP و اسید فولیک

ابتدا 20 میلی‌لیتر محلول یک صدم درصد نمک طلا ($HAuCl_4 \cdot H_2O$) در آب دو بار تقطیر تهیه شد. سپس پودر PVP (Polyvinylpyrrolidone) با نسبت جرمی دو برابر نمک طلا به محلول افزوده و حل شد. همچنین محلول یک درصد سیترات سدیم در آب دو بار تقطیر برای احیای نمک طلا آماده شد. دمای محلول نمک طلا و PVP بر روی استیرر تا حد نقطه جوش بالا برده و همزمان توسط مگنت به شدت استیرر شد. در حالی که محلول در حال استیرر می‌جوشید، 50 میکرولیتر از محلول سیترات سدیم به آن افزوده شد. طی زمان 10 دقیقه پس از افزودن محلول سیترات سدیم سنتز نانوذرات کامل شد، به گونه‌ای که رنگ محلول ابتدا تیره شد و بتدریج تغییر کرد تا در نهایت به رنگ قرمز شرابی در آمد (23-25). برای تهیه نانوذرات کائزوگه شده با اسید فولیک ابتدا 20 میلی‌لیتر محلول یک صدم درصد نمک طلا ($HAuCl_4 \cdot H_2O$) در آب دو بار تقطیر تهیه شد. هم‌چنین محلول یک درصد سیترات سدیم آب دو بار تقطیر برای احیای نمک طلا آماده شد. دمای محلول نمک طلا بر روی استیرر تا حد نقطه جوش بالا برده شد و همزمان توسط مگنت به شدت استیرر شد. سپس 200 میکرولیتر از محلول سیترات سدیم به محلول

الکترونی روشی گسیل میدانی (Field Emission: FESEM Scattering Electron Microscopy) (دستگاه FESEM مدل S4160، ساخت شرکت HITACHI، ژاپن) برای تعیین مورفولوژی و اندازه تقریبی نانوذرات طلای سنتز شده استفاده شد. برای بررسی اندازه آبیوشی شده (Hydrodynamic) نانوذرات سیستم اندازه گیری پراکنش نور پویا (DLS: Dynamic Light Scattering) به کار گرفته شد (دستگاه 90 Plus Nanoparticle size analyzer، ساخت شرکت Brookhaven Instruments، ایالات متحده آمریکا). براساس مبانی نظری پذیرفته شده، پیوندهای شیمیایی در فواصل آنگسترومی ارتعاش می کنند که نوسان‌های بسیار ضعیف و قابل چشم‌پوشی هستند. با برخورد نور فرسرخ دارای فرکانس ارتعاشی یک پیوند مشخص، فرکانس مربوط توسط پیوند جذب و به صورت پیک‌های جذبی در طیف‌های IR مشاهده می‌شود (30). در این تحقیق، برای بررسی تایید پوشش دهی نانوذرات از دستگاه FT-IR (مدل 10.03.06، ساخت شرکت PerkinElmer، آمریکا) استفاده شد.

نحوه بررسی سمیت‌زایی نانوذرات طلای هدفمند بر روی سلول‌های *HeLa* و تعیین کمیت IC_{10}

از سنجش MTT (-2-yl)-3-(4,5-dimethylthiazol) برای اندازه‌گیری فعالیت متابولیکی سلول‌ها در شرایط برون‌تنی استفاده می‌شود. این سنجش یک روش رنگ سنجی است که در آن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم محلول در آب در سیستم سلولی زنده توسط میتوکندری احیا می‌شود و کریستال‌های آبی رنگ نامحلول را تشکیل می‌دهد. برای تهیه محلول MTT با غلظت 5 mg/ml، براساس حجم مورد نیاز در هر آزمایش، مقدار مشخصی (به‌طور مثال 50 میلی‌گرم) از ماده خشک MTT در حجم مورد نیاز (به‌طور مثال 10 میلی‌لیتر) بافر نمکی فسفات (PBS) حل و سپس با فیلتر 0/22 میکرومتری فیلتر گردید. مقدار

در حال استیرر طلا افزوده شد. طی زمان 10 دقیقه پس از افزودن محلول سترات سدیم سنتز نانوذرات کامل شد، به گونه‌ای که رنگ محلول ابتدا تیره شد و به تدریج تغییر کرد تا در نهایت به رنگ قرمز شرابی در آمد (23). در یک بالن 50 میلی‌گرم اسید فولیک در 1 میلی‌لیتر DMSO حل شد. سپس 95 میلی‌گرم EDC و 60 میلی‌گرم NHS و یک قطره محلول سه مولار NaOH افزوده و به مدت نیم ساعت استیرر شد. در یک بالن دیگر 200 میلی‌گرم BSA در 4 میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر حل شد. در حالی که محلول BSA روی استیرر هم می‌خورد، محلول فولیک اسید فعال شده قطره قطره به آن افزوده شد و به مدت 24 ساعت در همین حالت باقی ماند. سپس محلول را داخل فیلتر آمیکون 30kDa ریخته و به مدت 30 دقیقه با سرعت 4000 g (طبق پروتکل پیشنهاد شده توسط سازنده فیلتر) سانتریفیوژ شد تا مولکول‌های متصل نشده به BSA از محلول جدا شوند و ماده BSA و فولیک اسید متصل شده به آن باقی بماند. محلول باقیمانده روی غشای فیلتر را با پیت جمع‌آوری کردیم که متشکل از کمپلکس FA@BSA بود. نانوذرات طلای سنتز شده به روش Turkevich را به نسبت وزنی 1 به 3 کمپلکس FA@BSA اضافه و یک شبانه‌روز استیرر شد. در نهایت محلول به دست آمده به مدت 20 دقیقه با سرعت 18000 سانتریفیوژ و محلول رویی تخلیه شد و نانوذراتی که به ته میکروتیوب چسبیده بودند چندین بار با آب دوبار تقطیر شستشو داده و سانتریفیوژ شدند تا مواد اضافی خارج شود و نانوذرات کائوگه شده با اسید فولیک باقی بماند (26-29).

