



بیست و ششمین کنفرانس اپتیک و
فوتونیک ایران و دوازدهمین کنفرانس
مهندسی و فناوری فوتونیک ایران،
دانشگاه خوارزمی،
تهران، ایران.
۱۶-۱۵ بهمن ۱۳۹۸



بستگی طول موجی نرخ دارورسانی به سلولهای سرطانی پوست موش تحت اثرات حرارتی نانو ذرات طلا در برهمکنش با لیزر نانو ثانیه

سیده هاجر حسینی کیا- محمد رضایی پندری- آتوسا سادات عربانیان- ندا سلیمانی- رضا مسعودی*

پژوهشکده‌ی لیزر و پلاسما، دانشگاه شهید بهشتی، اوین، تهران (R-Massudi@sbu.ac.ir*)

چکیده - برهمکنش پالسهای کوتاه لیزری با نانوذرات فلزی موجب ایجاد گرمای شدیدی در اطراف نانوذره می شود که امروزه جهت درمان سرطان، دارورسانی سلولی و دیگر کاربردهای پزشکی استفاده می شود. در این مقاله فرایند دارورسانی سلول های سرطانی پوست موش تحت اثرات گرمایی ناشی از نانوذرات طلا در برهمکنش با لیزر نانو ثانیه‌ی Nd:YAG با سه طول موج مختلف در محدوده‌ی فروسرخ، مرئی و فرابنفش مورد بررسی قرار می گیرد و نرخ دارورسانی و درصد زیست پذیری سلول ها برای این سه طول موج اندازه گیری می شود و در نهایت مشاهده می شود که به ازای یک انرژی مشخص، نرخ دارورسانی انجام شده در محدوده‌ی مرئی بیشتر از محدوده‌ی فرابنفش و فروسرخ خواهد بود.

کلید واژه- دارورسانی سلولی، لیزر پالسی نانو ثانیه، نانوذرات طلا

Wavelength dependence of rate of drug delivery to murine melanoma under the thermal effects of gold nanoparticles interaction with nanosecond laser

Seyyede Hajar Hosseinikia- Mohammad Rezaei Pandari- Atoosa Sadat Arabanian- Neda Soleimani- Reza Massudi*

Laser and Plasma Research Institute, Shahid Beheshti University, Evin, Tehran
(R-Massudi@sbu.ac.ir*)

Abstract- Interaction of the short-pulse lasers with metal nanoparticles leads to produce a large amount of heat around the nanoparticles. Today, it is used for cancer therapy, drug delivery and other medical applications. In this article, the process of drug delivery to murine melanoma under the thermal effects of gold nanoparticle interaction with three different wavelengths of Nd:YAG nanosecond laser in infrared, visible and ultraviolet regimes, is investigated and drug delivery rate and cell viability rate for these three different wavelengths is measured and finally, it is observed that for a specific amount of energy, the drug delivery rate in visible regime is more than that in ultraviolet and infrared regimes.

