Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ on Wednesday, July 24, 2013

مجله دانشکده بهداشت و انستیتوتحقیقات بهداشتی
دوره۱۰، شماره٤، صفحه ٤٤-۳۳

تعیین شاخص‌های سم شناسی کربن نانوتیوب و کریزوتایل بر اساس سمیت سلولی در سلول‌های اپیتلیال ریه انسان به صورت اینویترو

یوسف محمدیان: دانشجوی دوره کارشناسی ارشد، گروه بهداشت حرفه ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
سید جمال‌الدین شاه‌طاهری: استاد، گروه بهداشت حرفه‌ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران- نویسنده رابط: shahtaheri@tums.ac.ir
علی اکبر صبور یراقی: استادیار، گروه تغذیه و بیوشیمی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
حسین کاکویی: استاد، گروه بهداشت حرفه ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
محمد حاج آقا زاده: دانشجوی دوره دکتری، گروه بهداشت حرفه‌ای، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/٦/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۲٦

چکیده

زمینه و هدف : در این مطالعه سمیت سلولی کربن نانوتیوب تک جداره و چند جداره و کریزوتایل بر روی سلولهای اپیتلیال ریه انسان با استفاده از شاخص های سم شناسی : No Observable Adverse Effect Concentration (NOAEC) و Inhibitory Concentration 50 (IC50) و Total Lethal Concentration (TLC) مقایسه شد.

روش کار: سلولهای اپیتلیال ریه انسان در مواجهه با غلظت های مختلف (۱ تا ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) کربن نانوتیوبها وکریزوتایل به مدت ٦ و٢٤ ساعت قرار داده شدند و با استفاده از آزمون MTT سمیت سلولی بررسی شد. مقادیر شاخص های IC50، NOAEC و TLC با استفاده از آنالیز پروبیت بدست آمد.

نتایج : نتایج مطالعه نشان داد بین سمیت سلولی و غلظت مواجهه برای هر سه ماده از لحاظ آماری همبستگی معنی داری وجود دارد ($p<۰/۰۰۱$). کربن نانوتیوب چند جداره کمترین مقدار شاخص NOAEC و IC50 را در مقایسه با کربن نانوتیوب تک جداره و کریزوتایل داشت. میزان شاخص TLC کربن نانوتیوب تک جداره کمتر از کربن نانوتیوب چند جداره و کریزوتایل بود.

نتیجه گیری : سمیت سلولی کربن نانوتیوب چند جداره در غلظت های کم نسبت به کربن نانوتیوب تک جداره و کریزوتایل بیشتر می باشد و با توجه به اینکه مواجهه با این مواد عمدتا در غلظت های کم صورت می پذیرد، بنابرین سمیت سلولی کربن نانوتیوب چند جداره از اهمیت بالایی برخوردار است و باید مدنظر افرادی که در مواجهه با این ذرات هستند قرار بگیرد. با توجه به بررسی ها ی صورت گرفته می توان نتیجه گیری کرد که کربن نانوتیوب ها همانند الیاف کریزوتایل سمیت سلولی قابل ملاحظه ای بر سلولهای اپیتلیال ریه انسان دارند.

واژگان کلیدی : کربن نانوتیوب، کریزوتایل، سمیت سلولی، شاخص‌های سم شناسی، آزمون MTT

مقدمه

یکی از محصولات فناوری نانو، کربن نانوتیوب‌ها می‌باشند که ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و مکانیکی برجسته‌ای از قبیل قدرت کششی بالا، وزن فوق العاده کم، ثبات شیمیایی و حرارتی و ویژگی نیمه هادی الکترونیکی را دارا می‌باشند. این مواد پتانسیل زیادی برای کاربرد در بخش‌های مختلف صنعت از قبیل الکترونیک، ساختمان، هوافضا، شیمیایی، داروسازی و پزشکی دارند. با توجه به قابلیت کاربرد گسترده این مواد امکان مواجهه با ذرات نانو تیوب در مراکز تولیدی و تحقیقاتی به خصوص هنگام حمل و جابجایی این مواد وجود دارد. به طوری که در یک مطالعه ارزیابی مواجهه در یک فرآیند تولیدی

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ on Wednesday, July 24, 2013

مواجهه کارگران با نانوتیوب چند دیواره ۰/۳۳ میلی‌گرم بر مترمکعب گزارش گردیده است (Han et al. 2008). بنابراین انتظار می‌رود مواجهه‌ی شغلی و عمومی با کربن نانوتیوب‌ها به یکی از نگرانی‌های جدی در آینده نزدیک تبدیل شود. کربن نانوتیوب‌ها ساختاری فیبری شکل دارند و از لحاظ ابعاد فیزیکی و مقاومت زیستی (Bioresistence) شبیه به آزبست می‌باشند (Murr and Soto 2004). از اینرو محققان نگرانی‌هایی در خصوص اثرات فیبرهای نانوتیوب بر سلامتی انسان دارند و می‌کوشند تا اشتباه تاریخی مربوط به آزبست مجددا تکرار نشود. مطالعاتی در زمینه اثرات ناشی از مواجهه با کربن نانوتیوب و همچنین مقایسه اثرات سمیت سلولی کربن نانوتیوب‌ها و آزبست (کریزوتایل) به صورت in vitro و in vivo بر سلول‌های انسانی و حیوانی انجام شده است. با این وجود نتایج قطعی درباره اثرات کربن نانو تیوب‌ها بر سلامتی انسان از این مطالعات حاصل نگردیده است (Gracian et al. 2009).

