

Investigating the application of graphene quantum dots doped with heteroatoms as a contrast agent in magnetic resonance imaging system

Morteza Mollazadeh¹, Farshid Babapour Mofrad², Ashraf Fakhari³, Ali Jamali Nazari⁴, Tohid Mortazazadeh⁵

¹ Ph.D. Student of Department of Medical Radiation Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Associate Professor, Department of Medical Radiation Engineering, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

³ Assistant Professor, Department of Nuclear Medicine, Faculty of Medical Sciences, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Engineering, Shahrood Branch, Islamic Azad University, Shahrood Branch, Shahrood, Iran

⁵ Assistant Professor, Department of Medical Physics, Faculty of Medical Sciences, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Abstract

Background: Contrast agents used in MRI are mostly based on metallic elements such as gadolinium and are toxic. The present study aims to prepare a non-metallic and non-toxic nanoparticle based on quantum dots carbon, which can be used as a non-metallic and non-toxic contrast agent in MRI.

Materials and methods: The cytotoxicity of nanoparticles (PN-GQDots) against MCF-7 and MCF-10A cells was investigated using the MTT method. The value of longitudinal relaxation r_1 in the phantom model was calculated using MRI imaging with spin-echo protocol. The ability of nanoparticles to penetrate into cancer cells was determined using MRI imaging.

Results: Cytotoxicity assay results showed no significant decrease in cell viability with different concentrations of NPs for the incubation period of 24 hours. With MRI imaging in the phantom environment, $r_1=4.49$ was obtained for the synthesized nanoparticle, which was a significant increase compared to the dotarem material ($r_1=2.54$). The results of animal imaging showed the ability of nanoparticles to create a difference in the contrast of the images before and after the injection of the contrast agent.

Conclusion: The results exhibited low cytotoxicity of the PN-GQDots nanoparticles in the given concentration range, which is essential for MRI imaging and further biological *in vitro* and *in vivo* applications. According to the results of the animal study, these nanoparticles can be considered as a positive and non-toxic contrast agent, which minimizes the concern about the toxicity of this medical system due to the absence of metal compounds in the structure of this compound.

Keywords: Graphene quantum dots, MRI, Cytotoxicity.

Cited as: Mollazadeh M, Babapour Mofrad F, Fakhari A, Jamali Nazari A, Mortazazadeh T. Investigating the application of graphene quantum dots doped with heteroatoms as a contrast agent in magnetic resonance imaging system. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2024; 34(3): 245-254.

Correspondence to: Farshid Babapour Mofrad

Tel: +98 09121442360

E-mail: Babapour@srbiu.ac.ir

ORCID ID: 0000-0002-5892-7971

Received: 14 Oct 2023; **Accepted:** 20 Jan 2024

بررسی کاربرد نقاط کوانتمی گرافنی دوپه شده با هیترواتم‌ها به عنوان عامل کنتراست زا در سیستم تصویربرداری تشدید مغناطیسی

مرتضی ملازاده^۱، فرشید باباپور مفرد^۲، اشرف فخاری^۳، علی جمالی نظری^۴، توحید مرتضی زاده^۵

^۱دانشجوی دکترا مهندسی پرتوپزشکی، دانشکده فنی و مهندسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
^۲دانشیار، گروه مهندسی پرتوپزشکی، دانشکده فنی و مهندسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۳استادیار، گروه طب هسته ای، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۴استادیار، گروه مهندسی پزشکی، دانشکده فنی و مهندسی، واحد شاهروود، دانشگاه آزاد اسلامی، شاهروود، ایران

^۵استادیار، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

چکیده

سابقه و هدف: عوامل کنتراست زا مورد استفاده در MRI اکثرا بر پایه عناصر فلزی مانند گادولنیوم بوده و سمی هستند. مطالعه حاضر با هدف تهیه نانوذره ای غیرفلزی و غیرسمی بر پایه کربن کوانتوم داتها بود که می تواند به عنوان یک عامل کنتراست غیرفلزی و غیرسمی در MRI مورد استفاده قرار گیرد.

روش بررسی: سمیت سلولی نانوذرات (*PN-GQDots*) در برابر سلولهای *MCF-7* و *MCF-10A* با استفاده از روش *MTT* بررسی شد. مقدار آسودگی طولی *r1* در مدل فانتوم با استفاده از تصویربرداری MRI با پروتکل اسپین-اکو، محاسبه شد. توانایی نفوذ نانوذرات به داخل سلولهای سرطانی با استفاده از تصویربرداری MRI انجام گرفت.

یافته‌ها: نتایج سنجش سمیت سلولی نشان دهنده هیچ کاهش معنی داری در میزان زنده ماندن سلول با غلظت های مختلف NPs برای مدت زمان انکوباسیون ۲۴ ساعت نبود. با تصویربرداری MRI در محیط فانتوم مقدار *r1=4/49* برای نانوذره سنتز شده به دست آمد که نسبت به ماده دوتارم (*r2=2/54*) افزایش قابل توجهی داشت. نتایج تصویربرداری حیوانی توانایی نانوذرات برای ایجاد اختلاف در کنتراست تصاویر قبل و بعد از تزریق ماده کنتراست زا را نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که نانوذرات (*PN-GQDots*) سمیت سلولی کمی در محدوده غلظت مورد بررسی دارند، که برای تصویربرداری MRI و کاربردهای بیولوژیکی در شرایط آزمایشگاهی و درون تنی ضروری است. با توجه به نتایج مطالعه حیوانی این نانوذرات می توانند به عنوان یک ماده کنتراست زا مثبت و غیرسمی مورد توجه قرار گیرند که به دلیل عدم وجود ترکیبات فلزی در ساختار این ترکیب، نگرانی در مورد سمیت این سامانه دارویی به حداقل می رسد.

وازگان کلیدی: نقاط کوانتمی گرافنی، MRI، سمیت سلولی.

