

سنتز و ارزیابی نانو ذرات نانو میله‌های طلا جهت استفاده در روش پلاسمونیک فوتوترمال تراپی (گرما درمانی نوری)

الهه درویشی^۱، اسرا امانی^۲، سمیه میرصادقی^۳، بهرنگ شیری ورنامخواستی^{۴*}

مقاله پژوهشی

مقدمه: فوتوترمال تراپی یک روش درمانی برای سرطان است که در آن از نانوذرات پلاسمونی به منظور تبدیل نور مادون قرمز به گرمای موضعی استفاده می‌شود. به دلیل خواص پلاسمونیک نانوذرات طلا، از این ترکیبات به عنوان عوامل کنتراست استفاده شد. **روش بررسی:** این پژوهش یک مطالعه تجربی است. روش مورد استفاده برای سنتز نانو ذرات کروی و میله‌ای طلا در این تحقیق روش دانه‌گذاری است. نانوذرات سنتز شده با ترکیبات مختلف مانند ریفامپیسین، کوئرتستین و RGD (Arginylglycylaspartic acid) متصل شدند. سپس خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نانوذرات به روش DLS، UV-Vis و TEM مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین تست سمیت سلولی بر رده سلولی MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) انجام شد. درصد زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از نرم‌افزار prism محاسبه شد. تفاوت‌ها از طریق آزمون تحلیل واریانس (ANOVA) با استفاده از نرم افزار SPSS version 16 مقایسه گردید.

نتایج: در تست UV نانوذرات میله‌ای دو پیک در محدوده ۵۲۳ نانومتر و ۷۳۸ نانومتر و در مورد نانوذرات کروی هم در طول موج ۵۳۵ مشاهده گردید که نشان دهنده سنتز صحیح و بدون ناخالصی و با سایز مناسب می‌باشد. در تست سلولی کاهش میزان زنده‌ماندن سلول در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد. در ۲۴ ساعت اول نانوذرات کروی بیشترین کشندگی را داشته است تا جایی که در غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تقریباً ۵۰ درصد کشندگی داشته است. هم‌چنین با گذشت ۴۸ ساعت در غلظت‌های پایین، نانوذرات میله‌ای نتایج بهتری نشان دادند بنابراین مناسب‌ترند. با هدفمند کردن نانوذرات برای سلول‌های سرطانی خاص، می‌توان علاوه بر استفاده در کشندگی سلول‌های سرطانی، از تاثیر این نانوذرات بر سلول‌های سالم جلوگیری کرد. با کنژوگه کردن ترکیبات مختلف بر سطح این نانوذرات هم می‌توان جذب سلولی را افزایش داد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق، به نظر می‌رسد نانوذرات میله‌ای طلا با غلظت کم برای فوتوترمال تراپی مناسب‌تر هستند.

واژه‌های کلیدی: فوتوترمال تراپی، نانوذرات میله ای طلا، نانوذرات کروی طلا، کژوگه، سرطان

ارجاع: الهه درویشی، اسرا امانی، سمیه میرصادقی، بهرنگ شیری ورنامخواستی. سنتز و ارزیابی نانوذرات نانو میله‌های طلا جهت استفاده در روش پلاسمونیک فوتوترمال تراپی (گرما درمانی نوری). مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۴۰۱؛ ۳۰ (۳): ۴۶۵۶-۶۹.

۱- گروه نانو بیوتکنولوژی، دانشکده بیوتکنولوژی، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین آمل، آمل، ایران.

۲- مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

۳- مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، پژوهشگاه علوم غدد و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

۴- مرکز تحقیقات داروسازی نانو، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۶۳۱۳۹۸۶۵، پست الکترونیکی: shiribehrang@yahoo.com، صندوق پستی: ۱۶۷۳۶۷۱۴۵

سطحی نانوجیج‌های طلا در تصویربرداری تشخیصی و درمان *in vitro* استفاده شده است (۶). طلا به علت خنثی و زیست‌سازگار بودن و هم‌چنین آسان بودن پوشش‌دار کردن سطح آن در پزشکی کاربردهای زیادی دارد. (۵,۷,۸). به دلیل خواص و مزایای ذکر شده در مورد نانوذرات طلا، دستیابی به روش مؤثر برای مقابله با رشد سلول‌های سرطانی با استفاده از نانوذرات طلا کنژوگه شده با ترکیبات متفاوت و کاهش عوارض جانبی، هدف این تحقیق بوده است.

روش بررسی

۱-۲ مواد

به منظور سنتز و بررسی نانوذرات طلا، نمک کلرید طلای سه آبه ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) و ستیل‌تری‌متیل آمونیوم بروماید (CTAB) از شرکت Merk تهیه شد. هم‌چنین سدیم بوروهیدرید، آسکوربیک اسید، ریفامپیسین و Querctin از شرکت Sigma خریداری شدند. به منظور کشت سلول و بررسی سمیت سلولی نیز سرم آلبومین گاوی (BSA)، Cell Culture, Classic Media and Salts, RPMI- 1640 از شرکت Sigma تهیه شد. رده‌های سلولی سرطانی MCF-7 نیز از انستیتو پاستور خریداری شد.

۲-۲ سنتز نانوذرات کروی و میله‌ای طلا

روش مورد استفاده برای سنتز نانو ذرات در این تحقیق روش دانه‌گذاری Seeding است. دانه، به عنوان هسته اولیه برای شروع واکنش عمل می‌کند. نانوذراتی که به این روش تهیه می‌شوند، دارای پوشش Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) هستند، این پوشش به عنوان یک پایدارکننده برای نانوذرات عمل می‌کند. CTAB به صورت دو لایه با دو سر هیدروفوب و هیدروفیل سطح نانوذره را می‌پوشاند و به همین دلیل نانو ذرات طلا با پوشش CTAB توانایی واکنش با هر دو ترکیب هیدروفوب و هیدروفیل را دارند.

۱-۲-۲ سنتز seed

مهم‌ترین بخش سنتز نانوذرات طلا، سنتز seed است، آگه seed درست سنتز شود، مشکلی در تهیه نانوذرات میله‌ای به وجود نمی‌آید، برای سنتز seed، محلول ۰/۱M از CTAB در

امروزه استفاده از فناوری نانو به منظور درمان و تشخیص انواع بیماری‌ها از جمله سرطان‌ها بسیار مورد توجه قرار گرفته است. فناوری نانو بر روش‌های نوین و جایگزین درمان‌های معمولی و افزایش کارآمدی آن‌ها در درمان سرطان تمرکز دارد (۱,۲). امروزه به دلیل شیوع بالای بیماری سرطان نیاز به روش‌های درمانی نوین و کارآمد بسیار احساس می‌شود. فناوری نانو می‌تواند در این زمینه بسیار کمک کننده باشد. با توسعه قابل توجه فناوری نانو در سال‌های اخیر، استفاده از نانوذرات مختلف در روش‌های تشخیصی، تولید کیت و زیست‌حسگرها، تصویربرداری مغناطیسی، فوتوثرمال تراپی، دارورسانی نوین و هدفمند و ... بسیار مورد استفاده قرار گرفته‌اند. دستاوردهای اخیر نشان می‌دهد که نانوذرات می‌توانند در زمینه‌های مختلف تشخیصی و درمانی تاثیر بسزایی داشته باشند. در حال حاضر این فناوری متمرکز بر روش‌های نوین و در حال توسعه پیشگیری، تشخیص و درمان بیماری‌های مختلف به‌ویژه سرطان می‌باشد. یکی از این روش‌های درمانی، فوتوثرمال‌تراپی است (۳,۴). فوتوثرمال‌تراپی (PTT) یک روش درمانی با کمترین تهاجم (مسلماً در صورت عدم کنترل بر روی تابش لیزر، احتمال آسیب به سلول‌های نرمال هم وجود دارد، که با تنظیم شدت لیزر، مدت زمان تابش آن و استفاده از نانوذرات مناسب از عوارض جانبی روش کاهش می‌یابد) است که در آن انرژی فوتون‌ها به انرژی گرمایی تبدیل می‌شود تا هایپرترمیا سلولی القاء شود. پلاسمونیک فوتوثرمال‌تراپی به همراه نانوذرات فلزی طلا یک روش جدید و کارآمد برای مقابله با سلول‌های سرطانی است. این روش به دو صورت آپو‌توز و نکروز و به دلیل ایجاد گرما از رشد سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند و در نهایت آن‌ها را از بین می‌برد. در عین حال به دلیل خواص پلاسمونیک نانوذرات طلا، این ترکیبات به عنوان عوامل کنتراست برای شناسایی زودهنگام بیماری‌ها نیز کاربرد دارند (۵,۶). مطالعات بر روی کاربرد PTT، نشان دادند که کنترل موضعی تومور و زمان بقاء در مدل‌های حیوانی، به مقدار قابل توجهی بهبود یافته است. از سوی دیگر از جذب پلاسمون

