

Investigation of the Anticancer Effects of Nanocomposite of the Modified Graphene Oxide with Isatin-3-Semicarbazone on the Retinoblastoma Cells (Y79) Invitro

Zahra Ramezani¹ , Hasan Tahermansouri^{*} ¹, Farhoush Kiani¹

¹ Dept of Chemistry, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran

Article Info

Article type:
Research article

Article History:

Received: 05 December 2020
Revised: 16 December 2020
Accepted: 03 June 2021

* Correspondence to:

Hasan Tahermansouri
Dept of Chemistry, Ayatollah
Amoli Branch, Islamic Azad
University, Amol, Iran
Email:
h.tahermansouri@iauamol.ac.ir

ABSTRACT

Introduction: The most common ocular tumor is retinoblastoma, which can be treated by different methods. The use of carbon nanostructures has attracted much attention due to their unique properties, such as crossing cell membranes, for cancer diagnosis and other medical applications. This study aimed to investigate and assess the toxicity of the modified graphene oxide (GO) with isatin-3-semicarbazone (ISA) in order to treat retinoblastoma.

Material & Methods: This study utilized ISA to modify the GO. Subsequently, the modified GO-ISA was characterized by different techniques, such as Fourier transform infrared spectrometry, Scanning Electron Microscope, and Thermal Gravimetric Analysis. The cell toxicity of samples was assessed by MTT assay for two types of cells of retinoblastoma (Y79) and adipose-derived stem cells (ADSC) after 24 h at different concentrations. Data were analyzed in SPSS software using one-way analysis of variance (ANOVA). A p-value less than 0.05 was considered statistically significant.

Findings: The results showed that in the concentration range of 10-50 μL , GO-ISA decreased significantly ($P < 0.01$) the conservation percentage of retinoblastoma cells from 73.98% to 27.48%, while these values for ADSC decreased from 78.16% to 50.11% ($P < 0.01$). In addition, GO-ISA at 30 μL resulted in a significant increase ($P < 0.01$) in the cell toxicity of the retinoblastoma (26%), compared to GO.

Discussion & Conclusion: GO-ISA increases the toxicity of the retinoblastoma cells, compared to GO which was significant at 30 μL . Therefore, this modification of the surface can be useful in future applications. With this modification of the surface, the active sites are provided for the biological and pharmacogenetic reactions in future.

Keywords: Graphene oxide, Isatin, Retinoblastoma, Surface modification, Toxicity

➤ How to cite this paper

Ramezani Z, Tahermansouri H, Kiani F. Investigation of the Anticancer Effects of Nanocomposite of the Modified Graphene Oxide with Isatin-3-Semicarbazone on the Retinoblastoma Cells (Y79) Invitro. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2022;29(5): 75-88.



بررسی آثار ضد سرطانی نانوکامپوزیت گرافن اکساید اصلاح شده با ایزاتین-۳-سمی کاربازون بر سلول های رتینوبلاستوما (Y79) در شرایط آزمایشگاهی

زهرا رمضانی ^{ID}، حسن طاهرمنصوری* ^{ID}، فرحوش کیانی

اگره شیمی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۱۵

تاریخ داوری: ۱۳۹۹/۰۹/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۱۳

نویسنده مسئول:

حسن طاهرمنصوری

اگره شیمی، واحد آیت الله آملی،

دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

Email:

h.tahermansuri@iaumol.ac.ir

مقدمه: رتینوبلاستوما شایع ترین تومور چشمی است که توسط روش های مختلفی درمان می شود. استفاده از نانو ساختارهای کربنی به سبب ویژگی های منحصر به فرد آنها نظیر عبور از غشای سلولی، برای تشخیص سرطان و دیگر کاربردهای پزشکی توجه فراوانی را به خود جلب کرده است؛ بنابراین، هدف از این مطالعه بررسی و ارزیابی سمیت گرافن اکساید اصلاح شده با ایزاتین-۳-سمی کاربازون در درمان رتینوبلاستوما است.

مواد و روش ها: در این تحقیق، از ایزاتین-۳-سمی کاربازون (ISA) برای اصلاح سطح گرافن اکساید استفاده شد؛ سپس گرافن اکساید اصلاح شده (GO-ISA) با روش های مختلفی مانند طیف سنجی مادون قرمز، میکروسکوپ الکترونی روبشی و آنالیز وزن سنجی گرمایی شناسایی گردید. سمیت سلولی نمونه ها با روش MTT برای دو نوع سلول رتینوبلاستوما (Y79) و سلول بنیادی (ADSC)، پس از ۲۴ ساعت در غلظت های مختلف بررسی شد. داده ها با استفاده از آنالیز واریانس یک راهه (ANOVA) تجزیه و تحلیل گردید ($P < 0.05$) و به این منظور از نرم افزار SPSS استفاده شد.

یافته ها: نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که در محدوده غلظت ۱۰ تا ۵۰ میکرولیتر، نمونه GO-ISA سبب کاهش معنی دار ($P < 0.01$) و چشمگیر درصد بقای سلول های رتینوبلاستوما از ۷۳/۹۸ درصد به ۲۷/۴۸ درصد گردید، در صورتی که این مقادیر برای سلول های بنیادی از ۷۸/۱۶ درصد به ۵۰/۱۱ درصد رسید ($P < 0.01$)؛ همچنین GO-ISA در غلظت ۳۰ میکرولیتر سبب افزایش معنادار ($P < 0.01$) و چشمگیر سمیت در سلول های رتینوبلاستوما به میزان ۲۶ درصد در مقایسه با GO شد.

بحث و نتیجه گیری: GO-ISA سبب افزایش سمیت سلول های رتینوبلاستوما در مقایسه با GO گردید که در غلظت ۳۰ میکرولیتر قابل توجه بود؛ در نتیجه، این اصلاح سطح می تواند در کاربردهای آینده مفید باشد. با این اصلاح سطح، سایت های فعال برای واکنش های بیولوژیک و فارماکوژنیک آینده فراهم شد.

واژه های کلیدی: اصلاح سطح، ایزاتین، رتینوبلاستوما، سمیت، گرافن اکساید

استناد: رمضانی، زهرا؛ طاهر منصور، حسن؛ کیانی، فرحوش. بررسی آثار ضد سرطانی نانوکامپوزیت گرافن اکساید اصلاح شده با ایزاتین-۳-سمی کاربازون بر سلول های رتینوبلاستوما (Y79) در شرایط آزمایشگاهی. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، دی ۱۴۰۰؛ ۲۹(۵): ۷۵-۸۸.



به‌عنوان یک حامل دارورسانی هدفمند برای تحویل دوکسوروبیسین استفاده گردید (۸)؛ بنابراین، بررسی سمیت مربوط به آن‌ها برای استفاده از آن‌ها در کاربردهای پزشکی مهم و ضروری است.

گرافن ورقه‌ای دوبعدی از اتم‌های کربن در یک پیکربندی شش ضلعی است که اتم‌ها با هیبرید sp^2 به هم متصل شده‌اند (۹). گرافن اکساید نوعی از مشتقات گرافن است که در آن، گروه‌های عاملی اکسیژن‌دار مانند هیدروکسیل، کربوکسیل و اپوکسی حضور دارد. این نانوساختارهای کربنی خواص فراوانی نظیر رسانای برق عالی، خواص مکانیکی فوق‌العاده، ذخیره انرژی و حامل دارو از خود نشان داده است (۱۳-۱۰). تاکنون، برتری و مزیت‌های بسیاری برای کاربرد گرافن و گرافن اکساید در زمینه انتقال دارو بیان شده است؛ اما بعضی معایب وجود دارد که می‌توان با اصلاح سطح این نانوساختارها برطرف کرد. با توجه به شیمی سطح، گرافن بسیار آب‌گریز است و به‌خوبی در آب پخش نمی‌شود و برای کاربردهای بیولوژیکی نیاز به سورفاکتانت یا اصلاح سطح دارد. در مقابل، گرافن اکساید آب‌دوست است و می‌تواند در آب به‌صورت کلوئید پایدار پراکنده شود. به‌طور کلی، افزایش حلالیت و انحلال مواد نانویی حامل دارو در دستگاه انتقال دارو، موجب بهبود عملکرد و کاهش سمیت این مواد می‌گردد؛ در نتیجه، اصلاح سطح گرافن اکساید می‌تواند در بهبود خواص آن مفید باشد.

