

استفاده از نانوميله های طلا در درمان سلول های سرطانی سینه به روش نورگرما درمانی و بررسی توزیع بافتی آن در مدل موشی

محسن کلانتری^۱، کاظم پریور^۱، مجتبی صلوتی^۲، مهرداد حمیدی^۳، سعید عمادی^۴

۱- گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران. Saloutim@yahoo.com

۳- مرکز تحقیقات نانو تکنولوژی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران.

۴- دانشکده علوم زیستی، مرکز تحصیلات تکمیلی در علوم پایه، زنجان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۱

چکیده

زمینه و هدف: روش های مختلفی برای درمان سرطان سینه وجود دارد که بعضی از آن ها استاندارد و رایج بوده و برخی در مرحله آزمایش های بالینی است. فوتوترمال تراپی روشی است که در آن از انرژی نور لیزر به طور انتخابی جهت ایجاد گرمای کافی برای از بین بردن سلول های سرطانی استفاده می شود. در تحقیق حاضر اثر درمانی نانوميله های طلا به روش نورگرما درمانی پلاسمونی و به عنوان یک روش غیر تهاجمی بر روی سلول های سرطانی سینه بررسی گردید.

روش کار: نانوميله های طلا با پیک جذبی ۸۰۸ نانومتر به روش Seed-mediated growth سنتز و با پلی اتیلن گلیکول تیوله پوشش دار گردیده و مشخصات آن با استفاده از تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) و اسپکتروفوتومتر مرئی-فرا بنفش (UV-vis) تایید شد. پایداری و زیست پذیری آن ها به روش تست MTT بررسی گردید. سپس با استفاده از لیزر مادون قرمز نزدیک (NIR) با طول موج ۸۰۸nm، توان ۸۰mW و بصورت پیوسته به مدت ۳ دقیقه، اثر درمانی این کمپلکس بر روی سلول های سرطانی سینه (رده سلولی SK-BR-3) به صورت برون تنی مورد مطالعه قرار گرفت. هم چنین توزیع بافتی کمپلکس در بدن موش BALB/c سالم بررسی شد.

یافته ها: تصاویر میکروگراف نشان داد که نانوميله ها به طور میانگین دارای طول 37 ± 5 و عرض 12 ± 3 نانومتر بوده و هم چنین وجود دو پیک جذبی ۸۰۴ و ۵۲۰ نانومتر به دست آمده از طیف جذبی UV-vis میله ای بودن و اندازه نانوذرات را تایید کرد. در طی مطالعات فوتوترمال تراپی برون تنی، کمپلکس GNR-PEG به همراه تابش نور لیزر باعث مرگ ۳۲٪ از سلول های سرطانی سینه (SK-Br-3) نسبت به گروه کنترل گردید. نتایج توزیع بافتی نشان داد که کمپلکس سنتز شده، توزیع غیر طبیعی در بدن ندارد.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق بیان گر توانایی درمان بافت سرطانی سینه با استفاده از نانوميله های طلای پوشش دار شده به روش فوتوترمال تراپی در مدل موشی می باشد. می توان با نشان دار کردن نانوميله های طلا (از قبیل آنتی بادی) راندمان درمان را بالا برد و درمان را اختصاصی نمود تا از آسیب به سلول های سالم جلوگیری شود.

واژه های کلیدی: سرطان سینه، فوتوترمال تراپی، نانوميله های طلا، نور مادون قرمز نزدیک (NIR).

مقدمه

این سرطان دومین عامل مرگ و میر زنان در اثر سرطان در ایران و جهان می باشد. در ایران سالیانه ۹۷۹۵ مورد جدید از سرطان سینه شناسایی می شود که حدود ۲۵ درصد از سرطان ها را در بر می گیرد (۱۹). انواع روش های درمانی برای بیماران مبتلا به سرطان سینه

با وجودی که در سال های اخیر پیشرفت های مهمی در زمینه تشخیص زودرس و درمان به موقع و کاهش مرگ و میر برای سرطان سینه در زنان ایجاد شده است، اما هنوز این سرطان در بین زنان ایرانی همانند سایر کشورها، شایع ترین سرطان می باشد (۲).

وجود دارد. بعضی از درمان ها استاندارد و رایج است و بعضی انواع درمان در مرحله آزمایش در پژوهش های بالینی است. یکی از چالش های موجود در زمینه درمان سرطان این است که روش های متفاوت درمانی به تنهایی یا همراه با هم به نحوی استفاده شوند که بیمار حداکثر فایده را ببرد (۲۶). یکی از ایده های نو در این حیطه، به کارگیری نانو ذرات در تشخیص و درمان تعدادی از سرطان های رایج می باشد. به دلیل تنوع در ساختار و خصوصیات منحصر به فرد مواد در مقیاس نانو از جمله خواص نوری، الکترونیکی، مغناطیسی و کاتالیتیکی، می توان از نانو ذرات در زمینه تصویربرداری، تشخیص و درمان سرطان ها بهره برداری نمود (۲۸). در میان نانو ذرات، نانو ذرات طلا به خاطر خصوصیات عملکردی سطحی و توانایی ایجاد گرما به واسطه نور مورد توجه می باشند (۱). نانو ذرات طلا به دلیل پدیده رزونانس پلاسمون سطحی (حرکت جمعی الکترون های هدایتی)، به شدت نور را جذب کرده و آن را به انرژی حرارتی تبدیل می کنند. بنابراین زمانی که توده کوچکی از ذرات طلا توسط فرکانس مشخصی از لیزر تحریک می شوند، شروع به گرم کردن میدانی با شعاع هزار برابر بزرگتر از اندازه خود می کنند که این گرمای تولید شده باعث ضربه زدن به سلول های توموری و منهدم کردن آن ها می شود. از این خصوصیت نانو ذرات طلا می شود در از بین بردن سلول های سرطانی با روشی به نام فوتوترمال تراپی استفاده نمود (۲۲، ۳). نانومیله طلا یکی از اشکال نانو ذرات طلا می باشد. نانومیله های طلا مزایای زیادی جهت استفاده در درمان دارند. یکی از آن ها این است که دارای جذب نوری ۲۰ برابر یا بیشتر نسبت به سایر اشکال نانو ذرات طلا می باشند. هم چنین دارای دو وجه رزونانس پلاسمون سطحی طولی و عرضی می باشند و توانایی بالاتری در جذب نور رزونانس

پلاسمون طولی خود دارند. طول موجی از نور که در آن رزونانس طولی صورت می گیرد به وسیله نسبت طول به عرض نانومیله ها (Aspect ratio) کنترل می شود (۲۷، ۱۳). کمترین جذب نور در بیشتر بافت های بدن طول موج های ۷۰۰ الی ۹۰۰ نانومتر می باشند که گاهی اوقات به این ویژگی، پنجره بافت امواج مادون قرمز نزدیک (NIR tissue window) می گویند (۲۰). بنابراین نانو میله های طلا با نسبت تصویر ۳:۱ و ۴:۱ که دارای رزونانس پلاسمون در این پنجره هستند برای درمان مفید می باشند، زیرا استفاده از آن ها ریسک آسیب به سلول های سالم را در نتیجه جذب نور توسط کروموفورهای ذاتی را کاهش می دهد (۲۳). در تحقیق حاضر به دلایل فوق از نانومیله های طلا استفاده گردید. یافته ها حاکی از آن است که سلول های سرطانی در مقایسه با سلول های سالم، نسبت به حرارت بالا حساس تر می باشند. افزایش حرارت در ناحیه هدف ممکن است به وسیله منابع گرمایی متعددی از قبیل لامپ های مادون قرمز، اولتراسوند، فرکانس های رادیویی و لیزر صورت بگیرد (۱۷، ۱۴). در درمان های رایجی که از لیزر استفاده می شود، با تابش مستقیم اشعه ی لیزر بافت سرطانی را تخریب می کنند و به علت عدم کنترل گرما، حرارت ناشی از برخورد لیزر بافت سالم را نیز تحت تاثیر قرار می دهد. اما محققان دریافته اند که با به کارگیری نانو ذرات به عنوان جذب کننده نور و تبدیل آن به گرما، می توان تا حد قابل توجهی این اثرات را از بین برد. در روش فوتوترمال تراپی پلاسمونیک یا PPTT (Plasmonic Photothermal Therapy)، از پرتو مادون قرمز نزدیک یا (Near Infrared) NIR ایجاد شده توسط لیزر استفاده می شود تا از طریق پوست به اعماق نفوذ کند و توسط نانومیله های طلا جذب شده و تبدیل به حرارت گردد (۲۵). برای به کارگیری نانو میله های طلا

