

Synthesis of Graphene quantum dots Conjugated with Folic Acid for Specific Drug Delivery in Breast Cancer Treatment

Noora Amraee¹, Maryam Bikhof Torbati^{2*}, Ahmad Majd¹, Masoud Shaabanzadeh³

1. Department of Biology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Department of Biology, Yadegar-e-Imam Khomeini (RAH) Shahr-e-Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3. Department of Chemistry, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.

Abstract

Aim and Background: Graphene quantum dots (GQDs) conjugated with folic acid have a very high potential to identify cancer cells with high expression of folate receptor and cause tumor death by binding to an anti-cancer agent. The aim of this research is to design and evaluate a new nano-drug delivery system for breast cancer treatment.

Materials and Methods: GQDs nanoparticles were synthesized by pyrolysis of L-glutamic acid and its surface was coated with PEG and amine agent to create a longer half-life and more fluorescence intensity, and it was conjugated with folic acid for better binding to MCF-7 cancer cell line with folic acid receptor by thermal method. The structure of the nanocarrier was investigated using FTIR spectroscopy, fluorimetry, and TEM imaging methods. Penetration of nanoparticles into cells and their fluorescence emission were investigated by confocal microscopy.

Results: The synthesized GQDs had a uniform, relatively spherical structure and a size below 10 nm. With the addition of amine and PEG agents to GQDs nanoparticles, significant fluorescence intensities of up to 1000 a.u. were observed. According to the FTIR results, folic acid was successfully conjugated on the GQDs nanocarrier after using thermal reaction. The entry and fluorescence emission of nanoparticles into MCF-7 cells was confirmed using confocal microscopy.

Conclusion: According to the results, replacing the thermal method in the synthesis of targeted GQDs nanoparticles, instead of using chemical reagents, can provide a cost-effective and easier method. Pegylated and folated GQDs were suitable nanocarriers for targeted drug delivery to the MCF-7 breast cancer cell line.

Keywords: Breast cancer, GQDs, folate receptor, drug delivery.

Corresponding author:

Department of Biology, Yadegar-e-Imam Khomeini (RAH) Shahr-e-Rey Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Email: Maryam.bikhof@iau.ac.ir

سنتز نقاط کوانتومی گرافن کونژوگه با اسید فولیک به منظور دارو رسانی اختصاصی در درمان سرطان پستان

نورا امرایی^۱، مریم بی خوف تربتی^{۲*}، احمد مجد^۱، مسعود شعبانزاده^۳

۱. گروه زیست‌شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. گروه زیست‌شناسی، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهر ری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳. گروه شیمی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: نقاط کوانتومی گرافن (GQDs) کونژوگه با اسید فولیک، پتانسیل بسیار بالایی برای شناسایی سلول‌های سرطانی دارند که گیرنده اسید فولیک را به مقدار زیادی بیان می‌کنند و با اتصال به یک عامل ضدسرطان موجب مرگ تومور می‌شوند. هدف این پژوهش طراحی و بررسی یک نانوسیستم تحویل داروی جدید برای درمان سرطان پستان می‌باشد.

مواد و روش‌ها: نانوذرات GQDs با پیرولیز ال-گلوتامیک اسید سنتز و سطح آن با PEG و عامل آمین برای ایجاد نیمه‌عمر و شدت فلورسانس بیشتر پوشش داده شد و با اسید فولیک برای اتصال بهتر به رده سلولی سرطانی MCF-7 دارای گیرنده اسید فولیک، با روش حرارتی کونژوگه شد. ساختار نانوحامل با روش‌های طیف‌سنجی FTIR، فلوریمتری و تصویربرداری TEM مورد مطالعه قرار گرفت. نفوذ نانوذرات به درون سلول و نشر فلورسانس آن‌ها نیز با میکروسکوپ کانفوکال بررسی شد. **یافته‌ها:** GQDs سنتز شده دارای ساختار یکنواخت، نسبتاً کروی و اندازه زیر ۱۰ نانومتر بود. با اضافه شدن عامل آمین و PEG به نانوذرات GQDs شدت فلورسانس قابل توجهی تا بالای ۱۰۰۰ a.u. مشاهده شد. طبق نتایج FTIR پس از استفاده از واکنش حرارتی، اسید فولیک با موفقیت روی نانوحامل GQDs کونژوگه گردید. ورود و نشر فلورسانس نانوذرات به سلول MCF-7 با استفاده از روش میکروسکوپی کانفوکال تأیید شد.

نتیجه‌گیری: مطابق نتایج حاصل، جایگزین کردن روش حرارتی در سنتز نانوذرات GQDs هدفمند به جای استفاده از واکنشگرهای شیمیایی می‌تواند روش مقرون به صرفه و آسان‌تری ارائه دهد. GQDs پگیله فولاته، نانوحامل مناسبی برای دارو رسانی هدفمند به رده سلولی سرطان پستان MCF-7 بود.

واژگان کلیدی: سرطان پستان، GQDs، گیرنده اسید فولیک، دارو رسانی.

۱- مقدمه

سرطان پستان، شایع‌ترین سرطان مهاجم زنان در سراسر جهان است (۱). درمان‌های اصلی سرطان پستان جراحی، پرتودرمانی، شیمی‌درمانی و

هورمون‌درمانی است. هورمون‌درمانی و شیمی‌درمانی قدرتمند هستند، اما عوارض جانبی کوتاه مدت و طولانی مدت از جمله عوارض قلبی-عروقی ایجاد می‌کنند (۲). این عوامل با تجویز و ورود به سیستم گردش بدن، تقریباً در همه اندام‌ها پخش شده و نفوذ می‌کنند و باعث از بین رفتن سلول‌های تومور می‌شوند، اما در عین حال به سلول‌های سالم و نرمال نیز آسیب می‌رسانند. در حال حاضر درمان‌های مبتنی بر فناوری نانو در درمان سرطان به علت افزایش حلالیت دارو، پایداری و کاهش مقاومت چند دارویی و همچنین افزایش ایمنی و اثربخشی درمان سرطان بسیار مورد توجه قرار گرفته است. اخیراً یکی از اعضای

نویسنده مسئول:

گروه زیست‌شناسی، واحد یادگار امام خمینی (ره) شهر ری، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

پست الکترونیکی:

