



## اثر حساس‌کنندگی پرتوی نانو ذرات طلائی ترکیب شده با فولیک اسید در پرتو درمانی سطحی سلول‌های سرطانی رده‌ی MCF-7

کریم خوش‌گرد<sup>۱</sup>، بیژن هاشمی\*<sup>۱</sup>، عظیم اربابی<sup>۲</sup>، محمدجواد رسایی<sup>۳</sup>، مسعود سلیمانی<sup>۴</sup>

۱. گروه فیزیک پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، صندوق پستی: ۱۴۱۱۵-۳۳۱، تهران - ایران
۲. گروه رادیوتراپی اکتولوژی، مرکز پزشکی آموزشی درمانی امام حسین (ع)، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، صندوق پستی: ۱۹۳۹۵-۴۷۱۹، تهران - ایران
۳. گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، صندوق پستی: ۱۴۱۱۵-۳۳۱، تهران - ایران
۴. گروه هماتولوژی پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، صندوق پستی: ۱۴۱۱۵-۳۳۱، تهران - ایران

**چکیده:** امروزه با پیشرفت نانوفن آوری، می‌توان نانو موادی با عدد اتمی بالا، نظیر نانو ذرات طلا، را به روش‌های مختلفی به طور اختصاصی در سلول‌های توموری متمرکز کرد و از مزیت افزایش دز ناشی از مجاورت این عنصر دارای عدد اتمی بالا در کنار سلول‌های سرطانی به عنوان یک حساس‌کننده پرتویی بهره برد. در این پژوهش نانو ذرات طلا با قطر میانگین ۵۰ نانومتر سنتز و با مولکول فولیک اسید یکی شد. این کمپلکس به مدت ۲۴ ساعت و در غلظت‌های مختلف با سلول‌های MCF-7 گرماگذاری شده و میزان سمیت‌زایی آن مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که افزایش غلظت نانو ذرات طلا به بالاتر از حد مشخصی می‌تواند سلامت سلولی را تحت تأثیر قرار دهد. میزان حساس‌کنندگی پرتویی نانو ذرات طلا با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در سلول‌های MCF-7 تحت ۲ گری پرتو ایکس از یک دستگاه پرتو درمانی ارتولتاژ در انرژی‌های مختلف ۱۲۰، ۱۸۰، ۲۰۰ کیلو ولت بیشینه و با استفاده از روش MTT ارزیابی شد. اختلاف معناداری در میزان بقا در گروه‌های تابش‌دهی شده در حضور و عدم حضور نانو ذرات طلا مشاهده شد. بیش‌ترین مقدار ضریب افزایش دز برابر با  $1.34 \pm 0.03$  برای باریکه‌ی پرتو ایکس ۱۸۰ کیلو ولت بیشینه به دست آمد. یافته‌های این پژوهش این امکان را می‌دهد که با اعمال کاهش دزی به میزان یک سوم دز تجویزی، اثر مشابهی، از آسیب سلولی، در سلول‌های سرطانی هم‌زمان با محافظت بیش‌تر از بافت‌های سالم در معرض خطر، در مجاورت هدف ایجاد شود.

**کلیدواژه‌ها:** حساس‌کنندگی پرتویی، نانو ذرات طلا، فولیک اسید، پرتو درمانی سطحی

## The Radiosensitivity Effect of Folic Acid Conjugated Gold Nanoparticles in Superficial Radiation Therapy of MCF-7 Cancer Cell Line

K. Khoshgard<sup>1</sup>, B. Hashemi\*<sup>1</sup>, A. Arbabi<sup>2</sup>, M.J. Rasaei<sup>3</sup>, M. Soleimani<sup>4</sup>

1. Medical Physics Department, Tarbiat Modares University, P.O.Box: 14115-331, Tehran - Iran
2. Radiotherapy Department, Imam Hossein Hospital, Shahid Beheshti University, P.O.Box: 19395-4719, Tehran - Iran
3. Medical Biothecology Department, Tarbiat Modares University, P.O.Box: 14115-331, Tehran - Iran
4. Hematology Department, Tarbiat Modares University, P.O.Box: 14115-331, Tehran - Iran

**Abstract:** Recent advances in nanotechnology have enabled us to accumulate high atomic-number nano-materials, such as gold nanoparticles (GNPs), in tumor cells selectively using different techniques and take the advantage of the dose enhancement factor resulting from the presence of such high-Z elements as the vicinity of cancerous cells as a radiosensitizer agent. In this research, the GNPs with an average diameter of 50nm were synthesized and conjugated with folic acid. Different concentrations of this nanoconjugate were incubated with MCF-7 cells for 24 hours and its cytotoxicity was investigated. The results showed that increasing the nanoconjugate concentration up to a critical amount, affects the cells viability. The radiosensitizing effect of the folate nanoconjugate, with a concentration of 50 $\mu$ g/mL, on the MCF-7 cells was assessed under 2Gy of x-ray radiation, generated by an orthovoltage radiotherapy machine, at various energies of 120, 180, 200 kVp, using the MTT assay. Significant differences in the cell survival were noted among the groups exposed to x-ray radiation with and without the nanoconjugate. A maximum dose enhancement factor of  $1.34 \pm 0.03$  was obtained for the 180kVp X-ray beam. The findings enable us to decrease by one third of the prescribed dose while having the same level of damage to cancer cells. Also, this dose reduction results in lower exposure to the normal tissues located close to the target.

**Keywords:** Radiosensitization, Gold Nanoparticles, Folic Acid, Superficial Radiotherapy

\*email: bhashemi@modares.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۹۰/۱۱/۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۹۱/۱۱/۲۸



## ۱. مقدمه

یکی از شایع‌ترین علت‌های مرگ و میر در زنان، سرطان پستان است. این بیماری حدود ۲۲ درصد از کل سرطان‌ها را شامل می‌شود و ۷۰ درصد از مبتلایان به سرطان پستان به علت پیشرفته بودن بیماری در زمان تشخیص، جان خود را از دست می‌دهند [۱]. در پرتو درمانی سرطان، تابش یوننده اختلافی بین بافت‌های سالم و بدخیم قائل نیست و با وجود تلاش‌های زیاد، سمیت ناشی از تابش هم‌چنان به عنوان عامل محدودکننده‌ی دز تابشی باقی مانده است. از طرف دیگر، افزایش دز در سلول‌های سرطانی که به عنوان هدف غایی محسوب می‌شود، درمان سرطان را به طور قابل ملاحظه‌ای بهبود می‌بخشد [۲]. یکی از راه‌های افزایش دز در سلول‌های سرطانی، بدون تجاوز از حد دز قابل تحمل بافت‌ها و اندام سالم، استفاده از حساس‌کننده‌های پرتویی در این سلول‌ها است. در حال حاضر چندین ماده‌ی شیمیایی بدین منظور توسعه یافته‌اند [۳، ۴]، اما استفاده‌ی گسترده از آن‌ها مورد بحث و مناقشه است. مواد با عدد اتمی بالا نیز از زمان‌های طولانی در گذشته به عنوان عاملی برای افزایش دز کشته‌ی موضعی ناشی از پرتوهای یوننده در گستره‌ی انرژی‌های پایین شناخته شده‌اند [۵]. آثار سوختگی و نکروزه شدن پوست در بیماران مبتلا به سرطان نواحی سر و گردن، بعد از پرتو درمانی در نواحی‌ای که نزدیک صفحات فلزی قرار داشته‌اند، شاهده‌ی از مشاهدات اولیه‌ی بالینی ناشی از چنین حساس‌کننده‌های پرتویی است [۶]. امروزه با پیشرفت نانوفن‌آوری، بهره‌مندی از خصوصیت افزایش دز مواد با عدد اتمی بالا در مقیاس نانو، از طریق تجمع نانوذراتی نظیر نانوذرات طلا در تومورها امکان‌پذیر شده است. نخستین و شاخص‌ترین مطالعه‌ی مربوط به حساس‌کنندگی پرتوی نانوذرات طلا، در سال ۲۰۰۴ توسط هاینفیلد و همکارانش [۷] انجام شد. آن‌ها با تزریق درون‌رگی نانوذرات طلا به قطر ۱/۹ نانومتر به موش‌های دارای تومور، آن‌ها را تحت پرتو درمانی با پرتوهای ایکس ۲۵۰ کیلوولت بیشینه قرار دادند، که منجر به بقای یکساله‌ی ۸۶٪ در آن‌ها در مقابل ۲۰٪ در مقایسه با گروه تحت درمان با پرتو ایکس تنها شد. به نظر می‌رسد طلا به خاطر زیست‌سازگاری‌اش<sup>(۱)</sup>، بهترین گزینه برای این منظور باشد [۸]. هم‌چنین نانوذرات طلا به عنوان نانوذره‌ی مرجع با سمیت کم و به عنوان معیاری عملی<sup>(۲)</sup> برای مقایسه‌ی اثر دیگر نانوذرات پیشنهاد شده است [۹]. در برهم‌کنش فوتون- ماده، احتمال رخداد فرایند فوتوالکتریک که منجر به جذب پرتو یوننده‌ی

