

Radiosensitization effect of PEGylated Gold Nanoparticles in Orthovoltage X-ray Irradiation of the MCF-7 Cancerous Cell Line

Karim Khoshgard¹, Bijan Hashemi^{2*}, Azim Arbabi³, Mohammad Javad Rasaei⁴, Masoud Soleimani⁵

- 1- Ph.D. Candidate, Department of Medical Physics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 2- Associated Professor, Department of Medical Physics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 3- Professor, Department of Radiotherapy, Imam Hossein Hospital, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
- 4- Professor, Department of Medical Biothecnology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
- 5- Associated Professor, Department of Hematology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Medical Physics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: bhashemi@modares.ac.ir

Received: 13/May/2012, Accepted: 24/Sep/2012

Abstract

Objective: Due to recent advances in nanotechnology it is now possible to accumulate high atomic-number nanomaterial such as gold nanoparticles (GNPs) in cancerous cells and take advantage of their absorbed dose enhancement property as radiosensitizing agents. This study aimed to investigate the absorbed dose enhancement factor due to the presence of PEGylated GNPs under the irradiation of an MCF-7 cancerous cell line using orthovoltage X-ray beams.

Methods: We synthesized GNPs with an average diameter of 47 nm and joined them to polyethylene glycol. A total of 50 µg/mL of the pegylated GNPs were incubated with MCF-7 cells for 1, 2, 6, 12, and 24 hours, after which we compared their cytotoxicities. Then, PEGylated GNPs (50µg/mL) were incubated with MCF-7 cells for 12 and 24 hours and their radiosensitizing effect during 2Gy delivery of 120, 180 and 200 kVp X-ray beams were compared by the MTT assay.

Results: Cytotoxicity studies showed no significant effect of GNPs on cell viability. Significant differences in cell survival were observed between the groups irradiated with and without GNPs, which lead to an average absorbed dose enhancement factor of 1.22 ± 0.06 . According to the results, there was no radiosensitization difference due to the usage of 120, 180 and 200 kVp X-ray beams. However increased incubation time increased the dose enhancement factor.

Conclusion: By using PEGylated GNPs we can decrease the prescribed X-ray dose, yet maintain the same level of cancerous cell killing.

Keywords: Radiosensitization, Gold, Irradiation, Polyethylene glycol

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 15, No 3, Autumn 2012, Pages: 11-22

اثر حساس‌کنندگی نانوذرات طلای پگ‌دار شده در پرتودهی سلول‌های سرطانی ردهٔ MCF-7 با استفاده از پرتوی ایکس ارتوولتاژ

کریم خوش‌گرد^۱، بیژن هاشمی^{۲*}، عظیم اربابی^۳، محمدجواد رسایی^۴، مسعود سلیمانی^۵

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- دانشیار، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۳- استاد، گروه رادیوتراپی، مرکز پزشکی آموزشی درمانی امام حسین (ع)، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۴- استاد، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۵- دانشیار، گروه هماتولوژی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه فیزیک پزشکی
Email: bhashemi@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۱/۰۷/۰۳

دریافت مقاله: ۹۱/۰۲/۲۴

چکیده

هدف: در اثر پیشرفت‌های اخیر در فناوری نانو، می‌توان نانومواد با عدد اتمی بالا نظیر نانوذرات طلا، را در سلول‌های سرطانی متمرکز کرد و از خصوصیت افزایش دز جذبی آن‌ها به عنوان حساس‌کنندهٔ پرتویی بهره گرفت. هدف از این مطالعه بررسی ضریب افزایش دز جذبی در حضور نانوذرات طلای پگ‌دار شده در پرتودهی سلول‌های سرطانی ردهٔ MCF-7 با استفاده از پرتوی ایکس ارتوولتاژ بوده است.

مواد و روش‌ها: نانوذرات طلا با قطر میانگین ۴۷ نانومتر سنتز و به مولکول پلی‌اتیلن گلیکول متصل شد. ۵۰ میکروگرم به ازای هر میلی‌لیتر از نانوذرات طلای پگ‌دار شده در دوره‌های زمانی مختلف ۱، ۲، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت با سلول‌های MCF-7 انکوبه و میزان سمیت‌زایی آن‌ها مقایسه شد. سپس نانوذرات طلای پگ‌دار شده با غلظت ۵۰ میکروگرم به ازای هر میلی‌لیتر به مدت زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت با این سلول‌ها انکوبه شد و میزان حساس‌کنندگی پرتویی آن‌ها طی اعمال ۲ گری با باریک‌های پرتوی ایکس ۱۲۰، ۱۸۰ و ۲۰۰ کیلو ولت پیک و با استفاده از روش MTT ارزیابی شد.

نتایج: مطالعات سمیت‌زایی نشان داد که نانوذرات طلا اثر سمیتی معنی‌داری بر زیست‌پذیری سلولی ندارد؛ اما اختلاف معنی‌داری در میزان بقای سلول‌ها در گروه‌های تابش‌دهی شده در حضور و عدم حضور نانوذرات طلا مشاهده شد به طوری که میانگین ضریب افزایش دز جذبی برابر $1/22 \pm 0/06$ به دست آمد. همچنین نتایج نشان داد تفاوت معنی‌داری بین استفاده از باریک‌های پرتوی ایکس ۱۲۰، ۱۸۰ و ۲۰۰ کیلو ولت پیک در ایجاد حساس‌کنندگی پرتویی وجود ندارد اما افزایش مدت زمان انکوباسیون می‌تواند ضریب افزایش دز را بهبود بخشد. نتیجه‌گیری: با به‌کارگیری نانوذرات طلا، می‌توان با کاهش دز تجویزی، اثر کشندگی مشابهی را در سلول‌های سرطانی به دست آورد.

