



سنتر و بررسی رفتار بیولوژیکی نانوذرات $^{67}\text{Ga}@TGA\text{-Fe}_3\text{O}_4$ در حیوانات آزمایشگاهی

سمیعی متین، میلاد*^۱ - اشتیری، پرویز^۲ - فیضی، شهزاد^۲ - بیدمشکی پور، علی^۱ - فضائلی، یوسف^۲

۱- دانشگاه رازی، دانشکده علوم گروه بیولوژی سلولی، کرمانشاه، ایران.

۲- سازمان انرژی اتمی ایران، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده کاربرد پرتوها، تهران، ایران.

چکیده:

در این تحقیق، سنتز نانوذرات مغناطیسی، عامل دار کردن و نشاندارسازی آنها با گالیوم- ^{67}Tl انجام شد. سنتز نانوذرات مغناطیسی با استفاده از رسوبگیری مخلوط استوکیومتری محلول آهن (II) و آهن (III) انجام شد. سپس عامل دار سازی نانوذرات سنتز شده با استفاده از تیوگلیکولیک اسید در دمای 37°C در محیط آبی دنبال شد. در نهایت نشاندار سازی ذرات عاملدار شده با استفاده از محلول کلرید گالیوم- ^{67}Tl تکمیل شد. نتایج حاصل از تصویربرداری TEM نشان داد که سایز متوسط نانوذرات حدود ۲۰ نانومتر است که سایز مناسبی برای کاربردهای بیولوژیکی می باشد. پایداری نانو ذرات نشاندار سازی شده با روش کروماتوگرافی لایه نازک و در محیط نرمال سالین انجام شد. نتایج نشان داد که پایداری نشاندار سازی بیشتر از ۹۸٪ میباشد. با توجه به انرژی مناسب گالیوم- ^{67}Tl سازگاری و پایداری این نانوذرات در خون و امکان گردش آن در تمام بدن، از این نانوذرات برای بررسی توزیع زیستی در رت استفاده شد. ردیابی گردش کامل این نانوذرات در بدن که پس از تزریق با ورود به کبد شروع و با دفع نانوذرات از طریق کلیه و سیستم ادراری پایان می یابد، نشان از سازگاری کامل و پایداری نانوذرات تهیه شده دارد و آنرا کاندیدی مناسب برای روشهای تشخیصی بالینی معرفی می نماید. در این کار از عامل جدید فعال کننده سطح یعنی تیوگلیکولیک اسید استفاده شده است.

کلمات کلیدی: نانوذرات مغناطیسی، گالیوم- ^{67}Tl ، نشاندارسازی.

مقدمه :

نانوذرات مغناطیسی به دلیل زیست سازگاری، سهولت تهیه، اصلاح سطح آسان و خواص مغناطیسی کاربردهای زیادی در بیوشیمی، پزشکی و صنایع دارند. قابلیت جذب این نانوذرات توسط میدان مغناطیسی، دارو رسانی هدفمند با استفاده از آنها را تسهیل می کند [۱-۳]. نانو ذرات مغناطیسی با روش های ساده و جدید (فیزیکی و شیمیایی سنتز می شوند. از روش های فیزیکی می توان به اسپاتر کردن یونی، تبخیر با استفاده از قوس الکتریکی، تبخیر حرارتی، تبخیر لیزری و تبخیر با پلاسما اشاره کرد. از روش هایی شیمیایی می توان به سل-ژل، هم رسوبی، روش احتراقی، تبخیر شیمیایی، میکرومولسیون، روش هیدروترمال و سنتز در شعله اشاره کرد [۴ و ۵].

نانوذرات مغناطیسی کاربردهای زیادی در تهیه سیال های مغناطیسی، تصویر سازی های رنگی، سرد سازی مغناطیسی، سم زدایی از سیال های بیولوژیکی، سنتز مواد آلی، کاتالیزور، جداسازی های شیمیایی و بیوشیمیایی، دارورسانی، جداسازی داروها، جداسازی اجزای سلولی، جذب و حذف گونه های مختلف آلی و معدنی در آلاینده های محیطی دارند.