دو روش اصلی برای اصلاح سطح گرافن و گرافن اکساید وجود دارد: روش اصلاح غیر کوالانسی و روش اصلاح کوالانسی (۱۴). روش غیر کوالانسی شامل اتصال از طریق نیروهای واندروالسی، الکترواستاتیک و برهم‌کنش پای-پای بدون هیچ‌گونه تغییری در ساختار طبیعی گرافن است. گرافن اکساید اصلاح‌شده با این روش در زمینه‌های جذب سورفاکتانت، تعامل با پورفیرین‌ها و مولکول زیستی مانند DNA و پپتیدها استفاده شده است. روش اصلاح کوالانسی شامل واکنش ترکیبات آلی

رتینوبلاستوما شایع‌ترین تومور چشمی بدخیم در کودکان است و هر ساله موارد بسیاری از رتینوبلاستوما در سراسر جهان گزارش می‌شود (۱،۲). در حال حاضر، رتینوبلاستوما توسط روش‌های مختلفی نظیر لیزردرمانی، کرایوتراپی، جراحی، پرتودرمانی و شیمی‌درمانی درمان می‌شود (۳). هدف از درمان رتینوبلاستوما محافظت از بینایی و کاهش دادن عوارض جانبی است. شیمی‌درمانی روش مناسبی برای این منظور است که خود شیوه‌های گوناگونی دارد (۴). با وجود این، آثار جانبی داروهای شیمی‌درمانی یک مشکل بزرگ در درمان سرطان است؛ در نتیجه، یافتن و کشف کردن عوامل ضدسرطانی جدید با سمیت محدود و مقاومت دارویی کمتر نسبت به سلول‌های سرطانی مهم است (۵). از سوی دیگر، استفاده از نانومواد در صنایع دارویی و پزشکی از اهمیت فراوانی برخوردار است (۶). از نانومواد به‌سبب ویژگی‌های منحصر به فردی که در حالت توده در آن‌ها دیده نمی‌شود، مانند ویژگی‌های نوری، مغناطیسی، مکانیکی، شیمیایی و فیزیکی و توانایی آن‌ها در عبور از غشای سلولی، برای تشخیص نشانگرهای زیستی سرطان و دیگر کاربردهای پزشکی استفاده می‌شود (۷). در حقیقت، هدف مطالعات جدید، طراحی سیستم‌های جدید در نتیجه اصلاح نانومواد به‌منظور درمان و تشخیص ایمن و کارآمدتر بیماری‌هاست. در این میان، گرافن اکساید با توجه به ویژگی‌های خاص خود نظیر سیستم الکترونی مزدوج، فراوانی گروه‌های عاملی حاوی اکسیژن، مساحت سطح بالا و زیست‌سازگاری، امروزه توجهات بسیاری را برای تحقیقات بنیادی در زمینه کاربردهای صنعتی و زیست پزشکی به خود جلب کرده است. تلاش‌های فراوانی به‌منظور بررسی کاربردهای زیست پزشکی گرافن اکساید اصلاح‌شده در زمینه‌های مختلفی از جمله حامل‌های دارو، فناوری سلول‌های بنیادی، مهندسی بافت و درمان با نور صورت گرفته است؛ به‌عنوان مثال، از نانوکامپوزیت اکسید آهن/گرافن اکساید

با گروه‌های اکسیژن سطح گرافن اکسید است. اصلاح سطح با این روش به سهولت انجام می‌پذیرد و نانو ساختار اصلاح شده با این روش، عمدتاً در زمینه انتقال دارو به کار می‌رود؛ از این رو، روشی امیدوارکننده برای اتصال انواع آمین‌های آروماتیک و آلیفاتیک، اسیدهای آمینه و مولکول‌های زیستی، سیلان‌ها، آنزیم‌ها و پلیمرها است.

در سال‌های اخیر، خواص ضد میکروبی، ضد تشنجی و ضد سرطانی ایزاتین و مشتقات آن‌ها گزارش شده است (۱۶، ۱۵). یکی از خاصیت‌های ضد سرطانی مشتقات ایزاتین ویژگی مهار توبولین‌ها بوده است. علاوه بر این، سازوکار اثر سمیت سلولی مشتقات ایزاتین بسیار شبیه به سازوکار داروی شیمی‌درمانی وین بلاستین است که با مهار پلیمریزاسیون توبولین، سبب مرگ سلول‌های سرطانی می‌شوند (۱۷). علاوه بر این، در پژوهشی به بررسی آثار سمیت سلولی مشتقات دی‌برمو ایزاتین بر رده‌های سلولی HepG2 و Hela به روش MTT پرداخته شد. این مشتقات بر سلول‌های سرطانی کبدی مؤثرتر واقع گردیدند و نشان دادند که بعضی از مشتقات دی‌برمو ایزاتین روی سلول‌های سرطانی سمیت بالایی دارند که در ساخت داروهای شیمی‌درمانی می‌توانند مورد توجه قرار بگیرند (۱۸). علاوه بر این، در پژوهشی، سنتز مشتقات ناشی از سیروفلوکساسین و ایزاتین را به منظور دستیابی به ترکیبات جدید سیتوتوکسیک گزارش کردند. نتایج بیانگر آن بود که آنالوگ‌های کتزوگه از سیروفلوکساسین و مشتقات ایزاتین با روشی ساده قابل تهیه هستند. این ترکیبات دو نوع فارماکوفور برای اثر روی توپوایزومراز و سیستم توبولین دارند و به صورت بالقوه می‌توانند به عنوان ترکیبات ضد سرطان بررسی شوند (۱۹)؛ در نتیجه و بر اساس این پیشینه، تصمیم به توسعه تحقیقات درباره یک مشتق ایزاتین گرفته شد؛ بنابراین، هدف از این مطالعه بررسی و ارزیابی سمیت گرافن اکساید و گرافن اکساید اصلاح شده با ایزاتین-۳-سمی کاربازون و مقایسه آن‌ها با یکدیگر در درمان رتینوبلاستوما است؛ به عبارت دیگر، ابتدا گرافن اکساید با

مشتق ایزاتین اصلاح سطح شد که به منظور بررسی صحت پیوندهای تشکیل شده و تشخیص گروه‌های عاملی موجود در نانوکامپوزیت، از طیف‌سنجی مادون قرمز، تصاویر میکروسکوپ الکترونی و آنالیز وزن سنجی گرمایی استفاده گردید؛ سپس سمیت آن‌ها با سلول‌های رتینوبلاستوما چشم (Y79) و بنیادی چربی (ADSC) انسان ارزیابی شد. در حقیقت، تشکیل گروه‌های عاملی جدید حاصل از ایزاتین-۳-سمی کاربازون روی گرافن می‌تواند به تغییر سمیت آن منجر شود.

