



بررسی سمیت سلولی نقاط کوانتومی گرافن بر سلول‌های سرطانی پستان MCF-7

الهام حویزی: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران (* نویسنده مسئول) e.hoveizi@scu.ac.ir
پیمان عبدالعلی نژاد: دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

نقاط کوانتومی گرافن،
سرطان پستان،
داربست هیدروژل،
سمیت سلولی

زمینه و هدف: سرطان پستان عامل بیشترین مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان است. ترکیبات گرافنی دارای خواص مهم درمانی از جمله خاصیت ضد سرطانی هستند. هدف این مطالعه، بررسی و مقایسه اثرات غلظت‌های مختلف نقاط کوانتومی گرافن (graphene quantum dots: GQDs) بر سلول‌های سرطانی پستان بود.

روش کار: سلول‌های سرطانی پستان رده MCF-7 در داربست هیدروژل کشت و با غلظت‌های ۱۰، ۷، ۵ و ۱ میلی گرم بر میلی لیتر GQDs به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. برای سنجش میزان بقاء و مورفولوژی سلول‌ها از روش MTT و رنگ آمیزی‌های اکریدین اورنج و دیی استفاده گردید.

یافته‌ها: GQDs در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر و در زمان ۷۲ ساعت اثر کشندگی بیشتری روی سلول‌ها داشت و باعث تغییرات مورفولوژیکی مشهودی در سلول‌ها شد. غلظت IC50 برای GQDs در سلول‌های MCF-7 حدود ۷ میلی گرم بر میلی لیتر محاسبه شد ($P > 0.05$).

نتیجه گیری: GQDs دارای اثر سمیت سلولی بصورت وابسته به دوز و زمان بر سلول‌های سرطانی پستان MCF-7 است و می‌تواند به عنوان کاندیدی از ترکیبات ضد سرطان مورد توجه قرار گیرد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: دانشگاه شهیدچمران اهواز

شیوه استناد به این مقاله:

Hoveizi E, Abdolali nejad P. Evaluation of Graphene Quantum Dots Cytotoxicity on Breast Cancer MCF-7 Cells. Razi J Med Sci. 2021;28(9):31-44.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با **CC BY-NC-SA 3.0** صورت گرفته است.



Original Article

Evaluation of Graphene Quantum Dots Cytotoxicity on Breast Cancer MCF-7 Cells

- Elham Hoveizi:** Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran (* Corresponding author) e.hoveizi@scu.ac.ir
Peyman Abdolali nejad: MSc Student, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Abstract

Background & Aims: Breast cancer is one of the most common cancers today and how to deal with it is one of the challenges for oncologists today (1). One of the new treatment strategies is the use of nanotechnology in the field of cancer (1, 2). Nanoparticles are the most common elements in nanoscience and technology, whose interesting properties have led to a wide variety of applications (5). In this regard, graphene quantum dots (GQDs) can be used as an excellent option for nanomedical fields such as the release of anti-cancer drugs, cell culture, and tissue engineering (7, 8). Considering the role of nanoparticles as well as the antitumor effects of graphene compounds, it seems the use of these nanoparticles in 3D culture can be one of the useful strategies in suppressing cancer cells with fewer side effects (9). Therefore, the aim of this project was to compare the apoptotic effects of graphene quantum dots on the MCF-7 breast cancer cell line cultured in hydrogel scaffolds.

Methods: In this study, the MCF-7 breast cancer cell line was used as cancer cells. For cell culture in fibrin hydrogel scaffold, M199 medium containing 10% FBS serum and 1% penicillin/streptomycin and fibrinogen powder with a concentration of 3 mg/ml was used and it was added into each plate well of 24 wells and then cell suspension was added. Then, for 500 μ l of scaffolding and cells, 15 μ l of thrombin with a concentration of 120 u/ml was added in each well and it was immediately gently aspirated until the culture medium became gelatinous and the cell culture plate was transferred to the incubator. After 2 hours of cell incubation in the incubator (Sina, Iran), On the gelatinous scaffolding of each 24 well plates, 500 μ l of M199 medium containing 10% FBS serum and 1% antibiotic was added and transferred to the incubator again. Cell treatment was performed by first removing the culture medium from each well and concentrations of 1, 5, 7, and 10 mg/ml of graphene quantum dots were added. But only the culture medium was added to the control group. The plate was transferred to the incubator and treated for 1, 3, and 5 days. In this study, MCF-7 cells were cultured on a fibrin hydrogel scaffold for SEM imaging and after 24 hours of incubation, the medium was gently removed on each well. 300 μ l of PBS was added to each 24-well plate and wash three times and 300 μ l of 2.5% glutaraldehyde solution was added to each well and maintained at room temperature for 2 hours. Dehydration was done with increasing concentration of alcohol (30, 50, 70, 80, 90, 100, 100%) and then close the door of the plate and maintained in the freezer for 2 hours and freeze it to dry and dehydrate the fibrin hydrogel. MTT method and acridine orange and DAPI stains were used to measure cell survival and morphology. One-way ANOVA and t-test were used for statistical

Keywords

Graphene quantum dots,
Breast cancer,
Hydrogel scaffold,
Cytotoxicity

Received: 04/09/2021

Published: 04/12/2021

analysis. The chart was drawn in Excel 2016. $P < 0.05$ was considered a significant difference for samples.

Results: The results of scaffold morphology study using SEM electron microscope, showing the desired mechanical properties and suitable porosity for the scaffold. Therefore, the presence, growth, proliferation, and proper adhesion of cells to the scaffold and the natural morphology of the cells were confirmed. The results of the MTT test showed that the viability and survival of MCF-7 cells after exposure to the mentioned doses of graphene quantum dots were recorded (98, 81, 50, and 31%) respectively. This indicates that the viability of MCF-7 cells is significantly dependent on the concentration of graphene quantum dots. IC50 concentration of GQDs affecting MCF-7 cells was determined to be 7 mg/ml and after 1, 3, and 5 days decreased in a time-dependent manner so that after 24 hours, the average cell survival decreased to 50%, after 3 days to 35% and after 5 days to 22%. These data also showed the cytotoxic effect of IC50 concentration of graphene quantum dots on cells in a time-dependent manner. Also, the results of acridine and DAPI staining in GQDs-treated groups showed compact, fragmented, single, and orange nuclei, which indicated the onset of apoptosis in MCF-7 cells being treated. While in the control group cells that did not receive GQDs, the nuclei were clear, round, large, and in the form of light green clusters, which was a sign that the control group cells were alive.

Conclusion: In this study, the effects of graphene quantum dots on MCF-7 cancer cells cultured on fibrin hydrogel were investigated. The results showed that GODs had a cytotoxic effect on MCF-7 cancer cells, so these effects were dependent on the time and dose in the experiment. In fact, with increasing concentration and time, the toxicity of graphene quantum dots increased. In this study, the IC50 for GODs was calculated to be 7 mg/ml by MTT test. Examination of morphological changes with an inverted microscope and also, qualitative studies of the nucleus characteristics of control and treatment cells confirmed the induction of apoptosis in the treated cells. In addition, the results of acridine orange staining were another confirmation of these findings. As mentioned, graphene and its many derivatives, as well as graphene quantum dots, which is one of the newest products of graphene, have been used for valuable research. According to the results of this study, GQDs have a toxicity effect and induce dose-dependent and time-dependent apoptosis in cultured breast cancer cells on fibrin hydrogel. However, more studies are needed to determine the molecular mechanism involved. In addition, it is suggested that the effects of GQDs on other cancer cells and normal cell lines be investigated and compared.

Conflicts of interest: None

Funding: Shahid Chamran University of Ahvaz

Cite this article as:

Hoveizi E, Abdolali nejad P. Evaluation of Graphene Quantum Dots Cytotoxicity on Breast Cancer MCF-7 Cells. Razi J Med Sci. 2021;28(9):31-44.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

مقدمه

امروزه بیماری‌های صعب‌العلاج فراوانی در جامعه‌ی بشریت گسترش یافته‌اند. سرطان یکی از این بیماری‌ها بوده که دومین عامل مرگ در جهان بعد از بیماری‌های قلبی است (۱). سرطان یک شرایط کنترل نشده از تکثیر سلولی است و هنگامی رخ می‌دهد که سلول‌های عادی شروع به رشد خارج از کنترل کنند. انواع مختلفی از سرطان‌ها وجود دارد. از جمله شایع‌ترین سرطان‌ها، سرطان پستان است بطوری که سالانه میلیون‌ها نفر در جهان به این نوع سرطان مبتلا می‌شوند (۲). سرطان پستان به نوعی سرطان گفته می‌شود که از بافت پستان آغاز می‌شود. زن بودن، مهم‌ترین عامل احتمال بروز سرطان پستان است. اگرچه مردان نیز به این سرطان مبتلا می‌شوند اما احتمال آن در زنان بیش از صد برابر است (۳).

