

تهیه و بررسی اثر ضد سرطانی نانو سامانه های دارویی کورکومین بر پایه حامل های هیبریدی گرافن اکساید- پلی گلیسرول و گرافن اکساید کاهش یافته- پلی گلیسرول

فرهاد بانی¹، محسن عادل² و مجید صادقی زاده^{3*}

1- دانشجوی دکتری نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

2- استاد گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه لرستان، خرم آباد

3- استاد گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

* تهران، کد پستی 14115-175

sadeghma@modares.ac.ir

(دریافت مقاله: 94/6/24 پذیرش مقاله: 94/7/15)

چکیده - در این مطالعه، نانو حامل های دارورسان بر پایه هیبرید گرافن اکساید و گرافن اکساید کاهش یافته با پلیمر پرشاخه پلی گلیسرول ساخته شد. عامل دار کردن مواد گرافنی از طریق پیوندهای غیر کووالانسی بین سیستم کونژوگاسیون π مواد گرافنی با سیگمنت آروماتیکی در نقطه کانونی پلیمر انجام شد. پلی گلیسرول پلیمری آب دوست و زیست سازگار است که سبب افزایش پایداری کلوییدی و کاهش برهمکنش های غیر ویژه¹ مواد گرافنی در محیط های فیزیولوژیک شد. بارگذاری کورکومین به عنوان داروی گیاهی ضد سرطان و غیر محلول در آب با زیست دسترسی² اندک و سرعت متابولیزه بالا در داخل بدن، بسادگی بر روی این دو هیبرید انجام گرفت.

نتایج نشان از ظرفیت بارگذاری بالای هیبرید گرافن اکساید کاهش یافته (49%) در مقایسه با هیبرید گرافن- اکساید (15%) به علت بازیافت سیستم کونژوگاسیون π در گرافن- اکساید کاهش یافته داشت. کارایی ضد سرطانی این دو نانو هیبرید دارویی بر روی سلول های سرطان سینه انسانی MCF7 با آزمایش بقای سلولی به روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که حامل های هیبریدی زیست سازگاری مناسبی دارند. همچنین نانو هیبرید های دارویی حاصل ضمن افزایش حلالیت و پایداری کورکومین در محیط آبی، خاصیت ضد سرطانی قابل مقایسه با داروی آزاد کورکومین دارند. با توجه به ظرفیت بارگذاری بسیار بالایی هیبرید گرافن- اکساید کاهش یافته نسبت به هیبرید گرافن اکساید، می توان در دوز های پایین هیبرید دارویی به غلظت موثر دارو دست یافت و این مزیت استفاده از این هیبرید نسبت به هیبرید دارویی گرافن اکساید می باشد.

کلیدواژگان: نانو سامانه دارورسان، مواد خانواده گرافن، کورکومین.

¹ Nonspecific Interaction

² Bioavailability

1- مقدمه

گرافن صفحه‌ای دو بعدی با ضخامت تک اتمی از اتم‌های کربن با هیبریداسیون sp^2 و آرایش هگزاگونالی است که جداسازی آن از کریستال گرافیت و تعیین خواصش جایزه نوبل 2010 را از آن خود کرد [1]. گرافن با داشتن خواص مکانیکی، حرارتی، الکترونی و نوری بسیار ویژه، پتانسیل استفاده در بسیاری زمینه‌ها از جمله مواد کامپوزیتی [2]، پیل‌های زیست سوختی [3]، کاتالیست‌ها [4] و حسگرها [5] را پیدا کرده است.

از زمان اولین مطالعه گرافن اکساید به عنوان نانوحامل برای دارورسانی [6] در سال 2008 مطالعات جالبی جهت بررسی استفاده از گرافن و مشتقاتش برای کاربردهای متنوع زیست پزشکی از جمله دارورسانی و ژن درمانی [7]، حسگرهای زیستی [8]، تصویربرداری مولکولی [9]، مواد آنتی باکتریال [10] و داربست‌های زیست‌سازگار برای کشت سلولی [11] انجام شده است. پیش‌نیازهای لازم برای استفاده از مواد خانواده گرافن در زیست‌پزشکی شامل بهبود سطح¹ جهت تأمین پایداری و زیست‌سازگاری لازم در محیط‌های بیولوژیک و نیز داشتن اندازه مناسب است.

بررسی ایمنی و ضریب سلامتی نانو مواد خانواده گرافن برای توسعه این مواد یک ضرورت اساسی است. در حالی که برخی مطالعات برون تن² و درون تن³ هیچ خطری را به روشنی نشان نمی‌دهد، مطالعات دیگری وجود دارد که بیانگر امکان به مخاطره افتادن سلامتی در استفاده از این مواد است [12]. مطالعات نشان می‌دهد که میزان سمیت نانو مواد گرافنی وابسته به کاربرد ویژه (کامپوزیتها، تجهیزات الکترونیک یا ابزار زیست پزشکی)، نوع ساختار و چگونگی توسعه این مواد می‌باشد. دستکاری‌های شیمیایی می‌تواند خطر سمیت را کاهش دهد؛ بطوری که پوشش سطحی این مواد با سایر مواد زیست‌سازگار سبب بهبود نانو ایمنی این مواد شده است. بیشتر مطالعات موجود اشاره به هموسازگاری⁴ این مواد داشته‌اند. در مورد سمیت

این مواد در زمان‌های طولانی اطلاعات اندکی هست و باید مورد مطالعه قرار گیرد. در مورد تأثیر این مواد بر ارسال پیام‌های سلولی هم مطالعاتی شروع شده است [13]. اندازه یا ابعاد سطح می‌تواند بر بسیاری از پدیده‌های بیولوژیکی از جمله جذب سلولی، میزان تصفیه از طریق کلیه، عبور از سد مغزی-خونی و نیز بر اندازه اندوزوم یا لیزوزوم داخل سلول که ماده باید درونش حمل شود، اثر بگذارد [14]. میزان تغییر شکل صفحات گرافنی بر اثر گشتاور نیروهای سلولی علاوه بر تعداد لایه‌ها به ابعاد صفحه نیز وابسته است.

استفاده بیولوژیکی مولکول‌های آب‌گریز مختلف که بسیاری از آنها آروماتیک هستند از جمله داروهای گیاهی مانند کورکومین به خاطر حلالیت آبی ضعیفشان با محدودیت مواجه است. حامل‌های دارویی در گستره نانو، پل ارتباطی نانوتکنولوژی و دارورسانی پیشرفته شده است که شامل لیپوزوم‌ها [15]، نانوذرات [16]، کربن نانو تیوب‌ها [17] و بسیاری از حامل‌های دیگر است. بهبود ظرفیت بارگذاری⁵ داروها بر این حامل‌ها در تحقیقات دارویی بسیار ضروری است. یکی از خواص مواد گرافنی دارا بودن بیشترین سطح ویژه در بین نانو مواد (در حدود $2600 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) با پایداری مکانیکی و شیمیایی عالی است که می‌تواند مولکول‌های با حلالیت کم و با پیوندهای π کونژوگه شده را و نیز مولکول‌های با بار مثبت را به واسطه برهم‌کنش‌های π - π یا نیروهای الکترواستاتیک بین این مولکول‌ها با سطح کربن گرافنی با دانسیته بالا از طریق دو وجه جذب و در سیال‌های فیزیولوژیک حمل کند.