مواد و روش‌ها

همه واکنشگرها و حلال‌ها (تیونیل کلراید، ایزاتین، سمی کاربازید، سدیم استات، دی‌متیل فرمامید، اتانول) از شرکت شیمیایی Merck و گرافن اکساید با مشخصات (۹۹ درصد، با ضخامت ۳/۴-۷ نانومتر با تعداد لایه‌های ۱۰-۶) از کمپانی نتینو خریداری گردید. ایزاتین-۳-سمی کاربازون (ISA) از واکنش ایزاتین با سمی کاربازید (۲۰) فراهم شد. طیف‌سنجی مادون قرمز (FT-IR) با به کار بردن قرص‌های KBr روی طیف‌سنج با مدل Thermo Nicolet Nexus 870 FTIR ثبت گردید. میکروسکوپ الکترونی پویشی (SEM) با مدل MIRA3\TESCAN-XMU به منظور بررسی مورفولوژی ترکیبات استفاده شد. آنالیزهای وزن‌سنجی گرمایی (TGA) و مشتق وزن‌سنجی گرمایی (DTG) نمونه‌ها با دستگاه (NETZSCH TG 209 F1 Iris) در N₂ (۱۰ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه) صورت گرفت.

تهیه GO-ISA: ۴۰۰ میلی‌گرم GO با ۴۰ میلی‌لیتر SOCl₂ و ۱ میلی‌لیتر DMF مخلوط گردید؛ سپس مخلوط در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت تحت شرایط بازروانی قرار داده شد؛ پس از آن، SOCl₂ باقی‌مانده توسط تقطیر جدا گردید تا GO-Cl به دست آید؛ سپس ۳۰۰ میلی‌گرم از GO-Cl را با ۱۰۰ میلی‌گرم از ترکیب ISA در ۴۰ میلی‌لیتر DMF مخلوط و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد بازروانی شد. در

سه تکرار انجام شد. داده‌های به دست آمده توسط نرم افزار SPSS vol.26 و روش آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) و تست آماری توکی (Tukey) تجزیه و تحلیل گردید و تفاوت میانگین‌ها در سطوح $P < 0.05$ و $P < 0.01$ معنادار در نظر گرفته شد. اطلاعات و داده‌ها با استفاده از منحنی کالیبراسیون مناسب کالیبره گردید (۲۲).

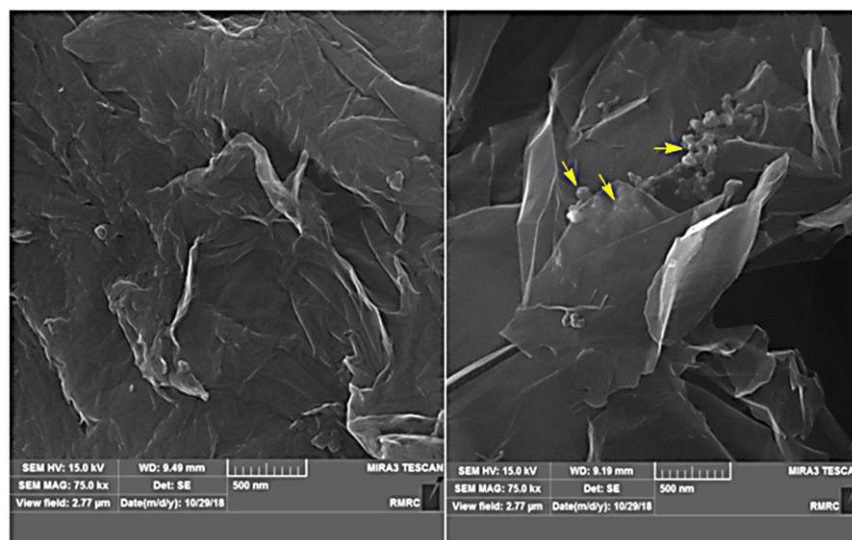
یافته‌ها

شناسایی نانوکامپوزیت سنتز شده: طیف‌های مادون قرمز مربوط به ترکیبات مدنظر در شکل شماره ۱ نشان داده شده است. در طیف مربوط به GO، پیک‌ها در حدود 1719 و 3406 cm^{-1} را به ترتیب می‌توان به گروه‌های OH و C=O کربوکسیل نسبت داد که نشان‌دهنده وجود گروه کربوکسیلیک روی سطح خارجی گرافن است؛ همچنین پیک در 1606 cm^{-1} را می‌توان به گروه C=C نسبت داد. در طیف ISA پیک‌ها در 1722 و 1632 cm^{-1} را می‌توان به گروه‌های کربونیل ISA مربوط ساخت؛ همچنین پیک‌ها در 1596 و 1444 cm^{-1} را می‌توان به C=N و C=C مربوط کرد. در طیف GO-ISA، پیک جدید جذبی در 1662 cm^{-1} را می‌توان

به کربونیل آمید (GO-C=O) نسبت داد. علاوه بر این، پیک‌ها در 1569 ، 1462 و 1165 cm^{-1} را می‌توان به ترتیب به ارتعاش کششی گروه‌های ایمین، C=C حلقه‌های آروماتیک و C-O یا C-N مرتبط ساخت که نشان می‌دهد گرافن با ISA مدنظر عامل دار شده است.

تصاویر SEM مربوط به گونه‌ها که نشان‌دهنده تغییرات مورفولوژی سطح گرافن در فرایند اصلاح سطح است، در شکل شماره ۲ نمایش داده شده است. همان‌طور که در شکل شماره ۲ مشاهده می‌شود، سطح گرافن اکسید به شکل صفحه‌ای و لایه لایه به صورت یکنواخت و بدون شکستگی است، در حالی که تصویر SEM مربوط به GO-ISA، حضور ترکیب ISA را بر سطح GO نشان می‌دهد که با پیکان‌های زرد نشان داده شده است؛ در نتیجه، اصلاح سطح GO با این ترکیب تأیید می‌گردد.

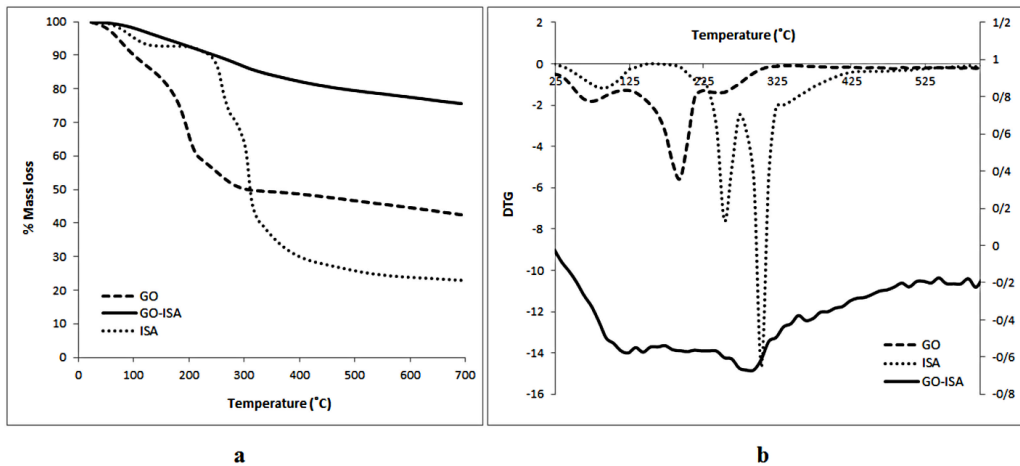
آنالیز وزن‌سنجی گرمایی (TGA) و وزن‌سنجی تفاضلی (DTG) اطلاعات کمی و مفیدی را درباره اصلاح سطح نانومواد کربنی فراهم می‌کند. از آنجا که دمای تجزیه گرافن اکساید و گروه‌های عاملی متصل به آن متفاوت است، کاهش وزن آن‌ها در دماهای مختلف می‌تواند برای تخمین مقدار گروه‌های عاملی متصل شده به گرافن



GO

GO-ISA

شکل شماره ۲. تصاویر SEM مربوط به نمونه‌ها. پیکان‌های زرد رنگ ISA را نشان می‌دهد که بر روی صفحه گرافن قرار گرفته است.