Maryam.bikhof@iau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۱۰

نسبت سطح به حجم بالایی دارند که این امر امکان بارگذاری بالا و تحویل مؤثرتر ترکیبات ضدسرطان را فراهم می‌کند، همچنین GQDs دارای سمیت سلولی بسیار کم و زیست سازگاری خوبی هستند و به دلیل داشتن خواص فلورسانس می‌توانند برای تصویربرداری زیستی با غلظت بالا استفاده شوند. گروه‌های عاملی غنی از اکسیژن مانند گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیل که در ساختار GQDs وجود دارند، امکان اتصال سطحی بخش‌های مفید مانند لیگاند‌های هدف‌گیری تومور یا داروهای شیمی‌درمانی را تسهیل می‌کند، علاوه بر این، اوربیتال‌های π که در سراسر شبکه GQDs به صورت هیبرید شده با sp^2 وجود دارد، می‌تواند ترکیب‌های درمانی را که یک حلقه آروماتیک در ساختار خود دارند، بدون نیاز به پیوند کوالانسی و از طریق برهمکنش π - π در ساختار GQDs متصل کند (۵). هدف این پژوهش طراحی و بررسی یک سیستم تحویل داروی جدید بر پایه GQDs برای درمان سرطان پستان می‌باشد. این مطالعه در مورد سیستم‌های تحویل داروی نانو، نه تنها به درمان سرطان پستان کمک می‌کند، بلکه می‌تواند برای درمان سایر سرطان‌ها از طریق اتصال لیگاند هدفمند و ترکیب‌های درمانی مناسب نیز گسترش یابد و به دلیل نشر فلورسانس ناشی از نقاط کوانتومی گرافن، این سیستم‌ها قابل ردیابی در سلول‌های هدف می‌باشند.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- سنتز نانوحامل با استفاده از نقاط کوانتومی

گرافن (GQDs)

در ابتدا برای تهیه GQDs از پیرولیز یک مرحله‌ای آمینواسید رایج ال-گلوتامیک اسید، با کمک یک دستگاه حرارتی استفاده شد. به این ترتیب که ۲ گرم گلوتامیک اسید در دمای ۲۱۲ درجه سلسیوس ذوب شده و پس از تغییر رنگ از سفید شفاف به قهوه‌ای پرتقالی، دستگاه حرارتی خاموش شده و ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه شد و با دور کم همزن به کمک مگنت به مدت نیم ساعت گردش محلول انجام شد. سپس سانتریفوژ با دور ۴۰۰۰ rpm به مدت نیم ساعت انجام شد، محلول رویی در آون خلاء ۸۰

خانواده گرافن با عنوان نقاط کوانتومی گرافن (GQDs)^۱، به عنوان نسل بعدی نانومواد مبتنی بر کربن با پتانسیل بسیار بالا در زمینه زیست‌پزشکی معرفی شده است (۳). GQDs ویژگی‌های الکترواپتیک خارق‌العاده‌ای را به نمایش می‌گذارند و همچنین زیست‌سازگاری عالی و روش‌های کم‌هزینه آماده‌سازی را ارائه می‌دهند (۴). فلورسانس ذاتی آن‌ها توجه بیشتری را در درمان سرطان به خود جلب کرده است و آن‌ها را برای درمان و ردیابی همزمان سلول‌های سرطانی مناسب می‌سازد (۳، ۵). به این ترتیب امکان نظارت بر کل فرایند داخل شدن دارو، توزیع داخل سلولی و رهايش دارو را فراهم می‌نماید. با این حال طراحی سیستم دارو رسانی مؤثر برای درمان سرطان باید شامل یک واحد لیگاند هدف گیرنده تومور باشد که به طور اختصاصی گیرنده‌های سرطانی در سطح سلول را تشخیص دهد و موجب اندوسیتوز با واسطه گیرنده گردد (۳، ۶). این رویکرد پتانسیل اثربخشی دارو را با افزایش مقدار داروی وارد شده به سلول هدف در یک دوز بهبود می‌بخشد. درحالی‌که اثرهای مضر دارو روی سلول‌های سالم، احتمال و شدت عوارض ناشی از دارو که در شیمی‌درمانی‌های معمول رایج است کاهش می‌دهد (۷). لیگاند‌های هدف‌گیری شامل آرژنین، گلايسين، آسپارتیک اسید، فولیک اسید، بیوتین، اسید هیالورونیک و آنتی‌بادی‌ها می‌باشند (۳، ۷)، که می‌توانند برای اتصال به گیرنده‌های سطحی و افزایش درونی سازی GQDs از طریق اندوسیتوز به کار برده شوند. مطالعه‌هایی نشان داده‌اند که اسید فولیک (FA) و اسید فولیک کونژوگه شده با اختصاصیت بالایی به گیرنده‌های اسید فولیک متصل می‌گردند. گیرنده اسید فولیک در تومورهای اپیتلیال، تخمدان، گردن رحم، پستان، ریه، کلیه، کولورکتال و مغز بیان بسیار بالایی دارند. نقاط کوانتومی که با اسید فولیک همراه می‌شوند پتانسیل بسیار بالایی برای شناسایی سلول‌های سرطانی که اسید فولیک را به مقدار زیادی بیان می‌کنند دارند. زیرا آن‌ها در این سلول‌ها می‌توانند نسبت به سلول‌های نرمال، بیشتر اندوسیتوز شوند و به همین ترتیب هنگامی که نقاط کوانتومی به یک عامل ضد سرطان متصل گردند موجب مرگ تومور می‌شوند (۸). نانوذرات GQDs به دلیل ساختار مسطح خود،

میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) تکنیکی است که از یک پرتوی الکترونی برای تصویربرداری از یک نمونه نانوذره استفاده می‌کند و وضوح بسیار بالاتری نسبت به سایر تکنیک‌های تصویربرداری مبتنی بر نور ارائه می‌دهد. TEM روش بهتری برای اندازه‌گیری مستقیم اندازه نانوذرات، توزیع اندازه و مورفولوژی (به‌ویژه ذرات کوچکتر از ۱۵ نانومتر) است. برای این منظور سوسپانسیون ۰/۱ میلی گرم در میلی لیتر از نانوحامل هدفمند تهیه شد و پس از سونیکاسیون به مدت ۵ دقیقه یک قطره از آن روی گرید با پوشش کربنی ریخته شد و پس از خشک شدن، مورفولوژی نانوذرات با دستگاه TEM zies Em10 بررسی شد (۱۱).