خورده، بعد از آن $500 \mu\text{L}$ محلول نمک طلا به آن اضافه شد و دوباره اجازه داده شد محلول به مدت ۲۰ دقیقه دیگر نیز هم بخورد، سپس $70 \mu\text{L}$ آسکوربیک اسید 0.1M به آن‌ها اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه همزدن ادامه پیدا کرد، در پایان $12 \mu\text{L}$ از محلول seed به محلول اضافه شده و تغییر رنگ در جایی که هیچ تکانی ندارد قرار داده شد. رنگ محلول تقریباً قهوه‌ای تیره مایل به سیاه است، هر رنگ دیگری مثل رنگ‌های با تم بنفش تیره، یعنی سنتز درست انجام نشده است و ترکیب مخلوطی از کروی و میله‌ای خواهد بود. شستشو نانوذرات با آب مقطر بعد از ۲۴ ساعت و سه بار صورت گرفت سپس طیف UV آن‌ها گرفته شد.

۲-۲-۴ بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نانوذرات کروی و نانومیله‌های طلا به روش (DLS) Dynamic Light Scattering ، UV-Vis و TEM) Transmission Electron Microscopy مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۲-۵ تعیین غلظت نانوذرات سنتز شده
به منظور تعیین غلظت نانوذرات طلا کروی و میله‌ای سنتز شده، از دستگاه طیف‌سنج جذب اتمی با روش آزمون /شماره استاندارد ISIRI-8523 استفاده شد. بدین منظور غلظت‌های مختلف طلا تهیه شد و سپس غلظت محلول حاوی نانوذرات مورد نظر برحسب (ppm or mg/L) به دست آمد.

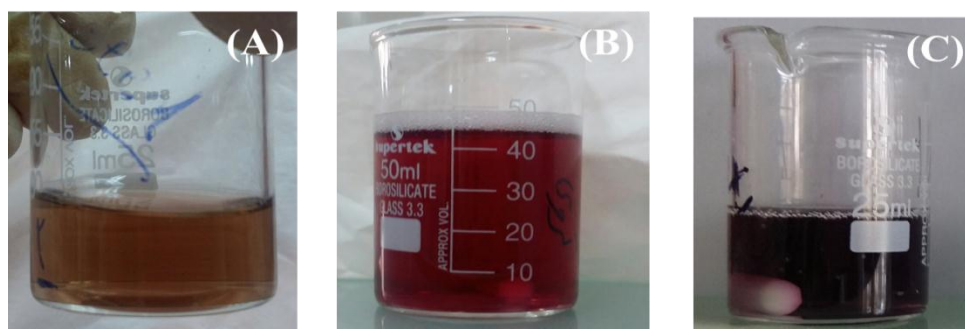
ظرف سنتز ریخته شد (این ظرف باید تنها برای سنتز seed استفاده شود) و $250 \mu\text{L}$ محلول نمک طلای 0.1M اضافه کرده و به مدت ۱۰ دقیقه بر روی استیرر قرار داده شد. سپس محلول 0.1M از سدیم بوروهیدرید تهیه و آنقدر از محلول سدیم بوروهیدرید به محلول قبلی اضافه می‌شود که رنگ آن طلایی مایل به قهوه‌ای باشد. بعد از تشخیص رنگ درست، محلول به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت بالا همزده شد، سپس با سرعت 200rpm حدود ۲ تا ۵ ساعت بعد محلول seed قابل استفاده است.

۲-۲-۲ سنتز نانوذرات کروی

45cc محلول رشد (CTAB 36cc + AU $1/125 \text{cc}$ + آب مقطر برای رسیدن به حجم 45cc)، اسید اکسوربیک $250 \mu\text{L}$ (غلظت 0.1M) و در نهایت $50 \mu\text{L}$ از محلول seed با هم ترکیب شده و چند دقیقه روی استیرر قرار داده شد، بعد از چند دقیقه محلول در جایی که ثابت باشد نگهداری شده تا تغییر رنگ کامل شود، رنگ محلول از قرمز شرابی تا صورتی پر رنگ با توجه به سایز آن متغیر است. بعد از شستشوی محلول از آن طیف UV گرفته شد که یک پیک شارپ بین 520 تا 530 باید دیده شود.

۲-۲-۳ سنتز نانوذرات میله‌ای

10cc محلول CTAB به همراه $100 \mu\text{L}$ محلول 0.1M از نیترات نقره حدوداً ۲۰ دقیقه به همراه هم بر روی استیرر هم



شکل ۱: تغییر رنگ محلول‌های حاوی نانوذرات طلا (A) محلول seed (B) نانوذرات کروی (C) نانوذرات میله‌ای

جدول ۲-۳: غلظت نانوذرات طلا کروی و میله‌ای سنتز شده با استفاده از دستگاه طیف‌سنج جذب اتمی

Sample number	Sample code	concentration of Au(ppm or mg/L)
1	Spherical	240.5062
2	rod	229.0696

۲-۴ آزمون سنجش میزان سمیت سلولی

جهت کنترل وضعیت سلول‌ها در محیط کشت، میزان بقا و همچنین بررسی وضعیت سلول‌ها بعد از تیمار آن‌ها با نانوذرات از روش MTT استفاده شد. آزمایش MTT یک روش رنگ سنجی است که بر اساس احیا شدن و شکسته شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز موجود در میتوکندری فعال سلول‌های زنده و تشکیل کریستال‌های آبی رنگ نامحلول انجام می‌شود. سپس کریستال‌های تشکیل شده در Dimethyl DMSO (Dimethyl sulfoxide) حل شده و شدت جذب نوری محلول رنگی حاصله توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر و در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه گیری می‌شود (۹,۱۰). کاهش تعداد سلول‌های زنده در نمونه آزمایش منجر به افت فعالیت متابولیکی کل آن گردیده و این کاهش مستقیماً با میزان تشکیل کریستال‌های بنفش رنگ مرتبط است که میزان فعالیت میتوکندری و در نتیجه میزان زنده یا مرده بودن سلول‌ها را نشان می‌دهد

۲-۴-۱ تهیه محلول رنگ MTT

این محلول از انحلال ۰/۵ گرم MTT در ۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات سالین تهیه شد. پس از تهیه باید در ظرف با پوشش آلومینیومی و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شود.

