

---

## EFECTELE RENALE ALE ADMINISTRĂRII SUBCUTANATE DE NANOTUBURI DE CARBON FUNCȚIONALIZATE CU ADN MONOCATENAR

TEODORA MOCAN<sup>1</sup>, CORNEL CATOI<sup>2</sup>, ALEXANDRU RADU BIRIS<sup>3</sup>, ȘTEFANIA ȘIMON<sup>3</sup>, FLAVIU TĂBĂRAN<sup>2</sup>, LUCIA AGOȘTON-COLDEA<sup>4</sup>, DOINA DAICOVICIU<sup>1</sup>, NICOLETA DECEA<sup>1</sup>, REMUS MOLDOVAN<sup>1</sup>, LUCIAN MOCAN<sup>5</sup>, ADRIANA MUREȘAN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Catedra de Fiziologie, UMF Cluj-Napoca

<sup>2</sup>Catedra de Morfopatologie, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară, Cluj-Napoca

<sup>3</sup>Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare pentru Tehnologii Izotopice și Moleculare, Cluj-Napoca

<sup>4</sup>Clinica Medicală II, UMF Cluj-Napoca

<sup>5</sup>Departamentul de Nanomedicină, Clinica Chirurgie III, Cluj-Napoca

### Rezumat

**Introducere.** Deși nanotuburile de carbon au fost propuse pentru variate aplicații medicale, datele legate de securitatea acestora in vivo sunt limitate și controversate. Scopul cercetării a fost evaluarea in vivo a efectelor nanomaterialului asupra echilibrului oxidativ la nivel renal.

**Material și Metodă.** Soluțiile de nanotuburi de carbon funcționalizate cu ADN monocatenar (ADN-CNT) au fost obținute prin sonicare. Lotului test (șobolani Wistar de 180±20 g) i s-a injectat 1,5 ml soluție ADN-CNT (390 g/l). Lotul martor a fost injectat subcutanat cu 1,5 ml ser fiziologic. S-a determinat prezența la nivel renal a ADN-CNT prin tehnici de microscopie optică. S-au dozat nivelele de proteină carbonilată (PC) și donorii de hidrogen (DH) în țesutul renal la 3, 6, 24 și 48 ore după administrare.

**Rezultate.** Nu s-a detectat prezența nanotuburilor de carbon la nivel renal la nici unul dintre intervalele de timp de urmărire, exceptând primele 3 ore post-administrare. Nivelele PC și DH au prezentat o evoluție fluctuantă, nivelele fiind nesemnificativ diferite față de nivelul lotului control ( $p > 0,05$  pentru toate momentele de timp).

**Concluzie.** Injectarea subcutanată de ADN-CNT nu determină cantonarea pe termen lung a nanomaterialului la nivel renal. Post-injectare, nanomaterialul nu induce efecte semnificative asupra echilibrului oxidativ la nivel renal, în intervalul 3-48 ore post-injectare.

**Cuvinte cheie:** nanotuburi de carbon, ADN, stres oxidativ, țesut renal.

## RENAL EFFECTS FOLLOWING SUBCUTANEOUS ADMINISTRATION OF DNA-FUNCTIONALIZED CARBON NANOTUBE SOLUTIONS

### Abstract

**Background.** Although intensively proposed for medical applications lately, carbon nanotubes still lack effect evaluation after their in vivo administration. Our aim was to assess the in vivo effects over oxidative equilibrium within renal tissue.

**Material and methods.** Single-stand-DNA-single-wall-carbon-nanotube solution (DNA-CNT) was obtained through sonication. Male Wistar rats (180±20 g) were s.c. injected with 1,5 ml of 390 g/L DNA-CNT solutions. Controls were s.c. injected with 1,5 ml serum. In all groups protein carbonyl (PC), hydrogen donors (HD) assessed in renal tissue at 3, 6, 24 and 48 hours after administration.

---

**Results.** Presence of carbon nanotubes within kidney tissue could not be detected at any of the follow-up intervals, except for the first 3 hours from administration. PC and HD levels presented an inhomogenous evolution. However, marker levels remained unsignificantly different as compared to controls ( $p > 0.05$  for all time points).