با توجه به اینکه اولین و مهمترین راه مواجهه با گازها، بخارات و ذرات در محیط‌های شغلی دستگاه تنفس می‌باشد، در این مطالعه سلول ریه انسان به منظور ارزیابی اثرات سمیت سلولی نانوتیوب‌ها انتخاب شده است سمیت کربن نانوتیوب‌ها براساس مشخصات فیزیکی- شیمیایی، فرآیند تولید، ناخالصی‌ها و روش‌های تهیه محلول سوسپانسیون کربن نانوتیوب‌ها متفاوت می‌باشد (Masumi et al. 2010). در سال‌های اخیر کشور ایران به عنوان یکی از کشورهای در حال توسعه در زمینه نانوتکنولوژی و تولید کربن نانوتیوب‌ها مطرح می‌باشد. لذا مطالعه حاضر با هدف مقایسه میزان اثرات سمی نانوتیوب‌های چند جداره و تک جداره با آزبست (کریزوتایل) در سلول‌های ریه انسان (A549) به صورت in vitro با استفاده از شاخص‌های Total Lethal Concentration (TLC)، No Observable Adverse Effect Concentration (NOAEC) و Inhibitory Concentration 50 (IC50) انجام پذیرفت.

روش کار

مواد شیمیایی: کربن نانوتیوب تک جداره و چند جداره از پژوهشگاه صنعت نفت ایران خریداری شد. در این پژوهشگاه این مواد نانو با فرآیند رسوب بخار شیمیایی Chemical Vapor Deposition تولید می‌شوند. الیاف کریزوتایل از گروه بهداشت حرفه‌ای دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران تامین گردید در مرحله اول کریزوتایل آسیاب و به صورت پودر درآورده و متعاقبا در آب مقطر به حالت سوسپانسیون در آورده شد. برای ایجاد سوسپانسیون یکنواخت به مدت ۵ دقیقه در شیکر (Shaker) قرار داده شد. محلول سوسپانسیون از فیلتر غشایی (Memberan filter) با پورسایز ۰/۴۵ میکرون و قطر ۳۷ میلی‌متری عبور داده شد. فیلتر غشایی با طلا پوشش داده شد و با استفاده از میکروسکوپ SEM طول و قطر ۵۰ لیف از الیاف کریزوتایل تعیین و میانگین آنها محاسبه گردید.

معرف 3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) از شرکت سیگما آلدریچ آمریکا، محیط کشت سلول (DMEM)، مکمل‌های آن و Trypsin–EDTA از شرکت PAA استرالیا و Dimethylsulfoxide (DMSO) از شرکت مرک آلمان خریداری شد.

مشخصه‌یابی کربن نانو تیوب‌ها و الیاف کریزوتایل: بمنظور تعیین ویژگی‌های فیزیکی کربن نانو تیوب‌ها و الیاف کریزوتایل مانند طول و قطر از روش‌های میکروسکوپی الکترونی استفاده گردید. طول و قطر کربن نانوتیوب ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری بدست آمد. مساحت سطح ویژه کربن نانو تیوب‌ها نیز با استفاده از روش جذب نیتروژن در دمای ۷۷ درجه کلوین بدست آمد. طول و قطر الیاف کریزوتایل نیز با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی بدست آورده شد. بمنظور آنالیز عنصری الیاف کریزوتایل از میکروسکوپ الکترونی روبشی مجهز به دتکتور اسپکتروسکوپی اشعه ایکس (SEM-EDS) بهره گرفته شد.

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ on Wednesday, July 24, 2013

کشت سلول: سلول A459 (ATCC,C137)، که یک لاین سلولی سرطانی اپتلیال ریه انسان می‌باشد، از بانک سلولی ایران (انستیتو پاستور) تهیه گردید. سلول‌ها در محیط کشت Dulbeccos Modified Essential Medium (DMEM) حاوی L-glutamine، ۱۰درصد Foetal Bovine Serum (FBS) و ۱۰درصد Penicilin/streptomysin در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن انکوباتور کشت داده شدند.

سلول‌های A549 از لحاظ ویژگی‌های مورفولوژیک چسبنده (Adherent) هستند. بنابراین زمانی که سلول‌ها به حالت تلاقی (Confluence) رسیدند، محیط کشت از فلاسک برداشته و سلول‌ها با Phosphate buffered saline (PBS) شستشو داده شدند. سلول‌های چسبیده به کف فلاسک با استفاده از Trypsin/ EDTA در محیط کشت به حالت شناور درآورده شد. زیست پذیری سلولی (Cell Viability) با استفاده از روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو ارزیابی و تعداد سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری تعیین گردید.

دیسپرس کردن نانوذرات و کریزوتایل: سوسپانسیون‌های استوک با غلظت ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی-لیتر از کربن نانوتیوب تک جداره، کربن نانوتیوب چند جداره و کریزوتایل در محیط کشت حاوی ۰/۵ درصد DMSO حل شدند. سمیت سلولی محیط کشت حاوی ۰/۵ درصد DMSO بر روی سلول‌های اپیتلیال ریه انسان بررسی شد و هیچ گونه سمیت سلولی بر سلول-های اپیتلیال ریه‌ی انسان مشاهده نشد. به‌منظور تهیه غلظت‌های مورد تست از عمل اولتراسونه استفاده شد. قبل و بعد از اولتراسونه کردن، سوسپانسیون استوک به مدت ۱دقیقه با شیکر به هم زده شد. عمل الولتراسونه که ۲۰ دقیقه بطول انجامید شامل ٤ مرحله پیایی بود که در هر مرحله، سوسپانسیون ۵ دقیقه اولتراسونه و یک دقیقه با شیکر بهم زده می‌شد. سوسپانسیون استوک بلافاصله به طور سریالی به غلظت‌های مورد آزمایش (۱، ۱/۹۵، ۳/۹، ۷/۸، ۱۵/٦، ۳۱/۲۵، ٦۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۱۰۰، ۱۲۰۰، ۱۳۰۰، ۱٤۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) رقیق شد.

