

## سنتز نقاط کوانتومی InP/ZnS عامل دار برای کاربرد در دارورسانی

زهرا رنجبر نوازی<sup>۱</sup>، علی نعمتی<sup>۲\*</sup>، حمید اکبری جور<sup>۳</sup>، سودابه داوران<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشکده مهندسی مواد، تهران، ایران.

<sup>۲</sup> دانشگاه صنعتی شریف، دانشکده مهندسی و علم مواد، تهران، ایران.

<sup>۳</sup> دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی، تهران، ایران.

<sup>۴</sup> دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات ریزفناوری دارویی، تبریز، ایران.

تاریخ ثبت اولیه: ۱۳۹۶/۰۳/۰۱، تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۱۳۹۶/۰۴/۱۲، تاریخ پذیرش قطعی: ۱۳۹۶/۰۴/۱۸

**چکیده** نقاط کوانتومی، نیمه رساناهایی در ابعاد کم تر از شعاع اکسایتونیک هستند که به دلیل اندازه کوچک و بروز پدیده حبس کوانتومی، خواص نوری منحصر به فردی، از جمله خاصیت فلورسانس قابل تنظیم با اندازه نقطه کوانتومی دارند. خاصیت فلورسانس، نسبت سطح به حجم بالا در نقاط کوانتومی و شیمی سطح آن‌ها در عامل دار شدن با بیومولکول‌های مختلف، قابلیت کاربرد در تشخیص و درمان هم‌زمان سلول‌های سرطانی را به آن‌ها می‌دهد. در این تحقیق نقاط کوانتومی InP/ZnS عاری از کادمیم و ایمنی بالاتر نسبت به نقاط کوانتومی پایه کادمیم، به روش کلونیدی تزریق داغ سنتز شد و خواص نوری آن با توجه به طیف جذب UV-Vis و طیف نشر فوتولومینسانس بررسی شد. تصویر TEM نقاط کوانتومی سنتز شده نشان‌دهنده اندازه در حدود ۱۰ نانومتر و مورفولوژی کروی بود. پس از انتقال نقاط کوانتومی با پروسه تعویض لیگاند از فاز آلی به فاز آبی، با فولیک اسید عامل دار شدند و سمی بودن نقاط کوانتومی فاقد گروه عاملی و عامل دار در غلظت‌های مختلف با روش MTT بر روی رده سلولی OVCAR-3 بررسی شد. نتایج حاصل نشان‌دهنده حدود ۷۰٫۳ و ۸۸٫۵ درصد زیست-پذیری سلول‌های تیمار شده به ترتیب ۰٫۲ mg/ml از نقاط کوانتومی InP/ZnS فاقد گروه عاملی و عامل دار شده با فولات بود. میزان ورود نقاط کوانتومی فاقد گروه عاملی و متصل به فولیک اسید، به درون رده‌های سلولی OVCAR-3 و A549 با دستگاه فلوسایتومتری FACS بررسی شد و تفاوت چشم‌گیر میان میزان ورود سلولی مجموعه نقاط کوانتومی عامل دار شده نسبت به نقاط کوانتومی فاقد گروه عاملی در مورد رده سلولی حاوی گیرنده‌های فولیک اسید مشهود بود. نتایج حاصل قابلیت مجموعه نقاط کوانتومی InP/ZnS دو عاملی متصل به فولیک اسید را در تصویربرداری و دارورسانی موفق و هم‌زمان به سلول‌های سرطانی نشان داد.

**کلمات کلیدی:** نقاط کوانتومی InP/ZnS، فولیک اسید، دارورسانی، تصویربرداری زیستی.

## Functionalized InP/ZnS Quantum Dots Synthesis for Applications in Drug Delivery Systems

Zahra Ranjbar Navazi<sup>1</sup>, Ali Nemati<sup>2\*</sup>, Hamid Akbari<sup>3</sup>, Soudabeh Davaran<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Science and Research Branch, Islamic Azad University, Department of Material Engineering, Tehran, Iran.

<sup>2</sup> Sharif University of Technology, Department of Materials Science and Engineering, Tehran, Iran.

<sup>3</sup> Tehran University of Medical Sciences (TUMS), Faculty of Pharmacy, Tehran, Iran.

<sup>4</sup> Tabriz University of Medical Sciences, Research Center for Pharmaceutical Nanotechnology, Tabriz, Iran.

**Abstract** Quantum dots are semiconductors with sizes less than their excitonic diameter, exhibiting quantum confinement effect and unique optical properties, including size adjustable fluorescent. Optical properties of quantum dots along with high surface to volume ratio and surface chemistry of quantum dots make them appealing for functionalization with variety of biomolecules, giving them applicability in bio-imaging and drug delivery. So they can be used for simultaneous diagnosis and treatment of cancer cells. In this study, core/shell InP/ZnS quantum dots were synthesized via hot injection colloidal method. Optical properties of synthesized quantum dots were investigated. TEM image of quantum dots showed approximately average size of 10 nm and spherical morphology of quantum dots. After transferring the quantum dots from organic to aqueous media via ligand exchange process, quantum dots were further functionalized with folic acid. Cytotoxicity of bare and functionalized InP/ZnS quantum dots on OVCAR-3 cell lines were investigated using MTT assay at different concentrations. The results indicated low toxicity of bare and functionalized InP/ZnS quantum dots. Cellular uptake of the functionalized and bare quantum dots were investigated on OVCAR-3 and A549 cell lines using FACS flow cytometry and results showed the enhancement of functionalized quantum dots internalization into folic acid receptor positive cell lines in comparison with bare quantum dots. Accordingly the functionalized InP/ZnS quantum dots are proper candidates for simultaneous bio-imaging and drug delivery.

