

اثر کربن نیتريد گرافیتی بر بقای رده سلول سرطانی Saos-2

مریم قاسمی کاسمان^{1*}، پریسا خاکپور²، شهرام قاسمی³، رقیه پورباقر⁴

- 1- استادیار، گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
- 2- دکترای عمومی داروسازی، دانشکده داروسازی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آیت الله آملی، آمل، ایران
- 3- دانشیار، گروه شیمی کاربردی، دانشکده شیمی، دانشگاه مازندران، بابل، ایران
- 4- کارشناس، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

*نویسنده مسئول: m.ghaseemi@mubabol.ac.ir

پذیرش: 1400/2/7

دریافت: 1399/11/11

چکیده:

سابقه و هدف: در سال‌های اخیر، نانو مواد دو بعدی در حوزه ی زیست پزشکی به میزان گسترده‌ای استفاده می‌شوند. کربن نیتريد گرافیتی به واسطه زیست سازگاری خوب و در عین حال سمیت اندک، در زمینه تصویربرداری زیستی، تشخیص و درمان سرطان اهمیت پیدا کرده است. هدف از انجام این طرح، بررسی اثر کربن نیتريد گرافیتی بر بقای رده سلول سرطانی Saos-2 می‌باشد.

روش‌ها: کربن نیتريد گرافیتی از طریق افزودن ملامین به هیدروکلرید اسید سنتز شد و با استفاده از تست‌های FT-IR، XRD و اسپکتروسکوپی رامان جهت بررسی ساختار و خواص فیزیکوشیمیایی مورد ارزیابی قرار گرفت. کربن نیتريد گرافیتی سنتز شده (50,100,200,400 و 800 میکروگرم/میلی لیتر) بر روی سلول‌های Saos-2 و فیروبلاست در دو بازه زمانی 48 و 72 اضافه شد. درصد بقای سلول‌ها با استفاده از MTT مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: تست‌های FTIR و XRD، ساختار و پیوندهای ترکیب سنتز شده، صحت و خلوص مناسب آن را نشان دادند. نتایج حاصل از طیف سنجی رامان نیز گرافیتی بودن محصول تولید شده را نشان داد. پس از گذشت 48 ساعت از مواجهه سلول‌ها با کربن نیتريد گرافیتی سنتز شده، میزان بقای سلولی در گروهی که دریافت کننده 800 میلی گرم/میلی لیتر بود نسبت به گروه کنترل (درمان نشده) تا 80 درصد کاهش پیدا کرد.

نتیجه‌گیری: ترکیب سنتز شده در این مطالعه ممکن است به عنوان گزینه‌ای مناسب در تحقیقات مربوط به سرطان در نظر گرفته شود.

کلید واژگان: کربن نیتريد گرافیتی، سرطان، رده سلولی Saos-2، بقای سلولی

مقدمه

درمان سرطان، توجه زیادی را در سال‌های اخیر به خود جلب کرده است. فناوری نانو رویکردی منحصر به فرد و تکنولوژی گسترده را جهت تشخیص اولیه، پیشگویی و ممانعت و تجویز درمان‌های مناسب در سرطان را فراهم کرده است (3-5).

به دنبال معرفی گرافن و موفقیت آن، نانو مواد دو بعدی به عنوان مواد مشابه گرافن مورد توجه قرار گرفتند. در سال‌های اخیر، نانو مواد دو بعدی بسیاری از جمله کربن نیتريد گرافیتی کشف شدند. این نانو مواد دو بعدی دارای کاربردهای زیادی در حوزه پزشکی مانند حسگرهای زیستی، تصویر برداری زیستی، تحویل دارو، انتقال ژن یا ژن درمانی و درمان سرطان می باشند (6-8).

کربن نیتريد گرافیتی، نوعی ترکیب پلیمری نیمه هادی متشکل از واحد های متراکم s-triazine یا tri-s-triazine است و به تازگی به واسطه خواص برجسته‌ای مانند زیست سازگاری بسیار خوب، سمیت اندک و عملکرد کوانتومی بالا، در کاربرد های زیست-پزشکی مورد استفاده قرار گرفته است (9-11). از مزایای دیگر کربن نیتريد گرافیتی می‌توان به امکان سنتز آن به روش تراکم حرارتی از پیش سازهای کاملاً معمولی و غنی از نیتروژن، مانند ملامین و اوره اشاره کرد. همچنین $g-C_3N_4$ از پایداری بالایی در برابر اکسیداسیون، رطوبت و محلول‌های اسیدی و بازی برخوردار است و همین موضوع، کربن نیتريد گرافیتی را قادر می‌سازد تا در محیط‌های مختلف به راحتی عمل کند. از طرف دیگر، با توجه به نسبت سطح به حجم بالای $g-C_3N_4$ ، این مواد ظرفیت بارگیری دارویی بسیار بالایی دارند (12-15).

با وجود ویژگی‌های مطلوب کربن نیتريد گرافیتی، مطالعات سم‌شناسی در مورد این ترکیب، در مراحل

استئوسارکوم بدخیمی با توانایی متاستاز در بافت مزانشیمی، که وظیفه ساخت استخوان را بر عهده دارد، می‌باشد. این بیماری ششمین مورد بدخیمی در کودکان و سومین مورد در نوجوانان و جوانان است. اوج بروز این بیماری در دهه دوم و همزمان با جهش رشد در نوجوانان گزارش شده است و در نتیجه بیشتر در بخش‌هایی که سرعت رشد بالاتری دارند، مانند استخوان ران، درشت نی و نازک نی مشاهده می‌شود. اتیولوژی استئوسارکوما ناشناخته است و در برخی جوامع مانند آفریقایی-کارائیب شیوع بیشتری دارد. همچنین در افراد تحت درمان با اشعه یونیزان و عوامل شیمی درمانی نیز مشاهده می شود (1).

