Original Article

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

Hadidi N[1], Ramezani L[2], Shokrghozar MA[1], Amanzadeh A[1], 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 600µg/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 µg/ml, while surface modification of CNTs with amine or carboxylic polyethylene glycol (PEG) led to a better biocompatibility of CNTs to 200 and 400 µg/ml, respectively. In 400µg/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 µg/ml, and amine PEG-CNTs in more than 400 µg/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

Please cite this article as: Hadidi N, Ramezani L, Shokrghozar MA, Amanzadeh A, Saffari M. The effect of surface modification of single-wall carbon nanotubes on cytotoxicity reduction in the liver cell model (HEPG2). ***Feyz*** 2015; 19(4): 302-8.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-06-10]

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

نغمه حدیدی [۱]، لیلی رمضانی [۲]، محمدعلی شکرگزار [۱]، امیر امان زاده [۱]، مصطفی صفاری [۳*]

خلاصه:

سابقه و هدف: نانولوله‌های کربنی (CNTs) که آب‌دوستی سطوح آنها اصلاح شده باشد، می‌توانند حامل مهمی جهت دارورسانی و کار-بردهای تشخیصی باشند. این مطالعه به‌منظور 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 دوگانه دوست پلی اتیلن گلیکول، با واسطه گروه‌های عاملی باردار (کربوکسیل و آمین) روکش گردید. سلول‌های HEPG2، به‌عنوان مدل سلولی کبد، با نانولوله‌های کربنی خالص و اصلاح شده مواجه گردیدند. مدت مواجهه ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و غلظت‌های مواجهه ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ µg/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 ۱۰۰µg/ml آثار سمی بر سلول‌های HEPG2 داشتند، درحالی‌که اصلاح سطح نانولوله‌های کربنی با پلی اتیلن گلیکول آمینه و کربوکسیله سبب بهبود زیست‌سازگاری نانولوله‌های کربنی به-ترتیب تا غلظت‌های ۴۰۰ µg/ml و ۲۰۰ گردید. غلظت‌های ۴۰۰ µg/ml و بالاتر از نانولوله‌های کربنی پگیله کربوکسیله، موجب تغییرات مورفولوژیکی شدید سلول‌ها شدند، درحالی‌که نانولوله‌های کربنی پگیله آمینی، در بازه زمانی مورد مطالعه، زیست‌سازگاری بهتری نشان دادند. در آزمون MTT دیده شد غلظت‌های بیش از ۲۰۰ µg/ml از نانولوله‌های کربنی پگیله کربوکسیله و بیش از ۴۰۰ µg/ml از نانولوله‌های کربنی پگیله 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 راه‌کار جذابی باشد.

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

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

مقدمه

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

[۱] گروه فیزیولوژی فارماکولوژی، انیستیتو پاستور تهران

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

[۳] استادیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

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

تلفن: ۰۹۱۳۳۶۲۰۱۴۷ **دورنویس:** ۰۳۱ ۵۵۵۴۶۰۳۰

پست الکترونیک: mostafa.saffary@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۳ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۴/۶/۲۵

از نقطه نظر شیمیایی، نانولوله‌های کربنی خنثی بوده و ذاتا نیز در بسیاری از حلال‌های آلی و غیرآلی و مایعات فیزیولوژیک کم-محلول هستند. دلیل این خصوصیت شیمیایی، وجود یک سطح نرم بدون پیوند آزاد، هیدروفوب 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 نانو-لوله‌های کربنی و پراکنده نمودن آن در حلال‌های آبی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. از این میان، می‌توان به رویکرد عامل‌دار کردن دیواره‌های جانبی نانولوله به‌صورت کووالان و غیرکووالان اشاره کرد که توجه بسیاری از محققین را به‌خود جلب نموده است [۲]. ایمنی و بی‌خطر بودن، اولین شرط لازم برای انتخاب موادی است که در دارورسانی و پزشکی به‌کار می‌روند. باتوجه به استفاده روزافزون از نانومواد و افزایش در معرض قرار گرفتن انسان با آنها، تصور بسیاری از دانشمندان این است که نانولوله‌ها،

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-06-10]