**Keywords:** InP/ZnS quantum dots, folic acid, drug delivery, bio-imaging.

\*عهده دار مکاتبات

نشانی: دانشگاه صنعتی شریف، دانشکده مهندسی و علم مواد، تهران، ایران، تلفن: ۰۹۱۲۳۷۲۸۹۸۵، پیام‌نگار: nemati@sharif.edu

## ۱- مقدمه

[۱۰، ۱۱]. نقاط کوانتومی مشخصات منحصربه‌فردی دارند که به آن‌ها قابلیت کاربرد به‌عنوان عوامل ایجاد کنتراست در تصویر را می‌دهد [۱۲]. در نقاط کوانتومی، الکترون‌ها و حفره‌ها در سه‌بعد در داخل شعاع بوهر اکسایتون ماده محبوس شده‌اند و خواص نوری منحصربه‌فردی از جمله باندهای جذب پهن و نشر باریک و رنگ فوتولومینسانس تنظیم‌پذیر با اندازه نقطه کوانتومی فراهم می‌آورد. همچنین نشر درخشان، پایداری نوری فوق‌العاده، مساحت سطحی بالا، سطح مقطع جذب دو فوتونی بزرگ، قابلیت دسترسی در چند رنگ و فوتولومینسانس مادون قرمز نزدیک، جذاب‌ترین خواص نقاط کوانتومی در تصویربرداری از سلول‌های سرطانی است [۱۳، ۱۴].

در کاربردهای بیولوژیک سمی بودن ماده مورد استفاده از اهمیت زیادی برخوردار است. مطالعاتی که بر روی میزان سمی بودن نقاط کوانتومی پایه کادمیم صورت گرفته است نشان می‌دهند که نقاط کوانتومی پایه کادمیم سمی بودن بسیار زیادی دارند که علت آن آزاد شدن یون کادمیم در محیط بدن است [۱۵]. لذا، نیاز به گسترش کاربرد نقاط کوانتومی عاری از کادمیم از جمله InP/ZnS است که سنتز آن در مقایسه با نقاط کوانتومی پایه کادمیم مشکل‌تر است.

در این تحقیق، نقاط کوانتومی InP/ZnS با خواص نوری مطلوب، جهت کاربرد در تصویربرداری زیستی و دارورسانی هم‌زمان، سنتز و پس از انتقال از محیط آلی به محیط آبی بیولوژیک، با فولیک اسید عامل‌دار شد. تأثیر گروه عاملی بر میزان سمی بودن و ورود سلولی مجموعه نقاط کوانتومی حاصل بررسی شد. نتایج نشان‌دهنده دست‌یابی به هدف دارورسانی و تصویربرداری هم‌زمان از سلول‌های سرطانی با افزایش میزان ورود نانوحامل در اثر عامل‌دار شدن با فولیک اسید بود.

## ۲- روش تحقیق

## ۲-۱ مواد و تجهیزات

مواد اولیه مورد استفاده در این پژوهش عبارت بودند از استات ایندیم، تریس تری متیل سیلیل فسفین، میریستیک اسید، آمین چرب، استئارات روی، سولفور، فولیک اسید، مرکاپتوسوکسینیک اسید، نرمال هگزان، متانول و استون. استات

نقاط کوانتومی، مواد نیمه‌رسانای کلوئیدی هستند که از یک هسته غیرآلی حاوی چند صد تا چند هزار اتم تشکیل و توسط یک لایه خارجی آلی از مولکول‌های سورفکتانت احاطه شده‌اند [۱]. علت نام‌گذاری نقاط کوانتومی، نشر لومینسانس قابل تنظیم آن‌ها است که از پدیده حبس کوانتومی<sup>۱</sup> نشأت می‌گیرد [۲]. اندازه کوچک نقاط کوانتومی منجر به بروز پدیده حبس کوانتومی و در نتیجه، افزایش شکاف انرژی و کوانتیزه شدن ترازهای انرژی<sup>۲</sup> به مقادیر مجزا می‌گردد و این پدیده با ازدیاد برهم‌کنش کولمبی<sup>۳</sup> میان حامل‌های بار همراه است. پدیده حبس کوانتومی در اکثر نیمه‌رساناها زمانی رخ می‌دهد که اندازه آن‌ها به چند نانومتر کاهش یابد [۱]. نقاط کوانتومی به‌علت اندازه کوچکتر از شعاع بوراکسایتونو ظهور پدیده حبس کوانتومی، خواص نوری منحصربه‌فردی از خود نشان می‌دهند [۳]. خواص منحصربه‌فرد نقاط کوانتومی، کاربردهای جالب توجهی را در زمینه‌های مختلف تحقیقاتی به ویژه در الکترونیک، اپتوالکترونیک [۴]، تبدیل انرژی [۵، ۶] و پزشکی [۷] موجب شده است. خواص نوری نقاط کوانتومی بسیار وابسته به اندازه آن‌ها است و در سال‌های اخیر این موضوع تحقیقات زیادی را به خود اختصاص داده است [۱]. علت مشاهده خواص وابسته به اندازه، محدود شدن حامل‌ها در چاه پتانسیل سه‌بعدی است [۲، ۸]. یک راه مؤثر جهت دست‌یابی به دارورسانی کارآمد، توسعه نانوسیستم‌ها براساس فهم صحیح از برهم‌کنش آن‌ها با محیط بیولوژیک، تعداد سلول‌ها، گیرنده‌های سطح سلول، تغییرات در گیرنده‌های سلولی با پیشرفت بیماری، مکان و سازوکار عملکرد دارو، ابقاء دارو، سازوکارهای مولکولی و پاتوبیولوژی بیماری مورد نظر است [۹]. نقاط کوانتومی، پایه تطبیق‌پذیری برای طراحی و مهندسی ابزارهای دارورسانی بر پایه نانوذره هستند. با استفاده از ترکیبی از خواص فیزیکی، شیمیایی و نوری منحصربه‌فرد نقاط کوانتومی، مطالعه عمیق برهم‌کنش نانوحامل‌ها با سیستم‌های بیولوژیک از طریق رصد در زمان واقعی<sup>۴</sup> امکان‌پذیر است

<sup>۱</sup>Quantum confinement effect<sup>۲</sup>Quantized energy levels<sup>۳</sup>Coulomb interaction<sup>۴</sup>Real-time monitoring

