

## Synthesis of CdSe/ZnS Core Shell Quantum Dots and in vitro Evaluation of Their Emission Effects on Raji Cells Death

M. Parviz<sup>1</sup>, M. Rabiee<sup>2\*</sup>, M.A. Shokrgozar<sup>3</sup>, F. Moztarzadeh<sup>4</sup>, F. Yousefi Gharebaghi<sup>5</sup>,  
M. Shayan<sup>6</sup>, M.R. Tahriri<sup>7</sup>

<sup>1</sup> M.Sc Student, Biomaterial Group, School of Biomedical Engineering, AmirKabir University of Technology, Tehran, Iran, mparviz@aut.ac.ir

<sup>2</sup> Associate Professor, Biomaterial Group, School of Biomedical Engineering, AmirKabir University of Technology, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Associate Professor, National Cell Bank of Iran, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran  
mashokrgozar@pasteur.ac.ir

<sup>4</sup> Professor, Biomaterial Group, School of Biomedical Engineering, AmirKabir University of Technology, Tehran, Iran, moztarzadeh@aut.ac.ir

<sup>5</sup> M.Sc Graduated, Biomaterial Group, School of Biomedical Engineering, AmirKabir University of Technology, Tehran, Iran, fgharebaaghi@aut.ac.ir

<sup>6</sup> M.Sc Student, Biomaterial Group, School of Biomedical Engineering, AmirKabir University of Technology, Tehran, Iran, mshayan@aut.ac.ir

<sup>7</sup> PhD Candidate, Biomaterial Group, School of Biomedical Engineering, AmirKabir University of Technology, Tehran, Iran, mtahriri@aut.ac.ir

### Abstract

A great deal of attention has been drawn to the colloidal chemistry based semiconductor nanocrystallites, also known as quantum dots (QDs). Because of the strong quantum confinement, quantum dots have unique size-dependent optical properties, which are much more superior to the conventional organic fluorescence materials. In addition, strong chemical resistant makes inorganic semiconductor QDs an ideal candidate for next-generation of bio-labels and other biomedical applications. This study presents a synthesized method of high quality biocompatible CdSe QDs in aqueous solution by using gelatin as inhibitor. A thin ZnS layer was grown on CdSe QDs, forming a CdSe/ZnS core/shell structure, to improve the photoluminescence. The optical properties of the QDs were characterized by photoluminescence spectra. The stability of CdSe/ZnS QDs in aqueous solution has been improved with capping in mercaptosuccinic acid (MSA) groups. PAGE test results show that carboxylic groups of MSA have interacted with NH<sub>2</sub> agent of CD20 antibodies. We evaluate the in vitro efficiency of the luminescence of the bioconjugated QDs to kill Raji cells. Raji cells have anti-CD20 which can especially connect to CD20-QDs. In conclusion, we found that CD20-CdSe/ZnS bioconjugated QDs with different concentration 50-250 µg/mL which have been excited at 400nm in 2h intervals can result in Raji cells death. This study shows the potential of CdSe/ZnS for cancer treatment.

**Keywords:** Quantum dots, CdSe, ZnS, Core/Shell, Cancer treatment.

\* Corresponding author

Address: Mohammad Rabiee Biomaterial Group, School of Biomedical Engineering, AmirKabir University of Technology, P. O. Box: 15875-4413, Tehran, Iran  
Tel: +98 21 64542381; +98 9121 4276858  
Fax: +98 21 64542381  
E-mail: mrabiee@aut.ac.ir

## سنتر نقاط کوانتومی هسته/پوسته CdSe/ZnS و بررسی اثربخشی آنها در مرگ سلول‌های راجی در شرایط آزمایشگاهی

مریم پرویز<sup>۱</sup>، محمد ربیعی<sup>۲\*</sup>، محمد علی شکرگذار<sup>۳</sup>، فتح‌اله مضطرزاده<sup>۴</sup>، فرزاد یوسفی قره‌باغی<sup>۵</sup>،  
مه‌دیس شایان<sup>۶</sup>، محمدرضا تحریری<sup>۷</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیومواد، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران [mparviz@aut.ac.ir](mailto:mparviz@aut.ac.ir)  
<sup>۲</sup> دانشیار، گروه بیومواد، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران  
<sup>۳</sup> دانشیار، بانک ملی سلول ایران، انستیتو پاستور ایران، تهران [mashokrgozar@pasteur.ac.ir](mailto:mashokrgozar@pasteur.ac.ir)  
<sup>۴</sup> استاد، گروه بیومواد، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران [moztarzadeh@aut.ac.ir](mailto:moztarzadeh@aut.ac.ir)  
<sup>۵</sup> کارشناس ارشد مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران [fgharebaaghi@aut.ac.ir](mailto:fgharebaaghi@aut.ac.ir)  
<sup>۶</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیومواد، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران [mshayan@aut.ac.ir](mailto:mshayan@aut.ac.ir)  
<sup>۷</sup> دانشجوی دکترا، گروه بیومواد، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران [mtahriri@aut.ac.ir](mailto:mtahriri@aut.ac.ir)

### چکیده

نقاط کوانتومی (نانو بلورهای نیمه هادی) و سیستم‌های هسته پوسته تهیه شده از آنها از جمله موادی هستند که امروزه بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. از میان این دسته از مواد نقاط کوانتومی کادمیم سلناید (CdSe) به تنهایی و یا به همراه پوسته‌ای از سولفاید روی (ZnS)، به دلیل پایداری نوری، بازدهی لومینسانس بالا و دامنه وسیعی از بازتاب آن هم در محدوده نور مرئی، مورد توجه ویژه در برخی کاربردهای مهندسی پزشکی هستند. در این تحقیق نقاط کوانتومی CdSe زیست‌سازگار و محلول در آب با روشی ساده و ارزان با استفاده از عامل بازدارنده ژلاتین سنتز شده است و سپس پوششی از ZnS به روش رسوبی بر روی آن قرار گرفته است. خواص نوری این نقاط با اندازه‌گیری میزان فوتولومینسانس ناشی از آنها بررسی شده است و زیست‌سازگاری آنها تا غلظت  $200 \mu\text{g/ml}$  با استفاده از تحلیل نتایج آزمون MTT تأیید شده است. با قرار دادن گروه‌های مرکاپتو ساکسینیک اسید بر روی سطح این نقاط علاوه بر افزایش پایداری آنها در محیط آبی، سطح با گروه‌های کربوکسیلیک عاملدار شده است. این گروه‌ها در مجاورت گروه‌های آمینی آنتی‌بادی CD20، پیوندهای آمیدی تشکیل داده است. به منظور بالا بردن بازده فرایند اتصال آنتی‌بادی‌ها به سطح نقاط کوانتومی از ۱- اتیل-۳- [۳- دی‌متیل آمینو پروپیل] کربودی‌آیماید هیدروکلراید و هیدروکسی سولفوساکسین آیماید استفاده شده است. نتایج آزمون PAGE، افزایش  $20 \text{ kDal}$  در وزن آنتی‌بادی‌ها را نشان می‌دهد که بیانگر کانژوگه شدن این پروتئین‌ها با نقاط کوانتومی مذکور است. غلظت‌های مختلف نقاط کوانتومی بیوکانژوگه شده در مجاورت سلول‌های رده لنفونیدی B (راجی) قرار داده شده‌اند و با اعمال تابش در محدوده  $400 \text{ nm}$  (فرابنفش) در بازه‌های زمانی مختلف اثر لومینسانس حاصل از این نقاط کوانتومی بر مرگ سلول‌ها بررسی شده است.