مقدمه

امروزه تصویربرداری مولکولی به سرعت گسترش یافته و نقش اساسی در بخش پژوهشی و کاربردی علوم زیستی دارد. تصویربرداری مولکولی حدفاصل علوم زیستی و فیزیک است و نگاهی جدید به تحقیقات بیومدیکال به منظور مشاهده و مانتیورینگ پروسه‌های بیولوژی در سلول‌ها، بافت‌ها و ارگانیسم‌ها با استفاده از مدل‌آلات‌های حساس و دقیق و همچنین مکانیسم‌های کنتراست زایی هست که به تشخیص

آدرس نویسنده مسئول: تهران، گروه پرتوپزشکی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، فرشید باباپور مفرد (email: Babapour@srbiau.ac.ir)

ORCID ID: 0000-0002-5892-7971

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۷/۲۲

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۱۰/۳۰

از جمله بمنظور اهداف داروسانی، تصویربرداری و درمان انواع بدخیمی‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. به دلیل تابش نور عالی، سمیت سلولی کم، نواحی سطحی بیشتر و بهره کوانتموی GQDs بالاتر، ساخت آسان، زیست سازگاری خوب، GQDs ساختارهای ارجح نسبت به QDs هستند. درواقع GQD نسل جدیدی از گرافن اکسید شده با درجه بالاتر نسبت به اکسیدهای نسل قبلی است. نقاط کوانتمی گرافنی (GQDs) Zero-Dimensional که در واقع به صورت ساختارهای کربنی با ابعاد جانبی کمتر از ۱۰۰ نانومتر و ضخامتی با کمتر از ۱۰ لایه کربنی هستند، در زمینه‌های تصویربرداری زیستی (bio imaging)، بر اساس ویژگی‌های فتولومینیسانس، مورد توجه قرار گرفته‌اند (۵-۹). همچنین بررسی‌های سمیت سلولی برای این مواد بر روی سلول‌های خونی و برخی از رده‌های سلولی معمول، حاکی از غیر سمی بودن GQDs (در مقایسه با نانو ساختارهایی با خواص مشابه)، در راستای تصویربرداری در محیط *in vivo* هستند که موجب گسترش استفاده از خواص نوری این مواد در امور تصویربرداری در ۱۰ سال گذشته شده است (۱۰-۱۲). حساسیت نقاط کوانتمی مبتنی بر پایه گرافن وابسته به عملکرد کوانتمی است که مربوط به تعداد لایه‌های نقاط کوانتمی و مواد دوپانت شده به آنهاست. دوپانت نقاط کوانتمی گرافنی با هیدرواتمهای مانند اتمهای S, N, P, B, Ne تنها می‌تواند نورهای تابشی را تقویت کند بلکه باعث افزایش عملکرد کوانتمی و در نتیجه باعث افزایش حساسیت آنها می‌شود (۱۳-۱۵).

هنگامی که هیترواتمهای ماده کربنی رها می‌شوند باعث انتقال آنها به مواد نیمه هادی نوع $n-p$ به خاطر انتقال الکترون‌ها بین مواد میزان و دوپانتها و پیوند اتمهای کربن و اتمهای مشابه است. اتمهای دوپانت روی مولکول‌های داخلی الکترون، قطبش پذیری، محتوای نفایص و ساختار باند انرژی را تغییر می‌دهند (۱۶-۱۸). به طور کلی پیوندهای دو قطبی کربن با هیترواتمهای ماده عنوان مراکز پارامغناطیسی بوده و عامل تولید سیگنال در سیستم تصویربرداری تشید مغناطیسی است (۱۹-۲۱).

هدف کلی از این پژوهش، تهیه ماده کنترast بدون یون‌های فلزی در مقیاس نانو و بررسی کاربرد آن به عنوان یک ماده کنترast ساز در سیستم تصویربرداری تشید مغناطیسی (MRI) بود.

دقیق تر بیماری‌ها از جمله سرطان‌ها و اختلالات عصبی و همچنین کمک قابل توجهی در طراحی درمان با استفاده از اطلاعاتی که در سطح سلولی و فیزیولوژیکی بافت‌ها و درجه تومور در اختیار کاربر قرار می‌دهد (۱). مواد کنترast زای مرسوم مورد استفاده برای MRI در کلینیک دارای مقیاس بزرگ‌تر بوده و تصویربرداری در سطح ملکولی با استفاده از این ترکیبات فراهم نمی‌شود. این ترکیبات در روش‌های تصویربرداری تشخیصی بطور یکنواخت در کل بدن توزیع می‌گردد و به صورت هدفمند در ناحیه مورد نظر برای تصویربرداری تجمع نمی‌کنند که باعث کاهش غلظت ترکیب در بدن شده و نیاز به تزریق با d^* بالا و حتی تزریقات بیشتر می‌باشد که نگرانی‌های مربوط به سمیت بخصوص در مورد ترکیبات کنترast مثبت گادولینیوم‌دار در بیماران نارسایی کلیوی مطرح است (۲). بنابراین نیاز به طراحی و سنتز مواد کنترast‌زا در مقیاس نانو است تا بتوان با تزریق d^* کمتری فرایند تصویربرداری را انجام داده و بدین ترتیب نگرانی در مورد سمیت مواد کنترast زای تزریقی هم به کمترین مقدار خود می‌رسد. یکی از مشکلات عمدۀ در مورد مواد کنترast مرسم در کلینیک، دفع سریع از طریق سیستم ادراری است که باعث می‌شود متوسط زمان چرخش در سیستم گردش خون در حدود ۲۰ دقیقه است که استفاده از این ماده را برای تمامی ارگان‌ها محدود می‌کند.

