Pejouhesh dar Pezeshki (i.e., Research in Medicine) **Original Article**

The Quarterly Journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences 2025; Vol. 49; No. 1

Antibacterial and Cytotoxic Effects of Graphene Oxide Nanosheets: Evaluation on Gram- Positive and Gram- Negative Bacteria and Skin Fibroblasts

Mohammad-Reza Nejadmoghaddaam[1*], Fatemeh Mozafari[1,2], Ramin Ghahremanzadeh[1]

1. Nanobiotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, Iran.
2. Department of Animal Sciences- Cellular and Developmental Biology, Islamic Azad University Science and Research Branch, Tehran, Iran.

Received: October 20, 2024; Accepted: March 10, 2025

Abstract

Background and Aim: Graphene oxide (GO) nanosheets have attracted considerable interest in biomedical applications due to their notable antibacterial and biological properties. This study aimed to evaluate the antibacterial efficacy and cytotoxicity of GO nanosheets against both Gram- positive and Gram-negative bacteria, as well as human skin fibroblast cells (AGO1522).

Methods: GO nanosheets were synthesized via a modified Hummer's method and characterized using Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD), atomic force microscopy (AFM), and dynamic light scattering (DLS). Antibacterial activity was determined by measuring the minimum inhibitory concentration (MIC), while cytotoxicity was assessed using the MTT assay to calculate the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}). Apoptotic effects were evaluated using Annexin V-FITC/PI staining followed by flow cytometry. Statistical analysis was performed using one- way ANOVA with Bonferroni correction, and significance was set at $p < 0.05$.

Results: Successful synthesis and characterization of GO nanosheets were confirmed. XRD revealed an interlayer spacing of 8.52 Å, while FTIR confirmed the presence of hydrophilic functional groups. AFM indicated nanosheet thickness ranging from 0.34 to 1.2 nm, and DLS measurements showed a zeta potential of -34.7 mV. Antibacterial testing showed greater efficacy of GO nanosheets against Gram- positive bacteria compared to Gram- negative strains, although the difference was not statistically significant ($p > 0.05$). The MTT assay determined an IC_{50} of 0.8605 ± 0.21 mg/mL, with cell viability exceeding 70% at concentrations below 0.3 mg/mL. Apoptosis analysis at 0.3 mg/mL revealed 5% early apoptosis and 7% late apoptosis among fibroblast cells.

Conclusion: GO nanosheets demonstrated promising antibacterial activity, particularly against Gram- positive bacteria, and exhibited dose- dependent cytotoxicity. At lower concentrations, they maintained effective antibacterial properties while preserving cell viability. These findings suggest potential applications of GO nanosheets in wound healing and biomedical devices; however, further in vivo and long- term studies are needed to validate their safety and efficacy under physiological conditions.

Keywords: Graphene oxide (GO); Nanosheets; Antibacterial properties; Cytotoxicity; Wound dressing; Skin fibroblast cells; IC_{50}

Please cite this article as: Nejadmoghaddaam MR, Mozafari F, Ghahremanzadeh R. Antibacterial and Cytotoxic Effects of Graphene Oxide Nanosheets: Evaluation on Gram- Positive and Gram- Negative Bacteria and Skin Fibroblasts. Pejouhesh dar Pezeshki. 2025;49(1):24-39.

[*]**Corresponding Author:** Mohammad-Reza Nejadmoghaddam; **Email:** moghaddam@avicenna.ac.ir
Nanobiotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, Iran.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-09-09]

پژوهش در پزشکی
مقاله پژوهشی
فصلنامه علمی- پژوهشی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی شهید بهشتی
دوره ۴۹، شماره ۱، سال ۱۴۰۴ شمسی، صفحات ۲۴ تا ۳۹

بررسی اثر ضدباکتریایی و سمیت سلولی نانوصفحه‌های گرافن اکساید: تحلیل تأثیر بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و فیبروبلاست‌های پوستی

محمدرضا نژادمقدم[1*]، فاطمه مظفری[1و2]، رامین قهرمان‌زاده[1]

۱- گروه پژوهشی نانوفناوری، مرکز تحقیقات ریز زیست‌فناوری، پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی- ابن‌سینا.
۲- دانش‌آموخته علوم‌جانوری- زیست‌شناسی سلولی و تکوینی، دانشگاه آزاد اسلامی علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۲۰

چکیده

سابقه و هدف: نانوصفحه‌های گرافن اکساید (GO) به دلیل خواص ضدباکتریایی و زیستی برجسته، توجه بسیاری در حوزه پزشکی به خود جلب کرده‌اند. این مطالعه به ارزیابی اثربخشی ضدباکتریایی و سمیت سلولی نانوصفحه‌های GO بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و سلول‌های فیبروبلاست پوستی انسان (AGO1522) می‌پردازد.

روش کار: در این مطالعه تجربی با استفاده از گروه شاهد، نانوصفحات GO به روش اصلاح‌شده هامر سنتز شدند و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آنها با تکنیک‌های FTIR، XRD، AFM و DLS ارزیابی و تأیید شد. آزمون‌های ضدباکتریایی برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC) و تست سمیت سلولی با روش MTT برای محاسبه IC50 انجام شد. همچنین، القای آپوپتوز از طریق رنگ‌آمیزی Annexin V-FITC/PI و تحلیل فلوسایتومتری بررسی شد. نتایج با آزمون واریانس یک‌طرفه (ANOVA) تحلیل شدند، برای مقایسه گروه‌ها، از آزمون تکمیلی Bonferroni استفاده شد و اختلاف با مقدار $P < ۰/۰۵$، معنادار در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها: نانوصفحه‌های GO با موفقیت سنتز و مشخصه‌یابی شدند. آنالیز XRD فاصله بین لایه‌ای ۸/۵۲ آنگستروم و طیف FTIR حضور گروه‌های عاملی هیدروفیل را تأیید کرد. AFM ضخامت لایه‌ها را ۰/۳۴ تا ۱/۲ نانومتر و DLS، پتانسیل زتا را ۳۴/۷- میلی‌ولت نشان داد. آزمون MIC نشان داد که نانوصفحات GO در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی، فعالیت ضدباکتریایی بیشتری علیه باکتری‌های گرم مثبت دارند، اما این تفاوت از نظر آماری معنادار نبود ($P > ۰/۰۵$). در تست MTT، مقدار IC_{50} برابر با ۰/۲۱± ۰/۸۶۰۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد و در غلظت‌های کمتر از ۰/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، زنده‌مانی سلولی در حدود ۷درصد حفظ شد. بررسی آپوپتوز نشان داد که در این غلظت، حدود ۵درصد از سلول‌ها دچار آپوپتوز اولیه و ۷درصددچار آپوپتوز تأخیری شدند.

نتیجه‌گیری: نانوصفحات گرافن اکساید اثر بازدارنده‌ای بر رشد باکتری‌ها نشان دادند، به‌ویژه بر باکتری‌های گرم مثبت. سمیت سلولی این نانوصفحه‌ها وابسته به دوز بوده و در غلظت‌های پایین، میزان زنده‌مانی سلولی بالای ۷۰ درصد باقی ماند. به نظر می‌رسد که با تعیین دوز مناسب، می‌توان اثر ضدباکتریایی را بدون ایجاد سمیت شدید حفظ کرد. با این حال، بررسی‌های بیشتری برای ارزیابی دقیق‌تر اثرات در شرایط بیولوژیکی مورد نیاز است.

واژگان کلیدی: گرافن اکساید (GO)؛ نانوصفحه‌ها؛ خواص ضدباکتریایی؛ سمیت سلولی؛ زخم پوش؛ سلول‌های فیبروبلاست پوستی؛ IC_{50}

به این مقاله، به صورت زیر استناد کنید:

Nejadmoghaddaam MR, Mozafari F, Ghahremanzadeh R. Antibacterial and Cytotoxic Effects of Graphene Oxide Nanosheets: Evaluation on Gram- Positive and Gram- Negative Bacteria and Skin Fibroblasts. Pejouhesh dar Pezeshki. 2025;49(1):24-39.

[*] **نویسنده مسئول مکاتبات:** محمدرضا نژادمقدم؛ **آدرس پست الکترونیکی:** moghaddam@avicenna.ac.ir
گروه پژوهشی نانوفناوری، مرکز تحقیقات ریز زیست‌فناوری، پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی- ابن‌سینا.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-09-09]

مقدمه

عفونت‌های باکتریایی یکی از چالش‌های عمده در مدیریت زخم‌ها به شمار می‌روند که می‌توانند فرآیند ترمیم را به‌طور قابل‌توجهی مختل کنند. ایجاد عفونت در محل زخم معمولاً ناشی از عدم تعادل بین توان دفاعی سیستم ایمنی میزبان و قابلیت رشد باکتری‌ها است (۱، ۲). این عفونت‌ها، به‌ویژه در زخم‌های مزمن یا مقاوم به درمان، می‌توانند منجر به تأخیر در ترمیم بافت، افزایش هزینه‌های درمانی و کاهش کیفیت زندگی بیماران شوند. در نتیجه، توسعه موادی که علاوه بر زیست‌سازگاری، دارای خواص ضدمیکروبی مؤثر باشند، یک ضرورت در حوزه پزشکی به شمار می‌آید.