۲-۴- بررسی خواص نوری نانوحامل با طیف‌سنجی فلورسانس (فلوریمتری)

در این روش نشر نور از ماده پس از دریافت فوتون و تهییج در طول موج‌های مختلف بررسی می‌گردد. بدین منظور ۲ میلی گرم از نانوحامل هدفمندشده با اسید فولیک و نانوحامل فاقد اسید فولیک به‌طور جداگانه در ۱ میلی لیتر آب مقطر دیونیزه حل شدند، سپس نشر نانوذرات با استفاده از دستگاه طیف‌سنج UVIR3510 در طول موج‌های تهییج ۳۰۰ تا ۴۶۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت (۱۲).

۲-۵- تصویربرداری سلولی از نانوذرات

برای ارزیابی جذب و شدت فلورسانس نانوحامل حاوی دارو از روش میکروسکوپ لیزری کانفوکال استفاده شد. رده سلولی MCF-7 (آدنوکارسینومای پستان انسان IBRC C10506) از مرکز ذخایر زیستی ایران تهیه شد. 1×10^5 سلول MCF-7 در کف پلیت ۶ چاهکی روی کاور اسلیپ به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد تا سلول‌ها به کاور اسلیپ بچسبند. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم سلولی ۷۰ درصد محیط رویی خارج شد و سلول‌ها با PBS شست‌وشو داده شدند؛ سپس سلول‌ها با $50 \mu\text{g/mL}$ از نانوحامل در محیط کشت حاوی ۱۰ درصد FBS به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند. مراحل در سه چاهک به‌طور جداگانه تکرار شد، همچنین سه چاهک به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شد و با نانوحامل تیمار نشدند. پس از شست‌وشو با PBS با

درجه سلسیوس با خلاء 5×10^{-3} میلی بار خشک شد. در ادامه برای انجام فرایند پگیلاسیون و آمین‌دار کردن نانوذرات GQDs به‌منظور افزایش حلالیت و شدت فلورسانس، ۲ گرم GQDs با ۰/۲ گرم هگزامتیلن‌دی‌آمین و ۰/۲ گرم پلی‌اتیلن‌گلایکول متیل‌دار (mPEG2000) در ۲۰ میلی لیتر DMSO و یک قطره اسید سولفوریک غلیظ در دمای ۱۱۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت رفلکس شد. محصول به‌دست‌آمده به آون خلاء ۶۰ درجه سلسیوس با خلاء 5×10^{-3} میلی بار به مدت ۴ ساعت انتقال داده شد، سپس به‌منظور خارج کردن هگزامتیلن‌دی‌آمین و دیگر مواد واکنش نداده توسط اتر شست‌وشو داده و دوباره به آون خلاء انتقال داده شد. در ادامه جهت فولاته کردن نانوذرات سنتز شده، از روش حرارتی استفاده شد، به‌این ترتیب که ۱ گرم گرافن پگیله آمین‌دار و ۰/۳۵ گرم فولیک اسید و ۲۰ میلی لیتر DMSO با دور متوسط همزن مغناطیسی در دمای ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ ساعت ترکیب شدند، واکنش در ارن که خروجی آن با درپوش لاستیکی مسدود شده بود انجام شد. در نهایت محصول به آون خلاء ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انتقال داده شد. برای تأیید واکنش‌ها از روش‌های تصویربرداری الکترونی عبوری (TEM)^۱، آنالیز مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR)^۲ و فلوریمتری استفاده شد (۹).

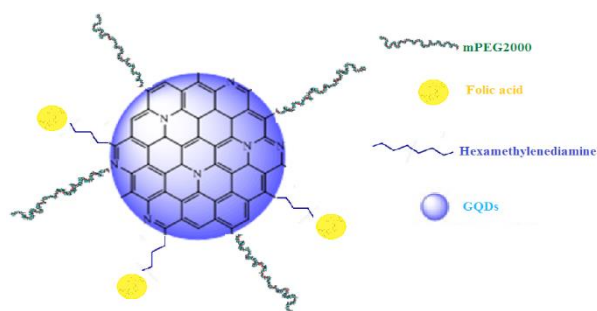
۲-۲- بررسی طیف‌سنجی FTIR از نانوحامل

در روش طیف‌سنجی مادون قرمز یا FTIR از نور مادون قرمز برای اسکن نمونه و مشاهده خواص شیمیایی آن استفاده می‌شود. برای مطالعه اصلاح‌های سطحی صورت‌گرفته روی نانوذرات، ۵ میلی گرم از نانوحامل هدفمند سنتز شده با پودر نمک KBr مخلوط شده و در یک قالب مخصوص به شکل قرص فشرده گردید، سپس طیف‌سنجی FTIR در دستگاه Thermo Scientific Avatar 380 در محدوده طول موج $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ انجام شد (۱۰).

۲-۳- بررسی خصوصیات ساختار نانوحامل با میکروسکوپ TEM

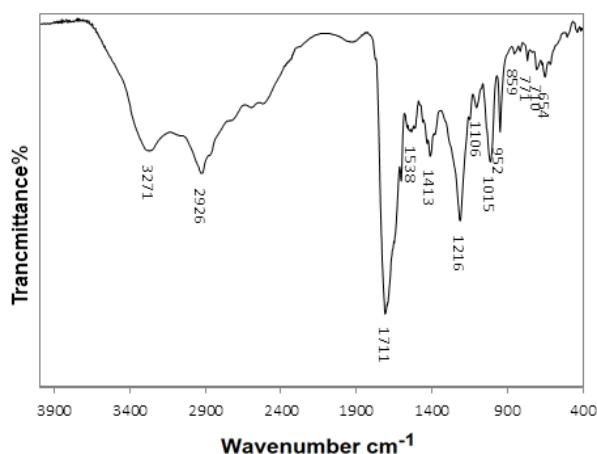
² Fourier Transform Infrared Spectrometer

¹ Transmission Electron Microscopes



شکل ۲- شماتیک نانوحامل سنتز شده

در نتایج FTIR، باند جذبی 1711 cm^{-1} به کربونیل mPEG-O-C=O مربوط می‌شود و با پیک آمید حاصل از واکنش اسید فولیک با گروه آمین (-NH-CO-) هم‌پوشانی دارد و باعث پهن شدن آن می‌شود. همچنین باند پهن 3271 به دلیل پیوندهای O-H و N-H در ترکیب‌های اسید فولیک و GQDs است (نمودار ۱).



