

اثر درمانی امواج فراصوت در حضور نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی / طلا بر روی رده‌ی سلولی ملانوما

آرمان اسماعیل‌زاده^۱، احمد شائنی^۲، ندا عطاران^۳، نجمه نجم‌الدین^۴، آتنا شیرازی^۵، سید حسین حجازی^۶

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: در درمان سرطان‌های مقاوم به پرتو مثل ملانوما، استفاده از روش‌های ترکیبی برای کاهش آسیب به بافت‌های سالم و بالا بردن بهره‌ی درمان ضروری می‌باشد. استفاده از امواج فراصوت در ترکیب با نانوذرات می‌تواند با هم‌افزایی در تولید رادیکال‌های آزاد به بالا رفتن پاسخ به درمان توسط امواج فراصوت کمک کند. نانوذرات اکسید روی با توجه به خاصیت پیزوالکتریک باعث تولید رادیکال‌های آزاد می‌شوند از طرفی نانوذرات طلا، قدرت تخریب امواج فراصوت را با کاهش شدت لازم برای حفره‌سازی بالا می‌برند که درمان سرطان با امواج فراصوت را تسهیل می‌کند. این پژوهش با هدف بررسی تأثیر درمانی امواج فراصوت در حضور نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی / طلا بر میزان مرگ سلولی در ملانوما انجام شد.

روش‌ها: در این مطالعه‌ی آزمایشگاهی، برای تعیین سطح رادیکال‌های آزاد تولید شده، ناشی از نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی / طلا با حضور و بدون تابش فراصوت از دزیمتری شیمیایی استفاده شد. همچنین سنجش میزان بقاء و آپوپتوز در سلول‌های کشت شده‌ی ملانوما، به ترتیب با تست‌های MTT و فلوسایتومتری انجام گردید.

یافته‌ها: با افزایش سطح تولید رادیکال‌های آزاد، درصد بقاء سلول‌های ملانوما درمان شده به صورت ترکیبی با نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی / طلا و امواج فراصوت در شدت 2 W/cm^2 مربع بیشترین کاهش (به میزان ۲۰ درصد) را نشان داد که با گروه شاهد، تفاوت معنی‌داری داشت. همچنین سطح آپوپتوز ایجاد شده با حضور نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی / طلا افزایش معنی‌داری داشت.

نتیجه‌گیری: استفاده از امواج فراصوت در ترکیب با نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی / طلا می‌تواند با بالا بردن سطح رادیکال‌های آزاد در بهبود پاسخ ملانوما به درمان، نقش مؤثری ایفا کند.

واژگان کلیدی: امواج فراصوت؛ نانوذره اکسید روی؛ نانو ذره طلا؛ ملانوما؛ آپوپتوز

ارجاع: اسماعیل‌زاده آرمان، شائنی احمد، عطاران ندا، نجم‌الدین نجمه، شیرازی آتنا، حجازی سید حسین. اثر درمانی امواج فراصوت در حضور نانوکامپوزیت

ترکیبی اکسید روی / طلا بر روی رده‌ی سلولی ملانوما. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۱؛ ۴۰ (۶۹۵): ۹۲۳-۹۱۷

عمق نفوذ مناسب، ماهیت غیر یونیزان و اثرات جانبی کمتر نسبت به پرتوهای یونیزان مثل اشعه‌ی ایکس بر روی بافت‌ها در درمان سرطان از جمله ملانوما مورد توجه بسیار قرار گرفته است (۳). از جمله اثرات امواج فراصوت که در درمان سونودینامیک سرطان نقش مهمی دارد، پدیده‌ی حفره‌سازی (Cavitation) می‌باشد (۳). دو نوع حفره‌سازی وجود دارد: ۱- حفره‌سازی پایدار و ۲- حفره‌سازی گذرا که

مقدمه

طبق گزارش انجمن سرطان آمریکا در سال ۲۰۱۹، سالانه تقریباً ۷۲۳۰ نفر مبتلا به ملانوما در ایالات متحده خواهند مرد (۱). ماهیت تهاجمی، مقاومت بالا و میزان پاسخ پایین به درمان، درمان ملانوم را با استراتژی‌های معمول درمان سرطان مانند رادیوتراپی و شیمی‌درمانی پیچیده می‌کند (۲). استفاده از امواج فراصوت به دلیل

