

تهیه و تعیین خصوصیات گرافن اکساید عامل دار شده با گاما-سیکلودکسترین و نانو ذرات سوپر پارامغناطیس اکسید آهن به عنوان نانو حامل جدید برای دارو رسانی

الهام عین افشار^۱، علی حقیقی اصل^{۲*}، محمد رضانی^{۳،۴}، آزاده هاشم نیا^۳، عظیم ملک زاده^۱

^۱دانشکده شیمی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران

^۲دانشکده مهندسی شیمی، نفت و گاز، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

^۳مرکز تحقیقات دارویی، موسسه فناوری‌های دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

^۴گروه بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۶/۱۸

تاریخ تصحیح: ۹۷/۰۵/۲۵

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۴/۱۲

چکیده

با وجود آنکه داروهای خوراکی بهترین انتخاب برای دارو رسانی است، ولی بسیاری از ترکیبات دارویی از جمله ضدسرطان‌ها با ساختار آروماتیک، محلولیت پایینی در آب و مایعات بیولوژیکی دارند، این امر موجب کاهش مقدار و سرعت جذب این مواد دارویی و در نهایت منجر به محدودیت استفاده از آن‌ها در درمان بیماری‌ها می‌شود. علم نانو با خصوصیات منحصر به فرد خود بسیاری از این محدودیت‌ها را کاهش داده است؛ به گونه‌ای که با کاربرد حامل‌های دارویی در مقیاس نانو، بسیاری از خواص دارویی مانند حلالیت و نیمه عمر ماده دارویی بهبود می‌یابد. در این بین گرافن و گرافن اکساید به دلیل ساختار دوبعدی مسطح، سطح بزرگ شیمیایی، پایداری شیمیایی و مکانیکی بالا، سمیت سلولی پایین و زیست سازگاری خوب موجب رویکرد امیدوارکننده به سوی سیستم‌های دارورسانی پیشرفته شده است. یکی از اهداف طراحی سیستم‌های دارورسانی افزایش تاثیر دارو از طریق تمرکز در محل مورد نظر است. در بین انواع نانوذرات مغناطیسی مورد بررسی، نانوذرات سوپر پارامغناطیس اکسید آهن (SPION) به دلیل خصوصیات مغناطیسی عالی، زیست سازگاری و زیست تخریب پذیری و قابلیت انتقال به محل‌های هدف یابی شده به کمک میدان مغناطیسی خارجی، توجه زیادی را به خود جلب نموده است. در این پژوهش از گرافن اکساید عامل دار شده با γ -سیکلودکسترین که از حلالیت آبی مناسبی برخوردار است، به عنوان حامل برای داروی SN38 و نانو ذرات مغناطیسی آهن استفاده گردید، که نتیجه حاصله نشان می‌دهد که اتصال دارو به صورت کووالانسی به پایه سیکلودکسترین-گرافن اکساید باعث افزایش انحلال آبی دارو شده و در اثر فرار گرفتن در برابر تشعشع لیزر با طول موج مشخص ۸۰۸ نانومتر باعث افزایش دمای موضعی و بروز اثر هایپرترمیا گردید.

کلمات کلیدی: گرافن اکساید، سیکلودکسترین، دارورسانی، نور درمان، شیمی درمانی، سرطان.

۱- مقدمه

سرطان دومین عامل موثر مرگ و میر در کشور است. سرطان به علت رشد غیرقابل کنترل سلول‌ها آغاز می‌شود. این نوع رشد متفاوت از رشد طبیعی سلول‌های دیگر است. سلول‌های سرطانی می‌توانند به بافت‌های دیگر نفوذ کنند که در سلول‌های سالم این قانون وجود ندارد. SN38 یک داروی ضد سرطان برجسته و موثر برای درمان انواع متفاوتی از سرطان‌ها از جمله سرطان روده بزرگ، ریه و تخمدان محسوب می‌شود. با وجود پتانسیل‌های ضدسرطانی عالی SN38، این دارو به علت ساختار آروماتیک، محلولیت پایینی در آب و مایعات بیولوژیک دستگاه گوارش دارد، این امر موجب کاهش مقدار و سرعت جذب این ماده دارویی از راه استفاده خوراکی و در نهایت منجر به محدودیت استفاده از آن در درمان بیماری‌ها می‌گردد. با توجه به اهمیت مطالبی که ذکر شد، تحقیقات بر روی انتقال این داروی ضد سرطان بیولوژیک فعال به بدن متمرکز می‌گردد. در طراحی و توسعه حامل‌های سیستم‌های دارو رسانی، هدف رسیدن به سیستمی با بارگذاری مناسب دارو و خواص آزادسازی مطلوب مورد نظر به همراه نیمه عمر بالا است [۱]. از جمله حامل‌های مورد استفاده در دارو رسانی می‌توان به مایسل‌ها [۲]، پلیمرها [۳]، نانوذرات [۴]، درخت سان‌ها، کریستال‌های مایع، هیدروژل‌ها اشاره کرد [۵]. یکی از حاملین دارو که به تازگی مورد توجه ویژه قرار گرفته، گرافن و مشتقات آن است که زمینه‌های متنوعی برای رسیدن به اهداف درمانی ایجاد کرده است. گرافن ماده‌ای تخت و تک لایه متشکل از اتم‌های کربن است که این اتم‌ها در یک شبکه دویعدی و شش ضلعی و کندو مانند به هم متصل شده‌اند [۶]. این ماده از زمانی که در سال ۲۰۰۴ میلادی در دانشگاه منچستر کشف گردید، به سرعت معروف گشت. از آنجاکه خواص گرافن هنوز ناشناخته است، هر روز دانشمندان بیشتری به کار بر روی پروژه‌های آن علاقمند می‌شوند [۷]. با توجه به مطالعاتی که اخیراً بر روی گرافن اکساید انجام شده است، نشان می‌دهد که نانو ورق‌های گرافن اکساید دارای خاصیت ضدباکتری فوق العاده بوده و سیتوتوکسیته کمی دارند [۸]. از طرفی دیگر، مساحت سطحی گرافن ۴ برابر بالاتر از سطح هر نانو مواد دیگر است که به عنوان حامل دارویی گزارش شده است. این امر باعث می‌گردد، که نسبت پرشدگی نانوگرافن به عنوان حامل دارویی به طور قابل ملاحظه‌ای در حدود ۲۰۰ درصد بالاتر از سایر نانو ذرات و سیستم‌های داروسازی شود و این خصوصیات سبب می‌شود که گرافن و مشتقات آن را از سایر حامل‌ها متمایز نماید [۹]. سیکلودکسترین‌ها مولکول‌های حلقوی هستند که از اتصال ۶، ۷ و یا ۸ مولکول گلوکز ایجاد می‌شوند که به ترتیب α ، β ، γ سیکلودکسترین نامیده می‌شوند [۱۰]. سیکلودکسترین مولکولی است که بیرون آن آبدوست است، که می‌تواند در آب حل شود و حفره‌ای ناقصی دارد که می‌تواند ماتریسی برای ترکیبات آب‌گریز به وجود آورد [۱۱]. شاید بتوان گفت، مهمترین خصوصیت سیکلودکسترین‌ها، توانایی آن‌ها در تشکیل کمپلکس‌های میزبان- میهمان با تعداد بسیار زیادی از ترکیبات آب‌گریز است. در این کمپلکس‌ها مولکول مهمان درون نانو حفره سیکلودکسترین میزبان قرار می‌گیرند. تشکیل کمپلکس می‌تواند به علت هم‌اندازه بودن ابعاد حفره میزبان و مولکول میهمان و یا نیروهای بین مولکولی باشد. که این امر