ایکس می‌شود وابستگی مستقیم شدیدی به عدد اتمی ماده‌ی جاذب (Z) دارد در حالی که وابستگی معکوس شدیدی نیز به انرژی (E) دارد، به طوری که سطح مقطع مؤثر برهم‌کنش فوتوالکتریک برای هر اتم تقریباً با  $Z^4$  افزایش و با  $E^3$  کاهش می‌یابد. در برهم‌کنش بین فوتون‌های با انرژی پایین، نظیر آنچه که در پرتو درمانی ارتوتولتاژ مورد استفاده قرار می‌گیرد، در صورت حضور نانوذرات طلا، فوتوالکتریک‌ها، الکترون‌های اوژه و الکترون‌های ثانویه‌ای با انرژی کم‌تر، تولید می‌شوند که فرایندهای کاهنده‌ی انرژی هستند. این الکترون‌های ثانویه بیش‌ترین انرژی اولیه‌ی ذره را حمل می‌کنند [۱۰] و می‌توانند به طور بسیار مؤثری باعث شکست در رشته‌ی DNA حتی در انرژی‌های زیر ۱۵ eV شوند [۱۱]. بنابراین، انتظار می‌رود در صورت حضور اختصاصی نانوذرات طلا در مجاورت سلول‌های سرطانی، در نتیجه‌ی افزایش احتمال برهم‌کنش‌های فوتوالکتریک با نانو ذرات مذکور و متعاقباً افزایش دز جذبی در این سلول‌ها، بهره‌ی پرتو درمانی به واسطه‌ی افزایش اثر تخریبی پرتویوننده در سلول‌ها افزایش یابد. با وجود مطالعات زیادی که حساس‌کنندگی پرتوی نانوذرات طلا را گزارش کرده‌اند [۱۲]. در اغلب آن‌ها تنها از مقدار انرژی معینی از پرتوهای یوننده استفاده شده و هم‌چنین این مقدار انرژی در مطالعه‌های مختلف متفاوت بوده است. از طرف دیگر، مطالعه‌های پیشین پرتوهای ایکس ناشی از دستگاه‌های ارتوتولتاژ معمول در بخش‌های پرتو درمانی بالینی به طور خاص مورد توجه قرار نگرفته‌اند. بنابراین یک توافق نظر کلی در کاربرد بالینی این موضوع، به علت شرایط مختلف مطالعات انجام شده و گزارش‌های علمی، وجود ندارد. از طرفی، یکی از بزرگترین مشکلات و محدودیت‌های روش‌های متعارف پرتو درمانی در درمان سرطان، آسیب هم‌زمان به سلول‌ها و بافت‌های سالم مجاور سلول‌های سرطانی در حین درمان است. لذا تمام تلاش‌های پژوهش‌گران بر آن است که اثربخشی ماده‌ی پرتوزای درمانی یا روش‌های پرتو درمانی داخلی یا خارجی به طور اختصاصی یا هدفمند به سلول‌های سرطانی رسانده شود و به نظر می‌رسد که به کمک فن‌آوری نانو بتوان به این مهم دست یافت [۱۳]. برای مثال در مطالعه‌ی برون‌تنی [۱۴]، نانوذرات طلا برای درمان هدفمندتر با مولکول‌های گلوکز و سیستمین ترکیب شدند. در مطالعه‌ی برون‌تنی دیگری [۱۵]، با استفاده از نانوذرات طلای ترکیب شده با گلوکز به همراه پرتو دهی با منبع ۲۰۰ کیلوولت بیشینه در سلول‌های سرطانی پروستات رده‌ی DU-۱۴۵،



۹۷٪) ساخت شرکت سیگما-آلدریج، متانول ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) و دی کلرومتان ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) ساخت شرکت مرک بودند.

### ۲.۲ تجهیزات مورد استفاده

مهم‌ترین تجهیزات مورد استفاده در این مطالعه عبارت بود از: یک دستگاه میکروسکوپ الکترون عبوری (TEM)، مدل LEO 906، یک دستگاه فرآوایی مدل UP400S، یک دستگاه طیف‌سنج تبدیل فوری زیر قرمز (FT-IR) مدل Nicolet IR100، Thermo Scientific، یک دستگاه ارتولتاژ پرتودرمانی مدل SIEMENS، Stabilipan2، و یک دستگاه دزیمر اتاقتک یونش فارمر مدل N30013.