گرافن اکساید و گرافن اکساید کاهش یافته دو عضو اصلی مواد خانواده گرافن⁶ هستند. گرافن اکساید، گرافن اصلاح شده شیمیایی است که به وسیله اکسداسیون شدید گرافیت کریستالی و با استفاده از ارتعاش فراصوت یا سایر روش‌های کلئیدسازی برای تولید صفحات تک لایه، بدست می‌آید [18]. صفحه گرافن ایده آل شامل اتم‌های کربن با هیبریداسیون sp^2 سرتاسری هست. در ساختار گرافن اکساید، درصدی از اتم‌های کربن در صفحه، به شکل گروه‌های اپوکسی و هیدروکسیل با اکسیژن پیوند سیگما

¹ Surface Modification² In Vitro³ In Vivo⁴ Hemocompatible⁵ Loading Capacity⁶ Graphene Family Materials

کورکومین می‌توان قابلیت زیست دسترسی¹ آن را افزایش داد که روش‌های متعددی در ده سال اخیر به کار گرفته شده‌است [22].

تاکنون بارگذاری و انتقال کورکومین توسط حامل‌های مواد خانواده گرافنی بشکل محدودی بررسی شده است [24,23]. در این مطالعه بارگذاری کورکومین بر روی نانو گرافن-اکساید و گرافن-اکساید کاهش یافته که با پلیمر پلی-گلیسرول جهت افزایش پایداری و زیست‌سازگاری در محیط فیزیولوژیک هیبرید شده است، بررسی و مقایسه می‌شود. سپس کارایی ضد سرطان هر دو نانوهیبرید دارویی روی سلول سرطان سینه انسانی MCF7 در محیط برون‌تن و با آزمون استاندارد MTT مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

2- روش‌ها

2-1- مواد

α - نفتول، گرافیت، سدیم هیدرید، سیانوریک کلراید (1)، 3، 5- تری‌کلرو-2، 4، 6- تری‌آزین، دی اتانول آمین، استون، متانول، اتانول، اسید کلرید، اسید سولفوریک، نیترات سدیم، تتراهیدروفوران، دی متیل سولفوکسید، پرمنگنات پتاسیم، پارافینیل دی آمین، پرمنگنات پتاسیم، دی‌کلرومتان، پراکسید هیدروژن و رزین تبادل یونی از شرکت مرک خریداری شدند. گلیسیدول، کورکومین، هیدرازین، بافر نمکی فسفات²، معرف³ MTT و دی متیل سولفوکسید از شرکت آلد ریچ خریداری شدند. محیط کشت⁴ DMEM با گلوکز بالا، محلول تریپسین-ای.دی.تی.آ⁵ (0/25%)، آنتی بیوتیک‌های پنسیلین-G-استرپتومایسین و سرم جنین گاو⁶ از شرکت گیبکو خریداری شدند. پلی گلیسرول طبق روش ارائه شده در مقاله سنتز شد [25].

2-2- دستگاه‌ها

طیف‌های مادون قرمز با استفاده از دستگاه

داشته، هیبریداسیون sp^3 دارند. نتیجه شبکه دوبعدی با گستره‌های متغییر از sp^2 و sp^3 می‌باشد که که دومین‌های sp^2 کوچک منظم 2-3 نانومتری داخل ماتریکس sp^3 کربن-اکسیژن از هم جدا شده‌اند. حذف قابل کنترل گروه های اکسیژنی گرافن-اکساید به وسیله شیمی کاهش سبب بازیافت دومین‌های کونژوگه sp^2 می‌شود و امکان دست‌کاری و تنظیم خواص الکتریکی، نوری و شیمیایی گرافن-اکساید کاهش یافته را فراهم می‌کند. در گرافن-اکساید کاهش یافته، مقدار اکسیژن کاهش یافته، هیدروفوبیسیته سطح افزایش می‌یابد؛ لذا بار سطحی و دیسپرسیته آن در داخل آب کاهش می‌یابد. در ضمن، سوراخ‌ها و نقص‌های در شبکه کربنی بو سیله آزاد سازی CO₂ و CO ایجاد می‌شود.

اگرچه کلونیدهای گرافن-اکساید در آب خالص می‌تواند پایدار باشد، گزارش شده است که برای پایداری طولانی مدت در محیط‌های نمکی یا کشت نیاز به عامل دار کردن بعدی است [19]. گرافن اصلاح نشده پراکندگی بسیار ضعیفی در آب دارد و نیاز به عوامل پایدار سازی دارد [14].

بطور کلی سیستم‌های دارورسانی مواد خانواده گرافن بیشتر بر پایه گرافن-اکساید بخاطر دیسپرسیتهی بهتر در فازهای آبی، بوده است و گرافن-اکساید کاهش یافته کمتر مطالعه شده‌است.

کورکومین با یک سیستم کونژوگاسیون π وسیع، حدود 2 تا 8 درصد وزنی زردچوبه را تشکیل می‌دهد. کورکومین دارای اثرات چندگانه ضدالتهابی و ضدسرطانی بوده و این اثرات عمدتاً به خاطر اثرات آنتی‌اکسیدانی و تأثیر آن روی آنزیم‌های سلولی و مهار مسیرهای ارسال سیگنال در سطوح مختلف می‌باشد [20]. بخصوص با توجه به تأثیر آن روی نسخه‌برداری ژن‌ها و القاء آپوپتوزیس از آن در پیش‌گیری و شیمی درمانی سرطان می‌توان استفاده نمود [21]. با این حال کورکومین به دلیل جذب پایین، متابولیسم سریع و حذف سریع سیستماتیک به واسطه غیر قابل حل‌بودن آن در آب تحت شرایط خنثی یا اسیدی، سطوح پایینی در بافت‌های بدن و پلاسمای خون دارد. بنابراین با پیدا کردن راهی برای حفاظت از

¹ Bioavailability

² Phosphate buffer saline(PBS)

³ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

⁴ Dulbecco Modified Eagle's Minimal Essential Medium

⁵ E.D.T.A

⁶ Fetal bovine serum(FBS)

4-2- تهیه نانوهیبریدهای گرافن اکساید پلی-

گلیسرول و گرافن اکساید کاهش یافته پلی گلیسرول
عامل دار کردن غیر کووالانسی گرافن اکساید و گرافن کساید کاهش یافته با پلیمر پلی گلیسرول به آسانی با مخلوط کردن دیسپرسیون آنها در بافر PBS با pH 7/4 با محلول پلیمر و قرار دادن مخلوط حاصل به مدت 30 دقیقه در دمای محیط و تحت ارتعاش فراصوت و یک شب در حال به هم خوردن ملایم بدست آمد. نانو هیبریدهای گرافنی حاصل توسط تکنیک‌های UV-vis، Zeta potential، DLS، مورد بررسی قرار گرفت.

