



## بررسی توزیع زیستی و نشاندار سازی رادیو اکتیو نانوذرات طلای عاملدار شده با

### تیوگلیکولیک اسید بوسیله گالیوم-۶۸: معرفی یک عامل تشخیصی جدید PET

اشتری، پرویز\*<sup>۱</sup> - فضائی، سید یوسف<sup>۱</sup> - کاردان، محمدرضا<sup>۲</sup>

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

۲. پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده راکتور، تهران- ایران

#### چکیده:

به سبب خواص تشخیصی و درمانی برجسته نانوذرات طلا و رادیونوکلید گالیوم-۶۸، جهت رسانش هدفمند این رادیونوکلید به اندام‌های هدف، این رادیونوکلید بر روی میزبان نانو عاملدار شده با تیوگلیکولیک اسید تثبیت شد. مراحل کنترل کیفی دقیق و آزمایش‌هایی نظیر *PET scan*، *TEM*، *RTLC* و *HPGe* جهت اندازه‌گیری دقیق رفتارهای این نانوذرات نشاندار در محیط آزمایشگاه و درون بدن حیوانات آزمایشگاهی انجام شد. اطلاعات بیولوژیکی نانو ذرات نشاندار حاکی از تغییر عملکرد مکانیسم دفع (افزایش مثبت دفع کلیوی) و دسترسی کامل نانوذرات به تمامی اندامهای حیاتی حیوانات آزمایشگاهی بود. با در نظر گرفتن ویژگی‌های فارماکوکینتیکی متمایز نانو ذرات طلای نشاندار نظیر توزیع مناسب در بدن، دفع سریع، پایداری ساختاری مناسب، و گردش مناسب در بدن از طریق خون، این نانوذرات نشاندار را می‌توان به عنوان یکی از گزینه‌های بالقوه و مناسب در تصویر برداری هسته‌ای *PET* جهت مقاصد تشخیصی معرفی نمود.

**کلمات کلیدی:** رادیونوکلید گالیوم-۶۸، توزیع بیولوژیکی، نانو ذرات طلا، تیوگلیکولیک اسید.

#### مقدمه:

نانو ذرات معدنی با دارا بودن یک هسته مرکزی از جنس عناصر معدنی نظیر فلزات، می‌توانند توسط یک پوشش از جنس مواد آلی پوشانده شده تا این هسته‌ها دارای خواص فلوئورسنس، مغناطیسی و الکتریکی متمایز و برتر گردند [۱]. با کوچکتر شدن اندازه این ذرات معدنی و رسیدن به محدوده مقیاس چند ده نانو و کوچکتر از آن، رفتار مغناطیسی، الکتریکی و اپتیکی این مواد به شدت تحت تأثیر قرار می‌گیرد. برای مثال نانو کریستال‌های نیکل از نظر استحکام به سختی فولاد هستند [۲] از کاربردهای نانو ذرات معدنی در حیطه پزشکی می‌توان به تشخیص پیشرفته تومورهای سرطانی (تصویر برداری) و تحویل برنامه ریزی شده و هدفمند دارو در درمان سرطان نام برد [۳]. یکی از نانو ذرات معدنی که در حوزه نانو دارو از شگفت‌انگیزترین‌ها می‌باشد، نانو ذرات طلا است. داستان استفاده از طلا در درمان به چین در ۲۵۰۰ سال قبل از میلاد بر میگردد و هنوز هم در سنت‌های درمان شرقی و نوین مورد استفاده است. در طی چند دهه



گذشته، نانوذرات طلا (GNPs) با توجه به اندازه مقیاس نانو و خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی برجسته بسیار مورد توجه بوده و هستند [۱].