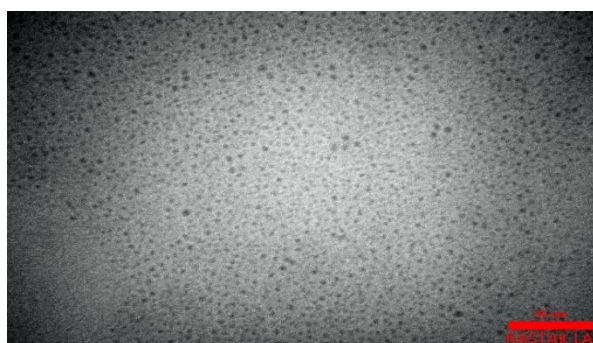
نمودار ۱- طیف FTIR نانوحامل GQDs عامل داروی کونژوگه شده با اسید فولیک با روش حرارتی

برای بررسی میزان نشر نانوذرات بعد از اضافه شدن عامل آمین و کونژوگه شدن با اسید فولیک از طیف‌سنجی فلورسنس یا فلوریمتری استفاده شد. پس از تهییج نانوذرات در طول موج‌های 300 تا 460 نانومتر، نشر نانوذرات مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نمودار، شدت فلورسنس براساس میزان طول موج تهییج تغییر می‌کند. در طیف مربوط به GQDs پگیله و عامل دار شده با آمین (نمودار ۲a) بیشترین شدت فلورسنس در طول موج تهییج 400 نانومتر و بالای 1000 a.u ارزیابی شد. بعد از اضافه شدن اسید فولیک، بیشترین شدت فلورسنس در طول موج تهییج 440 نانومتر در حدود 350 a.u می‌باشد که در محدوده مناسب برای تصویربرداری سلولی قرار دارد (نمودار ۲b).

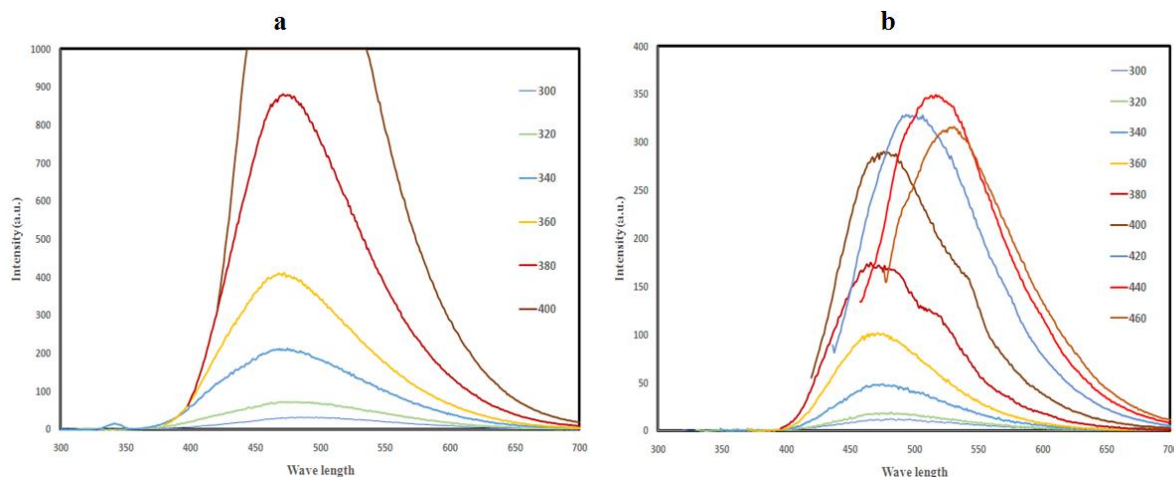
استفاده از پارافرمالدهید 4 درصد به مدت 20 دقیقه فیکس و در نهایت با میکروسکوپ کانفوکال بررسی شدند (۱۳).

۳- یافته‌ها

در این پژوهش برای تولید GQDs تک‌لایه و با سایز مناسب از روش تجزیه حرارتی یا پیرولیز آمینواسید رایج ال-گلوتامیک اسید استفاده شد. به منظور بررسی خصوصیات مورفولوژی GQDs سنتز شده از نانوذرات با میکروسکوپ الکترونی TEM تصویربرداری شد. نتایج این تصویربرداری نشان می‌دهد که GQDs سنتز شده دارای ساختار یکنواخت و نسبتاً کروی و اندازه زیر 10 نانومتر می‌باشند (شکل ۱). همچنین به منظور هدفمندسازی، نانوذرات با اسید فولیک به عنوان لیگاند، کونژوگه شدند. برای اتصال اسید فولیک به سطح نانوذرات GQDs از هگزامتیلندی آمین که ایجادکننده گروه‌های آمین به عنوان رابط می‌باشد استفاده شد و اسید فولیک با ایجاد پیوند کوالانسی با گروه آمین با استفاده از حرارت و بدون نیاز به واکنشگرهای شیمیایی به سطح نانوذرات اتصال یافت، همچنین اضافه کردن عامل آمین و PEG سبب حفظ خاصیت فلورسنس نانوذرات شد. شماتیک نانوحامل سنتز شده در شکل ۲ به نمایش گذاشته شده است.



شکل ۱- تصویربرداری الکترونی TEM از نانوذرات GQDs

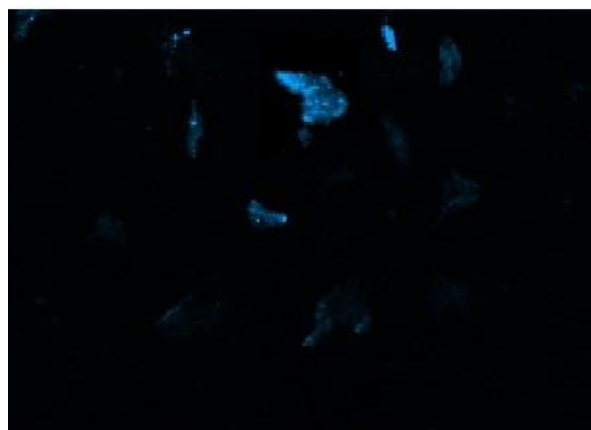


نمودار ۲- طیف فلورسنس نانوحامل GQDs پگیله عامل دار شده با آمین (a) و کونژوگه شده با اسید فولیک (b).