شکل شماره ۳. الف. منحنی TGA و ب. منحنی DTG نمونه‌ها در محیط گاز نیتروژن ($10^{\circ}\text{C}/\text{min}$)

وزن $49/50$ درصد است که می‌توان به گروه‌های عاملی موجود در ISA نسبت داد. منحنی DTG مربوط به ISA هم دو پیک در ناحیه 260 و 310 درجه سانتی‌گراد نشان می‌دهد که می‌توان به گروه‌های عاملی ISA مربوط کرد. در نمودار GO-ISA، یک کاهش وزن گسترده از 80 تا 700 درجه سانتی‌گراد با مقدار $24/54$ درصد دیده شد که می‌توان به گروه‌های ISA متصل به گرافن مرتبط دانست؛ از آنجا که با نمودار TGA مربوط به ISA مقایسه گردید. منحنی DTG مربوط به GO-ISA هم یک پیک چشمگیر در 290 درجه دارد که مربوط به تجزیه ISA است. این نتایج اصلاح سطح GO را با ISA تأیید کرد.

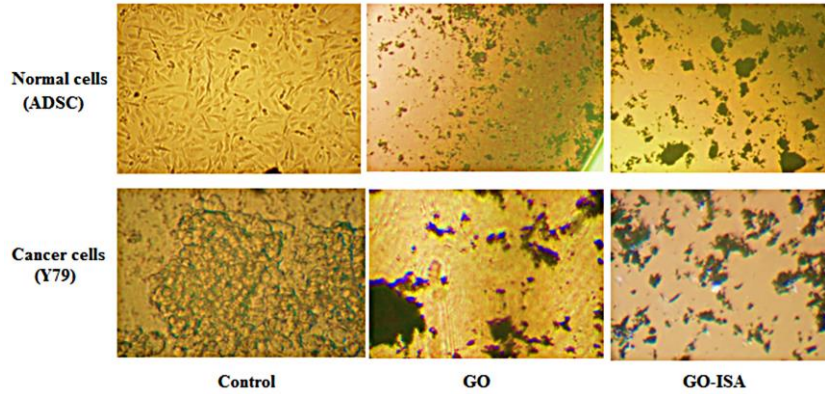
اثر GO و GO-ISA بر سمیت سلول‌های رتینوبلاستوما (Y79) و بنیادی (ADSC) بررسی گردید. با توجه به تصاویر مربوط به شکل شماره ۴، نمونه‌های کنترل مربوط به کشت سلول‌های رتینوبلاستوما و بنیادی بر روی سطح TCPS (کشت بافت پلی‌استایرن) نشان می‌دهد که سلول‌ها به خوبی چسبیده شدند و بر روی سطح TCPS گسترش پیدا کردند. تصاویر دیگر مربوط به اثر سلول‌های رتینوبلاستوما و بنیادی در مجاورت GO و GO-ISA است. این موضوع نشان می‌دهد که نمونه‌ها به خوبی به سلول‌های رتینوبلاستوما نفوذ کرده‌اند که در شکل به خوبی نشان داده شده است.

آنالیز MTT یک روش رنگ‌سنجی است که در آن، ماده MTT زردرنگ توسط میتوکندری احیا می‌گردد که به ماده بنفش‌رنگ نامحلول فرمازان منجر می‌شود.

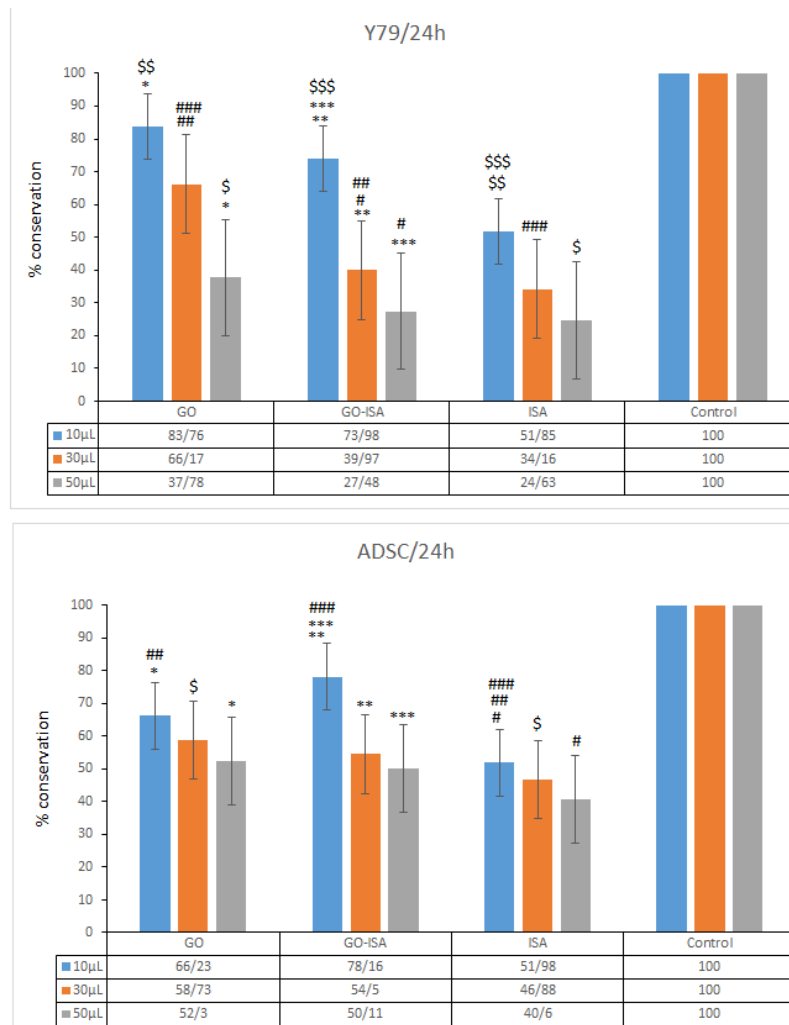
به کاربرده شود. منحنی‌های TGA و DTG مربوط به نمونه‌ها در شکل شماره ۳ ارائه شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، کاهش وزن‌های قابل توجه برای ترکیبات نشان‌دهنده اتصال گروه‌های مختلف به گرافن است که تأییدی بر اصلاح سطح گرافن توسط ISA است. منحنی TGA مربوط به GO سه کاهش وزن دارد. کاهش وزن اول تقریباً در دمای نزدیک به 120 درجه سانتی‌گراد اتفاق می‌افتد که مربوط به جذب آب بر روی سطح گرافن است. کاهش وزن دوم در دمایی بین 120 تا 230 درجه اتفاق افتاد و مشخصاً نشانه‌ای بر تجزیه گروه‌های هیدروکسیل است. کاهش وزن سوم در دمای بالای 240 درجه سانتی‌گراد مشاهده شد که می‌توان به گروه‌های کربوکسیل نسبت داد. مقدار کاهش وزن اول $13/24$ درصد، کاهش وزن دوم $29/75$ درصد و کاهش وزن سوم $14/56$ درصد تخمین زده شد. این نتایج بیانگر وجود گروه‌های اکسیژن‌دار فراوانی روی گرافن اکساید است. منحنی DTG در شکل شماره ۳. ب هم شامل سه پیک در نقاط 75 و 198 و 240 درجه است که به ترتیب به رطوبت، گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیل نسبت داده می‌شود. در نمودار ISA هم سه کاهش وزن دیده می‌شود که کاهش وزن اول در محدوده 120 درجه با مقدار $7/16$ درصد و منتسب به گروه‌های OH و یا H_2O است؛ کاهش وزن دوم در محدوده 220 تا 260 درجه با مقدار $20/24$ درصد و کاهش وزن سوم در محدوده 270 تا 600 درجه و با مقدار کاهش