شکل نانو ذرات طلا، اثر زیادی بر ویژگی‌های آن می‌گذارد مثلاً نانو ذرات کروی طلا نور را در ناحیه مرئی جذب می‌کند، نانو ذرات میله‌ای، قفسی و صدفی، نور را در ناحیه فرو سرخ نزدیک (NIR) جذب می‌کند یعنی محدوده‌ای که غالباً نور از بدن انسان عبور می‌کند. جذب در ناحیه فرو سرخ نزدیک (NIR) خیلی سودمند است چرا که در فتوترمال تراپی (به منظور تولید گرما در بافت‌های آسیب‌دیده بیمار) از آن استفاده می‌شود. ذرات طلا در میان پلت فرم‌های مطالعه شده به منظور رادیوتراپی به واسطه ضریب جذب بالای اشعه ایکس، سهولت در دستکاری و سنتز آن و در نهایت کنترل راحت‌تر تمام ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن بیشتر مطالعه شده‌اند که از آن جمله دستکاری آسانتر اندازه ذرات، شکل ذرات، سطح پوشاننده و عملکرد آن را می‌توان نام برد [۲]. از مهمترین مزیت‌های نانو ذرات طلا، غیر سمی بودن آنها و داشتن مساحت سطح بالا است که به سبب آن به راحتی برای اصلاح با مولکول‌های هدفمند یا مارکرهای زیستی خاص به منظور اهداف زیست‌پزشکی قابل استفاده هستند [۳]. نانو ذرات طلا به صورت کلوئیدی یا خوشه‌ای هستند که قطر آنها بین ۱ تا چند صد نانومتر است که شامل هسته طلا و سطوح پوشاننده است. با وجود مطالعات وسیع روی نانو ذرات طلا، عامل‌دار شدن شیمیایی آنها اغلب توسط تیول‌ها یا آمین‌ها صورت می‌گیرد. توانایی سطوح نانوذرات طلا برای متصل شدن به تیول‌ها و آمین‌ها منجر به تولید یک راه مناسب برای تولید گروه‌های عاملی واکنشگر می‌شود که برای نشاندار کردن (مانند پروب‌های تصویر برداری)، هدف قرار دادن (مانند آنتی‌بادی‌ها یا پپتیدها) و کونژوگاسیون عوامل درمانی (مانند داروها، رادیو نوکلئیدها) می‌توانند استفاده شوند [۴]. نانو ذرات طلا به علت داشتن عدد اتمی بالا، چگالی الکترون بالا و ضریب جذب بیشتر از ید، سبب افزایش کنتراست توموگرافی کامپیوتری نسبت به ید می‌شود و بدین ترتیب می‌توانند به عنوان پروب‌های مولکولی در توموگرافی کامپیوتری اشعه ایکس استفاده شوند [۵]. توزیع زیستی نانو ذرات در بدن بسته به نوع رادیو نوکلئید و همچنین گروه‌های عاملی سطوح نانو ذرات متفاوت است. همچنین مکانیسم دفع این نانومواد در بدن بسیار وابسته به میزان آبدوستی این مواد می‌باشد. لذا در این تحقیق با اصلاح سطح نانوذرات طلا با تیوگلیکولیک اسید به بررسی عملکرد این نانوذرات در حضور این عامل می‌پردازیم.

## روش کار :

رادیونوکلید گالیوم-۶۸ از ژنراتورهای ژرمانیوم-۶۸/گالیوم-۶۸ با اکتیویته ۳۵ میلی کوری تولید شده در سازمان انرژی اتمی ایران (شرکت پارس ایزوتوپ) تهیه شد. تمامی حلالها و مواد شیمیایی عمومی از شرکت سیگما تهیه شد. موش صحرائی نرمال از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. از آنالیز میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) برای مطالعه اندازه ذرات طلا استفاده شد. نانوذرات طلا با روش کاهش  $\text{HAuCl}_4$  با تری سدیم سیترات تهیه شدند. بدین منظور، ۲۵ میلی لیتر از محلول



