

Evaluation of the cytotoxicity of original and functional carbon nanotubes in human lung cells

Hadidi N¹, Ramezani L², Saffari M^{2,3*}

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

2- Department of Medical Nanotechnology, Faculty of Advanced Sciences & Technology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University (IAUPS), Tehran, I. R. Iran.

3- School of Pharmacy, Iran University of Medical Sciences, Tehran, I. R. Iran.

Received December 14, 2014; Accepted September 16, 2015

Abstract:

Background: Carbon nanotubes (CNT) are important carriers in drug delivery and medical application. This study aimed to investigate the cytotoxic effects of original and modified CNTs on A549 cells, as a cellular model of human lung.

Materials and Methods: Single-wall CNTs were pegilated via different functional groups. Original and modified CNTs were exposed to A549 cells. Different concentrations (0-600 µg/ml) of CNTs were evaluated at exposure times of 24, 48 and 72 hours. Morphologic changes were observed by an inverted microscope and the viability percentage of A549 cells was determined using the methylthiazol tetrazolium (MTT) assay.

Results: Amine-mediated pegilated CNT (amin-PEG-CNTs) and carboxyl-mediated pegilated CNT (carboxyl-PEG-CNTs) in concentration of 600 µg/ml after 48 hours exposure led to severe morphologic changes in the A549 cells. These changes were also obvious after 72 hours. In concentrations of 100, 200 and 400 µg/ml of CNTs, in all times, amin-PEG-CNTs showed better biocompatibility than carboxyl-PEG-CNTs. The MTT results showed a significant reduction in viability of A549 cells in concentrations more than 200 µg/ml after carboxyl-PEG-CNTs exposure and more than 400 µg/ml after amin-PEG-CNTs exposure ($P < 0.05$). While, original CNTs showed a cytotoxic effect on A549 cells in concentration of 100 µg/ml.

Conclusion: It seems that the amine group in combination with positive charge in surface, with surface modification of CNTs, can be an interesting solution to safer application of CNTs as carriers.

Keywords: Carbon nanotubes, Pegilated CNTs, Cytotoxicity, Surface modification, Lung cells

* 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 326-333

Please cite this article as: Hadidi N, Ramezani L, Saffari M. Evaluation of the cytotoxicity of original and functional carbon nanotubes in human lung cells. *Feyz* 2015; 19(4): 326-33.

بررسی سمیت نانو لوله‌های کربنی اولیه و عامل‌دار شده در سلول‌های ریوی انسان

نغمه حدیدی^۱، لیلی رضائی^۲، مصطفی صفاری^{۳*}

خلاصه:

سابقه و هدف: نانولوله‌های کربنی حاملی مهم در امر دارورسانی و کاربردهای پزشکی هستند. این مطالعه جهت بررسی آثار سمیت سلولی نانولوله‌های کربنی اولیه و عامل‌دار شده در سلول‌های A549 به‌عنوان مدل سلولی ریوی انسان انجام شد. **مواد و روش‌ها:** نانولوله‌های کربنی تک دیواره به‌وسیله گروه‌های عاملی مختلف پگیله شدند. سپس، نانولوله‌های کربنی اولیه و اصلاح شده با سلول‌های A549 مواجه گردیدند. مدت مواجهه ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بود و غلظت‌های صفر تا ۶۰۰ $\mu\text{g/ml}$ بررسی گردید. تغییرات مورفولوژیک با میکروسکوپ معکوس و درصد زنده ماندن رده سلولی A549 توسط آزمون MTT بررسی گردید. **نتایج:** غلظت ۶۰۰ $\mu\text{g/ml}$ از نانولوله‌های کربنی پگیله شده به‌واسطه عاملی آمین و کربوکسیل، پس از ۴۸ ساعت موجب تغییرات مورفولوژیکی معنی‌دار در سلول‌های A549 شدند. این تغییرات در ۷۲ ساعت نیز به‌صورت مشابه تداوم داشت. در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰، نانولوله‌های آمینه زیست‌سازگاری بهتری در همه فواصل زمانی در مقایسه با نانولوله‌های کربنی پگیله کربوکسیله نشان دادند. نتایج آزمون MTT نشان‌دهنده کاهش معنی‌داری در میزان زنده ماندن سلول‌های A549 در غلظت‌های بیش از ۲۰۰ $\mu\text{g/ml}$ در نانولوله‌های کربنی پگیله کربوکسیله و غلظت‌های بیش از ۴۰۰ $\mu\text{g/ml}$ در مواجهه نانولوله‌های کربنی پگیله آمینه بودند ($P < 0.05$). در حالی که نانولوله‌های کربنی خالص در غلظت ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ اثرات سایتوتوکسیک بر سلول‌های A549 نشان دادند. **نتیجه‌گیری:** به‌نظر می‌رسد گروه عاملی آمین و بار مثبت سطحی با اصلاح سطحی نانولوله‌های کربنی، می‌تواند راه‌کار جذابی جهت کاربرد نانولوله‌های کربنی به‌عنوان حامل‌های ایمن‌تر باشد.