درستی از سلول‌های زنده باشد. درواقع، آنالیز MTT ارزیابی دقیق و مهمی از میزان بقای سلول‌ها ارائه می‌دهد. شکل شماره ۵ آنالیز MTT مربوط به نمونه‌ها

از آنجا که سلول‌های زنده و فعال متابولیکی می‌توانند موجب این فرایند گردند، اندازه‌گیری میزان فرمازان تولیدشده به روش طیف‌سنجی نوری می‌تواند تخمین



شکل شماره ۴. رشد سلول‌های بنیادی (ADSC) و رتینوبلاستوما (Y79) روی نمونه‌ها



شکل شماره ۵. آنالیز MTT مربوط به نمونه‌ها در غلظت‌های متفاوت و آثار آن‌ها بر سلول‌های رتینوبلاستوما (Y79) و سلول‌های بنیادی (ADSC) در مدت‌زمان ۲۴ ساعت. نتایج به‌صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه‌های کنترل گزارش و $P < 0.05$ و $P < 0.01$ معنادار در نظر گرفته شده است. علامت‌های نشان‌دار نشان‌دهنده اختلاف معنادار میان دو گروه است (***)، اختلاف معنادار در سطح $P < 0.01$ و سایر علائم اختلاف معنادار در سطح $P < 0.05$ است.

جدول شماره ۱. آزمون تحلیل واریانس (ANOVA) آثار غلظت نمونه‌ها بر سلول‌های بنیادی (ADSC) و رتینوبلاستوما (Y79)

میانگین مربعات						درجه آزادی	منشأ تغییرات
آثار غلظت Y79 بر ISA	آثار غلظت ISA بر ADSC	آثار غلظت GO-ISA بر Y79	آثار غلظت GO-ISA بر ADSC	آثار غلظت GO بر Y79	آثار غلظت GO بر ADSC		
۳۴۸/۶۹۳ns	۴۱۹/۱۶۵*	۹۶۲/۹۱۹**	۱۱۱۲/۳۵۰**	۴۸۵/۳۹۱*	۴۰۳/۸۹۰*	۲	بین گروه‌ها
۸۶/۳۲۰ns	۶۵/۰۴۴*	۳۴/۲۳۸**	۷۴/۲۳۸**	۵۸/۵۱۷*	۷۳/۹۳۲*	۶	درون گروه‌ها
						۸	کل

* و ** به ترتیب معنادار در سطح پنج و یک درصد؛ ns. غیرمعنادار

را نشان می‌دهد که سمیت فراوانی را برای نمونه GO-ISA ارائه می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، درصد بقای سلول‌ها برای هر دو نوع سلول با افزایش مقدار نمونه‌ها، کاهش یافت؛ همچنین نتایج آنالیز واریانس و توکی نمونه‌ها در جدول‌های شماره ۱ تا ۴ ارائه شده است.

با توجه به شکل شماره ۵ و جدول واریانس شماره ۱، درصد بقای سلول‌های رتینوبلاستوما در اثر عمل با GO، از ۸۳/۷۶ درصد به ۳۷/۷۸ درصد به‌طور معناداری کاهش یافت ($P < 0.05$). این نتیجه زمانی

جدول شماره ۲. مقایسه آثار غلظت نمونه‌ها روی سلول‌های بنیادی (ADSC) و رتینوبلاستوما (Y79) بر اساس آنالیز توکی

میانگین مربعات						درجه آزادی	منشأ تغییرات
آثار نمونه‌ها بر Y79 در ۵۰ غلظت میکرولیتر	آثار نمونه‌ها بر ADSC در ۵۰ غلظت میکرولیتر	آثار نمونه‌ها بر Y79 در ۳۰ غلظت میکرولیتر	آثار نمونه‌ها بر ADSC در ۳۰ غلظت میکرولیتر	آثار نمونه‌ها بر Y79 در ۱۰ غلظت میکرولیتر	آثار نمونه‌ها بر ADSC در ۱۰ غلظت میکرولیتر		
۵۲۵/۷۰۹*	۴۵۶/۶۱۶ ns	۶۵۶/۴۵۰**	۴۲۰/۹۴۱*	۷۶۴/۸۹۵*	۵۸۴/۴۱۲**	۲	بین گروه‌ها
۵۶/۳۳۶*	۱۰۶/۱۱۷ ns	۳۶/۲۳۸**	۶۷/۳۷۱*	۸۶/۵۰۱*	۳۹/۷۲۶**	۶	درون گروه‌ها
						۸	کل

* و ** به ترتیب معنادار در سطح پنج و یک درصد؛ ns. غیرمعنادار

جدول شماره ۳. آزمون تحلیل واریانس (ANOVA) آثار نمونه‌های مختلف (GO، GO-ISA، ISA) در غلظت‌های مشخص بر سلول‌های بنیادی (ADSC) و رتینوبلاستوما (Y79)

ارزش P	Y79		ADSC		مقایسه گروه‌ها	آنالیز توکی
	میانگین	ارزش P	میانگین	ارزش P		
۰/۷۵۴	^f ۷۴/۰۹	۰/۹۹۸	^a ۷۵/۱۳		GO با GO-ISA	
۰/۰۴۲	^f ۶۸/۵۲	۰/۰۰۸	^a ۷۵/۴۲		ISA با GO-ISA	۱۰ میکرولیتر
۰/۰۱۸	^g ۴۴/۰۷	۰/۰۰۸	^b ۵۱/۱۰		GO با ISA	
۰/۰۴۲	^h ۶۳/۹۴	۰/۳۷۳	^c ۶۲/۴۸		GO-ISA با GO	
۰/۰۶۹	ⁱ ۴۸/۱۸	۰/۱۷۹	^{cd} ۵۲/۷۰		ISA با GO-ISA	۳۰ میکرولیتر
۰/۰۰۲	ⁱ ۳۴/۳۸	۰/۰۲۹	^d ۳۸/۹۰		GO با ISA	
۰/۰۸۹	^k ۴۸/۸۱	۰/۲۵۹	^e ۵۱/۹۶		GO-ISA با GO	
۰/۲۸۹	^{kl} ۳۲/۸۱	۰/۵۲۲	^e ۳۷/۱۳		ISA با GO-ISA	۵۰ میکرولیتر
۰/۰۱۲	^l ۲۲/۵۵	۰/۰۶۱	^e ۲۷/۴۶		GO با ISA	

حروف انگلیسی مشابه نشان‌دهنده نبود اختلاف معنادار میان میانگین بین گروه‌ها است ($P < 0.05$).