### ۳.۲ ساخت نانوذرات طلا و اتصال آن‌ها به فولیک اسید

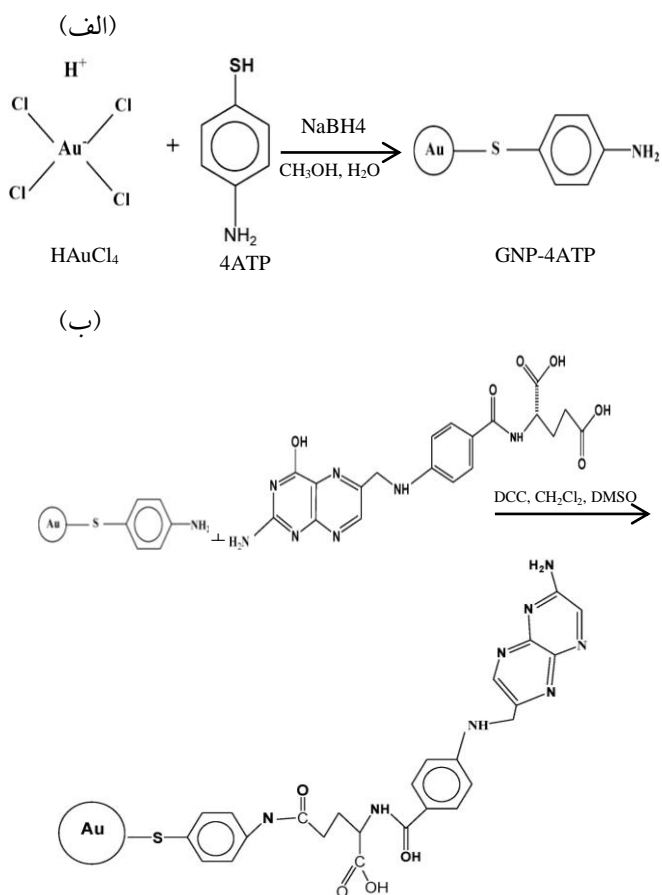
برای ساخت نانوذرات طلا (GNP) از روش کاهش به وسیله سدیم بروهیدرید استفاده شد [۲۰]. در این روش که در دو مرحله جداگانه انجام می‌شود (شکل ۱)، در مرحله نخست نانوذرات طلا سنتز می‌شوند، در حین واکنش کاهش در این مرحله، مولکول ۴-آمینوتیوفنول (EATP) که به عنوان پیوندگر عمل می‌کند، نیز در محیط واکنش وجود دارد و از طریق گروه  $-\text{SH}$  به اتم‌های طلا متصل شده و کمپلکس پایدار از نانوذرات ۴ATP-GNP تشکیل می‌شود. هم‌چنین مولکول ۴ATP، در انتهای سر دیگر خود گروه  $-\text{NH}_2$  دارد که برای یکی شدن با فولیت یا مولکول فولیک اسید مناسب است. اتصال فولیک اسید به کمپلکس ۴ATP-GNP در واکنشی مجزا و در مرحله‌ای دیگری انجام می‌شود. ساخت بعد از انجام آزمایش‌های مختلف به این صورت انجام شد: در مرحله نخست، ابتدا مقدار ۴۰ میلی‌گرم از نمک طلا در ۱۰ میلی‌لیتر متانول حل شد و به محلول، مقدار ۷۵ میلی‌گرم ۴-آمینوتیوفنول در حال هم‌زدن اضافه شد. سپس محلول کاهنده از انحلال ۸۰ میلی‌گرم سدیم بورهیدرید در ۵ میلی‌لیتر آب ۴ بار تقطیر شده به صورت تازه تهیه شد و به محلول طلا در حالی که به شدت در حال هم‌زدن بود، طی مدت ۱۵ دقیقه اضافه شد. طی این عمل رنگ محلول به صورت قهوه‌ای تیره درآمد که نشان‌دهنده تشکیل نانوذرات طلا است. فرایند هم‌زدن تا یک ساعت ادامه یافت و در نهایت محصول نهایی (GNP-۴ATP) در مدت ۲۰ دقیقه در سانتریفوژ با سرعت ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه از متانول جدا شد؛ سپس برای خالص‌سازی از شستشوی مکرر با دی کلرومتان و آب یون‌زدایی

توانستند بهره‌ی درمانی را تا حدود ۲ برابر افزایش دهند. در توسعه‌ی عوامل ضد توموری جدید، به سیستم‌های دارای فولیک اسید توجه ویژه‌ای شده است. فولیک اسید یک ویتامین ضروری برای بدن است و در تکثیر سلولی نقش بسیار مهمی را دارا است. بر روی غشای سلول‌های سرطانی خاصی نظیر سلول‌های رده سرگردن، پستان، رحم، تخمدان و ... گیرنده‌های فراوانی برای دریافت فولیک اسید وجود دارد. به طوری که می‌توان با ترکیب فولیک اسید با مواد درمانی گامی مؤثرتر در راستای هدف‌گیری اختصاصی سلول‌های سرطانی داشت. مزایای انتخاب لیگاند کوچکی مثل فولیک اسید در مقابل لیگاندهای بزرگ‌تری چون منوکلونال آنتی بادی، وزن کم آن و در نتیجه محدودتر شدن ابعاد حامل‌های دارویی است [۱۳، ۱۶]. در زمینه‌ی هدف‌گیری سلول‌های سرطانی به واسطه‌ی ترکیب عوامل ضد سرطان با فولیک اسید مطالعاتی انجام گرفته است. برای مثال در مطالعه‌ی داروی پالیپکس [۱۷] و در مطالعه‌ی دیگری داروی ضد سرطان داکسوروبیسین [۱۸] با فولیک اسید یکی شدند و درصد جذب بالای این دارو در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های سالم تأیید شد. اخیراً در مطالعه‌ی [۱۹] فولیک اسید با نانوذرات طلا به قطر حدود ۵۰nm یکی شده و در درمان سلول‌های سرطانی حنجره و دهانه‌ی رحم با باریکه‌ی لیزر استفاده نمودند. در تمامی این مطالعه‌ها دلیل ترکیب مولکول فولیک اسید و با دارو یا عامل درمانی براساس این واقعیت است که سلول‌های سرطانی از رشد و سرعت تکثیر بالایی برخوردارند و چون نیاز به فولیک اسید در آن‌ها بالا است منجر به برداشت بیش‌تر آن شده و در نتیجه بازده درمانی افزایش یافته است. هدف از مطالعه‌ی حاضر، مقایسه‌ی میزان حساس‌کنندگی پرتوی نانوذرات طلائی ترکیب شده با فولیک اسید بر روی سلول‌های سرطانی پستانی رده‌ی MCF-7 در انرژی‌های مختلف پرتوهای ایکس حاصل از دستگاه‌های ارتولتاژ معمول در بخش‌های پرتودرمانی بوده است.

## ۲. مواد و روش‌ها

### ۱.۲ مواد

نمک طلا ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) با خلوص بیش از ۴۹٪، ۴-آمینوتیوفنول ( $\text{C}_6\text{H}_4\text{NS}$ ) با خلوص بیش از ۹۹/۵٪، سدیم بورهیدرید ( $\text{NaBH}_4$ ) با خلوص ۹۹/۹۹٪، ان و ان پریم-دی سیکلوهاگزیل کربودی‌آمید یا به اختصار DCC ( $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_2$ ) با خلوص بیش از ۹۹٪، فولیک اسید ( $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_6$ ) با خلوص



**شکل ۱.** نحوه‌ی اتصال فولیک اسید به نانوذرات طلا به وسیله‌ی پیوندگر ۴-آمینوتیوفنول به صورت طرح‌واره؛ الف) مرحله‌ی تشکیل GNP-4ATP؛ ب) مرحله‌ی تشکیل ترکیب نهایی GNP-4ATP-FA.

## ۵.۲ پرتودهی و دزیمتری تابش

برای پرتودهی، از دستگاه پرتو درمانی ارتوولتاژ موجود در بیمارستان امام حسین (ع) تهران استفاده شد. پرتودهی گروه‌های مختلف با انرژی‌های ۱۲۰، ۱۸۰ و ۲۰۰ کیلو ولت بیشینه انجام شد. قبل از پرتودهی، دستگاه با استفاده از دزیمتری اتافکک یونش فارمر درجه‌بندی [۲۱] و میزان خروجی دستگاه با وسیله‌های مختلف موجود و در فواصل مختلف از سر دستگاه تعیین شد. برای پرتودهی، تعداد ۱۰ هزار سلول در تعداد مشخصی از خانه‌های صفحه‌ی ۹۶ چاهکی ریخته و دز ۲ گری به وسیله‌ی دستگاه مناسب میدان تابش ۱۰cm×۸cm و فاصله‌ی سطح کاغذی برابر با ۳۰ سانتی‌متر به گروه‌های درمانی اعمال شد. در کنار گروه‌های درمانی که متشکل از «پرتو تنها» و «پرتو به همراه نانوذرات طلا» بود، گروه‌های کنترل (سلول تنها) یا به عبارتی سلول بدون پرتو و بدون نانوذرات و گروه «نانوذرات تنها» (سلول با نانوذرات) نیز در صفحه‌های ۹۶ چاهکی کشت داده شدند.