واژگان کلیدی: نانوتیوب‌های کربنی، نانوتیوب‌های کربنی پگیله، سایتوتوکسیسته، فعال‌سازی سطحی، سلول‌های ریه

دو ماه‌نامه علمی- پژوهشی فیض، دوره نوزدهم، شماره ۴، مهر و آبان ۱۳۹۴، صفحات ۳۳۳-۳۲۶

مقدمه

و نشان داده شده است که به ویژگی‌های فیزیکی متعددی همانند طول، قطر، سطح، تمایل به متراکم شدن، دیسپرسی، وجود و ماهیت کاتالیزور باقیمانده و هم‌چنین گروه‌های عاملی شیمیایی این نانو مواد بستگی دارد [۸،۷]. به‌همین علل و به‌خصوص با توجه به روند رو به‌رشد کارایی نانولوله‌های کربنی در دارورسانی بررسی سمیت CNT در محیط‌های بیولوژیک و تلاش برای رفع این مشکل ضروری است [۹]. به‌طور کلی، مشاهده شده است در محیط‌های بیولوژیکی که تعامل CNT با پروتئین‌ها و تداخل با ساختار آنها صورت می‌گیرد، احتمال دارد که سمیت نانولوله‌های کربنی باعث مرگ سلولی شود. یکی از راه‌هایی که برای از کاهش سمیت CNT پیشنهاد شده است استفاده از پوشش سطحی بر روی نانولوله‌ها می‌باشد. به قرار دادن گروه‌های عاملی مناسب تکنیک عامل‌دار نمودن گویند [۱۰]. در مطالعات مختلف نشان داده شده است که قرار گرفتن در معرض نانولوله‌های کربنی خالص، به‌طور قابل توجهی باعث کاهش میزان تکثیر سلول‌ها و چرخه سلولی، آپوپتوز و نکروز می‌شود [۱۱،۱۲]. در اثر فرایند عامل‌دار نمودن نانولوله‌های کربنی، که به‌طور معمول به‌صورت خوشه تجمع می‌یابد، از هم جدا شده و با مولکول‌های خاص پوشش داده می‌شوند. نانو لوله‌های کربنی ترکیبات پلی‌آروماتیک با مساحت سطحی بیش از ۲۶۰۰ m^2/g هستند. سطوح جانبی نانولوله‌ها بسیار هیدروفوب می‌باشد. اتصال

نانوتیوب‌های کربنی (CNT)، به‌دلیل خواص فیزیکی- شیمیایی ویژه‌ای همانند حرارتی، مغناطیسی، نوری و یا هدایت الکتریکی که از خود نشان می‌دهند [۱]. برای گستره وسیعی از علوم، از جمله نانوپزشکی، دارورسانی (به‌خصوص ترکیبات ضد سرطان)، زیست‌مولکول‌ها (شامل پروتئین‌ها، پپتیدها، اسیدهای نوکلئیک، پلاسمید و حتی siRNA) جذابیت یافته‌اند [۳،۲]. از سال ۲۰۰۴، نانولوله‌های کربنی به‌طور گسترده به‌عنوان حامل‌های دارویی برای انتقال درون سلولی داروهای شیمی درمانی، پروتئین‌ها و ژن‌ها مورد بررسی قرار گرفته‌اند [۴]. با توجه به استفاده روزافزون از این نانو مواد و افزایش در معرض قرار گرفتن انسان به وجود آنها، تصور بسیاری از دانشمندان این است که واکنش‌های بیولوژیکی و سمیت در خصوص نانولوله‌های کربنی، همانند نانو مواد دیگر، وجود داشته [۵،۶].