برای هر کدام از این کاربردها، نانوذرات باید دارای اندازه، شکل، ویژگی سطح و خواص مغناطیسی ویژه‌ی آن کاربرد باشد. این ویژگی‌ها بستگی پیدا می‌کند به: (۱) روش اولیه سنتز نانوذرات، (۲) مساحت ویژه سطح به حجم زیاد، (۳) خاصیت سوپرپارامغناطیسی (پا سخ ذرات به وجود و یا عدم وجود میدان مغناطیسی خارجی)، (۴) جدا سازی سریع گونه‌های مورد نظر با به کارگیری میدان مغناطیسی و بدون نیاز به فیلتراسیون و سانتریفیوژ از حجم زیاد نمونه‌ها و (۵) امکان اصلاح آسان و سریع سطح نانوذرات.

جنس ذرات مغناطیسی می‌تواند از فریت‌ها با فرمول عمومی $(M) FeM_2O_4$ (M یک کاتیون دو ظرفیتی مثل Ni, Co, Mg, Zn است)، مگنتیت (Fe_3O_4)، مگهمیت (Fe_2O_3) و حتی شامل آهن، کبالت و نیکل فلزی باشد.

نانو ذرات مغناطیسی به اشکال مختلفی قابلیت مصرف دارند. ۱- ساختار پوسته- هسته: که در این ساختار هسته مغناطیسی با مواد زیست سازگار و گروه‌های عاملی پوشش داده می‌شود. این ساختارها به خاطر آماده سازی آسان و کنترل بهتر واکنش مواد پوسته مورد توجه قرار گرفته اند. انواعی از نانوذرات مغناطیسی دارای ساختار پوسته-هسته که در آن هسته مغناطیسی با ساختار پوسته از جنس سیلیکات، دکستران، پلی‌وینیل‌الکل (PVA)، پلیمرها و فلزاتی از قبیل طلا که امکان اتصال آسان گروه‌های عاملی را فراهم می‌کند، سنتز و مورد استفاده قرار گرفته اند. این ذرات با استفاده از سورفاکتانت‌های یونی و غیر یونی و یا از طریق کپسوله کردن در داخل ساختارهایی مثل قفس‌های کربنی یا پروتئین‌های فریتین سنتز می‌شود و در نهایت بوسیله اتصال گروه‌های کربوکسیل، آمین، بیوتین، استرپتویدین، آنتی بادی و ... عامل دار می‌شود. ۲- گاهی نیز گروه‌های عاملی بدون هیچ واسطه‌ای به سطح نانو ذرات مغناطیسی متصل است و میتواند موجب اتصال ترکیبات، داروها و کاتیونهای فلزی و رادیو ایزوتوپها را به سطح ذرات مغناطیسی فراهم نماید.

نانوذرات مغناطیسی کاربردهای زیادی در پزشکی دارند. الف) نانوذرات مغناطیسی به واسطه گرادیان میدان مغناطیسی خارجی که همراه با نفوذپذیری ذاتی میدان مغناطیسی در داخل بافت‌های حیوانی است قابل کنترل می‌باشند. از این عملکرد و قابلیت کنترل از راه دور نانو ذرات در انتقال و تجمع نانوذرات مغناطیسی، نشاندار کردن اختصاصی ساختارها و اندامهای زیستی و به طور خاص در انتقال داروهای ضد سرطان به اندام و بافت هدف استفاده می‌شود. ب- قرار دادن بافت بدن در معرض گرمای $43^{\circ}C$ یکی از روش‌های معمول و رایج در درمان سرطان است که موجب ایجاد حساسیت به دارو و آسیب رساندن به سلول‌های سرطانی و نابودی آنها می‌شود. نانوذرات می‌توانند در اثر میدان‌های مغناطیسی متناوب گرما تولید کنند. میزان گرمای تولید شده بستگی به نوع ذره، خواص مغناطیسی آن و عوامل موثر بر میدان مغناطیسی دارد. ج- تصویربرداری تشدید مغناطیسی، روشی است که با استفاده از یک میدان مغناطیسی قوی خارجی، تصاویر دقیق همراه با جزئیات از ساختارها و اندامها بدست می‌دهد. در این روش تشخیصی، با استفاده از تزریق نانوذرات مغناطیسی به خصوص اکسید آهن، شناسایی بافت‌های آسیب دیده با حساسیت بسیار بالا قابل انجام است. د-



