

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 data 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@srbiau.ac.ir

ORCID ID: 0000-0002-5892-7971

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

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

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

^۱ دانشجوی دکترای مهندسی پرتوپزشکی، دانشکده فنی و مهندسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
^۲ دانشیار، گروه مهندسی پرتوپزشکی، دانشکده فنی و مهندسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
^۳ استادیار، گروه طب هسته ای، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
^۴ استادیار، گروه مهندسی پزشکی، دانشکده فنی و مهندسی، واحد شاهرود، دانشگاه آزاد اسلامی، شاهرود، ایران
^۵ استادیار، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

چکیده

سابقه و هدف: عوامل کنتراست زای مورد استفاده در MRI اکثراً بر پایه عناصر فلزی مانند گادولونیوم بوده و سمی هستند. مطالعه حاضر با هدف تهیه نانوذره ای غیرفلزی و غیرسمی بر پایه کرین 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 (r1=2/54) افزایش قابل توجهی داشت. نتایج تصویربرداری حیوانی توانایی نانوذرات برای ایجاد اختلاف در کنتراست تصاویر قبل و بعد از تزریق ماده کنتراست را نشان داد.

نتیجه گیری: 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 زای 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.

واژگان کلیدی: نقاط کوانتومی 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 حفاصل علوم زیستی و فیزیک است و نگاهی جدید به تحقیقات بیومدیکال به منظور مشاهده و مانیتورینگ پروسه‌های بیولوژی در سلول‌ها، بافت‌ها و ارگانیسم‌ها با استفاده از مدالیته‌های 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

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 کنتراست‌زای 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 می‌گردند 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 دُز بالا و حتی تزریقات بیشتر می‌باشد که نگرانی‌های مربوط به سمیت بخصوص در مورد ترکیبات کنتراست مثبت گادولینیوم‌دار در بیماران نارسایی کلیوی مطرح است (۲). بنابراین نیاز به طراحی و سنتز مواد کنتراست‌زا در مقیاس نانو است تا بتوان با تزریق دُز کمتری فرایند تصویربرداری را انجام داده و بدین ترتیب نگرانی در مورد سمیت مواد کنتراست زای تزریقی هم به کمترین مقدار خود می‌رسد. یکی از مشکلات عمده در مورد مواد کنتراست مرسوم 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 گسترده در دهه‌های گذشته به عنوان عوامل کنتراست‌زای بالقوه (CAs) برای MRI مورد بررسی قرار گرفته‌اند تا بر محدودیت عمر کوتاه و حساسیت پایین و نگرانی‌های ایمنی عوامل کنتراست مبتنی بر Gd، از جمله نارساییهای کلیوی غلبه کنند (۲). اگر چه می‌توان با کپسوله کردن عوامل کنتراست زای فلزی، میزان آزاد شدگی یونهای فلزی را کاهش داده و سمیت را به حداقل رسانید، ولی با تخریب ترکیبات شلات‌کننده، ممکن است یونهای فلزی در محیط اطراف آزاد شده و منجر به عوارض و بروز سمیت شوند (۳). بنابراین لزوم توسعه عوامل کنتراست زای غیر فلزی در تصویربرداری MRI با حساسیت و ویژگیهای قابل مقایسه یا برتر نسبت به عوامل کنتراست زای فلزی مرسوم، ضروری است. همچنین سازمان دارو و غذا (FDA)، اخیرا هشدار ایمنی در مورد رسوب طولانی احتمالی عوامل کنتراست بر پایه Gd در بافت مغز و کلیه‌ها را صادر کرده است (۴). طی دهه گذشته کوانتوم دات‌ها (QDs) و طی سالیان اخیر گرافن کوانتوم دات‌ها (GQDs) از جمله نانو موادی بودند که در زمینه‌های مختلف تحقیقاتی داروسازی و پزشکی