^۱ گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی انیستیتو پاستور، تهران، ایران

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

^۳ دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

* نشانی نویسنده مسئول:

کاشان، کیلومتر ۵ بلوار قطب روانی، دانشکده پزشکی، گروه فارماکولوژی

تلفن: ۰۹۱۳۳۶۲۰۱۴۷، دورنگ: ۰۳۱۵۵۵۴۶۰۳۰

پست الکترونیک: mostafa.saffary@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۲۳، تاریخ پذیرش نهایی: ۹۴/۶/۲۵

گروه‌های عاملی با کاهش هیدروفوبیسیته سطحی و محلول ساختن نانوتیوب‌های کربنی سبب کاهش سمیت و آسیب رسانی آنها به سلول‌های موجودات زنده می‌شود. زیست‌سازگار کردن نانولوله‌های کربنی، امکان بهره‌گیری از خصوصیات منحصر به فرد آنها را در محیط بیولوژیک فراهم می‌سازد. اتصال گروه‌های عاملی می‌تواند در سطوح خارجی، از طریق نقاطی که دارای نقایص ساختمانی هستند و یا در دو انتهای باز نانو تیوب‌ها و حتی با وارد ساختن ساختارهای مولکولی به فضای داخلی نانو تیوب صورت پذیرد [۱۷-۱۳]. در حالی‌که راه‌های بسیاری برای عامل‌دار نمودن نانو لوله‌ها وجود دارد، یکی از روش‌های رایج پوشش نانو لوله‌ها با پلی اتیلن گلیکول (PEG) است که به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌شود. پوشش پلی اتیلن گلیکول پلیمری زیست‌سازگار است و با بهبود رفتار فارماکو-کیتیک، طولانی شدن نیمه عمر حضور ذره در گردش خون و کاهش حساسیت سیستم رتیکولو اندوتلیال (RES)، می‌تواند سمیت CNT در داخل بدن را کاهش دهد [۱۹]. در هنگام باند شدن، این مواد می‌توانند از طریق کووالانسی یا پیوند غیر کووالانسی CNT را پوشش دهند. مطالعات نشان داده‌اند که با پیوند کووالانسی PEG به سطح CNT، وزن مولکولی افزایش می‌یابد. با بیشتر شدن شاخه‌های PEG، رفتار فارماکو-کیتیک CNT مطلوب‌تر شده و در کاهش سمیت آن اثر بیشتری دارد [۲۰]. از دیگر مزایای استفاده از مشتقات پلی اتیلن گلیکول برای عامل‌دار نمودن نانو لوله‌های 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 با توجه به گروه عاملی انتهایی زنجیره پلی اتیلن گلیکول، کاهش آب-گریزی سطحی و کاهش جذب غیر اختصاصی پروتئین‌ها به حامل-های دارویی اشاره کرد. همچنین، نانولوله‌های پگیله شده مدت بیشتری در گردش خون باقی می‌مانند و میزان برداشت آنها توسط سیستم رتیکولو اندوتلیال نیز کاهش می‌یابد [۲۱، ۲۲]. در این تحقیق نیز سعی شده تا با تغییر در خصوصیات سطحی نانو لوله‌های کربنی تک لایه از طریق اتصال مشتقات فسفو لیپید - پلی اتیلن گلیکول بر روی سطح نانولوله، محلولیت و زیست‌سازگاری آنها افزایش داده شود و تاثیر آن بررسی گردد.