پیشرفت‌های اخیر در حوزه نانوفناوری امکان طراحی مواد جدیدی را فراهم کرده است که می‌توانند برای بهبود درمان زخم‌ها استفاده شوند (۳، ۴).

در این راستا، انواع مختلفی از نانومواد، از جمله نانوذرات فلزی (مانند نقره، مس و زینک اکساید)، نانوکامپوزیت‌های پلیمری و نانوساختارهای کربنی مورد بررسی قرار گرفته‌اند. نانوذرات نقره به دلیل خواص ضدمیکروبی قوی، در بسیاری از پانسمان‌های پیشرفته زخم استفاده شده‌اند (۵). بااین‌حال، برخی مطالعه‌ها نشان داده‌اند که حتی نانوذرات نقره‌ای که به روش‌های شیمی سبز سنتز می‌شوند، ممکن است دارای سمیت بالقوه برای سلول‌های انسانی بوده و بر بافت‌های سالم تأثیر نامطلوب بگذارند (۶). نانوذرات زینک اکساید (ZnO)، به عنوان یک گزینه امیدوارکننده در نانوپزشکی، به دلیل خواص ضدمیکروبی و پتانسیل بالای خود در بهبود درمان زخم شناخته شده‌اند (۷). با این وجود، تحقیق‌ها نشان می‌دهند که سمیت این نانوذرات به دلیل انحلال آنها در محیط و افزایش سطح یون‌های Zn^{2+} درون‌سلولی می‌تواند سبب ایجاد استرس اکسیداتیو، سمیت سلولی و تغییرهای مورفولوژیکی در انواع مختلف سلول‌ها شود (۸). همچنین، نانوذرات مس با خواص آنتی‌باکتریال مطلوب، به دلیل پایداری پایین و احتمال آزادسازی یون‌های سمی، با چالش‌های در کاربرد خود مواجه هستند (۹). از طرف دیگر، نانوالیاف پلیمری بارگذاری‌شده با ترکیب‌های ضدمیکروبی، به دلیل ساختار متخلخل و توانایی کنترل رهایش عوامل زیستی فعال، به عنوان گزینه‌ای امیدوارکننده در درمان زخم‌ها مطرح شده‌اند (۱۰).

یکی دیگر از این مواد، گرافن اکساید است که به دلیل ویژگی‌هایی همچون انعطاف‌پذیری بالا و حضور گروه‌های آب‌دوست مانند اپوکسی، هیدروکسیل و اسیدی، توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده است (۲، ۱۱). اگرچه برخی مطالعه‌ها، سمیت سلولی کم و سازگاری گرافن و مشتقات آن با سلول‌های پستانداران را گزارش کرده‌اند (۲، ۱۲)، اما تحقیق‌های دیگری بر سمیت نانوصفحات گرافن اکساید و توان بالای آنها در مهار باکتری‌ها تأکید دارند (۱، ۲، ۱۳، ۱۴). به همین دلیل، پژوهشگران هنوز به توافق کامل در مورد آثار زیستی گرافن اکساید دست نیافته‌اند.

این تناقض‌ها معمولاً به تفاوت در ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نانوصفحات گرافن اکساید، نظیر اندازه، بار سطحی، گروه‌های عاملی و دوز استفاده شده مرتبط است (۱۵، ۱۶). به عنوان مثال، کاهش اندازه نانوصفحات گرافن اکساید می‌تواند سبب افزایش سطح تماس با سلول‌ها و افزایش سمیت آن شود، درحالی‌که بار سطحی مثبت این نانوصفحات سبب کنش بیشتر با غشای باکتری‌ها و در نتیجه افزایش خاصیت ضدباکتریایی آن‌ها می‌شود (۱۷، ۱۸). همچنین، حضور گروه‌های عاملی مانند اپوکسی و کربوکسیل در سطح نانوصفحات، می‌تواند بر میزان جذب آن توسط سلول‌ها و نحوه برهم‌کنش با اجزای زیستی اثر بگذارد (۱۹). علاوه بر این، روش‌های ارزیابی سمیت این مواد به تکرارپذیری و بهینه‌سازی‌هایی متناسب با شرایط سنتز و خلوص آنها هم ارتباط دارد (۳، ۲۰).

مطالعه‌های اخیر نیز نشان داده‌اند که سمیت گرافن اکساید بستگی زیادی به شرایط محیطی و نوع سلول‌های در معرض دارد. برای مثال، مطالعه‌ای نشان داده است که سمیت نانوصفحات گرافن اکساید در رده سلولی فیبروبلاست پوست انسان کمتر از سمیت آن در سلول‌های ایمنی مانند ماکروفاژها است (۲۱). همچنین، بررسی اثر سمیت گرافن اکساید بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان داده است که این ماده

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-09-09]

تأثیر بیشتری بر استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با اشریشیاکلی دارد، که احتمالاً به تفاوت در ساختار دیواره سلولی این باکتری‌ها مرتبط است (۲۲، ۲۳).

با توجه به محدودیت‌های موجود در اطلاعات پیرامون آثار زیستی گرافن اکساید در شرایط برون‌تنی (in vitro) و درون‌تنی (in vivo)، که به نتایج متناقضی در مطالعه‌های موجود منجر شده است، لازم است تحقیق‌های بیشتری انجام شود تا ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و آثار زیستی نانوصفحات گرافن اکساید به طور دقیق‌تری بررسی شود. این امر از تعمیم نتایج یک مطالعه خاص به سایر نمونه‌های مشابه جلوگیری می‌کند (۱۴، ۲۴).

در پژوهش حاضر، به‌طور خاص خواص ضدمیکروبی و سمیت سلولی نانوصفحات گرافن اکساید در شرایط برون‌تنی بررسی شده است. این مطالعه تأثیر گرافن اکساید را روی عوامل شایع عفونت زخم، شامل اشریشیاکلی پاتوژن، استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا، و همچنین رده سلولی پوستی AGO1522 ارزیابی می‌کند. نتایج این تحقیق می‌تواند درک بهتری از ایمنی و اثربخشی گرافن اکساید در شرایط برون‌تنی فراهم کرده و در توسعه محصولات جدید در زمینه زخم‌پوش‌های پیشرفته و همچنین سیستم‌های دارورسانی مبتنی بر نانوصفحات گرافن اکساید مؤثر واقع شود.

نوآوری اصلی این تحقیق در ترکیب همزمان ارزیابی خواص ضدباکتریایی و سمیت سلولی نانوصفحات گرافن اکساید است. در حالی که بسیاری از مطالعه‌های پیشین به‌طور جداگانه به بررسی آثار ضدباکتریایی یا سمیت سلولی گرافن اکساید پرداخته‌اند، تحقیق حاضر به‌طور همزمان این دو جنبه را مورد توجه قرار می‌دهد. این رویکرد می‌تواند اطلاعات جامع‌تری در خصوص پتانسیل گرافن اکساید در کاربردهای زیست‌پزشکی ارائه دهد و به‌ویژه در طراحی محصولات درمانی نوآورانه مؤثر باشد.

روش کار

این مطالعه یک پژوهش تجربی با استفاده از گروه شاهد است که به بررسی آثار ضدباکتریایی و همچنین سیتوتوکسیک نانوصفحات گرافن اکساید بر رده سلولی AGO1522 پرداخته است. رده سلولی AGO1522 از انستیتو پاستور ایران و سویه‌های باکتریایی از استوک‌های الیکه شده نمونه‌های خریداری شده از ATCC پژوهشگاه ابن‌سینا در سال‌های دور تأمین شد. این مطالعه، گروه شاهد برای مقایسه نتایج با گروه‌های تیمار در نظر گرفته شده است. برای ارزیابی آثار نانوصفحات گرافن اکساید، از روش‌های مختلف آزمایشگاهی مانند آزمون MIC برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده و آزمایش MTT برای ارزیابی سمیت سلولی و القای آپوپتوز استفاده شد. در ادامه، جزئیات مربوط به روش سنتز نانوصفحات گرافن اکساید، ارزیابی‌های فیزیکوشیمیایی و بیولوژیکی آن ارائه می‌شود.

سنتز نانوصفحات گرافن اکساید

برای سنتز نانوصفحات گرافن اکساید از روش هامر اصلاح‌شده استفاده شد (۲۵). ابتدا یک حمام یخ آماده و روی دستگاه استیرر قرار داده شد. سپس ۰/۵ گرم گرافن و ۰/۵ گرم نیترات سدیم وزن و در داخل یک بالن که قبلاً در حمام یخ قرار داده شده بود، همراه با یک مگنت اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه، ۲۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۶درصد به مخلوط اضافه شد و به‌خوبی همزده شد. بعد از ۳۰ دقیقه، ۳.۵ گرم پتاسیم پرمنگنات ($KMnO_4$) به تدریج طی یک ساعت به مخلوط اضافه شد؛ در این مرحله دمای مخلوط کمتر از ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شد. در ادامه، یک حمام ۳۵ درجه سانتی‌گراد تهیه شد و بالن به مدت دو ساعت در این حمام قرار گرفت. سپس دما به ۹۵ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت و در این مدت ۴۵ میلی‌لیتر آب آنالار به‌تدریج به مخلوط اضافه شد. پس از اتمام این مرحله، هیتر خاموش شد و ۲۷/۵ میلی‌لیتر آب آنالار به‌صورت یکجا به محلول اضافه شد. سپس، ۱/۵ میلی‌لیتر آب اکسیژنه به‌تدریج افزوده شد، زیرا این واکنش به‌شدت گرمازا بود. مخلوط در دمای محیط سرد شد. پس از سرد شدن، محلول در ۶ فالکون ریخته و سانتریفیوژ شد. محلول رویی دور ریخته شد و ۴۰ میلی‌لیتر HCl به محلول اضافه و دوباره سانتریفیوژ شد (در ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه). این شست‌وشو با HCl سه مرتبه

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-09-09]

تکرار شد و سپس ۱۲ تا ۱۵ بار با آب آنالار شسته شد. در مرحله بعد، برای ورقه‌ورقه کردن نمونه، محلول به مدت یک ساعت در دستگاه التراسونیک پروب با قدرت ۷۰درصد قرار گرفت. پس از آن، محلول از صافی عبور داده شده و در چهار پلیت تقسیم شد. پلیت‌ها در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا کاملاً یخ بزنند. سپس، پلیت‌ها به فریزدرای منتقل شدند، درب آنها برداشته شد و با فویل پوشانده و با سوزن سوراخ شدند. این فرآیند به مدت ۴۰ ساعت در فریزدرای ادامه یافت تا پودر گرافن اکساید به دست آید.