طیف جذب فرابنفش - مرئی (UV-Vis) به دست آمد. برای ایجاد پوسته ZnS بر روی هسته نقطه کوانتومی InP حاصل، بعد از گذشت مدت سه ساعت و رشد هسته نقاط کوانتومی InP، مخلوط واکنش به ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد سرد و ۱/۲ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ مولار استئارات روی در اکتادسن به مخلوط واکنش افزوده و پس از گذشت مدت ۱۰ دقیقه مقدار ۱/۲ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ مولار سولفور در اکتادسن اضافه شد. سپس، دما به ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد افزایش داده شد و پس از گذشت ۳۰ دقیقه دوباره دما به ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت و ۱/۶ میلی‌لیتر از محلول‌های استئارات روی و سولفور در اکتادسن با فاصله زمانی ۱۰ دقیقه اضافه و پس از گذشت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۲۰ درجه سانتی‌گراد، مخلوط واکنش به دمای اتاق سرد شد. برای تخلیص نقاط کوانتومی حاصل، ۱۰ میلی‌لیتر هگزان و متانول به مخلوط واکنش اضافه شد و استخراج فاز متانول تا جایی ادامه یافت که فاز متانول بی‌رنگ شد و در نهایت، نقاط کوانتومی قابل پخش در حلال‌های آلی مانند تولوئن یا کلروفرم حاصل شد. با استفاده از اسپکتروفتومتر UV-vis و اسپکتروفلوریمتر، طیف جذب و نشر نقاط کوانتومی هسته/پوسته InP/ZnS حاصل شد.

## ۲-۳ انتقال نقاط کوانتومی از محیط آبی به محیط آبی

جهت انتقال نقاط کوانتومی InP/ZnS از محیط آبی به محیط آبی از روش جایگزینی لیگاند هیدروفوب بر روی سطح نقاط کوانتومی با لیگاند هیدروفیل و به منظور افزایش قطبیت سطح نقاط کوانتومی از اسید مرکاپتوسوکسینیک (MSA)<sup>۱</sup>، حاوی دو گروه کربوکسیل، به عنوان لیگاند هیدروفیل استفاده شد. برای اتصال گروه تیول اسید مرکاپتو بر روی سطح نقاط کوانتومی، مطابق با روشی که در مقالات ارائه شده است [۱۸]، چهار میلی‌مول اسید مرکاپتوسوکسینیک با پنج میلی‌لیتر کلروفرم به مدت ۱۵ دقیقه شدید هم‌زده شد و سپس، ۲۰ میلی‌گرم نقاط کوانتومی InP/ZnS تخلیص و تغلیظ شده به آن افزوده و پس از گذشت یک دقیقه، یک میلی‌لیتر هیدروکسید آمونیوم به محلول در حال هم‌زدن اضافه شد تا pH محلول در حدود ۱۱ تنظیم شود. محلول در طول شب بر روی هم‌زن باقی ماند و نقاط کوانتومی با افزودن اتانول و سانتریفوژ به-

این‌دیم، اسید میریستیک، تریس تری‌متیل سیلیل فسفین (P(TMS)<sub>3</sub>)، فولیک اسید، مرکاپتوسوکسینیک اسید، گوگرد و استئارات روی از شرکت سیگما آلدریج، اکتادسن و اکتیل آمین از شرکت مرک خریداری شدند. همه حلال‌های درجه آزمایشگاهی از جمله هگزان، متانول، استون، کلروفرم و اتانول به صورت خریداری شده از شرکت سیگما آلدریج و بدون خالص‌سازی بیش‌تر مورد استفاده قرار گرفتند.

طیف جذب فرابنفش - مرئی و طیف نشر فوتولومینسانس به ترتیب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu 1650PC) و اسپکتروفلوریمتر (Jasco FP-8000) به دست آمد. از میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM: Carl ZeissLEO 906E, 80kV) برای بررسی اندازه و مورفولوژی نقاط کوانتومی استفاده شد. طیف‌های مادون‌قرمز تبدیل فوریه (FTIR) نقاط کوانتومی InP/ZnS با استفاده از اسپکترومتر (BrukerOptik GmbH, Tensor 27, 4000-400 cm<sup>-1</sup>) حاصل شد.

## ۲-۲ سنتز نقاط کوانتومی InP/ZnS

برای دستیابی به نقاط کوانتومی با توزیع اندازه باریک، نیاز به جوانه‌زنی ناگهانی یا انفجاری و هم‌چنین جداسازی مراحل جوانه‌زنی و رشد است. بنابراین، با توجه به مطالعات صورت گرفته، روش تزریق داغ جهت سنتز نقاط کوانتومی هسته/پوسته InP/ZnS انتخاب شد [۱۶، ۱۷].

به منظور سنتز نقاط کوانتومی InP/ZnS مقدار ۰/۱۲ گرم استات ایندیم، میریستیک اسید با نسبت ۳/۵ به یک از ایندیم و چهار گرم اکتادسن در فلاسک سه دهانه تحت جریان گاز آرگون تا دمای ۱۹۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد تا محلول شفاف به دست آید. مخلوط حاصل به مدت یک ساعت تحت گاز آرگون، گاززدایی شد. محلول تزریق که مخلوطی از ۰/۰۵ گرم تریس تری‌متیل سیلیل فسفین، ۰/۳۱ گرم اکتیل آمین و ۱/۵ میلی‌لیتر اکتادسن بود، در فلاسک دیگری تحت گاز آرگون گاززدایی و تا انحلال کامل تریس تری‌متیل سیلیل فسفین هم‌زده شد. سپس، با استفاده از سرنگ، محلول حاصل به مخلوط واکنش در دمای ۱۹۰ درجه سانتی‌گراد، تزریق و منجر به کاهش دمای مخلوط واکنش به حدود ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد شد. از مخلوط واکنش در زمان‌های مختلف نمونه‌گیری شد و

<sup>۱</sup>Mercaptosuccinic Acid (MSA)

تهیه و سلول‌های OVCAR-3 به تعداد  $10^4$  عدد سلول در هر چاهک در سه پلیت ۹۶ خانه، به منظور بررسی سمی بودن بعد گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت از زمان تیمار سلول‌ها، کاشت شدند. آزمایش MTT یک روش رنگ‌سنجی است که براساس احیا شدن و شکسته شدن بلورهای زرد رنگ نمک تترازولیم به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و تشکیل بلورهای آبی رنگ نامحلول انجام می‌شود [۲۱]. سلول‌های OVCAR-3 با نمونه‌های نقاط کوانتومی InP/ZnS فاقد گروه عاملی (QDs) و نقاط کوانتومی عامل‌دار شده با فولیک اسید (QD-FA) در چهار غلظت حاوی  $0.4$ ،  $0.2$ ،  $0.1$  و  $0.05$  میلی‌گرم در میلی‌لیتر از نقاط کوانتومی تیمار شدند. هر دو پلیت ۹۶ چاهک با نمونه‌های آماده شده تیمار شدند و در انکوباتور  $CO_2$  در دمای  $37$  درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