مواد و روش‌ها

کربن نانوتیوب تک لایه با اندازه ذره‌ای متوسط، با ابعاد ۱۰ نانومتر و غلظت اولیه ۰/۱ mg/ml از شرکت بسیار تجهیز یاران (بلژیک) 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. برای انجام فرایند عامل‌دار کردن ماده PL-PEG2000-SWCNT-COOH به‌صورت کامل در ۲ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شد و یک میلی‌گرم از نانوتیوب‌های کربنی تک لایه به دو لوله‌های آزمایش جدا حاوی ۲ میلی‌لیتر آب دیونیزه منتقل شده و مخلوط حاصل به‌مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق، در حمام سونیکاتیور قرار گرفتند. به‌تدریج حجم به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد و در آخر نمونه کامل به‌مدت ۲ دقیقه با اولتراسوند با قدرت ۵ درصد هموژنایز شد. عمل سونیکه کردن دو بار دیگر برای اطمینان از یکنواختی و پراکندگی کامل تکرار شد.

مطالعات سلولی

در این مطالعه رده سلولی A549، که سلول‌های نامیرای اپی‌تلیال آلوئولار ریه هستند، به‌عنوان مدل سلولی سرطان ریه انتخاب گردید و مورفولوژی و خصوصیات آنها در محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا یک کرایو ویال سلول A549 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 (100 U/mL Penicillin و 100 mg/mL Streptomycin) کامل گردید و پیش از افزودن سرم محیط با فیلتراسیون استریل شد.

بررسی سمیت سلولی با روش MTT

در مرحله بعد، سنجش کمیت سلول‌ها پس از مواجهه با نانو لوله‌های کربنی به روش رنگ سنجی MTT صورت گرفت. رنگ سنجی MTT، یک روش رنگ سنجی بر اساس احیا شدن و شکسته شدن کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم با فرمول شیمیایی dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) می‌باشد. کشت در پلیت‌های ۹۶ خانه کشت سلولی انجام شد و نتایج با دستگاه الیزا ریدر (رینباو، استرالیا) قرائت گردید. درصد سلول‌های زنده مانده در هر غلظت، با فرمول زیر محاسبه گردید:

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

سلول‌های مذکور در سه پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت شده و برای زمان-های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، با نانولوله‌های عامل‌دار شده یا عامل‌دار نشده به‌صورت جداگانه مواجه شدند. نانوتیوب‌ها با غلظت‌های ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰ μg/ml به هر چاهک اضافه شدند و پلیت‌ها

غلظت‌های کمتر نتوانستند آسیب جدی در فعالیت حیاتی سلول‌ها ایجاد نمایند. ولی پس از ۷۲ ساعت، تقریباً در تمامی غلظت‌ها کاهش مختصر رشد یا کاهش مختصر فعالیت حیاتی نسبت به گروه شاهد از نظر آماری معنی‌دار بود و ممکن است نشان دهنده تأثیر تنظیمی بر رشد این سلول‌ها باشد که به زمان بیشتری برای مشاهده آن نیاز است. نتایج تست IC50 (غلظتی که می‌تواند موجب مرگ و میر ۵۰ درصد سلول‌ها شود) نشان داد که آسیب ناشی از نانو لوله‌ها در زمان‌های بیشتر، 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 به صورت معنی‌داری کمتر است ($P < 0.05$) (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱- درصد زنده ماندن سلول‌های A549 در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مواجهه با PL-PEG5000-SWCNT-COOH

با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر			
غلظت نانولوله ($\mu\text{g/ml}$)	درصد بقای ۲۴ ساعته	درصد بقای ۴۸ ساعته	درصد بقای ۷۲ ساعته
شاهد	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
۱۰۰	۹۱/۱	۷۶/۴	۷۰/۸
۲۰۰	۷۰/۴	۵۶/۳	۶۶/۴
۴۰۰	۴۱/۷	۲۳/۵	۱۲/۹
۶۰۰	۲۸/۳	۱۵/۲	۳/۶

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 نانو تیوب خالص و عامل-دار رسم شد (شکل شماره ۲). البته نتایج آنالیز واریانس دو طرفه نشان داد اثر زمان و غلظت بر میزان سمیت باهم تداخل داشته و با اثر هم افزایی یکدیگر را تقویت می‌نمایند ($P < 0.05$). به‌طور کلی نتایج نشان می‌دهد که فرایند عامل‌دار کردن نانولوله‌های کربنی با فسفولیپید پگیله (PL-PEG) در غلظت‌های بالا نقش مهمی در سمیت نانوتیوب کربنی و کاهش IC50 دارد (جدول شماره ۲). علت این امر را می‌توان، پوشاندگی مساحت سطح نانوتیوب با PL-PEG و در نتیجه زیست‌سازگار شدن آن سلول‌های ریوی دانست.

