

The effect of surface modification of single-wall carbon nanotubes on cytotoxicity reduction in the liver cell model (HEPG2)

Hadidi N¹, Ramezani L², Shokrghozar MA¹, Amanzadeh A¹, Saffari M^{3*}

1-Department of Physiology and Pharmacology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, I. R. Iran.

2- Department of Medical Nanotechnology, Islamic Azad University, Tehran Branch, Tehran, I. R. Iran.

3- Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.

Received 24 December, 2014; Accepted 16 September, 2015

Abstract:

Background: Carbon nanotubes (CNTs) that their surface hydrophilicity has been modified are important vehicles in drug delivery and diagnostic application. This study aimed to evaluate the cytotoxicity of original and functional CNTs on human cells.

Materials and Methods: In an interventional study, lateral surfaces of single wall-carbon nanotubes were coated by polyethylene glycol, as an amphiphilic polymer, via charged functional groups (the amine or carboxylic group). Original and functional carbon nanotubes were exposed to human hepatoma (HEPG2) cells, as a cellular model of liver. Exposure times were 24, 48 and 72 hours and CNT suspension applied in concentrations of 100, 200, 400 and 600 μ g/ml. Morphologic changes of cells were analyzed using an inverted microscope. Viability percentage of HEPG2 cells was also evaluated by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay.

Results: The naked CNTs after 72 hours exposure showed toxicity on HEPG2 in concentrations more than 100 μ g/ml, while surface modification of CNTs with amine or carboxylic polyethylene glycol (PEG) led to a better biocompatibility of CNTs to 200 and 400 μ g/ml, respectively. In 400 μ g/ml concentrations of CNTs and more, PEG-CNTs via carboxilic functional groups showed severe morphological changes in the HEPG2 cells, while amine mediated PEG-CNTs, in the same experimental time were more biocompatible. The results of the MTT test showed that carboxylic PEG-CNTs in concentrations more than 200 μ g/ml, and amine PEG-CNTs in more than 400 μ g/ml decreased viability of HEPG2 cells significantly ($P<0.05$).

Conclusion: Accumulation of charged functional groups on the surface of CNTs can be an interesting pathway to render CNTs as biocompatible nanoparticles for application in drug delivery and diagnostic systems.

Keywords: Carbon nanotube, Polyethylene glycol, Cytotoxicity, Surface modification, HEPG2

* Corresponding Author.

Email: mostafa.saffary@gmail.com

Tel: 0098 913 362 0147

Fax: 0098 315 554 6030

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, October, 2015; Vol. 19, No 4, Pages 302-308

اثر اصلاح سطحی نانولوله‌های کربنی تک لایه بر کاهش سمیت سلولی در مدل سلولی کبد (HEPG2)

نغمه حیدری^۱، لیلی رمضانی^۲، محمدعلی شکرگزار^۱، امیر امان زاده^۱، مصطفی صفاری^{*}

خلاصه:

سابقه و هدف: نانولوله‌های کربنی (CNTs) که آب‌دوستی سطوح آنها اصلاح شده باشد، می‌توانند حامل مهمی جهت دارورسانی و کاربردهای تشخیصی باشند. این مطالعه به منظور بررسی سمیت CNTs خالص و اصلاح شده بر سلول‌های انسانی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در یک مطالعه تداخلی، سطوح خارجی نانولوله‌های کربنی تک‌دیواره به‌وسیله پلیمر دوکانه دوست پلی‌اتیلن گلیکول، با واسطه گروههای عاملی باردار (کربوکسیل و آمین) روکش گردید. سلول‌های HEPG2، به عنوان مدل سلولی کبد، با نانولوله‌های کربنی خالص و اصلاح شده مواجه گردیدند. مدت مواجهه ۷۲، ۴۸ و ۲۴ ساعت و غلظت‌های مواجهه $0\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ ، $100\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ ، $200\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ و $400\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ تعیین گردید. تغییرات مورفولوژیک حاصل با میکروسکوپ معکوس و درصد بقای سلول‌ها توسط آزمون MTT بررسی شد.

