



Synthesis and characterization of Gelatin-functionalized Reduced Graphene Oxide for drug delivery application

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Fatemeh Sadat Mostafavi¹
Rana Imani^{*2}

1. Bachelor of Science, Biomedical Engineering Department, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran
2. Assistant Professor, Tissue Engineering Group, Biomedical Engineering Department, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Biomedical Engineering Department, Amirkabir University of Technology, NO 350, Hafex Street, Valiasr Square, Tehran, Iran. Tel: +98 (21) 64545676 Fax: +98 (21) 66468186
r.imani@aut.ac.ir

Article History

Received: January 31, 2020

Accepted: April 10, 2021

ePublished: March 6, 2021

ABSTRACT

Aims Using nanomaterials in cancer therapy has shown that this kind of treatment is more efficient with fewer side effects. A considerable number of nanomaterials that can be used in cancer therapy are introduced; among them, graphene attracts most of the scientist's attention due to its unique features. In this study, the graphene oxide (GO) was synthesized and reduced by gelatin for cellular delivery of an anticancer drug, curcumin.

Materials and Methods GO was synthesized by hummer method and reduced by gelatin. Curcumin anticancer drug was loaded on the synthesized nanocarriers via hydrophobic-hydrophobic interaction.

Findings Chemical, physical and biological assays have been done to evaluate the synthesis and surface modification. In the next step, the drug loading efficiency was obtained by the UV-Vis spectroscopy method.

Conclusion: GO is successfully synthesized, with the average size of 300nm. AFM pictures of GO before and after reduction show an increasing in thickness that proves the presence of gelatin on the surface. From the cytotoxicity assay on L292 cell line, it can be concluded that surface modification was effective because GO showed remarkable toxicity while gelatin-rGO did not show any toxicity even at concentration of 200 μgml^{-1} . Also, the drug loading efficiency is obtained at 78%. Therefore, the gelatin-rGO with excellent stability and biocompatibility can be suggested as a drug carrier applicable in biomedical studies.

Keywords: Graphene; Nanocarrier; Cancer; Drug delivery; Surface modification

ساخت و مشخصه یابی نانو حامل گرافن اکسید اصلاح شده با ژلاتین جهت کاربرد به عنوان حامل داروی ضدسرطان

فاطمه سادات مصطفوی

دانشکده مهندسی پزشکی، کارشناسی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر

رعنا ایمانی*

استادیار، گروه مهندسی بافت، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه

صنعتی امیرکبیر

چکیده

اهداف: استفاده از نانومواد در درمان سرطان سبب شده که فرآیند درمان به صورت کارآمدتر و با آثار جانبی کمتر صورت گیرد. در میان نانومواد که قابلیت استفاده در کاربردهای درمانی سرطان را دارند، گرافن به علت خواص منحصر به فرد، توجه دانشمندان را به خود جلب کرده است. در این پژوهش، ساخت یک نانوحامل بر پایه گرافن اکساید اصلاح شده با پلیمر زیست سازگار ژلاتین برای بارگذاری و انتقال دارو ضدسرطان کورکومین بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: گرافن اکساید با استفاده از روش هامر سنتز و سپس فرآیند کاهش آن در حضور ژلاتین انجام شد. داروی کورکومین، توسط پیوند هیدروفوب-هیدروفوب روی نانوحامل سنتز شده بارگذاری شد.

یافته‌ها: درستی فرآیند سنتز گرافن اکسید، کاهش آن و اتصال ژلاتین توسط ارزیابی‌های شیمیایی، فیزیکی و زیستی بررسی شد. درصد بارگذاری دارو با استفاده از نمودار استاندارد جذب-غلظت داروی کورکومین محاسبه و درصد زنده‌مانی سلول‌ها در حضور نانوذرات بررسی شد.

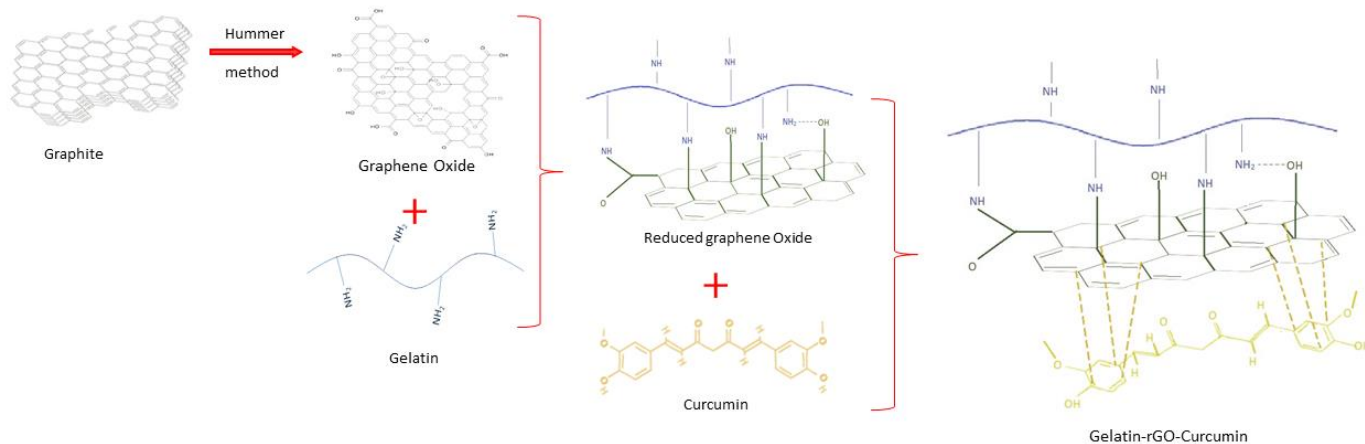
نتیجه‌گیری: نانوذرات گرافن اکساید با ابعاد ۳۰۰ نانومتر با موفقیت سنتز شد. افزایش ضخامت نانوذرات بعد از اصلاح با ژلاتین مشاهده شد، نشان از تثبیت زنجیره‌های ژلاتین روی سطح دارد. از تست سمیت که روی سلول‌های L292 انجام شد می‌توان نتیجه گرفت که اصلاح سطح موفق بوده به طوری که نمونه اصلاح شده با ژلاتین حتی در غلظت $200 \mu\text{gml}^{-1}$ هیچ سمیتی از خود نشان نداد. همچنین، مقدار داروی بارگذاری شده روی نانوحامل ۷۸٪ به دست آمد. بنابر نتایج، گرافن اکساید اصلاح شده با ژلاتین به علت پایداری و زیست‌سازگاری مناسب می‌تواند به عنوان یک حامل دارو برای استفاده در مطالعات پزشکی پیشنهاد شود.