جدول شماره ۴. مقایسه آثار نمونه‌های مختلف (GO، GO-ISA، ISA) در غلظت‌های مشخص بر سلول‌های بنیادی (ADSC) و رتینوبلاستوما (Y79) بر اساس آنالیز توکی

آنالیز توکی	مقایسه گروه‌ها	ADSC		Y79	
		میانگین	ارزش P	میانگین	ارزش P
GO	۱۰ با ۳۰ میکرولیتر	^a ۷۵/۱۳	۰/۲۴۷	^g ۷۴/۰۹	۰/۳۰۷
	۳۰ با ۵۰ میکرولیتر	^{ab} ۶۲/۴۸	۰/۳۵۶	^{gh} ۶۳/۹۴	۰/۱۱۳
	۵۰ با ۱۰ میکرولیتر	^b ۵۱/۹۶	۰/۰۳۸	^h ۴۸/۸۱	۰/۰۱۶
GO-ISA	۱۰ با ۳۰ میکرولیتر	^c ۷۵/۴۲	۰/۰۴۱	ⁱ ۶۸/۵۲	۰/۰۱۳
	۳۰ با ۵۰ میکرولیتر	^d ۵۲/۷۰	۰/۱۴۷	^k ۴۸/۱۸	۰/۰۴۲
	۵۰ با ۱۰ میکرولیتر	^d ۳۷/۱۳	۰/۰۰۴	^j ۳۲/۸۱	۰/۰۰۱
ISA	۱۰ با ۳۰ میکرولیتر	^e ۵۱/۱۰	^e ۰/۲۳۲	^l ۴۴/۰۷	۰/۴۵۶
	۳۰ با ۵۰ میکرولیتر	^e ۳۸/۹۰	^e ۰/۲۶۸	^l ۳۴/۳۸	۰/۳۳۱
	۵۰ با ۱۰ میکرولیتر	^f ۲۷/۴۶	^f ۰/۰۲۷	^l ۲۲/۵۵	۰/۰۶۷

حروف انگلیسی مشابه نشان‌دهنده نبود اختلاف معنادار میان میانگین بین گروه‌ها است ($P < 0.05$).

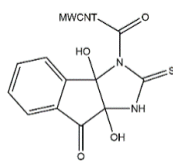
۵ قابل مشاهده است. با وجود این، اختلاف معناداری میان غلظت‌های ۳۰ و ۵۰ میکرولیتر نبود؛ اما اختلاف میان غلظت‌های ۱۰ میکرولیتر با ۳۰ (** با سطح $P < 0.05$) و ۵۰ (***) با سطح $P < 0.01$) میکرولیتر معنادار بود که در جدول شماره ۲ ارائه گردیده است؛ در نتیجه، درصد بقای سلول‌های بنیادی توسط GO-ISA نسبت به سلول‌های رتینوبلاستوما بیشتر بود. با وجود این، اثر ISA بر سلول‌های رتینوبلاستوما معنادار نبود ($P > 0.05$)؛ اما روی سلول‌های بنیادی معنادار (# با سطح $P < 0.05$) بود؛ زیرا اختلاف معنی‌دار میان غلظت‌های ۱۰ با ۵۰ میکرولیتر به دست آمد (شکل شماره ۵).

از مقایسه نمونه‌های GO با GO-ISA به این نتیجه می‌رسیم که عامل‌دار کردن GO با ترکیب ISA سبب افزایش سمیت یا کاهش بقای سلول‌های رتینوبلاستوما می‌شود و این در غلظت ۳۰ میکرولیتر به‌طور معناداری ($P < 0.01$) مشهود بود (جدول شماره ۳)؛ زیرا اختلاف معناداری میان GO و GO-ISA وجود داشت (###)؛ اما این سمیت درباره سلول‌های بنیادی به علت نبودن اختلاف معنی‌دار میان آن‌ها ($P > 0.05$) تقریباً ثابت بود (جدول شماره ۴). از سوی دیگر، با توجه به جدول شماره ۳ و شکل شماره ۵، اختلاف معناداری در غلظت ۵۰ میکرولیتر میان GO و

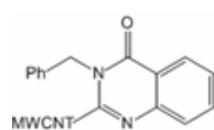
است که مقدار نمونه‌ها از ۱۰ میکرولیتر به ۵۰ میکرولیتر افزایش یافت. همین روند برای سلول‌های بنیادی هم به دست آمد؛ زیرا درصد بقای سلولی از ۶۶/۲۳ درصد به ۵۲/۳ درصد کاهش یافت که این تغییرات معنادار بود ($P < 0.05$). علاوه بر این، مقادیر P مربوط به آنالیز توکی برای هر دو نوع سلول نشان داد که اختلاف معناداری میان غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکرولیتر برای نمونه GO وجود دارد (جدول شماره ۲). در شکل شماره ۵ این اختلاف با علامت * نشان داده شده است؛ به عبارت دیگر، سمیت در غلظت ۵۰ میکرولیتر برای سلول‌های رتینوبلاستوما و بنیادی به‌طور معناداری افزایش یافت. این نتایج نشان داد که در مقدار ۵۰ میکرولیتر، تأثیر GO بر سلول‌های رتینوبلاستوما بیشتر است و سمیت بیشتری برای آن‌ها، در مقایسه با سلول‌های بنیادی، از خود نشان می‌دهد. از سوی دیگر، نمونه GO-ISA باعث کاهش معنی‌دار ($P < 0.01$) و چشمگیر درصد بقا از ۷۳/۹۸ درصد به ۲۷/۴۸ درصد برای سلول‌های رتینوبلاستوما شد (شکل شماره ۵)؛ زیرا اختلاف معناداری میان سه غلظت بر اساس آنالیز توکی (** با سطح $P < 0.05$) و (***) با سطح $P < 0.01$) به دست آمد (جدول شماره ۲)؛ همچنین این مقادیر برای سلول‌های بنیادی از ۷۸/۱۶ درصد به ۵۰/۱۱ درصد کاهش یافت ($P < 0.01$) که در شکل شماره

به‌طورکلی، این روش‌های شناسایی اصلاح سطح گرافن را توسط ISA تأیید نمود.

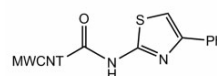
از آنجا که تغییرات سطح توجه بسیاری از دانشمندان را به خود جلب کرده است، در ده سال اخیر، تحقیقات گسترده‌ای در زمینه سمیت نانوساختارهای کربنی صورت گرفته است (۲۳). در یک تحقیق، سمیت سلولی نانولوله‌های کربنی چنددیواره کربوکسیل‌دار (MWCNT-COOH) بررسی گردید که با نین‌هیدرین و تیواوره اصلاح‌شده بود (۲۴). تحقیقات سمیت سلولی برای سلول‌های سرطانی سینه (MCF7) نشان داد که نانولوله‌های کربنی اصلاح‌شده با این ترکیبات (MWCNT-Inden)، سمیت بالایی را برای MCF7 حدود ۶۵ درصد، در مقایسه با MWCNT-COOH که حدود ۴۷ درصد بود، از خود ارائه داد؛ به‌عبارت‌دیگر، عامل‌دار کردن سبب افزایش سمیت سلول‌های سرطانی به‌اندازه ۱۸ درصد گردید. در پروژه‌ای دیگر، عامل‌دار کردن شیمیایی MWCNT-COOH با ۳-بنزیل کینازولین-۴-۳H) اون بررسی شد. نتایج سلولی برای دو نوع سلول، سلول‌های سرطانی معده (MKN-45) و MCF7 انسان، بیانگر سمیت بالای MWCNT-quinaz بر سلول‌های MKN-45 در مقایسه با سلول‌های MCF7 بود (۲۵). سمیت نانولوله‌های کربنی اصلاح‌شده با مشتق تiazol (MWCNT-Thiazol) با رده‌های سلولی کلیه جنینی انسان (HEK293) و سرطان پستان انسان (SKBR3) نیز گزارش شد. تحقیقات سلولی نشان داد که MWCNT-Thiazol تأثیر سمیت چشمگیری بر SKBR3 نسبت به HEK293 در غلظت‌های ۴ تا ۵ میکرولیتر از خود نشان می‌دهد (۲۶). علاوه بر این، عامل‌دار کردن MWCNT-COOH با ۴-هیدروکسی کینازولین (MWCNT-Quin)، سمیت فراوانی بر SKBR3 نسبت به HEK293 در غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از خود نشان داد (۲۷). ساختار ترکیبات در زیر آمده است.



