

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

Hadidi N<sup>1</sup>, Ramezani L<sup>2</sup>, Shokrghozar MA<sup>1</sup>, Amanzadeh A<sup>1</sup>, Saffari M<sup>3\*</sup>

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 µg/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 400 µg/ml concentrations of CNTs and more, PEG-CNTs via carboxylic 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.

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

نغمه حدیدی<sup>۱</sup>، لیلی رضائی<sup>۲</sup>، محمدعلی شکرگزار<sup>۱</sup>، امیر امان زاده<sup>۱</sup>، مصطفی صفاری<sup>۳\*</sup>

## 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 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 به وسیله پلیمر دوگانه دوست پلی اتیلن 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 ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و غلظت‌های مواجهه ۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰  $\mu\text{g/ml}$  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  $100 \mu\text{g/ml}$  آثار سمی بر سلول‌های HEPG2 داشتند، در حالی که اصلاح سطح نانولوله‌های کربنی با پلی اتیلن گلیکول آمینه و کربوکسیله سبب بهبود زیست‌سازگاری نانولوله‌های کربنی به-ترتیب تا غلظت‌های  $400 \mu\text{g/ml}$  و  $200 \mu\text{g/ml}$  گردید. غلظت‌های  $400 \mu\text{g/ml}$  و بالاتر از نانولوله‌های کربنی پگیله کربوکسیله، موجب تغییرات مورفولوژیکی شدید سلول‌ها شدند، در حالی که نانولوله‌های کربنی پگیله آمینه، در بازه زمانی مورد مطالعه، زیست‌سازگاری بهتری نشان دادند. در آزمون MTT دیده شد غلظت‌های بیش از  $200 \mu\text{g/ml}$  از نانولوله‌های کربنی پگیله کربوکسیله و بیش از  $400 \mu\text{g/ml}$  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، پلی اتیلن گلیکول، سمیت سلولی، اصلاح سطحی، سلول‌های HEPG2

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

## مقدمه

از نقطه نظر شیمیایی، نانولوله‌های کربنی خنثی بوده و ذاتاً 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 به حساب 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]. ایمنی 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،

نانولوله‌های کربنی (CNTs)، خصوصیات فیزیکی-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، پلاسמיד و حتی siRNA) و طراحی بیوسنسورها یافته‌اند [۱]. از سال ۲۰۰۴، نانولوله‌های کربنی به-طور گسترده به‌عنوان حامل‌های دارویی برای انتقال درون سلولی داروهای شیمی درمانی، پروتئین‌ها و ژن‌ها مورد بررسی قرار گرفته‌اند.

<sup>۱</sup> گروه فیزیولوژی فارماکولوژی، انیستیتو پاستور تهران

<sup>۲</sup> گروه نانوتکنولوژی پزشکی، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی،

واحد تهران

<sup>۳</sup> استادیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

## \* نشانی نویسنده مسئول:

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

تلفن: ۰۹۱۳ ۳۶۲۰۱۴۷ دورنویس: ۰۳۱ ۵۵۵۴۶۰۳۰

پست الکترونیک: mostafa.saffary@gmail.com

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

مطالعات نشان داده‌اند که با پیوند کووالانسی PEG به سطح نانو-لوله‌های کربنی، وزن مولکولی افزایش می‌یابد. با بیشتر شدن شاخه‌های PEG، رفتار فارماکوکینتیک نانولوله‌های کربنی مطلوب-تر شده و در کاهش سمیت آن اثر بیشتری دارد [۱۱]. از دیگر مزایای استفاده از مشتقات پلی اتیلن گلیکول 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 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 رتیکولاندوتلیال نیز کاهش می‌یابد [۱۲، ۱۳]. در این تحقیق نیز سعی شد تا با تغییر در خصوصیات سطحی نانولوله‌های کربنی تک لایه از طریق اتصال مشتقات فسفو لیبید-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 ۰/۸ 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-COOH و PL-PEG2000-NH<sub>2</sub> 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-NH<sub>2</sub> و در لوله دیگر PL-PEG2000-COOH به صورت کامل در ۲ میلی‌لیتر آب دیونیزه حل شده به یک میلی‌گرم از نانولوله‌های کربنی تک لایه به هر کدام از دو لوله آزمایش منتقل گردید. مخلوط حاصل به مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق، در حمام سونیکاتور 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 هم‌وزن‌نیز 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، دیسپرسی، وجود و ماهیت کاتالیزور باقی مانده و هم‌چنین گروه‌های عاملی شیمیایی این نانومواد بستگی دارد. به همین علل و خصوصاً 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]. به طور 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 به طور قابل توجهی باعث کاهش میزان تکثیر سلول‌ها شده و با تاثیر بر چرخه سلولی، منجر به آپوپتوز و نکروز می‌شود [۶، ۷]. بر اثر عامل‌دار کردن، نانولوله‌های کربنی که به طور معمول به صورت 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<sup>2</sup>/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 به فرد 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 نانو-لوله‌ها وجود دارد، یکی از روش‌های رایج پوشش نانولوله‌های کربنی با پلی اتیلن گلیکول (PEG) است که به طور گسترده‌ای 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 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.

