مروری بر مکانیسم‌های سمیت سلولی و فعالیت ضد باکتریایی گرافن

اشرف احمدی شادمهری[۱]، فریده نامور*[۲]، حمیدرضا میری[۳]، پریچهره یغمایی[٤]، محبوبه نخعی مقدم[٥]

تاریخ دریافت ۱۳۹۸/۰٦/۳۱ تاریخ پذیرش ۱۳۹۸/۱۰/۰٤

چکیده

گرافن به دلیل خواص منحصربه‌فرد فیزیکی و شیمیایی، کاربردهای گسترده‌ای را در نانوتکنولوژی به‌ویژه در زیست پزشکی نشان می‌دهد. درجه سمیت مواد گرافن به عوامل مختلفی ازجمله بار سطحی، خواص فیزیکوشیمیایی، روش‌های تعیین سمیت و نوع رده سلولی بستگی دارد. تماس مستقیم لبه‌های بسیار تیز گرافن با غشای سلول به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های اصلی درگیر در سمیت سلولی ورقه‌های گرافن می‌باشد. با به دام انداختن میکروارگانیسم‌ها در بین ورقه‌های گرافن به‌عنوان یکی دیگر از مکانیسم‌های مؤثر برای غیرفعال کردن میکروارگانیسم‌هاست و با توجه به نسبت بالای سطح به حجم، زیست سازگاری عالی و ساختار دوبعدی، به‌عنوان یک ماده ضد سرطان و ضد باکتری می‌تواند بکار رود. این بررسی، پیشرفت‌های اخیر در مورد سمیت سلولی، فعالیت‌های ضد سرطانی و ضد باکتری گرافن را ارائه می‌دهد و بر طیف گسترده‌ای از مکانیسم‌های سمیت و ضد باکتری متمرکز شده است. انتظار می‌رود که این بررسی کاربرد گسترده گرافن را در سایر زمینه‌ها تسهیل کند.

کلیدواژه‌ها: گرافن، ضد باکتری، سمیت سلولی، کاربرد زیست پزشکی

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی‌ام، شماره یازدهم، ص ۹۰٤-۸۹۵، بهمن ۱۳۹۸

آدرس مکاتبه: دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، دانشکده پزشکی، مشهد، ایران، تلفن: ۰۵۱۳۲۲۵۰۰۴۳

Email: nanoscience96@yahoo.com, ahmadi492004@yahoo.com

مقدمه

حوزه علم و فن‌آوری نانو به‌عنوان یک فن‌آوری کاربردی در دهه‌های گذشته موردتوجه قرار گرفته است. این فن‌آوری توانایی کار در سطح اتم‌های کربن و ایجاد ساختارهایی که نظم مولکولی کاملاً جدیدی دارند را فراهم می‌نماید(۱). گرافن ورقه‌ای دوبعدی از اتم‌های کربن است که با کنار هم قرار گرفتن اتم‌های کربن با هیبرید sp^2 در یک شبکه شش‌ضلعی لانه‌زنبوری مانند و شبکه کریستالی دوبعدی تشکیل می‌شوند(۲). در یک صفحه گرافن هر اتم کربن با سه‌اتم کربن دیگر پیوند داده می‌شود که این سه پیوند در یک صفحه قرار دارند و زوایای بین آن‌ها مساوی و برابر با ۱۲۰ درجه می‌باشد در این حالت اتم‌های کربن شبکه شش‌ضلعی منتظم را ایجاد می‌کنند(۳) . ساختار مسطح گرافن باعث شده که نقش مهمی در زمینه انتقال موادی مانند مولکول‌های زیستی و فلزات داشته باشد(۴). همچنین گرافن به دلیل ساختار هندسی و منحصربه‌فردش دارای خواص فیزیکی و شیمیایی و زیست سازگاری قابل‌توجه ای است و می‌تواند در تشخیص بیماری، مواد ضد باکتریایی و ضدویروسی، هدف قرار دادن سرطان، حامل برای انتقال دارو و مهندسی بافت مورد استفاده قرار گیرد(۵) . بااین‌وجود، برای ارزیابی ایمنی زیستی گرافن باید خواص فیزیکوشیمیایی آن ازجمله، شیمی سطح، بار، اندازه و شکل آن موردبررسی قرار گیرد(۶). همچنین زیست سازگاری و رفتار سمی گرافن باید موردتوجه قرار گیرد، که مطالعات زیادی برای اثبات ایمنی گرافن برای سلامت بشر لازم است. با توجه به اینکه نتایج متناقضی در مورد سمیت سلولی گرافن وجود دارد، تاکنون مطالعه جامعی در رابطه با نتایج متناقض سمیت و فعالیت ضد باکتری گرافن صورت نگرفته است، که در این مقاله، نظرات گسترده‌ای در مورد سمیت سلولی، فعالیت ضد سرطانی و

[۱] گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۲] دانشکده پزشکی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران (نویسنده مسئول)

[۳] دانشگاه علوم پزشکی تربت حیدریه، تربت حیدریه، ایران

[٤] گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[٥] گروه زیست شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2023-06-01]

فعالیت ضد باکتری گرافن ارائه شده است و بر طیف گسترده‌ای از مکانیسم‌های سمیت و ضد باکتری متمرکز شده که باعث فعالیت ضد سرطانی و ضد باکتری گرافن می‌گردد.

