

**شیمی - لیزر درمانی سلولهای سرطانی با استفاده از نانومیله های طلای پوشش داده شده با
کوپلیمرهای هوشمند**فریده محمودزاده^{۱*}، مهدی حسین زاده^۲

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد مرند، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، مرند، ایران

۲- دانشکده فنی مهندسی مرند - دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

فریده محمودزاده *: mahmoodzadeh.farideh@gmail.com

چکیده

سرطان یک اصطلاح عمومی برای گروه بزرگی از بیماری‌هایی است که از متاستاز سلول‌های غیرطبیعی ارگان‌های بدن ناشی شده و یکی از دلایل اصلی مرگ و میر در جهان محسوب می‌شود. پس از گذشت قرن‌ها، پزشکان و بیماران در سراسر جهان روش‌هایی را برای تشخیص و شکست سرطان ارائه کردند، در روش‌های تشخیص جاری بر پایه شیمی درمانی با مشکلاتی از قبیل مقدار نامناسب داروی تجویز شده در محل بیماری، واکنش‌های طاقت فرسای ناسازگاری دارو و در آخر مقاومت دارویی بافت سرطانی مواجه هستیم. از اینرو یافتن روش‌های جدید و کم‌خطر تر برای درمان این بیماری اهمیت ویژه‌ای خواهد داشت. یکی از ایده‌های نو در این حیطه، استفاده از همزمانی از شیمی - لیزر درمانی برای از بین بردن سلولهای سرطانی با کاهش عوارض جانبی می‌باشد. در کار تحقیقی ارائه شده برای رسیدن به این هدف، ابتدا پلیمرهای حساس به pH و دما با روش‌های پلیمریزاسیون کنترل شده سنتز و این پلیمر هوشمند بر روی نانو میله‌های طلا قرار می‌گیرند. سپس بارگذاری داروی دوکسوروبیسین انجام گردیده و این سیستم دارویی با توجه به اینکه حساس به عوامل محیطی می‌باشد و همچنین قادر به کنترل از بیرون بدن و با استفاده از لیزر درمانی است بنابراین قادر است با استفاده از شیمی درمانی و لیزر درمانی بیشترین رهش دارو در بافت سرطانی بدون آسیب زدن به سلول‌های سالم را انجام دهد.

واژه‌های کلیدی: شیمی - لیزر درمانی - نانو میله‌های طلا - داروی دوکسوروبیسین - پلیمریزاسیون رادیکالی زنده - مایسل پلیمری

¹ Young Researchers and Elite Clube, Marand Branch, Islamic Azad
University, Marand, Iran
Email:mahmoodzadeh.farideh@gmail.com

۱- مقدمه

سلول‌های سرطانی به علت سرعت رشد و متابولیسم سریع، نسبت به سلول‌های عادی به درمان هایپرترمیا (گرما افزایی) حساس‌تر هستند. به طور کلی چندین روش انتقال انرژی به بدن برای گرم کردن بافتهای بدن وجود دارد که شامل استفاده از میدان الکتریکی، تابش مایکروویو، استفاده از پالس‌های الکترومغناطیس، اولتراسوند و نور ناحیه مادون قرمز نزدیک می باشد. هنگام استفاده از روش های فوق برای گرمادرمانی یا لیزر درمانی، توزیع انرژی در تمامی نقاط تومور یکسان نیست و بافت سالم اطراف تومور نیز آسیب می‌بیند. گرما درمانی به واسطه ی نانوساختارهای طلا (فتوترمال تراپی) تاحدودی این مشکل را حل می کند(۱-۲).

استفاده از نانوساختارها به عنوان عواملی که بتوانند به صورت اختصاصی تنها در سلول‌های توموری تجمع و به عنوان مبدل انرژی (نانو ذرات می توانند انرژی تابیده شده را به گرما در سلول‌های توموری تبدیل کنند) عمل کنند، در سالیان اخیر به شدت مورد توجه بوده اند. نانوساختارهای طلا با جذب نور در ناحیه مرئی و مادون قرمز نزدیک (NIR) و نیز تولید سریع گرما در مدت زمان پیکوثانیه یا کمتر، ابزارهای بسیار خوبی برای تیمار هایپرترمیای سرطان نشان داده اند. علاوه بر این، نانوساختارهای طلا به عنوان یک عامل پخش کننده، ابزار مناسبی برای آشکار سازی سرطان از طریق خواص پراکندگی و فتولومینسانس نوری در روش‌های تصویربرداری سه بعدی درون تن^۱ می‌باشند (۳-۸).

با این حال اثربخشی این روش به دلیل آسیب احتمالی بافتهای سالم در اطراف تومور می‌تواند محدود شود و شاید نیاز به از بین بردن بخش‌های کوچکی در اطراف تومور باشد، که باقی‌مانده سلول‌های سرطانی است. در کار پژوهشی حاضر ترکیب همزمان شیمی درمانی و لیزر درمانی یک راهبرد جدید برای از بین بردن تمام تومور بدون آسیب دیدن سلولهای سالم می باشد. با این روش نانوذرات فعال شده با گرما، محتویات دارویی خود را درون تومور رهاسازی می‌کنند. رهش دارو دوبرابر شده و اثربخشی درمان افزایش می یابد(۹-۱۲).

۲- روش انجام آزمایش**۲-۱- سنتز دی هیدروکسی پلی کاپرولاکتون (PCL-S)₂**

(۲۱۲ میلی گرم، ۱/۳۷۵ میلی مول) بیس (۲- هیدروکسی اتیل) دی سولفید، (۰/۲۳۷ میلی مول، ۹۶ میلی گرم) اکتانوات قلع، (۱۰۳ میلی مول، ۱۲ گرم) کاپرولاکتون و ۲۰ میلی لیتر تولوئن به بالون سه دهانه تحت گاز نیتروژن اضافه گردید. مخلوط واکنش به مدت ده دقیقه گاززدایی و داخل حمام روغن با دمای ۱۰۰ درجه ی سانتی گراد قرار داده شد. اجازه داده شد. پلیمریزاسیون به مدت ۲۴ ساعت انجام گیرد. فرایند پلیمریزاسیون با سرد کردن بالون در حمام آب یخ، متوقف گردید. سپس مواد موجود بالون، در ۲۰۰ میلی لیتر متانول سرد رسوب داده شد. رسوب بدست آمده صاف و در آون خلا خشک گردید. پودر سفید رنگی بعد از خشک کردن بدست می آید. راندمان محصول ۷۷ درصد می باشد.