کلیدواژه‌ها: گرافن، نانوحامل، سرطان، رهایش دارو، اصلاح سطح

تاریخ دریافت ۹۹/۳/۱۲

تاریخ پذیرش ۱۴۰۰/۹/۲۳

Email: r.imani@aut.ac.ir



مقدمه

امروزه سرطان با وجود تمام تلاش‌های که برای درمان آن شده است هنوز یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر در دنیا محسوب می‌شود و جزء بزرگترین چالش‌های پزشکی است. در طول سرطان، ابتدا رشد سلول از کنترل خارج شده و تکثیر آن به صورت فزاینده رخ می‌دهد. در مراحل پیشرفته، سلول‌های سرطانی چسبندگی خود را از دست داده و با مهاجرت به سایر مناطق بدن، در آن جا شروع به رشد می‌کنند که به این مرحله متاستاز می‌گویند [۱]. یکی از روش‌های درمانی، استفاده از داروهای ضد سرطان است که باید تا حد امکان از آسیب آثار جانبی دارو بر سلول‌های سالم جلوگیری کرد. نانوتکنولوژی یکی از روش‌های نویدبخشی است که می‌تواند در درمان سلول‌های سرطانی به صورت موثرتر و کارآمدتر و با آثار جانبی کمتر استفاده شود [۲]. در واقع با استفاده از این تکنولوژی می‌توان دارو را به منطقه سلول‌های بیمار رساند. در درمان‌های پیشرفته‌تر، نانومواد می‌توانند به عنوان ابزارهایی برای عکس‌برداری تشخیصی و همچنین شبیه‌سازی و رهایش کنترل شده دارو در مناطق سرطانی نیز استفاده شوند [۳]. در سال‌های اخیر، تعداد قابل توجهی از نانومواد که توانایی استفاده در کاربردهای درمان سرطان را داشته باشند کشف شده و مورد مطالعه قرار گرفته است. در مقایسه با درمان‌های فعلی، نانومواد می‌توانند برای کاربردهای چندگانه در یک سامانه طراحی شوند به گونه‌ای که بتوانند علاوه به رسانش و حمل دارو به سلول‌های بیمار، داروی مورد نظر را به صورت هدف گیری شده به سلول مورد نظر برسانند. امید است که نسل‌های پیشرفته‌تر نانومواد بتوانند تحولی در درمان موثر سرطان ایجاد کنند [۱، ۴]. از میان نانومواد جدید، گرافن و مشتقاتش توجه زیادی را در بین دانشمندان در زمینه‌های مختلف علم به خود جلب کرده است. این ماده به خاطر خواص منحصر به فرد فیزیکی، شیمیایی، الکتریکی، مکانیکی، حرارتی و نوری می‌تواند در کاربردهای بسیار زیادی مورد استفاده قرار گیرد [۵]. گرافن در سال ۲۰۰۴ کشف شد و از سال ۲۰۰۸ برای کاربردهای زیستی و پزشکی مورد توجه قرار گرفت [۶]. توانایی بارگذاری زیاد دارو در گرافن و قابلیت اصلاح سطح آن با انواع پلیمرهای زیست سازگار به روش‌های کوالانت و غیرکوالانت برای افزایش

زیست سازگاری و پایداری آن در محیط‌های بیولوژیک، دانشمندان را تشویق کرد تا در زمینه‌های درمان سرطان از آن استفاده کنند. تاکنون سرطان‌هایی مانند: سرطان روده، سرطان پوست، سرطان ریه، سرطان پروستات، سرطان پستان و ... مورد بررسی درمان دارویی توسط حامل‌هایی بر پایه گرافن و گرافن اکساید قرار گرفته‌اند [۷].

پژوهش‌های زیادی انجام شده که در آن از نانوذرات گرافن به تنهایی یا به صورت اصلاح شده، به عنوان نانوحامل برای انتقال دارو استفاده شده است [۵]. در دو پژوهش که در سال ۲۰۰۸ انجام شد، گرافن اکساید (GO) عامل‌دار شده با پلی اتیلن گلیکول (PEG) شاخه‌دار با انتهای آمینی به تولید نانو اکسید گرافن عامل‌دار شده با پلی اتیلن گلیکول (NGO-PEG) با اندازه کوچک و پایداری بالا در محلول‌های فیزیولوژیکی منجر شد. سطح بسیار زیاد گرافن، با داشتن کلیه اتم‌ها روی سطح آن، اجازه بارگذاری زیاد دارو (مانند داروهای ضدآروماتیکی سرطان از جمله داکسوروبیسین (DOX) و 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN38)) روی NGO-PEG می‌دهد. انتهای زنجیره‌های PEG محل مناسبی برای اتصال با لیگاند‌های هدف‌گیر مانند آنتی‌بادی‌ها است، این مواد تسهیل کننده دارو رسانی هدفمند به سلول‌های خاصی از سرطان هستند [۸]. Liu و همکارانش از گرافن اصلاح شده با PEG برای رساندن DOX و ترنسفرین به تومورهای مغزی استفاده کردند. این سامانه کارایی بسیار بالاتر در رهایش دارو بین‌سلولی و همچنین ایجاد سمیت در تومورهای مغزی را از خود نشان داد. در مطالعه که به تازگی انجام شد، Rosenthal و همکارانش از پلیمر پلی اکریلیم اسید (PAA) برای اصلاح سطح گرافن استفاده کردند [۹]. نتایج این مطالعه نشان داده که ترکیب GO-PAA نه تنها زیست سازگاری و زیست ایمنی بیشتری نسبت به گرافن عامل‌دار شده با PEG، بلکه ظرفیت بارگذاری بالایی برای داروهای ضدسرطان را نیز دارد. سایر پلیمرها مانند پلی وینیل الکل (PVA) پلی اتیلن ایمین (PEI)، پلی وینیل الکل (PVA) و کوپلیمرهای آمفی‌فیلیک نیز می‌توانند برای افزایش زیست سازگاری گرافن از طریق پیوندهای کوالانت به صفحات GO متصل شوند [۱۰]. گرافن اصلاح شده با PEI برای افزایش پایداری در آب و اتصال فولیک اسید برای

ابریشم و کیتوسان اشاره کرد [۱۷]. برای نمونه در مطالعه‌ای که توسط Makharza و همکارانش صورت گرفت از گرافن اکسید عامل دار شده با ژلاتین (Gelatin-NGO) برای رهایش دارو ضد سرطان کربوپلاتین استفاده شد. نتایج نشان داد که ترکیب فوق، زیست سازگاری و پایداری بالایی در محیط‌های بیولوژیکی از خود نشان داد [۱۸].