شده استفاده، و در هوای آزاد خشک شد. در مرحله‌ی دوم که جهت اتصال فولیک اسید به نانوذرات طلا انجام شد؛ ابتدا ۸ میلی‌گرم از محصول مرحله‌ی قبل (GNP-4ATP) در ۱۵ میلی‌لیتر دی‌کلرومتان به مدت حدود ۱۵ دقیقه در دستگاه فراآوایی قرار گرفت، تا حجم نهایی به ۱۰ میلی‌لیتر برسد؛ سپس محلول فولیک اسید (۲۲ میلی‌گرم) در حلال DMSO (۵ میلی‌لیتر) به آن اضافه شد. در این حالت محلول به رنگ زرد مایل به نارنجی درآمد؛ فرایند هم‌زدن تا ۲۰ دقیقه ادامه یافت و سپس محلول DCC (۱۱ میلی‌گرم) در دی‌کلرومتان (۱۰ میلی‌لیتر) به آهستگی و به صورت قطره قطره به محلول در حال هم‌زدن اضافه شد. فرایند هم‌زدن تا ۱۰ ساعت ادامه یافت و رنگ محلول به رنگ سبز-زرد درآمد. سپس برای جداسازی محلول نهایی از سانتریفوژ (۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه، به مدت ۲۰ دقیقه) و برای خالص‌سازی از شستشو در دی‌کلرومتان و آب یون‌زدایی شده استفاده شد. محصول نهایی (GNP-4ATP-FA) بعد از خشک کردن در مجاورت هوا به صورت پودر برای استفاده‌های بعدی در دمای اتاق نگهداری شد.

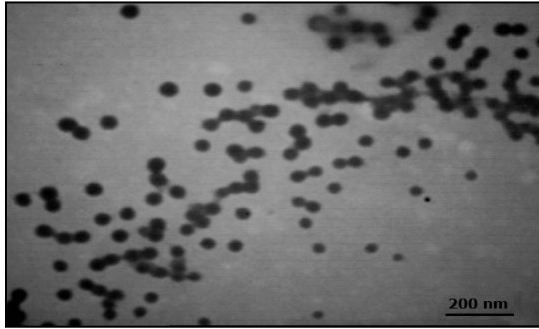
برای بررسی اندازه و نیز شکل ظاهری نانوذرات طلای ساخته شده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری استفاده شد. تحلیل توزیع اندازه‌ی نانوذرات طلا به کمک نرم‌افزار Image Tool انجام شد.

## ۴.۲ کشت سلول‌های سرطانی رده‌ی MCF-7

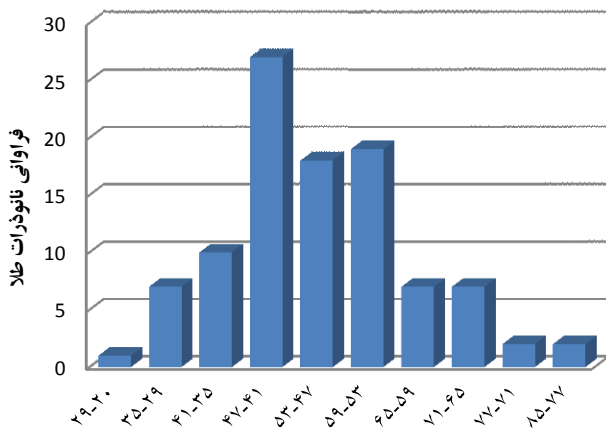
این رده از سلول‌های سرطانی از آن پستان است و از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سرطان پستان به علت میزان شیوع بالای آن انتخاب شد؛ همچنین در این رده‌ی سلولی، بیان گیرنده‌های فولیک اسید در سطح سلولی نسبت به سلول‌های سالم در بافت‌های مجاور تومور بیشتر بوده و از این رو برداشت فولیک اسید و در نتیجه برداشت نانوذرات طلای متصل شده به فولیک اسید نسبت به سلول‌های سالم بسیار بیش‌تر خواهد بود. کشت سلول‌های سرطانی در محیط DMEM 1X (DMEM 1X حاوی ۴/۵ گرم بر لیتر D-Glucose، NaHCO<sub>3</sub>، HEPES، Glutamax) به اضافه‌ی ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین / استرپتومایسین (همگی از شرکت Invitrogen-GIBCO) در دستگاه گرم‌کننده در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد CO<sub>2</sub> انجام شد.



(الف)

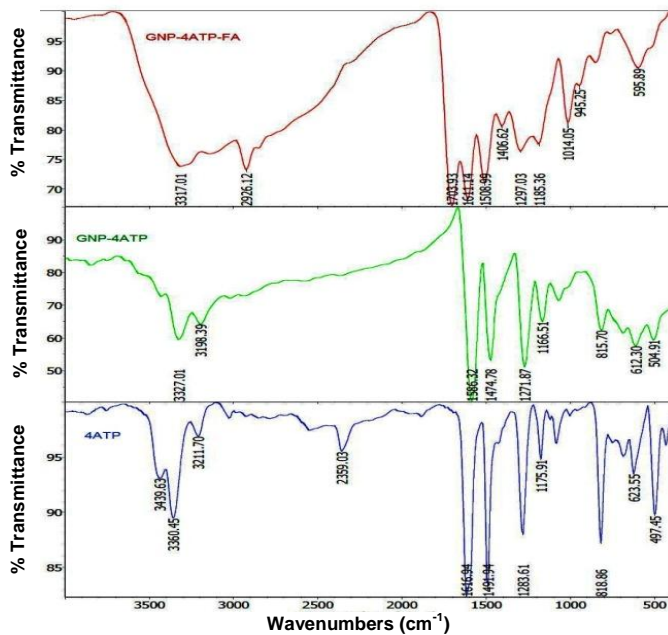


(ب)



محدوده‌ی اندازه‌ی قطر نانوذرات (نانومتر)

شکل ۲. الف) ریزنگار میکروسکوپ الکترون عبوری (TEM) نمونه‌ی ساخته شده‌ی نانوذرات طلا؛ ب) محدوده‌ی اندازه‌ی قطر بیش از صد نانو ذره‌ی تحلیل شده با نرم‌افزار Image Tool.



شکل ۳. طیف‌های تبدیل فوریه‌ی زیر قرمز (FT-IR) مولکول 4ATP (منحنی پایینی) و کمپلکس GNP-4ATP (منحنی وسطی) و کمپلکس نهایی GNP-4ATP-FA (منحنی بالایی).

## ۶.۲ سنجش سمیت‌زایی و میزان حساس‌کنندگی پرتویی نانوذرات طلا

میزان سمیت‌زایی و نیز میزان افزایش بهره‌ی پرتودرمانی در حضور نانوذرات طلا نشان‌دار شده با فولیک اسید، بر روی سلول‌های MCF-۷ به وسیله‌ی روش سنجش MTT انجام شد. به طور خلاصه در این روش رنگ‌سنجی، میزان رنگ تولید شده توسط سلول‌هایی که تیمار شده‌اند با سلول‌هایی که تیمار نشده‌اند (کنترل) مقایسه می‌شوند. برای انجام این تست، بعد از گذشت ۴۸ ساعت از پرتودهی، ۲۰ میکرولیتر از ماده‌ی MTT به غلظت ۵ گرم بر لیتر به هر یک از چاهک‌های صفحه‌ی ۹۶ خانه‌ای حاوی سلول‌های پرتو دیده و نیز سلول‌های گروه‌های کنترل و شش اضافه شد و سپس پلاک‌ها به مدت ۴ ساعت در دستگاه گرم‌کننده با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد کربن دی‌اکسید قرار داده شدند. پس از گرماگذاری پلاک‌ها، به کمک نمونه‌گیر محیط کشت حاوی ماده‌ی MTT از چاهک‌ها برداشته، و ۱۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکسید به هر یک از چاهک اضافه شد. در ادامه، جذب نوری در دستگاه صفحه‌خوان در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد.