مناسب را نشان دادند (شکل ۳). این یافته نشان می‌دهد که این نانوذره به عنوان یک نانوحامل می‌تواند برای تصویربرداری هم‌زمان سلول‌های سرطانی و تحویل دارو به سلول‌های سرطان پستان مطلوب باشد.

شکل ۳- تصویر میکروسکوپ کانفوکال. به ترتیب از چپ به راست تصویر میدان روشن سلول کنترل MCF-7 بدون تیمار با نانوحامل (۴۰X)، تصویر فلورسانس سلول MCF-7 تیمار شده با نانوحامل در طول موج تهییج ۳۴۰ نانومتر (۲۰X).

نتایج تصویربرداری کانفوکال، جذب سلولی نانوحامل و وارد شدن آن به سلول‌های سرطان پستان MCF-7 پس از ۲ ساعت انکوباسیون دارویی را تأیید می‌کند. سلول‌های MCF-7 تیمار شده با نانوحامل سنتز شده شدت فلورسانس



۴- بحث

تجزیه حرارتی از آمینو اسید رایج ال-گلوتامیک اسید سنتز شدند و با هگزامتیلن دی‌آمین، پلی اتیلن گلیکول و اسید فولیک جهت افزایش شدت نشر فلورسانس، پایداری و هدفمندسازی اصلاح سطح گردیدند. در تصویربرداری TEM ساختار نانوذرات GQDs سنتز شده به صورت یکنواخت و با شکل نیمه کروی با سایزی کمتر از ۱۰ نانومتر مشخص شد که اندازه مناسبی به عنوان حامل دارو می‌باشد، ضمن آنکه خواص فلورسانس آن حفظ گردید (۱۶، ۱۷). تحقیق‌ها نشان داده است که سایز نانوذرات در خواص فلورسانس GQDs اثرگذار است، Kim و همکارانش GQDs با اندازه‌های ۵ تا ۳۵ نانومتر سنتز کردند و با بررسی مورفولوژی و ساختار آن‌ها با میکروسکوپ الکترونی عبوری

توسعه فرمول‌های دارویی مبتنی بر نانوذرات، فرصت‌هایی را برای رسیدگی و درمان بیماری‌های چالش برانگیز ایجاد کرده است. نانوذرات را می‌توان از طریق دست‌کاری اندازه، ویژگی‌های سطح و مواد مورد استفاده، به سیستم‌های هوشمندی تبدیل کرد که قابلیت درمان و تصویربرداری هم‌زمان را ارائه دهند (۱۴، ۱۵). پژوهش‌های اخیر بر روی GQDs نشان داده‌اند که اصلاح سطح ساختار GQDs بر خواص نوری، الکترونیکی، مغناطیسی و بیولوژیکی آن‌ها تأثیرگذار است و باعث می‌شود که کارایی بهتری در کاربردهای پزشکی از جمله تصویربرداری زیستی داشته باشند (۵). در مطالعه حاضر نانوذرات GQDs با روش

با وضوح بالا و میکروسکوپ نیروی اتمی نتیجه گرفتند که خواص فلورسانس این نانوذرات با سایز آن‌ها مرتبط بوده و با کوچکتر شدن سایز نانوذرات، فلورسانس ساطع شده از آن‌ها قوی‌تر می‌گردد (۱۸). همچنین نتایج مطالعه حاضر هم‌راستا با پژوهش Liu و همکارانش بود، آن‌ها GQDs با سایز ۶ تا ۱۰ نانومتر را توسط یک فرایند هیدروترمال و با استفاده از هیدروکربن آروماتیک پیرن سنتز کردند. نتایج این تحقیق حاکی از قوی‌تر بودن نشر فلورسانس GQDs با سایز کوچکتر بود (۱۹). در مطالعه حاضر برای حفظ قابلیت نشر فلورسانس، نانوذرات با آمین و PEG عامل‌دار شدند، نتایج فلوریمتری نشان داد که نانوذرات عامل‌دار شده نشر قابل‌توجهی تا بالای ۱۰۰۰ a.u به‌ویژه در محدوده تهییج ۴۰۰ نانومتر داشتند. تحقیق‌های انجام شده در این زمینه نشان‌دهنده تأثیر عامل آمین در پایداری و شدت فلورسانس نانوذرات GQDs می‌باشد. علاوه بر این وجود عامل آمین، اتصال اسید فولیک به نانوذرات را تسهیل می‌کند (۵). نتایج تحقیق‌های Zhang و همکارانش نشان می‌دهد که عامل آمین با اتم‌های کربن موجود در ساختار GQDs متصل شده و روی سطح آن‌ها توزیع می‌شود و ظهور گروه‌های آمیدی در سطح این نانوذرات سبب افزایش نشر ذاتی آن‌ها می‌گردد (۲۰). Liu و همکاران GQDs دوپ شده با نیتروژن را به‌عنوان پروب‌های فلورسنت کارآمد گزارش کردند که برای تصویربرداری سلولی و بافت عمیق استفاده می‌گردد، در این پژوهش حداکثر شدت فلورسانس ۹۵۰ a.u گزارش شد (۲۱). Kuo و همکارانش نانومواد متشکل از GQDs دارای عامل آمین و دوپ شده با نیتروژن (-amino-N-GQDs) را با استفاده از آمونیاک سنتز و پایداری فلورسانس آن‌ها را برای تصویربرداری زیستی بررسی کردند. نتایج این پژوهش نشان داد که GQDs دارای گروه آمین نسبت به آن‌هایی است که مقدار کمتری از چنین گروه‌هایی داشتند و ویژگی‌های برتری از لحاظ پایداری و شدت فلورسانس از خود نشان دادند (۲۲). همچنین سایر نتایج این پژوهش تأییدی بر نتایج مطالعه حاضر بود با این تفاوت که در مطالعه حاضر از هگزامتیلن‌دی‌آمین به‌جای آمونیاک برای عامل‌دار کردن استفاده شده است. اثر دوپینگ یا افزودن عامل‌ها در GQDs بر روی خصوصیات فلورسانس آن‌ها نه‌تنها به عامل دوپ شده بلکه به روش عامل‌دار کردن و همچنین ساختار حاصل بستگی دارد (۵، ۲۳). در مطالعه