نحوه‌ی مقابله با بیماری سرطان پستان یکی از چالش‌های امروز سرطان شناسان است. طی دهه‌های اخیر معمولاً از روش‌های شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و جراحی استفاده شده است. این روش‌ها دارای نقاط ضعفی مانند نرسیدن دارو با غلظت کافی به تومور و عدم دقت لازم در دارو رسانی هستند که از عوارض جانبی آن‌ها مقاوم شدن بدن در برابر دارو است. بنابراین ابداع راهکارهای درمانی جدید، موثر و بدون عوارض جانبی، ضروری است (۴).

یکی از این راهکارهای جدید استفاده از نانوتکنولوژی در زمینه‌ی درمان سرطان است. نانو ذرات رایج‌ترین عناصر در علم و فناوری نانو بوده که خواص جالب توجه آنها باعث گردیده کاربردهای وسیع و بسیار متنوعی داشته باشند. نانوذرات مواد طبیعی یا مصنوعی هستند که می‌توانند از روش‌های مختلف سنتز شوند و معمولاً ساختار کریستالی دارند. تبدیل کردن مواد به مقیاس نانو عمدتاً می‌تواند خواص آن‌ها را تغییر دهد (۵). نانوذرات با ترکیبات و اندازه‌ها، شکل و خصوصیات شیمیایی سطحی مختلف می‌توانند کاربردهای بیولوژیکی و زیست‌پزشکی مختلفی داشته باشند. کاهش اندازه‌ی مواد در مقیاس نانو می‌تواند اغلب باعث تغییر شکل الکتریکی، مغناطیسی، خواص ساختاری و مورفولوژیکی و شیمیایی آن‌ها شود (۶). نانوذرات مورد استفاده در دو گروه اصلی طبقه بندی

می‌گردند. ذراتی که حاوی مولکول‌های آلی به عنوان ماده‌ی اصلی ساختمانی هستند و گروه دوم که معمولاً دارای فلزات و عناصر معدنی به عنوان هسته‌ی مرکزی می‌باشند. نقاط کوانتومی (QD) نانوذرات فلئورسنتی (۱۰-۲ نانومتر) هستند که شامل یک هسته‌ی مرکزی از صدها تا هزاران اتم از عناصر گروه ۲، ۶ و یا گروه ۳ و ۵ می‌باشند (۷).

گرافن، یک لایه از اتم‌های کربن، با هیبریداسیون sp² مرتب شده در یک بافت لانه زنبوری دو بعدی و شبکه‌ی کریستالی است که مورد توجه بسیاری از مجامع علمی می‌باشد. گرافن در صورت اصلاح مناسب می‌تواند به عنوان یک گزینه‌ی بسیار عالی برای زمینه‌های نانوپزشکی و بیوپزشکی از جمله رهایش داروهای ضد سرطان، حسگر زیستی، تصویربرداری زیستی، کاربردهای ضدباکتریایی، کشت سلول و مهندسی بافت مورد استفاده قرار گیرد (۸، ۹).

گرافن خصوصیات منحصر به فردی دارد و در مصارف پزشکی دارای نقش‌های متنوع و مهمی می‌باشد؛ از جمله در زمینه انتقال دارو مولکول‌های زیستی نقش ترکیبات گرافن غیرقابل انکار است. همچنین با توجه به خواص شیمیایی و فیزیکی، گرافن کاربردهای مهمی در زمینه مهندسی بافت و سرطان دارد (۹). در ارتباط با سمیت سلولی ترکیبات گرافن تناقضاتی مطرح است و تاکنون مطالعه جامعی در این زمینه صورت نگرفته و نتایج متناقضی انتشار یافته است که احتیاج به بررسی‌های دقیق‌تر دارند. از آنجایی که گرافن از عنصر کربن تشکیل شده که به صورت ذاتی با محیط‌های زیستی سازگار است بنابراین استفاده از ترکیبات گرافن در کاربردهای زیست پزشکی بسیار پیشنهاد شده است من جمله اینکه در سیستم‌های تحویل دارویی کاربردهای وسیعی داشته است (۱۰). همچنین مطالعات نشان می‌دهد که ترکیبات گرافنی با مکانیسم‌هایی مانند شکستن فیزیکی غشای سلولی و فعالیت گونه‌های اکسیژن می‌توانند دارای خواص ضد باکتریایی و القا کننده آپوپتوز سلولی باشند. در زمینه سمیت ترکیبات گرافن مکانیسم‌های دقیق آن هنوز مشخص نشده است و در این زمینه اطلاعات محدودی موجود است بنابراین هرگونه مطالعه در ارتباط با تاثیرات ترکیبات گرافن با سیستم‌های زنده ضروری به

با توجه به نقش ضد توموری ترکیبات کوانتومی گرافن، به نظر می‌رسد استفاده این ترکیبات می‌تواند یکی از راهکارهای مفید در سرکوب مناسب سلول‌های سرطانی با عوارض جانبی کمتر باشد. لذا هدف از انجام این پروژه بررسی اثرات سیتوتوکسیک ذرات کوانتومی گرافن (GQDs) بر رده‌ی سلول‌های سرطانی پستان MCF-7 کشت داده شده در داربست‌های هیدروژل می‌باشد.

روش کار

این کار تجربی حاصل پایان‌نامه دانشجوی کارشناسی ارشد سلولی تک‌وینی با کد اخلاق EE.97.243.93365/scu.ac.ir می‌باشد که در آزمایشگاه تحقیقاتی کشت سلول دانشگاه شهید چمران اهواز انجام گرفته است.

محیط کشت (M199): پودر محیط کشت M199 از شرکت Gibco با بی‌کربنات سدیم به میزان و نسبت‌های معین در آب دیونیزه اتوکلاو شده و استریل، در دمای اتاق حل گردید و عمل فیلتراسیون با سرنگ و فیلتر سرسرنگی با منافذهای ۰/۲۲ میکرون در شرایط استریل انجام، پس از آن تنظیم Ph صورت گرفت و در فالکن‌های استریل ۵۰ میلی‌لیتری در دمای ۲-۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تهیه سلول: در این پژوهش، از رده سلول‌های سرطان پستان MCF-7 به عنوان سلول سرطانی استفاده شد. سلول‌ها از انیستیتو پاستور تهران به صورت کشت داده شده در فلاسک T-25 خریداری شد و سپس در انکوباتور نگهداری شد تا زمانی که به تراکم ۷۰-۸۰ درصد رسید، پاساژ انجام شود.

پاساژ سلولی: فلاسک‌ها (SPL, Korea) روزانه در شرایط استریل با میکروسکوپ معکوس (Bioered, USA) از نظر رشد، تقسیم سلولی، مورفولوژی سلولی و همچنین کنترل آلودگی باکتریایی و قارچی مورد بازدید قرار گرفتند و در صورت تغییر رنگ در محیط، تعویض محیط هر ۴۸ ساعت انجام گرفت. پس از اینکه تراکم سلول‌ها در فلاسک به حدود ۷۰ تا ۸۰ درصد رسید پاساژ با تریپسین / EDTA (Gibco, USA) انجام شد. سپس با پیپت پاستور استریل محتویات فلاسک به فالکون ۱۵ سی‌سی منتقل و با دور rpm ۱۵۰۰ به مدت

نظر می‌رسد. در سیستم‌های زنده سمیت ترکیبات گرافن به الگوی جذب سلول‌های مختلف، مسیره‌های متفاوت ورود و خروج ترکیبات گرافن و بعلاوه روش ساخت این ترکیبات وابسته است (۱۱). مطالعات نشان می‌دهند ترکیبات گرافن از طرق مختلف مانند آندوسیتوز می‌توانند وارد سلول شده و گونه‌های اکسیژن فعال و همچنین فعالیت لاکتات دهیدروژنازها را افزایش دهند. به علاوه مطالعات نشان می‌دهد ترکیبات گرافن منجر به آسیب‌هایی از جمله ایجاد التهاب، آسیب به DNA، اختلالات میتوکندری، آسیب غشای سلولی و آپوپتوز سلولی می‌گردند که البته سمیت این ترکیبات به غلظت، خواص شیمیایی، اندازه و روش ساخت آن‌ها وابسته است. همچنین نوع سلول می‌تواند در ارتباط با ترکیبات گرافن رفتارهای متفاوتی آشکار سازد (۱۲). به عنوان نمونه مطالعه‌ای بر روی سلول‌ها MCF-7 انجام گرفت و نتایج نشان داد که به صورت وابسته به دوز اکسید گرافن با غلظت ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثرات سمیت چشم‌گیری بر این سلول‌ها داشته در حالی که مطالعه‌ی دیگر بر سلول‌های HeLa و A549 نشان داد که اکسید گرافن در غلظت‌های ۱۰ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثرات سمیت سلولی نداشته است (۱۳).