موجب محافظت ملکول مهمان از تخریب ناشی از میکروارگانسیم‌ها، تجزیه بر اثر حضور نور یا اکسیژن و ثبات بخشیدن به مواد بسیار فرار و بهبود حلالیت مواد به عنوان ملکول مهمان گردد [۱۲، ۱۳]. سیکلودکسترین‌ها می‌توانند در صنعت داروسازی برای بهبود رهایش دارو و افزایش حلالیت به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار گیرد. بنابراین در این طرح، گرافن اکساید را با سیکلودکسترین عامل‌دار نموده تا از خصوصیات ویژه این ماده پرکاربرد بهره‌برداری نماییم. گزارش‌های متعددی از اتصال غیرکوالانسی داروی SN38 به گرافن اکساید وجود دارد که بر این اساس SN38 بوسیله نیروی پای-پای به گرافن اکساید متصل می‌شود. در روشی که در مجله انجمن شیمی آمریکا^۱ منتشر شده است، گرافن اکساید را با پلی اتیلن گلیکول عامل‌دار نموده‌اند تا حلالیت گرافن را بهبود ببخشند. در این روش گروه‌های کربوکسیلیک موجود بر روی گرافن اکساید با گروه‌های آمینی موجود در اتیلن گلیکول، پیوند آمیدی تشکیل داده و در ادامه داروی ضد سرطان SN38 بر روی سطح گرافن اکساید از طریق برهمکنش ساده غیرکوالانسی $\pi-\pi$ بارگذاری می‌شود و کمپلکس GO-PEG-SN38 را تشکیل می‌دهند که آثار سمی سلولی بالایی برای سلول‌های سرطانی HCT-116 نشان می‌دهد [۱۴]. اما تاکنون گزارشی از اتصال کوالانسی SN38 به گرافن اکساید مشاهده نشده است. ما در این طرح برای اتصال کوالانسی SN38 به گاما-سیکلودکسترین و گرافن اکساید از یک لینکر استفاده نمودیم و انتخاب ما اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) به عنوان لینکر مناسب بوده است، زیرا هم دارای گروه‌های فعال جهت اتصال به SN38 و گاما-سیکلودکسترین می‌باشد و هم به علت داشتن آرایش فضایی مناسب قادر به کوردینه نمودن نانوذرات آهن می‌باشد. لینکر EDTA با استفاده از گروه کربوکسیل با گروه هیدروکسیل فعال در SN38 واکنش داده و به این طریق به یکدیگر متصل می‌شوند. سپس ماده سنتز شده به گرافن اکساید عامل‌دار شده با سیکلودکسترین در حضور DMAP/EDC اضافه می‌گردد. این امر سبب می‌گردد تا EDTA از طریق یکی دیگر از گروه کربوکسیل با گروه هیدروکسیل سیکلودکسترین وارد واکنش استریفیکاسیون شده و بدین طریق SN38 به گرافن اکساید متصل گردد.

۲- بخش تجربی

۲-۱- مواد و روش‌ها

داروی SN38 از شرکت Medkoo در کشور ایالات متحده آمریکا دریافت شد. EDC (۱-اتیل-۳-(۳-دی‌متیل آمینوپروپیل) کربوایمید هیدروکلراید) از شرکت Fluka ژاپن خریداری شده است. DMAP (۴-دی‌متیل آمینوپیریدین) و گاما-سیکلودکسترین از کمپانی Aldrich در ایالات متحده آمریکا و EDTA (اتیلن دی آمین تترا استیک اسید) و DMSO (دی‌متیل سولفید) از شرکت مرک ژاپن به دست آمد.

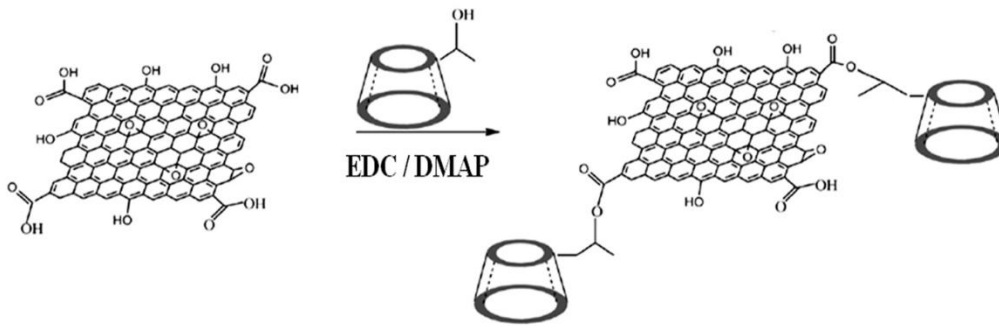
¹ American chemical society

۲-۲- سنتز گرافن اکساید و سیکلودکسترین-گرافن اکساید

نانو ورق‌های اکسیدگرافن، در حقیقت گرافنی است که از لحاظ شیمیایی با هیدروکسیل، اپوکسی و گروه‌های عاملی کربوکسیل اصلاح شده است. حضور این گروه‌های عاملی سبب می‌شود که بتواند به راحتی در آب پخش شود و در واکنش‌های شیمیایی فعال ظاهر شود. متدهای گوناگونی برای سنتز گرافن اکساید استفاده شده است. تا به حال، معمول ترین روش برای سنتز گرافن اکساید، اکسیداسیون شیمیایی گرافیت (روش هومر) می‌باشد که ما از این روش برای سنتز گرافن اکساید بهره گرفتیم [۱۵]. در این روش، ۰٫۵ گرم گرافیت و ۰٫۵ گرم NaNO_3 به ۲۳ میلی‌لیتر H_2SO_4 اضافه گردید. پس از آن، مخلوط در حمام یخ به مدت ۱۰ دقیقه هم زده شد. سپس ۰٫۳ گرم KMnO_4 به تدریج در طول ۳۰-۴۵ دقیقه در دمای اتاق به مخلوط اضافه شد و مخلوط در حمام آب به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد هم زده شد. پس از آن، مخلوط تهیه شده توسط ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه رقیق گردید. در طول رقیق شدن، دما در کمتر از ۶۰ درجه سانتی‌گراد نگه داشته می‌شود. در نهایت، ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه با ۳ میلی‌لیتر H_2O_2 ، ۳۰٪ به منظور کاهش پرمنگنات باقی مانده به یون‌های منگنز به محلول اضافه می‌شود. در ادامه به مخلوط ۲۵۰ میلی‌لیتر محلول آبی ۱۰٪ HCl برای حذف یون‌های فلزی اضافه شده و به کمک سانتریفوژ در ۸۰۰۰ دور در دقیقه شسته و فیلتر می‌شود و به دنبال آن از آب مقطر جهت شستشوی اسید و رسیدن به pH خنثی استفاده گردید.