از جمله بمنظور اهداف دارورسانی، تصویربرداری و درمان انواع بدخیمی‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. به دلیل تابش نور عالی، سمیت سلولی کم، نواحی سطحی بیشتر و بهره کوانتومی 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 کوانتومی گرافنی (GQDs) که در واقع به صورت ساختارهای کربنی Zero-Dimensional 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 فتولومینسانس، مورد توجه قرار گرفته‌اند (۹-۵). 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 (۱۲-۱۰). حساسیت نقاط کوانتومی مبتنی بر پایه گرافن وابسته به عملکرد کوانتومی است که مربوط به تعداد لایه‌های نقاط کوانتومی و مواد دوپانت شده به آنهاست. دوپانت نقاط کوانتومی گرافنی با هیدروآتمها مانند B، N، P، S نه تنها می‌تواند نورهای تابشی را تقویت کند بلکه باعث افزایش عملکرد کوانتومی و در نتیجه باعث افزایش حساسیت آنها می‌شود (۱۵-۱۳).

هنگامی که هیتروآتم‌ها به مواد کربنی رها می‌شوند باعث انتقال آنها به مواد نیمه هادی نوع n یا p به خاطر انتقال الکترون‌ها بین مواد میزبان و دوپانتها و پیوند اتمهای کربن و اتمهای مشابه است. اتمهای دوپانت روی مولکول‌های داخلی GQD قرار گرفته و محتوای عناصر آنها، پیکربندی محلی الکترون، قطبش پذیری، محتوای نقایص و ساختار باند انرژی را تغییر می‌دهند (۱۸-۱۶). به طور کلی پیوندهای دو قطبی کربن با هیتروآتم‌ها به عنوان مراکز پارامغناطیسی بوده و عامل تولید سیگنال در سیستم تصویربرداری تشدید مغناطیسی است (۲۱-۱۹).

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

مواد و روشها

نمونه های نقاط کوانتومی 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 نمونه ها ۱۵mgf اسید اسیتیک، ۳cc محلول آمونیاک ۲۵ درصد و ۱cc اسید فسفریک 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 سانتریفوژ 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 نمونه ها انجام شد.

بررسی سمیت سلولی

برای بررسی سمیت سلولی نمونه های سنتز شده، سلول های MCF-7 و MCF-10A به ترتیب به عنوان رده های 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 غلظت های ۰، ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ 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 کانال های 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 درون انکوباتور برای مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. پس از ۴ ساعت محیط کشت درون پلیت ها 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 می توان در طول موج ۵۷۰nm توسط میکروپلیت ریدر قرائت کرد و با معادله زیر به سلول های کنترل تیمار نشده نرمال شد:

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

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 اپیتelial	انستیتو پاستور ایران
(MCF-7)	
رده سلولی غیر تومورال پستان انسانی اپیتelial	انستیتو پاستور ایران
(MCF-10A)	
محیط کشت سلولی RPMI	Sigma Aldrich
محیط کشت سلولی DMEM	Sigma Aldrich
سرم جنین گاوی (FBS)	Gibco
پنی سیلین / استرپتومایسین	Biosera
فسفات سالیین بافر (PBS)	Dulbecco
تریپسین	Merck Chemicals

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 کوئل 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_1 از پروتکل تصویربرداری اسپین-اکو بر حسب TRهای مختلف برای غلظتهای مختلف PN-GQDs و دوتارم (Dotarem) به عنوان ماده کنترل (ماده کنتراست تجاری MRI تایید شده) در مدل فانتوم انجام شد. با استفاده از روش چند نقطه ای و با برازش خطی منحنی نمایی بر شدت سیگنال برای چندین TR مختلف و برای غلظتهای مختلف از نمونه ها و به ازای TE 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

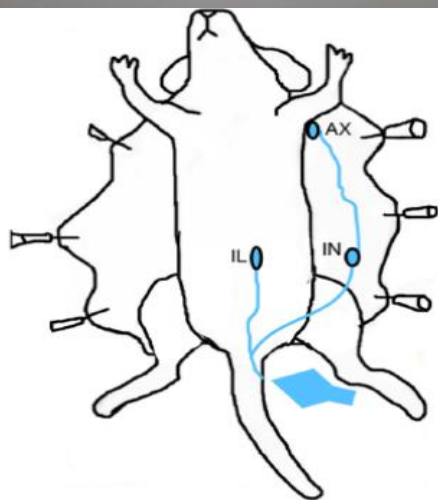
نانوذره سنتز شده و دوتارم به عنوان ماده کنترل با غلظت های ۰/۰۲، ۰/۰۴، ۰/۰۸، ۰/۱۶، ۰/۳۲ و ۰/۶۴ میلی مولار (mM) در داخل ژل آگارژ فراهم شد.