تهیه محیط کشت آگار مولر هینتون جامد

طبق بروشور مربوطه، ۳۶ گرم از پودر محیط کشت آگار مولر هینتون در یک لیتر آب مقطر حل شده و با حرارت دادن، به حالت شفاف درآمد. سپس محیط کشت استریل شده در اتوکلاو، تحت شرایط استریل و زیر هود در پلیت‌های استریل ریخته شد و اجازه داده شد تا به مدت ۱۵-۲۰ دقیقه به حالت جامد تبدیل شود.

تهیه و تنظیم سوسپانسیون میکروبی

برای تهیه استاندارد ۰/۵ مک فارلند، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول کلرید باریم ($BaCl_2$) ۰/۱ درصد با ۹۹/۵ میلی‌لیتر محلول اسید سولفوریک ۱درصد مخلوط شد (۲۶). سپس ۱۰ میلی‌لیتر از این مخلوط در لوله آزمایش ریخته شد و ۵۰ میکرولیتر از آن جدا شده و به آن ۵۰ میکرولیتر از محلول کلرید باریم اضافه شد. جذب نوری محلول در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت، محلول به لوله‌ای خشک و تمیز منتقل و کاملاً مسدود شد و در دمای اتاق و در تاریکی نگه‌داری شد.

در دو لوله آزمایش، هرکدام چهار میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی ریخته و استریل شد. سپس کلنی‌های باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* که از نمونه‌های بالینی جدا شده بودند، به لوله‌های جداگانه اضافه شدند تا کدورت سوسپانسیون مشابه استاندارد ۰/۵ مک فارلند شود.

تلقیح سوسپانسیون میکروبی و آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی

پس از تهیه سوسپانسیون میکروبی مطابق با کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند، یک سواپ استریل به سوسپانسیون آغشته شد و مایع اضافی آن با فشار دادن سواپ به دیواره داخلی لوله حذف شد. سپس سواپ مرطوب به طور یکنواخت روی سطح محیط مولر هینتون آگار که به دمای اتاق رسیده بود، کشت شد.

برای آزمون حساسیت آنتی‌بیوتیکی، ۱۵ دقیقه قبل از شروع این مرحله، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک آمیکاسین، سفتازیدیم، جنتامایسین، ایمی‌پنم، تتراسیکلین و سیپروفلوکساسین از یخچال خارج شدند و اجازه داده شد به دمای اتاق برسند. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک با استفاده از پنس استریل و سرد شده برداشته شده و در سطح پلیت قرار داده شدند. دیسک‌ها با فاصله ۲۰ میلی‌متر از لبه پلیت و ۲۰ میلی‌متر از یکدیگر قرار گرفتند و سپس پلیت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت، قطر هاله‌های عدم رشد اندازه‌گیری شد.

تعیین اثر ضد باکتریایی نانوصفحات گرافن اکساید

در این مطالعه، به منظور بررسی آثار ضد میکروبی نانوصفحات گرافن اکساید سنتز شده، از روش تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC) استفاده شد. در ابتدا، کشت تازه‌ای از باکتری‌های استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشرشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* تهیه شد. سپس از تمام باکتری‌های مطالعه شده، سوسپانسیون‌هایی با کدورت نیم مک‌فارلند تهیه شد و همچنین از نانوصفحات گرافن اکساید سنتز شده، غلظت‌های ۰/۰۲ تا ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شد.

در مرحله بعد، در چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای، ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت مولر هینتون براث، ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های نانوصفحات گرافن اکساید و ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری‌های مطالعه شده اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۱۹ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و میزان تحت غلظت‌های ۰/۰۰۱ تا ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از نانوذره گرافن اکساید MIC بررسی شد. پس از اتمام دوره انکوباسیون، پلیت‌هایی که رشد باکتری در آنها به صورت تک کلنی و قابل شمارش بود (تعداد کلنی بین ۳۰ تا ۳۰۰)، بررسی

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-09-09]

و تعداد کلنی‌ها شمارش شد. نتایج به صورت CFU/mL گزارش شد.

تعیین تعداد سلول اولیه (Cell seeding) دستیابی به ۸۰-۷۰ درصد تراکم (Confluency) طی ۲۴ ساعت کشت

در این مطالعه، به منظور تعیین تعداد مناسب سلول‌های AGO1522 برای رسیدن به تراکم مطلوب برای آزمون‌های بعدی مثل ارزیابی سمیت یلولی و القای آپوپتوز، ابتدا سلول‌های AGO1522 با استفاده از محلول trypsin-EDTA (حاوی ۰/۲۵ درصد تریپسین، ۵ میلی‌مولار EDTA و PBS 1X) جمع‌آوری شدند. سپس از سلول‌ها سری رقت‌های مختلفی به نسبت 10^{2} × ۱/۵ الی 10^{5} × ۲ تهیه و در پلیت‌های ۹۶ چاهکی توزیع شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور کشت سلولی قرار گرفتند. پس از ۲۴ ساعت، محیط کشت از تمامی چاهک‌های پلیت خارج و سپس ۵۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد. پلیت‌ها به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، برای حل شدن کریستال‌های فورمازان، محلول MTT از چاهک‌ها خارج شده و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد. سطح پلیت با فویل آلومینیومی پوشانده شده و سپس با استفاده از دستگاه شیکر Microtex به مدت دو دقیقه شیکینگ انجام شد تا کریستال‌های فورمازان به طور یکنواخت در DMSO حل شوند. جذب نوری (OD) چاهک‌ها حداکثر طی ۳۰ دقیقه پس از شیکینگ، با استفاده از دستگاه Elisa reader Convergys ELR 96X در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. OD به دست آمده از چاهک‌های مختلف نشان‌دهنده تعداد سلول‌های زنده در هر تراکم است. سپس با رسم نمودار و بررسی نتایج همزمان با کنترل بوسیله مشاهده تراکم سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری اینورت، تراکم سلولی معادل با ۷۰ تا ۸۰ درصد به عنوان تراکم بهینه برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شد.

بررسی آثار سیتوتوکسیک نانوصفحات گرافن اکساید

آثار سیتوتوکسیک نانوصفحات گرافن اکساید سنتز شده روی رده سلولی AGO1522 پوست با استفاده از روش رنگ‌سنجی MTT که پیش از این نیز گزارش شده (۲۷)، با اندکی اصلاحات بررسی شد. مطابق با نمودار تعیین تراکم بهینه رده سلولی، تعداد ۱۰,۰۰۰ سلول AGO1522 در پلیت‌های کشت سلول کاشته شدند و سپس سلول‌ها تحت تأثیر غلظت‌های ۲درصد تا ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از نانوصفحات گرافن اکساید قرار گرفتند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، محیط کشت تمامی چاهک‌های نمونه تست، کنترل مثبت، منفی، بلانک و کنترل سلول خارج شد و سپس ۵۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت یک میلی‌گرم/ میلی‌لیتر به چاهک‌ها اضافه شد و پلیت‌ها به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. سپس، برای حل شدن کریستال‌های فورمازان، محلول MTT از چاهک‌ها خارج و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به چاهک‌ها اضافه شد. روی پلیت را با فویل آلومینیومی پوشانده و سپس با استفاده از دستگاه شیکر Microtex مدت دو دقیقه عمل شیکینگ انجام شد تا کریستال‌های فورمازان به‌صورت یکسان در DMSO حل شوند. میزان جذب چاهک‌ها حداکثر طی مدت ۳۰ دقیقه با استفاده از دستگاه Elisa reader Convergys ELR 96X در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان کشندگی سلول با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد زنده مانی} = \left(\frac{\text{جذب نوری های‌سلول تیمار شده}}{\text{جذب نوری های‌سلول کنترل}}\right) \times 100$$

همچنین، میزان دوز ۵۰درصد کشندگی (IC50) با استفاده از نرم‌افزار Prism و معادله Log(inhibitor) vs. response - Variable slope (four parameters) محاسبه شد (۲۸). برای این کار، داده‌های جذب نوری به نرم‌افزار وارد شده و منحنی دوز- پاسخ ترسیم شد. سپس، معادله‌های غیرخطی به منحنی دوز- پاسخ برازش داده شد تا غلظت نانوصفحات گرافن اکساید که ۵۰ درصد از سلول‌ها را کشته است (IC50) تعیین شد.