5-2- جذب سطحی پروتئین

برای اندازه‌گیری جذب سطحی پروتئین، مخلوط حاوی $0/2 \text{ mg ml}^{-1}$ نانو گرافن اکساید و $0/2 \text{ mg ml}^{-1}$ پروتئین آلبومین سرم گاوی برای 24 ساعت به هم زده شدند. سپس نانوذرات با سانتریفوژ ترسیب شدند و غلظت پروتئین در محلول رویی با آزمون بردفورد⁴ اندازه‌گیری شد [27]. این روش برای نانو گرافن اکساید کاهش یافته بدون عامل دار شدن و پس از عامل دار شدن با پلی گلیسرول و نیز نانو گرافن اکساید عامل دار شده انجام یافت.

6-2- تهیه نانوهیبریدهای دارویی

بارگذاری کورکومین بر روی نانوحامل‌های هیبریدی با افزودن 1 ml از محلول اتانولی کورکومین با غلظت 1 mg ml^{-1} بر روی 10 ml دیسپرسیون نانو هیبرید داخل PBS با غلظت $0/1 \text{ mg ml}^{-1}$ در دمای محیط و تحت ارتعاش فراصوت و یک شب در حال به هم خوردن ملایم انجام شد. سپس مخلوط با کیسه دیالیز دیالیز شد و باقی مانده کورکومین آزاد با سانتریفوژ با دور 3000 rpm حذف شد. ظرفیت بارگذاری کورکومین به وسیله جذبش در 430 نانومتر پس از کم کردن جذب هیبرید حامل و با استفاده از منحنی کالیبراسیون کورکومین در اتانول تخمین زده شد.

ظرفیت بار گذاری کورکومین با استفاده از فرمول (1)

اسپکتروفوتومتر نیکولت 320 به صورت قرص یا فیلم بر روی قرص KBr ثبت شدند. پراکندگی دینامیک نور¹ با استفاده از دستگاه Brookhaven, 90Plus انجام شد. طیف‌های UV-vis با استفاده از اسپکتروفوتومتر Varian Cary 100 conc ثبت شدند. طیف‌های فلورسانس با استفاده از دستگاه اسپکتروفلوریمتر Varian, Carey Eclipse ثبت شدند. دستگاه فراصوت پروبی از Hielscher UP200H استفاده شد. عکس‌های میکروسکوپ فلورسانس با استفاده از میکروسکوپ اینورت Nikon, TS100 و با دوربین Hitachi گرفته شد. از دستگاه پلیت ریدر Biotek, synergy H4 برای خوانش جذب پلیت استفاده شد.

3-2- سنتز نانو گرافن اکساید و گرافن اکساید کاهش یافته

گرافن اکساید از اکسیداسون شیمیایی گرافیت به روش‌های اصلاح شده² تهیه شد [26]. گرافن اکساید حاصل پس از دیسپرس کردن در آب دیونایز، تحت ارتعاش فراصوت با توان 200 W به مدت یک ساعت قرار داده شد. ارتعاش فراصوت در فواصل زمانی پنج دقیقه و در داخل حمام یخ انجام شد. سپس محلول با دور 12000 rpm سانتریفوژ شده و سوپ حاصل به عنوان نانو گرافن با فریز درایر خشک گردید. سپس گرافن اکساید به وسیله هیدرازین مونوهیدرات کاهش یافت. بر روی 30 میلی لیتر محلول گرافن اکساید ($0/5 \text{ mg ml}^{-1}$) که با آمونیاک pH آن به 10 رسانده شده بود، هیدرازین مونوهیدرات با نسبت وزنی 7:10 به گرافن اکساید اضافه شده و مخلوط به مدت نیم ساعت در حمام روغن در دمای 95 درجه سانتیگراد رفلکس شد. سپس محلول حاصل را با کیسه دیالیز با مولکولار کات آف³ 12 کیلودالتون به مدت 24 ساعت دیالیز کرده و محصول سیاه رنگ گرافن کساید-کاهش یافته توسط فریز درایر خشک شد. گرافن حاصل توسط تکنیک‌های UV-vis، FT-IR، Raman، DLS و Zeta potential مورد شناسایی و بررسی قرار گرفت.

¹ Dynamic Light Scattering² Modified Hummers Method³ molecular cut-off⁴ Bradford Assay

محاسبه شد:

افزاده شد. هر غلظت به صورت تکرار 3 تائی مورد آزمایش قرار گرفت. محیط کشت حاوی دارو پس از طی شدن 48 ساعت زمان تیمار پس از تخلیه و شستشوی با PBS با 200 میکرولیتر محیط کشت کامل و تازه جایگزین شد. 20 میکرولیتر معرف MTT¹ با غلظت 5 mg ml⁻¹ حل شده در بافر PBS به هر چاهک اضافه شده و پلیت 96 خانه در انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد با 5% دی‌اکسید کربن به مدت 4 ساعت نگهداری شد. سپس چاهک‌ها تخلیه شده و 200 میکرولیتر دی‌متیل سولفوکسید به هر چاهک اضافه شده و به آهستگی برای 5 دقیقه به هم زده شد. در مرحله آخر جذب طول موج 570 نانومتر توسط پلیت ریدر برای هر چاهک خوانده شد. درصد بقای سلولی² با استفاده از بدست آوردن نسبت جذب در سلول‌های گروه تیمار به گروه کنترل محاسبه شد.

3- نتایج و بحث

گرافن‌اکساید طبق روش‌های از پودر گرافیت اولیه با اکسایش قوی سنتز شد. سپس تحت ارتعاش فراصوت قوی برای بدست آوردن گرافن‌اکساید تک لایه با سایز کاهش یافته قرار گرفت و با سانتریفوژ صفحات چند لایه و آگلومره شده‌ها حذف شدند.

تأثیر سوء احتمالی ارتعاش فراصوت قوی بر روی کیفیت ساختار گرافن‌اکساید با بررسی طیف رامان گرافن‌اکساید قبل و بعد از تیمار بررسی شد. طیف‌سنجی رامان ابزار متداول برای بررسی میزان بی‌نظمی در ساختارهای مواد کربنی است. برای مواد گرافنی نسبت شدت پیک D به G در عدد موجی به ترتیب در 1358 و 1597 cm⁻¹ نشانگر میزان بی‌نظمی است [28]. همان‌طور که در شکل 1- الف دیده می‌شود این نسبت در گرافن‌اکساید با قرار گرفتن تحت ارتعاش فراصوت قوی تغییری نکرده است در حالی که یک کاهش قابل ملاحظه در نسبت شدت پیک D به G در نانو گرافن¹-اکساید کاهش یافته حاصل از واکنش نانوگرافن‌اکساید با هیدرازین، دیده می‌شود که نشانگر کاهش گرافن‌اکساید و تشکیل دومین‌های گرافنی جدید است.

