

## اثر سمیت نانوذرات طلا بر تومور رتینوبلاستوما در مدل حیوانی خرگوش

سمیه مرادی<sup>۱</sup> (Ph.D)، منیژه مختاری دیزجی<sup>۱\*</sup> (Ph.D)، فریبا قاسمی<sup>۲</sup> (Ph.D)، شهاب شیبانی<sup>۳</sup> (Ph.D)، فهیمه اسدی آملی<sup>۴</sup> (Ph.D)

۱- گروه فیزیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات چشم بیمارستان فارابی، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳- پژوهشکده کاربرد پرتوها، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، تهران، ایران

۴- مرکز تحقیقات چشم بیمارستان فارابی، دپارتمان پاتولوژی، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: تاریخ پذیرش:

mokhtarm@modares.ac.ir

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۸۲۸۹۲

### چکیده

هدف: رتینوبلاستوما از تومورهای چشمی بدخیم در کودکان است. هدف از درمان رتینوبلاستوما حفظ بینایی و به حداقل رساندن عوارض جانبی است. در این مطالعه سمیت غلظت ایمن نانوذرات طلا در شرایط *in vitro*، بر روی تومور رتینوبلاستوما در شرایط *in vivo* بررسی شد.

مواد و روش‌ها: ارزیابی سمیت نانوذرات طلا با استفاده از تست MTT، پس از گذشت ۴۸ ساعت در انکوباتور CO<sub>2</sub> با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در سلول‌های رده Y79 با غلظت‌های ۱/۶۹، ۱/۷۵، ۳/۵، ۷، ۱۴ و ۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات طلا، در شرایط *in vitro* انجام شد. دوز ایمن در شرایط *in vitro* استخراج شد. سمیت نانوذرات طلا در درمان تومور رتینوبلاستوما، در شرایط *in vivo* در مدل حیوانی خرگوش با استفاده از آنالیز هیستوشیمی و نیز اندازه‌گیری سطح مقطع تومور با استفاده از آنالیز تصاویر متوالی فراصوتی و استخراج آن با استفاده از نرم‌افزار Image J بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد با افزایش غلظت نانوذرات طلا، درصد سلول‌های زنده در مقایسه با گروه کنترل، در غلظت‌های بیش‌تر از ۱/۶۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای اختلاف معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) و در غلظت ۱/۶۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدون اختلاف معنی‌دار ( $p > 0.05$ ) بوده است. نتایج نشان داد تزریق نانوذرات طلا در داخل چشم خرگوش حامل تومور رتینوبلاستوما، موجب کاهش ابعاد تومور در چشم خرگوش می‌شود.

نتیجه‌گیری: سمیت نانوذرات طلا، اثر درمانی بر روی سلول‌های رده Y79 در شرایط *in vitro* و تومور رتینوبلاستومای چشم در شرایط *in vivo* دارد.

واژه‌های کلیدی: نانوذرات طلا، سلول‌های رده Y79، رتینوبلاستوما، سرطان‌های چشم، خرگوش

### مقدمه

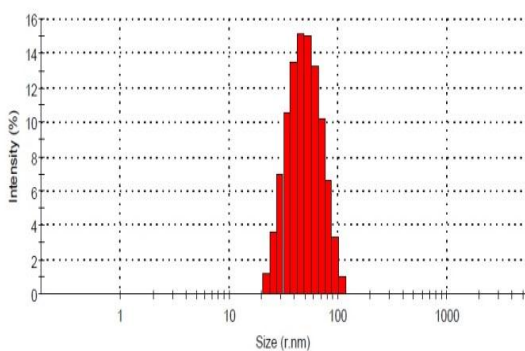
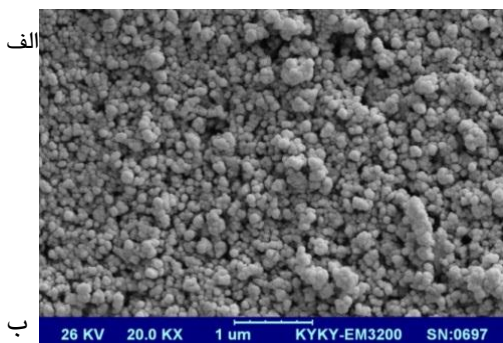
مقاومت دارویی کم‌تر نسبت به سلول‌های سرطانی وجود دارد [۵].

در این مطالعه سعی شده است که درمان رتینوبلاستوما با نانوذرات طلا با عوارض کم‌تر و حفظ بینایی برای چشم همراه باشد. هدف از این مطالعه بررسی و ارزیابی سمیت نانوذرات طلا در درمان رتینوبلاستوما می‌باشد. استفاده از نانوذرات بر روی ارگان‌های بدن انسان می‌تواند سمیت ایجاد کند. از این رو، پژوهشگران مطالعاتی در زمینه نحوه ایجاد سمیت نانوذرات و تعیین مقدار آن در درمان سرطان‌ها انجام دادند [۶، ۷]. نانوذرات می‌توانند وارد سلول شوند و موجب تغییرات در سلول، پروتئین و دی‌ان‌ای و سبب از بین رفتن عملکرد آن‌ها و باعث اثرات زیان‌آور شوند [۸]. از این رو ضروری است که در زمینه سمیت نانوذرات در محیط‌های برون‌تنی (*in vitro*) و درون‌تنی

رتینوبلاستوما شایع‌ترین تومورهای چشمی بدخیم در کودکان با احتمال بروز ۴ درصد است [۱]. هر ساله ۲۵۰ تا ۳۰۰ مورد از رتینوبلاستوما در ایالات متحده و ۵۰۰۰ مورد در سراسر جهان تشخیص داده می‌شود [۲]. درمان رتینوبلاستوما شامل لیزردرمانی، کرایوتراپی، جراحی، پرتودرمانی و شیمی‌درمانی است [۳]. هدف از درمان رتینوبلاستوما حفظ بینایی و به حداقل رساندن عوارض جانبی است. چند گزینه درمان در دسترس هستند که شیمی‌درمانی روشی امیدوارکننده می‌باشد. روش‌های مختلف شیمی‌درمانی برای درمان رتینوبلاستوما وجود دارد [۴]. یکی از مشکلات مهم در درمان سرطان، اثرات جانبی ناخواسته و مقاومت داروهای شیمی‌درمانی موجود است. بنابراین، همیشه نیاز برای یافتن عوامل ضد سرطانی جدید با سمیت محدود و

سنتز نانوذرات طلا: در این مطالعه، نانوذرات طلا با استفاده از چیتوزان (جرم مولکولی متوسط) و با استفاده از روش پیشنهاد شده از گروه مطالعاتی Qian و همکاران [۱۸] سنتز شد. در ابتدا، ۰٫۳۴۶ گرم چیتوزان در ۱۰ سی سی اسید استیک (یک درصد) با استفاده از vortex و حمام اولتراسوند (sonicator) حل شد. سپس، غلظت طلا در محلول استاندارد معادل ۵ میلی مولار تهیه شد. پس از آن، ۱ سی سی از محلول ۵ میلی مولار طلا به میزان ۵ برابر رقیق گردید و سپس ۴ سی سی از آن به ۱۰ سی سی چیتوزان در حالت به هم زدن شدید، اضافه شد. با حرارت دادن محلول داخل بشر در حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت حدود ۱ ساعت، رنگ قرمز یاقوتی به دست آمد. بدین ترتیب نانوذرات طلا سنتز شد.