۱- دانشجوی دکتری تخصصی فیزیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۲- استاد، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استادیار، گروه نانو تکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم و فناوری‌های پزشکی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۴- استادیار، دپارتمان مهندسی پزشکی، گروه بیومواد و بافت، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۵- کارشناسی ارشد بیومواد، دپارتمان مهندسی پزشکی، گروه بیومواد و بافت، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۶- استاد، گروه انگل و قارچ‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: احمد شائنی؛ استاد، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

تنهایی از درمان ترکیبی سونودینامیک برای بالا رفتن بهره‌ی درمان استفاده می‌کند. در نتیجه در این مطالعه تأثیر درمان ملانوما به کمک نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی/طلا به عنوان یک حساس‌کننده‌ی صوتی برای درمان سونودینامیک ملانوما مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا برای اندازه‌گیری کاویتاسیون صوتی ناشی از ترکیب امواج فراصوت و نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی/طلا بر اساس مطالعات قبلی از روش دزیمتری شیمیایی با استفاده از اسید ترفتالیک استفاده شد (۴). در نهایت، آزمایشات برون‌تنی برای بررسی اثرات حساس‌کننده‌ی صوتی مبتنی بر نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی/طلا در طی درمان سونودینامیک برای درمان ملانوما انجام شد.

روش‌ها

این مطالعه‌ی درون آزمایشگاهی طی اردیبهشت تا مرداد ماه ۱۴۰۱ در آزمایشگاه گروه انگل و قارچ‌شناسی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان طی مراحل زیر انجام شد:

بررسی تولید رادیکال آزاد به کمک دزیمتری شیمیایی: برای تهیه‌ی محلول دزیمتری اسید ترفتالیک با غلظت ۲ میلی‌مول در لیتر، مقدار مناسب از پودر آن در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شد و متعاقباً ۵ میلی‌لیتر از NaOH (۱ مولار) به مخلوط اضافه شد و سپس به مدت یک ساعت در محیط سرد (۴ درجه‌ی سانتی‌گراد) و تاریک هم زده شد تا از واکنش‌های فوتوشیمیایی جلوگیری شود (۴). برای انجام دزیمتری شیمیایی، محلول آماده شده به همراه نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی/طلا با غلظت‌های ۰.۲، ۱.۰، ۲.۵، ۵.۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ترکیب و در ظرف‌های جداگانه استوانه‌ای شکل ریخته شد. سپس تابش فراصوت با فرکانس ۱ مگاهرتز، در شدت‌های ۰.۵، ۱، ۱/۵ و ۲ وات بر سانتی‌متر مربع و زمان تابش ۳ دقیقه به کمک پروب اولتراسوند (ULTRASOUND 215X) غوطه‌ور شده در محفظه‌ی آب بدون گاز انجام شد. پس از گذشت ۴ ساعت، شدت سیگنال فلورسانس محلول به عنوان معیاری از میزان رادیکال‌های آزاد تولید شده توسط دستگاه طیف سنج (V-670, JASCO, Tokyo, Japan) در طول موج‌های ۳۱۰ و ۴۲۵ نانومتر خوانده شد. سیگنال فلورسانس محلول تابش ندیده به عنوان گروه شاهد بود.

کشت آزمایشگاهی رده‌ی سلولی B16F10 ملانوما موشی از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. سپس سلول‌ها درون فلاسک‌های کشت T25 در محیط کشت RPMI-1640 غنی شده با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۵ درصد آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین، به صورت تک لایه در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه و ۵ درصد CO₂ کشت داده شدند. بعد از تکثیر، تعداد ۲×۱۰^۴ سلول به