آزمون ارزیابی سمیت سلولی: به‌منظور ارزیابی سمیت سلولی از آزمون MTT استفاده شد. MTT یک نمک تترازولیوم محلول در آب است و هنگامی که این ترکیب در PBS آماده سازی می‌شود، ترکیب زرد رنگی ایجاد می‌کند. پس از افزودن MTT آماده سازی شده به سلول‌های کشت داده شده، حلقه MTT فقط در میتوکندری سلول‌های زنده توسط آنزیم هیدروژناز شکسته و به ترکیب نامحلول فورمازان تبدیل می‌گردد. بلورهای فورمازان در حلالی مانند DMSO حل شده و به رنگ ارغوانی ظاهر می‌شود که میزان جذب محلول در طول موج ۵۷۰ nm با استفاده از ریدر الیزا اندازه‌گیری می‌شود.

سلول‌ها به تعداد ۱۰۰۰۰ سلول در هر حفره پلیت ریخته شد، پلیت‌ها بمدت ۲٤ ساعت در انکوباتور قرار داده شد تا سلول‌ها در کف ثابت شوند، پس از ۲٤ ساعت، محیط رویی حفره‌ها کامل برداشته شد و با PBS شستشو داده شدند. غلظت‌های مختلف کربن نانوتیوب‌ها و کریزوتایل که در محیط کشت حاوی ۵ درصد سرم و محیط کشت بعلاوه‌ی DMSO آماده شده بود به حفره‌ها اضافه شد. دو عدد حفره به عنوان کنترل استفاده گردید. حفره اول IC_0 نامگذاری شد که فقط حاوی محیط کشت بود و دیگری IC_{100} نام داشت که محیط کشت حاوی سلول بود. به‌منظور حذف جذب زمینه‌ای ناشی از خود ذرات کربن نانوتیوب‌ها و کریزوتایل از غلظت‌های مورد تست نیز حفره کنترل در نظر گرفته شد. ۲٤ ساعت بعد از مواجهه محیط، مایه رویی حفره‌ها برداشته و هر حفره با ۱۰۰ میکرولیتر PBS شستشو داده شد. محیط بدون سرم به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به حفره‌ها افزوده شد، معرف MTT به مقدار ۱۰ میکرولیتر به هر یک از حفره‌ها اضافه شد. پلیتها ۳ ساعت در انکوباتور قرار داده شد و سپس محیط رویی حفره‌ها بیرون ریخته شد. از آنجایی که کریستال‌های آبی رنگ فورمازان در آب غیر محلول

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ on Wednesday, July 24, 2013

می‌باشند و بایستی قبل از رنگ سنجی توسط ماده‌ی حلالی نظیر DMSO به حالت محلول در آیند، ۲۰۰ میکرولیتر DMSO به هر حفره اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در شیکر قرار داده شدند. در نهایت جذب نوری محلول در طول موج ۵۷۰ با استفاده از دستگاه ریدر الیزا قرائت گردید.

با استفاده از میزان جذب در غلظت‌های مختلف کربن نانوتیوب‌ها وکریزوتایل شاخص‌های Total Lethal Concentration (TLC)، No Observable Adverse Effect Concentration (NOAEC) و Inhibitory Concentration 50 (IC50) بدست آورده شد.

آنالیز نتایج: آزمایش مربوط به هر غلظت سه بار تکرار شد و میانگین آنها بدست آمد. میانگین بدست آمده برای هر غلظت توسط آنالیز پروبیت و با استفاده از نرم افزار SPSS Version 16.0 آنالیز شد و شاخص های LC50، NOAEC و TLC محاسبه گردید. مقادیر شاخص‌هایNOAEC ، LC_{50} و TLC برابر غلظتی در نظر گرفته شد که مرگ و میر سلول‌ها در آنها به ترتیب ۱۰، ۵۰ و ۹۹ درصد بود. به‌منظور بررسی معنی‌داری اختلاف این شاخص‌ها در بین مواد نانو ساختار و در دو دوره زمانی مواجهه ٦ و ٢٤ ساعته از آزمون مقایسه t-test استفاده شد.

نتایج

مشخصات کربن نانو تیوب‌ها و الیاف کریزوتایل: طول کربن نانوتیوب‌های تک جداره و چند جداره مشترکا ۱۰ میکرومتر بود. در حالیکه قطر کربن نانوتیوب-های تک جداره ۱۰ نانومتر و کربن نانوتیوب‌های چند جداره ١٦ نانومتر بود. مساحت سطح ویژه کربن نانوتیوب‌های تک جداره و چند جداره به ترتیب ۳۰۳ و ۱۳۳ متر مربع به ازاء هر گرم آنها بود. آهن به عنوان ناخالصی عمده کربن نانوتیوب‌ها با میزان ۱۰ درصد تعیین گردید. در شکل ۱ تصاویر تهیه شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری از کربن نانو تیوب‌ها آورده شده است.

مشخصات الیاف کریزوتایل با استفاده از میکروسکوپ SEM بدست آورده شد، بطوریکه میانگین طول و قطر ۵۰ لیف مطالعه شده به ترتیب ۲۷/۳۹ و ۲/۹۳ میکرومتر بدست آمد. در شکل ۲ تصاویری از الیاف کریزوتایل که با استفاده از میکروسکوپ SEM تهیه شده است، آورده شده است. در شکل ۳ نیز آنالیز عنصری یک لیف کریزوتایل با استفاده از میکروسکوپ SEM-EDS نشان داده شده است.