در حال حاضر دوکسوروبیسیسین، سیس پلاتین و متوتروکسات با دوز بالا خط اول شیمی درمانی هستند و بیماران حتی با بهترین مراقبت‌های حمایتی موجود نیز این روش درمانی را سخت می‌دانند و عوارض جانبی شدیدی مانند حالت تهوع، کاهش اشتها، التهاب مخاط و سرکوب مغز استخوان برای بسیاری از بیماران به وجود می‌آورد. به‌طور بالقوه‌ای این رژیم سمیت بالایی برای دستگاه و اندام‌های مختلف دارد و ممکن است به قلب، کلیه‌ها، شنوایی و باروری فرد آسیب برساند. در نتیجه بیمارانی که از این روش درمانی استفاده کرده‌اند باید برای پیگیری دائماً به کلینیک انکولوژی، جهت بررسی اثرات دیررس شیمی درمانی، مراجعه کنند (2).

اگرچه تلاش‌های زیادی در زمینه درمان سرطان‌ها انجام شده است، میزان حیات 5 ساله بیماران سرطانی همچنان پایین است و در نتیجه نیاز فوری به توسعه و تولید روش‌های منطقی و کارآمد با هدف تصویربرداری و ترانوستیک وجود دارد. استفاده از فناوری نانو در

مادون قرمز (FTIR) توسط دستگاه مدل (Thermo AVATAR، آمریکا) در شرکت دانش بنیان بیم گستر تابان (تهران، ایران) مورد ارزیابی قرار گرفت.

رده سلولی مورد استفاده و شرایط کشت سلول

در این مطالعه، از رده سلولی Saos-2 (رده سلولی سرطان استخوان انسان) و فیبروبلاست به عنوان سلول سالم که از طرف مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی (دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل) اهدا شد؛ استفاده شد. سلول ها در محیط کشت DMEM همراه با FBS 10 درصد کشت داده شدند و پس از انجام سه بار پاساژ، برای آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی میزان بقای سلولی با استفاده از روش MTT محلول MTT با استفاده از انحلال 5 گرم پودر زرد رنگ 2,5-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-گ diphenyltetrazolium bromid (MTT) در 100 میلی لیتر محیط کشت DMSO و 10% PBS به عنوان محلول استوک (با غلظت نهایی 5 میلی گرم/میلی لیتر) تهیه شد. کرایوتیوب از غلظت های مختلف کربن نیتريد 50-100-200-400 و 800 میکروگرم بر میلی لیتر تهیه شد. به هر چاهک پلیت 96 خانه ای، 50 میکرولیتر از محیط کشت حاوی سلول های Saos-2 و فیبروبلاست اضافه شد (برای هر غلظت از کربن نیتريد 3 چاهک در نظر گرفته شد). پلیت های 96 خانه ای حاوی سلول ها به مدت 72 ساعت در انکوباتور با 5 درصد CO₂، دمای 37 درجه سانتی گراد و 95 درصد رطوبت قرار گرفت تا سلول ها به مرحله رشد لگاریتمی برسند و طی زمان انکوباسیون، سلول ها به طور مرتب مورد بررسی قرار گرفت تا از رشد و نبود آلودگی آنها

اول قرار دارد (15, 16). اگرچه مطالعات بسیار محدودی در مورد ارزیابی سمیت سلولی این ترکیب وجود دارد و برخی از مطالعات نشان دهنده سازگاری زیستی بسیار بالای سلول ها با این ترکیب حتی در غلظت های زیاد می باشند (17-19).

تاکنون مطالعه ای در مورد اثر کربن نیتريد گرافیتی بر بقای رده Saos-2 انجام نپذیرفته است؛ بنابراین در این مطالعه برآنیم تا پس از سنتز و تعیین ویژگی های کربن نیتريد گرافیتی، اثر آن بر میزان بقای سلول های رده ی سرطانی Saos-2 را مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش ها

تهیه ی کربن نیتريد گرافیتی

ملامین هیدروکلراید با افزودن ملامین به هیدروکلریک اسید سنتز گردید. در این روش، 10 گرم ملامین در آب مقطر داغ حل شد. سپس، 5 میلی لیتر هیدروکلریک اسید (37%) حین هم زدن با همزن مغناطیسی به محلول ملامین خنک شده، اضافه شد و محلول آماده شده به منظور تبخیر کامل آب و سنتز ملامین هیدروکلراید، به کوره به مدت 12 ساعت در دمای 80 درجه سانتی گراد انتقال داده شد. g-C₃N₄ نیز از طریق چگالش گرمایی ملامین هیدروکلراید به دست آمد به این صورت که ملامین هیدروکلراید در ظرف در بسته (بوتله) پوشیده شده با آلومینا قرار گرفته و تا دمای 500-550 یا 600 درجه سانتی گراد به مدت 4 ساعت حرارت داده شد (20).