¹ 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

² Cell Viability

= ظرفیت بارگذاری

(1)

نانو هیبرید دارویی حاصل توسط تکنیکهای UV-vis, Fluorescence, DLS, Zeta potential مورد بررسی قرار گرفت.

7-2- بررسی جذب سلولی نانو هیبریدهای دارویی

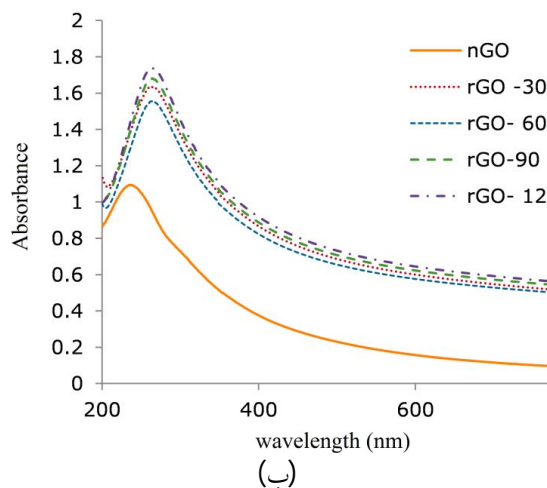
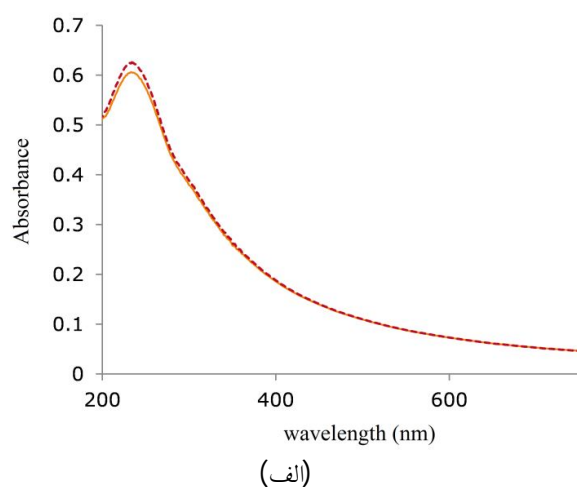
مطالعات سلولی نانو هیبرید دارویی بر روی سلول‌های سرطان سینه انسانی MCF7 انجام گرفت. نخست بررسی جذب سلولی نانو هیبریدهای دارویی توسط میکروسکوپ فلورسانس انجام گرفت. سلول‌های MCF7 در پلیت شش خانه‌ای به تعداد 10⁵ در محیط کشت کامل DMEM کشت داده شدند. سپس پلیت در انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد 5% دی‌اکسید کربن تا هنگام اتصال سلول‌ها به سطح فلاسک و رسیدن به مرفولوژی نگهداری شدند. سپس سلول‌ها با نمونه‌های کورکومین آزاد، و نانو هیبریدهای دارویی گرافن و گرافن‌اکساید با غلظت کورکومین 30 μM برای 4 ساعت تیمار شدند. سپس سلول‌ها پس از سه بار شستشو با PBS زیر میکروسکوپ فلورسانس اینورت و با فیلتر آبی مشاهده و عکس گرفته شدند.

8-2- بررسی سمیت سلولی نانو هیبریدهای دارویی

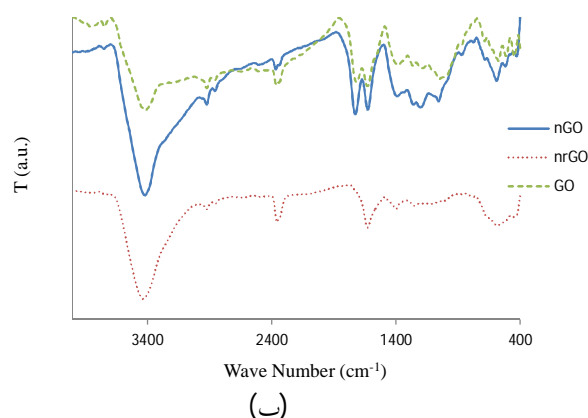
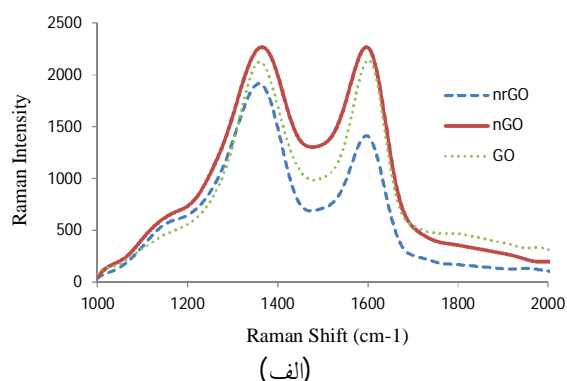
با آزمون MTT

مطالعه سمیت سلولی نانو حامل‌ها و نانو هیبریدهای دارویی با استفاده از آزمون استاندارد MTT انجام گرفت. برای این منظور سلول‌ها با تعداد بهینه شده 10⁴ سلول برای هر چاهک در پلیت 96 خانه با حجم نهائی 200 میکرولیتر محیط کشت کامل DMEM کشت داده شدند. پس از اتصال سلول‌ها به سطح فلاسک و رسیدن به مرفولوژی، غلظت‌های مختلفی از نانو حامل‌ها و نانو هیبریدهای دارویی گرافن و گرافن‌اکساید به هر چاهک

همان‌طور که در شکل 3-ب دیده می‌شود واکنش کاهش باعث افزایش جذب گرافن اکساید کاهش یافته در کل ناحیه مرئی و ماوراء بنفش شده و جذب بیشینه یک شیفتم قرمز¹ به طول موج 265 نانومتر نشان داده است که بیانگر بازیافت و افزایش دومین‌های گرافنی (سیستم کانژوگاسیون 2π) و در نتیجه انتقالات الکترونی با انرژی کمتر در گرافن اکساید کاهش یافته است [29]. در ضمن ملاحظه می‌شود که افزایش زمان واکنش کاهش از نیم ساعت به بعد تأثیر قابل ملاحظه‌ای در بازیافت دومین‌های گرافنی ندارد (شکل 2-ب).



شکل 2 طیف جذب نور ماوراءبنفش و مرئی (الف) گرافن اکساید (GO) و نانو گرافن اکساید (nGO)، (ب) نانو گرافن اکساید (nGO) و نانو گرافن اکساید کاهش یافته (rGO) در زمانهای مختلف واکنش کاهش با هیدرازین



شکل 1 (الف) طیف رامان گرافن اکساید (GO)، نانو گرافن اکساید (nGO) و نانو گرافن اکساید کاهش یافته (nrGO)، (ب) طیف FT-IR گرافن اکساید، نانو گرافن اکساید و نانو گرافن کاهش یافته.