۲-۲- سنتز دی هیدروکسی پلی کاپرولاکتون پیوندی با عامل RAFT : (CTA-PCL-S)₂

(۳ میلی مول، ۰/۸ گرم) عامل RAFT، (۱،۲۴ گرم، ۶ میلی مول) دی سیکلو هگزیل کربو دی ایمید و ۷۰ میلی لیتر دی کلرومتان به بالون ته گرد تحت گاز نیتروژن اضافه گردید. واکنش به مدت سه ساعت در دمای اتاق همزده شد. سپس (۴ گرم، ۰/۴۸ میلی مول) دی هیدروکسی کاپرولاکتون، (۱۲/۰ گرم، یک میلی مول) دی متیل امینو پیریدین به بالون اضافه شد. مخلوط واکنش به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق همزده شد. در فرآیند واکنش اوره تشکیل می شود اوره بوسیله ی کاغذ صافی

^۱ In-vivo

5th International Conference On Recent Innovations in Chemistry and Chemical Engineering

ICCCE.ir

February, 2018, Tehran-Iran

جدا، زیر صافی در متانول سرد رسوب داده شد. سپس در اون خلا خشک و پودر زرد رنگی بدست آمد. راندمان محصول ۶۷ درصد می باشد

۳-۲- سنتز پلی *N*-ایزوپروپیل اکریل امید بلوک پلی کاپرولاکتون: (PNIPAAm-*b*-PCL-S)₂

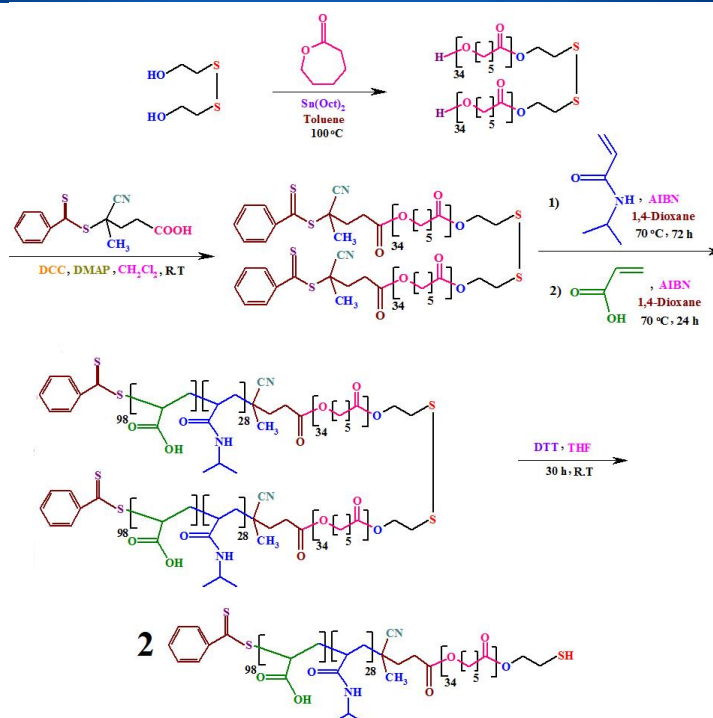
(۱/۶ گرم، ۱۵ میلی مول) *N*-ایزوپروپیل اکریل امید، (۲ میلی گرم، ۱۲ میکرومول) آغازگر آزوایزو بوتیرو نیتریل، ۱۰ گرم کاپرولاکتون پیوندی با عامل RAFT، ۸ میلی لیتر ۱ و ۴ دی اکسان خشک به بالون دو دهانه مجهز به کندانسور تحت گاز نیتروژن، اضافه شد واکنش به مدت بیست دقیقه در حمام آب و یخ گاز زدایی شد. سپس داخل حمام روغن با دمای ۷۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. بعد از ۷۲ ساعت، مخلوط واکنش در دی اتیل اتر سرد رسوب داده شد. رسوب زرد روشن بدست آمده صاف و در دمای اتاق خشک شد. راندمان محصول ۷۰ درصد می باشد.

۴-۲- سنتز پلی اکریلیک اسید بلوک پلی *N*-ایزوپروپیل اکریل امید بلوک پلی کاپرولاکتون: (PAA-*b*-PNIPAAm-*b*-PCL-S)₂

(۱ گرم، ۰/۰۶۸ میلی مول) ماکرو آغازگر (PNIPAAm-*b*-PCL-S)₂، ۱/۵ گرم مونومر اکریلیک اسید، دو میلی گرم آغازگر آزوایزو بوتیرو نیتریل، ۸ میلی لیتر ۱ و ۴ دی اکسان خشک به بالون دو دهانه مجهز به مبرد اضافه شد. مخلوط واکنش به مدت بیست دقیقه گاز زدایی شد. سپس بالون داخل حمام روغن با دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. بعد از ۲۴ ساعت، مخلوط واکنش در دی اتیل اتر سرد رسوب داده شد. رسوب زرد روشن بدست آمده صاف و خشک گردید. راندمان محصول ۶۸ درصد می باشد.

۵-۲- سنتز پلی اکریلیک اسید- بلوک - پلی *N*-ایزوپروپیل اکریل امید- بلوک- پلی کاپرولاکتون تیول دار: PAA-*b*-PNIPAAm-*b*-PCL-SH

(۲/۴ میلی گرم، ۰/۰۴۴ میلی مول) سدیم متوکسید، (۰/۱۵ گرم، یک میلی مول) دی تیوتریتول، (۱ گرم، ۰/۰۳۵ میلی مول) (PAA-*b*-PNIPAAm-*b*-PCL-S)₂، به بالون دارای ۵ میلی لیتر حلال تترا هیدرافوران تحت گاز آرگون اضافه شد. مخلوط واکنش به مدت سی ساعت در دمای اتاق همزده شد. پلیمر نهایی در دی اتیل اتر سرد رسوب داده شد. رسوب بدست آمده، صاف و در دمای اتاق خشک گردید. بعد از خشک شدن پودر شیری رنگی بدست می آید. شکل ۱ شمای کلی مراحل سنتز تری بلک را نشان می دهد.



شکل ۱: مراحل سنتز کوپلیمر تری بلوک تیول دار

۲-۶- سنتز نانو مایسل پلیمری

۵۰ میلی گرم کوپلیمر تری بلوک تیول دار (PAA-*b*-PNIPAAm-*b*-PCL-SH) در ده میلی لیتر دی متیل سولفوکسید حل شد. سپس محلول بدست آمده داخل کیسه ی دیالیز ریخته شد. کیسه ی دیالیز در یک لیتر آب دیونیزه قرار گرفت و هر یک ساعت آب بشر تعویض شد. بتدریج حلال دی متیل سولفوکسید از کیسه ی دیالیز خارج شد و آب جایگزین گردید. بعد از یک ساعت محلول داخل کیسه ی دیالیز کدر خیلی کم رنگ شد که نشان دهنده ی تشکیل مایسل ها می باشد. بعد از ۴۸ ساعت مایسل ها به طور کامل تشکیل شدند. محلول داخل کیسه ی دیالیز داخل ظرف شیشه ای برای استفاده های بعدی نگهداری شد.

۲-۷- سنتز نانو میله های طلای پوشش داده شده با دودکان تیول : GNRs-DDT

نانومیله های طلا طبق رفرنس (۱۳) سنتز گردید سپس یک میلی لیتر محلول نانو میله ی طلای سانتیفریژ شده با دو میلی لیتر دودکان تیول به مدت سی ثانیه التراسونیک شد. سپس ۴ میلی لیتر استون ریخته و به آرامی هم زده شد تا دو فاز از هم جدا شود فاز پایینی آب و فاز بالایی استون همراه با نانو میله می باشد. فاز بالایی در تولوئن دیسپرس گردید. محلول کلونیدی حاصل دوبار سانتیفریژ شد تا دودکان تیول اضافی حذف شود. سپس نانومیله های طلا در دمای اتاق خشک گردید.