کلیدواژگان: حساس‌کنندگی پرتویی، طلا، پرتودهی، پلی‌اتیلن گلیکول

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۵، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱، صفحات: ۱۱-۲۲

سرطان سومین عامل اصلی مرگ در ایران است و حدود ۲۲ درصد از کل موارد گزارش شده سرطان در ایران را سرطان پستان تشکیل می‌دهد [۱]. بیش از نیمی از بیماران مبتلا به سرطان طی مراحل درمانی تحت درمان با تابش یونیزان قرار می‌گیرند [۲]. در پرتودرمانی خارجی هر دو گروه بافت‌های سالم و بدخیم تحت تابش قرار می‌گیرند و با وجود تلاش‌ها و پیشرفت‌های زیادی که در راستای افزایش بازدهی درمان و کاهش دز بافت‌های سالم در پرتودرمانی در طول چند دهه اخیر انجام گرفته است، آثار جانبی ناشی از تابش یونیزان همچنان به عنوان یک عامل محدود کننده دز تابشی باقی مانده است. همچنین ثابت شده است که افزایش دز فقط در سلول‌های سرطانی، درمان سرطان را به‌طور معنی‌داری بهبود خواهد بخشید [۲، ۳]. یکی از راه‌کارها برای افزایش دز در سلول‌های سرطانی بدون تجاوز از حد دز قابل تحمل اندام‌های در معرض خطر، استفاده از حساس‌کننده‌های پرتوی در سلول‌های سرطانی است. تا به امروز چند ماده شیمیایی به عنوان حساس‌کننده پرتوی از قبیل پرمیدین‌های هالوژندار (Halogen Pyrimidines) مثل یدودئوکسی یوریدین (Iododeoxyuridine) و حساس‌کننده سلول‌های هیپوکسیک (Hypoxic Cells) مانند میزونیدازول (Misonidazole) معرفی شده‌است و برخی دیگر نیز تحت آزمایش‌های بالینی قرار دارد [۴، ۵]؛ اما استفاده گسترده از آنها مورد بحث است. افزایش دز موضعی حاصل از مواد با عدد اتمی بالا نیز مدت زمان زیادی است که شناخته شده است [۶]. نخستین مشاهده بالینی از حساس‌کننده پرتوی مربوط به آثار سوختگی و نکروزه شدن در نواحی نزدیک به صفحات فلزی در حین پرتودرمانی است [۷]. امروزه با پیشرفت فناوری نانو امکان بهره‌مندی از ویژگی افزایش دز مواد با عدد اتمی بالا به واسطه تجمع نانوذراتی مانند نانوذرات طلا در تومورها فراهم آمده است. طلا به علت دارا بودن خصوصیت زیست‌سازگاری (Biocompatibility) و بی‌اثری از لحاظ شیمیایی (Chemical

حساس‌کنندگی پرتویی نانوذرات طلا با پرتوهای ایکس ارتولتاژ

(Inertness) گزینه مناسبی برای این منظور است [۸، ۹]. در تابش پرتو فوتونی به ماده احتمال رخداد فرآیند فوتوالکتریک که فرآیند اصلی جذب انرژی است وابستگی شدیدی (متناسب با توان سوم عدد اتمی) به عدد اتمی ماده جاذب دارد؛ با یک مقایسه یک به یک میزان نسبی احتمال اثر فوتوالکتریک در هدف طلا (با عدد اتمی ۷۹) ۱۲۱۷ مرتبه بیشتر از بافت نرم (با عدد اتمی ۷/۴) در یک انرژی معین مثلاً برابر با لبه k طلا (۸۰/۷ کیلو الکترون ولت) است. در برخورد فوتون‌های ارتولتاژ با نانوذرات طلا، فوتوالکتریک‌ها، الکترون‌های اوژه (Auger Electrons) و الکترون‌های ثانویه‌ای با انرژی کمتر تولید می‌شود که در اثر این فرایندها انرژی فرودی کاهش و واگذاری انرژی انجام می‌گیرد. ذرات ثانویه می‌تواند به‌طور بسیار مؤثری منجر به شکست‌های رشته DNA حتی در انرژی‌های کمتر از ۱۵ الکترون ولت شود [۱۰]. همچنین این الکترون‌ها می‌تواند با مولکول‌های آب برهمکنش کرده و رادیکال‌های آزاد را تولید نماید؛ به‌طوری که نانوذرات طلا را می‌توان به عنوان چشمه‌های رادیکال هیدروکسیل به‌شمار آورد [۱۱]. بنابراین انتظار می‌رود که حضور نانوذرات طلا به همراه پرتودرمانی ارتولتاژ منجر به افزایش احتمال برهمکنش‌های فوتوالکتریک و در نتیجه افزایش دز جذبی و در نهایت افزایش آسیب در سلول‌های سرطانی شود. نخستین مطالعه درون‌تنی (In Vivo) درباره حساس‌کنندگی پرتویی نانوذرات طلا در سال ۲۰۰۴ انجام شد [۱۲]. در این مطالعه به موش‌های دارای تومورهای زیرجلدی، غلظت مشخصی از نانوذرات طلا با قطر ۱/۹ نانومتر به‌صورت درون رگی تزریق شد و سپس آنها را تحت پرتودرمانی با پرتوی ایکس ۲۵۰ کیلو ولت پیک قرار دادند؛ پارامتر بقا در یک سال در گروه تابش به همراه تزریق، برابر ۸۶ درصد در مقابل ۲۰ درصد در گروه تابش تنها به‌دست آمد. در ادامه، این اثر در مطالعات برون‌تنی (In Vitro) و در تابش‌دهی‌های سلول‌ها و DNA پلاسمیدی مشاهده شده است. برای مثال باترورث (Butterworth) و همکارانش ضریب افزایشی برابر ۲/۲۹ و ۱/۲۵