ویژگی های کلی و مشخصات ظاهری و سطحی ترکیب ساخته شده، به وسیله پراش اشعه ایکس (XRD) توسط مدل دستگاه (PHILIPS) PW1730، هلند، طیف سنجی رامان توسط مدل دستگاه TakRam (Teksan)N1-541، ایران) و طیف سنجی تبدیل فوریه

آنالیز آماری

نتایج آزمایش با استفاده از تست آماری آنالیز واریانس یک طرفه و پس آزمون بونفرونی¹ مورد آنالیز قرار گرفت. داده ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ نشان داده شد و مقادیر p کمتر از 0/05 از لحاظ آماری، معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

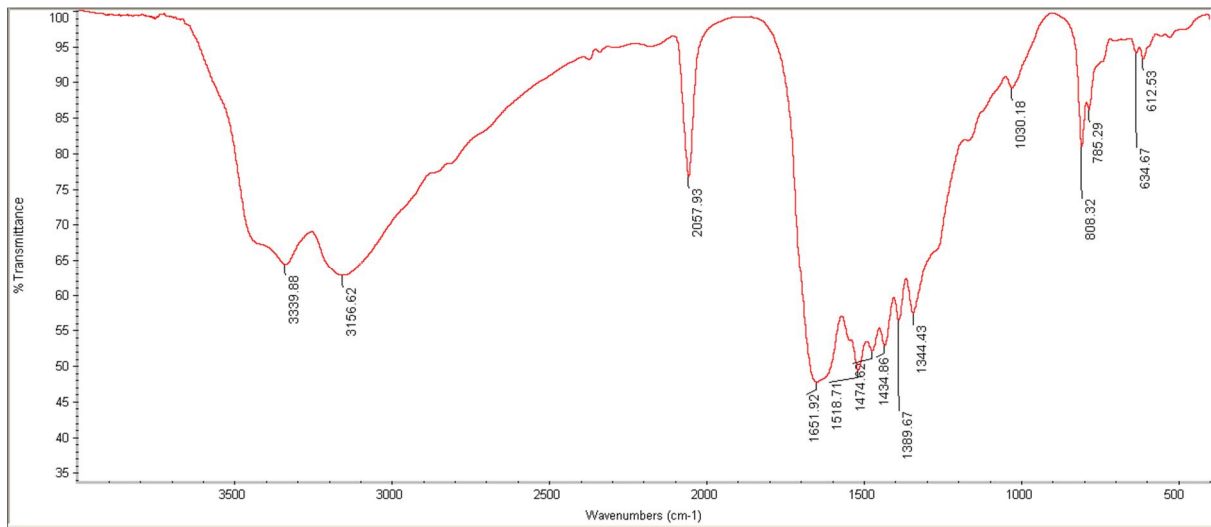
کربن نیتريد گرافیتی تهیه شده برای تعیین ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی‌های مبتنی بر FTIR

نمودار زیر نمایان گر طیف FTIR کربن نیتريد گرافیتی سنتز شده در بازه $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ است. قله ایجاد شده در $808/32 \text{ cm}^{-1}$ را می‌توان به حلقه تری آزین نسبت داد. قله‌های موجود در $1344/43 \text{ cm}^{-1}$ ، $1389/67$ ، $1434/86$ و $1474/62$ نشان دهنده پیوندهای C-N و پیک‌های ثبت شده در $1518/71$ و $1651/92$ نیز پیوندهای C=N را نشان می‌دهند. همچنین پیک‌های ایجاد شده در $3156/62 \text{ cm}^{-1}$ و $3339/88$ را نیز می‌توان به گروه‌های NH_2 یا NH نسبت داد (شکل 1).

اطمینان حاصل شود. پس از اتمام انکوباسیون، 50 میکرولیتر از هر کدام از غلظت‌های تهیه شده کربن نیتريد گرافیتی به 3 چاهک مشخص و نام گذاری شده افزوده شد و 3 چاهک نیز به عنوان نمونه های شاهد، بدون کربن نیتريد گرافیتی باقی گذاشته شد. پس از افزودن غلظت‌های مورد نظر، پلیت 96 خانه ای برای 48 و 72 ساعت دیگر در انکوباتور قرار داده شد تا سلول‌ها به مدت کافی در تماس با کربن نیتريد گرافیتی قرار گیرند. پس از 48 یا 72 ساعت، پلیت‌ها را از انکوباتور خارج نموده و محیط کشت و کربن نیتريد گرافیتی با استفاده از پیپت از چاهک‌ها خارج شد و سلول‌ها 3 مرتبه و هر بار با نیم سی سی فسفات بافر سالین استریل شستشو داده شد. به هر چاهک 45 میکرولیتر رنگ MTT افزوده شد و پلیت‌ها به مدت 2 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس به منظور حل کردن کریستال‌های فرومازان، محتوای محیط کشت و کربن نیتريد گرافیتی چاهک‌ها را به دقت تخلیه کرده است و با 50 میکرولیتر DMSO جایگزین شدند. پس از 15 دقیقه میزان جذب نوری هر چاهک با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 570 نانومتر اندازه گیری شد. میزان رنگ تولید شده با تعداد سلول‌هایی که از نظر متابولیکی فعال هستند؛ رابطه مستقیم دارد. هر کدام از آزمایشات سه بار تکرار گردید و میزان بقای سلولی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{تست} = \text{درصد بقای سلول} \times 100 \text{ (جذب نوری کنترل (سلول سالم) / جذب نوری}$$

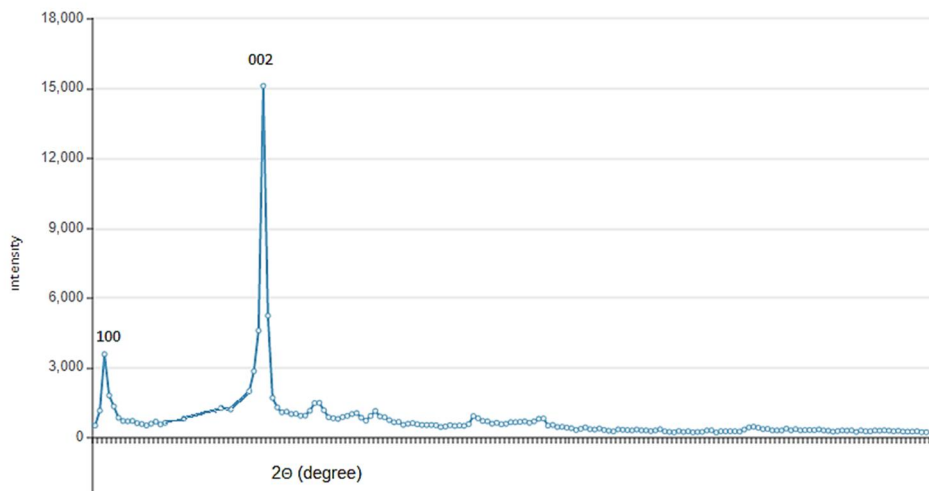


شکل 1- طيف FTIR کربن نیتريد گرافيتي سنتز شده.

