

## **ΜΑΓΝΗΤΙΚΑ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΣΕ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ - ΣΥΝΘΕΣΗ, ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ, ΔΡΑΣΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΝΔΕΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ**

**Λώρη Ναλμπαντιάν, Ευδοκία Πατρικιάδου, Βασίλης Ζασπάλης**  
Ινστιτούτο Τεχνικής Χημικών Διεργασιών ΙΤΧΗΔ/ΕΚΕΤΑ, Τ.Θ. 361, 57001, Θέρμη,  
Θεσσαλονίκη

**Άννα Πατρικίδου, Ελένα Χατζηδάκη, Χρήστος Ν. Παπανδρέου**  
Τμήμα Παθολογικής Ογκολογίας, Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Λάρισας και Τμήμα  
Ιατρικής, Σχολή Επιστημών Υγείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

### **ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Τα μαγνητικά νανοςωματίδια μπορούν να βρουν ένα πλήθος βιοϊατρικών εφαρμογών, τόσο διαγνωστικών όσο και θεραπευτικών, ιδιαίτερα όταν κατευθύνονται εκλεκτικά σε συγκεκριμένα όργανα ή ιστούς με χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων συζευγμένων με αυτά. Με στόχο την σήμανση καρκινικών κυττάρων και την ευκολότερη ανίχνευση τους με μαγνητική τομογραφία (MRI), στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε μεθοδολογία για την σύνθεση μαγνητικών νανοςωματιδίων με στενή κατανομή μεγέθους, την δραστηικοποίηση αυτών, και την σύζευξη τους με ειδικά αντισώματα έναντι καρκινικών αντιγόνων. Τα νανοςωματίδια χαρακτηρίστηκαν φυσικοχημικά με περιθλασιμετρία ακτίνων X, ρόφηση N<sub>2</sub>, Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διερχόμενης Δέσμης Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας (HRTEM), Μικροανάλυση ακτίνων X (EDS) και Φασματοσκοπία Υπερύθρου (FTIR). Σαν δείγμα ελέγχου προκειμένου να αποδειχθεί ότι τα νανοςωματίδια που παρασκευάστηκαν είναι ικανά να συζευχθούν με πρωτεΐνες και να βελτιστοποιηθεί η μέθοδος, χρησιμοποιήθηκε η βοείας προέλευσης πρωτεΐνη αλβουμίνη (Bovine Serum Albumin, BSA).

### **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Τα τελευταία χρόνια, οι μαγνητικές ιδιότητες νανοςωματιδιακών κόνεων οξειδίων του σιδήρου όπως α-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> και Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> έχουν μελετηθεί ευρέως και παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον επειδή τα μαγνητικά νανοςωματίδια μπορούν να βρουν ένα πλήθος βιοϊατρικών εφαρμογών [1]. Μεταξύ των άλλων, τα μαγνητικά νανοςωματίδια προσφέρουν μεγάλες δυνατότητες στην βελτίωση της ποιότητας και διαγνωστικής ευαισθησίας της απεικόνισης με Μαγνητική Τομογραφία (Magnetic Resonance Imaging, MRI) [2,3]. Υπερπαραμαγνητικά νανοςωματίδια οξειδίου του σιδήρου χρησιμοποιούνται σαν σκιαγραφικές ουσίες για βιοϊατρική διαγνωστική απεικόνιση με MRI. Παρόλο που διατίθενται ήδη κάποια εμπορικά σκευάσματα, υπάρχει έντονη ερευνητική προσπάθεια με στόχο την επίτευξη αρκετά μεγάλης ευαισθησίας η οποία είναι απαραίτητη για την ανίχνευση κακοηθειών σε πρώιμα στάδια. Οι πιο σημαντικές βελτιώσεις μπορούν να επιτευχθούν όταν οι σκιαγραφικές ουσίες κατευθύνονται εκλεκτικά σε συγκεκριμένα όργανα ή ιστούς με χρήση δραστικών παραγόντων (π.χ. μονοκλωνικών αντισωμάτων) συζευγμένων με νανοςωματίδια [4]. Οι βιοϊατρικές εφαρμογές απαιτούν νανοςωματίδια διακριτά και υπερπαραμαγνητικά με μικρή διάμετρο σωματιδίων και στενή κατανομή μεγέθους, ούτως ώστε να έχουν ενιαίες φυσικοχημικές ιδιότητες.