مواد و روش‌ها

سنتز نانوذرات طلا

برای سنتز نانوذرات طلا از روش احیا به روش تورکوویچ (Turkevich) استفاده شد [۱۷]. در این روش از احیا توسط ماده سدیم سیترات استفاده می‌شود. در سنتز نانوذرات طلا با استفاده از این روش و برای تهیه ۱۰۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون نانوذرات طلا، ابتدا محلول ۰/۰۱ درصد از تتراکلروایوریک اسید ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (Sigma، آلمان) در آب ۴ بار تقطیر به صورت تازه تهیه شد. همچنین یک میلی‌لیتر محلول تری سدیم سیترات ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) (Merck، آلمان) با غلظت یک درصد به عنوان محلول کاهنده و به صورت تازه آماده شد. محلول طلا در ظرف مناسب حرارت داده شد. در این مرحله محلول به طور همزمان با آهن ربای میله‌ای (مگنت) مناسب با سرعت بالا و به صورت یکنواخت همزده شد تا به آستانه جوش برسد. سپس محلول کاهنده به آهستگی و به صورت قطره قطره به آن اضافه شد و اجازه داده شد تا محلول نهایی در هوای آزاد خنک شود. در مرحله بعد به میزان ۰/۰۵ درصد وزنی، ماده پلی‌اتیلن گلیکول (Polyethyleneglycol، Merck، آلمان) با وزن مولکولی ۲ کیلودالتون برای پایدارسازی به محلول در حال همزدن اضافه شد. برای دستیابی به نانوذرات طلای با قطر حدود ۵۰ نانومتر بر مبنای آزمایش‌های قبلی، حجم مشخص اشاره شده از احیا کننده استفاده شد. برای بررسی اندازه و نیز شکل ظاهری نانوذرات طلای سنتز شده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری (Transmission Electron Microscopy: TEM) مدل LEO ۹۰۶ با ولتاژ تیوب ۱۰۰ کیلو ولت ساخت کشور آلمان استفاده شد. همچنین تجزیه و تحلیل توزیع اندازه نانوذرات به کمک نرم‌افزار Image Tool انجام شد.

کشت سلول‌های سرطانی رده MCF-7

سلول‌های سرطان پستان رده MCF-7 از انستیتو پاستور

در شکست‌های تک رشته‌ای و دو رشته‌ای DNA پلاسمیدی بعد از تابش در حضور نانوذرات طلای ۵ نانومتری را گزارش کردند [۱۳]. رحمان (Rahman) و همکارانش عامل افزایش دز زیستی تا حدود ۲۴/۶ را در تابش‌دهی سلول‌های اندوتلیال (Endothelial Cells) آئورتی با فوتون‌های ۸۰ کیلو ولت پیک در حضور نانوذرات طلای ۱/۹ نانومتر نشان دادند [۱۴]. این نتایج و نتایج برخی از مطالعات دیگر دورنمای جالبی را در پرتودرمانی ایجاد نموده است؛ اما به علت شرایط مختلف مطالعات انجام شده توافق نظر کلی برای کاربری بالینی به دست نیامده است. میزان حساس‌کنندگی نانوذرات طلا به عوامل مختلفی از قبیل انرژی تابش‌دهی، اندازه و غلظت نانوذرات طلا و میزان تجمع این ذرات در سلول‌های هدف بستگی دارد [۱۳-۱۵]. مطالعات تجربی بسیار محدودی وجود دارد که به بررسی عامل انرژی پرداخته است. برای مثال در مطالعه‌ای برون‌تنی تابش‌دهی با پرتوهای ۲۰۰ کیلو ولت پیک و گامای سزیم-۱۳۷ و کبالت-۶۰ در حضور نانوذرات طلای پوشانده شده با گلوکز و سیستامین با قطر ۱۰/۸ نانومتر نشان داد که بیشترین میزان افزایش دز جذبی مربوط به پرتوهای ۲۰۰ کیلو ولت پیک است [۱۶]. در مطالعه دیگری نشان داده شده است که حساس‌کنندگی پرتویی با استفاده از نانوذرات طلای ۱/۹ نانومتری در پرتودرمانی با باریکه ارتولتاژ ۸۰ کیلو ولت پیک، بیش از ۶ مرتبه بیشتر از باریکه الکترونی با انرژی ۶ مگا الکترون ولتی است [۱۴]. هدف از مطالعه حاضر این بوده است که اثر حساس‌کنندگی پرتویی نانوذرات طلای پگ‌دار شده [PEG: Polyethyleneglycol] PEGylated Gold Nanoparticles در انرژی‌های ارتولتاژ پرتوهای ایکس که به‌طور معمول در پرتودرمانی ارتولتاژ استفاده می‌شوند، روی سلول‌های سرطانی پستانی رده MCF-7 با یکدیگر مقایسه شود. همچنین محققان در مطالعه حاضر تأثیر عامل مدت زمان انکوباسیون نانوذرات طلای پگ‌دار شده را در میزان حساس‌کنندگی پرتویی در انرژی‌های ارتولتاژ روی این سلول‌ها بررسی نمودند.

حساس‌کنندگی پرتویی نانوذرات طلا با پرتوهای ایکس ارتولتاژ

ایران تهیه شد. این سلول‌ها از نوع آدنوکارسینوما (Adenocarcinoma) بود و منشأ انسانی داشتند. سلول‌های سرطانی در محیط DMEM 1X] DMEM حاوی D-گلوکز ۴/۵ گرم در لیتر، گلوتاماکس (Glutamax)، HEPES، (4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonic Acid)، $[NaHCO_3]$ به اضافه ۱۰ درصد (Fetal Bovin Serum) FBS و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین (Penicillin/Streptomycin) (همه این مواد از شرکت Invitrogen-GIBCO، آلمان تهیه شد) و تحت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 کشت شدند. منحنی رشد سلول‌ها براساس شمارش سلول‌های زنده در ۱۰ روز متوالی رسم و زمان تقریبی لازم برای رسیدن سلول‌ها به فاز لگاریتمی به دست آمد. قبل از پاساژ دادن و همچنین انتقال به پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای، سلول‌ها در فلاسک T75 کشت شدند و هنگامی که بیش از ۷۰ درصد از کف فلاسک را پر کردند توسط تریپسین-EDTA (۲۵ Trypsin-EDTA درصد) (Invitrogen-GIBCO، آلمان) از کف ظرف جدا شدند و بعد از شمارش زیر میکروسکوپ نوری توسط لام نئوبار تعداد ۵۰۰۰ سلول به هر یک از خانه‌های پلیت انتقال داده شد.