کلیدواژگان: کادمیم سلناید، سولفید روی، نقاط کوانتومی، هسته/ پوسته، درمان سرطان.

\*عهده‌دار مکاتبات

نشانی: تهران، خیابان حافظ، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی پزشکی

تلفن: ۶۴۵۴۲۳۸۱، دورنگار: ۶۴۵۴۲۳۸۱، پیام‌نگار: [mrabiee@aut.ac.ir](mailto:mrabiee@aut.ac.ir)

## ۱- مقدمه

و انواع مختلف آنالیت‌های زیستی، شدت فوتولومینسانس متفاوت از خود نشان می‌دهند که بیانگر حضور و مقدار آنالیت موردنظر در محیط است [۱۴، ۱۷].

سنتر  $CdSe/ZnS$  به روش ارگانومتالیک<sup>۵</sup> با استفاده از  $TOPO$ <sup>۶</sup> روشی بسیار رایج است [۱۳]. ذرات تولید شده از این روش در محیط‌های آبی نظیر محیط بیولوژیک بدن، محلول نیستند و حاوی ترکیبات سمی آلی- فلزی‌اند. که استفاده از آنها در کاربردهای بیولوژیکی را محدود می‌سازد [۱۸، ۱۹]. امروزه روش‌های مختلفی برای تولید نقاط کوانتومی  $CdSe/ZnS$  محلول در آب توسعه یافته‌اند از این رو امکان اتصال مولکول‌های زیستی به سطح نقاط کوانتومی  $CdSe/ZnS$  به واسطه پیوندهای کووالانسی و غیر کووالانسی وجود دارد [۱۰].

دیپیک<sup>۷</sup> و همکاران نقاط کوانتومی  $CdSe/ZnS$  را در اتصال با مولکول‌های زیستی آنتی‌بادی را به‌عنوان برچسب‌های لومینسانس برای تشخیص آنتی ژن‌های سرطان روده به‌کار برده‌اند [۲]. در روش‌های معمول تشخیص و درمان سرطان شامل جراحی، شیمی‌درمانی و رادیودرمانی قابلیت درمان به موقع پایین است. و میزان دارویی که در روش‌های درمانی رایج به محل دقیق تومور می‌رسد کافی نیست؛ همچنین امکان آسیب‌رسانی به بافت‌های سالم بدن بالاست [۲۰]. بنابراین امروزه رویکرد محققان به روش‌های تشخیصی-درمانی جدید با کارایی بالاتر و آسیب‌رسانی کمتر به بافت‌های سالم بدن است. استفاده از نقاط کوانتومی با پوشش پلیمری یا سرامیکی زیست‌سازگار که با عوامل شیمیایی یا زیستی خاص هدفمند شده‌اند از رویکردهای این محققان است [۲۱]. با توجه به بالا بودن چگالی اتم و الکترون در نقاط کوانتومی، این ذرات پتانسیل جذب انرژی فوتون بالایی داشته و می‌توانند با نشانه‌گیری سلول‌های سرطانی به صورت هدفمند، موجب مرگ آنها شوند [۲۲]. از طرفی تابش مستقیم پرتو ماوراء بنفش ممکن است به آزاد شدن رادیکال آزادهای اکسیژن و آسیب به بافت‌های سالم منجر شود [۲۰]. بنابراین با تابش‌دهی نقاط کوانتومی می‌توان از آسیب‌های احتمالی تابش مستقیم UV خودداری کرد.

نانوبلورهای نیمه‌هادی که در معرض تابش نور در طول موج بالاتر از خود نور ساطع می‌کنند نقاط کوانتومی<sup>۱</sup> (QDs) نامیده می‌شوند. علت این نامگذاری رفتار یکسان الکترون‌های موجود در این بلورهاست [۱]. نقاط کوانتومی قابلیت جذب نور در محدوده وسیعی دارند و طول موج نور بازتابی از آنها به اندازه ذرات بستگی دارد. خواص لومینسانس<sup>۲</sup> منحصر به فرد نانوبلورهای نیمه‌هادی به استفاده از این مواد در ساخت انواع وسایل الکترونیکی منجر شده است [۲-۴]. این دسته جدید از مواد فلورسنت در کاربردهای مختلف پزشکی مانند ساخت انواع زیست حسگرها [۵، ۶]، تصویر کردن و درمان تابشی تومورهای سرطانی [۷]، استفاده می‌شود.

استفاده از نقاط کوانتومی در کاربردهای مختلف، دارای محدودیت‌هایی چون تجمع ذرات<sup>۳</sup>، سمیت و عدم زیست سازگاری و نیز عدم انتخاب‌پذیری آنهاست [۸]. محققان پس از سنتز این نقاط، با انجام عملیات تکمیلی به اصلاح سطح [۸] و انتخاب‌پذیر کردن عوامل سطحی [۹] می‌پردازند. پوشش‌دهی نقاط کوانتومی (هسته) با لایه‌ای از نیمه‌هادی دیگر (پوسته) که دارای باند انرژی بزرگتری است، به بهبود خواص تشعشع لومینسانس مجموعه منجر می‌شود و معمولاً در این عملیات پوسته لایه نسبتاً خنثایی است که روی سطح قرار می‌گیرد که از آزاد شدن یون‌های سمی هسته به محیط جلوگیری می‌کند. تاکنون سیستم‌های هسته-پوسته مختلفی از جمله سیستم‌های  $CdSe/ZnS$  [۱۰]،  $CdSe/CdS$  [۱۱] و  $Hgs/CdS$  [۱۲] سنتز شده است. از این میان این دسته از مواد، نقاط کوانتومی با هسته از جنس  $CdSe$  و پوسته  $ZnS$  بیشتر از همه در ساخت وسایل نوری مورد توجه بوده‌اند [۱۳]. این نقاط کوانتومی به دلیل شباهت ابعادی به بیومولکول‌ها (نوکلئیک‌اسیدها و پروتئین‌ها) اخیراً در کاربردهای مهندسی پزشکی نیز بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند [۱۴، ۱۵]. طیف لومینسانس نقاط کوانتومی  $CdSe/ZnS$  با تغییر اندازه هسته تغییر می‌کند [۱۶]. این ترکیب‌ها در اتصال با گیرنده‌های مناسب<sup>۴</sup>، در حضور مقادیر