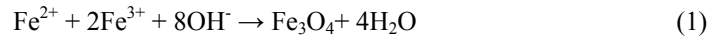
Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η σύνθεση μαγνητικών νανοςωματιδίων, τα οποία μετά από την κατάλληλη κατεργασία δραστηικοποίησης είναι σε θέση να συζευχθούν με αντισώματα. Όταν χρησιμοποιούνται κατάλληλα επιλεγμένα αντισώματα, τα οποία ανιχνεύουν συγκεκριμένα είδη καρκινικών κυττάρων, τα μαγνητικά νανοςωματίδια χρησιμοποιούνται για την σήμανση των καρκινικών κυττάρων και την ευκολότερη ανίχνευση τους με μαγνητική τομογραφία.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η παρασκευή των νανοσωματιδίων περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

### Σύνθεση καθαρών μαγνητικών νανοσωματιδίων (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) - Μέθοδος συγκαταβύθισης

Σε φιάλη με αποσταγμένο νερό προστίθενται FeCl<sub>3</sub> 6H<sub>2</sub>O και FeCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O (αναλογία mol 2:1) υπό συνεχή ανάδευση και παρουσία αζώτου σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστίθεται αργά, σε σταγόνες, υδατικό διάλυμα NaOH 1.5 M (pH=12 ή 9) και αμέσως καταβυθίζεται σαν μαύρο ίζημα ο μαγνητίτης (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) σύμφωνα με την αντίδραση:



Το διάλυμα αναδεύεται μηχανικά επί 20-30min σε θερμοκρασία δωματίου και με υπερήχους για 30min, γίνεται διήθηση υπό κενό, πλύση με αποσταγμένο νερό, πλύση με αιθανόλη και τέλος ξήρανση στον αέρα για μία νύχτα.

### Επίστρωση νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου με silica

Για την επικάλυψη των νανοσωματιδίων με silica χρησιμοποιήθηκαν δύο τεχνικές:

(α) Τα νανοσωματίδια Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> που παρασκευάστηκαν με την μέθοδο συγκαταβύθισης προστίθενται σε διάλυμα αιθανόλης- νερού, αναδεύονται στη συσκευή υπερήχων για 10 min, στη συνέχεια προσαρμόζεται το pH τους στο 9, προστίθεται Tetraethoxysilane (TEOS). Το προϊόν αναδεύεται για 10 hrs στη συνέχεια θερμαίνεται για άλλες 12 hrs στους ~50°C, διηθείται, πλένεται με νερό και αιθανόλη και ξηραίνεται.

(β) Στα νανοσωματίδια Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> προστίθεται διάλυμα sodium silicate με pH=11.3. Το μίγμα αναδεύεται στη συσκευή υπερήχων για 30 min θερμαίνεται στους 90-100°C για 30 min. Τέλος προστίθεται HCl για να προσαρμοστεί το pH του διαλύματος στο 6 περίπου. Τα νανοσωματίδια που παρασκευάστηκαν πλένονται με διήθηση πολλές φορές με νερό και ξηραίνονται υπό κενό για μία νύχτα.

### Δραστηκοποίηση νανοσωματιδίων

Η δραστηκοποίηση αφορά την δημιουργία και ενεργοποίηση αμινικών ομάδων στην επιφάνεια της πυριτίας, ώστε να καταστεί δυνατή η σύζευξη των επικαλυμμένων νανοσωματιδίων με μόρια πρωτεϊνών. Χρησιμοποιείται διάλυμα 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) σε μεθανόλη και στη συνέχεια προστίθεται γλυκερόλη. Τέλος προστίθεται γλουταραλδεϋδη για την μετατροπή των αμινικών ομάδων που βρίσκονται στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων σε αλδεϋδικές ομάδες οι οποίες μπορούν να αντιδράσουν με τις αμινικές ομάδες των πρωτεϊνών.