نتایج: نانولوله‌های کربنی خالص پس از ۷۲ ساعت در غلظت‌های بیشتر از $100\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ آثار سمی بر سلول‌های HEPG2 داشتند، در حالی که اصلاح سطح نانولوله‌های کربنی با پلی‌اتیلن گلیکول آمینه و کربوکسیله سبب بهبود زیست‌سازگاری نانولوله‌های کربنی به ترتیب تا غلظت‌های $400\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ و $200\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ گردید. غلظت‌های $400\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ و بالاتر از نانولوله‌های کربنی پکیله کربوکسیله، موجب تغییرات مورفولوژیکی شدید سلول‌ها شدند، در حالی که نانولوله‌های کربنی پکیله آمینی، در بازه زمانی مورد مطالعه، زیست‌سازگاری بهتری نشان دادند. در آزمون MTT دیده شد غلظت‌های بیش از $200\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ از نانولوله‌های کربنی پکیله کربوکسیله و بیش از $400\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ از نانولوله‌های کربنی پکیله آمینه سبب کاهش معنی‌دار درصد سلول‌های زنده HEPG2 گردیدند ($P<0.05$).

نتیجه‌گیری: تجمع گروههای آب‌دوست در سطح نانولوله‌های کربنی می‌تواند برای زیست‌سازگار نمودن این نانوساختارها، جهت استفاده در سیستم‌های دارورسانی و تشخیصی راه کار جذابی باشد.

واژگان کلیدی: نانولوله‌های کربنی، پلی‌اتیلن گلیکول، سمیت سلولی، اصلاح سطحی، سلول‌های HEPG2

دو ماده‌نامه علمی-پژوهشی فیض، دوره نوزدهم، شماره ۴، مهر و آبان ۱۳۹۴، صفحات ۳۰۸-۳۰۲

از نقطه نظر شیمیابی، نانولوله‌های کربنی خنثی بوده و ذاتاً نیز در بسیاری از حلال‌های آلی و غیرآلی و مایعات فیزیولوژیک کم- محلول هستند. دلیل این خصوصیت شیمیابی، وجود یک سطح نرم بدون پیوند آزاد، هیدرووفوب بودن دیواره‌های جانبی، جفت شدن نانولوله‌ها به یکدیگر و تشکیل توده‌ای از نانولوله‌ها است. برای اینکه این ساختارها زیست‌سازگار باشند و بتوانند در دارورسانی مورد استفاده قرار گیرند، محلول بودن آن‌ها در آب یک شرط اساسی است. مطالعات نشان داده است که حل نمودن نانولوله‌های کربنی در حلال‌های آبی، کماکان یک مشکل اساسی به‌حساب می‌آید. تاکنون رویکردهای گوناگونی برای افزایش محلولیت نانولوله‌های کربنی و پراکنده نمودن آن در حلال‌های آبی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. از این میان، می‌توان به رویکرد عامل‌دار کردن دیواره‌های جانبی نانولوله به صورت کووالان و غیرکووالان اشاره کرد که توجه بسیاری از محققین را به خود جلب نموده است [۲]. اینمی و بی‌خطر بودن، اولین شرط لازم برای انتخاب موادی است که در دارورسانی و پزشکی به کار می‌روند. باتوجه به استفاده روزافزون از نانومواد و افزایش در معرض قرار گرفتن انسان با آنها، تصور بسیاری از دانشمندان این است که نانولوله‌ها،

مقدمه

نانولوله‌های کربنی (CNTs)، خصوصیات فیزیکو-شیمیابی منحصر به فردی مانند خواص حرارتی، مغناطیسی، نوری و یا هدایت الکتریکی از خود نشان می‌دهند و جایگاه رویه‌رشدی در گستره وسیعی از علوم، از جمله نانوپیزشکی، دارورسانی (به مخصوص ترکیبات ضد سرطان)، زیست مولکول‌ها (شامل پروتئین‌ها، پیتیدها، اسیدهای نوکلئیک، پلاسمید و حتی siRNA) و طراحی بیوسنسورها یافته‌اند [۱]. از سال ۲۰۰۴، نانولوله‌های کربنی به طور گسترده به عنوان حامل‌های دارویی برای انتقال درون سلولی داروهای شیمی درمانی، پروتئین‌ها و ژن‌ها مورد بررسی قرار گرفته‌اند.

^۱ گروه فیزیولوژی فارماکولوژی، انسیستو پاستور تهران

^۲ گروه نانوتکنولوژی پزشکی، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران

^۳ استادیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

***لشان نویسنده مسئول:** کاشان، کیلومتر ۵ بلوار قطب راوندی، دانشکده پزشکی، گروه فارماکولوژی

تلفن: ۰۳۱ ۵۵۵۴۶۰۳۰ - ۰۹۱۳ ۳۶۲۰ ۱۴۷

پست الکترونیک: mostafa.saffary@gmail.com

تاریخ پذیرش نهایی: ۹۴/۶/۲۵ تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۳