نحوه بررسی اندازه نانوذرات طلای سنتز شده و اتصال آلبومین سرم گاوی و فولیک اسید به نانوذرات طلا برای تایید اندازه (Size) نانوذرات طلای سنتز شده، روش طیف سنجی UV-VIS (دستگاه طیف سنجی UV-VIS مدل T70، ساخت شرکت PG Instrument Ltd، انگلستان) به کار برده شد. هم‌چنین از تصویر میکروسکوپ

روش سنجش میزان جذب نانوذرات هدفمند و غیرهدفمند
طلا در سلول‌های HeLa

طیف سنجی نشر اتمی با پلاسما جفت شده القایی (ICP-AES) معمولاً برای تعیین جذب سلولی نانوذرات فلزی قابل استفاده است. برای سنجش میزان جذب نانوذرات توسط سلول‌های مورد مطالعه، از دستگاه طیف سنجی نشر اتمی با پلاسما جفت شده القایی (ساخت شرکت SPECTRO ARCOS، آلمان) با دقت یک در میلیارد (ppb) استفاده شد. به این منظور تعداد 300000 سلول در فلاسک‌های 25 cm^2 کشت داده شدند و پس از 24 ساعت، آنکوباسیون نانوذرات در غلظت‌های مورد نظر انجام شد. قبل از انجام آزمایش جذب اتمی، محیط کشت رویی هر یک از خانه‌ها خارج و سه مرتبه با محلول بافر نمکی فسفات (PBS) شسته شدند تا نانوذراتی که وارد سلول نشده بودند به طور کامل از روی سلول‌ها شسته شوند. سپس سلول‌ها با استفاده از تریپسین از کف فلاسک کنده شدند. نمونه‌ها در محلولی متشکل از اسید نیتریک (HNO_3) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) به مدت 12 ساعت قرار گرفتند تا کاملاً هضم شوند و سپس یک ساعت در دمای 100 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و در نهایت به حجم لازم رسانده شدند. نمونه‌های آماده شده در دستگاه ICP قرار داده شدند و شدت طول موج منتشر شده از هر نمونه اندازه‌گیری شد. برای نانوذرات طلا شدت در طول موج مشخصه $242/795 \text{ nm}$ اندازه‌گیری شد. از قبل نمونه‌های بدون مداخله/خالی (blank) و غلظت‌های استاندارد به دستگاه داده و دستگاه کالیبره شد. در انتها، غلظت عنصر مورد نظر در هر نمونه به دست آمد. آزمایش‌ها به صورت سه بار تکرار انجام و نتایج نهایی از میانگین‌گیری نتایج گزارش شدند (32).

تابش‌دهی سلول‌ها در حضور نانوذرات هدفمند و غیر هدفمند طلا و در عدم حضور نانوذرات
به منظور تابش‌دهی از دستگاه شتابدهنده خطی

حجمی که از محلول تازه تهیه شده MTT به هر چاهک حاوی سلول و نانوذره ریخته می‌شد به میزان محیط کشت وابسته بود، به گونه‌ای که از نسبت 1 به حداکثر 10 از محلول به محیط کشت در همه‌ی آزمایش‌ها استفاده گردید. برای انجام این سنجش، از یک پلیت 96 خانه‌ای استفاده شد. برای هر یک از انواع نانوذرات هدفمند و غیر هدفمند، در هر یک از خانه‌های واقع در 10 ستون و سه ردیف پلیت مورد استفاده 10000 سلول در محیط کشت قرار داده شد. بعد از گذشت 24 ساعت که سلول‌ها به کف پلیت چسبیدند، محیط کشت رویی توسط سمپلر تخلیه شد. پس از آن نانوذرات هدفمند و غیر هدفمند در 10 غلظت مختلف (صفر تا $45 \mu\text{g/ml}$) در محیط کشت جدید آماده و سلول‌ها با این نانوذرات آنکوبه شدند. پس از گذشت 24 ساعت از آنکوباسیون سلول‌ها و نانوذرات، ابتدا محیط رویی هر خانه به کمک سمپلر با دقت تخلیه و سپس 100 میکرولیتر از محلول ماده MTT با غلظت 10 درصد به هر یک از خانه‌های پلیت 96 اضافه گردید و در نهایت پلیت‌ها به مدت 4 ساعت در آنکوباتور 37 درجه و 5 درصد دی‌اکسید کربن قرار داده شدند. سپس، به کمک یک سمپلر محیط کشت حاوی ماده‌ی MTT از خانه‌ها برداشته شد. بعد از برداشتن محیط رویی، 100 میکرولیتر دی‌متیل سولفو کساید (DMSO) به هر چاهک اضافه و به مدت 15 دقیقه در آنکوباتور قرار داده شد. سپس، پلیت در دستگاه لرزاننده به مدت 5 دقیقه قرار داده شد تا بلورهای تشکیل شده در DMSO حل و یکنواخت گردد. در انتها، جذب نوری در دستگاه خوانشگر میکروپلیت فتومتر یا خوانشگر الیزا در طول موج 570 نانومتر قرائت و میزان رنگ تولید شده توسط سلول‌ها در گروه‌های مختلف مقایسه و سمیت هر یک از نانوذرات بررسی شد (31). از این روش برای تعیین غلظتی از نانوذرات که به کاهش 10 درصدی بقای سلول‌ها می‌انجامد (IC_{10}) و سنجش MTT استفاده کردیم.

روز یک بار محیط کشت سلولی تعویض شد. پس از 14 روز که سلول‌های سالم سبب تشکیل کلونی‌های سلولی شدند، توسط فورمازان و کریستال ویوله تثبیت و رنگ آمیزی و تعداد کلونی‌ها شمرده شدند. نسبت بقای سلولی در هر گروه نسبت به گروه کنترل مربوط محاسبه شد (33).