ولی ابقاء آن‌ها ضعیف است. اگرچه پس از ترکیب با یک لیگاند هدف، ابقاء در تومور به میزان زیادی بهبود می‌یابد و تقویت می‌شود. هدف‌گیری فعال را می‌توان از طریق باند کردن لیگاندهای گوناگون به سطح نانوذرات کسب نمود. لیگاندهایی نظیر پپتیدها، فاکتورهای رشد، ترانس‌فرین، آنتی‌بادی‌ها یا قطعات آن‌ها مثل تک‌زنجیره ۷، ترکیبات کوچکی مثل فولات که می‌تواند سلول‌های سرطانی را تشخیص دهد. از جمله این سیگنال‌های بیولوژیک، آنتی‌بادی‌ها هستند که بیشتر مورد توجه می‌باشند (۳۶). اولین استفاده از نانوذرات طلا در فوتوترمال تراپی پلاسمونیک به سال ۲۰۰۳ بر می‌گردد. در این سال Pitsillides و همکارانش نشان دادند که به کمک نانوذرات طلای هدفمند شده، می‌توان درمان فوتوترمال انتخابی انجام داد. آن‌ها از گرم شدن نانوذرات با پالس‌های کوتاه لیزر، در حالی که فقط جذب نور اتفاق افتاده استفاده کردند. آن‌ها نانوذرات طلای متصل به anti-CD28 را با لنفوسیت‌های T انکوبه کردند. سپس نانوذرات وارد شده به داخل لنفوسیت‌ها را توسط لیزر پالس با طول موج ۵۶۵ نانومتر تحریک و بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها را از بین بردند (۳۲). El-sayed و همکارانش در سال ۲۰۰۶ با استفاده از نانوکره‌های هدف‌مند با آنتی EGFR (اندازه ۴۰ نانومتر) نسبت به درمان فوتوترمال سلول‌های سرطانی که بیان بالای EGFR دارند اقدام کردند. درمان با لیزر ۵۱۴ نانومتر نشان داد که درمان سلول‌های سرطانی بیان‌کننده EGFR با شدت لیزر حدود 25 W/cm^2 به نتیجه رسید ولی سلول‌های کراتینوسیت خوش‌خیم انسانی که EGFR بیان نمی‌کنند با لیزر 57 W/cm^2 درمان شدند که آن‌ها هم حاصل اتصال غیر اختصاصی نانوذرات بود (۱۲). هدف از این تحقیق هدف‌گیری غیرفعال تومور با استفاده از نانومیله‌های

در این روش و استفاده از آن در داخل موجود زنده، بایستی توجه داشت که پاکسازی سریع نانو ذرات از خون توانایی درمان آن‌ها را محدود می‌کند. جهت دستیابی به ماندگاری طولانی در سیستم گردش موجود زنده، اندازه ذرات بایستی کمتر از ۱۰۰ نانومتر باشد و به منظور اجتناب از حذف آن‌ها توسط ماکروفاژها، بایستی سطح آبدوست داشته باشند. یک روش مرسوم و موثر برای کاهش پاکسازی نانوذرات توسط سیستم ایمنی، استفاده از مشتقات پلی‌(اتیلن گلیکول) (PEG) در سطح آن‌ها است. این مولکول یک لایه محافظتی آبدوست روی سطح نانوذرات ایجاد کرده و میان‌کنش آن‌ها را با اجزاء خون کاهش می‌دهد. همین‌طور، اپسونیزاسیون به وسیله پروتئین‌های خون و حذف نانوذرات توسط ماکروفاژهای MPS را نیز کم کرده و اجازه ماندگاری طولانی مدت در خون را به نانوذرات می‌دهد (۷). برای استفاده از نانوذرات طلا در فوتوترمال تراپی می‌توان از دو روش هدف‌گیری فعال و غیرفعال استفاده نمود. هدف‌گیری غیرفعال با تکیه بر اثرات دارویی منحصر به فرد نانوذرات، از قبیل پاک‌سازی توسط کلیه و اثر افزایش نفوذپذیری و بقاء (EPR) در تومور می‌باشد. در تومورها به علت این که ساختار عروق معیوب می‌باشد دیواره عروق منفذدار می‌شود. آنژیوژنز و ایجاد عروق به این خاطر است که سلول‌های تومور سریع‌تر تکامل یافته و نیاز به تهیه غذا و اکسیژن بالا می‌باشد. این پدیده به نام اثر EPR معروف است. در نتیجه، افزایش نفوذپذیری عروق، نانوذرات با اندازه ۵۰-۵۰۰ نانومتری می‌توانند به صورت انتخابی تحویل بافت توموری گردند. در مقابل، نانوذرات خیلی ریز (کمتر از ۳۰-۲۰ نانومتر) می‌توانند به راحتی از دیواره مویرگ‌های منفذدار در تومور عبور کرده و به وسیله انتشار نیز به گردش خون باز گردند. بنابراین ذرات ریز نفوذپذیری خوبی دارند

گردید، سپس ۶۰۰ میکرولیتر از سدیم بور هیدرید (NaBH_4) ۱۰ میلی مولار به محلول اضافه و واکنش برای دو ساعت در بن ماری ۳۰ درجه قرار گرفت تا رنگ محلول به رنگ طلایی متمایل به قهوه ای کم رنگ در آید (این محلول seed نامیده می شود). حال بایستی محلول growth تهیه شود. بدین منظور ۲۰۰ میکرولیتر از محلول طلای یک میلی مولار به ۴/۷ml CTAB ۰/۲ مولار و ۴۰ میکرولیتر محلول نترات نقره ۴ میلی مولار اضافه گردید. ۳۲ میکرولیتر از محلول آسکوربیک اسید ۷۸/۸ میلی مولار به محلول فوق اضافه و به آرامی هم زده شد تا رنگ محلول شفاف شود (این محلول، محلول growth نامیده می شود). در این مرحله ۲۱ میکرولیتر از محلول seed، به محلول growth، بدون هم زدن اضافه و محلول حاصل برای دو ساعت انکوبه شد. نانومیله های طلای سنتز شده به وسیله روش فوق تقریباً ۱۲ نانومتر عرض و ۳۸ نانومتر طول دارند و دارای ماکزیمم طول موج جذبی پلاسمون حدود ۸۰۰ نانومتر هستند که جهت تایید خصوصیات ظاهری نانومیله های سنتز شده و تایید اندازه آن ها میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) استفاده گردید. غلظت نانومیله های طلا توسط دستگاه اسپکترومتر جذب اتمی تعیین شد. بدین صورت که از محلول طلای استاندارد که خریداری، سه محلول با غلظت های ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در لیتر تهیه شده و با توجه به این غلظت ها، نمونه مورد نظر توسط دستگاه تعیین غلظت گردید. جهت بررسی پایداری نانومیله های طلای سنتز شده به مدت شش ماه، هر ماه مقداری از محلول نانومیله سنتز شده داخل کووت ریخته شده و طیف جذبی آن در محدوده ۴۰۰ الی ۹۰۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر جذبی نور مرئی- فرابنفش بررسی گردید (۳۳).

طلای پوشیده شده با روکش PEG و بررسی اثر سیتوتوکسیک آن روی سلول های سرطان سینه به روش فوتوترمال تراپی در شرایط برون تنی و بررسی توزیع بافتی کمپلکس سنتز شده در موش BALB/c سالم می باشد. در صورت کسب نتایج مثبت از تحقیق همین کار به صورت هدف مند انجام خواهد شد. بدین ترتیب که نانومیله های طلا با آنتی بادی کونژوگه شده و پس از اتصال اختصاصی آن به سلول های سرطانی اثر درمان فوتوترمال در مدل موشی آزمایش خواهد شد.