مطالعات نشان داده‌اند که با پیوند کووالانسی PEG به سطح نانوللهای کربنی، وزن مولکولی افزایش می‌یابد. با بیشتر شدن شاخه‌های PEG، رفتار فارماکوکینتیک نانوللهای کربنی مطلوب‌تر شده و در کاهش سمیت آن اثر بیشتری دارد [۱۱]. از دیگر مزایای استفاده از مشتقات پلی اتیلن گلیکول برای عامل‌دار کردن نانوللهای کربنی می‌توان به حفظ پایداری نانوللهای کربنی در حضور مقادیر بالای نمکها، زیست‌سازگاری بهتر، حفظ قابلیت عبور نانوللهای تغییر یافته از غشاء سلولی، قابلیت اتصال ثانویه به داروها و ترکیبات دیگر با توجه به گروه عاملی انتهایی زنجیره پلی اتیلن گلیکول، کاهش آب‌گریزی سطحی و کاهش جذب غیر-اختصاصی پروتئین‌ها به حامل‌های دارویی اشاره کرد. همچنین، نانوتیوهای پگیله شده مدت بیشتری در گردش خون باقی می‌مانند و میزان برداشت آنها توسط سیستم ریکولواندوتلیال نیز کاهش می‌یابد [۱۲، ۱۳]. در این تحقیق نیز سعی شد تا با تغییر در خصوصیات سطحی نانوللهای کربنی تک لایه از طریق اتصال مشتقات فسفولیپید-پلی اتیلن گلیکول بر روی سطح نانولله، محلولیت و زیست‌سازگاری آنها افزایش داده شود و تاثیر این اصلاح سطحی بر میزان سمیت سلولی نانوللهای کربنی بررسی گردد.

مواد و روش‌ها

نانوللهای کربنی تک لایه با اندازه ذره‌ای متوسط، با ابعاد ۱۰ نانومتر و غلظت اولیه 0.1 mg/ml از شرکت مرک آلمان خریداری شد. پس از بررسی اولیه و اطمینان از قابل استفاده بودن در محیط کشت سلول (از نظر ایجاد آلودگی) مقداری از آن جهت آزمون به صورت خالص و عامل‌دار شده مورد استفاده قرار گرفت. دو پیش‌ساز PL-PEG2000-NH₂ و PL-PEG2000-COOH از شرکت سیگما تهیه گردید. حلال‌ها و مواد با گرید آنالیز و از آزمایشگاه مرجع انسیستو پاستور تهیه گردید.

عامل‌دار کردن نانوللهای کربنی:

برای انجام فرایند عامل‌دار کردن ماده در یک لوله-PL-PEG2000-NH₂ و در لوله دیگر PL-PEG2000-COOH به صورت کامل در ۲ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شده و یک میلی‌گرم از نانوللهای کربنی تک لایه به هر کدام از دو لوله آزمایش منتقل گردید. محلوت حاصل به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق، در حمام سونیکاتیور قرار گرفت. به تدریج حجم به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد و در انتها نمونه کامل به مدت ۲ دقیقه با اولتراسوند با قدرت ۵ درصد هموژنایز شد و برای برای دو بار دیگر فرایند آخر برای اطمینان از یکنواختی و پراکندگی کامل تکرار شد.