تاثیر اولتراسونه کردن بر میزان حل شدن کربن نانوتویب‌ها در محلول: ویژگی غیر قابل حل بودن کربن نانوتیوب‌ها ممکن است منجر به چسبیدن ذرات به همدیگر (Aggregation) و آگلومراسیون (Agglomereation) در محلول‌های آبی بشود. بنابراین برای سوسپانسیون کامل کربن نانوتیوب‌ها باید اولتراسونه شوند. در شکل ٤ تاثیر اولتراسونه بر میزان حل شدن کربن نانوتیوب‌ها بعد از ۲۰ دقیقه اولتراسونه در محلول DMSO محیط کشت نشان داده شده است.

تعیین مقادیر شاخص‌های NOAEC، IC_{50} و TLC: به‌منظور بدست آوردن مقادیر شاخص‌های سمیت NOAEC، IC50 و TLC از آنالیز پروبیت استفاده شد. آنالیز پروبیت در بررسی سمیت مواد مختلف و مقایسه آنها در سم‌شناسی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در جدول ۱ مقادیر شاخص‌های سمیت دو نوع کربن نانوتیوب و الیاف کریزوتایل آورده شده است.

مقایسه شاخص‌های سم‌شناسی مواد نانو ساختار در بین آنها: به‌منظور مقایسه سمیت مواد شیمیائی مورد مطالعه با یکدیگر مقادیر شاخص‌های NOAEC، IC50 وTLC با استفاده از آزمون آماری t-test مورد آمون قرار گرفت. بنابراین مقادیر سه شاخص در دو دوره مواجهه ٦ و ٢٤ ساعت برای کربن نانوتیوب تک جداره با چند جداره، کربن نانوتیوب تک جداره با کریزوتایل و کربن نانوتیوب چند جداره با کریزوتایل آزمون گردید (جدول ۲). نتایج

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ on Wednesday, July 24, 2013

آزمون t-test نشان داد که تنها در دوره مواجهه ٢٤ ساعته مقادیر شاخص NOAEC (کربن نانوتیوب تک جداره – چند جداره و کربن نانوتیوب تک جداره – کریزوتایل) و IC50 (کربن نانوتیوب تک جداره- چند جداره) از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری نداشتند. در بقیه موارد مقایسه مقادیر شاخص‌ها در دو دوره زمانی ٦ و ٢٤ ساعته در بین مواد نانوساختار مطالعه شده اختلاف معنی-داری نشان نداد.

مقایسه شاخص‌های سم‌شناسی مواد نانو ساختار در دو دوره زمانی مواجهه ٦ و ٢٤ ساعته: علاوه بر مقایسه آماری شاخص‌های سمیت در بین مواد نانوساختار مطالعه شده به تفکیک دوره‌های زمانی مواجهه، مقایسه آماری شاخص‌های سم‌شناسی در بین دو دوره زمانی مواجهه برای تک تک مواد نانوساختار با استفاده از آزمون آماری t-test بعمل آمد (جدول ٣). همانطور که ملاحظه می‌گردد به جز شاخص NOAEC کربن نانوتیوب چند جداره، میزان شاخص‌های NOAEC، IC50 و TLC هر سه ماده در دو دوره‌ی مواجهه ٦ و ٢٤ ساعته از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری داشتند.

بحث

ویژگی غیر قابل حل بودن کربن نانوتیوب‌ها ممکن است منجر به چسبیدن ذرات به همدیگر (Agglomeration) در محلول‌های آبی گردد (Hirano et al. 2010) تاثیر آگلومره شده کربن نانوتیوب‌ها بر سمیت آنها در مطالعات In vitro و In vivo مورد بررسی قرار گرفته است. در یک مطالعه تاثیر آگلومراسیون کربن نانوتیوب‌ها بر سمیت سلولی نشان داده شد، به‌طوری که سمیت کربن نانوتیوب‌های خوب دیسپرس شده بیشتر از کربن نانوتیوب‌های آگلومره شده بود (Shaobin et al. 2009).

ذرات بزرگ کربن نانوتیوب که آگلومره شده‌اند نمی‌توانند وارد سلول شوند ولی ذرات ریز که به طور مجزا هستند وارد سلول می‌شوند که ممکن است با میکروسکوپ نوری و حتی TEM نیز دیده نشوند. مطالعات کمی در مورد آگلومراسیون و نفوذ (Internalization) کربن نانوتیوب‌ها انجام شده است. در مطالعات Monterio-Rivier و همکارانش و Bussy و همکارانش نشان داده شد که سمیت سلولی ناشی از کربن نانوتیوب چند جداره بر سلول‌های کراتینوسیت اپیدرمال انسان ناشی از نفوذ (Internalization) این ذرات به داخل سلول می‌باشد (Monteiro-Riviereand et al. 2005; Bussy et al. 2008).

