مقاله مروری

نقاط کوانتومی در ردیابی سلول‌ها

سارا رنجبروزیری M.Sc. *،**، ✉ **ناصر اقدمی** M.D., Ph.D.*،***

*گروه سلول‌های بنیادی مرکز تحقیقات علوم سلولی پژوهشکده رویان، تهران، ایران

** گروه زیست شناسی تکوینی دانشگاه علم و فرهنگ، تهران، ایران

*** گروه طب ترمیمی مرکز تحقیقات علوم سلولی پژوهشکده رویان، تهران، ایران

تاریخ وصول: شهریور ماه ۸۹ تاریخ پذیرش: مهر ماه ۸۹

چکیده

ردیابی سلول‌ها بعد از پیوند همواره یکی از دغدغه‌های اصلی محققان در عرصه علم ترمیمی است. یافتن یک ماده به عنوان ردیاب که بتواند ضمن ماندگاری طولانی در سلول، آثار سمی کمتری را نیز به دنبال داشته باشد، می‌تواند به عنوان یک راه حل برای این مسئله در نظر گرفته شود. نانوکریستال‌های نیمه‌هادی موسوم به نقاط کوانتومی به دلیل ویژگی‌های نوری-فیزیکی منحصر به فردی که دارند کاندید مناسبی در این زمینه هستند. محدوده تحریک‌پذیری گسترده، طیف تابشی کم پهنا و تنظیم‌پذیر، درخشندگی بالا و پایداری ویژه در برابر نور از جمله ویژگی‌هایی است که امکان استفاده از این نانو مواد را در تصویربرداری طولانی مدت، چند منظوره و حساس از بدن موجود زنده فراهم می‌نماید. با این حال به دلیل وجود عوامل سمی در هسته نقاط کوانتومی، بهتر است کاربردهای بالینی آن‌ها با احتیاط بیشتری صورت گیرد. این مقاله خلاصه‌ای از نقش نقاط کوانتومی در نشان‌دار کردن و ردیابی سلول‌ها است؛ ضمن آن که توانایی بالقوه آن‌ها را در مسمومیت سلولی شرح می‌دهد.

کلیدواژه‌ها: نقاط کوانتومی، ردیابی سلول‌ها، مسمومیت سلولی

مقدمه

شناسایی بسیاری از فرایندهای اساسی در دنیای علوم، بر پایه ردیابی سریع، حساس، دقیق و تکرارپذیر برهم‌کنش‌های بیومولکول‌ها با یکدیگر و با سایر مولکول‌ها یا یون‌ها است. توانایی ردیابی و تصویربرداری یک روش تا اندازه زیادی توسط ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی ردیاب مورد استفاده از جمله سایز، خواص ذاتی، زیست سازگاری و برهم‌کنش آن با عوامل زیستی تعیین می‌شود [۱]. این ویژگی‌ها در تعیین محدوده ردیابی، توانایی شناسایی اختصاصی یک هدف یا رویداد ویژه و قابلیت شناسایی هم‌زمان چندین هدف(Multiplexing) موثر هستند. روش‌های فلئورسنت به دلیل توانایی تفکیک‌پذیری در مقیاس نانومتر و حساسیت بالا تا حد تک مولکول برای تحقق بخشیدن به این اهداف بسیار مناسب است [۲]. فلوئورسازه‌های (Flourophore) آلی مدت‌ها است که به منظور نشان‌دار کردن سلول‌ها و بافت‌ها در شرایط آزمایشگاهی و در درون موجودات زنده به‌کار می‌رود. با این حال به‌کارگیری آن‌ها در تصویربرداری و استفاده از این نانوذرات در تحقیقات پس از انتشار اولین مقاله در سال ۱۹۹۸ توسط دو گروه بروچز (Bruchez) [٤] و نای (Nie) [٥] درباره امکان به‌کارگیری نقاط کوانتومی در تصویربرداری و کاربردهای مربوطه به سرعت افزایش یافته است. در کمتر از یک دهه، نقاط کوانتومی بر بسیاری از محدودیت‌های ذاتی رنگ‌های

✉ **آدرس مکاتبه:** تهران، خیابان رسالت، خیابان بنی‌هاشم، پژوهشکده رویان، صندوق پستی ۱۹۳۹۵-٤٦٤٤

Email: Nasser.aghdami@royaninstitute.org

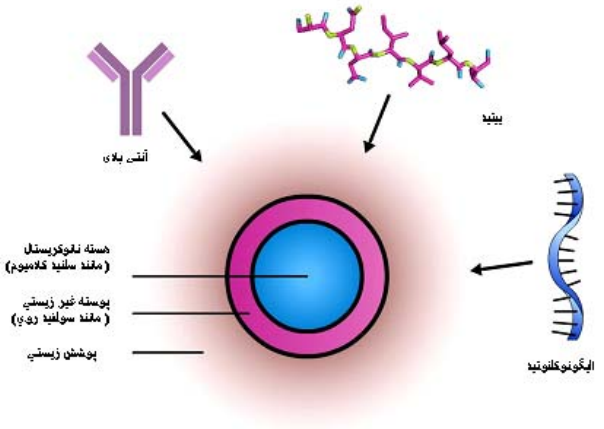
Archive of SID

www.SID.ir

آلی و پروتئین‌های فلئورسنت غلبه کردند و به ابزارهایی توانمند در زمینه‌هایی چون زیست‌شناسی مولکولی، زیست‌شناسی سلولی، تصویربرداری مولکولی و تشخیص‌های پزشکی تبدیل شدند [٦].