همانند نانومواد دیگر قابلیت ایجاد سمیت را دارند [۳]. میزان این سمیت به ویژگی‌های فیزیکی متعددی همانند طول، قطر، سطح، تمایل به متراکم شدن، دیسپرسیتی، وجود و ماهیت کاتالیزور باقی مانده و همچنین گروههای عاملی شیمیایی این نانومواد بستگی دارد. به همین علل و خصوصاً با توجه به روند رو به رشد کارایی نانوللهای کربنی در داروسانی، بررسی سمیت این نانوللهای در محیط‌های بیولوژیک و تلاش برای رفع این سمیت ضروری می‌نماید [۴]. به طور کلی، مشاهده شده است در محیط‌های بیولوژیک تعامل نانوللهای کربنی با پروتئین‌ها و تداخل با ساختار آنها صورت می‌گیرد. احتمال آن وجود دارد که سمیت نانوللهای کربنی باعث مرگ سلول‌ها شود. یکی از راه‌هایی که برای از کاهش سمیت نانوللهای کربنی پیشنهاد شده است استفاده از پوشش بر روی سطح نانوللهای کربنی باشد. به قرار دادن گروههای عاملی مناسب تکنیک عامل‌دار کردن یا فانکشنالیزه کردن گویند [۵]. در مطالعات مختلف نشان داده شده است که قرار گرفتن در معرض نانوللهای کربنی خالص به طور قابل توجهی باعث کاهش میزان تکثیر سلول‌ها شده و با تاثیر بر چرخه سلولی، منجر به آپوپتوز و نکروز می‌شود [۷، ۸]. بر اثر عامل‌دار کردن، نانوللهای کربنی که به طور معمول به صورت خوش تجمع می‌یابند، از هم جدا شده و با مولکول‌های خاص پوشش داده می‌شوند. نانوللهای کربنی ترکیبات پلی آروماتیک با مساحت سطحی بیش از $2600\text{ m}^2/\text{g}$ هستند [۸]. سطوح جانبی نانوللهای بسیار آب‌گریز می‌باشد. اتصال گروههای عاملی با کاهش هیدروفیبیسیته سطحی و محلول ساختن نانوللهای کربنی سبب کاهش سمیت و آسیب رسانی به سلول‌های موجودات زنده می‌شود. زیست‌سازگار کردن نانوللهای کربنی امکان بهره‌گیری از خصوصیات منحصر به‌فرد آنها در محیط بیولوژیک را فراهم می‌سازد. اتصال گروههای عاملی می‌تواند در سطوح خارجی، از طریق نقاطی که دارای نقاطی ساختمانی هستند و یا در دو انتهای باز نانوللهای و حتی با وارد ساختن ساختارهای مولکولی به فضای داخلی نانولله صورت پذیرد [۹]. در حالی که راه‌های بسیاری برای عامل‌دار کردن نانوللهای وجود دارد، یکی از روش‌های رایج پوشش نانوللهای کربنی با پلی اتیلن گلیکول (PEG) است که به طور گستره‌ای استفاده می‌شود. پوشش پلی اتیلن گلیکول پلیمری زیست‌سازگار است و با بهبود رفتار فارماکوکینتیک، طولانی شدن نیمه عمر حضور ذره در گردش خون و کاهش حساسیت سیستم ریکولو-اندونتیال (RES) می‌تواند سمیت نانوللهای کربنی در داخل بدن را کاهش دهد [۱۰]. مواد می‌توانند از طریق کووالانسی یا با واسطه پیوند غیر کووالانسی نانوللهای کربنی را پوشش دهند.

حسب زمان و غلظت و نوع نانولوله استفاده شده، مقایسه آماری بین گروه‌ها انجام شد و همچنین IC50 (غلظتی که می‌تواند موجب ۵۰ درصد مهار رشد سلول‌ها شود) برای نانولوله‌های کربنی اولیه و اصلاح شده محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها:

اطلاعات به دست آمده توسط نرم‌افزار آماری Prism به کمک آزمون واریانس یک طرفه (ANOVA) تجزیه و تحلیل شدند. مقایسه هر گروه از چاهک‌ها با گروه چاهک‌های شاهد با تست Danet و در صورت وجود اختلاف معنی دار میان گروه‌ها و بهمنظر پیش‌گیری از بروز خطای نوع اول در حین مقایسه و تفکیک گروه‌هایی که با یکدیگر اختلاف معنی داری دار داشتند، از آزمون تصحیحی Tukey استفاده شد.

نتایج

نتایج آزمون MTT:

نتایج نشان داد مواجهه سلول‌های کبدی با نانولوله‌های عامل دار شده، با غلظت‌های $600 \mu\text{g}/\text{ml}$ و $400 \mu\text{g}/\text{ml}$ در مقایسه با گروه شاهد موجب کاهش معنی داری در میزان درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی رده HEPG2 شده است ($P < 0.05$). بیشترین درصد زنده ماندن در غلظت $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ و $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ، بعد از ۲۴ ساعت نسبت به گروه شاهد بود و بیشترین سمیت سلولی بعد از ۷۲ ساعت مواجهه با غلظت‌های بالاتر از $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ میکروگرم بر میلی‌لیتر دیده شد که این نتایج نشان دهنده ارتباط مستقیم زمان و غلظت بر میزان سمیت سلولی نانولوله‌ها می‌باشد (جدول شماره ۱). هرچه زمان مواجهه و غلظت نانولوله‌ها افزایش یافت درصد سلول‌های باقیمانده نیز کمتر گردید. بیست و چهار ساعت پس از تیمار سلول‌های HEPG2 با PL-PEG-SWCNT-COOH با غلظت $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ۱۰۰٪ تغییرات مورفوژیک کمی در مقایسه با نمونه‌های گروه شاهد مشاهده شد و سلول‌های HEPG2 از نظر شکل و اندازه تقریباً مشابه با سلول‌های گروه شاهد بودند. اما در غلظت‌های بالاتر از $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ تغییرات به مراتب بیشتر و قابل مشاهده بود و این تغییرات در مواجهه با نانولوله‌های خالص نسبت به مواجهه سلول‌ها با نانولوله‌های عامل دار به صورت معنی داری مشهودتر بود؛ به طوری که غلظت $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ نیز اثر سمیت خود را نشان داد. نتایج تست MTT نشان داد که ماده مورد نظر طی ۷۲ و ۴۸ ساعت از غلظت‌های بالاتر از $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ به بالا اثر سمی روی سلول‌ها داشت، اما غلظت‌های کمتر توانستند آسیب جدی در فعالیت حیاتی سلول‌ها ایجاد نمایند و ممکن است نشان دهنده