حفره‌سازی گذرا، نقش مهمی در تولید رادیکال‌های آزاد دارد. در پدیده‌ی حفره‌سازی انبساط و انقباض ایجاد شده در بافت هنگام برخورد امواج فراصوت، نواحی پرفشار و کم‌فشار متناوبی تشکیل می‌دهد که باعث ایجاد و بزرگ شدن میکروحباب‌های گاز می‌شود. قرار گرفتن میکروحباب‌های گاز در معرض امواج فشاری فراصوت باعث فروپاشی ناگهانی آن‌ها و ایجاد دما و فشار لحظه‌ای بسیار بالا در محل فروپاشی می‌شود. این دما و فشار بسیار بالا، موجب تشکیل رادیکال‌های آزاد از جمله گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species) می‌شود (۴). این رادیکال‌های آزاد با آسیب به غشاء سلول‌ها و تغییر در نفوذپذیری آن می‌توانند باعث القاء آپوپتوز و در نهایت مرگ در سلول‌های سرطانی شوند (۵). طیف گسترده‌ای از مولکول‌ها و مواد مانند مشتقات پروتوپورفیرین، عوامل شیمی‌درمانی و نانوذرات به عنوان حساس‌کننده‌های صوتی در درمان سونودینامیک توسعه یافته‌اند. نانوذرات اکسید روی یکی از انواع نانوذرات است که به دلیل خواص شیمیایی و فیزیکی مناسب مثل خاصیت پیزوالکتریکی و خاصیت ضدباکتریایی کاندیدای استفاده در درمان سرطان می‌باشد (۶). با توجه به مطالعات گذشته این نانوذرات خواص سیتوتوکسیک خود را در سطح pH اسیدی تومورها با تبدیل شدن به یون Zn²⁺ و در نتیجه تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و استرس اکسیداتیو به DNA و در نهایت مرگ سلول نشان می‌دهند (۷). همچنین خاصیت پیزوالکتریکی در نانوذرات اکسید روی آن‌ها را قادر می‌سازد تا ارتعاشات مکانیکی فراصوت را به انرژی الکتریکی در سطوح میلی‌ولت تبدیل کند و این انرژی الکتریکی با برهم زدن پتانسیل غشای الکتریکی سلول‌ها باعث اختلال در تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود (۸).

از طرف دیگر نانوذرات طلا با خواصی مانند توزیع زیستی خوب و جذب توسط سلول‌ها، سمیت ناچیز و ویژگی‌های ضد رگ‌زایی به عنوان حساس‌کننده‌های صوتی جذاب شناخته شده‌اند (۴). همچنین ثابت شده است که نانوذرات طلا با کاهش آستانه کاویتاسیون به عنوان مکان‌های هسته‌زایی به کاویتاسیون فراصوتی کمک می‌کنند (۴).

Duan و همکاران در سال ۲۰۲۰ در مطالعه‌ای به بررسی اثرات ضد توموری نانوذرات اکسید روی پرداختند. بر اساس مطالعه‌ی آن‌ها، این نانوذرات میزان القاء آپوپتوز و نکروز را بالا می‌برد (۹). در مطالعه‌ی دیگری که توسط Fan و همکاران در سال ۲۰۲۱ انجام شد، میزان استرس اکسیداتیو ناشی از نانوذرات اکسید روی بر سلول‌های ملانوما را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها بالا رفتن تولید رادیکال‌های آزاد در حضور این نانوذرات را تأیید کردند و آن را در درمان ملانوما مؤثر دانستند (۱۰).

مطالعه‌ی حاضر، به جای استفاده از نانوذرات اکسید روی به

برنامه‌ریزی شده‌ی سلول یا آپوپتوز یکی از انواع مرگ سلول می‌باشد که به منظور حذف سلول‌های ناخواسته یا غیرضروری در موجودات زنده به کار می‌رود و در بسیاری از مکانیسم‌های سیستم ایمنی یا بیماری‌ها مداخله می‌کند. این فرایند در تنظیم میزان رشد و تکثیر سلول‌ها بسیار مهم بوده و بروز بسیاری از سرطان‌ها نتیجه عملکرد ضعیف یا مهار شدن پدیده مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی است. در این مطالعه میزان آپوپتوز القا شده توسط درمان‌های اعمال شده در سلول‌ها به کمک روش فلوسایتومتری ارزیابی شد. ابتدا با توجه به راهنمای کیت سنجنش آپوپتوز (BioLegend FITC Annexin V - PI Apoptosis Detection Kit) تعداد یک میلیون سلول در چاهک‌های پلیت ۶ خانه کشت داده شد و ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. پس از گذشت ۲۴ ساعت درمان در گروه‌های مختلف انجام شد و مجدداً پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس با استفاده از تریسین سلول‌ها جدا شده و شمارش گردیدند. از هر گروه 2×10^5 سلول شمارش شده و دوبار با PBS شستشو و به سانتریفیوژ شدند و در ۰/۵ میلی لیتر بافر موجود در کیت پراکنده و به لوله‌ی فلوسایتومتری منتقل شدند. سپس برای هر گروه ۵ میکرو لیتر Annexin V و ۳ میکرو لیتر PI اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و محیط تاریک انکوبه شدند. سپس خوانش با دستگاه فلوسایتومتری آزمایشگاه مرکزی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان (BD FACSCalibur) انجام گرفت.

