



تأثیر استفاده از ترکیبات نانو ذرات در درمان به روش هایپرترمی

سلیمی شاد، مژده^(۱) - ره گشای، محمد^(۲)

دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، دانشکده فنی مهندسی، گروه مهندسی هسته‌ای
دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده فنی و مهندسی، گروه مهندسی هسته‌ای

چکیده:

در این پژوهش اثر شیوه درمانی هایپرترمی مغناطیسی با استفاده از نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن و همچنین استفاده از میدان مغناطیسی بر سلول‌های سرطانی 4T1 بررسی شد و همچنین اثر پرتونشاندارسازی نانوذرات مذکور با رادیویازوتوپ ایتريوم-90 اثر همزمان هایپرترمی و رادیویازوتوپ تراپی در سلول‌های سرطانی 4T1 مقایسه شده است. پس از انجام ارزیابی های درمانی هایپرترمی بر درصد زنده مانی سلول ها ، در زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار سلول ها با ترکیب نانوذرات پرتونشاندار و اعمال میدان مغناطیسی نتایج قابل قبولی حاصل گردید.
کلمات کلیدی: هایپرترمی-نانوذرات-ایتريوم-90-میدان مغناطیسی.

مقدمه :

علم نانو در عرصه ی پزشکی کاربردهای فراوانی از قبیل؛ تولید واکسن، تشخیص زودرس بیماری ها، تصویربرداری، کنترل و درمان بیماری ها، ژن درمانی.... دارد. از جمله بیماری هایی که نانو فناوری می تواند در تشخیص و درمان آن حضور فعالی داشته باشد، سرطان است. روش درمانی هایپرترمی به عنوان یک روش درمان مکمل در کنار پرتودرمانی و شیمی درمانی استفاده می شود. البته امروزه در دنیا و از جمله کشور ما برای مقابله با توده های سرطانی از روش های درمانی متعددی مثل ژن درمانی، پیوند سلول های پایه، استفاده می شود [1]. در سال ۱۹۷۵، در اولین کنگره ی بین المللی هایپرترمی در واشنگتن، دانشمندان اعلام نمودند که اعمال حرارت به عنوان یک روش درمانی به همراه روش های درمانی معمول، روش مؤثری در درمان تومورهاست. از آن زمان به بعد هایپرترمی به عنوان یک روش درمان الحاقی به همراه پرتودرمانی و شیمی درمانی استفاده می شود [2].
مهم ترین مزیت نانو ساختارها به عنوان حامل دارو کوچکی اندازه ی آنهاست. این موضوع عبور آنان را از غشای سلول های زیستی امکان پذیر و آسان می سازد. هم چنین به منظور زیست سازگار نمودن نانوحامل های دارویی و در امان ماندن آنها از سیستم ایمنی بدن، آنان را با پوشش های محافظ مناسبی می پوشانند. در نتیجه ی این امر، افزایش حضورشان در سیستم گردش خون تضمین می گردد. نانوحامل های مغناطیسی معمولاً دارای هسته ای مغناطیسی بوده که با روکشی پلیمری پوشیده شده اند. هسته ی مغناطیسی آنان می تواند نانوذرات مغناطیسی بر پایه ی اکسید آهن، کبالت و یا نیکل باشد. [1] xie J و همکاران در سال 2010 نانوذرات اکسید آهن را با دوپامین روکش کردند و به مس ۶۴ متصل کردند و آن را به آلبومین سرم انسان تزریق کردند و بوسیله PET و MRI تصویربرداری کردند که نتیجه آن افزایش جذب توموری و کاهش جذب در ماکروفاژها بود. [3].