خصوصیات نانوذرات طلا: نانوذرات کروی طلا با قطر میانگین در حدود ۶۰ نانومتر در این مطالعه سنتز شدند که شکل کروی و ابعاد و سائز این ذرات با استفاده از تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) در شکل ۱ الف نشان داده شده است. میانگین قطر هیدرودینامیکی این نانوذرات طلا با دستگاه 89 DLS (Dynamic light scattering) نانومتر اندازه گیری شد (شکل ۱ ب). طول موج ماکزیم طیف جذب فرابنفش آن نیز در حدود ۵۴۲ نانومتر به دست آمد.



شکل ۱. اندازه و شکل نانوذرات طلا (الف) تصویر SEM و (ب) خروجی دستگاه DLS. میانگین قطر هیدرودینامیکی نانوذرات طلا ۸۹ نانومتر است.

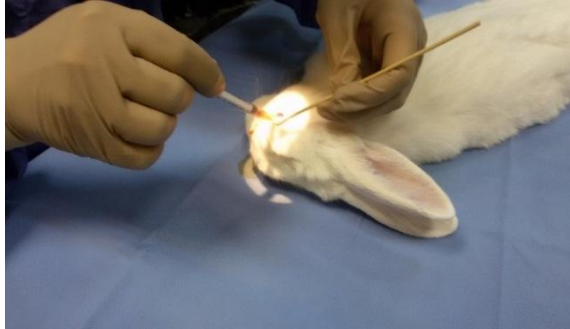
ارزیابی اثر نانوذرات طلا بر سلول های رتینوبلاستوما در شرایط آزمایشگاهی برون تنی: برای تعیین سمیت سلولی نانوذرات طلا، از رنگ آمیزی MTT برای سنجش درصد

(in vivo) مطالعاتی انجام و میزان سمیت نانومواد ارزیابی و برای طراحی ایمن در درمان سرطان استفاده گردد. نانوذرات فلزی کاربرد وسیعی در رهایش دارو [۹]، بیوسنسورها [۱۰]، تصویربرداری زیستی [۱۱]، نگهداری و حفظ غذا [۱۲] از طریق بهره برداری از خواص فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی منحصر به فرد آنها دارند. با توسعه سریع فناوری نانو، خطرات بالقوه سلامت و اثرات زیست محیطی از نانوذرات ساخته شده، نگران کننده هستند [۱۳]. فناوری نانو، نقش حیاتی در تحویل و رهایش دارو در درمان های انسانی ایفا می کند. نسبت سطح به حجم بزرگ نانوذرات فلزی، اجازه می دهد که سطح آنها، صدها مولکول را پوشش دهد [۱۴]. در مطالعات نشان داده شده است که نانوذرات طلا با افزایش دوز، سمیتشان افزایش می یابد. یک پرسش مهم این است که نانوذرات در چه غلظتی برای استفاده مناسب هستند [۱۵]. موقعیت های بسیار زیادی برای استفاده نانومواد در کاربردهای دارویی و پزشکی وجود دارد که درک کامل از سمیت سیستمیک مرتبط با آن بسیار مهم است [۱۶]. مطالعات کشت سلولی، سمیت نانوذرات را از طریق گزارش سمیت و کاهش سلول های زنده و ایجاد التهاب تأیید می کنند. در آزمایش های درون تنی، اثرات سمیت نانوذرات طلا به اندام هدف وابسته است [۱۷]. در این تحقیق، میزان سمیت نانوذرات طلا در شرایط برون تنی بر روی رده سلولی رتینوبلاستوما و هم چنین در شرایط درون تنی بر تومور رتینوبلاستوما مدل حیوانی خرگوش مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه برای نخستین بار امکان ایجاد تومور رتینوبلاستوما در چشم خرگوش به عنوان یک مدل حیوانی فراهم شد.

## مواد و روش ها

رده سلولی و شرایط کشت و تکثیر آن: ابتدا رده سلولی سرطانی Y79 مشتق شده از تومور رتینوبلاستوما انسانی از انستیتو پاستور تهران تهیه گردید. سلول ها در محیط کشت RPMI1640 همراه با ۱۰ درصد سرم گاو FBS (Fetal bovine serum) و ۱ درصد آنتی بیوتیک پنی سیلین - استرپتومایسین در فلاسک استریل T75 کشت داده شد. در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و محیط CO<sub>2</sub> ۵ درصد انکوبه شده و مورد تکثیر قرار گرفت. پس از گذشت دو تا سه روز برای پاساژ سلول ها، ابتدا محیط کشت حاوی سلول های Y79 داخل فلاسک ها در داخل فالكون های استریل ریخته شد و سپس به مدت ۵ دقیقه با ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. محیط کشت رویی سلول ها خارج شد و سلول های رسوب کرده به داخل محیط کشت جدید داخل فلاسک اضافه گردید. تمامی این مراحل در شرایط استریل و زیر هود انجام شد.

رتینوبلاستوما، ابتدا خرگوش‌ها از طریق تزریق عضلانی ترکیب دو داروی کتامین و زایلین با نسبت ۳ به ۲ بی‌هوش شدند. سپس به هر دو چشم حیوان،  $3 \times 10^6$  سلول Y79 با حجم ۳۰ میکرولیتر در داخل ویتره از قسمت فوقانی چشم خرگوش تزریق شد. تصویر تزریق سلول به چشم خرگوش در شکل ۲ مشاهده می‌شود.



شکل ۲. تصویر تزریق سلول های Y79 به داخل ویتره چشم خرگوش

برای القاء تومور رتینوبلاستوما و برای تضعیف سیستم ایمنی داروی سیکلوسپورین با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن حیوان [۲۰] به صورت زیر پوستی تزریق شد. از سه روز قبل از تزریق سلول‌ها به چشم و هم‌چنین بعد از تزریق سلول‌ها، به صورت زیرپوستی روزانه به خرگوش‌ها تزریق شد. بعد از یک هفته از تزریق رده سلولی Y79، لکه‌های سفیدی در داخل چشم خرگوش‌ها ایجاد شدند. دو هفته پس از تزریق سلول‌ها، چشم خرگوش‌ها با افتالموسکوپ به روش غیرمستقیم بررسی شد. با رسیدن ابعاد تومورها به قطر میانگین ۵-۷ میلی‌متر وارد مطالعه تجویز نانوذر شدند. تصویر پاتولوژی تومور رتینوبلاستوما القاء شده در چشم خرگوش در شکل ۳ (الف) و هم‌چنین تصویر لکه سفید تومور رتینوبلاستوما ایجاد شده در چشم خرگوش در شکل ۳ (ب) مشاهده می‌شود. برای ارزیابی ابعاد تومور از تصویربرداری فراصوتی با فرکانس ۴۰ مگاهرتز استفاده شد. تصویربرداری فراصوتی B-mode فرکانس بالا (Sonix Ultrasonix Medical, TOUCH Ultrasound System

Canada, Richmond) با پروب خطی (۱/۵ سانتی‌متر در ۰/۵ سانتی‌متر، فرکانس ۴۰ مگاهرتز)، انجام شد. نمونه‌ای از تصویر B-mode اولتراسوند از تومور رتینوبلاستوما القاء شده در شکل ۳ (ج) مشاهده می‌شود. برای بررسی اثر سمیت نانوذرات طلا بر روی تومور رتینوبلاستوما در مدل حیوانی خرگوش، ۸ چشم تومورال خرگوش در گروه بدون تزریق نانوذرات طلا و ۸ چشم تومورال خرگوش در گروه همراه با تزریق نانوذرات طلا قرار گرفتند. نانوذرات طلا با حجم ۳۰ میکرولیتر و غلظت ۱,۶۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر (غلظت ایمن که از مطالعه سلولی حاصل

سلول‌های زنده پس از تجویز استفاده شد و تعداد سلول‌های زنده از طریق ارزیابی فعالیت آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی با روش MTT Assay پس از ۴۸ ساعت بررسی شد [۱۹].