خواص گرافن

خواص فیزیکی و شیمیایی گرافن:

مواد خانواده گرافن دارای نسبت سطح به حجم بالا، هدایت الکتریکی عالی(۷)، قدرت مکانیکی قوی و انعطاف‌پذیر و هدایت گرمایی بی‌نظیر می‌باشد (۸) . ازآنجایی‌که عنصر سازنده گرافن، کربن است. هر اتم کربن، سه‌اتم از میان چهار اتم آزاد خود را توسط پیوند کووالانسی (نافلز-نافلز) به اشتراک می‌گذارد و به همین دلیل یکی از سخت‌ترین مواد به‌حساب می‌آید و به این نحو صفحه‌ای از شش‌ضلعی‌های متصل‌به‌هم تشکیل می‌گردد(۹). در میان این صفحات که صفحات گرافن می‌نامیم و شبیه لانه زنبور هستند، نیروی ضعیف واندروالس حاکم است، که باعث می‌شود این صفحات به‌راحتی روی‌هم بلغزند(۱۰). به دلیل نازکی به‌راحتی نور را از خود عبور می‌دهد و شفافیت بسیار خوبی دارد(۱۱). ازآنجاکه هر اتم کربن در این ساختار به سه‌اتم کربن دیگر پیوند می‌دهد یکی از الکترون‌های آزاد آن باقی می‌مانند که پیوندی برقرار نمی‌کند و در اصلاح به آن بازوی آزاد اتم کربن گفته می‌شود(۱۲). علت رسانندگی بالای گرافن مربوط به تعداد همین بازوهای آزاد و درواقع مجموعه‌ای از الکترون‌های آزاد می‌باشد. بنابراین گرافن می‌تواند کاربردهای بالقوه‌ای را در مورد ابررسانای خازن، باتری، ترانزیستورهای میدان مغناطیسی، حسگرهای نوری و غیره اجرا داشته باشد(۱۳).

خواص زیستی گرافن:

با توجه به پایداری شیمیایی بالا و ویژگی‌های نوری و الکتریکی استثنایی، گرافن و مشتقات آن کاربردهای منحصربه‌فردی در زمینه بیولوژیکی، تشخیص و درمان بیماری‌ها را ارائه می‌دهند(۱۴). یکی از موانع مهم تکنیکی در کاربردهای بیولوژیکی و شیمیایی گرافن، عدم حلالیت آن‌ها در محیط‌های آبی می‌باشد و در بافرهای فیزیولوژیکی حاوی نمک به علت بار الکترواستاتیک و اتصال غیراختصاصی به پروتئین، تجمع می‌یابند. با استفاده از واکنش‌های بسته‌بندی (پلیمرها و یا سورفاکتانت)، حلالیت آب و ثبات ورقه‌های گرافن و میزان سازگاری بیولوژیکی آن می‌تواند به‌طور چشمگیری بهبود یابد(۱،۱۳). به‌این‌ترتیب برای انتقال پروتئین، اسید نوکلئیک و داروها می‌توان از آن‌ها استفاده کرد. در طول چند سال گذشته، نانوسیستم‌های گرافن با موفقیت در زمینه تحویل دارو(۱۵)، انتقال ژن(۱۶)، حسگر زیستی(۱۲)، تشخیص، مهندسی بافت، تصویربرداری مولکولی و خواص ضد باکتریایی(۱۷) مورد آزمایش قرار گرفتند و به‌سرعت در حال پیشرفت بوده‌اند. در مقایسه با دیگر نانومواد برای کاربردهای زیست پزشکی مانند نقاط کوانتومی معدنی یا نانوذرات فلزی پیشنهاد شده است(۱۰، ۱۸). گرافن از کربن تشکیل شده است، عنصر کربن به‌طور ذاتی با سیستم‌های زنده سازگار است(۸) .

استفاده از گرافن در کاربردهای زیست پزشکی

کاربرد در تحویل دارو و ژن:

در کاربردهای تحویل دارو و ژن به خصوصیاتی مانند ناحیه سطح بزرگ ویژه، پیوند π-π و تعاملات هیدروفوب برای بارگیری داروهایی با مولکول کوچک نیاز می‌باشد(۱۲). بار سطحی منفی ناشی از ابر الکترون آزاد π برای متراکم سازی ژن‌ها و داروهای ضد سرطان استفاده می‌شود. علاوه بر این، سطح تخت بزرگ گرافن برای عملکردهای زیستی با تراکم بالا از طریق اصلاح سطوح کوالانتی و هم غیر کوالانتی بکار می‌رود(۸)، با عامل دار کردن داروهای مورد استفاده بر روی گرافن در درمان سرطان باعث می‌شود که دارو با کارایی بیشتری به سلول‌های سرطانی تحویل داده شود و از طرفی سمیت و عوارض جانبی آن بر روی سلول‌های سالم کاهش یابد(۱۵). توسعه سیستم‌های تحویل دارویی مواد مبتنی بر گرافن به دلیل توانایی آن‌هاست که به‌راحتی می‌توانند وارد سلول‌ها شوند و در سیتوزول توزیع گردند. علاوه بر این، در یک ورقه گرافن تک لایه، هر اتم در سطح قرار گرفته و دو طرف آن در معرض محیط اطراف است، بدین ترتیب گرافن دارای بالاترین سطح در مقایسه با سایر نانومواد است که مزایای مازاد در تحویل دارو به‌عنوان بارگذاری فوق‌العاده کارآمد دارو و تحویل چند دارو به جایگاه بیماری را به همراه دارد(۱۶).

کاربرد ضد باکتریایی:

گرافن می‌تواند از ایجاد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا جلوگیری کند و حتی باکتری‌ها را از بین ببرد(۸). اثر ضد باکتریایی گرافن احتمال دارد از طریق دو مکانیسم احتمالی، شکستن فیزیکی غشای سلولی و افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن اثر خود را نشان دهد(۱۹). مکانیسم ضد باکتری گرافن به این صورت است که باکتری توسط ورقه‌های گرافن به دام افتاده، و لبه‌های تیز آن به شدت با لیپید دولایه‌ای باکتری واکنش دهد و مولکول‌های چربی را از غشا جدا کند و غشای سیتوپلاسمی را تخریب نماید و درنهایت فعالیت باکتریایی را مهار کند. باکتری‌ها و نانومواد گرافن به‌عنوان یک سیستم ردوکس و انتقال الکترون و میانجی گر الکترون عمل می‌کنند(۱۴). تماس مستقیم لبه‌های بسیار تیز دیواره‌های نانو گرافن با دیواره غشای سلول‌ها به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های اصلی

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2023-06-01]