حاضر در کنار عامل آمین، پلی‌اتیلن‌گلایکول (PEG) نیز برای بهبود زیست‌سازگاری و در عین حال حفظ پتانسیل فلورسانس GQDs استفاده شد. از آنجایی که هنگام سنتز GQDs گروه‌های عاملی اکسیژن در لبه‌ها و در صفحه پایه GQDs تشکیل شده و با ایجاد نقص در ساختار شدت فلورسانس را کاهش می‌دهند، بنابراین غیرفعال‌سازی سطحی GQDs با پلیمرهای مختلف یا مولکول‌های آلی نقش مهمی برای بهبود و تنظیم فلورسانس GQDs عامل-دار شده دارد (۲۴). Kim و همکارانش، GQDs که سطح آن‌ها با استفاده از پلی‌اتیلن‌گلایکول غیرفعال شده بود سنتز کردند. در بررسی‌های انجام‌شده PEG-GQDs نسبت به GQDs خالص شدت فلورسانس بالاتری را نشان دادند که با نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر مطابقت دارد (۲۴). همچنین عامل‌دار کردن GQDs با PEG باعث افزایش زیست‌سازگاری این نانوذرات و تسهیل ورود آن‌ها به سلول می‌شود (۲۵). به‌جهت هدفمندسازی نانوحامل برای هدایت آن‌ها به سلول‌های سرطانی با بیان بالای گیرنده فولات، از ترکیب اسید فولیک به‌عنوان لیگاند هدف‌گیری استفاده شد، بدین منظور برای ساده‌تر شدن و حذف عوامل واکنشگر شیمیایی از روش حرارتی برای ایجاد پیوند کووالانسی بین عامل کربوکسیل اسید فولیک و عامل آمین روی سطح GQDs استفاده گردید. با توجه به نتایج طیف‌سنجی فلورسانس، نانوذرات GQDs کونژوگه با اسید فولیک در مطالعه حاضر شدت فلورسانس مناسبی از خود نشان دادند، در طول‌موج تهییج ۳۴۰ نانومتر که در تصویربرداری کانفوکال استفاده شد شدت فلورسانس بالای ۳۰۰ a.u بود که عدد قابل‌توجهی نسبت به سایر نانوحامل‌های مشابه می‌باشد. درحالی‌که Nasrollahi و همکاران از GQDs و آهن برای تصویربرداری و تحویل داروی دوکسوروبیوسین استفاده کردند و حداکثر شدت فلورسانس برای نانوحامل در مطالعه آن‌ها ۱۶۰ a.u گزارش شده است (۲۶). نانوذرات تولیدشده در پژوهش حاضر می‌توانند بازدهی خوبی از لحاظ نفوذ سلولی و بازنشر نور در تصویربرداری سلولی ارائه دهند (۲۷). Kumawat و همکارانش با تجزیه و تحلیل کمی جذب سلولی GQDs نشان دادند که این امر عمدتاً از طریق اندوسیتوز با واسطه کلاترین و حفره غشایی کاوولین رخ می‌دهد، و یک فرآیند فعال وابسته به انرژی می‌باشد (۲۸). همچنین در مطالعه

دیگری Wang و همکارانش GQDs متصل به اسید فولیک را برای دارو رسانی دوکسوروبیوسین سنتز کردند، نتایج تحقیق‌های آن‌ها نشان داد که نانودارو هدفمند شده با اسید فولیک به وسیله اندوسیتوز با واسطهٔ رسپتور اسید فولیک وارد سلول MCF-7 می‌شود (۱۳). همچنین از مهمترین عوامل مؤثر بر جذب و نشر نانوذرات GQDs، اندازهٔ آن‌ها و اصلاح‌های سطحی در ساختار این نانوذرات مانند اضافه شدن عوامل آمین، کلر، بور و غیره به آن‌ها می‌باشد که می‌توانند با تغییر در میزان طول موج تهییج بر شدت باز نشر نیز تأثیرگذار باشند (۲۹). در مطالعهٔ حاضر نفوذ نانوحامل به ردهٔ سلولی سرطان پستان MCF-7 با بیان بالای گیرندهٔ فولات بررسی شد، تصاویر میکروسکوپ کانفوکال از سلول‌های MCF-7 تیمار شده با نانوذرات هدفمند، بیانگر جذب سلولی نانوذرات و مناسب بودن شدت فلورسانس ساطع شده از آن‌ها برای تصویربرداری سلولی بود. Feng و همکارانش تهیه و کاربرد GQDs دوپ شده با نیتروژن کونژوگه با اسید فولیک را به عنوان یک ترکیب تشخیصی فلورسنت برای سلول‌های MCF-7 سرطان پستان گزارش دادند. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که اسید فولیک می‌تواند به گیرنده‌های فولات در سطح سلول‌های MCF-7 متصل شده و GQDs دوپ شده با نیتروژن می‌توانند فلورسانس آبی ساطع و سلول‌های سرطانی را شناسایی کنند، همچنین آن‌ها گزارش کردند که افزایش گروه‌های عاملی نیتروژن دار در سطح GQDs می‌تواند محل‌های اتصال (پیوندهای N-H) بیشتری را برای اسید فولیک فراهم کند و ورود GQDs حاوی اسید فولیک به سلول را تسهیل نموده و به این ترتیب شدت فلورسانس سلول‌های سرطان پستانی که این نانوذرات را جذب کرده‌اند افزایش دهد (۳۰). همچنین در تحقیق دیگری Kang و همکاران نشان دادند که GQDs اصلاح شده با لیگاند می‌تواند هم‌زمان چندین کار شامل برچسب‌گذاری انتخابی سلول، دارو رسانی هدفمند و نظارت بر جذب سلولی را بدون نیاز به رنگ‌های خارجی تسهیل کند. در مطالعهٔ بیان شده، از نانوحامل GQDs کونژوگه شده با اسید فولیک برای حمل داروی دوکسوروبیوسین استفاده شد، نانوحامل سنتز شده توانست دارو را به‌طور مؤثر و از طریق اندوسیتوز با واسطهٔ گیرنده به سلول‌های هدف دارای گیرندهٔ اسید فولیک برساند و سمیت سلولی در سلول‌های غیرهدف را به‌طور قابل توجهی کاهش دهد (۳۱). این