### Φυσικοχημικός Χαρακτηρισμός

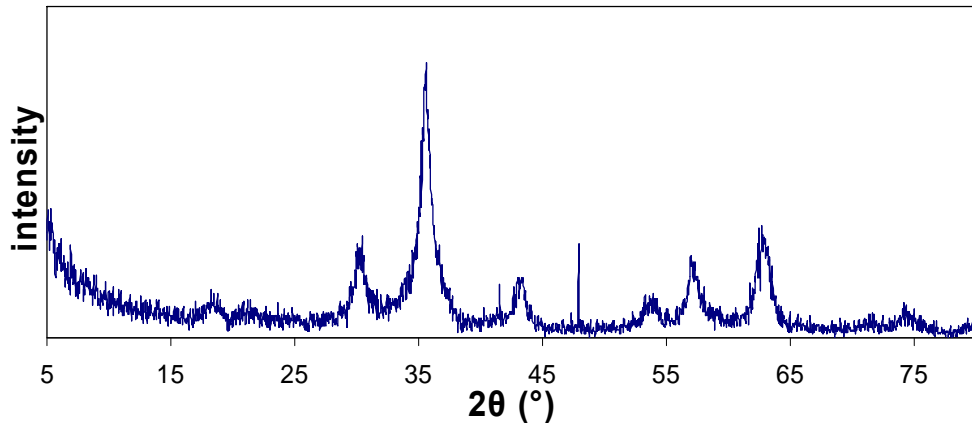
Οι κρυσταλλικές ενώσεις που σχηματίστηκαν ταυτοποιήθηκαν με περίθλαση ακτίνων X (XRD) (Siemens D-500). Η ειδική επιφάνεια των σωματιδίων μετρήθηκε με φυσική ρόφηση αζώτου (Tristar, Micromeritics). Η μορφολογία των νανοσωματιδίων μελετήθηκε με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης σε συνδυασμό με Μικροανάλυση Ακτίνων X (SEM-EDS) και Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διερχόμενης Δέσμης Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας (HRTEM). Η παρουσία ενεργών ομάδων στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων μελετήθηκε με φασματοσκοπία Υπερύθρου (FTIR). Τα φάσματα FTIR ελήφθησαν σε φασματόμετρο Bruker Tensor 27, με διακριτική ικανότητα 4 cm<sup>-1</sup>, στην περιοχή 400-4000 cm<sup>-1</sup>. Για την λήψη των φασμάτων FTIR τα στερεά δείγματα διεσπάρησαν σε KBr (σε αναλογία 10:90).

Τα φάσματα υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) ελήφθησαν σε φασματοφωτόμετρο Hitachi U-3010, στην περιοχή 250-330 nm, με ταχύτητα 60 nm/min και διακριτική ικανότητα 2 nm, σε κυβελίδες από χαλαζία με μήκος οπτικής διαδρομής 1 cm.

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

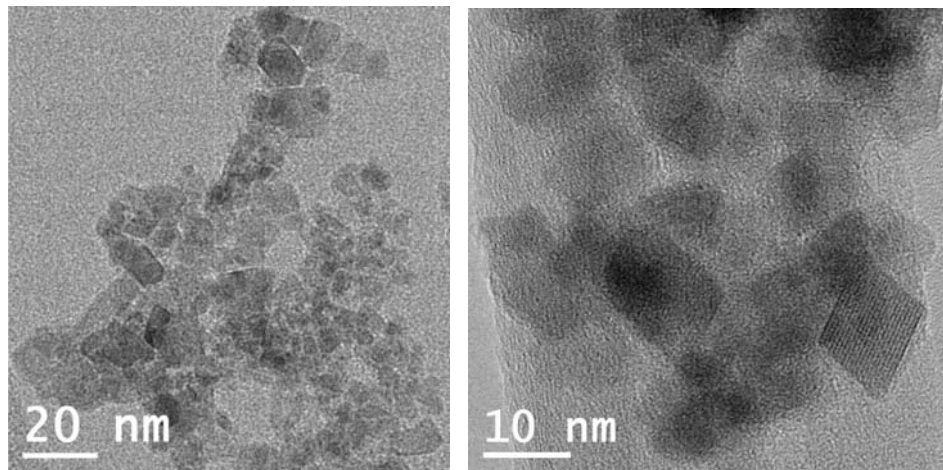
### Καθάρια μαγνητικά νανοσωματίδια (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>).