همچنین امروزه کشت آزمایشگاهی شرایط مناسبی را برای آزمایش دارو و ترکیبات ضدسرطانی جدید فراهم آورده است. هدف کشت آزمایشگاهی فراهم آوردن شرایطی مشابه با شرایط درون‌تنی می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهند که کشت سلول‌ها بر داربست‌ها و محیط‌های سه بعدی سبب فراهم آوردن شرایطی می‌شود که از جنبه‌های مختلف همچون مورفولوژی و پروفایل بیان ژنی بسیار نزدیک به سلول‌های محیط درون‌تنی می‌باشند (۱۴، ۱۵). داربست‌های مورد استفاده برای کشت سلول‌های مختلف بسته به مشخصات سلولی و هدف از انجام پروژه متفاوت است (۱۶). یکی از محیط‌های مورد استفاده در کشت‌های سه‌بعدی استفاده از داربست هیدروژلی فیبرین است که به دلیل ساختار ویژه‌ای که دارد، شبکه‌ی متخلخل نرم و با خاصیت ارتجاعی زیاد فراهم می‌کند که این الاستیسیته به رشد، تکثیر و مهاجرت سلول‌ها کمک می‌کند (۱۷).

شد. مراحل آب‌گیری با غلظت صعودی الکل (۳۰، ۵۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰، ۱۰۰ درصد) انجام شد و سپس در پلیت را بسته و در فریزر ۲۰- به مدت ۲ ساعت نگهداری و به مدت ۲ ساعت عملیات فریزدرای جهت خشک کردن و دهیدراته کردن هیدروژل فیبرین انجام شد. عکس‌برداری SEM (Philips, XL 30, Amsterdam, Netherlands) از داربست‌های هیدروژل فیبرینی فاقد و دارای سلول انجام شد.

طرز تهیه استوک نقاط کوانتومی گرافن: یک گرم از پودر نقاط کوانتومی گرافن وزن و در ۱۰ سی‌سی محیط حل شد و به وسیله دستگاه سونیکاتور، به مدت ۱۰ دقیقه سونیکه و با استفاده از فیلتر سر سرنگی ۰/۲۲ فیلتر و به عنوان استوک، درون یخچال نگهداری شد.

تیمار سلولی: پس از گذشت ۲۴ ساعت از انکوباسیون سلول‌ها در انکوباتور و بررسی مورفولوژی سلول‌ها با میکروسکوپ معکوس، تیمار سلولی بدین ترتیب صورت گرفت که، ابتدا محیط کشت روی سلول‌ها از هر چاهک خارج و غلظت‌های ۱، ۵، ۷ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر از نقاط کوانتومی گرافن اضافه گردید اما به گروه کنترل فقط محیط کشت کامل اضافه شد. پلیت کشت سلولی مجدداً پس از بررسی زیر میکروسکوپ به انکوباتور منتقل گشت و عملیات فوق برای گروه‌های سلولی انجام شد که به ترتیب ۱، ۳ و ۵ روز تحت تیمار قرار گرفتند.

ساخت محلول MTT: برای ساخت محلول MTT، ۲۵ میلی گرم از پودر MTT خریداری شده از شرکت Sigma در ۵ سی‌سی PBS حل شد. سپس زیر هود لامینار با فیلتر سر سرنگی با قطر ۰/۲۲ میکرون در یک فالکون ۱۵ سی‌سی استریل فیلتر شد سپس فالکون حاوی محلول فویل پیچیده و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد به‌عنوان استوک اصلی نگهداری شد. لازم به ذکر است که مراحل تهیه در شرایط تاریکی انجام شد.

انجام تست MTT: بدین منظور زمانی که سلول‌های مورد نظر در تراکم $10^4 \times 1$ سلول در هر چاهک، در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند پس از ۲۴ ساعت انکوبه شدن و رسیدن به تراکم مطلوب، مایع رویی با غلظت‌های مختلف از تیمار تعویض و همراه با محیط کشت حاوی ۱۰٪ FBS به چاهک‌ها اضافه گردید پس

۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از آن محیط رویی خارج و حدود ۱ میلی لیتر محیط کشت DMEM (Gibco, USA) حاوی ۱۰٪ FBS (Gibco, USA) به رسوب سلولی اضافه و به آرامی آسپیره شد تا سلول‌ها به صورت منفرد درآیند. در ادامه حجم معینی از سوسپانسیون سلولی به فلاسک T25 حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشت ۱۰٪ FBS اضافه و به انکوباتور جهت کشت انتقال داده شد.

کشت سلولی سه‌بعدی: در این پژوهش به منظور کشت سه‌بعدی ابتدا شست‌وشوی فلاسک سلولی، تریپسینه کردن سلول‌ها، تهیه رسوب سلولی و ایجاد سوسپانسیون سلول‌های منفرد و شمارش سلولی انجام شد. سپس برای کشت سلولی در داربست هیدروژل فیبرینی، محیط M199 حاوی ۱۰ درصد سرم FBS و ۱ درصد پنی‌سیلین/استرپتومایسین و پودر فیبرینوژن (Sigma, USA) با غلظت ۳ میلی گرم بر میلی لیتر (mg/ml)، مورد استفاده قرار گرفت و به هر چاهک پلیت ۲۴ خانه ریخته شد و سپس سوسپانسیون سلولی اضافه شد. در ادامه به ازای ۵۰۰ میکرولیتر داربست و سلول در هر چاهک ۱۵ میکرولیتر ترومبین (Sigma, USA) با غلظت ۱۲۰ u/ml اضافه گردید و بلافاصله به آرامی آسپیره شد و محیط کشت به حالت ژلاتینی درآمد و پلیت کشت سلولی به انکوباتور منتقل شد. بعد از گذشت ۲ ساعت از انکوباسیون سلول‌ها در انکوباتور (سینا، ایران)، روی داربست‌های ژلاتینی هر چاهک پلیت ۲۴ خانه، ۵۰۰ میکرولیتر محیط M199 حاوی ۱۰ درصد سرم FBS و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک اضافه شد و مجدداً به انکوباتور منتقل گردید.

آماده‌سازی داربست برای عکس‌برداری با میکروسکوپ الکترونی SEM: در این مطالعه، به منظور عکس‌برداری SEM، سلول‌های MCF-7 بر روی داربست هیدروژل فیبرین کشت داده شدند و به همین ترتیب داربست‌های فاقد سلول تهیه و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، تثبیت داربست جهت عکس‌برداری SEM بدین صورت انجام شد که؛ محیط روی هر چاهک به آرامی خارج شد. هر چاهک پلیت ۲۴ خانه ۳۰۰ میکرولیتر PBS اضافه کرده و شست‌شو ۳ مرتبه انجام و به هر چاهک ۳۰۰ میکرولیتر محلول گلو تارد هید ۲/۵ درصد اضافه و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق نگهداری

میکروگرم بر میلی لیتر اضافه شد و بعد از ۵ دقیقه با فیلتر آبی میکروسکوپ فلئورسنس بررسی و عکس برداری شد.

رنگ آمیزی دیپی (DAPI): به منظور رنگ آمیزی DAPI سلولها در پلیت ۲۴ خانه کشت و تیمار شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار سلولها با پارافرم آلدئید ۴ درصد به مدت ۴۰ دقیقه در دمای اتاق فیکس شد و پس از شست و شو به مدت ۱ الی ۵ دقیقه در دمای اتاق تحت اثر رنگ DAPI قرار داده شدند در نهایت پس از شست و شو با میکروسکوپ فلئورسنس (Olympus, Japan) بررسی شدند.