Cigdem Ichedef و همکاران در سال 2012 با اتصال گوانین به نانوذرات مغناطیسی (MNP) به منظور تصویربرداری و تشخیص در نواحی کبد و شش در آزمایش *in vivo* پس از تجویز داخل وریدی سطح بالای رادیوایکتیو را در کبد و ریه مشاهده نمودند. [4]. فتاحیان و همکاران در سال 2012 نانوذرات آهن را با استفاده از DMSA روکش کردند و با تکنسیم ^{99m}Tc نشاندار کردند و سمیت و توزیع زیستی در موش سالم را ارزیابی کردند که نتایج نشان می‌دهد که نانوذرات آهن از طریق غشای سلول‌های مختلف منتقل می‌شوند اما هیچ اختلالی در عملکرد کلیه و کبد ایجاد نمی‌کند حتی در دوزهای بالا [5]. در این پژوهش پس از سنتز نانوذرات اکسید آهن به شیوه هم‌رسوبی و تیمار شدن سطح آنها توسط (۳-APTES) (۳-aminopropyl) triethoxysilane به شلاتور DOTA-NHS متصل گردید و سپس با ایتريوم ^{90}Y پرتونشاندارسازی انجام شد. اثر درمانی ترکیب در سلول‌های سرطانی T1 (murine mammary carcinoma cells) با استفاده از تریپان بلو مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس میدان مغناطیسی متناوب (f: 100 KHz, H: 290Gs) بر روی سلول‌های تیمار شده با ترکیب نانورادیودارویی به یک شیوه غیرمخرب اعمال گردید.

روش کار:

در ابتدا با استفاده از شیوه متداول هم‌رسوبی نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن سنتز شده است. و سپس به منظور اصلاح نانوذرات از روکش APTES استفاده شده است. رادیوایزوتوپ مورد استفاده در این تحقیق ایتريوم ^{90}Y می‌باشد. رادیوایزوتوپ ایتريوم ^{90}Y (با نیمه عمر ۶۴ ساعت) از ژنراتور استرانسیوم ^{90}Y دوشیده می‌شود. پس از سنتز نانوذرات پرتوزا، با استفاده از تکنیک‌هایی نظیر TEM اندازه و همگنی نانوذرات مورد ارزیابی قرار گرفته شده است. به منظور پرتونشاندارسازی از روش غیر مستقیم نشاندارسازی استفاده شده است زیرا راندمان و پایداری این شیوه نشاندارسازی به مراتب بیشتر از شیوه مستقیم است و از لیگاند DOTA-NHS استفاده شده است. پس از انجام پرتونشاندارسازی نانوذرات، بازده نشاندارسازی با روش رادیو کروماتوگرافی لایه نازک (RTLC) مورد ارزیابی قرار گرفته است. به منظور ارزیابی درون سلولی، اندازه‌گیری میزان زنده بودن سلولی و تکثیر انجام شده است. به منظور ارزیابی درصد زنده ماندن سلول‌های تیمار شده با ترکیبات مختلف سنتز شده در این پژوهش از روش رنگ آمیزی تریپان بلو استفاده شده است. با استفاده از روش مذکور سلول‌های زنده سفید رنگ و سلول‌های از بین رفته با رنگ آبی در زیر میکروسکوپ نمایان و قابل مشاهده بود. سپس درصد سلول‌های زنده از رابطه ذیل به دست آمد:

$$\% \text{ Viability} = \frac{\text{تعداد سلول زنده}}{\text{تعداد کل سلول ها}} \times 100$$