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری نتایج این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism8 انجام شد. داده‌ها در هر گروه با سه بار تکرار جمع‌آوری شد. مقایسه داده‌ها با استفاده از روش‌های آماری پارامتریک انجام شد. میزان معنی‌داری اختلاف در مقدار بقای سلولی در هر یک از گروه‌های تیمار و کنترل با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه بررسی و سطح $P < 0/05$ برای معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تعیین طیف UV-VIS نانوذرات طلای سنتز شده و نتایج مربوط به اندازه‌گیری قطر و مورفولوژی نانوذرات طلا در طیف UV-VIS به دست آمده از نانوذرات طول موج پیک در طیف پلاسما سطحی در 530 نانومتر مشاهده شد که مربوط به نانوذرات طلای کروی 50 نانومتری است (تصویر شماره 1، الف). هم‌چنین تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی نشان داد نانوذرات طلا با شکل کروی و قطر تقریبی 50 نانومتر سنتز شده است (تصویر شماره 1، ب).

نمودار شماره 1 توزیع اندازه آبیوشی شده قطر نانوذرات طلای سنتز شده را نشان می‌دهد. مقدار متوسط قطر هیدرودینامیکی نانوذرات طلای کانژوگه شده با PVP و نانوذرات کانژوگه شده با اسید فولیک به ترتیب 57/4 nm و 67/7 nm با شاخص پراکندگی 0/15 و 0/17 به دست آمد.

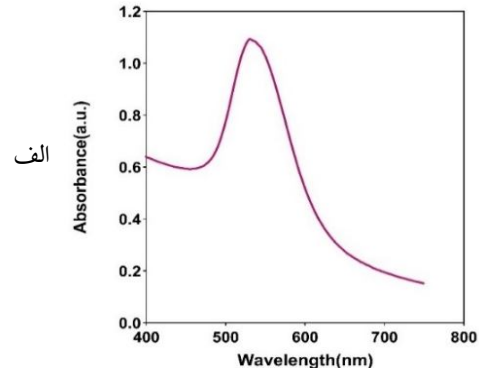
ساخت شرکت SIEMENS، آلمان واقع در کلینیک پرتودرمانی امید استفاده شد. پرتو دهی نمونه‌ها در گروه‌های آزمایشی مربوط با باریکه فوتونی 6 مگاولتی انجام شد. اندازه میدان به ابعاد $20 \times 18 \text{ cm}^2$ و فاصله منبع و نمونه سلولی به اندازه $\text{SAD} = 100 \text{ cm}$ تنظیم شد. آهنگ دوز تابش دهی دستگاه MU/min 200 بود و برای هر گروه از پلیت‌ها زمان تابش دهی به گونه‌ای تنظیم شد که گروه‌های مختلف پرتوی به طور جداگانه تحت تابش دوزهای 0/5، 1، 2، 3 و 4 Gray (Gy) قرار گیرند. گیرند. ضخامت ورقه پلکسی گلس در مسیر برخورد پرتو به سلول‌ها 3 سانتی‌متر بود و زاویه گنتری شتاب‌دهنده در 180 درجه تنظیم شد.

سنجش کلونی‌زایی سلول‌ها

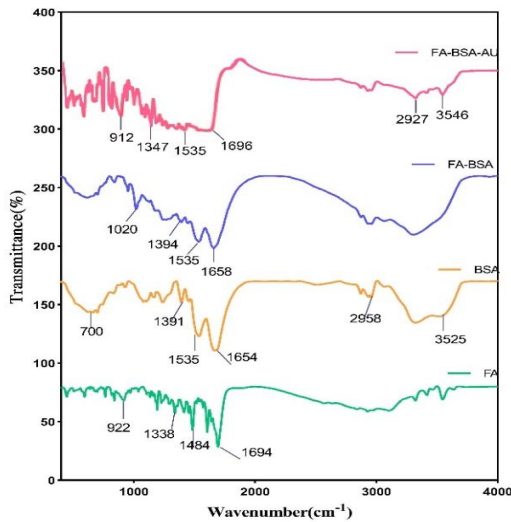
روش سنجش کلونی‌زایی به‌عنوان ابزاری مفید برای ارزیابی تفاوت در تولید مثل سلولی بین گروه‌های کنترل و گروه‌های تحت درمان‌های مختلف، مثل سلول‌های تحت تابش پرتوی یونیزان استفاده می‌شود. منظور از کلونی‌زایی توانایی یک سلول در تولید مثل و تشکیل یک مجموعه حداقل 50 سلولی است. برای بررسی اثر تابش سلول‌ها در حضور نانوذرات مختلف، ابتدا سلول‌ها در 6 پلیت 12 خانه کشت داده شدند. تعداد سلول‌ها در هر پلیت متناسب با مقدار تابش در نظر گرفته شده برای آن پلیت کشت داده شد. پس از 24 ساعت پلیت‌ها را به سه گروه مجزای سلول‌های تنها، سلول‌های انکوبه شده با نانوذرات طلای هدفمند و سلول‌های انکوبه شده با نانوذرات طلای غیزهدفمند تقسیم‌بندی کردیم. انکوباسیون نانوذرات با غلظت IC_{10} و به‌مدت 24 ساعت انجام شد. در هر گروه یک پلیت به‌عنوان نمونه کنترل تحت تابش قرار نگرفت. از هر گروه سایر پلیت‌ها تحت تابش پرتو فوتونی 6 MV با دوزهای 0/5 و 1 و 2 و 3 و 4 Gy تحت تابش قرار گرفتند. پس از تابش دهی، سلول‌ها در انکوباتور قرارداد شدند و هر دو

تایید اتصال آلبومین سرم گاوی و فولیک اسید به نانوذرات طلا

همان گونه که بیان شد برای اتصال نانوذرات طلا به فولیک اسید از پروتئین BSA به عنوان لینکر استفاده شد. پس از فعالسازی گروه کربوکسیل مولکول های فولیک اسید، مولکول های BSA از طریق پیوند پپتیدی به مولکول های فولیک اسید متصل می شوند. سپس از طریق گروه های سولفیدریل مولکول BSA نانوذرات طلا به سمت دیگر BSA متصل می شوند و به این ترتیب نانوذرات طلای کائزوگه با اسید فولیک سنتز می شوند. به منظور تایید اتصال مولکول ها به یکدیگر، پس از انجام هر مرحله، طیف سنجی فرسرخ انجام شد (تصویر شماره 2).