۲-۳- سنتز گاما-سیکلودکسترین-گرافن اکساید ($\gamma\text{-CD-GO}$)

برای عامل دار کردن گرافن اکساید به گاما-سیکلودکسترین، ما روشی ساده و راحت را طراحی نمودیم. در این روش با استفاده از واکنش استریفیکاسیون بین گروه کربوکسیل گرافن اکساید و گروه‌های هیدروکسیل واقع در سطح خارجی سیکلودکسترین در حضور DMAP/EDC، گرافن اکساید با سیکلودکسترین عامل دار گردید که این فرایند در مقاله‌ای که به تازگی منتشر شده است گزارش گردیده است [۱۶]. در این روش گرافن اکساید را در ۷ میلی‌لیتر آب خالص حل نموده و سپس تحت التراسونیک به مدت ۳۰ دقیقه قرار می‌دهیم. در ادامه ۱۵۰ میلی‌گرم EDC به عنوان واکنشگر جفت کننده به محلول اضافه نموده و سپس ۴۵ دقیقه در دمای اتاق هم زده می‌شود. در انتها DMAP و $\gamma\text{-CD}$ اضافه شده و مخلوط به مدت ۴ روز هم زده می‌شود. در انتها محصول چندین مرتبه با آب مقطر شستشو داده شده و سانتریفوژ می‌گردد و در نهایت برای استفاده‌های بعدی خشک و ذخیره می‌گردد.



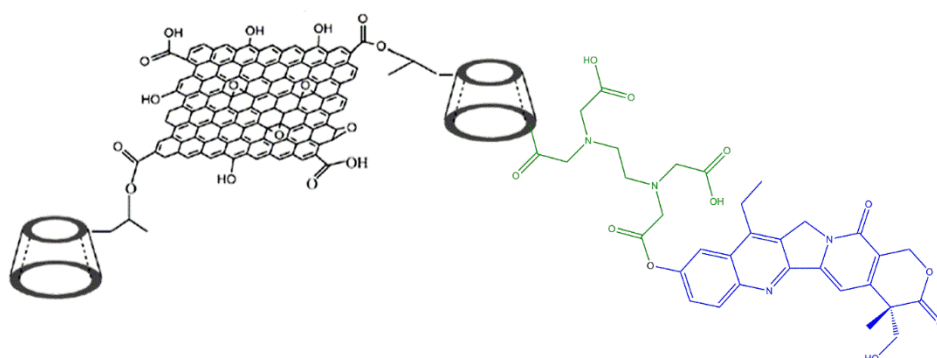
شکل ۱- شماتیکی از اتصال سیکلودکسترین به گرافن اکساید

۲-۴- سنتز نانو ذرات مغناطیسی اکسید آهن

برای سنتز نانو ذرات مغناطیسی اکسید آهن از روش هم رسوبی استفاده گردید [۱۷]. ابتدا ۴۵۰ میلی گرم آب دیونیزه به مدت ۱۵ دقیقه تحت جریان گاز نیتروژن به هم زده شد تا اکسیژن محلول در آب تا حد ممکن خارج شود. سپس در حین به هم زدن، ۰/۱۹ میلی گرم $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ و ۰/۴۸۶ میلی گرم $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ به داخل آب دیونیزه اضافه شد و در ادامه ظرف حاوی مواد در حمام آب گرم ($75^{\circ}C - 80^{\circ}C$) قرار داده شد. سپس ۴۰ میلی لیتر $NH_3 \cdot H_2O$ به صورت قطره قطره اضافه گردید و محلول به مدت یک ساعت تحت گاز نیتروژن هم زده شد، سپس جریان گاز نیتروژن بعد از طی زمان مورد نظر قطع گردید. بعد از طی زمان حدود ۳۰ دقیقه رسوب نانوذرات مغناطیسی اکسید آهن حاصل گردید. در ادامه بعد از رسیدن محصول به دمای اتاق، سه مرتبه با آب دیونیزه گرم شستشو گردید و نانو ذرات رسوبی به کمک سانتریفوژ با دور 9000 rpm جمع آوری و در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر حل و به مدت ۱۰ دقیقه سونیکیت گردید، سپس در دستگاه فریز درایو قرار داده شد تا به صورت پودری خشک برای استفاده‌های بعدی نگهداری شود.

۲-۵- اتصال کوالانسی SN38 به کمپلکس گاما-سیکلودکسترین-گرافن اکساید ($\gamma\text{-CD-GO-EDTA-SN38}$)

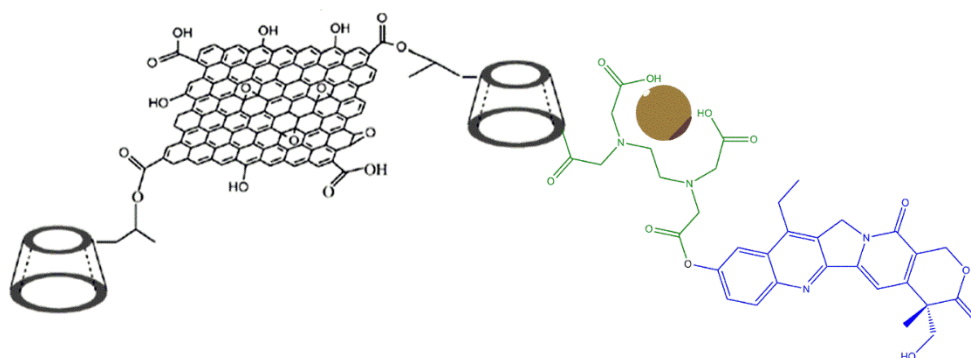
جهت اتصال کوالانسی SN38 به $\gamma\text{-CD-GO}$ از EDTA استفاده گردید، برای این منظور، ابتدا ۷,۴۴۷ میلی گرم EDTA در ۵ میلی لیتر آب دیونیزه حل گردید و به مدت ۵ دقیقه تحت امواج فراصوت بوسیله پروب سونیکیت قرار گرفت تا مخلوطی همگن بدست آید. سپس ۴,۸۸ میلی گرم EDC رادر ۲ میلی لیتر آب حل نموده و به نمونه اضافه گشت. مخلوط به مدت ۴۵ دقیقه هم زده شد و در انتها ۱۴,۶۵ میلی گرم DMAP و ۱۰ میلی گرم SN38 به مخلوط اضافه و به مدت ۴ روز هم زده شد. سپس مجدد ۴,۸۸ میلی گرم EDC و ۱۴,۶۵ میلی گرم DMAP تازه به نمونه افزوده و پس از ۴۵ دقیقه هم زدن، ۱۰ میلی گرم $\gamma\text{-CD-GO}$ حل شده در آب و سونیکیت شده به مخلوط اضافه شد و واکنش به مدت ۴ روز دیگر در دمای $25^{\circ}C$ درجه رفلاکس گردید.



شکل ۲- شماتیکی از اتصال کوالانسی SN38 به گاما-سیکلودکسترتین-گرافن اکساید بوسیله EDTA

۲-۶- کوردینه شدن Fe_3O_4 به کمپلکس γ -CD-GO-EDTA-SN38

۲۵ میلی مول از Fe_3O_4 سنتز شده به مخلوط کمپلکس γ -CD-GO-EDTA-SN38 اضافه گردید و به مدت یک شبانه روز در دمای اتاق بر روی شیکر تکان داده شد و در انتها با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتری فوژ گشته و سه مرتبه با آب مقطر شستشو داده شد، سپس محصول نهایی اتصال کوالانسی SN38 به نانوحامل (γ -CD-GO-EDTA-) Fe_3O_4 -SN38) به مدت ۲۴ ساعت در برابر آب مقطر دیالیز گردید. محصول بوسیله فریزدرايو خشک و در دمای $4^{\circ}C$ برای مطالعات بیشتر ذخیره شد.