نقاط کوانتومی

نقاط کوانتومی نانوکریستال‌های نیمه‌هادی معدنی با قطر ۲ تا ۱۰ نانومتر هستند که بعد از تحریک از خود نور ساطع می‌کنند و به طور معمول از ۲۰۰ تا ۱۰،۰۰۰ اتم تشکیل شده اند [۷]. ساختار کلی یک نقطه کوانتومی همان طور که در شکل ۱ مشاهده می‌کنید، شامل هسته، پوسته و پوشش دهنده است. هسته از اتم‌های گروه II–VI(به عنوان مثال سلنید کادمیوم) یا III–V(به عنوان مثال فسفات ایندیوم) عناصر جدول تناوبی تشکیل شده است [۸]. یک پوسته از جنس یک نیمه‌هادی دیگر، در اغلب موارد سولفید روی (ZnS) [۹] به منظور بهبود ویژگی‌های نوری و افزایش پایداری، هسته را می‌پوشاند. در نهایت یک پوشش آلی برای آبدوست کردن نانوذره به‌کار برده می‌شود که جایگاهی برای اتصال بیومولکول‌های مختلف ازجمله الیگونوکلئوتیدها، پروتئین‌ها، پپتیدها و مولکول‌های کوچک نیز به‌شمار می‌رود [۱۰].

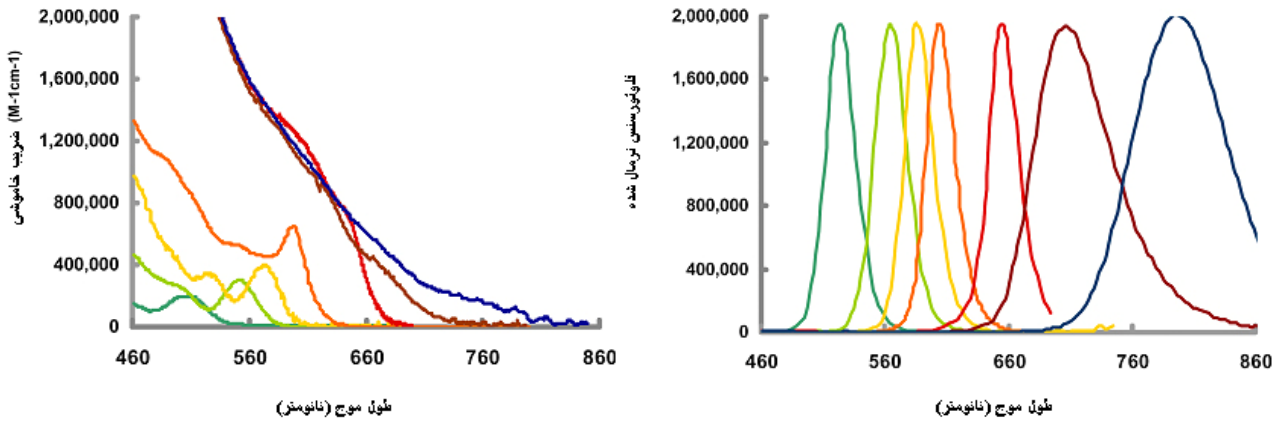


شکل ۱. شکل شماتیک از ساختار فیزیکی یک نقطه کوانتومی

در مقایسه با فلوئورسازه‌های آلی، نقاط کوانتومی از یک طیف جذبی گسترده برخوردار اند و می‌توان آن‌ها را در هر طول موجی کوتاه‌تر از پیک تابشی شان تحریک نمود (شکل۲– الف). با این وجود احتمال تحریک‌پذیری آن‌ها به تدریج به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر افزایش می‌یابد [۱۱]. این ویژگی امکان تحریک‌پذیری هم‌زمان نقاط کوانتومی مختلف را با به‌کارگیری یک منبع نوری می‌دهد [۹]. وجود یک طیف تابشی متقارن و کم پهنا، پهنای کامل باند در نصف مقدار بیشینه (Full Width at Half Maximum) معمولا بین ۲۰ تا ٤۰ نانومتر (شکل ۲–ب)، امکان تصویر برداری‌های چند رنگ را در شرایط آزمایشگاهی و در درون موجودات زنده بدون هیچ‌گونه هم‌پوشانی طیفی می‌دهد [۱۲]. با استفاده از نقاط کوانتومی متصل شده به آنتی‌بادی‌های اختصاصی و یک طول موج تحریکی، اجزای مختلف سلولی از جمله میکروتوبول‌ها، میتوکندری‌ها و نوکلئوزوم‌ها در سلول سرطانی هلا مشاهده شد [۱۳]. همچنین در مطالعه‌ای دیگر با به‌کارگیری میکروسکوپ فلوئورسنت تابشی–روبشی (Fluorescence emission-scanning microscopy)، جمعیت‌های مختلفی از سلول‌های ملانومای نشان‌دار شده با نقاط کوانتومی در حال نشت (Extravasation) به بافت ریه در یک موش زنده به طور هم‌زمان شناسایی شد [١٤].

آستانه بالای رنگ‌زدایی در برابر نور، امکان ردیابی و تصویربرداری سلول‌های نشان‌دار شده با نقاط کوانتومی را در طولانی مدت می‌دهد [۱۵]. در مطالعه‌ای که توسط وو (Wu) و همکارانش [١٦] طراحی شده بود، آنتی‌ژن‌های هسته‌ای و میکروتوبول‌ها به طور هم‌زمان با رنگ AlexaFluor488 (سبز) و نقاط کوانتومی با تابش ٦۳۰ نانومتر (قرمز) در یک سلول نشان‌دار شد. صرف نظر از این که کدام هدف با رنگ الکسا نشان‌دار شده بود، سیگنال‌های فلئورسنت پس از ۲ دقیقه غیرقابل تشخیص بود در حالی‌که نقاط کوانتومی در کل مدت زمان آزمایش پایدار بودند. علاوه بر این، در مقایسه با

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۲. الف) طیف جذبی و ب) طیف تابشی نقاط کوانتومی مختلف. برگرفته از منبع [۱]

1. Lin, S., et al., Quantum dot imaging for embryonic stem cells. BMC Biotechnol, 2007. 7: p. 67.

ردیاب‌های فلوئورسنت آلی، نقاط کوانتومی به دلیل طبیعت غیر آلی خود کمتر در معرض تخریبات متابولیک هستند. مطالعات نشان داده‌است که نقاط کوانتومی به مدت چندین هفته تا چندین ماه بدون اثری از تجزیه، در سلول‌ها و موجودات زنده به طور دست نخورده باقی مانده‌اند [۱۷و۱۸].