**Conclusion.** Subcutaneous injection of DNA-CNT does not induce long term aggregation at kidney site. Nanomaterial does not generate significant effects over oxidative equilibrium within 3-48 hours interval post injection.

**Keywords:** carbon nanotubes, DNA, oxidative stress, kidney tissue.

---

## Introducere

Nanotuburile de carbon reprezintă aranjamente hexagonale de atomi de carbon, de formă cilindrică și de dimensiuni variate între 0,9-1,2 nm. Datorită proprietăților fizico-chimice unice, nanomaterialul și-a găsit numeroase aplicații în medicină, incluzând diagnosticul tumoral, terapia anti-neoplazică sau antimicrobiană, biosenzorii, echipamentele și instrumentația medicală [1-2].

Totuși, informațiile legate de securitatea nanotuburilor de carbon sunt limitate. Prezentul studiu își propune evaluarea efectelor asupra echilibrului oxidativ la nivel renal, a administrării subcutanate de nanotuburi de carbon funcționalizate cu ADN monocatenar.

## Material și metodă

### Prepararea soluțiilor de injectat

Nanotuburile de carbon cu perete unic au fost sintetizate prin metoda CCVD (Catalytic Chemical Vapor Deposition), cu încălzire inductivă (850°C, acetilenă), utilizând un catalizator de tip Fe:Mo:MgO (1,5:0,15:98,35 wt %). După sinteză, nanotuburile au fost supuse la 2 etape succesive de purificare utilizând HCl. Metoda de sinteză și purificare a fost descrisă în detaliu anterior [3-5].

În scopul dispersării în soluție apoasă, nanotuburile au fost funcționalizate cu ADN monocatenar (Sigma-Aldrich) prin ultrasonare (7 ore), utilizând un sonicator tip „cup-horn” (Sonics, Vibra-Cell VC 505, 500 Watt, 20 kHz) în baie cu gheață timp de 15 minute la o amplitudine de 30%. S-au îndepărtat nanotuburile nedispersate prin centrifugare (1 oră, 4000 g). S-a determinat concentrația supernatantului prin citirea absorbției, utilizând un spectroforometru Jasco V-570 UV-vis-NIR. S-a estimat concentrația finală a soluției ca fiind 390 mg/L, utilizând curbe etalon (soluții de concentrație cunoscută).

Înainte de administrării s-a ajustat tonicitatea soluției prin adaos de NaCl până la concentrația de 0,9% NaCl.

### Administrarea soluțiilor

Experimentul a fost realizat pe 25 de șobolani Wistar (180±20 grame). Lotul test a fost compus din 20 de animale. Acestea li s-a administrat prin injectare subcutanată 1,5 ml din soluția preparată după metoda descrisă mai sus. Lotul a fost sacrificat seriat la următoarele

intervale: 3, 6, 24 și 48 ore. Lotul martor a constatat din 5 animale. Acestea li s-a injectat subcutan 1,5 ml soluție ser fiziologic. Animalele aparținând lotului martor au fost sacrificate la 3 ore post-injectare. Imediat după sacrificare s-a recoltat țesut renal.

### Tehnici microscopice de detecție

Analiza țesuturilor s-a realizat după colorarea cu hematoxilină-eozină, utilizând un microscop Olympus BX51, dotat cu sistem de achiziție Olympus SP350 acquisition system.