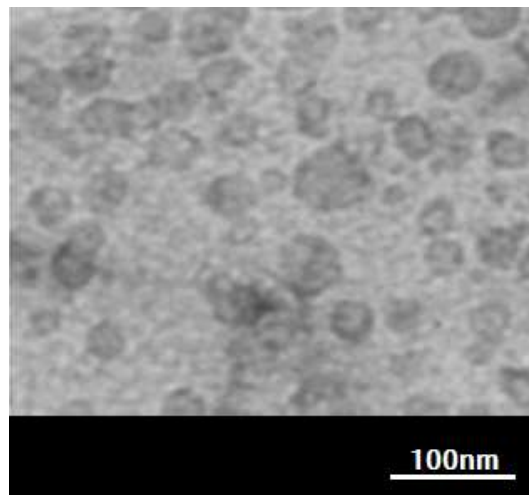
تری سدیم سیترات (۴۰ میلی مولار) به ۲۵۰ میلی لیتر از محلول یک میلی مولار  $\text{HAuCl}_4$  در حال رفلاکس اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه رفلاکس ادامه داده شد تا رنگ محلول از زرد کم‌رنگ به قرمز تغییر نماید. بعد از آن، به محلول در حال هم‌زده شدن اجازه داده شد به آرامی سرد شود. به ناو ذرات تشکیل شده ۲۰ میکرولیتر از محلول ۱۰ میلی مولار تیوگلیکولیک اسید اضافه شد و به مدت ۶ ساعت در دمای محیط هم زده شد. ۲ میلی لیتر محلول اسیدی گالیوم-۶۸ کلراید (۵ میلی کوری رادیو اکتیویته) به ویال ۳ میلی لیتری بوروسیلیکاتی انتقال داده شد. سپس جهت خارج کردن اسید کلریدریک، ظرف واکنش در دمای ۵۰-۶۰ درجه سانتی گراد حرارت داده شد و با بکارگیری جریان گاز نیتروژن، محلول خشک گردید. ۱۵۰ میکرولیتر از محلول ۱ میلی گرم بر میلی لیتر نانوذرات طلا، به ظرف واکنش اضافه شد و pH مخلوط توسط بافر استات (۴۵۰ میکرو لیتر) در محدوده ۵/۵ تا ۶ تنظیم شد. مخلوط حاصل به مدت ۲۴ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد هم‌زده شد. سپس محصول نهایی از میان یک فیلتر ۰/۲۲ میکرونی برای جداسازی ناخالصی های بیولوژیک و غیر بیولوژیک عبور داده شد و pH نهایی محصول مجدداً بین ۵/۵ تا ۷ تنظیم شد. بعد از تهیه نانوذرات نشاندار طلا عاملدار شده با تیوگلیکولیک اسید با گالیوم-۶۸، برای بررسی خلوص رادیوشیمیایی و مشاهده درصد نشاندارسازی (نسبت نانوذرات نشاندار طلا با گالیوم-۶۸ به گالیوم-۶۸ کلراید) و همچنین انجام تست های پایداری آن، از روش رادیوکروماتوگرافی لایه نازک رادیواکتیو (RTLC) استفاده گردید [۱۱]. برای این منظور یک نمونه ۱۰ میکرولیتری از محلول نهایی، روی یک کاغذ واتمن شماره ۲ به عنوان فاز ثابت کروماتوگرافی، لکه گذاری شد. سپس کاغذ در ظرف حاوی فاز متحرک، دی تی پی ای ۰/۱ میلی مولار، قرار داده شد. پس از مهاجرت کامل (۱۰ سانتی متر) فاز متحرک، کاغذ واتمن از ظرف خارج و خشک گردید. سپس توسط یک دستگاه اسکنر RTLC محل رادیواکتیویته خوانش گردید. به منظور بررسی پایداری نانوذرات نشاندار طلا عاملدار شده با تیوگلیکولیک اسید با گالیوم-۶۸ 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 رادیوشیمیایی توسط RTLC مورد بررسی قرار گرفت. تصاویر هسته ای در ۳۰، ۴۵، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه بعد از تزریق نانوذرات نشاندار طلا عاملدار شده از طریق ورید دمی موش، با استفاده از یک سیستم تصویربرداری هسته ای PET تهیه شدند. توزیع بیولوژیکی کمپلکس نشاندار بین بافت ها برای موش صحرائی نرمال بلافاصله بعد از تصویربرداری تعیین شد. مقدار کلی رادیواکتیویته تزریق شده به هر موش ۰/۱ میلی لیتر بود. در ۳۰، ۴۵، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه بعد از تزریق نانوذرات نشاندار طلا، 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 آن ها توسط یک دستگاه آشکارساز فوق خالص ژرمانیم (HPGe) شمارش شد.