نانوذرات پارامغناطیسی (NPs) به طور گستردۀ در دهه‌های گذشته به عنوان عوامل کنترast‌زا بالقوه (CAs) برای MRI مورد بررسی قرار گرفته اند تا بر محدودیت عمر کوتاه و حساسیت پایین و نگرانی‌های اینمی عوامل کنترast مبتنی بر Gd، از جمله نارسایی‌های کلیوی غلبه کنند (۲). اگر چه می‌توان با کپسوله کردن عوامل کنترast زای فلزی، میزان آزاد شدگی یونهای فلزی را کاهش داده و سمیت را به حداقل رسانید، ولی با تحریب ترکیبات شلات کننده، ممکن است یونهای فلزی در محیط اطراف آزاد شده و منجر به عوارض و بروز سمیت شوند (۳). بنابراین لزوم توسعه عوامل کنترast زای غیر فلزی در تصویربرداری MRI با حساسیت و ویژگی‌های قابل مقایسه یا برتر نسبت به عوامل کنترast زای فلزی مرسوم، ضروری است. همچنین سازمان دارو و غذا (FDA)، اخیرا هشدار اینمی در مورد رسوب طولانی احتمالی عوامل کنترast بر پایه Gd در بافت مغز و کلیه‌ها را صادر کرده است (۴). طی دهه گذشته کوانتم دات‌ها (QDs) و طی سالیان اخیر گرافن کوانتم دات‌ها (GQDs) از جمله نانو موادی بودند که در زمینه‌های مختلف تحقیقاتی داروسازی و پزشکی

جهت بررسی های سلولی از مواد فهرست شده در جدول ۱ استفاده شد.

جدول ۱. مواد مورد استفاده برای بررسی های سلولی	
نام ماده	شرکت
رده سلولی تومورال پستان انسانی اپیتیال	استیتو پاستور ایران (MCF-7)
رده سلولی غیر تومورال پستان انسانی اپیتیال	استیتو پاستور ایران (MCF-10A)
Sigma Aldrich	محیط کشت سلولی RPMI
Sigma Aldrich	محیط کشت سلولی DMEM
Gibco	سرم جنبن گاوی (FBS)
Biosera	پنی سیلین/ استریوتومایسین
Dulbecco	فسفات سالین بافر(PBS)
Merck Chemicals	تریپسین

بررسی میزان آسودگی طولی نانوذرات سنتز شده

برای تعیین کاربرد بالقوه نانوذرات (PN-GQDots) به عنوان ماده کنتراست زای MRI، دستگاه MRI مورد استفاده برای اندازه گیری زمان آسایش نانوذرات سنتز شده اسکنر 3T مرکز ملی تصویربرداری مغزی دانشگاه علوم پزشکی تهران (Prisma، Siemens Healthcare, Erlangen, Germany) و اطلاعات توسط کویل سر برای اندازه گیری زمان آسایش فراهم شده است. با توجه به اینکه نمونه سنتز شده عامل کنتراست T_1 است. برای به دست آوردن زمان آسایش طولی T_1 و متناسب با آن توانایی آسایش طولی T_2 از پروتکل تصویربرداری اسپین-اکو بر حسب TR های مختلف برای غلظتهای مختلف PN-GQDs و دوتارم MRI (Dotarem) به عنوان ماده کنترل (ماده کنتراست تجاری MRI تایید شده) در مدل فانتوم انجام شد. با استفاده از روش چند نقطه‌ای و با برازش خطی منحنی نمایی بر شدت سیگنال برای چندین TR مختلف و برای غلظتهای مختلف از نمونه‌ها و به ازای ثابت مقادیر T_1 و T_2 برای نمونه محاسبه شد. مشخصات پروتکل مورد استفاده به صورت زیر بود:

TR=50, 200, 400, 600, 800, 1100, 1300, 1500, 1800, 2000ms, TE=11ms
Slice Thickness=5mm, FOV=250mm×250mm, Matrix Size=256×256
نانوذره سنتز شده و دوتارم به عنوان ماده کنترل با غلظت-های ۰/۰۲، ۰/۰۴، ۰/۰۸، ۰/۱۶، ۰/۳۲ و ۰/۶۴ میلی مولار (mM) در داخل ژل آگارز فراهم شد.

تصویربرداری MRI بصورت *in vitro*

برای بررسی نفوذ نانوذرات به داخل سلول‌ها و تأیید توانایی هدف‌گیری سلول‌های سرطانی نانوذرات (PN-GQDots)، از

مواد و روشها

نمونه های نقاط کوانتمی گرافنی دوپه شده با فسفر و نیتروژن (PN-GQD)، با روش سنتز هیدروترمال پایین به بالا در دستگاه سنتز میکروسنتز با استفاده از مواد اولیه تهیه شده از شرکت MERK با خلوص بالا و بدون خلوص سازی بیشتر سنتز شدند. برای سنتز نمونه‌ها ۱۵mgr آسید اسیتیک، ۳cc آمونیاک ۲۵ درصد و ۱cc آسید فسفوک و ۱۰cc آب مقطر در سلول میکروویو دستگاه میکروسنتز با هم مخلوط شده و با آهنگ دمایی ۳۸ درجه سانتیگراد بر دقیقه از دمای ۱۲۰ تا ۱۵۵ درجه سانتیگراد و تحت فشار ثابت ۱۰۰۰ پاسکال به صورت گام به گام انجام شد. پس از آن محلول حاصل دوبار در اتانول حل شد و با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ خالص سازی PN-GQD سنتز شده انجام شد. سپس رسوب محصول جمع آوری شد و پس از خشک کردن نمونه های سنتز شده مشخصه یابی (TEM,XRD,FTIR,XPS,TGA) روی نمونه‌ها انجام شد.