<sup>۱</sup> Quantum dots  
<sup>۵</sup> Organometallic

<sup>۲</sup> Luminance  
<sup>۶</sup> Tri-n-octylphosphin oxide

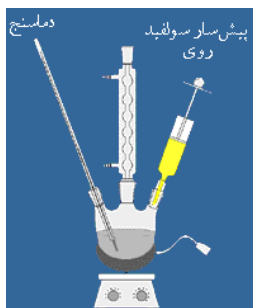
<sup>۳</sup> Agglomeration  
<sup>۷</sup> Dybie

<sup>۴</sup> Ligand

ساعت در دمای  $80^{\circ}\text{C}$  حل شدند. برای تهیه محلول ۲،  $0.147\text{g}$  از  $\text{CdCl}_2$  با همان مقدار ژلاتین در  $20\text{mlit}$  آب دیونیزه حل شد. به منظور سریع تر شدن فرایند حل شدن کلرید کلسیم در آب، از حمام آبی با دمای  $50^{\circ}\text{C}$  به مدت ۵ دقیقه استفاده شد. pH محلول ۲ را روی ۷ تنظیم شد. برای این کار آمونیوم رقیق شده به کار رفت. دو محلول به نحوی به هم اضافه شدند که نسبت مولی  $1/2$  بین کادمیم و سلنیوم برقرار شود. سپس محلول نهایی به مدت ۲۴ ساعت روی دستگاه لرزاننده<sup>۱۵</sup> قرار گرفت تا واکنش میان کادمیم و سلنیوم به شکل گیری نانوبلورهای کادمیم سلناید ( $\text{CdSe}$ ) منجر شود که در نهایت محلولی نارنجی رنگی به دست می دهد.

### ۲-۳- سنتز $\text{CdSe/ZnS}$

$8\text{mlit}$  از محلول  $20\text{mMol}$   $\text{CdSe}$  درون ظرف ۳ دهانه ای قرار گرفت و با پیاده کردن سیستم بازروانی<sup>۱۱</sup> اجازه داده شد تا دمای محلول به  $80^{\circ}\text{C}$  برسد. این عملیات با استفاده از دستگاه گرمادهنده و چرخاننده مدل آلفا- $505\text{AG}$ <sup>۱۲</sup> انجام شد.  $10\text{mlit}$  محلول  $\text{ZnCl}_2$  به عنوان پیش ساز روی و  $10\text{mlit}$  محلول سولفیت سدیم به عنوان پیش ساز گوگرد را به نحوی تهیه می کنیم که غلظت مولی آنها ۲ برابر غلظت مولی  $\text{CdSe}$  مورد استفاده در این مرحله باشد. از دهانه ظرف قطره قطره محلول های آماده شده به محلول  $\text{CdSe}$  که در حال هم خوردن شدید است، اضافه شد. رنگ محلول به تدریج نارنجی پررنگ می شود. شکل ۱ نمایی از سیستم سنتز نقاط کوانتومی  $\text{CdSe/ZnS}$  را نشان می دهد.



شکل ۱- طراحی ساده از سیستم پیاده شده در

سنتز  $\text{CdSe/ZnS}$  [۲۴]

در این تحقیق با استفاده از روش ساده ای بدون نیاز به دمای بالا و مواد هزینه بر آلی-فلزی، نقاط کوانتومی محلول در آب  $\text{CdSe}$  با استفاده از ژلاتین سنتز شده است و سپس لایه ای از  $\text{ZnS}$  بر روی سطح آن پوشش داده شده است. طیف بازتابی لومینسانس هسته در  $646\text{nm}$  نشان دهنده اندازه کوچک این ذرات و عرض کم این طیف بیانگر توزیع محدود اندازه ذرات است [۲۳]. با استفاده از ترکیب مرکاپتو ساکسینیک اسید<sup>۸</sup> (MSA) روی سطح نقاط کوانتومی، ضمن افزایش پایداری ذرات در محیط آبی، سطح برای اتصال به آنتی بادی ها عامل دار شده است. با اتصال آنتی بادی  $\text{CD20}$ ، نقاط کوانتومی برای اتصال تخصصی با سلول های رده لنفوبیدی B از نوع راجی<sup>۹</sup> آماده شده اند. نقاط کوانتومی آماده شده در غلظت های مختلف در تماس با این سلول ها تحت تابش طول موج UV قرار گرفته و اثر طیف بازتابی از این ذرات بر مرگ سلول ها بررسی شده است. نتایج این بررسی می تواند در توسعه روشی جدید در درمان سرطان، با کمترین آسیب به بافت های سالم، مورد استفاده قرار گیرد.

### ۲- مواد و روش ها

#### ۲-۱- مواد اولیه

پودر سلنیوم با خلوص ۹۹٪، کلرید کادمیم ( $\text{CdCl}_2$ )، محلول آمونیوم ( $\text{NH}_3\text{OH}$ )، سولفیت سدیم ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ )، ژلاتین، مرکاپتو ساکسینیک اسید و استات روی ( $\text{Zn}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_2$ ) محصولات شرکت مرک<sup>۱۰</sup> و سدیم سولفاید ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) محصول اکروس ارگانیک<sup>۱۱</sup> مورد استفاده قرار گرفتند. ۱- اتیل-۳-(۳- دی متیل آمینو پروپیل) کربودی ایماید هیدروکلراید<sup>۱۲</sup> (EDC) و نرمال-هیدروکسی سولفوساکسین ایماید<sup>۱۳</sup> (NHS) از شرکت ترموسایتیفیک<sup>۱۴</sup> تهیه شد. همچنین در تمامی مراحل کار از آب دیونیزه استفاده شد.

#### ۲-۲- سنتز نقاط کوانتومی $\text{CdSe}$

برای تهیه نقاط کوانتومی  $\text{CdSe}$ ، ابتدا دو محلول به قرار زیر تهیه شدند. برای تهیه محلول ۱،  $0.32\text{g}$  پودر سلنیوم را با  $0.15\text{g}$  سولفیت سدیم در  $20\text{mlit}$  آب دیونیزه به مدت ۱

<sup>8</sup> Mercapto Succinic Acid

<sup>9</sup> Raji

<sup>10</sup> Merck

<sup>11</sup> Across Organic

<sup>12</sup> 1-Ethyl-3-[3-Dimethylaminopropyl]Carbodiimide Hydrochloride

<sup>13</sup> Normal hydroxysuccinimide

<sup>14</sup> Thermo Fisher Scientific Inc.