انتخاب عامل اصلاح کننده نانوذرات گرافن و بهینه سازی فرایند اصلاح حائز اهمیت است زیرا عامل اصلاح کننده علاوه بر افزایش زیست سازگاری نباید سبب کاهش امکان بارگذاری دارو روی نانوصفحات شود. در این پژوهش، ساخت یک نانو حامل بر پایه گرافن اکساید و اصلاح شده با پلیمر زیست سازگار ژلاتین برای بارگذاری دارو ضد سرطان گیاهی کورکومین به منظور انتقال دارو به سلول‌های سرطانی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

پودر گرافیت و ژلاتین از شرکت مرک (آلمان) و DMSO از شرکت سیگما (آلمان) خریداری شدند. رده سلولی L929 از انستیتو پاستور تهیه شد. کلیه حلال‌ها و سایر مواد مورد استفاده در سنتز، از نوع آزمایشگاهی با خلوص بالا (مرک آلمان) مورد استفاده قرار گرفت.

ساخت نانوحامل گرافن اکساید: سنتز گرافن اکساید با استفاده از روش هامر انجام گرفت [۱۹]. به طور خلاصه، ابتدا پودرگرافیت و سولفوریک اسید و NaNO_3 در مخلوط آب و یخ مخلوط و به مدت یک ساعت روی همزن مغناطیسی با دور ۳۰۰rpm قرار داده و دما در این مدت ثابت نگه داشته شد. سپس ۱/۵ گرم پتاسیم پرمنگنات به آرامی به مخلوط اضافه شد و با دور ۳۰۰rpm در دمای محیط قرار گرفت. سپس ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر در مخلوط آب و یخ به آرامی به آن اضافه شد و رنگ آن از سبز یشمی در یک واکنش گرمازا به قرمز تیره تغییر کرد. سپس هیدروژن پركساید به آرامی اضافه و تغییر رنگ تند به زرد و سبز ایجاد و پس از چند دقیقه ۵۰ میلی لیتر آب مقطر به آرامی اضافه شد. محلول در مکانی ثابت قرار گرفت تا رسوب کند و سپس با HCL ۵ مرتبه، با NaOH ۳ مرتبه و با آب دیونیزه برای ۵

هدفمند کردن سامانه برای سلول‌های سرطانی رده CBRH7919 استفاده شد. پلورونیک F127 (PF127) به عنوان یک عامل سطح مناسب برای گرافن معرفی شد و ترکیب GO-PF127 زیست سازگاری و پایداری مناسب در آب و همچنین رهایش مناسب DOX از خود نشان داد [۱۱]. Shan و همکارانش گرافن اصلاح شده با پلی ال لیزین (PLL) را مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که این ترکیب حلالیت در آب و زیست سازگاری خوبی دارد، و همچنین شرایطی را برای اتصال به بیومولکول‌ها ایجاد می‌کند [۱۲]. Zhang و همکارانش سطح گرافن را با سولفونیک اسید (SO_3H) اصلاح کردند و مولکول‌های فولیک اسید را (FA) از طریق پیوندهای کووالانسی به آن متصل کردند. نشان داده شد که گرافن عامل‌دار شده با فولیک اسید می‌تواند به خوبی دیسپرس شود و برای ماه‌ها در محلول فیزیولوژیک D-Hanks buffer پایدار بماند. سپس دو دارو ضد سرطان (DOX و camptothecin) را روی این سامانه بارگذاری کردند و نتایج انتقال این دو دارو توسط حامل گرافنی روی رده سلولی MCF-7 نشان از کاهش بیشتر زنده مانی سلول‌های درمان شده توسط این سامانه نسبت به دارو تنها را داد [۱۳]. Stankovich و همکارانش اولین اصلاح سطح غیرکوالانت گرافن را ارائه دادند. آن‌ها از poly sodium 4-styrenesulphonate (PSS) برای اصلاح سطح نانوصفحات گرافنی استفاده کردند [۱۴]. Feng و همکارانش برای اصلاح سطح گرافن از PEI با اتصال الکترواستاتیک غیرکوالانت استفاده کردند. ترکیب GO-PEI دارای بار مثبت قوی است و همچنین پایداری بالا در محیط فیزیولوژیک و کاهش سمیت دارد [۱۵]. یکی دیگر از مطالعه‌های ارزشمند انجام شده در این زمینه توسط Yin و همکارانش انجام گرفت. آن‌ها از ترکیب GO-PEI-PEG به عنوان حاملی برای انتقال plasmid-based Stat3 siRNA استفاده کردند. نتایج آن در تست‌های درون تن رضایت بخش بود، دیده شد که وزن تومور و رشد آن پس از درمان کاهش یافت و سامانه سمیتی از خود نشان نداد [۱۶]. واضح است که پلیمرهای طبیعی به علت غیرسمی بودن، زیست تخریب پذیری مناسب و زیست سازگاری طولانی مدت گزینه‌های مناسبی برای اصلاح سطح گرافن هستند. از جمله پلیمرهای پرکاربرد در پزشکی می‌توان به کلاژن، سلولز، ژلاتین، آلجینات، فیبروئین

همچنین، مقدار درصد وزنی داروی بارگذاری شده روی نانوحامل نسبت به وزن نانوحامل نیز تحت عنوان، ظرفیت بارگذاری با توجه به رابطه ۲، محاسبه شد:

$$\text{Loading efficiency} = [(W_{\text{initial cur}} - W_{\text{cur in excess}}) / W_{\text{nanocarrier}}] * 100$$

رابطه ۲:

به طوری که:

$W_{\text{nanocarrier}}$ = وزن نانوحامل بارگذاری شده با داور است.