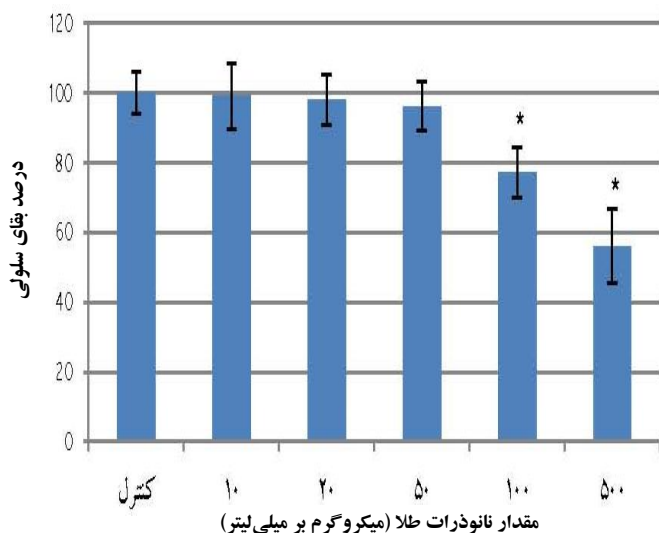
## ۳. یافته‌ها

### ۱.۳ بررسی اندازه و شکل ظاهری نانوذرات طلا

ریزننگارهای میکروسکوپ الکترون عبوری (TEM) نشان داد که نانوذرات ساخته شده کاملاً کروی شکل هستند. هم‌چنین تجزیه و تحلیل ریزنگارها با استفاده از نرم‌افزار Image Tool نشان داد که میانگین اندازه‌ی ذرات در حدود ۵۰ نانومتر (با احتساب یک انحراف معیار به طور دقیق‌تر برابر  $50.18 \pm 11.14$  nm) بود. جزئیات بیش‌تر در شکل ۲ آورده شده است.

### ۲.۳ بررسی اتصال فولیک اسید به نانوذرات طلا

در شکل ۳ طیف تبدیل فوریه‌ی زیر قرمز مولکول 4ATP و کمپلکس GNP-4ATP نشان داده شده است. در طیف 4ATP به علت وجود نیول، گروه -SH- جذب کششی در عدد موج حدود  $2360 \text{ cm}^{-1}$  دارد، که این قله در طیف GNP-4ATP به خاطر اتصال از طریق گروه -SH- با اتم‌های طلا حذف شده است، که شاهده‌ی قوی بر اتصال مولکول‌های 4ATP به اتم‌های طلا است. هم‌چنین در طیف کمپلکس GNP-4ATP وجود جذب‌های کششی مربوط به گروه  $\text{NH}_2$ - در عدد موج‌های  $3325 \text{ cm}^{-1}$  و  $3200 \text{ cm}^{-1}$  دلیل دیگری بر این ادعا است.



**شکل ۴.** رابطه‌ی بین میزان سمیت‌زایی نانوذرات طلای متصل شده به فولیک اسید بر روی سلول‌های MCF-7 و مقدار نانوذرات.

به طور هم‌زمان، در کنار گروه‌های درمانی، که متشکل از «پرتو تنها» و «پرتو به همراه نانوذرات طلا» بود، گروه‌های کنترل (سلول تنها) و گروه «نانوذرات تنها» نیز کشت داده شدند. پرتودهی گروه‌های درمانی با استفاده از دستگاه پرتودرمانی ارتولتاژ بالینی و در انرژی‌های ۱۲۰، ۱۸۰ و ۲۰۰ کیلوولت بیشینه و دز ۲ گری انجام شد. ۴۸ ساعت بعد از خاتمه‌ی پرتودهی، سنجنش MTT برای همه‌ی گروه‌ها انجام شد. نتایج بعد از سه مرتبه تکرار در شکل ۵ آورده شده است. با توجه به شکل ۵، ملاحظه می‌شود که حضور نانوذرات طلای متصل شده به فولیت به همراه پرتودرمانی منجر به کاهش قابل ملاحظه‌ای در درصد بقای سلولی نسبت به هر یک از گروه‌های پرتو تنها، شده است. ضریب افزایش دز در انرژی‌های ۱۲۰، ۱۸۰ و ۲۰۰ کیلوولت بیشینه، به ترتیب، برابر ۱٫۳۱، ۱٫۳۴ و ۱٫۲۹ بود که این افزایش در انرژی ۱۸۰ کیلوولت بیشینه بیش‌تر از دیگر انرژی‌های مورد آزمون بود، هر چند که این اختلاف از نظر آماری بسیار محسوس نبود ( $P\text{-value} > 0.05$ ). اختلاف معنی‌داری در بین گروه‌های پرتو تنها با یک‌دیگر و در بین گروه‌های پرتو به همراه نانوذرات طلا با یک‌دیگر مشاهده نشد. برای مقایسه‌ی میانگین بقای سلولی بین گروه‌ها با یک‌دیگر و با گروه کنترل، از تحلیل واریانس ANOVA با فاصله‌ی اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد.

در شکل ۳ هم‌چنین طیف‌های کمپلکس GNP-4ATP و کمپلکس نهایی GNP-4ATP-FA نشان داده شده‌اند. طیف ترکیب نهایی، جذب قوی گروه کربونیل را به خاطر وجود گروه -CONH- و -COOH در ترکیب در حدود  $1700\text{cm}^{-1}$  نشان می‌دهد. هم‌چنین جذب خمشی -NH- آمینی نوع دوم در حدود  $1500\text{cm}^{-1}$  در مولکول فولیک اسید و جذب کششی مربوط به -NH- آمیدی نوع دوم در حدود  $3320\text{cm}^{-1}$  موجود در محل اتصال فولیک اسید به GNP-4ATP در کمپلکس نهایی نیز تأییدی بر تشکیل کمپلکس است. هم‌چنین قابل ذکر است که نوارهای ۸۳۵ و ۱۱۹۰ و  $1235\text{cm}^{-1}$  مطابق با جذب‌های خمشی داخل صفحه و خارج صفحه‌ای گروه -NH<sub>2</sub>- و کشش‌های C-N در فولیک اسید در کمپلکس نهایی به سمت اعداد بالاتر جابه‌جا شده‌اند. همه‌ی این مشاهد‌ها، تأییدی بر تشکیل کمپلکس نهایی GNP-4ATP-FA است [۲۰].