تصویربرداری MRI بصورت in vitro

برای بررسی نفوذ نانوذرات به داخل سلولها و تأیید توانایی هدف گیری سلول های سرطانی نانوذرات (PN-GQDOTs) از

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 فلاتک 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 می گرفت. بدین ترتیب بیشینه سیگنال قابل دستیابی بود. در مطالعات مختلف، تزریق نانوذرات به صورت 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 اندازه گیری پارامتر شدت Signal اندازه گیری 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 دیگرام تزریق نانوذرات به موش

تصویربرداری تشدید مغناطیسی استفاده شد. برای این منظور، با تیمار سلول های MCF-7 و MCF 10A (5×10^6 سلول در هر چاه) با غلظت های مختلف (۰، ۱۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) از نانوذرات سنتز شده (PN-(GQDOTs)) به مدت ۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، انکوبه شدند. تا مشخص شود که NP ها انواع خاصی از سلول ها را هدف قرار می دهند یا خیر. قبل از تصویربرداری MR، بعد از گذشت ۶ ساعت سلول ها با استفاده از محلول بافر (PBS) سه بار شستشو داده شد و در ویال های مخصوص با تراکم سلولی 1×10^6 سلول در میلی لیتر 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

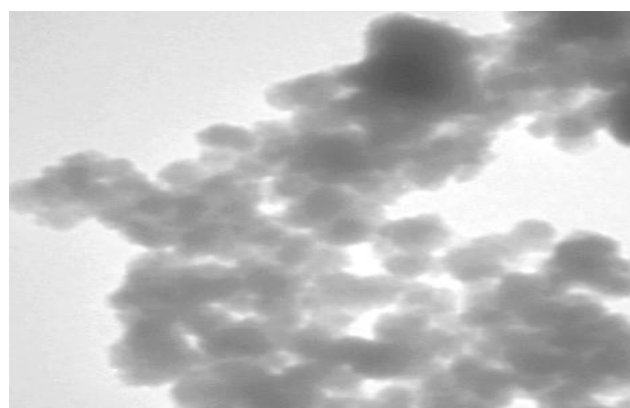
آزمایش های درون تنی برای آشکارسازی بافت توموری

یکی از اهداف پروژه آشکارسازی بافت توموری در موش های حامل تومور است. که جهت اثبات موثر بودن ترکیبات سنتز شده اقدام به تولید مدل حیوانی شد. حیوانات مورد استفاده، موش های سوری بزرگ نر سالم با وزن ۲۰-۳۰ گرم بودند. بدین ترتیب که سه میلیون سلول از نوع تومور پستانی موش $4T_1$ به صورت زیر جلدی در ناحیه فلاتک پای چپ به حیوان تزریق گردید. بعد از ۲ هفته از تزریق سلول ها که یک توده ی سرطانی با حجم $1 \times 1 \times 1$ میلی متر مشاهده شد، ماده کنتراست با دوز 1 mmol NPs/Kg وزن موش از طریق ورید دمی به حیوان تزریق شد و تصویربرداری قبل از تزریق ماده کنتراست و در زمان های مختلف پس از تزریق انجام گرفت. برای به دست آوردن دز مورد نظر از نانوذرات، سوسپانسیون نانوذرات با استفاده از آب رقیق شد. موش ها به صورت تصادفی در سه گروه که هر گروه شامل ۵ موش است تقسیم بندی می شود. گروهی که Dotarem تزریق شده به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شد. این موش های آزمایشگاهی قبل از تزریق مواد کنتراست با استفاده از اتیل اتر تحت بیهوشی سطحی قرار گرفتند و قبل از تصویربرداری MRI، بیهوشی عمیق و طولانی با استفاده از مخلوط کتامین با دز 15 mg/kg و زایلازین با دز 0.8 mg/kg برای این موش ها انجام شد. سپس با پروتکل مشخص از هر سه گروه تصویربرداری به عمل آمد.