ارزیابی گرافن اکساید سنتز شده و اصلاح شده با ژلاتین:

برای ارزیابی خواص شیمیایی گرافن اکساید سنتز شده و بررسی گروه‌های عاملی ایجاد شده روی سطح صفحات گرافن حین فرایند سنتز از مشخصه یابی طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR-ATR) توسط دستگاه Tensor 27 (ساخت شرکت Bruker)، طیف سنجی ماورای بنفش-نور مرئی (Uv-Vis spectroscopy) توسط دستگاه SPECORD 250 (ساخت شرکت Analytik) و پراش اشعه ایکس (XRD) توسط دستگاه EQUINOX 3000 (ساخت شرکت INEL) استفاده شد. مورفولوژی محصول به دست آمده اعم از مورفولوژی نانوصفحات، ابعاد و شکل کلی لایه‌ها توسط میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)، دستگاه SPM (ساخت شرکت VEECO) (کشور آمریکا) مورد بررسی قرار گرفت. برای ارزیابی شیمیایی تثبیت ژلاتین و کاهش گرافن اکساید از آزمون Uv-Vis spectroscopy استفاده شد. برای بررسی کیفی و کمی ساختار حاصل و اثبات حضور عامل اصلاح کننده سطح از آزمون وزن سنجی دمایی (TGA) توسط دستگاه Pyris 1 (ساخت شرکت Perkin Elmer) و برای بررسی مورفولوژی و تغییر ضخامت نانوذرات از آنالیز در محور z روی تصاویر به دست آمده از AFM استفاده شد.

سمیت سلولی در محیط برون‌تنی به روش MTT: برای ارزیابی سمیت سلولی به واسطه حضور نانوذرات در برهمکنش با سلول از آزمون MTT استفاده شد. سلول‌های فیروبلست دم موش (L292) در محیط کشت DMEM در حضور ۱۰٪ سرم، پنیسیلین (۱۰۰ U mL⁻¹) و streptomycin (100 U mL⁻¹) در ۳۷ درجه و

مرتب شستشو داده شد تا pH آن به ۶/۵ رسید. محلول یک ساعت در سانتریفیوژ با دور ۶۰۰۰ قرار داشت تا ذرات ناپایدار رسوب کنند. سپس محلول در سونیکاتور پروبی (توان ۲۰۰ و دامنه ۸۰٪) به مدت نیم ساعت قرار داده شد.

تثبیت ژلاتین روی ساختار گرافن تحت فرایند کاهش: GO که از گرافیت طبیعی به روش هامر سنتز شده شامل گروه‌های فعال اکسیژن است. برای کاهش شیمیایی ساختار GO، مقدار ۱ گرم از ژلاتین در ۵۰ میلی‌لیتر آب حل و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب ۸۰ درجه سانتی‌گراد برای حلالیت کامل ژلاتین توسط همزن مغناطیسی همزده شد. سپس ۵۰ میلی‌لیتر محلول GO دیسپرس شده با غلظت ۰/۲ mgml⁻¹ نیم ساعت در سونیکاتور حمامی قرار گرفت و سپس به محلول ژلاتین در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد اضافه شد و برای ۳۰ دقیقه در این دما توسط همزن مغناطیسی همزده شد و سپس به مدت ۴۸ ساعت روی همزن مغناطیسی در دمای میانگین ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. محصول به دست آمده برای حذف ژلاتین اضافه، چهار مرتبه با آب گرم و توسط فیلتر لوله ۱۲۰۰۰ کیلو دالتون شستشو داده شد.

بارگذاری دارو روی نانوحامل: کورکومین ابتدا در اتانول با غلظت ۱ mgml⁻¹ حل شد. سپس ۲ میلی‌لیتر گرافن اکساید کاهش یافته با ژلاتین (G-rGO) با غلظت (۰/۱۵ mgml⁻¹) به محلول اضافه شد و برای یک ساعت در سونیکاتور حمامی قرار گرفت، سپس برای یک ساعت دیگر روی همزن مغناطیسی قرار داده شد. محلول نهایی در سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ برای مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. محلول رویی برای ارزیابی توسط طیف سنجی UV-Vis Spectroscopy برداشته و غلظت کورکومین با استفاده از نمودار استاندارد جذب- غلظت کورکومین محاسبه شد.

برای محاسبه درصد بارگذاری دارو از رابطه ۱ استفاده شد:

رابطه ۱:

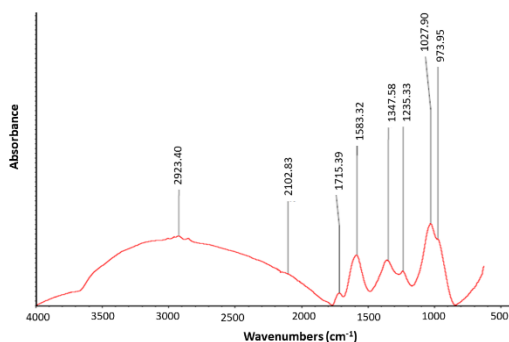
$$\text{Entrapment efficiency} = [(W_{\text{initial cur}} - W_{\text{cur in excess}}) / W_{\text{initial cur}}] * 100$$

به شکلی که:

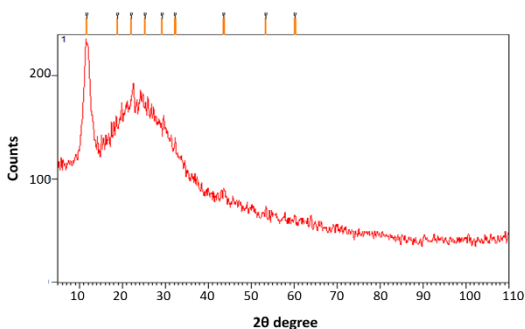
$W_{\text{initial cur}}$ = وزن کورکومین اضافه شده به محلول و $W_{\text{cur in excess}}$ = وزن کورکومین در محلول رویی است.

مشخصه ساختار گرافن اکساید، نشان از سنتز موفق این نانوذره از گرافیت دارد.

برای اطمینان بیشتر از سنتز صحیح گرافن اکساید از ارزیابی X-ray powder diffraction (XRD) استفاده شد. شکل ۲ الگو پراش اشعه ایکس گرافن اکساید را نشان می‌دهد. طیف مربوطه در زاویه $2\theta = 12^\circ$ الگوی پراش واضحی را نشان می‌دهد که مربوط به گرافن اکساید می‌باشد و در $2\theta = 26.5^\circ$ الگو پراش دیگری نیز دیده می‌شود که مربوط به گرافیت است. این پیک نشان می‌دهد که گرافیت به طور کامل اکسید نشده است. نتایج به دست آمده توسط اکسیداسیون تک مرحله‌ای گرافیت با نتایج مطالعات قبلی سازگار است [۲۱].