#### ۲-۶ بررسی میزان نفوذ نقاط کوانتومی InP/ZnS فاقد گروه

##### عاملی و عامل‌دار به درون سلول با روش فلوسایتومتري

برای بررسی تأثیر گروه عاملی فولات بر میزان ورود مجموعه نقاط کوانتومی InP/ZnS عامل‌دار به درون سلول‌های سرطانی، از دو رده سلولی A549 و OVCAR-3 استفاده شد که به ترتیب فاقد گیرنده‌های فولات<sup>۷</sup> و حاوی گیرنده‌های فولات هستند. ابتدا سلول‌های A549 و OVCAR-3 در پلیت‌های حاوی شش چاهک، به تعداد  $500 \times 10^3$  عدد سلول در هر چاهک کاشت شدند. سپس، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور  $CO_2$  در  $37$  درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از گذشت زمان انکوباسیون، پلیت‌ها خارج شده و تخلیه شدند و با ۲ml از نمونه‌های QDs و QD-FA تیمار و به مدت دو ساعت در انکوباتور  $CO_2$  در  $37$  درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از شستشوی سلول‌ها با بافر نمکی فسفات (PBS) و سانتریفوژ در  $37$  درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۰ دقیقه در  $1000$  rpm، سلول‌ها در ۱ml بافر نمکی فسفات پخش شدند و در لوله‌های مخصوص دستگاه فلوسایتومتري ریخته شدند. برای انجام هر نوع فلوسایتومتري ابتدا باید سلول‌ها را آماده کرد به طوری که سلول‌ها به صورت تکی درآمده و در محیط مناسبی معلق شده باشند [۲۲].

مدت ۱۰ دقیقه با دور ۹۰۰۰ در دقیقه از سورفکتانت‌ها جدا شد و نقاط کوانتومی قابل انحلال در محیط آبی و بافرهای بیولوژیک حاصل شد.

#### ۲-۴ تهیه نقاط کوانتومی InP/ZnS عامل‌دار شده با فولات

برای ایجاد اتصال میان فولیک اسید و سطح نقاط کوانتومی، ابتدا نیاز به فعال‌سازی گروه‌های کربوکسیل موجود در سطح نقاط کوانتومی بود. روش کربودی‌ایمید<sup>۱</sup> مناسب‌ترین راه در فعال‌سازی گروه‌های کربوکسیل و اتصال آن به گروه‌های آمین و تشکیل آمید است [۲۰]. از ترکیبات متداول کربودی‌ایمید مورد استفاده در این روش ۱-اتیل-۳-(۳-دی‌متیل‌آمینوپروپیل) کربودی‌ایمید<sup>۲</sup> و N-هیدروکسی سوکسین‌ایمید<sup>۳</sup> هستند که به ترتیب با نام اختصاری EDC و NHS دی‌متیل‌سولفوکسید (DMSO) افزوده شد و به مدت یک ساعت به صورت شدید هم‌زده شد تا گروه کربوکسیل موجود در سطح نقاط کوانتومی فعال شود و قابلیت اتصال به گروه آمین فولیک اسید را پیدا کند. سپس، ۵۰ میکرولیتر محلول  $0.05$  مولار فولیک اسید به مخلوط حاصل اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت بر روی هم‌زن قرار گرفت.

بعد از گذشت ۲۴ ساعت نمونه نقاط کوانتومی متصل به گروه فولات به صورت انجمادی خشک<sup>۴</sup> و با استفاده از اتیل استات تخلیص شد و طیف FTIR آن برای بررسی اتصال فولیک اسید به سطح نقاط کوانتومی تهیه شد.

#### ۲-۵ بررسی میزان سمی بودن نقاط کوانتومی فاقد گروه

##### عاملی و عامل‌دار بر روی رده سلولی OVCAR-3

برای بررسی سمی بودن نمونه‌های مختلف، از روش MTT<sup>۵</sup> و به دلیل عامل‌دار شدن نقاط کوانتومی InP/ZnS با فولات، از سلول‌های سرطانی OVCAR-3 حاوی گیرنده‌های فولات (FR+)<sup>۶</sup> استفاده شد. سلول‌ها از انستیتو پاستور ایران

<sup>۱</sup>Carbodiimide

<sup>۲</sup>1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC)

<sup>۳</sup>N-hydroxysuccinimide (NHS)

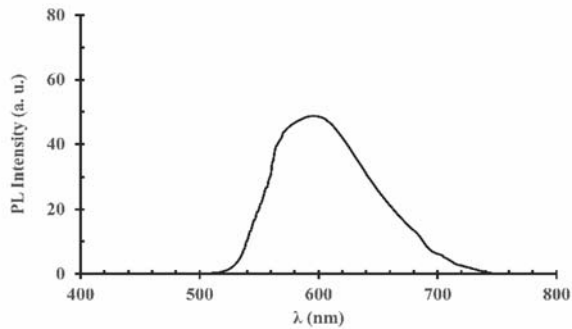
<sup>۴</sup>Lyophilize

<sup>۵</sup>Microculture Tetrazolium assay (MTT assay)

<sup>۶</sup>Folate Receptor positive (FR+)

<sup>۷</sup>Folate Receptor negative (FR-)

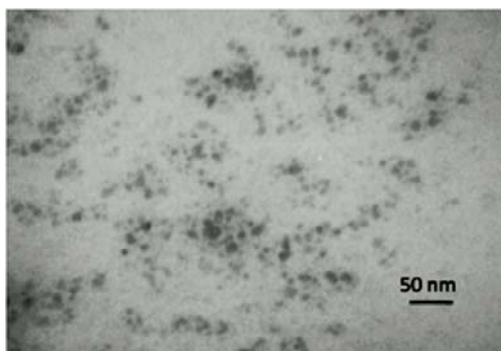
دارد، بنابراین، شکل و عرض آن به شدت تحت تأثیر توزیع اندازه و همچنین شکل و استوکیومتری نقاط کوانتومی است.