۲-۴-۲ نحوه اثر دادن نانوذرات

به منظور بررسی میزان اثر سایتوتوکسیسیته نانوذرات در محیط برون تن، پس از کشت رده سلولی MCF-7 و رسیدن به تراکم مناسب سلولی، سلول‌ها در پلیت ۹۶ خانه ای به ازای هر خانه 5×10^3 سلول کاشته شد و یک روز پس از کشت سلول‌ها با غلظت‌های مختلفی (۱ تا ۳۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از نانوذرات کروی و میله‌ای، داروی سیس‌پلاتین به عنوان کنترل مثبت و محیط کشت بدون دارو به عنوان کنترل منفی تیمار شدند. نتایج حاصل از تست MTT پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت از

۲-۳ آماده‌سازی نانوذرات به منظور استفاده از آن‌ها در

PPTT

۲-۳-۱ تهیه کنژوگه نانوذره-سرم آلبومین گاوی (BSA)؛ استفاده از BSA به منظور جلوگیری از واکنش‌های ناخواسته انجام می‌شود. بدین منظور از ۵۰ میلی‌لیتر محلول ۵ میلی‌مولار BSA با ۱ نانومولار نانوذره به مدت ۱۰ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. سپس اضافی BSA توسط سانتریفیوژ جدا گردید. ۲-۳-۲ سپس به ترکیب NPs-BSA، ۱ میلی‌لیتر (RGD) Arginylglycylasparic acid (Genscript) (CGPDGRDGRDGRDGR) با غلظت ۵ میلی‌مولار اضافه گردید. این ترکیب سبب می‌شود، اندوسایتوز به واسطه اینتگرین Integrin فعال شود.

۲-۳-۳ به محلول NPs-BSA-RGD، ۵ میلی‌لیتر داروی ریفامپیسین (RF) با غلظت ۵ میلی‌مولار اضافه شد، این دارو به عنوان مهارکننده آگزوسایتوز عمل می‌کند. ترکیب NPs-BSA-RGD به همراه RF در دمای اتاق به مدت ۵ ساعت انکوبه شده و سپس برای جدا کردن مقدار اضافی RF سانتریفیوژ انجام گرفت.

۲-۳-۴ تعیین خصوصیات ترکیب NPs-BSA-RGD-RF توسط UV-Vis، RF در دو طول موج ۴۷۰ nm و ۳۳۰ nm جذب دارد وقتی با NPs ترکیب می‌شود جذب در این دو ناحیه در طیف جذبی طلا نیز دیده می‌شود که ثابت می‌کند طلا و ریفامپیسین با هم واکنش داده‌اند.

۲-۳-۵ سپس Quercetin (به عنوان بازدارنده HSPs عمل می‌کند) با حجم ۵ میلی‌لیتر و غلظت ۵ میلی‌مولار غلظت مناسب اضافه شد و ترکیب به مدت ۵ ساعت در دمای اتاق به آهستگی هم زده شد، QE در ۳۷۰ nm جذب دارد. برای تأیید تشکیل کنژوگه QE-NPs از UV-Vis استفاده می‌شود. نانوذره طلا کنژوگه شده، برای جدا کردن مولکول QE واکنش نداده، سانتریفیوژ می‌شود.

ترکیب سنتز شده خواهند بود (۱۵-۱۳). اما با توجه به شکل ۲ قسمت B پیک کوچک در محدوده ۵۲۳ نانومتر و پیک بزرگ در محدوده ۷۳۸ نانومتر مشاهده می‌شود که نشان دهنده سنتز صحیح و بدون ناخالصی و با سایز و AR درست می‌باشد. نتایج به دست آمده در این آنالیز مشابه نتایج سایر محققین می‌باشد به عنوان نمونه مشابه تحقیقات Sayed و همکاران در سال ۲۰۱۰ و هم‌چنین Amini و همکاران در سال ۲۰۱۸ می‌باشد (۱۵،۱۶).

۳-۲ نتایج بررسی اندازه ذرات و شاخص پراکندگی اندازه

نانوذرات (PDI) Poly dispersity index

به منظور تعیین حدودی اندازه نانوذرات از آنالیز Dynamic Light Scattering (DLS) استفاده شد. در این آنالیز شعاع هیدرودینامیکی نانوذرات و شاخص پراکندگی اندازه آن‌ها (PDI) به دست آمد (شکل ۳). نتایج به دست آمده نشان داد که نانوذرات کروی دارای شعاع هیدرودینامیکی ۹۵/۴۴ نانومتر بوده و شاخص پراکندگی اندازه ذرات ۰/۲۵۷ بود که بسیار مناسب بوده و نشان دهنده سنتز نانوذرات همگن و با اندازه یکنواخت است (شکل 3A). هم‌چنین در مورد نانوذرات میله‌ای (شکل 3B) دو پیک مشاهده شد که با نتایج حاصل از تحقیقات سایر محققین کاملاً مطابقت داشت (۱۹-۱۷). Liu و همکاران در سال ۲۰۱۲ در مقاله خود به بررسی نانوذرات طلا میله‌ای شکل با سایزهای متفاوت توسط DLS پرداخت که نتایج مشابهی با این تحقیق گزارش کرد و حضور دو پیک را در این آنالیز به خوبی نشان داد (۱۹). برای بررسی سایز دقیق نانوذرات از دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری استفاده شد.

۳-۳ نتایج بررسی نانوذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی

عبوری (TEM)

اساس عملکرد میکروسکوپ انتقال الکترونی (Transmission Electron Microscope) که به اختصار به آن TEM می‌گویند مشابه میکروسکوپ‌های نوری است با این تفاوت که به جای پرتوی نور در آن از پرتوی الکترون استفاده می‌شود. آنچه که می‌توان با کمک میکروسکوپ نوری مشاهده کرده بسیار محدود است در حالیکه

تیمار سلول‌ها بررسی شد و درصد viability به دست آمد و مقدار ic50 با استفاده از نرم‌افزار prism محاسبه گردید. داده‌ها به صورت عدد متوسط انحراف از معیار گزارش شده‌اند. تفاوت‌ها از طریق آزمون تحلیل واریانس (Analysis of Variance (ANOVA)) با استفاده از نرم‌افزار SPSS version 16 مقایسه و وجود یا عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین آن‌ها مشخص شد.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها به صورت عدد متوسط انحراف از معیار گزارش شده‌اند. تفاوت‌ها از طریق آزمون تحلیل واریانس (Analysis of Variance (ANOVA)) با استفاده از نرم افزار SPSS version 16 مقایسه و وجود یا عدم وجود تفاوت معنی‌دار بین آن‌ها مشخص شد.

ملاحظات اخلاقی

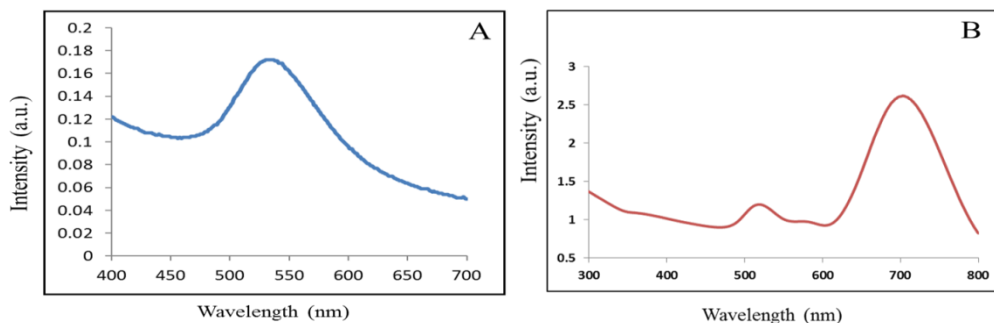
پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه تایید شده است (IR.KUMS.REC.1397.354).