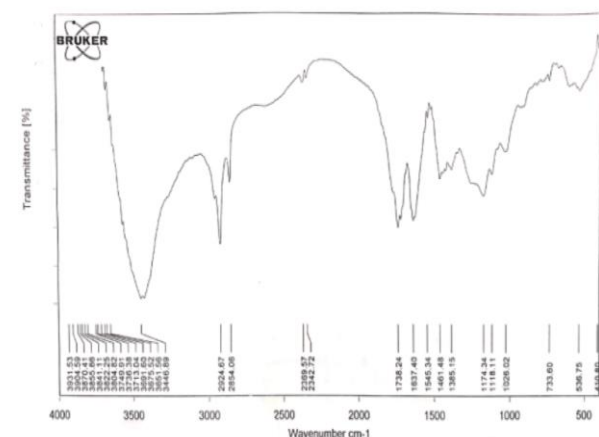
تصویربرداری با دستگاه MRI، ۳ تسلا Prisma, Siemens (Healthcare, Erlangen, Germany) در مرکز ملی نقشه برداری مغزی با استفاده از کویل سر ۶۴ کاناله و با پروتکل تصویربرداری زیر انجام گرفت.

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 محدوده ۵-۱۵ nm است. در این تصویر ساختار کروی ذرات و همچنین اندازه یکنواخت آنها قابل مشاهده است که با پیوندهای هیدروژنی با هم برهمکنش کرده و به حالت تجمعی در تصویر مشخص شده‌اند.

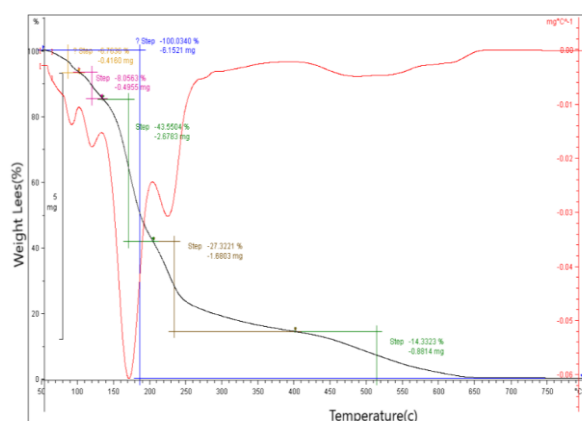


شکل ۲. تصویر TEM نمونه سنتز شده (PN-GQD)



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 می شود که در گستره دمایی دمای اتاق تا ۷۵۰ درجه سانتیگراد با آهنگ ۱۰C/min انجام شد. تا دمای ۱۰۰ درجه کاهش حدود ۶/۷ درصد مربوط به رطوبت و آب سطحی می باشد. طیف آنالیز TGA که بر اساس افزایش دما بر حسب زمان می باشد دو پلکان شاخص که نشان دهنده جرم در نقاط ۱۵۰ (ترکیب آلی فسفر که به گرافن کوانتوم دات دوپه گردیده) و ۲۰۰ (از دست دادن جرم گرافن کوانتوم دات) می باشد نشان دهنده دوپه شدن فسفر به گرافن است.



شکل ۴. طیف آنالیز TGA برای نمونه سنتز شده (PN-GQD)