### ۳.۳ سنجنش سمیت‌زایی نانوذرات طلای متصل شده به فولیک اسید بر روی سلول‌های MCF-7

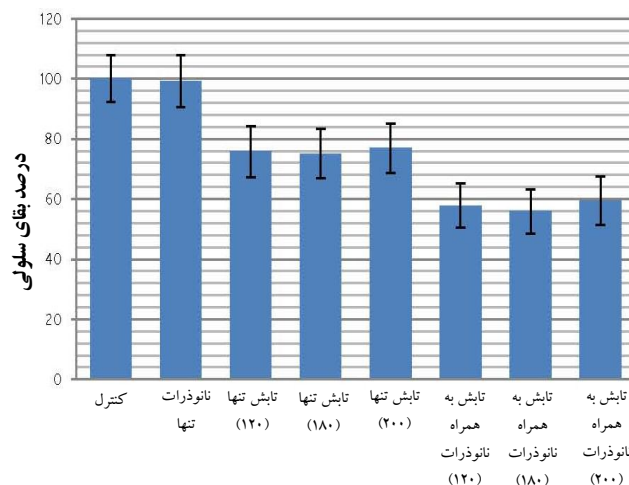
برای سنجنش سمیت‌زایی نانوذرات طلا، گرماگذاری سلول‌های MCF-7 به همراه مقدارهای مختلف (۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) نانوذرات به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. به طور هم‌زمان سلول‌های گروه کنترل بدون نانوذرات طلا کشت داده شدند. سپس سنجنش MTT برای همه‌ی گروه‌ها انجام شد که نتایج به صورت میانگین سه تکرار در شکل ۴ آورده شده است. برای مقایسه‌ی میانگین بقای سلولی بین گروه‌ها با یک‌دیگر و با گروه کنترل از تحلیل واریانس (ANOVA) با فاصله‌ی اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. نتایج آماری سمیت معنی‌داری در گروه‌های ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نسبت به گروه کنترل نشان داد. در بقیه‌ی گروه‌ها اختلاف معنی‌داری بین میانگین بقای سلولی با گروه کنترل وجود نداشت ( $P\text{-value} > 0.05$ ).

### ۴.۳ پرتودهی سلول‌های MCF-7 در حضور و عدم حضور نانوذرات طلای متصل شده به فولیک اسید

برای سنجنش میزان حساس‌کنندگی پرتویی نانوذرات طلا، ۲۰ میکرولیتر محلول ۵۰ میکروگرم بر لیتر نانوذرات طلا و سلول‌های MCF-7 به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد.



آورد. در این مطالعه اگرچه پارامتر انرژی با منابع ارتوتولتاژ مورد بررسی قرار گرفت، اما محدودیت اصلی آن قرار دادن مستقیم DNA استخراج شده از باکتری در کنار نانوذررات طلا بود که سازوکارهای مسئول در ورود و تجمع نانوذررات به داخل سلول را مدنظر قرار نمی‌دهد. انتخاب انرژی بهینه پرتو، مهم‌ترین عامل در پرتودرمانی است. طبق مطالعه‌ها، دو دیدگاه مفهومی برای دستیابی به انرژی بهینه برای پرتودهی به تومورهای حاوی مواد با عدد اتمی بالا موجود است. نخستین دیدگاه، بهره‌مندی از سهم رخدادهای الکترونی‌های اوژه، در پرتودهی با انرژی برابر لبهی K است. اما، به لحاظ تجربی نشان داده شده است [۲۳] که ترکیب درمانی دی‌کلروپلاتین (II) سیس-دی‌آمین و پرتودهی سنکروترونی بر زیر و بالای لبهی K پلاتین (۷۸،۴keV)، منجر به آسیب‌های یکسانی می‌شود. طبق بررسی دیگری [۲۴]، فوتون فرودی با انرژی برابر انرژی لبهی K، همه‌ی انرژی‌اش را صرف خارج کردن الکترونی از لایه‌ی K می‌کند، به طوری که این فوتوالکترون انرژی جنبشی اضافی دریافت نخواهد کرد و بنابراین کمکی در انتشار آسیب‌ها نخواهد نمود. برای مثال در مطالعه‌ای [۲۵]، که سلول‌های سرطانی را قبل از پرتودهی با باریکه‌ی پرتو ایکس تک انرژی، در مجاورت یدودئوکسی‌یوریدین قرار دادند، کم‌ترین میزان بقا در ۵۰keV و نه برابر لبهی K یید (۳۳،۲keV) به دست آمد. دیدگاه دیگر، توجه به اختلاف در جذب بین ماده با عدد اتمی بالا و محیط اطرافش با تکیه بر پارامتر ضریب جذب جرمی انرژی ( $\mu_{en}/\rho$ ) است، به این دلیل که این پارامتر میزان انرژی به جا مانده در حجم موضعی را تعیین می‌کند. براساس مقادیر  $\mu_{en}/\rho$ ، می‌توان نسبت ضریب‌های جذب جرمی انرژی طلا به آب را در انرژی‌های مختلف رسم نمود [۲۵] (شکل ۶). با توجه به این شکل، بیشینه‌ی مقدار ضریب افزایش دز به لحاظ نظری، بین انرژی‌های ۴۰ تا ۵۰keV به دست می‌آید که به صورت گاوسی‌شکل قابل مشاهده است. در مطالعه‌ی حاضر، میانگین ضریب افزایش دز حدود  $1/31 \pm 0/3$  در گستره‌ی انرژی ۱۲۰ تا ۲۰۰ کیلوولت بیشینه بر روی رده‌ی سلولی MCF-7 به دست آمد، اما تأثیر پارامتر انرژی در دامنه‌ی ۱۲۰ تا ۲۰۰ کیلوولت بیشینه بسیار محسوس و قابل ملاحظه نبود. اگر چه در این مطالعه انرژی‌های نزدیک به یک‌دیگر انتخاب شده بودند، اما نتایج نشان داد که انرژی ۱۸۰ کیلوولت بیشینه می‌تواند از بقیه‌ی انرژی‌ها مؤثرتر باشد؛ هر چند که این اختلاف از لحاظ آماری و در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی‌دار نبود. افزایش دز با باریکه‌های پرتوایکس دستگاه‌های ارتوتولتاژ در محدوده‌ی ۱۲۰ تا ۲۰۰ کیلوولت بیشینه که هر یک از آن‌ها خود شامل طیفی



شکل ۵. میانگین درصد بقای سلولی سلول‌های MCF-7 در پرتودهی بدون و همراه با نانوذررات طلای متصل شده به فولیک اسید.