درخشش کم نظیر در نقاط کوانتومی ترکیبی از بازده کوانتومی (Quantum Yield) بالا و ضریب خاموشی (Extinction Coefficient) بسیار بزرگ است [۱۹]. بازده کوانتومی، نسبت فوتون‌های جذب شده به تابش شده است که می‌تواند تا ۸۵ درصد در نقاط کوانتومی افزایش یابد. برخلاف ردیاب‌های فلوئورسنت آلی بازده کوانتومی در نقاط کوانتومی پس از فرایند اتصال‌دهی به بیومولکول‌های مختلف تغییر چشمگیری نمی‌کند [۲۰]. ضریب خاموشی در نقاط کوانتومی در حدود $۰/۵-۵ \times ۱۰^{۶}$ M-۱cm-۱ است که باعث درخشندگی بیشتر این نانوذرات در درون موجودات زنده، تحت شرایطی که نور به دلیل جذب و پراکنش بالا به شدت کاهش می‌یابد، می‌شود [۲۱].

در نهایت قابلیت بالای جذب دو فوتون در هر مقطع (Two-photon absorption cross-section) اجازه ردیابی موثر نقاط کوانتومی را در نمونه‌های ضخیم می‌دهد. با استفاده از میکروسکوپ فلئورسنس چند فوتونی (Multiphoton microscopy)، سیگنال‌های فلئورسنس رسیده از نقاط کوانتومی در مویرگ‌های واقع در عمق چند صد میکرومتری از میان پوست سالم یک موش زنده قابل تشخیص بود [۳]. در مطالعه‌ای که توسط استروث (Stroh) و همکارانش [۲۲] انجام شد، نقاط کوانتومی با تابش ۴۷۰ نانومتر به منظور نشان‌دار کردن عروق سرطانی در موش‌های ترانس ژنی که سلول‌های پیرامون رگی آن‌ها (Perivascular) پروتئین فلوئورسنت سبز (Green Fluorescent Protein) را تحت نظارت پروموتر عامل رشد اندوتلیوم عروقی بیان می‌کرد، به کار گرفته شد. در مقایسه با به کارگیری دکسترانهای نشان‌دار شده در مطالعات قبلی، نقاط کوانتومی مرزهای مشخص‌تری را میان فضاهای داخل و خارج عروقی نمایان می‌ساخت.

کاربردها

ویژگی‌های نوری-فیزیکی منحصر به فرد در نقاط کوانتومی همراه با پیشرفت‌های قابل توجهی که در شیوه ساخت، پوشش‌دار کردن و اتصال انواع بیومولکول‌ها صورت گرفته است، محققان را بر آن داشته تا از این نانوذرات به عنوان ردیاب‌های فلوئورسنتی موثر در بسیاری از حوزه‌های تصویربرداری استفاده کنند [۲۳]. توانایی ردیابی مهاجرت و

Archive of SID
www.SID.ir

تمایز یک سلول به طور هم زمان در درون موجودات زنده، فرضی مهم در بسیاری از زمینه‌های پژوهشی از قبیل زیست‌شناسی تکوین، سلول‌های بنیادی و هدف‌گیری تومورها به شمار می‌آید [۲٤].

ردیابی سلول‌ها در زیست شناسی تکوین

زیست شناسی تکوینی، از جمله رشته‌های مهیج و رو به رشد در علم زیست‌شناسی به شمار می‌آید. این علم چارچوبی را به‌وجود آورده که در آن علوم مختلف با یکدیگر تلفیق می‌شود. از این رو، شناخت دقیق و جامع فرآیند تکوین مقدمه‌ای برای درک بهتر سایر شاخه‌های زیست شناسی به شمار می‌آید. تکوین یک فرایند پیشرونده است که در آن، یک سلول منفرد می‌تواند یک ارگانیسم چند سلولی با انواع مختلفی از سلول‌ها را به وجود آورد. ایجاد تنوع سلولی در هر نسل یکی از اهداف اساسی طی تکوین است که به چندین سئوال اساسی منجر می‌شود: چگونه یک سلول منفرد می‌تواند به صدها نوع سلول مختلف تمایز یابد یا کدام سلول در مراحل اولیه جنینی سرانجام کدام بخش از موجود نهایی را ایجاد می‌کند.