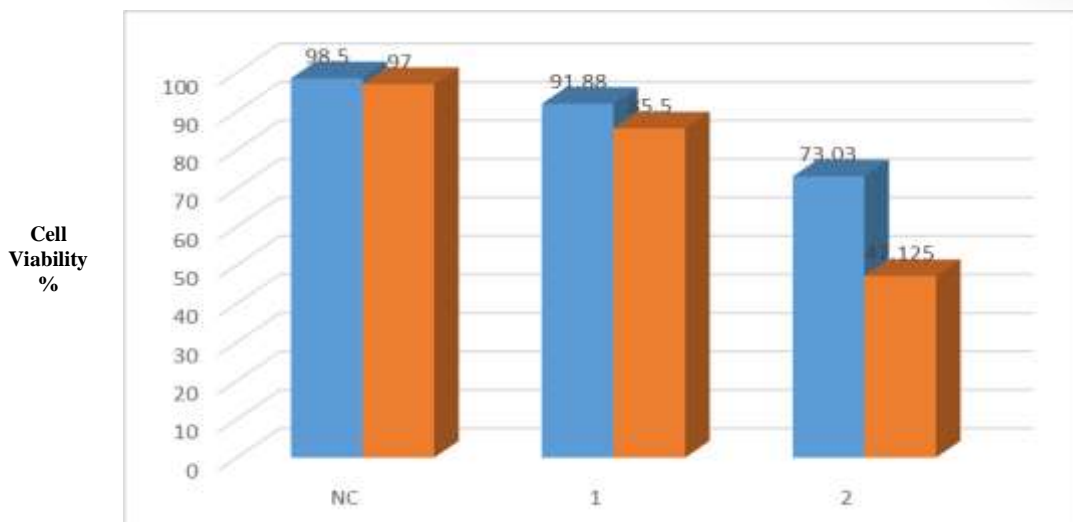
به منظور انجام هایپرترمیای مغناطیسی از یک میدان مغناطیسی متناوب استفاده شده است. شدت و بسامد میدان مورد استفاده به ترتیب ۲۹۰ گوس و ۱۰۰ کیلوهرتز بوده است. به منظور ارزیابی درون سلولی، پس از آماده سازی سلول‌ها و استخراج از مخزن نیترون مایع، کشت سلولی انجام شد و به منظور رشد و تکثیر آنها پس از تقویت در انکوباتور و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس سلول‌های (3.8×10^5) 4T1 با نانوذرات و نانوذرات پرتونشاندار (حاوی ۲۰ میکروکوری ایتريوم ^{90}Y) تیمار شدند. پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباته شدن سلول‌ها در دمای



۳۷ درجه سلسیوس ، درصد زنده مانی آنها به شیوه تریپان بلو زیر میکروسکوپ مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمایش‌های اخیر یک مرتبه نیز با اعمال میدان مغناطیسی متناوب بر روی سلول‌ها تکرار گردید. به منظور انجام هایپرترمیای مغناطیسی با استفاده از میدان مغناطیسی، چاهک‌های حاوی سلول‌های تیمار شده با دو نمونه مذکور در مرکز میدان مغناطیسی (اندازه میدان حدود ۲۹۰ گاوس و فرکانس ۱۰۰ کیلوهرتز) قرار گرفتند و سپس دمای آنها با استفاده از یک مولتی متر اندازه‌گیری شد. با کنترل شدت میدان مغناطیسی (با تنظیم جریان با بیشینه ۵۰۰ آمپر)، دمای مذکور برای ۳ دقیقه ثابت نگه داشته شد. اثر درمانی درون سلولی در سلول‌های تیمار شده با ۱. نانوذرات و ۲. نانوذرات پرتونشاندار شده با ایتريوم ۹۰ مورد ارزیابی قرار گرفت. تعیین درصد زنده مانی سلولی مجدداً در حضور میدان مغناطیسی متناوب نیز تکرار شد. همچنین اختلاف دمای ایجاد شده در چاهک‌های سلولی نیز پس از اعمال میدان با استفاده از یک مولتی متر اندازه‌گیری شد. دستگاه میدان مغناطیسی استفاده شده در این پژوهش متعلق به سازمان انرژی اتمی کرج می باشد. که با همکاری دکتر حمیدرضا ذوالعطا و دکتر فریدون عباسی و در اختیار قرار دادن وسایل و لوازم آزمایشگاهی این پروژه به انجام رسید.