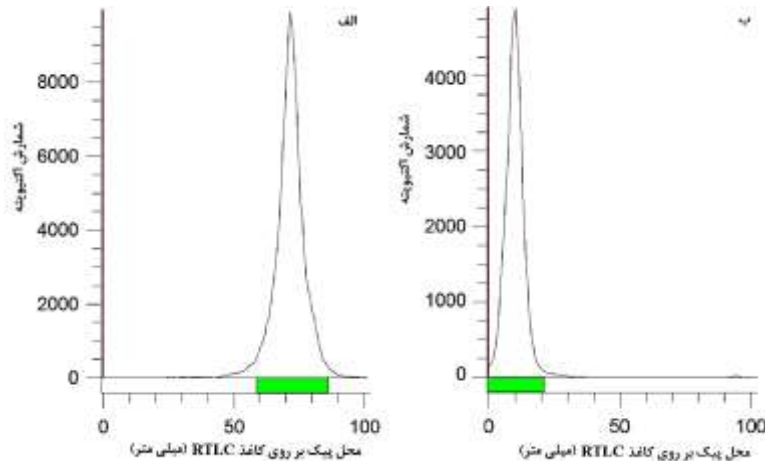
میزان اکتیویته بافت ها به صورت واحد درصد دوز تزریق شده بر گرم بافت (میزان کل اکتیویته تزریقی \* وزن بافت / درصد میزان اکتیویته در بافت = %ID/g) بیان گردید.

### نتایج :

همانطور که در تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از ذرات طلا عاملدار شده با تیوگلیکولیک اسید در شکل ۱ نشان داده شده است، ذرات کروی طلا با اندازه ذرات کمتر از ۵۰ نانومتر (میانگین اندازه ۳۵ نانومتر) تشکیل شده است. مولکول های تیوگلیکولیک اسید با اتصال به سطح نانو ذرات طلا علاوه بر کمک به پایداری نانو ذره طلا، به عنوان یک لیگاند دودندانه عمل نموده و با اتم های گالیوم-۶۸ نیز تشکیل کمپلکس می دهند. برای بررسی میزان نشاندارسازی نانو ذرات طلا از تکنیک RTLC استفاده شد. در آزمایش RTLC گالیوم آزاد با واکنش با DTPA به Rf بالاتر جابجا شد (۰/۶)، این در حالی است که نانو ذرات نشاندار قابلیت اتصال به لیگاند DTPA را نداشته و در محل نقطه گذاری (0=Rf) باقی می ماند (شکل ۲). تکنیک RTLC، تشکیل نانو ذرات نشاندار شده با خلوص ۹۸٪ 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-۶۸ آزاد دیده نشد.



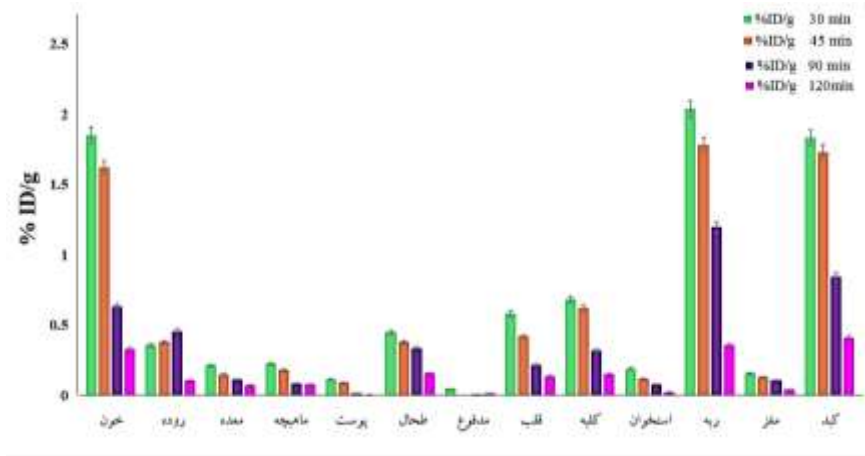
شکل ۱. تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری از نانو ذرات طلا عاملدار شده با تیوگلیکولیک اسید