شکل ۳- شماتیکی از کوردینه شدن Fe_3O_4 به کمپلکس γ -CD-GO-EDTA-SN38

۲-۶- اندازه بارگیری دارو

دارو می تواند به دو روش جذب سطحی و به دام افتادن به وسیله ی حامل و ذرات درون آن بارگذاری می شوند. در روش جذب سطحی، دارو بر روی سطح ذرات چسبیده و در محل تومور با قطع اتصال دارو با سطح ذره، در محیط آزاد می شود. در حالی که در روش به دام افتادن دارو به وسیله نیروی ذرات درون حامل، پس از قرارگرفتن ذره مورد نظر درون محلول حاوی دارو، در اثر

فشار اسمزی موجود در محلول، دارو به درون ذره نفوذ نموده و هنگامی که ذره در محل مورد نظر قرار می‌گیرد، آزادسازی دارو صورت می‌پذیرد. میزان بارگیری دارو با استفاده از فرمول زیر قابل محاسبه است [۱۸].

$$(1) \quad \text{درصد بارگیری دارو} = \frac{\text{داروی باقیمانده در نانوذرات}}{\text{مقدار داروی اولیه به کار رفته}} \times 100$$

برای تعیین مقدار داروی SN38 در نانوذرات γ -CD-GO-EDTA-Fe₃O₄، از روش طیف سنجی UV-Vis در طول موج ۳۹۰ nm با بلانک DMSO استفاده گردید.

۲-۷- بررسی آزاد سازی دارو (تست ریلیز)

میزان آزاد شدن دارو از نانوحامل و به دنبال آن سرعت رهش دارو، به میزان نیروهای میان دارو و ماتریکس حامل بستگی دارد. در آزمایشگاه، انتشار SN38 از کمپلکس دارویی سنتزی به روش دیالیز غشایی در برابر بافر سیترات (pH=5.4) و بافر فسفات (pH 7.4، PBS^۲) مورد بررسی قرار گرفت. این بافرها جهت شبیه‌سازی pH سلول‌های سرطانی و خون به ترتیب مورد استفاده قرار گرفتند، تا میزان آزاد سازی دارو از محدوده ورود مشخص گردد. برای این بررسی، ۱ ml از کمپلکس دارویی γ -CD-GO-EDTA-Fe₃O₄-SN38 در داخل غشای دیالیز قرار داده شد و در ۲۰۰ میلی‌لیتر PBS با غلظت 100mM غوطه‌ور گردید و در شیکر انکوباتور با سرعت ۶۰ دور بر دقیقه و با دمای ۶۰°C قرار داده شد. سپس در زمان مشخص شده، ۲۰۰ μ l از محیط PBS خارج نموده و بلافاصله با همان حجم با محیط تازه جایگزین گردید. این بررسی به مدت ۸ روز ادامه داشت. سپس، نمونه‌ها تحت آنالیز قرار گرفته و از آن برای تخمین مقدار SN38 رها شده از فرمولاسیون سنتزی بر حسب زمان با کمک طیف سنجی UV-vis در طول موج مرجع ۳۹۰ nm استفاده شد. به شیوه مشابه میزان آزاد سازی دارو با بافر سیترات نیز انجام گردید.

۲-۸- آزمون برون تنی فعالیت ضد توموری (MTT^۳)

برای کنترل وضعیت سلول‌ها در محیط کشت، میزان بقاء و همچنین بررسی وضعیت سلول‌ها بعد از تیمارهای مختلف دارویی از روش‌های مختلفی استفاده می‌شود. یکی از این روش‌ها تست MTT است که در آن میزان بقاء سلولی با تعیین کمی، یک محصول متابولیک مورد ارزیابی قرار می‌گیرد و بیانگر فعالیت میتوکندری سلول‌ها می‌باشد که رابطه مستقیم با بقاء سلول‌ها دارد. MTT یک نمک تترازولیوم زرد رنگ است و توسط آنزیم دهیدروژناز موجود در میتوکندری فعال سلول‌های زنده احیاء شده و به متابولیت ارغوانی رنگ فورمازان که کریستالی و نامحلول می‌باشد، تبدیل می‌گردد. سپس کریستال‌های تشکیل شده

² phosphate buffer saline

³ 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

در DMSO حل شده و شدت جذب نوری محلول رنگی حاصله توسط دستگاه الیزا ریدر^۴ در طول موج ۵۷۰ nm خوانده و اندازه گیری می شود. کاهش تعداد سلول های زنده در نمونه آزمایش، منجر به افت فعالیت متابولیکی کل آن گردیده و این کاهش، مستقیماً با میزان تشکیل کریستال های بنفش رنگ مرتبط بوده و میزان فعالیت میتوکندری و در نتیجه میزان زنده یا مرده بودن سلول ها را نشان می دهد. درصد زنده بودن سلول ها با تقسیم شدت جذب سلول های تیمار شده بر سلول های کنترل محاسبه گردید.

۹-۲- اثر شیمی درمانی - فتوحهراتی - فتودینامیکی

اثر شیمی درمانی - فتوحهراتی - فتودینامیکی کمپلکس سنتزی ارزیابی شده است. Fe_3O_4 ترکیبی است که این قابلیت را دارد که بتواند برای درمان هیپرترمیا استفاده شود، همچنین GO می تواند مقدار زیادی از گونه های فعال اکسیژن (ROS) و هیپرترمی محلی تولید نماید. بنابراین کمپلکس سنتز شده می تواند هر دو اثر فتوحهراتی - فتودینامیکی را داشته باشند. طول موج لیزر بهینه برای فتوحهراتی برابر با میزان بهینه برای فتودینامیکی یعنی ۸۰۸ نانومتر است [۱۹]. لذا نتیجه حاصل از تابش، ناشی از تاثیر گذاری هر دو اثر فتوحهراتی و فتودینامیکی خواهد بود. این ارزیابی بر روی سلول های سرطانی HT-29 انجام شد. سلول های سرطانی HT-29 به مدت ۲ ساعت با کمپلکس دارویی γ -CD-GO- Fe_3O_4 -EDTA-SN38 انکوبه شدند، پس از آن تحت تابش لیزر با طول موج (۸۰۸ nm) به مدت ۵ دقیقه و در غلظت ۵ و ۱۰ میکروگرم/ میلی لیتر قرار گرفتند.

۱۰-۲- آنالیز آماری

تمامی داده های مربوط به سمیت سلولی و اثر فتودینامیکی و فتوحهراتی با نرم افزار Prism6 مورد آنالیز قرار گرفتند. نتایج بصورت $mean \pm SD$ با حداقل سه بار تکرار نمونه ها بیان شد. تفاوت های آماری نتایج برای گروه های چندگانه با استفاده از One way ANOVA^۵ تعیین شد و سطح معناداری با (P value < 0.05) برای تفاوت ها در نظر گرفته شد.