مواد و روش ها

مواد شیمیایی مختلف جهت سنتز نانومیله های طلا و پوشش دار کردن آن ها از قبیل پلی اتیلن گلیکول تیول دار (mPEG-SH)، متیل تiazول تترازولیوم (MTT)، دی متیل سولفوکساید (DMSO)، آسکوربیک اسید، کلرید طلا (HAuCl_4)، سدیم بور هیدرید و نترات نقره از شرکت سیگما خریداری، محلول استیل تری متیل آمونیوم بروماید (CTAB)، اسید کلریدریک، اسیدنیتریک از شرکت Merck خریداری شدند. رده سلولی SK-BR-3 (مربوط به آدنوکارسینوما سینه) از مرکز ذخایر ژنتیکی تهیه شد. موش BALB/c ماده هم خون ۵-۷ هفته ای از بخش حیوانات انستیتو پاستور کرج خریداری گردید. محیط کشت سلول، محلول ها، مکمل ها و معرف های لازم جهت کشت سلول از شرکت زیست ایده نو ترکیب تهیه شد. نانومیله های طلا به روش Seed-mediated growth سنتز و تمامی وسایل شیشه ای جهت سنتز با محلول تیزاب سلطانی (نسبت ۳ به ۱ از اسید کلریدریک و اسیدنیتریک) شستشو گردید. روش کار به شرح ذیل می باشد (۱۱، ۱۰): ۲۵۰ میکرولیتر محلول کلرید طلا (HAuCl_4) یک میلی مولار به ۷/۵ml محلول استیل تری متیل آمونیوم بروماید (CTAB) ۰/۲ مولار اضافه

PEG اضافه کرده و بعد از گذشت ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای اتاق، نمونه در میکروتیوب به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ می-شود. محلول رویی جدا شده و طیف جذب نوری آن در محدوده ۵۰۰ تا ۹۰۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر جذبی UV-visible گرفته شد. اگر جذب کمپلکس طی ۲۴ ساعت بدون تغییر باقی بماند حاکی از آن است که دارای پایداری مناسبی در خون باشد (۱۱). جهت استفاده کمپلکس در شرایط درون، بایستی زیست سازگاری آن ارزیابی شود. از روش هایی که می توان با آن می توان تاثیر مواد مختلف در میزان تکثیر و زنده بودن سلول ها را ارزیابی کرد، تست MTT می باشد که یک آزمون رنگ سنجی برای اندازه گیری فعالیت متابولیکی سلول ها است. اساس این تست بر پایه توانایی آنزیم های اکسیدوردوکتاز سلولی وابسته به NADPH در احیاء نمک زرد رنگ MTT به فورمازان نامحلول بنفش رنگ می باشد. بنابراین این تست با استفاده از فعالیت احیاکنندگی آنزیم های سلول در تبدیل ترکیب ترازولیوم به کریستال های نامحلول در آب فورمازان، زنده بودن یا زیست پذیری (viability) سلول ها را ارزیابی می کند. عمل احیاکنندگی توسط دهیدروژنازهای مستقر در میتوکندری سلول های زنده و آنزیم هایی که در اندامک های دیگر از قبیل شبکه آندوپلاسمی وجود دارند انجام می گیرد. در تست MTT، جهت حل کردن کریستال های بنفش رنگ فورمازان از حلال هایی نظیر دی متیل سولفوکساید (DMSO) استفاده می گردد. پس از حل شدن فورمازان با استفاده از حلال، محلول رنگی به وجود می آید که می توان میزان جذب آن را در طول موج معین (معمولاً بین ۵۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر) توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه گیری نمود. میزان رنگ تولید شده با تعداد سلول هایی که از نظر متابولیک فعال

جهت تهیه کمپلکس نانومیله طلا- پلی اتیلن گلیکول (GNR-PEG)، ۵ میلی لیتر از نانومیله های طلای سنتز شده با روکش CTAB (در ۵ میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری، هر کدام ۱ میلی لیتر) با دور rpm ۱۴۰۰۰، دو بار سانتریفیوژ و رسوب حاصل در ۵ میلی لیتر آب دیونیزه حل گردید (جهت حذف CTAB). ۵۰ میکرو لیتر پلی اتیلن گلیکول تیول دار (mPEG-Thiol ۱ میلی مولار با وزن مولکولی ۵۰۰۰ دالتون به ۵ میلی لیتر از محلول افزوده و در دمای اتاق به مدت یک شبانه روز ساعت انکوبه گردید. بعد از پلی اتیلن گلیکوله کردن نانوکونژوگه، محلول ۲ بار با دور rpm ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید تا کمپلکس از مواد اضافی پاک شده و خالص سازی صورت گیرد. در نهایت، مخلوط نهایی (GNR-PEG) با افزودن PBS رقیق شد تا چگالی نوری ۱ در طول موج حدود ۸۰۰ نانومتر (پیک جذب نانومیله های طلا سنتز شده) به دست آید (۲۴، ۱۸). جهت تایید کمپلکس ساخته شده از روش اسپکتروسکوپی جذبی مرئی-فرا بنفش (UV-visible) استفاده گردید. این روش یکی از تکنیک های رایج و متداول جهت تایید اتصال نانوذرات به مولکول های بیولوژیکی می باشد. طیف جذبی کمپلکس حاصل در محدوده ۹۰۰-۴۰۰ نانومتر توسط دستگاه گرفته شد. در صورت اتصال موفق، پیک جذبی نانومیله به طول موج های بالاتر شیفیت خواهد یافت (۳۷، ۳۵). در خون عوامل مختلفی از قبیل یون ها (مثل Ca^{+2} ، H^+ ، Na^+ ، Cl^-)، پروتئین ها، لیپیدها، هیدروکربن ها و ترکیبات سلولی مخلف وجود دارد که می توانند بر روی پایداری و عملکرد کمپلکس تولید شده اثر بگذارند. بنابراین بایستی پایداری و عملکرد کمپلکس ساخته شده در شرایط درون تنی مورد ارزیابی قرار گیرد. بدین منظور به هر ۱ ml از خون هپارینه، مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر از کمپلکس GNR-

هستند رابطه مستقیم دارد (۲۱). زیست سازگاری کمپلکس GNR-CTAB و GNR-PEG به این روش بر روی رده سلولی SK-BR-3 مورد ارزیابی قرار گرفت. به این ترتیب که در پلیت استریل ۹۶ خانه‌ای، به هر چاهک مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل حاوی حدوداً ۱۰۰۰۰ سلول اضافه و در انکوباتور CO₂ دار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت و چسبیدن سلول ها به کف پلیت، چاهک ها با بافر فسفات سالین شستشو داده شد تا سلول های متصل نشده و مرده حذف گردند. در مرحله بعد به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر محلول GNR-PEG و یا کمپلکس GNR-CTAB و یا غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر به همراه ۸۰ میکرولیتر محیط کشت اضافه شده و ۲۴ ساعت در انکوباتور CO₂ دار و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. پس از گذشت زمان مورد نظر محیط رویی هر چاهک برداشته شده و معرف MTT به مقدار ۱۰٪ حجم محیط کشت و غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر به همراه محیط کشت به هر چاهک حاوی سلول اضافه و پس از گذشت ۴ ساعت محیط رویی هر چاهک به آرامی و به نحوی که کریستال های فورمازان خارج نشود، برداشته شد. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شده و چندین بار به آرامی با سمپلر پیتاژ شد تا کریستال های فورمازان به طور کامل حل شوند. سپس پلیت به مدت نیم ساعت و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه و جذب نوری محلول رنگی تشکیل شده توسط دستگاه الیزا ریدر در طول موج

$$100 \times \left(\frac{\text{میانگین جذب نمونه تحت درمان}}{\text{میانگین جذب نمونه کنترل}} \right) = \text{درصد بقای سلول ها}$$