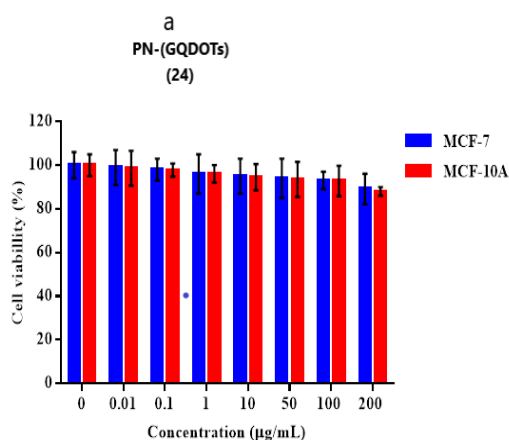
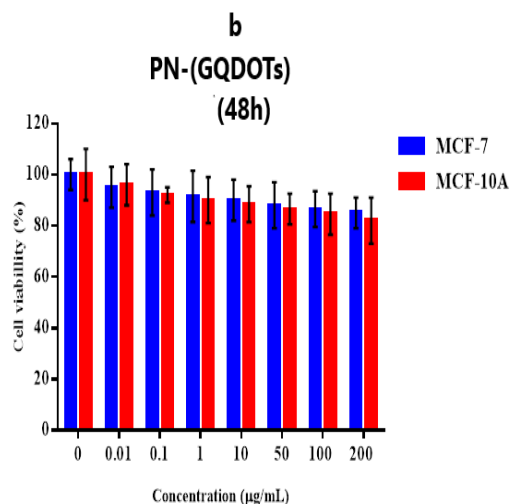
با استفاده از آنالیز XPS که در شکل ۵ نشان داده شده، درصد عناصر موجود در نمونه عبارت بودند از: ۵۸/۱۹ درصد کربن، ۱۲/۳۵ درصد نیتروژن، ۲۶/۳۲ درصد اکسیژن و ۳/۱۴ درصد فسفر. همچنین عدم حضور عناصر فلزی در نمونه سنتز شده مشاهده می‌شود.

با استفاده از آنالیز FTIR برای شناسایی نوع پیوندهای تشکیل شده یا گروه های 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 می شود. نتایج نشان دهنده پیوند کششی H-O در محدوده ۳۵۰۰ که مربوط به گروههای عامل هیدروکسیل می باشد. پیک موجود در محدوده ۲۹۰۰ مربوط به پیوند کششی C-H و پیک موجود در محدوده ۱۴۰۰ مربوط به پیوند کششی C-N می باشد. پیکهای مربوط به پیوند کششی C=O در محدوده ۱۷۰۰ مشاهده شد که مربوط به گروههای عامل کربونیل می باشند. در محدوده ۱۵۰۰، پیک مشاهده شده مربوط به پیوند کششی C=C و پیک مشاهده شده در محدوده ۹۵۰ مربوط به پیوند P-C می باشند. پیکهای مشاهده شده در محدوده ۱۱۰۰ نیز مربوط به پیوندهای کششی C-O هستند.

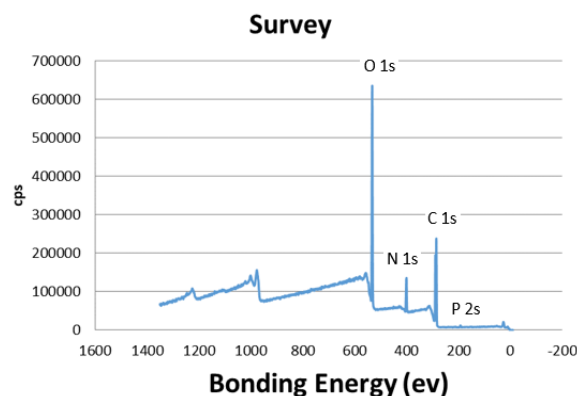
نشان داد که نانوذرات (PN-GQDOTs) می‌توانند سمیت سلولی کمی در محدوده غلظت داده شده باشند، که برای تصویربرداری MR و کاربردهای بیولوژیکی بیشتر در شرایط آزمایشگاهی و درون تنی ضروری است.

نتایج اندازه گیرهای *In vitro*

نتایج حاصل از بررسی قابلیت استفاده از نانوذرات سنتز شده به عنوان ماده کنتراست را 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 همین‌طور میزان افزایش کنتراست روشن در تصاویر وزنی T_1 با افزایش غلظت نمونه ارتباط مستقیم دارد. مقادیر توانایی آسایش T_1 برای P-(GQDOTs) NPs و Dotarem به ترتیب ۴/۴۹ و ۲/۵۴ به دست آمد.