۳- بحث و نتیجه گیری

۳-۱- مشخصات فیزیکی و شیمیایی نانوذرات

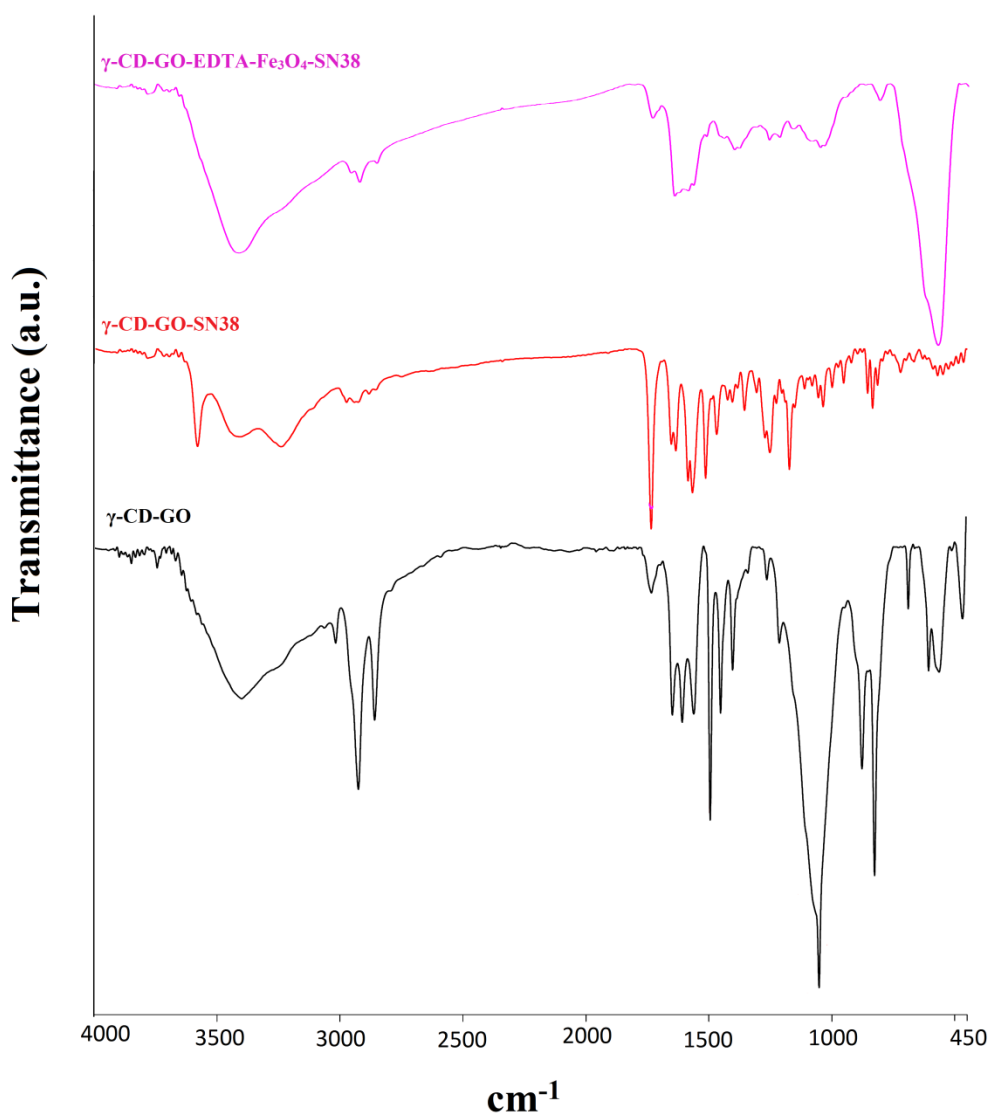
طیف FTIR گرافن اکساید و γ -CD-GO و نانوکمپلکس دارویی آماده شده، مورد بررسی قرار گرفت (تصویر ۱). تصویر FT-IR ترکیبات، در محدوده ی طول موج های 450 cm^{-1} تا 4000 cm^{-1} برای نمایش حضور گروه های عاملی موجود بر سطح مواد سنتزی به شکل کامل و مشخص توسط دستگاه (Shimadzu FT-IR spectrophotometer, Japan) انجام شد. در طیف FTIR کمپلکس γ -CD-GO، در طول موج 3420 cm^{-1} یک پیک بزرگ مشاهده می شود که مرتبط با ارتعاش

⁴ ELISA Reader

⁵ analysis of variance

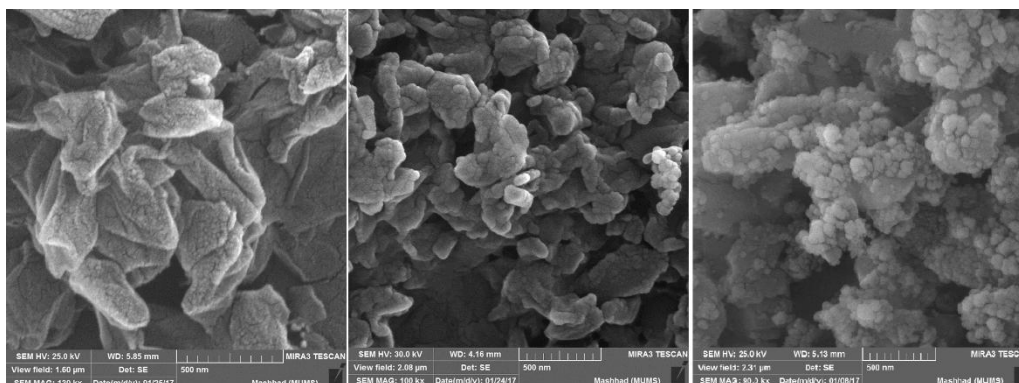
کششی O-H است و به گروه‌های هیدروکسیل موجود بر سطح گرافن اکساید مربوط می‌شود. پیک دیگر موجود در طول موج 1730 cm^{-1} ، مرتبط با گروه عاملی کربوکسیل (C=O) است. پیوند دوگانه C=C از طرق پیک ایجاد شده از کشش ساختاری در محدوده‌ی طول موجی 1620 cm^{-1} قابل تشخیص است. پیک‌های 1375 cm^{-1} و 1575 cm^{-1} نیز به ترتیب مربوط به گروه‌های عاملی C-OH و C-O-C است، وجود این پیک‌ها بیانگر حضور گرافن اکساید در ترکیبات است. همچنین اتصال انواع متفاوت سیکلودکستری‌ن به گرافن اکساید با حضور پیک‌های مشخصه سیکلودکستری‌ن در طیف FT-IR قابل تایید است. پیک موجود در 2925 cm^{-1} به ارتعاشات کششی متقارن C-H مربوط می‌شود. پیک‌های موجود در 1030 cm^{-1} و 942 cm^{-1} به ترتیب به ارتعاشات غیرمتقارن گلوکز (C-O-C) و ارتعاشات ساختاری R-1,4-bond اختصاص دارد [۲۰]. تمام پیک‌های مشخص شده، حضور سیکلودکستری‌ن را تایید می‌کند. کمپلکس دارویی نیز مورد بررسی آنالیز FTIR قرار گرفتند. کمپلکس γ -CD-GO-SN38 مربوط به اتصال غیر کووالانسی داروی SN38 به گاما-سیکلودکستری‌ن-گرافن اکساید است. در طیف FT-IR این ترکیب، پیک مشخصه مربوط به SN38 در 3580 cm^{-1} به طور مشخص قابل مشاهده است و مربوط به گروه OH موجود در ساختار SN38 می‌باشد.