<sup>15</sup> Shaker

<sup>16</sup> Reflux set

<sup>17</sup> Heater-Stirrer ALPHA-AG505

## ۷-۲- روش اتصال آنتی بادی CD20 به نقاط

### کوانتومی CdSe/ZnS

برای این منظور از پیوندهای کربودی‌ایمیدی کمک گرفته شد. به منظور برقراری پیوندهای کربودی‌ایمیدی بین گروه‌های کربوکسیلیک که به دلیل استفاده از مرکاپتوساکسینیک اسید در مرحله نهایی، سنتز نقاط کوانتومی بر سطح ذرات وجود دارند و گروه‌های آمینی موجود در ساختار آنتی‌بادی، از دو عامل شبکه‌ای کننده EDC و NHS استفاده شد. ۱۰ mlit محلول PBS<sup>۲۲</sup> بافر با pH=۷/۴ تهیه گردید و دو عامل شبکه‌ای کننده با نسبت‌های مولی مشخص در این محلول حل شدند. پس از این مرحله ۵ mlit از محلول نقاط کوانتومی به این محلول افزوده شد و در نهایت به ۰/۵ mlit از محلول نهایی ۲۰۰ litu آنتی‌بادی CD20 با غلظت ۰/۰۶ μg/mlt افزوده شد. این محلول به مدت ۲ ساعت در انکوباتور با ۲۰۰ دور در دقیقه هم زده شد، محلول مذکور هر ۳۰ دقیقه یکبار از انکوباتور خارج شده و تکان داده شد تا از حالت رسوبی در آید. پس از گذشت ۲ ساعت، محلول به مدت ۱۰ دقیقه با دور بالا سانتریفیوژ شد و بعد از مرحله سانتریفیوژ، محلول در داخل کیسه دیالیز ریخته شده و به مدت ۱۸ ساعت دیالیز شد. برای آماده‌سازی کیسه دیالیز که حاوی چند ماده نگهدارنده و چرب بود، این کیسه دوبار در آب ۸۰°C به مدت ۳۰ دقیقه حرارت داده شد تا این مواد از ساختار کیسه خارج و دفع شوند. از PBS به عنوان محیط خارج کیسه استفاده شد. نقاط کوانتومی کوئزورگه شده<sup>۲۳</sup> پس از دیالیز در دمای ۴°C نگهداری می‌شوند تا آنتی‌بادی ساختار و عملکرد خود را از دست ندهد. نحوه اتصال آنتی بادی CD20 به سطح نقاط کوانتومی CdSe در شکل ۳ نشان داده شده است.

## ۸-۲- آزمون SDS-PAGE

برای اطمینان از اتصال آنتی‌بادی‌ها به نقاط کوانتومی، از رایج‌ترین آزمون الکتروفورز ژلی<sup>۲۴</sup> با عنوان آزمون SDS-PAGE<sup>۲۵</sup> استفاده شد. در صورت اتصال نقاط کوانتومی به پروتئین‌ها، به‌طور حتم تغییری در بار کلی و نیز جرم آنها

## ۴-۲- عاملدار کردن سطح نقاط کوانتومی با استفاده

### از مرکاپتو ساکسینیک اسید (MSA)

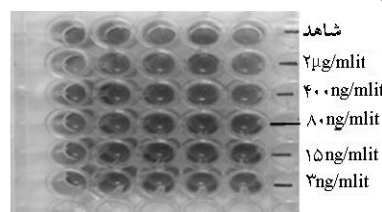
محلولی از MSA با ۸ برابر غلظت مولی CdSe تهیه شد و آن را در دمای اتاق به محلول CdSe/ZnS تهیه شده اضافه کرده و اجازه داریم تا دقایقی هم بخورد. این عملیات موجب قرارگیری گروه‌های کربوکسیلیک روی سطح می‌شود که با توجه به دافعه بین بارهای همنام باعث پایداری محلول می‌شود. گروه‌های کربوکسیلیک روی سطح، قابلیت برقراری اتصال با گروه‌های آمینی ساختارهای مختلف از جمله گروه‌های آمینی آنتی‌بادی‌ها را دارا هستند.

## ۵-۲- آزمون اسپکتروسکوپی

محلول‌های حاوی CdSe و CdSe/ZnS با طول موج ۳۶۰ nm دستگاه اسپکتروسکوپی دیجیتال المر پرکین ۱۸۵۵<sup>۱۸</sup> تحریک شدند. پرتوی نوری لومینسانس بازتاب شده در محدوده طول موج گزارش شده در سایر مطالعات که با روش‌های مختلف این نقاط کوانتومی را سنتز کرده‌اند، قرار داشت [۱۳، ۲۳].

## ۶-۲- آزمون MTT<sup>۱۹</sup>

برای انجام این آزمون ابتدا سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری ژیکس آکزیسکو<sup>۲۰</sup> بررسی شدند. پس از اطمینان از شرایط زیستی سلول‌ها، آزمون MTT (۳-۴ دی‌متیل تیزول ۲-۵- تترا زولیوم برمید) که آزمون مشخص کننده تعداد سلول‌های زنده در چاهک‌های مجموعه MTT است، انجام شد. این آزمون مطابق شکل ۲ برای غلظت‌های مختلف نقاط کوانتومی همزمان به مدت ۳ روز صورت گرفت. بعد از انجام آزمون، نتایج الیزا<sup>۲۱</sup> خوانده و ثبت شد.



شکل ۲- بشقاب ۹۶ خانه‌ای چاهک‌های حاوی سلول در آزمون MTT، اعداد نشان داده شده در هر ردیف غلظت نقاط کوانتومی در چاهک‌های آن ردیف را نشان می‌دهد.

<sup>18</sup> Elmer Perkin 55

<sup>19</sup> 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

<sup>20</sup> ZEISS, Axiosko

<sup>21</sup> AWARENESS Technology, Inc. start Fax-2100)

<sup>22</sup> Phosphate Buffered Saline

<sup>23</sup> Conjugated quantum dots

<sup>24</sup> Gel electrophoresis

<sup>25</sup> Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis

سلول راجی TK+ تهیه شده از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران با کد C124 ریخته شد. در چاهک اول به عنوان کنترل، نقاط کوانتومی کونژوگه شده‌ای، ریخته نشد و در ۵ خانه بعدی به ترتیب غلظت‌های ۲، ۱۰، ۵۰، ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نقاط کوانتومی استفاده شد. ظرف کشت در ۳ مرحله با فواصل زمانی ۲ ساعت تحت تابش UV با طول موج ۴۰۰nm قرار گرفت و وضعیت سلول‌های سرطانی پس از هر مرحله با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت.

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- اسپکتروسکوپی<sup>۲۶</sup>

رایج‌ترین روش برای اطمینان اولیه از تشکیل نقاط کوانتومی و عملکرد صحیح آنها آزمون اسپکتروسکوپی است. به این منظور حدود ۳mlit از محلول نقاط کوانتومی کادمیم سلناید به عنوان هسته و به همان مقدار از کادمیم سلناید محصور شده در سولفاید روی، به صورت جداگانه تحت آزمون اسپکتروسکوپی قرار گرفتند تا طول موج و شدت نسبی فوتولومینسانس حاصل از آنها اندازه‌گیری شود.