#### ۴. بحث و نتیجه‌گیری

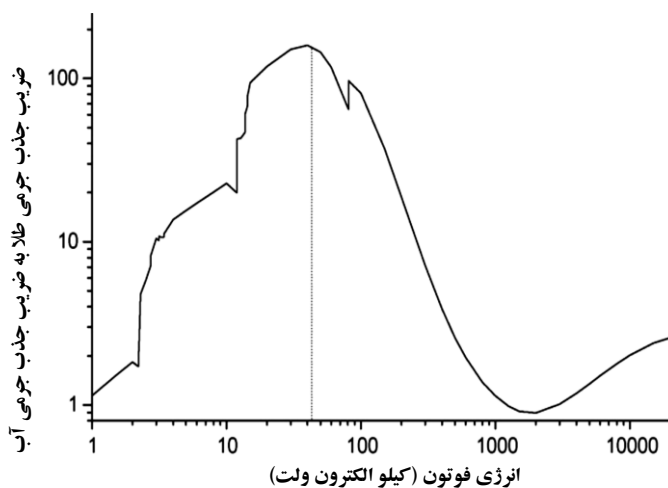
استفاده از نانوذررات طلای متصل شده به فولیک اسید به عنوان حساس‌کننده‌ی پرتویی در پرتودرمانی سلول‌های سرطانی پستانی رده‌ی MCF-7 منجر به افزایش بهره‌ی درمانی به طور متوسط تا حدود ۳۰ درصد در انرژی‌های پایین فوتونی با منابع فوتونی مورد استفاده در دستگاه‌های پرتودرمانی ارتوتولتاژ سطحی شد. علت چنین افزایشی، افزایش رخدادهای فوتوالکتریک در حضور نانوذررات طلا است. لازم به ذکر است که ضریب افزایش دز مطالعه‌ی حاضر، که حدود ۱/۳ به دست آمد در مقایسه با دیگر مطالعه‌ها، برای مثال با یک مطالعه‌ی برون‌تنی [۱۵] که در آن ضریب افزایش دز در حدود ۱/۵ تا ۲ به دست آمد، متفاوت است. این اختلاف را می‌توان به اختلاف‌هایی در مقدار نانوذررات طلا، نوع مزدوج نانوذررات طلا و نوع رده‌ی سلولی و یا ترکیبی از این پارامتر در مطالعه‌ی مذکور نسبت داد. با وجود مطالعه‌های زیاد در زمینه‌ی حساس‌کنندگی پرتویی نانوذررات طلا، در تعداد بسیار محدودی از آن‌ها در کنار استفاده از نانوذررات طلای مزدوج به بررسی اثر تغییرات انرژی پرداخته شده است. برای مثال در مطالعه‌ای برون‌تنی [۱۴]، نانوذررات طلا را با گلوکز و سیستمین مزدوج کرده و کاهش در میزان بقای سلولی رده‌ی MCF-7 را تحت تابش‌دهی با پرتوهای ۲۰۰ کیلوولت بیشینه و پرتو گامای سزیم-۱۳۷ و کبالت-۶۰ مورد بررسی قرار دادند، که بیش‌ترین کاهش مربوط به پرتوهای ارتوتولتاژ بود. در مطالعه‌ی دیگری [۲۲]، که در ارتباط با حساس‌کنندگی پرتویی نانوذررات طلا بر روی DNA در محلول DNA و نانوذررات طلا انجام شد، نشان داده شد که می‌توان ضریب افزایش دز قابل توجهی (بیش از ۳) را با نانوذررات طلا با پرتوهای ایکس ۴۹ کیلوولت به دست

به سلول، برای فراهم آوردن یک درمان مؤثرتر و هدفمند، باید تجمع نانوذرات را تنها در سلول‌های هدف افزایش داد و در واقع آن‌ها را به طور اختصاصی به کار گرفت. برای این منظور می‌توان آن‌ها را به مولکول‌های زیست‌شناختی مانند فولیک اسید متصل نمود [۲۰]. همان‌طور که در یک مطالعه‌ی اخیر [۱۹] نشان داده شده است، استفاده از نانوذرات طلا متصل به فولیت، کارآیی درمان فزون‌تری<sup>(۶)</sup> سلول‌های هلا<sup>(۷)</sup> با باریکه‌های لیزری را به طور قابل توجهی افزایش می‌دهد. در مطالعه‌ی حاضر نیز، نانوذرات طلا به مولکول فولیک اسید متصل شدند تا نانوذرات به صورت اختصاصی‌تر و بیش‌تر جذب سلول‌های سرطانی هدف شوند. هم‌چنین لازم به ذکر است که در این مطالعه، برای نخستین بار، اثر نانوذرات طلا متصل شده به فولیک اسید همراه با بررسی تغییرات انرژی پرتوهای یوننده‌ی ایکس معمول در دستگاه‌های پرتودرمانی ارتوتولناژ بالینی مورد پژوهش قرار گرفتند.

با در نظر گرفتن اثر اجتناب‌ناپذیر حساس‌کنندگی پرتویی نانوذرات طلا، ممکن است، اصلاح و استفاده از منابع پرتوهای ایکس دستگاه‌های ارتوتولناژ موجود در بخش‌های پرتودرمانی بالینی برای بهره‌برداری در این زمینه مورد توجه قرار گیرد. نانوذرات طلا، ابزاری امیدوارکننده و کمک‌کننده در پرتودرمانی خصوصاً با منابع ارتوتولناژ می‌توانند باشند و به نظر می‌رسد که استفاده از فن‌آوری‌های نوین نانو در پرتودرمانی، بتواند رویکردی جهشی و نویدبخش در زمینه‌ی درمان بیماری سخت-درمان سرطان باشد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله، مستخرج از یک رساله‌ی دکتری است که توسط نویسنده‌ی اول این مقاله و تحت راهنمایی نویسنده‌ی رابط و با مشاوره‌ی تخصصی سایر نویسندگان در گروه فیزیک پزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و با حمایت مالی و مساعدت و همکاری گروه‌های دیگری از این دانشگاه و هم‌چنین تجهیزات پرتودرمانی ارتوتولناژ بیمارستان امام حسین(ع) تهران انجام شده است. لذا بر خود لازم می‌دانیم که از دانشگاه مذکور، به خصوص از گروه‌های فیزیک پزشکی، زیست فن‌آوری پزشکی و هماتولوژی پزشکی آن تشکر و قدردانی خود را ابراز کنیم. هم‌چنین بر خود لازم می‌دانیم که از مسئولین بیمارستان امام حسین(ع) به خصوص متخصص‌های فیزیک پزشکی بخش پرتودرمانی آن، سرکار خانم‌ها نفیسه فرضی و منیژه بیگی، که در زمینه‌ی درجه‌بندی، دزیمتری و تابش‌دهی همکاری داشتند، تشکر و قدردانی نماییم.



شکل ۶. نسبت ضریب‌های جذب جرمی انرژی طلا به آب برحسب انرژی فوتون تابشی [۲۲].

از فوتون‌های با انرژی‌های مختلف هستند که با یک قاعده‌ی سرانگشتی دارای انرژی مؤثری در حدود ۴۰ تا ۶۰ keV هستند، با این واقعیت نظری که پرتوهای فوتونی در محدوده‌ی انرژی از حدود ۴۰ تا ۶۰ keV مطابق شکل ۶ ضریب جذب جرمی انرژی بالایی در طلا نسبت به آب، به عنوان ماده‌ای معادل بافت نرم، دارند در توافق است.

آزمایش‌های تعیین سمیت نشان دادند که نانوذرات می‌توانند قابلیت زنده ماندن<sup>(۳)</sup> سلول‌ها را کاهش دهند. میزان سمیت‌زایی نانوذرات بر روی سلول، به غلظت، اندازه و شکل نانوذرات و نیز به نوع رده‌ی سلول بستگی دارد [۹]. در این مطالعه غلظت بیشینه‌ای، که سمیت معنی‌داری برای سلول‌های مورد آزمون نداشته باشد، به دست آمد و در مطالعه‌ی اصلی استفاده شد. چندین عامل نظیر اندازه‌ی نانوذرات، شکل ظاهری و اصلاح سطح، در داخل شدن نانوذرات به سلول تأثیر گذارند. در زمینه‌ی اندازه‌ی نانوذرات، نشان داده شده که نانوذرات طلائی کروی با قطر حدود ۵۰ نانومتر بیش‌ترین نفوذ به داخل سلول را دارند [۲۶]. در این مطالعه، سنتز به گونه‌ای انجام شد تا اندازه‌ی حدود ۵۰ نانومتر به دست آید و متعاقباً از این موضوع اطمینان حاصل شد که نانوذرات توانایی داخل شدن به سلول را خواهند داشت. هم‌چنین نشان داده شد که در نزدیکی یا مجاورت بافت تومورال، ورود نانوذرات از طریق نفوذ<sup>(۴)</sup> [۲۷] یا فرایند آندوسیتوز با واسطه‌ی گیرنده<sup>(۵)</sup> [۲۸] به معنای داشتن قطره‌هایی با اندازه‌ی کوچک‌تر از ۱۰۰ نانومتر است. نانوذرات طلائی متصل شده به فولیک اسید از طریق فرایند آندوسیتوز با واسطه‌ی گیرنده، وارد سلول‌هایی نظیر سلول‌های مورد مطالعه که گیرنده‌ی فولیک اسید روی سطح سلولی آن‌ها، وجود دارد، می‌شوند. علاوه بر بحث داخل شدن