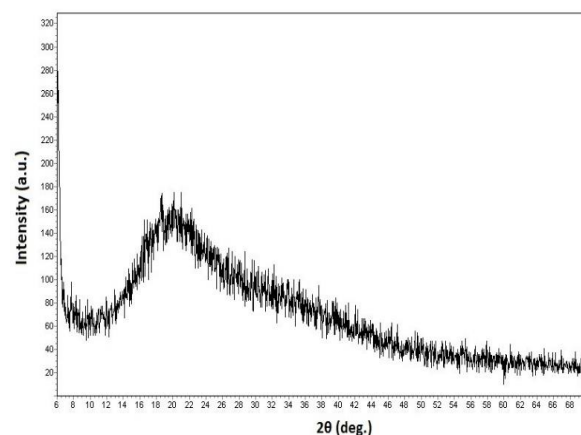


شکل ۷. زنده ماندن سلول‌های MCF-7 و MCF-10A پس از تیمار با PN-(GQDOTs) NPs در غلظت‌های مختلف پس از زمان انکوباسیون ۲۴ (شکل ۷-ا) و ۴۸ ساعت (شکل ۷-ب).



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

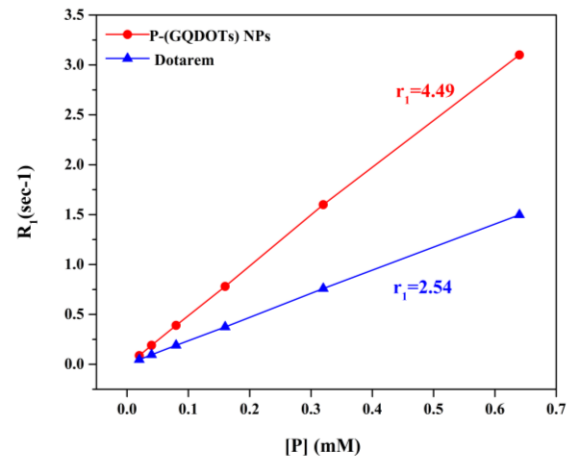
طیف XRD برای نمونه سنتز شده (PN-GQD)، در شکل ۶، نشان دهنده یک پیک پراش گسترده به خاطر کریستالیتیه خیلی کم یا آمورف بودن نمونه بوه که مرکز پیک در حدود $2\theta = 22^\circ$ است و هیچ پیک دیگری مشاهده نمی‌شود. بنابراین از طیف XRD نمونه می‌توان خلوص بالای نمونه سنتز شده را نتیجه گرفت. با دوپه شدن گروه فسفات 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.



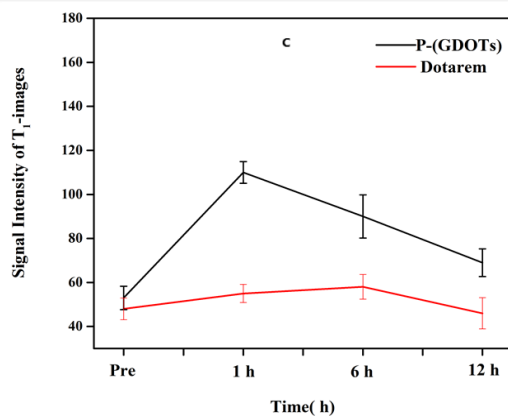
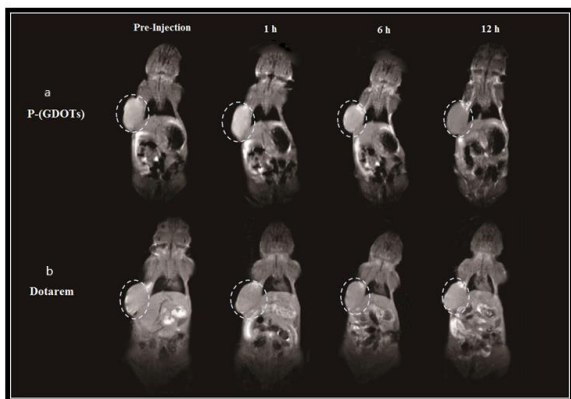
شکل ۶. آنالیز XRD مربوط به نمونه سنتز شده (PN-GQD)