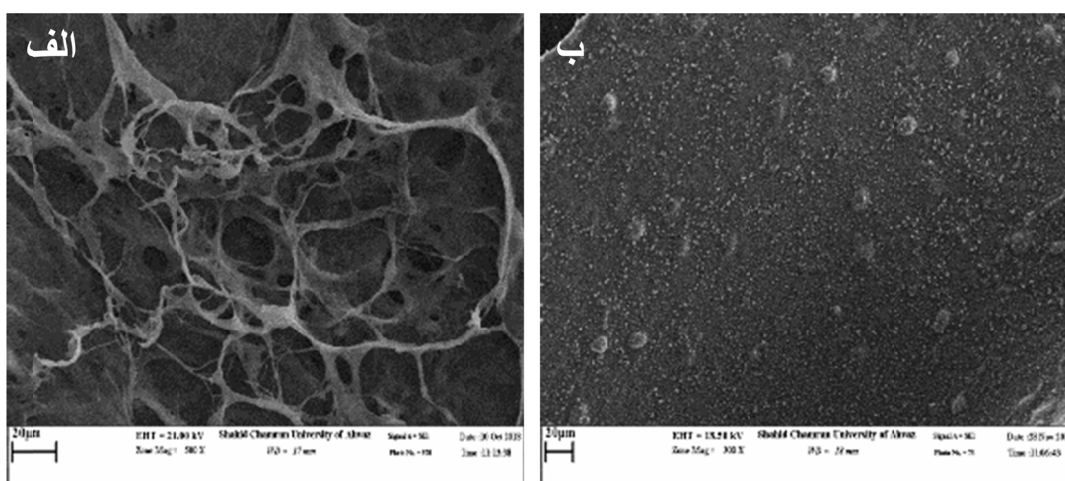
بررسی آماری: داده‌های حاصل، با کمک نسخه ۱۸ نرم افزار SPSS (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) و آزمون one-way ANOVA و Tukey انجام گردید. رسم نمودار در Excel 2016 انجام گرفت. $P < 0.05$ برای نمونه‌ها به عنوان اختلاف معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بررسی مورفولوژی داربست هیدروژل فیبرین و سلولهای کشت داده شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی: نتایج حاصل از بررسی مورفولوژی داربست سه بعدی هیدروژل فیبرین فاقد سلول و همچنین حاوی سلولهای MCF-7 کشت داده شده بر این داربست، با

از ۲۴ ساعت تیمار سوپرناتانت رویی خارج و با ۱۰۰ میکرولیتر PBS هر چاهک شست‌وشو داده شد. آنگاه محلول MTT را به نسبت ۱ به ۹ (۹ قسمت محیط کشت و ۱ قسمت محلول MTT) ترکیب کرده سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول فوق به هر چاهک اضافه شد و پلیت به مدت ۳ الی ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد سپس محتویات کشت با احتیاط دور ریخته شد و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به منظور حل کردن کریستال‌های فورمازان به هر چاهک اضافه و محتویات هر چاهک به آرامی با سمپلر، پیپتاژ شد و به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. در ادامه جذب نوری محلول در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الیزا (FAX STAT2100, USA) خوانده و درصد زیستایی سلولی محاسبه شد. لازم به ذکر است که از مرحله‌ی اضافه کردن MTT کار در شرایط تاریکی انجام شد و برای هر غلظت از ترکیب در چاهک تکرار شد. سپس این تست در روزهای ۱، ۳، ۵، و ۷ برای تیمارهای مختلف انجام شد. درصد بقای سلولی از این فرمول به دست آمد: $100 \times$ (جذب نمونه کنترل / جذب نمونه تیمار) = درصد بقای سلولی

رنگ آمیزی سلولها با اکریدین اورنج / اتیدیوم بروماید: به منظور رنگ آمیزی اکریدین اورنج / اتیدیوم برماید سلولها در پلیت ۲۴ خانه کشت و تیمار داده شدند و پس از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار سلولها، به آنها رنگ اکریدین اورنج / اتیدیوم برماید با غلظت ۱۰۰



شکل ۱- بررسی مورفولوژی داربست هیدروژل فیبرینی و سلولهای کشت داده شده با میکروسکوپ الکترونی SEM

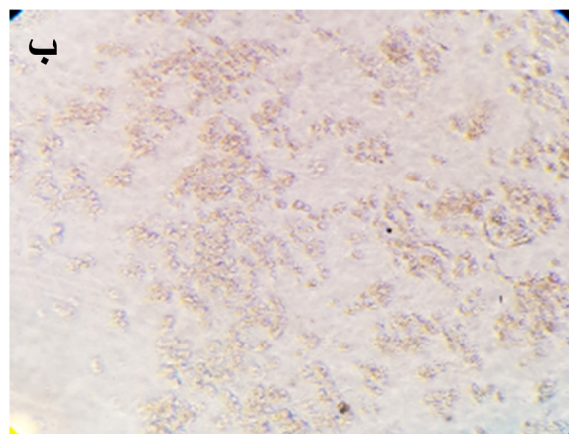
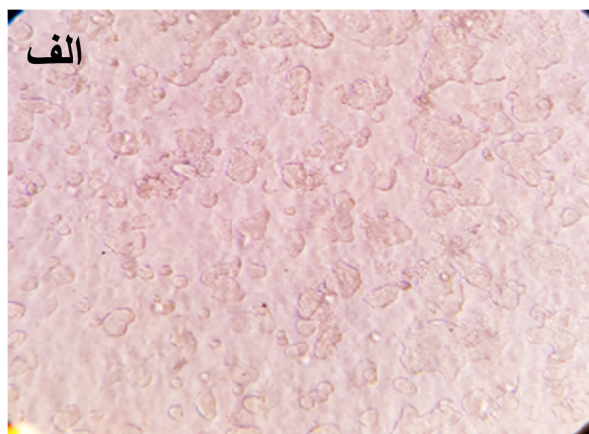
تصویر "الف" با بزرگنمایی ۲۰ میکرومتر داربست‌های بدون سلول، نشان دهنده تخلخل و ساختار مکانیکی مطلوب داربست می باشد. در تصویر "ب" مورفولوژی سلولها روی داربست قابل مشاهده است. این تصاویر نشان دهنده‌ی زنده و سالم بودن با مورفولوژی طبیعی سلولها و چسبندگی و ارتباط مناسب آنها با داربست است.

اثر نقاط کوانتومی گرافن بر بقای رده سلولی سرطان MCF-7: آزمایش MTT جهت بررسی اثر نقاط کوانتومی گرافن بر زیست پذیری سلول‌های MCF-7 در زمان ۲۴ ساعت و به ترتیب با غلظت‌های (۱، ۵، ۷ و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر) انجام شد. نتایج آماری در شکل ۳ نشان می‌دهد که زیست پذیری و بقای سلول‌های MCF-7 بعد از مواجهه با این دوزها از نقاط کوانتومی گرافن به ترتیب به میزان (۹۸، ۸۱، ۵۰ و ۳۱ درصد) رسید. و بیان‌گر این است که زیست‌پذیری سلول‌های MCF-7 به طور معنی‌داری وابسته به غلظت نقاط کوانتومی گرافن است و به این ترتیب میزان غلظت IC50 مربوط به GQD های موثر بر سلول‌های MCF-7، ۷ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین گردید.