مطالعات سلوالی:

سلول‌های مورد استفاده در این مطالعه رده سلوالی HEPG2 و مورفوژی و خصوصیات آنها در محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا یک کراپو ویال سلول HEPG2 از بانک سلوالی انتستیتو پاستور ایران تحويل گرفته شد. محیط کشت مناسب جهت رده سلوالی مورد نظر محلول ۱۶۴۰ pH با $\text{pH} 7/2$ RPMI 1640 با حدود ۱۰ درصد سرمه جنین گاوی (FBS) و مقادیر ۱۰۰ mg/mL Streptomycin درصد از آنتی‌بیوتیک (Penicillin) (100 U/mL) کامل گردید و پیش از افزودن سرمه محیط با فیلتراسیون از خلال غشای $0.25 \mu\text{m}$ میکرونی استریل شد.

بررسی سمیت سلوالی با روش MTT:

سنجهش درصد بقای سلول‌ها پس از مواجهه با نانولوله‌های کربنی به روش رنگ‌سنجه MTT صورت گرفت. رنگ‌سنجه MTT یک روش رنگ‌سنجه بر اساس احیا شدن و شکسته شدن کریستال‌های زرد رنک ترازاولیوم با فرمول شیمیایی (dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) می‌باشد. بدین‌منظور تعداد ۱۰۰۰۰ سلول HEPG2 پس از شمارش دقیق در هر چاهک سه پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوبه شدن سلول‌ها در انکوباتور، یکی از پلیت‌ها ۲۴ ساعت، دومی ۴۸ ساعت و سومی ۷۲ ساعت، با نانولوله‌ای عامل دار شده یا عامل دار نشده به صورت جداگانه مواجه شدند. نانولوله‌ها با غلظت‌های $0, 100, 200, 400, 600 \mu\text{g}/\text{ml}$ به هر چاهک اضافه شدند (۶ چاهک برای هر غلظت تکرار گردید) و پلیت‌ها به ترتیب بعد از مدت زمان موردنظر، با واکنشگر MTT با غلظت $5 \text{ mg}/\text{ml}$ به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. بعد از طی این مدت زمان، کریستال‌های فورمازون ارغوانی رنگ ایجاد شدند که با افزودن DMSO حل شده و بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون، با استفاده از الیزا ریدر (Spectra rainbow, Australia) در طول موج جذبی 570 nm و طول موج رفرنس 630 nm نانومتر شدت رنگ حاصله قرائت شد. درصد سلول‌های زنده نسبت به شاهد به روش MTT تعیین و در مقابل غلظت ترسیم و تفسیر شد. جذب نوری به دست آمده از ۶ چاهک حاوی سلول‌های تیمار شده با هر غلظت مشخص نانولوله‌های عامل دار شده، با جذب نوری خانه‌های حاوی گروه شاهد مقایسه شد و درصد سلول‌های زنده مانده با فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\frac{\text{میانگین جذب نوری چاهک‌های تیمار شده با نانولوله}}{\text{میانگین جذب نوری چاهک حاوی شاهد}} \times 100 = \frac{\text{درصد سلول‌های زنده در واحد یمل}}{\text{میانگین جذب نوری چاهک حاوی شاهد}}$$

(خالص و عامل دار) نیاز است تا آسیب های جدی دیده شود. این زمان در نانولوله خالص به صورت معنی داری کمتر بود ($P < 0.05$) (جدول شماره ۲).