شکل ۲. نشر فوتولومینسانس (PL) نقاط کوانتومی InP/ZnS

در شکل ۲ طیف نشر فوتولومینسانس<sup>۴</sup> نقاط کوانتومی InP/ZnS آورده شده است. نشر فوتولومینسانس نقاط کوانتومی در اثر برانگیختگی با طول موج ۴۰۰ نانومتر حاصل شد. با تغییر طول موج برانگیختگی نقاط کوانتومی، شدت نشر آنها دچار تغییر شد که علت آن می‌تواند قابلیت نقاط کوانتومی در جذب طول موج‌های خاص به دلیل کوانتیزه بودن ترازهای انرژی الکترون باشد [۲۵]. در واقع طول موج‌های تحریک متعددی از ۳۵۰ نانومتر تا ۵۵۰ نانومتر بررسی شد و با توجه به پیک‌های نشر حاصل، بیشترین شدت نشر فوتولومینسانس در طول موج برانگیختگی ۴۰۰ نانومتر به دست آمد.

تصویر TEM نقاط کوانتومی InP/ZnS در شکل ۳ نشان‌دهنده اندازه میانگین ۱۱ نانومتری نقاط کوانتومی و مورفولوژی کروی آنها است.



شکل ۳. تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) نقاط کوانتومی InP/ZnS

### ۲-۳ نقاط کوانتومی InP/ZnS عامل دار

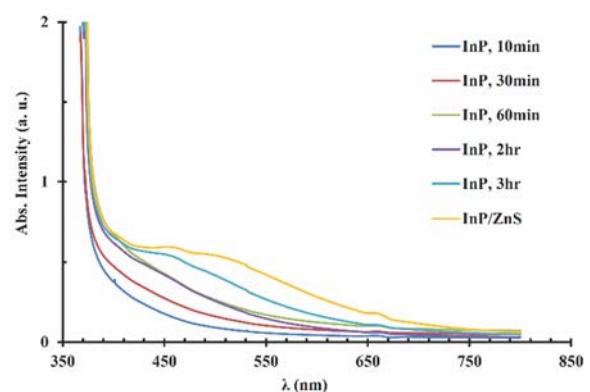
طیف مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) QDs و QD-FA در شکل ۴ آورده شده است. مشابه دیگر انواع جذب انرژی،

برای انجام آزمایش میزان نفوذ نانوحامل در این قسمت از روش فلوسایتومتری<sup>۱</sup> FACS استفاده شد که اساس این روش، طبقه‌بندی مخلوطی هتروژن از سلول‌های بیولوژیک برپایه پراش نور و مشخصه فلورسانس هر سلول است. در این مرحله سلول‌های تیمار شده با نمونه‌های QDs و QD-FA با غلظت نقاط کوانتومی ۰/۲ mg/ml در محدوده FITC مورد بررسی قرار گرفتند و جمعیت سلولی حاوی نقاط کوانتومی فلورسانس در مورد هر دو رده سلولی A549 و OVCAR-3 جهت مقایسه تأثیر گروه‌های عاملی در میزان ورود به سلول و قابلیت نقاط کوانتومی در تصویربرداری به دست آمد.

## ۳- نتایج و بحث

### ۱-۳ خواص نوری نقاط کوانتومی InP/ZnS

طیف جذب UV-vis نقاط کوانتومی InP پس از گذشت زمان‌های مختلف و نقاط کوانتومی هسته/پوسته InP/ZnS در گستره طول موج ۳۵۰ تا ۸۰۰ نانومتر در شکل ۱ آورده شده‌اند. جذب یک فوتون در نقاط کوانتومی زمانی اتفاق می‌افتد که انرژی فوتون از شکاف انرژی بیش تر باشد.



شکل ۱. طیف جذب فرابنفش - مرئی (UV-Vis) نقاط کوانتومی InP/ZnS

کاهش اندازه ذره، به دلیل وقوع حبس کوانتومی، منجر به شیفت آبی<sup>۲</sup> شروع جذب در طیف جذب ذره می‌شود [۲۳]. پیک جذب نسبی برجسته در شروع طیف جذب مربوط به پیک اکسایتونیک<sup>۳</sup> است [۲۴]، به عبارت دیگر پایین‌ترین حالت برانگیخته، شدت نوسان بالایی نشان می‌دهد و با توجه به اینکه موقعیت آن بستگی به شکاف انرژی و در نتیجه به اندازه ذره

<sup>۱</sup>Fluorescence activated cell sorting (FACS)

<sup>۲</sup>Hypsochromic (blue-) shift

<sup>۳</sup>Excitonic peak

<sup>۴</sup>Photoluminescence

ظهور پیک این پیوند نیز تأییدی بر اتصال موفق گروه آمین در گروه عاملی به گروه کربوکسیل در سطح نقاط کوانتومی است.

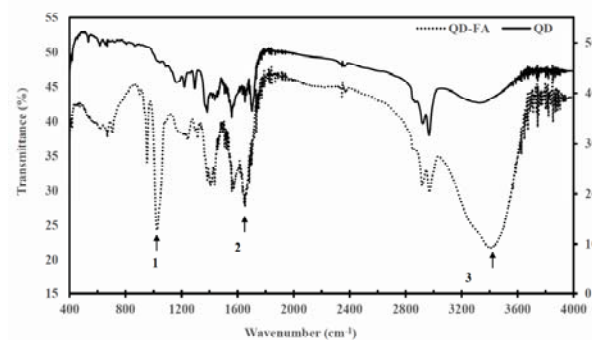
### ۳-۳ سمی بودن نقاط کوانتومی InP/ZnS

در آزمون سمی بودن، رده سلولی OVCAR-3 با QDs و QD-FA در غلظت‌های ۰/۴، ۰/۲، ۰/۱ و ۰/۰۵ میلی گرم از نقاط کوانتومی InP/ZnS در یک میلی لیتر تیمار شدند. شکل ۵ نتایج آزمون سمی بودن به روش MTT را نشان می دهد. با توجه به شکل ۵ در مورد تمامی نمونه‌ها، با افزایش غلظت نقاط کوانتومی، میزان زیست‌پذیری سلول‌های OVCAR-3 تیمار شده، کاهش یافت. همچنین، زیست‌پذیری سلول‌ها با گذشت زمان در ۲۴ و ۴۸ ساعت روند کاهشی داشت.