ایجاد می‌شود و با مقایسه جرم و بار نقاط کوانتومی کونژوگه شده با آنتی‌بادی و آنتی‌بادی‌های آزاد می‌توان به این تفاوت پی برد. انتظار می‌رود با چسبیدن آنتی‌بادی و نقطه کوانتومی جرم آنتی‌بادی بیشتر شود و سرعت حرکت در ماده ژلی زمینه PAGE کاهش یابد.

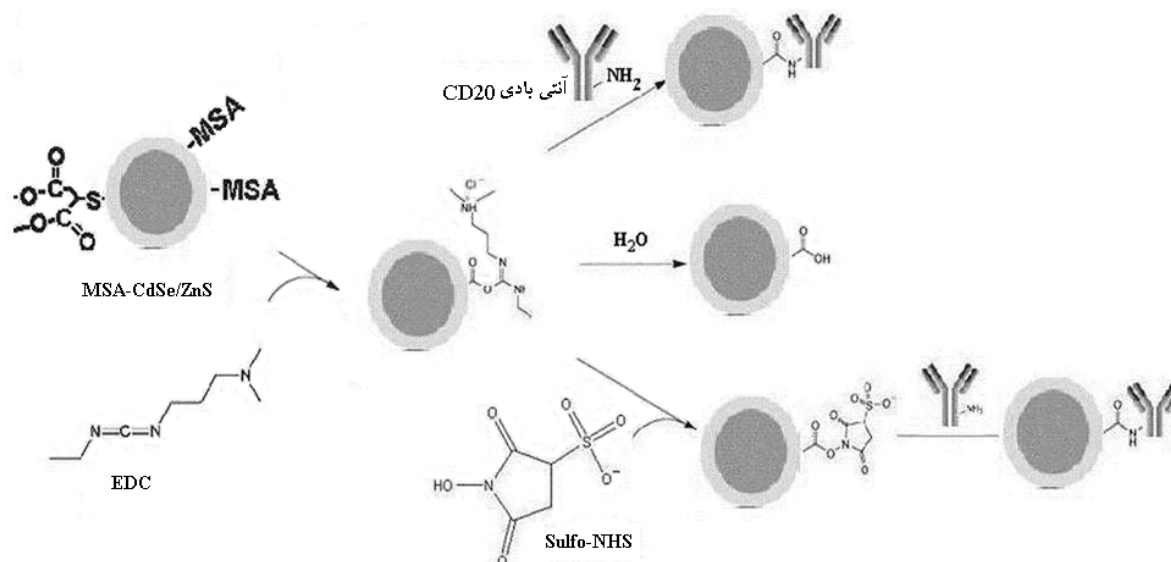
#### ۹-۲- مطالعه اثر نقاط کوانتومی کونژوگه شده با

##### آنتی‌بادی آنتی-CD20 بر سلول‌های راجی

سلول راجی، یک رده سلولی لنفوئیدی است که در سطح خود تعداد بسیار بیشتری نشانگر CD20 دارد و به همین دلیل هدف خوبی برای نقاط کوانتومی کونژوگه شده با آنتی‌بادی آنتی-CD20 محسوب می‌شود.

پیش از این گروهی از محققان نشان داده‌اند که که Zn تا غلظت  $100\mu\text{M}$  در زمان‌های تماس متعدد با رده سلولی راجی، اثر سمی بر زنده ماندن سلول‌ها ندارد. اما در غلظت  $200\mu\text{M}$  اثر سمی داشته و با افزایش غلظت و زمان تماس بر شدت اثر آن روی این سلول‌ها افزوده می‌شود [۲۵].

در این مطالعه، بعد از مرحله کونژوگه کردن نقاط کوانتومی با آنتی‌بادی مذکور، ۴ غلظت مشخص از آن تهیه شد و در هر چاهک ظرف کشت ۶ خانه‌ای تعداد ۲۰۰۰۰



شکل ۳- طرحواره از اتصال آنتی‌بادی CD20 به سطح نقاط کوانتومی CdSe/ZnS که با گروه‌های مرکاپتوساکسینیک اسید عاملدار شده‌اند. EDC به عنوان عامل واسطه برای اتصال گروه‌های کربوکسیلیک MSA به گروه‌های آمینی CD20 عمل می‌کند و NHS عملکرد EDC را بهبود می‌بخشد.

<sup>26</sup> Spectroscopy

### ۳-۳- اتصال آنتی‌بادی CD20 به سطح نقاط

#### کوانتومی CdSe/ZnS

نتیجه آزمون PAGE نشان داد با توجه به نشانگر به کار رفته در آزمون، نوار مربوط به آنتی‌بادی در ناحیه ۱۵۰Kdal تشکیل شد و نوار مربوط به آنتی‌بادی کونژوگه شده با نقاط کوانتومی در ۱۷۰Kdal تشکیل شد. این اختلاف را می‌توان به این صورت توجیه کرد که کونژوگه شدن آنتی‌بادی و نقاط کوانتومی، مطابق شکل ۳، سبب افزایش جرم کلی آنتی‌بادی شده و در اثر ممانعت فضائی، میزان پایین آمدن آنتی‌بادی کونژوگه شده در زمینه ژلی در مقایسه با آنتی‌بادی شاهد کمتر است. چون پروتئین‌های با بار و جرم بیشتر، در قسمت‌های بالایی نوار آزمون باقی می‌مانند و در حرکت خود در ژل آکریل آمیدی<sup>۲۷</sup> تحت جریان ماده خنثای آلکالینی، با نیروی جلوگیری کننده بیشتری روبرو هستند.

### ۳-۴- اثر نقاط کوانتومی کونژوگه شده با آنتی‌بادی

#### CD20-آنتی بر روی سلول‌های راجی

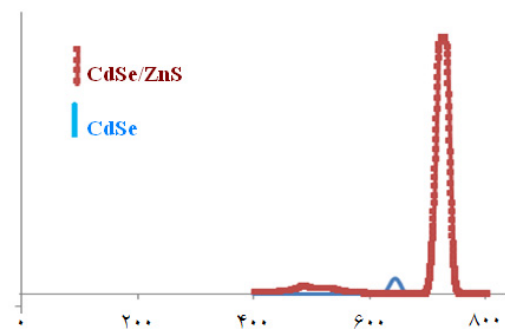
طبق آنچه در بخش ۹-۲ توضیح داده شده است، ۴ نمونه در مجاورت نقاط کوانتومی با ۴ غلظت متفاوت ۲، ۱۰، ۵۰ و ۲۵۰ μg/mL آماده شده و از نظر اثر تابش بر مرگ سلول‌ها مورد بررسی قرار گرفته‌اند.

شکل ۶ مربوط به نمونه شاهد است که در آن سلول‌های راجی بدون حضور نقاط کوانتومی کونژوگه شده، قبل و بعد از تابش‌های سه‌گانه نشان داده شده‌اند. شکل الف-۶ مربوط به قبل از تابش و شکل‌های بعدی به ترتیب تصویر سلول‌ها زیر میکروسکوپ پس از تابش‌های اول، دوم و سوم را نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود تغییری در سلول‌ها دیده نمی‌شود و تابش نور با طول موج ۴۰۰nm تأثیری بر سلول‌ها نداشته است. البته شایان ذکر است که این سلول‌ها در حالت عادی به ایجاد خوشه‌های سلولی<sup>۲۸</sup> تمایل دارند که با تکان دادن شدید فلاسک سلول، تا حدودی سلول‌ها از هم جدا می‌شوند که در مجموع تأثیری در روند کار ایجاد نمی‌کند.