پایداری ویژه در برابر نور، توزیع متقارن نانوذرات میان سلول‌های دختری طی تقسیمات سلولی و ماندگاری طولانی مدت در سلول‌های نشان‌دارشده باعث به کارگیری نقاط کوانتومی برای ردیابی مهاجرت و تمایز سلول‌های اولیه جنینی در درون ارگانیسم زنده شده است. در آزمایش طراحی شده توسط دوبرتروت (Dubertret) و همکاران، نقاط کوانتومی در درون میسل‌های فسفولیپیدی قرار گرفته و سپس به سلول‌های مجزا در جنین‌های اولیه قورباغه تزریق (Microinject) شدند. نتایج نشان دهنده توزیع مساوی این ذرات میان سلول‌های دختری و سازگاری آن‌ها با روند طبیعی تکوین جنین‌ها و در نتیجه ردیابی رده‌های سلولی مشتق شده تا مرحله جوانه دمی بود [۲۵]. تکوین جنین‌های گورخر ماهی به علت شفافیت، تکوین بیرونی و سهولت دست کاری به عنوان نمونه‌ای از مهره‌داران توسط گروه ریجر (Rieger) [۲٦] مطالعه شد. نقاط کوانتومی با تابش نور قرمز به همراه mRNAهای رمز کننده پروتئین فلوئورسنت سبز به بلاستومرهای مجزا در مراحل ۳۲ و ٦٤ سلولی تزریق شد. نتایج نشانگر آن بود که نقاط کوانتومی، توانایی نشان‌دار کردن اخلاف سلولی مشتق شده را داشتند. ضمن آن که هیچ‌گونه ناهنجاری یا مشکلی در جنین‌های حاصل به ازای ورود $۱۰^{۸}$ نقطه کوانتومی به هر سلول به‌وجود نمی‌آمد. در مطالعه دیگری که توسط اسلوتکین (Slotkin) و همکارانش [۲۷] صورت گرفت، نقاط کوانتومی پوشیده شده با فسفولیپیدهای تجاری با استفاده از روش‌های الکتروتراواسازی درون رحمی (Utero electroporation) و میکروسکوپ هدایت شونده با فراصوت (Ultrasound guided biomicroscopy) به درون سلول‌های بنیادی و پیش سازهای عصبی موشی (Mouse neural stem and progenitor cells) در جنین‌های در حال تکوین منتقل شد. نتایج به‌دست آمده از این مطالعه نشان داد که سلول‌های نشان‌دار شده توانایی بقا، مهاجرت و تمایز به کلیه رده‌های سیستم عصبی بالغ را حفظ کرده بودند.

این مطالعات بیانگر پایداری و سازگاری نقاط کوانتومی با فرایند بسیار حساس و پیچیده تکوین است [۱۳]. امید آن می‌رود که با به‌کارگیری و بهبود روزافزون این نانوذرات، بررسی و درک صحیح بسیاری از جنبه‌های ناشناخته تکوین میسر شود [۲٦].

ردیابی سلول‌های بنیادی

سلول درمانی از یک راهبرد جدید و امیدبخش در درمان بسیاری از بیماری‌ها خبر می‌دهد که امروزه شاهد گسترش آن در حوزه‌های کاربردی- بالینی مختلف هستیم. با وجود پیشرفت سریعی که در به‌کارگیری سلول‌های بنیادی در عرصه

Archive of SID
www.SID.ir

درمان صورت گرفته است، سئوالات بی‌شماری در رابطه با نحوه توزیع این سلول‌ها در بدن موجودات زنده بی پاسخ مانده است [۲۸]. تلاش‌های قبلی مبنی بر ردیابی این سلول‌ها به دلیل محدودیت‌های تکنیکی موجود، بی‌نتیجه مانده‌اند. از آنجایی که توانایی ردیابی و تصویربرداری با وضوح تک سلول و تعیین تعداد دقیق سلول‌ها در جایگاه‌های مختلف آناتومیکی در سلول درمانی از اهمیت بسیاری برخورداراست، روسن (Rosen) و همکارانش [۲۹] مطالعه‌ای را به منظور شناسایی دقیق نحوه توزیع سه بعدی سلول‌ها در بدن صورت دادند. بر این اساس، سلول‌های بنیادی مزانشیمی که با نقاط کوانتومی نشان‌دار شده بودند، روی داربستی از جنس ماتریکس خارج سلولی در بطن سگ قرار گرفتند. با وجود فلوئورسنت خودبه‌خودی بالا در قلب، نقطه‌های کوانتومی به مدت ۸ هفته در درون برش‌های بافتی قابل مشاهده بودند. ضمن آن که بسیاری از سلول‌های نشان‌دار فنوتیپی مشابه با سلول‌های اندوتلیالی داشتند که این پدیده شاهدی بر سازگاری نقاط کوانتومی با توانایی تمایزی سلول‌ها به شمار می‌آمد. در مطالعه دیگری سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از متعهد شدن به سمت رده‌های قلبی با نقاط کوانتومی نشان‌دار شده و روی یک داربست به درون قلب رت مبتلا به نقص دیواره بین بطنی منتقل شدند. نتایج حاکی از آن بود که سلول‌های زاینده قلبی (Cardiogenic cells) نشان‌دار به سلول‌های بالغ قلبی با فواصل سارکومری طبیعی تمایز یافتند [۳۰].

شناسایی بسیاری از سلول‌های بنیادی با به کارگیری یک شناساگر اختصاصی امکان‌پذیر نیست و معمولا ترکیبی از چندین شناساگر در تشخیص آنها ضروری است. توانایی تحریک‌پذیری نقاط کوانتومی مختلف با استفاده از یک طول موج تحریکی امکان نشان‌دار کردن شناساگرهای مختلف و در نتیجه ردیابی یک جمعیت مشخص از سلول‌های بنیادی را با حساسیت بسیار بالا در شرایط آزمایشگاهی و در موجودات زنده مقدور می‌سازد [۳۱و۳۲]. به منظور اثبات به کارگیری نقاط کوانتومی در تصویر برداری‌های چند رنگه در درون موجودات زنده، سلول‌های بنیادی جنینی موشی با نقاط کوانتومی دارای تابش‌های مختلف (۸۰۰، ۷۰۵، ٦٥٥، ٦٠٥، ٥٦٥، ٥٢٥ نانومتر) نشان‌دار شد [۳۳]. سلول‌های نشان‌دار شده سپس به نقاط مختلفی در پشت موش با نقص سیستم ایمنی تزریق شدند. با استفاده از یک طول موج تحریکی، شش رنگ، از مرئی تا مادون قرمز به طور هم‌زمان در درون موجود زنده قابل مشاهده بود. همچنین نقاط کوانتومی با تابش ۸۰۰ نانومتر تا روز ١٤ قابل شناسایی بود. شدت جذب، پراکنش و فلورسنس خودبه‌خودی پایین در این گستره تابشی (نزدیک مادون قرمز) به همراه توانایی نفوذ بالای این فوتون‌ها به قسمت‌های عمقی بافت‌ها، در توجیه پایداری طولانی مدت‌تر این نانوذرات در مقایسه با دیگر ذرات به‌کار می‌رود. در مطالعه‌ای دیگر، سلول‌های پیش‌ساز (Precursor) مشتق شده از مغز استخوان با نقاط کوانتومی دارای تابش ۵۹۰ نانومتر (نارنجی) نشان‌دار شده و در حالی که به سمت عروق سرطانی نشان‌دار شده با نقاط کوانتومی دارای تابش ٤٧٠ نانومتر (آبی) هدایت می‌شد، مورد مشاهده مستقیم قرار گرفت [۲۲].