نتایج سنجش سمیت سلولی، همانطور که در شکل ۷ نشان داده شده است، هیچ کاهش واضحی در زنده ماندن سلول با غلظت‌های مختلف PN-(GQDOTs) NPs (تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) برای مدت زمان انکوباسیون ۲۴ 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 PN-(GQDOTs) NPs (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 ۱/۴ برابر بیشتر از سلول‌های کنترل تیمار نشده بود. جذب سلولی خاص نانوذرات PN-(GQDOT) 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.



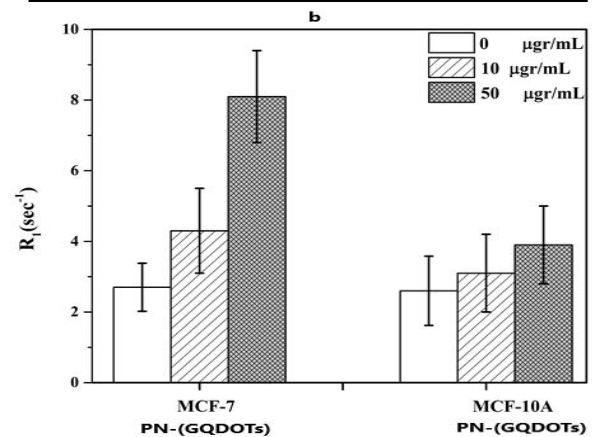
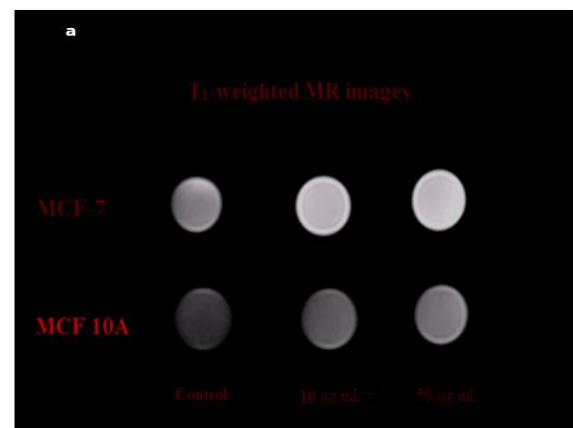
شکل ۸. تصاویر وزنی T_1 ، آسایش طولی نانوذرات Dotarem و PN-(GQDOTs)



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

نتایج آزمایش‌های درون تنی

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 T_1 -Weighted از نانوکمپلکس PN-(GQDOTs) در مجاورت سلول‌های سرطانی MCF-7 و MCF 10A. b: نمودار شدت سیگنال برای تصاویر T_1 -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

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 می‌توان نتیجه گرفت که نانوکمپلکس PN-(GDOTs) می‌تواند به عنوان یک ماده کنتراست زای مثبت مورد توجه قرار گیرد که با توجه به عدم وجود ترکیبات فلزی مانند گادولنیوم 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

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

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. نویسندگان از تمام افرادی که در این مطالعه مشارکت کردند کمال تشکر و قدردانی را دارند.

REFERENCES

1. 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.
2. Shin TH, Choi Y, Kim S, Cheon J. Recent advances in magnetic nanoparticle-based multi-modal imaging. *Chem Soc Rev* 2015;44:4501-16.
3. 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.
4. Rogosnitzky M, Branch S. Gadolinium-based contrast agent toxicity: a review of known and proposed mechanisms. *Biometals* 2016;29:365-76.
5. Younis MR, He G, Lin J, Huang P. Recent Advances on Graphene Quantum Dots for Bioimaging Applications. *Front Chem* 2020;8:424.
6. 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.
7. 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
8. PG Balkanloo. Sharifi K, Marjani A. Graphene quantum dots: synthesis, characterization, and application in wastewater treatment: a review *Mat Adv* 2023;4:4272-4293.
9. 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.
10. 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.
11. 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.