گزارش‌ها با نتایج به‌دست آمده در مطالعهٔ حاضر منطبق بوده، با این تفاوت که در تحقیق گروه Feng و گروه Kang برای ایجاد پیوند آمیدی با اسید فولیک از واکنشگرهای شیمیایی و گرانی قیمت استفاده شده است، اما مطالعهٔ حاضر یک روش ساده و کم‌هزینه برای سنتز نانوحامل هدفمند با فلورسانس پایدار ارائه می‌دهد. نانوحامل سنتز شده می‌تواند به عنوان حامل برای دارو رسانی هدفمند به سلول‌های سرطانی MCF-7 و همچنین سایر سلول‌هایی که دارای بیان بالای گیرندهٔ اسید فولیک هستند، استفاده شود. علاوه بر این می‌توان از این روش برای هدفمندسازی GQDs با طیف گسترده‌ای از مولکول‌های زیستی نظیر آمینواسیدها، پپتیدها و غیره که بتواند با عامل آمین پیوند کووالانسی ایجاد کند در دارو رسانی هدفمند استفاده نمود.

۵- نتیجه‌گیری

این مطالعه با هدف طراحی، سنتز و شناسایی نانوحامل مبتنی بر GQDs برای تصویربرداری و درمان هم‌زمان سلول‌های سرطان پستان با بیان بالای گیرندهٔ اسید فولیک انجام شد. نتایج این پژوهش حاکی از آن است که نانوذرات GQDs پس از عامل‌دار شدن با mPEG2000 و هگزامتیلن‌دی‌آمین، خواص نوری منحصر به فرد خود را که برای تصویربرداری سلولی و دارو رسانی هدفمند بسیار مهم است حفظ کردند. همچنین هدفمندسازی نانوذرات GQDs با اسید فولیک به روش حرارتی و بدون استفاده از فعال‌کننده‌های شیمیایی در راستای اهداف شیمی سبز با موفقیت انجام شد. تصاویر میکروسکوپ اسکن لیزری کانفوکال نشان داد که نانوذرات GQDs عامل‌دار فولاته به خوبی به درون سلول‌های MCF-7 دارای گیرندهٔ اسید فولیک نفوذ کرده و نشر فلورسانس مناسبی از خود نشان می‌دهند و می‌توانند برای تشخیص، نظارت و درمان سرطان پستان با کاهش عوارض جانبی، کارآمد باشند. ضمن آنکه در مقایسه با تحقیق‌های مشابه این روش سنتز ساده‌تر بوده و نانوذرات GQDs عامل‌دار شده، بازدهی فلورسانس بالاتری را نشان می‌دهند. بنابراین می‌توان از نتایج این پژوهش در زمینهٔ دارو رسانی هدفمند برای درمان سرطان‌های با بیان بالای گیرندهٔ اسید فولیک بهره برد؛ همچنین می‌توان از این روش به عنوان جایگزین مقرون به صرفه برای ساختن

طیف وسیعی از GQDs عامل دار شده با لیگاندهای موردنظر استفاده نمود.

۷- ملاحظات اخلاقی

ندارد.

۸- تشکر و قدردانی

از حمایت آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد یادگار امام (ره) از این اثر تشکر و قدردانی می شود.

۹- تعارض منافع

ندارد.