Με βάση τα ακτινογραφήματα XRD διαπιστώθηκε, σε όλα τα δείγματα, ο σχηματισμός καθαρού μαγνητίτη (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>). Με βάση το σχήμα των κορυφών XRD υπολογίστηκαν, μέσω της εξίσωσης Scherrer, τα μεγέθη των κρυσταλλιτών, τα οποία κυμαίνονται στην περιοχή 9-12 nm.



Σχήμα 1. Ακτινογράφημα XRD καθαρών μαγνητικών νανοσωματιδίων

Οι ειδικές επιφάνειες ήταν 100-160 m<sup>2</sup>/gr οι οποίες δεικνύουν καθαρά την παρουσία νανοσωματιδίων με διάμετρο 8-12 nm, σε απόλυτη συμφωνία με τα αποτελέσματα του XRD. Από την μελέτη με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία διαπιστώθηκε ότι τα σωματίδια είναι κρυσταλλικά και έχουν μέση διάμετρο 10-15nm, αποτέλεσμα που βρίσκεται σε απόλυτη συμφωνία με αυτά του XRD και της φυσικής ρόφησης N<sub>2</sub>.



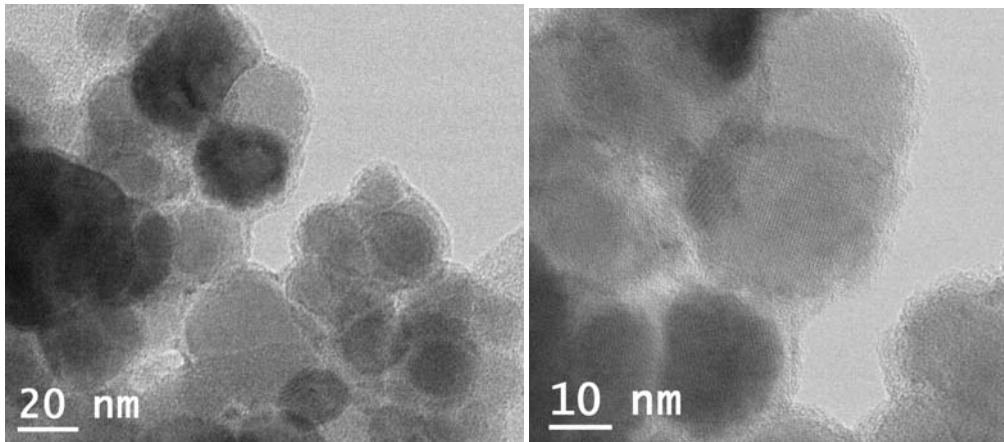
Σχήμα 2. Απεικόνιση HRTEM των καθαρών μαγνητικών νανοσωματιδίων

#### Νανοσωματίδια επικαλυμμένα με πυριτία

Η επίστρωση των νανοσωματιδίων με πυριτία (SiO<sub>2</sub>) προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα. Είναι βιοσυμβατή, μη τοξική, υδρόφιλη και αποτρέπει την ηλεκτροστατική έλξη και συσσωμάτωση των νανοσωματιδίων, ενώ οι υδροξυλικές ομάδες στην επιφάνεια της μπορούν εύκολα να δραστικοποιηθούν [5].

Η παρουσία πυριτίας γύρω από τα νανοσωματίδια ελέγχθηκε με Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας (HRTEM) σε συνδυασμό με Μικροανάλυση ακτίνων X (EDS). Στο σχήμα 3 διακρίνονται τα κρυσταλλικά νανοσωματίδια μαγνητίτη, τα οποία έχουν επικαλυφθεί με ένα λεπτό στρώμα άμορφης πυριτίας.

Επίσης η παρουσία πυριτίας διαπιστώθηκε με φασματοσκοπία υπερύθρου (FTIR). Στο σχήμα 5 φαίνονται τα φάσματα που ελήφθησαν από καθαρά νανοσωματίδια μαγνητίτη και από τα αντίστοιχα σωματίδια μετά την επικάλυψη. Στην περιοχή μηκών κύματος 780-1200 nm, εμφανίζεται στο φάσμα των επικαλυμμένων σωματιδίων (Σχ. 4c) μια ευρεία κορυφή με κέντρο περίπου στα 1080 nm η οποία αποδίδεται στις δονήσεις έκτασης της ομάδας Si-OH [6].