### Dozări biochimice

#### Proteinele carbonilate (PC)-[6]

Tehnica s-a bazat pe reacția cu un reactiv clasic pentru dozarea carbonililor: 2,4-dinitrofenil hidrazina. S-a indus formarea 2,4-dinitrofenilhidrazonului de culoare galbenă care poate fi determinată spectrofotometric. Probele serice au fost supuse reacției cu o soluție de 2,4-dinitrofenilhidrazină 10 mM în HCl 2,5 N, timp de 1 oră la temperatura camerei și la întuneric. După tratarea lor cu acid tricloracetic 20% și separarea precipitatului obținut prin centrifugare, acesta a fost spălat de trei ori cu un amestec de acetat de etil și alcool etilic absolut 1:1 (v/v). În continuare s-a dizolvat precipitatul proteic în clorhidrat de guanidină 6 M. În probele astfel obținute s-a determinat concentrația de proteină prin măsurarea extincției la 280 nm. Ulterior, pe aceleași probe s-a citit și extincția la 355 nm, lungime de undă corespunzătoare absorbției hidrazonelor. Concentrația de proteină din probele de analizat s-a obținut pe baza unei curbe de etalonare realizată cu soluții de albumină de concentrații cunoscute în clorhidrat de guanidină 6 M. În paralel cu probele tratate cu 2,4-dinitrofenilhidrazină s-au prelucrat și probe blanc care se tratează numai cu HCl 2,5 N. Citirile extincțiilor s-au realizat față de aceste probe. Evaluarea concentrației de carbonil s-a realizat conform formulei:  $C = \text{Abs}_{355} \times 45,45 \text{ nmol/ml}$ .

#### Capacitatea de donator de hidrogen (DH)-[7]

Măsurarea capacității de donator de hidrogen a serului s-a bazat pe reducerea radicalului stabil 1,1-difenilpicrilhidrazil (DPPH) de către o serie de componente antioxidante, neenzimatice ale acestuia: glutatión, tocoferol, acid ascorbic. Această reducere a putut fi urmărită prin schimbarea culorii de la violet la galben pal, monitorizată prin modificarea absorbției la 520 nm. Probele de ser au fost diluate cu tampon fosfat 10 mM, pH

7,4. S-a adăugat apoi soluția 0,1 mM de DPPH, s-a lăsat timp de 30 min la temperatura camerei și s-a citit extincția față de blancuri care constau în probe tratate în același fel, dar în care a fost adăugat metanol absolut în locul soluției de DPPH. În paralel, s-a realizat determinarea extincției unor probe de control care nu conțin ser, ci un volum corespunzător de tampon fosfat. Capacitatea de donor de hidrogen s-a măsurat în Inhibiție %, față de probele de control, conform următoarei formule de calcul:  $\text{Inhibiție\%} = (\text{Extincție control} - \text{Extincție probă de ser}) / \text{Extincție control} \times 100$ .

#### Metode statistice

Normalitatea datelor a fost testată utilizând testul Kolmogorov-Smirnov. Nivelele înregistrate la lotul martor au fost considerate ca valori de referință (momentul 0 ore). Pornind de această valoare bazală, s-a recurs la exprimarea procentuală în evoluție a markerilor analizați. Comparațiile între nivelele lotului test la diferite intervale și valoarea de referință s-au realizat utilizând testul Mann-Whitney U Test. S-au realizat corelații bivariate între nivelele parametrilor numerici utilizând calculul coeficientului Spearman. S-a ales pragul de semnificație statistică  $p < 0,05$ . Datele au fost analizate cu ajutorul pachetului statistic SPSS 17.0 (Chicago, IL).

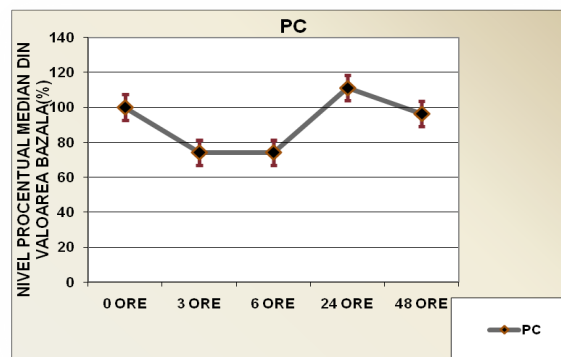
#### Rezultate

##### Detecția nanotuburilor de carbon la nivel renal

Utilizând tehnici microscopice comparative între loturile de studiu s-a determinat prezența nanotuburilor de carbon la nivel renal la 3 ore după injectare. După acest moment de timp s-a evidențiat absența post injectare a nanotuburilor de carbon de la nivel renal la toate intervalele de urmărire (6, 24, respectiv 48 de ore).