درگیر در سمیت سلولی ورقه‌های گرافن می‌باشد(۱۰). با به دام انداختن میکروارگانیسم‌ها در بین ورقه‌های گرافن به‌عنوان یکی دیگر از مکانیسم‌های مؤثر برای غیرفعال کردن میکروارگانیسم‌هاست (۲۰). نانومواد گرافن می‌توانند در آینده برای برنامه‌های کاربردی مانند پوشش ضد باکتری و یا محصولات مرتبط استفاده شوند(۴). مطالعات گذشته، فعالیت ضد باکتریایی چهار نوع ماده گرافن شامل گرافیت، اکسید گرافیت، اکسید گرافن و اکسید گرافن احیاشده را نسبت به یک مدل باکتری *اشریشیاکلی* مقایسه کردند. تحت شرایط غلظت و انکوباتور مشابه، اکسید گرافن بالاترین فعالیت ضد باکتریایی را نشان داد و به دنبال آن اکسید گرافن احیاشده، اکسید گرافیت و گرافیت می‌باشد(۲۱). تصاویر SEM نشان داد که تماس مستقیم با نانوساختارهای گرافنی باعث شکستن غشای سلولی شد. هیچ آنیون سوپراکسید تولید گونه‌های فعال اکسیژن را القا نکرد. بااین‌وجود، این چهار نوع مواد می‌توانند گلوتاتیون را اکسید کنند که به‌عنوان واسطه حالت اکسیداسیون احیا در باکتری عمل می‌کنند. مکانیسم ضد باکتریایی سه مرحله‌ای، برای مواد بر پایه گرافن شامل رسوب اولیه گرافن بر روی سلول، استرس غشایی ناشی از تماس مستقیم با نانوساختارهای تیز و اکسیداسیون مستقل از آنیون سوپراکسید است. حساسیت باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به گرافن فقط به ساختار دیواره سلولی مرتبط نیست، بلکه ممکن است به پراکسیداسیون چربی و تولید گونه‌های اکسیژن نیز مربوط باشد(۲۲). در مطالعه‌ای دیگر باهدف بررسی فعالیت ضد باکتریایی اکسید گرافن، مشاهده شد که اکسید گرافن به‌طور کامل رشد *اشریشیاکلی* را سرکوب می‌کند، که منجر به کاهش افت حیاتی تا ۹۸.۵٪ می‌گردد(۲۳). برخی مطالعات نشان می‌دهد که مقادیر MIC باکتری‌های گرم مثبت کم‌تر از باکتری‌های گرم منفی برای گرافن هستند. این اطلاعات ممکن است از ساختار متمایز دیواره سلولی بین باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت حاصل شود. حساسیت باکتری گرم مثبت می‌تواند به‌راحتی توضیح داده شود به این صورت که دیواره سلولی باکتری گرم مثبت ضخیم‌تر از باکتری گرم منفی است. گرافن با لبه‌های تیز خود باعث آسیب غشا و تولید گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود که این امر منجر به نفوذپذیری تعداد بیشتری از رادیکال‌های آزاد با بار منفی همانند آنیون‌های سوپراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل به داخل سلول، مختل شدن فرایندهای سلولی و مرگ سلول می‌گردد (۲۴).

مکانیسم سمیت گرافن:

گرچه بسیاری از برنامه‌های کاربردی بالقوه بیولوژیکی و پزشکی گرافن و مشتقات موردبررسی قرار گرفته است (۱۳)، مکانیسم دقیق سمیت گرافن هنوز نامشخص است و نشان‌دهنده یک چالش بزرگ در کاربرد بالینی است و اطلاعات کمی در رابطه با اثر طولانی‌مدت گرافن بر روی سلامت انسان در دسترس می‌باشد(۲۵) بنابراین درک تعامل گرافن با سیستم‌های زنده و اثرات نامطلوب آن‌ها در شرایط *in vitro* و*in vivo* برای توسعه بیشتر و استفاده ایمن از نانومواد مبتنی بر گرافن ضروری است(۲۶). مکانیسم سمیت گرافن ممکن است شامل: تخریب فیزیکی و تولید گونه‌های اکسیژن فعال باشند(۱۵). گرافن از طریق موانع فیزیولوژیکی یا ساختارهای سلولی به‌وسیله روش‌های مختلف در معرض قرار گرفتن وارد سلول می‌شوند و درنهایت منجر به سمیت در*in vivo* و *in vitro* می‌شوند. مسیرهای مختلف ورود، توزیع و دفع بافت‌های مختلف، حتی الگوی جذب سلول‌های مختلف سلولی، ممکن است میزان سمیت گرافن را تعیین کند(۲۷). گرافن به روش‌های مختلفی (مانند مسیرهای آندوسیتوز مانند مسیر وابسته به کلوترین و ماکروپینوسیتیک) وارد سلول می‌شوند که تولید گونه‌های اکسیژن فعال، افزایش لاکتات دهیدروژناز و مالون دی آلدئید و رهاسازی Ca^{2+} را منجر می‌شوند. بعلاوه، گرافن سبب آسیب سلولی به‌عنوان‌مثال، آسیب غشای سلولی، التهاب، آسیب DNA، اختلالات میتوکندری، آپوپتوز یا نکروز می‌گردد(۲۸). مطالعات گذشته گزارش کرد که گرافن سمیت سلولی را در غلظت‌های بالا بر روی سلول‌های سرطانی کبد نشان داد(۲۹). مطالعات سمیت سلولی گرافن شامل تأثیر روی زنده‌بودن و مورفولوژی سلول، یکپارچگی غشا، نسبت ROS، آسیب DNA، بیان ژن، آسیب DNA و مکانیسم جذب می‌باشد. تعامل نانوذرات گرافن با سلول‌ها به خواص فیزیکی و شیمیایی بستگی دارد. گزارش‌ها نشان می‌دهد که مورفولوژی (اندازه، شکل و لبه‌های تیز)، بار سطحی، عامل دار کردن سطح، پراکندگی، حالت تجمع، تعداد لایه‌ها، خلوص و روش سنتز، عوامل کلیدی‌اند که بر مکانیسم جذب (انتشار غیرفعال و جذب اندوزومی) و پاسخ بافت به نانومواد مبتنی بر گرافن تأثیر می‌گذارند. علاوه بر این، اثر سمی گرافن خیلی بستگی به شرایط آزمایش دارد که شامل زمان در معرض قرار گرفتن، دوز، نوع سلول و روش استفاده‌شده برای ایجاد زنده ماندن سلول دارد(۲۸). مطالعات نشان می‌دهد که تماس غیرمستقیم سلول‌های پستانداران با گرافن باعث واکنش‌های سمیت سلولی، همانند تولید ROS و ایجاد استرس اکسیداتیو به دنبال آزادسازی سیتوکین‌ها و التهاب می‌گردد(۶). درجه سمیت مواد کربنی گرافن بستگی به عواملی ازجمله: ۱) جزئیات فیزیکوشیمیایی شامل اندازه، مورفولوژی(۳۰)، بار سطحی، تغییرات سطح، خلوص و انباشتگی دارد(۲۸). ۲) معیارهای مختلف قابل‌مشاهده، پارامترها و انتخاب روش‌های تجربی ممکن می‌باشد به‌عنوان‌مثال، آزمون MTT همیشه قادر به پیش‌بینی دقیق سمیت سلولی گرافن نیست زیرا