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 آزمون MTT:

نتایج نشان داد مواجهه سلول‌های کبدی 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 HEPG2 شده است ( $P < 0.05$ ). بیشترین درصد زنده ماندن در غلظت ۲۰۰ و ۱۰۰، 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 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 ۱۰۰  $\mu\text{g/ml}$  تغییرات مورفولوژیک 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 ۲۰۰  $\mu\text{g/ml}$  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  $\mu\text{g/ml}$  به بالا اثر سمی روی سلول‌ها داشت، اما غلظت‌های کمتر نتوانستند آسیب جدی در فعالیت حیاتی سلول‌ها ایجاد نمایند و ممکن است نشان دهنده

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 نانولوله‌های 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  $\mu\text{g/ml}$  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:

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

خالص و عامل‌دار) نیاز است تا آسیب‌های جدی دیده شود. این زمان در نانولوله خالص به صورت معنی‌داری کمتر بود ( $P < 0.05$ ) (جدول شماره ۲).

تأثیر تنظیمی بر رشد این سلول‌ها باشد که به زمان بیشتری برای مشاهده آن نیاز است. نتایج تست  $IC_{50}$  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

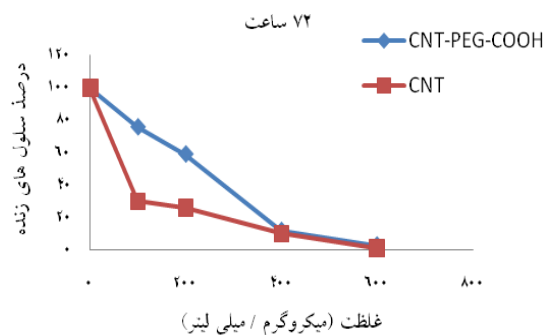
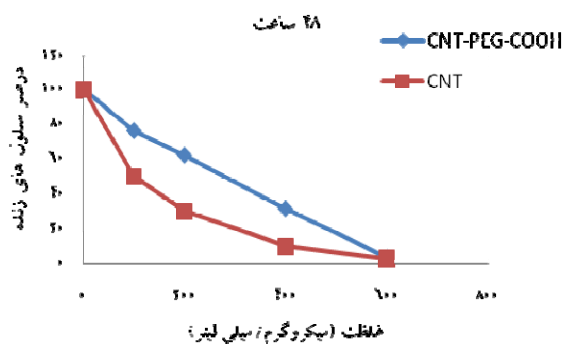
جدول شماره ۱- درصد زنده ماندن سلول‌های HEPG2 در ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت پس از مواجهه با PL-PEG5000-SWCNT-COOH

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	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  $IC_{50}$  به دست آمده از مجاورت سلول‌های HEPG2 با نانولوله‌های کربنی در زمان‌های مختلف

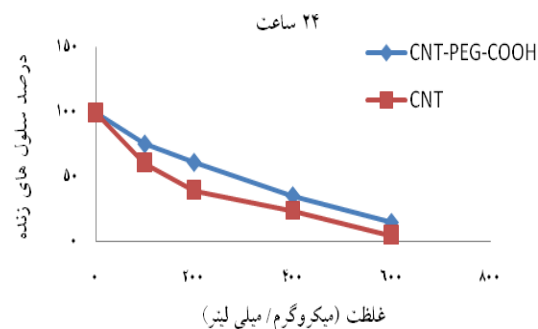
	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ ) after		
	۲۴ hours	۴۸ hours	۷۲ hours
Pure SWCNT	۱۵۰	۱۰۰	<۵۰
PL-PLG-SWCNT-COOH	۳۰۰	۲۸۰	۲۵۰

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



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

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 ۵۰ درصد در این زمینه موثر بوده و میزان  $IC_{50}$  را تا ۲۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر افزایش داد. با کاهش مدت مواجهه این اثر زیست‌سازگاری نیز کاهش یافت؛ به طوری که در مواجهه ۲۴ ساعته  $IC_{50}$  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 (نمودار شماره ۱).



میزان ۳ mg/kg، 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 ایمن است [۱۹]. اخیراً پگلیاسیون برای تعدیل و تغییر ترکیبات درمانی مانند پروتئین‌ها، پپتیدها، الیگونوکلوئیدها، 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 پگیلاسیون نه تنها 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 رتیکولاندوتلیال آسیب 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 پرسنل محترمی که در انجام این پژوهش ما را یاری نموده‌اند، به ویژه 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.

#### بحث

به طور 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 پوشاندگی 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 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 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 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

- [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, Bagonluri M. Carbon nanotubes as functional excipients 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 sp<sup>3</sup> 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.