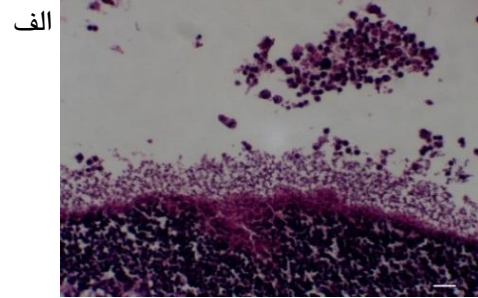
پس از شمارش سلول‌ها با استفاده از تریپان بلو، سوسپانسیون سلولی با تراکم  $5 \times 10^4$  سلول به ازای هر میلی‌لیتر در محیط کشت تهیه شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر محلول کشت حاوی سلول Y79 با غلظت‌های مختلف ۱/۶۹، ۱/۷۵، ۳/۵، ۷، ۱۴ و ۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات طلا به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه اضافه شد. به طوری که از هر نمونه‌ی غلظت نانوذرات طلا بر روی سلول‌های رتینوبلاستوما در ۴ چاهک از پلیت ۹۶ خانه تکرار شد و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید.

محلول MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه گردید. پس از سپری شدن ۴۸ ساعت، انکوباسیون سلول‌ها با نانوذرات طلا با غلظت‌های مختلف در دمای ۳۷ درجه سلیسیوس، محلول رویی سلول‌ها خارج شد. ۲۰ میکرولیتر محلول MTT به هر چاهک اضافه شد و مجدداً به مدت ۴ ساعت دیگر در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از آن پلیت ۹۶ خانه را از انکوباتور خارج کرده و ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO (Dimethyl sulfoxide) به هر چاهک اضافه شد تا رسوب سلولی حاصل در DMSO حل شود و بلورهای فورمازان تشکیل شود. سپس به مدت ۱۵ دقیقه پلیت مربوطه بر روی دستگاه شیکر قرار گرفت تا کاملاً رسوب سلولی در DMSO حل شود. در انتها، جذب نوری بلورهای فورمازان تشکیل شده توسط دستگاه Cytation 5 Cell Imaging Multi-Mode Reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر با مرجع ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد سلول‌های زنده هر نمونه در مقایسه با گروه کنترل بر اساس رابطه ۱ برآورد شد. تمامی مراحل آزمایش سه بار تکرار انجام گرفت. (رابطه ۱)

$$100 \times \frac{\text{میانگین جذب خوانده شده برای هر نمونه}}{\text{میانگین جذب خوانده شده نمونه کنترل}} = \text{درصد سلول‌های زنده}$$

القاء تومور رتینوبلاستوما در مدل حیوانی خرگوش و تزریق نانوذرات طلا به داخل تومور: در این مطالعه، ۱۰ خرگوش سفید نر نیوزیلند از انستیتو رازی خریداری شد. خرگوش‌ها از ۱۰ روز قبل از تزریق سلول‌های رتینوبلاستوما برای عادت به شرایط جدید در آزمایشگاه حیوانات دانشگاه تربیت مدرس نگهداری شدند (تاییدیه کمیته اخلاق، کد Ir.tmu.rec.1395.325). با رسیدن وزن تقریبی خرگوش‌ها به ۱ کیلوگرم، تزریق سلول و القای تومور رتینوبلاستوما در مرکز تحقیقات چشم بیمارستان فارابی بر روی هر دو چشم انجام شد. برای تزریق سلول‌های

شد) به داخل ویتره ۸ چشم خرگوش بعد از دو هفته از تزریق سلول‌های Y79 و القای تومور رتینوبلاستوما تزریق شد.

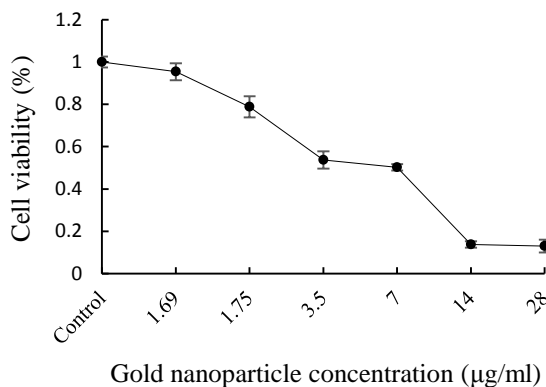


شکل ۳. الف) تصویر پاتولوژی تومور رتینوبلاستوما القاء شده با بزرگنمایی ۱۰۰ برابر، ب) لکه سفید تومور رتینوبلاستوما ایجاد شده در چشم خرگوش، ج) تصویر سونوگرافی زلوشن بالا با فرکانس ۴۰ مگاهرتز از چشم خرگوش. تومور رتینوبلاستوما القاء شده در تصویر مشخص شده است.

تومور در هر تصویر مشخص گردید. تصویری که بیشترین سطح مقطع تومور با بیشترین تعداد پیکسل را دارد، انتخاب گردید. بدین ترتیب اندازه سطح تومور در هفته‌های ۰، ۳، ۶ و ۹ ام ثبت شد. نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار برای هر نمونه محاسبه شد. برای تمایز بین گروهی از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه با سطح اطمینان ۹۵ درصد، با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ (Version 22, SPSS Inc, Chicago, IL) انجام شد.

### نتایج

شکل ۴ تاثیر افزایش غلظت نانوذرات طلا را در شرایط *in vitro* نشان می‌دهد. در این مطالعه درصد سلول‌های زنده در مقایسه با گروه کنترل کاهش می‌یابد به طوری که در غلظت‌های بیش از ۱/۶۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر، در مقایسه با گروه کنترل، اختلاف معنی‌داری وجود دارد ( $P < 0.05$ ). در حالی که میزان مرگ سلولی ناشی از نانوذرات طلا در غلظت ۱/۶۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۹۵ درصد) اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل حاصل نشد ( $P > 0.05$ ).