##### Nivelul proteinelor carboniate (PC)

Nivelele PC din omogenatul tisular renal au prezentat variații în dinamică. Figura 1 prezintă evoluția parametrului în decurs de 48 ore post-administrație. Nivelul median al variabilei a înregistrat o scădere de până la 74,07% din nivelul inițial, valoare menținută și la 6 ore post-administrație. Valorile au prezentat, după acest interval o revenire, atingând nivele de 110% din cele bazale la 24 de ore. La finalul intervalului, nivelul parametrului s-a situat la 96,3% din valoarea inițială. Comparațiile valorilor PC înregistrate la diverse interval de timp cu cele inițiale au fost nesemnificative (3 ore:  $p=0,564$ ; 6 ore:  $p=0,476$ ; 24 ore:  $p=0,224$ ; 48 ore:  $p=0,854$ , Tabelul 1).

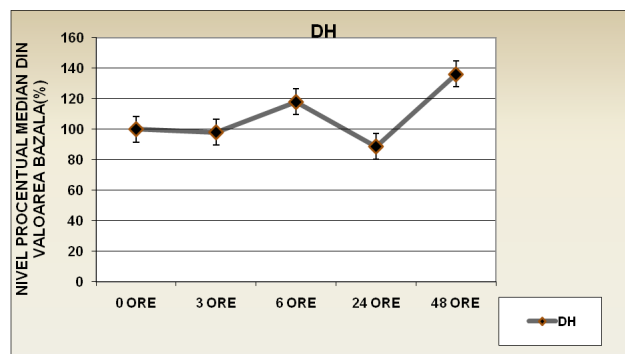


**Fig. 1.** Dinamica nivelului proteinelor carboniate la nivelul țesutului renal după injectarea subcutanată a nanotuburilor de carbon funcționalizate cu ADN monocatenar.

Nivelele reprezintă mediana valorilor procentuale față de nivelul bazal. Liniile de eroare reprezintă eroarea standard.

##### Nivelul donatorilor de hidrogen (DH)

Nivelele mediane ale DH au variat nesemnificativ față de valorile inițiale (Figura 2). Astfel, la 3 ore de la experiment, valorile au atins un nivel de 97,94% din nivelul bazal ( $p=0,976$ ), pentru ca la 6 ore după injectare nivelul atins să fie de 117,8% ( $p=0,876$ ). După acest moment de timp nivelele au înregistrat la 24 de ore post-administrație o scădere sub nivelul inițial (88,56%,  $p=0,625$ ). La finalul intervalului, nivelele DH au înregistrat o creștere până la 136,7% din nivelul bazal ( $p=0,114$ , Tabelul 1).



**Fig. 2.** Dinamica nivelului donatorilor de hidrogen la nivelul țesutului renal după injectarea subcutanată a nanotuburilor de carbon funcționalizate cu ADN monocatenar.

Nivelele reprezintă mediana valorilor procentuale față de nivelul bazal. Liniile de eroare reprezintă eroarea standard.

**Tabelul 1.** Nivelele absolute ale markerilor la fiecare interval de timp de la injectare.

	Lot martor 3 ore	Lot test 3 ore	Lot test 6 ore	Lot test 24 ore	Lot test 48 ore
Proteine carboniate (nmol/mg)	1.35(0.3)	1.00(0.0)	1.00(0.0)	1.50 (0.0)	1.30(0.7)
Donori de hidrogen (Inhibiție%)	17.00(3.1)	16.70(0.0)	20.10(1.0)	15.14(0.0)	23.50(0.3)

Valorile reprezintă mediana (maxim-minim).

### Corelații între markerii de stres oxidativ

S-a detectat o corelație puternică de tip negativ între nivelele PC și nivelele DH ( $r=-0,754$ ,  $p<0,0001$ ).