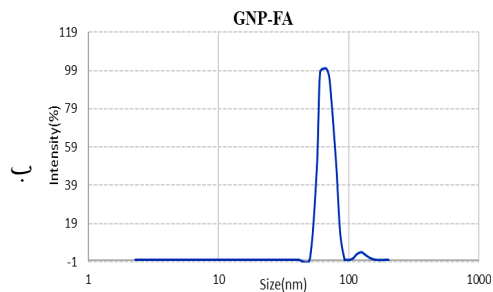
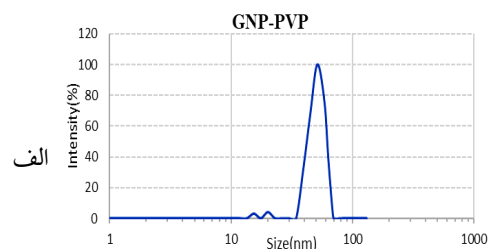


تصویر شماره 2: طیف جذبی نانوذرات طلای سنتز شده در گستره فرابنفش-مرئی (شکل بالا) و تصویر FESEM نانوذرات سنتز شده



تصویر شماره 2: طیف FT-IR نانوذرات طلای کائزوگه شده با اسید فولیک

در طیف BSA-FA پیک های جذبی در فرکانس های 1658 cm^{-1} و 1535 cm^{-1} و 1020 cm^{-1} قرار داشتند، که به ترتیب مربوط به فرکانس نوسان پیوندهای C=O و N-H و C-N هستند و وجود پیوند جدید آمینی را در ترکیب نشان می دهد. هم چنین انتقال پیک جذبی 1391 cm^{-1} در طیف BSA به 1394 cm^{-1} در طیف BSA-FA نشان دهنده



نمودار شماره 1: توزیع اندازه قطر آبیوشی شده نانوذرات طلا در آزمون DLS

Find ECanything vs. response [Agonist] برای تحلیل پاسخ سلول به عامل بازدارنده (نانوذرات) انتخاب و غلظتی از نانوذرات که منجر به 10 درصد کاهش در پاسخ سلول گردید و توسط نرم افزار تعیین شد. کمیت IC₁₀ نانوذرات طلای کانژوگه شده با PVP و کانژوگه شده با اسید فولیک برای سلول‌های HeLa به ترتیب مقادیر $12/0 \pm 1/1 \mu\text{g/ml}$ و $18/5 \pm 1/5 \mu\text{g/ml}$ و رگرسیون $0/97$ و $0/98$ به دست آمد. در ادامه مطالعه برای بررسی مقایسه‌ای میزان جذب و میزان حساس کنندگی بین نانوذرات هدفمند و غیرهدفمند از غلظت غیرسمی مساوی $12 \mu\text{g/ml}$ در هر دو نوع نانوذرات استفاده کردیم.

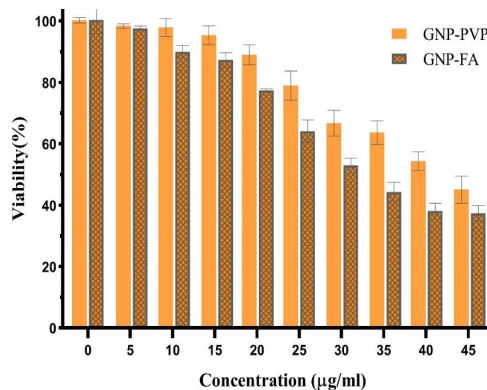
مقایسه میزان جذب نانوذرات طلای کانژوگه شده با PVP و اسید فولیک در سلول‌های HeLa

سنجش میزان جذب سلولی نانوذرات طلا توسط طیف سنجی ICP-AES با حساسیت ppb اندازه‌گیری شد. ابتدا تعداد معینی از سلول‌های HeLa در پلیت‌های 6 خانه کشت داده شد و پس از 24 ساعت دو نوع نانوذرات طلا در شرایط یکسان و با غلظت مساوی $12 \mu\text{g/ml}$ با سلول‌ها انکوبه شدند. انکوباسیون هر یک از نانوذرات در سه بازه زمانی 2، 4 و 24 ساعت انجام شد. برای تعیین غلظت عنصر طلا در هر نمونه از طیف سنجی ICP-AES استفاده شد. با تقسیم مقدار نانوذرات داخل نمونه بر تعداد سلول‌های نمونه میزان جذب نانوذرات توسط سلول‌ها محاسبه شد. همان‌طور که در تصویر شماره 5 مشاهده می‌شود، تفاوت میزان جذب نانوذرات طلا کانژوگه شده با اسید فولیک در سلول‌های HeLa با میزان جذب نانوذرات طلا کانژوگه شده با PVP در سلول‌های مذکور در دو ساعت اول کاملاً مشهود است، در چهار ساعت میزان جذب نانوذرات طلا کانژوگه شده با اسید فولیک نسبت به جذب نانوذرات طلا کانژوگه شده با PVP بیش از 4 برابر افزایش می‌یابد و با گذشت 24 ساعت این مقدار به عدد 2 می‌رسد (نمودار شماره 3).

اتصال دو مولکول است. در محصول نهایی پیک‌های جذبی در فرکانس‌های 2927 cm^{-1} و 1347 cm^{-1} و 912 cm^{-1} به ترتیب متعلق به فرکانس نوسان کششی پیوند C-H، نوسان خمشی داخل صفحه‌ای و خارج صفحه‌ای پیوند O-H حلقه آروماتیک مولکول اسید فولیک هستند و نشان می‌دهد مولکول اسید فولیک به نانوذرات طلا کانژوگه شده است (34، 35).