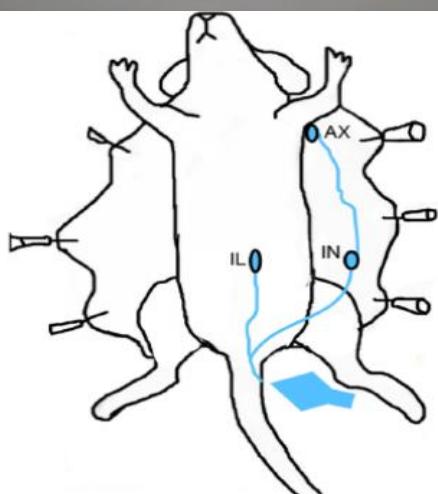
بررسی سمیت سلولی

برای بررسی سمیت سلولی نمونه‌های سنتز شده، سلول‌های MCF-7 و MCF-10A به ترتیب به عنوان رده‌های سلولی تومورال و سالم پستان در پلیت ۹۶ خانه به مدت ۲۴ ساعت در شرایط انکوباسیون با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ دی اکسید کربن انکوبه شدند. بعد از یک شبانه روز انکوباسیون محیط کشت سلولها تخلیه و سلولها تحت محیط کشت تازه حاوی نانوذرات سنتز شده (PN-GQDs) در غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۰۲، ۰/۰۳، ۰/۰۴ و ۰/۰۵ میکروگرم بر میلی لیتر قرار گرفتند. ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از انکوباسیون، محیط کشت سلول‌ها خارج گردید و سلول‌ها سه مرتبه توسط PBS شستشو داده شدند. سپس ۲۰ میکرو لیتر MTT و ۲۰۰ میکرو لیتر محیط کشت بدون FBS به هر چاهک اضافه شد. با توجه به اینکه FBS حاوی پروتئین است، برای جلوگیری از انسداد کانال‌های غشای سلول محیط کشت بدون FBS افزوده شد. در این مرحله از یک ورقه آلومینیوم به منظور جلوگیری از ورود نور به پلیت و جلوگیری از ایجاد واکنش نور با MTT استفاده شد. سپس سلول‌ها در درون انکوباتور برای مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. پس از ۴ ساعت محیط کشت درون پلیت‌ها تخلیه شد و ۲۰۰ میکرو لیتر DMSO (به منظور تخریب غشای سلول) به هر چاهک اضافه گردید. در نهایت جذب نوری محلول بدست آمده را می‌توان در طول موج 570nm توسط میکروپلیت ریدر قرائت کرد و با معادله زیر به سلول‌های کنترل تیمار نشده نرمال شد:

$$\text{Survival fraction (\%)} = \left(\frac{\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{Blank}}}{\text{OD}_{\text{Control}} - \text{OD}_{\text{Blank}}} \right) \times 100$$

Fast Spin Echo, TR= 800ms, TE= 8/6ms, NEX= 5, Flip angle= 150°, Matrix= 192×128, FOV= 10mm×11mm, Slice Thickness= 2mm, BW= 10 KHz

قسمت مورد بررسی، ناحیه تومورال ناحیه فلانک پای چپ موش بود. این حیوانات در حین تصویربرداری در وضعیت خوابیده به پشت ثابت شدند و دقت کامل برای رعایت تقارن کامل بدن حیوان انجام شد. حیوان بین دو صفحه کویل و با حداقل فاصله ممکن از کویل قرار می‌گرفت. بدین ترتیب بیشینه سیگنال قابل دستیابی بود. در مطالعات مختلف، تزریق نانوذرات بهصورت داخل وریدی (IV) انجام شد. درحالی که در تمامی مطالعات حیوانی، قوانین اخلاقی مربوط به کار با حیوانات بر اساس پروتکل CCAC مراعات گردید. (کد اخلاقی مربوط به این کار پژوهشی: IR.TABZMED.AEC.1402.049 ، مطالعات کمی تصاویر بر اساس اندازه‌گیری پارامتر شدت Signal اندازه‌گیری شد. در شکل ۱، نحوه تزریق و همچنین قرارگیری حیوان در حین تصویربرداری نشان داده شده است.



شکل ۱. طرز قرار گرفتن موش و بیهوشی آن و طرح و دیاگرام تزریق نانوذرات به موش

تصویربرداری تشدید مغناطیسی استفاده شد. برای این منظور، با تیمار سلول‌های MCF-7 و MCF 10A (5×10^6 سلول در هر چاه) با غلظت‌های مختلف (۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از نانوذرات سنتز شده (PN-GQDots) به مدت ۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، انکوبه شدند. تا مشخص شود که NP ها نوع خاصی از سلول‌ها را هدف قرار می‌دهند یا خیر. قبل از تصویربرداری MR، بعد از گذشت ۶ ساعت سلولها با استفاده از محلول بافر (PBS) سه بار شستشو داده شد و در ویلهای مخصوص با تراکم سلولی 1×10^6 سلول در میلی‌لیتر تحت تصویربرداری MRI قرار گرفتند. تصویربرداری MRI با استفاده از پروتکل تصویربرداری اسپین-اکو با پارامترهای زیر انجام گرفت: TR/TE = 500/12 ms, 220 × 320 matrices, 82 × 120 mm field of view, 140 Hz/Px of bandwidth, and a slice thickness of 3 mm

آزمایش‌های درون تنی برای آشکارسازی بافت توموری

یکی از اهداف پژوهه آشکارسازی بافت توموری در موش‌های حامل تومور است. که جهت اثبات موثر بودن ترکیبات سنتز شده اقدام به تولید مدل حیوانی شد. حیوانات مورد استفاده، موش‌های سوری بزرگ نر سالم با وزن ۲۰-۳۰ گرم بودند. بدین ترتیب که سه میلیون سلول از نوع تومور پستانی موش $4T_1$ بهصورت زیر چلدری در ناحیه فلانک پای چپ به حیوان تزریق گردید. بعد از ۲ هفته از تزریق سلول‌ها که یک توده‌ی سرطانی با حجم $1 \times 1 \times 1$ mm³ میلی‌متر مشاهده شد، ماده کنتراست با دوز ۰.۱ mmol NPs/Kg وزن موش از طریق ورید دمی به حیوان تزریق شد و تصویربرداری قبل از تزریق ماده کنتراست و در زمان‌های مختلف پس از تزریق انجام گرفت. برای به دست آوردن دز مورد نظر از نانوذرات، سوسپانسیون نانوذرات با استفاده از آب رقیق شد. موش‌ها به صورت تصادفی در سه گروه که هر گروه شامل ۵ موش است تقسیم‌بندی می‌شود. گروهی که Dotarem تزریق شده به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. این موش‌های آزمایشگاهی قبل از تزریق مواد کنتراستزا با استفاده از اتیل اتر تحت بیهوشی سطحی قرار گرفتند و قبل از تصویربرداری MRI بیهوشی عمیق و طولانی با استفاده از مخلوط کتابتامین با دز ۱۵mg/kg و زایلazin با دز ۰/۸mg/kg برای این موش‌ها انجام شد. سپس با پروتکل مشخص از هر سه گروه تصویربرداری به عمل آمد.