بررسی میزان القای آپوپتوز به روش رنگ‌آمیزی همزمان Annexin V-FITC و PI

سلول‌های AGO1522 با تراکم سلولی ۸۰درصد با استفاده از محلول محلول trypsin- EDTA جمع‌آوری و با غلظت 10^{5}

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-09-09]

سلول در هر میلی‌لیتر در پلیت‌های ۱۲- حفره‌ای پاساژ داده شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، سلول‌ها با غلظت IC50 از گرافن اکساید تیمار شدند. محیط کشت سلول‌های تیمار شده و کنترل به صورت جداگانه به لوله‌های فالکون منتقل شد. سپس سلول‌ها پس از یک بار شست‌وشو با PBS 1X با استفاده از محلول سیترات(۱۵ میلی‌مولار سدیم سیترات، ۱۳۵ میلی‌مولار پتاسیم کلرید، pH 8-8.3) از کف پلیت جدا شدند. سلول‌های جدا شده نیز به لوله‌های فالکون اضافه و سپس با دور g ۳۰۰ به مدت دو دقیقه سانتریفیوژ و شمارش شدند (برای هر نمونه $۱۰^{۵}$ × ۵ سلول لازم است).

رسوب سلولی یک بار با یک میلی‌لیتر بافر PBS 1X و یک بار دیگر با یک میلی‌لیتر بافر اتصال (binding buffer) حاوی ۱۰ میلی‌مولار HEPES، ۱۴۰ میلی‌مولار NaCl، و ۲/۵ میلی‌مولار $CaCl_2$ شست‌وشو داده شد و سپس با دور g ۳۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاوی $۱۰^{۵}$ × ۵ سلول با ۱۰۰ میکرولیتر از بافر اتصال سوسپانسیون شد. به این محلول ۵ میکرولیتر Annexin V-FITC اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شد. سلول‌ها سپس با یک میلی‌لیتر از بافر اتصال شست‌وشو و پس از سانتریفیوژ، با ۵۰۰ میکرولیتر از همان بافر سوسپانسیون شدند. به سوسپانسیون حاصل، ۵ میکرولیتر رنگ PI با غلظت ۵۰میکروگرم/ میلی‌لیتر اضافه و پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق و در تاریکی، قرائت نتایج با فلوسایتومتری انجام شد.

برای تفسیر صحیح نتایج فلوسایتومتری، کنترل‌های زیر به کار گرفته شد:

سلول‌هایی که با آب جوش کشته شده و تنها با PI رنگ‌آمیزی شدند (کنترل مثبت PI).

سلول‌هایی که القای آپوپتوز در آنها تأیید شده و تنها با Annexin V-FITC رنگ‌آمیزی شدند کنترل مثبت Annexin V-FITC).

سلول‌هایی که نه با PI و نه با Annexin V-FITC رنگ‌آمیزی نشدند (کنترل منفی).

تجزیه و تحلیل آماری

در این مطالعه، تمامی آزمون‌ها حداقل سه بار تحت شرایط مشابه تکرار شدند (۲۹). نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار (Mean ± SD) گزارش شدند. برای تحلیل آماری داده‌ها از آزمون تی مستقل یا تحلیل واریانس یکطرفه (ANOVA) و برای مقایسه گروه‌ها، از آزمون تکمیلی Bonferroni استفاده شد. اختلاف آماری با مقدار P کمتر از ۰/۰۵ ($P < ۰/۰۵$) معنادار در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها

آنالیز جامع ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نانوصفحات گرافن‌اکساید

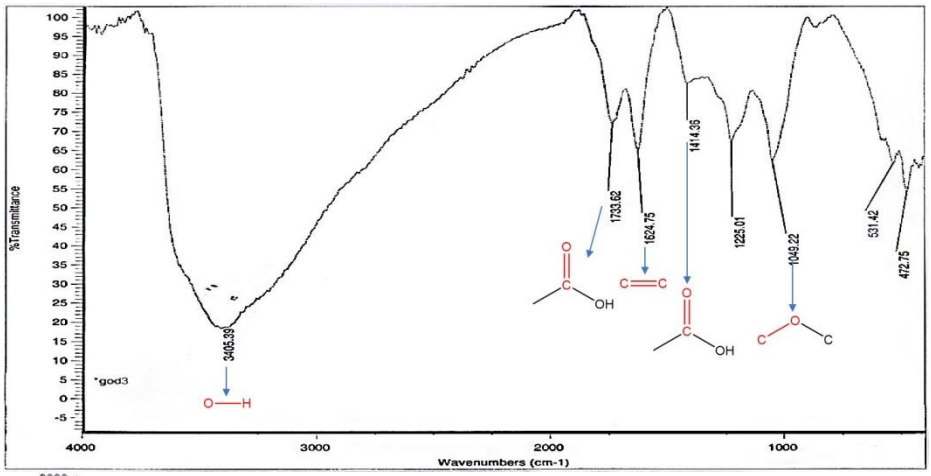
در طیف‌سنجی زیرقرمز تبدیل فوریه (FTIR) ، حضور پیک‌های بارز در نواحی $۱۶۲۴ cm^{-1}$ ، $۱۴۱۴ cm^{-1}$، و $۱۰۴۹ cm^{-1}$ به‌ترتیب کشش پیوند C-C در ساختار کربنیsp^2، گروه هیدروکسیل (C-OH) ، و ارتعاش کششی پیوند اتری C-O-C را نشان داد (شکل ۱a). همچنین، پیک‌های مشاهده‌شده در محدوده $۳۵۰۰-۲۵۰۰ cm^{-1}$ و پیک $۱۷۳۳ cm^{-1}$ ارتعاش‌های کششی پیوندهای O-H و پیوند C=O در گروه کربوکسیلیک (COOH) را تأیید کردند (شکل ۱a). این نتایج با الگوهای مرسوم برای گرافن‌اکساید تطابق کامل دارند.

الگوی پراش پرتو ایکس (XRD) گرافن‌اکساید، وجود یک پیک بسیار قوی در زاویه $2\theta = 10.39^{\circ}$ مربوط به صفحه [001] را نشان داد که مؤید موفقیت‌آمیز بودن فرآیند سنتز گرافن‌اکساید است (شکل ۱b). پیک بارز در $2\theta=10.39$ نشان‌دهنده سنتز گرافن اکساید با مقدار d-spacing نزدیک به ۸/۵۲ Å است. این پیک معمولاً به دلیل فاصله بزرگ‌تر بین لایه‌ها نسبت به گرافن است که در نتیجه اکسیداسیون به وجود می‌آید (۳۰).

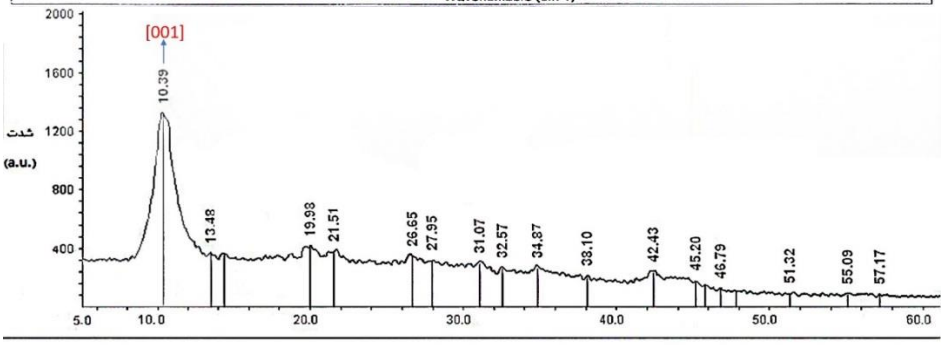
تحلیل میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) نشان داد که ضخامت لایه‌های منفرد گرافن‌اکساید در محدوده ۰/۳۴ تا ۱/۲ نانومتر قرار دارد (شکل ۱c). در نهایت، بررسی پتانسیل زتای صفحات گرافن‌اکساید، بار سطحی منفی معادل ۳۴/۷- میلی‌ولت را نشان داد (شکل ۱d).