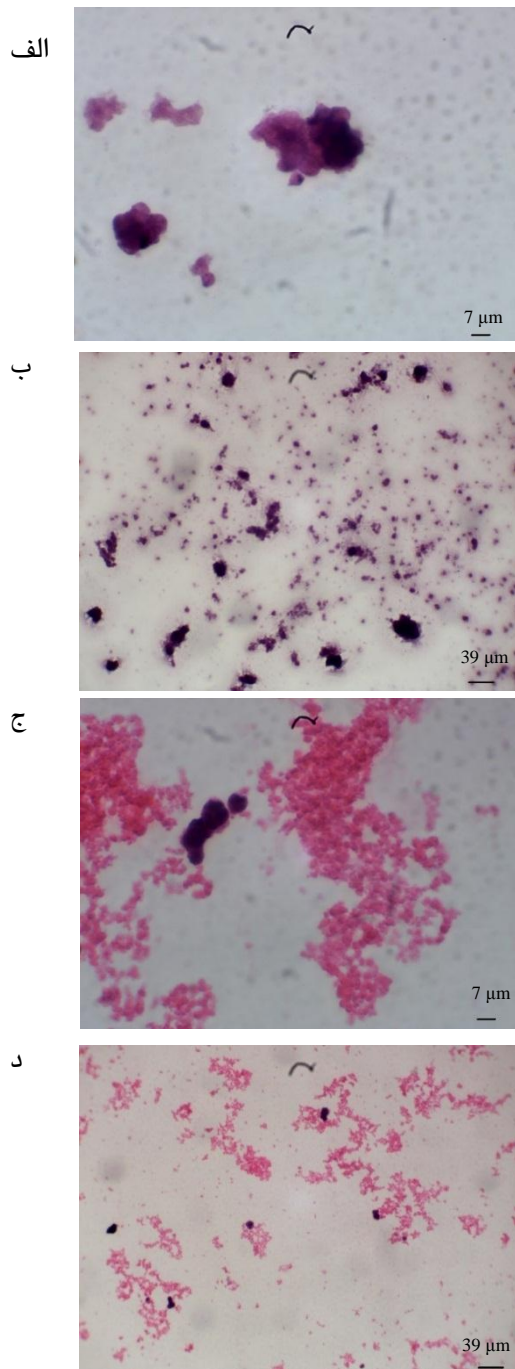


شکل ۴. درصد سلول‌های زنده Y79 بر حسب غلظت‌های مختلف نانوذرات طلا پس از ۴۸ ساعت با استفاده از تست MTT

آنالیز هیستوشیمی در شرایط *in vitro*: در یک پلیت ۳۵ میلی‌متری شامل ۲ سی‌سی محیط کشت RPMI1640 همراه با ۱۰ درصد سرم گاوی FBS و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک همراه با سلول Y79 اضافه می‌گردد. در یک پلیت ۳۵ میلی‌متری دیگر نیز، ۵۰ میکرولیتر نانوذرات طلا با غلظت ۱/۶۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ۲ سی‌سی محیط کشت سلول‌ها در محیط کشت RPMI1640 همراه با ۱۰ درصد سرم گاوی FBS و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک همراه با سلول Y79 افزوده می‌گردد. سپس هر دو پلیت به مدت ۱۴ روز در داخل انکوباتور  $CO_2$ ، ۵ درصد انکوبه شده و سپس محتوی هر دو پلیت را در داخل فرمالین ۱۰ درصد ریخته تا تثبیت شود. هر دو نمونه تحت رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و آئوزین (H&E) قرار می‌گیرند. سپس یک قطره از هر نمونه

نحوه اندازه‌گیری سطح تومور: برای اندازه‌گیری سطح تومور از تصاویر سونوگرافی و نرم‌افزار Image J استفاده شد. پس از مدرج کردن نرم‌افزار Image J بر اساس قدرت تفکیک تصاویر فراصوتی، ابعاد تومور به صورت دو بعدی اندازه‌گیری و آنالیز شد. روش اندازه‌گیری بدین صورت است که در ابتدا، فیلم سونوگرافی در هفته‌های ۰، ۳، ۶ و ۹ از چشم حیوان و موقعیت تومور گرفته شد. در همه فیلم‌های سونوگرافی، پروب دستگاه اولتراسوند در قسمت فوقانی چشم خرگوش قرار داده شد و همه فیلم‌ها و تصاویر سونوگرافی از ناحیه فوقانی چشم خرگوش با آهنگ ۳۰ فریم در ثانیه گرفته شدند. سپس برای اندازه‌گیری سطح تومور، هر فیلم سونوگرافی تبدیل به فریم‌های سازنده شد. در هر تصویر سونوگرافی با استفاده از نرم‌افزار Image J مرز حول تومور مشخص گردید، تعداد پیکسل‌های سازنده سطح





تمایز معنی دار نشان دهنده این موضوع است که تزریق نانوذرات طلا به تومور رتینوبلاستوما موجب مهار رشد تومور می شود. شکل ۵. نمونه های سلولی بدون نانوذرات طلا همراه با رنگ آمیزی هماتوکسیلین و آنوزین (H&E) در زیر میکروسکوپ نوری به ترتیب با بزرگنمایی الف) ۴۰۰ برابر و ب) ۱۰۰ برابر. نمونه های سلولی همراه با نانوذرات طلا با رنگ آمیزی هماتوکسیلین و آنوزین (H&E) به ترتیب با بزرگنمایی ج) ۴۰۰ برابر و د) ۱۰۰ برابر.

رنگ آمیزی شده بر روی لام قرار گرفته و خشک می شود. در شکل ۵، تصاویر هر دو نمونه بر روی لام در زیر میکروسکوپ نوری (Leica DM750, Heerbrugg, Switzerland) نشان داده شده است. شکل های ۵ الف) و ۵ ب)، نمونه های سلولی Y79 بدون نانوذرات طلا همراه با رنگ آمیزی هماتوکسیلین و آنوزین (H&E) در زیر میکروسکوپ نوری به ترتیب با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر و ۱۰۰ برابر است. شکل های ۵ ج) و ۵ د) نمونه های سلولی Y79 همراه با نانوذرات طلا با رنگ آمیزی هماتوکسیلین و آنوزین (H&E) به ترتیب با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر و ۱۰۰ برابر می باشد.

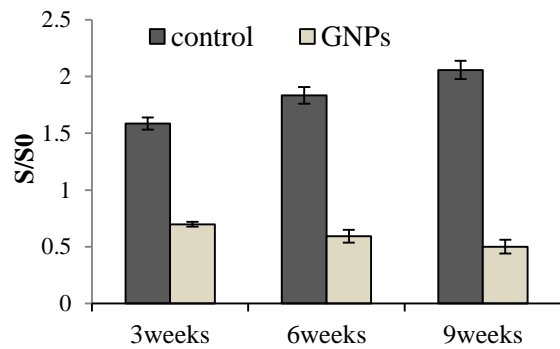
همان طور که در شکل ها مشخص است، پس از گذشت ۱۴ روز، تعداد و تجمع سلول ها در کنار هم در نمونه های سلولی که به آن ها نانوذرات طلا اضافه شده است، به طور آشکاری نسبت به نمونه های سلولی بدون نانوذرات طلا کاهش یافته است.

ارزیابی اثر نانوذرات طلا با غلظت های مختلف ۱/۶۹، ۱/۷۵، ۳/۵، ۷، ۱۴، ۲۸ میکروگرم بر میلی لیتر نانوذرات طلا بر سلول های رتینوبلاستوما در شرایط آزمایشگاهی برون تنی با استفاده از تست MTT، درصد سلول های زنده اندازه گیری و مشاهده شد میزان کاهش درصد سلول های زنده، در مقایسه با گروه کنترل، در اثر نانوذرات طلا با غلظت های بیش از ۱/۶۹ میکروگرم بر میلی لیتر تمایز معنی داری وجود دارد ( $P < 0.05$ ). در حالی که میزان مرگ سلولی ناشی از نانوذرات طلا در غلظت ۱/۶۹ میکروگرم بر میلی لیتر (۹۵ درصد) اختلاف معنی داری با گروه کنترل حاصل نشد ( $P > 0.05$ ). به همین دلیل پس از القای تومور رتینوبلاستوما در داخل چشم خرگوش نانوذرات طلا با غلظت ۱/۶۹ میکروگرم بر میلی لیتر به داخل و بتره چشم تومورال خرگوش تزریق شد.