جدول شماره ۲- مقادیر IC50 به‌دست آمده از مجاورت سلول‌های

A549 با نانولوله کربنی در زمان‌های مختلف			
IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) بعد از			
۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	
۱۵۰	۱۰۰	۵۰	Pure SWCNT
۳۷۰	۲۵۰	۲۴۰	PL-PEG5000 SWCNT

به‌ترتیب بعد از مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، با واکنش گر MTT با غلظت ۵ mg/ml به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. بعد از مدت زمان لازم کریستال‌های فورمازون ارغوانی رنگ ایجاد شده با افزودن DMSO حل شده و بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون، با استفاده از الیزا ریدر 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.

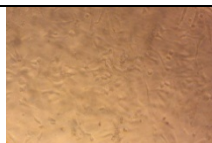
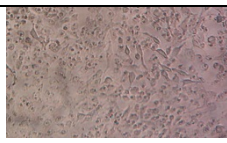
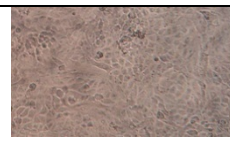
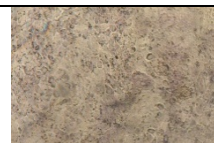
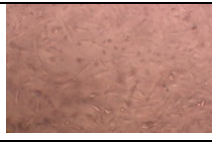
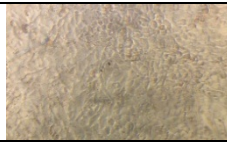
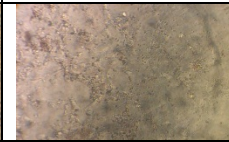
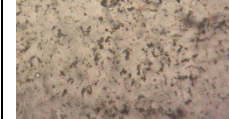
روش تجزیه و تحلیل داده‌ها

اطلاعات به دست آمده توسط نرم‌افزار آماری Prism 5 به کمک آزمون واریانس یک طرفه (ANOVA) تجزیه و تحلیل شدند. در صورت وجود اختلاف معنی‌دار میان گروه‌ها و به‌منظور تفکیک گروه‌هایی که با یکدیگر اختلاف معنی‌دار سطح معنی‌داری ($P < 0.05$) داشتند، از آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد.

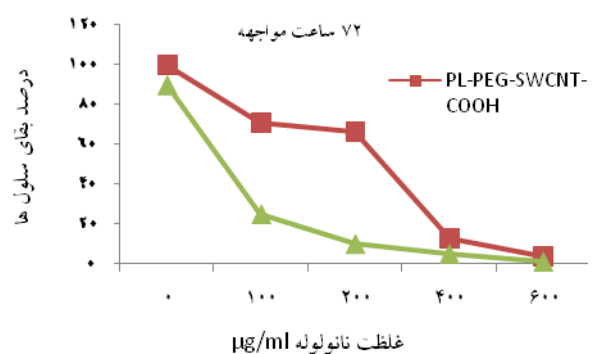
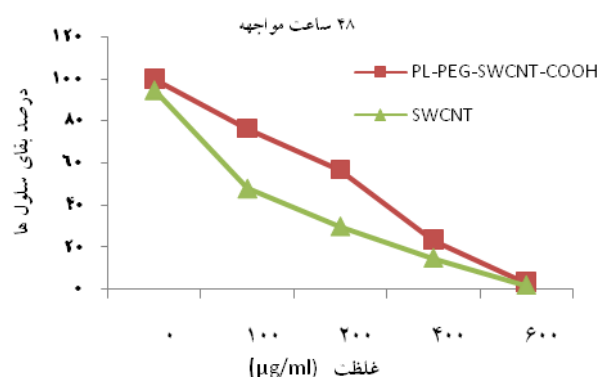
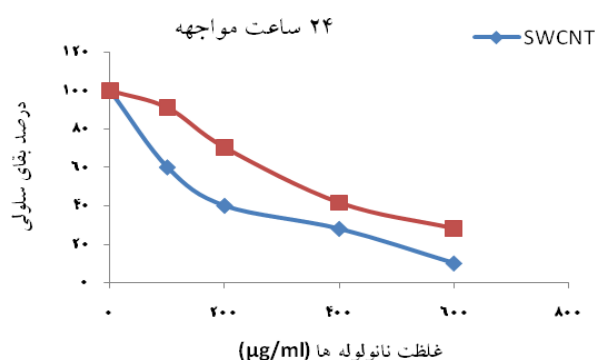
نتایج