شکل ۱: نمودار FTIR-ATR گرافن اکساید سنتز شده



شکل ۲: نمودار XRD گرافن اکساید سنتز شده

در ادامه فرایند کاهش گرافن اکساید به گرافن اکساید کاهیده مورد بررسی قرار گرفت. محلول قهوه‌ای رنگ گرافن اکساید پس از کاهش به رنگ مشکی درآمد که خود این تغییر رنگ گواهی بر

۵٪ CO_2 کشت داده شدند. برای انجام ازمون MTT سلول‌های کشت یافته درون پلیت کشت ۹۶ چاهکی، با دانسیته 10^3 سلول در هر چاهک در محیط کشت DMEM با ۱۰٪ سرم قرار گرفت و به مدت ۲۴ ساعت کشت یافتند. سپس محیط کشت تعویض شده و سلول‌ها با غلظت‌های مختلف گرافن اکساید اصلاح شده با ژلاتین ($50, 100, 150, 200 \text{ gml}^{-1}$) و گرافن اکساید ($50, 100, 150, 200 \text{ gml}^{-1}$) به مدت ۴۸ ساعت دیگر کشت یافتند. (حجم محیط کشت درون چاهک به ۳۰۰ μl رسید). پس از آن زنده‌مانی سلول‌ها با تست MTT اندازه‌گیری شد. محیط کشت از چاهک‌ها خارج شد و با PBS شسته شد و سپس ۱۰۰ μl محلول MTT با غلظت 0.5 gml^{-1} به هر چاهک برای مدت ۴ ساعت اضافه شد. سپس محلول درون چاهک دور ریخته شد و DMSO یا ایزوپروپانول به مقدار ۱۰۰ μl به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه درون انکوباتور قرار گرفت و جذب چاهک‌ها به کمک دستگاه الایزا در طول موج ۵۷۰ و ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. تعداد تکرار برای هر نمونه ۳ بار بود. بقا نسبی سلول به نسبت نمونه کنترل با استفاده از رابطه ۳ محاسبه شد.

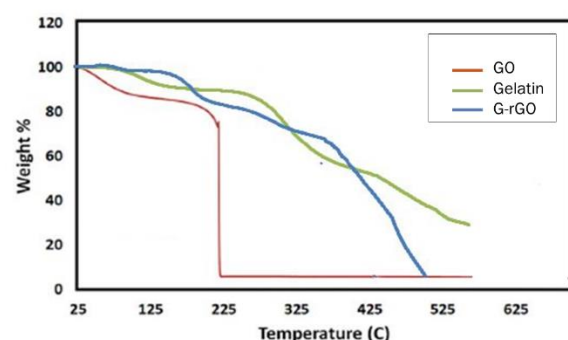
$$\% \text{Viability} = ([\text{OD}]_{\text{test}} / [\text{OD}]_{\text{control}}) \times 100$$

به شکلی که $[\text{OD}]_{\text{test}}$ جذب نمونه مورد آزمایش و $[\text{OD}]_{\text{control}}$ جذب نمونه کنترل است.

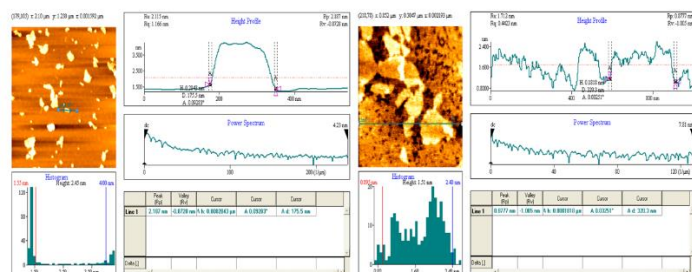
یافته‌ها و بحث

برای اطمینان از درستی فرآیند سنتز گرافن اکساید از پودر گرافیت، از ارزیابی شیمیایی FTIR-ATR استفاده شد. در شکل (۱) می‌توان گروه‌های شامل اکسیژن مانند گروه‌های عاملی اپکسی، هیدروکسیل و کربوکسیلیک را مشاهده کرد. پیک 2923 cm^{-1} مربوط به پیوند C-H است. پیوند در 1715 cm^{-1} نشان دهنده پیوند C=O در گروه‌های کربوکسیلیک اسید و کربونیل است. پیک 1583 cm^{-1} مربوط به گرافیت اکسید نشده است. در 1347 cm^{-1} برای پیوند C-H و 1027 cm^{-1} مربوط به C-O (alkoxy) است در حالی که پیوند 1235 cm^{-1} مربوط به C-O (epoxy) است [۲۰، ۲۱]. پیک‌های مشاهده شده و برابری آن با پیک‌های

چشمگیری کم شده که نشان می‌دهد فرآیند کاهش گرافن اکساید به خوبی انجام شده و گروه‌های عاملی اکسیژن از سطح حذف شدند. همچنین نتایج نشان داد که خواص فیزیکی و استحکام دمایی گرافن اکساید اصلاح شده بهبود یافته است. در شکل ۴ (سبز) نمودار گرماوزن‌سنجی ژلاتین قرار که در این نمودار نیز افت وزن کمی در محدوده دمایی ۱۰۰ به علت وجود رطوبت و آب موجود در نمونه مشاهده می‌شود. سپس افت وزنی در محدوده دمایی ۲۵۰ تا ۵۰۰ که مربوط به تخریب زنجیره‌های اصلی ژلاتین است. بیشترین افت وزن در دمای ۳۲۰ درجه رخ می‌دهد که در این دما افت وزن محسوسی در نمودار گرافن اکساید اصلاح شده نیز مشاهده شد که نشان دهنده حضور ژلاتین تثبیت شده روی سطح نانوذرات گرافن اکساید می‌باشد [۲۴].

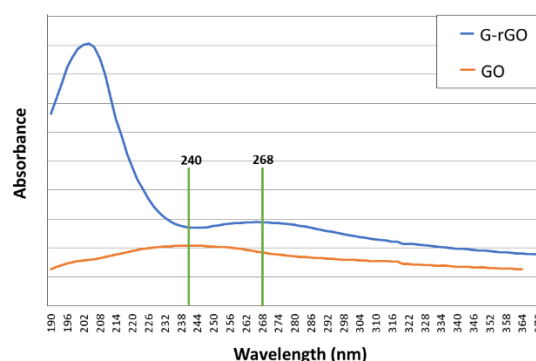


شکل ۴: نمودار گرماوزن‌سنجی گرافن اکساید، ژلاتین و گرافن اکساید اصلاح شده با ژلاتین



شکل ۵: تصویر میکروسکوپ نیروی اتمی گرافن اکساید (راست)، تصویر میکروسکوپ الکترونی گرافن اکساید کاهش یافته با ژلاتین (چپ)