اثر غلظت نانوذرات طلای هدفمند و غیرهدفمند در ایجاد سمیت بر سلول‌های HeLa

برای سنجش میزان سمیت‌زایی، نانوذرات هدفمند و غیر هدفمند در ده غلظت مختلف (از غلظت صفر به عنوان نمونه کنترل تا غلظت 45 میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت 24 ساعت با سلول‌های HeLa انکوبه نمودیم. سپس سنجش MTT برای همه گروه‌ها با سه بار تکرار انجام شد و میانگین زنده مانی سلول‌ها در هر گروه با توجه به چگالی نوری (Optical Density) خوانده شده توسط دستگاه خوانش الیزا استخراج گردید (نمودار شماره 2).



نمودار شماره 2: میزان سمیت‌زایی نانوذرات طلای پوشش داده شده با PVP (نمودار بالا) و اسید فولیک (نمودار پایین) در غلظت‌های مختلف بر روی سلول‌های HeLa

نتایج به دست آمده در نرم‌افزار GraphPad Prism وارد و از بخش Nonlinear Regression مدل

سپس منحنی بقا با استفاده از نرم افزار Prism GraphPad به مدل رادیوبیولوژیکی خطی-توانی درجه دو فیت شده است و ضرایب آلفا و بتای هر منحنی به دست آمده است (جدول شماره 1).

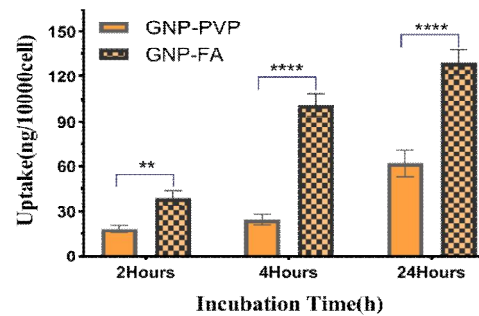
جدول شماره 1: مقادیر ضرایب آلفا و بتا در مدل خطی-توانی درجه دو بدست آمده از منحنی بقای سلولهای HeLa در حضور و عدم حضور نانوذرات

گروه	α	β
کنترل	$0/143 \pm 0/044$	$0/035 \pm 0/016$
GNP-PVP	$0/225 \pm 0/032$	$0/048 \pm 0/017$
GNP-FA	$0/299 \pm 0/030$	$0/048 \pm 0/016$

برای مقایسه اثر نانوذرات هدفمند و غیرهدفمند بر حساس کنندگی پرتوی سلولهای موردنظر کمیت SER (نسبت افزایش حساسیت پرتوی) مورد استفاده قرار گرفت. مقدار کمیت SER برای نانوذرات هدفمند $1/19 \pm 0/02$ و برای نانوذرات غیر هدفمند $1/32 \pm 0/02$ به دست آمده است.

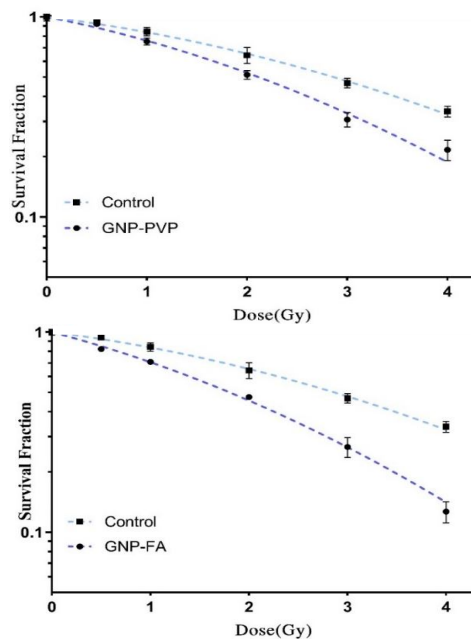
بحث

پرتودرمانی یکی از روشهای درمان سرطان و مبتنی بر پرتوهای یونیزان است که برای درمان تومورهای اولیه و هم چنین برای جلوگیری از عود سرطان پس از برداشتن تومور اصلی با جراحی استفاده می شود. پرتوهای یونیزان از طریق یونیزاسیون مولکولی که منجر به ایجاد آبخاری از رادیکالهای آزاد می شود به اجزای متعدد درون سلولی مانند DNA آسیب می رساند. اگرچه پرتوهای یونیزان در آسیب رساندن به سلولهای توموری بسیار مؤثر است، اما بر بافت های سالم اطراف نیز تأثیر می گذارد. از این رو، کنترل دوز پرتوی تجویز شده برای به حداقل رساندن سمیت برای بافت های طبیعی ضروری است و استراتژی های جدیدی برای هدف گیری سلول های سرطانی برای دستیابی به پرتودرمانی خاص تومور در دست بررسی هستند. استراتژی های مبتنی بر استفاده از تکنولوژی های نوین کامپیوتری، دستگاه های پیشرفته، ترکیب



نمودار شماره 3: مقایسه میزان جذب نانوذرات هدفمند و غیرهدفمند توسط سلول های HeLa در مدت زمان انکوباسیون متفاوت

منحنی بقای سلول های HeLa تحت تابش فوتون های 6 مگاولتی در حضور و عدم حضور نانوذرات طلا بر پایه مدل رادیوبیولوژیکی خطی-توانی درجه 2 همان طور که در بخش قبلی مشاهده شد، کسر بقای سلولی پس از پرتو دهی سلول ها به تنهایی و هم چنین در مجاورت نانوذرات محاسبه شده است. اثر پرتو بر سلول به شکل منحنی دوز-پاسخ به صورت لگاریتم طبیعی کسر بقا بر حسب دوز رسم شده است (نمودار شماره 4).