تأثیر تنظیمی بر رشد این سلول ها باشد که به زمان بیشتری برای مشاهده آن نیاز است. نتایج تست IC50 نیز نشان داد که آسیب ناشی از نانولوله ها در مواجهه با زمان های طولانی تر خود را بهتر نشان می دهد و در زمان های کوتاه تر به دوز بیشتری از نانولوله

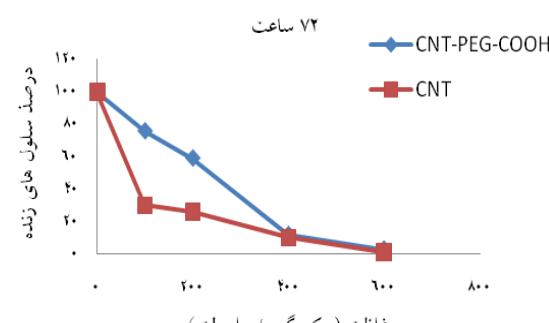
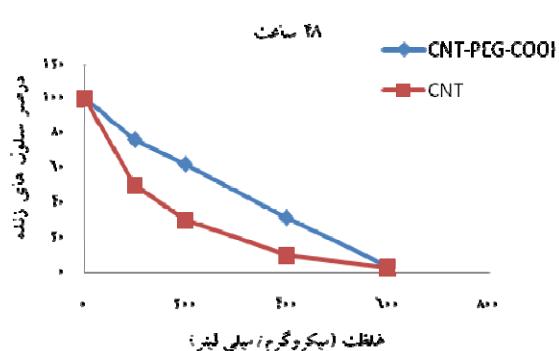
جدول شماره ۱- درصد زنده ماندن سلول های HEPG2 در ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت پس از مواجهه با PL-PEG5000-SWCNT-COOH

غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر

غلوظت نانولوله (μg/ml)	درصد بقای ۲۴ ساعت	درصد بقای ۴۸ ساعت	درصد بقای ۷۲ ساعت	غلوظت نانولوله
۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	شاهد
۷۵/۸	۷۶	۷۵/۶	۷۵/۸	۱۰۰
۵۹	۶۱/۹	۶۱/۴	۶۱/۹	۲۰۰
۱۱/۷	۳۱/۳	۳۵/۶	۳۱/۷	۴۰۰
۲/۷	۳/۴	۱۵	۲/۷	۶۰۰

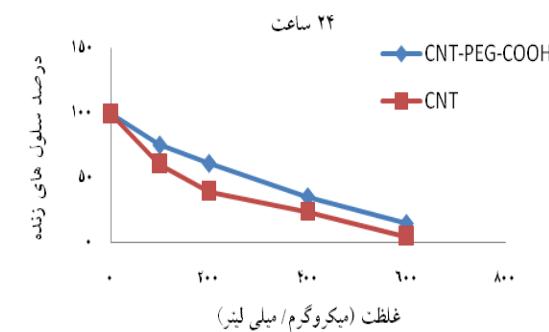
جدول شماره ۲- مقادیر IC50 به دست آمده از مجاورت سلول های HEPG2 با نانولوله های کربنی در زمان های مختلف

	IC ₅₀ (μg/ml) after		
	۲۴ hours	۴۸ hours	۷۲ hours
Pure SWCNT	۱۵۰	۱۰۰	<۵۰
PL-PLG-SWCNT-COOH	۳۰۰	۲۸۰	۲۵۰
نانولوله کربنی تک دیواره خالص:			
نانولوله کربنی تک دیواره پگیله:			



نمودار شماره ۱- نمودار درصد زنده ماندن سلول های HEPG2 بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مواجهه با غلظت های متفاوت SWCNT و PL-PEG-SWCNT-COOH

در حالی که کمتر از ۵۰ میکرو گرم در میلی لیتر نانولوله های کربنی تک دیواره خالص پس از ۷۲ ساعت توانست بیش از نیمی از سلول های مدل کبدی را از بین ببرد. پگیله کردن این نانوساختار بیش از ۵۰۰ درصد در این زمینه موثر بوده و میزان IC50 را تا ۲۵۰ میکرو گرم در میلی لیتر افزایش داد. با کاهش مدت مواجهه این اثر زیست سازگاری نیز کاهش یافت؛ به طوری که در مواجهه ۲۴ ساعته IC50 نانولوله کربنی غیر پگیله یک سوم نانولوله عامل دار شده با پلی اتیلن گلیکول است ($P < 0.05$). بر اساس نتایج با مقایسه درصد زنده ماندن سلول ها در مقایسه با گروه شاهد اثر زمان نسبت به اثر غلظت از نقش و اهمیت کمتری برخوردار است. نمودار هر سه زمان برای نانولوله خالص و عامل دار رسم شد (نمودار شماره ۱).