## بی‌نوشت‌ها:

۱. Biocompatibility
۲. Benchmark
۳. Viability
۴. Diffusion

۵. Receptor-Mediated Endocytosis
۶. Hyper Thermia
۷. Hela

## مرجع‌ها:

1. I. Harirchi, M. Karbakhsh, A. Kashefi, A. J. Momtahan, Breast cancer in Iran: results of a multi-center study, *Asian Pac J Cancer Prev*, 5 (2004) 24-27.
2. H. J. Andreyev, Gastrointestinal problems after pelvic radiotherapy: the past, the present and the future, *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 19 (2007) 790-799.
3. Y. Shibamoto, L. Zhou, H. Hatta, M. Mori, S. I. Nishimoto, In vivo evaluation of a novel antitumor prodrug, 1-(2'-oxopropyl)-5-fluorouracil (OFU001), which releases 5-fluorouracil upon hypoxic irradiation, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 49 (2001) 407-413.
4. K. Miyake, M. Shimada, M. Nishioka, K. Sugimoto, E. Batmunkh, Y. Uto, H. Nagasawa, H. Hori, The novel hypoxic cell radiosensitizer, TX-1877 has antitumor activity through suppression of angiogenesis and inhibits liver metastasis on xenograft model of pancreatic cancer, *Cancer Lett*, 272 (2008) 325-335.
5. F. W. Spiers, The influence of energy absorption and electron range on dosage in irradiated bone, *Br J Radiol*, 22 (1949) 521-533.
6. M. H. Castillo, T. M. Button, R. Doerr, M. I. Homs, C. W. Pruett, J. I. Pearce, Effects of radiotherapy on mandibular reconstruction plates, *Am J Surg*, 156 (1988) 261-263.
7. J. F. Hainfeld, D. N. Slatkin, H. M. Smilowitz, The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice, *Phys Med Biol*, 49 (2004) N309-315.
8. R. Shukla, V. Bansal, M. Chaudhary, A. Basu, R. R. Bhonde, M. Sastry, Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview, *Langmuir*, 21 (2005) 10644-10654.
9. N. Lewinski, V. Colvin, R. Drezek, Cytotoxicity of nanoparticles, *Small*, 4 (2008) 26-49.
10. S. Uehara, H. Nikjoo, D. T. Goodhead, Comparison and assessment of electron cross sections for Monte Carlo track structure codes, *Radiat Res*, 152 (1999) 202-213.
11. B. Boudaiffa, P. Cloutier, D. Hunting, M. A. Huels, L. Sanche, Resonant formation of DNA strand breaks by low-energy (3 to 20eV) electrons, *Science*, 287 (2000) 1658-1660.
12. M. Y. Chang, A. L. Shiau, Y. H. Chen, C. J. Chang, H. H. Chen, C. L. Wu, Increased apoptotic potential and dose-enhancing effect of gold nanoparticles in combination with single-dose clinical electron beams on tumor-bearing mice, *Cancer Sci*, 99 (2008) 1479-1484.
13. S. E. McNeil, Nanotechnology for the biologist, *J. Leukoc Biol*, 78 (2005) 585-594.
14. T. Kong, J. Zeng, X. Wang, X. Yang, J. Yang, S. McQuarrie, A. McEwan, W. Roa, J. Chen, J. Z. Xing, Enhancement of radiation cytotoxicity in breast-cancer cells by localized attachment of gold nanoparticles, *Small*, 4 (2008) 1537-1543.
15. W. Roa, X. Zhang, L. Guo, A. Shaw, X. Hu, Y. Xiong, S. Gulavita, S. Patel, X. Sun, J. Chen, R. Moore, J. Z. Xing, Gold nanoparticle sensitize radiotherapy of prostate cancer cells by regulation of the cell cycle, *Nanotechnology* 20 (2009) 375101.
16. J. Sudimack and R. J. Lee, Targeted drug delivery via the folate receptor, *Adv Drug Deliv Rev*, 41 (2000) 147-162.
17. J. H. van Steenis, E. M. van Maarseveen, F. J. Verbaan, R. Verrijck, D. J. Crommelin, G. Storm, W. E. Hennink, Preparation and characterization of folate-targeted pEG-coated pDMAEMA-based polyplexes, *J. Control Release*, 87 (2003) 167-176.



18. H. S. Yoo and T. G. Park, Folate-receptor-targeted delivery of doxorubicin nano-aggregates stabilized by doxorubicin-PEG-folate conjugate, *J. Control Release*, 100 (2004) 247-256.
19. A. Shakeri-Zadeh, G. A. Mansoori, A. R. Hashemian, H. Eshghi, A. Sazgarnia, A. R. Montazer-Abadi, Cancer cells targeting and destruction using folate conjugated gold nanoparticles, *Proc Biotech Mol*, 4 (2010) 6-12.
20. A. Shakeri-Zadeh, M. Ghasemifard, G. A. Mansoori, Structural and Optical Characterization of Folate conjugated Gold Nanoparticle, *Physica E*, 42 (2010) 1272-1280.
21. P. Andreo, D. T. Burns, K. Hohlfield, M. S. Huq, T. Kanai, F. Laitano, V. G. Smyth, S. Vynckier, Absorbed dose determination in external beam radiotherapy: An international Code of Practice for dosimetry based on standards of absorbed dose to water, IAEA, Technical Report Serie Vienna, 2000.
22. E. Brun, L. Sanche, C. Sicard-Roselli, Parameters governing gold nanoparticle X-ray radiosensitization of DNA in solution, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 72 (2009) 128-134.
23. M. C. Biston, A. Joubert, J. F. Adam, H. Elleaume, S. Bohic, A. M. Charvet, F. Esteve, N. Foray, J. Balosso, Cure of Fisher rats bearing radioresistant F98 glioma treated with cis-platinum and irradiated with monochromatic synchrotron X-rays, *Cancer Res*, 64 (2004) 2317-2323.
24. J. F. Hainfeld, F. A. Dilmanian, D. N. Slatkin, H. M. Smilowitz, Radiotherapy enhancement with gold nanoparticles, *J. Pharm Pharmacol*, 60 (2008) 977-985.
25. S. Corde, A. Joubert, J. F. Adam, A. M. Charvet, J. F. Le Bas, F. Esteve, H. Elleaume, J. Balosso, Synchrotron radiation-based experimental determination of the optimal energy for cell radiotoxicity enhancement following photoelectric effect on stable iodinated compounds, *Br. J. Cancer*, 91 (2004) 544-551.
26. B. D. Chithrani, A. A. Ghazani, W. C. Chan, Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells, *Nano Lett*, 6 (2006) 662-668.
27. N. Pernodet, X. Fang, Y. Sun, A. Bakhtina, A. Ramakrishnan, J. Sokolov, A. Ulman, M. Rafailovich, Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts, *Small*, 2 (2006) 7673-7676.
28. B. D. Chithrani and W. C. Chan, Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes, *Nano Lett*, 7 (2007) 1542-1550.