Keywords: Cell drug delivery, nanosecond-pulse laser, gold nanoparticles

مقدمه

غشاء سلول‌های جانوری به عنوان یک لایه‌ی محافظ بین سیتوپلاسم و محیط خارج عمل می‌کند، بطوریکه تنها مولکول‌ها و یون‌های کوچک اجازه‌ی نفوذ به محیط درون سلول را دارند. بنابراین داروهایی با ابعاد مولکول‌های بزرگ‌تر اجازه‌ی نفوذ به درون سلول را ندارند. از طرفی تولید داروهای جدید در ابعاد کوچک‌تر کاری بسیار پرهزینه می‌باشد. امروزه محققان به دنبال یافتن روش‌های نوینی جهت انتقال دارو به درون سلول می‌باشند. روش‌های زیستی، شیمیایی و فیزیکی هم‌چون تزریق مستقیم، الکتروپوریشن^۱ و ... هر یک با معایبی نظیر درصد پایین زیست‌پذیری (درصد پایین زنده ماندن سلول‌ها) یا نرخ پایین دارورسانی (درصد پایین سلول‌های دارورسانی شده) روبه‌رو هستند. نتایج تجربی نشان می‌دهد که گرمای ایجاد شده در اثر برهمکنش پالس لیزری با نانوذرات طلا توانایی ذوب کردن لایه لیبیدی غشای سلولی و ایجاد روزنه روی آن را دارد [۱]. در سال ۲۰۰۳، برای اولین بار لین^۲ و همکارانش با استفاده از ذرات پلاسمونی بر روی افزایش نفوذپذیری غشاء کار کردند و دو مشکل درصد پایین زیست‌پذیری و نرخ پایین دارورسانی را رفع کردند [۳]. تا سال ۲۰۱۳ تمامی تحقیقات با استفاده از طول موج ۵۳۲ nm انجام می‌گرفت تا این‌که در سال ۲۰۱۳ مونییر^۳ و همکارانش اثر طول موج ۵۳۲nm و ۱۰۶۴nm لیزر نانوآئینه‌ی Nd:YAG و نانوذرات طلا را جهت انجام فرایند دارورسانی سلولی بررسی کردند و به مقایسه‌ی اثر این دو طول موج بر روی نتیجه‌ی آزمایشات مربوط به دارورسانی سلولی پرداختند [۱]. به دلیل وابستگی نرخ دارورسانی به طول موج لیزر، در این مقاله به بررسی و مقایسه‌ی اثر برهمکنش سه طول موج ۱۰۶۴nm، ۵۳۲nm و ۳۵۵nm لیزر نانوآئینه‌ی Nd:YAG و نانوذرات طلا جهت انجام فرایند دارورسانی به سلول سرطانی پوست موش خواهیم پرداخت.

تئوری

۱- برهمکنش نور با نانوذرات فلزی

هنگامی که نانوذرات فلزی تحت تابش امواج الکترومغناطیسی با طول موج‌هایی بزرگ‌تر از ابعاد نانوذره قرار می‌گیرند، الکترون‌های آزاد آن‌ها تحت فرکانسی به نام فرکانس پلازما شروع به نوسان می‌کنند. نوسان این الکترون‌ها موجب تولید یک میدان الکترومغناطیسی قوی و میزان زیادی گرما در فاصله‌ی کمی از نانوذره می‌شود که اندازه‌ی این میدان و گرما مستقیماً به دو کمیت سطح مقطع پراش C_{sca} و سطح مقطع جذب C_{abs} مربوط می‌شود [۴].

$$C_{sca} = \frac{8}{3} \pi k^4 a^3 \left| \frac{\epsilon - \epsilon_m}{\epsilon + 2\epsilon_m} \right|^2 \quad (1)$$

$$C_{abs} = 4\pi k a^3 \text{Im} \left[\frac{\epsilon - \epsilon_m}{\epsilon + 2\epsilon_m} \right] \quad (2)$$

که $\epsilon = \epsilon(\omega)$ گذردهی الکتریکی نانوذرات، ϵ_m گذردهی الکتریکی محیط، ω فرکانس نور فرودی، a شعاع نانوذرات و K تابعی از ضریب شکست نانوذره است. بنابراین اندازه‌ی گرما و میدان تولید شده به فرکانس نور فرودی بستگی دارد.

در اثر برهمکنش نانوذرات فلزی با امواج الکترومغناطیسی درون محیط‌های مایع هم‌چون محیط کشت سلول، بسته به میزان بزرگی میدان الکترومغناطیسی و گرمای تولید شده، امکان تولید حباب‌هایی در ابعاد نانومتری وجود دارد که به دو دسته‌ی نانوحباب‌های پلاسمایی و نانوحباب‌های گرمایی تقسیم می‌شود. برای تولید نانوحباب‌های پلاسمایی، شدت میدان نزدیک ایجاد شده حدود 10^{13} w/cm^2 و برای تولید نانوحباب‌های گرمایی، دمای آستانه‌ی ایجاد شده در فاصله‌ی بسیار کم از نانوذره حدود $520 \text{ K} - 647 \text{ K}$ می‌باشد. در اثر برهمکنش لیزر نانوآئینه با نانوذرات طلا، شدت میدان نزدیک ایجاد شده در حدود 10^7 W/cm^2 می‌باشد که برای تولید نانوحباب پلاسمایی کافی نمی‌باشد. اما میزان گرمای ایجاد شده در حدی است که می‌تواند منجر به تولید نانوحباب گرمایی بشود [۵، ۱].