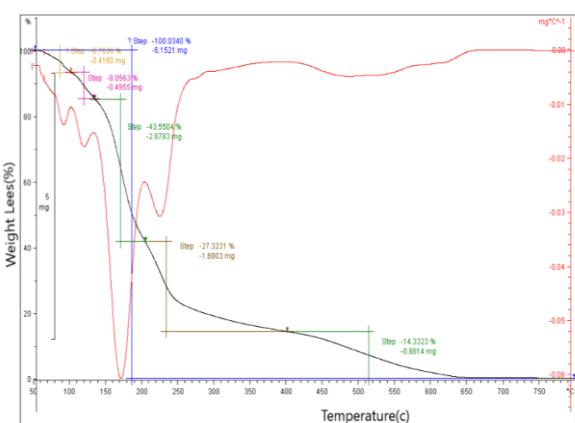
تصویربرداری با دستگاه MRI ۳ تسلا Prisma، Siemens (Healthcare, Erlangen, Germany) در مرکز ملی نقشه‌برداری مغزی با استفاده از کویل سر ۶۴ کاناله و با پروتکل تصویربرداری زیر انجام گرفت.

یافته‌ها

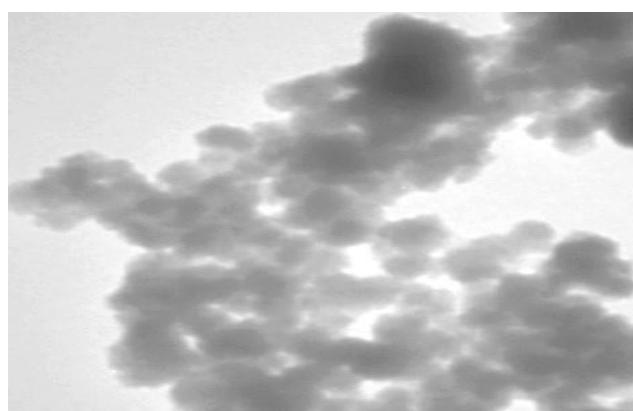
ساختار مورفولوژی نانوذرات سنتز شده به وسیله میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) مورد بررسی قرار گرفت. در شکل ۲، تصویر TEM نمونه سنتز شده نشان داده شده است که نشان دهنده این است که اندازه متوسط نانوذرات سنتز شده در حدود ۵-۱۵nm است. در این تصویر ساختار کروی ذرات و همچنین اندازه یکنواخت آنها قابل مشاهده است که با پیوندهای هیدروژنی با هم برهمنکش کرده و به حالت تجمعی در تصویر مشخص شده‌اند.

شکل ۳. نمودار آنالیز FTIR نمودار مربوط به نمونه سنتز شده (PN-GQD)

با استفاده از آزمون آنالیز حرارتی به منظور بررسی خواص فیزیکی یک ماده به عنوان تابعی از دما استفاده شد. در شکل ۴، طیف آنالیز TGA برای نمونه سنتز شده (PN-GQD) نشان داده می‌شود که در گستره دمایی دمای اتاق تا ۷۵۰ درجه سانتیگراد با آهنگ 10C/min انجام شد. تا دمای ۱۰۰ درجه کاهش حدود ۶/۷ درصد مربوط به رطوبت و آب سطحی می‌باشد. طیف آنالیز TGA که بر اساس افزایش دما بر حسب زمان ۱۵۰ (از دست دادن جرم گرافن کوانتوم دات) می‌باشد نشان دهنده دوپه شدن فسفر به گرافن است.



با استفاده از آنالیز XPS که در شکل ۵ نشان داده شده، درصد عناصر موجود در نمونه عبارت بودند از: ۵۸/۱۹ درصد کربن، ۱۲/۳۵ درصد نیتروژن، ۲۶/۳۲ درصد اکسیژن و ۳/۱۴ درصد فسفر. همچنین عدم حضور عناصر فلزی در نمونه سنتز شده مشاهده می‌شود.



شکل ۲. تصویر TEM نمونه سنتز شده (PN-GQD)

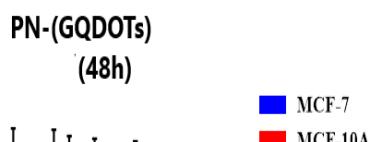
با استفاده از آنالیز FTIR برای شناسایی نوع پیوندهای تشکیل شده یا گروه‌های عامل قرار گرفته بر سطح ساختار نمونه سنتز شده و تعیین ساختار مولکولها از آنالیز طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز استفاده شد. در شکل ۳، نمودار آنالیز FTIR برای نمونه سنتز شده نشان داده می‌شود. نتایج نشان دهنده پیوند کششی H-O در محدوده ۳۵۰ که مربوط به گروه‌های عامل هیدروکسیل می‌باشد. پیک موجود در محدوده ۲۹۰۰ مربوط به پیوند کششی C-H و پیک موجود در محدوده ۱۴۰۰ مربوط به پیوند N-C-N می‌باشد. پیکهای مربوط به پیوند کششی C=O در محدوده ۱۷۰۰ مشاهده شد که مربوط به گروه‌های عامل کربونیل می‌باشند. در محدوده ۱۵۰۰، پیک مشاهده شده مربوط به پیوند کششی C=C و پیک مشاهده شده در محدوده ۹۵۰ مربوط به پیوند P-C می‌باشند. پیکهای مشاهده شده در محدوده ۱۱۰۰ نیز مربوط به پیوندهای کششی O-C-O هستند.

نشان داد که نانوذرات (PN-GQDOTs) می‌توانند سمت سلولی کمی در محدوده غلظت داده شده داشته باشند، که برای تصویربرداری MR و کاربردهای بیولوژیکی بیشتر در شرایط آزمایشگاهی و درون تنی ضروری است.