نتایج آزمون سمی بودن MTT در شکل ۵ نشان می دهد که غلظت بهینه نقاط کوانتومی که در آن غلظت، سمی بودن پایینی از نقاط کوانتومی فاقد گروه عاملی و عامل دار شده با فولیک اسید حاصل شد، مقدار ۰/۲ میلی گرم بر میلی لیتر (۰/۸۲) از نقاط کوانتومی InP/ZnS بود که در این غلظت پس از گذشت ۲۴ ساعت ۷۸/۵ و ۹۵/۲۷ درصد از سلول‌های تیمار شده به ترتیب با نقاط کوانتومی فاقد گروه عاملی و نقاط کوانتومی عامل دار شده با فولیک اسید زنده ماندند. در گزارش‌های منتشر شده در رابطه با میزان سمی بودن نقاط کوانتومی InP و InP/ZnS درصد سلول‌های زنده در غلظت ۲۰۰ nM از نقاط کوانتومی InP حدود ۷۷ درصد [۲۶] و در غلظت ۵ nM حدود ۹۵ درصد [۲۷] حاصل شده است که این غلظت‌ها در مقایسه با غلظتی از نقاط کوانتومی که در این پژوهش بررسی شد (۱/۶۴  $\mu$ M - ۰/۲  $\mu$ M) کمتر هستند.

همچنین با توجه به نتایج آزمون سمی بودن، عامل دار شدن نقاط کوانتومی با فولیک اسید باعث کاهش سمی بودن نقاط کوانتومی شد که مزیت خوبی به خصوص در تصویربرداری و تشخیص محسوب می گردد، زیرا هم‌زمان با افزایش هدفمندی ورود نقاط کوانتومی به سلول‌های سرطانی، سمی بودن بسیار کمی برای سلول‌های سالم دارد. علاوه بر ماده هسته، عوامل سطحی، نوع رده سلولی مورد بررسی و میزان ورود نانوحامل‌ها به درون سلول تأثیر بسزایی در میزان سمی بودن آن دارد. بنابراین، سمی بودن نقاط کوانتومی باید مورد به مورد بررسی شود و نتایج نشان می دهد که نیاز اساسی

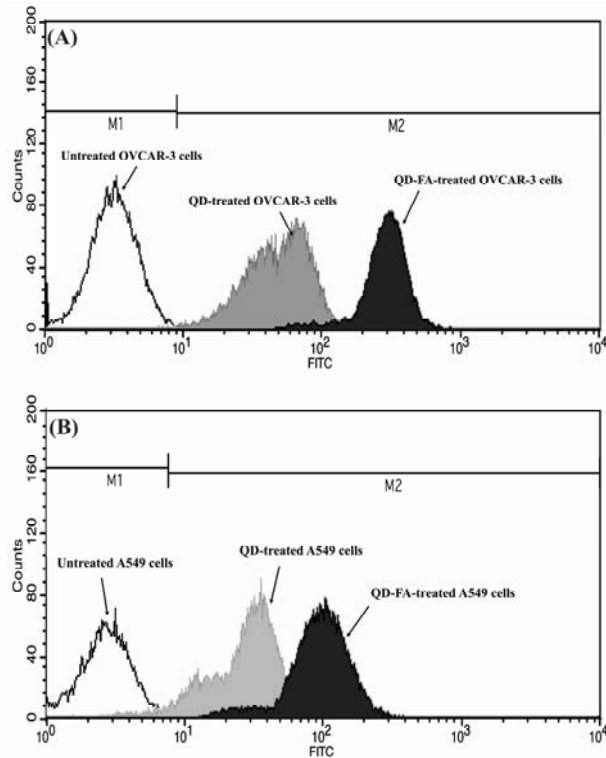
هنگامی که مولکول‌ها اشعه مادون قرمز را جذب می کنند، به حالت انرژی بالاتر برانگیخته می شود. جذب تابش مادون قرمز همانند دیگر فرآیندهای جذب، فرآیندی کوانتایی است. به این صورت که فقط فرکانس‌های خاصی از تابش مادون قرمز توسط مولکول جذب و باعث ارتعاش کششی و خمشی پیوندهای کوالانسی می شود. انرژی جذب شده از نور مادون قرمز توسط پیوندهای شیمیایی یا گروه‌های عاملی خاص در طول موج مشخص، منجر به کاهش شدت عبور نور شده و به طور معمول به عنوان تابعی از عدد موج (1/cm) رسم می شود. با توجه به شکل ۴ پیک شماره دو در حدود عدد موج ۱۷۰۰ در طیف FTIR نقاط کوانتومی فاقد گروه‌های عاملی مربوط به پیوند C=O اسیدی است که در طیف مربوط به نقاط کوانتومی عامل دار به سمت ۱۶۵۰ انتقال پیدا کرده است که معرف پیوند C=O آمیدی است. پیوند آمیدی نتیجه ایجاد پیوند میان گروه‌های آمین و کربوکسیل است.



شکل ۴. طیف مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) نقاط کوانتومی فاقد گروه عاملی (QDs) و نقاط کوانتومی عامل دار شده با فولیک اسید (QD-FA).

پیک شماره سه در حدود عدد موج ۳۳۰۰ در طیف FTIR نمونه فاقد گروه‌های عاملی که معرف پیوند H=O است در طیف مربوط به نمونه عامل دار شده با فولات جابه‌جایی کمی به سمت عدد موج ۳۴۰۰ پیدا کرده است که در واقع معرف پیوند N-H و O-H است. در این ناحیه هم‌پوشانی پیک مربوط به این دو پیوند، تفسیر طیف FTIR را مشکل می سازد، لیکن پیک مربوط به آمید، خود می تواند تأییدی بر اتصال گروه آمین موجود در فولیک اسید به گروه کربوکسیل موجود در سطح نقاط کوانتومی باشد که در شکل ۴ آورده شده است. همچنین پیک شماره یک که در طیف مربوط به نقاط کوانتومی عامل دار در شکل ۴ ظاهر شده است، مربوط به پیوند C-N است که

A549 و OVCAR-3 که با نمونه‌های مختلف تیمار شده بودند، با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری FACS به دست آمد.