درصد سلول های زنده - ۱۰۰ : درصد سمیت

۵۷۰ نانومتر اندازه گیری شد (۳۴، ۱۵). درصد بقای

سلول و درصد سمیت سلولی نیز طبق روابط زیر محاسبه گردید (۲۹). تمامی آزمایشات سه بار تکرار شد. جهت بررسی اثر درمانی کمپلکس GNR-PEG بر روی سلول های سرطانی در محیط کشت سلولی از رده سلولی SK-BR-3 استفاده شد. این سلول به صورت زنده خریداری شده و در زیر هود لامینار و در شرایط کاملاً استریل کشت داده شدند. محیط DMEM جهت کشت این سلول و جهت شمارش سلول ها نیز از روش MTT استفاده شد. سلول ها در پلیت ۹۶ خانه ای به تعداد ۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک کشت داده شدند (در هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت). خانه های پلیت به ۳ گروه ۶ تایی تقسیم شده و آزمایش های زیر بر روی آن ها انجام گرفت: یک گروه ۱۰۰ میکرولیتر GNR-PEG به هر خانه اضافه شده و به مدت ۶ ساعت انکوبه گردید. در مرحله بعد محیط کشت اضافه شده و تابش نور لیزر مادون قرمز نزدیک (۸۰۸ nm) به مدت سه دقیقه با شدت لیزر ۸۰mW انجام شد. گروه بعدی ۱۰۰ میکرولیتر GNR-PEG به هر خانه اضافه شده و به مدت ۶ ساعت انکوبه گردید. به این گروه لیزر تابانده نشد. گروه آخر هم بدون تیمار (گروه کنترل) می باشد. در مرحله بعد جهت ارزیابی درمان، سلول های زنده با روش MTT شمارش شدند. نتیجه مورد انتظار این است که اکثریت سلول های سرطانی سینه در اثر فوتوترمال تراپی با کمپلکس GNR-PEG در مقایسه با سلول های گروه کنترل مرده باشند (۱۶، ۱۲، ۸). جهت آزمایش توزیع بافتی در موش های سالم، موش-های BALB/c ماده همخون سالم با عمر حدود ۵-۷ هفته خریداری شده و به مدت یک هفته تا شروع آزمایش ها، در اتاق حیوانات نگهداری گردیدند تا خود را با شرایط آزمایشگاه وفق یابند. جهت بررسی توزیع بافتی آزمایش زیر انجام شد: ۹ سر موش در ۳ گروه ۳ تایی تقسیم گردید و سپس ۱۵۰ میکرولیتر

ANOVA)، آزمون تعقیبی LSD استفاده گردید. تمامی محاسبات و آزمون های آماری در محیط نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد و در کل تحقیق سطح معنی ۰/۰۵ = لحاظ شده است.

نتایج

شکل ۱ الف تصویر میکروگراف نانومیله های سنتز شده را نشان می دهد. این تصویر مورفولوژی میله ای بودن نانوذرات سنتز شده را تایید می کند. متوسط طول و عرض نانومیله ها با استفاده از نرم افزار ImageJ اندازه گیری شد. نانومیله های سنتز شده به طور میانگین دارای طول 37 ± 5 نانومتر و عرض 12 ± 3 نانومتر می باشند. پیک جذب نوری نانومیله های طلای سنتز شده که توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-vis تعیین شده است در شکل ۱ ب نمایش داده شده است. همان گونه که در شکل دیده می شود، نانومیله های سنتز شده دارای دو پیک رزونانس پلاسمون سطحی هستند. یک پیک قوی در طول موج 808 نانومتر که در نتیجه نوسانات الکترونی در امتداد طولی نانومیله و پیک کوچکتر 520 نانومتر که در نتیجه نوسانات الکترونی عبور یافته از پهنای نانومیله می باشد. با استفاده از دستگاه اسپکترومتر جذب اتمی غلظت نانومیله ها تعیین شده 55 ppm یا میلی گرم در لیتر است. نتایج تست پایداری نیز نشان داد که نانومیله های طلا سنتز شده با روکش CTAB دارای پایداری قابل ملاحظه ای به مدت ۴ ماه هستند و طیف جذبی آن ها طی این مدت دچار پهن شدگی و یا کاهش شدید شدت جذب نمی گردد. جهت تایید پوشش دار شدن نانومیله های طلا با پلی اتیلن گلیکول نیز از روش طیف سنجی جذبی مرئی-فرابنفش (UV-vis) استفاده گردید که نتایج آن به این صورت می باشد: همان گونه که در نمودار ۱ مشاهده می شود، در نتیجه اتصال مولکول های PEG به نانومیله های طلا شیفتهی در

کمپلکس با غلظت 100 میکروگرم در میلی لیتر به هر موش از طریق ورید دمی تزریق گردید. در زمان های ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تزریق، موش ها کشته شده و اندام های حیاتی هر یک از موش ها شامل خون، کبد، معده، کلیه و قلب در هر یک از ساعت های ذکر شده جداسازی شده و هر کدام از آن ها جداگانه وزن شدند. در مرحله بعد هر یک از ارگان ها به طور جداگانه در بوته چینی قرار داده شدند و حدود 1 میلی لیتر اسید سولفوریک به بوته چینی اضافه گردید. بعد از گذشت ۲۴ ساعت و مشاهده لیز ارگان ها، نمونه ها بر روی هیتر با دمای 100 درجه سانتی گراد (در زیر هود) قرار داده شد تا اسیدسولفوریک باقی مانده بخار شود. رسوب حاصل در بوته چینی در تیزاب سلطانی (مخلوطی از محلول اسیدنیتریک و اسیدکلریدریک) حل گردید. نمونه ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد تا حلال آن تبخیر گردد. سپس هر یک از نمونه ها در 10 سی سی HCl $0/5$ نرمال حل گردیدند. در مرحله بعد غلظت کمپلکس در هر یک از ارگان ها با استفاده از اسپکتروفوتومتر جذب اتمی محاسبه و غلظت نانوذرات طلای جذب شده بر حسب درصد دوز تزریق شده در هر گرم از بافت، بر حسب ID/g% با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید. تعداد موش های مورد آزمایش برای هر ساعت سه سر بود (۴، ۵، ۹).

$$\%ID = \frac{\text{غلظت نانوذرات در بافت لیز شده} \times \text{وزن بافت}}{\text{غلظت نانوذرات در تزریق شده} \times \text{وزن کل موش}} \times 100$$

جهت تجزیه و تحلیل داده های تحقیق از دو بخش آمار توصیفی و آمار استنباطی استفاده شد. در بخش آمار توصیفی از شاخص های میانگین، انحراف معیار، کمینه و بیشینه استفاده شد و در بخش آمار استنباطی از آزمون های آنالیز واریانس یک طرفه (One Way