۲-۸- سنتز نانو میله های طلا پوشش داده شده با کوپلیمر تری بلوک تیول دار : GNRs@polymer

دو میلی گرم نانو میله ی طلای خشک شده (بند ۲-۷) در ۱ میلی لیتر تولوئن دیسپرس شد. سپس ۰/۰۲ گرم پلیمر حل شده در ۵۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکسید به آن اضافه گردید. بعد از ۲۴ ساعت، تولوئن باقی مانده با قراردادن ظرف در زیر هود به مدت یک روز خارج شد. نانو میله ی همراه با پلیمر داخل کیسه ی دیالیز منتقل شد و در یک لیتر بشر حاوی آب

5th International Conference On Recent Innovations in Chemistry and Chemical Engineering

ICCCE.ir

February, 2018, Tehran-Iran

دیونیزه قرار داده شد. نانو میله ی پوشش داده شده با پلیمر بعد از ۴۸ ساعت تشکیل شد. سپس محلول داخل کیسه ی دیالیز داخل بشر منتقل شد و زیر هود با تبخیر آب موجود در محلول برای کارهای کشت سلولی تغلیظ گردید

۹-۲- روش بارگذاری داروی دوکسوروبیسین بر روی GNRs@polymer

داخل با لون ۲۰۰ میلی گرم نانو کامپوزیت (GNRs@polymer) در ۲۰ میلی لیتر آب دیونیزه دیسپرس شد. ۲۰ میلی گرم داروی دوکسوروبیسین به داخل بالون اضافه شد. مخلوط واکنش به مدت ۴۸ ساعت در تاریکی انجام شد. تا بارگذاری دارو به طور کامل انجام شود. سپس داروی بارگذاری نشده از طریق سانتریفوژ خارج شد. محلول روی سانتریفوژ در ظرف جداگانه نگهداری شد تا مقدار داروی بارگذاری نشده محاسبه گردد. مخلوط زیر سانتریفوژ خشک گردید. مقدار داروی لود شده ۹۶/۸ درصد برای نانومیله ی پوشش داده شده با پلیمر می باشد. که از طریق رابطه ی زیر محاسبه می گردد.

EE: مقدار داروی لود شده

C_T: مقدار کل داروی استفاده شده

C_{DOX}: مقدار داروی موجود در نانوکامپوزیت

$$EE(\%) = \frac{(C_T - C_{DOX})}{C_T} \times 100$$

۱۰-۲- رهش دارو در دما و pH های مختلف

۶۰ میلی گرم از نانوکامپوزیت حاوی دارو، داخل ۶ عدد میکرو تیوب هر کدام ۱۰ میلی گرم ریخته شد. سپس دمای انکوباتور را در ۳۷ °C تنظیم گردید و محلول های بافر فسفات سالین (PBS) ۷/۴، ۵/۴ و ۴ برای همدم شدن قبل از شروع رهش داخل انکوباتور قرار داده شد. سپس داخل میکرو تیوب های حاوی نانوکامپوزیت-دارو سه بافر ۷/۴، ۵/۴ و ۴ می ریزیم و در زمانهای مختلف نمونه برداری کرده و جذب آن توسط دستگاه UV-Vis در طول موج ۲۷۲ و ۴۷۰ نانومتر اندازه گیری شد. نمونه برداری تا زمانی که جذب آن به ۰/۱ کاهش یابد ادامه می یابد و نتایج به دست آمده بصورت نمودار درصد رهش دارو-زمان تبدیل گردید.

۱۱-۲- بررسی سمیت پلیمر و نانوکامپوزیت حاوی دارو روی رده سلولی MCF-7

در این مطالعه رده سلولی MCF-7 که از بانک سلول انستیتو پاستور ایران خریداری شده این رده سلولی در محیط کشت اختصاصی 1640-RPMI حاوی ده درصد سرم گاوی FBS و مقادیر کافی از آنتی بیوتیک های پنی سیلین و استرپتومایسین و انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد حاوی ۵٪ دی اکسید کربن مرطوب در فلاسک کشت سلول، کشت داده شد.

۱۲-۲- بررسی تاثیرات سایتوتوکسیک (سمیت) داروها

برای انجام این کار در پلیت های ۹۶ خانه با دانسیته ۵۰۰۰ الی ۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه سید می شوند و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور انکوبه می شوند سپس به وسیله دوزهای مختلف داروی اختصاصی دوکسوروبیسین و نانوکامپوزیت به صورت آزاد و بارگذاری شده در نانوکامپوزیت به فاصله های زمانی ۲۴ ساعت تیمار می شوند سپس تحت تابش لیزر با طول موج ۱۰۶۴ و دستگاه لیزر پالسی قرار گرفت. بعد از ۲۴ ساعت با محلول MTT (۵۰ میلی گرم از پودر MTT در ۱۰ میلی لیتر

5th International Conference On Recent Innovations in Chemistry and Chemical Engineering

ICCCE.ir

February, 2018, Tehran-Iran

PBS حل شده و سپس توسط فیلتررد گردیده) به مدت ۴ ساعت انکوبه شده و سپس کریستال‌های فورمازان تشکیل شده با کمک DMSO حل شده و نهایتاً "جذب هر نمونه توسط الیزا ریدر قرائت می‌شود.