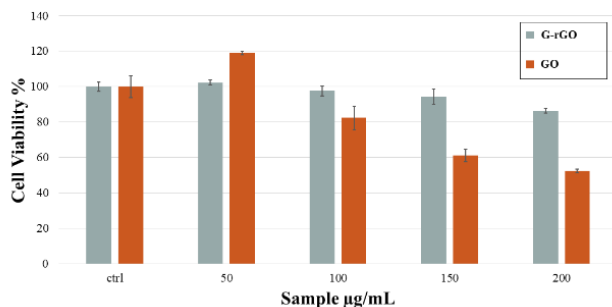
کاهیده شدن شیمیایی ساختار گرافن اکساید بود. فرآیند کاهش گرافن اکساید با طیف سنجی Uv-Vis spectroscopy ارزیابی شد (شکل ۳). با کمک بررسی طیف حاصل از جذب UV-vis می‌توان عمل کاهش روی گروه‌های اکسیژن GO را مشاهده کرد. در GO جذب بالایی در ۲۴۰ نانومتر مشاهده می‌شود که به علت پیوندهای $\pi \rightarrow \pi^*$ در باندهای C=C است. بعد از فرایند کاهش، پیک جذب از ۲۴۰ به ۲۶۸ تغییر پیدا می‌کند که نشان‌گر اصلاح خواص الکتریکی در گرافن کاهش یافته است [۱۸، ۲۲]. پس از عمل کاهش بیشتر گروه‌های عاملی حاوی اکسیژن حذف می‌شوند که به این معنی است درصد پیوندهای C-C در ماده بیشتر می‌شود. و هرچه پیوندهای کربنی بیشتر باشد رنگ محلول سیاه‌تر می‌شود [۲۳].



شکل ۳: نمودار Uv-Vis spectroscopy گرافن اکساید و گرافن اکساید کاهش یافته با ژلاتین.

در مرحله بعد، پس از تثبیت ژلاتین، ارزیابی TGA برای اثبات حضور عامل اصلاح کننده سطح انجام شد. این آزمون افت وزن نانوذرات را با افزایش دما در محدوده دمایی ۰ تا ۶۰۰ درجه در اتمسفر نیتروژن بررسی می‌کند. شکل ۴ (نمودار قرمز رنگ) مربوط به استقامت حرارتی GO است که در ابتدا افت وزن کمی را تا محدوده دمایی ۱۰۰ درجه داریم که مربوط به رطوبت و آب موجود در نمونه است، سپس کاهش وزن چشمگیری را در محدوده دمای ۲۲۵ مشاهده می‌کنیم. این کاهش وزن مربوط به تخریب گروه‌های عاملی اکسیژن گرافن اکساید است. در حالی‌که در گرافن اکساید کاهش یافته با ژلاتین این افت به صورت

شده با ژلاتین می‌تواند حاملی نوید بخش برای استفاده در محیط های برون تنی و درون تنی باشد.



شکل ۶: نمودار مقایسه سمیت گرافن اکساید و گرافن اکساید اصلاح شده با روش MTT

بارگذاری دارو کورکومین روی گرافن اکساید اصلاح شده با ژلاتین: کورکومین ساختار آبگریزی دارد و مانند سایر داروهای آبگریز می‌تواند روی فضاهای خالی گرافن بارگذاری شود که این عمل از طریق پیوندهای آبگریز پای-پای بین دارو و ساختار آروماتیک گرافن انجام شده و سبب تسهیل فرایند بارگذاری دارو بدون نیاز با واکنش شیمیایی خاصی می‌شود.

نمودار استاندارد جذب- غلظت کورکومین در دستگاه طیف‌سنج مرئی- فرابنفش: برای به دست آوردن طول موج جذب بیشینه مربوط به داروی کورکومین، جذب محلول کورکومین با غلظت ۱۰ micro-gram در طول موج‌های ۶۰۰ - ۲۰۰ نانومتر در دستگاه طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش خوانده شد و طول موج نقطه بیشینه نمودار که نشان دهنده طول موج جذب بیشینه است، ۴۴۲ نانومتر اندازه‌گیری شد و جذب تمامی محلول‌ها در این طول موج خوانده شد. میزان جذب هر نمونه با غلظت مشخص و نمودار استاندارد غلظت کورکومین در جدول ۱ آمده است. نمودار استاندارد جذب - غلظت کورکومین با تقریب بسیار خوبی خطی به دست آمد (شکل ۷).

AFM در حالت tapping ابزار قوی‌ای برای محاسبه تغییر ضخامت و توپوگرافی نانوذرات در اثر اصلاح سطح است. همانگونه که در شکل ۵ نشان داده شده ضخامت میانگین نانوذرات گرافن اکساید ۱/۵ nm است (شکل ۵ راست) که پس از اصلاح سطح با ژلاتین ضخامت میانگین به ۲/۵ nm تغییر پیدا می‌کند (شکل ۵ چپ). این افزایش ضخامت نشان دهنده اتصال ژلاتین به لایه‌های گرافن اکساید کاهش یافته است [۱۸]. همچنین از تصاویر AFM مشاهده می‌شود که نانوذرات گرافن اکساید اصلاح شده با ژلاتین به صورت تک ذرات بدون کلوخه شدن دیده می‌شوند که این نشان از دیسپرسن مناسب در محلول آبی است [۲۱]. همچنین، ابعاد نانوذرات در مرحله کاهش و تثبیت ژلاتین دستخوش کاهش قابل توجهی از ۳۰۰ به ۱۷۰ نانومتر شده است که این امر می‌تواند بر اثر شکستن صفحات در حین فرایند کاهش از محل‌های نقص‌های ساختاری صفحات کربنی گرافن اکساید و همچنین استفاده از التراسونیک پروبی برای دیسپرس نگه داشتن محیط واکنش باشد.