گروه ۱: کونژوگه GNR-PEG بدون لیزر

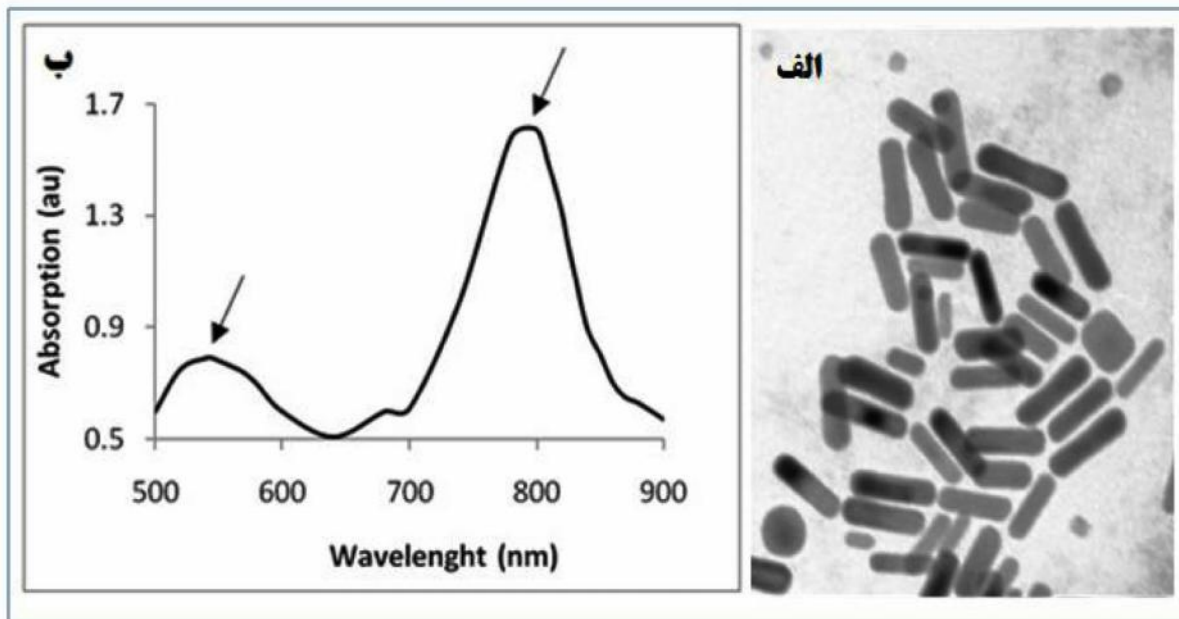
گروه ۲: کونژوگه GNR-PEG با لیزر

گروه ۳: گروه کنترل بدون کونژوگه و بدون لیزر

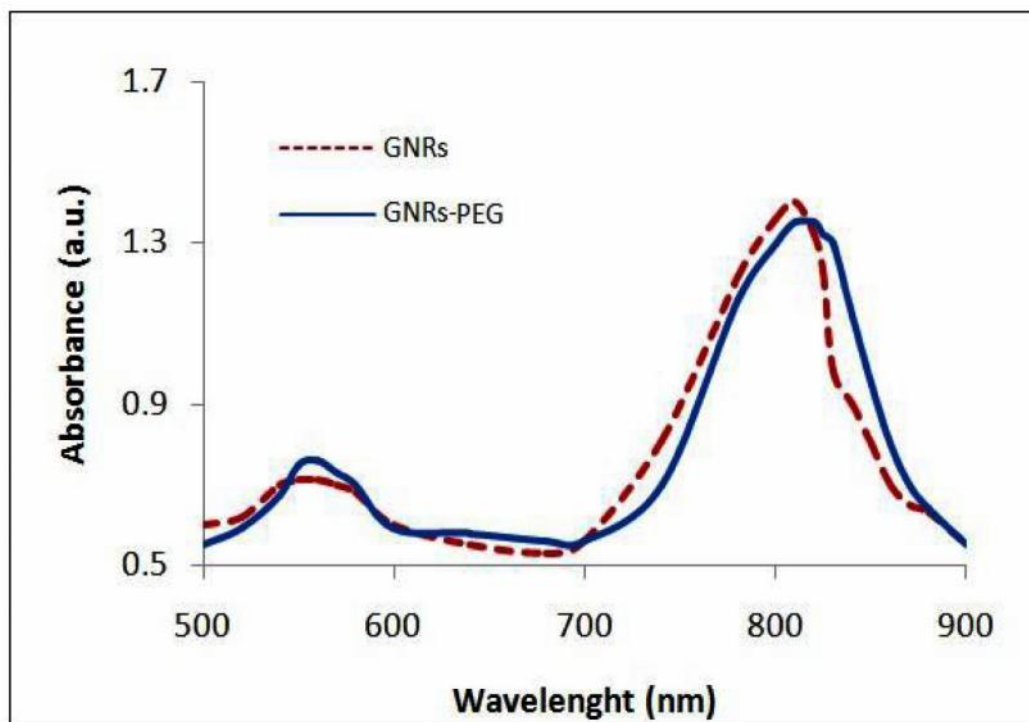
گروه ۴: لیزر تنها

همان گونه که در نمودار ۴ دیده می شود، در گروه یک که شامل کمپلکس بدون تابش لیزر می باشد، به دلیل خارج ساختن پوشش CTAB و پوشیده شدن نانومیله ها با PEG از سمیت آن بسیار کاسته شده و در این رده تعداد اندکی از سلول ها (حدود ۶٪ و ۴٪) از بین رفته اند که با نتایج به دست آمده از تست سمیت سلولی مطابقت دارد. گروه شماره دو که گروه اصلی می باشد، پس از تابش لیزر نانومیله های موجود در کمپلکس نور لیزر را جذب کرده و با ایجاد حرارت باعث مرگ حدود ۳۲٪ سلول ها شده است. شکل نمودار ۵ توزیع بافتی کونژوگه را در بازه های زمانی ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از تزریق وریدی آن به موش های سالم به صورت دوز تزریق شده بر حسب هر گرم از ارگان (%ID/g) نشان می دهد. همان گونه که در نمودار مشاهده می شود حدود ۷٪ از دوز کونژوگه تزریق شده در هر گرم، به واسطه سیستم (Reticuloendothelial system) RES توسط کبد برداشت شده است.

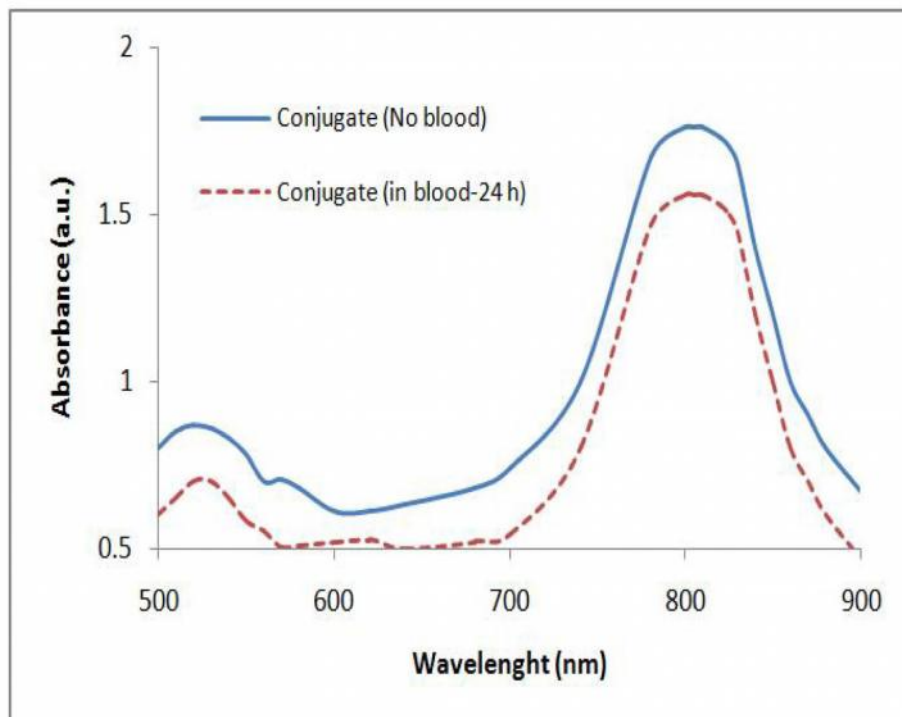
حدود ۶ نانومتر به سمت طول موج های بالاتر به وجود می آید که این مساله نشان دهنده این است که نانومیله های طلا به خوبی پوشش دار شده اند. کمپلکس سنتز شده با توجه به نمودار ۲، در خون نیز دارای پایداری قابل ملاحظه ای در خون است که علت آن اتصال روکش پلی اتیلن گلیکول تیول دار آن می باشد. لذا می توان نتیجه گرفت که کونژوگه GNR-PEG پتانسیل لازم جهت مطالعات *in vivo* را دارد. نتایج حاصل از مطالعات تست سمیت کمپلکس GNR-PEG که در نمودار ۳ نمایش داده شده است نشان می دهد که درصد سلول های زنده در این کمپلکس حدود ۹۴٪ است که نشان دهنده زیست سازگاری بالای آن می باشد (P ۰/۰۵). در حالی که GNR-CTAB به دلیل وجود CTAB، سمیت بسیار بالایی را نشان داده و باعث مرگ حدود ۸۵٪ از سلول ها شد. این نتایج نشان داد که کمپلکس GNR-PEG برای سلول ها سمی نبوده و به خوبی توسط آن ها تحمل می شود. بازده و کارایی کونژوگه GNR-PEG به عنوان عامل فوتوترمال تراپی جهت از بین بردن سلول های سرطانی سینه روی سلول های SK-BR-3 در شرایط برون تنی به روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. سلول های در پلیت های ۹۶ خانه ای کشت شده و تاثیر مواد ذیل در حیات سلول ها مورد بررسی قرار گرفت:



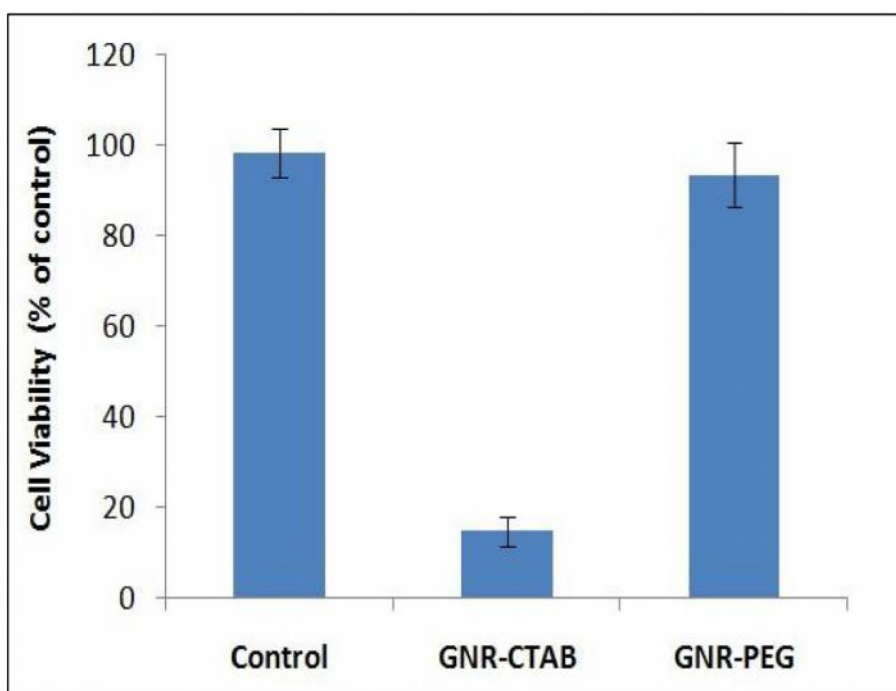
شکل ۱- الف) میکروگراف نانومیله های سنتز شده که توسط میکروسکوپ TEM تهیه شده است (Scale bars = 50 nm). ب) در این منحنی طیف جذبی نانومیله های طلای سنتز شده مشاهده می شود. این نانومیله ها در طول موج ۸۰۸ نانومتر دارای بیشترین میزان جذب نور می باشند.



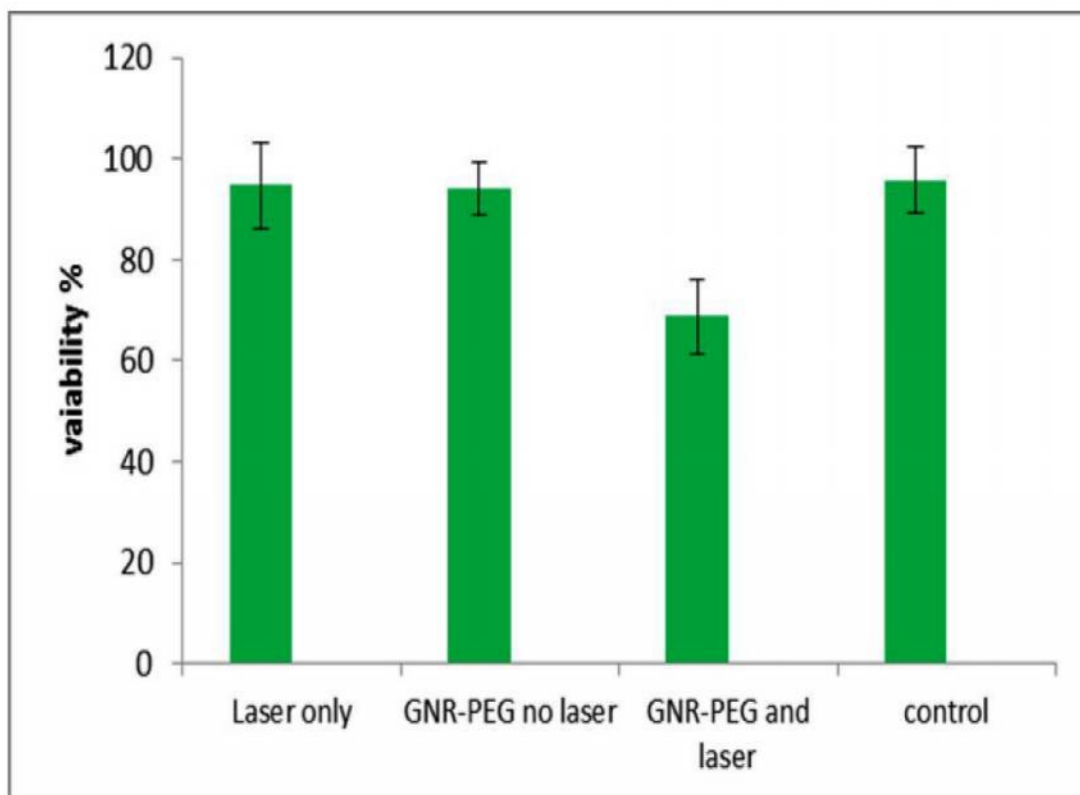
نمودار ۱- طیف جذبی نانومیله های طلا و کمپلکس GNR-PEG.



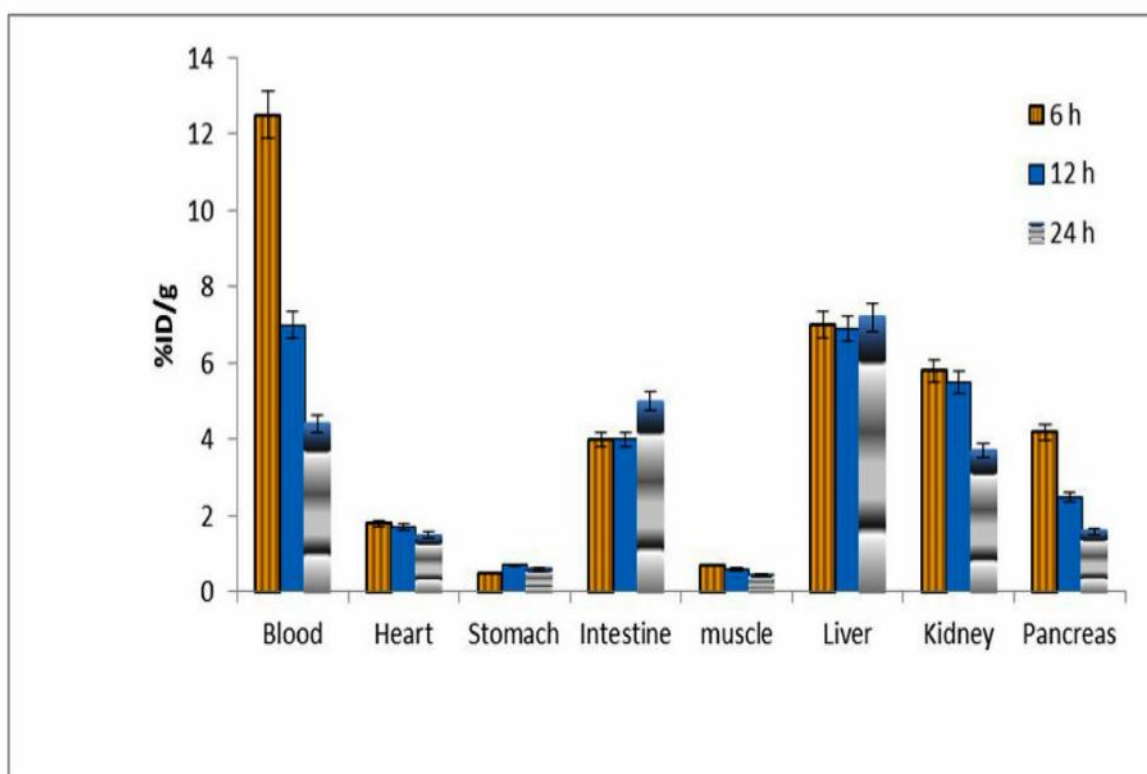
نمودار ۲- جذب کونژوگه GNR-PEG پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در خون.



نمودار ۳- درصد بقای سلول های سرطانی پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون با کمپلکس GNR-CTAB و GNR-PEG به MTT.