توانایی خروج نانوذرات کوچکتر از سلول‌ها [۳۱]، کاهش شدت فلوئورسنت و ایجاد سلول‌های فاقد فلوئورسنت در نتیجه تقسیمات نامتقارن سلول‌های بنیادی [٣٤] و امکان ورود ذرات به سلول‌های مجاور از طریق کانال‌های سلولی یا پس از نفوذپذیری غشا در اثر مرگ سلولی از اصلی‌ترین موانع در حوزه ردیابی سلول‌های بنیادی با استفاده از نقاط کوانتومی به شمار می‌آید [۳۵]. به منظور ارزیابی احتمال انتقال ذرات از سلول‌های نشان‌دار شده به سایر سلول‌ها، سلول‌های بنیادی مزانشیمی با نقاط کوانتومی دارای تابش ٦٥٥ نانومتر نشان‌دار شده و با سلول‌های بیان کننده پروتئین فلوئورسنت سبز هم کشت شدند. همچنین به منظور ایجاد مدلی از سلول‌های مرده در درون موجود زنده، سلول‌های ماهیچه‌ای سگ با محصول

Archive of SID
www.SID.ir

تجزیه شده سلول‌های مزانشیمی نشان‌دار، به مدت ۲٤ ساعت انکوبه شدند. نتایج هر دو آزمایش نشان می‌داد که هیچ‌گونه مدرکی دال بر ورود این نانوذرات به درون سلول‌های نشان‌دار نشده وجود ندارد [۲۹].

تصویر برداری و هدف گیری تومورهای سرطانی

یکی از قابلیت‌های کاربردی نقاط کوانتومی، ردیابی دقیق و اختصاصی سلول‌ها از طریق شناسایی شناساگرهای ویژه آن‌ها است. این توانایی امکانات جدیدی را درعرصه تصویربرداری و هدف گیری تومورهای سرطانی در اختیار دانشمندان قرار داده است. بر این اساس گائو (Gao) و همکارانش [۳٦] از نقاط کوانتومی متصل به آنتی‌بادی‌های اختصاصی در شناسایی سلول‌های سرطانی پروستات انسانی استفاده کردند. به دنبال تزریق این نانوذرات به موش با نقص سیستم ایمنی که با سلول‌های سرطانی پیوند شده بود، دنباله (Domain)خارج سلولی آنتی‌ژن غشایی اختصاصی پروستات(Prostate Specific Membrane Antigen) انسانی در محل قرارگیری تومور شناسایی و تصویربرداری شد.

شناخت بسیاری از فرایندهای مؤثر در انتقال نانوذرات به جایگاه‌های اختصاصی مورد نظر پس از تزریق آن‌ها به موجود زنده، تنها از تصویر برداری و ردیابی هم‌زمان ذرات به صورت مجزا (Single particle) امکان‌پذیراست. روش‌های تصویربرداری موجود ازجمله سی‌تی اسکن، تصویربرداری رزونانس مغناطیسی (Magnetic resonance imaging)، توموگرافی با استفاده از تابش پوزیترون(Positron emission tomography) و تصویربرداری با کمک ردیاب‌های فلوئورسنت آلی به دلیل قدرت تفکیک‌پذیری کمی که در مقیاس تک ذره دارند، در هدف گیری و تصویربرداری از تومورها کاربرد لازم را ندارند [۳۷]. به منظور ارزیابی قابلیت استفاده از نقاط کوانتومی در ردیابی ذرات به صورت مجزا، نقاط کوانتومی با تابش ۸۰۰ نانومتر به آنتی‌بادی‌های شناساگر گیرنده عامل رشد اپیدرمال انسانی [Human epidermal receptor (HER2)] متصل شدند. پس از تزریق این نانوذرات به موش مبتلا به سرطان سینه با بیان بیش از حد شناساگر HER2، مراحل دخیل در فرایند انتقال نانوذرات به سلول‌های سرطانی مورد شناسایی قرار گرفت. این مراحل شامل گردش نانوذرات در درون عروق خونی، خروج از رگ‌ها، رسیدن به فضای خارج سلولی، اتصال به آنتی ژن HER2 روی غشای سلول‌ها، اندوسیتوز و سرانجام قرارگیری در فضای اطراف هسته بود. نتایج به دست آمده اطلاعات جامعی در رابطه با نحوه هدف‌گیری سلول‌های سرطانی با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی در اختیار محققان قرار می‌دهد که موجب بهبود طراحی نانوحامل‌های مورد استفاده در هدف‌گیری تومورها، به منظور افزایش شاخص درمانی آن‌ها می‌شود [۳۸].