در طیف FT-IR محصول نهایی سنتز کووالانسی کمپلکس دارویی (γ -CD-GO-EDTA-Fe₃O₄-SN38)، پیک مشخصه مربوط به SN38 در 3580 cm^{-1} به علت واکنش این گروه عاملی (OH) در اتصال کووالانسی به سیکلودکستری‌ن-گرافن اکساید توسط EDTA، قابل مشاهده نیست و تایید کننده اتصال کووالانسی این گروه عاملی است و تک پیک قوی موجود در 570 cm^{-1} به ارتعاشات پیوند Fe-O مربوط است که حضور ذرات Fe₃O₄ را در محصول نهایی تایید می‌کند. همچنین حضور پیک‌های مشخصه سایر ترکیبات پایه از جمله گرافن اکساید و سیکلودکستری‌ن-گرافن اکساید در محصول نهایی قابل مشاهده و شناسایی است.



شکل ۴- طیف FTIR، γ -CD-GO، γ -CD-GO-EDTA-Fe₃O₄-SN38

برای مشاهده مورفولوژی سطح نانوذرات GO، γ -CD-GO، γ -CD-GO-EDTA-Fe₃O₄-SN38 از میکروسکوپ الکترونی عبوری (FE-SEM, Mira III FEG, TESCAN-UK, Ltd.) استفاده شد. برای این منظور نانوذرات سنتزی به کمک حمام سونیکیتور در آب دیونیزه پخش شد و نمونه بر روی فویل آلومینیومی قرار داده شد. بعد از اطمینان از خشک شدن نمونه‌ها، با ورقه‌های طلا روکش گردید و تصویربرداری انجام شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانوذرات گرافن اکساید بصورت سطوحی مسطح و دارای چین خوردگی هستند که به عنوان پایه برای سایر ترکیبات به کار می‌روند. تصاویر نانو ذرات گاما-سیکلودکسترین-گرافن اکساید، نشان می‌دهد که سیکلودکسترین سطح گرافن اکساید را پوشانده اند و در تصویر کمپلکس دارویی γ -CD-GO-EDTA-Fe₃O₄-SN38 حضور ذرات SN38 و Fe₃O₄ به صورت اشکال کروی و جدا از هم بر روی سطح گرافن اکساید قابل مشاهده می‌باشند.



شکل ۵- تصاویر FE-SEM، γ -CD-GO، γ -CD-GO-EDTA- Fe_3O_4 -SN38

برای تعیین سایز و پتانسیل زتا فرمولاسیون سنتزی، از روش پراکندگی نوری پویا (DLS) و یا طیف سنجی همبستگی نوری، با کمک دستگاه زتاسایزر استفاده شد. برای این منظور، مقدار ۱ میلی گرم از از کمپلکس دارویی در ۱ میلی لیتر آب دیونیزه با کمک حمام سونیکیتور پخش شد و در داخل کووت دستگاه قرار داده شد و سایز و پتانسیل زتای فرمولاسیون سنتزی بدست آمد. میانگین سایز ذرات در حدود ۲۰۰ نانومتر است و پتانسیل زتا اندازه گیری شده دارای بار منفی می باشد.

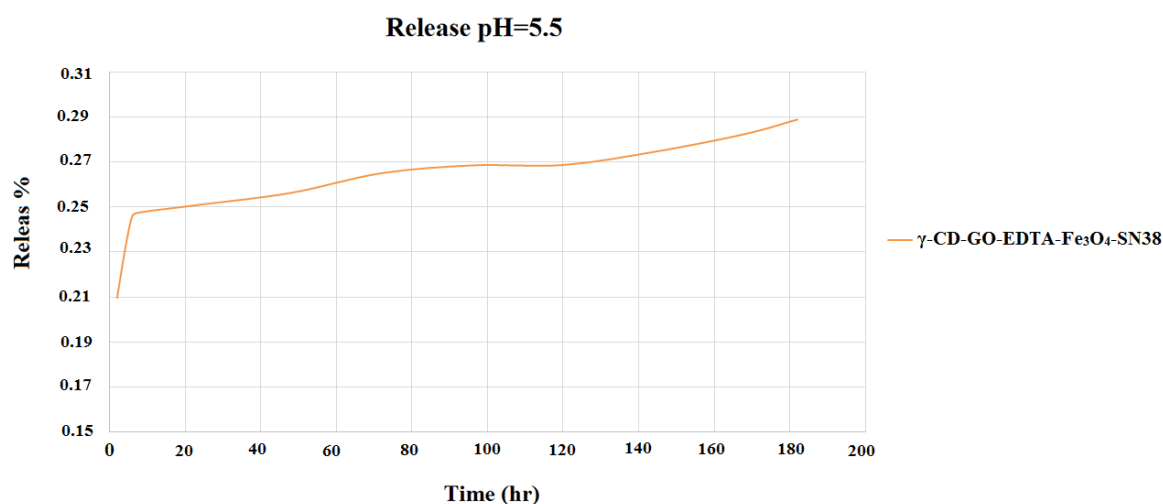
جدول ۱. میانگین سایز و پتانسیل زتای نانو کمپلکس دارویی سنتز شده

Sample	Average size(nm)	Zeta potential(mV)
γ -CD-GO- Fe_3O_4 -EDTA-SN38	202.9 ± 34.07	$(-10.73) \pm 0.69$

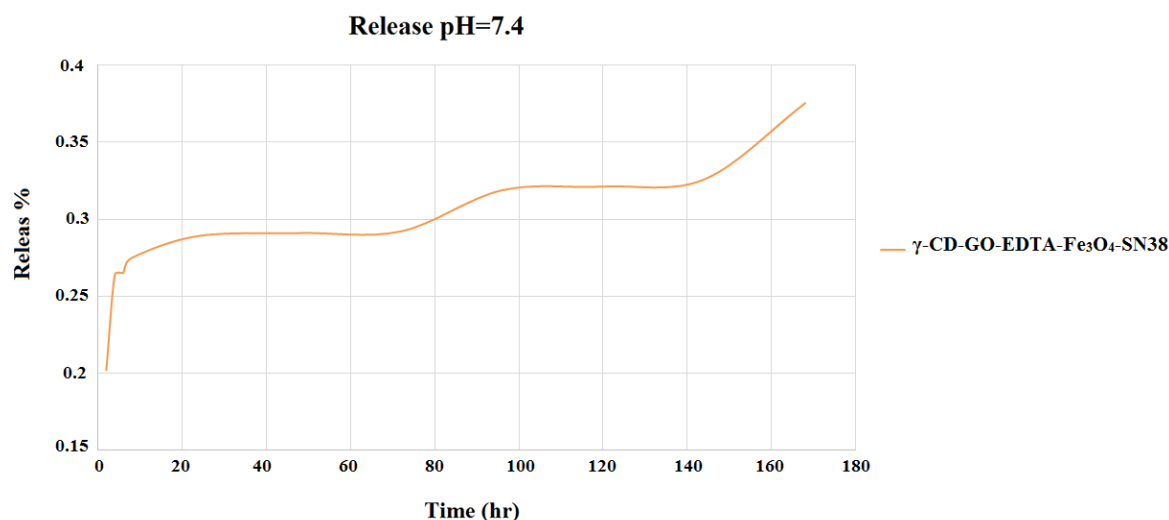
ظرفیت بارگیری SN38 محاسبه شده برای کمپلکس دارویی γ -CD-GO- Fe_3O_4 -EDTA-SN38 در حدود ۱۸٪ است.