است که پراش شاخص اين ترکيب است. قله ي کوچک تر در زاويه ي $11/05^\circ$ مربوط به صفحه ي 100 شبکه ي $g-C_3N_4$ و ساختارهاي هپتازين است. عدم وجود قله هاي متعدد و بزرگ ديگر در اين الگوي پراش نشان دهنده خلوص ترکيب سنتز شده مي باشد (شکل 2).

بررسی های مبتنی بر XRD

پراش اشعه ایکس روشی مخرب و قدرتمند برای تعیین ساختار فاز و ترکيب فاز مواد است. به منظور بررسی ساختار و ترکيب کربن نیتريد گرافيتي سنتز شده است، الگوي XRD در ناحیه ي 2θ از 100° تا 0° ثبت شدند. نمودار زیر الگوي XRD را نشان می دهد. پراش در زاويه ي $28/05^\circ$ مربوط به صفحه ي 002

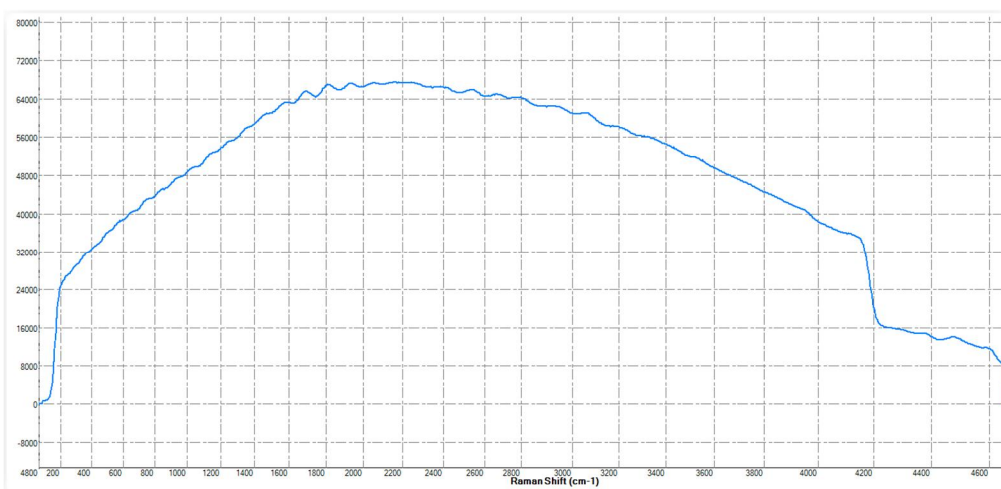


شکل 2- نمودار XRD کربن نیتريد گرافيتي سنتز شده.

بررسی‌های مبتنی بر طیف سنجی رامان

شکل زیر طیف سنجی رامان کربن نیتريد گرافیتی سنتز شده را نشان می‌دهد. این تکنیک روشی مناسب برای تشخیص مواد کربنی و شناسایی ساختار مولکولی آنها می‌باشد. طیف سنجی رامان اطلاعاتی در زمینه خلوص، وجود نواقص و جهت گیری و نظم ترکیب مورد نظر به ما می‌دهد. همان طور که در شکل زیر دیده می‌شود، یک باند ارتعاشی گسترده از محدوده 200 تا 4200 cm^{-1}

وجود دارد که نشان دهنده واحدهای تری آزین در کربن نیتريد گرافیتی سنتز شده است. قله‌های مربوط به G و D ممکن است در این باند گسترده قرار گرفته باشند. برای مثال پیک کشیده شده از $1500-1800 \text{ cm}^{-1}$ که باند G را تشکیل می‌دهد، معیار خوبی برای تعیین میزان گرافیتی بودن نمونه است و پیوندهای sp^2 موجود در ترکیب را به ما نشان می‌دهد (شکل 3).



شکل 3 - نمودار طیف سنجی رامان $\text{g-C}_3\text{N}_4$ سنتز شده.

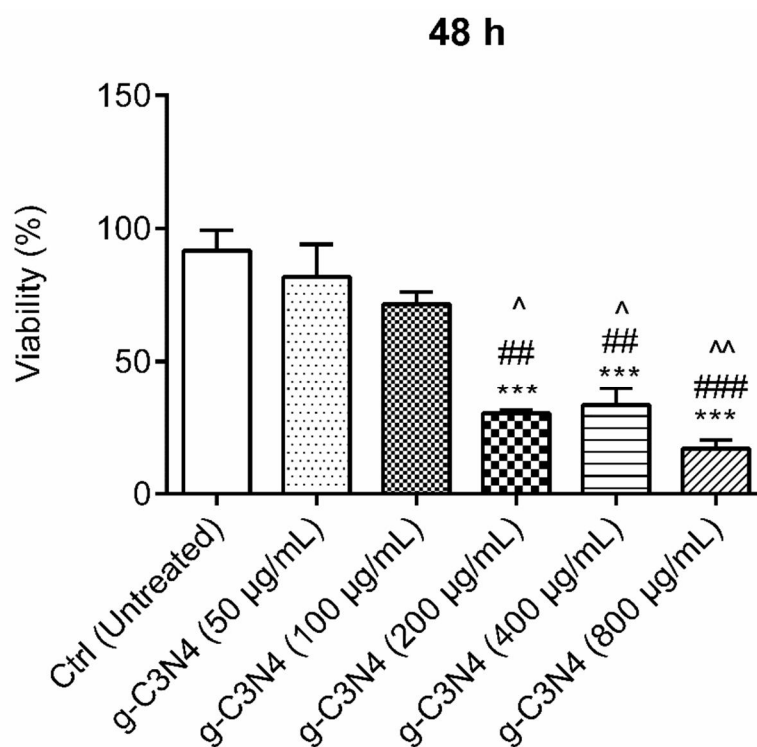
بررسی اثرات سایتوتوکسیک کربن نیتريد گرافیتی (g- C_3N_4) سنتز شده