بررسی بقای سلول‌های MCF-7 تیمار شده با نقاط کوانتومی گرافن در روزهای مختلف با روش MTT: در بررسی بقای سلولی با استفاده از تست MTT مشخص شد که میانگین جذب نوری و بقای سلول‌های سرطانی MCF-7 تحت تیمار نقاط کوانتومی گرافن با غلظت ۷ mg/mL (IC50) در سه بار تکرار، پس از گذشت ۱، ۳ و ۵ روز به صورت وابسته به زمان کاهش یافت به نحوی که بعد از گذشت ۲۴ ساعت درصد میانگین بقاء سلولی به ۵۰ درصد، پس از ۳ روز به ۳۵

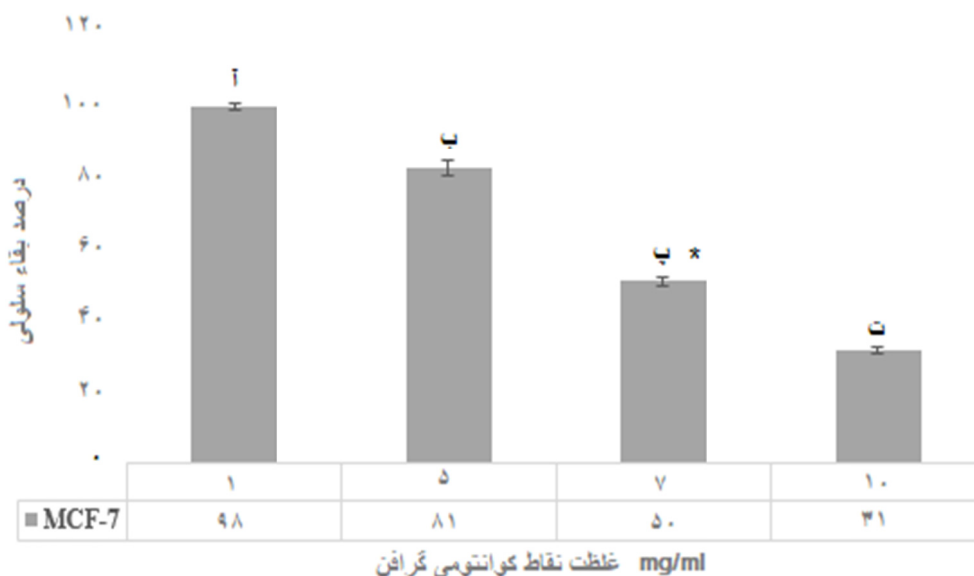
استفاده از روس عکسبرداری میکروسکوپ الکترونی SEM، نشان دهنده خواص مکانیکی مطلوب و تخلخل مناسب داربست تهیه شده (شکل ۱-الف) و همچنین حضور، رشد، تکثیر و چسبندگی مناسب سلول‌ها به داربست و ایجاد مورفولوژی طبیعی سه بعدی و حالت نرمال این سلول‌های است (شکل ۱-ب).

بررسی مورفولوژی سلول‌های MCF-7 کشت داده شده با استفاده از میکروسکوپ اینورت: نتایج حاصل از بررسی مورفولوژی سلول‌های رده MCF-7 کشت داده شده در محیط کشت سه بعدی، بر داربست هیدروژل فیبریتی، با استفاده از میکروسکوپ نوری اینورت با عدسی ۲۰X بعد از ۲۴ ساعت، نشان می‌دهد که سلول‌های تیمار شده با و ۷ mg/ml GQDs (به عنوان غلظت IC50) (شکل ۲-ب) در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل (شکل ۲-الف) دچار چروکیدگی، کاهش حجم سلول، گرانبه شدن و کاهش حجم سیتوپلاسم، از بین رفتن کلونی‌ها و منفرد شدن سلول‌ها شده‌اند، که این مسئله حاکی از سمیت این غلظت و پیشبرد سلول‌ها به سمت مرگ سلولی آنهاست. در تصویر (الف) که مربوط به گروه کنترل است، سیتوپلاسم سلول‌ها شفاف و کلونی‌های سلولی به خوبی دیده می‌شود که بیانگر سلامت و زنده بودن سلول‌های تیمار نشده است (شکل ۲).

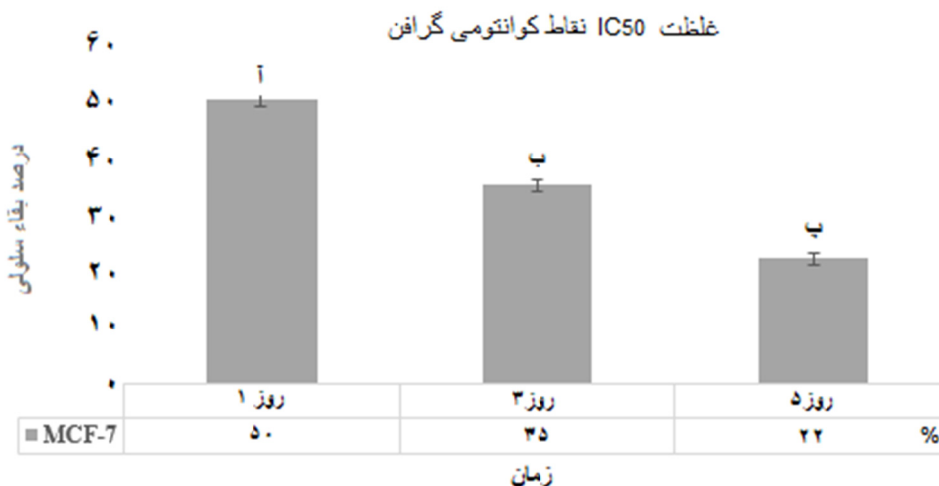


100µm

شکل ۲- بررسی مورفولوژی سلول‌های تیمار شده MCF-7 کشت داده شده با استفاده از میکروسکوپ اینورت بعد از ۲۴ ساعت: الف) سلول‌ها در ژل فیبرین نمونه کنترل بدون تیمار. در این گروه سیتوپلاسم سلول‌ها شفاف و کلونی‌های سلولی به خوبی دیده می‌شود که بیانگر سلامت و زنده بودن سلول‌های تیمار نشده است، ب) سلول‌ها در ژل فیبرین نمونه تیمار با غلظت ۷ mg/ml نقاط کوانتومی گرافن. چروکیدگی، کاهش حجم سلول، کاهش حجم سیتوپلاسم و از دست دادن مورفولوژی کلونی‌ها نشانه رفتن به سمت مرگ سلولی گروه‌های تیمار است.



شکل ۳- نمودار اثر غلظت‌های مختلف GQDs بر زیست‌پذیری سلول‌های MCF-7 در زمان ۲۴ ساعت با سه بار تکرار که نشان می‌دهد زیست‌پذیری این سلول‌ها وابسته به غلظت این مولکول است. IC_{50} به دست آمده برای سلول‌های MCF-7 در دوز ۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر GQDs تعیین شد.

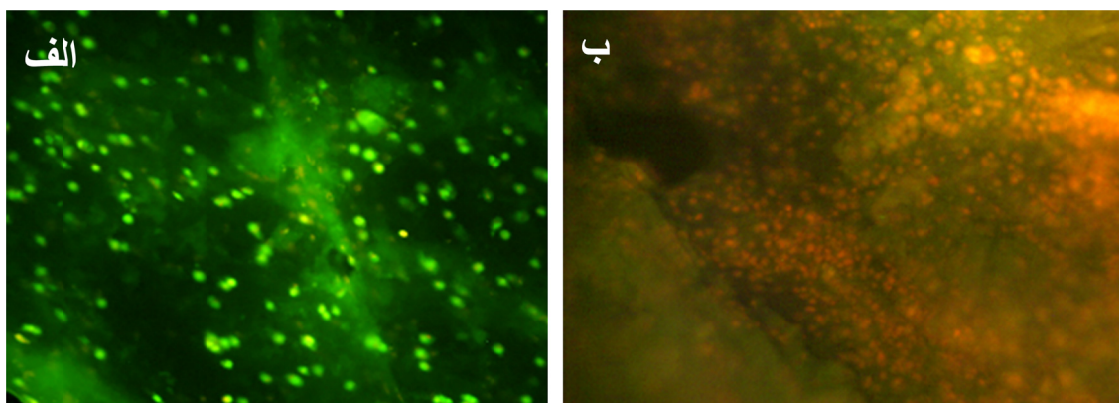


شکل ۴- درصد بقای سلول‌های MCF-7 که ۱، ۳ و ۵ روز پس‌تیمار شدن با غلظت IC_{50} (۷ mg/ml) نقاط کوانتومی گرافن به ترتیب مقادیر (۵۰، ۳۵ و ۲۲) درصد را در تست MTT نشان می‌دهد و بیان‌گر اثر معنی‌دار سیتوتوکسیک این غلظت از QGDS بر سلول‌ها، به صورت وابسته به زمان است ($n = 3$).

رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید استفاده شد. اکریدین اورنج یک رنگ حیاتی است و توسط سلول‌های زنده جذب می‌شود. اکریدین اورنج وارد DNA سلول زنده می‌شود و در زیر میکروسکوپ یک نمای سبز رنگ به کروماتین سلول زنده می‌دهد. اما اتیدیوم بروماید فقط سلول‌های مرده و آپوپتوزی را رنگ می‌کند. اتیدیوم بروماید، از غشاء آسیب دیده عبور کرده و وارد DNA سلول مرده شده و در زیر میکروسکوپ فلوئورسنت، رنگ

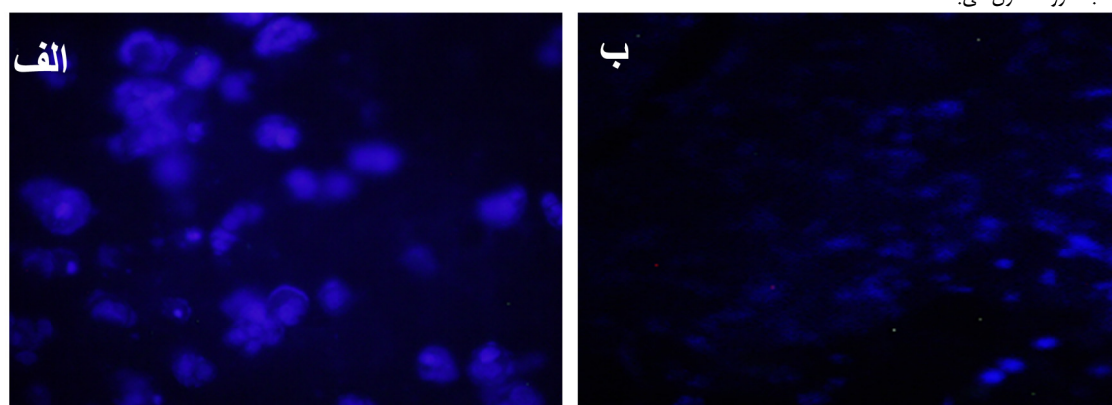
درصد و پس از ۵ روز به ۲۲ درصد کاهش یافت. این داده‌ها نیز نشان دهنده اثر سیتوتوکسیک غلظت IC_{50} نقاط کوانتومی گرافن بر سلول‌ها به صورت وابسته به زمان می‌باشند (شکل ۴).

رنگ آمیزی سلول‌ها با روش اکریدین اورنج / اتیدیوم بروماید: به منظور تعیین نوع مرگ سلولی القا شده توسط غلظت‌های IC_{50} نقاط کوانتومی گرافن (۷ mg/ml) در سلول‌های سرطانی MCF-7 از روش



200µm

شکل ۵- بررسی روند آپوپتوز در سلول‌های MCF-7 کنترل و تیمار با استفاده از رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج/ اتیدیم بروماید. الف) گروه کنترل. ب) سلول‌های تیمار شده با غلظت IC50 (7 mg/ml) نقاط کوانتومی گرافن. در گروه کنترل (الف) که سلول‌های تیمار نشده را نشان می‌دهد در تصویر نیز هسته سلول‌ها به شکل درشت، سبزرنگ و شفاف به صورت مجموعه‌هایی در کنار هم دیده می‌شوند که نشان دهنده‌ی زنده و سالم بودن آن‌هاست. همچنین در نمونه‌های گروه‌های تیمار (ب) رنگ نارنجی سلول‌ها، کوچک بودن هسته‌ها، منفرد و پراکنده بودن آن‌ها تأییدی بر رخ دادن آپوپتوز در در سلول‌های MCF-7 تیمار شده نسبت به گروه کنترل می‌باشد.



100µm

شکل ۶- بررسی روند تغییرات هسته در سلول‌های MCF-7 کنترل و تیمار با استفاده از رنگ‌آمیزی DAPI. الف) گروه کنترل. ب) سلول‌های تیمار شده با غلظت IC50 (7 mg/ml) نقاط کوانتومی گرافن. در گروه سلولی تیمار (ب) تغییراتی مانند چروک خوردن، کوچک و منفرد شدن هسته‌ی سلول‌ها، متلاشی شدن آن‌ها و همچنین کروماتین‌های قطعه‌قطعه و فشرده، دیده می‌شود. این تغییرات از خصوصیات سلول‌های آپوپتوزی است و نشان‌دهنده‌ی آغاز روند مرگ سلول‌ها در گروه‌های تیمار می‌باشد. در حالی که در گروه کنترل (الف) که شامل سلول‌های تیمار نشده است، هسته سلول‌ها کاملاً کروی، بزرگ، شفاف و با رنگی روشن دیده می‌شود، همچنین تجمع سلول‌ها در کنار هم و ایجاد نقاط روشن بزرگ، نشان‌دهنده‌ی کلنی‌های سلول‌های سالم و زنده می‌باشد.

است (شکل ۵).

رنگ آمیزی سلول‌های MCF-7 با رنگ DAPI
به منظور بررسی تغییرات هسته در سلول‌های MCF-7 حاصل از تیمار با غلظت‌های IC50 نقاط کوانتومی گرافن (7 mg/ml)، این سلول‌ها با رنگ DAPI رنگ‌آمیزی شدند. DAPI یک رنگ فلوروسنت است که برای مشاهده هسته سلول به کار می‌رود و می‌تواند اتصال قوی و محکمی با ناحیه بازهای A-T در دو رشته

نارنجی به کروماتین سلول مرده می‌دهد. در گروه‌های تیمار شده با GQDs (شکل ۵-ب) هسته‌های فشرده، تکه‌تکه، منفرد و نارنجی رنگ مشاهده شد که نشانه شروع فرایند آپوپتوز در سلول‌های MCF-7 تحت تیمار است. در صورتی که در سلول‌های گروه کنترل که نانوذره دریافت نکردند، هسته‌ها شفاف، گرد، درشت و به صورت مجموعه‌هایی روشن و سبز رنگ دیده شدند که نشانه‌ی زنده و سالم بودن سلول‌های گروه کنترل

یکی از مشکلات بر سر راه درمان سرطان، گریز از آپوپتوز سلول‌های سرطانی در روش‌های سنتی شیمی‌درمانی است، به همین دلیل یکی از اهداف در شیمی‌درمانی نوین، بر گرداندن مجدد مکانیسم‌های آپوپتوز در سلول‌های سرطانی است. همچنین به دلیل دیگر مشکلات درمانی، مثل مقاومت و شکست درمان، همچنین هزینه بالا و سایر مشکلات باعث شده که استفاده از نانویوتکنولوژی، توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کند (۱۸). در سال‌های اخیر راهکار استفاده از نانوذرات به عنوان سیستم حامل برای درمان و انتقال دارو پیشرفت قابل توجهی کرده است. فناوری نانو از طریق تولید داروهای نانو ساختاری که به صورت همزمان دارای چندین قابلیت متفاوت باشند به کمک دانش پزشکی و داروسازی آمده است تا امکان تشخیص و درمان موثرتر سرطان را فراهم نماید (۱۹). از مهم ترین QD ها می‌توان به نقاط کوانتومی گرافن اشاره کرد که خصوصیات فتولومینسنت (PL) و زیست سازگاری بسیار خوب، پایداری نوری و شیمیایی بالا به همراه عدم سمیت و عامل دارشدن ساده آنها با مولکول‌های زیستی، این‌ها نانو ذرات را به عنوان پروب‌های فلورسنت بسیار مناسب در تصویربرداری زیستی و ردیابی و سایر کاربردهای زیست پزشکی مطرح کرده است (۲۰).

در این پژوهش اثرات نقاط کوانتومی گرافن بر سلول‌های سرطانی رده MCF-7 بررسی شد و نتایج نشان داد که GODs اثر سیتوتوکسیک بر سلول‌های سرطانی MCF-7 داشته، به طوری که این اثرات وابسته به زمان و دوز استعمال شده در آزمایش بوده است. در واقع با افزایش زمان، سمیت نقاط کوانتومی گرافن افزایش یافت. (در این پژوهش به وسیله آزمون MTT، میزان IC50 برای GODs، ۷ mg/ml به دست آمد). بررسی تغییرات مورفولوژی از جمله تغییر در هسته، چروکیدگی سلول، فشردگی کروماتین با میکروسکوپ معکوس و همچنین بررسی‌های کیفی ویژگی‌های هسته سلول‌های کنترل و تیمار تایید کننده القای آپوپتوز در سلول‌های تیمار یافته است. بعلاوه نتایج رنگ آمیزی آکریدین اورنج تایید دیگری بر این یافته‌ها بود. همانگونه که اشاره شد از گرافن و مشتقات فراوان آن و همچنین نقاط کوانتومی گرافن که از جدیدترین

DNA برقرار کند. به منظور رنگ آمیزی، سلول‌ها پس از کشت در پلیت ۲۴ خاته، تیمار سلول‌ها با غلظت‌های IC50 از GQDs صورت گرفت و پس از طی ۲۴ ساعت، رنگ آمیزی DAPI بر روی سلول‌های MCF-7 انجام شد. در گروه‌های سلولی تیمار (شکل ۶-ب) تغییراتی مانند چروک خوردن، کوچک و منفرد شدن هسته‌ی سلول‌ها و همچنین متلاشی شدن آن‌ها، کروماتین فشرده و قطعه قطعه شده، دیده شد. این تغییرات از خصوصیات سلول‌های آپوپتوزی می‌باشد و نشان دهنده‌ی آغاز روند مرگ سلول‌ها در گروه‌های تیمار می‌باشد. در حالی که در گروه کنترل (شکل ۶-الف) که شامل سلول‌های تیمار نشده است، هسته سلول‌ها کاملاً کروی، بزرگ، شفاف و با رنگی روشن، دیده می‌شود، همچنین تجمع سلول‌ها در کنار هم و ایجاد نقاط روشن بزرگ، نشان‌دهنده‌ی کلنی‌های سلول‌های سالم و زنده می‌باشد (شکل ۶-ع).