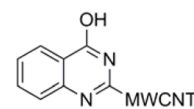
MWCNT-quinaz



MWCNT-Inden



MWCNT-Thiazol



MWCNT-quin

GO-ISA برای هر دو نوع سلول به‌دست نیامد ($P > 0.05$). با وجود این، اختلاف معناداری میان GO و ISA برای سلول‌های رتینوبلاستوما وجود داشت ($P < 0.05$). علاوه بر این، نمونه GO-ISA در غلظت ۱۰ میکرولیتر، درصد بقای بیشتری برای سلول‌های بنیادی نسبت به نمونه GO از خود نشان داد (شکل شماره ۵)؛ به‌عبارت‌دیگر، درصد بقای سلول‌های بنیادی از ۶۶/۲۳ درصد مربوط به GO به ۷۸/۱۶ درصد مربوط به GO-ISA افزایش یافت که بر اساس آنالیز توکی در جدول شماره ۴، اختلاف معناداری میان GO و GO-ISA نبود ($P > 0.05$)؛ همچنین برای سلول‌های رتینوبلاستوما اختلاف معناداری میان GO و GO-ISA در غلظت ۱۰ میکرولیتر به‌دست نیامد ($P > 0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری

تغییرات سطح در نانوساختارهای کربنی به‌ویژه نانوگرافن‌ها نقش مهمی در سمیت، کامپوزیت‌ها، تهیه فیبرها و بنابراین، در تعیین خواص مکانیکی مواد دارند (۲۳). همه روش‌های موجود برای ایجاد مشتقات شیمیایی روی نانوساختارهای کربن به دو گروه تقسیم می‌شوند: اتصال یک گروه به دیواره و یا واکنش با اتصالات ایجادشده. با این اتصالات ایجادشده خواص آن‌ها دچار تغییرات می‌شود. این تحقیق شامل واکنش ISA با اتصالات ایجادشده نظیر کربوکسیلیک اسیدها بر گرافن اکساید بود؛ در نتیجه، بر اساس نتایج طیف FT-IR که حضور گروه‌های عاملی ISA را بر سطح گرافن نشان داد، در این مطالعه اصلاح سطح با ISA تأیید شد؛ همچنین تصاویر SEM یکی از شواهد مهم برای تأیید اصلاح سطح گرافن است که شکل و مورفولوژی مربوط به ترکیبات مربوطه را ارائه داد. از سوی دیگر، آنالیز وزن‌سنجی گرمایی وجود گروه‌های ISA را روی گرافن بر اساس کاهش جرم و دمای تجزیه آن‌ها اثبات کرد.

با مقایسه کردن نتایج پژوهش‌های ارائه‌شده در بالا و این پروژه، به این نتیجه می‌رسیم که درصد سمیت سلول‌های سرطانی با اصلاح سطح نانولوله‌های کربنی افزایش می‌یابد؛ به‌عنوان مثال، نمونه‌های MWCNT-Inden و MWCNT-quinaz در مقایسه با MWCNT-COOH باعث افزایش سمیت سلول‌های سرطانی شد؛ به‌عبارت‌دیگر، اصلاح سطح در کشتن سلول‌های سرطانی نقش مؤثر داشت. این موضوع درباره GO-ISA هم صدق کرد. وقتی این نمونه با GO مقایسه گردید، سبب افزایش سمیت سلول سرطانی شد. علاوه بر این، نمونه‌های MWCNT-Thiazol و MWCNT-quin در غلظت ۵ میکرولیتر سمیت قابل توجهی بر سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های نرمال داشتند، درحالی‌که نمونه GO-ISA در غلظت ۳۰ میکرولیتر، اثر معنی‌دار خود را بر سلول‌های سرطانی در مقایسه با نرمال گذاشت.

از سوی دیگر، پژوهشی روی تغییرات سطح و اندازه نانومقیاسی گرافن اکسید در درمان فوتوگرمایی سرطان با استفاده از قدرت لیزر فوق‌العاده پایین انجام شد (۲۸). طی این پژوهش، با استفاده از گرافن اکسید کوچک با پوشش نانوکامپوزیتی پلی‌اتیلن گلیکول، متوجه شدند که اندازه و شیمی سطح روی رفتارهای *in vivo* (داخل بدن موجود زنده) گرافن تأثیر می‌گذارد و به‌طور قابل توجهی به بهبود عملکرد آن منجر می‌شود. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که شیمی سطح شیمیایی و اندازه ذره در عملکرد *in vivo* گرافن حیاتی هستند و نوید استفاده از نانوگرافن بهینه‌شده برای درمان فتوترمال را می‌دهد که می‌تواند به‌طور بالقوه، با سایر روش‌های درمانی ترکیب شود تا برای مبارزه علیه سرطان مفید واقع گردد (۲۸). در تحقیقی دیگر، یک ماده کامپوزیتی با استفاده از β -سیکلودکسترین/گرافن اکساید گزارش شد که اثر فراوانی بر رده‌های سلولی سرطان دهانه رحم داشتند

(۲۹). نتایج نشان داد که افزایش غلظت مواد کامپوزیتی از ۵۰ تا ۲۰۰ میکروگرم، به کاهش درصد بقای سلول‌های سرطانی از ۷۴ درصد به ۲۵ درصد منجر گردید. نتایج مشابهی نیز برای نمونه GO-ISA به‌دست آمد، هنگامی‌که غلظت از ۱۰ به ۵۰ میکرولیتر رسید. در پژوهشی دیگر، آثار گرافن اکساید اصلاح‌شده با ۸-هیدروکسی کینولین بر سمیت سلول‌های سرطانی و نرمال پستان بررسی شد. نتایج بیانگر افزایش چشمگیر سمیت سلول‌های سرطانی پستان تحت عمل قرارگرفته با نانوکامپوزیت، در مقایسه با سلول‌های نرمال پستان بود (۳۰)؛ همچنین نمونه بررسی‌شده GO-ISA تأثیر بیشتری بر سلول‌های سرطانی، در مقایسه با سلول‌های نرمال داشت.

به‌طور کلی، بررسی مطالعات بالا نشان می‌دهد که نانوساختارهای کربنی اصلاح‌شده با ترکیبات آلی مختلف، آثار سمیت سلولی فراوانی از خود نشان می‌دهند که حتی در برخی موارد، این نانومواد آثار سمیت بالایی بر سلول‌های سرطانی در مقایسه با سلول‌های نرمال داشته‌اند. به‌طور کلی، وجود گروه‌های عاملی جدید بر نانوساختارهای کربنی می‌تواند باعث تغییر خواص فیزیکی و شیمیایی آن‌ها شود. این گروه‌ها می‌توانند با سلول‌ها برهم‌کنش داشته باشند و باعث افزایش و یا کاهش سمیت آن‌ها گردند. مشابه با نتایج مطالعات بالا، مطالعه حاضر نشان داد که GO-ISA سنتز شده پتانسیل بالایی برای از بین بردن سلول‌های سرطانی رتینوبلاستوما در مقایسه با سلول‌های بنیادی دارد و به‌عنوان کاندید مناسبی برای درمان و مهار سلول‌های رتینوبلاستوما معرفی می‌شود.

سپاس‌گزاری

مقاله حاضر برگرفته از پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد است و بدین وسیله، نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت‌الله آملی بیان می‌دارند.