سطح تومور بعد از سه، شش و نه هفته از تزریق نانوذرات طلا در شکل ۶ آمده است. در گروه تومور چشمی رتینوبلاستوما همراه با تزریق نانوذرات طلا، سطح تومور به ۰/۶۹ برابر سطح اولیه کاهش یافته و در گروه رتینوبلاستوما بدون تزریق نانوذرات طلا، سطح تومور به ۱/۵۸ برابر سطح اولیه رسیده است. هم چنین سطح تومور بعد از شش هفته و نه هفته از تزریق نانوذرات طلا در گروه تومور رتینوبلاستوما بدون تزریق نانوذرات طلا (کنترل) به ترتیب برابر با ۱/۸۳ و ۲/۰۵ برابر روز اول حاصل شد. در گروه حیوان با تومور رتینوبلاستوما همراه با تزریق نانوذرات طلا بعد از شش و نه هفته، ۰/۵۹ برابر و ۰/۰۵۰ برابر نسبت به روز صفر است. در این مطالعه سطح نسبی تومور رتینوبلاستوما القاء شده در چشم خرگوش در هفته های سوم، ششم و نهم در دو گروه کنترل (بدون تزریق نانوذرات طلا) در مقایسه با گروه همراه با تزریق نانوذرات طلا، تمایز معنی داری وجود دارد ( $P < 0.05$ ).

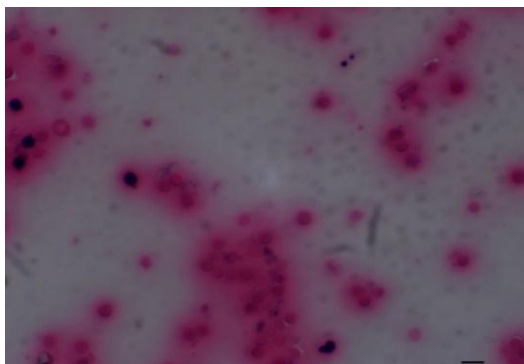
واکس پارافین قالب‌گیری شد و به قطعات با ضخامت ۱۰ میکرومتری برش داده شد. قطعات با رنگ هماتوکسیلین و آئوزین (H&E) تحت رنگ‌آمیزی قرار گرفت و سپس نمونه حاصل بر روی لام گذاشته و با استفاده از میکروسکوپ نوری تحت بررسی قرار گرفتند. در شکل ۷ (الف) و ۷ (ب) تصاویر تومور رتینوبلاستوما در داخل ویتره چشم خرگوش با حضور نانوذرات طلا به ترتیب با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر و ۴۰۰ برابر و در شکل ۷ (ج) و ۷ (د) تصاویر تومور رتینوبلاستوما در داخل ویتره چشم خرگوش بدون حضور نانوذرات طلا به ترتیب با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر و ۴۰۰ برابر نشان داده شده است.

همان‌طور که در شکل‌های ۷ مشاهده می‌شود، تزریق نانوذرات طلا در داخل ویتره چشم خرگوش موجب کاهش معنی‌دار سلول‌های زنده رتینوبلاستوما در داخل ویتره نسبت به حالتی می‌باشد که نانوذرات طلا به داخل ویتره چشم تومورال خرگوش تزریق نشده است.



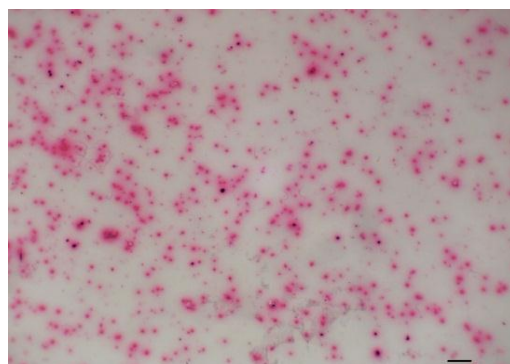
شکل ۶. سطح نسبی تومور رتینوبلاستومای القاء شده در چشم خرگوش در هفته‌های سوم، ششم و نهم در دو گروه کنترل (بدون تزریق نانوذرات طلا) و گروه همراه با تزریق نانوذرات طلا

بعد از گذشت ۳ هفته از تزریق نانوذرات طلا به داخل چشم تومورال خرگوش، چشم تخلیه شده خرگوش‌ها در داخل فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفت. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، در



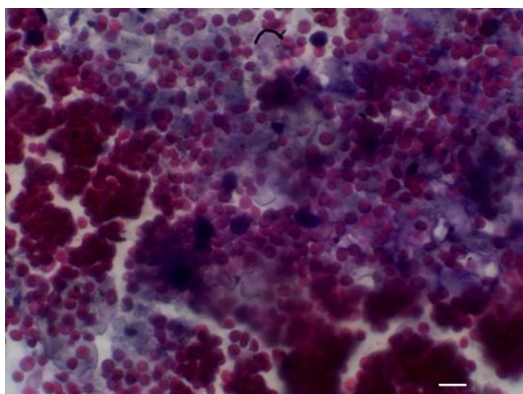
ب

7 μm



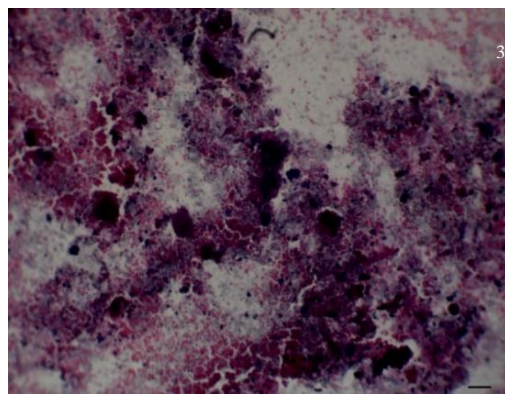
الف

39 μm



د

7 μm



ج

39 μm

شکل ۷. تصاویر تومور رتینوبلاستوما با حضور نانوذرات طلا (الف) بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر و (ب) ۴۰۰ برابر. تصاویر تومور رتینوبلاستوما بدون حضور نانوذرات طلا (ج) بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر و (د) ۴۰۰ برابر.

اکسیژن فعال است. افزایش در مقدار اکسیژن فعال، سبب شکست مولکول دی.ان.ای شده و در نهایت منجر به مرگ سلول می‌شود [۲۱]. با افزایش غلظت نانوذرات طلا، میزان تجمع نانوذرات در سلول افزایش یافته و باعث کاهش عملکرد میتوکندری و افزایش

### بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعات مختلفی، اثر سمیت نانوذرات طلا بر سلول‌های سالم و سرطانی مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج محققین نشان می‌دهد که مکانیسم سمیت این نانوذرات از طریق تولید