بررسی آماری: تمامی مراحل آزمایش ۳ بار تکرار شد و داده‌ها به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۲ (IBM Corporation, version 22, Armonk, NY) به صورت ارزیابی میانگین و انحراف معیار با آزمون One-Way ANOVA تحلیل گردیدند. همچنین $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

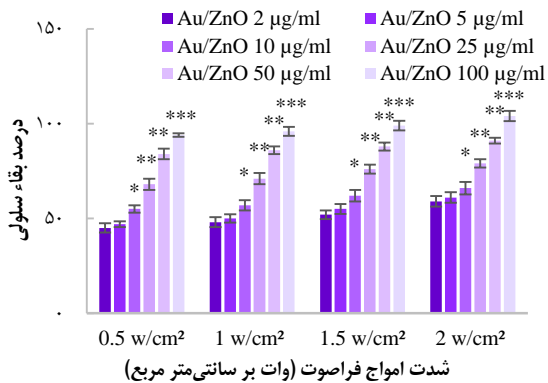
دوزیمتری شیمیایی: نتایج دوزیمتری شیمیایی برای نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی/طلا بدون تابش فراصوت، شدت سیگنال فلورسانس کمی بیشتر از گروه شاهد را نشان می‌دهد که این شدت سیگنال‌های فلورسانس با افزایش غلظت نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی/طلا در محلول دوزیمتری افزایش می‌یابد (شکل ۱). در مورد ترکیب تابش فراصوت و حضور نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی/طلا (شکل ۲)، شدت سیگنال با افزایش غلظت نانوکامپوزیت یا شدت فراصوت در مقایسه با محلول کنترل افزایش یافت ($P < 0/05$).
میزان بقای سلول‌های تحت درمان: نتایج تست MTT برای سلول‌های تحت درمان با غلظت‌های مختلف نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی/طلا در شکل ۲ نشان‌دهنده‌ی کاهش تدریجی میزان بقای

ازای هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه برای انجام تست‌ها شمارش شد. برای انجام آزمایشات، گروه‌های زیر در نظر گرفته شدند:
۱- گروه سلول‌های تیمار شده با نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی/طلا: سلول‌های قرار گرفته در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه با غلظت‌های ۰/۲، ۰/۵، ۱/۰، ۲/۵، ۵/۰ و ۱۰/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی/طلا به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند و سپس میزان سمیت سلولی بررسی شد.
۲- گروه سلول‌های درمان شده با امواج فراصوت: تابش دهی سلول‌های قرار گرفته در پلیت کشت به کمک امواج فراصوت تولید شده با دستگاه فراصوت درمانی ساخت شرکت مهندسی پزشکی نوین در مد پیوسته و بسامد ۱ مگاهرتز، با شدت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ وات بر سانتی متر مربع به مدت ۳ دقیقه انجام شد (۴). بعد از تابش دهی، سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور نگهداری شدند.
۳- گروه سلول‌های درمان شده با غلظت بهینه‌ی نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی/طلا و امواج فراصوت به عنوان درمان ترکیبی: به منظور مشاهده نتایج درمان ترکیبی با امواج فراصوت و نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی/طلا، غلظتی از نانوذرات که در آن کسر بقاء سلول‌ها به میزان ۸۰ درصد است انتخاب شد و بعد از اعمال آن، سلول‌ها به مدت ۱ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه نگهداری شدند. بعد از گذشت ۱ ساعت، سلول‌ها به صورت ذکر شده در مرحله‌ی قبل به کمک امواج فراصوت، تابش دهی شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند.
۴- گروه سلول‌های کنترل که هیچ درمانی دریافت نکردند.