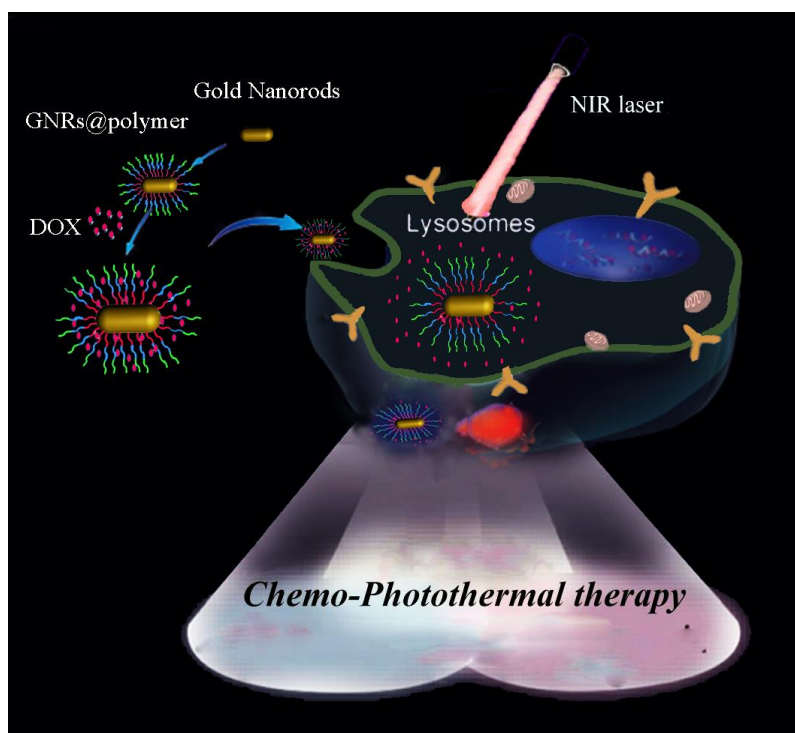
۲-۱۳- رنگ آمیزی سلولی

اساس و پایه رنگ آمیزی ترکیب مولکول‌های ماده رنگی مورد نظر با مولکول‌های اندامک‌های سلولی یا اجزای هدف می‌باشد ۴و۶-دی آمینو-۲-فنیل ایندول (DAPI)، عضوی از رنگهای فلوروسنت که پیوند قوی با کروماتین دارد استفاده گردید. درکار پژوهشی حاضر سلولهای MCF-7 بر روی پلیت‌های هشت خانه ی شیشه ای رشد داده شدند. سپس نمونه‌های مختلف با غلظت 25 µg/mL بر روی سلولها افزوده شد. بعد از ۲۴ ساعت سلولها در معرض تابش لیزر ۱۰۶۴ نانومتر قرار داده شدند. بعد تابش، سلولها به مدت ۲۴ ساعت دیگر در انکوباتور قرار گرفتند. سپس سل‌ها با محلول بافر فسفات شستشو داده شد و فرمالدهید ۴٪ و محلول دپی اضافه شد و در نهایت توسط میکروسکوپ فلورسنتی تصویربرداری انجام شد

۳- نتایج و بحث

مطالعات بالینی نشان داده اند که گرما درمانی به عنوان روشی برای مقابله با بافتهای سرطانی می‌تواند مفید باشد، به شرط اینکه عوارض جانبی کمی داشته باشد. عدم توزیع حرارت در تمامی سلول‌های توموری و نیز تیمار حرارتی سلول‌های سالم چالشی است که در بیشتر روش‌های گرما درمانی حتی روش‌های گرما درمانی منطقه‌ای و ناحیه‌ای وجود دارد. فوتوترمال تراپی به واسطه‌ی نانو ساختارهای طلا می‌تواند تا حدودی این مشکل را حل کند، زیرا نانوذرات این توانایی را دارند تا به صورت هدفمند و اختصاصی وارد بافتهای توموری و سلولهای سرطانی شوند و در نتیجه فقط سلولهای سرطانی را تحت تاثیر قرار دهند. با این حال تنها با فوتوترمال تراپی، امکان از بین بردن سلولهای سرطانی بدون آسیب دیدن سلولهای سالم وجود ندارد. درنتیجه درکار پژوهشی حاضی با ترکیب فوتوترمال تراپی و شیمی درمانی سعی کردیم کاهش سلولهای سرطانی را به حداکثر برسانیم.

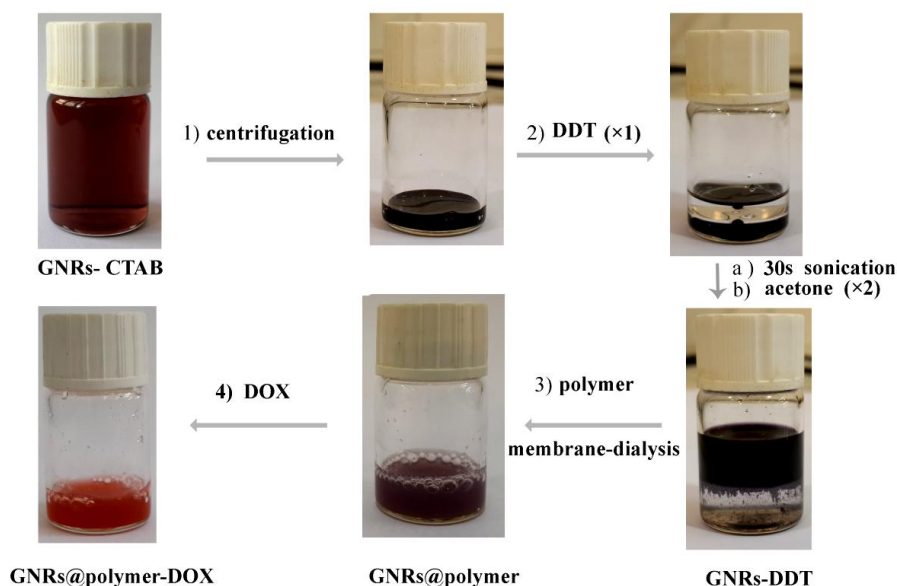
در ابتدای کار: نانومیله‌های طلا سنتز گردید، سپس طبق شکل (۲) با پلیمرهای هوشمند سنتزی پوشش داده شد و شیمی -لیزر درمانی بر روی نانومایسل سنتزی انجام گردید.



شکل ۲: مراحل فوتوترمال تراپی و بارگذاری دارو بر روی نانومیله های طلا (لیزر ۱۰۶۴ نانومتر)

۳-۱- بررسی سنتز GNRs@polymer/DOX

شکل (۳) تمام مراحل لازم برای سنتز GNRs@polymer/DOX را نشان می دهد. در مرحله ی اول رنگ قهوه ای محلول GNRs نشان از سنتز موفقیت آمیز نانومیله های طلا به طول ۸۰ نانومتر می باشد. نانومیله های طلا سه بار سانتریفیوژ و شستشو داده می شود تا سورفکتانت داخل محلول حذف شود. برای حذف کامل سورفکتانت به اندازه ی دو برابر محلول نانومیله، دودکان تیول اضافه شد. سپس به اندازه ی دو برابر دودکان تیول استون ریخته شد و سی ثانیه تحت التراسونیک قرار گرفت تا تیول های دودکان تیول به نانومیله ی طلا متصل شود. بعد از کمی همزدن نانومیله های طلا از فاز پایینی (آب و دودکان تیول) به فاز بالایی (استون) منتقل می شود. سپس فاز بالایی GNRs-DDT با تری بلوک سنتزی وارد واکنش می شود برای تشکیل مایسل و حذف فاز آلی محلول دیالیز می شود و در انتها داروی ضد سرطان دوکسوروبیسین به GNRs@polymer متصل می شود.