۳-۲- رهاسازی بررون تنی دارو

مقدار رهاسازی تجمعی SN38 از γ -CD-GO-EDTA- Fe_3O_4 -SN38 در فواصل زمانی مشخص (۲، ۴، ۶ و ۸ ساعت و ۱ تا ۸ روز) در محیط بافری PBS با pH= ۷/۴ و بافر سیترات با pH= ۷/۴، با کمک طیف سنجی UV-Vis در طول موج ۳۹۰ nm حاصل شد. در شکل (۶) و (۷)، منحنی رهاسازی تجمعی داروی SN38 از فرمولاسیون سنتزی γ -CD-GO-EDTA- Fe_3O_4 -SN38 در فواصل زمانی مشخص آمده است. مطابق شکل، رهاسازی دارو از نانوذرات در شرایط طبیعی (pH=۷/۴) بصورت پیوسته و کنترل شده می باشد. میزان آزاد سازی در pH ۵,۵ و ۷,۴ در پایان روز ۸ به ترتیب در حدود ۲۹٪ و ۳۵٪ است.



شکل ۶- درصد رهاسازی تجمعی برون تنی SN38 از کمپلکس دارویی در فواصل زمانی مختلف در pH 5.5

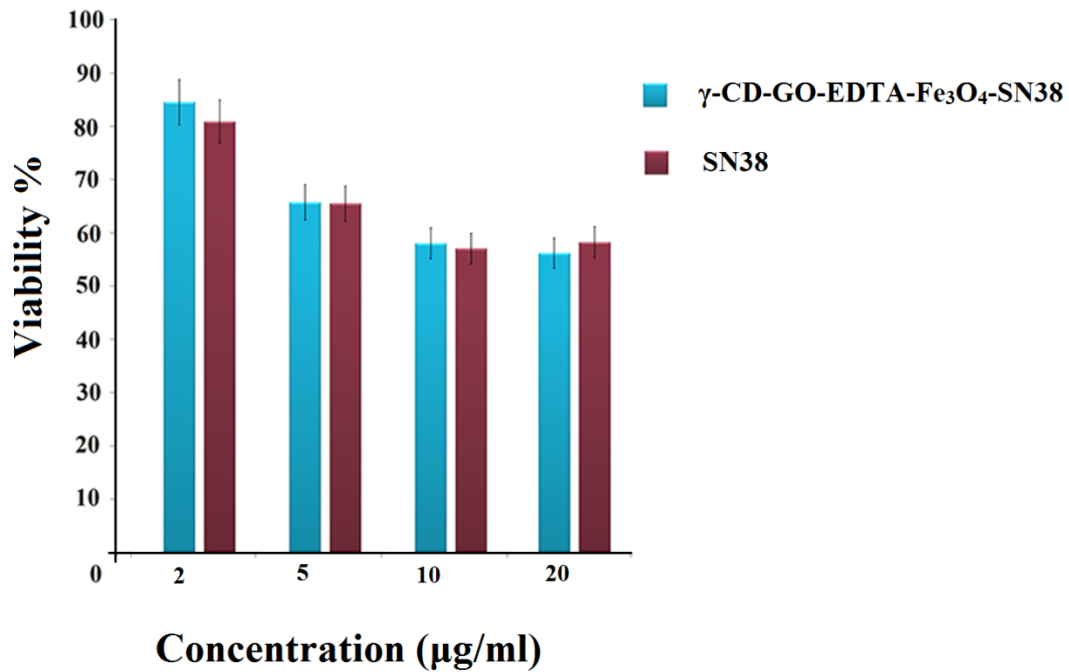


شکل ۷- درصد رهاسازی تجمعی برون تنی SN38 از کمپلکس دارویی در فواصل زمانی مختلف در pH 7.4

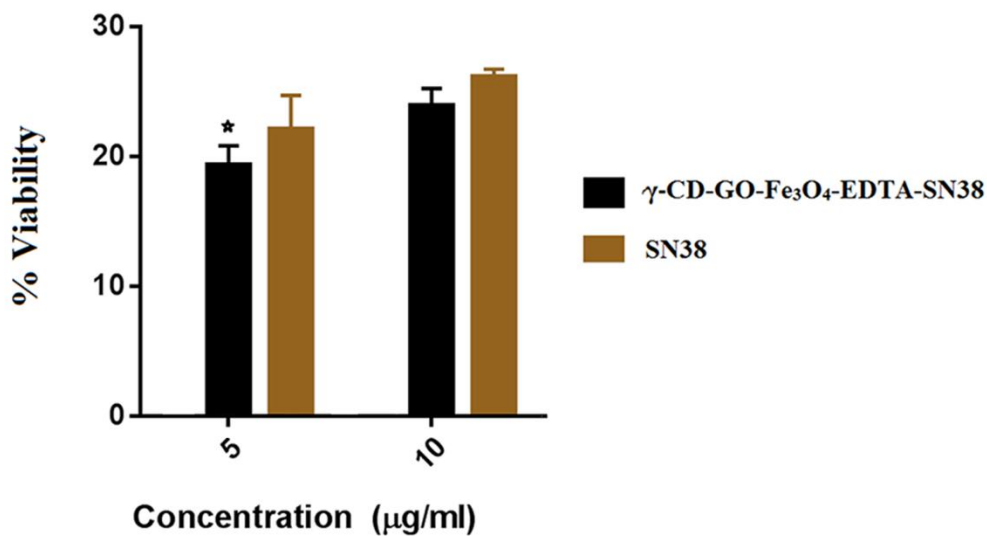
۳-۳- نتایج درمان سلول‌ها با نانوکمپلکس دارویی γ -CD-GO-EDTA-Fe₃O₄-SN38

آزمون برون تنی سمیت سلولی با استفاده از تست MTT تعیین گردید. لازم به ذکر است برای اطمینان از عدم مرگ سلول‌ها، توسط نانوذرات پایه سنتز شده، سلول‌ها در مجاورت غلظت‌های مختلف نانوذرات قرار گرفته و تست MTT برای آن‌ها انجام شد. بر طبق نتایج قبلی، سمیت سلولی γ -CD-GO و GO با غلظت‌های مختلف توسط سلول‌های HT-29 سمیتی چندانی ندارند [۱۶]. بنابراین حامل‌ها به تنهایی نمی‌توانند سمیت قابل توجهی بر روی سلول‌های HT-29 داشته باشند. برای بررسی و مقایسه درمان با SN38 و درمان با نانو ذرات حامل SN38، سمیت سلولی دارو و کمپلکس حامل دارو در رنج غلظتی معادل با غلظت‌های $1 \mu\text{M}$ تا $20 \mu\text{M}$ ، SN38 با زمان انکوباسیون ۴۸ ساعت به کمک آزمون MTT مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. همان‌طور که در شکل (۸) مشخص است نتایج نشان می‌دهد که γ -CD-GO-EDTA-Fe₃O₄-SN38 دارای سمیتی معادل

با سمیت SN38 به عنوان داروی آزاد بر روی سلول‌های سرطانی HT-29 است، اما این سمیت در اثر تابش نور در طول موج ۸۰۸ نانومتر به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد. ترکیب اثر شیمی درمانی به همراه نوردرمانی فرمولاسیون سنتزی در غلظت‌های متفاوت در شکل (۹) نشان داده شده است. همان طور که مشخص است کمپلکس دارویی سمیت قابل توجهی را در غلظت ۵ μM به SN38 به عنوان شاهد، نشان می‌دهند که بیانگر موفقیت در درمان این کمپلکس دارویی است.