سنجنش میزان بقای سلول‌ها به کمک آزمون دی متیل تیازول - ۲ و ۵ دی فنیل تترازیلیوم برمید (MTT): برای سنجنش میزان بقای سلولی بعد از گذشت ۲۴ ساعت از اعمال درمان‌ها، ابتدا محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در بافر PBS آماده شد. سپس محیط هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه به دقت خارج شد و ترکیبی از ۹۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI-1640 بدون سرم جنین گاوی و ۱۰ میکرولیتر محلول آماده شده MTT به هر چاهک اضافه گردید و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه و محیط تاریک برای تشکیل کریستال‌های فروزمان، انکوباسیون انجام شد. در مرحله‌ی بعد محلول رویی هر چاهک به دقت خارج شد و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به منظور حل شدن کریستال‌های تشکیل شده اضافه شد و پلیت به مدت ۲۰ دقیقه در شیکر قرار گرفت. در مرحله‌ی آخر، جذب نوری هر چاهک توسط دستگاه ELISA reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد و درصد زنده بودن سلول‌ها با استفاده از فرمول مربوطه محاسبه شد.

سنجنش میزان آپوپتوز به کمک آزمون فلوسایتومتری: مرگ

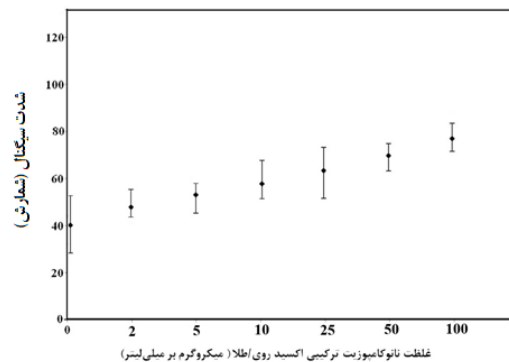
نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی/طلا و امواج فراصوت با شدت ۲ وات بر سانتی متر مربع میزان بقا به ۲۰ درصد رسیده است که دارای اختلاف معنی داری با گروه شاهد می باشد ($P < 0/01$).



شکل ۲. میانگین و انحراف معیار شدت سیگنال فلوروسانس ناشی از تولید رادیکال‌های آزاد در هم‌افزایی نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی/طلا و امواج فراصوت در مقایسه با نانوذرات بدون تابش فراصوت ($^{***}P < 0/001$, $^{**}P < 0/01$, $^{*}P < 0/05$)

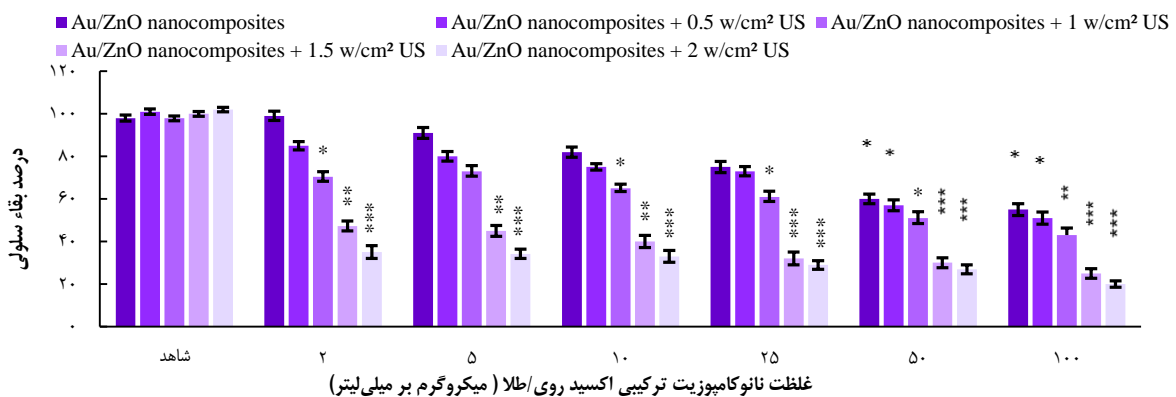
سنجش میزان آپوپتوز: در شکل ۴، نتایج سنجش میزان آپوپتوز در سلول‌های تحت درمان با امواج فراصوت در شدت ۱/۵ وات بر سانتی متر مربع، نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی/طلا با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی لیتر و درمان ترکیبی با نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی/طلا در غلظت ذکر شده و امواج فراصوت با شدت ۱/۵ وات بر سانتی متر مربع در مقایسه با گروه شاهد نشان داده شده است. همانطور که در شکل ۴ مشاهده می شود، میزان آپوپتوز در سلول‌های ملانوما درمان شده با ترکیب نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی/طلا و امواج فراصوت نسبت به درمان‌های ذکر شده به تنهایی افزایش معنی داری از خود نشان داده است ($P < 0/001$).