داده‌های حاصل از بررسی میزان بقای سلول‌های رده Saos-2 در مقایسه با سلول‌های نرمال فیروبلاست در 48 و 72 ساعت، با نرم افزار آماری گراف پد پریزم² مورد آنالیز قرار گرفت و نتایج با استفاده از تست آماری آنالیز واریانس دو طرفه و پس آزمون توکی مورد بررسی قرار گرفتند.

همان طور که در نمودار مشاهده می‌شود، میزان زنده ماندن سلول‌های Saos-2 پس از گذشت 48 ساعت از دریافت کربن نیتريد گرافیتی در غلظت‌های 200 ($P =$

0.0006)، 400 ($P = 0.0009$) و 800 میکروگرم/میلی لیتر ($P < 0.0001$) نسبت به گروه کنترل (درمان نشده)، کاهش معناداری را نشان داد. از طرفی در بین گروه‌های 200 ($P = 0.0028$)، 400 ($P = 0.0047$) و 800 ($P = 0.0003$) میکروگرم/میلی لیتر نسبت به گروهی که در معرض 50 میکروگرم/میلی لیتر از کربن نیتريد گرافیتی قرار گرفته بودند نیز می‌توان تفاوت معناداری را مشاهده کرد. علاوه بر این، درصد بقای سلولی در سلول‌هایی که با غلظت‌های 200 ($P = 0.0028$)، 400 ($P = 0.0294$) و 800 ($P = 0.0017$) میکروگرم/میلی لیتر انکوبه شده بودند، نسبت به غلظت 100 میکروگرم/میلی لیتر به صورت معنی داری کاهش پیدا کرد (شکل 4).

2. GraphPad Prism

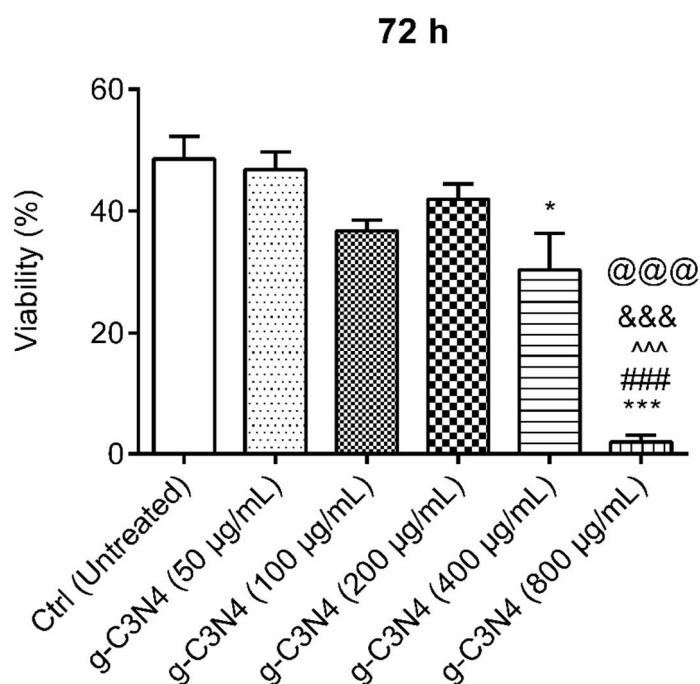


شکل 4- نمودار درصد زنده ماندن سلول‌های رده Saos-2 چهل و هشت ساعت پس از مواجهه با غلظت‌های مختلف کربن نیتريد گرافیتی. $P < 0.001$ در مقایسه با گروه کنترل (درمان نشده)؛ $P < 0.01$ و $P < 0.001$ در مقایسه با غلظت 50 میکروگرم/میلی لیتر کربن نیتريد گرافیتی؛ $P < 0.05$ و $P < 0.01$ در مقایسه با غلظت 100 میکروگرم/میلی لیتر کربن نیتريد گرافیتی.

علاوه بر این، پس از گذشت 72 ساعت از مواجهه با کربن نیتريد گرافیتی درصد زنده ماندن سلول‌های رده Saos-2 نیز کاهش پیدا کرد. درصد بقای سلولی در سلول‌های رده Saos-2 که با غلظت 400 میکروگرم/میلی لیتر از کربن نیتريد گرافیتی انکوبه شدند؛ به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل کاهش یافت ($P=0.0363$). میزان بقای سلولی در سلول‌های رده

Saos-2 که با غلظت بالای کربن نیتريد گرافیتی (800 میکروگرم/میلی لیتر) انکوبه شدند به صورت معنی داری نسبت به گروه درمان نشده (کنترل) ($P < 0.0001$)، غلظت‌های 50 ($P < 0.0001$)، 100 ($P = 0.0001$)، 200 ($P < 0.0001$) و 400 ($P = 0.0010$) میکروگرم/میلی لیتر کربن نیتريد گرافیتی، کاهش یافت (شکل 5).