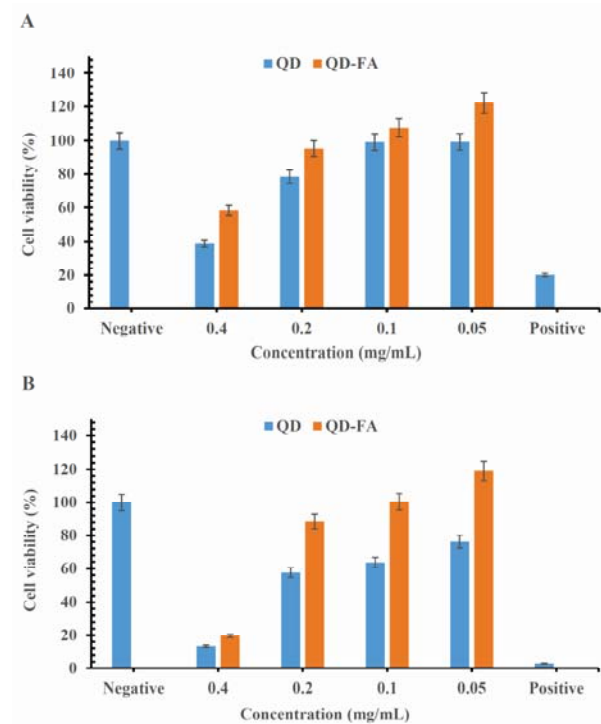


شکل ۶. هیستوگرام فلوسایتومتری سلول‌های OVCAR-3 (A) و A549 (B) تیمار شده با QDs و QD-FA.

هیستوگرام مربوط به سلول‌های رده OVCAR-3 تیمار نشده، تیمار شده با QDs و QD-FA در شکل (A) ۶ مقایسه شده است. در هیستوگرام فلوسایتومتری، هر چه جمعیت سلولی بر روی محور FITC که همان محور افقی است، به سمت راست جابه‌جا شود، نماینده از دیاد شدت فلورسانس و یا به عبارت دیگر افزایش میزان ورود ماده فلورسانس به درون سلول‌ها است. با توجه به شکل ۶، سلول‌های تیمار شده با نقاط کوانتومی در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده، بر روی محور افقی به سمت راست جابه‌جایی داشت که نشان‌دهنده ورود نقاط کوانتومی به درون سلول بود. هیستوگرام مربوط به سلول‌های تیمار شده با QD-FA جابه‌جایی بیشتری نسبت به سلول‌های تیمار شده با QDs داشت که نشان می‌داد، عامل‌دار شدن نقاط کوانتومی با فولیک اسید تأثیر بسزایی بر میزان ورود نقاط کوانتومی به درون سلول‌های OVCAR-3 که حاوی گیرنده‌های فولیک اسید هستند، دارد.

در شکل (B) ۶ نیز هیستوگرام فلوسایتومتری سلول‌های رده A549، افزایش ورود نقاط کوانتومی به درون سلول را در

به ایجاد فرآیندها و پروتکل‌های استاندارد جهت ارزیابی سمی بودن فرمولاسیون‌های مختلف نقاط کوانتومی وجود دارد [۲۸].



شکل ۵. نتایج آزمون سمی بودن سلول‌های OVCAR-3 تیمار شده با QDs و QD-FA به روش MTT بعد از گذشت زمان‌های (A) ۲۴ و (B) ۴۸ ساعت.

### ۳-۴ میزان نفوذ نقاط کوانتومی InP/ZnS عامل‌دار به درون سلول‌های سرطانی

هیستوگرام‌های حاصل از فلوسایتومتری سلول‌های رده A549 و OVCAR-3 که با QDs و QD-FA به مدت دو ساعت تیمار شده بودند در شکل ۶ آورده شده است.

در مورد هر دو رده سلولی، یک نمونه کنترل که در واقع سلول‌های تیمار نشده بودند، وجود داشت. نمونه کنترل در فلوسایتومتری برای تعیین ناحیه سلول‌های رنگ نشده ضروری است. به عبارت دیگر در بررسی میزان ورود تمامی نمونه‌ها به درون سلول‌ها، ابتدا ناحیه سلول‌های رنگ نشده در محدوده FITC مشخص شد. علت انتخاب محدوده FITC، سبز بودن رنگ نقاط کوانتومی InP/ZnS و قرار داشتن طول موج نشری آن‌ها در محدوده FITC بود. پس از مشخص شدن ناحیه سلول‌هایی که فاقد رنگ یا نقاط کوانتومی فلورسانس بودند، تعداد سلول‌های حاوی نقاط کوانتومی در هر دو رده سلولی

نقاط کوانتومی در اثر عامل دار شدن با گروه عاملی فولات در مورد سلول‌های OVCAR-3(FR+) در مقایسه با سلول‌های A549(FR-) بود.

به‌طور کلی نتایج حاصل از این پژوهش نشان‌دهنده دست‌یابی به هدف تهیه نقاط کوانتومی InP/ZnS عامل‌دار با حداقل سمی بودن با قابلیت اتصال به دارو برای کاربرد در تصویربرداری و درمان هم‌زمان سلول‌های سرطانی بود.