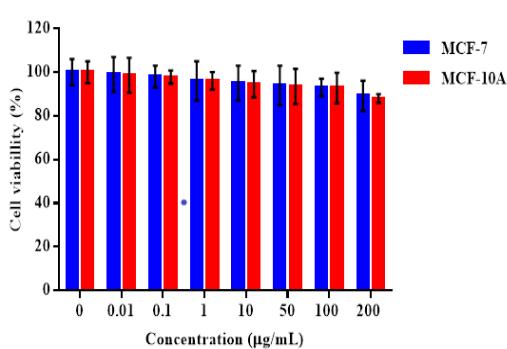
In vitro نتایج اندازه گیرهای

نتایج حاصل از بررسی قابلیت استفاده از نانوذرات سنتز شده به عنوان ماده کنترast زا در تصویربرداری MRI با اندازه گیری میزان آسودگی طولی آنها در شکل ۸ نشان داده شده است که بیانگر این است که نانوذرات سنتز شده (PN-GQDs) به طور موثری زمان آسایش طولی T_1 را کوتاهتر می‌کند و شدت سیگنال را در تصاویر وزنی T_1 در مقایسه با دوتارم به طور قابل توجهی افزایش می‌دهد و همین طور میزان آسایش کنتراست روشن در تصاویر وزنی T_1 با افزایش غلظت نمونه ارتباط مستقیم دارد. مقادیر توانایی آسایش T_1 برای NPs (GQDOTs) P-(GQDOTs) و Dotarem به ترتیب $4/49$ و $2/54$ به دست آمد.

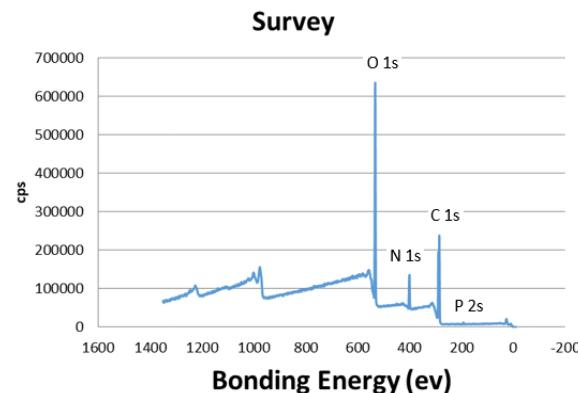
b



a
PN-(GQDOTs)
(24)

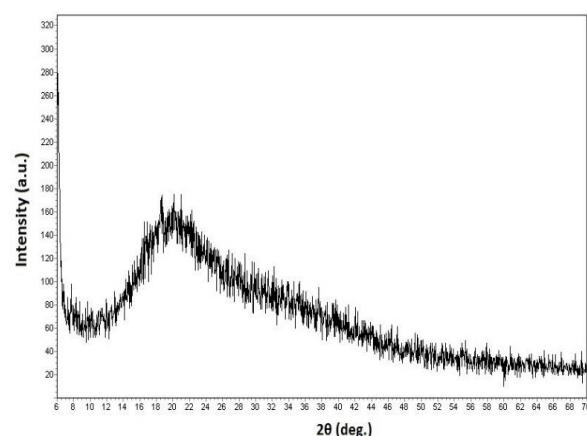


شکل ۷. زنده ماندن سلول‌های MCF-7 و MCF-10A پس از تیمار با NPs (GQDOTs) در غلظت‌های مختلف پس از زمان انکوباسیون ۲۴ (شکل ۷-a) و ۴۸ ساعت (شکل ۷-b).



شکل ۵. طیف آنالیز XPS برای نمونه سنتز شده (PN-GQD)

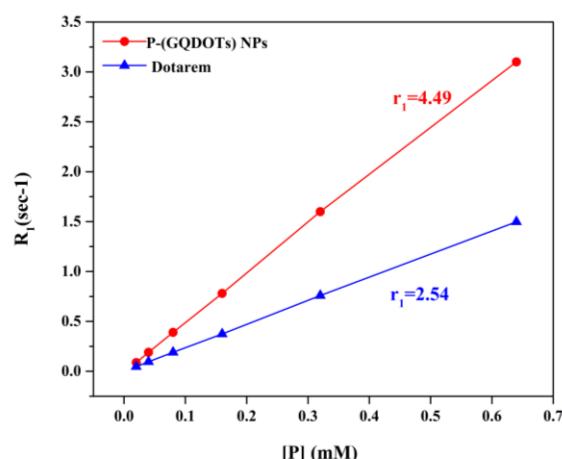
طیف XRD برای نمونه سنتز شده (PN-GQD)، در شکل ۶، نشان دهنده یک پیک پراش گسترده به خاطر کریستالیتیه خیلی کم یا آمورف بودن نمونه بوه که مرکز پیک در حدود $\theta=22^\circ$ است و هیچ پیک دیگری مشاهده نمی‌شود. بنابراین از طیف XRD نمونه می‌توان خلوص بالای نمونه سنتز شده را نتیجه گرفت. با دوپه شدن گروه فسفات این مقدار هیچ گونه تغییری را نشان نمی‌دهد که بر حسب انتظار حاکی از یک ترکیب آمورف بوده و با اضافه شدن گروه آلی فاصله بین صفحات تغییری نکرده است.