نمودار ۴- درصد بقای سلول های SK-BR-3 پس از تاثیر کمپلکس ساخته شده و فوتوترمال تراپی (p-value < 0.05)



نمودار ۵- توزیع بافتی کمپلکس PEG-GNR در اندام های حیاتی موش در بازه های زمانی مختلف پس از تزریق (p-value < 0.05)

بحث و نتیجه گیری

از آن جایی که هدف نهایی از سنتز نانومیله های طلا استفاده در شرایط درون تنی بود، در طراحی آن بایستی برخی نکات مد نظر قرار می گرفت. نیکویخت و El-Sayed در سال ۲۰۰۳ نانومیله های طلا را با روش Seed-mediated growth سنتز کردند و نشان دادند که با تغییر اندازه نانومیله ها، جذب پلاسمون طولی آن ها می تواند از ناحیه مرئی به ناحیه مادون قرمز نزدیک (NIR) تغییر نماید (۳۱). در این تحقیق هم از روش فوق استفاده و نانومیله های طلا با نسبت طول به عرض ۳/۹ سنتز شد که حداکثر جذب آن ها در ناحیه NIR (۹۰۰-۶۵۰ نانومتر) بوده و برهم کنش های ناخواسته نور-بافت به حداقل رسیده و از وارد آمدن آسیب حرارتی به بافت های سالم جلوگیری می شود. El-Sayed و همکارانش در سال ۲۰۰۵ با استفاده از نانوکره های طلا و با استفاده از نور لیزر ۵۱۴ نانومتر، موفق به تخریب سلول های سرطانی اپی تلیالی بدون تخریب سلول های سالم در شرایط *in vitro* شدند (۱۲). ایرادی که این مطالعه و بررسی های مشابه دارد این است که پیک جذب نانوذرات کره در محدوده نور مرئی قرار گرفته و این نور جذب کروموفورهای بافت می شود که در ۶۰۰-۴۰۰ نانومتر جذب دارند. بنابراین استفاده از نانوکره ها در مطالعات درون تنی مناسب نمی باشد. مورد دیگری که در سنتز نانومیله های طلا مد نظر قرار گرفت ماندگاری بالای آن در خون جهت تجمع در بافت هدف و کاهش جذب سلولی آن توسط سلول ها است. اندازه، شکل و ویژگی های سطحی نانوذرات طلا نقش مهمی در تعیین سرعت پاکسازی آن از جریان خون دارد. در مطالعه ای که سال ۲۰۰۵ در دانشگاه تورنتو کانادا انجام گرفت شکل و اندازه نانوذرات طلا بر میزان جذب آن ها در سلول های پستانداران مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که جذب سلولی نانومیله های طلا کمتر از نانوکره های طلا

بوده و نانوذرات طلا سمیتی برای سلول ها ندارند (۶). جهت دستیابی به ماندگاری طولانی در سیستم گردش خون، اندازه نانوذرات بایستی کمتر از ۱۰۰ نانومتر باشد و به منظور اجتناب از حذف آن ها توسط ماکروفاژها، بایستی سطح آبدوست داشته باشند. نانوذرات آبگریز به سرعت از جریان خون خارج شده و در کبد تجمع می یابند. بدین منظور باید آن ها را با مواد هیدروفیل و قطبی پوشش داد. از متداول ترین پوشش های مورد استفاده می توان به پلی اتیلن گلیکول (PEG) اشاره کرد. پلی اتیلن گلیکول کردن نانوذرات مانع از تجمع نانوذرات در خون و یا جذب پروتئین های سرم خون بر روی سطح نانوذرات می گردد. به علاوه این پوشش سبب می شود تا جذب نانوذرات در کبد کاهش یافته و زمان ماندگاری و پایداری آن در خون افزایش یابد (۱۸). پلی اتیلن گلیکوله کردن هم چنین سبب می شود هنگامی که نانوکونژوگه در جریان خون وارد گردید مانع از فعال شدن پاسخ ایمنی گردد (۳۰). با توجه به این که در این تحقیق جهت سنتز نانومیله های طلا از ماده سمی CTAB استفاده شده بود برای کاهش سمیت آن با ساترئیفیوژ، این ماده خارج و نانومیله ها با پلی اتیلن گلیکول تیول دار پوشش دار گردید. تست سمیت نشان داد که کمپلکس GNR-PEG به دلیل دارا بودن پوشش PEG که به طور کووالانسی به نانومیله ها متصل شده، دارای زیست سازگاری بالایی برای سلول می باشد و می توان از آن در مطالعات درون تنی استفاده نمود. در ضمن با توجه به نتایج آزمایش های انجام شده، از این کونژوگه می توان به عنوان عامل نور گرما درمانی در شرایط درون تنی استفاده نمود. منتهی برای این که بتوان از آن در داخل موجود زنده استفاده نمود بایستی با یک مولکول هدف-گیری کننده مثل آنتی بادی، هدف مند شود تا در داخل تومور تجمع یافته و از آسیب به سلول های سالم جلوگیری به عمل آید. در مرحله هدایت تحقیقات از

این تحقیق انتظار می رود که بتوان استفاده از نانوذرات پلاسمونیک طلا را برای فوتوترمال تراپی انتخابی سرطان سینه گسترش داد به شرطی که کلیه پارامترهای بهینه سازی آن بررسی گردد و این تحقیقی که امروزه در بسیاری از جوامع در حال انجام است. شاید بتوان در آینده از این روش ها در جهت هدف گیری دقیق سلول-های توموری انسانی (به خصوص در بافت های استرژیک یا در عمق بافت ها) به منظور درمان دقیق و غیر قابل برگشت سرطان استفاده نمود. از آن جایی که هدف نهایی از تحقیق حاضر سنتز یک نانوداروی هدف-مند جهت استفاده در شرایط درون تنی بود، برخی نکات در طراحی دارو از قبیل کونژوگه کردن یک مولکول به نانوميله ها جهت هدف گیری فعال آن و اتصال اختصاصی به سلول های سرطانی و اتصال کوالان مولکول هدف گیری کننده به نانوذرات طلا جهت ماندگاری بالایی در خون، بایستی مدنظر قرار گیرد.

سطح سلولی به مطالعات درون تنی مسئله مهمی که وجود دارد، نحوه توزیع بافتی نانوذرات در اندام های مدل حیوانی و نحوه تجمع در بافت هدف می باشد. در سال ۲۰۰۶ Niidome و همکارانش توزیع بافتی نانوميله-های طلای پوشیده شده با پلی اتیلن گلیکول را در موش بررسی کردند. نتایج حاکی از آن بود نانوميله های پوشیده شده با پلی اتیلن گلیکول به مدت طولانی تری نسبت به نانوميله های بدون پوشش در خون باقی می-مانند (۳۰). نتایج توزیع بافتی نشان داد که در ۶ ساعت ابتدایی پس از تزریق مقدار کونژوگه در خون بالا بوده و ۲۴ ساعت بعد حدود ۷٪ از دوز کونژوگه تزریق شده در هر گرم، به واسطه سیستم RES توسط کبد و حدود ۴٪ آن توسط کلیه ها برداشت شده است. در ضمن کونژوگه GNR-PEG توزیع غیرعادی در اندام های حیاتی دیگر ندارد. در این مطالعه، فوتوترمال تراپی برون تنی با استفاده از کمپلکس GNR-PEG باعث از بین رفتن سلول های سرطانی سینه گردید. با توجه به نتایج

منابع

1. Abadeer, N. S., Murphy, C. J. (2016). Recent progress in cancer thermal therapy using gold nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*, 120(9); 4691-4716.
2. Akbari, A., Hadi, A. R., Tabib, A. A., Majd, A. R., Razaghi, Z., Esfahani, M. M. (2012). Breast cancer risk reduction by parity and breastfeeding, islamic perspective; a case control study. *Iranian Journal of Cancer Prevention*, 3(2); 56-61.
3. Bhandare, N., Narayana, A. (2014). Applications of nanotechnology in cancer: a literature review of imaging and treatment. *Journal of Nuclear Medicine & Radiation Therapy* 2014.
4. Chanda, N., Shukla, R., Katti, K. V., Kannan, R. (2009). Gastrin releasing protein receptor specific gold nanorods: breast and prostate tumor avid nanovectors for molecular imaging. *Nano letters*, 9(5); 1798-1805.
5. Chanda, N., Kattumuri, V., Shukla, R., Zambre, A., Katti, K., Upendran, A. (2010). Bombesin functionalized gold nanoparticles show in vitro and in vivo cancer receptor specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(19); 8760-8765.
6. Chithrani, B. D., Ghazani, A. A., Chan, W. C. (2006). Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano let*, 6(4); 662-668.
7. Choi, H. S., Liu, W., Liu, F., Nasr, K., Misra, P., Bawendi, M. G. (2010). Design considerations for tumour-targeted nanoparticles. *Nature nanotechnology*, 5(1); 42-47.
8. Dickerson, E. B., Dreaden, E. C., Huang, X., El-Sayed, I. H., Chu, H., Pushpanketh, S. (2008). Gold nanorod assisted near-infrared plasmonic photothermal therapy (PPTT) of squamous cell carcinoma in mice. *Cancer letters* 269(1); 57-66.
9. Ding, A.-A., Chen, Y.-Y., Wang, C.-R. C., Li, P.-C., Shieh, D.-B. (2008). HER-2 antibody conjugated gold nano rod for in vivo photothermal therapy. *IEEE*.
10. Eghtedari, M., Oraevsky, A., Copland, J. A., Kotov, N. A., Conjusteau, A., Motamedi, M. (2007). High sensitivity of in vivo detection of

gold nanorods using a laser optoacoustic imaging system. *Nano letters*, 7(7); 1914-1918.