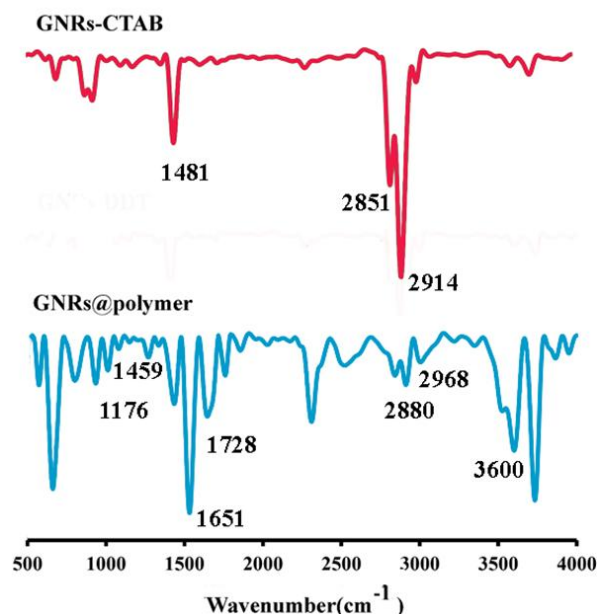


شکل ۳: تصویر مراحل لازم برای تهیه ی GNRs@polymer/DOX

۲-۳- بررسی طیف FT-IR و UV-Vis

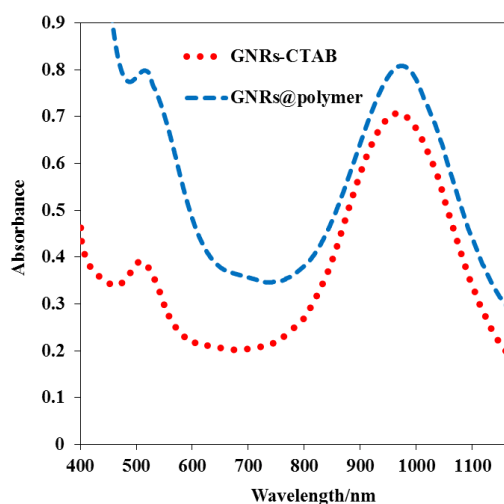
شکل (۴) طیف FT-IR و GNRs @polymer و GNRs-CTAB را نشان می دهد. همانطور که مشاهده می شود نانومیله های طلا همراه با سورفکتانت (GNRs-CTAB) پیک های قوی در 2851 cm^{-1} و 2914 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی C-H سورفکتانت CTAB نشان می دهد.

بعد از پوشش دادن نانومیله های طلا با کوپلیمر تری بلوک سنتزی GNRs@polymer پیک های مشخصی در 1728 cm^{-1} و 2968 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی C-H الیفاتیک ، ارتعاشات کششی گروه کربونیل پلی کاپرولاکتون 1728 cm^{-1} و گروه کربونیل پلی ایزوپروپیل اکریل امید 1651 cm^{-1} مشاهده می شود. همچنین ارتعاشات کششی C-O-C نامتقارن و متقارن به ترتیب در 1459 cm^{-1} و 1176 cm^{-1} مشاهده می شود. پیک موجود در 3600 cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی امید و گروه هیدروکسیل کربوکسیلیک اسید می باشد.



شکل ۴: طیف FT-IR GNRs-CTAB و GNRs@polymer

خواص نوری نانو میله های طلا بوسیله ی طیف UV-Vis بررسی شد. نانو میله های طلا دو جذب در حوالی ۵۱۵ و ۹۷۱ نانومتر بسته به شرایط واکنش نشان می دهند که به ترتیب مرتبط به رزونانس ارتعاشات عرضی و طولی نانو میله های طلا می باشد. بعد از اینکه سطح نانو میله های طلا با پلیمر تری بلوک پوشش داده شد طول موج ماکسیمم از ۹۷۱ به ۹۸۸ نانومتر به دلیل تغییر در ضریب شکست (پوشش پلیمری) جابجایی پیدا می کند. این نتایج نشان می دهد نانو میله های پوشش داده شده با پلیمر می توانند در محدوده ی NIR (600_1400 nm) نور را جذب کنند و گرما تولید کنند تا از طریق گرم کردن تومورهای سرطانی باعث کاهش سلولهای سرطانی شوند.



شکل ۵: طیف UV-Vis ترکیب GNRs-CTAB و نانو کامپوزیت GNRs@polymer

۳-۳- بررسی طیف میکروسکوب الکترونی عبوری TEM

همانطور که در بحث های قبلی گفتیم شکل A (۶) سنتز نانو مایسل های پلیمری با اندازه ی ۳۰ و پراکندگی خوب را نشان می دهد.

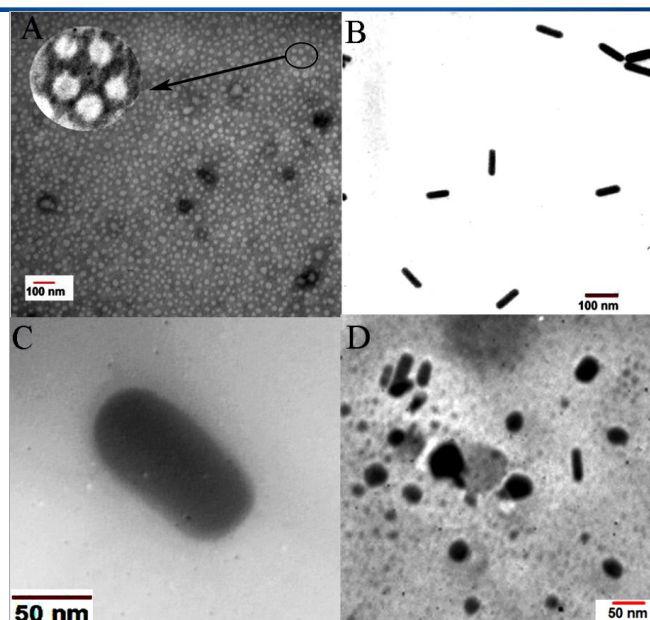
5th International Conference On Recent Innovations in Chemistry and Chemical Engineering

ICCCE.ir

February, 2018, Tehran-Iran

تصویر TEM نانومیله های طلا با اندازه ی یکنواخت و طول ۸۳ نانومتر به طور میانگین در شکل B مشاهده می شود بعد از پوشش نانومیله های طلا با کوپلیمر تری بلوک تیول دار هاله ی کم رنگ اطراف نانومیله طلا مشاهده می شود که نشان از پیوند پلیمر یا خودتجمعی پلیمر بر روی نانومیله می باشد (شکل C).

شکل D نشان می دهد وقتی نانومیله ی طلا همراه با پوشش پلیمری در معرض لیزر ۱۰۶۴ نانومتر با توان (137mj/pulse, 3min) قرار می گیرد شکل نانومیله ها در اثر لیزر تغییر پیدا می کند که نشان از جذب لیزر توسط نانومیله ، تولید گرما و تغییر شکل نانومیله ها در اثر گرمای تولیدی می باشد .



شکل ۶: تصویر TEM (a) کوپلیمر تری بلوک سنتزی PCL-b-PNIPAAm-b-PAA-SH (b) GNRs@polymer (137mj/pulse, 3min) (c) GNRs (D) GNRs@polymer در محلول آب

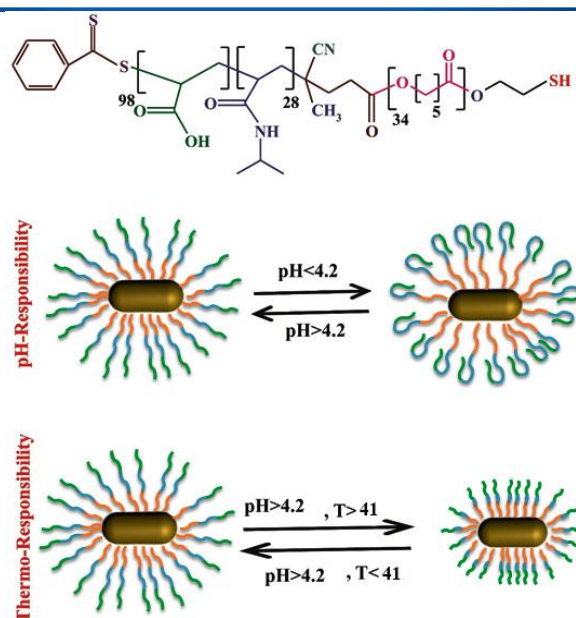
۳-۴: بررسی نتایج DLS نانومیله ی پوشش داده شده با پلیمر: GNRs@polymer تحت دما و pH