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-09-09]

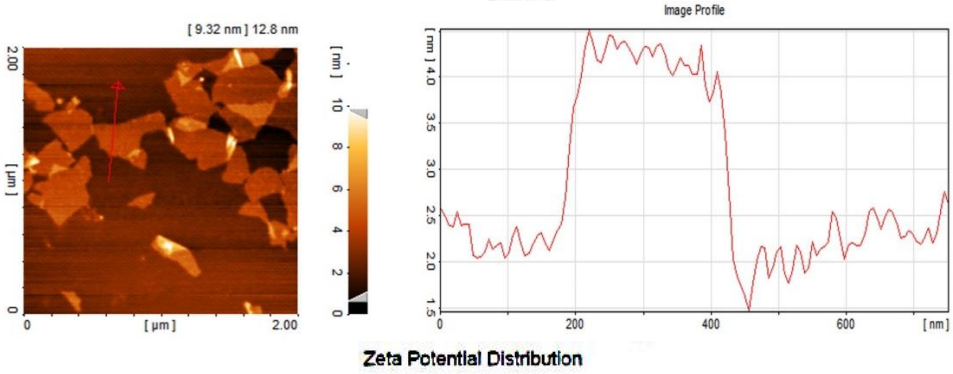
a



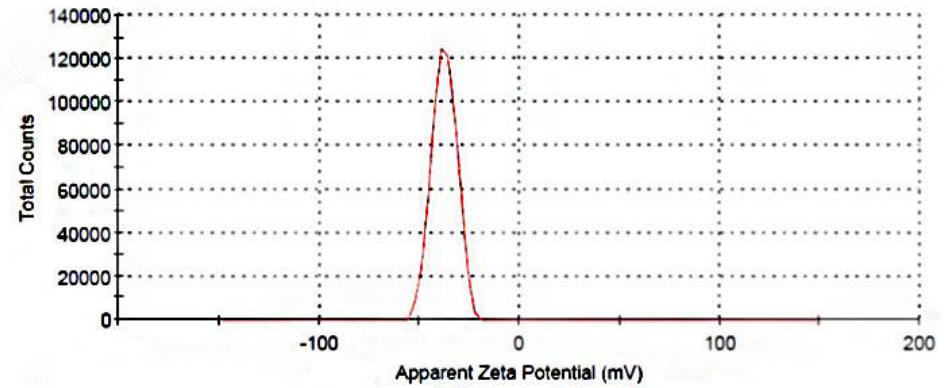
b



c



d



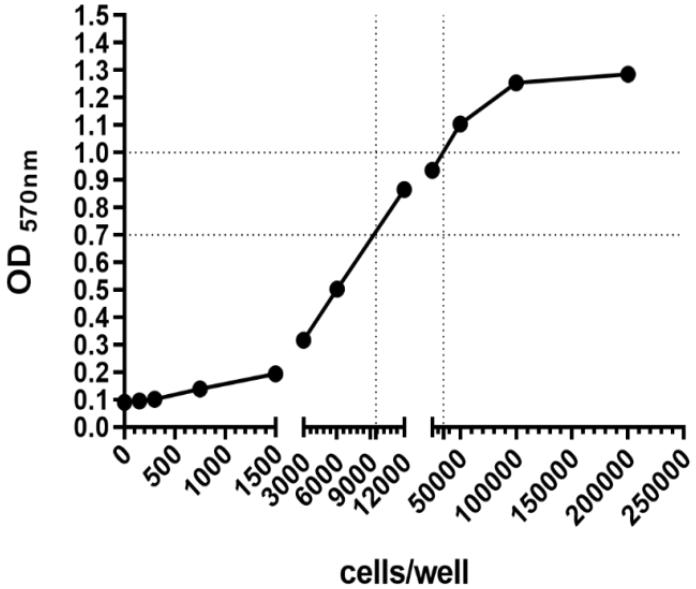
شکل ۱- آنالیزهای طیف‌سنجی و میکروسکوپی برای بررسی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی گرافن‌اکساید سنتز شده.

طیف FTIR گرافن‌اکساید، نشان‌دهنده حضور پیوندهای C-C، C-OH و C-O-C (a). الگوی XRD، تأیید وجود پیک مشخصه گرافن‌اکساید در زاویه ۱۰/۳۹ درجه (b). تصویربرداری AFM، تأیید ضخامت لایه‌های گرافن در محدوده ۱/۲-۰/۳۴ نانومتر (c) و طیف پتانسیل زتا (DLS)، پتانسیل زتای ۳۴/۷- میلی‌ولت، نشان‌دهنده پایداری بالای نانوصفحات (d).

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-09-09]

نتایج بهینه‌سازی تراکم سلولی برای آماده‌سازی رده سلولی AGO1522 در آزمون‌های زیستی

نتایج نشان داد که تعداد سلول‌های $۱۰^{۴} \times ۱$ تا $۱۰^{۴} \times ۳$، جذب نوری (OD) در محدوده ۰/۷ تا ۱/۲ را ایجاد کرده و به‌عنوان مقادیر مناسب برای آغاز ارزیابی سمیت سلولی با استفاده از رده سلولی AGO1522 شناسایی شدند نمودار ۱. همچنین، مقایسه تعداد سلول‌های $۱۰^{۴} \times ۱$ و $۱۰^{۴} \times ۲$ در پلیت‌های ۹۶ چاهکی نشان داد که تعداد $۱۰^{۴} \times ۲$ برای شروع آزمون MTT و ارزیابی سمیت سلولی در این پلیت‌ها بهینه است نمودار ۱. به‌علاوه، تعداد سلول‌های $۱۰^{۴} \times ۷$ برای پلیت‌های ۲۴ چاهکی بهینه‌سازی شد و نتایج به‌طور مؤثری تراکم سلولی مورد نیاز برای آزمون را تأمین کردند.



نمودار۱- نتایج تیتراسیون رده سلولی فیبروبلاست پوست انسان (AGO1522).

تعداد سلول‌های $۱۰^{۴} \times ۲$ برای پلیت‌های ۹۶ چاهکی و $۱۰^{۴} \times ۷$ برای پلیت‌های ۲۴ چاهکی به عنوان مقادیر بهینه شناسایی شدند. این تیتراسیون با هدف تعیین تعداد سلول‌های مناسب برای استفاده در ارزیابی‌های سمیت سلولی به روش MTT انجام شد، به‌طوری‌که در هر چاهک از پلیت ۹۶ چاهکی کشت سلول، تعداد سلول‌های بهینه برای آزمایش‌ها توزیع شود.

بررسی آثار ضدباکتریایی نانوصفحات گرافن اکساید بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی

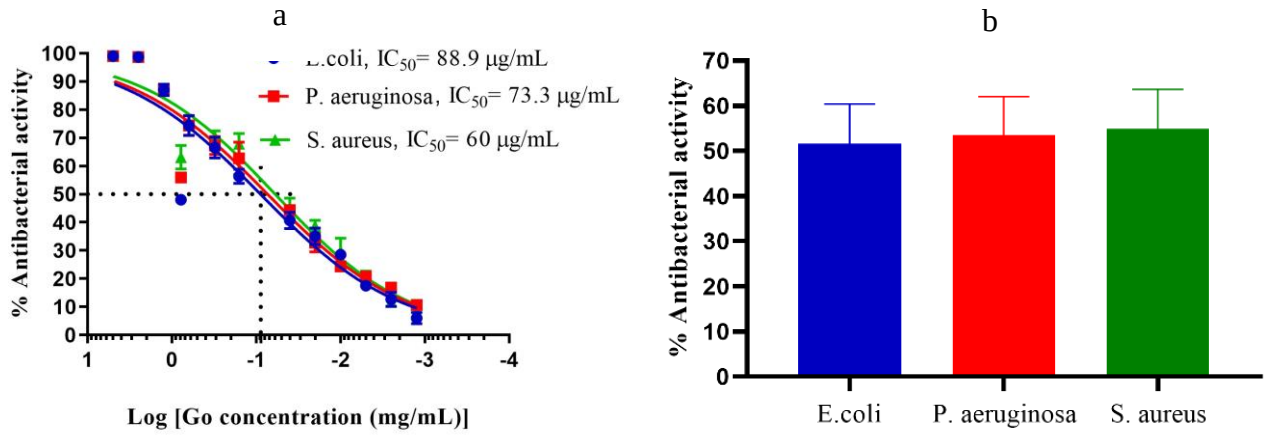
آثار ضدباکتریایی نانوصفحات گرافن‌اکساید بر سه نوع باکتری شامل *اشرشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* (هر دو گرم منفی) و *استافیلوکوکوس اورئوس* (گرم مثبت) بررسی شد. نتایج نشان داد که نانوصفحات گرافن‌اکساید در غلظت‌های پایین‌تر فعالیت ضدباکتریایی بیشتری علیه باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به باکتری‌های گرم منفی *اشریشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* دارند (نمودار ۲a). با این حال، این تفاوت از نظر آماری معنادار نبود ($P > ۰/۰۵$) (نمودار ۲b).

بررسی سمیت سلولی نانوصفحات گرافن اکساید

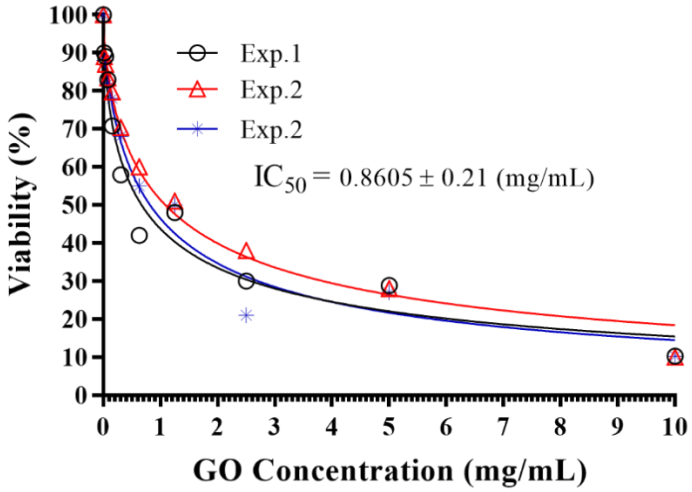
در این مطالعه، آثار سمیت سلولی نانوصفحات گرافن‌اکساید سنتزشده روی رده سلولی AGO1522 پوست با استفاده از روش MTT بررسی شد. پس از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های مختلف نانوصفحات گرافن‌اکساید، درصد زنده‌ماندن سلول‌ها ارزیابی شد. با افزایش غلظت نانوصفحات از ۲درصد تا ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، میزان زنده‌ماندن سلول‌ها کاهش یافت. در غلظت یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر، حدود ۵۰ درصد از سلول‌ها تحت تأثیر

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-09-09]

قرار گرفتند (IC50 = 0.8605 ± 0.21 mg/mL). همچنین، در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، تا ۹۰ درصد از سلول‌ها دچار سمیت شدند. این داده‌ها رابطه وابستگی دوز نانوصفحات گرافن‌اکساید با سمیت سلولی را نشان می‌دهند (نمودار ۳).