7



شکل 5- نمودار درصد زنده ماندن سلول‌های رده Saos-2 هفتاد و دو ساعت پس از مواجهه با غلظت‌های مختلف کربن نیتريد گرافیتی. $P < 0.05$ * در مقایسه با گروه کنترل؛ $P < 0.001$ ### در مقایسه با غلظت 50 میکروگرم/میلی لیتر کربن نیتريد گرافیتی؛ $P < 0.001$ ^^ در مقایسه با غلظت 100 میکروگرم/میلی لیتر کربن نیتريد گرافیتی؛ $P < 0.001$ ^^& در مقایسه با غلظت 200 میکروگرم/میلی لیتر کربن نیتريد گرافیتی، $P < 0.001$ ^^& در مقایسه با غلظت 400 میکروگرم/میلی لیتر کربن نیتريد گرافیتی و $P < 0.001$ @@@ در مقایسه با غلظت 800 میکروگرم/میلی لیتر کربن نیتريد گرافیتی.

بحث و نتیجه‌گیری

به تازگی در درمان سرطان‌ها، توجه ویژه‌ای به نانو مواد به خصوص نانو مواد کربنی شده است. نانو مواد کربنی به دلیل خواص منحصر به فرد خود که به شدت به اندازه و شکل و پارامترهای دیگر بستگی دارد، کاربردهای مختلفی از جمله الکتروشیمیایی، سلول‌های خورشیدی، پیل‌های سوختی و مصارف دارویی و پزشکی دارند (21). نانو مواد کربنی از جمله نانولوله‌ها، گرافن، نانوشیت‌ها، کوانتوم دات‌ها و کربن نیتريد گرافیتی از مواد کربنی با ساختار sp² در ابعاد بسیار کوچک (نانو) هستند. طی چند سال اخیر، کربن نیتريد گرافیتی به طور گسترده به عنوان یک فتوکاتالیست بدون فلز و کارآمد که به طور مداوم قابلیت جذب نور مرئی و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن را دارد؛ مورد بررسی قرار گرفته است. رادیکال‌های آزاد

نقش حیاتی در فیزیولوژی و پاتولوژی ایفا می‌کنند و از طریق واکنش‌های اکسیداتیو سبب تخریب سلول و سرعت بخشی به فرایند آپوپتوز می‌شوند. نانوشیت‌های کربن نیتريد گرافیتی تحت تابش نور با شدت کم (20 میلی وات بر سانتی مترمربع) می‌توانند به طور مؤثری از طریق تولید رادیکال آزاد اکسیژن (ROS)، سلول‌های سرطانی را از بین ببرند. بازده اثر فوتوکاتالیستی کربن نیتريد گرافیتی به مقدار رادیکال آزاد اکسیژن ساخته شده که به طور مستقیم توانایی از بین بردن سلول‌های سرطانی را دارد، بستگی دارد (12-15). به طور قابل توجهی، ساختار الکترونیک کربن نیتريد گرافیتی که به وسیله واحدهای تریازین شکل می‌گیرد؛ می‌تواند به عنوان یک حس کننده نوری بالقوه جهت تولید ROS برای اهداف فتودینامیک تراپی مورد استفاده قرار گیرد (22, 23).

ی نوری، می‌تواند به طور مؤثری در درمان فتودینامیکی مورد استفاده قرار گیرد (25). طی مطالعه‌ای در سال 2020 داوردوست منش و همکارانش، از کربن نیتريد گرافيتي تهیه شده به روش الکتروفورز با توزیع اندازه یک نواخت به‌عنوان عامل ضد سرطان در برابر سرطان استخوان استفاده کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که در صورت نبود وجود منبع نور خارجی، صفحات نانوی تهیه شده در مقایسه با فرم بالک کربن نیتريد گرافيتي به طور قابل توجهی از خود سمیت بیشتری نشان می‌دهند. در مطالعه ذکر شده، سلول‌های Saos-2 به مدت 24 و 48 ساعت، در معرض غلظت‌های مختلف کربن نیتريد گرافيتي (12/5، 25، 50، 100 و 200 میکروگرم/میلی لیتر) قرار گرفتند. با توجه به نتایج حاصل از آزمون MTT، کاهش 50 درصدی بقای سلولی در غلظت به‌طور تقریبی 25 میکروگرم/میلی لیتر کربن نیتريد گرافيتي پس از 48 ساعت مواجهه با این ترکیب به‌وجود آمد (21).

چو⁴ و همکارانش در سال 2017 به کاوش در زمینه درمان فتودینامیک با استفاده از امواج مایکروویو به وسیله کوانتوم دات‌های کربن نیتريد گرافيتي پرداختند. برای اولین بار در این مطالعه مشاهده شد که اکسیژن برانگیخته ای که توسط کربن نیتريد گرافيتي تحریک شده با امواج مایکروویو تولید می‌شود؛ می‌تواند به‌طور مؤثری سلول‌های سرطانی را از بین ببرد (15).