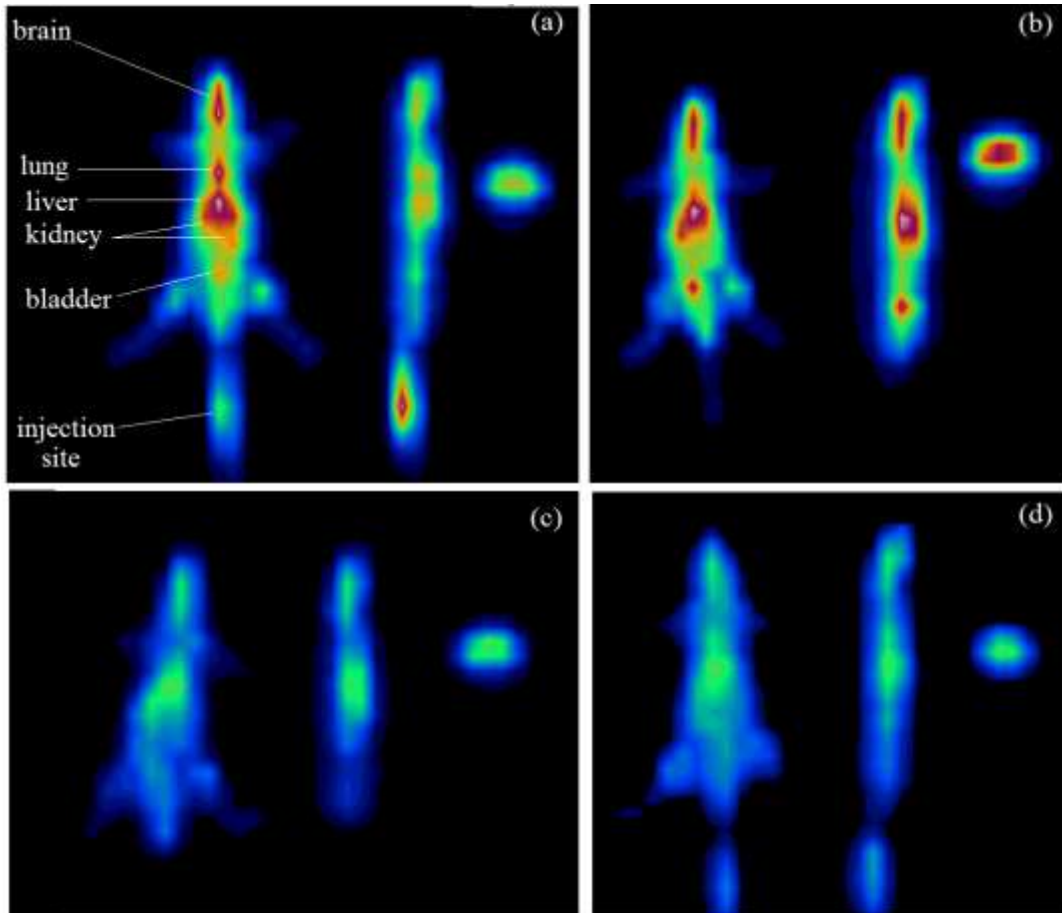
شکل ۲. رادیوکروماتوگرام ترکیب گالیوم-۶۸ کلرید (الف) و نانوذرات نشاندار طلا با گالیوم-۶۸ (ب)