نمودار۲- ارزیابی آثار ضدباکتریایی نانوصفحات گرافن اکساید بر *اشرشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس*.
مقادیر IC50 برای هر سه باکتری نمایش داده شده است (a). نتایج حاصل از تحلیل آماری با استفاده از آزمون ANOVA یک‌طرفه نشان می‌دهد که تفاوت معناداری بین آثار گرافن اکساید بر سه باکتری وجود ندارد ($p > 0.05$) (b).

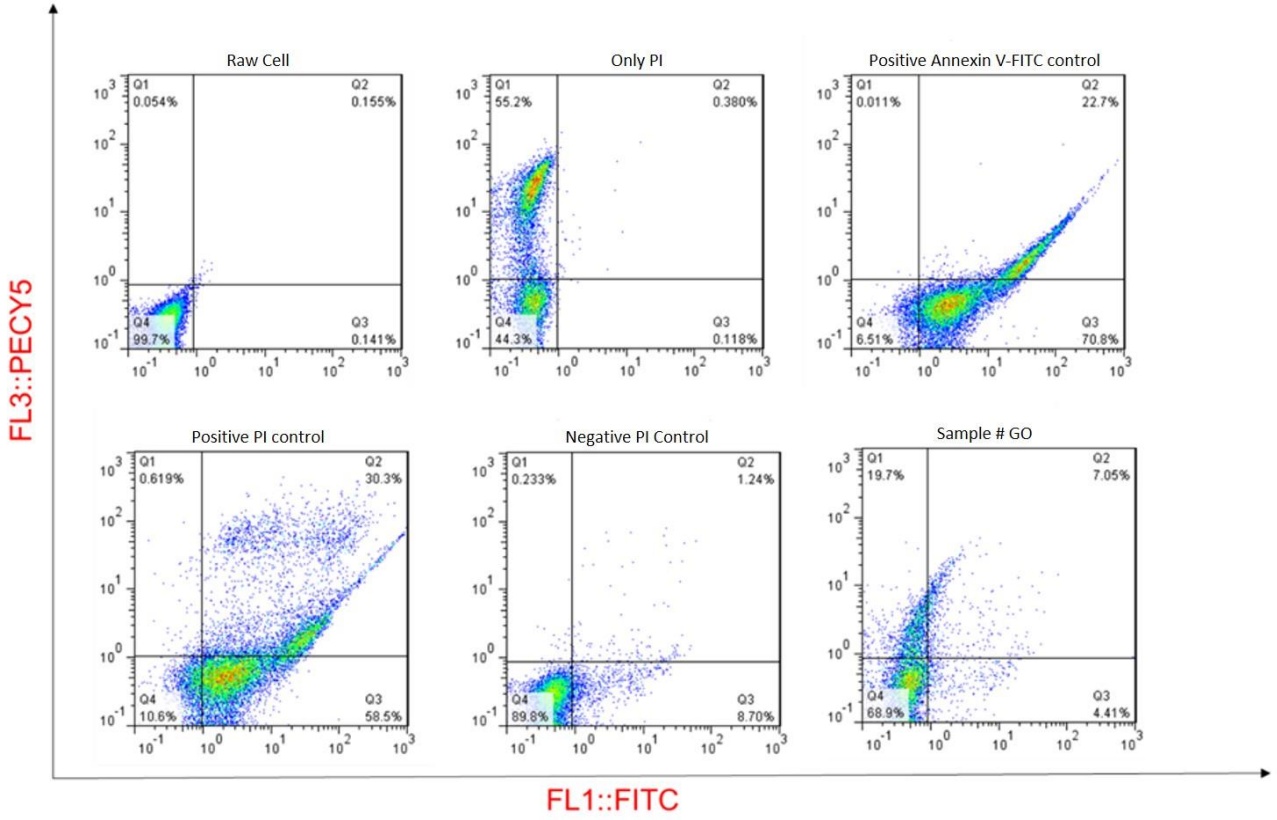


نمودار ۳- ارزیابی آثار سیتوتوکسیسیتی نانوصفحات گرافن اکساید در شرایط برون‌تنی و محاسبه IC_{50} با استفاده از آزمون MTT.
سلول‌های AGO1522 به‌عنوان نمونه‌ای از رده‌های سلولی نرمال فیبروبلاست با غلظت‌های مختلف گرافن اکساید (۰/۰۲ تا ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) تیمار شدند. اثر این نانوصفحات بر زنده‌مانی سلولی با استفاده از آزمون MTT و از طریق مدل [Inhibitor] vs. response – Variable slope (چهار پارامتری) در نرم‌افزار پریزیم ارزیابی شد.

برای بررسی میزان آپوپتوز القاشده در سلول‌های AGO1522 تیمارشده با نانوصفحات گرافن‌اکساید، از غلظت ۰/۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر استفاده شد. در این غلظت، حدود ۷۰ درصد از سلول‌ها زنده‌مانده بودند. سلول‌ها پس از تیمار با نانوصفحات، با روش FITC Annexin V/PI رنگ‌آمیزی شده و توسط آنالیز فلوسایتومتری تحلیل شدند.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-09-09]

نتایج آنالیز فلوسایتومتری در شکل ۲ نمایش داده شده است. بر اساس این تحلیل، نواحی Q4، Q2، Q3 و Q1 به‌ترتیب نشان‌دهنده سلول‌های زنده، آپوپتوز تأخیری، آپوپتوز اولیه و نکروز سلولی هستند. نتایج نشان دادند که میزان آپوپتوز اولیه در سلول‌های AGO1522 حدود ۱۱/۵درصد است (شکل ۲).



شکل ۲- نتایج آنالیز فلوسایتومتری برای تعیین میزان آپوپتوز القا شده توسط نانوصفحات گرافن اکساید در سلول‌های AGO1522.
سلول‌ها با غلظت ۰/۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از نانوصفحات گرافن اکساید تیمار شدند و سپس با FITC Annexin V و PI رنگ‌آمیزی شدند. نواحی Q4، Q2، Q3 و Q1 به‌ترتیب نشان‌دهنده میزان سلول‌های زنده، آپوپتوز تأخیری، آپوپتوز اولیه و نکروزی سلولی هستند. نتایج نشان‌دهنده میزان آپوپتوز حدود ۱۱/۵ درصد در سلول‌های AGO1522 است.

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که نانوصفحات گرافن اکساید دارای آثار ضدباکتریایی قابل توجهی بر هر دو گروه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی هستند، در حالی که سمیت سلولی آنها در غلظت‌های پایین قابل کنترل است. این ویژگی‌ها، گرافن اکساید را به گزینه‌ای جذاب برای کاربردهای پزشکی، از جمله زخم‌پوش‌های آنتی‌باکتریال و سیستم‌های دارورسانی موضعی، تبدیل می‌کند. مطالعه‌های پیشین نیز آثار مشابهی از نانوصفحات گرافن اکساید در مهار رشد باکتری‌ها گزارش کرده‌اند (۱، ۲، ۱۳). بااین‌حال، برخی تحقیق‌ها تفاوت‌هایی در میزان حساسیت باکتری‌ها نسبت به این نانوصفحات نشان داده‌اند (۲۲). به‌ویژه، برخی گزارش‌ها حاکی از عملکرد ضعیف این نانوصفحات در برابر باکتری‌های گرم منفی هستند که به ویژگی‌های ساختاری دیواره سلولی آنها مرتبط است (۲۳، ۳۱). این تفاوت‌ها احتمالاً ناشی از نحوه تعامل دیواره سلولی باکتری‌ها با نانوصفحات گرافن اکساید است و نشان می‌دهد که ممکن است برای هر نوع باکتری، غلظت بهینه‌ای برای ایجاد اثر کشندگی وجود داشته باشد.

نتایج آنالیزهای XRD و FTIR نشان داد که افزایش فاصله بین لایه‌های گرافیت به دلیل حضور گروه‌های عاملی اکسیژن‌دار در ساختار گرافن اکساید رخ می‌دهد (۳۲). این افزایش فاصله تا

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-09-09]

۰/۷۱۳ نانومتر اندازه‌گیری شد، سبب بهبود خواصی مانند هیدروفیلیته و پایداری در محیط آبی می‌شود. همچنین، حضور این گروه‌های عاملی سبب افزایش حلالیت گرافن اکساید در محیط‌های بیولوژیکی شده و آن را برای کاربردهای پزشکی مناسب‌تر می‌کند (۳۳). علاوه بر این، تصاویر AFM نشان دادند که ضخامت نانوصفحات گرافن در محدوده ۰/۳۴ تا ۱/۲ نانومتر قرار دارد، که نشان‌دهنده پوسته‌پوسته شدن کامل ساختار گرافیت است (۳۴). این ویژگی منجر به افزایش سطح فعال نانوصفحات شده و می‌تواند تماس بیشتری با سلول‌های باکتریایی یا سلول‌های بدن برقرار کند، در نتیجه، سمیت و خاصیت ضدباکتریایی گرافن اکساید را تقویت می‌کند (۳۵).