رفتار خود تجمعی کوپلیمر تری بلوک GNRs@polymer بوسیله ی آنالیز DLS بررسی شد. نتایج نشان می دهد پلی اکریلیک اسید بسته به پروتونه شدن و دپروتونه شدن خواص آگریز و آب دوست در محلول های با pH های متفاوت نشان می دهد. بنابراین زنجیر پلی اکریلیک اسید در pH های مختلف بر اندازه ی مایسل تاثیر میگذارد. همانطور که در شکل ۷ نشان داده شده است. در همه ی pH ها پلی کاپرولاکتون مرکز هسته را تشکیل می دهد. علاوه بر این در محلول های اسیدی پلی کاپرولاکتون و پلی اکریلیک اسید در هسته و پلی ایزوپروپیل اکریل امید در پوسته قرار می گیرد. اما برعکس در pH های بالاتر به خاطر دپروتونه شدن گروههای کربوکسیلیک اسید، پلی کاپرولاکتون و پلی ایزوپروپیل اکریل امید در هسته اما پلی اکریلیک اسید در پوسته قرار می گیرد. شکل ۷ نشان می دهد با کاهش pH از ۴/۵ به ۳/۵ اندازه ی مایسل از ۳۴۴ به ۲۰۴ نانومتر به خاطر پیوند هیدروژنی بین زنجیر های پلی اکریلیک اسید، کاهش می یابد. زمانی که pH به ۵/۵ افزایش می یابد قطر مایسل ها از ۳۴۴ به ۴۸۶ نانومتر به خاطر افزایش الکترواستاتیک بین زنجیر پلی اکریلیک اسید. در مایسل و دپروتونه شدن گروههای کربوکسیلیک اسید افزایش مییابد. همچنین با افزایش دما به دلیل اینکه زنجیر و پلی ایزوپروپیل اکریل امید روی کاپرولاکتون جمع می شود. اندازه مایسل ها کاهش می یابد.

5th International Conference On Recent Innovations in
Chemistry and Chemical Engineering

ICCCE.ir

February, 2018, Tehran-Iran



شکل ۷: بررسی رفتار خود تجمعی GNRs@polymer در دما و pH های مختلف

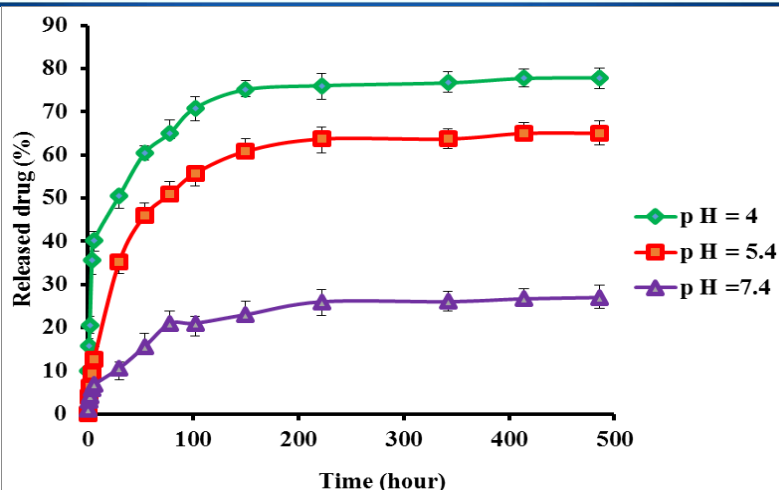
۳-۵- مطالعه رهش دارو در دما و pH های مختلف

نتایج بدست آمده برای رهش داروی دوکسوروبیسین در شکل ۸ و ۹ خلاصه شده است. رهش دارو در pH های مختلف برای GNRs@polymer/DOX بررسی شد. همانطور که مشاهده می شود رهش دارو در pH= 4/5 بیشتر از pH های دیگر می باشد زیرا در محیط اسیدی گروههای کربوکسیل اکریلیک اسید پروتون دار می شود و باعث می شود دارو سریعتر آزاد شود. اما برعکس در محیط خنثی پلی اکریلیک اسید به طور کامل دیپروتونه می شود و برهم کنش قوی بین دارو و بار منفی اکریلیک اسید ایجاد می شود در نتیجه رهش دارو کند تر می شود. همچنین در دماهای بالاتر پوسته مایسل تجمع پیدا می کند و قطر مایسل کوچکتر می شود و باعث می شود رهش دارو سریعتر شود. توجه به نتایج بدست آمده رهش دارو در دمای ۵۰ درجه بیشتر از دمای ۳۷ درجه می باشد. همچنین به دلیل پیوند هیدروژنی قوی گروههای امین و هیدروکسی مولکول دوکسوروبیسین با زنجیر پلیمر، رهش کامل دارو انجام نمی شود.

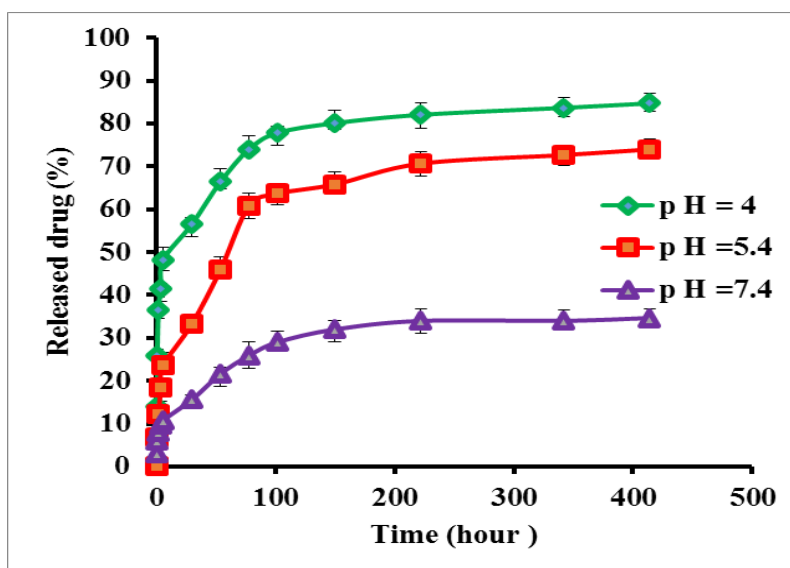
درصد سرعت رهش دارو با توجه به معادله ی روبرو بدست می آید.

$$R = M_1 / M_0$$

M_0 مقدار داروی بارگذاری شده به پلیمر، M_1 مقدار داروی آزاد شده از تری بلوک سنتزی را نشان میدهد