1-Electroporation

2-Lin

3-Meunier

۲-غشاء سلول و ایجاد روزنه بر روی آن

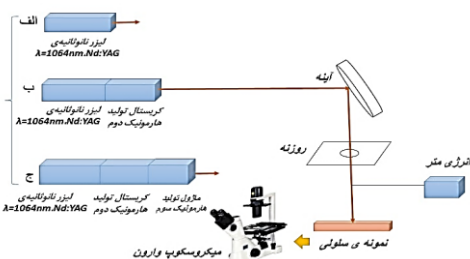
جهت وارد کردن داروهایی با ابعاد بزرگ به درون سلول، باید روی غشاء آن روزنه ایجاد کنیم. نتایج تجربی نشان می دهد که گرمای ناشی از نانوحباب های ایجاد شده در اثر برهمکنش پالس لیزری با نانوذرات طلا توانایی ذوب کردن لایه لیپیدی غشای سلول و ایجاد روزنه روی آن را دارد و می تواند اجازه ی ورود مولکول های بزرگ تر اعم از انواع داروها را بدهند و ایده ی مناسبی جهت دارورسانی سلولی باشد به طوری که در نهایت میزان زیست پذیری سلولها و نرخ دارورسانی نتیجه ی مناسب تری را نسبت به روش های پیشین فراهم می کند [۱].

چیدمان تجربی

آماده سازی نمونه:

نانوذرات طلا به روش سنتز شیمیایی تهیه شده است که اندازه ی اکثر آنها در بازه ی ۵۰-۶۰ nm می باشد. آزمایشات صورت گرفته در بخش بعد نیز، برای سه غلظت ۸، ۱۶ و ۲۴ $\mu\text{g/ml}$ انجام گرفته است که برای غلظت ۸ $\mu\text{g/ml}$ دارورسانی سلولی انجام نمی پذیرد و در غلظت ۲۴ $\mu\text{g/ml}$ نیز تمامی سلول ها دچار مرگ سلولی می شوند. اما برای غلظت ۱۶ $\mu\text{g/ml}$ درصد زیست پذیری سلولها و نرخ دارورسانی در حالت بهینه می باشد. بنابر این تمامی آزمایش ها با نانوذرات با غلظت ۱۶ $\mu\text{g/ml}$ انجام می شود. چهار ساعت قبل از انجام آزمایش، سلول های سرطانی پوست موش کشت داده می شود و سپس تعداد ۵۰۰۰ سلول داخل چاهک های مورد مطالعه ریخته می شود. سپس سلول ها میان نانوذرات طلا با غلظت ۱۶ $\mu\text{g/ml}$ خوابانده می شود. برای بررسی میزان دارورسانی صورت گرفته به جای دارو از رنگ تریپان بلو^۴ استفاده می شود تا سازوکار باز و بسته شدن غشاء توسط ورود رنگ به درون سیتوپلاسم بررسی شود. بررسی درصد زیست پذیری سلولها و بسته شدن غشاء نیز، توسط اضافه کردن رنگ تریپان بلو به محیط کشت سلول، پس از گذشت ۲ ساعت صورت می گیرد [۲].