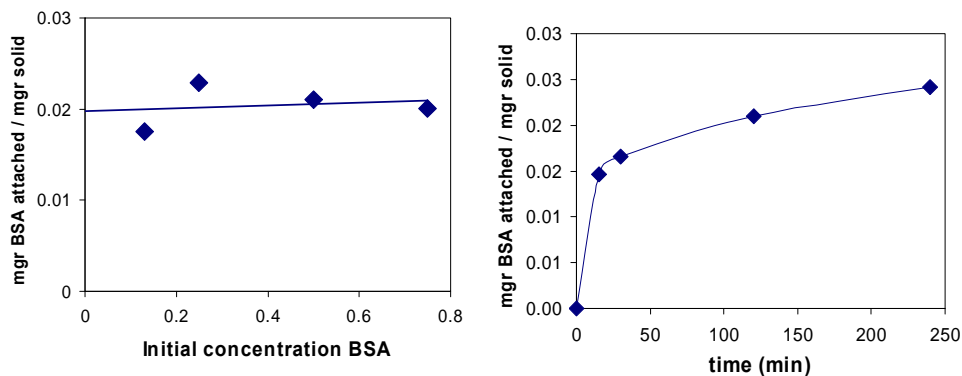
Σχήμα 3. Απεικόνιση HRTEM μαγνητικών νανοσωματιδίων επικαλυμμένων με πυριτία

#### Σύζευξη αλβουμίνης (BSA).

Προκειμένου να αποδειχθεί ότι τα νανοσωματίδια που παρασκευάστηκαν είναι ικανά να συζευχθούν με πρωτεΐνες χρησιμοποιήθηκε η βοείου προέλευσης πρωτεΐνη αλβουμίνη (Bovine Serum Albumin, BSA) σαν δείγμα ελέγχου.

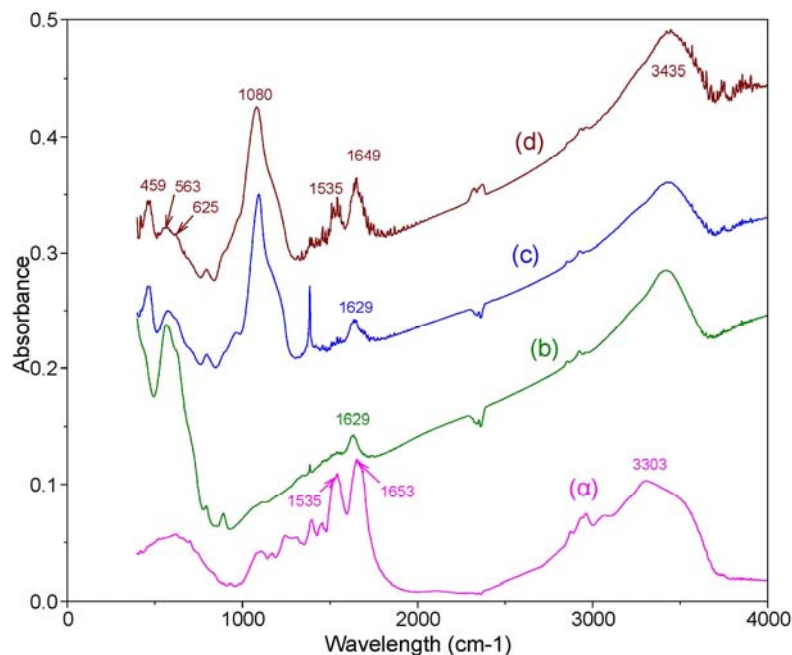
Τα δραστικοποιημένα νανοσωματίδια διασπείρονται σε PBS (Phosphate Buffer Saline) στο οποίο έχει διαλυθεί κατάλληλη ποσότητα πρωτεΐνης (BSA). Το μίγμα αναδεύεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στο τέλος τα μαγνητικά νανοσωματίδια διαχωρίζονται με μαγνήτη.