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 خصوصا با توجه به روند روبه‌رشد کارایی نانولوله‌های کربنی در دارورسانی، بررسی سمیت این نانولوله‌ها در محیط‌های بیولوژیک و تلاش برای رفع این سمیت ضروری می‌نماید [۴]. به‌طور کلی، مشاهده شده است در محیط‌های بیولوژیک تعامل نانولوله‌های کربنی با پروتئین‌ها و تداخل با ساختار آنها صورت می‌گیرد. احتمال آن وجود دارد که سمیت نانولوله‌های کربنی باعث مرگ سلول‌ها شود. یکی از راه‌هایی که برای از کاهش سمیت نانولوله‌های کربنی پیشنهاد شده است استفاده از پوشش بر روی سطح نانولوله‌ها می‌باشد. 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 نانولوله‌های کربنی خالص به‌طور قابل توجهی باعث کاهش میزان تکثیر سلول‌ها شده و با تاثیر بر چرخه سلولی، منجر به آپوپتوز و نکروز می‌شود [۷،۶]. بر اثر عامل‌دار کردن، نانولوله‌های کربنی که به‌طور معمول به‌صورت خوشه تجمع می‌یابند، از هم جدا شده و با مولکول‌های خاص پوشش داده می‌شوند. نانولوله‌های کربنی ترکیبات پلی آروماتیک با مساحت سطحی بیش از $۲۶۰۰\ m^2/g$ هستند [۸]. سطوح جانبی نانولوله‌ها بسیار آب‌گریز می‌باشد. اتصال گروه‌های عاملی با کاهش هیدروفوبیسیته سطحی و محلول ساختن نانولوله‌های کربنی سبب کاهش سمیت و آسیب رسانی به سلول‌های موجودات زنده می‌شود. زیست‌سازگار کردن نانولوله‌های 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 نقایص ساختمانی هستند و یا در دو انتهای باز نانولوله‌ها و حتی با وارد ساختن ساختارهای مولکولی به فضای داخلی نانولوله صورت پذیرد [۹]. درحالی‌که راه‌های بسیاری برای عامل‌دار کردن نانولوله‌ها وجود دارد، یکی از روش‌های رایج پوشش نانولوله‌های کربنی با پلی اتیلن گلیکول (PEG) است که به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌شود. پوشش پلی اتیلن گلیکول پلیمری زیست‌سازگار است و با بهبود رفتار فارماکوکینتیک، طولانی شدن نیمه عمر حضور ذره درگردش خون و کاهش حساسیت سیستم رتیکولو-اندوتلیال (RES) می‌تواند سمیت نانولوله‌های کربنی در داخل بدن را کاهش دهد [۱۰]. مواد می‌توانند از طریق کووالانسی یا با واسطه پیوند غیر کووالانسی نانولوله‌های کربنی را پوشش دهند. مطالعات نشان داده‌اند که با پیوند کووالانسی PEG به سطح نانولوله‌های کربنی، وزن مولکولی افزایش می‌یابد. با بیشتر شدن شاخه‌های PEG، رفتار فارماکوکینتیک نانولوله‌های کربنی مطلوب‌تر شده و در کاهش سمیت آن اثر بیشتری دارد [۱۱]. از دیگر مزایای استفاده از مشتقات پلی اتیلن گلیگول برای عامل‌دار کردن نانولوله‌های کربنی می‌توان به حفظ پایداری نانولوله‌های کربنی در حضور مقادیر بالای نمک‌ها، زیست‌سازگاری بهتر، حفظ قابلیت عبور نانولوله‌های تغییر یافته از غشاء سلولی، قابلیت اتصال ثانویه به داروها و ترکیبات دیگر باتوجه 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 رتیکولواندوتلیال نیز کاهش می‌یابد [۱۳،۱۲]. در این تحقیق نیز سعی شد تا با تغییر در خصوصیات سطحی نانولوله‌های کربنی تک لایه از طریق اتصال مشتقات فسفو لیپید-پلی اتیلن گلیکول بر روی سطح نانولوله، محلولیت و زیست-سازگاری آنها افزایش داده شود و تاثیر این اصلاح سطحی بر میزان سمیت سلولی نانولوله‌های کربنی بررسی گردد.