تابش‌دهی و دزیمتری (Dosimetry) تابش

برای تابش‌دهی از دستگاه پرتودرمانی سطحی مدل

جدول ۱ پارامترهای تابش‌دهی با دستگاه پرتودرمانی ارتولتاژ

انرژی پتانسیل (کیلو ولت پیک)	فیلتراسیون افزوده (میلی متر)	مقدار لایه نیم‌کننده آلومینیوم (میلی متر)	انرژی معادل (کیلو الکترون ولت)	آهنگ دز (گری بر دقیقه)	دز اعمالی (گری)
۱۲۰	۴ Al	۳/۵۷	۳۸	۱/۸۲	۲
۱۸۰	۰/۲ Cu	۶/۴۲	۵۰	۳/۴۳	۲
۲۰۰	۰/۵ Cu	۹/۶۸	۶۶	۲/۶۷	۲

Shimadzu، ژاپن) با کوره گرافیتی استفاده شد. به این منظور سلول‌های مورد آزمون در پلیت‌های ۶ خانه‌ای کشت داده شدند و بعد از گذشت ۴۸ ساعت که سلول‌ها در فاز لگاریتمی

سنجش میزان جذب نانوذرات طلا توسط سلول‌ها

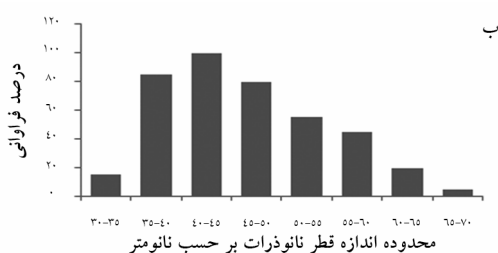
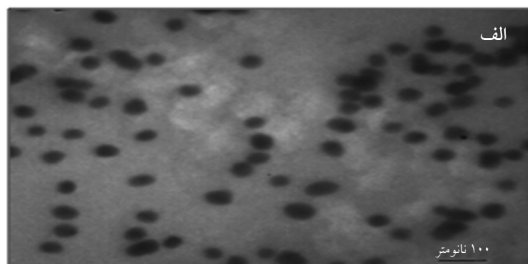
برای سنجش میزان جذب نانوذرات طلای پگ‌دار توسط سلول‌های مورد مطالعه از دستگاه جذب اتمی مدل AA-670G

انکوباسیون پلیت‌ها از چاهک‌ها برداشته شد و ۱۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکساید (Dimethyl Sulfoxide: DMSO) به هر چاهک اضافه شد و سپس جذب نوری در دستگاه قرائت‌گر الیزا (ELISA Reader) در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد.

نتایج

اندازه و شکل ظاهری نانوذرات طلا

بر اساس تصاویر TEM از نمونه‌ها نشان داده شد که نانوذرات سنتز شده تقریباً به شکل کروی است. همچنین تجزیه و تحلیل تصاویر با استفاده از نرم‌افزار Image Tool نشان داد که میانگین اندازه ذرات در حدود ۴۷ نانومتر (با احتساب دو انحراف معیار به‌طور دقیق‌تر برابر 46.7 ± 1.6 نانومتر) است. جزئیات بیشتر در شکل ۱ آمده است.



شکل ۱ الف) تصویر TEM از نمونه سنتز شده نانوذرات طلا، ب) نمایش درصد فراوانی نانوذرات طلا بر حسب محدوده اندازه قطر نانوذرات تجزیه و تحلیل شده با نرم‌افزار Image Tool

سنجش میزان جذب سلولی نانوذرات طلای پگ‌دار شده

نتایج حاصل از سنجش میزان جذب سلولی نانوذرات

از منحنی رشد قرار گرفتند انکوباسیون نانوذرات طلا به مدت ۶، ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شد. بعد از سپری شدن هر یک از این زمان‌ها و قبل از انجام آزمایش جذب اتمی، محیط کشت رویی هر یک از خانه‌ها خارج شد و دو مرتبه با محلول بافر نمکی فسفات (Phosphate Buffered Saline: PBS) شسته شد. سپس شمارش سلولی انجام شد و نمونه‌ها در هر گروه به‌صورت سه تایی و در حجم ۵۰ میکرولیتر آماده شد.

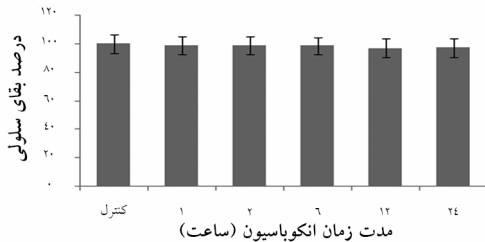
سنجش میزان حساس‌کنندگی پرتویی و سمیت‌زایی

نانوذرات طلا

میزان افزایش بهره‌ درمانی با پرتوهای فوتونی ارتوتلاژ در حضور نانوذرات طلای پگ‌دار و همچنین میزان سمیت‌زایی این نانوذرات روی سلول‌های MCF-7 با استفاده از روش سنجش MTT [3-(4, 5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazolium Bromide] انجام شد. سنجش MTT یک روش استاندارد رنگ‌سنجی است که میزان سلامت سلولی (رشد و تقسیم سلولی) را اندازه‌گیری می‌نماید. ماده MTT زرد رنگ است و در میتوکندری سلول‌های زنده به فورمازان (Formazan) بنفش رنگ احیا می‌شود. این واکنش احیا تنها زمانی رخ می‌دهد که آنزیم‌های ردوکتاز (از آنزیم‌های چرخه تنفسی در میتوکندری) فعال باشد؛ بنابراین واکنش احیا با تعداد سلول‌های زنده رابطه مستقیم دارد. زمانی که مقدار فورمازان بنفش رنگ تولید شده توسط سلول‌هایی که تیمار شده‌اند با مقدار فورمازان تولیدی توسط سلول‌هایی که تیمار نشده‌اند (کنترل) مقایسه شود، اثرگذاری آن عامل تیمارگر در مرگ سلولی مشخص می‌شود. برای انجام این آزمون بعد از گذشت ۴۸ ساعت از تابش دهی ۲۰ میکرولیتر از ماده MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای حاوی سلول‌های تابش دیده و نیز سلول‌های گروه‌های کنترل و شم (Sham) اضافه شد و سپس پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO₂ قرار داده شد. محیط کشت حاوی ماده MTT پس از

حساس کنندگی پرتویی نانوذرات طلا با پرتوهای ایکس ارتولتاژ

نداشت ($P > 0.05$).