نانوذرات مغناطیسی با ساختارهای خوشه‌ای که ظرفیت بالایی در نگهداری و حمل هدفمند دارو دارند، استفاده بسیار گسترده‌ای در تشخیص و درمان انواع بیماری سرطان، بیماری‌های قلبی و عصبی دارد. نشاندار سازی این نانو ذرات علاوه بر استفاده دو گانه از آنها در تسهیل انتقال به اندام هدف، باعث افزایش حساسیت روشهای تشخیصی نیز میشود و مانع از پراکنده شده رادیو ایزوتوپها در بدن میشود. از طرفی نیز از این ذرات نشاندار میتوان در مطالعه جذب و دفع این مواد استفاده کرد. بدین صورت که با اصلاح ساختار سطح آنها میتوان نانو ذرات را به صورت محلول در آب یا محلول در چربی تبدیل کرد. این خاصیت باعث اختلاف فاحش در روش جذب و دفع این مواد میشود.

در حالیکه نانوذرات به تنهایی قادر به جذب رادیو ایزوتوپهای فلزی در سطح خود نیستند با اصلاح سطح نانو ذرات مذکور توسط گروههای عاملی، از قبیل هیدروکسیل یا گوگردی، خاصیت گزینش پذیری نسبت به کاتیونها را میتوان در آنها نهادینه کرد. علاوه بر خاصیت گزینش پذیری مذکور، می‌توان رادیو ایزوتوپها را با روش کمپلکسه کردن نیز در سطح نانو ذرات تثبیت نمود. با ردیابی رادیو ایزوتوپهای متصل به نانو ذرات توسط روش تصویر برداری میتوان از میزان جذب این نانو مواد در هر اندام و عضو، نوع جذب و گردش و دفع آنها در بدن با توجه به SPECT بسیاری از مطالعات و بررسی‌های آزمایشگاهی اطلاعات ساختار سطح این نانوذرات اطلاعات مفیدی بدست آورد. در مقایسه با سمیت کم برای نانوذرات اکسید آهن نشان داده است. این روند سمیت بالا برای نانوذرات روی و نقره سمیت در مطالعات آزمایشگاهی نشان دهنده سمیت پایین نانوذرات اکسید آهن - در غلظت های ۳۰ میکروگرم بر میلی در [۶۵] در مطالعه حیوانی یافت شد Co_3O_4 و Mn_3O_4 ، NiO ، SiO_2 ، TiO_2 ، VOSO_4 - در مقایسه با نانو ذرات این تحقیق نانو ذرات مگنتیت با روش رسوبدهی تهیه میشوند و سپس سطح این نانو ذرات با استفاده از تیوگلیکولیک اسید اصلاح میشود. سپس رادیو ایزوتوپ گالیوم-۶۸ با استفاده از گروههای عاملی متصل به سطح نانو ذرات، بر روی این نانو ذرات تثبیت میشود. پس از تعیین ساختار و مشخصات این نانو ذرات، این ذرات اصلاح شده به موش تزریق میشود و نوع جذب و دفع آن در این ساختار زیستی بررسی میگردد. مقایسه نتایج نشان داد که اصلاح سطح نانو ذرات رفتار جذبی و دفعی آنها را کاملاً متحول میکند زیرا از عامل جدید فعال کننده سطح یعنی تیوگلیکولیک اسید استفاده شده است.