با جرم مولکولی کم و نانوذرات طلا با پوشش چیتوزان با همین سایز و با جرم مولکولی زیاد بر روی سلول‌های THP-1 مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه‌ی مذکور، سلول‌ها در معرض نانوذرات طلا با پوشش سیترات سدیم با محدوده‌ی غلظت  $(0.8 - 3.2 \mu\text{g/ml})$  قرار گرفتند که درصد زنده ماندن سلول‌ها پس از ۴۸h تقریباً در محدوده‌ی ۱۱۵درصد-۱۰۵درصد بود. همچنین سلول‌ها در معرض نانوذرات طلا با پوشش چیتوزان با جرم مولکولی کم و نانوذرات طلا با پوشش چیتوزان با همین سایز و با جرم مولکولی زیاد با محدوده‌ی غلظت  $(0.6 \mu\text{g/ml} - 2.5)$  قرار گرفتند که در نتیجه‌ی آن مقدار درصد زنده ماندن سلول‌ها به ترتیب برابر با ۴۰درصد-۴۵درصد و ۴۵درصد-۹۸درصد به دست آمد. ما در این تحقیق، مقدار درصد زنده ماندن سلول‌های Y79 در معرض نانوذرات طلای سنتز شده با چیتوزان با جرم مولکولی متوسط با بار مثبت، در محدوده‌ی غلظت  $(1/69 - 28 \mu\text{g/ml})$  انجام شد که برای مقایسه‌ی نتایج درصد زنده ماندن سلول‌ها در محدوده‌ی غلظت مشابه از مطالعه‌ی مذکور با این مقاله، درصد زنده ماندن سلول‌ها در محدوده‌ی غلظت تقریباً مشابه این مقاله  $(3/5 - 1/69 \mu\text{g/ml})$  بعد از ۴۸ ساعت با استفاده از ارزیابی تست MTT به ترتیب برابر با ۵۳درصد-۹۵درصد بوده است، می‌توان گفت نتایج محدوده‌ی غلظت این تحقیق با مطالعه‌ی مذکور تقریباً موافقت دارد، البته قابل ذکر است که در این تحقیق رده سلولی متفاوت بوده و نانوذرات طلا با چیتوزان با جرم مولکولی متوسط سنتز شده است. ترکیب نانوتکنولوژی و بیولوژی به ما فرصت فوق‌العاده‌ای در جهت بهبود تشخیص و ارائه طرح‌های درمان سرطان می‌دهد. با این حال، چالش‌های زیادی نیز وجود دارد. اگر چه استفاده از نانوذرات می‌تواند در علم پزشکی مفید باشد، اما ممکن است، عوارض جانبی سمیتی هم داشته باشند. نانوذرات، به‌ویژه آن‌هایی که از اجزای غیر بیولوژیکی، غیر قابل تجزیه هستند، می‌توانند التهاب ایجاد کنند و واکنش‌های ایمنی را تحت تأثیر قرار دهند [۳۰]. در این مطالعه، سمیت غلظت‌های مختلف نانوذرات طلا با قطر میانگین در حدود  $60 \text{nm}$  بر روی سلول‌های سرطانی Y79 پس از گذشت حدود ۴۸ ساعت با استفاده از تست MTT بررسی شد و مشخص گردید که غلظت  $1/69 \mu\text{g/ml}$  را می‌توان برای انجام آزمایشات انتخاب کرد، زیرا اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل ندارد. در این غلظت مقدار درصد سلول‌های زنده نسبت به گروه کنترل (سلول بدون نانوذرات طلا) برابر با ۹۵درصد می‌باشد که کم‌ترین اثر سمیت را دارد. این غلظت می‌تواند منجر به پیشنهاد تجویز دوز کم نانوذرات طلا در درمان تومورهای سرطانی شود که نقش کلیدی و مهمی در کاهش عوارض جانبی دارد. در این مطالعه آماده‌سازی و سنتز نانوذرات طلا با استفاده

مرگ سلولی می‌شود. نانوذرات به دلیل اندازه‌های کوچک و عروق خونی داخل تومور، می‌توانند در بافت‌های تومور تجمع کنند. لذا انتخاب غلظت بهینه نانوذرات ضروری است، زیرا مقدار بیش‌تر نانوذرات باعث سمیت بیش‌تری نسبت به بدن انسان می‌شود. بدین جهت، در این مطالعه سعی بر این بود که با انتخاب غلظت بهینه نانوذرات طلا در آزمایشات *in vitro*، دوز بهینه در آزمایشات *in vivo* در درمان تومور رتینوبلاستوما حاصل شود. بر اساس مشاهدات و نتایج مطالعه‌ی سانگ و همکارانش [۲۲] نشان داده شد که سلول‌های HeLa و MCF-7 نانوذرات  $57 \text{nm}$  را بیش از نانوذرات  $84 \text{nm}$  جذب می‌کنند. این نتیجه تقریباً با نتایج مطالعات Chithrani و همکارانش [۲۳] هم‌خوانی دارد که نشان می‌داد  $50 \text{nm}$  انتخاب خوبی برای نانوذرات طلا در درمان تومور است. بر اساس این نتایج، اندازه نانوذرات برای کاربردهای بیومدیكال تأثیر دارد، علاوه بر آن مطالعه‌ای که توسط سانگ و همکارانش [۲۲] انجام شد، نشان داد که جذب سلولی نانوذرات طلا برای سلول‌های MCF-7 تقریباً ۱۰ برابر بیش‌تر از سلول‌های HeLa است. برخی مطالعات نشان داده‌اند که استفاده از نانوذرات طلا برای درمان سلول‌های سرطانی، تأثیری بر روی سلول‌های طبیعی ندارد [۱۵، ۲۴]. در مطالعه‌ای، جو و همکارانش [۲۵] نشان دادند که اگر اندازه و غلظت نانوذرات طلا مناسب باشد، بر روی سلول اثر سمیت ندارد. آن‌ها نشان دادند که استفاده از نانوذرات میله‌ای طلا با اندازه  $10 \text{nm}$  نانومتر اثر سمیتی بر روی سلول ندارد و با جذب نور لیزر، سلول‌های سرطانی را گرم کرده و از بین می‌برند [۲۶]. هم‌چنین در یک مطالعه، سلول‌های HeLa و T3/NIH3 به مدت  $h3$  در معرض نانوذرات طلا با ابعاد  $20 \text{nm}$  قرار گرفتند که به ترتیب موجب مرگ سلول‌ها به مقدار ۲۰درصد و ۵درصد شدند [۲۷]. در مطالعه دیگری نیز سلول‌های ماکروفاژ در معرض نانوذرات طلا با محدوده اندازه  $100 - 10 \mu\text{m}$  برای  $24 - 72 \text{h}$  قرار گرفتند، این مطالعه نشان داد که  $72 \text{h}$  قرار گرفتن سلول‌ها در معرض نانوذرات  $100 \mu\text{m}$ ، میزان زنده ماندن سلول‌ها را تا ۸۵درصد کاهش می‌دهد [۱۵]. Martinerz-Torres و همکارانش [۲۸] در سال ۲۰۱۸ دریافتند که نانوذرات طلای سنتز شده با چیتوزان (بار مثبت) دارای اثر سمیت بیش‌تری نسبت به نانوذرات طلای سنتز شده با سیترات سدیم (بار منفی) با اندازه‌ی یکسان و رده سلولی مشابه و غلظت برابر می‌باشند، این اثر، به میزان میل و جذب بارهای مثبت نانوذرات طلا با بار منفی غشای سلول سرطانی مرتبط است. هم‌چنین می‌توان به مطالعه‌ی Boyles و همکارانش در سال ۲۰۱۵ اشاره کرد [۲۹]، که در آن مطالعه، اثر سمیت نانوذرات طلا با قطر تقریبی  $10 \text{nm}$  و پوشش سیترات سدیم و نانوذرات طلا با پوشش چیتوزان با قطر تقریبی  $7 \text{nm}$  و



صورتی که در گروه کنترل تومور رتینوبلاستوما، بدون تزریق نانوذرات طلا، حجم تومور به  $1/58$  برابر حجم اولیه می‌رسد. پس از گذشت ۶ و ۹ هفته، ابعاد نسبی تومور چشمی رتینوبلاستوما در گروه کنترل، به ترتیب  $1/83$  و  $2/05$  برابر روز صفرم می‌شود. در مقایسه، پس از گذشت ۶ و ۹ هفته، ابعاد نسبی تومور در گروه با تزریق نانوذرات طلا به ترتیب  $0/50$  و  $0/59$  برابر نسبت به روز صفر شده است. مطالعه بافت‌شناسی نشان داد، تزریق نانوذرات طلا در چشم خرگوش، هیچ‌گونه التهاب و سمیتی برای سلول‌های طبیعی و سالم و شبکه چشم خرگوش ایجاد نکرد و بینایی همه خرگوش‌های پس از دوره بررسی حفظ شد.