میزان mg/kg ۳، به صورت داخل وریدی به موش تزریق شد. آزمایشات خون و سرم و همچنین بررسی‌های آسیب شناسی دقیق و بافت شناسی، ۴ ماه پس از تزریق انجام شد که هیچ تغییری در هر یک از پارامترها مشاهده نشد. این مشاهدات نشان می‌دهد که با عامل‌دار نمودن نانولوله‌های کربنی تک دیواره با PEG، این ذرات را می‌توان در داخل بدن استفاده کرد و کاربرد بیولوژیکی آنها اینم است [۱۹]. اخیراً پگیلاسیون برای تعديل و تغییر ترکیبات درمانی مانند پروتئین‌ها، پپتیدها، الیگونوکلئوتیدها، فراغمنت‌های آنتی‌بادی و ملکول‌های آلی کوچک و حامل‌های دارویی و سیستم‌های دارورسانی (مانند دندریتمرا و نانوذرات پلیمری) استفاده می‌شود [۹]. تحقیقات نشان داده است که پگیلاسیون نه تنها می‌تواند سبب بهبود فراهمی زیستی بعضی از بیو‌ملکول‌ها گردد؛ بلکه با بهبود محلولیت، مانع از جذب غیر اختصاصی، مهار برداشت سیستم‌های دارورسانی توسط سیستم رتیکولوانتوتیال آسب افزایش ماندگاری این سیستم‌ها در جریان سیستمیک نیز می‌شود [۲۰].

نتیجه‌گیری

به طور کلی به نظر می‌رسد بتوان با عامل‌دار نمودن نانولوله‌های کربنی با عوامل هیدروفیلی همچون پلی اتیلن گلیکول از سمیت ذاتی آنها کاست و غلظت‌های بالاتری از داروها را به وسیله آنها به داخل بدن هدایت نمود و در عین حال سمیت کبدی کمتری را مشاهده نمود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از تمامی پرستن محترمی که در انجام این پژوهش ما را باری نموده‌اند، به ویژه دوستان و همکاران آزمایشگاه سلوی پاستور و آزمایشگاه صنعتی دانشگاه آزاد اسلامی تهران تشکر و قدردانی می‌شود.

بحث

به طور کلی نتایج نشان می‌دهد که فرایند عامل‌دار نمودن نانولوله‌های کربنی با فسفولیپید پگیله (PL-PEG) در غلظت‌های IC50 بالا نقش مهمی در کاهش سمیت نانولوله کربنی و افزایش ۵۰ دارد (جدول شماره ۲). علت این امر را می‌توان پوشانندگی مساحت سطح نانولوله با PL-PEG و در نتیجه زیست‌سازگار شدن آن با سلول‌های کبدی دانست. استفاده از PL-PEG در محلول سازی نانولوله‌های کربنی نخستین بار توسط Dia و Hemkaran وی پیشنهاد گردید [۱۲، ۱۳]. برای عامل‌دار نمودن نانولوله‌های کربنی می‌توان از مشتقات PL-PEG با طول زنجیره‌های مختلف و ساختار شاخه‌ای یا خطی استفاده نمود. حضور گروه‌های عاملی مانند آمین در انتهای زنجیره پلی اتیلن گلیکول [۱۴] و نیز امکان بارگذاری مولکول‌های بیولوژیک و در نتیجه کاربرد نانولوله‌ها را در تصویربرداری برای فرآیندهای تشخیصی و همچنین دارورسانی فراهم می‌سازد [۱۵]. حدیدی و همکارانش در مطالعات خود با استفاده از نوع آمینی از PL-PEG، به نانولوله‌های کربنی پگیله با حداقل غلظت دمایی mg/mL ۹۶-۰/۸۵ در هر میلی‌لیتر دست یافتد [۱۶، ۱۷]. نشان داده شده است که با استفاده از PEG2000 نیمه عمر نانولوله‌های کربنی در گردش خون به ۱/۲ ساعت و با استفاده از PEG5000 می‌توان آن را به ۵ ساعت افزایش داد و در مطالعه‌ای دیگر، نتایج حاکی از آن است که با استفاده از PEG شاخه‌دار می‌توان زمان گردش در خون را تا ۱۵ ساعت بهبود بخشید [۱۸]. از نظر دفع و پاکسازی بدن از نانولوله‌های کربنی نتایج نشان داده است که نانولوله‌های کربنی از بدن زمان‌بر و کند است، در حالی که نانولوله‌های کربنی پگیله از طریق ادرار و مدفوع به خوبی دفع می‌گردد. از نظر سمیت، نیز مطالعات مختلف سمیت نانوذرات متصل به PEG را ناچیز گزارش کرده‌اند و سمیت نانولوله‌ها تنها در دوزهای بالا گزارش شده است [۱۸]. در یک مطالعه، ترکیب PEG-SWCNT به