روش کار :

برای تولید نانوذرات مگنتیت با روش رسوبگیری، ۱۰ mL محلول کلرید آهن (III) با غلظت ۲/۷ مولار و ۱۰ mL کلرید آهن (II) با غلظت ۱/۳۵ مولار با استفاده از همزن مکانیکی با هم مخلوط شد. محلول آهن حاصله به ۱۱۰ mL محلول آمونیاک ۱/۵ مولار طی فرآیند همزدن افزوده شد. محصول محلول نانوذرات تیره رنگ است. به محلول نانو ذرات



حاصله ۱/۰ mL محلول اسید تیو گلیکولیک غلیظ اضافه شد. جهت تکمیل فرآیند اصلاح سطح نانوذرات، همزدن محلول به مدت ۶ ساعت در دمای اتاق ادامه یافت. نانوذرات حاصله از محلول به وسیله نیروی مغناطیسی آهنربا جدا شد. به وسیله دستگاه اولتراسوند به مدت ۱۰ دقیقه در آب پراکنده و دو مرتبه با آب شستشو شد. نانوذرات اصلاح شده، در محلول نرمال سالین پراکنده و برای نشاندار سازی با گالیوم-۶۷ ذخیره شد. بدین ترتیب نانوذرات مغناطیسی با اندازه متوسط در حدود ۲۰ نانومتر تهیه می‌شود. ملکولهای اسید تیو گلیکولیک از یک طرف بر روی نانوسطح ذرات تثبیت شده و از طرف دیگر با گروههای عاملی آزادشان که داخل محلول گسترده شده اند، میتوانند با رادیو ایزوتوپهای گالیوم-۶۷ تشکیل کمپلکس داده و نشاندار شوند. برای انجام فرآیند نشاندار سازی گالیوم-۶۷ بر روی نانوذرات مغناطیسی اصلاح شده، محلول محتوی ۳/۰ mCi از کلرید گالیوم-۶۷ را با حرارت ملایم هیترخشک نموده و در ۰/۵ mL محلول سالین محلول می‌نماییم. سپس ۵۰ میکرولیتر از محلول نانوذرات مغناطیسی (با غلظت ۱/۰ mg/mL) را به محلول اضافه می‌نماییم. با همزدن ملایم به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C، عملیات نشاندار سازی کامل می‌شود. سپس نانو ذرات نشاندار سازی شده با اعمال میدان مغناطیسی از محلول جدا شد. محلول نانو ذرات نهایی پس از عبور از فیلتر ۰/۲۲ میکرونی به موش آزمایشگاهی تزریق و تصاویر SPEC مربوطه در زمان های مختلف ثبت و توزیع زیستی آن در اندامهای موش تعیین شد.