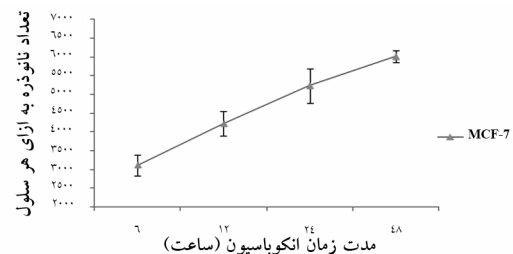


شکل ۳ نمودار میزان سمیت‌زایی نانوذرات طلا با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بر سلول‌های MCF-7 بر حسب مدت زمان‌های مختلف پس از انکوباسیون

تابش‌دهی سلول‌های MCF-7 در حضور و عدم حضور نانوذرات طلا پگ‌دار

به منظور تعیین میزان افزایش بهره‌ درمانی یا به عبارت دیگر سنجش میزان حساس کنندگی پرتویی نانوذرات طلا، ۲۰ میکرولیتر از نانوذرات با غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت با سلول‌های MCF-7 (حدود ۵۰۰۰ سلول اولیه در هر چاهک) انکوبه شد. بعد از گذشت این مدت زمان‌ها، محیط کشت رویی سلول‌های هر یک از چاهک‌ها خارج و دو مرتبه با محلول PBS برای خارج ساختن نانوذرات طلا موجود در محیط کشت رویی شستشو و آماده تابش‌دهی شد. به‌طور همزمان در کنار گروه‌های درمانی که متشکل از «تابش تنها» و «تابش به همراه نانوذرات طلا» بود، گروه‌های کنترل («سلول تنها» و «نانوذرات تنها») نیز کشت داده شدند. تابش‌دهی در گروه‌های درمانی با پرتوهای ایکس ۱۲۰، ۱۸۰ و ۲۰۰ کیلو ولت پیک و دز ۲ گری انجام شد. بعد از گذشت ۴۸ ساعت از تابش‌دهی، سنجش MTT برای همه گروه‌ها انجام شد که نتایج به صورت میانگینی از سه مرتبه تکرار در شکل ۴ آمده است. با توجه به شکل ملاحظه می‌شود که حضور نانوذرات طلا به همراه پرتودرمانی منجر به کاهش معنی‌داری در درصد بقای سلولی نسبت به هر یک از گروه‌های تابش تنها شده است. این اختلاف در میزان بقا در گروه‌های تابش‌دهی شده در حضور و عدم حضور نانوذرات طلا منجر به میانگین

طلا پگ‌دار شده توسط سلول‌های MCF-7 با استفاده از دستگاه جذب اتمی و به‌صورت میانگینی از تعداد نانوذرات طلا داخل شده در سلول‌ها در شکل ۲ آورده شده است. قابل ذکر است با داشتن مقادیر غلظت طلا در حجم برداشته شده، تعداد اتم طلا موجود محاسبه و با داشتن قطر نانوذرات طلا سنتز شده و نیز تعداد شمارش شده سلولی (چگالی سلولی) قبل از انجام آزمایش جذب اتمی، تعداد نانوذره وارد شده به ازای هر سلول محاسبه شد.



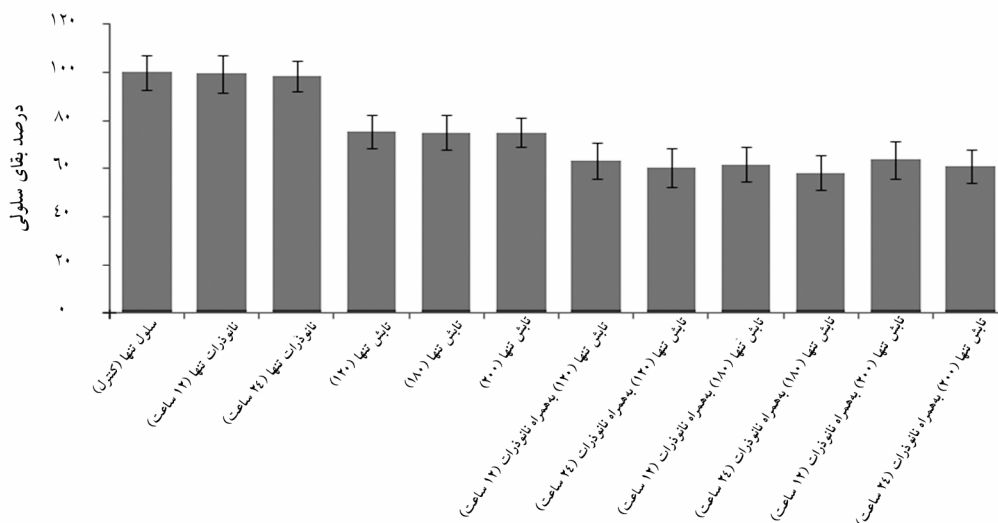
شکل ۲ میانگین تعداد نانوذرات طلا در هر سلول بر حسب مدت زمان انکوباسیون نانوذرات طلا پگ‌دار شده با سلول‌های MCF-7

سمیت‌زایی نانوذرات طلا پگ‌دار شده بر روی سلول‌های MCF-7

به منظور سنجش سمیت‌زایی نانوذرات سنتز شده، غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانوذرات به مدت ۱، ۲، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت با سلول‌های MCF-7 انکوبه شد. سلول‌های گروه‌های کنترل (سلول بدون نانوذرات طلا) به‌طور همزمان کشت داده شدند. سپس سنجش MTT برای همه گروه‌ها انجام شد. نتایج حاصل از سه مرتبه تکرار به‌صورت میانگین در شکل ۳ نشان داده شده است. برای مقایسه میانگین بقای سلولی بین گروه‌ها با یکدیگر و با گروه‌های کنترل از آزمون آماری آنووا (ANOVA) با فاصله اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد. نتایج آماری سمیت معنی‌داری در گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل نشان نداد. به عبارت دیگر، اختلاف معنی‌داری در میانگین بقای سلولی بین هر گروه با گروه کنترل وجود

انکوباسیون ۲۴ ساعت به‌طور معنی‌داری بیش از دسته پرتوهای دیگر در مدت زمان انکوباسیون ۱۲ ساعت بود ($P < 0/05$). اختلاف معنی‌داری در بین گروه‌های تابش تنها با یکدیگر و در بین گروه‌های تابش به همراه نانوذرات طلا در یک مدت زمان یکسان انکوباسیون با یکدیگر مشاهده نشد. برای سنجش آماری از آزمون آنووا با فاصله اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد.