نتایج

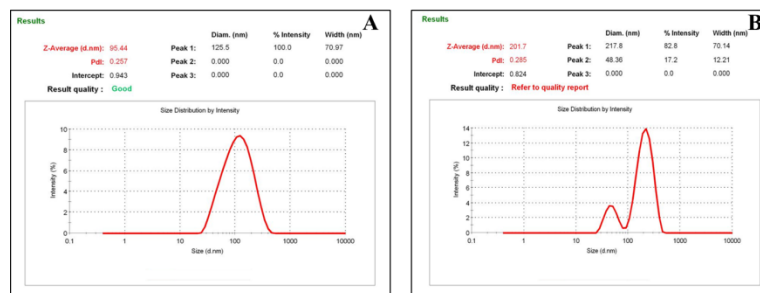
۳-۱ طیف‌سنجی مرئی - فرابنفش نانوذرات کروی و میله‌ای اولین آنالیزی که برای تایید سنتز صحیح نانوذرات کروی و میله‌ای طلا انجام گرفت، طیف‌سنجی مرئی - فرابنفش نانوذرات بود. بعد از شستشوی کامل نانوذرات با آب مقطر، از آن طیف UV گرفته شد در مورد نانوذرات کروی طلا، همانطور که در شکل ۲ قسمت A مشاهده می‌شود، یک پیک شارپ بین ۵۳۵ دیده شد که تایید کننده سنتز نانوذرات کروی به طور صحیح است و با تحقیقات سایر محققین نیز مطابقت دارد (۱۱،۱۲). در طیف UV نانوذرات میله‌ای طلا باید دو پیک مشاهده شود. پیک اولی کوچک و در ناحیه ۵۲۰ تا ۵۳۰ قرار دارد که مربوط به عرض نانوذره است و پیک بعدی یک پیک شارپ در ناحیه بالای ۷۰۰ نانومتر است که مربوط به طول نانوذره است. اگر اختلاف جذب دو پیک کم باشد نشان دهنده وجود نانوذرات کروی در محلول نانوذرات میله‌ای است. اگر دو پیک درست پشت سر هم باشند یعنی AR (aspect ratio) پایین است که هر کدام از این موارد نشان دهنده نامناسب بودن

است. در شکل ۴ مرفولوژی کروی نانوذرات با سایز حدود ۲۱ نانومتر قابل مشاهده است. هم‌چنین در شکل ۵ مرفولوژی میله‌ای نانوذرات به درستی مشخص است. همان‌طور که از تصاویر مربوط به نانوذرات میله‌ای مشخص است، نانوذرات خالص (اشکال دیگر نانوذرات مشاهده نشد) و با $AR \sim 4$ می‌باشند. در هر دو مورد نانوذرات کروی و میله‌ای طلا، تصاویر ثبت شده نشان دهنده این است که نانوذرات سنتز شده، از پراکندگی مناسبی برخوردار هستند.

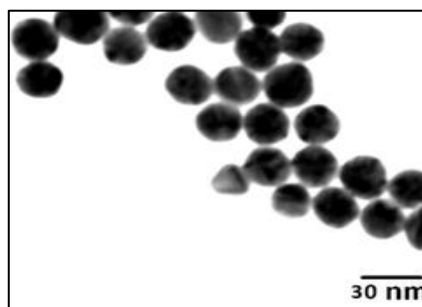
با استفاده از الکترون‌ها به جای نور، این محدودیت از بین می‌رود. وضوح تصویر در TEM هزار برابر بیشتر از یک میکروسکوپ نوری است (۲۰). برای بزرگ‌نمایی، TEM ابزار مناسبی است که هم در تحقیقات پزشکی، بیولوژیکی و هم در تحقیقات مرتبط با مواد قابل استفاده است. وضوح این میکروسکوپ ۰/۲ نانومتر است که در حد اتم است. با این نوع میکروسکوپ حتی می‌توان نحوه قرار گرفتن اتم‌ها در یک ماده را بررسی کرد. تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانوذرات کروی و میله‌ای سنتز شده در شکل ۴ و ۵ نشان داده شده



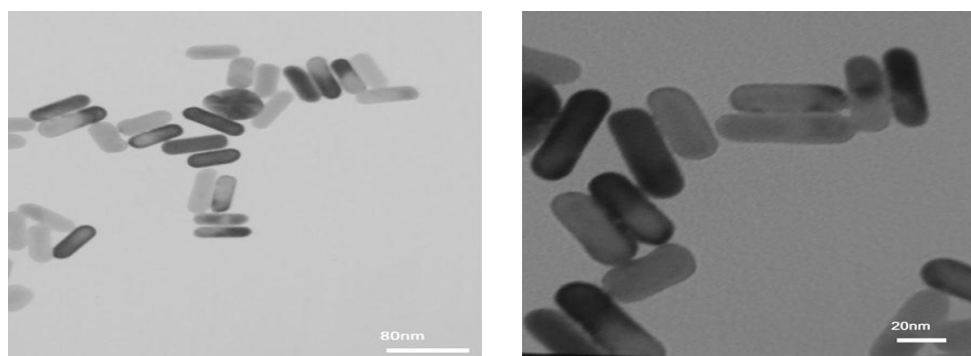
شکل ۲: طیف مرئی - فرابنفش نانوذرات (A) طلا کروی (B) طلا میله‌ای



شکل ۳: توزیع اندازه ذرات (A) طلا کروی (B) طلا میله‌ای به دست آمده توسط دستگاه زتا سایزر در شرایط بهینه



شکل ۴: تصاویر TEM نانوذرات کروی طلا



شکل ۵: تصاویر TEM نانوذرات میله‌ای طلا

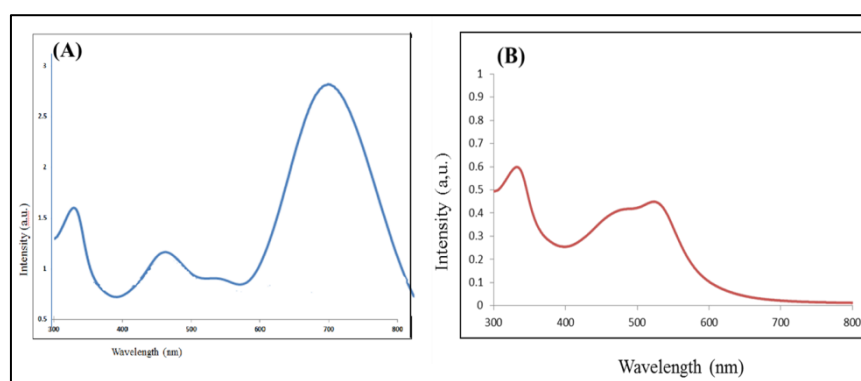
در دمای اتاق به آهستگی هم زده شد، QE در ۳۷۰ nm جذب دارد. استفاده از نانوذرات کنژوگه شده با مهار کننده های HSP70 می‌توانند اثر PPTT را بیشتر کند. از آنجا که کوئرستین (QE) یک مهار کننده امیدوار کننده HSP70 است، نانوذرات با QE کنژوگه شدند. برای تأیید تشکیل کنژوگه QE-NPs از UV-Vis استفاده می‌شود. لازم به ذکر است که QE به تنهایی در طول موج ۳۷۰ نانومتر جذب دارد. نانوذرات به تنهایی قبل از کنژوگه شدن با QE، پیکی در ۳۷۰ نانومتر را نشان نمی‌دهند، با این حال پس از کنژوگه شدن با QE نمایش یک پیک در ۳۷۰ نانومتر را نشان می‌دهد که ترکیب QE را با نانوذرات تأیید می‌کند. این نتایج با نتایج تحقیقات Moustafa R.K و همکاران در سال ۲۰۱۶ مطابق دارد (۲۱).