### بحث و نتیجه گیری :

توزیع زیستی نانو ذرات در بدن حیوانات مورد آزمایش بسته به نوع رادیو نوکلئید (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 طلای نشاندار در تمام زمان‌ها در جریان خون، پراکنش قابل توجهی را به خود اختصاص داده است (شکل ۳). با توجه به اهمیت مقاصد تشخیصی - درمانی نانو ذرات دارویی، ماندگاری مناسب در جریان خون، یک فاکتور مثبت تلقی می‌شود. میزان جذب در کبد در تمامی زمان‌های آزمایش، به جهت متابولیسم دفع کبدی، بالا است که این حقیقت در مورد تمامی نانومواد صدق می‌نماید. نکته جالب توجه در مورد این نانوذرات آغاز دفع سریع کلیوی به واسطه حضور گروه‌های عاملی آبدوست می‌باشد که این امر با تجمع رادیواکتیویته در کلیه‌ها و مثانه ۳۰ دقیقه پس از تزریق رادیودارو مشاهده شد. کاهش میزان رادیو اکتیویته در تصاویر مربوط به زمان‌های ۹۰ دقیقه و ۱۲۰ دقیقه مشهود است (شکل ۴) و این امر به واپاشی (زوال) رادیونوکلید گالیوم-۶۸ مربوط است که از مزایای این رادیودارو است. علت این مزیت نیز میزان کمتر دوز جذب شده اشعه‌های یونیزان توط بیمار است. 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 سرطان‌های مغز نشان می‌دهد. همه این عوامل این ترکیب نشاندار را برای مقاصد تصویربرداری PET و مطالعات آینده تشخیص و درمان سرطان به عنوان یک ترکیب امیدوار کننده معرفی می‌نماید.



شکل ۳. نمودار توزیع زیستی نانوذرات نشاندار طلا در اندام‌های حیاتی در ۳۰، ۴۵، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه بعد از تزریق از طریق ورید دم‌می موش



شکل ۴. تصاویر هسته‌ای PET در ۳۰، ۴۵، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه بعد از تزریق نانوذرات نشاندار طلا از طریق ورید دمی موش با در نظر گرفتن ویژگی‌های فارماکوکینتیکی متمایز نانو ذرات طلای نشاندار نظیر توزیع مناسب در بدن، دفع سریع، پایداری ساختاری مناسب، و گردش مناسب در بدن از طریق خون، این نانوذرات نشاندار را می‌توان به عنوان یکی از گزینه‌های بالقوه و مناسب در تصویر برداری هسته‌ای PET جهت مقاصد تشخیصی معرفی نمود. تمامی آزمایش‌ها در پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای انجام گردیده است.

مرجع‌ها

- i. Paul W., P.Sharma C., in book; Biointegration of Medical Implant Materials, chapter 8-Inorganic nanoparticles for targeted drug delivery, Woodhead Publishing Series in Biomaterials 2010, Pages 204-235.





i . Drexler, K.E., in book; Nanosystems. Molecular machinery, manufacturing and computation, chapter 10-Nanoscale Structural Components. 1992.

, Novel aspects of application of cadmium . Feizi S ., Rahighi R ., Karimi S.H , Zare. Fazaeli Y.i telluride quantum dots nanostructures in radiation oncology, Applied Physics A, 123, 2007, 507.

i . Fazaeli Y.,vHosseini M. A., Afrasyabi M., Ashtari P., <sup>68</sup>Ga@ pyridine-functionalized MCM-41 mesoporous silica: a novel radio labeled composite for diagnostic applications, Radiochimica Acta, 107, 2018, Pages 157–164.

v . Yeh Y., Creran B., Rotello V., Gold Nanoparticles: Preparation, Properties, and Applications in Bionanotechnology, Nanoscale. 21, 2012, 1871–1880.

v . Bali K., Sáfrán G., Pécz B., Mészáros R., Preparation of Gold Nanocomposites with Tunable Charge and Hydrophobicity via the Application of Polymer/Surfactant Complexation, ACS Omega, 2(12), 2017, 8709–8716.

v . Guo, Q., Guo Q., i Zeng J., Biosynthesis of gold nanoparticles using a kind of flavonol: Dihydromyricetin. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 441, 2014, 132.

v . Fazaeli Y., Akhavan O.i Rahighi R., Aboudzadeh M., Karimi E., Afarideh H., In vivo SPECT imaging of tumors by <sup>198,199</sup>Au-labeled graphene oxide nanostructures, Materials Science and Engineering: C, 45, 2014, 196-204.

i . Fazaeli Y., Amini MM., Ashourion H., Heydari H., Majdabadi A., Jalilian A.R., Grafting of a novel gold (III) complex on nanoporous MCM-41 and evaluation of its toxicity in Saccharomyces cerevisiae, International journal of nanomedicine, 6, 2010, 3251.

x. Stobiecka, M., M. Hepel, Double-shell gold nanoparticle-based DNA-carriers with poly-L-lysine binding surface. Biomaterials, 32, 2011, 3312-3321.