### Discuții

Prezența nanomaterialului identificată în studiul nostru în primele 3 ore de la injectare și dispariția sa după acest interval concordă cu unele studii existente în literatură. Astfel, într-un studiu care evaluează comportamentul nanotuburilor de carbon după injectarea intravenoasă, autorii au raportat, pe baza spectrelor Raman, nivele minime ale materialului (nanotuburi de carbon funcționalizate cu polietilen glicol) la 3 zile post administrare. Prin contrast, gradul de captare al semnalului a fost înalt detectabil în ficat și în splină [8]. În mod similar, un studiu care a utilizat ca metodă de detecție marcarea nanotuburilor de carbon cu  $\text{In}^{111}$  și detecția nivelului de radioactivitate, a raportat rezultate concordante cu cele prezentate în studiul de față. Astfel, după injectarea intravenoasă, nanotuburile de carbon au prezentat un nivel de radioactivitate maximal la 30 de minute post-injectare [9]. Cercetări de ordin recent confirmă, de asemenea, epurarea de la nivel renal în primele 24 de ore post-injectare intravenoasă utilizând, de această dată metode imagistice moderne de detecție [10]. Intervalele de timp necesare epurării, ușor diferite în cazul nostru, se datorează cel mai probabil, tipului diferit de administrare, precum și caracteristicilor specifice administrării subcutanate (absorbție lentă).

Evaluarea efectelor ADN-CNT s-a realizat prin dozarea carbonilor proteici, marker cunoscut al agresiunii oxidative asupra macromoleculelor proteice [11]. Nivelele fluctuante de amplitudine mică înregistrate în cazul experimentului prezentat reprezintă dovezi ale unei agresiuni de intensitate redusă induse de radicali liberi ai oxigenului. Aceste rezultate sunt dublate de evoluția paralelă de tip invers a donatorilor de hidrogen. Markerul înglobează întreaga capacitate antioxidantă a sistemelor cu rol protector (glutition, grupări tiol, vitamine etc.). Împreună, evoluțiile celor doi markeri sugerează un tablou al unei agresiuni cu răsunet limitat asupra mecanismelor echilibrului oxidant, în intervalul 3-48 de ore post-administrare.

Dovezi provenind din experimente *in vitro* ce vizează implicarea echilibrului oxidativ și mecanismele inflamatorii în relația cu nanotuburile de carbon sunt prezente în literatura de specialitate a ultimilor ani. Majoritatea autorilor susțin capacitatea nanotuburilor de carbon de a stimula producția de radicali liberi [12] și de citokine [13], de a produce inhibarea creșterii și diviziunii celulare, precum și de a produce alterări membranare și ale acizilor nucleici [14]. S-au adus dovezi concludente privind capacitatea acestora de a activa *in vitro* căile MAPK, AP-1, NF- $\kappa$ B, Akt de semnalizare intracelulară [15]. Există un acord unanim privind dependența efectelor menționate de proprietățile fizico-chimice ale nanomaterialului: puritate, cristalinitate, grupare funcțională, etc [16]. Cercetări de ordin recent au

arătat că nanotuburile de carbon au capacitatea de a altera expresia genelor responsabile de semnalizarea intracelulară în cadrul lanțurilor fiziopatogenetice implicate în modularea nivelului de stres oxidativ [17].

Cercetările *in vivo* s-au concentrat în special pe inhalarea sau aspirarea de nanotuburi de carbon, acestui tip de expunere fiindu-i asociate, ca efecte, formarea de granuloame asemănătoare celor prezente în cadrul azbestozei [18-19]. S-a demonstrat, deasemenea, că expunerea cronică la nanotuburi de carbon prin aspirare determină creșterea numărului de leucocite și a celularității la nivel local [20]. S-au imaginat și testat chiar și unele metode de contracarare a efectelor producției crescute de radicali liberi ai oxigenului, ca efect al expunerii la nanotuburi de carbon. Astfel, un studiu de ordin recent demonstrează eficiența vitaminei E în profilaxia efectelor stresului oxidativ la șoareci C57BL/6 [21].

După cunoștința noastră nu există studii concentrate pe efectele injectării subcutanate de nanotuburi de carbon. Deasemenea, nu am regăsit cercetări dedicate elucidării implicării mecanismelor de stres oxidativ în interacțiunea *in vivo* a nanotuburilor de carbon cu țesutul renal. Rezultatele obținute sugerează securitatea tranzitului renal al unor astfel de compuși.

### Concluzii

Injectarea subcutanată de nanotuburi de carbon cu perete unic funcționalizate cu ADN monocatenar nu determină cantonarea pe termen lung a nanomaterialului la nivel renal. Post-injectare, nanomaterialul nu induce efecte semnificative asupra echilibrului oxidativ la nivelul țesutului renal, în intervalul 3-48 ore post-injectare.