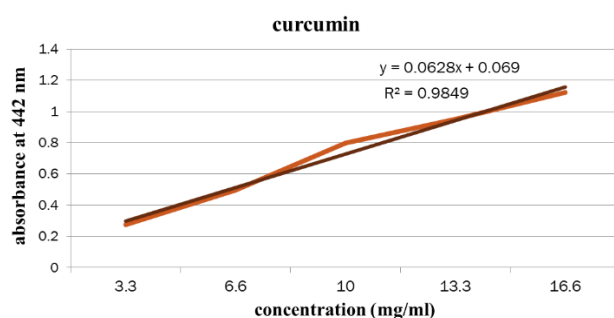
آزمون سمیت سلولی گرافن اکساید اصلاح شده با ژلاتین در محیط برون تنی: با توجه به اینکه انتظار می‌رفت که ژلاتین به عنوان یک عامل افزایش زیست سازگاری نانوذرات عمل نماید، میزان سمیت گرافن اکساید اصلاح شده با ژلاتین و مقایسه آن با گرافن اکساید روی رده سلولی L292 مطالعه شد. سلول‌های L292 در معرض غلظت‌های مختلفی از G-rGO و GO به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند. اندازه‌گیری زنده‌مانی نسبی سلول‌ها با استفاده از روش MTT انجام گرفت. همانگونه که در شکل ۶ نشان داده شده است، گرافن اکساید اصلاح شده با ژلاتین سمیت مشخصی را حتی در غلظت‌های بالا (۲۰۰ micro-gram) نشان نمی‌دهد، در حالیکه گرافن اکساید حتی در غلظت‌های کمتر سمیت زیادی از خود نشان داده است. این مقایسه نشان می‌دهد که اصلاح سطح گرافن برای زیست سازگار کردن آن مفید بوده و از سمیت آن به میزان چشمگیری کاسته است. در پژوهش مشابه- ای که توسط Jing An و همکارانش صورت گرفته، گرافن اکساید اصلاح شده با ژلاتین حتی در غلظت‌های بالاتر هیچگونه سمیتی از خود نشان نداده و درصد زنده‌مانی سلول‌ها از نمونه کنترل بیشتر بوده است [۲۱]. بنابراین نانو حامل گرافن اکساید اصلاح

جدول ۱: میزان جذب نمونه های محلول کورکومین با غلظت های مختلف

غلظت محلول ($\mu\text{g/ml}$)	۳/۳	۶/۶	۱۰	۱۳/۳	۱۶/۶
میزان جذب در ۴۴۲ nm	۰/۲۷۶	۰/۴۹۵	۰/۷۹۸	۰/۹۵۲	۱/۱۱۲

جدول ۲: مقایسه بارگذاری دارو کورکومین در حامل های مختلف

حامل	درصد بارگذاری دارو (%)	مرجع
Protein-pectin	۸۶	[۲۵]
Cremophor	۹۴	[۲۶]
Catechin	۸۸	[۲۷]
Gelatin	۴۸	[۲۸]
PEG-PLA	۸/۶	[۲۹]
GO	۴۲	[۳۰]
GP (polymer –functionalized reduced graphene oxide)	۹۷	[۳۱]
ZnO-PBA (phenyl boronic acid)	۲۷	[۳۲]
Cationic liposomes (made up of DOTAP and DOPE)	۸۶/۶	[۳۳]
mPEG-PCL	۸۹/۳۲	[۳۴]



شکل ۷: نمودار استاندارد جذب-غلظت محلول کورکومین

درصد بارگذاری دارو : میزان کورکومینی که برای بارگذاری دارو روی گرافن اکساید اصلاح شده با ژلاتین استفاده شد ۲ میلی گرم بود که بازدهی بارگذاری آن طبق رابطه ۱ مقدار ۷۸٪ محاسبه شد. این مقدار در مقایسه با سایر حامل ها برای انتقال کورکومین در پژوهش های قبلی مقدار قابل قبولی است (جدول ۲). و همچنین ظرفیت بارگذاری نیز ۵۱۳ wt% محاسبه شد. که در مورد گرافن اکساید این مقدار فقط ۲۰۸ wt% است که تقریباً نصف مقداری هست که در پژوهش ما محاسبه شده است که نشان می دهد اصلاحات انجام شده بر سطح گرافن اکساید اصلاح شده با ژلاتین کارآمد بوده و میزان جذب سطحی دارو را در حامل افزایش داده است. در واقع تثبیت زنجیره های ژلاتین به گونه ای صورت گرفته است که علاوه بر افزایش زیست سازگاری و دیسپرسن نانوذرات، ممانعتی برای جذب داروی کورکومین از طریق پیوندهای پای روی صفحه نانوذره ایجاد نکرده است و مولکول دارو قادر است روی سطح نانوذره اصلاح شده با موفقیت بارگذاری شود.

نتیجه گیری

در این پژوهش گرافن اکساید اصلاح شده با ژلاتین به عنوان حامل داروی ضد سرطان کورکومین سنتز شد. تثبیت ژلاتین به صورت یک مرحله ای و حین کاهش نانوذرات انجام شد که این امر سبب ایجاد نواحی مناسب با ساختار پیوندهای پای برای بارگذاری داروی کورکومین بود که در ساختار حلقه های بنزنی حاوی پیوند پای موجود است. اگرچه ساختار گرافن اکساید در فرایند تثبیت ژلاتین دچار کاهیدگی شده و این کاهیدگی می تواند سبب کاهش دیسپرس در محیط های آبی و رسوب شود اما حضور زنجیرهای آبدوست ژلاتین این امر را جبران نمود به گونه ای که نانوذرات اصلاح شده دیسپرسن و پایداری قابل قبولی در

- polymeric modification, toxicology, therapeutics and challenges. RSC advances, 2015. 5(52): p. 42141-42161.
7. Orecchioni, M., et al., Graphene as cancer theranostic tool: progress and future challenges. *Theranostics*, 2015. 5(7): p. 710.
 8. Yang, K., L. Feng, and Z. Liu, Stimuli responsive drug delivery systems based on nano-graphene for cancer therapy. *Advanced drug delivery reviews*, 2016. 105: p. 228-241.
 9. Rosenthal, A., et al., Biofunctionalization of titanium substrates using nanoscale polymer brushes with cell adhesion peptides. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2018. 122(25): p. 6543-6550.
 10. Liu, J., L. Cui, and D. Losic, Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications. *Acta biomaterialia*, 2013. 9(12): p. 9243-9257.
 11. Zhang, X., et al., Preparation of thermo/pH-sensitive reduced graphene oxide interpenetrating hydrogel nanocomposites for co-delivery of paclitaxel and epirubicin. *Materials technology*, 2018. 33(4): p. 245-252.
 12. Shan, C., et al., Water-soluble graphene covalently functionalized by biocompatible poly-L-lysine. *Langmuir*, 2009. 25(20): p. 12030-12033.
 13. Zhang, L., et al., Functional graphene oxide as a nanocarrier for controlled loading and targeted delivery of mixed anticancer drugs. *Small*, 2010. 6(4): p. 537-544.
 14. Stankovich, S., et al., Stable aqueous dispersions of graphitic nanoplatelets via the reduction of exfoliated graphite oxide in the presence of poly (sodium 4-styrenesulfonate). *Journal of Materials Chemistry*, 2006. 16(2): p. 155-158.
 15. Feng, L., S. Zhang, and Z. Liu, Graphene based gene transfection. *Nanoscale*, 2011. 3(3): p. 1252-1257.
 16. Yin, D., et al., Functional graphene oxide as a plasmid-based Stat3 siRNA carrier inhibits mouse malignant melanoma growth in vivo. *Nanotechnology*, 2013. 24(10): p. 105102.
 17. Ege, D., A.R. Kamali, and A.R. Boccaccini, Graphene oxide/polymer-based biomaterials. *Advanced Engineering Materials*, 2017. 19(12): p. 1700627.
 18. Makharza, S., et al., Graphene oxide-gelatin nanohybrids as functional tools for enhanced carboplatin activity in neuroblastoma cells. *Pharmaceutical research*, 2015. 32(6): p. 2132-2143.
 19. Shahriary, L. and A.A. Athawale, Graphene oxide synthesized by using modified hummers approach. *Int. J. Renew. Energy Environ. Eng.*, 2014. 2(01): p. 58-63.
 20. Fernandez-Fernandez, A., R. Manchanda, and A.J. McGoron, Theranostic applications of nanomaterials in cancer: drug delivery, image-guided therapy, and multifunctional platforms. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2011. 165(7-8): p. 1628-1651.
 21. An, J., et al., Synthesis of a biocompatible gelatin functionalized graphene nanosheets and its