در طیف FT-IR گرافن اکساید به وضوح گروه‌های عاملی اکسیژن دار مشاهده می‌شود. باند 1728 cm^{-1} ارتعاشات کششی پیوند $\text{C}=\text{O}$ گروه‌های کربونیل و کربوکسیل، 1627 cm^{-1} ارتعاشات کششی $\text{C}=\text{C}$ ، 3420 cm^{-1} ارتعاشات کششی $\text{O}-\text{H}$ ، 1218 cm^{-1} ارتعاشات کششی $\text{C}-\text{O}$ اپوکسی، 1728 cm^{-1} ارتعاشات کششی $\text{C}-\text{O}$ الکوکی را در نانو گرافن اکساید نشان می‌دهد (شکل 1-ب) که با ارتعاش فراصوت قوی تغییری در این پیک‌ها حاصل نشده است. در حالی که واکنش گرافن اکساید با هیدرازین سبب حذف کامل و یا کم شدن شدت پیک‌های گروه‌های عاملی اکسیژن دار در گرافن اکساید کاهش یافته گردیده است. طیف جذبی نور ماوراءبنفش و مرئی گرافن اکساید و نانوگرافن اکساید بدون هیچ تفاوتی (شکل 2-الف) یک جذب بیشینه در طول موج 225 نانومتر نشان می‌دهد.

¹ Red Shift

² π Conjugation System

اندازه‌گیری شد که نشانگر عامل‌دار شدن سطح گرافن-اکساید و گرافن-اکساید کاهش یافته با پلیمر پلی‌گلیسرول داشت. کاهش شدت فلورسانس پلی‌گلیسرول در حضور نانوغرافن-اکساید و گرافن-اکساید کاهش یافته نشان دهنده وجود برهمکنش غیرکووالانسی π - π بین قطعه‌های آروماتیکی پلیمر با دومین‌های گرافنی داخل صفحه‌های گرافن-اکساید و گرافن-اکساید کاهش یافته می‌باشد (شکل 4). این کاهش برای گرافن-اکساید کاهش یافته بیشتر از گرافن-اکساید می‌باشد که نشانگر کارایی خاموش‌سازی⁴ بیشتر گرافن-اکساید کاهش یافته می‌باشد که قبلاً با عکس میکروسکوپ فلورسانس گزارش شده بود [31].

یکی از خواص پلیمر پلی‌گلیسرول عدم برهمکنش‌های غیر ویژه⁵ با بیومولکول‌ها به خصوص پروتئین‌های سرم خون می‌باشد که باعث افزایش زمان گردش در خون و افزایش امکان رسیدن نانوسامانه‌دارویی به تومور می‌شود. بررسی میزان جذب پروتئین آلبومین سرم گاوی⁶ بر روی صفحات گرافنی عامل‌دار شده ونشده با انکوباسیون این مواد با پروتئین آلبومین به مدت 24 ساعت انجام یافت. نتایج نشان می‌دهد یک جذب سطحی 20 mg از پروتئین برای یک گرم نانوهیبرید گرافن-اکساید-پلی‌گلیسرول بدست می‌آید در حالی که این مقدار برای گرافن-اکساید بدون عامل‌دار شدن 215 mg است. این مقدار برای نانو هیبرید گرافن-اکساید کاهش یافته-پلی‌گلیسرول و گرافن-اکساید کاهش یافته بدون عامل‌دار شدن به ترتیب 13 و 280 میلی‌گرم شد که نشانگر برهم کنش بیشتر گرافن-اکساید کاهش یافته با پروتئین در مقایسه با گرافن-اکساید به علت داشتن دومین‌های گرافنی بیشتر می‌باشد. همچنین در هر دو نانوهیبرید کاهش زیاد جذب سطحی پروتئین دیده می‌شود که نشانگر پوشش هر دو صفحه گرافن-اکساید و گرافن-اکساید کاهش یافته با پلیمر پلی‌گلیسرول دارد. شاخه‌های پلی‌گلیسرول که بر روی سطح گرافن قرار گرفته است نه تنها سبب افزایش پایداری کلوئید آبی گرافن می‌شود، بلکه سبب بهبود مقاومت در برابر برهمکنش‌های غیرویزه با پروتئین‌های سرم می‌گردد.

میانگین قطر گرافن-اکساید، نانو گرافن-اکساید و گرافن-اکساید کاهش یافته توسط روش¹ DLS اندازه‌گیری شد که به ترتیب 49، 419 و 50 نانومتر بدست آمد که نشان از کاهش چشمگیر اندازه گرافن-اکساید تحت ارتعاش فراصوت داشت و اینکه واکنش کاهش تأثیری در اندازه صفحات گرافن حاصل نداشت. اندازه‌گیری پتانسیل زتای این ذرات نیز توسط تکنیک² ELS اندازه‌گیری شد که به ترتیب 22-، 51- و 25- میلی‌ولت به دست آمد. مشاهده می‌شود که با کاهش اندازه صفحات گرافن-اکساید، دانسیته بار سطحی مربوط به گروه‌های کربوکسیلات لبه‌های صفحه گرافن-اکساید افزایش زیادی یافته است. همچنین به علت کم شدن تعداد گروه‌های عاملی قابل یونیزه در اثر کاهش، بار سطحی گرافن-اکساید کاهش یافته بطور قابل ملاحظه‌ای کاسته شده است. بر همین اساس است که گرافن-اکساید کاهش یافته بدون اصلاح سطح به دلیل خاصیت هیدروفوبی در محیط آبی بخصوص در محلول نمکی مانند بافر فسفات پایداری کلوئیدی ضعیفی از خود نشان داد و ظرف یک روز در محیط بافری ترسیب می‌شد. در این کار تحقیقاتی از پلیمر پلی‌گلیسرول پرشاخه هیدروفیل باحلقه‌های آروماتیکی نفتولی در نقطه کانونی-اش³ [25]، برای عامل‌دار کردن و پایداری سازی نانو گرافن-اکساید و گرافن-اکساید کاهش یافته در محیط بیولوژیکی استفاده شد (شکل 3). پلی‌گلیسرول یک پلیمر آب‌دوست، زیست‌سازگار و مقاوم در جذب پروتئین است که با گروه‌های عاملی فراوان به عنوان یک جایگزین به جای پلی‌اتیلن‌گلیکول برای کاربری‌های زیست‌پزشکی مطرح است [30]. تهیه هیبرید گرافن-پلی‌گلیسرول با عامل‌دار کردن غیرکووالانسی صفحات گرافنی با پلیمر به آسانی با مخلوط کردن صفحات گرافنی با پلیمر در محلول PBS با pH 7/4 تحت ارتعاش فراصوت انجام گرفت. پایداری نانو هیبریدهای گرافنی حاصل افزایش زیادی داشت، بطوری که پس از چندین ماه همچنان هیچ ترسیبی با چشم غیرمسلح در دیسپرسیون دیده نشد.