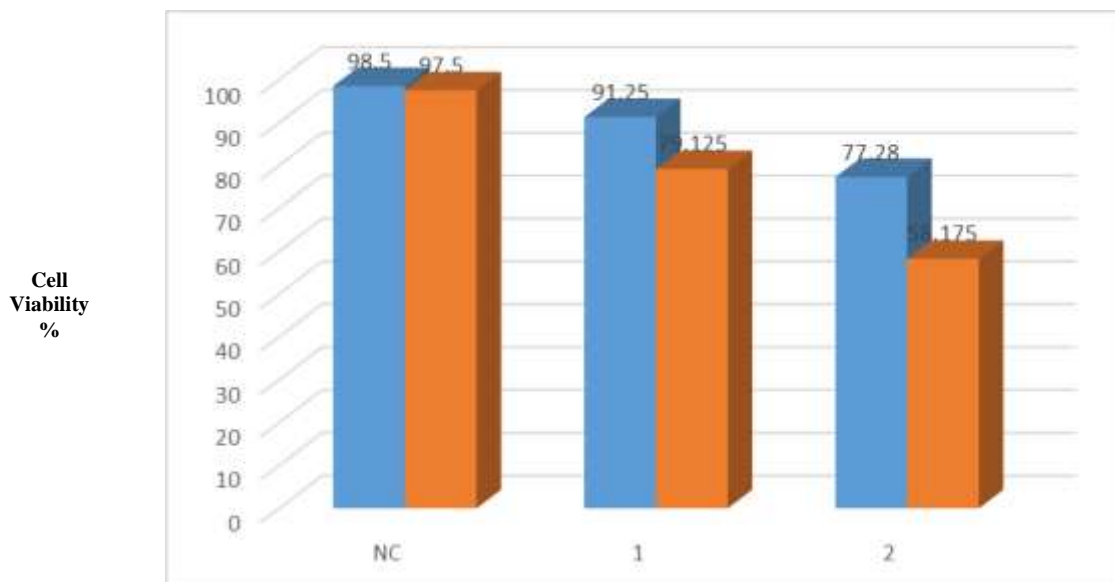
نتایج :

با انجام میکروسکوپی (Transmission Electron Microscopy (TEM) ، از تک پخشی و همچنین اندازه مناسب نانوذرات اکسید آهن سنتز شده اطمینان حاصل گردید. نانوذرات مغناطیسی سنتز شده با این روش تک پخش بوده و دارای قطر متوسط کوچکتر از ۲۰ نانومتر می باشند. ارزیابی نشاندارسازی نانوذرات با استفاده از دستگاه RTLC انجام شد و درصد نشاندارسازی ۹۷/۳ بود که درصد قابل قبولی است. همچنین میزان دمای ایجاد شده بر اثر هایپرترمی در غلظت مشخص نانوذرات اکسید آهن طی ۳ دقیقه اعمال میدان مغناطیسی نیز با مولتی متر اندازه‌گیری شد که نتایج نشان دهنده بطور متوسط 0.2 ± 0.5 افزایش دما است. دو محلول حاوی نانوذره و نانوذره نشاندار شده با ایتريوم ۹۰ به منظور آزمایشات سلولی در رده سلول‌های سرطانی آماده سازی و فیلتر شد (ایتريوم ۹۰ به مقدار ۴۰ میکرو کوری، نانوذرات ۳۰ میکروگرم) و پس از تیمار سلول‌ها با محلول‌های مذکور، میزان مرگ آنها پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و جو CO_2 مورد ارزیابی قرار گرفت. شمارش سلول‌ها در هر تیمار و درصد زنده مانی سلول‌های سرطانی پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت در شکل (۵) نشان داده شده است.



شکل (۵) درصد زنده مانی سلول های توموری تیمار شده با NC (کنترل) ۱. نانوذره، ۲. نانوذره نشاندار شده با ایتريوم ۹۰ و بدون اعمال میدان (پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت)