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد تجویز نانوذرات طلا با دوز ایمن در مطالعه *in vitro* می‌تواند در شرایط *in vivo* آثار ضد سرطانی داشته باشد. در واقع می‌توان از نانوذرات طلا به‌عنوان عامل همیار در روش‌های درمانی معمول دیگر استفاده کرد. در این مطالعه، نقش موثر نانوذرات طلا همراه با درمان‌های ترکیبی دیگر به‌عنوان عامل موثر در مرگ سلول‌های سرطان رتینوبلاستوما و بهبود روند درمان پیشنهاد می‌شود.

### تشکر و قدردانی

این تحقیق قسمتی از رساله دکتری رشته فیزیک پزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس است. نویسندگان مقاله از حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس در جهت انجام این مطالعه، پرسنل پژوهشکده کاربرد پرتوها و مرکز تحقیقات چشم بیمارستان فارابی و دپارتمان پاتولوژی بیمارستان فارابی و خانم آتنا نظام‌آبادی کمال تشکر و قدردانی را دارند.

### منابع

- [1] Castillo BV, Kaufman L. Pediatric tumors of the eye and orbit. *Pediatr Clin North Am* 2003; 50: 149-172.
- [2] Shields CL, Shields JA. Diagnosis and management of retinoblastoma. *Cancer Control* 2004; 11: 317-324.
- [3] Thampi S, Hets SW, Cooke DL, Stewart PJ, Robbins E, Banerjee A, Dubois SG, Char D, Halbach V, Matthy K. Supersensitive intra-arterial melphalan therapy for newly diagnosed and refractory retinoblastoma: results from a single institution. *Clin Ophthalmol* 2013; 7: 981-989.
- [4] Anubhav C, Shashi DS. Chemotherapy in retinoblastoma. *Int J Therap Rehabil Res* 2016; 5: 55-60.
- [5] Kooshafar Z, Salimi M., Javid A. Evaluating antitumor effect of a novel hydrazide derivative in mammalian mice model. *Koomesh*, 2018; 20 (3): 582- 587.
- [6] Sarkar A, Ghosh M, Sil PC. Nanotoxicity: Oxidative stress mediated toxicity of metal and metal oxide nanoparticles. *J Nanosci Nanotechnol* 2014; 14: 730-743.
- [7] Omidi M, Yadegari A, Zali H, Hashemi M, Hasanazadeh H. Cancer cell detection using electrochemical nano biosensor based on graphene/ gold nanoparticle. *Koomesh* 2016; 18: 211- 219.
- [8] Rothen-Rutishauser B, Mühlfeld C, Blank F, Musso C, Gehr P. Translocation of particles and inflammatory responses after exposure to fine particles and nanoparticles in an epithelial airway model. *Part Fibre Toxicol* 2007; 4: 9-18.

از چیتوزان انجام شد و برای ارزیابی سمیت نانوذرات در سلول‌های رتینوبلاستوما در آزمایشات برون‌تنی، تکنیک‌های مختلفی از قبیل تست MTT و رنگ‌آمیزی H&E مورد استفاده قرار گرفت. در مطالعات مربوط به سمیت نانوذرات طلا در آزمایشات درون‌تنی که انجام شده است، اغلب اندام‌های بدن در معرض نانوذرات طلا قرار گرفته‌اند. نتایج این مطالعات گزارش‌هایی از آپوپتوز و التهاب حاد در کبد، تجمع نانوذرات در اندام‌ها را به همراه داشت. در یک مطالعه‌ی آزمایش درون‌تنی برای مشاهده سمیت در کبد از نانوذرات طلا با ابعاد  $13\text{nm}$  با پوشش PEG استفاده شد. نتایج نشان داد که ۷ روز پس از تزریق، نانوذرات در کبد و طحال انباشته و موجب آپوپتوز و التهاب در کبد شدند [۳۱]. در مطالعه‌ی دیگری، نانوذرات طلا با ابعاد  $3-100\text{nm}$  به موش Balb/C با دوز  $8\text{mg/kg}$  از وزن حیوان در هفته به صورت داخل صفاقی تزریق شد. نانوذرات طلا با ابعاد  $5$ ،  $50$  و  $100$  نانومتر اثرات مضر نشان ندادند؛ با این حال، نانوذرات طلا با ابعاد  $8\text{nm}$  تا  $37\text{nm}$  موجب بیماری شدید در موش شد که اکثریت موش‌ها در این گروه‌ها در طی ۲۱ روز از بین رفتند. با این حال، تزریق نانوذرات طلا با ابعاد  $3\text{nm}$  و  $5\text{nm}$ ، در موش‌ها بیماری یا مرگ را ایجاد نکرد [۳۲]. کوماتسو و همکارانش [۳۳] نشان دادند که سرکوب و مهار رشد تومور ملانوما در موش‌ها با نانوذرات طلا به ابعاد  $15\text{nm}$  به‌تنهایی میسر نمی‌شود. فقط اگر تومور در مرحله اولیه باشد، می‌توان رشد تومور را با نانوذرات طلا کنترل کرد و در مورد تومورهای بزرگ‌تر استفاده از نانوذرات به‌تنهایی نمی‌تواند رشد تومور را مهار کند. در این حالت می‌توان از نانوذرات طلا به‌عنوان حساس‌کننده پرتویی تومور استفاده کرد. در اکثر مطالعات از نانوذرات طلا به‌تنهایی در درمان تومورهای سرطانی استفاده نمی‌شود و بیش‌تر به‌صورت عامل هم‌یاری با روش‌های درمانی مختلف از نانوذرات طلا استفاده می‌شود. در این مطالعه، آثار سمیت نانوذرات طلا در مقایسه با گروه کنترل روی سلول‌های تومور رتینوبلاستوما مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش، در قسمت آزمایش درون‌تنی، با استفاده از آنالیز هیستوشیمی و رنگ‌آمیزی H&E و تصویربرداری فراصوتی  $40$  مگاهرتز و پردازش تصاویر متوالی فراصوتی و استخراج سطح مقطع تومور در هفته‌های  $3$ ،  $6$  و  $9$  نسبت به روز صفر با استفاده از نرم‌افزار Image J، نشان داد که تزریق نانوذرات طلا در داخل چشم خرگوش دارای رتینوبلاستوما موجب از بین رفتن سلول‌های رتینوبلاستوما در داخل و پرتره و هم‌چنین کاهش سطح مقطع تومور می‌شود. به‌طوری‌که بعد از سه هفته از تزریق نانوذرات طلا، در گروه رتینوبلاستوما همراه با تزریق نانوذرات طلا، سطح مقطع تومور به  $0/69$  سطح اولیه کاهش می‌یابد، در