نمودار شماره 4: منحنی دوز-پاسخ سلول های HeLa تحت تابش پرتو، در حضور نانوذرات طلای کانژوگه شده با PVP (نمودار بالا) و در حضور نانوذرات طلای کانژوگه شده با اسید فولیک (نمودار پایین)

10 $\mu\text{g/ml}$ می‌رساند. شایان توجه است که در مطالعه مذکور حساس‌کنندگی پرتوی نانوذرات طلا تحت تابش پرتوهای فوتونی اورتولتاژ و Co-60 بررسی شده است، در حالی که امروزه سرطان دهانه رحم غالباً با فوتون‌های 6 MV در تودرمانی می‌شود. در مطالعه دیگری نانوکلاسترهای طلا به واسطه‌ی لینکر BSA با مولکول‌های اسید فولیک هدفمند شدند (19). در این مطالعه نیز اثر هدفمند نمودن نانوکریستال‌های طلا با اسید فولیک بر افزایش جذب آن نسبت به میزان جذب نانوذرات غیرهدفمند بررسی نشده است. در مطالعه‌ای که توسط نانومیل‌های طلای کانژوگه شده با اسید فولیک به واسطه لینکرسیلیس انجام شد، در 4 ساعت میزان جذب نانوذرات هدفمند نسبت به غیر هدفمند با نسبت 2/65 افزایش داشت (20). مطالعه دیگری توسط Huang و همکاران (21) نیز نشان داد که در مدت آنکوباسیون 2 تا 8 ساعت میزان جذب نانوذرات هدفمند در سلول‌های MGC803 حدود 3 برابر افزایش پیدا می‌کند.

در مطالعه ما نانوذرات طلا از طریق احیای ذرات طلا توسط سترات سدیم سنتز شدند که طیف جذبی UV-VIS و تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی آن‌ها نشان‌دهنده نانوذرات کروی با قطر تقریبی 50 نانومتر است. به عنوان نانوذرات غیرهدفمند نانوذرات طلا با PVP کانژوگه شد و نانوذرات هدفمند از طریق اتصال نانوذرات طلا با اسید فولیک به واسطه لینکر BSA تهیه شدند و صحت اتصال فولیک اسید به نانوذرات طلا با استفاده از طیف سنجی FT-IR مورد بررسی و تایید قرار گرفت. مقادیر کمیته IC₁₀ با استفاده از روش سمیت سنجی MTT برای نانوذرات هدفمند و غیرهدفمند به ترتیب 12 $\mu\text{g/ml}$ و 20 $\mu\text{g/ml}$ به دست آمد. بررسی اختلاف جذب نانوذرات هدفمند و غیرهدفمند در سلول‌های مورد نظر نشان داد که افزایش در جذب نانوذرات هدفمند از حدود 2 ساعت پس از آنکوباسیون مشهود است و پس از 4 ساعت جذب نانوذرات هدفمند به بیش از 4 برابر جذب نانوذرات غیر هدفمند در

پروتکل‌های پرتودرمانی و استفاده از روش‌های ترکیبی با سایر مدالیته‌ها مثل هایپرترمیا (5-1) نیاز به استفاده از دستگاه‌ها و تجهیزات و تکنولوژی‌های پرهزینه در کلینیک را دارند. در مقابل استفاده از حساس‌کننده‌های پرتوی مثل نانوذرات فلزی (6) به دلیل زیست‌سازگاری، قابلیت‌های افزایش جذب سلولی و سهولت عملکرد با مولکول‌های زیستی و عوامل درمانی، در سال‌های اخیر به‌عنوان سیستم‌های تحویل داروی استثنایی ظهور کرده‌اند. استفاده از این روش برای افزایش بازده پرتودرمانی و حفاظت بافت سالم از قرار گرفتن در معرض پرتو، با چالش کم‌تر و عدم نیاز به تجهیزات گرانقیمت در مرکز درمانی نسبت به سایر استراتژی‌ها برتری دارد. علاوه بر این، خواص فیزیکوشیمیایی منحصر به فرد نانوذرات در پروتکل‌های درمانی مختلف می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد و امکان درمان‌های هم‌افزایی را فراهم کند. در پرتودرمانی خارجی نانوذرات از عناصر با عدد اتمی بالا (مانند طلا، هافنیوم، بیسموت و گادولینیوم) برای افزایش سطح مقطع جذب تشعشع استفاده می‌شود. با عملکردی کردن سطح نانوذرات با مولکول‌های هدفمند (مانند اسید فولیک، آپتامر، گلوکز و...)، می‌توان به تحویل دوز درمانی اختصاصی تومور (اصطلاحاً هدفمندی فعال نامیده می‌شود) دست یافت. عملکردی کردن نانوذرات طلا با مولکول‌ها هدفمند اسید فولیک به واسطه یک لینکر انجام می‌شود. مطالعه بررسی‌های انجام شده با لینکرهای مختلف نشان می‌دهد که نوع لینکر مورد استفاده بر سمیت سلولی، میزان جذب در سلول‌ها و حساس‌کنندگی پرتوی نانوذرات طلا اثرگذار است. در یک مطالعه، از نانوذرات طلای هدفمند شده با فولیک اسید توسط لینکر 4-آمینو تیوفنول (4-aminothiophenol) برای حساس‌کنندگی پرتوی سلول‌های HeLa استفاده شد (18). نتایج این مطالعه نشان داد که هدفمند نمودن نانوذرات طلا در این روش غلظت غیر سمی این نانوذرات را نسبت به نانوذرات غیرهدفمند به شدت کاهش می‌دهد و به مقدار کم‌تر از

بیش تر، اندازه گیری مقدار اسید فولیک بارگیری شده روی لینکر BSA ضروری است و می توان با بررسی های بیش تری به نتیجه گیری دقیق تری دست یافت. در نهایت نتیجه گیری می شود که با استفاده از غلظت غیرسمی نانوذرات هدفمند می توان اثر کشندگی پرتوهای یونیزان در مقایسه با بکارگیری نانوذرات غیرهدفمند با همان غلظت افزایش داد و با استفاده از دوزهای کنترل شده در پرتودرمانی موفق به مهار بیش تر رشد سلول های سرطانی و در عین حال کاهش آسیب به بافت های سالم شد. با توجه به هزینه پایین، زیست سازگاری و در دسترس بودن ماده BSA و همچنین سهولت تهیه نانوذرات طلا و امکان استفاده از حساس کننده ها در رادیوتراپی بالینی با کم ترین هزینه و تجهیزات می توان از این ماده به عنوان لینکر برای اتصال اسید فولیک به نانوذرات طلا استفاده کرد و از مزایای درمان هدفمند در سلول های HeLa در پرتودرمانی بالینی با فوتون های 6MV بهره برد.