مواد و روش‌ها

نانولوله‌های کربنی تک لایه با اندازه ذره‌ای متوسط، با ابعاد ۱۰ نانومتر و غلظت اولیه ۰/۱ 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 به‌صورت 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 انیستیتو پاستور تهیه گردید.

عامل‌دار کردن نانولوله‌های کربنی:

برای انجام فرایند عامل‌دار کردن ماده در یک لوله PL-PEG2000-NH2 و در لوله دیگر PL-PEG2000-COOH به‌صورت کامل در ۲ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شده و یک میلی‌گرم از نانولوله‌های کربنی تک لایه به هر کدام از دو لوله آزمایش منتقل گردید. مخلوط حاصل به‌مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق، در حمام سونیکاتیور قرار گرفت. به‌تدریج حجم به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد و در انتها نمونه کامل به‌مدت 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.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-06-10]

مطالعات سلولی:

سلول‌های مورد استفاده در این مطالعه رده سلولی HEPG2، که سلول‌های نامیرای سرطان کبد انسانی هستند، بودند و مورفولوژی و خصوصیات آنها در محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا یک کرایو ویال سلول HEPG2 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تحویل گرفته شد. محیط کشت مناسب جهت رده سلولی مورد نظر محلول RPMI 1640 با pH حدود ۷/۲ می‌باشد که با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و مقادیر ۱ درصد از آنتی‌بیوتیک Penicillin (100 U/mL) و Streptomycin (100 mg/mL) کامل گردید و پیش از افزودن سرم محیط با فیلتراسیون از خلال غشای ۰/۲۵ میکرونی استریل شد.

بررسی سمیت سلولی با روش MTT:

سنجش درصد بقای سلول‌ها پس از مواجهه با نانولوله-های کربنی به‌روش رنگ‌سنجی MTT صورت گرفت. رنگ‌سنجی MTT، یک روش رنگ‌سنجی بر اساس احیا شدن و شکسته شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم 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 نانو-لوله‌های عامل‌دار شده یا عامل‌دار نشده به‌صورت جداگانه مواجه شدند. نانو لوله‌ها با غلظت‌های ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰ µg/ml به هر چاهک اضافه شدند (۶ چاهک برای هر غلظت تکرار گردید) و پلیت‌ها به‌ترتیب بعد از مدت زمان موردنظر، با واکنشگر MTT با غلظت ۵ mg/ml به‌مدت 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 ۵۷۰ و طول موج رفرنس ۶۳۰ 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 به‌دست آمده از ۶ چاهک حاوی سلول‌های تیمار شده با هر غلظت مشخص نانولوله‌های عامل‌دار شده، با جذب نوری خانه‌های حاوی گروه شاهد مقایسه شد و درصد سلول‌های زنده مانده با فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد سلولهای زنده در واحد زمان} = \frac{\text{میانگین جذب نوری چاهک های تیمارشده با نانولوله}}{\text{میانگین جذب نوری چاهک حاوی شاهد}} \times 100$$

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 به‌دست آمده توسط نرم‌افزار آماری Prism 5 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 به‌منظور پیش‌گیری از بروز خطای نوع اول در حین مقایسه و تفکیک گروه‌هایی که با یکدیگر اختلاف معنی‌داری دار داشتند، از آزمون تصحیحی Tukey استفاده شد.

نتایج

نتایج آزمونMTT:

نتایج نشان داد مواجهه سلول‌های کبدی با نانولوله‌های عامل‌دار شده، با غلظت‌های µg/ml ۶۰۰ و۴۰۰ در مقایسه با گروه شاهد موجب کاهش معنی‌داری در میزان درصد زنده ماندن سلول-های سرطانی رده HEPG2 شده است ($P<۰/۰۵$). بیشترین درصد زنده ماندن در غلظت µg/ml ۲۰۰ و۱۰۰، بعد از ۲۴ ساعت نسبت به گروه شاهد بود و بیشترین سمیت سلولی بعد از ۷۲ ساعت مواجهه با غلظت‌های بالاتر از ۲۰۰ میکروگرم بر میلی-لیتر 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 µg/ml ۱۰۰ تغییرات مورفولوژیک کمی در مقایسه با نمونه‌های گروه شاهد مشاهده شد و سلول‌های HEPG2 از نظر شکل و اندازه تقریبا مشابه با سلول‌های گروه شاهد بودند. اما در غلظت‌های بالاتر از ۲۰۰ µg/ml تغییرات به‌مراتب بیشتر و قابل مشاهده بود و این تغییرات در مواجهه با نانولوله‌های خالص نسبت به مواجهه سلول‌ها با نانولوله‌های عامل‌دار به‌صورت معنی‌داری مشهودتر بود؛ به‌طوری‌که غلظت ۲۰۰ آن 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 ۲۰۰ µg/ml به بالا اثر سمی روی سلول‌ها داشت، اما غلظت‌های کمتر نتوانستند آسیب جدی در فعالیت حیاتی سلول‌ها ایجاد نمایند و ممکن است نشان دهنده

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-06-10]

تأثیر تنظیمی بر رشد این سلول‌ها باشد که به زمان بیشتری برای مشاهده آن نیاز است. نتایج تست IC50 نیز نشان داد که آسیب ناشی از نانولوله‌ها در مواجهه با زمان‌های طولانی‌تر خود را بهتر نشان می‌دهد و در زمان‌های کوتاه‌تر به دوز بیشتری از نانولوله (خالص و عامل‌دار) نیاز است تا آسیب‌های جدی دیده شود. این زمان در نانولوله خالص به‌صورت معنی‌داری کمتر بود ($P<0/05$) (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۱- درصد زنده ماندن سلول‌های HEPG2 در ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت پس از مواجهه با PL-PEG5000-SWCNT-COOH با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر

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

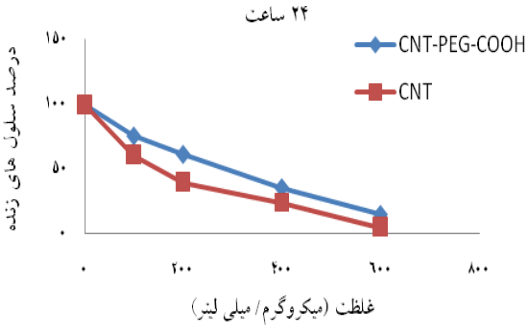
جدول شماره ۲- مقادیر IC50 به‌دست آمده از مجاورت سلول‌های HEPG2 با نانو لوله‌های کربنی در زمان‌های مختلف

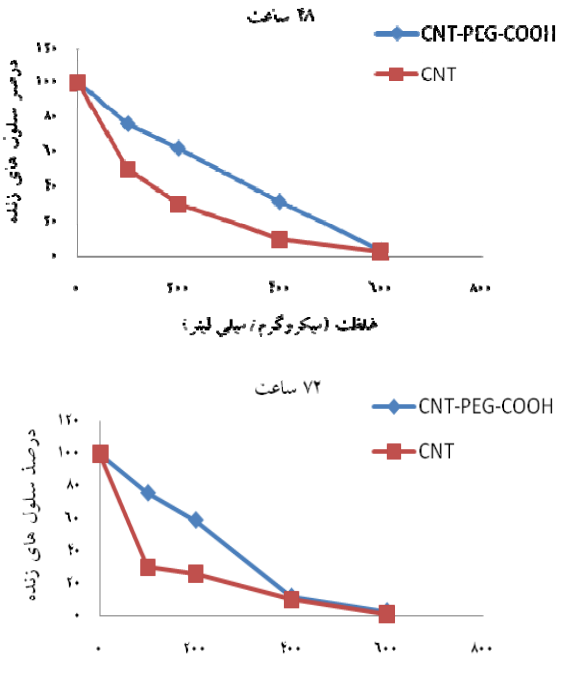
	IC_{50} (µg/ml) after		
	۲۴ hours	۴۸ hours	۷۲ hours
Pure SWCNT	۱۵۰	۱۰۰	<۵۰
PL-PLG-SWCNT-COOH	۳۰۰	۲۸۰	۲۵۰