سلول‌ها با افزایش غلظت در مقایسه با گروه شاهد می‌باشد. در غلظت‌های کمتر از ۵ میکروگرم در میلی لیتر، اثر سیتوتوکسیک قابل توجهی بر سلول‌ها دیده نمی‌شود ($P > 0/05$). در حالی که با افزایش غلظت نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی/طلا به ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر، بقا سلول‌ها به صورت وابسته به غلظت تا ۵۵ درصد کاهش یافت ($P < 0/05$). در نتیجه غلظت ۵ میکروگرم در میلی لیتر به عنوان غلظت بهینه برای انجام آزمایشات ترکیبی با فراصوت انتخاب شد.



شکل ۱. میانگین و انحراف معیار شدت سیگنال فلوروسانس ناشی از تولید رادیکال‌های آزاد توسط نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی/طلا

میزان بقا سلول‌های تحت درمان ترکیبی با امواج فراصوت و نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی/طلا: همان‌گونه که در شکل ۳ دیده می‌شود، میزان بقا سلول‌های تحت درمان ترکیبی نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی/طلا با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی لیتر و امواج فراصوت نسبت به گروه درمان با نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی/طلا کاهش یافته است. این کاهش بقا سلول‌ها با افزایش در شدت امواج فراصوت چشم‌گیرتر بود تا جایی که در درمان ترکیبی



شکل ۳. میانگین و انحراف معیار درصد بقا سلول‌ها در درمان ترکیبی با نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی/طلا و امواج فراصوت ($^{***}P < 0/001$, $^{**}P < 0/01$, $^{*}P < 0/05$)

این مطالعه با مطالعات پیشین در مورد افزایش سطح رادیکال‌های آزاد و همچنین بالا رفتن آپوپتوز و سمیت سلولی همخوانی داشت (۹، ۱۰). با توجه به شکل ۴، میزان آپوپتوز ایجاد شده در سلول‌های ملانوما تحت درمان با ترکیب امواج فراصوت و نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی/طلا، افزایش چشمگیری نسبت به گروه‌های دیگر داشته است. دلیل این امر می‌تواند هم افزایشی امواج فراصوت و نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی/طلا در ایجاد رادیکال‌های آزاد و در نتیجه ایجاد آسیب مضاعف در غشاء و ماده‌ی ژنتیکی سلول‌ها باشد.

از محدودیت‌های پیش روی این مطالعه می‌توان از عدم وجود امکانات لازم برای تغییر ویژگی‌های نانوذرات نام برد. در مطالعات آینده قدم‌های بعدی می‌تواند بررسی این درمان به صورت درون‌تنی باشد که امکان بررسی اثرات این درمان بر بافت‌های مجاور هدف را ممکن می‌سازد.