نتایج آزمون MTT

جذب نوری به‌دست آمده از خانه‌های حاوی سلول‌های تیمار شده با نانو لوله‌های عامل‌دار شده با جذب نوری خانه‌های حاوی گروه شاهد مقایسه شد؛ نتایج نشان داد مواجهه با نانولوله‌های عامل‌دار شده با غلظت‌های ۶۰۰ و ۴۰۰ $\mu\text{g/ml}$ در مقایسه با گروه شاهد موجب کاهش معنی‌داری در میزان درصد زنده ماندن سلول‌های سرطانی رده A549 شده است. بیشترین درصد زنده ماندن در غلظت ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ بعد از ۲۴ ساعت نسبت به گروه شاهد بود. و بیشترین سمیت سلولی بعد از ۷۲ ساعت مواجهه با غلظت ۶۰۰ 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 شد. بیست و چهار ساعت پس از تیمار سلول‌های A549 با PL-PEG-SWCNT-COOH با غلظت ۱۰۰ $\mu\text{g/ml}$ تغییرات مورفولوژیک مختصری در مقایسه با نمونه‌های گروه شاهد مشاهده شد و سلول‌های A549 از نظر شکل و اندازه مشابه با سلول‌های گروه شاهد بودند (شکل شماره ۱). اما در غلظت‌های ۶۰۰ و ۴۰۰ تغییرات به‌مراتب بیشتر و قابل مشاهده بود و این تغییرات در مواجهه با نانولوله‌های خالص نسبت به مواجهه سلول‌ها با نانو لوله‌های 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 ۲۴ و ۴۸ ساعت از غلظت‌های ۴۰۰ $\mu\text{g/ml}$ به بالا اثر سمی روی سلول‌ها داشت، اما

		غلظت‌های مواجهه (میکروگرم بر میلی‌لیتر)					
		A549 9	0	100	200	400	600
مدت زمان مواجهه (ساعت)	24						
	48						
	72						

شکل شماره ۱- تغییرات مورفولوژیک سلول‌های A549 پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مواجهه با غلظت‌های ۰ تا ۶۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانولوله‌های کربنی غیر پگیده



شکل شماره ۲- نمودار در صد زنده ماندن سلول‌های A549 بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت مواجهه با غلظت‌های متفاوت SWCNT و PL-PEG-SWCNT-COOH

بحث

سرم و هم‌چنین بررسی‌های آسیب شناسی دقیق و بافت شناسی، ۴ پس از ماه تزریق انجام شد و هیچ تغییری در هر یک از پارامترها مشاهده نشد. این مشاهدات نشان می‌دهد که عامل‌دار کردن SWCNT با PEG را می‌توان در داخل بدن استفاده کرد و کاربرد بیولوژیکی آن ایمن است [۳۴،۳۳]. اخیراً پگیلاسیون برای تعدیل و تغییر ترکیبات درمانی (شامل پروتئین‌ها، پپتیدها، الیگونوکلوئیدها، فراگمنت‌های آنتی‌بادی و ملکول‌های آلی کوچک) و حامل‌های دارویی و سیستم‌های دارو رسانی (مانند دندریمرها و نانو ذرات پلیمری) استفاده می‌شود. تحقیقات نشان داده است که پگیلاسیون نه تنها می‌تواند سبب بهبود فراهمی زیستی بعضی از بیومولکول‌ها گردد، بلکه با بهبود محلولیت، مانع از جذب غیر اختصاصی، و مهار برداشت سیستم‌های دارو رسانی توسط سیستم رتیگولاندوتلیال، سبب افزایش ماندگاری این سیستم‌ها در جریان سیستمیک نیز می‌شود [۳۵-۳۸].