سپاسگزاری

این مطالعه در قالب یک طرح پژوهشی رساله دکتری فیزیک پزشکی با اعتبارات تخصیص یافته از دانشگاه تربیت مدرس و هم چنین صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (به شماره: 98016816) مصوب شورای پژوهشی دانشگاه و صندوق به تصویب رسیده و انجام شده است. کد اخلاق در پژوهش این مطالعه (کد: IR.MODARES.REC.1398.036) نیز از کمیته دانشگاهی/منطقه ای اخلاق در پژوهش های زیست پزشکی دانشگاه تربیت مدرس دریافت و در سامانه ملی اخلاق در پژوهش های زیست پزشکی (<https://ethics.research.ac.ir>) نیز ثبت شده است.

References

1. Rezaeijo SM, Hashemi B, Mofid B, Bakhshandeh M, Mahdavi A, Hashemi MS. The feasibility of a dose painting procedure

سلول های HeLa افزایش می یابد. تجمع مقدار بیش تر نانوذرات هدفمند در سلول های مورد مطالعه منجر به افزایش فرآیندهای حساس کنندگی ناشی از نانوذرات و افزایش جذب انرژی پرتوی یونیزان در داخل سلول شد. نتایج مطالعه ما نشان می دهد زمانی که سلول های مورد نظر با غلظت یکسان از نانوذرات هدفمند و غیرهدفمند انکوبه می شوند میزان مرگ و میر سلول های انکوبه شده با نانوذرات هدفمند تحت تابش پرتوهای 6MV بیش تر است، به طوری که نسبت حساس کنندگی نانوذرات هدفمند و نانوذرات غیر هدفمند به گروه کنترل (بدون نانوذرات) به ترتیب $1/32 \pm 0/02$ و $1/19 \pm 0/02$ به دست آمد. همچنین کمیت α در سلول های HeLa تحت تابش فوتون های 6MV که معیاری از آسیب های غیر قابل ترمیم DNA می باشد از مقدار $0/143$ در گروه بدون نانوذره به $0/225$ در گروه دارای نانوذرات غیرهدفمند و $0/299$ در گروه دارای نانوذرات هدفمند افزایش پیدا کرد. همان طور که نتایج مطالعه ما نشان می دهد نسبت β/α در حضور نانوذرات هدفمند در مقایسه با نانوذرات غیرهدفمند بیش تر افزایش پیدا کرده است که بیانگر افزایش حساسیت پرتوی سلول های مورد نظر است (36). بر مبنای نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر، استفاده از نانوذرات طلای فولانه شده با لینکر BSA به میزان قابل قبولی سبب افزایش جذب نانوذرات در داخل سلول های HeLa نسبت به جذب نانوذرات غیرهدفمند می شود که دلیل آن می تواند کاتز و گاسیون موثر مولکول های فولیک اسید به واسطه لینکر BSA به دلیل فراوانی تعداد گروه های آمین در هر یک از مولکول های BSA باشد و می تواند منجر به بارگیری تعداد بیش تری از مولکول های فولیک اسید شود. البته برای تعیین جزئیات

to treat prostate cancer based on mpMR images and hierarchical clustering. Radiat Oncol 2021; 16(1): 182.

2. Moradi S, Hashemi B, Bakhshandeh M, Banaei A, Mofid BJRO. Introducing new plan evaluation indices for prostate dose painting IMRT plans based on apparent diffusion coefficient images. *Radiat Oncol* 2022; 17(1): 193.
3. Rezaeijoo S, Hashemi B, Mofid B, Bakhshandeh M, Rostami A, Molana S. Comparison of various common whole pelvic radiotherapy (WPRT) and local radiotherapy (LRT) procedures to treat prostate cancer based on dosimetric parameters and radiobiological models. *Int J Radiat Res* 2021; 19(4): 843-852.
4. Sharbo G, Hashemi B, Bakhshandeh M, Rakhsha AJJoRi P. Radiobiological assessment of nasopharyngeal cancer IMRT using various collimator angles and non-coplanar fields. *J Radiother Pract* 2021; 20(2): 168-175.
5. Hatamian M, Hashemi B, Mahdavi SR, Soleimani M, Khalafi L. *Therapeutics*. Effect of 13.56 MHz radiofrequency hyperthermia on mitotic cell cycle arrest in MCF7 breast cancer cell line and suggest a time interval for radiotherapy. *J Cancer Res Ther* 2023; 19(2): 447-451.
6. Hashemi B, Amini Kadijani B, Mahdavi SR, Soleimani M. Evaluation of the Radiosensitization effect of Gold and Hafnium Oxide Nanoparticles on HeLa Cancer Cells under 6 MV Photon Radiation. *AOCMP-2021, 21st Asia-Oceania Congress of Medical Physics; United International University (UIU), Dhaka, Bangladesh; 10-12 December 2021*.
7. Le Tourneau C, Calugaru V, Takacs-Nagy Z, Liem X, Papai Z, Fijuth J, et al. Phase I study of functionalized hafnium oxide nanoparticles (NBTRX3) activated by radiotherapy in cisplatin-ineligible locally advanced HNSCC patients. *Int J Radiat Oncol Biol* 2021; 111(3): 392.
8. Wang H, Mu X, He H, Zhang X-D. Cancer radiosensitizers. *Trends Pharmacol Sci* 2018; 39(1): 24-48.
9. Tsai S-W, Lo C-Y, Yu S-Y, Chen F-H, Huang H-C, Wang L-K, et al. Gold Nanoparticles Enhancing Generation of ROS for Cs-137 Radiotherapy. *Nanoscale Res Lett* 2022; 17(1): 123.
10. Her S, Jaffray DA, Allen CJAddr. Gold nanoparticles for applications in cancer radiotherapy: Mechanisms and recent advancements. *Adv Drug Deliv Rev* 2017; 109: 84-101.
11. Tremi I, Spyratou E, Souli M, Efstathopoulos EP, Makropoulou M, Georgakilas AG, et al. Requirements for designing an effective metallic nanoparticle (NP)-boosted radiation therapy (RT). *Cancers* 2021; 13(13): 3185.
12. Barreto JA, O'Malley W, Kubeil M, Graham B, Stephan H, Spiccia LJAm. *Nanomaterials: applications in cancer imaging and therapy*. *Adv Mater* 2011; 23(12): H18-H40.
13. Salvati A, Pitek AS, Monopoli MP, Prapainop K, Bombelli FB, Hristov DR, et al. Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. *Nat Nanotechnol* 2013; 8(2): 137-143.
14. Shen H, Huang H, Jiang ZJFiP. Nanoparticle-based radiosensitization strategies for improving radiation therapy. *Front Pharmacol* 2023; 14: 310.
15. Haume K, Rosa S, Grellet S, Śmiałek MA, Butterworth KT, Solov'yov AV, et al. Gold nanoparticles for cancer radiotherapy: a review. *Cancer Nanotechnol* 2016; 7(1): 8.
16. Mehrnia SS, Hashemi B, Mowla SJ, Nikkha M, Arbabi AJRO. Radiosensitization of