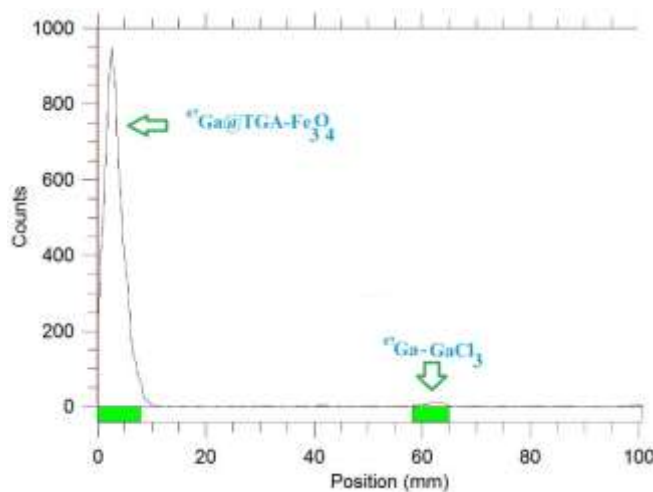
بعد از نشاندار سازی نانوذرات مغناطیسی عاملدار شده با اسید تیو گلیکولیک، برای بررسی خلوص رادیو شیمیایی و مشاهده درصد نشاندار سازی (نسبت نانوذرات مغناطیسی نشاندار به گالیوم-۶۷ کلراید) در محصول نهایی و همچنین انجام تست های پایداری آن، از روش رادیوکروماتوگرافی لایه نازک رادیواکتیو (RTLC) استفاده شد. برای این منظور یک نمونه ۱۰ میکرولیتری از محلول نهایی، روی کاغذ واتمن شماره ۲ به عنوان فاز ثابت کروماتوگرافی، لکه گذاری شد. سپس کاغذ در ظرف حاوی فاز متحرک کروماتوگرافی-DTPA ۰/۱ میلی مولار- قرار داده شد. پس از مهاجرت کامل فاز متحرک (۱۰ سانتی متر)، کاغذ واتمن از ظرف حاوی حلال خارج و خشک شد. سپس توسط دستگاه اسکنر RTLC محل رادیواکتیویته خوانش گردید (شکل ۱). به منظور بررسی پایداری نانوذرات مغناطیسی نشاندار با گالیوم-۶۷ در سرم خون انسانی، ۱ میلی کوری از نانوذرات نشاندار به ۵۰۰ میکرولیتر از سرم تازه انسانی اضافه شد و مخلوط حاصل در دمای اتاق به مدت ۴ ساعت انکوبه شد. سپس خلوص رادیو شیمیایی توسط RTLC مورد بررسی قرار گرفت. توزیع بیولوژیکی کمپلکس نشاندار بین بافت ها برای موش صحرایی نرمال بلافاصله بعد از تصویربرداری تعیین شد. مقدار کلی رادیواکتیویته تزریق شده به هر موش ۰/۱ میلی لیتر بود. حیوانات بوسیله روش خفگی با گاز قربانی شدند. سپس بافت های خون، قلب، شش، مغز، روده، مدفوع، پوست، معده، کبد، ماهیچه، کلیه و استخوان، با نرمال سالین شسته (به جز خون) و وزن شدند و فعالیت رادیواکتیویته ویژه آنها توسط یک دستگاه آشکار ساز فوق



خالص ژرمانیم (HPGe) شمارش شد. میزان اکتیویته بافت ها به صورت واحد در صد دوز تزریق شده بر گرم بافت (میزان کل اکتیویته تزریقی \times وزن بافت / در صد میزان اکتیویته در بافت = ID/g %) بیان گردید (شکل ۲). تصاویر هسته ای در ۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت بعد از تزریق نانوذرات نشاندار از طریق ورید دمی موش، با استفاده از یک سیستم تصویربرداری هسته ای SPECT تهیه شدند که در شکل ۳ نشان داده شده‌اند.

نتایج و بحث:

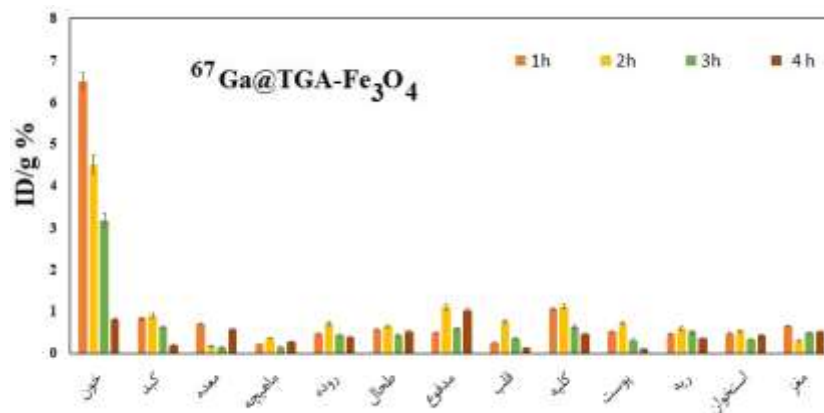
مولکول های تیوگلیکولک اسید با اتصال به سطح نانو ذرات مغناطیسی علاوه بر کمک به پایداری نانو ذره ، به عنوان یک لیگاند دودندانه عمل نموده و با اتم های گالیوم- 67 نیز تشکیل کمپلکس می دهند. برای بررسی میزان نشاندارسازی نانوذرات از تکنیک RTLC استفاده شد. در آزمایش RTLC گالیوم- 67 آزاد با تشکیل کمپلکس با DTPA به Rf بالاتر جابجا شد (۰/۶)، در حالی که نانوذرات نشاندار قابلیت تشکیل کمپلکس با لیگاند DTPA را نداشته و در محل نقطه گذاری (Rf=0) باقی می ماند که در شکل ۱ بوضوح قابل مشاهده است. نتایج تکنیک RTLC، تشکیل نانوذرات نشاندار شده با خلوص ۹۹٪ را تأیید کرد. کمپلکس نشاندار شده پایداری بسیار خوبی را در سرم آلبومین انسان ، انکوبه شده در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴ ساعت نشان داد و هیچ مقداری از گالیوم- 67 آزاد دیده نشد. توزیع زیستی نانو ذرات در بدن حیوانات مورد آزمایش بسته به نوع رادیوایزوتوپ (فلز و غیر فلز) و همچنین گروه‌های عاملی سطوح نانو ذرات (تیوگلیکولیک اسید) در بدن متفاوت است. طبق نتایج به دست آمده، توزیع زیستی نانو ذرات مغناطیسی نشاندار در تمام زمان‌ها در جریان خون، پراکنش قابل توجهی را به خود اختصاص داده است. با توجه به اهمیت مقاصد تشخیصی- درمانی نانو ذرات دارویی، ماندگاری مناسب در جریان خون، یک فاکتور مثبت تلقی می‌شود.



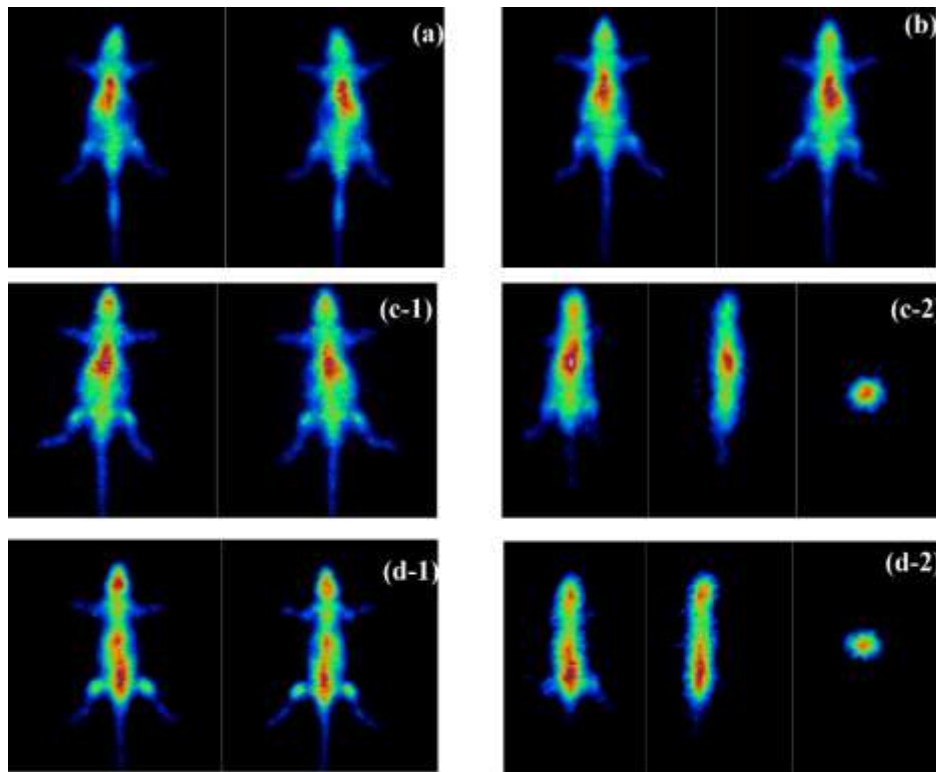
شکل ۱. رادیوکروماتوگرام نانوذرات مغناطیسی نشاندار با گالیوم- 67 .