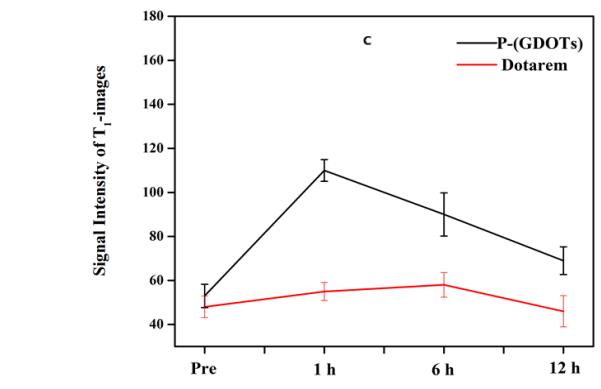
شکل ۶. آنالیز XRD مربوط به نمونه سنتز شده (PN-GQD)

نتایج سنجش سمت سلولی، همانطور که در شکل ۷ نشان داده است، هیچ کاهش واضحی در زنده ماندن سلول با غلظت‌های مختلف NPs (GQDOTs) (تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) برای مدت زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت وجود نداشت. حتی در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر، زنده ماندن سلول همچنان بالای ۹۰ درصد باقی ماند. با افزایش زمان انکوباسیون NPs به ۴۸ ساعت، میزان بقای سلولی با روند وابسته به غلظت کاهش یافت و کاهش غیر قابل توجهی در زنده ماندن سلول در مقایسه با گروه کنترل وجود داشت. این نتایج

سیگنال MR، مقدار R_1 سلول‌های MCF-7 در زمانی که با ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۶ ساعت تیمار شدند، تقریباً سه برابر بیشتر از سلول‌های کنترل تیمار نشده بود. با این حال، تحت شرایط مشابه، مقدار R_1 برای سلول‌های MCF-10A تنها $1/4$ برابر بیشتر از سلول‌های کنترل تیمار نشده بود. جذب سلولی خاص نانوذرات (PN-(GQDOTs) به سلول‌های MCF-7 در نتیجه تقسیم سلولی و فعالیت بیشتر در مقایسه با سلول‌های نرمال MCF 10A ممکن است به تفاوت قابل توجه بین سلول‌های MCF-7 و سلول‌های MCF 10A در تصاویر MRI نسبت داده شود.



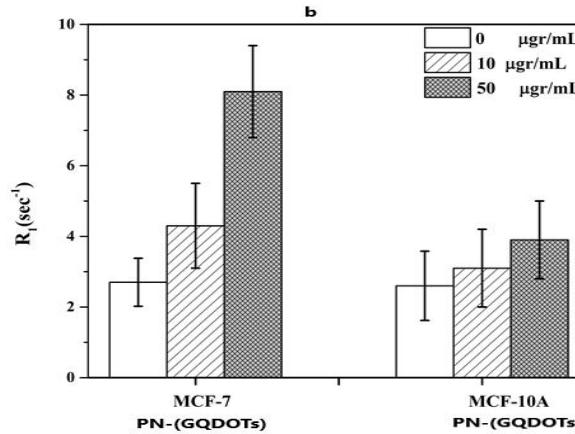
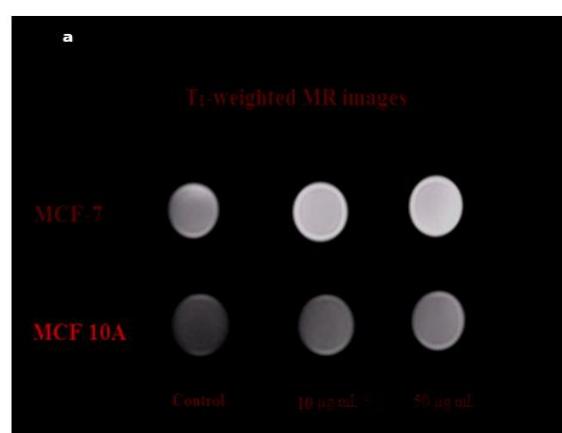
شکل ۸. تصاویر وزنی T1، آسایش طولی نانوذرات Dotarem و PN-(GQDOTs)



شکل ۱۰. تصاویر موش‌های توموری بعد از تزریق به ترتیب a: تزریق (P-(GQDOTs) NPs) (b) تزریق دوتارم، (c) نمودار سیگنال نویز در زمانهای مختلف بعد از تزریق.

نتایج آزمایش‌های درون‌تنی

همان‌طور که در شکل ۱۰ دیده می‌شود کنتراست و تفاوتی در تصاویر قبل و بعد از تزریق ماده کنتراست برای زمان‌های مختلف بعد از تزریق دیده می‌شود. تفاوت معنی‌داری بین مقادیر شدت سیگنال در زمان‌های مختلف بعد از تزریق نانوذرات (PN-(GQDOTs) و دوتارم دیده



شکل ۹. a. تصاویر T1-Weighted از نانوکمپلکس PN-(GQDOTs) در مجاورت سلول‌های سرطانی MCF-7 و MCF-10A b. نمودار شدت سیگنال برای تصاویر T1-Weighted

تصویربرداری MRI به صورت in vitro

همان‌طور که در شکل ۹ نشان داده شده است، تصاویر MRI با وزن T_1 به دست آمده از فانتومهای حاوی سلول‌های MCF-7، افزایش قابل توجهی در شدت سیگنال T_1 را نشان می‌دهد. با توجه به تجزیه و تحلیل کمی تغییر

ماده کنتراست بدون یون‌های فلزی و غیرسمی در مقیاس نانو و بررسی کاربرد آن در تصویربرداری MRI به عنوان یک عامل کنتراست زای مثبت بود. نتایج نشان داد که نانوذرات-(PN) GQDots می‌توانند سمیت سلولی کمی در محدوده غلظت داده شده داشته باشند، که برای تصویربرداری MRI و کاربردهای بیولوژیکی بیشتر در شرایط آزمایشگاهی و درون تنی ضروری است و توانایی کاهش زمان آسایش طولی(T_1) آن نسبت به دوتارم تایید شد. همچنین نتایج آزمایشات به صورت برون تنی و درون تنی نشان دهنده این است که این نانوذره سنتز شده (PN-GQD) می‌تواند به عنوان یک عامل کنتراست‌زای مثبت غیرفلزی و غیر سمی در سیستم تصویربرداری تشديد مغناطیسی استفاده شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش نتایج بخشی از رساله دکتری در رشته مهندسی پرتوپزشکی است که در گروه مهندسی پرتوپزشکی دانشگاه آزاد واحد علوم تحقیقات به تصویب رسیده است. نویسنده‌گان از تمام افرادی که در این مطالعه مشارکت کردند کمال تشکر و قدردانی را دارند.