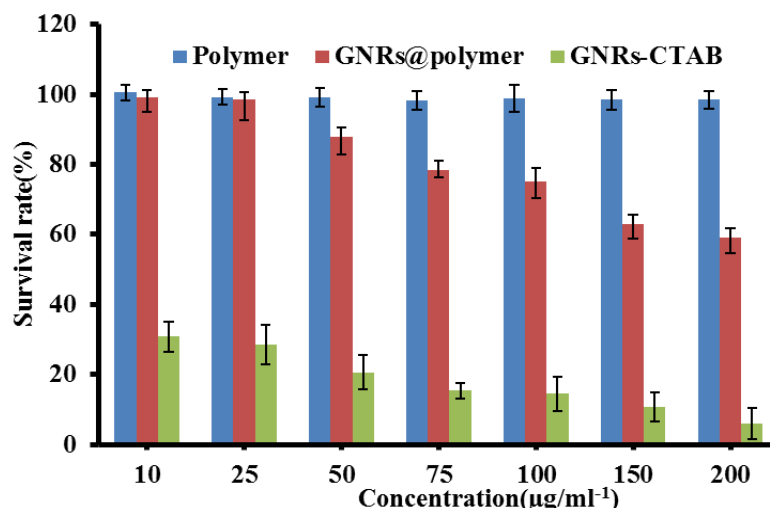
شکل ۸: نمودار رهش دارو برحسب زمان GNRs@polymer/DOX در pH های مختلف در دمای 37 °C



شکل ۹: نمودار رهش دارو برحسب زمان GNRs@polymer/DOX در pH های مختلف در دمای 50 °C

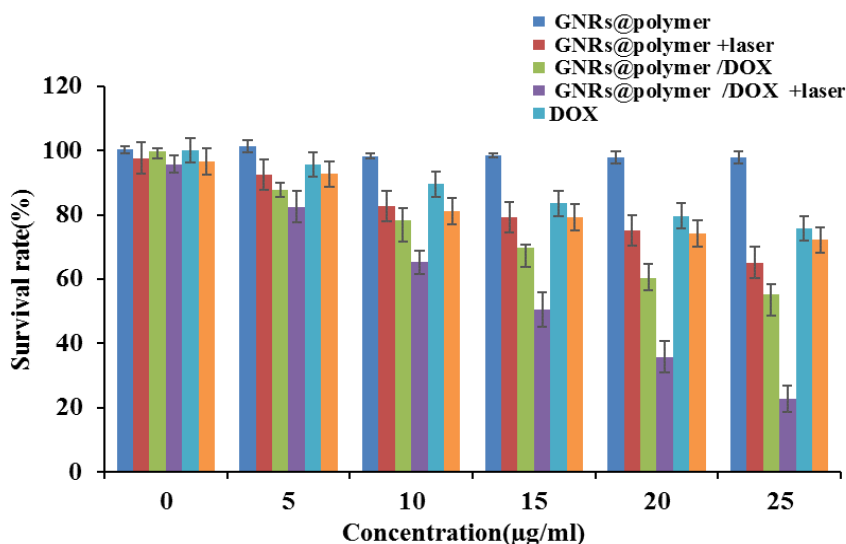
۳-۶- تست سمیت و نتایج شیمی - لیزر درمانی

نتایج تست سمیت: همانطور که در شکل ۱۰ مشاهده می شود نانومیله های طلا GNRs - CTAB خیلی سمی می باشد اما پلیمر تا غلظت های بالا سمیت نشان نمی دهد و با پوشش دادن پلیمر بر روی نانو میله ی طلا، سمیت نانو میله ی طلا همراه با پوشش پلیمری GNRs@polymer خیلی کاهش می یابد و این نشان می دهد که پلیمر به خوبی سطح نانو میله را پوشش داده است. و ترکیب سنتزی GNRs@polymer برای فوتوترمال تراپی و شیمی درمانی خیلی مناسب می باشد.



شکل ۱۰ : نمودار درصد زنده ماندن سلولهای سرطانی MCF7 برحسب غلظت های مختلف پلیمر (Polymer) - نانومیله ی طلا همراه با سورفکتانت (GNRs-CTAB) - نانومیله ی پوشش داده شده با پلیمر GNRs@polymer

شکل ۱۱ درصد زنده ماندن سلولهای سرطانی را نسبت به غلظت های مختلف DOX ، GNRs@polymer ، GNRs@polymer-DOX با لیزر و بدون لیزر پالسی (1064 nm; 137 mJ/pulse, 3 min) نانومتر نشان می دهد. همانطور که مشاهده می شود سلولهای سرطانی بدون اعمال لیزر هیچ گونه سمیت را نشان نمی دهند. در حالی که بعد از اعمال لیزر ۱۰۶۴ نانومتر سلولهای سرطانی با افزایش غلظت به طور قابل توجهی کاهش می یابد. در غلظت $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ حدودا ۶۵ درصد سلولها کاهش می یابد. که نشان از اثر فوتوترمال تراپی می باشد. اما وقتی که در همان غلظت ، GNRs@polymer-DOX، تحت لیزر پالسی قرار می گیرد مقدار سلولهای سرطانی به ۲۱ درصد می رسد که خیلی کمتر از شیمی درمانی (GNRs@polymer/DOX:55%) و یا فوتوترمال تراپی (GNRs@polymer:65%) می باشد. این نتایج نشان می دهد که شیمی -لیزر درمانی در کنار هم می تواند تاثیرات خیلی زیادی برای از بین بردن سلولهای سرطانی داشته باشد. چرا که وقتی از لیزر همراه با دارو استفاده می شود اعمال لیزر باعث می شود دمای محیط بالاتر از LCST تری بلوک شود و باعث شود مایسل از حالت swelling به حالت shrink گرایش پیدا کند و مقدار رهش دارو زیاده تر شود. همچنین با اعمال لیزر نانومیله های طلا شروع به جذب لیزر و تبدیل آن به گرما و در نهایت افزایش دمای محیط می شوند که این افزایش دما باعث کاهش سلولهای سرطانی می شود .

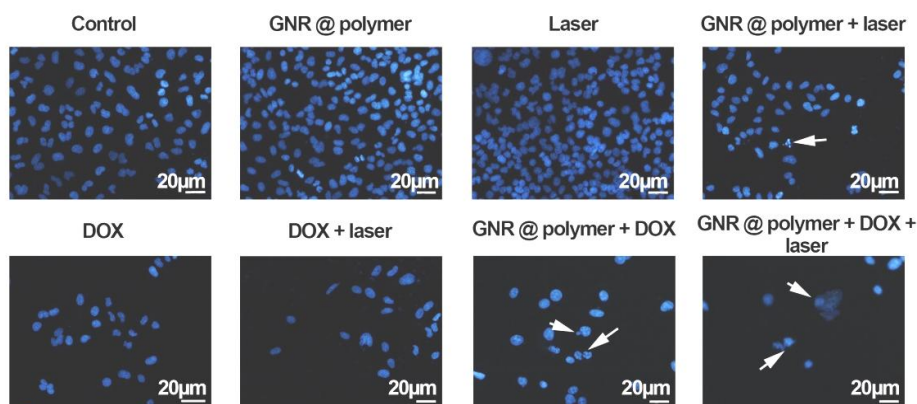


شکل ۱۱: نمودار درصد زنده ماندن سلولهای سرطانی MCF-7 ترکیبات، با غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر تحت تابش لیزر و بدون لیزر پالسی (808 nm)

۷-۳- بررسی تست رنگ آمیزی سلولی

DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole)، یک رنگ فلورسنت که به شدت به مناطق A-T غنی از DNA متصل می شود. و به طور وسیعی در میکروسکوپ فلورسانس استفاده می شود. همچنین می تواند از طریق عبور از غشاء سلول برای رنگ آمیزی سلول زنده و مرده استفاده می شود، زیرا عبور آن از غشاء سلول های زنده کمتر بوده و در نتیجه اثر بخشی لکه پایین تر است.