مسمومیت سلولی

استفاده روزافزون از نقاط کوانتومی در ردیابی سلول‌ها در بدن موجودات زنده نگرانی‌های بی‌شماری را مبنی بر سمی بودن این ذرات ایجاد کرده است به طوری که در حال حاضر این نگرانی یکی از موانع اصلی در استفاده از این مواد در مطالعات بالینی است [۳۹]. به منظور معرفی این فناوری به عرصه درمان، گروه‌های تحقیقاتی بسیاری روی مطالعات پیش بالینی در شرایط آزمایشگاهی و در درون موجودات زنده متمرکز شده‌اند. اگرچه نتیجه‌گیری قطعی مبنی بر سمی بودن این ذرات، به دلیل داده‌های متناقض در مقالات موجود، دشوار به نظر می‌رسد [۳۹]. علاوه بر آن؛ عوامل متعددی که با خواص فیزیکی-شیمیایی ذاتی ذرات و شرایط محیطی مرتبط هستند، در مسمومیت سلولی ناشی از نقاط کوانتومی دخالت دارند. سایز، بار الکتریکی، غلظت، عوامل پوشش دهنده و پایداری در برابر شرایط اکسیداتیو، نورکافت (Photolytic) و مکانیکی از جمله این ویژگی‌ها به شمار می‌آیند که هر یک از آنها می‌بایست به طور جداگانه‌ای مورد

Archive of SID
www.SID.ir

ارزیابی قرار گیرد [۸].

مطالعات بسیاری ارتباط بین اندازه ذره و مسمومیت القا شده را در سطح درون سلولی و جانوری تأیید می‌کند. در مطالعه‌ای که توسط لووریک (lovric) و همکاران [۴۰] انجام شد، نقاط کوانتومی ۲/۲ نانومتری در مقایسه با ذرات ۵/۲ نانومتری آسیب‌های جدی‌تری را به سلول‌ها وارد کردند. تفاوت در نحوه پراکندگی نانو ذرات می‌تواند از جمله دلایل این پدیده باشد، چنانچه ذرات بزرگتر در داخل سیتوپلاسم تجمع یافته بودند و ذرات کوچکتر اغلب وارد فضاهای هسته‌ای شده بودند. برهم‌کنش نقاط کوانتومی با اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌های هسته‌ای می‌تواند انواع مختلفی از مسمومیت‌های ژنتیکی (Genotoxicity)را موجب شود [۴۱]. در مطالعه دیگری که روی رده‌های مختلف سلولی از جمله فیبروبلاست‌ها، سلول‌های سرطانی سینه، سلول‌های سرطانی تخمدان هامستر چینی و سلول‌های منفرد لوکمیای بازوفیلیک موش صحرایی صورت گرفت سلول‌ها در معرض غلظت‌های مشابه‌ای از نقاط کوانتومی با اندازه‌های مختلف قرار گرفتند. به نظر می‌رسید که نسبت بیشتر سطح به حجم در ذرات کوچکتر از جمله عوامل اصلی در مسمومیت القا شده بود [۴۲].

بار سطحی از جمله عوامل کلیدی در نحوه توزیع و عملکرد نانو ذرات در موجودات زنده به شمار می‌آید. به منظور بررسی سمیت القا شده از بار سطحی نانوذرات در سلول‌های کبدی، نقاط کوانتومی با اسید مرکاپتواندکانوئیک (Mercaptoundecanoic acid) (MUA) (QD-COOH)، سیستامین (Cysteamine) (QD-NH2)، تیوگلیسرول (Thioglycerol) (QD-OH) و ترکیبات آنها پوشانده شدند [۴۳]. نتایج نشان‌دهنده آن بود که سمیت القا شده صرف نظر از جنس هسته، به نوع عامل سطحی وابسته است. چنانچه تراکم بالای بار منفی در نقاط کوانتومی پوشیده شده با MUA، آسیب‌های جدی‌تری را در DNA سلول‌ها بعد از ۲ ساعت انکوباسیون با این نانوذرات القا می‌کرد ولی تیوگلیسرول با بار منفی کمتر، حداقل مسمومیت ژنتیکی و در نتیجه آسیب سلولی کمتری را موجب می‌شد. در مطالعه دیگری نقاط کوانتومی پوشیده شده با پلی اتیلن گلیکول (Poly Ethylene Glycol) خنثی مسمومیت کمتری را در در مقایسه با پلی اتیلن گلیکول آمین با بار مثبت یا اسید کربوکسیلیک با بار منفی در سلول‌های کراتین اپیدرمال انسانی القا می‌کرد [۴۴].

غلظت نیز عامل تعیین کننده دیگری در زمینه مسمومیت سلولی ناشی از نانوذرات است که توجه بیشتری را می‌طلبد. در مطالعه‌ای که توسط هوشینو (Hoshino) و همکارانش [۴۵] صورت گرفت سلول‌های رده لنفومای موشی با غلظت‌های مختلفی از نقاط کوانتومی دارای سلنید کادمیوم در هسته و پوسته‌ای از جنس سولفید روی که با آلبومین سرم گوسفندی پوشیده شده بودند، انکوبه شدند. نتایج به دست آمده نشانگر مرگ اکثریت سلول‌ها بعد از ٦ ساعت انکوبه شدن در غلظت‌های بالا بود. همچنین درصد بالای مرگ و میر سلولی در سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت چربی که با غلظت‌های بالاتراز ۲ نانومولار از نقاط کوانتومی انکوبه شده بودند، مشاهده شد. حساسیت فوق‌العاده بالا در برابر تغییرات ناچیز که اغلب به صورت ناهنجاری‌های فنوتیپی بروز می‌کند، جنین را به عنوان یک مدل ایده آل در عرصه تحقیقات روی آثار سمی مواد مختلف مطرح می‌نماید [٤٦]. تزریق ۵×۱۰^{۹} نقطه کوانتومی به ازای هر سلول در بلاستومرهای قورباغه، ناهنجاری‌های گوناگونی از جمله تغییر در سایز سلول‌ها، حرکات سلولی و کشیدگی محور (Axis elongation) را موجب می‌شد این در حالی بود که جنین‌های تزریق شده با ۲×۱۰^{۹} نقطه کوانتومی به ازای هر سلول از نظر تکوینی با جنین‌های تزریق نشده کاملا مشابه بودند [۲۵]. ناهنجاری‌های شدید و مرگ جنینی همچنین در جنین گورخرماهی‌هایی که با میزان بیش از حد نقاط کوانتومی تزریق شده بودند مشاهده می‌شد. در نتیجه کاهش غلظت نقاط کوانتومی به کمترین میزان ممکن در مطالعاتی که به ردیابی طولانی سلول‌های پیوندی در بدن