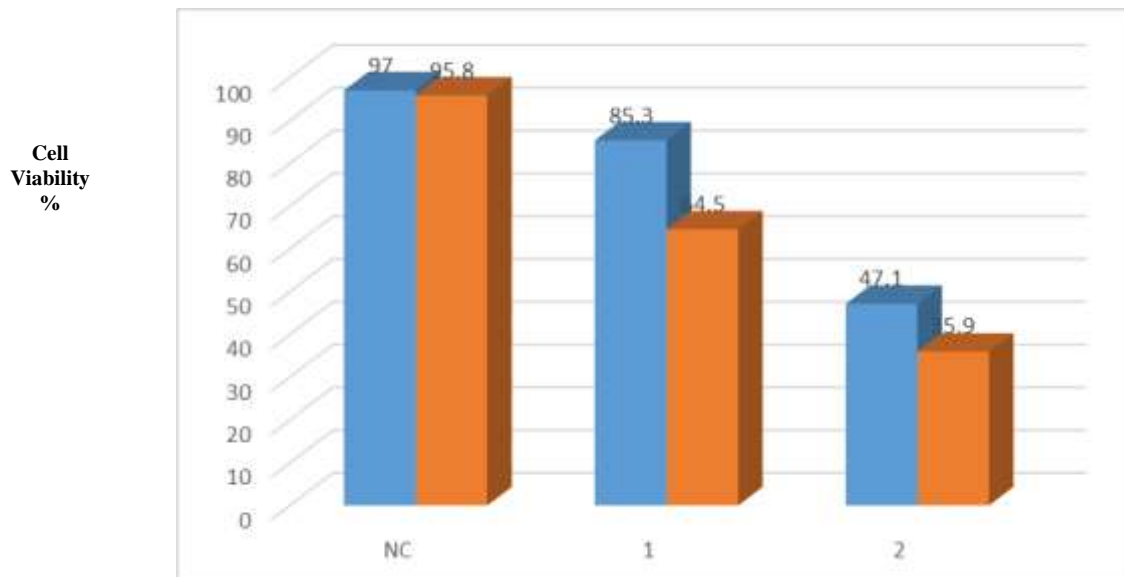
با اعمال میدان مغناطیسی و انجام همزمان هایپرترمی مغناطیسی در ۲۴ ساعت پس از تیمار سلول ها نتایج ذیل حاصل گردید:



شکل (۶) درصد زنده ماندن سلولهای (N=4) سرطانی 4T1 پس از تیمار با داروی سنتز شده (پس از ۲۴ ساعت) و انجام هایپرترمی مغناطیسی (NC- کنترل، ۱- نانوذره اکسید آهن، ۲- نانوذره نشاندار شده با ایتريوم ۹۰)



با اعمال میدان مغناطیسی و انجام همزمان هایپرترمی مغناطیسی در ۴۸ ساعت پس از تیمار سلول‌ها نتایج ذیل حاصل گردید:



شکل (۷) درصد زنده ماندن سلول‌های 4T1 پس از تیمار با داروی سنتز شده (NC- کنترل، ۱- نانوذره اکسید آهن، ۲- نانوذره نشاندار شده با ایتريوم-۹۰) و انجام هایپرترمی مغناطیسی (۴۸ ساعت پس از تیمار).

بحث و نتیجه گیری :

شمارش سلول‌ها در هر تیمار و درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی پس از ۲۴ ساعت نشان می‌دهد که درصد زنده ماندن سلول‌های توموری تیمار شده با ۱- نانوذرات اکسید آهن و ۲- نانوذره نشاندار شده با ایتريوم ۹۰ به ترتیب به $91/8 \pm 2/5$ و $73 \pm 2/9$ کاهش یافته اند یعنی بترتیب $6/7\%$ ، $25/5\%$ نسبت به نمونه کنترل ($98/5 \pm 1$) کاهش درصد زنده ماندن مشاهده گردیده است. همچنین شمارش سلول‌ها در هر تیمار و درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی پس از ۴۸ ساعت نشان می‌دهد که درصد زنده ماندن سلول‌های توموری تیمار شده با ۱- نانوذرات اکسید آهن و ۲- نانوذره نشاندار شده با ایتريوم ۹۰ به ترتیب به $85/3 \pm 3$ و $47/1 \pm 1/9$ کاهش یافته اند یعنی بترتیب $11/7\%$ ، $49/9\%$ نسبت به نمونه کنترل ($97 \pm 1/4$) کاهش درصد زنده ماندن مشاهده گردیده است. با اعمال میدان مغناطیسی و انجام همزمان هایپرترمی مغناطیسی، درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی تیمار شده با نمونه شماره یک (نانوذرات مغناطیسی) از $91/8$ درصد (در غیاب میدان) به $79/1$ (در حضور میدان مغناطیسی) کاهش یافته است. نتیجه مذکور نشان دهنده این است که انجام هایپرترمی مغناطیسی $12/7$ درصد از سلول‌های سرطانی را (در ۲۴ ساعت پس از تیمار سلول‌ها) بیشتر از بین برده است.