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به خصوصیات منحصر به فرد ترکیبات گرافن و کاربرد های فراوان آنها در علوم زیستی، در این مطالعه بر آن شدیم تا اثرات سایتوتوکسیک نقاط کوانتومی گرافن، به عنوان یکی از جدیدترین ترکیبات گرافن، بر سلول‌های سرطانی رده MCF-7 را به عنوان رویکردی نوین در استفاده از مشتقات گرافن به منظور مهار رشد سلول‌های سرطانی مورد بررسی قرار دهیم. از آنجایی که کنام و جهت گیری سلول‌ها بویژه در سرطان‌ها از اهمیت خاصی برخوردار است و همچنین برای برقراری تشابه بیشتر با شرایط درون تنی در این مطالعه آزمایشات در شرایط سه بعدی با استفاده از داربست هیدروژلی انجام پذیرفت. نتایج این تحقیق مطابق فرضیه نشان داد نقاط کوانتومی گرافن به صورت وابسته به غلظت و زمان دارای اثرات سایتوتوکسیک قابل توجهی بر سلول‌های سرطانی پستانی رده MCF-7 بودند و مطالعه ما نشان داد غلظت ۷ میلی گرم بر میلی لیتر نقاط کوانتومی گرافن به عنوان غلظت IC50 تعیین شد که در این غلظت می‌تواند به صورت چشمگیری سبب تغییرات مورفولوژیک و القاء ویژگی‌های آپوپتوزی سلول‌های MCF-7 گردد که نتایج ما تایید کننده این تغییرات بود.

تشکیل شده بود پس از تیمار رده‌ی سلول‌های جنینی کلیه انسان (HEK 293T) با این کمپلکس، به کمک MTT، سمیت سلولی و به کمک روش‌های اسپکترومتری و فتولومینسنت (PL) و غیره ردیابی‌های لازم صورت گرفت. نتایج آنها حاکی از سمیت پایین سلولی و قابلیت بالای ورود کمپلکس‌های MPG-2H1/GQD به سلول‌ها بود، در حالی که GQD های آزاد نتوانستند به طور قابل توجهی به درون سلول راه یابند (۲۲) اگرچه در مطالعه حاضر از GQD به عنوان حامل دارویی استفاده نشد اما در بخش بررسی اثرات سایتوتوکسیک GQD، نتایج آنها همسو با نتایج ما تایید کرد که غلظت‌های پایین GQD (۱۷ میکروگرم) اثرات توکسیک سلولی نشان نداد. Iannazzo و همکارانش از ترکیب GQDs و یک داروی ضد سرطان از جنس ساختار بنزوفوران (BFG) به‌عنوان یک نانوحامل فلورسنت و هدفمند بر روی رده‌های سلولی مختلف از قبیل سرطان حنجره (HEp-2)، سلول‌های سرطانی اپی‌تلیال ریه (A549) و سلول‌های آدنوکارسینومای کولورکتال (HT-29) آزمایش و به‌کمک تست MTT، سمیت سلولی این ترکیب (BFG-GQD) را سنجیدند. نتایج پژوهش آنها نشان دهنده سمیت سلولی کم GQDs به طوری که در غلظت‌های بین ۱۰ تا ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر درصد کشندگی زیر ۵۰ بوده است که نتایج تحقیق ما نیز تایید کننده نتایج آنها بود اما بدلیل هدف متفاوت ما در مطالعه حاضر از غلظت‌های بالاتر برای افزایش اثرات سایتوتوکسیک GQD استفاده گردید (۲۳). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که غلظت‌های متفاوت GQD در علوم زیستی و پزشکی می‌تواند کارایی و کاربردهای بسیار متفاوتی داشته باشد بطوریکه ماهیت نقاط کوانتومی گرافن در غلظت‌های مختلف بسیار متفاوت خواهد بود. بعلاوه Qin و همکارانش به منظور روشن کردن اثرات GQDs بر ماکروفاژها و مکانیسم‌های زمینه‌ای آنها، ماکروفاژهای حاصل از تمایز رده سلول‌های بنیادی (THP-1) را در معرض نقاط کوانتومی گرافنی که خودشان سنتز کرده بودند قرار دادند. نتایج کار آنها نشان داد که GQDs با به مقدار کمی روی بقای سلول و یکپارچگی غشای ماکروفاژها اثر گذاشت، در حالی که این نانو ذره به طور قابل توجهی باعث افزایش تولید

محصولات گرافن محسوب می‌گردد استفاده‌های تحقیقاتی ارزشمندی صورت گرفته است. بخشی از پژوهش‌های انجام شده در مورد ترکیبات گرافن، مربوط به خواص فلئورسنت این مولکول و کمک به تصویر برداری‌های زیستی و همچنین قابلیت رسانش دارویی این گروه از مواد است برای مثال، Roy و همکارانش، با هدف تصویر برداری از آپوپتوز در محیط درون‌تنی لارو ماهی زبرا و سرطان دهانه رحم (HeLa) و سلول‌های نرمال اپی‌تلیال پستان (MCF-10A)، از ترکیب GODs و آنتی‌بادی (Ab_{AS}) به منظور برچسب زدن به سلول‌های در حال آپوپتوز استفاده کردند و سپس به بررسی سمیت سلولی GODs پرداختند و در نهایت به این نتیجه رسیدند که GODs با سمیت سلولی پایین و وابسته به غلظت در سلول‌های محیط درون‌تنی لارو ماهی‌ها، و رده‌های سلولی تیمار شده، قدرت فتولومینسنت زیادی دارند و گزینه مناسبی برای تصویر برداری درون‌تنی و برون‌تنی هستند (۲۱). اگرچه هدف مطالعه ما تصویر برداری از فرایند آپوپتوز و ردیاب سلولی نبود اما در ارتباط با بررسی سمیت سلولی GODs مطالعه ما نیز تایید کننده اثرات وابسته به غلظت GQDs بود بطوریکه در غلظت‌های زیر ۱ میلی گرم بر میلی لیتر خاصیت توکسیک مشاهده نشد. در پژوهشی دیگر، Monroe و همکارانش با روش طیف سنجی نوری (جهت اندازه‌گیری مقدار جذب) اثر گرافن و متیلن بلو و همچنین ترکیب این دو ماده را با نسبت‌های مختلف بر سلول‌های MCF-7 سنجیدند و دریافتند که نسبت یک به یک این دو ماده در مقایسه با نسبت‌های دیگر، باعث ایجاد سمیت سلولی بیشتر و تولید اکسیژن‌های منفرد و اکسیژن‌های واکنش‌پذیر می‌شود، ولی اثر متیلن بلو به‌تنهایی بالاتر از گرافن بر سلول‌های MCF-7 بود (۲۲). در مطالعه Monroe و همکاران نیز همسو با مطالعه حاضر به تاثیرات سایتوتوکسیک وابسته به غلظت GODs اشاره گردیده است اگرچه در مطالعه حاضر به بررسی اثرات مستقل و بدون ترکیب GQD با سایر داروها پرداخته شده است. همچنین Ghafari و همکارانش، با هدف تولید نانوحامل دارویی برای انتقال مواد به هسته سلول و قابلیت ردیابی آنها، کمپلکسی ساختند که از پیوندهای غیر کووالان نقاط کوانتومی گرافن و نوعی پپتید کایمیریک

unshiu Peel in Human Breast Cancer MCF-7 Cells: Involvement of ROS-Dependent Activation of AMPK. *Biol Pharm Bull.* 2018;41(5):713-21.