۴-۳ خصوصیات نانوذرات سنتز شده به منظور استفاده از آن‌ها در PPTT

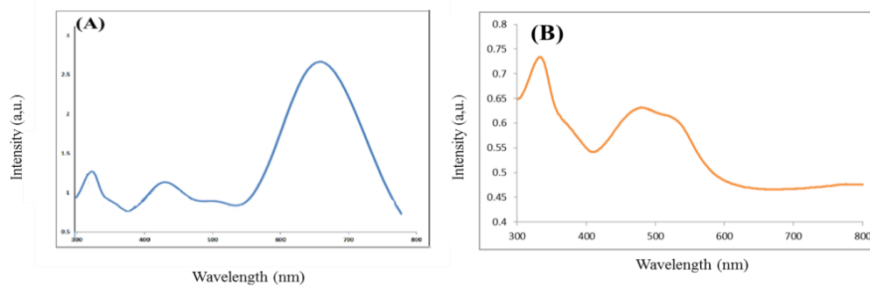
۱-۴-۳ طیف سنجی مرئی فرابنفش RF-NPs

ریفامپیسین (RF) در دو طول موج ۴۷۰ nm و ۳۳۰ nm جذب دارد وقتی با NPs ترکیب می‌شود جذب در این دو ناحیه در طیف جذبی طلا برای نانوذرات کروی (۲ پیک) و نانوذرات کروی (۱ پیک) نیز دیده می‌شود که ثابت می‌کند طلا و ریفامپیسین با هم واکنش داده‌اند (۲۱). با توجه به شکل ۶ پیک‌های مربوط به ریفامپیسین و نانوذرات کروی و میله‌ای طلا در کنژوگه RF-NPs قابل مشاهده است که نشان دهنده واکنش میان نانوذرات میله‌ای و کروی طلا با ریفامپیسین بوده و سنتز صحیح کنژوگه RF-NPs می‌باشد.

۲-۳-۵ Quercetin (به عنوان بازدارنده HSPs عمل می‌کند) با غلظت مناسب اضافه شد و ترکیب به مدت ۵ ساعت



شکل ۶: طیف سنجی مرئی فرابنفش (A): نانوذرات میله‌ای طلا-ریفامپیسین، (B): نانوذرات کروی طلا-ریفامپیسین

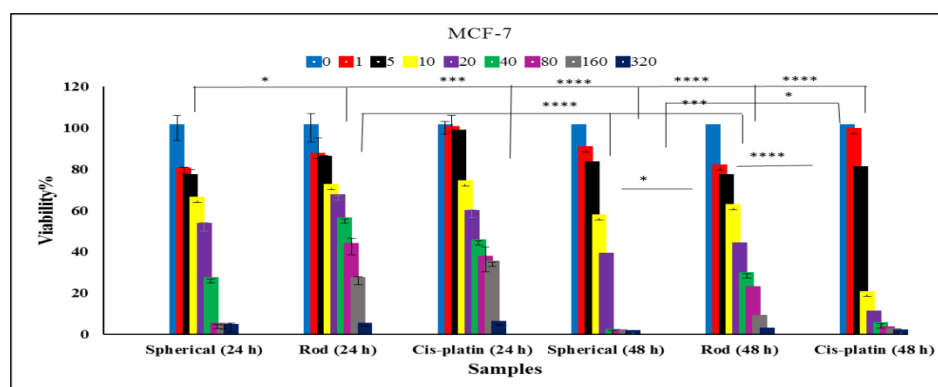


شکل ۷: طیف سنجی مرئی فرابنفش (A): نانوذرات میله‌ای طلا- ریغامپیسین - کوئرستین، (B): نانوذرات کروی طلا- ریغامپیسین - کوئرستین

۲-۳-۶ آزمون سنجش میزان سمیت سلولی

جهت کنترل وضعیت سلول‌ها در محیط کشت، میزان بقا و همچنین بررسی وضعیت سلول‌ها بعد از تیمارهای مختلف دارویی و نانوذرات، از سنجش MTT استفاده شد. آزمایش MTT یک روش رنگ سنجی است که بر اساس احیا شدن و شکسته شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز موجود در میتوکندری فعال سلول‌های زنده و تشکیل کریستال‌های آبی رنگ نامحلول انجام می‌شود. سپس کریستال‌های تشکیل شده در DMSO حل شده و شدت جذب نوری محلول رنگی حاصله توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر و در طول موج ۵۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. کاهش تعداد سلول‌های زنده در نمونه آزمایش منجر به افت فعالیت متابولیکی کل آن گردیده و این کاهش مستقیماً با میزان تشکیل کریستال‌های بنفش رنگ مرتبط است که میزان فعالیت میتوکندری و در نتیجه میزان زنده یا مرده بودن سلول‌ها را نشان می‌دهد. به منظور بررسی میزان اثر سایتوتوکسیسیته نانوذرات در محیط برون تن، پس از کشت رده سلولی MCF-7 و رسیدن به تراکم مناسب سلولی، سلول‌ها در پلیت ۹۶ خانه ای به ازای هر خانه 5×10^3 سلول کاشته شد و یک روز پس از کشت سلول‌ها با غلظت‌های مختلفی (۱ تا ۳۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از نانوذرات کروی و میله‌ای، داروی سیس پلاتین به عنوان کنترل مثبت و محیط کشت بدون دارو به عنوان کنترل منفی تیمار شدند. نتایج حاصل از تست MTT پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت از تیمار سلول‌ها بررسی شد و درصد viability به دست آمد و مقدار ic_{50} با استفاده از نرم‌افزار prism محاسبه

گردید. این آزمایش سه بار مورد تکرار قرار گرفت. با توجه به شکل ۸ در ۲۴ ساعت اول نانوذرات کروی بیشترین کشندگی را نسبت به نانوذرات میله‌ای و حتی سیس پلاتین داشته است تا جایی که در غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تقریباً ۵۰ درصد کشندگی داشته است. این نتیجه می‌تواند به دلیل سایز کوچکتر نانوذرات نسبت به نانوذرات میله‌ای و نسبت سطح به حجم و واکنش‌پذیری بیشتر این ذرات و نفوذ سلولی بیشتر نانوذرات کروی باشد. همچنین با گذشت ۴۸ ساعت از تیمار سلولی توسط نانوذرات با کمترین غلظت، ابتدا کشندگی سلول‌های سرطانی توسط نانوذرات میله‌ای بیشتر بود اما در غلظت‌های بیشتر کشندگی نانوذرات کروی طلا بیشتر شده تا جایی که در غلظت‌های بالای ۴۰ تقریباً زنده مانی سلول‌ها به زیر ۵ درصد رسیده است. به طور کلی هرچه غلظت نانوذرات در محیط سلولی افزایش می‌یابد درصد زنده مانی سلول‌ها کاهش یافته است و اثر این نانوذرات حتی بیشتر از داروی سیس پلاتین مشاهده شد. بنابراین به نظر می‌رسد نانوذرات میله‌ای طلا با غلظت کم برای فتوترمال تراپی بهتر است که نتایج سایر محققین نیز تاییدکننده این موضوع می‌باشد (۲۵-۲۲). همچنین با هدفمند کردن این نانوذرات برای سلول‌های سرطانی خاص به طور مثال با آنتی بادی خاص، می‌توان علاوه بر استفاده در کشندگی سلول‌های سرطانی، از تاثیر این نانوذرات بر سلول‌های سالم جلوگیری کرد. با کنژوگه کردن ترکیبات مختلف بر سطح این نانوذرات هم می‌توان جذب سلولی را افزایش داد و با استفاده از فتوترمال تراپی سلول‌های سرطانی را از بین برد.