همچنین درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی تیمار شده با نمونه شماره دو (نانوذرات مغناطیسی پرتو نشاندار شده با ایتريوم-۹۰) از 73 درصد (در غیاب میدان) به $58/2$ (در حضور میدان مغناطیسی) کاهش یافته است. نتیجه مذکور نشان دهنده این است که انجام هایپرترمی مغناطیسی همزمان با رادیوایزوتوپ درمانی، $14/8$ درصد از سلول‌های



سرطانی را بیشتر از بین برده است. با اعمال میدان مغناطیسی و انجام همزمان هایپرترمی مغناطیسی در ۴۸ ساعت پس از تیمار سلول-ها، درصد زنده مانی سلول های سرطانی تیمار شده با نمونه شماره یک (نانوذرات مغناطیسی) از ۸۵/۳ درصد (در غیاب میدان) به ۶۴/۴ درصد (در حضور میدان مغناطیسی) کاهش یافته است. نتیجه مذکور نشان دهنده این است که انجام هایپرترمی مغناطیسی ۲۰/۹ درصد از سلول های سرطانی را (در ۴۸ ساعت پس از تیمار سلول-ها) بیشتر از بین برده است. همچنین درصد زنده مانی سلول های سرطانی تیمار شده با نمونه شماره دو (نانوذرات مغناطیسی پرتو نشاندار شده با ایتريوم ۹۰) از ۴۷/۱ درصد (در غیاب میدان مغناطیسی) به ۳۵/۸ درصد (در حضور میدان مغناطیسی) کاهش یافته است. نتیجه مذکور نشان دهنده این است که انجام هایپرترمی مغناطیسی همزمان با رادیویازوتوپ درمانی، ۱۱/۳ درصد از سلول های سرطانی را در ۴۸ ساعت بیشتر از بین برده است. بنابراین میتوان نتیجه گرفت که ترکیب استفاده از هر دو شیوه درمان (رادیویازوتوپ و هایپرترمی) به طور همزمان بهترین اثر ضد سرطانی را بر روی رده سلولی مذکور داشته است. نتایج نشان داد که استفاده از نانوذرات اصلاح شده پرتونشاندار (در حضور میدان مغناطیسی متناوب) برای درمان سرطان های از نوع 4T1 امکانپذیر و موثر است. همچنین جمع دو شیوه درمانی بطور همزمان با مهندسی نانوذرات سوپراپارامغناطیسی پرتونشاندار و میدان مغناطیسی منجر به نتایج بهتری نسبت به انجام هر شیوه بطور مجزا گردیده است.

تشکر و قدردانی:

دستگاه میدان مغناطیسی استفاده شده در این پژوهش متعلق به سازمان انرژی اتمی کرج می باشد که تمامی آزمایش ها در این سازمان انجام شده است. با تشکر فراوان از زحمات و همکاری دکتر حمیدرضا ذوالعطا و دکتر فریدون عباسی که با در اختیار قرار دادن وسایل و لوازم آزمایشگاهی، نویسندگان را در نوشتن این پژوهش یاری کردند.

مراجع :

- [1] Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery, Challa S.S.R. Kumar A, Faruq M. *Advanced Drug Delivery Reviews* 63 (2011) 789-8028 .
- [2] Hyperthermia; A New Cancer Treatment Modality, Daryuosh Fatehi, *Journal of Isfahan Medical school*, (2009), Vol27 No.94
- [3] [3]PET/NIRF/MRI triple functional iron oxide nanoparticles. Xie J, Chen K, Huang J, Lee S, Wang J, Gao J, Li X, Chen X. *Biomaterials* 31 (2010) 3016–3022.
- [4] [4]Preparation and characterization of radiolabeled magnetic nanoparticles as an imaging agent. Çiğdem İçedef, Serap Teksöz, Perihan Ünak, Emin İ. *MedineJ Nanopart Res* 14 (2012) 1077
- [5] [5]Biodistribution and toxicity assessment of radiolabeled and DMSA Coated ferrite nanoparticles in mice, *J Radioanal Nucl Chem* (2012) 293915–921.