References:

- [1] Pastorin G. Crucial functionalizations of carbon nanotubes for improved drug delivery: a valuable option? *Pharm Res* 2009; 26(4): 746-69.
- [2] Foldvari M. Formulating nanomedicines: Focus on carbon nanotubes as novel nanoexcipients. *Key Engineering Materials* 2010; 441: 53-74.
- [3] Kolosnjaj-Tabi J, Hartman KB, Boudjemaa S, Ananta JS, Morgant G, Szwarc H, et al. In vivo behavior of large doses of ultrashort and full-length single-walled carbon nanotubes after oral and intra peritoneal administration to Swiss mice. *ACS Nano* 2010; 4(3): 1481-92.
- [4] Zhang Y, Wang B, Meng X, Sun G, Gao C. Influences of acid-treated multiwalled carbon nanotubes on fibroblasts: proliferation, adhesion, migration, and wound healing. *Ann Biomed Eng* 2010; 39(1): 1-13.
- [5] Zhao X, Liu R. Recent progress and perspectives on the toxicity of carbon nanotubes at organism, organ, cell, and biomacromolecule levels. *Environ Int* 2012; 40: 244-55.
- [6] Foldvari M, Bagomluri M. Carbon nanotubes as functionalexcipients for nanomedicines: II. Drug

- delivery and biocompatibility issues. *Nanomedicine* 2008; 4(3): 183-200.
- [7] Tang S, Tang Y, Zhong L, Murat K, Asan G, Yu J, et al. Short and long-term toxicities of multi-walled carbon nanotubes in vivo and in vitro. *J Appl Toxicol* 2012; 32(11): 900-12.
- [8] Pastorin G. Crucial functionalizations of carbon nanotubes for improved drug delivery: a valuable option? *Pharm Res* 2009; 26(4): 746-69.
- [9] Foldvari M, Bagonluri M. Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: I. pharmaceutical properties, Nanomedicine: Nanotechnology. *Biol Med* 2008; 4(3): 183-200.
- [10] Liu Z, Cai WB, He LN, Nakayama N, Chen K, Sun XM, et al. In vivo biodistribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice. *Nat Nanotech* 2007; 2(1): 47-52.
- [11] Huang X, Teng X, Chen D, Tang F, He J. The effect of the shape of mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake and cell function. *Biomaterials* 2010; 31(3): 438-48.
- [12] Liu Z, Tabakman S, Welsher K, Dai H. Carbon nanotubes in biology and medicine: in vitro and in vivo detection, imaging and drug delivery. *Nano Res* 2009; 2(2): 85-120.
- [13] Zeng L, Alemany LB, Edwards CL, Barron AR. Demonstration of covalent sidewall functionalization of single wall carbon nanotubes by NMR spectroscopy: Side chain length dependence on the observation of the sidewall sp₃ carbons. *Nano Res* 2008; 1(1): 72-88.
- [14] Liu Z, Tabakman S, Welsher K, Dai H. Carbon nanotubes in biology and medicine: in vitro and in vivo detection, imaging & drug delivery. *Nano Res* 2009; 2(2): 85-120.
- [15] Islam MF, Rojas E, Bergey DM, Johnson AT, Yodh AG. High weight fraction surfactant solubilization of single-wall carbon nanotubes in water. *Nano Letters* 2003; 3(2): 269-73.
- [16] Hadidi N, Kobarfard F, Nafissi-Varcheh N, Aboofazeli R. Optimization of single-walled carbon nanotube solubility by noncovalent PEGylation using experimental design methods. *Int J Nanomedicine* 2011; 6: 737-46.
- [17] Hadidi N, Hosseini Shirazi SF, Kobarfard F, Nafissi-Varcheh N, Aboofazeli R. Evaluation of the Effect of PEGylated Single-Walled Carbon Nanotubes on Viability and Proliferation of Jurkat Cells. *Iran J Pharm Res* 2011; 11(1): 27-37.
- [18] Yang ST, Luo J, Zhou Q, Wang H. Pharmacokinetics, metabolism and toxicity of carbon nanotubes for biomedical purposes. *Theranostics* 2012; 2(3): 271-82.
- [19] Huang X, Teng X, Chen D, Tang F, He J. The effect of the shape of mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake and cell function. *Biomaterials* 2010; 31(3): 438-48.
- [20] Son SJ, Bai X, Lee SB. Inorganic hollow nanoparticles and nanotubes in nanomedicine part 1, drug/gen delivery applications. *Drug Discov Today* 2007; 12(15-16): 650-6.