شکل ۸: بررسی میزان اثر سایتوتوکسیسیته غلظت‌های متفاوت نانوذرات کروی و میله‌ای طلا در محیط برون تن بر رده سلولی MCF-7 ($p < 0.0001$)

می‌شود (۲۶). فوتوترمال تراپی باعث مرگ سلول‌های سرطانی عمدتاً از طریق نکروز و آپوپتوز می‌شود اما یکی از مهم‌ترین چالش‌های این روش، گرمای بیش از حد است. این گرمای بیش از حد می‌تواند ناشی از دوز زیاد نانوذرات یا قرار گرفتن در معرض لیزر باشد که سبب نکروز می‌شود. در حین نکروز غشای پلاسمایی شکسته و اجزای سیتوپلاسمی به بیرون نشت می‌کنند. التهاب ایجاد شده می‌تواند باعث ایجاد متاستاز و رشد سرطان شود. علاوه بر این، گرمای بیش از حد می‌تواند به سلول‌های سالم همسایه نیز صدمه بزند. از طرف دیگر، فوتوترمال تراپی باعث ایجاد آپوپتوز از طریق مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده می‌گردد که باعث بروز التهاب نمی‌شود. بنابراین، هدف تحقیقات تدوین یک استراتژی جدید از آپوپتوز سلول‌های سرطانی و جلوگیری از نکروز می‌باشد (۲۷). با این وجود، گرمایش پایین باعث کاهش کارایی این روش می‌شود و ممکن است برای سلول‌هایی که مقاومت حرارتی نشان می‌دهند، بسیار مؤثر نباشد. بنابراین شناختن بازیکنان اصلی که در مقاومت در برابر گرما کمک می‌کنند مهم است. بر این اساس، می‌توان استراتژی‌های جدیدی ایجاد کرد که از مقاومت در برابر گرما جلوگیری کرده و آپوپتوز را تقویت کند. عوامل زیادی می‌توانند در مقاومت به گرما نقش داشته باشند مانند: مهار سیگنال‌های مرگ سلولی، مهار اندوسیتوز یا افزایش آگروسیتوز نانوذرات. آپوپتوز ناشی از گرما هم‌چنین می‌تواند توسط یک کلاس از پروتئین‌ها به نام پروتئین‌های شوک

بحث

فوتوترمال تراپی یک روش درمانی با کمترین تهاجم (مسئلاً در صورت عدم کنترل بر روی تابش لیزر، احتمال آسیب به سلول‌های نرمال هم وجود دارد، که با تنظیم شدت لیزر، مدت زمان تابش آن و استفاده از نانوذرات مناسب از عوارض جانبی روش کاهش می‌یابد) است که در آن انرژی فوتون‌ها به انرژی گرمایی تبدیل می‌شود تا هایپرترمی سلولی القاء شود. پلاسمونیک فوتوترمال تراپی به همراه نانوذرات فلزی طلا یک روش جدید و کارآمد برای مقابله با سلول‌های سرطانی است. این روش به دو صورت آپتوز و نکروز و به دلیل ایجاد گرما از رشد سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند و در نهایت آن‌ها را از بین می‌برد. در عین حال به دلیل خواص پلاسمونیک نانوذرات طلا، این ترکیبات به عنوان عوامل کنتراست برای شناسایی زودهنگام بیماری‌ها نیز کاربرد دارند (۵,۶). استفاده از هایپرترمی به عنوان روش درمانی اولیه و کمکی، امروزه به خوبی شناخته شده و در زمینه تحقیقات پزشکی در حال رشد است. در روش هایپرترمی، دمای بافت تومور به 43°C - 40°C می‌رسد و این بالا رفتن دما توسط میکروویو، تابش، اولتراسوند، میدان مغناطیسی تناوبی، نور مادون قرمز (IR) یا تابش نور مرئی انجام می‌شود. در دمای بالاتر از 43°C ، دنا توره شدن پروتئین و تخریب غشاء سلولی اتفاق می‌افتد. در عین حال، مزایای قابل توجهی بر روی کنترل موضعی تومور و نرخ بقاء کلی هم در هایپرترمی به عنوان درمان اولیه و هم کمکی، دیده

عنوان مهارکننده آگزوسایتوز اضافه گردید. برای تأیید کنژوگه با RF، طیف جذب نانوذرات قبل و بعد از کنژوگه با RF بررسی شد. ریفامپیسین به تنهایی در دو طول موج جذب دارد: ۳۳۰ نانومتر و ۴۷۰ نانومتر. وقتی که نانوذرات با RF کنژوگه می‌شوند دو پیک جدید در همان طیف UV نانوذرات ظاهر می‌شوند که نشان‌دهنده سنتز صحیح کنژوگه نانوذرات و ریفامپیسین است. اگر HSP70 برای مقاومت سرطان در برابر فتوترمال تراپی ضروری است، پس استفاده از نانوذرات کنژوگه با مهارکننده‌های HSP70 می‌تواند اثربخشی فتوترمال تراپی را بیشتر کند. از آنجا که کوئرستین (QE) یک مهارکننده امیدوارکننده HSP70 است، در این تحقیق نانوذرات با QE کنژوگه شدند. برای اطمینان از کنژوگه شدن، میزان جذب نانوذرات با و بدون QE اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است که QE به تنهایی در طول موج ۳۷۰ نانومتر جذب دارد. نانوذرات طلا به تنهایی قبل از کنژوگه شدن با QE، پیکی در ۳۷۰ نانومتر را نشان نمی‌دهند، با این حال پس از کنژوگه شدن با QE نمایش یک پیک در ۳۷۰ نانومتر را نشان می‌دهد که ترکیب QE را با نانوذرات تأیید می‌کند. این نتایج با نتایج تحقیقات Moustafa R.K و همکاران در سال ۲۰۱۶ مطابقت دارد (۲۱). سپس اثربخشی نانوذرات طلا کنژوگه شده را بر زنده ماندن سلول‌های سرطانی MCF-7 مورد آزمایش قرار گرفت که کاهش میزان زنده ماندن سلول در مقایسه با گروه شاهد مشاهده شد. در ۲۴ ساعت اول نانوذرات کروی بیشترین کشندگی را نسبت به نانوذرات میله‌ای و حتی سیس پلاتین داشته است تا جایی که در غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تقریباً ۵۰ درصد کشندگی داشته است. این نتیجه می‌تواند به دلیل سایز کوچکتر نانوذرات نسبت به نانوذرات میله‌ای و نسبت سطح به حجم و واکنش‌پذیری بیشتر این ذرات و نفوذ سلولی بیشتر نانوذرات کروی باشد. همچنین با گذشت ۴۸ ساعت از تیمار سلولی توسط نانوذرات با کمترین غلظت، ابتدا کشندگی سلول‌های سرطانی توسط نانوذرات میله‌ای بیشتر بود اما در غلظت‌های بیشتر کشندگی نانوذرات کروی طلا بیشتر شده تا جایی که در غلظت‌های بالای ۴۰ تقریباً زنده‌مانی سلول‌ها به