11. Eghtedari, M., Liopo, A. V., Copland, J. A., Oraevsky, A. A., Motamedi, M. (2008). Engineering of hetero-functional gold nanorods for the in vivo molecular targeting of breast cancer cells. *Nano letters*, 9(1); 287-291.

12. 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.

14. Hainfeld, J. F., Dilmanian, F. A., Zhong, Z., Slatkin, D. N., Kalef-Ezra, J. A., Smilowitz, H. M. (2010). Gold nanoparticles enhance the radiation therapy of a murine squamous cell carcinoma. *Physics in Medicine and Biology*, 55(11); 3045.

15. Hu, M., Chen, J., Li, Z.-Y., Au, L., Hartland, G. V., Li, X. (2006). Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications. *Chemical Society Reviews*, 35(11); 1084-1094.

16. Huang, K., Ma, H., Liu, J., Huo, S., Kumar, A., Wei, T. (2012). Size-dependent localization and penetration of ultrasmall gold nanoparticles in cancer cells, multicellular spheroids, and tumors in vivo. *ACS nano*, 6(5); 4483-4493.

17. 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.

18. Huang, X. (2007). Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer. *Diagnostics and Therapy*, 681-693.

19. Jokerst, J. V., Lobovkina, T., Zare, R. N., Gambhir, S. S. (2011). Nanoparticle pegylation for imaging and therapy. *Nanomedicine*, 6(4); 715-728.

20. Kashi, A. S.Y., Yazdanfar, S., Akbari M.-E., Rakhsha, A. (2017). Triple negative breast cancer in Iranian women: clinical profile and survival study. *International Journal of Cancer Management (In Press)*.

21. Kelly, K. L., Coronado, E., Zhao, L. L., Schatz, G. C. (2003). The optical properties of metal nanoparticles: the influence of size, shape, and dielectric environment. *The Journal of Physical Chemistry B*, 107(3); 668-677.

22. Kuete, V., Karaosmanoglu, O., Sivas, H. (2017). Anticancer activities of African medicinal spices and vegetables." medicinal spices and vegetables from Africa: Therapeutic

Potential against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases, 271.

23. Kumar, A., Boruah, B. M., Liang, X.-J. (2011). Gold nanoparticles: promising nanomaterials for the diagnosis of cancer and HIV/AIDS. *Journal of Nanomaterials*, 22.

24. Link, S., El-Sayed, M. A. (2003). Optical properties and ultrafast dynamics of metallic nanocrystals. *Annual review of physical chemistry*, 54(1); 331-366.

25. Liu, S.-Y., Liang, Z.-S., Gao, F., Luo, S.-F., Lu, G.-Q. (2010). In vitro photothermal study of gold nanoshells functionalized with small targeting peptides to liver cancer cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21(2); 665-674.

26. Marsh, M., Schelew, E., Wolf, S., Skippon, T. (2009). Gold nanoparticles for cancer treatment. *Queen's University, Kingston*, 29.

27. Miller, Kimberly, D. (2016). Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 66(4); 271-289.

28. Morton, Jennifer, G. (2010). Nanoshells for photothermal cancer therapy. *Cancer Nanotechnology: Methods and Protocols*, 101-117.

29. Mousa, S. A., Bharali, D. J. (2011). Nanotechnology-based detection and targeted therapy in cancer: nano-bio paradigms and applications. *Cancers*, 3(3); 2888-2903.

30. Murali, R., Thanikaivelan, P. (2016). Bionic, porous, functionalized hybrid scaffolds with vascular endothelial growth factor promote rapid wound healing in Wistar albino rats. *RSC Advances*, 6(23); 19252-19264.

31. Niidome, T., Yamagata, M., Okamoto, Y., Akiyama, Y., Takahashi, H., Kawano, T. (2006). PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications. *Journal of Controlled Release*, 114(3); 343-347.

32. Nikoobakht, B., El-Sayed, M. A. (2003). Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method. *Chem. Mater*, 15(10); 1957-1962.

33. Pitsillides, C. M., Joe, E. K., Wei, X., Anderson, R. R., Lin, C. P. (2003). Selective cell targeting with light-absorbing microparticles and nanoparticles. *Biophysical journal*, 84(6); 4023-4032.

34. Rasaneh, S., Rajabi, H., Babaei, M. H., Akhlaghpour, S. (2011). MRI contrast agent for molecular imaging of the HER2/neu receptor using targeted magnetic nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(6); 2285-2293.

35. Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., Minor, L. (2016). Cell Viability Assays.

36. Wang, J., Dong, B., Chen, B., Jiang, Z., Song, H. (2012). Selective photothermal therapy for breast cancer with targeting peptide modified gold nanorods. Dalton Transactions, 41(36); 11134-11144.

37. Wang, J., Sui, M., Fan, W. (2010). Nanoparticles for tumor targeted therapies and their pharmacokinetics. Curr Drug Metab, 11(2); 129-141.

38. Xiao, Y., Hong, H., Matson, V. Z., Javadi, A., Xu, W., Yang, Y. (2012). Gold nanorods conjugated with doxorubicin and cRGD for combined anticancer drug delivery and PET imaging. Theranostics, 2(8); 757-768.



Breast Cancer Photothermal Therapy by Using Gold Nanorods and Tissue Distribution of Gold Nanoparticles in Mouse Model

M. Kalantari¹, K. Parivar¹, **M. Salouti**², M. Hamidi³, S. Emadi⁴

1.Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2.Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Zanzan Branch, Islamic Azad University, Zanzan, Iran. Saloutim@yahoo.com

3.Zanzan Pharmaceutical Nanotechnology Research Center, Zanzan University of Medical Sciences, Zanzan, Iran.

4.Department of Biological Sciences, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences (IASBS), Zanzan, Iran.

Received:2017.4.8

Accepted: 2017.23. 10

Abstract

Introduction & Objective: Treatment methods for breast cancer are not specific and each one has its own drawbacks. For this reason, scientists are seeking ways of which specifically affect cancer cells. Photothermal therapy is a method that uses near-infra red (NIR) laser energy to create sufficient heat to destroy cancer cells. In this study, the photothermal effect of gold nanorods (GNRs) was investigated for breast cancer treatment *in vitro*.

Materials and Methods: GNRs with peak absorption of 808 nm were synthesized and coated with Poly ethilen glycol (PEG). After confirming the characteristics of the prepared complex, the therapeutic effect of new agent was studied on SK-BR-3 cell line by using the NIR laser.

Results: The cytotoxicity assay showed the biocompatibility of PEGylated GNRs complex. Through the *in vitro* photothermal study, significant cell death was observed in breast cancer cells incubated with the complex along with the laser irradiation. The biodistribution study showed the appropriate localization of new agent in vital organs after 24 h in mouse model.

Conclusion: In summary, the present study reports the successful treatment of Breast cancer cells by the prepared photothermal agent using. Labeling of gold nanoparticles(such as antibodies) can improve the treatment efficiency and prevent damage to healthy cells that need further studies.

Keywords: Breast cancer; photothermal therapy; gold nanorods; Near-Infrared (NIR) laser.