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2023-06-01]

کاهش خود به خودی منجر به یک سیگنال مثبت کاذب می‌شود(۳۱). ۳) انتخاب رده‌های سلولی از اهمیت حیاتی برخوردار است به‌عنوان‌مثال، رده‌های سلولی سرطانی بسته به زمینه ژنتیکی آن‌ها حساس یا مقاوم هستند. نانوذرات شبیه گرافن بسته به نوع سلول‌های مختلف می‌توانند واکنش‌های مختلفی ایجاد کنند. برای جلوگیری از نتایج غلط مثبت یا منفی باید از سلول‌های مناسب با پایداری خوب استفاده شود. چندین مطالعه، نتایج متناقضی را نشان داده که به‌طور هم‌زمان سمیت سلولی و عدم سمیت گرافن را گزارش کرده‌اند(۳۲). به‌عنوان‌مثال، اکسید گرافن و اکسید گرافن احیاشده باکتریایی(B-rGO) سمیت به سلول‌های MCF-7 را در روش وابسته به دوز نشان می‌دهد، با یک دوز ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثرات سمیت سلولی واضحی را نشان می‌دهد(۳۳). برعکس، اکسید گرافن سمیت سلولی قابل‌توجهی بر روی سلول‌های A549 و Hela در غلظت‌های ۱۰, ۲۵, ۵۰, ۱۰۰ ماکروگرم بر میلی‌لیتر نداشت(۳۴). در تحقیقی دیگر(۲۰۱۲) با ارزیابی سمیت نانولوله‌های کربنی تک‌دیواره اکسیدشده و اکسید گرافن بر روی سلول‌های HepG2 در شرایط *in vitro* نشان دادند که نانولوله‌های کربنی تک‌دیواره اکسیدشده باعث افزایش سطح گونه‌های فعال اکسیژن شد، سلول را تحریک و باعث افزایش قابل‌توجهی در نسبت سلول‌های آپوپتوز شد. بااین‌حال، تنها تغییرات متوسط سطح پروتئین برای سلول‌های تیمار شده با اکسید گرافن مشاهده شد و تست‌های عملکردی بیشتر تأیید کرد که اکسید گرافن در مقایسه با نانولوله‌های کربنی تک‌دیواره اکسیدشده کم‌تر سمی می‌باشد. این یافته‌ها نشان می‌دهد اکسید گرافن بیشتر سازگار با محیط‌زیست است(۳۵). در پژوهشی دیگر مشخص شد که گرافن سمیت سلولی کم‌تری را در سلول‌های طبیعی ریه انسان (BEAS-2B) به‌طور وابسته به دوز و زمان با غلظت‌های ۱۰- ۱۰۰ ماکروگرم بر میلی‌لیتر، را نشان می‌دهد(۳۶).

گونه‌های اکسیژن فعال در پاسخ به محرک‌های مختلف ازجمله گرافن القا می‌شود که به علت ویژگی‌های سطح گرافن، آن‌ها را یک سیستم واکنش ردوکس(بازدارنده) تولید گونه‌ای اکسیژن فعال می‌سازد(۳۷). یکی از مهم‌ترین مسائل برای کاربردهای زیست پزشکی گرافن سمیت کوتاه و بلندمدت آن است. هرچند برخی گزارشات بر روی اثرات سمیت سلولی گرافن در شرایط *in vitro* وجود دارد، هنوز هیچ درک عمیق بر روی مکانیسم‌های درگیر در سمیت سلولی گرافن وجود ندارد؛ بنابراین، در زیر به جزئیات پرداخته است:

تخریب فیزیکی:

به دلیل ماهیت کربنی گرافن ، لایه‌های گرافن قادر به تعامل با لیپیدهای غشای سلولی هستند. تعامل فیزیکی نانوذرات گرافن با غشای سلولی یکی از علل اصلی سمیت سلولی گرافن محسوب می‌شود(۳۸). فعل‌وانفعالات بین سطح گرافن و دم‌های لیپیدی می‌تواند به حدی قوی باشد که بر جاذبه‌های لیپید-لیپید غشا غلبه کند و باعث اختلال در غشای فیزیکی شود(۲۴). دم‌های فسفولیپید موجود در دولایه سلول باکتریایی در تعامل با گرافن باعث می‌شود که گرافن وارد غشا شود که احتمالاً با ایجاد منافذ یا از طریق استخراج مولکول‌های لیپیدی به غشای سلولی نفوذ کند. از بین رفتن یکپارچگی غشایی منجر به نشت ترکیبات سیتوپلاسمی ازجمله RNA، الکترولیت داخل سلولی می‌شود که به‌نوبه خود باعث مرگ سلولی می‌گردد(۳۹). از طرفی، گرافن به دلیل انحنای سطح مناسب، دارای توانایی بالا برای اتصال با ساختارهای الفا مارپیچی پپتیدها می‌باشد. تعاملات هیدروفوبیک قوی گرافن با غشای سلولی منجر به گسترش مورفولوژیک اختلالات فیلوپدیال F -اکتین و سیتواسکلت می‌شود. علاوه بر این، لبه‌های تیز گرافن ممکن است به‌عنوان "تیغه‌ها" عمل کند، و از غشای سلولی باکتریایی عبور کنند و برش داده می‌شوند(۲۸) و نانو مواد گرافن می‌توانند به‌عنوان مواد ضد باکتریایی مؤثر باشند. حساسیت بالای گرافن به دلیل ابر حامل π محدود شده در بین یک لایه اتمی-ضخیم، باندهای الکترونیکی با فاصله نزدیک، و یک سطح بزرگ می‌باشد(۴۰). با توجه به اثر الکترونگاتیویته دیواره سلولی، باکتری توسط ورقه‌های گرافن به دام افتاده و لبه‌های آن غشای سیتوپلاسمی را تخریب می‌کند(۴۱)، منجر به رها سازی ترکیبات داخل سلولی می‌شود و فعالیت باکتریایی را مهار می‌کند(۲۰).