نتیجه‌گیری

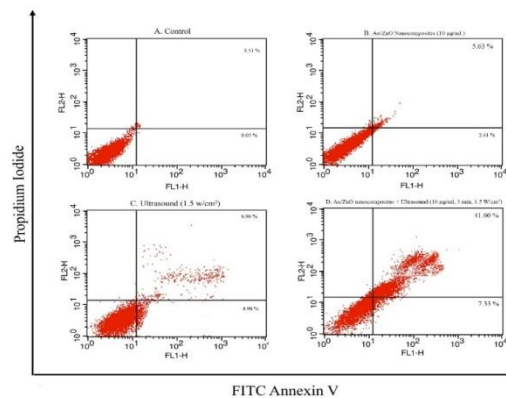
استفاده از امواج فراصوت به عنوان یکی از روش‌های درمانی با عوارض جانبی کمتر در درمان سرطان‌ها تلقی می‌شود. امواج فراصوت ضمن ایجاد آسیب به صورت مستقیم در سلول‌های موجود در میدان تابش فراصوت می‌تواند در درمان‌های ترکیبی با نانوکامپوزیت‌های خاص مثل نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی/طلا که خود می‌تواند باعث آسیب مستقیم به سلول با تولید رادیکال‌های آزاد شوند، مفید واقع گردد. این امر باعث کم شدن عوارض جانبی در درمان و بهبود کیفیت زندگی در بیماران می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل از یافته‌های طرح تحقیقاتی مصوب شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به شماره‌ی ۱۹۹۴۵۶ می‌باشد. بدین وسیله از کارکنان محترم گروه قارچ و انگل‌شناسی و گروه فیزیک پزشکی دانشکده‌ی پزشکی اصفهان که در انجام این پژوهش همکاری نمودند، سپاسگزاری می‌شود.

References

1. Siegel R, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 2019; 69(1):7-34.
2. Domingues B, Lopes JM, Soares P, Pópulo H. Melanoma treatment in review. *Immunotargets Ther* 2018; 7: 35-49.
3. Bansal K, Jha CK, Bhatia D, Shekhar H. Ultrasound-enabled therapeutic delivery and regenerative medicine: Physical and biological perspectives. *ACS Biomater Sci Eng* 2021; 7(9): 4371-87.
4. Shanei A, Baradaran M, Shanei MM. The effect of ultrasound waves on melanoma cells in presence of



شکل ۴. میزان القاء آپوپتوز در سلول‌های درمان شده در گروه‌های مختلف

بحث

در این مطالعه، میزان بقاء و آپوپتوز سلولی و همچنین میزان رادیکال‌های آزاد تولیدی ناشی از درمان ترکیبی امواج فراصوت و نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی/طلا بر روی رده‌ی سلولی ملانوما به صورت آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. در مورد افزایش سیگنال فلوروسنت در دوزیمتری شیمیایی نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی/طلا به تنهایی، تحقیقات بیشتری برای اطمینان یافتن از این موضوع مورد نیاز است، اما با توجه به مطالعات گذشته یک فرضیه می‌تواند ویژگی ذاتی نانوذرات اکسید روی در تولید رادیکال‌های آزاد بر اساس فعالیت‌های ضد باکتریایی این نانوذرات باشد (۱۱). به دلیل شکل سوزنی و سطح نسبتاً وسیع نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی/طلا، می‌توان گفت که شدت‌های سیگنال بالاتر در ترکیب با امواج فراصوت نتیجه مکان‌های هسته‌زایی بیشتر برای القای پدیده حفره‌سازی است که در نهایت آسیب به سلول‌های ملانوما را ایجاد می‌کند.

با توجه به نتایج تست‌های سنجش بقاء سلولی و آپوپتوز در سلول‌ها می‌توان این نتیجه را گرفت که نانوکامپوزیت ترکیبی اکسید روی/طلا برای استفاده به عنوان حساس‌کننده‌ی صوتی در درمان سونودینامیک می‌تواند حتی در غلظت پایین ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر باعث کشندگی سلول‌های ملانوما با القاء آپوپتوز در آن‌ها شود. نتایج

gold nanoparticles [in Persian]. *J Isfahan Med Sch* 2017; 34(412): 1550-5.

5. Cai L, Liu J, Wang Y, Chen H, Ma Y, Wang Y, et al. Enhanced anti-melanoma efficacy of interferon α -2b via overexpression of ING4 by enhanced Fas/FasL-mediated apoptosis. *Oncol Lett* 2018; 15(6): 9577-83.
6. Pan X, Wang H, Wang S, Sun X, Wang L, Wang W, et al. Sonodynamic therapy (SDT): a novel strategy for cancer nanotheranostics. *Sci China Life Sci* 2018; 61(4): 415-26.
7. Chen X, Niu T, Gao Y, Liang X, Li S, Zhang L, et al.