ضریب افزایش دزی برابر $1/22 \pm 0/06$ شد. همچنین نتایج نشان داد که افزایش زمان انکوباسیون از ۱۲ ساعت به ۲۴ ساعت می‌تواند فاکتور افزایش دز را حدود ۵ درصد بهبود دهد. مقادیر فاکتور افزایش دز در انرژی‌ها و مدت زمان‌های انکوباسیون مختلف در جدول ۲ آمده است. فاکتور افزایش دز در تابش دهی با پرتوی ایکس ۱۸۰ کیلو ولت پیک و مدت زمان



شکل ۴ نمودار میانگین درصد بقای سلولی سلول‌های MCF-7 در تابش دهی بدون نانوذرات طلای پگ‌دار شده و به همراه آن در مدت زمان‌های انکوباسیون مختلف بر حسب ساعت

جدول ۲ ضریب افزایش دز جذبی در باریکه‌های مختلف پرتوی ایکس و در مدت زمان‌های مختلف انکوباسیون نانوذرات طلای پگ‌دار شده با سلول‌های MCF-7

مدت زمان انکوباسیون نانوذرات (بر حسب ساعت)		دسته پرتوی تابشی (بر حسب کیلو ولت پیک)
۲۴	۱۲	
ضریب افزایش دز		
۱/۲۴۵	۱/۱۸۹	۱۲۰
۱/۲۷۴	۱/۲۰۳	۱۸۰
۱/۲۳۰	۱/۱۷۹	۲۰۰

بحث

۲۲ درصد در انرژی‌های پایین فوتونی با منابع ارتوتولناژ درمانی شد. هر چند که انرژی فوتونی مورد استفاده در مطالعه حاضر در سرطان پستان استفاده بالینی ندارد و صرفاً برای ارزیابی اثر حساس‌کنندگی نانوذرات طلا از این رده سلولی استفاده شده

استفاده از نانوذرات طلای پگ‌دار شده به عنوان حساس‌کننده پرتویی در پرتودهی سلول‌های سرطانی پستانی رده MCF-7 منجر به افزایش بهره درمانی به‌طور میانگین تا حدود

حساس‌کنندگی پرتویی نانوذرات طلا با پرتوهای ایکس ارتولتاژ

نفوذ به داخل سلول را دارد [۲۳]. در این مطالعه برخی از پارامترهای اصلی حاکم بر سنتز به گونه‌ای تغییر داده شد تا نانوذراتی به قطر حدود ۵۰ نانومتر به‌دست آید. مطالعات سنجش سمیت نانوذرات نشان می‌دهد که نانو ذرات می‌تواند قابلیت زیستن و در نتیجه روند رشد سلول‌ها را کاهش دهد. از آنجایی که میزان سمیت زایی نانوذرات طلا بر سلول به غلظت، اندازه و شکل نانوذرات، مدت زمان انکوباسیون و نیز به نوع رده سلول بستگی دارد [۹]. در این مطالعه بیشینه مدت زمان انکوباسیون با غلظت مشخصی که سمیت معنی‌داری برای سلول‌ها نداشته باشد، به‌دست آمد و استفاده شد. یکی از مهم‌ترین ملاحظات در پرتودرمانی مؤثر انتخاب انرژی مناسب دسته پرتوی تابشی است. ممکن است از تابش‌دهی با انرژی لبه K، برای بهره‌گیری از الکترون‌های اوژه در واگذاری انرژی استفاده شود؛ اما در مطالعه‌ای نشان داده شده است که ترکیب درمانی داروی شیمی‌درمانی حاوی عنصر پلاتین (Cis-diamine (dichloroplatin (II) و تابش‌دهی سلول‌های سرطانی گلیوما (Glioma Cancer Cells) به‌صورت درون‌تنی در رت با چشمه تک انرژی کیلوولتاژ، با انرژی کمی پایین‌تر و بالاتر از لبه K پلاتین (۷۸/۴ کیلو الکترون ولت)، باعث ایجاد آسیب‌های یکسان می‌شود [۲۴]. در دیدگاه دیگر می‌توان بر تفاوت بین ضرایب جذب جرمی انرژی (مقادیر μ_{en}/ρ ، مقادیر جذب جرمی انرژی) طلا نسبت به بافت نرم یا به‌طور تقریباً معادل، آب توجه نمود. با داشتن ضرایب جذب جرمی انرژی می‌توان میزان انرژی واگذار شده در حجم موضعی را تعیین نمود. بر پایه مقادیر جذب جرمی انرژی که به‌طور رایگان و آزاد از طریق موسسه ملی استانداردها و تکنولوژی آمریکا (National Institute of Standards and Technology: <http://www.nist.gov/srd>) قابل دسترسی است، می‌توان نسبت ضرایب جذب جرمی انرژی طلا به آب را بر حسب بازه‌های انرژی مورد نظر به‌دست آورد. با توجه به مقادیری که در وبگاه موسسه مذکور در خصوص طلا گزارش شده و براساس مبانی نظری حاکم بر برهم‌کنش پرتوهای ایکس با مواد حاوی این عنصر می‌توان ضرایب افزایش دزی به میزان