میزان جذب در کبد در تمامی زمان های آزمایش، به جهت متابولیسم دفع کبدی به عنوان مسیر دوم خروج از بدن بالا است. نکته جالب توجه در مورد این نانوذرات آغاز دفع سریع کلیوی به عنوان مسیر اول خروج از بدن به واسطه حضور گروه های عاملی آبدوست می باشد که این امر با تجمع رادیواکتیویته در کلیه ها و مثانه در زمان ۱ ساعت پس از تزریق رادیودارو مشاهده شد. دسترسی سریع این نانوذرات نشاندار به مغز نیز از دیگر مزایای این ترکیب نشاندار است و قابلیت استفاده از آن را در مورد تشخیص و درمان سرطان های مغز نشان می دهد. همه این عوامل این ترکیب نشاندار را برای مقاصد تصویربرداری هسته ای و مطالعات آینده تشخیص و درمان سرطان به عنوان یک ترکیب امیدوار کننده معرفی می نماید. نتایج توزیع زیستی نانوذرات مغناطیسی نشاندار شده با گالیم- ^{67}Tl در شکل ۲ نشاندهنده این نتایج است.

تصاویر هسته‌ای تصویربرداری هسته ای SPECT که در شکل ۳ نشان داده شده‌اند، تایید کننده نتایج حاصل از نتایج توزیع زیستی می باشد که با استفاده از اصلاح سطح نانو ذرات مغناطیسی با عامل جدید فعال کننده سطح یعنی اسید تیوگلیکولیک حاصل شده است.



شکل ۲. نمودار توزیع زیستی نانوذرات مغناطیسی نشاندار در اندام های حیاتی در ۱، ۲، ۳ و ۴ ساعت بعد از تزریق.



شکل ۳. تصاویر هسته‌ای در ۱ ساعت (a-planar)، ۲ ساعت (b-planar)، ۳ ساعت (c1-planar) و (c2-SPECT)، ۴ ساعت (d1-planar) و (d2-SPECT).

مراجع:

- 1- Drexler, K.E., in book; Nanosystems. Molecular machinery, manufacturing and computation, chapter 10- Nanoscale Structural Components. 1992.
- 2- Fazaeli Y., Zare H., Karimi S., Rahighi R., Feizi S. Novel aspects of application of 2-cadmium telluride quantum dots nanostructures in radiation oncology, *Applied Physics A*, 123, 2007, 507.
- 3- Fazaeli Y., Hosseini M. A., Afrasyabi M., Ashtari P., ^{68}Ga @ pyridine-functionalized MCM-41 mesoporous silica: a novel radio labeled composite for diagnostic applications, *Radiochimica Acta*, 107, 2018, Pages 157–164.
- 4- Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL-3A rat liver cells. *Toxicol in Vitro* 2005, 19:975–983.
- 5- Jeng HA, Swanson J. Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. *J Environ Sci. Health A* 2006,41: 2699–2711.
- 6- Ashtari K, Khajeh K, Fasihi J, Ashtari P, Ramazani A, Vali H, Silica-encapsulated magnetic nanoparticles: enzyme immobilization and cytotoxic study, *Inter. J. biological macromolecules*, 2012, 50:1063-1069.