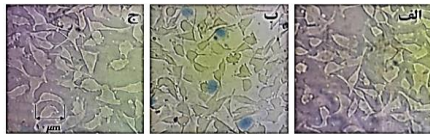
چیدمان اپتیکی:



شکل ۱: چیدمان تجربی دارورسانی سلولی توسط برهمکنش لیزر و نانوذرات طلا در طول موج الف) ۱۰۶۴ nm (ب) ۵۳۲ nm (ج) ۳۵۵

در این چیدمان، از یک لیزر Nd:YAG با طول پالس ۱۰ ns و نرخ تکرار ۱۰ Hz استفاده شده است. در هر سه آزمایش، باریکه ی لیزر پس از برخورد به یک آینه با ضریب بازتاب بالا و عبور از یک روزنه که قطر آن به اندازه ی قطر هر چاهک حاوی سلول است، به نمونه ی سلولی حاوی نانوذرات طلا برخورد می کند. انرژی پالس خروجی از روزنه توسط انرژی متر اندازه گیری می شود. جهت بررسی نرخ دارورسانی انجام شده، رنگ را قبل از پرتو دهی سلولها، به محیط کشت اضافه می کنیم. در اثر برهمکنش لیزر با نانوذرات طلا انتظار می رود بر روی غشاء سلولها روزنه ایجاد شود و رنگ به عنوان دارو وارد سلول شود. سپس با استفاده از یک میکروسکوپ وارون تعداد سلول های رنگ شده (آبی) و رنگ نشده بررسی می شود. به این ترتیب سلولهایی که روی غشاء آنها روزنه ایجاد شده و رنگ وارد آنها شده یا به عبارتی دارورسانی شده است از سلولهای بی رنگ دارورسانی نشده متمایز می گردد. برای بررسی میزان درصد زیست پذیری، ابتدا سلولها تحت تابش لیزر قرار داده می شود و پس از گذشت دو ساعت و بسته شدن غشاء سلولها، رنگ را به محیط کشت اضافه می کنیم و سلولها را توسط میکروسکوپ بررسی می کنیم. به این ترتیب، سلولهای رنگ شده نمایشگر سلولهایی هستند که غشاء آنها پس از باز شدن، بسته نشده است، بنابراین سلول مرده محسوب می شوند. سلولهای رنگ نشده نیز نمایشگر سلولهای زنده می باشد. درصد زیست پذیری و نرخ دارورسانی با استفاده از روابط زیر محاسبه می شود:

نانوذرات طلا برای سه طول موج الف) ۱۰۶۴ nm، ب) ۵۳۲ nm و ج) ۳۵۵ nm را نشان می‌دهد. بزرگ‌نمایی میکروسکوپ نوری نیز، $200\times$ می‌باشد. طبق شکل ۳-ب، در اثر برهمکنش طول موج ۵۳۲nm لیزر با نانوذرات طلا، واکنش‌های لازم جهت تولید گرما و ایجاد روزنه بر روی غشاء رخ داده است و رنگ تریپان بلو وارد محیط سیتوپلاسم شده است. در حالی که به ازای طول موج‌های ۳۵۵nm و ۱۰۶۴nm میزان گرمای لازم جهت ایجاد روزنه بر روی غشاء تولید نشده است و رنگ وارد محیط سیتوپلاسم نشده است و سلول‌ها بی‌رنگ مانده‌اند.



شکل ۳: تصویر میکروسکوپی سلول‌های مورد مطالعه پس از برهمکنش لیزر و نانوذرات طلا برای سه طول موج الف) ۱۰۶۴ nm، ب) ۵۳۲ nm و ج) ۳۵۵ nm

نتیجه‌گیری

سطح مقطع جذب بالای نانوذرات طلا در طول موج ۵۳۲nm نسبت به طول موج‌های ۳۵۵nm و ۱۰۶۴nm باعث تولید مقدار زیادی گرما در انرژی‌های نسبتاً پایین شده، که سبب ذوب شدن غشاء و ایجاد روزنه بر روی آن می‌شود. نتایج این بررسی نشان می‌دهد که با استفاده از هارمونیک دوم لیزر Nd:YAG می‌توان در انرژی‌های پایین، نرخ بالایی از دارو رسانی و زیست‌پذیری برای سلول‌های زیستی را بدست آورد.