نانوصفحات گرافن اکساید به دلیل ساختار تک‌لایه یا چندلایه و سطح وسیع خود قادرند تعامل قوی با غشای سلولی باکتری‌ها برقرار کنند (۱۷). این تعامل در باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌تواند متفاوت باشد. به‌عنوان مثال، دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی مانند *اشریشیاکلی* به دلیل حضور لایه لیپوپلی‌ساکاریدی، به‌عنوان مانعی فیزیکی عمل کرده و نفوذ نانوصفحات را کاهش می‌دهد (۲۲). در مقابل، دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت، به دلیل ضخامت بیشتر لایه پپتیدوگلیکان، نفوذپذیری بیشتری برای نانوصفحات دارد (۲۲).

علاوه بر ویژگی‌های دیواره سلولی، حساسیت باکتری‌ها به نانوصفحات به مکانیسم‌های دیگری مانند پراکسیداسیون چربی و تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) نیز مرتبط است (۲۲، ۲۳، ۳۶). این مکانیسم‌ها منجر به نفوذ نانوصفحات به غشاهای سلولی، تخریب غشا و در نهایت مرگ سلولی می‌شوند. مطالعه‌ها نشان داده‌اند که توانایی گرافن اکساید در ایجاد استرس اکسیداتیو در باکتری‌های گرم مثبت، به دلیل سطح تماس بیشتر با غشای آنها، نسبت به باکتری‌های گرم منفی بیشتر است (۲۲، ۳۱). به همین دلیل، آثار ضدباکتریایی قوی‌تری بر باکتری‌های گرم مثبت مانند *استافیلوکوکوس اورئوس* (IC_{50} = 60 µg/mL) نسبت به *اشریشیا کلی* (IC_{50} = 73.3 µg/mL) و *سودوموناس آئروژینوزا* (IC_{50} = 88.9 µg/mL) گزارش شده است.

اگرچه مکانیسم‌های دقیق آثار ضدباکتریایی نانوصفحات گرافن اکساید هنوز به‌طور کامل مشخص نشده‌اند. برخی پژوهش‌ها پیشنهاد کرده‌اند که این نانوصفحات می‌توانند با آزادسازی یون‌هایی که با گروه‌های تیول (-SH) پروتئین‌های غشای باکتریایی واکنش می‌دهند، سبب اختلال در عملکرد سلولی شوند. این پروتئین‌ها مسئول انتقال مواد مغذی از دیواره سلولی هستند و غیرفعال شدن آنها سبب کاهش نفوذپذیری غشا و مرگ سلولی می‌شود (۳۷). این یافته‌ها نشان‌دهنده اهمیت تعیین دقیق دوز و غلظت نانوصفحات برای کاربردهای ضدباکتریایی هستند.

در زمینه سمیت سلولی، نتایج MTT نشان داد که نانوصفحات گرافن اکساید به‌صورت وابسته به دوز، اثر سمی بیشتری ایجاد می‌کنند. مطابق با استاندارد ISO 10993، اگر میزان زنده‌مانی سلول‌ها در بالاترین غلظت نمونه حداقل ۷۰درصد نسبت به گروه کنترل باشد، ماده به‌عنوان غیر سمی در نظر گرفته می‌شود (۳۸). در این مطالعه مشخص شد که در غلظت‌های بالاتر از ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، زنده‌مانی سلولی به کمتر از ۷۰ درصد کاهش می‌یابد، که نشان‌دهنده سمیت این نانوصفحات در این غلظت‌ها است. خوشبختانه اثر آنتی‌باکتریال نانوصفحات گرافن اکساید در غلظت‌های پایین‌تر از ۰/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد که امکان تعیین دوز مناسب برای استفاده بالینی را فراهم می‌کند؛ به‌گونه‌ای که بتوان خواص ضد باکتریایی بالا را بدون ایجاد سمیت سلولی حفظ کرد.

نکته مهم دیگر بررسی نوع مرگ سلولی ناشی از نانوصفحات گرافن اکساید است. مطالعه‌ها نشان داده‌اند که این نانوصفحات می‌توانند از طریق ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و پراکسیداسیون چربی، غشاهای سلولی را تخریب کنند. این فرآیند سبب اختلال در عملکرد فسفولیپیدهای غشایی و در نتیجه القای مرگ سلولی از طریق مسیرهای آپوپتوز یا فروپتوز (ferroptosis) می‌شود (۳۹، ۴۰). علاوه بر این، نانوصفحات گرافن اکساید می‌توانند با تغییر در پتانسیل غشای میتوکندریایی و اختلال در فعالیت آنزیم‌های غشایی، منجر به مرگ سلولی شوند (۳۹). نتایج فلوسایتومتری با

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-09-09]

Annexin V-FITC و PI نیز تأیید کرد که در غلظت ۰/۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، بخشی از سلول‌ها دچار آپوپتوز شده‌اند، که نقش احتمالی استرس اکسیداتیو در مرگ سلولی را نشان می‌دهد.

در مقایسه با نانوذرات فلزی مانند نقره، گرافن اکساید به دلیل ساختار دو بعدی و گروه‌های عاملی اکسیژن دار، پایداری شیمیایی بالاتری دارد و می‌تواند فعالیت ضدباکتریایی خود را برای مدت طولانی حفظ کند (۱۱، ۴۱). این ویژگی برای کاربردهای طولانی‌مدت مانند زخم‌پوش‌ها که نیاز به محافظت مداوم دارند، اهمیت ویژه‌ای دارد. بااین‌حال، بهینه‌سازی ساختار نانوصفحات برای افزایش اثربخشی و کاهش سمیت آنها همچنان ضروری است. برخی مطالعه‌ها نشان داده‌اند که نانوصفحات گرافن اکساید می‌توانند در شرایط خاص، به‌ویژه در دوزهای بالا، سبب التهاب و تحریکات بافتی شوند. این نانوصفحات با ایجاد استرس اکسیداتیو و فعال‌سازی مسیرهای التهابی، می‌توانند منجر به آسیب بافتی، تجمع در اندام‌هایی مانند کبد و کلیه‌ها، و حتی فیبروز ریوی شوند. تحقیق های مدل‌های حیوانی نیز نشان داده‌اند که نانوصفحات گرافن اکساید ممکن است در سیستم تنفسی سبب تحریکات بافتی و پاسخ‌های التهابی شدید شوند (۱۴، ۴۲). بنابراین، بهینه‌سازی این نانوصفحات برای افزایش ایمنی زیستی در کنار حفظ کارایی ضدباکتریایی ضروری است. علاوه بر خواص ضدباکتریایی و زیستی، نانوصفحات گرافن اکساید می‌توانند ویژگی‌های مکانیکی کامپوزیت‌ها، ازجمله استحکام و انعطاف‌پذیری را بهبود بخشند (۲). این ویژگی‌ها نه‌تنها به افزایش دوام و انعطاف‌پذیری زخم‌پوش‌ها کمک می‌کنند، بلکه امکان استفاده مؤثر از آنها را در نواحی پرتحرک بدن، مانند مفاصل، که پانسمان زخم در آنها چالش‌برانگیز است، فراهم می‌سازد.

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که نانوصفحات گرافن اکساید نه‌تنها پتانسیل بالایی برای استفاده در زخم‌پوش‌های ضدباکتریایی دارند، بلکه می‌توانند با بهبود استحکام و انعطاف‌پذیری پانسمان‌ها، به کاربرد مؤثرتر آنها در نواحی دشوار مانند مفاصل کمک کنند. این ویژگی‌ها می‌توانند جایگزینی مؤثر برای آنتی‌بیوتیک‌ها در کنترل عفونت‌های باکتریایی ارائه دهند. بااین‌حال، پیش از استفاده بالینی، ارزیابی‌های بیشتری در زمینه ایمنی طولانی‌مدت و تعیین دوز بهینه ضروری است. این پژوهش گامی اولیه در مسیر بهره‌گیری از نانوصفحات در پزشکی و درمان زخم‌های عفونی محسوب می‌شود، اما چالش‌هایی مانند سمیت طولانی‌مدت همچنان پابرجاست و نیازمند بررسی‌های تکمیلی پیش‌بالینی و بالینی است.

نتیجه‌گیری و توصیه‌ها

به نظر می‌رسد که نانوصفحات گرافن اکساید دارای آثار ضدباکتریایی بر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی هستند و در دوزهای پایین، سمیت سلولی کنترل‌شده‌ای دارند. این یافته‌ها می‌توانند در طراحی نانومواد ضدباکتریایی ایمن‌تر و مؤثرتر کاربرد داشته باشند. با این حال، بررسی‌های بیشتر در مدل‌های حیوانی و شرایط بالینی برای ارزیابی دقیق‌تر آثار زیستی آنها ضروری است.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه، در پژوهشگاه فناوری‌های نوین علوم زیستی جهاد دانشگاهی- ابن‌سینا بررسی و با کد اخلاق IR.ACECR.Avicenna.REC.1396.21 ثبت شده است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه استخراج شده از پروژه مصوب با عنوان «تهیه و ارزیابی نانوذرات گرافن اکسید و بررسی اتصال آنها به بستر کایتوزانی (کد ۰۲۵-۹۵)» است.