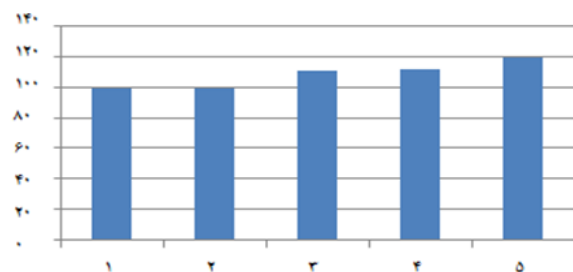
کادمیم سلناید در ۶۴۶nm بیشترین میزان تابش را از خود نشان داد. در سیستم هسته/ پوسته به علت بزرگ‌تر شدن اندازه ذرات، جابه‌جایی به سمت طول موج قرمز مشاهده می‌شود. طیف اسپکتروسکوپی CdSe/ZnS شدت فلورسنس بسیار بالاتری را نسبت به CdSe نشان می‌دهد (شکل ۴). با توجه به طول موجی که نقاط کوانتومی بیشترین میزان تابش را دارند، می‌توان به اندازه بلورهای موجود در ساختار هر یک پی برد [۱۸]. تعیین این اندازه در موضوع مورد بررسی در این تحقیق کارآمد نخواهد بود هرچند بسیار ساده است.

### ۳-۲- آزمون MTT

با توجه به شکل ۵ که نتایج حاصل از آزمون MTT را نشان می‌دهد، می‌توان نتیجه گرفت که غلظت‌های به کار رفته اثر سمی روی سلول‌ها ندارند و اغلب غلظت‌ها در محدوده زیست‌سازگاری کامل یعنی ۱۰۰ قرار دارند.



شکل ۴- قله طیف اسپکتروسکوپی CdSe، در طول موج ۶۴۶nm و قله طیف اسپکتروسکوپی CdSe/ZnS در ۷۲۰nm رخ داده است. طول موج تهییج ۳۸۰nm بوده است.

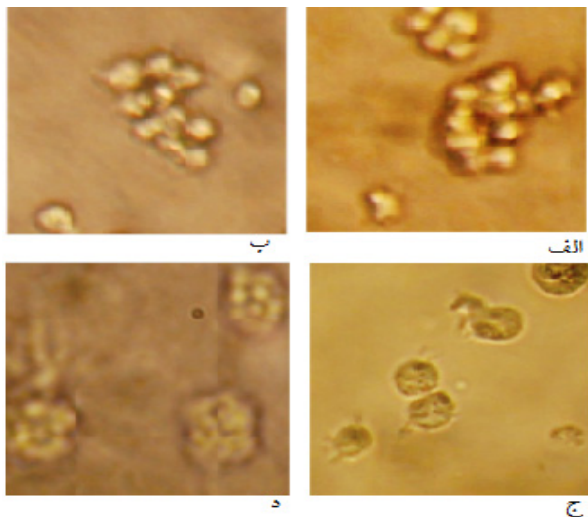


شکل ۵- نمودار MTT مربوط به ۵ غلظت متفاوت نمودارها به ترتیب از شماره ۱ تا ۵ مربوط به غلظت‌های ۲۰۰ μg/mL، ۴۰۰ μg/mL، ۸۰ ng/mL، ۱۵ ng/mL و ۳ ng/mL است.

<sup>27</sup> Acryl amide Gel

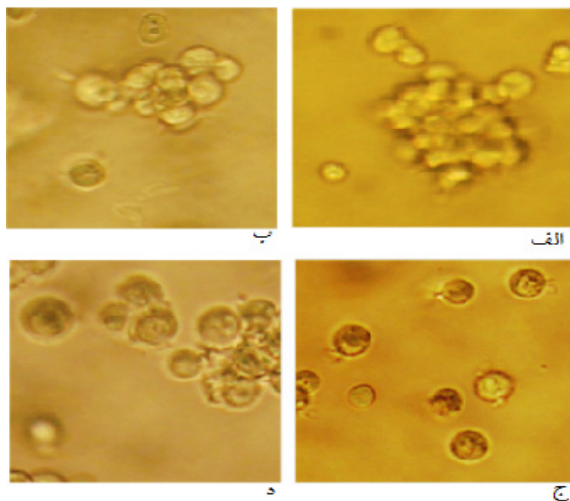
<sup>28</sup> Clamp

نمونه ۲ در شکل ۸ تحت تابش‌های سه گانه با طول موج و فاصله زمانی اعمال شده در سایر نمونه‌ها قرار گرفته است. با افزایش غلظت نسبت به نمونه ۱، میزان آسیب سلولی بعد از سه تابش نسبت به غلظت‌های پیشین اندکی افزایش یافته هر چند تغییر چندانی در وضع سلول‌ها مشاهده نمی‌شود. به‌طور کلی تابش حاصل از نقاط کوانتومی کائزوگه شده در غلظت  $10 \mu\text{g/mlit}$ ، به مرگ برخی سلول‌ها منجر شده است.



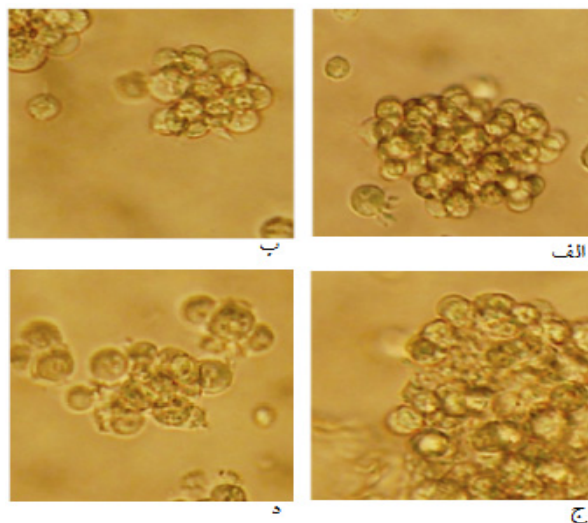
شکل ۸- سلول‌ها در مجاورت نقاط کوانتومی با غلظت

$10 \mu\text{g/mlit}$  (نمونه ۲). تصاویر الف، ب، ج و د سلول‌های راجی را در نمونه ۲ پس از ۰، ۱، ۲ و ۳ بار تابش نشان می‌دهند.