- [24] Chen H, Dorrigan A, Saad S, Hare DJ, Cortie MB, Valenzuela SM. In vivo study of spherical gold nanoparticles: Inflammatory effects and distribution in mice. *PLOS ONE* 2013; 8: e58208.
- [25] Cho WK, Kang S, Choi H, Rho CR. Topically administered gold nanoparticles inhibit experimental corneal neovascularization in mice. *Cornea* 2015; 34: 456-459.
- [26] Hao K, Yan Z, Shuang Y, Sun J, Tao S, Fu W. Association between interferon gamma 13-CA-repeats polymorphism and metastasis of nasopharyngeal carcinoma in a population of Northern China. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8: 7409-7414.
- [27] Tkachenko AG, Xie H, Liu Y, Coleman D, Ryan J, Glomm WR, Shipton MK, Franzen S, Feldheim DL. Cellular trajectories of peptide-modified gold particle complexes: Comparison of nuclear localization signals and peptide transduction domains. *Bioconjug Chem* 2004; 15: 482-490.
- [28] Martínez-Torres AC, GZarate-Triviño D, Lorenzo-Anota HY, Ávila-Ávila A, Rodríguez-Abrego C, Rodríguez-Padilla C. Chitosan gold nanoparticles induce cell death in HeLa and MCF-7 cells through reactive oxygen species production. *International Journal of Nanomedicine*, 2018; 13: 3235-3250.
- [29] Boyles M, Kristl T, Andosch A, Zimmermann M, Tran N, Casals E, Himly M, Puentes V, Huber C, Lutz-Meindl U, Duschl A. Chitosan functionalisation of gold nanoparticles encourages particle uptake and induces cytotoxicity and pro-inflammatory conditions in phagocytic cells, as well as enhancing particle interactions with serum components. *J Nanobiotechnol* 2015; 13: 1-20.
- [30] Jong WHD, Borm PJA. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *Int J Nanomed* 2008; 3: 133-149.
- [31] Cho WS, Cho M, Jeong J, Choi M, Cho HY, Han BS, Kim SH, Kim HO, Lim YT, Chung BH, Jeong J. Acute toxicity and pharmacokinetics of 13 nm-sized PEG-coated gold nanoparticles. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 236: 16-24.
- [32] Chen YS, Hung YC, Liau I, Huang GS. Assessment of the in vivo toxicity of gold nanoparticles. *Nanoscal Res Lett* 2009; 4: 858-864.
- [33] Komatsu T, Nakamura K, Okuura Y, Konishi K. Optimal method of gold nanoparticle administration in melanoma-bearing mice. *Exp Therap Med* 2018; 15: 2994-2999.
- [9] Keun SO, Ree SK, Jinho L, Dongmin K, Sun HC, Soon HY. Gold/chitosan/pluronic composite nanoparticles for drug delivery. *J Appl Polym Sci* 2008; 108: 3239-3244.
- [10] Amanda JH, Lei C, William LK, Richard PVD. Detection of a biomarker for Alzheimer's disease from synthetic and clinical samples using a nanoscale optical biosensor. *J Am Chem Soc* 2005; 127: 2264-2271.
- [11] Hongwei L, Colleen LN, Jason HH. Biomedical applications of plasma on resonant metal nanoparticles. *Nanomedicine* 2006; 1: 201-208.
- [12] Fayaz AM, Balaji K, Girilal M, Kalaichelvan PT, Venkatesan RM. Synthesis of silver nanoparticles and their incorporation into sodium alginate films for vegetable and fruit preservation. *J Agric Food Chem* 2009; 57: 6246-6252.
- [13] Service RF. Nanotoxicology: Nanotechnology grows up. *Science* 2004; 304: 1732-1734.
- [14] Ghosh P, Han G, De M, Kim CH, Rotello VM. Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; 60:1307-1315.
- [15] Shukla R, Bansal V, Chaudhary M, Basu A, Bhonde RR, Sastry M. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview. *Langmuir* 2005; 8: 10644-10654.
- [16] Yamanaka YJ, Leong KW. Engineering strategies to enhance nanoparticle mediated oral delivery. *J Biomater Sci Polym Ed* 2008;19:1549-70.
- [17] Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, Hofmann MC. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germ line stem cells. *Toxic Sci* 2005; 88: 412-419.
- [18] Wei D, Qian W. Facile synthesis of Ag and Au nanoparticles utilizing chitosan as a mediator agent. *Coll Sur B: Biointerfaces* 2008; 62: 136-142.
- [19] Shokrzadeh M, Zalzar Z, Ebrahimnejad P. Preparation, characterization and in vitro cytotoxicity evaluation of docetaxel nanoparticles against A549 cell line. *Koomesh. Spring* 2019; 21 (2): 340-346.
- [20] Kang SJ, Grossniklaus HE. Rabbit model of retinoblastoma. *J Biomed Biotechnol* 2011; 394730: 1-6.
- [21] Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic potential of materials at the nano-level. *Science* 2006; 311: 622-627.
- [22] Song K, Xu P, Meng Y, Geng F, Li J, Li Z, Xing J, Chen J. Smart gold nanoparticles enhance killing effect on cancer cells. *Int J Oncol* 2013; 42: 597-608.
- [23] Chithrani BD, Chan WC. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. *Nano Lett* 2007; 7: 1542-1550.

## Cytotoxicity effect of gold nanoparticles against a rabbit model of retinoblastoma

Somayeh Moradi (Ph.D Student)<sup>1</sup>, Manijhe Mokhtari-Dizaji (Ph.D)<sup>\*1</sup>, Fariba Ghassemi (Ph.D)<sup>2</sup>, Shahab Sheibani (Ph.D)<sup>3</sup>, Fahimeh Asadi Amoli (Ph.D)<sup>4</sup>

1- Department of Medical Physics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Eye Research Center, Farabi Eye Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Radiation Application Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Tehran, Iran

4- Department of Pathology, Eye Research Center, Farabi Eye Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

\* Corresponding author. +98 21-82883893 mokhtarm@modares.ac.ir

Received: ; Accepted:

**Introduction:** Retinoblastoma is a malignant tumor in children. The goal of retinoblastoma treatment is to maintain vision and minimize side effects. In this study, the toxicity of the gold nanoparticle safety in vitro was investigated on an eye tumor of retinoblastoma under in vivo conditions.

**Materials and Methods:** For the evaluation of the toxicity of gold nanoparticles using MTT test after 48 hours in a CO<sub>2</sub> incubator at 37 ° C, Y79 cell line was administered under in vitro conditions at concentrations of 1.69, 1.75, 3.5, 7, 14 and 28 µg/ml of gold nanoparticles. Safe dose in vitro was extracted. The toxicity of gold nanoparticles in the treatment of retinoblastoma tumor under in vivo conditions in a rabbit animal model using histochemistry analysis and hemoxin-eosin staining, as well as measuring the cross-sectional area of the tumor using ultrasonic sequential image analysis and extraction using software Image J was studied.

**Results:** The results showed that with increasing the concentration of gold nanoparticles, the percentage of live cells in comparison with the control group had a significant difference ( $p < 0.05$ ) at concentrations greater than 1.69 µg/ml and no significant difference ( $p > 0.05$ ) in the concentration of 1.69 µg/ml. The results indicated that the injection of gold nanoparticles into the rabbit's eye, with retinoblastoma tumor reduced the size of tumor in the rabbit's eye.

**Conclusion:** It is concluded that the toxicity of gold nanoparticles has a therapeutic effect on Y79 cell line in vitro and in the eye of retinoblastoma tumors in vivo.

**Keywords:** Gold nanoparticles, Y79 cell line, Retinoblastoma, Eye Neoplasms, Rabbit.