References

- Castillo BV, Kaufman L. Pediatric tumors of the eye and orbit. *Pediatr Clin North Am* 2003; 50: 149-72. doi.10.1016/S0031-3955(02)00115-3
- Shields CL, Shields JA. Diagnosis and management of retinoblastoma. *Cancer Cont* 2004; 11: 317-27. doi.10.1177/107327480401100506

3. Thampi S, Hetts SW, Cooke DL, Stewart PJ, Robbins E, Banerjee A, et al. Superselective intra arterial melphalan therapy for newly diagnosed and refractory retinoblastoma: results from a single institution. *Clin Ophthalmol* 2013; 7: 981-9. doi.10.2147/OPTH.S43398
4. Anubhav C, Shashi DS. Chemotherapy in retinoblastoma. *Int J Therap Rehabil Res* 2016; 5: 55-60. doi. 10.5455/ijtrr.000000116
5. Kooshafar Z, Salimi M, Javid A. [Evaluating antitumor effect of a novel hydrazone derivative in mammalian mice model]. *Koomesh* 2018; 20: 582-7. (Persian)
6. Yamanaka YJ, Leong KW. Engineering strategies to enhance nanoparticle mediated oral delivery. *J Biomate Sci Pol Edu* 2008; 19:1549-70. doi. 10.1163/156856208786440479
7. Choi YE, Kwak JW, Park JW. Nanotechnology for early cancer detection. *Sensors* 2010; 10: 428-55. doi.10.3390/s100100428
8. Yang X, Zhang X, Ma Y, Huang Y, Wang Y, Chen Y. Superparamagnetic graphene oxide Fe₃O₄ nanoparticles hybrid for controlled targeted drug carriers. *J Mate Chem* 2009; 19: 2710-4. doi.10.1039/B821416F
9. Sun Z, James DK, Tour JM. Graphene chemistry synthesis and manipulation. *J Phys Chem Let* 2011; 2: 2425-32. doi.10.1021/jz201000a
10. Papageorgiou DG, Kinloch IA, Young RJ. Mechanical properties of graphene and graphene based nanocomposites. *Prog Mate Sci* 2017; 90: 75-127. doi.10.1016/j.pmatsci.2017.07.004
11. Wei J, Zang Z, Zhang Y, Wang M, Du J, Tang X. Enhanced performance of light controlled conductive switching in hybrid cuprous oxide reduced graphene oxide Cu₂O rgo nanocomposites. *Opt Let* 2017; 42: 911-4. doi.10.1364/OL.42.000911
12. Lu X, Li L, Song B, Moon K, Hu N, Liao G, et.al. Mechanistic investigation of the graphene functionalization using p-phenylenediamine and its application for supercapacitors. *Nano Ene* 2015; 17: 160-70. doi.10.1016/j.nanoen.2015.08.011
13. Huang J, Jacobsen J, Larsen SW, Genina N, Weert M, Mullertz A, et al. Graphene oxide as a functional excipient in buccal films for delivery of clotrimazole effect of molecular interactions on drug release and antifungal activity in vitro. *Int J Pharm* 2020; 589: 119811. doi.10.1016/j.ijpharm.2020.119811
14. Chouhan A, Mungse H P, Khatri OP. Surface chemistry of graphene and graphene oxide a versatile route for their dispersion and tribological applications. *Adv Coll Int Sci* 2020; 283: 102215. doi.10.1016/j.cis.2020.102215
15. Pandeya SN, Smitha S, Jyoti M, Sridhar SK. Biological activities of isatin and its derivatives. *Acta Pharm* 2005; 55:27-46.
16. Vine KL, Matesic L, Locke JM, Ranson M, Skropeta D. Cytotoxic and anticancer activities of isatin and its derivatives a comprehensive review from 2000-8. *Ant Age Med Chem* 2009; 9: 397-414.
17. Jordan MA. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr Med Chem Ant Age* 2002; 2:1-17. doi.10.2174/1568011023354290
18. Shokrzadeh M, Emami S, Amirzadeh M, Modanloo M. [Cytotoxic effects of Dibromoisatin derivatives on hela and hepg2 cell lines using mtt assay]. *Mazandaran Uni Med Sci* 2017; 27:24-31. (Persian)
19. Emami S, Raeesi M. [Synthesis of Ciprofloxacin isatin conjugates as potential cytotoxic agents]. *J Mazandaran Uni Med Sci* 2016; 26: 161-9. (Persian)
20. Pandeya SN, Tripathi K, Kulshreshtha S. Synthesis and antifungal activity of isatin3 semicarbazone. *Asian J Chem* 2009; 21: 3367-70.
21. Haydarikashl S, Entezari M, Hekmati M, Solaimani S. [Functionalization of carboxylated multi walled nanotubes with diazo compounds of aromatic amins and anti cancer study on sw742 cell line by invitro conditions]. *J Ilam Uni Med Sci* 2013; 21:138-43. (Persian)
22. Haydari kashl S, Tahermansori H, Atghae M, Biazar E, Saifipour F, Avazpour M, et al. [Evaluation of multi walled carbon nanotubes cytotoxicity elements oxathiazole and phenyl hydrazine derivative was prepared by microwave]. *J Ilam Uni Med Sci* 2013; 20: 255-64. (Persian)
23. Jastrzebska A M, Kurtycz P, Olszyna AR. Recent advances in graphene family materials toxicity investigations. *J Nanopart Res* 2012; 14:1320. doi.10.1007/s11051-012-1320-8
24. Tahermansouri H, Abedi E. One pot functionalization of short carboxyl multi walled carbon nanotubes with ninhydrin and thiourea via Microwave and thermal methods and their effect on the MKN-45 and MCF7 cancer cells. *Full Nanotub Carbon Nanostru* 2014; 22: 834-44. doi.10.1080/1536383X.2012.742428
25. Tahermansouri H, Mirosanloo A. One pot and three component functionalization of short multi walled carbon nanotubes with isatoic anhydride and benzyl amine and their effect on the MKN-45 and MCF7 cancer cells. *Fullerenes, Nanotub Carbon Nanostruc* 2015; 23: 500-8. doi.10.1080/1536383X.2013.868440
26. Tahermansouri H, Islami F, Gardaneh M, Kiani F. Functionalisation of multiwalled carbon nanotubes with thiazole derivative and their influence on SKBR3 and HEK293 cell lines. *Mate Technol* 2016; 31: 371-6. doi. 10.1179/1753555715Y.0000000062
27. Tahermansouri H, Mirosanloo A, Heidarikeshel S, Gardaneh M. Synthesis characterization and toxicity of multi walled carbon nanotubes functionalized with 4hydroxyquinazoline. *Carbon Let* 2016; 17: 45-52. doi. 10.5714/CL.2016.17.1.045
28. Yang K, Wan J, Zhang S, Tian B, Zhang Y, Liu Z. The influence of surface chemistry and size of nanoscale graphene oxide on photothermal therapy of cancer using ultra low laser power. *Biomaterials* 2012; 33: 2206-14. doi.10.1016/j.biomaterials.2011.11.064
29. Samuel M S, Selvarajan E, Subramaniam K, Mathimani T, Seethappan S, Pugazhendhi A. Synthesized β -cyclodextrin modified graphene oxide composite for adsorption of cadmium and their toxicity profile in cervical cancer cell lines. *Proce Biochem* 2020; 93: 28-35. doi. 10.1016/j.procbio.2020.02.014

30. Kheiltash F, Parivar K, Hayati Roodbari N, Sadeghi B, Badiei A. [Effects of 8hydroxyquinoline coated graphene oxide on cell

death and apoptosis in MCF-7 and MCF-10 breast cell lines]. Iran J Bas Med Sci 2020; 23:871-8. (Persian)