مقدار پتانسیل زتای نانو هیبریدهای گرافن-اکساید و گرافن-اکساید کاهش یافته به ترتیب 14- و 11- میلی‌ولت

⁴ Quenching Efficiency

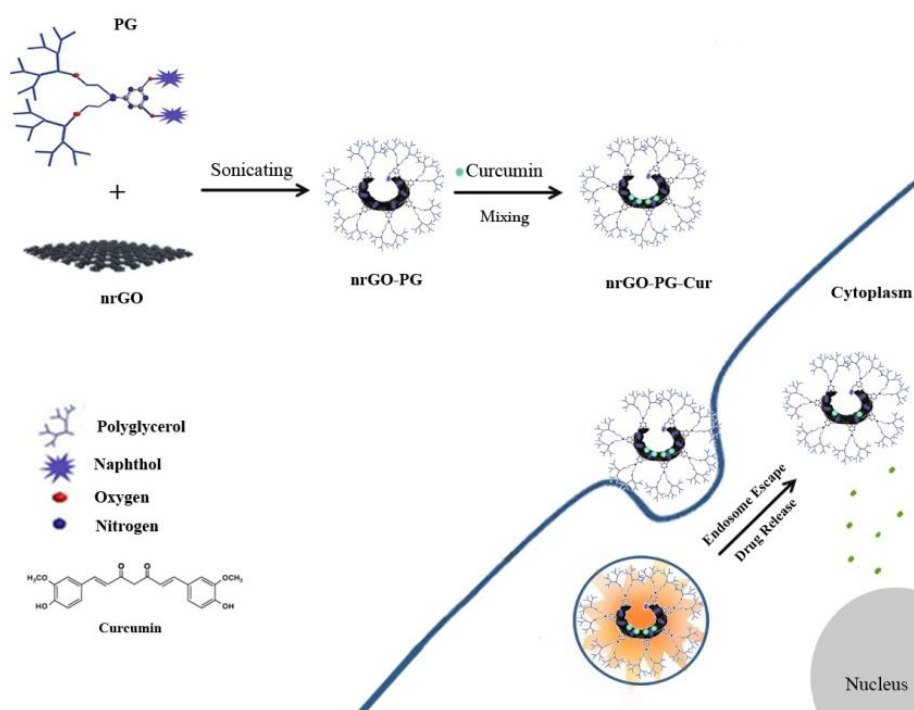
⁵ Nonspecific Interaction

⁶ BSA

¹ Dynamic Light Scattering

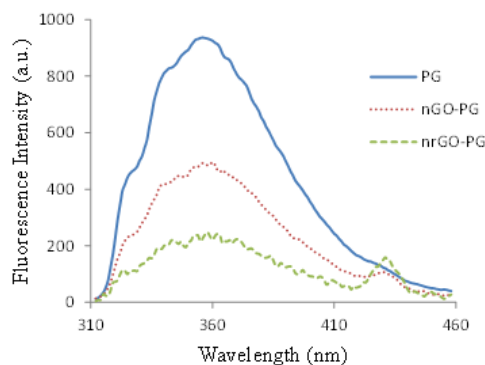
² Electrophoretic Light Scattering

³ Focal Point



شکل 3 توضیح نمایشی از نحوه تهیه نانوهیبرید گرافن-پلی گلیسرول-کورکومین بعنوان یک نانوهیبرید دارویی و جذب سلولی آن از طریق اندوسیتوز.

و بهم‌زدن مخلوط حاصل برای یک شب بمنظور اطمینان از کامل شدن برهمکنش، بر روی نانو هیبریدهای حامل بار می‌شود. آزمایش کنترل نشان داد که کورکومین بر روی محلول پلیمر به‌تنهایی بار نمی‌شود. کورکومین یک سیستم کونژوگه وسیع با دو حلقه آروماتیکی دارد که سبب القاء برهمکنش π - π استاکینگ¹ با سیستم کونژوگاسیون π هیبریدهای گرافنی می‌شود. پهن شدن پیک جذب کورکومین در 430 nm طیف جذبی نانو هیبریدهای دارویی حاصل نشانگر وجود همین برهمکنش π - π استاکینگ است (شکل 5-الف). همچنین خاموش شدن قوی فلورسانس کورکومین پس از لود شدن روی ناو هیبریدها بیانگر بارگذاری موفق کورکومین روی صفحات گرافنی است (شکل 5-ب). ظرفیت لودینگ کورکومین به‌وسیله بدست آوردن جذب کورکومین در نانوهیبرید دارویی در 430 nm با کم کردن جذب هیبرید حامل از جذب هیبرید دارویی و با استفاده از منحنی کالیبراسیون کورکومین در اتانول تخمین زده شد.



شکل 4 طیفهای فلورسانس مربوط به خاموش شدن فلورسانس محلول پلی گلیسرول (8 $\mu\text{g ml}^{-1}$) در حضور نانوغرافن اکساید و نانوغرافن اکساید کاهش‌یافته (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$) (28). طول موج تحریک 215 nm بود

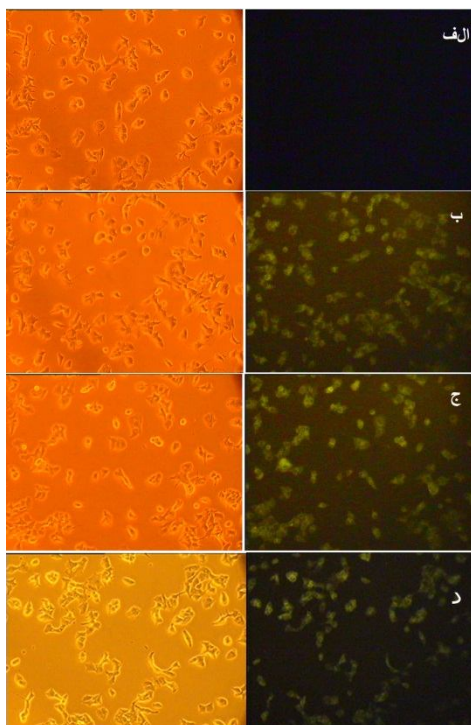
مشاهده می‌شود که برهمکنش غیرکووالان بین پلیمر و گرافن به‌اندازه کافی قوی است که حتی در حضور پروتئین-های سرم با استحکام کافی متصل به گرافن باقی می‌ماند و مانع جذب سطحی پروتئین می‌شود.