هم راستا با مطالعات ذکر شده در توضیحات فوق، در این پروژه نیز نشان داده شد که کربن نیتريد گرافيتي بدون نیاز به حامل‌های دیگر یا بارگذاری دارو و عوامل حساس‌کننده ی نوری، می‌تواند باعث کاهش درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی شود. مشاهده شد که در طی 48 ساعت غلظت‌های 200، 400 و 800 میکروگرم/میلی لیتر کربن نیتريد گرافيتي سنتز شده توانست به خوبی و به طور معنادار و در برخی موارد بیش از 50 درصد، سبب

هئو³ و همکارانش در سال 2018، مطالعه ای بر مبنای تصویر برداری و درمان سرطان به وسیله نور مرئی و با استفاده از نانوذرات کربن نیتريد گرافيتي انجام دادند. نانوذرات کربن نیتريد گرافيتي به راحتی به سلول‌های سرطانی نفوذ کرده و به طور مؤثری با ایجاد رادیکال آزاد اکسیژن، توانست سلول‌های سرطانی رده HeLa و cos-7 را به صورت انتخابی از بین ببرد. پژوهش جالب توجه این بود که با تغییر شدت نور مرئی، کربن نیتريد گرافيتي آسیب بیشتری را به سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های سالم حتی در غلظت‌های پایین ایجاد می‌کرد (14). Ju و همکارانش در سال 2016، با بهره‌گیری از اثر هم‌افزایی مس (II) و کربن نیتريد گرافيتي برای بهبود تولید ROS برای درمان فتودینامیکی استفاده کردند. با توجه به این که گلوکاتایون سبب کاهش مقدار ROS تولید شده پیش از رسیدن به محل مورد نظر می‌گردید؛ ادغام نانوصفات مس (II) با کربن نیتريد گرافيتي منجر به افزایش تولید رادیکال آزاد اکسیژن و همچنین کاهش سطح گلوکاتایون داخل سلولی و در نتیجه افزایش بازده درمان سرطان شد (24).

حدیثه طاهری و همکارانش در سال 2020، از کربن نیتريد گرافيتي به‌عنوان ماده‌ای دو بعدی مؤثر و بی‌خطر در درمان فتودینامیکی در آزمایشات برون تنی و درون تنی استفاده کردند. در این مطالعه، سلول‌ها پس از 4 ساعت قرارگیری در معرض غلظت‌های مختلف کربن نیتريد گرافيتي (0، 100، 200 و 400 میکروگرم/میلی لیتر) در مواجهه با نور به طول موج 450 نانومتر در دوره های 0/5، 1 و 2 ساعته قرار گرفتند و کاهش 50 درصدی بقای سلولی در غلظت 200 میکروگرم/میلی لیتر پس از یک ساعت قرارگیری در برابر نور، مشاهده شد. در نهایت نشان داده شد که تحریک نوری کربن نیتريد گرافيتي حتی بدون استفاده از حامل‌های دیگر یا عوامل حساس‌کننده

4. Chu

3. Heo

5. Heath JR, Davis ME. Nanotechnology and Cancer. Annual Review of Medicine. 2008;59(1):251-65.
6. Kim J-H, Benelmekki M. Chapter 4 - Two-dimensional nanostructures for biomedical applications. In: Benelmekki M, Erbe A, editors. Frontiers of Nanoscience. 14: Elsevier; 2019. p. 103-20.
7. Chen Y, Tan C, Zhang H, Wang L. Two-dimensional graphene analogues for biomedical applications. Chemical Society Reviews. 2015;44(9):2681-701.
8. Chimene D, Alge DL, Gaharwar AK. Two-Dimensional Nanomaterials for Biomedical Applications: Emerging Trends and Future Prospects. Advanced Materials. 2015;27(45):7261-84.
9. Liao G, He F, Li Q, Zhong L, Zhao R, Che H, et al. Emerging graphitic carbon nitride-based materials for biomedical applications. Progress in Materials Science. 2020;112:100666.
10. Lin T, Zhong L, Wang J, Guo L, Wu H, Guo Q, et al. Graphite-like carbon nitrides as peroxidase mimetics and their applications to glucose detection. Biosensors and Bioelectronics. 2014;59:89-93.
11. Zhang L, Liu C, Wang Q, Wang X, Wang S. Electrochemical sensor based on an electrode modified with porous graphitic carbon nitride nanosheets (C(3)N(4)) embedded in graphene oxide for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. Mikrochimica acta. 2020;187(2):149.
12. Dong Y, Wang Q, Wu H, Chen Y, Lu CH, Chi Y, et al. Graphitic carbon nitride materials: sensing, imaging and therapy. Small. 2016;12(39):5376-93.
13. Cao Q, Cui Q, Yang Y, Xu J, Han C, Lidong L. Graphitic carbon nitride as a distinct solid stabilizer for emulsion polymerization. Chemistry-A European Journal. 2018;24(9):2286-91.
14. Heo NS, Lee SU, Rethinasabapathy M, Lee EZ, Cho H-J, Oh SY, et al. Visible-light-driven dynamic cancer therapy and imaging using graphitic carbon nitride nanoparticles. Materials Science and Engineering: C. 2018;90:531-8.
15. Chu X, Li K, Guo H, Zheng H, Shuda S, Wang X, et al. Exploration of Graphitic-C3N4 Quantum Dots for Microwave-Induced Photodynamic Therapy. ACS Biomaterials Science & Engineering. 2017;3(8):1836-44.

کاهش درصد زنده ماندن سلول های سرطانی نسبت به گروه کنترل شود. به علاوه با بررسی نتایج حاصل از مواجهه 72 ساعته ی سلول ها با کربن نیتريد گرافیتی با اطلاعات به دست آمده از انکوباسیون 48 ساعته ی سلول ها با کربن نیتريد گرافیتی، نیز می توان کاهش چشمگیر درصد بقای سلولی را در گروه دریافت کننده غلظت 800 میکروگرم/میلی لیتر و پس از آن در غلظت 400 میکروگرم/میلی لیتر را مشاهده کرد.

با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق و کاهش معنا دار درصد زنده ماندن سلول های Saos در غلظت های 200، 400 و 800 میکروگرم/میلی لیتر نسبت به گروه کنترل، ممکن است از این ماده به عنوان ترکیبی جدید در تحقیقات مربوط به سرطان استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

با قدردانی و سپاس از کارشناسان محترم مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی که همکاری شایانی را در انجام این تحقیق به عهده داشتند.