در این مطالعه در مرحله اول بر اساس مطالعات Maria Davoren و همکارانش (Davoren et al. 2007) از محیط کشت حاوی ٥ درصد سرم به‌منظور دیسپرس کردن کربن نانوتیوب‌ها استفاده شد و به مدت ١٠ دقیقه اولتراسونه گردید. با این وجود ذرات کربن نانوتیوب در محلول مورد استفاده خوب دیسپرس نشدند و آگلومراسیون صورت گرفت. احتمالا دلیل اینکه کربن نانوتیوب‌ها مورد استفاده در این مطالعه در مقایسه با مطالعه قبلی در محلول حاوی ٥ درصد سرم به خوبی دیسپرس نشدند بدلیل تفاوت در سایز ذرات مورد استفاده و فرآیند تولید باشد. به طوریکه قطر ذرات کربن نانوتیوب چند جداره و تک جداره مورد استفاده در مطالعه حاضر به ترتیب ١٦ و ١٠ نانومتر بود و در مطالعه Davoren و همکارانش ١ نانومتر بود. بنابراین برای دیسپرس کردن کامل ذرات بر اساس مطالعه(Masumi et al. 2010) از محیط کشت حاوی DMSO استفاده شد. غلظت نهایی DMSO در محیط کشت ٠/٥ درصد بود. این محلول به مدت ٢٠ دقیقه اولتراسونه شد. با استفاده از این محلول ذرات به خوبی دیسپرس و برای مطالعه از این محلول استفاده گردید.

در این مطالعه مقدار شاخص NOAEC و IC50 کربن نانوتیوب چند جداره نسبت به کربن نانوتیوب تک جداره در هر دو دوره‌ی مواجهه ٦ و ٢٤ ساعته کمتر بود. بنابراین کربن نانوتیوب چند جداره سمی‌تر از کربن نانوتیوب تک جداره است.

مقدار شاخص NOAEC و IC50 کربن نانوتیوب چند جداره نسبت به کریزوتایل در هر دو دوره‌ی مواجهه ٦ و ٢٤ ساعته کمتر بود (جدول۱) بنابراین کربن نانوتیوب چند جداره سمی‌تر از کریزوتایل است. مقدار شاخص NOAEC در کربن نانوتیوب تک جداره نسبت به کریزوتایل در هر دو دوره‌ی مواجهه ٦ و ٢٤ ساعته بیشتر است (جدول۱)، بنابرین سمیت سلولی کریزوتایل در غلظت‌های پایین بیشتر از کربن نانوتیوب تک جداره می‌باشد. مقدار شاخص IC50 و TLC در کربن نانوتیوب تک جداره در هر دو دوره‌ی مواجهه ٦ و ٢٤ ساعته نسبت به کریزوتایل کمتر می‌باشد (جدول۱)، بنابراین سمیت سلولی کربن نانوتیوب تک جداره در غلظت‌های بالا نسبت به کریزوتایل بیشتر می‌باشد.

در مطالعه‌ای که Lone در سال ۲۰۱۱ بر روی سمیت کربن نانوتیوب چند جداره بر روی سلول‌های برونشیال اپیتلیال ریه انسان انجام دادند، از دو نوع کربن نانوتیوب چند جداره که یکی تولید کشور ژاپن و دیگری تولید کشور نروژ بود، استفاده کردند و سمیت این دو کربن نانوتیوب‌ها را با کروسیدولیت مقایسه کردند. نتایج مطالعه نشان داد که کربن نانوتیوب چند جداره تولید کشور ژاپن از کروسیدولیت و کربن نانوتیوب چند جداره تولید کشور نروژ سمی‌تر است (Lone 2011). کربن نانوتیوب چند جداره تولید شده در کشور ژاپن توسط روش رسوب بخار شیمیایی تولید شده بود که کربن نانوتیوب‌های مورد استفاده در این مطالعه نیز با این روش تولید شده‌اند.

نتایج نشان می‌دهد که سمیت سلولی کربن نانوتیوب تک جداره نسبت به کربن نانوتیوب چند جداره و کریزوتایل وابستگی بیشتری به زمان دارد. به عنوان مثال شاخص IC50 کربن نانوتیوب تک جداره بعد از ٦ و ٢٤ ساعت مواجهه به ترتیب ۱۹۹٦ و ۱۳۲ میکروگرم بدست آمد و بین این دو مقدار اختلاف زیادی وجود دارد. این شاخص در مورد کربن نانوتیوب چند جداره بعد از ٦ و ٢٤ ساعت مواجهه به ترتیب ٤٤٢ و ١١٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. اختلاف این دو مقدار در مقایسه با نانوتیوب تک جداره بسیار کم می‌باشد (جدول ۱).

نتیجه گیری

کربن نانوتیوب‌ها یکی از محصولات فن آوری نانو می‌باشند که ویژگی‌های فوق العاده‌ای دارند بنابراین می‌تواند کاربردهای زیادی در صنایع مختلف داشته باشد. از طرفی سمیت این مواد نگرانی‌هایی را ایجاد کرده است. فاکتورهای موثر بر سمیت کربن نانوتیوب‌ها مشخصات فیزیکی و شیمیایی آنها شامل سایز ذرات، مساحت سطح ویژه و ناخالصی فلزات کربن نانوتیوب‌ها می‌باشد. روش‌های دیسپرس کردن ذرات کربن نانوتیوب نیز بر سمیت این مواد تاثیرگذار است. کربن نانوتیوب‌ها از لحاظ مشخصات فیزیکی شبیه الیاف آزبست بوده و به صورت فیبر هستند. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان نتیجه‌گیری کرد که کربن نانوتیوب‌ها همانند الیاف کریزوتایل سمیت سلولی قابل ملاحظه‌ای بر سلول‌های اپیتلیال ریه انسان دارند و باید در نظر داشت که غلظت و مدت زمان مواجهه می‌تواند در تاثیرگذاری بر سلول‌های اپیتلیال ریه انسان نقش قابل ملاحظه‌ای داشته باشد. بنابراین ملاحظات ایمنی و بهداشت هنگام مصرف و کار با کربن نانوتیوب‌ها باید در نظر گرفته شود تا تجربیات تلخ ماده‌ی شیمیایی آزبست تکرار نشود.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به کد ۱۵۱۹٦ می‌باشد. بنابراین از حمایت و پشتیبانی دانشگاه علوم پزشکی تهران قدردانی می‌شود.