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه موید آن می‌باشد که اصلاح ساختار و شیمی سطوح در نانو ذرات می‌تواند با حفظ عملکرد، از سمیت سلولی آنها به‌ویژه در بافت ریوی بکاهد. اثر گروه‌های عاملی آمینی در این راستا بر گروه کربوکسیل ارجحیت دارد.

تشکر و قدردانی

از واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی و معاونت پژوهشی انستیتو پاستور تهران جهت حمایت از انجام این طرح تشکر می‌گردد.

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] Foldvari M, Bagonluri M. Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: I. Pharmaceutical properties. *Nanomedicine* 2008; 4(3): 173-82.
- [4] Foldvari M, Bagonluri M. Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: I. pharmaceutical properties, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biol Med* 2008; 4(3): 183-200.
- [5] Kolosnjaj-Tabi J, Hartman KB, Boudjemaa S, Ananta JS, Morgant G, Szwarc H, et al. In

استفاده از فسفولیپید - پلی اتیلن گلیکول در محلول سازی نانولوله‌های کربنی نخستین بار توسط Dia و همکاران وی پیشنهاد گردید [۲۲،۲۱]. برای عامل‌دار کردن نانولوله‌های کربنی، می‌توان از مشتقات فسفولیپید - پلی اتیلن گلیکول با طول زنجیره مختلف و ساختار شاخه‌ای یا خطی استفاده نمود. حضور گروه‌های عاملی مانند آمین در انتهای زنجیره پلی اتیلن گلیکول نیز امکان بارگذاری مولکول‌های بیولوژیک و در نتیجه کاربرد نانولوله‌ها را در تصویر برداری برای فرآیندهای تشخیصی و هم-چنین دارورسانی فراهم می‌سازد [۲۳-۲۹]. حدیدی و همکارانش در مطالعات خود با استفاده از آمینو فسفولیپید - پلی اتیلن گلیکول، به نانولوله‌های کربنی پگیله با حداکثر غلظت mg/mL ۰/۸۵-۰/۹۶ میلی گرم در هر میلی لیتر دست یافتند [۳۰-۳۲]. یک گزارش نشان داده است که با استفاده از PEG2000 نیمه عمر CNT در گردش خون به ۱/۲ ساعت رسیده و با استفاده از PEG5000 می‌توان آن را به ۵ ساعت افزایش داد. گزارش دیگری نشان داده است که با استفاده از PEG شاخه‌دار می‌توان زمان گردش در خون را تا ۱۵ ساعت بهبود بخشید [۳۳]. هم-چنین، نتایج نشان می‌دهد که CNT دفع شده از بدن حداقل است، درحالی که CNT-PEG گالوانیزه از طریق ادرار و مدفوع دفع می‌شود. از نظر سمیت نیز مطالعات مختلف سمیت نانولوله‌های متصل به PEG را بسیار ناچیز گزارش کرده‌اند و سمیت CNT - PEG تنها در دوزهای بالای CNT گزارش شده است [۳۳]. در یک مطالعه، گروه PEG-SWCNT (۳ mg/kg) به-صورت داخل وریدی به موش تزریق شد. آزمایشات خون و

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.

[6] 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): 414-26.

[7] Donaldson K, Poland CA. Nanotoxicology: new insights into nanotubes. *Nat Nanotechnol* 2009; 4(11): 708-10.

[8] Herzog E, Casey A, Lyng FM, Chambers G, Byrne HJ, Davoren M. A new approach to the toxicity testing of carbon-based nanomaterials the clonogenic assay. *Toxicol Lett* 2007; 174(1-3): 49-60.