است، اما استفاده از این نانوذرات نشان داد که می‌توان با کاهش بیش از بیست درصدی از دز تجویزی، اثر کشندگی مشابهی را در این سلول‌های سرطانی انتظار داشت. عامل ایجاد حساس‌کنندگی پرتویی نانوذرات طلا عدد اتمی بالای طلا نسبت به عدد اتمی عناصر زیستی موجود در بافت یا سلول‌هاست. مطالعات زیادی وجود دارد که حساس‌کنندگی پرتویی نانوذرات طلا را تأیید می‌کند [۱۲، ۱۴، ۱۵، ۱۹، ۲۰]. به علت این که شرایط مطالعات انجام شده از یک مطالعه به مطالعه دیگر بسیار متفاوت است، بنابراین میزان حساس‌کنندگی گزارش شده در این گونه مطالعات نیز از یکدیگر متفاوت است. برای مثال در مطالعه‌ای برون‌تنی، با استفاده از نانوذرات طلای پوشانده شده با گلوکز به همراه پرتودهی با منبع ۲۰۰ کیلو ولت پیک در سلول‌های سرطانی پروستات، ضریب افزایش دز جذبی حدود ۱/۵ تا ۲ به‌دست آمد [۲۱] که در مقایسه با مطالعه حاضر، تنها از یک دسته پرتو برای تابش‌دهی استفاده شده است. به عبارت دیگر؛ به پارامتر انرژی نپداخته است. در مطالعه‌ای دیگر با تابش دز ۲ گری و انرژی ۷۳ کیلو الکترون ولت میزان بقای سلولی براساس سنجش کلونی‌زایی از ۷۲/۵ درصد در سلول‌های کنترل (تابش تنها) به ۵۸/۷ درصد در سلول‌هایی که در معرض نانوذرات طلای پگ‌دار قرار داده شده بودند، کاهش یافت [۲۲] که با مقایسه نسبی این اعداد، ضریب افزایش دز جذبی برابر ۱/۲۳۵ به‌دست می‌آید که مطالعه حاضر با آن در توافق است. اما به‌طور کلی اختلاف در ضریب افزایش دز جذبی در مطالعات تجربی دیگر با مطالعه حاضر که حدود ۱/۲۲ به‌دست آمد را می‌توان به اختلاف در غلظت نانوذرات طلا، نوع پوشش نانوذرات طلا و نوع رده سلولی یا ترکیبی از این عوامل نسبت داد. واضح است که می‌توان با افزایش غلظت نانوذرات طلا، البته تا حد مشخصی، به ضریب افزایش دز بالاتری دست یافت اما در استفاده از اندازه بزرگ‌تر نانوذرات برای افزایش دز باید مصالحه‌ای بین ورود و تجمع بیشتر نانوذرات در داخل سلول و اندازه قطر نانوذره انجام گیرد. در زمینه برداشت نانوذرات توسط سلول‌ها نشان داده شده است که نانوذرات طلای کروی با قطر حدود ۵۰ نانومتر بیشترین

بیش از ۱۰۰ را در انرژی‌های ۴۰ تا ۵۰ کیلو الکترون ولت حاصل از به‌کارگیری این عنصر انتظار داشت. در مطالعه حاضر ضریب افزایش دزی بیش از ۱/۲۷ در منبع مولد پرتوی ایکس پلی انرژتیک ۱۸۰ کیلو ولت پیک که انرژی معادل آن برابر با ۵۰ کیلو الکترون ولت است با مدت زمان انکوباسیون ۲۴ ساعت به‌دست آمد. همچنین مقایسه‌ای بین پرتوهای مختلف در یک زمان انکوباسیون معین انجام شد و نتایج نشان داد که پرتوی ایکس ۱۸۰ کیلو ولت پیک می‌تواند مؤثرتر از بقیه گزینه‌ها باشد؛ هر چند که این اختلاف به لحاظ آماری معنی‌دار نبود. این افزایش در ضریب افزایش دز جذبی پرتوی ایکس ۱۸۰ کیلو ولت پیک، با این واقعیت نظری که پرتوهای فوتونی با انرژی حدود ۵۰ کیلو الکترون ولت، ضریب جذب جرمی انرژی بالایی در طلا نسبت به آب یا به‌طور معادل بافت نرم دارد، مطابق است. همچنین این مقدار انرژی با مقداری که در مطالعه دیگری که در آن به بررسی اثر انرژی پرتوی تابشی در میزان حساس کنندگی، در محلول DNA و نانوذرات طلا پرداخته شد و ضریب افزایش دز جذبی بیش از ۳ با پرتوهای ایکس ۴۹ کیلو الکترون ولت به‌دست آمد، همخوانی دارد [۱۵]؛ هر چند که میزان ضریب افزایش دزی در این مطالعه بیش از دو برابر مطالعه حاضر بوده است اما نکته قابل توجه آن است که در آن مطالعه نانوذرات طلا به‌طور مستقیم کنار DNA استخراج شده از باکتری قرار داده شده‌است و ورود نانوذرات به داخل سلول مدنظر نبوده است و از سوی دیگر؛ نانوذرات طلا بدون هیچ پوشش خاصی بوده‌است که در عمل از پایداری مناسبی برخوردار نیست. همچنین براساس نتایج روند حساس کنندگی پرتویی که با دسته پرتوهای مختلف به‌صورت افزایشی از انرژی ۳۸ تا ۵۰ کیلو الکترون ولت و سپس کاهش تا انرژی ۶۶ کیلو الکترون ولت به‌دست آمد، نشان داده شد که الگوی حساس کنندگی منطبق بر روند تغییرات نسبت ضرایب جذب جرمی انرژی طلا به آب بر حسب انرژی گزارش شده (مؤسسه ملی استانداردها و تکنولوژی آمریکا) و به شکلی زنگوله‌ای مانند است. نکته قابل ملاحظه دیگر این‌که نتایج نشان داد که افزایش زمان انکوباسیون با نانوذرات طلا می‌تواند اثر هم‌افزایی

در ترکیب با پرتوی ایکس ۱۸۰ کیلو ولت پیک داشته باشد. در توجیه این مشاهده می‌توان بیان داشت که افزایش زمان انکوباسیون به معنای افزایش ورود و تجمع نانوذرات در داخل سلول‌ها است و از آنجایی که برتری نسبی با پرتوی ۱۸۰ کیلو ولت پیک نسبت به سایر انرژی‌ها وجود دارد، بنابراین تشدید افزایش دز جذبی در ترکیب این دو پارامتر دور از انتظار نخواهد بود.

با در نظر گرفتن اثر اجتناب‌ناپذیر حساس کنندگی پرتویی نانوذرات طلا در محدوده انرژی‌های کیلوولتاژ، ممکن است منابع ایکس ارتولتاژ موجود با اعمال اصلاحاتی در آن‌ها مورد استفاده‌ی مجدد بالینی قرار گیرد. همچنین ممکن است منابع جدید پرتوهای ایکس ارتولتاژ با انرژی‌های نزدیک به ۵۰ کیلو الکترون ولت که توانایی داخل شدن به قسمت‌های خاص بدن نظیر حفره‌ها را داشته باشد، برای درمان سرطان‌های این نواحی توسعه داده شود. براساس مطالعات نانوذرات طلا ایزاری امیدوار کننده در پرتودرمانی به‌نظر می‌آید به‌طوری که در کنار تلاش‌های چند دهه اخیر و پیشرفت‌ها در سخت‌افزار و نرم‌افزارهای پرتودرمانی، به نظر می‌رسد استفاده از فناوری نوین نانو در پرتودرمانی بتواند رویکردی جهشی و نوید بخش را در زمینه درمان بیماری صعب‌العلاج سرطان پیش رویمان باز کند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل رساله دکتری نویسنده اول این مقاله در گروه فیزیک پزشکی است که با مساعدت گروه‌های فیزیک پزشکی، بیوتکنولوژی پزشکی و هماتولوژی پزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس و با حمایت مالی این دانشگاه انجام شده است؛ بنابراین بر خود لازم می‌دانیم که از دانشگاه و گروه‌های مذکور تشکر و قدردانی کنیم. همچنین ضروری است از مسئولین محترم بیمارستان امام حسین (ع) و دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی به‌ویژه متخصصین فیزیک پزشکی بخش رادیوتراپی آن سرکار خانم‌ها نفیسه فرضی و

حساس‌کنندگی پرتویی نانوذرات طلا با پرتوهای ایکس ارتوولتاژ

پرسنل محترم آن، به‌خصوص سرکار خانم همت‌یار که در مراحل سنتز همکاری داشتند، تشکر و قدردانی نمایم.