- Tunable synthesis of pH-responsive biodegradable ZnO nanospheres assembled from ultrasmall particles for cancer chemotherapy. *Chem Eng J* 2019; 371: 443-51.
8. Liu Y, Wang Y, Zhen W, Wang Y, Zhang S, Zhao Y, et al. Defect modified zinc oxide with augmenting sonodynamic reactive oxygen species generation. *Biomaterials* 2020; 251: 120075.
 9. Duan X, Liao Y, Liu T, Yang H, Liu Y, Chen Y, et al. Zinc oxide nanoparticles synthesized from *Cardiospermum halicacabum* and its anticancer activity in human melanoma cells (A375) through the modulation of apoptosis pathway. *J Photochem Photobiol B* 2020; 202: 111718.
 10. Fan P, Yang C, Wang L, Wang Q, Zhang Y, Zhou J, et al. ZnO nanoparticles stimulate oxidative stress to induce apoptosis of B16F10 melanoma cells: In vitro and in vivo studies. *Biomed Phys Eng Express* 2021; 7(6).
 11. Venkatasubbu G, Baskar R, Anusuya T, Seshan CA, Chelliah R. Toxicity mechanism of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles against food pathogens. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2016; 148: 600-6.

The Effect of Ultrasound Therapy in the Presence of Combined Zinc Oxide/Gold Nanocomposite on Melanoma Cell Line

Arman Esmailzadeh¹, Ahmad Shanei², Neda Attaran³, Najmeh Najmoddin⁴,
Atena Aliakbar Shirazi⁵, Seyed Hossein Hejazi⁶

Original Article

Abstract

Background: Zinc oxide nanoparticles can produce free radicals due to their piezoelectric properties, which are needed for cancer treatment. Also, using ultrasound waves in combination with zinc oxide nanoparticles can help increase the response to sonodynamic therapy by synergistically producing free radicals. On the other hand, with gold nanoparticles as a place for cavitation in the ultrasound field, the intensity threshold required for cavitation is reduced, reducing the damage to normal cells. This study aimed to investigate the effect of sonodynamic therapy of melanoma with zinc oxide/gold nanocomposite as a sonosensitizer.

Methods: Chemical dosimetry was used to determine the level of free radicals produced due to combined zinc oxide/gold nanocomposite with and without ultrasound radiation. Also, measuring the survival and apoptosis rate in the cultured melanoma cells was done in-vitro by MTT and flow cytometry tests, respectively.

Findings: With the increase in the production of free radicals, the survival percentage of melanoma cells treated with combined zinc oxide/gold nanocomposite and ultrasound waves at an intensity of 2 W/cm² showed the most significant decrease (by 20%) which was significantly different from the control group. Also, the apoptosis level caused by sonodynamic therapy with zinc oxide/gold nanocomposite increased significantly.

Conclusion: Using ultrasound waves in combination with zinc oxide/gold nanocomposite can play an influential role in improving the response of melanoma to treatment by raising the level of free radicals and reducing the general toxicity for non-cancerous cells by lowering the cavitation threshold.

Keywords: Apoptosis; Gold; Nanoparticles; Melanoma; Ultrasonic Waves; Zinc Oxide

Citation: Esmailzadeh A, Shanei A, Attaran N, Najmoddin N, Aliakbar Shirazi A, Hejazi SH. **The Effect of Ultrasound Therapy in the Presence of Combined Zinc Oxide/Gold Nanocomposite on Melanoma Cell Line.** J Isfahan Med Sch 2023; 40(694): 917-23.

1- PhD in Medical Physics, Department of Medical Physics, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- Professor, Department of Medical Physics, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Assistant Professor, Department of Medical Nanotechnology, Applied Biophotonics Research Center, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

4- Assistant Professor, Department of Biomedical Engineering, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

5- Msc in Biomedical Engineering, Department of Biomedical Engineering, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

6- Professor, Department of Parasitology and Mycology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Ahmad Shanei, Professor, Department of Medical Physics, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: shanei@med.mui.ac.ir