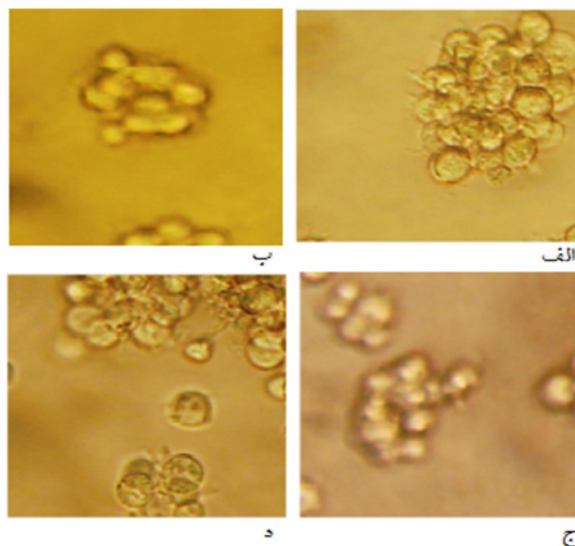


شکل ۹- سلول‌ها در مجاورت نقاط کوانتومی کائزوگه شده با غلظت  $50 \mu\text{g/mlit}$  (نمونه ۳). تصاویر الف، ب، ج و د سلول‌های راجی را در نمونه ۳ پس از ۰، ۱، ۲ و ۳ بار تابش نشان می‌دهند.

در غلظت  $2 \mu\text{g/mlit}$  بعد از تابش‌های مختلف تفاوتی در سلول‌ها مشاهده نشد که در شکل ۷ قابل مشاهده است. دلیل این پدیده احتمالاً تعداد کم ذرات است که نمی‌تواند تحت تابش UV، سلول‌ها اثر بگذارد.



شکل ۶- نمونه کنترل (سلول‌ها بدون نقاط کوانتومی کائزوگه شده). تصاویر الف، ب، ج و د به ترتیب پس از ۰، ۱، ۲ و ۳ بار تابش تهیه شده‌اند.



شکل ۷- سلول‌ها در مجاورت نقاط کوانتومی کائزوگه شده با غلظت  $2 \mu\text{g/mlit}$  (نمونه ۱).

تصاویر الف، ب، ج و د سلول‌های راجی را در نمونه ۱ پس از ۰، ۱، ۲ و ۳ بار تابش نشان می‌دهند.



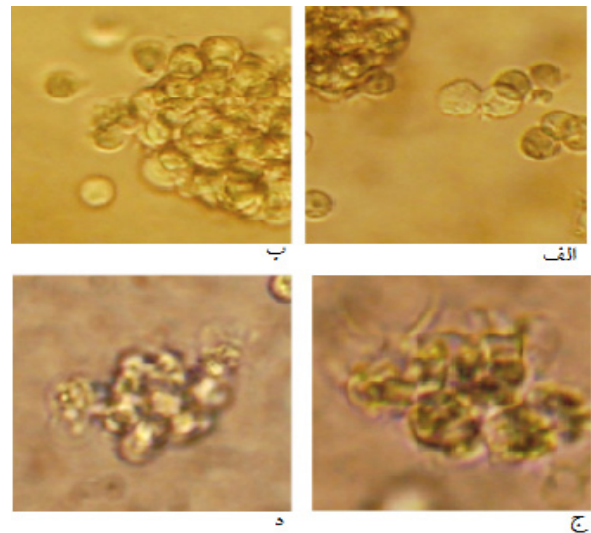
نتایج این مطالعه نشان داد که با افزایش غلظت نقاط کوانتومی کونژوگه شده و نیز افزایش تعداد دفعات تابش نور UV این ذرات کونژوگه شده تعداد بیشتری از سلول‌های راجی را که در سطح خود CD20 بسیار زیادی دارند، از بین می‌برد. با توجه به این نکته که احتمال مرگ سلول‌ها در اثر عوامل دیگر در مطالعه نمونه‌های شاهد در هر بار آزمایش رد شده است، می‌توان دریافت که کونژوگه کردن نقاط کوانتومی می‌تواند عملکرد این نقاط را در قبال سلول‌های سرطانی بهبود بخشد.

#### ۴- نتیجه‌گیری

در این مقاله چگونگی سنتز نقاط کوانتومی CdSe زیست‌سازگار و محلول در آب به روشی ساده و ارزان بدون نیاز به استفاده از ترکیبات آلی-فلزی سمی در دمای پایین ارائه شده است. با پوشش لایه‌ای از ZnS روی سطح این نقاط، اگر چه اندازه ذرات بیشتر شده و طیف لومینسانس بازتابی به طول موج بالاتر انتقال یافت اما شدت لومینسانس حاصل به طرز چشمگیری افزایش یافته است. گروه‌های MSA با بار منفی بر روی سطح سبب افزایش پایداری نقاط کوانتومی در محلول آبی شده است. طبق شکل ۲ نقاط کوانتومی بیوکائزوگه شده با آنتی‌بادی‌های CD20 پس از انجام چند مرحله تکمیلی شکل گرفته‌اند. نقاط کوانتومی بیوکائزوگه شده با غلظت‌های مختلف در مجاورت سلول‌های راجی قرار گرفته و نقاط با طول موج UV تحریک شدند. آثار مرگ سلول‌ها، ناشی از لومینسانس نقاط کوانتومی با غلظت  $10 \mu\text{g/mlit}$  پس از ۳ بار تابش؛ لومینسانس نقاط کوانتومی با غلظت  $50 \mu\text{g/mlit}$  پس از دو بار تابش و لومینسانس نقاط کوانتومی با غلظت  $250 \mu\text{g/mlit}$  پس از ۱ بار تابش قابل مشاهده است. در حالی که بازه زمانی بین تابش‌های متوالی ۲ ساعت باشد. نتایج این بررسی می‌تواند در پیگیری روشی نوین در پرتودرمانی سلول‌های سرطانی با کمترین آسیب به بافت‌های سالم مفید باشد.

همان‌گونه که در شکل ۹ مشاهده می‌شود، پس از تابش دوم تعداد سلول‌های مرده افزایش یافته است. وضعیت کلی در این غلظت شباهت زیادی به نمونه ۴ در شکل ۱۰ دارد. بعد از تابش سوم چروکیدگی در غشای سلولی دیده می‌شود که نشان از آسیب دیدگیست. به‌رغم شباهت کلی به غلظت ۲۵۰، تعداد سلول‌های مرده در مقایسه با غلظت ۲۵۰ بعد از تابش سوم کاهش داشت که وابسته بودن این پدیده به غلظت را بیش از پیش آشکار می‌سازد.

با اعمال غلظت  $250 \mu\text{g/mlit}$  از نقاط کوانتومی CdSe/ZnS در نمونه ۴، مشاهده می‌شود که تعدادی از سلول‌ها بعد از تابش دوم از بین رفته‌اند، این مشاهده مربوط به حالت چروکیدگی در سطح سلول و از دست رفتن ساختمان یکنواخت سلول‌هاست. از آنجا که نقاط کوانتومی در سطح خود آنتی‌بادی CD20-آنتی دارند که می‌تواند به CD20 موجود در سطح سلول‌ها بچسبد، بعد از تابش و به دلیل بازتاب صورت گرفته از نقاط کوانتومی در طول موج بالاتر، نقاط کوانتومی تعدادی از سلول‌ها را نابود می‌کنند. تعداد سلول‌های مرده در این غلظت نسبت به غلظت‌های دیگر بیشتر است.