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ on Wednesday, July 24, 2013

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ on Wednesday, July 24, 2013

جدول۱ – مقادیر شاخص های NOAEC، IC50 و TLC کربن نانو تیوب ها و الیاف کریزوتایل

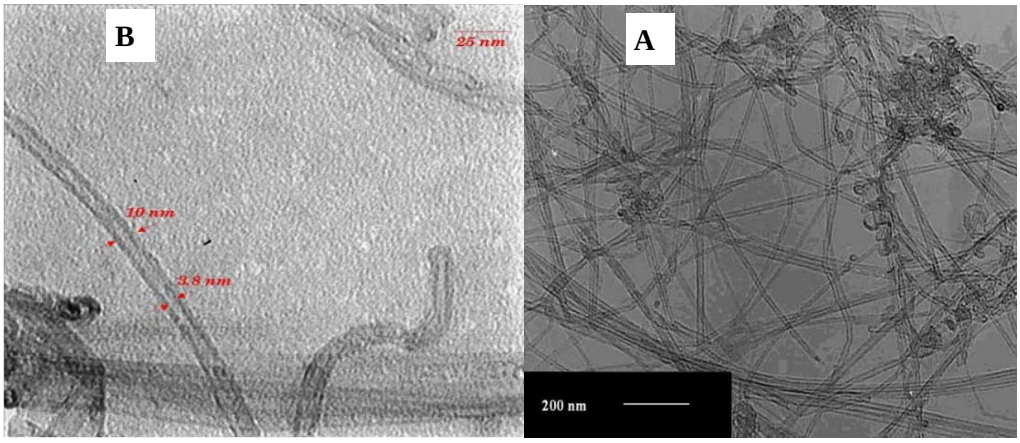
شاخص سمیت	نانوتیوب چند جداره		نانوتیوب تک جداره		کریزوتایل	
ساعت	٦	٢٤	٦	٢٤	٦	٢٤
NOAEC (µg/ml)	۰/۳	۰/٤	۳٤	۳	۱۷/۵	۲/۵
IC50 (µg/ml)	٤٤٢	۱۱٤	۱۹۹٦	۱۳۲	۲۰۹۹	۵۱٦
TLC (mg/ml)	۵۸۰۰۰۰	۳۱۰۰	۳۰۰۰	۱۵۰	۱۳۰۰۰	۸۲۰۰

جدول۲– مقایسه آماری مقادیر شاخص NOAEC، IC50 و TLC برای کربن نانوتیوب ها و کریزوتایل در دو دوره ی مواجهه ی ٦ و ٢٤ ساعته

شاخص سم شناسی	ماده نانوساختار	نتیجه آزمون t تست	
		مواجهه ٦ ساعته	مواجهه ٢٤ ساعته
NOAEC	MWCNT-SWCNT	p<۰/۰۱	p=۰/۰۹
	MWCNT-chrysotile	p<۰/۰۱	p<۰/۰۱
	SWCNT-chrysotile	p<۰/۰۱	p=۰/۰٤۸
IC50	MWCNT-SWCNT	p<۰/۰۱	p=۰/۰۹
	MWCNT-chrysotile	p<۰/۰۱	p<۰/۰۱
	SWCNT-chrysotile	p<۰/۰۱	p<۰/۰۱
TLC	MWCNT-SWCNT	p<۰/۰۱	p<۰/۰۱
	MWCNT-chrysotile	p<۰/۰۱	p<۰/۰۱
	SWCNT-chrysotile	p<۰/۰۱	p<۰/۰۱

جدول۳ – مقایسه آماری مقادیر شاخص های سم شناسی مواد نانوساختار در دو دوره مواجهه ٦ و ٢٤ ساعته

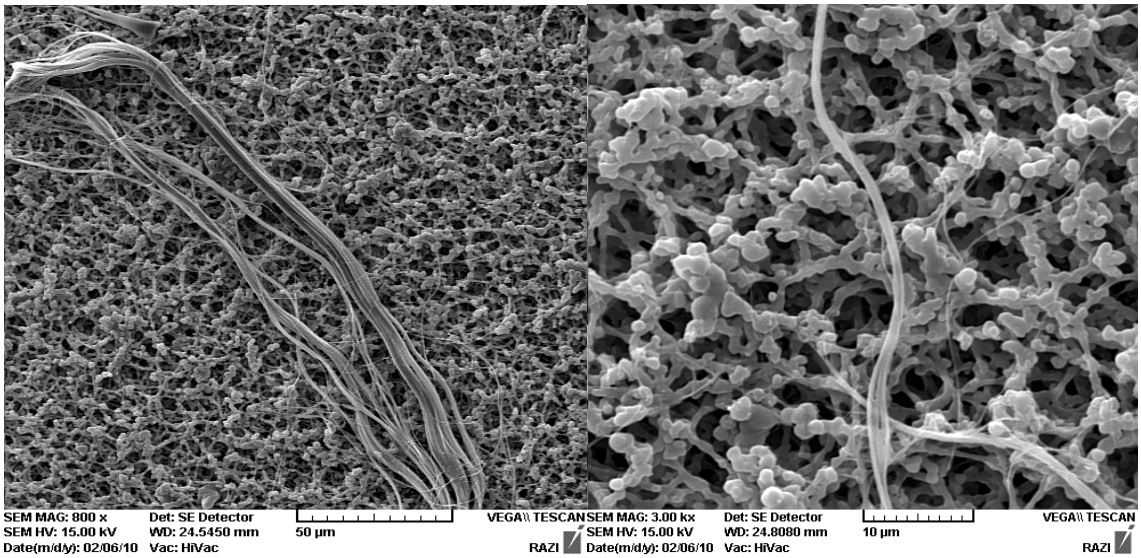
ماده نانوساختار	شاخص سمیت	مقدار شاخص در مدت زمان مواجهه		نتیجه آزمون t
		٦	٢٤	تست
کربن نانوتیوب چند جداره	(µg/ml) NOAEC	۰/۳	۰/٤	p= ۰/۲۸
	(µg/ml) IC50	٤٤٢	١١٤	p <۰/۰١
	(mg/ml) TLC	٥٨۰۰۰۰	۳١۰۰	p <۰/۰١
کربن نانوتیوب تک جداره	(µg/ml) NOAEC	۳٤	۳	p <۰/۰١
	(µg/ml) IC50	١٩٩٦	١۳۲	p <۰/۰١
	(mg/ml) TLC	۳۰۰۰	١٥۰	p <۰/۰١
کریزوتایل	(µg/ml) NOAEC	١٧/٥	۲/٥	p <۰/۰١
	(µg/ml) IC50	۲۰۹۹	٥١٦	p <۰/۰١
	(mg/ml) TLC	١۳۰۰۰	۸۲۰۰	p <۰/۰١