منیژه بیگی که در زمینه کالیبراسیون، دزیمتری و تابش‌دهی همکاری داشتند، و مسئولین محترم شرکت روژان آزما و

منابع

- [1] Mousavi SM, Gouya MM, Ramazani R, Davanlou M, Hajsadeghi N, Seddighi Z. Cancer incidence and mortality in Iran. *Ann Oncol* 2009; 20(3): 556-63.
- [2] Andreyev HJ. Gastrointestinal problems after pelvic radiotherapy: the past, the present and the future. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2007; 19(10): 790-9.
- [3] Witteles RM. Radiation therapy for breast cancer: buyer beware. *J Am Coll Cardiol* 2011; 57(4): 453-4.
- [4] Shibamoto Y, Zhou L, Hatta H, Mori M, Nishimoto SI. *n 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* 2001; 49(2): 407-13.
- [5] Miyake K, Shimada M, Nishioka M, Sugimoto K, Batmunkh E, Uto Y, Nagasawa H, Hori H. 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* 2008; 272(2): 325-35.
- [6] Spiers Fw. The influence of energy absorption and electron range on dosage in irradiated bone. *Br J Radiol* 1949; 22(261): 521-33.
- [7] Castillo MH, Button TM, Doerr R, Homs MI, Pruett CW, Pearce JI. Effects of radiotherapy on mandibular reconstruction plates. *Am J Surg* 1988; 156(4): 261-3.
- [8] Shukla R, Bansal V, Chaudhary M, Basu A, Bhone RR, Sastry M. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. *Langmuir* 200; 21(23): 10644-54.
- [9] Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small* 2008; 4(1): 26-49.
- [10] Boudaïffa B, Cloutier P, Hunting D, Huels MA, Sanche L. Resonant formation of DNA strand breaks by low-energy (3 to 20 eV) electrons. *Science* 2000; 287(5458): 1658-60.
- [11] Carter JD, Cheng NN, Qu Y, Suarez GD, Guo T. Nanoscale energy deposition by X-ray absorbing nanostructures. *J Phys Chem B* 2007; 111(40): 11622-5.
- [12] Hainfeld JF, Slatkin DN, Smilowitz HM. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Phys Med Biol* 2004; 49(18): N309-15.
- [13] Butterworth KT, Wyer JA, Brennan-Fournet M, Latimer CJ, Shah MB, Currell FJ, Hirst DG. Variation of strand break yield for plasmid DNA irradiated with high-Z metal nanoparticles. *Radiat Res* 2008; 170(3): 381-7.
- [14] Rahman WN, Bishara N, Ackerly T, He CF, Jackson P, Wong C, Davidson R, Geso M. Enhancement of radiation effects by gold nanoparticles for superficial radiation therapy. *Nanomedicine* 2009; 5(2): 136-42.
- [15] Brun E, Sanche L, Sicard-Roselli C. Parameters governing gold nanoparticle X-ray radio-

- sensitization of DNA in solution. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2009; 72(1): 128-34.
- [16] Kong T, Zeng J, Wang X, Yang X, Yang J, McQuarrie S, McEwan A, Roa W, Chen J, Xing JZ. Enhancement of radiation cytotoxicity in breast-cancer cells by localized attachment of gold nanoparticles. *Small* 2008; 4(9): 1537-43.
- [17] Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss Faraday Soc* 1951; 11: 55-75.
- [18] Andreo P, Burns DT, Hohlfeld K, Huq MS, Kanai T, Laitano F, Smythe VG, Vynckier S. Absorbed dose determination in external beam radiotherapy: An international Code of Practice for dosimetry based on standards of absorbed dose to water. Vienna: IAEA, Technical Reports Series No. 398, 2000.
- [19] Zheng Y, Hunting DJ, Ayotte P, Sanche L. Radiosensitization of DNA by gold nanoparticles irradiated with high-energy electrons. *Radiat Res* 2008; 169(1): 19-27.
- [20] Chang MY, Shiau AL, Chen YH, Chang CJ, Chen HH, Wu CL. Increased apoptotic potential and dose-enhancing effect of gold nanoparticles in combination with single-dose clinical electron beams on tumor-bearing mice. *Cancer Sci* 2008; 99(7): 1479-84.
- [21] Roa W, Zhang X, Guo L, Shaw A, Hu X, Xiong Y, Gulavita S, Patel S, Sun X, Chen J, Moore R, Xing JZ. Gold nanoparticles sensitize radiotherapy of prostate cancer cells by regulation of the cell cycle. *Nanotechnology* 2009; 20(37): 375101.
- [22] Liu CJ, Wang CH, Chen ST, Chen HH, Leng WH, Chien CC, Wang CL, Kempson IM, Hwu Y, Lai TC, Hsiao M, Yang CS, Chen YJ, Margaritondo G. Enhancement of cell radiation sensitivity by pegylated gold nanoparticles. *Phys Med Biol* 2010; 55(4): 931-45.
- [23] Chithrani BD, Ghazani AA, Chan WC. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Lett* 2006; 6(4): 662-8.
- [24] Biston MC, Joubert A, Adam JF, Elleaume H, Bohic S, Charvet AM, Estève F, Foray N, Balosso J. Cure of Fisherrats bearing radioresistant F98 glioma treated with cis-platinum and irradiated with monochromatic synchrotron X-rays. *Cancer Res* 2004; 64(7): 2317-23.