مرجع‌ها

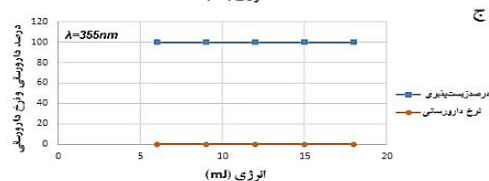
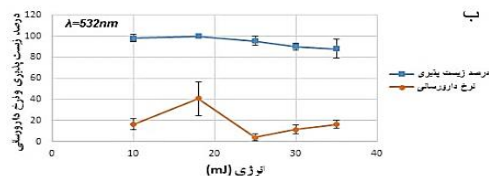
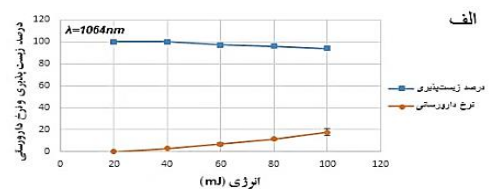
- [1] Lalonde, B. S.-L.; Boulais, É.; Lebrun, J.-J.; Meunier, M. Visible and Near Infrared Resonance Plasmonic Enhanced Nanosecond Laser Optoporation of Cancer Cells. *Biomed. Opt. Express* 2013, 4, 490-499
- [2] Cell perforation mediated by plasmonic bubbles generated by a single near infrared femtosecond laser pulse
- [3] Pitsillides CM, Joe EK, Wei X, Anderson RR, Lin CP (2003) Selective cell targeting with light-absorbing microparticles and nanoparticles. *Biophys J* 84:4023-4032
- [4] Stefan A. Maier, Plasmonics: Fundamentals and applications
- [5] Pustovalov VK, Smetannikov AS, Zharov VP. Photothermal and accompanied phenomena of selective nanophotothermolysis with gold nanoparticles and laser pulses. *Laser Phys Lett* 2008;5(11):775-92

$$\text{درصد زیست‌پذیری} = \frac{\text{سلول‌های بدون رنگ}}{\text{کل سلول‌ها}} \times 100\%$$

$$\text{نرخ دارو رسانی} = \frac{\text{سلول‌های رنگ‌شده}}{\text{کل سلول‌ها}} \times (\text{درصد زیست‌پذیری})$$

نتایج تجربی

نرخ دارو رسانی سلولی و درصد زیست‌پذیری پس از گذشت دو ساعت برای سه آزمایش جداگانه در طول موج‌های ۱۰۶۴ nm، ۵۳۲nm و ۳۵۵nm لیزر نانوئانی‌هی Nd:YAG به ازای تابش ۹۰ پالس برای هر چاهک حاوی سلول، محاسبه و در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲: نرخ دارو رسانی (نقاط دایره) و درصد زیست‌پذیری (نقاط مربع) سلول‌های B16 برای سه طول موج الف) ۱۰۶۴ nm، ب) ۵۳۲ nm، ج) ۳۵۵ nm به ازای انرژی‌های مختلف پالس (هر آزمایش سه بار تکرار شده است)

با محاسبه سطح مقطع‌های جذب توسط رابطه‌ی ۲، سطح مقطع جذب در طول موج ۵۳۲ nm بیست برابر سطح مقطع جذب در طول موج ۱۰۶۴nm و دو برابر سطح مقطع جذب در طول موج ۳۵۵ nm می‌باشد که باعث می‌شود نانوذرات طلا در این طول موج گرمای بیشتری تولید کند و منجر به ذوب غشاء و ایجاد روزنه بر روی آن بشود. طبق نمودارهای شکل ۲، نرخ دارو رسانی سلولی در انرژی ۱۸mJ برای طول موج ۵۳۲ nm بیشترین میزان خود را دارد که نشان دهنده‌ی تولید گرمای بیشتر توسط نانوذرات می‌باشد. در حالی که به ازای این انرژی در دو طول موج دیگر دارو رسانی انجام نشده است. شکل ۳ تصویر میکروسکوپی سلول‌های مورد مطالعه پس از برهمکنش لیزر و