Για τον προσδιορισμό της ποσότητας BSA που παρακρατήθηκε από τα νανοσωματίδια, μετράται η απορρόφηση του διηθήματος στα 280nm σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους – ορατού (UV-Vis) και συγκρίνεται με την αντίστοιχη απορρόφηση του αρχικού διαλύματος BSA. Η ποσότητα BSA που παρακρατήθηκε από τα νανοσωματίδια υπολογίζεται με βάση το ισοζύγιο μάζας της πρωτεΐνης, στα 20 mg BSA/g στερεού.



Σχήμα 4. Ποσότητα συζευγμένου BSA σαν συνάρτηση της αρχικής συγκέντρωσης του διαλύματος και του χρόνου αντίδρασης

Στο σχήμα 4α παρουσιάζεται η εξάρτηση της ποσότητας συζευγμένης από τα δραστικοποιημένα νανοσωματίδια πρωτεΐνης, σαν συνάρτηση της αρχικής συγκέντρωσης του διαλύματος. Στο σχήμα 4β φαίνεται η επίδραση του χρόνου αντίδρασης στην ποσότητα συζευγμένης πρωτεΐνης.



**Σχήμα 5.** Φάσματα FTIR από (a) καθαρή βοείας προέλευσης πρωτεΐνη αλβουμίνη (BSA) (b) καθαρά νανοσωματίδια μαγνητίτη (c) νανοσωματίδια επικαλυμμένα με πυριτία και (d) νανοσωματίδια επικαλυμμένα με πυριτία και συζευγμένα με BSA

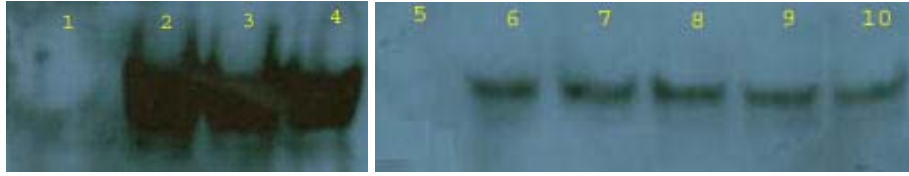
Η παρουσία συζευγμένης πρωτεΐνης στα νανοσωματίδια επιβεβαιώθηκε με φασματοσκοπία FTIR. Στο σχήμα 5 συγκρίνονται τα φάσματα των ασύζευκτων νανοσωματιδίων (σχήμα 5b και 5c) με το φάσμα που ελήφθη από νανοσωματίδια μετά την σύζευξη τους με πρωτεΐνη (σχήμα 5d). Στο ίδιο σχήμα φαίνεται επίσης το φάσμα FTIR της καθαρής πρωτεΐνης (σχήμα 5a). Οι κορυφές στα 1649 και 1535  $\text{cm}^{-1}$ , που εμφανίζονται μόνο στο φάσμα των συζευγμένων νανοσωματιδίων, αντιστοιχούν στον αμιδικό δεσμό του BSA [6]. Επομένως, η ανάλυση FTIR αποδεικνύει ότι η πρωτεΐνη BSA έχει επιτυχώς προσδεθεί πάνω στα επικαλυμμένα με πυριτία νανοσωματίδια.

#### Σύζευξη καρκινικών αντισωμάτων.

Για την σύζευξη των νανοσωματιδίων που παρασκευάστηκαν με καρκινικά αντισώματα επιλέχθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του Προστατικού Ειδικού Αντιγόνου (Prostate-Specific Antigen, PSA; κλώνος C-19, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) και ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω για την σύζευξη της πρωτεΐνης BSA. Για να ελεγχθεί η επίτευξη της σύζευξης χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ηλεκτροφόρησης σε γέλη πολυακρυλαμίδης με SDS και ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών με τεχνική Western Blotting. Τα νανοσωματίδια με τα οποία είχαν συζευχθεί πρωτογενή καρκινικά αντισώματα έναντι του αντιγόνου PSA επώαστηκαν σε μεμβράνη όπου είχαν προηγουμένως αποτυπωθεί ολικά κυτταρικά πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κυτταρικές σειρές ανδρογόνου-εξαρτώμενου καρκίνου προστάτου (LnCaP). Σαν δείγμα ελέγχου, σε μια δεύτερη μεμβράνη στην οποία είχαν αποτυπωθεί τα ίδια πρωτεϊνικά εκχυλίσματα, προστέθηκαν μη συνδεδεμένα αντισώματα έναντι PSA. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε στήλη ελέγχου στη οποία αποτυπώθηκαν μόνο νανοσωματίδια (χωρίς προηγούμενη σύνδεση με αντίσωμα). Η ανίχνευση έγινε με χρήση κατάλληλου δευτερογενούς αντισώματος και τεχνική χημειοφωταύγειας.