۱۱- منابع

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015 Mar; 65(2):87-108. DOI: [10.3322/caac.21262](https://doi.org/10.3322/caac.21262)
2. Maurea N, Coppola C, Ragone G, Frasci G, Bonelli A, Romano C, Iaffaioli RV. Women survive breast cancer but fall victim to heart failure: the shadows and lights of targeted therapy. *J Cardiovasc Med.* 2010 Dec 1; 11(12):861-8. DOI: [10.2459/JCM.0b013e328336b4c1](https://doi.org/10.2459/JCM.0b013e328336b4c1)
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin.* 2018 Jan;68(1):7-30. <https://doi.org/10.3322/caac.21442>
4. Lippman SM, Brown PH. Tamoxifen prevention of breast cancer: an instance of the fingerpost. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Nov 3; 91(21):1809-19. DOI: [10.1093/jnci/91.21.1809](https://doi.org/10.1093/jnci/91.21.1809)
5. Chung S, Revia RA, Zhang M. Graphene quantum dots and their applications in bioimaging, biosensing, and therapy. *Adv. Mater.* 2021 Jun; 33(22):1904362. <https://doi.org/10.1002/adma.201904362>
6. Jin S, Ye K. Targeted drug delivery for breast cancer treatment. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2013 May 1; 8(2):143-53. doi: [10.20900/mo.20190021](https://doi.org/10.20900/mo.20190021)
7. Nayfield SG, Karp JE, Ford LG, Dorr FA, Kramer BS. Potential role of tamoxifen in prevention of breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1991 Oct 16; 83(20):1450-9. DOI: [10.1093/jnci/83.20.1450](https://doi.org/10.1093/jnci/83.20.1450)
8. Howell A, Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet (London, England).* 1998 May 16; 351(9114):1451-67. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)11423-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)11423-4)
9. Qu D, Zheng M, Zhang L, Zhao H, Xie Z, Jing X, Haddad RE, Fan H, Sun Z. Formation mechanism and optimization of highly luminescent N-doped graphene quantum dots. *Sci. Rep.* 2014 Jun 18; 4(1):5294. DOI:[10.1038/srep05294](https://doi.org/10.1038/srep05294)
10. Chhabra VA, Kaur R, Kumar N, Deep A, Rajesh C, Kim KH. Synthesis and spectroscopic studies of functionalized graphene quantum dots with diverse fluorescence characteristics. *RSC Adv.* 2018;8(21):11446-54. DOI: [10.1039/C8RA01148F](https://doi.org/10.1039/C8RA01148F)
11. Wilson A, Nambiar A, Sobha A. Synthesis of graphene quantum dots by liquid phase exfoliation method and its applications. *Mater. Today Proc.* 2023 May 3. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2023.04.362>
12. Xu X, Gao F, Bai X, Liu F, Kong W, Li M. Tuning the photoluminescence of graphene quantum dots by photochemical doping with nitrogen. *Mater.* 2017 Nov 20;10(11):1328. <https://doi.org/10.3390/ma10111328>
13. Wang X, Sun X, Lao J, He H, Cheng T, Wang M, Wang S, Huang F. Multifunctional graphene quantum dots for simultaneous targeted cellular imaging and drug delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2014 Oct 1;122:638-44. DOI: [10.1016/j.colsurfb.2014.07.043](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.07.043)
14. Rizvi SA, Saleh AM. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi Pharm J.* 2018 Jan 1; 26(1):64-70. doi: [10.1016/j.jsps.2017.10.012](https://doi.org/10.1016/j.jsps.2017.10.012)
15. Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EV, Rodriguez-Torres MD, Acosta-Torres LS, Diaz-Torres LA, Grillo R, Swamy MK, Sharma S, Habtemariam S. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J. Nanobiotechnology.* 2018 Dec; 16(1):1-33. DOI: [10.1186/s12951-018-0392-8](https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8)
16. Walkey CD, Olsen JB, Guo H, Emili A, Chan WC. Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake. *J. Am. Chem. Soc.* 2012 Feb 1; 134(4):2139-47. DOI: [10.1021/ja2084338](https://doi.org/10.1021/ja2084338)
17. Banerjee A, Qi J, Gogoi R, Wong J, Mitragotri S. Role of nanoparticle size, shape and surface chemistry in oral drug delivery. *J. Control. Release.* 2016 Sep 28; 238: 176-85. DOI: [10.1016/j.jconrel.2016.07.051](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.07.051)
18. Kim S, Hwang SW, Kim MK, Shin DY, Shin DH, Kim CO, Yang SB, Park JH, Hwang E, Choi SH, Ko G. Anomalous behaviors of visible luminescence from graphene quantum dots: interplay between size and shape. *ACS Nano.* 2012 Sep 25; 6(9):8203-8. <https://doi.org/10.1021/nn302878r>
19. Liu Z, Li F, Luo Y, Li M, Hu G, Pu X, Tang T, Wen J, Li X, Li W. Size effect of graphene quantum dots on photoluminescence. *Molecules.* 2021 Jun 26; 26(13):3922. <https://doi.org/10.3390/molecules26133922>
20. Zhang Q, Deng S, Liu J, Zhong X, He J, Chen X, Feng B, Chen Y, Ostrikov K. Cancer-targeting graphene quantum dots: fluorescence quantum yields, stability, and cell selectivity. *Adv. Funct. Mater.* 2019 Feb;29(5):1805860. doi:[10.1002/adfm.201805860](https://doi.org/10.1002/adfm.201805860)
21. Liu Q, Guo B, Rao Z, Zhang B, Gong JR. Strong two-photon-induced fluorescence from photostable, biocompatible nitrogen-doped graphene quantum dots for cellular and deep-tissue imaging. *Nano Lett.* 2013 Jun 12;13(6):2436-41. DOI: [10.1021/nl400368v](https://doi.org/10.1021/nl400368v)
22. Kuo WS, Chang CY, Huang KS, Liu JC, Shao YT, Yang CH, Wu PC. Amino-functionalized nitrogen-doped graphene-quantum-dot-based nanomaterials with nitrogen and amino-functionalized group content dependence for highly efficient two-photon bioimaging. *Int. J. Mol. Sci.* 2020 Apr 22; 21(8):2939. <https://doi.org/10.3390/ijms21082939>

23. Qian F, Li X, Tang L, Lai SK, Lu C, Lau SP. Potassium doping: Tuning the optical properties of graphene quantum dots. *AIP Adv.* 2016 Jul 1; 6(7). <https://doi.org/10.1063/1.4959906>
24. Kim HJ, Lee CK, Seo JG, Hong SJ, Song G, Lee J, Ahn C, Lee DJ, Song SH. Highly luminescent polyethylene glycol-passivated graphene quantum dots for light emitting diodes. *RSC Adv.* 2020; 10(46):27418-23. <https://doi.org/10.1039/D0RA02257H>
25. Ji Y, Li YM, Seo JG, Jang TS, Knowles JC, Song SH, Lee JH. Biological potential of polyethylene glycol (PEG)-functionalized graphene quantum dots in in vitro neural stem/progenitor cells. *Nanomater.* 2021 May 29; 11(6):1446. <https://doi.org/10.3390/nano11061446>
26. Nasrollahi F, Sana B, Paramelle D, Ahadian S, Khademhosseini A, Lim S. Incorporation of graphene quantum dots, iron, and doxorubicin in/on ferritin nanocages for bimodal imaging and drug delivery. *Adv. Ther.* 2020 Mar; 3(3):1900183. [doi:10.1002/adtp.201900183](https://doi.org/10.1002/adtp.201900183)
27. Tade RS, Patil PO. Theranostic prospects of graphene quantum dots in breast cancer. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2020 Oct 27;6(11):5987-6008. [DOI: 10.1021/acsbiomaterials.0c01045](https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c01045)
28. Kumawat MK, Thakur M, Gurung RB, Srivastava R. Graphene quantum dots for cell proliferation, nucleus imaging, and photoluminescent sensing applications. *Sci. Rep.* 2017 Nov 20;7(1):15858. [DOI: 10.1038/s41598-017-16025-w](https://doi.org/10.1038/s41598-017-16025-w)
29. Li X, Lau SP, Tang L, Ji R, Yang P. Multicolour light emission from chlorine-doped graphene quantum dots. *J. Mater. Chem. C.* 2013;1(44):7308-13. <https://doi.org/10.1039/C3TC31473A>
30. Feng S, Pan J, Li C, Zheng Y. Folic acid-conjugated nitrogen-doped graphene quantum dots as a fluorescent diagnostic material for MCF-7 cells. *Nanotechnology.* 2020 Jan 13; 31(13):135701. [DOI: 10.1088/1361-6528/ab5f7f](https://doi.org/10.1088/1361-6528/ab5f7f)
31. Kang H, Wang T, Liu W, Tian D. Folic acid modified graphene quantum dots from konjac glucomannan for cell imaging and targeted drug delivery. *ChemistrySelect.* 2022 Dec 13;7(46):e202203295. <https://doi.org/10.1002/slct.202203295>