تعارض منافع

نویسندگان، تعارض منافعی را گزارش نکرده‌اند.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-09-09]

References

1. Shanmugam DK، Madhavan Y، Manimaran A، Kaliaraj GS، Mohanraj KG، Kandhasamy N، et al. Efficacy of graphene-based nanocomposite gels as a promising wound healing biomaterial. Gels. 2022;9(1):22.

2. Yousefi M، Ghahremanzadeh R، Nejadmoghaddam M-R، Samadi FY، Najafzadeh S، Fatideh FM، et al. Nanofabrication of chitosan-based dressing to treat the infected wounds: in vitro and in vivo evaluations. Future Science OA. 2024;10(1):FSO921.

3. Badoni A، Prakash J. Noble metal nanoparticles and graphene oxide based hybrid nanostructures for antibacterial applications: recent advances، synergistic antibacterial activities، and mechanistic approaches. Micro and Nano Engineering. 2024:100239.

4. Sarkar B، Sonawane A. Biological Applications of Nanoparticles: Springer; 2023.

5. Baveloni FG، Meneguin AB، Sábio RM، de Camargo BAF، Trevisan DPV، Duarte JL، et al. Antimicrobial effect of silver nanoparticles as a potential healing treatment for wounds contaminated with Staphylococcus aureus in wistar rats. Journal of Drug Delivery Science and Technology. 2025;103:106445.

6. Morais M، Teixeira AL، Dias F، Machado V، Medeiros R، Prior JA. Cytotoxic effect of silver nanoparticles synthesized by green methods in cancer. Journal of Medicinal Chemistry. 2020;63(23):14308-35.

7. Kaushik M، Niranjan R، Thangam R، Madhan B، Pandiyarasan V، Ramachandran C، et al. Investigations on the antimicrobial activity and wound healing potential of ZnO nanoparticles. Applied Surface Science. 2019;479:1169-77.

8. Pandurangan M، Kim DH. In vitro toxicity of zinc oxide nanoparticles: a review. Journal of Nanoparticle Research. 2015;17:1-8.

9. Salvo J، Sandoval C. Role of copper nanoparticles in wound healing for chronic wounds: literature review. Burns & trauma. 2022;10:tkab047.

10. Maliszewska I، Czapka T. Electrospun polymer nanofibers with antimicrobial activity. Polymers. 2022;14(9):1661.

11. Priyadarsini S، Mohanty S، Mukherjee S، Basu S، Mishra M. Graphene and graphene oxide as nanomaterials for medicine and biology application. Journal of Nanostructure in Chemistry. 2018;8:123-37.

12. Nezakati T، Cousins BG، Seifalian AM. Toxicology of chemically modified graphene-based materials for medical application. Archives of toxicology. 2014;88:1987-2012.

13. Chung C، Kim Y-K، Shin D، Ryoo S-R، Hong BH، Min D-H. Biomedical applications of graphene and graphene oxide. Accounts of chemical research. 2013;46(10):2211-24.

14. Sepahi MM، Azizi M. Graphene Oxide Nanotoxicity: A Comprehensive Analysis. 2024.

15. Rhazouani A، Gamrani H، El Achaby M، Aziz K، Gebrati L، Uddin MS، et al. Synthesis and toxicity of graphene oxide nanoparticles: A literature review of in vitro and in vivo studies. BioMed Research International. 2021;2021(1):5518999.

16. Seabra AB، Paula AJ، de Lima R، Alves OL، Durán N. Nanotoxicity of graphene and graphene oxide. Chemical research in toxicology. 2014;27(2):159-68.

17. Mohammed H، Kumar A، Bekyarova E، Al-Hadeethi Y، Zhang X، Chen M، et al. Antimicrobial mechanisms and effectiveness of graphene and graphene-functionalized biomaterials. A scope review. Frontiers in bioengineering and biotechnology. 2020;8:465.

18. Lu B-Y، Zhu G-Y، Yu C-H، Chen G-Y، Zhang C-L، Zeng X، et al. Functionalized graphene oxide nanosheets with unique three-in-one properties for efficient and tunable antibacterial applications. Nano Research. 2021;14:185-90.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-09-09]

19. Majeed W، Bourdo S، Petibone DM، Saini V، Vang KB، Nima ZA، et al. The role of surface chemistry in the cytotoxicity profile of graphene. Journal of Applied Toxicology. 2017;37(4):462-70.

20. Jasim DA، Lozano N، Kostarelos K. Synthesis of few-layered، high-purity graphene oxide sheets from different graphite sources for biology. 2D Materials. 2016;3(1):014006.

21. 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. Particle and fibre toxicology. 2016;13:1-24.

22. Pulingam T، Thong KL، Ali ME، Appaturi JN، Dinshaw IJ، Ong ZY، et al. Graphene oxide exhibits differential mechanistic action towards Gram-positive and Gram-negative bacteria. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2019;181:6-15.

23. Ravikumar V، Mijakovic I، Pandit S. Antimicrobial activity of graphene oxide contributes to alteration of key stress-related and membrane bound proteins. International Journal of Nanomedicine. 2022;17:6707.

24. Liao K-H، Lin Y-S، Macosko CW، Haynes CL. Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts. ACS applied materials & interfaces. 2011;3(7):2607-15.

25. Hummers Jr WS، Offeman RE. Preparation of graphitic oxide. Journal of the american chemical society. 1958;80(6):1339.-

26. McFarland J. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. Journal of the American Medical Association. 1907;49(14):1176-8.

27. Nejadmoghaddam M-R، Zarnani A-H، Ghahremanzadeh R، Ghods R، Mahmoudian J، Yousefi M، et al. Placenta-specific1 (PLAC1) is a potential target for antibody-drug conjugate-based prostate cancer immunotherapy. Scientific reports. 2017;7(1):13373.

28. Farahani TZ، Nejadmoghaddam M-R، Sari S، Ghahremanzadeh R، Minai-Tehrani A. Generation of anti-SN38 antibody for loading efficacy and therapeutic monitoring of SN38-containing therapeutics .Heliyon. 2024;10(12).

29. Eastwood BJ، Farmen MW، Iversen PW، Craft TJ، Smallwood JK، Garbison KE، et al. The minimum significant ratio: a statistical parameter to characterize the reproducibility of potency estimates from concentration-response assays and estimation by replicate-experiment studies. SLAS Discovery. 2006;11(3):253-61.

30. Im H، Kim J. Thermal conductivity of a graphene oxide–carbon nanotube hybrid/epoxy composite. Carbon. 2012;50(15):5429-40.

31. Yaragalla S، Bhavitha KB، Athanassiou A. A review on graphene based materials and their antimicrobial properties. Coatings. 2021;11(10):1197.

32. Aliyev E، Filiz V، Khan MM، Lee YJ، Abetz C، Abetz V. Structural characterization of graphene oxide: Surface functional groups and fractionated oxidative debris. Nanomaterials. 2019;9(8):1180.

33. Yu W، Sisi L، Haiyan Y، Jie L. Progress in the functional modification of graphene/graphene oxide: A review. RSC advances. 2020;10(26):15328-45.

34. Achee TC، Sun W، Hope JT، Quitzau SG، Sweeney CB، Shah SA، et al. High-yield scalable graphene nanosheet production from compressed graphite using electrochemical exfoliation. Scientific reports. 2018;8(1):14525.

35. Kumar P، Huo P، Zhang R، Liu B. Antibacterial properties of graphene-based nanomaterials. Nanomaterials. 2019;9(5):737.

36. Eshed M، Lellouche J، Gedanken A، Banin E. A Zn-doped CuO nanocomposite shows enhanced antibiofilm and antibacterial activities against streptococcus mutans compared to nanosized CuO. Advanced Functional Materials. 2014;24(10):1382-90.

37. Jha S، Rani R، Singh S. Biogenic zinc oxide nanoparticles and their biomedical applications: a

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-09-09]

review. Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials. 2023;33(6):1437-52.

38. Standardization I. Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 2009:1-34.

39. Wang B، Wang Y، Zhang J، Hu C، Jiang J، Li Y، et al. ROS-induced lipid peroxidation modulates cell death outcome: mechanisms behind apoptosis، autophagy، and ferroptosis. Archives of toxicology. 2023;97(6):1439-51.

40. Zhang J، Cao H-Y، Wang J-Q، Wu G-D، Wang L. Graphene oxide and reduced graphene oxide exhibit cardiotoxicity through the regulation of lipid peroxidation، oxidative stress، and mitochondrial dysfunction. Frontiers in cell and developmental biology. 2021;9:616888.

41. Cobos M، De-La-Pinta I، Quindós G، Fernández MJ، Fernández MD. Graphene oxide–silver nanoparticle nanohybrids: Synthesis، characterization، and antimicrobial properties. Nanomaterials. 2020;10(2):376.

42. Fusco L، Garrido M، Martín C، Sosa S، Ponti C، Centeno A، et al. Skin irritation potential of graphene-based materials using a non-animal test. Nanoscale. 2020;12(2):610-22.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-09-09]