Pure SWCNT: نانولوله کربنی تک دیواره خالص

PL-PLG-SWCNT-COOH: نانولوله کربنی تک دیواره پگیله

در حالی که کمتر از ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر نانولوله‌های کربنی تک دیواره خالص پس از ۷۲ ساعت توانست بیش از نیمی از سلول‌های 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 میکروگرم در میلی‌لیتر افزایش داد. با کاهش مدت مواجهه این اثر زیست‌سازگاری نیز کاهش یافت؛ به‌طوری‌که در مواجهه ۲۴ ساعته IC50 نانولوله کربنی غیر پگیله یک سوم نانولوله عامل‌دار شده با پلی اتیلن گلیکول است ($P<0/05$). بر اساس نتایج با مقایسه درصد زنده ماندن سلول‌ها 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 عامل‌دار رسم شد (نمودارشماره ۱).





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

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-06-10]

بحث

به‌طور کلی نتایج نشان می‌دهد که فرایند عامل‌دار نمودن نانولوله‌های کربنی با فسفولیپید پگیله (PL-PEG) در غلظت‌های بالا نقش مهمی در کاهش سمیت نانولوله کربنی و افزایش IC50 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 همکاران وی پیشنهاد گردید [۱۳،۱۲]. برای عامل‌دار نمودن نانو-لوله‌های 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 نانو-لوله‌ها 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 حداکثر غلظت دمایی ۰/۸۵-۰/۹۶ mg/mL میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر دست یافتند [۱۷،۱۶]. 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، درحالی‌که نانولوله‌های کربنی پگیله از طریق ادرار و مدفوع به‌خوبی دفع می‌گردد. از نظرسمیت، 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 میزان ۳ mg/kg، به‌صورت 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 ایمن است [۱۹]. اخیرا پگیلاسیون برای تعدیل و تغییر ترکیبات درمانی مانند پروتئین‌ها، پپتیدها، الیگونوکلئوتیدها، فراگمنت‌های آنتی‌بادی و ملکول‌های آلی کوچک و حامل‌های دارویی و سیستم‌های دارورسانی (مانند دندریمرها و نانوذرات پلیمری) استفاده می‌شود [۹]. تحقیقات نشان داده است که پگیلا-سیون نه‌تنها می‌تواند سبب بهبود فراهمی زیستی بعضی از بیو-ملکول‌ها گردد؛ بلکه با بهبود محلولیت، مانع از جذب غیر اختصاصی، مهار برداشت سیستم‌های دارورسانی توسط سیستم رتیکولواندوتلیال آسیب افزایش ماندگاری این سیستم‌ها در جریان سیستمیک نیز می‌شود [۲۰].

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی به‌نظر می‌رسد بتوان با عامل‌دار نمودن نانو-لوله‌های کربنی با عوامل هیدروفیلی هم‌چون پلی اتیلن گلیکول از سمیت ذاتی آنها کاست و غلظت‌های بالاتری از داروها را به‌وسیله آنها به داخل بدن هدایت نمود و در عین حال سمیت کبدی کمتری را مشاهده نمود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از تمامی پرسنل محترمی که در انجام این پژوهش ما را یاری نموده‌اند، به‌ویژه دوستان و همکاران آزمایشگاه سلولی پاستور و آزمایشگاه صنعتی دانشگاه آزاد اسلامی تهران تشکر و قدردانی می‌شود.

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 toxicityof carbon nanotubes at organism, organ, cell, and biomacromoleculelevels. ***Environ Int*** 2012; 40: 244-55.

[6] Foldvari M, Bagonluri M. Carbon nanotubes as functionalexcipients for nanomedicines: II. Drug

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-06-10]

delivery and biocompatibilityissues. ***Nanomedicine*** 2008; 4(3): 183-200.
[7] Tang S, Tang Y, Zhong L, Murat K, Asan G, Yu J, et al. Shortandlong-term toxicities of multi-walled carbon nanotubes invivo 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 shapeof mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake and cellfunction. ***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, metabolismand 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.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2026-06-10]