2. Harbeck N. Advances in targeting HER2-positive breast cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2018;30(1):55-9.

3. Hassett MJ, Li H, Burstein HJ, Punglia RS. Neoadjuvant treatment strategies for HER2-positive breast cancer: cost-effectiveness and quality of life outcomes. *Breast Cancer Res Treat.* 2020.

4. Silversmit G, Jegou D, Vaes E, Van Hoof E, Goetghebeur E, Van Eycken L. Cure of cancer for seven cancer sites in the Flemish Region. *International journal of cancer.* 2017;140(5):1102-10.

5. Sengupta S. Cancer Nanomedicine: Lessons for Immuno-Oncology. *Trends Cancer.* 2017;3(8):551-60.

6. Kosheleva OK, Lai TC, Chen NG, Hsiao M, Chen CH. Selective killing of cancer cells by nanoparticle-assisted ultrasound. *J Nanobiotechnol.* 2016;14(1):46.

7. Mukherjee A, Shim Y, Myong Song J. Quantum dot as probe for disease diagnosis and monitoring. *Biotechnol J.* 2016;11(1):31-42.

8. Bharathi G, Nataraj D, Premkumar S, Sowmiya M, Senthilkumar K, Thangadurai TD, et al. Graphene Quantum Dot Solid Sheets: Strong blue-light-emitting & photocurrent-producing band-gap-opened nanostructures. *Sci Rep.* 2017;7(1):10850.

9. Qiu J, Li D, Mou X, Li J, Guo W, Wang S, et al. Effects of Graphene Quantum Dots on the Self-Renewal and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Adv Healthcare Mat.* 2016;5(6):702-10.

10. Iannazzo D, Celesti C, Espro C. Recent Advances on Graphene Quantum Dots as Multifunctional Nanoplatforms for Cancer Treatment. *Biotechnol J.* 2021;16(2):e1900422.

11. Iannazzo D, Ziccarelli I, Pistone A. Graphene quantum dots: multifunctional nanoplatforms for anticancer therapy. *J Mat Chem B.* 2017;5(32):6471-89.

12. Fang J, Liu Y, Chen Y, Ouyang D, Yang G, Yu T. Graphene quantum dots-gated hollow mesoporous carbon nanoplatform for targeting drug delivery and synergistic chemo-photothermal therapy. *Int J Nanomed.* 2018;13:5991-6007.

13. Tang Z, Zhao L, Yang Z, Liu Z, Gu J, Bai B, et al. Mechanisms of oxidative stress, apoptosis, and autophagy involved in graphene oxide nanomaterial anti-osteosarcoma effect. *Int J Nanomed.* 2018;13:2907-19.

14. Hoveizi E, Ebrahimi-Barough S, Tavakol S, Nabiani M. In vitro comparative survey of cell adhesion and proliferation of human induced pluripotent stem cells on surfaces of polymeric electrospun nanofibrous and solution-cast film scaffolds. *J Biomed Mat Res Part A.* 2015;103(9):2952-8.

اکسیژن‌های فعال، ترابری هسته ای و همچنین مرگ سلولی بر اثر آپوپتوز و اتوفازی شد در مطالعه ما نیز نتایج تغییرات مورفولوژیکی سلول ها و هسته تایید کننده بروز آپوپتوز بود اگرچه در زمینه های مولکولی بررسی نشد. برای مثال در پژوهش آنها افزایش سطح بیان ژنهایی مثل (کاسپاز ۳ و ۹)، (بکلین ۱) و فاکتور نکروز دهنده تومور (TNF- α), همچنین کاهش سطح (Bcl-2) دیده شد و در تهاتر گزارش شد که علت اصلی وقایع بالا این است که نقاط کوانتومی گرافن باعث فعال شدن مسیرهای سیگنالینگ مربوط به تولید مپکیناز p38 (p38 MAPK) و همچنین عامل ترابری هسته‌ای (NF- κ B) است (۲۴). در این مطالعه به علت محدودیت‌های موجود مطالعات مولکولی انجام نشده لذا بررسی بیان ژن‌های درگیر در مسیر سیگنالینگ متفاوت مرگ سلولی و آپوپتوز، بررسی اثر این ماده بر آنزیم‌های درگیر در مسیرهای استرس اکسیداتیو این سلول‌ها و تاثیر هر یک از این مواد بر سایر سلول‌های سرطانی و غیر سرطانی پیشنهاد می‌گردد.

بر طبق نتایج این تحقیق GQDs دارای اثر سمیت و القا آپوپتوز وابسته به دوز و زمان در سلول‌های سرطانی پستان کشت داده شده بر هیدروژل فیبرینی می‌باشد و غلظت IC50 برای GQDs در سلول‌های MCF-7 حدود ۷ میلی گرم بر میلی لیتر محاسبه شد. البته مطالعات بیشتری در جهت مشخص نمودن مکانیسم مولکولی درگیر در این مشاهدات مورد نیاز است. علاوه بر این، پیشنهاد می‌شود اثرات GQDs بر رده‌های سلولی سرطانی و نرمال دیگر بررسی و مقایسه شود.

تقدیر و تشکر

هزینه تحقیقات از محل اعتبارات پژوهانه سال ۹۸ معاونت پژوهشی دانشگاه شهیدچمران اهواز تامین گردیده است. نویسندگان این مقاله کمال تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی و فن‌آوری دانشگاه شهید چمران اهواز به‌خاطر حمایت‌های مالی اعلام می‌دارد.

References

1. Kim MY, Bo HH, Choi EO, Kwon DH, Kim HJ, Ahn KI, et al. Induction of Apoptosis by Citrus

15. Liu P, Zhang R, Yu W, Ye Y, Cheng Y, Han L, et al. FGF1 and IGF1-conditioned 3D culture system promoted the amplification and cancer stemness of lung cancer cells. *Biomaterials*. 2017;149:63-76.
16. Hoveizi E, Khodadadi S, Tavakol S, Karima O, Nasiri-Khalili MA. Small molecules differentiate definitive endoderm from human induced pluripotent stem cells on PCL scaffold. *Appl Biochem Biotechnol*. 2014;173(7):1727-36.
17. Bayat N, Izadpanah R, Ebrahimi-Barough S, Norouzi Javidan A, Ai A, Mokhtari Ardakan MM, et al. The Anti-Angiogenic Effect of Atorvastatin in Glioblastoma Spheroids Tumor Cultured in Fibrin Gel: in 3D in Vitro Model. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018;19(9):2553-60.
18. Liu C, Wu F, Liu Y, Meng C. Catalpol suppresses proliferation and facilitates apoptosis of MCF-7 breast cancer cells through upregulating microRNA-146a and downregulating matrix metalloproteinase-16 expression. *Mol Med Rep*. 2015;12(5):7609-14.
19. Sanchez-Moreno P, Ortega-Vinuesa JL, Peula-Garcia JM, Marchal JA, Boulaiz H. Smart Drug-Delivery Systems for Cancer Nanotherapy. *Curr Drug Targets*. 2018;19(4):339-59.
20. Haghshenas M, Hoveizi E, Mohammadi T, Kazemi Nezhad SR. Use of embryonic fibroblasts associated with graphene quantum dots for burn wound healing in Wistar rats. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2019;55(4):312-22.
21. Roy P, Periasamy AP, Lin CY, Her GM, Chiu WJ, Li CL, et al. Photoluminescent graphene quantum dots for in vivo imaging of apoptotic cells. *Nanoscale*. 2015;7(6):2504-10.
22. Ghafary SM, Nikkhah M, Hatamie S, Hosseinkhani S. Simultaneous Gene Delivery and Tracking through Preparation of Photo-Luminescent Nanoparticles Based on Graphene Quantum Dots and Chimeric Peptides. *Sci Rep*. 2017;7(1):9552.
23. Iannazzo D, Pistone A, Celesti C, Triolo C, Patane S, Giofre SV, et al. A Smart Nanovector for Cancer Targeted Drug Delivery Based on Graphene Quantum Dots. *Nanomaterials (Basel)*. 2019;9(2).
24. Qin X, Wang Q, Geng L, Shu X, Wang Y. A "signal-on" photoelectrochemical aptasensor based on graphene quantum dots-sensitized TiO₂ nanotube arrays for sensitive detection of chloramphenicol. *Talanta*. 2019;197:28-35.