تولید ROS و استرس اکسیداتیو:

نقش استرس اکسیداتیو در تعیین مکانیسم ضد باکتریایی سطوح گرافن اغلب مسئول سمیت سلولی گسترده نانومواد است (۴۲). هنگامی که سطح ROS افزایش می‌یابد، استرس اکسیداتیو فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، ازجمله کاتالاز، سوپراکسید دسموتاز(SOD) و گلوتاتیون پراکسیداز (GSH-PX) را بالا می‌برد(۲۸). ROS به‌عنوان پیام رسان ثانویه در بسیاری از آبشارهای سیگنال‌های داخل سلولی عمل می‌کند و منجر به آسیب شدید ماکرومولکول های سلولی مانند تخریب لیپید غشا، تجزیه DNA، دناتوراسیون پروتئین و اختلال عملکرد میتوکندری می‌گردد که به شدت بر متابولیسم سلولی و سیگنالینگ سلول تأثیر می‌گذارد(۴۳). تعامل مواد مبتنی بر گرافن با سلول‌ها می‌تواند منجر به تولید بیش از حد ROS شود، که اولین گام در مکانیسم‌های سرطان زایی، پیری و جهش زایی است(۴۲، ۲۸). فعالیت SOD و GSH-PX پس از در معرض بودن با مواد مبتنی بر گرافن به صورت وابسته به زمان و دوز کاهش می‌یابد. به همین ترتیب، استرس اکسیداتیو عامل اصلی

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2023-06-01]

آپوپتوز و آسیب DNA سلول‌های در معرض مواد مبتنی بر گرافن می‌باشد(۴۵). اخیراً مطالعات نشان می‌دهد که اکسید گرافن زیست سازگاری بالایی دارد. در حالیکه برخی مطالعات گزارش شد(۲۳) که اکسید گرافن سمیت بالاتری نسبت به سلول‌ها و حیوانات در غلظت‌های بالا دارد، و مشخص شد که اکسید گرافن به سلول‌های انسانی فیبروبلاست در غلظت‌های ۵۰ و بالاتر سمی بود، که ناشی از ساختار و خصوصیات فیزیکوشیمایی نانومواد کربنی است، که استرس اکسیداتیو را به‌عنوان یک مکانیسم ضد باکتریایی القا می‌کند(۲۲).

تغییر پتانسیل غشای میتوکندری:

میتوکندری ها مراکز تولید انرژی هستند که در مسیرهای مختلف سیگنالینگ در سلول‌ها دخیل هستند و همچنین یک نقطه کلیدی برای تنظیم آپوپتوز است(۴۶). پتانسیل غشای میتوکندری نقش مهمی در حفظ شیب پروتون در غشای میتوکندری دارد و برای زنجیره انتقال الکترون ضروری است و از طرفی، دپلاریزاسیون غشای میتوکندری یکی از وقایع مهم مرتبط با تولید ROS داخل سلولی است(۴۷). قرار گرفتن در معرض گرافن باعث تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) شامل رادیکال سوپراکسید (O_2^-) ، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروکسیل می‌گردد. این مولکول‌ها در تحریک فرآیندهای سلولی ، به‌ویژه آپوپتوز ، مهم هستند (۴۸) و پیشنهاد شده است که تولید بیش از حد ROS باعث نفوذپذیری غشای میتوکندری، مختل شدن فرآیندهای تنفسی سلولی و شروع مرگ برنامه ریزی شده سلول می‌شود (۴۲). همچنین گرافن بطور قابل‌توجهی باعث افزایش مصرف اکسیژن میتوکندری متصل شده و غیر متصل شده می‌گردد، تخریب پتانسیل غشای میتوکندری و نهایتاً ایجاد آپوپتوز با فعال کردن مسیر میتوکندری میسر است(۴۹). بنابراین، به استثناء آسیب‌های غشای پلاسما و القاء استرس اکسیداتیو، گرافن می‌تواند باعث ایجاد آپوپتوز و / یا نکروز سلولی با تأثیر مستقیم بر فعالیت میتوکندری سلول شود(۳۳).

القای آپوپتوز:

آپوپتوز یا مرگ برنامه ریزی شده سلول یک فرایند بیولوژیکی پیچیده و پایه است، توسط ژن‌ها از طریق برنامه‌های پیچیده تعریف می‌شود و شامل حذف سلول‌های مضر و غیر ضروری(۲۹)، کنترل تکثیر سلول‌ها و حفظ هموستاز طبیعی بدن می‌باشد. سلول‌هایی که دچار مرگ آپوپتوزی می‌شوند تغییرات مورفولوژیکی متعددی از خود نشان می‌دهند، ازجمله: کوچک و جمع شدن سلول، انقباض سلولی، از دست دادن چسبندگی هسته و قطعه قطعه شدن هسته می‌باشد(۵۰). به همین دلیل در سال‌های اخیر توجه زیادی به داروهایی شده که بتوانند مسیر سیگنالینگ آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی ایجاد کنند و آن‌ها را از بین ببرند(۵۱). ROS، یکی از بازیکنان مهم برای آپوپتوز درونی میتوکندری است. با افزایش سطوح ROS و استرس اکسیداتیو، مواد گرافن اثرات زیان آوری بر روی لیپید، پروتئین و اسید نوکلئیک سلول نشان می‌دهند(۵۲). افزایش ROS باعث ایجاد آسیب غشائی از طریق پراکسیداسیون لیپید و دناتوراسیون پروتئین می‌شود که باعث مرگ سلول توسط نکروز و آسیب DNA می‌شود و درنتیجه منجر به مرگ سلول توسط آپوپتوز می‌گردد(۵۳). آسیب DNA به‌طور عمده توسط شکست‌های رشته DNA و پیوندهای پروتئین DNA اتفاق می‌افتد. گونه‌های بسیار واکنشی ROS می‌توانند با اجزای DNA واکنش نشان دهند، ترکیب DNA تغییر می‌یابد و جهش در DNA انجام می‌شود. این شکست‌های DNA و تخریب پیوندهای DNA، منجر به فعال شدن مسیر آپوپتوز میتوکندری می‌شود و در نهایت باعث مرگ سلول توسط آپوپتوز می‌گردد. مکانیسم اصلی مرگ سلولی، پاسخ سمیت سلولی نانومواد می‌باشد و (۵۴). آپوپتوز بواسطه عوامل درونی و بیرون سلولی کنترل می‌شود. از میان عوامل درون سلولی، تعادل بین bax وbcl-2 به‌عنوان مهم‌ترین پارامتر تعیین کننده سرنوشت سلول در پاسخ به محرک خارج سلولی معرفی شده است(۵۵). گرافن ممکن است دارای اثرات پیش آپوپتوز در سلول‌ها باشند (۳۶) و پروتئین‌های پروآپوپتوز مانند اعضای خانواده bax را با هدف گیری مستقیم میتوکندری و خنثی سازی اعضای آنتی آپوپتوز خانواده bcl-2 را تنظیم کند. bax در سیتوپلاسم سلول‌های طبیعی وجود دارد و به هنگام تحریک آپوپتوز به میتوکندری مننتقل گردیده و به‌عنوان یک آغازگر مسیر آپوپتوز شناخته می‌شود. ژن‌های bax برای اختلال میتوکندری و آپوپتوز در پاسخ به سیگنال‌های مرگ چندگانه ضروری هستند(۲۹). همچنین گرافن می‌تواند باعث آسیب فیزیکی غشای سلولی، افزایش نفوذپذیری غشای خارجی میتوکندری و تغییر پتانسیل غشای میتوکندری شود. ازآنجاکه آپوپتوز ناشی از گرافن با از دست دادن پتانسیل غشای میتوکندری و افزایش سطح ROS سلولی همراه است، مسیر میتوکندری ممکن است مکانیسم غالب زمینه ساز آپوپتوز ناشی از گرافن باشد(۴۷). افزایش ROS باعث مسیردهی سیگنالینگ پروتئین کیناز فعال کننده میتوژن(MAPK)، TGF-β و فعال شدن مسیر کاسپاز-۳ از طریق آبشارهای آپوپتوزی وابسته به میتوکندری، موجب القای آپوپتوز می‌گردد(۲۸).

نتیجه‌گیری

اخیراً، گرافن در طیف گسترده‌ای از زمینه‌های نانوفناوری و زیست پزشکی مورد استفاده قرار گرفته است. در حال حاضر بیشتر

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2023-06-01]

مطالعات بر روی سمیت سلولی و فعالیت ضد باکتریایی گرافن متمرکز شده است. باکتری‌ها و نانومواد گرافن به‌عنوان یک سیستم ردوکس در انتقال الکترون عمل می‌کنند. تماس مستقیم لبه‌های بسیار تیز دیواره‌های گرافن با دیواره غشای سلول به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های اصلی درگیر در سمیت سلولی ورقه‌های گرافن می‌باشد. بنابراین، گرافن دارای اثر ضد باکتریایی است که احتمال دارد از طریق شکستن فیزیکی غشای سلولی، موجب انتقال بار و افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن اثر خود را نشان می‌دهد. نتایج متناقضی در مورد سمیت سلولی گرافن ارائه شده است که عوامل مختلفی ازجمله بار سطحی، خواص فیزیکوشیمیایی، روش‌های تعیین سمیت و نوع رده سلولی بر سمیت سلولی تأثیر می‌گذارند، همچنین باید از روش‌های تجربی و مطالعات سیستماتیک در شرایط in vivo استفاده کرد. این بررسی‌ها به نگرانی ایمنی قبل از کاربردهای بالینی گرافن کمک می‌کند و برای پیشرفت گرافن در کاربردهای بیولوژیکی مهم خواهد بود.

References:

1. Shadmehri AA, Namvar F, Miri H, Yaghmaei P. Anti-Angiogenesis effect of Graphene-loaded Green Synthesized Zinc Oxide Nanoparticles on Chick Chorioalantoic Membrane. J Biotechem Tec 2018;17–22.
2. Katsnelson MI. Graphene : carbon in Carbon is one of the most intriguing elements in the Periodic Table. Mater Today 2007;10(1):20–7.
3. Royal THE, Academy S, Sciences OF. compiled by the Class for Physics of the Royal Swedish Academy of Sciences Graphene. Kungl. Vetenskapsakademien 2010;50005:0–10.
4. Namvar F, Rahman HS. Green synthesis , characterization , and anticancer activity of hyaluronan / zinc oxide nanocomposite. Oncotargets Ther 2016;4549–59.
5. Radich JG, Mcginn PJ, Kamat P V. Graphene-based Composites for Electrochemical Energy Storage. The Electrochemical Society Interface 63:63–6.
6. Nezakati T, Cousins BG, Seifalian AM. Toxicology of chemically modified graphene-based materials for medical application. Arch Toxicol 2014;88(11):1987–2012.
7. Majumdar D, Pal S. Synthesis, Characterization and Electrochemical Study of Hydroxy-functionalized Graphene. IJNN 2016;(1):1–5.
8. Byun J. Emerging frontiers of graphene in biomedicine. J Microbiol Biotechnol 2015;25(2):145–51.
9. Kayat J, Gajbhiye V, Tekade RK, Jain NK. Pulmonary toxicity of carbon nanotubes : a systematic report. Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med 2011;7(1):40–9.
10. Shadmehri AA, Namvar F. Assessment of antioxidant and antibacterial activities of Zinc Oxide nanoparticles , Graphene and Graphene decorated by Zinc Oxide nanoparticles. Int J Nano Dimen 2019;(1467):2015–7.
11. Thanh Thuy Tran N, Dahal D, Gumbs G, Lin M-F. Adatom Doping-Enriched Geometric and Electronic Properties of Pristine Graphene: a Method to Modify the Band Gap. arXiv e-prints 2017;1703:arXiv:1703.02491.
12. Sun X, Liu Z, Welsher K, Robinson JT, Goodwin A, Zaric S, et al. Nano-graphene oxide for cellular imaging and drug delivery. Nano Res 2008;1(3):203–12.
13. Wu C, Zhang Y, Wu X, Yang y, Zhou X, Wu H. Biological Applications of Graphene and Graphene Oxide. Nano Biomed Eng. 2012;4(4):157–62.
14. Mohajeri M, Behnam B, Sahebkar A. Biomedical applications of carbon nanomaterials: Drug and gene delivery potentials. J Cell Physiol 2018;234(1):298–319.
15. Sanchez V, Jachak A, Hurt R H, Kane AB. Biological Interactions of Graphene-Family Nanomaterials – An Interdisciplinary Review. Chem Res Toxicol 2008;23(1):1–7.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2023-06-01]

16. Dong H, Dong C, Ren T, Li Y, Shi D. Surface-engineered graphene-based nanomaterials for drug delivery. J Biomed Nanotechnol 2014;10(9):2086–106.
17. Ge Z, Yang L, Xiao F, Wu Y, Yu T, Chen J, et al. Graphene Family Nanomaterials: Properties and Potential Applications in Dentistry. Int J Biomater 2018;2018.
18. Khan M, Nawaz M, Adil SF, Khan HU, Siddiqui MRH, Al-Warrthan, Trenet W. Graphene based metal and metal oxide nanocomposites: synthesis, properties and their applications. J. Mater. Chem. A 2015;3,18753.
19. Zhong L, Yun K. Graphene oxide-modified zno particles: Synthesis, characterization, and antibacterial properties. Int J Nanomedicine 2015;10:79–92.
20. Mao HY, Laurent S, Chen W, Akhavan O, Imani M, Ashkarran AA, et al. Graphene: Promises, Facts, Opportunities, and Challenges in Nanomedicine. Chem Rev 2013;113(5):3407–24.
21. Valentini F, Calcaterra A, Ruggiero V, Pichichero E, Martino A, Iosi F, et al. Functionalized Graphene Derivatives: Antibacterial Properties and Cytotoxicity [Internet]. Journal of Nanomaterials. 2019 [cited 2020 Jan 31]. Available from: https://www.hindawi.com/journals/jnm/2019/2752539/
22. Liu S, Zeng TH, Hofmann M, Burcombe E, Wei J, Jiang R. Antibacterial Activity of Graphite , Graphite Oxide , Graphene Oxide , and Reduced Graphene Oxide : Membrane and Oxidative Stress. ACS Nano 2011;(9):6971–80.
23. Hu W, Peng C, Luo W, Lv M, Li X, Li D, et al. Graphene-Based Antibacterial Paper. ACS Nano 2010;4(7):4317–23.
24. Reddy KM, Feris K, Bell J, Wingett DG, Hanely C, Punnose A. Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. Appl Phys Lett 2007;90(213902):1–8.
25. Madani SY, Mandel A, Seifalian AM. A concise review of carbon nanotube's toxicology. Nano Reviews 2013;1:1–14.
26. Wang Y, Wu S, Zhao X, Su Z, Du L, Sui A. In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on human RPMI 8226 cells. Biomed Mater Eng 2014;24(6):2007–13.
27. Pelin M, Fusco L, León V, Martín C, Criado A, Sosa S, et al. Differential cytotoxic effects of graphene and graphene oxide on skin keratinocytes. Sci Rep 2017;7:1–12.
28. Ou L, Song B, Liang H, Liu J, Feng X, Deng B, et al. Toxicity of graphene-family nanoparticles : a general review of the origins and mechanisms. Part Fibre Toxicol 2016;13:57.
29. Yuan YG, Wang YH, Xing HH, Gurunathan S. Quercetin-mediated synthesis of graphene oxide—silver nanoparticle nanocomposites: A suitable alternative nanotherapy for neuroblastoma. Int J Nanomedicine 2017;12:5819–39.
30. Vaidyanathan R, Kalishwaralal K, Gopalram S, Gurunathan S. Nanosilver-The burgeoning therapeutic molecule and its green synthesis. Biotechnol Adv 2009;27(6):924–37.
31. Nano GJ, Banerjee AN. Prospects and Challenges of Graphene-Based Nanomaterials in Nanomedicine. Glob J Nanomedicine Mini Rev 2016;1(1).
32. Jiao G, He X, Li X, Qiu J, Xu H, Zhang N, et al. Limitations of MTT and CCK-8 assay for evaluation of graphene cytotoxicity. RSC Adv 2015;5(66):53240–4.
33. Han JW, Kim J. Green synthesis of graphene and its cytotoxic effects in human breast cancer cells. Int J Nanomedicine 2013;1015–27.
34. Chang Y, Yang S-T, Liu J-H, Dong E, Wang Y, Cao A, et al. In vitro toxicity evaluation of graphene

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2023-06-01]

oxide on A549 cells. Toxicol Lett 2011;200(3):201–10.