کورکومین به آسانی با مخلوط کردن ساده نانوهیبریدهای گرافنی با محلول اتانولی کورکومین تحت ارتعاش فراصوت

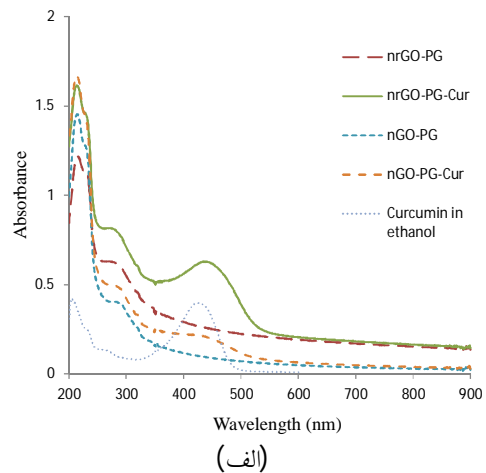
¹ π - π stacking

بیشتر در گرافن اکساید کاهش یافته نسبت به گرافن اکساید می باشد. نانوهیبرید دارویی حاصل غلظتی در حدود 1 mg l^{-1} و 50 و 15 از کورکومین محلول در بافر PBS با غلظت حامل 100 mg l^{-1} از هر دو هیبرید را سبب شد که پایداری کلونیدی خوبی بدون ته نشینی حتی در چندین ماه از خود نشان نداد (شکل 5-ج) در حالی که حلالیت کورکومین آزاد در بافر PBS در حد قابل اغماض 1 mg l^{-1} می باشد و ناپایدار بوده و تجزیه می شود.

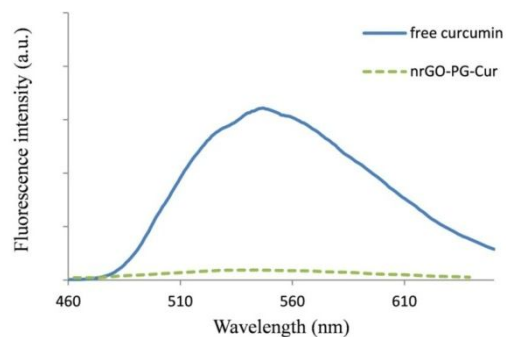
کارایی نانوهیبریدهای دارویی در انتقال کورکومین به داخل سلول به وسیله فلورسانس سبز ذاتی کورکومین مورد بررسی قرار گرفت. نور فلورسانس سبز مشاهده شده در داخل سیتوپلاسم سلول های تیمار شده با نانوهیبریدهای دارویی مشابه با سلول های تیمار شده با کورکومین آزاد در عکس های گرفته شده با میکروسکوپ فلورسانس اینورت اثبات توانایی نانوسیستم ها در انتقال کورکومین از غشاء سلولی است (شکل 6).



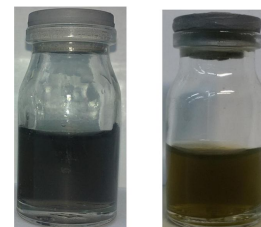
شکل 6 تصاویر میکروسکوپ نوری (چپ) و فلورسانس (راست) سلول های MCF7. (الف) کنترل، (ب) تیمار شده با کورکومین لود شده بر هیبرید گرافن اکساید-پلیمر، (ج) تیمار شده با کورکومین لود شده بر هیبرید گرافن اکساید کاهش یافته-پلیمر (د) کورکومین آزاد به مدت 4 ساعت.



(الف)



(ب)



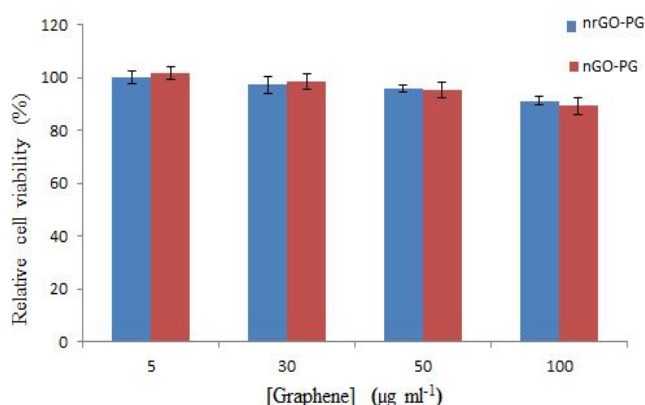
(ج)

شکل 5 الف) طیف جذبی هیبریدهای گرافن اکساید-پلی-گلیسرول، گرافن اکساید کاهش یافته-پلی-گلیسرول، گرافن اکساید-پلی-گلیسرول-کورکومین، گرافن اکساید کاهش یافته-پلی-گلیسرول و کورکومین آزاد در اتانول، ب) طیف فلورسانس محلول اتانولی کورکومین و دیسپرسیون آبی کورکومین لود شده بر روی هیبرید گرافن اکساید کاهش یافته-پلی-گلیسرول با غلظت یکسان از کورکومین. طول موج تحریک کورکومین 430 nm بود، ج) تصویر هیبرید حامل گرافن اکساید کاهش یافته-پلی-گلیسرول (سمت چپ) و هیبرید دارویی کورکومین

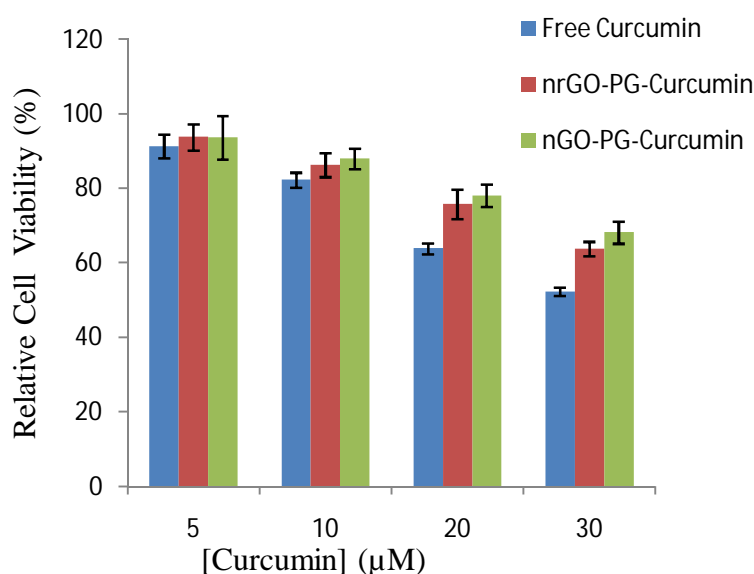
نتایج نشان داد که ظرفیت لودینگ هیبرید گرافن اکساید کاهش یافته-پلی-گلیسرول (در حدود 49%) بیشتر از گرافن اکساید-پلی-گلیسرول (در حدود 15%) است که به دلیل بازیافت سیستم کونژوگه π ودومین های گرافنی

دارویی دیده شد (شکل 7-ب). نتایج نشان داد که سمیت نانو هیبریدهای دارویی قابل مقایسه با داروی آزاد در غلظت یکسان کورکومین می‌باشد. مقدار اندکی کمتر سمیت نانو هیبریدهای دارویی نسبت به کورکومین آزاد بخصوص در غلظت‌های بالاتر می‌تواند به علت سرعت کم رهایش دارو از هیبریدهای گرافنی در مقایسه با داروی آزاد باشد.