می‌شود. بیشترین میزان شدت سیگنال در ناحیه تومورال در یک ساعت بعد از تزریق مشاهده می‌شود. این نتایج میزان ماندگاری بالای نانوکمپلکس سنتز شده در ناحیه تومورال و بدن حیوان تا ۱۲ ساعت بعد از تزریق را نشان می‌دهد که نسبت به ماده کنتراست زای تجاری دوتارم، تفاوت معنی‌دار است. با توجه به نتایج مطالعه حیوانی PN-(GDOTs) می‌توان نتیجه گرفت که نانوکمپلکس (GQD) می‌تواند به عنوان یک ماده کنتراست زای مثبت مورد توجه قرار گیرد که با توجه به عدم وجود ترکیبات فلزی مانند گادلینیوم در ساختار این ترکیب، نگرانی در مورد سمیت این سامانه دارویی نیز به حداقل می‌رسد که نتایج مطالعات سمیت سلولی نیز این موضوع را ثابت می‌کند.

بحث

GQDها به دلیل دفع سریع از کلیه‌ها و عدم تجمع قابل توجه در اندامهای اصلی بدن، هیچ آسیب قابل توجهی در موش-هایی که توسط GQDها تحت درمان قرار گرفته‌اند، نداشته‌اند. بنابراین زیست سازگاری این ترکیبات در کاربردهای بالینی مورد توجه قرار گرفته است. هدف کلی از این پژوهش، تهییه

REFERENCES

- Baumann T, Rottenburger C, Nicolas G, Wild D. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours (GEP-NET) - Imaging and staging. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2016;30:45-57.
- Shin TH, Choi Y, Kim S, Cheon J. Recent advances in magnetic nanoparticle-based multi-modal imaging. Chem Soc Rev 2015;44:4501-16.
- Chen H, Wang GD, Tang W, Todd T, Zhen Z, Tsang C, et al. Gd-encapsulated carbonaceous dots with efficient renal clearance for magnetic resonance imaging. Adv Mater 2014;26:6761-6766.
- Rogosnitzky M, Branch S. Gadolinium-based contrast agent toxicity: a review of known and proposed mechanisms. Biometals 2016;29:365-76.
- Younis MR, He G, Lin J, Huang P. Recent Advances on Graphene Quantum Dots for Bioimaging Applications. Front Chem 2020;8:424.
- Chowdhury Sh, Jiang Y, Muthukaruppan S, Balasubramanian R. Effect of boron doping level on the photocatalytic activity of graphene aerogels. Carbon 2018;128:237-248.
- Huang Ch, Huang Ch Ch, Mai F, Yen Ch, Tzing Sh, Hsieh H. Application of graphene quantum dots for simultaneous fluorescence imaging and tumor-targeted drug delivery. J Mater Chem B 2015;3: 651-664
- PG Balkanloo. Sharifi K, Marjani A. Graphene quantum dots: synthesis, characterization, and application in wastewater treatment: a review. Mat Adv 2023;4:4272-4293.
- Hadish F, Chiang M, Hsieh Y, Wu Sh, Jou Sh. Boron- Doped Graphene quantum dots (BGQDs) from Spent Coffee Ground for Glucose Sensor. Adv Mater Sci Eng 2022;2022.
- Biswas M, Islam Md, Nandy P, Hossein Md. Graphene quantum dots (GQDs) for bioimaging and drug delivery applications: a review. ACS Materials Letters 2021;3:889-911.
- Chung S., Revia R.A, Zhang M. Graphene quantum dots and their applications in bioimaging, biosensing, and therapy. Adv Mat 2021;33:1904362.

12. Shang Li, Li Y, Xiao Yi. Synergistic effect of oxygen-and nitrogen-containing groups in graphene quantum dots: Red emitted dual-mode magnetic resonance imaging contrast agents with high relaxivity. *ACS Appl Mater Interfaces* 2022;14: 39885–39895.
13. Arvand M, Hemmati S. Analytical methodology for the electro-catalytic determination of estradiol and progesterone based on graphene quantum dots and poly (sulfosalicylic acid) co-modified electrode. *Talanta* 2017;174:243-255.
14. Zhao H, Ding R, Zhao X, Li Y, Qu L, Pei H, et al. Graphene-based nanomaterials for drug and/or gene delivery, bioimaging, and tissue engineering. *Drug Discov Today* 2017;22:1302-1317.
15. Chowdhury S. Effect of boron doping level on the photocatalytic activity of graphene aerogels. *Carbon* 2018;128:237-248.
16. Pan D, Guo L, Zhang J, Xi Ch, Xue Q, Huang H. Cutting sp₂ clusters in graphene sheets into colloidal graphene quantum dots with strong green fluorescence. *J Mat Chem* 2012;2: 3314-3318
17. Zhang J, Zhao Z, Xia Z, Dai L. A metal-free bifunctional electrocatalyst for oxygen reduction and oxygen evolution reactions. *Nat Nanotechnol* 2015;10:444-52.
18. Yu D, Xue Y, Dai L. Vertically Aligned Carbon Nanotube Arrays Co-doped with Phosphorus and Nitrogen as Efficient Metal-Free Electrocatalysts for Oxygen Reduction. *J Phys Chem Lett* 2012;3:2863-70.
19. Hu YH. The first magnetic-nanoparticle-free carbon-based contrast agent of magnetic-resonance imaging-fluorinated graphene oxide. *Small* 2014;10:1451-2.
20. Wang H, Revia R, Mu Q, Lin G, Yen C, Zhang M. Single-layer boron-doped graphene quantum dots for contrast-enhanced *in vivo* T₁-weighted MRI. *Nanoscale Horiz* 2020;5:573-579.
21. Wang H, Revia R, Wang K, Kant RJ, Mu Q, Gai Z, et al. Paramagnetic Properties of Metal-Free Boron-Doped Graphene Quantum Dots and Their Application for Safe Magnetic Resonance Imaging. *Adv Mater* 2017;29:10.