Archive of SID
www.SID.ir

موجود زنده نیاز است ازاهمیت بسیاری برخوردار است [٤٧].

از آن جایی که آزاد شدن عناصر موجود در هسته نقاط کوانتومی از جمله عوامل اصلی در القای مسمومیت سلولی به شمار می‌آید و کاربرد پوسته به عنوان محافظی در برابر تخریبات متابولیکی و اکسیده شدن ناشی از هوا به اثبات رسیده است، مطالعات بسیاری درباره به کارگیری پوسته به منظور کاهش سمیت توافق دارند. نقاط کوانتومی با هسته تلورید کادمیوم بدون پوسته موجب تغییرات گسترده‌ای در سلول‌های سرطانی سینه شد. این در حالی است که پوشاندن این ذرات با استفاده از اسید مرکاپتوپروپیونیک (Mercaptopropionic acid)، سیستئامین و ان-استیل سیستئین (N-acetylcysteine) کاهش قابل توجهی را در مسمومیت حاصل ایجاد نمود [٤٨]. با این وجود سمیت عوامل پوشش دهنده نیز می‌بایست مورد توجه قرار گیرد؛ چنانچه مسمومیت سلولی ناشی از ماده پوشش دهنده اسید مرکاپتواستیک(Mercaptoacetic acid) توسط بسیاری از گروه‌ها گزارش شده است [٤٩].

پایداری نقاط کوانتومی در برابر شرایط ویژه به عنوان یکی از مهمترین جنبه‌ها در پدیده مسمومیت سلولی قلمداد می‌شود. باوجود اصلاحات بسیاری که در راستای افزایش پایداری این نانوذرات صورت گرفته است، مطالعات متعددی مبنی بر ناپایداری نقاط کوانتومی تحت شرایط اکسیداتیو و نورکافت وجود دارد [٨]. همچنین ماندگاری طولانی مدت نقاط کوانتومی در درون بدن موجودات زنده، باعث تخریب متعاقب این نانوذرات به مرور زمان می‌شود. عوامل محدود کننده در تصفیه این نانوذرات از بدن شامل اندازه هیدرودینامیک بالا در نقاط کوانتومی، قطر کم مجاری عروقی در پستانداران و سد گلومرولی است[٥٠]. با انتخاب پوشش‌های سطحی مناسب و قطر هیدرودینامیکی بهینه، می‌توان به خروج بسیاری از نقاط کوانتومی از بدن موجود امیدوار بود [٥١].

تا به امروز نقاط کوانتومی به عنوان ردیاب‌های زیستی، عملکردی بیش از آنچه در ابتدا از آنها انتظار می‌رفت را در زمینه تصویربرداری در شرایط آزمایشگاهی و در درون موجود زنده نشان داده‌اند. به‌کارگیری این نانوذرات در جانوران زنده امکان شناسایی و مطالعه فرایندهای مولکولی دخیل در ایجاد بسیاری از بیماری‌ها را برای محققان فراهم می‌سازد. با این وجود معرفی این فناوری به عرصه درمان، تنها زمانی میسر است که مبحث سمیت نقاط کوانتومی به خوبی شناخته شده و همچنین راه‌هایی برای خروج آن‌ها از بدن در نظر گرفته شود. با ساخت و گسترش نقاط کوانتومی کوچک‌تر بدون پایه کادمیوم که در محدوده نزدیک مادون قرمز تابش داشته باشد، انتظار می‌رود که در آینده‌ای نه چندان دور شاهد به کارگیری این نانو مواد در عرصه پزشکی-درمانی باشیم.

References

1. **Ambrosini G, Andrisani A, Porcu E, Rebellato E, Revelli A, et al.** Oocytes cryopreservation: state of art. Reprod Toxicol 2006; 22: 250-62.
2. **Pereira RM, Marques CC.** Animal oocyte and embryo cryopreservation. Cell Tissue Bank 2008; 9: 267-77.
3. **Gosden RG.** Prospects for oocyte banking and in vitro maturation. JNCI Monog 2005; 34: 60-3.
4. **Jain JK, Paulson RJ.** Oocyte cryopreservation. Fertil Steril 2006; 86(suppl 3): 1037-46.
5. **Fernandez CB, Peres KR, Alvarenga MA, Landim-Alvarenga FC.** The use of transmission electron microscopy and oocyte transfer to evaluate in vitro maturation of equine oocytes in different culture conditions. J Equine Vet Sci 2006; 26(4): 159-67.
6. **Carrell DT, Moskovtsev S, Chohan KR, Peterson CM.** Ovarian folliculogenesis: emerging role of in vitro maturation of oocytes and follicles in clinical practice. Clin Obstet Gynecol 2003; 46: 239-53.