کارایی ضد سرطانی نانو هیبریدهای دارویی بر روی سلول‌های سرطان سینه انسانی MCF7 با آزمایش بقای سلولی به روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که حامل‌های هیبریدی بدون کورکومین سمیت قابل ملاحظه‌ای حتی تا غلظت $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ بعد از 48 ساعت انکوباسیون ندارند که نشانگر زیست‌سازگاری حامل‌های هیبریدی است (شکل 7-الف). کاهش بقای سلولی وابسته به غلظت برای تیمار با نانو هیبریدهای



(الف)



(ب)

شکل 7 بقای سلولی نسبی سلول‌های MCF7 (الف) پس از تیمار با غلظت‌های متفاوت از هیبریدهای حامل گرافن اکساید-پلی گلیسرول و گرافن اکساید کاهش یافته-پلی گلیسرول بمدت 48 ساعت، (ب) پس از تیمار با غلظت‌های متفاوت از کورکومین آزاد، هیبرید گرافن اکساید-پلی گلیسرول-کورکومین و هیبرید گرافن اکساید احیاء شده-پلی گلیسرول-کورکومین بمدت 48 ساعت.

- [11] Kalbacova, M., et al. (2010) Graphene substrates promote adherence of human osteoblasts and mesenchymal stromal cells. *Carbon*. 48, 4323-4329.
- [12] Bianco, A. (2013) Graphene: safe or toxic? The two faces of the medal. *Angewandte Chemie International Edition*. 52, 4986-4997.
- [13] Pinto, A.M., I.C. Gonçalves, and F.D. Magalhães. (2013) Graphene-based materials biocompatibility: a review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 111, 188-202.
- [14] Sanchez, V.C., et al. (2012) Biological Interactions of Graphene-Family Nanomaterials: An Interdisciplinary Review. *Chemical Research in Toxicology*. 25, 15-34.
- [15] Burger, K.N., et al. (2002) Nanocapsules: lipid-coated aggregates of cisplatin with high cytotoxicity. *Nature medicine*. 8, 81-84.
- [16] Seo, S.-B., et al. (2007) Novel multifunctional PHDCA/PEI nano-drug carriers for simultaneous magnetically targeted cancer therapy and diagnosis via magnetic resonance imaging. *Nanotechnology*. 18, 475105.
- [17] Wu, W., et al. (2005) Targeted delivery of amphotericin B to cells by using functionalized carbon nanotubes. *Angewandte Chemie International Edition*. 44, 6358-6362.
- [18] Park, S. and R.S. Ruoff. (2009) Chemical methods for the production of graphenes. *Nature nanotechnology*. 4, 217-224.
- [19] Sun, X., et al. (2008) Nano-graphene oxide for cellular imaging and drug delivery. *Nano research*. 1, 203-212.
- [20] Zhou, H., C.S. Beevers, and S. Huang. (2011) Targets of curcumin. *Current drug targets*. 12, 332.
- [21] López-Lázaro, M. (2008) (Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: considerations for its clinical development as a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent. *Molecular nutrition & food research*. 52, S103-S127.
- [22] Yallapu, M.M., M. Jaggi, and S.C. Chauhan. (2012) Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer. *Drug discovery today*. 17, 71-80.
- [23] Liu, C.-W., et al. (2013) Graphene-Based Anticancer Nanosystem and Its Biosafety Evaluation Using a Zebrafish Model. *Biomacromolecules*. 14, 358-366.

با این حال با توجه به زیست دسترسی¹ اندک و سرعت متابولیسم بالایی کورکومین در داخل بدن، استفاده از نانوهیبرید حامل می تواند سبب افزایش پایداری دارو شود. همچنین با توجه به کارایی بارگذاری بسیار بالایی هیبرید گرافن اکساید کاهش یافته نسب به هیبرید گرافن اکساید، می توان در دوزهای پایین هیبرید دارویی به غلظت مؤثر دارو دستیافت و این مزیت استفاده از این هیبرید نسبت به هیبرید دارویی گرافن اکساید می باشد.

4- منابع

- [1] Novoselov, K.S., et al. (2004) Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science*. 306, 666-669.
- [2] Stankovich, S., et al. (2006) Graphene-based composite materials. *Nature*. 442, 282-286.
- [3] Liu, C., et al. (2010) Membraneless enzymatic biofuel cells based on graphene nanosheets. *Biosensors and Bioelectronics*. 25, 1829-1833.
- [4] Qu, L., et al. (2010) Nitrogen-doped graphene as efficient metal-free electrocatalyst for oxygen reduction in fuel cells. *ACS nano*. 4, 1321-1326.
- [5] Lu, C.H., et al. (2009) A graphene platform for sensing biomolecules. *Angewandte Chemie*. 121, 4879-4881.
- [6] Liu, Z., et al. (2008) PEGylated nanographene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs. *Journal of the American Chemical Society*. 130, 10876-10877.
- [7] Zhang, L., et al. (2011) Enhanced Chemotherapy Efficacy by Sequential Delivery of siRNA and Anticancer Drugs Using PEI-Grafted Graphene Oxide. *Small*. 7, 460-464.
- [8] Jung, J.H., et al. (2010) A Graphene Oxide Based Immuno-biosensor for Pathogen Detection. *Angewandte Chemie International Edition*. 49, 5708-5711.
- [9] Zhang, L., et al. (2010) Functional Graphene Oxide as a Nanocarrier for Controlled Loading and Targeted Delivery of Mixed Anticancer Drugs. *Small*. 6, 537-544.
- [10] Hu, W., et al. (2010) Graphene-based antibacterial paper. *ACS nano*. 4, 4317-4323.

¹ Bioavailability

- 72, 248-254.
- [28] Stankovich, S., et al. (2007) Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide. *Carbon*. 45, 1558-1565.
- [29] Li, D., et al. (2008) Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets. *Nature Nanotechnology*. 3, 101-105.
- [30] Calderón, M., et al. (2010) Dendritic polyglycerols for biomedical applications. *Advanced Materials*. 22, 190-218.
- [31] Kim, J., et al. (2009) Visualizing graphene based sheets by fluorescence quenching microscopy. *Journal of the American Chemical Society*. 132, 260-267.
- [24] Some, S., et al. (2014) Cancer therapy using ultrahigh hydrophobic drug-loaded graphene derivatives. *Scientific reports*. 4.
- [25] Movahedi, S., et al. (2013) Edge-functionalization of graphene by polyglycerol; A way to change its flat topology. *Polymer*. 54, 2917-2925.
- [26] Robinson, J.T., et al. (2008) Reduced graphene oxide molecular sensors. *Nano Letters*. 8, 3137-3140.
- [27] Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*.