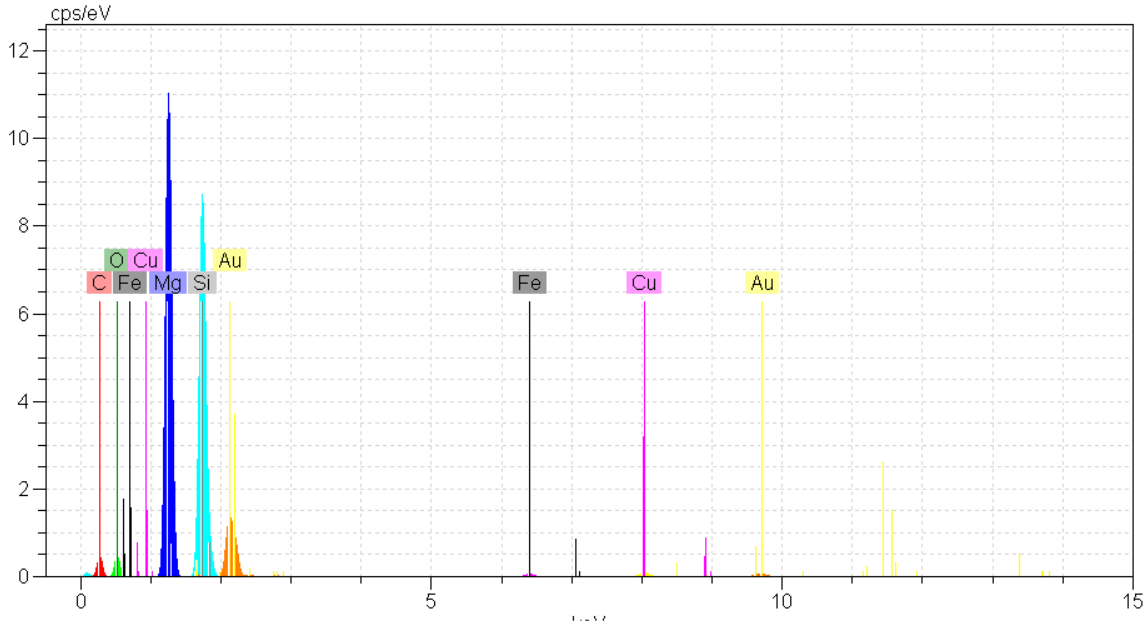
شکل۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی کربن نانوتیوب تک جداره(A) و چند جداره (B)

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ on Wednesday, July 24, 2013

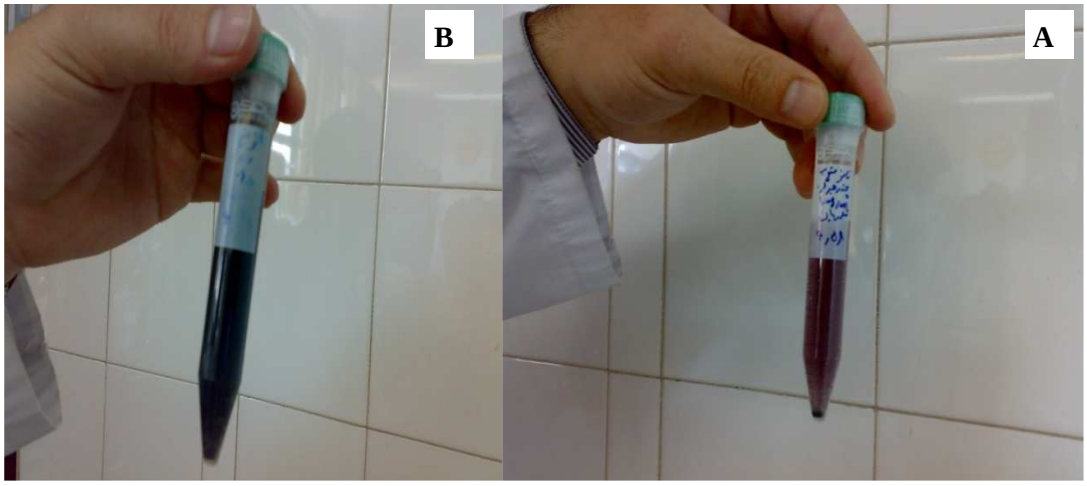
Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ on Wednesday, July 24, 2013