Archive of SID
www.SID.ir

7. **Fu XW, Shi WQ, Zhang QJ, Zhao XM, Yan CL, Hou YP, et al.** Positive effects of taxol pretereatment on morphology, distribution and ultrastructure of mitochondria and lipid droplets in vitrification of in vitro matured porcine oocytes. Anim Reprod Sci 2009; 115(1-4): 158-68.

8. **Shi LY, Jin HF, Kim JG, Kumar BM, Balasubramanian S, Choe SY, et al.** Ultra-structural changes and developmental potential of porcine oocytes following vitrification. Anim Reprod Sci 2007; 100: 128-40.

9. **Sathananthan AH, Selvaraj K, Girijashankar ML, Ganesh V, Selvaraj P, Trounson AO.** From oogonia to mature oocytes: inactivation of the maternal centrosome in humans. Micros Res Tech 2006; 69: 396-407.

10. **Yang Yj, Zhang YJ, Li Y.** Ultrastructure of human oocytes of different maturity stages and the alteration during in vitro maturation. Fertil steril 2009; 92(1): 396. e1-6.

11. **Valojerdi MR, Salehnia M.** Developmental potential and ultrastructural injuries of methaphase II mouse oocytes after slow freezing or vitrification. J Assist Reprod Genet 2005; 22(3): 119-27.

12. **Wani NA, Wani GM, Khan MZ, Sidiqui MA.** Effect of different factors on the recovery of oocytes for IVM-IVF procedures in sheep. Small Rum Res 1999; 34: 71-6.

13. **Cetin Y, Bastan A.** Cryopreservation of immature bovine oocytes by vitrification in straws. Anim Reprod Sci 2006; 92: 29-36.

14. **Shirazi A, Shams-Esfandabadi N, Hosseini SM, Karimi I.** The presence of cumulus cells on nuclear maturation of sheep oocytes during in vitro maturation. Small Rum Res 2007; 68: 291-95.

15. **Wani NA.** In vitro maturation and in vitro fertilization of sheep oocytes. Small Rum Res 2002; 44: 89-95.

16. **Kuwayama M.** Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. Reprod Biomed Online 2005; 11(3): 300-8.

17. **Chen SU, Lien YR, Chen HF, Chen HF, Ho HN, Yang YS.** Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. Hum Reprod 2001; 16: 2350-6.

18. **Chen SU, Lien YL, Chen HF, Chao KH, Ho HN, Yang YS.** Open pulled straws for vitrification of mature mouse oocytes preserve patterns of meiotic spindles and chromosomes better than conventional straws. Hum Reprod 2000; 15: 2598-603.

19. **Gupta MK, Uhm SJ, Lee HT.** Cryopreservation of immature and in vitro matured porcine oocytes by solid surface vitrification. Theriogenology 2007; 67: 238-48.

20. **Kuwayama M.** All around vitrification of human oocytes and embryo. J Assist Reprod Genet 2000; 17(8): 477.

21. **Succu S, Leoni GG, Berlinguer F, Madeddu M, Bebbere D, Mossa F, et al.** Effect of vitrification solutions and cooling upon in vitro matured prepubertal ovine oocytes. Theriogenology 2007; 68: 107-14.

22. **Mossa F, Leoni GG, Berlinguer F, Succu S, Madeddu M, Bebbere D, et al.** Recovery of COCs from ovaries with high follicle numbers enhances in vitro embryo yield in sheep. Anim Reprod Sci 2008; 109: 134-45.

23. **Keefer CL, keystone A, Lazaris A, Bhatia B, Begin I, Bilodeau AS, et al.** Production of cloned goat after nuclear transfer using adult somatic cells. Biol Reprod 2002; 66: 199-203.

24. **Fuku E, Xia L, Downey BR.** Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. Cryobiology 1995; 32: 139-56.

25. **Eroglu A, Toth TL, Toner M.** Alterations of cytoskeleton and polyploidy induced by

Archive of SID

www.SID.ir

cryopreservation of methaphase II mouse oocytes. Fertil Steril 1998; 69: 944-57.

26. **Motta PM, Nottola SA, Micara G, Familiari G.** Ultrastructure of human unfertilized oocytes and polyspermic embryos in an IVF-ET program. Ann NY Acad Sci 1988; 541:367–83.
27. **Asada M, Horii M, Mogoe T, Fukui Y, Ishikawa H, Ohsumi S.** In vitro maturation and ultrastructural observation of cryopreserved minke whale (Balaenoptera acutorostrata) follicular oocytes. Biol Reprod 2000; 62: 253-9.
28. **Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Gaiswinkler U, Shebl O, Jesacher K, et al.** Occurrence and developmental consequences of vacuoles throughout preimplantation development. Fertil Steril 2005; 83: 1635–40.
29. **Nottola SA, Macchiarelli G, Coticchio G, Bianchi S, Cecconi S, De Santis L, et al.** Ultrastructure of human mature oocytes after slow cooling cryopreservation using different sucrose concentrations. Hum Reprod 2007; 22(4); 1123-33.
30. **El.Shafie M, Sousa M, Windt M-L, Kruger TF.** An Atlas of the Ultrastructure of Human Oocytes. Parthenon Publishing, New York, USA 2000.
31. **Ghetler Y, Skutelsky E, Ben Nun I, Ben Dor L, Amihai D, Shalgi R.** Human oocyte cryopreservation and the fate of cortical granules. Fertil Steril 2006; 86: 210-6.
32. **Gualtieri R, Iaccarino M, Mollo V, Prisco M, Iaccarino S, Talevi R.** Slow cooling of human oocytes: ultrastructural injuries and apoptotic status. Fertil Steril 2009; 91(4): 1023-34.
33. **Vincent C, Pickering SJ, Jhonson MH, Quick SJ.** Dimethyl sulphoxide affects the organization of microfilaments in the mouse oocytes. Mol Reprod Dev 1990; 26: 227-35.

Archive of SID

www.SID.ir