حرارتی (HSPs) مهار شود. هنگام اتصال به پروتئین‌های دناتوره شده یا واسطه‌هایی که تا حدی آشکار نشده‌اند، HSPها از تجمع آن‌ها جلوگیری می‌کنند و باعث القا refolding پروتئین می‌شوند. جالب است که، فتوترمال تراپی بیان اکثر HSPها را القا می‌کند. مطالعات متعدد اهمیت HSP را در مقاوم ساختن سلول‌های سرطانی در برابر آپوپتوز ناشی از گرما نشان داده‌اند با این حال، ویژگی این مهارکننده‌ها در پروتئین‌های شوک حرارتی منحصر به فرد آزمایش نشده است (۲۸). این نتایج منجر به ساخت مهارکننده HSP70 (Quercetin) کنژوگه شده به نانوذرات طلا شد که در مقایسه با AuNPs بدون کنژوگه، ترکیب جدید نشان داد که توانایی برتر برای مقابله با مقاومت در برابر گرما، باعث می‌شود درصد بیشتری از سلول‌ها تحت آپوپتوز قرار بگیرند. بنابراین، AuNPs در انتقال Quercetin به سلول‌های سرطانی و همچنین به عنوان یک عامل محرک فتوترمال تراپی مرتبط با آپوپتوز عمل می‌کنند (۲۱). در این تحقیق نانوذرات طلا میله‌ای (AuNRs) و کروی با استفاده از یک تکنیک جدید سنتز شد. از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) برای تعیین کیفیت و همگنی نانوذرات استفاده گردید. این نانوذرات به طور یکنواخت سنتز شدند. سپس از آن‌ها تست UV گرفته شد که نانوذرات میله‌ای دو پیک که پیک کوچک در محدوده ۵۲۳ نانومتر و پیک بزرگ در محدوده ۷۳۸ نانومتر مشاهده گردید که نشان دهنده سنتز صحیح و بدون ناخالصی و با سایز و AR حدود ۴ می‌باشد. در مورد نانوذرات کروی هم در طول موج ۵۳۵ نانومتر پیک مشخصی نشان داد. نتایج به دست آمده در این آنالیز مشابه نتایج سایر محققین می‌باشد به عنوان نمونه مشابه تحقیقات Sayed و همکاران در سال ۲۰۱۰ و همچنین Amini و همکاران در سال ۲۰۱۸ می‌باشد. سپس کنژوگه نانوذره-سرم آلبومین گاوی (BSA) تهیه شد؛ استفاده از BSA به منظور جلوگیری از واکنش‌های ناخواسته انجام گرفت. سپس به ترکیب NPs-BSA، آرژینیل گلیسیلاسپارتیک اسید (RGD) اضافه شد. این ترکیب سبب می‌شود، اندوسایتوز به واسطه اینتگرین فعال شود. داروی ریفامپیسین (RF) هم به

خاص در سطح آن‌ها و یا تولید AuNPs با اندازه جدید که در تبدیل انرژی نور به گرما با راندمان بالاتری را توسعه داد. فوتوترمال تراپی، مرگ سلولی را از طریق آپوپتوز یا نکروز ایجاد می‌کند. دوزهای بالای گرمایش (بیشتر از ۵۰ درجه سانتی‌گراد) باعث نکروز می‌شود، که منجر به التهاب شده و برای سلول‌های سالم همسایه مضر است. از طرف دیگر، درجه حرارت پایین‌تر (کمتر از ۵۰ درجه سانتی‌گراد) عمدتاً باعث بروز آپوپتوز می‌شود، زیرا برنامه‌ریزی برای مرگ سلول یک روش برای از بین بردن سلول‌های سرطانی است. هدف اصلی ما این است که فقط در طول فوتوترمال تراپی شروع به آپوپتوز کنیم. برای انجام آپوپتوز در دماهای پایین‌تر، مکانیسم‌های سلولی مقاومت در برابر حرارت باید کنار گذاشته شوند. در واقع HSP70 با جلوگیری از فعال‌سازی سیتوکروم DATP/c کاسپاز به عنوان مهارکننده بالادست آپوپتوز سلول عمل می‌کند. هرچه سطح اولیه HSP70 کمتر باشد، درصد بیشتری از سلول‌ها پس از فوتوترمال تراپی تحت آپوپتوز قرار می‌گیرند. ما این نتایج را با استفاده از ترکیبات نانوذرات میله‌ای و کروی طلا با یک مهارکننده پروتئین شوک حرارتی که سلول‌ها را به فوتوترمال تراپی حساس می‌کند افزایش دادیم و از این طریق، آپوپتوز را به عنوان مرگ سلول‌های سرطان غیر التهابی ترویج می‌کنیم. گسترش این نتایج، نشان دهنده قدم بعدی برای از بین بردن سرطان‌ها به‌طور موثر و با حداقل عوارض جانبی است.

سپاس‌گزاری

این تحقیق، حاصل طرح مصوب در دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه می‌باشد. از کلیه کسانی که به نوعی در تهیه این مقاله مشارکت داشته‌اند تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.
حامی مالی: دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه
تعارض در منافع: وجود ندارد.

زیر ۵ درصد رسیده است. به طور کلی هرچه غلظت نانوذرات در محیط سلولی افزایش میابد درصد زنده مانده سلول‌ها کاهش یافته است و اثر این نانوذرات حتی بیشتر از داروی سیس پلاتین مشاهده شد. بنابراین به نظر می‌رسد نانوذرات میله‌ای طلا با غلظت کم برای فوتوترمال تراپی بهتر است که نتایج سایر محققین نیز تاییدکننده این موضوع می‌باشد (۲۵-۲۲). هم‌چنین با هدفمند کردن این نانوذرات برای سلول‌های سرطانی خاص به طور مثال با آنتی بادی خاص، می‌توان علاوه بر استفاده در کشندگی سلول‌های سرطانی، از تاثیر این نانوذرات بر سلول‌های سالم جلوگیری کرد. با کنژوگه کردن ترکیبات مختلف بر سطح این نانوذرات هم می‌توان جذب سلولی را افزایش داد و با استفاده از فوتوترمال تراپی سلول‌های سرطانی را از بین برد.

نتیجه‌گیری

در دهه گذشته، بسیاری از نشریات مرتبط با استفاده از نانوذرات طلا (AuNPs) در فوتوترمال تراپی نتایج امیدوار کننده-ای برای مقابله با سرطان نشان داده‌اند. در واقع AuNPs ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مناسبی در مقایسه با سایر نانوذرات را نشان می‌دهند. نانوذرات طلا که در معرض نور مادون قرمز قرار می‌گیرند آن را جذب کرده با سرعت و کارایی بالا آن را به گرما تبدیل می‌کنند بنابراین، هنگامی که AuNPs درون یا در مجاورت سلول‌های سرطانی قرار گیرند با تابش الکترومغناطیسی توسط لیزر باعث به وجود آمدن گرمای کافی برای از بین بردن سلول‌های سرطانی می‌شود. علاوه بر این، AuNPs مطلوب هستند زیرا این توانایی را دارند که با مولکول‌های مختلفی که می‌توانند عملکرد آن‌ها را تقویت کنند به راحتی کنژوگه شوند. مطالعات تحقیقات مختلفی برای هدف قرار دادن سلول‌های سرطانی، افزایش جذب سلولی نانوذرات با کنژوگاسیون ترکیب

References:

- 1-Ito A, Shinkai M, Honda H, Kobayashi T. *Medical Application of Functionalized Magnetic Nanoparticles*. *J Biosci Bioeng* 2005; 100(1): 1-11.
- 2-Luksiene Z. *Nanoparticles and their potential application as antimicrobials in the food industry*. In: Food Preservation, Nanotechnology in the Agri-Food Industry, Grumezescu AM, editor. Academic Press; 2017: 567-601.
- 3-Wei W, Zhang X, Zhang S, Wei G, Su Z. *Biomedical and Bioactive Engineered Nanomaterials for Targeted Tumor Photothermal Therapy: A Review*. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2019; 104: 109891.
- 4-Norouzi H, Khoshgard K, Akbarzadeh F. *In Vitro Outlook of Gold Nanoparticles in Photo-Thermal Therapy: A Literature Review*. *Lasers in Medical Science* 2018; 33(4): 917-26.
- 5-Huang X, El-Sayed MA. *Plasmonic Photo-Thermal Therapy (PPTT)*. *Alexandria J Medicine* 2011; 47(1): 1-9.
- 6-Huang X, Jain PK, El-Sayed IH, El-Sayed MA. *Plasmonic Photothermal Therapy (PPTT) Using Gold Nanoparticles*. *Lasers Med Sci* 2008; 23(3): 217-28.
- 7-Liu Y, Crawford BM, Vo-Dinh T. *Gold Nanoparticles-Mediated Photothermal Therapy and Immunotherapy*. *Immunotherapy* 2018; 10(13): 1175-88.
- 8-Li J, Gu M. *Gold-Nanoparticle-Enhanced Cancer Photothermal Therapy*. *IEEE J Selected Topics in Quantum Electronics* 2009; 16(4): 989-96.
- 9-Wan H, Williams RL, Doherty PJ, Williams DF. *A Study of The Reproducibility of the MTT Test*. *J Materials Science: Materials in Medicine* 1994; 5: 154-9.
- 10-Ciapetti G, Cenni E, Pratelli L, Pizzoferrato A. *In Vitro Evaluation of Cell/Biomaterial Interaction by MTT Assay*. *Biomaterials* 1993; 14(5): 359-64.
- 11-Haiss W, Thanh NT, Aveyard J, Fernig DG. *Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles From UV- vis Spectra*. *Anal Chem* 2007; 79(11): 4215-21.
- 12-Amendola V, Meneghetti M. *Size Evaluation of Gold Nanoparticles by UV- vis Spectroscopy*. *J Physl Chem C* 2009; 113(11): 4277-85.
- 13-Jana NR, Gearheart L, Murphy CJ. *Seed - Mediated Growth Approach for Shape - Controlled Synthesis of Spheroidal and Rod-Like Gold Nanoparticles Using a Surfactant Template*. *Advanced Materials* 2001; 13(18): 1389-93.
- 14-Saber R, Shakoory Z, Sarkar S, Tavoosidana G, Kharrazi S, Gill P. *Spectroscopic And Microscopic Analyses of Rod-Shaped Gold Nanoparticles Interacting with Single-Stranded DNA Oligonucleotides*. *IET nanobiotechnology* 2013; 7(2): 42-9.
- 15-Al-Sherbini E-SA. *UV-visible Light Reshaping of Gold Nanorods*. *Materials Chemistry and Physics* 2010; 121(1-2): 349-53.
- 16-Amini A, Kamali M, Amini B, Najafi A. *Enhanced Antibacterial Activity of Imipenem Immobilized on Surface of Spherical and Rod Gold Nanoparticles*. *J Phys D Appl Phys* 2018; 52(6): 065401
- 17- Arnida, Malugin A, Ghandehari H. *Cellular Uptake and Toxicity of Gold Nanoparticles in Prostate*

- Cancer Cells: A Comparative Study of Rods and Spheres*. J Appl Toxicol 2010; 30(3): 212-7.
- 18-Parial D, Patra HK, Roychoudhury P, Dasgupta AK, Pal R. *Gold Nanorod Production by Cyanobacteria—A Green Chemistry Approach*. J Appl Phycol 2012; 24: 55-60.
- 19-Liu H, Pierre-Pierre N, Huo Q. *Dynamic Light Scattering for Gold Nanorod Size Characterization and Study of Nanorod-Protein Interactions*. Gold Bull 2012; 45: 187-95.
- 20-Williams DB, Carter CB. *The Transmission Electron Microscope*. In: Transmission Electron Microscopy. Springer, Boston, MA 1996: 3-17.
- 21-Ali MR, Ali HR, Rankin CR, El-Sayed MA. *Targeting Heat Shock Protein 70 Using Gold Nanorods Enhances Cancer Cell Apoptosis in Low Dose Plasmonic Photothermal Therapy*. Biomaterials 2016; 102: 1-8.
- 22-Dickerson EB, Dreaden EC, Huang X, El-Sayed IH, Chu H, Pushpanketh S, et al. *Gold Nanorod Assisted Near-Infrared Plasmonic Photothermal Therapy (PPTT) of Squamous Cell Carcinoma in Mice*. Cancer Lett 2008; 269(1): 57-66.
- 23-Jang B, Park JY, Tung CH, Kim IH, Choi Y. *Gold Nanorod-Photosensitizer Complex for Near-Infrared Fluorescence Imaging and Photodynamic/Photothermal Therapy in Vivo*. ACS Nano 2011; 5(2): 1086-94.
- 24-Choi WI, Kim JY, Kang C, Byeon CC, Kim YH, Tae G. *Tumor Regression in Vivo by Photothermal Therapy based on Gold-Nanorod-Loaded, Functional Nanocarriers*. ACS Nano 2011; 5(3): 1995-2003.
- 25-Mackey MA, Ali MR, Austin LA, Near RD, El-Sayed MA. *The Most Effective Gold Nanorod Size for Plasmonic Photothermal Therapy: Theory and in Vitro Experiments*. J Phys Chem B 2014; 118(5): 1319-26.
- 26-Graham EG, Macneill CM, Levi-Polyachenko NH. *Review of Metal, Carbon and Polymer Nanoparticles for Infrared Photothermal Therapy*. Nano Life 2013; 3(3): 1330002.
- 27-Sheng W, He S, Seare WJ, Almutairi A. *Review of the Progress Toward Achieving Heat Confinement—the Holy Grail of Photothermal Therapy*. J Biomed Opt 2017; 22(8): 080901.
- 28-Tang X, Tan L, Shi K, Peng J, Xiao Y, Li W, et al. *Gold Nanorods Together with HSP Inhibitor-VER-155008 Micelles for Colon Cancer Mild-Temperature Photothermal Therapy*. Acta Pharmaceutica Sinica B 2018; 8(4): 587-601.

Synthesis and Evaluation of Gold Nanoparticles/Nanorods to Use in Plasmonic Photothermal Therapy

Elahe Darvishi¹, Asra Amani², Somayeh Mirsadeghi³, Behrang Shiri Varnamkhasti^{†2, 4}

Original Article

Introduction: Photothermal therapy is a method of cancer treatment that plasmonic nanoparticles are used to convert infrared light into local heat. Due to the plasmonic properties of gold nanoparticles, this compound was used as a contrast agent. The aim of this study was to synthesize gold nanoparticles with different conjugations for photothermal therapy.

Methods: This research was an experimental study. The method used for the synthesis of spherical and rod gold nanoparticles in this research was the Seeding Method. The nanoparticles were then conjugated with various compounds such as rifampicin, quercetin and RGD. Then, the physical and chemical properties of nanoparticles were determined by DLS, UV-Vis and TEM methods. Cytotoxicity test was also performed on MCF-7 ((Michigan Cancer Foundation-7)) cell line. Cell viability was calculated using prism software. Differences were compared by analysis of variance (ANOVA) using SPSS version 16 software.

Results: In the UV test, two-peaked rod nanoparticles were observed in the range of 523 and 738 nm, and in the case of spherical nanoparticles at 535 wavelengths, which indicates the correct synthesis without impurities and with the appropriate size. In the cell test, a decrease in cell viability was observed compared to the control group. In the first 24 hours, spherical nanoparticles had the highest lethality to the point that at a concentration of 20 µg / ml, it had almost 50% lethality. In addition, after 48 hours at low concentrations, rod nanoparticles showed better results, so they were more suitable. By targeting these nanoparticles to specific cancer cells, in addition to being used to kill cancer cells, the effect of these nanoparticles on healthy cells can be prevented. By conjugating different compounds on the surface of these nanoparticles, cell uptake can also be increased and cancer cells can be killed using photothermal therapy.

Conclusion: According to the results obtained in this study, it seems that low-concentration of gold nanorods are more suitable for photothermal therapy.

Keywords: Photothermal therapy, Gold rod nanoparticles, Gold spherical nanoparticles, Conjugation, Cancer.

Citation: Darvishi E, Amani A, Mirsadeghi S, SHiri Varnamkhasti B. **Synthesis and Evaluation of Gold Nanoparticles/Nanorods to Use in Plasmonic Photothermal Therapy.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2022; 30(3): 4656-69.

¹Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of New Technologies, Amol, Iran.

²Pharmaceutical Sciences Research Center, School of Pharmacy, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

³Endocrinology and Metabolism Research Center, Endocrinology and Metabolism Clinical Sciences Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

⁴Nano Drug Delivery Research Center, Faculty of Pharmacy, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran.

*Corresponding author: Tel: 09163139865, email: shiribehrang@yahoo.com