## مراجع

1. Reiss, P., Protiere, M. and Li, L., Core/shell semiconductor nanocrystals, *Small*, 5(2) (2009) 154-168.
2. Dickerson, B.D., Organometallic synthesis kinetics of CdSe quantum dots, (2005), Virginia Tech.
3. Sargent, E.H., Colloidal quantum dot solar cells, *Nature photonics*, 6(3) (2012) 133-135.
4. Bao, J. and Bawendi, M.G., A colloidal quantum dot spectrometer, *Nature*, 523 (2015) 67-70.
5. Ning, Z., et al., Air-stable n-type colloidal quantum dot solids, *Nature Materials*, 13(8) (2014) 822-828.
6. Chuang, C.-H.M., et al., Improved performance and stability in quantum dot solar cells through band alignment engineering, *Nature Materials*, 13(8) (2014) 796-801.
7. Voura, E.B., et al., Tracking metastatic tumor cell extravasation with quantum dot nanocrystals and fluorescence emission-scanning microscopy, *Nature Medicine*, 10(9) (2004) 993-998.
8. Allen, P.M., Semiconductor nanocrystals: synthesis, mechanisms of formation, and applications in biology, 2010, Massachusetts Institute of Technology.
9. Suri, S.S., Fenniri, H. and Singh, B., Nanotechnology-based drug delivery systems, *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 2(1) (2007) 16.
10. Probst, C.E., et al., Quantum dots as a platform for nanoparticle drug delivery vehicle design, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(5) (2013) 703-718.
11. Dey, N.S. and Rao, M., Quantum dot: Novel carrier for drug delivery, *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 2 (2011) 448-458.
12. Yong, K.-T., et al., Preparation of quantum dot/drug nanoparticle formulations for traceable targeted delivery and therapy, *Theranostics*, 2(7) (2012) 681-694.
13. Shi, C., et al. Quantum dots: emerging applications in urologic oncology. in *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, (2008), Elsevier.
14. Biju, V., et al., Bioconjugated quantum dots for cancer research: present status, prospects and remaining issues, *Biotechnology Advances*, 28(2) (2010) 199-213.
15. Su, Y., et al., The cytotoxicity of cadmium based, aqueous phase-synthesized, quantum dots and its modulation by surface coating, *Biomaterials*, 30(1) (2009) 19-25.
16. Battaglia, D. and Peng, X., Formation of high quality InP and InAs nanocrystals in a noncoordinating solvent, *Nano Letters*, 2(9) (2002) 1027-1030.
17. Xu, S., Kumar, S. and Nann, T., Rapid synthesis of high-quality InP nanocrystals, *Journal of the American Chemical Society*, 128(4) (2006) 1054-1055.
18. Bharali, D.J., et al., Folate-receptor-mediated delivery of

اثر عامل دار شدن با فولیک اسید نشان می‌دهد. رده سلولی A549 فاقد گیرنده‌های فولیک اسید است و به همین علت میزان جابه‌جایی جمعیت سلولی بر روی محور FITC نسبت به سلول‌های OVCAR-3 کمتر بود.

به‌طور کلی نتایج حاصل از فلوسایتومتری نشان‌دهنده دست‌یابی به هدف افزایش ورود نقاط کوانتومی به درون سلول‌های سرطانی در اثر اتصال گروه عاملی فولات بود.

## ۴- نتیجه‌گیری

نقاط کوانتومی به دلیل خواص منحصر به فرد نوری و خاصیت فلورسانس قابل تنظیم با اندازه، کاربردهای بیولوژیکی جالب توجهی دارند. از این میان، نقاط کوانتومی InP/ZnS به دلیل سمی بودن اندک، در حوزه بیولوژی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند.

در این تحقیق، نقاط کوانتومی InP/ZnS به روش تزریق داغ سنتز شدند و طیف جذب فرابنفش - مرئی (UV-Vis) نقاط کوانتومی در زمان‌های مختلف نشان‌دهنده بزرگ‌تر شدن اندازه نقاط کوانتومی با گذشت زمان و در نتیجه جابه‌جایی طول موج جذب به سمت طول موج‌های بزرگ‌تر شد. پس از اتصال فولیک اسید به سطح نقاط کوانتومی، سمی بودن QDs و QD-FA با استفاده از روش MTT بر روی رده سلولی OVCAR-3 بررسی شد. نتایج حاکی از سمی بودن اندک نقاط کوانتومی فاقد گروه عاملی و نقاط کوانتومی عامل‌دار بود. عامل دار شدن نقاط کوانتومی باعث کاهش بیش‌تر سمی بودن نقاط کوانتومی InP/ZnS شد. نتایج آزمون MTT، میزان زیست‌پذیری ۷۰٫۳ درصدی سلول‌ها را در مورد نقاط کوانتومی با غلظت ۰٫۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نشان داد. عامل دار شدن نقاط کوانتومی با فولیک اسید، باعث کاهش بیش‌تر سمی بودن نقاط کوانتومی InP/ZnS شد و ۸۸٫۵ درصد سلول‌ها پس از ۴۸ ساعت تیمار شدن با QD-FA با همان غلظت از نقاط کوانتومی، زنده ماندند. آزمونش، آزمون

بررسی میزان ورود نقاط کوانتومی فاقد گروه عاملی (QDs) و عامل‌دار شده با فولیک اسید (QD-FA) به درون سلول‌های رده OVCAR-3 و A549 با استفاده از فلوسایتومتری FACS نشان‌دهنده افزایش چشم‌گیر میزان ورود



- InP quantum dots for bioimaging using confocal and two-photon microscopy, *Journal of the American Chemical Society*, 127(32) (2005) 11364-11371.
19. Yong, K.-T., et al., Imaging pancreatic cancer using bioconjugated InP quantum dots, *Acs Nano*, 3(3) (2009) 502-510.
  20. Bellucci, M.C. and Volonterio, A., Carbodiimides-Mediated Multi component synthesis of Biologically Relevant structures, *Organic Chemistry Insights*, 4 (2012) 1-24.
  21. van Meerloo, J., Kaspers, G.J. and Cloos, J., Cell sensitivity assays: the MTT assay, *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*, 731 (2011) 237-245.
  22. Picot, J., et al., Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation, *Cytotechnology*, 64(2) (2012) 109-130.
  23. Cao, G. and Brinker, C.J., Annual review of nano research, *NJ: World Scientific*, 2 (2008).
  24. Hawrylak, P., et al., Excitonic absorption in a quantum dot, *Physical review letters*, 85(2) (2000) 389.
  25. Jones, A., Verlinden, N. and Quimby, R., Optical properties of quantum dots: An undergraduate Physics Laboratory, (2007).
  26. Zhang, X., et al., Comparative cytotoxicity of gold-doxorubicin and InP-doxorubicin conjugates, *Nanotechnology*, 23(27) (2012) 275103.
  27. Brunetti, V., et al., InP/ZnS as a safer alternative to CdSe/ZnS core/shell quantum dots: in vitro and in vivo toxicity assessment, *Nanoscale*, 5(1) (2013) 307-317.
  28. Liu, J., et al., Cytotoxicity assessment of functionalized CdSe, CdTe and InP quantum dots in two human cancer cell models, *Materials Science and Engineering: C*, 57 (2015) 222-231.