- breast cancer cells using AS1411 aptamer-conjugated gold nanoparticles. *Radiat Oncol* 2021; 16: 33.
17. Chen Y, Yang J, Fu S, Wu J. Gold nanoparticles as radiosensitizers in cancer radiotherapy. *Int J Nanomedicine* 2020; 9407-9430.
 18. Khoshgard K, Hashemi B, Arbabi A, Rasaei MJ, Soleimani M. Radiosensitization effect of folate-conjugated gold nanoparticles on HeLa cancer cells under orthovoltage superficial radiotherapy techniques. *Phys Med Biol* 2014; 59(9): 2249-2263.
 19. Kefayat A, Ghahremani F, Motaghi H, Amouheidari A. Biology, Medicine. Ultra-small but ultra-effective: Folic acid-targeted gold nanoclusters for enhancement of intracranial glioma tumors' radiation therapy efficacy. *Nanomedicine* 2019; 16: 173-184.
 20. Gao B, Shen L, He KW, Xiao WH. GNRs@SiO₂-FA in combination with radiotherapy induces the apoptosis of HepG2 cells by modulating the expression of apoptosis-related proteins. *Int J Mol Med* 2015; 36(5): 1282-1290.
 21. Huang P, Bao L, Zhang C, Lin J, Luo T, Yang D, et al. Folic acid-conjugated silica-modified gold nanorods for X-ray/CT imaging-guided dual-mode radiation and photo-thermal therapy. *Biomaterials* 2011; 32(36): 9796-9809.
 22. Chandra V, Tiwari A, Pant KK, Bhatt R. *Animal Cell Culture: Basics and Applications*. In: *Industrial Microbiology and Biotechnology*. Singapore: Springer; 2022. p. 691-719.
 23. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss Faraday Soc* 1951; 11: 55-75.
 24. Mahl D, Greulich C, Meyer-Zaika W, Köller M, Epple M. Gold nanoparticles: dispersibility in biological media and cell-biological effect. *J Mater Chem* 2010; 20(29): 6176-6181.
 25. Zhou M, Wang B, Rozynek Z, Xie Z, Fossum JO, Yu X, et al. Minute synthesis of extremely stable gold nanoparticles. *Nanotechnology* 2009; 20(50): 505606.
 26. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. *Nat Phys Sci* 1973; 241(105): 20-22.
 27. Abhari F, Charmi J, Rezaeejam H, Karimimoghaddam Z, Nosrati H, Danafar H, et al. Folic acid modified bismuth sulfide and gold heterodimers for enhancing radiosensitization of mice tumors to X-ray radiation. *ACS Sustain Chem Eng* 2020; 8(13): 5260-5269.
 28. Nosrati H, Abbasi R, Charmi J, Rakhshbahar A, Aliakbarzadeh F, Danafar H, et al. Folic acid conjugated bovine serum albumin: An efficient smart and tumor targeted biomacromolecule for inhibition folate receptor positive cancer cells. *Int J Biol Macromol* 2018; 117: 1125-1132.
 29. Robertson JD, Rizzello L, Avila-Olias M, Gaitzsch J, Contini C, Magoń MS, et al. Purification of nanoparticles by size and shape. *Sci Rep* 2016; 6: 27494.
 30. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. *Principles of instrumental analysis*. 7th ed. New York: Cengage Pub; 2017.
 31. Tolosa L, Donato MT, Gómez-Lechón MJ. General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay. *Protocols in in vitro hepatocyte research*. *Methods Mol Biol* 2015; 1250: 333-348.

32. Sharma I. ICP-OES: an advance tool in biological research. *J Environ Biol* 2020; 5(1): 027-033.
33. Rafehi H, Orłowski C, Georgiadis GT, Ververis K, El-Osta A, Karagiannis TC. Clonogenic assay: adherent cells. *J Vis Exp* 2011; (49): 2573.
34. Ma N, Liu J, He W, Li Z, Luan Y, Song Y, et al. Folic acid-grafted bovine serum albumin decorated graphene oxide: an efficient drug carrier for targeted cancer therapy. *J Colloid Interface Sci* 2017; 490: 598-607.
35. Retnakumari A, Setua S, Menon D, Ravindran P, Muhammed H, Pradeep T, et al. Molecular-receptor-specific, non-toxic, near-infrared-emitting Au cluster-protein nanoconjugates for targeted cancer imaging. *Nanotechnology* 2009; 21(5): 055103.
36. Rashid RA, Razak KA, Geso M, Abdullah R, Dollah N, Rahman WJB. Radiobiological characterization of the radiosensitization effects by gold nanoparticles for megavoltage clinical radiotherapy beams. *BioNanoScience* 2018; 8(3): 713-722.