بر اساس نتایج بدست آمده از تست DAPI، سل های تری ت شده با GNRs@polymer-DOX + laser انتقال کروماتین را در مقایسه با سل های رشد یافته در مقایسه با نمونه های ذکر شده در شکل ۱۲ نشان داده شده است. با توجه به شکل فرکانس انتقال کروماتین در سل های تری ت شده با GNRs@polymer-DOX + laser بیشتر از نمونه های ذکر شده در تصویر می باشد که نشان می دهد نانوکامپوزیت GNRs@polymer-DOX می تواند در نانوپزشکی کاربرد داشته باشد.



شکل ۱۲: تصاویر فلورسانس سلولهای MCF-7 تری شده با GNRs@polymer، GNRs@polymer-DOX، DOX، و بدون لیزر (1064 nm; 137 mJ/pulse, 3 min)

۴- نتیجه گیری

در کار پژوهشی حاضر نانو مایسل تیول دار سنتز شد سپس گروههای تیول به نانومیله های طلا وصل گردید و بارگذاری داروی دوکسوروبیسین انجام شد و در انتها به سلولهای سرطانی تزریق گردید و تحت تابش لیزر پالسی ۱۰۶۴ نانومتر با توان ۱۳۷ میلی ژول بر هر پالس به مدت ۳ دقیقه قرار گرفت .

جزئیات و نتایج پژوهش بدین صورت می باشد که کوپلیمر تری بلاک تیول دار از طریق پلیمریزاسیون رادیکالی زنده و حلقه گشا سنتز شد سپس پوشش نانو میله های طلا و بارگذاری داروی دوکسوروبیسین انجام شد . بارگذاری ورهش دارو در pH و دماهای مختلف بررسی شد و نتایج نشان داد با کاهش pH و افزایش دما رهش دارو زیاد می شود.

تست سمیت نانو کامپوزیت نسبت به طلا بررسی شد و نتایج نشان داد که با پوشش دادن پلیمر سمیت به طور قابل توجهی کاهش می یابد و تا غلظت ۲۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر سمیت به طور قابل توجهی کاهش می یابد .

سلولهای سرطانی MCF7 حاوی نانو میله های طلا- پلیمر - دارو ، نانو میله های طلا- پلیمر و داروی دوکسوروبیسین تحت تابش لیزر پالسی با طول موج ۱۰۶۴ نانومتر قرار گرفتند نتایج نشان می دهد، در صد کشندگی سلولهای سرطانی در لیزر پالسی بیشتر می باشد. و نتایج شیمی - لیزر درمانی نانو میله طلا- پلیمر- دارو ، بهتر از داروی تنها و نانو میله طلا - پلیمر می باشد پس با استفاده ی همزمان از شیمی درمانی و لیزر درمانی درصد کشندگی سلولهای سرطانی خیلی بیشتر می باشد. نتایج نشان می دهد نانو کامپوزیت GNRs@polymer -DOX می تواند در نانوپزشکی کاربرد داشته باشد.

تشکر و قدردانی

باتشکر از باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی - مرند ، دانشکده ی فنی مهندسی - دانشگاه تبریز ، دانشکده ی علوم نوین پزشکی و مرکز تحقیقات کاربردی دارویی برای حمایت از پروژه

مراجع

- 1- Huang, X., Jain, P. K., El-Sayed, I. H., & El-Sayed, M. A. (2008). Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. *Lasers in medical science*, 23(3), 217.
- 2- Huang, X., & El-Sayed, M. A. (2010). Gold nanoparticles: optical properties and implementations in cancer diagnosis and photothermal therapy. *Journal of advanced research*, 1(1), 13-28.
- 3- El-Sayed, I. H., Huang, X., & El-Sayed, M. A. (2006). Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles. *Cancer letters*, 239(1), 129-135.
- 4- Khlebtsov, B., Zharov, V., Melnikov, A., Tuchin, V., & Khlebtsov, N. (2006). Optical amplification of photothermal therapy with gold nanoparticles and nanoclusters. *Nanotechnology*, 17(20), 5167.
- 5- Baek, S. K. (2011). Clinical Application of Nanotechnology. *Korean Journal of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery*, 54(3), 185-191

5th International Conference On Recent Innovations in Chemistry and Chemical Engineering

ICCCE.ir

February ,2018 ,Tehran-Iran

- 6- Huang, X., El-Sayed, I. H., Qian, W., & El-Sayed, M. A. (2006). Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. *Journal of the American Chemical Society*, 128(6), 2115-2120.
- 7- Kim, J., Park, S., Lee, J. E., Jin, S. M., Lee, J. H., Lee, I. S., ... & Hyeon, T. (2006). Designed fabrication of multifunctional magnetic gold nanoshells and their application to magnetic resonance imaging and photothermal therapy. *Angewandte Chemie*, 118(46), 7918-7922.
- 8- Ji, X., Shao, R., Elliott, A. M., Stafford, R. J., Esparza-Coss, E., Bankson, J. A., ... & Li, C. (2007). Bifunctional gold nanoshells with a superparamagnetic iron oxide– silica core suitable for both MR imaging and photothermal therapy. *The Journal of Physical Chemistry C*, 111(17), 6245-6251.
- 9- Huang, P., Lin, J., Li, W., Rong, P., Wang, Z., Wang, S., ... & Leapman, R. D. (2013). Biodegradable gold nanovesicles with an ultrastrong plasmonic coupling effect for photoacoustic imaging and photothermal therapy. *Angewandte Chemie*, 125(52), 14208-14214.
- 10- Coates, A., Abraham, S., Kaye, S. B., Sowerbutts, T., Frewin, C., Fox, R. M., & Tattersall, M. H. N. (1983). On the receiving end—patient perception of the side-effects of cancer chemotherapy. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 19(2), 203-208.
- 11- Lerman, C., Rimer, B., Blumberg, B., Cristinzio, S., Engstrom, P. F., MacElwee, N., & Seay, J. (1990). Effects of coping style and relaxation on cancer chemotherapy side effects and emotional responses. *Cancer Nursing*, 13(5), 308-315.
- 12- Lindley, C., McCune, J. S., Thomason, T. E., Lauder, D., Sauls, A., Adkins, S., & Sawyer, W. T. (1999). Perception of chemotherapy side effects cancer versus noncancer patients. *Cancer practice*, 7(2), 59-65.
- 13- Xu, X., Zhao, Y., Xue, X., Huo, S., Chen, F., Zou, G., & Liang, X. J. (2014). Seedless synthesis of high aspect ratio gold nanorods with high yield. *Journal of Materials Chemistry A*, 2(10), 3528-3535.