- [9] Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science** 2006; 311(5761): 622-7.
- [10] 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.
- [11] Foldvari M, Bagonluri M. Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: II. Drug delivery and biocompatibility issues. **Nanomedicine** 2008; 4(3): 183-200.
- [12] 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.
- [13] Pastorin G. Crucial functionalizations of carbon nanotubes for improved drug delivery: a valuable option? **Pharm Res** 2009; 26(4): 746-69.
- [14] Foldvari M. Formulating nanomedicines: Focus on carbon nanotubes as novel nanoexcipients. **Key Engineering Materials** 2010; 441: 53-74.
- [15] Klumpp C, Kostarelos K, Prato M, Bianco A. Functionalized carbon nanotubes as emerging nanovectors for the delivery of therapeutics. **Biochim Biophys Acta** 2006; 1758(3): 404-12.
- [16] Foldvari M, Bagonluri M. Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: I. pharmaceutical properties, Nanomedicine: Nanotechnology. **Biol Med** 2008; 4(3): 173-82.
- [17] Gomez-Gualdrón DA, Burgos JC, Yu J, Balbuena PB. Carbon nanotubes: engineering biomedical application. **Prog Mol Biol Transl Sci** 2011; 104: 175-245.
- [18] Zhang Y, Bai Y, Yan B. Functionalized carbon nanotubes for potential biomedical application. **Drug Deliv Today** 2010; 15(11-12): 428-35.
- [19] Liu Z, Cai WB, He L, Nakayama N, Chen K, Sun X, et al. In vivo biodistribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice. **Nat Nanotech** 2007; 2(1): 47-52.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] Islam MF, Rojas E, Bergey DM, Johnson AT, Yodanis CL. High weight fraction surfactant solubilization of single-wall carbon nanotubes in water. **Nano Letters** 2003; 3(2): 269-73.
- [25] Supramolecular chemistry on water-soluble carbon nanotubes for drug loading and delivery. **J Am Chem Soc** 2007; 129(1): 50-56.
- [26] Kam NWS, O'Connell M, Wisdom JA, Dai H. Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction. **Proceedings National Academy Sci United States America** 2005; 102(33): 11600-5.
- [27] Kam NWS, Liu Z, Dai H. Functionalization of carbon nanotubes via cleavable disulfide bonds for efficient intracellular delivery of siRNA and potent gene silencing. **J Am Chem Soc** 2005; 127(36): 12492-3.
- [28] Liu Z, Chen K, Davis C, Sherlock S, Cao Q, Chen X, et al. Drug delivery with carbon nanotubes for in vivo cancer treatment. **Cancer Res** 2008; 68(16): 6652-60.
- [29] Liu Z, Winters M, Holodniy M, Dai H. siRNA delivery into human T cells and primary cells with carbon nanotube transporters. **Angew Chem Int Ed Engl** 2007; 46(12): 2023-7.
- [30] 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 Nanomed** 2011; 6: 737-46.
- [31] 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.
- [32] Hadidi N, Kobarfard F, Nafissi-Varcheh N, Aboofazeli R. PEGylated Single-Walled Carbon Nanotubes as Nanocarriers for Cyclosporin A Delivery. **AAPS PharmSciTech** 2013; 14(2): 593-600.
- [33] Yang ST, Luo J, Zhou Q, Wang H. Pharmacokinetics, metabolism and toxicity of carbon nanotubes for biomedical purposes. **Theranostics** 2012; 2(3): 271-82.

- [34] 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.
- [35] 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.
- [36] Lu KL, Lago RM, Chen YK, Green MLH, Harris PJF, Tsang SC. Mechanical damage of carbon nanotubes by ultrasound. *Carbon* 1996; 34(6): 814-6.
- [37] Liu Z, Sun X, Nakayama N, Dai H. Supramolecular chemistry on water-soluble carbon nanotubes for drug loading and delivery. *J Am Chem Soc* 2007; 1(1): 50-56.
- [38] Moghaddam MJ, Taylor S, Gao M, Huang SM, Dai LM, McCall MJ. Highly efficient binding of DNA on the sidewalls and tips of carbon nanotubes using photochemistry. *Nano Letters* 2004; 4(1): 89-93.