35. Yuan J, Gao H, Sui J, Duan H, Chen WN, Ching CB. Cytotoxicity Evaluation of Oxidized Single-Walled Carbon Nanotubes and Graphene Oxide on Human Hepatoma HepG2 cells : An iTRAQ-Coupled 2D LC-MS / MS Proteome Analysis. Toxicol Sci 2017;126:149–61.
36. Vallabani NVS, Mittal S, Shukla RK, Pandey AK, Dhakate SR, Pasricha R, et al. Toxicity of graphene in normal human lung cells (BEAS-2B). J Biomed Nanotechnol 2011;7(1):106–7.
37. Rasmussen JW, Martinez E, Louka P, Wingett DG. Zinc Oxide Nanoparticles for Selective Destruction of Tumor Cells and Potential for Drug Delivery Applications. Exper Opin Drug Deliv 2011;7(9):1063–77.
38. Gurunathan S, Han JW, Park JH, Kim JH. An in vitro evaluation of graphene oxide reduced by Ganoderma spp. in human breast cancer cells (MDA-MB-231). Int J Nanomedicine 2014;9(1):1783–97.
39. Lu X, Feng X, Werber JR, Chu C, Zucker I, Kim JH, et al. Enhanced antibacterial activity through the controlled alignment of graphene oxide nanosheets. Proc Natl Acad Sci U S A 2017;114(46):E9793–801.
40. Kumar P, Huo P, Zhang R, Liu B. Antibacterial properties of graphene-based nanomaterials. Nanomaterials 2019;9(5):1–32.
41. Li J, Wang G, Zhu H, Zhang M, Zheng X, Di Z, et al. Antibacterial activity of large-area monolayer graphene film manipulated. Scientific Reports 2014;4:4359
42. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. Apoptosis 2007;12(5):913–22.
43. Chong Y, Ma Y, Shen H, Tu X, Zhou X, Xu J, et al. The in vitro and in vivo toxicity of graphene quantum dots. Biomaterials 2014;35(19):5041–8.
44. Gurunathan S, Han JW, Abdal Dayem A, Eppakayala V, Kim JH. Oxidative stress-mediated antibacterial activity of graphene oxide and reduced graphene oxide in Pseudomonas aeruginosa. Int J Nanomedicine 2012;7:5901–14.
45. Zhang Y, Ali SF, Dervishi E, Xu Y, Li Z, Casciano D, et al. Cytotoxicity effects of graphene and single-wall carbon nanotubes in neural phaeochromocytoma-derived pc12 cells. ACS Nano 2010;4(6):3181–6.
46. Lammel T, Boisseaux P, Fernández-Cruz M-L, Navas JM. Internalization and cytotoxicity of graphene oxide and carboxyl graphene nanoplatelets in the human hepatocellular carcinoma cell line Hep G2. Part Fibre Toxicol 2013;10(1):27.
47. Li Y, Liu Y, Fu Y, Wei T, Le L, Gao G, et al. Biomaterials The triggering of apoptosis in macrophages by pristine graphene through the MAPK and TGF-beta signaling pathways. Biomaterials 2012;33(2):402–11.
48. Linklater DP, Baulin VA, Juodkazis S, Ivanova EP. Mechano-bactericidal mechanism of graphene nanomaterials. Interface Focus 2018;8(3):1–9.
49. Qiu Y, Wang Z, Owens AC.E, Kulaots I, Chen Y, Kane AB, Hurt RH. Antioxidant Chemistry of Graphene-Based Materials and its Role in Oxidation Protection Technology. Nnanoscal 2015;6(20):11744–55.
50. Huerta S, Goulet EJ, Huerta-yepez S, Ph D, Livingston EH, Words K. Screening and Detection of Apoptosis. J Surg Res 2007;139:143–56.
51. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM. Molecular Mechanisms of Apoptosis and Roles in Cancer Development and Treatment.Asian Pac J Cancer Prev 2015;16:2129–44.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2023-06-01]

52. Brunelle JK, Brunelle JK, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family Control of Mitochondrial Apoptosis by the Bcl-2 Family.J. Cell Sci 2009:437–41.
53. Bisht G, Rayamajhi S. ZnO Nanoparticles : A Promising Anticancer Agent. Nanobiomedicine 2016;3-9.
54. Bedi PS, Kaur A. an Overview on Uses of Zinc Oxide Nanoparticles. World J Pharm Pharm Sci 2015;4(12):1177–96.
55. Jaworski S, Sawosz E, Grodzik M, Winnicka A, Prasek M, Wierzbicki M, et al. In vitro evaluation of the effects of graphene platelets on glioblastoma multiforme cells. Int J Nanomedicine 2013;8:413–20.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2023-06-01]

Review Article

A REVIEW OF THE MECHANISMS OF CYTOTOXICITY AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF GRAPHENE

Ashraf Ahmadi Shadmehri[1], Farideh Namvar[2], Hamidreza Miri[3], Parichehre Yaghmaei[4], Mahboobeh Nakhaei Moghaddam[5]*

Received: 01 Oct, 2019; Accepted: 25 Dec, 2019

Abstract

Graphene has exhibited wide applications in nanotechnology, especially in biomedicine because of its unique physical and chemical properties. The degree of toxicity of graphene materials depends on various factors such as surface charge, physicochemical properties, toxicity determination methods, and cell line. Direct contact of the very sharp edges of graphene with the cell membrane is one of the major mechanisms involved in the cytotoxicity of graphene sheets. By trapping microorganisms among graphene sheets, it is another effective mechanism to inactivate microorganisms, and due to their high surface-to-volume ratio, excellent biocompatibility, and two-dimensional structure, it can be used as an anticancer and antibacterial material. This review presents recent advances in the cytotoxicity, anti-cancer, and antibacterial activities of graphene and has focused on a wide range of toxicity and antibacterial mechanisms. This study is expected to facilitate the widespread application of graphene in other fields.

***Keyword*:** graphene, antibacterial, cytotoxicity, biomedical application

***Address*:** Department of Medicine, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran
Tel: +985132250043
***Email*:** nanoscience96@yahoo.com, ahmadi492004@yahoo.com

SOURCE: STUD MED SCI 2020: 30(11): 904 ISSN: 1027-3727

[1] *Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*
[2] *Department of Medicine, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran (Corresponding Author)*
[3] *School of medicine, Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences, Torbat Heydariyeh, Iran*
[4] *Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*
[5] *Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran*

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2023-06-01]