شکل ۱۰- سلول‌ها در مجاورت ذرات نقاط کوانتومی کونژوگه شده با غلظت  $250 \mu\text{g/mlit}$  (نمونه ۴).

تصاویر الف، ب، ج و د سلول‌های راجی را در نمونه ۴ پس از ۰، ۱، ۲ و ۳ بار تابش نشان می‌دهند.

## مراجع

- [14] Anas A., Akita H., Harashima H., Itoh T., Ishikawa M., Biju V., Photosensitized Breakage and Damage of DNA by CdSe-ZnS Quantum Dots, *J. Phys. Chem.*, 2008; 112: 10005-10011.
- [15] Pass H. I., Lott D., Leonardo F., Asbestos Exposure, Pleural Mesothelioma, and Serum Osteopontin Levels, *New Engl. J. Med.*, 2005; 353: 1564-1573.
- [16] Kuno M., Fromm D. P., Hamann H. F., Gallagher A., Nesbitt D. J., "On"/"off" fluorescence intermittency of single semiconductor quantum dots, *J. Chem. Phys.*, 2001; 115: 1028-1037.
- [17] Tran P. T., Goldman E. R., Anderson P. G., Mauro J. M., Mattoussi M. H., Application of luminescent CdSe-ZnS quantum dot bioconjugates in immuno- and fluorescence-quenching assays, *Nanoscience Using Laser-Solid Interactions conference.*, 2002; 4636: 23-25.
- [18] Dabbousi B. O., Rodriguez V. J., Mikulec F. V., Heine J. R., Mattoussi H., Ober R., Jensen K. F., Bawendi M. G., (CdSe)ZnS Core-Shell Quantum Dots: Synthesis and Characterization of a Size Series of Highly Luminescent Nanocrystallites, *J. Phys. Chem. B.* 1997; 101: 9463-9475.
- [19] Peng X., Schlamp C. M., Kadavanich A. V., Alivisatos A. P., Epitaxial Growth of Highly Luminescent CdSe/CdS Core/Shell Nanocrystals with Photostability and Electronic Accessibility, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997; 119: 7019-7029.
- [20] Jiang S., Gnanasammandhan M. K., Zhang Y., Optical imaging-guided cancer therapy with fluorescent nanoparticles, *J. R. Soc. Interface.* 2010; 7: 3-18.
- [21] Atri M., New technologies and directed agents for applications of cancer imaging, *J. Clin. Oncol.*, 2005; 24: 3299-3308.
- [22] Carter J. D., Cheng N. N., Qu Y., Suarez G. D., Guo T., Nanoscale energy deposition by X-ray absorbing nanostructures, *J. Phys. Chem. B.* 2007; 111: 11622-11625.
- [23] Ling X., Kunji C., Hatimmonemced E. L. K., Minghai L., Xinfan H., Enhancement of band-edge luminescence and photo stability in colloidal CdSe quantum dots by various surface passivation technologies, *Appl. Surf. Sci.*, 2001; 172: 84-88.
- [24] Semiconductor Nanocrystals Magnetic Nanoparticles, Research; Nanocrystal synthesis & functionalization; was seen at: <http://www-drfmc.cea.fr/spram/NanoX/research1.htm>
- [۲۵] تکمه داشی حسن، اوسطی آشتیانی فرزانه، پورفتحاله علی اکبر، مقایسه اثر روی (Zn) بر زنده ماندن و شکل ظاهری سلول‌های رده لنفوئیدی Raji و Molt-4، *مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان*، ۱۳۸۳؛ ۱۳: ۳۷-۳۲.
- [1] Qiangbin W., Yang X., Xiaohang Z., Yung C., Yan L., Lijinig J., Jaswinder S., Dong-Kyun S., Hao Y.; A Facile one-step in situ Functionalization of Quantum dots with preserved photoluminescence for bioconjugation, *J. Am. CHEM. Soc.*, 2007; 129: 6380-6381.
- [2] Dybiec M., Chomokur G., Ostapenko S., Wolcott A., Zhang J. Z., Zajac A., Phelan C., Sellers T., Gerion G., Photoluminescence spectroscopy of bioconjugated CdSe/ZnS quantum dots, *Appl. Phys. Lett.*, 2007; 90: 26311-26312.
- [3] Gerion D., Pinaud F., Williams S. C., Parak W. J., Zanchet D., Weiss S., Alivisatos A. P., Synthesis and Properties of Biocompatible Water-Soluble Silica-Coated CdSe/ZnS Semiconductor Quantum Dots, *J. Phys. Chem., B.* 2001; 105: 8861-8871.
- [4] Lee C. W., Chou C. H., Huang J. H., Hsu C. S., Nguyen T. P., Investigations of organic light emitting diodes with CdSe (ZnS) quantum dots, *Mater. Sci. Eng., B.* 2008; 147: 307-311.
- [5] Hardman R., A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors, *Environ Health Perspect.*, 2006; 114: 165-172.
- [6] Jovin T.M., Quantum dots finally come of age", *Nat Biotechnol.* 2003; 21: 32-33.
- [7] Lee J., Sundar V.C., Heine J.R., Bawendi M.G., Jensen K.F., Full Color Emission from II-VI Semiconductor Quantum Dot-Polymer Composites, *Advanced Materials.* 2000; 15: 1102-1105.
- [8] Boatman E. M., Lisensky G. C., A safer, easier, faster synthesis for CdSe quantum dot nanocrystals, *J Chem Educ.*, 2005; 82: 1697-1699.
- [9] Chen W., Sun X. K., Luminescent nanoparticles for biological applications: Imaging, therapy, and targeting strategies, In: Chen X., editor, *Recent Advances of Bioconjugation Chemistry in Molecular Imaging*, Research Signpost; Kerala: (in press).
- [10] Medintz I. L., Uyeda H. T., Goldman E. R., Mattoussi H., Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing, *Nat. Mater.*, 2005; 4: 435-446.
- [11] Schooss D., Mews A., Egchmuller A., Weller H., Quantum dot quantum well CdS/HgS/CdS: theory and experiments, 1994; 49: 17072-17078.
- [12] Chestnoy N., Harris T. D., Hull R., Brus L. E., Luminescence and Photophysics of CdS Semiconductor Clusters: The Nature of the Emitting Electronic State, *J. Phys. Chem.*, 1986; 90: 3393-3399.
- [13] Wang Q., Iancu N., Seo D. K., Preparation of Large Transparent Silica Monoliths with Embedded Photoluminescent CdSe@ZnS Core/Shell Quantum Dots, *Chem. Mater.*, 2005; 17: 4762-4764.