محیط آبی از خود نشان دادند. افزایش زیست سازگاری نانوذرات اصلاح شده با ژلاتین به ویژه در غلظت‌های بالاتر قابل توجه بود. نتایج بارگذاری داروی کورکومین نشان از بارگذاری مناسب در حدود ۷۸ درصد داشت که در مقایسه با مطالعات قبلی مقدار قابل قبولی است. همچنین ظرفیت بارگذاری بالای محاسبه شده نشان از فراهم شدن سطح مناسب برای بارگذاری این دارو پس از اصلاح با ژلاتین می‌باشد. در واقع نتایج این مطالعه نشان داد که نانوذرات گرافن اصلاح شده با ژلاتین از طریق فرآیند کاهش هم زمان می‌تواند حامل مناسبی برای بارگذاری داروی ضد سرطان کورکومین باشد. اگرچه، در ادامه، برای بررسی دقیق‌تر کارایی نهایی نانوحامل سنتز شده لازم است آزمون سمیت سلولی نانوحامل حاوی دارو، کارایی آن در عبور از غشا سلولی و از بین بردن موثر سلول‌های سرطانی در مقایسه با نانوحامل بدون دارو و داروی آزاد بدون حضور نانوحامل انجام شود. همچنین، اتصال لیگاندهای هدف به نانوحامل برای افزایش هدفگیری نانوحامل به سمت سلول‌های سرطانی و انجام همزمان دارورسانی و ژن رسانی برای افزایش تاثیر درمانی پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی: نویسندگان مقاله از مسئولین آزمایشگاه مهندسی بافت دانشکده مهندسی پزشکی دانشگاه صنعتی امیرکبیر به خاطر همکاری‌شان در تامین تجهیزات و مواد مورد نیاز این پژوهش تشکر می‌نماید.

منابع

1. Jemal, A., et al., Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2011. 61(2): p. 69-90.
2. Song, S., et al., Biomedical application of graphene: From drug delivery, tumor therapy, to theranostics. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2020. 185: p. 110596.
3. Wang, L., M. Zheng, and Z. Xie, Nanoscale metal-organic frameworks for drug delivery: a conventional platform with new promise. *Journal of Materials Chemistry B*, 2018. 6(5): p. 707-717.
4. Brannon-Peppas, L. and J.O. Blanchette, Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced drug delivery reviews*, 2012. 64: p. 206-212.
5. Yang, K., L. Feng, and Z. Liu, The advancing uses of nano-graphene in drug delivery. *Expert opinion on drug delivery*, 2015. 12(4): p. 601-612.
6. Nurunnabi, M., et al., Bioapplication of graphene oxide derivatives: drug/gene delivery, imaging,

- International journal of pharmaceutics, 2015. 478(2): p. 788-795.
29. Wang, Z., et al., Tuning the architecture of polymeric conjugate to mediate intracellular delivery of pleiotropic curcumin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2015. 90: p. 53-62.
30. Some, S., et al., Cancer therapy using ultrahigh hydrophobic drug-loaded graphene derivatives. *Scientific reports*, 2014. 4: p. 6314.
31. Muthoosamy, K., et al., Exceedingly higher co-loading of curcumin and paclitaxel onto polymer-functionalized reduced graphene oxide for highly potent synergistic anticancer treatment. *Scientific reports*, 2016. 6: p. 32808.
32. Kundu, M., et al., pH-responsive and targeted delivery of curcumin via phenylboronic acid-functionalized ZnO nanoparticles for breast cancer therapy. *Journal of advanced research*, 2019. 18: p. 161-172.
33. Jose, A., et al., Effective skin cancer treatment by topical co-delivery of curcumin and STAT3 siRNA using cationic liposomes. *AAPS PharmSciTech*, 2018. 19: (1) p. 166-175.
34. Manjili, H.K., et al., Pharmacokinetics and in vivo delivery of curcumin by copolymeric mPEG-PCL micelles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2017. 116: p. 17-30.
- application for drug delivery. *Materials Science and Engineering: C*, 2013. 33(5): p. 2827-2837.
22. Lee, D.Y., et al., Blood compatible graphene/heparin conjugate through noncovalent chemistry. *Biomacromolecules*, 2011. 12(2): p. 336-341.
23. Zhou, Y., et al., Hydrothermal dehydration for the "green" reduction of exfoliated graphene oxide to graphene and demonstration of tunable optical limiting properties. *Chemistry of Materials*, 2009. 21(13): p. 2950-2956.
24. Imani, R., et al., Dual-functionalized graphene oxide for enhanced siRNA delivery to breast cancer cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2016. 147: p. 315-325.
25. Hu, K., et al., Core-shell biopolymer nanoparticle delivery systems: synthesis and characterization of curcumin fortified zein-pectin nanoparticles. *Food chemistry*, 2015. 182: p. 275-281.
26. Li, Q., et al., Curcumin-piperine mixtures in self-microemulsifying drug delivery system for ulcerative colitis therapy. *International journal of pharmaceutics*, 2015. 490(1-2): p. 22-31.
27. Aditya, N., et al., Co-delivery of hydrophobic curcumin and hydrophilic catechin by a water-in-oil-in-water double emulsion. *Food chemistry*, 2015. 173: p. 7-13.
28. Rao, K.M., et al., Curcumin encapsulated pH sensitive gelatin based interpenetrating polymeric network nanogels for anti cancer drug delivery.