شکل ۸- بررسی و مقایسه درمان با SN38 و درمان با نانو کمپلکس سنتزی



شکل ۹- بررسی تفاوت‌های آماری درصد بقای رده سلولی HT-29 تحت درمان با SN38 و کمپلکس دارویی

۴- نتیجه گیری

همان طور که قبلاً ذکر شد، دلیل محدودیت استفاده از SN38 در کلینیک‌ها، حلالیت کم و هیدرولیز شدن آن در $\text{pH} > 6$ است [۱۸] و از آنجا که افزایش دوز در شیمی‌درمانی چندان کاربردی و قابل اجرا نیست. یکی از رویکردهای در حال ظهور، استفاده از نانوذرات سازگار با محیط زیست است که عامل هیدروفوب را جذب می‌کند و ثبات و حلالیت مولکول را بهبود بخشد. در مطالعه حاضر، فرمولا سیون زیست سازگار و پایدار $\gamma\text{-CD-GO}$ با ابعاد نانومتری تهیه شدند. سپس Fe_3O_4 و SN38 بر روی نانو صفحات گرافنی با استفاده از EDTA بارگیری گردید و مشاهده شد که عامل دار کردن گرافن اکساید با گاما سیکلودکسترین باعث افزایش حلالیت دارو و ساخت فرمولا سیونی پایدار شد. فرم اتصال کووالانسی سنتزی به منظور ارزیابی کارایی در دارورسانی مورد بررسی قرار گرفت. فرمولا سیون $\gamma\text{-CD-GO-Fe}_3\text{O}_4\text{-SN38}$ با اندازه ذرات ۲۰۲ نانومتر اثرات سمیت معادل با SN38 بر روی سلول‌های سرطانی HT-29 دارند، با این حال، نتایج اثر فتوحارتی- فتودینامیکی نشان می‌دهد که قرار گرفتن تحت تابش سبب می‌شود که هر این فرم سمیت بیشتری نسبت SN38 داشته باشند و این امر بیانگر موفقیت در اهداف مورد نظرمان است. اگر چه تحقیقات بیشتری مورد نیاز است، اما یافته‌های تحقیق نشان داد که فرمولا سیون سنتزی براساس نتایج، پتانسیل خوبی برای استفاده به عنوان شیمی درمانی به همراه نوردرمانی دارد.

۵- مراجع

- [1] A. Behnaz, S. Sayedeh Maryam, M. Leila, *J. Of Applied Chemistry*, **35** (1394) 45, in Persian.
- [2] S.-Y. Lee, C.-Y. Yang, C.-L. Peng, M.-F. Wei, K.-C. Chen, C.-J. Yao, M.-J. Shieh, A theranostic micelleplex co-delivering SN-38 and VEGF siRNA for colorectal cancer therapy, *Biomaterials*, **86** (2016) 92.
- [3] M. Gan, W. Zhang, S. Wei, H. Dang, The influence of mPEG-PCL and mPEG-PLGA on encapsulation efficiency and drug-loading of SN-38 NPs, *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, **45** (2017) 38.
- [4] Y. Jia, M. Yuan, H. Yuan, X. Huang, X. Sui, X. Cui, F. Tang, J. Peng, J. Chen, S. Lu, Co-encapsulation of magnetic Fe_3O_4 nanoparticles and doxorubicin into biodegradable PLGA nanocarriers for intratumoral drug delivery, *International journal of nanomedicine*, **7** (2012) 1697.
- [5] R.M. England, J.I. Hare, J. Barnes, J. Wilson, A. Smith, N. Strittmatter, P.D. Kemmitt, M.J. Waring, S.T. Barry, C. Alexander, Tumour regression and improved gastrointestinal tolerability from controlled release of SN-38 from novel polyoxazoline-modified dendrimers, *Journal of Controlled Release*, **247** (2017) 73.
- [6] H.Z.M. Aisan Khaligh, Alimorad Rashidi, Ultrasonic assisted removal of Ni(II) and Co(II) ions from aqueous solutions by carboxylated nanoporous graphene, *Journal of Applied Chemistry*, **11** (2017) 10.

- [7] P. Tahereh, G. Hadi, Sh. Mohammad reza, B. Y. Mohsen, *J. Of Applied Chemistry*, **26** (1392) 9, in Persian.
- [8] W. Hu, C. Peng, W. Luo, M. Lv, X. Li, D. Li, Q. Huang, C. Fan, Graphene-based antibacterial paper, *ACS nano*, **4** (2010) 4317.
- [9] V. Georgakilas, *Functionalization of graphene*, First ed., John Wiley & Sons, Germany, 2014.
- [10] Y. Guo, S. Guo, J. Li, E. Wang, S. Dong, Cyclodextrin-graphene hybrid nanosheets as enhanced sensing platform for ultrasensitive determination of carbendazim, *Talanta*, **84** (2011) 60.
- [11] E.M. Del Valle, Cyclodextrins and their uses: a review, *Process biochemistry*, **39** (2004) 1033.
- [12] C. Foulon, J. Tedou, T.Q. Lamerie, C. Vaccher, J. Bonte, J. Goossens, Assessment of the complexation degree of camptothecin derivatives and cyclodextrins using spectroscopic and separative methodologies, *Tetrahedron: Asymmetry*, **20** (2009) 2482.
- [13] N. Zafar, H. Fessi, A. Elaissari, Cyclodextrin containing biodegradable particles: from preparation to drug delivery applications, *International journal of pharmaceutics*, **461** (2014) 351.
- [14] Z. Liu, J.T. Robinson, X. Sun, H. Dai, PEGylated nano-graphene oxide for delivery of water insoluble cancer drugs, *Journal of the American Chemical Society*, **130** (2008) 10876.
- [15] W.S. Hummers Jr, R.E. Offeman, Preparation of graphitic oxide, *Journal of the American Chemical Society*, **80** (1958) 1339.
- [16] E.Einafshar, A.Haghighi Asl, A.Hashem Nia, M.Mohammadi, A.Malekzadeh, M.Ramezani, New cyclodextrin-based nanocarriers for drug delivery and phototherapy using an irinotecan metabolite *Carbohydr Polym*, **194** (2018) 103.
- [17] H. El Ghandoor, H. Zidan, M.M. Khalil, M. Ismail, Synthesis and some physical properties of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles, *Int. J. Electrochem. Sci*, **7** (2012) 5734.
- [18] N. Sepehri, H. Rouhani, F. Tavassolian, H. Montazeri, M.R. Khoshayand, M.H. Ghahremani, S.N. Ostad, F. Atyabi, R. Dinarvand, SN38 polymeric nanoparticles: in vitro cytotoxicity and in vivo antitumor efficacy in xenograft balb/c model with breast cancer versus irinotecan, *International journal of pharmaceutics*, **471** (2014) 485.
- [19] E.S. Shibu, M. Hamada, N. Murase, V. Biju, Nanomaterials formulations for photothermal and photodynamic therapy of cancer, *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, **15** (2013) 53.
- [20] V. Štengl, S. Bakardjieva, T.M. Grygar, J. Bludská, M. Kormunda, TiO₂-graphene oxide nanocomposite as advanced photocatalytic materials, *Chemistry Central Journal*, **7** (2013) 41.