Η εικόνα των δύο μεμβρανών δείχνει ότι τόσο στις θέσεις όπου βρίσκεται το δείγμα ελέγχου με το μη συνδεδεμένο αντίσωμα, όσο και στις θέσεις όπου χρησιμοποιήθηκε νανο-συνδεδεμένο αντίσωμα ανιχνεύθηκε σήμα ειδικό για την πρωτεΐνη PSA (επιβεβαίωση με χρήση δείκτη μοριακού βάρους). Το γεγονός ότι ο διαχωρισμός του νανο-συνδεδεμένου αντισώματος που χρησιμοποιήθηκε στην δεύτερη μεμβράνη έγινε με βάση μαγνητικές

ιδιότητες, αποκλείει την πιθανότητα ύπαρξης ελεύθερου (μη νανο-συνδεδεμένου) αντισώματος στο επωαστικό διάλυμα στο οποίο να οφείλεται το θετικό σήμα. Οι στήλες ελέγχου στις οποίες αποτυπώθηκαν ελεύθερα νανοσωματίδια δεν έδωσαν καθόλου σήμα, όπως αναμενόταν.



**Σχήμα 6.** Απεικονίζονται με σκούρο χρώμα τα καρκινικά αντισώματα PSA τα οποία έχουν συζευχθεί με τα αντίστοιχα καρκινικά κύτταρα. Στις θέσεις 2-4 προστέθηκαν ελεύθερα αντισώματα PSA ενώ στις θέσεις 6-10 προστέθηκαν νανοσωματίδια στα οποία είχαν συζευχθεί τα αντισώματα. Στις θέσεις 1 και 5 προστέθηκαν ελεύθερα νανοσωματίδια.

### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα παραπάνω τεκμηριώνουν επιτυχή ανάπτυξη μεθοδολογίας για σύνθεση, δραστηκοποίηση και σύνδεση νανοσωματιδίων με ειδικά αντισώματα έναντι καρκινικών αντιγόνων, με επιτυχή αναγνώριση των αντιγόνων αυτών σε εργαστηριακό επίπεδο. Οι τεχνικές αυτές βεβαίως χρήζουν περαιτέρω επιβεβαίωσης σε *in vitro* κυτταρικά συστήματα και *in vivo* ζωικά μοντέλα, με απώτερο στόχο την χρήση τους σε βιοϊατρικές εφαρμογές απεικόνισης και έγκαιρης διάγνωσης καρκίνου.

### ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.

- [1]. LaConte L., Nitin N., Bao G., *Materials Today*, **8**:32 (2005)
- [2]. Tartaj P., Morales M. d. P., Veintemillas-Verdaguer S., Gonzalez-Carreño T., Serna C.S., *J. Phys. D: Appl. Phys.* **36**:R184 (2003)
- [3]. Berry C.C., Curtis A.S.G., *J. Phys. D: Appl. Phys.* **36**:R200 (2003)
- [4]. Arruebo M., Fernandez-Racheco R., Velasco B., Marquina C., Arbiol J., Irusta S., Ibarra R. M., Santamaria J., *Adv. Funct. Mater.* **17**:1473 (2007)
- [5]. He Y.P., Wang S.Q., Li C.R., Miao Y.M., Wu Z.Y., Zou B.S., *J. Phys. D: Appl. Phys.* **38**:1344 (2005)
- [6]. Yu C.H., Tam K.Y., Lo C.C.H., and Tsang S.C., *IEEE Trans. on Magn.*, **43**:2436 (2007)