شکل۲- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی تهیه شده از الیاف کریزوتایل



شکل ۳ – آنالیز عنصری یک لیف کریزوتایل با استفاده از میکروسکوپ SEM-EDS



شکل٤- تاثیر اولتراسونه بر میزان حل شده کربن نانوتیوب چند جداره، قبل از اولتراسونه(A) و بعد از اولتراسونه(B)

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ on Wednesday, July 24, 2013

References

Bussy, C., Cambedouzou, J., Lanone, S., Leccia, E., Heresanu, V., Pinault, M., Mayne-L'hermite, M., Brun, N., Mory, C., Cotte, M., Doucet, J., Boczkowski, J. and Launois, P., 2008. Carbon Nanotubes in Macrophages: Imaging and Chemical Analysis by X-ray Fluorescence Microscopy. Nano Lett.

Davoren, M., Herzog, E., Casey, A., Cottineau, B., Chambers, G., Byrne, HJ. and Lyng, FM., 2007. In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells, *Toxicol In Vitro*, **21**(3), pp. 438–448.

Gracian, T, Nagender Reddy, P. and Josef, H., 2009. Carbon nanotubes: toxicological impact on human health and environment, *J Appl Biomed*, **7**(1), pp. 1–13.

Han, JH., Lee, EJ., Lee, JH., So, KP., Lee, YH., Bae, GN., Lee, SB., JI., JH., Cho, MH. and Yu, IJ., 2008. Monitoring multiwalled carbon nanotube exposure in carbon nanotube research facility, *Inhal Toxicol*, **20**(8), pp.741-749.

Hirano, S., Fujitani, Y., Furuyama, A., Kanno., 2010. Uptake and cytotoxic effects of multi-walled carbon nanotubes in human bronchial epithelial cells, *Toxicol Appl Pharmacol*, **249**(1), pp. 8-15.

Lone Nilson., 2011. Cytotoxic and inflamatory responses of human lung cells exposed to multi-walled carbon nanotubes. Thesis of MSc degree. Norvegian University of Science and technology (NTNU).

Masumi, A., Toshiaka, S., Toshie, S., Mttsutoshi, T., Shiegeki, k., Kasuke, N., Heihachiro, A. and Shojo, F., 2010. Genotoxicity and Cytotoxicity of Multi-wall Carbon Nanotubes in Cultured Chinese Hamster Lung Cells in Comparison with Chrysotile A Fibers, *J Occup Health*, **52**(3), pp. 155_166.

Monteiro-Riviere, N., Nemanich, R., Inman, A., Wang, Y. and Riviere, J., 2005. Multi-

walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes, *Toxicol Letters*, **15**5(3), pp. 377–384.

Murr, LE. and Soto, KF., 2004. TEM comparision of chrysotile (asbestos) nanotubes and carbonnanotubes, *J Matre Sci Lett*, **39**(15), pp. 4941-4947.

Shaobin, L., Li, W., Lin, H., Ning, F., Matthew, W., Rong, X., Yanhui, Y. and Yuan, C., 2009. Sharper and faster "nano darts" kill more bacteria: a study of antibacterial activity of individually dispersed pristine single-walled carbon nanotube, *ACS Nano*, **3**(12), pp. 891-902.

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ on Wednesday, July 24, 2013

Determination of toxicological indexes of carbon nanotubes and Chrysotile according to invitro cytotoxicity on Human Lung epithelium cells

Mohammadian, Y., MSPH. **Student, Department of Occupational Health, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran**
Shahtaheri, SJ., Ph.D. **Professor, Department of Occupational Health, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran- Corresponding author: shahtaheri@tums.ac.ir**
Saboor Yaraghi, A., Ph.D. **Assistant Professor, Department of Nutrition and Biochemistry, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran**
Kakooei, H., Ph.D. **Professor, Department of Occupational Health, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran**
Hajaghazadeh, M., Ph.D. **Student, Department of Occupational Health, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran**

Received: Sep 3, 2012 **Accepted: Jan 16, 2013**

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ on Wednesday, July 24, 2013

ABSTRACT

Background and aim: In this study the cytotoxicity to human epithelial lung cells of single-walled carbon nanotubes, multi-walled carbon nanotubes and chrysotile was compared based on the following cytotoxicity indices: no observable adverse effect concentration (NOAEC), inhibitory concentration 50 (IC50), and Total Lethal Concentration (TLC).
Materials and Methods: Human epithelial lung cells were exposed to different concentrations (1 to 1500 µg/ml) of carbon nanotubes and chrysotile for 6 and 24 hours. Cytotoxicity was assessed using the MTT assay. NOAEC, IC50, and TLC idices were determined by probit analysis.
Results: The results showed statistically significant correlations ($p<0.001$) between cytoxicity and exposure concentration in the case of all the three compounds. The NOAEC and IC50 indices were lowest for the multi-walled carbon nanotubes, while the single-walled carbon nanotubes showed the lowest TLC index.
Conclusion: Cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes at low concentrations was higher than that of single-walled carbon nanotubes and chrysotile. This would mean that exposure to this compound occurs at low concentrations. Thus, cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes is a cause for concern. It can be concluded, then, that, like chrysotile fibers, crabon nanotubes are also considerably toxic to human epithelial lung cells.

Key words: Carbon nanotubes, Chrysotile, Cytotoxicity, Toxicological indexes, MTT assay