تائیدیه اخلاقی: موردی بیان نشده است.

تعارض منافع: موردی بیان نشده است.

منابع

1. Clark JCM, Dass CR, Choong PFM. A review of clinical and molecular prognostic factors in osteosarcoma. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. 2008;134(3):281-97.
2. Lee V. Bone tumours in childhood and adolescence. Paediatrics and Child Health. 2018;28(4):164-8.
3. Nie S, Xing Y, Kim GJ, Simons JW. Nanotechnology Applications in Cancer. Annual Review of Biomedical Engineering. 2007;9(1):257-88.
4. Misra R, Acharya S, Sahoo SK. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. Drug Discovery Today. 2010;15(19):842-50.

- electrophoretic size fractionation as an anticancer agent against human bone carcinoma. *Materials Science and Engineering: C*. 2020;110803.
22. Lin L-S, Cong Z-X, Li J, Ke K-M, Guo S-S, Yang H-H, et al. Graphitic-phase C₃N₄ nanosheets as efficient photosensitizers and pH-responsive drug nanocarriers for cancer imaging and therapy. *Journal of Materials Chemistry B*. 2014;2(8):1031-7.
23. Ju E, Dong K, Chen Z, Liu Z, Liu C, Huang Y, et al. Copper(II)-Graphitic Carbon Nitride Triggered Synergy: Improved ROS Generation and Reduced Glutathione Levels for Enhanced Photodynamic Therapy. *Angewandte Chemie International Edition*. 2016;55(38):11467-71.
24. Ju E, Dong K, Chen Z, Liu Z, Liu C, Huang Y, et al. Copper (II)-graphitic carbon nitride triggered synergy: Improved ROS generation and reduced glutathione levels for enhanced photodynamic therapy. *Angewandte Chemie International Edition*. 2016;55(38):11467-71.
25. Taheri H, Unal MA, Sevim M, Gurcan C, Ekim O, Ceylan A, et al. Photocatalytically active graphitic carbon nitride as an effective and safe 2D material for in vitro and in vivo photodynamic therapy. *Small*. 2020;16(10):1904619.
16. Chung YJ, Lee BI, Ko JW, Park CB. Photoactive g-C₃N₄ Nanosheets for Light-Induced Suppression of Alzheimer's β -Amyloid Aggregation and Toxicity. *Advanced Healthcare Materials*. 2016;5(13):1560-5.
17. Li M, Guan Y, Chen Z, Gao N, Ren J, Dong K, et al. Platinum-coordinated graphitic carbon nitride nanosheet used for targeted inhibition of amyloid β -peptide aggregation. *Nano Research*. 2016;9(8):2411-23.
18. Rong M, Cai Z, Xie L, Lin C, Song X, Luo F, et al. Study on the Ultrahigh Quantum Yield of Fluorescent P,O-g-C₃N₄ Nanodots and its Application in Cell Imaging. *Chemistry – A European Journal*. 2016;22(27):9387-95.
19. Zhang X, Xie X, Wang H, Zhang J, Pan B, Xie Y. Enhanced Photoresponsive Ultrathin Graphitic-Phase C₃N₄ Nanosheets for Bioimaging. *Journal of the American Chemical Society*. 2013;135(1):18-21.
20. Jiang X, Li J, Fang J, Gao L, Cai W, Li X, et al. The photocatalytic performance of g-C₃N₄ from melamine hydrochloride for dyes degradation with peroxymonosulfate. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2017;336:54-62.
21. Davardoostmanesh M, Ahmadzadeh H, Goharshadi EK, Meshkini A, Sistanipour E. Graphitic carbon nitride nanosheets prepared by

The effect of graphitic carbon nitride on viability of Saos-2 cancer cell line

Maryam Ghasemi-Kasman^{1*}, Parisa Khakpour², Shahram Ghasemi³, Roghayeh Pourbagher⁴

1- Assistant Professor, Department of Physiology, School of Medical Sciences, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran)

2- Doctor of Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Islamic Azad University, Ayatollah Amoli Branch, Amol, Iran

3- Associate Professor, Department of Applied Chemistry, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

4- Expert, Cellular and Molecular Biology Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

*Corresponding author: m.ghasemi@mubabol.ac.ir

Received: 2021/1/30

Accepted: 2021/4/27

Abstract:

Background and objective: In recent years, two-dimensional nanomaterials are widely used in biomedical applications. Graphitic carbon nitride has been significant not only due to good biocompatibility but also because of its application in the bio-imaging, diagnosis, and treatment of cancer. The purpose of this study was to investigate the effect of graphitic carbon nitride on viability of Saos-2 cancer cell line.

Methods: Graphitic carbon nitride was synthesized by adding melamine to hydrochloride acid and its physicochemical properties and structure was evaluated using FTIR, XRD, and Raman spectroscopy. Synthesized graphitic carbon nitride (50, 100, 200, 400, and 800 µg/mL) was added on Saos-2 cells and fibroblasts in two periods of 48 and 72 hours. The survival rate of the cells was investigated by MTT.

Findings: The results of FT-IR and XRD tests showed the structure and bonds of the synthesized compound, its accuracy and purity, respectively. Raman spectroscopy results also showed the graphitic content of the synthesized product. After passing 48 hours of the exposure of the cells to synthesized graphitic carbon nitride, the level of cell survival in the group that received 800 µg/mL was decreased to nearly 80% compared to the control (untreated) group.

Conclusion: The synthesized compound in this study might be considered as an appropriate option in cancer related researches.

Keywords: Graphitic carbon nitride, Cancer, Saos-2, Cell survival