*Prezentul studiu a fost finanțat de către Ministerul Educației și Cercetării prin proiectul PNCDI-42-112-NANOCITOX.*

### Bibliografie

1. Li Z, Tabakman Z, Welsher T, et al. Carbon Nanotubes in Biology and Medicine: In vitro and in vivo Detection, Imaging and Drug Delivery., Nano Res. 2010 Available from: URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc?term=applications%20nanotubes>
2. Jithesh V, Veetil V, Kaiming Y. Tailored Carbon Nanotubes for Tissue Engineering Applications. Biotechnol Prog 2009; 25(3): 709-721.
3. Biris AR, Biris AS, Lupu D, et al. Catalyst excitation by radio frequency for improved carbon nanotubes synthesis. Chem Phys Let 2006; 429 (1): 204-208.
4. Dervishi E, Li Z, Biris AR, et al. Morphology of Multi-Walled Carbon Nanotubes Affected by the Thermal Stability of the Catalyst System. Chem Mater 2007; 19 (2):179-184.
5. Biris AR, Lupu D, Grüneis A, et al. High Quality Double Wall Carbon Nanotubes Grown by a Cold-Walled Radio Frequency Chemical Vapor Deposition Process", Chem Mater 2008; 22(10): 3466-3472.
6. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins:

---

spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol* 1994; 233: 357-363.

7. Janazsewska A, Bartosz G. Assay of antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand. J Lab Invest* 2002; 62 (3):231-236.

8. Li Z., Davis C, Cai W, et al. Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(5): 1410-1415.

9. Singh R, Pantarotto D, Lacerda L, et al. Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(9): 3357-3362.

10. McDevitt R, Chattopadhyay D, Jaggi SJ, et al. PET Imaging of Soluble Yttrium-86-Labeled Carbon Nanotubes in Mice, *ONE*. 2007; 2(9):907.

11. Wu G, Fang Y Z, Yang S, et al. Glutathione Metabolism and its implications for health. *J Nutr* 2004; 134(3): 489-492.

12. Shvedova AA, Castranova V, Kisin ER, et al. Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells, *J Toxicol Environ Health A* 2003; 66(20):1909-1926.

13. Kagan VE, Bayir H, Shvedova AA, et al. Nanomedicine and Nanotoxicology-two sides of the same coin. *Nanomedicine* 2005; 1(4): 313-316.

14. Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 2006; 311(5761): 622-627.

15. Pacurari M, Yin X, Zhao J, et al. Raw Single-Wall Carbon Nanotubes Induce Oxidative Stress and Activate MAPKs, AP-1, NF- $\kappa$ B, and Akt in Normal and Malignant Human Mesothelial Cells *Environ Health Perspect* 2008; 116(9): 1211-1217.

16. Garza KM, Soto KF, Murr LE. Cytotoxicity and reactive oxygen species generation from aggregated carbon and carbonaceous nanoparticulate materials. *Int J Nanomedicine* 2008; 3(1): 83-94.

17. Sharma CS, Sarkar S, Yog R, et al. Analysis of Stress Responsive Genes Induced by Single-Walled Carbon Nanotubes in BJ Foreskin Cells. *J Nanosci Nanotechnol* 2007; 7(2): 584-592.

18. Sharma CS, Sarkar S, Periyakaruppan A, et al. Single-Walled Carbon Nanotubes Induces Oxidative Stress in Rat Lung Epithelial Cells. *J Nanosci Nanotechnol*. 2007; 7(7):2466-2472.

19. Shvedova AA, Kisin ER, Murray AR, et al. Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008; 295(4): 552-565.

20. Shvedova AA, Fabisiak JP, Kisin ER, Sequential Exposure to Carbon Nanotubes and Bacteria Enhances Pulmonary Inflammation and Infectivity *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008; 38(5): 579-590.

21. Shvedova AA, Kisin ER, Murray AR, et al. Vitamin E Deficiency Enhances Pulmonary Inflammatory Response and Oxidative Stress Induced by Single Walled Carbon Nanotubes in C57BL/6 Mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 221(3):339-348.