

BADANIE BIOZGODNOŚCI JEDNOŚCIENNYCH NANORUREK WĘGLOWYCH W WARUNKACH *IN VITRO* I *IN VIVO*

A. FRACZEK¹, E. MENASZEK², B. CZAJKOWSKA³,
L. BACA KOVA⁴, M. BLAZE WICZ¹

¹AGH, WYDZIAŁ INŻYNIERII MATERIAŁOWEJ I CERAMIKI,
KATEDRA BIOMATERIAŁÓW,
AL. MICKIEWICZA 30, 30-059 KRAKÓW

²UNI WERSYTET JAGIELLOŃSKI, COLLEGIUM MEDIUM,
ZAKŁAD CYTOBIOLOGII I HISTOCHEMII,
UL. MEDYCZNA 9, 30-688 KRAKÓW

³UNI WERSYTET JAGIELLOŃSKI,
COLLEGIUM MEDIUM,

KATEDRA IMMUNOLOGII, UL. CZYSTA 18, 31-121 KRAKÓW

⁴CZE SKA AKADEMIA NAUK, INSTYTUT FIZJOLOGII,
WIDENSKA 10983, 142 20 PRAGA

Słowa kluczowe: Jednościenne nanorurki węglowe, wolne rodniki, biouzgodność, badania histologiczne i histochemiczne.

[*Inżynieria Biomateriałów*, 69-72, (2007), 8-11]

Wprowadzenie

Nanorurki węglowe uznawane są jako obiecujący materiał dla zastosowania, zarówno w technice jak i w medycynie ze względu na unikatowe właściwości mechaniczne, elektryczne i chemiczne. W medycynie prowadzone są badania nad zastosowaniem nanoform węgla w inżynierii tkankowej, terapii genowej, nośnikach leków i w konstrukcji implantów [1].

Jednakże nowe technologie związane z zastosowaniem nanorurek węglowych dla celów biomedycznych muszą być bezpieczne. Tymczasem, mechanizm oddziaływania nanorurek węglowych ze środowiskiem biologicznym (*in vitro* i *in vivo*) jest stosunkowo słabo rozpoznany [2]. Liczne badania toksyczności nanorurek wskazują, iż jest to materiał toksyczny, podczas gdy szereg innych badań świadczy, iż CNT mogą być zastosowane jako doskonale podłoże dla wzrostu komórek [3,4]. Na poziomie komórkowym większość nanocząstek jest w stanie przedostawać się do wnętrza komórki w wyniku procesu endocytozy [5,6]. Właściwości powierzchniowe oraz małe rozmiary nanorurek węglowych sprawiają iż mogą one brać udział w przyłączaniu oraz transporcie toksycznych substancji chemicznych, zanieczyszczeń, metali przejściowych, a także organicznych produktów spalania do wnętrza komórki wykorzystując mechanizm endocytozy. Duże rozwinięcie powierzchni nanocząstek może przyczyniać się do produkcji wolnych rodników, które mogą doprowadzić do zniszczenia komórki poprzez uszkodzenie jej DNA, białek a także błony komórkowej. Dodatkowo substancje obce takie jak metale przejściowe, zanieczyszczenia mogą powodować nasilenie reakcji toksycznej samego materiału, który normalnie uważany jest jako materiał nietoksyczny. Dlatego też konieczny jest rozwój nowoczesnych urządzeń i metod służących do lepszej oceny wpływu nanocząstek na organizm żywy.

Celem niniejszej pracy było badanie biouzgodności jednościennych nanorurek węglowych w warunkach *in vitro* i *in vivo*.

IN VITRO AND *IN VIVO* BIOCOMPATIBILITY OF SINGLE WALL CARBON NANOTUBES

A. FRACZEK¹, E. MENASZEK², B. CZAJKOWSKA³,
L. BACA KOVA⁴, M. BLAZE WICZ¹

¹AGH – UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY,
FACULTY OF MATERIALS SCIENCE AND CERAMICS
DEPARTMENT OF BIOMATERIALS,
30, MICKIEWICZA AL., 30, 30-059 CRACOW, POLAND

²JAGIELLONIAN UNIVERSITY,
COLLEGIUM MEDIUM,
DEPARTMENT OF CYTOBIOLOGY AND HISTOCHEMISTRY,
MEDYCZNA, 9 30-688 CRACOW, POLAND

³JAGIELLONIAN UNIVERSITY,
COLLEGIUM MEDIUM,
DEPARTMENT OF IMMUNOLOGY,
18, CZYSTA STR., 31-121 CRACOW, POLAND

⁴ACADEMY OF SCIENCES OF CZECH REPUBLIC,
INSTITUTE OF PHYSIOLOGY,
WIDENSKA 10983, 142 20 PRAGUE, CZECH REPUBLIC

Keywords: Single wall carbon nanotubes, free radicals, biocompatibility, histological and histochemical reaction

[*Engineering of Biomaterials*, 69-72, (2007), 8-11]

Introduction

Carbon nanotubes have been considered as a promising material both technical and medical application due to the unique mechanical, electrical and chemical properties. In medical area, it is considered the use of carbon nanotubes as a material for tissue engineering, gene therapy, drug carriers etc. [1].

However, new technologies involved with the use of carbon nanotubes for biomedical applications must be safety. While the toxicological mechanisms of *in vitro* and *in vivo* response of carbon nanoparticles are poor understood [2]. The number of studies for research on the toxicology indicate that carbon nanotubes can be cytotoxic, while others have shown nanotubes to be excellent substrates for cellular growth [3,4]. At the cellular level, most of nanoparticles are able to get inside the cell via endocytosis. Endocytotic pathways into cells can either lead to the endosomal and lysosomal compartments or else via cell-surface lipid raft associated domains know as caveolae [5,6]. The surface properties and very small size of nanoparticles and nanotubes provide surfaces that may bind and transmit toxic chemical pollutants, transition metals and organic chemical combustions products inside the cells via these pathways. The very large surface area of nanoparticles can generate of harmful free radicals which can cause cell damage by attacking DNA, proteins and membranes. Additionally, the foreign substances such as transition metals, pollutants could enhance the toxicity of some nanoparticles which normally would not induce toxic action. That is why it is required to develop new tools and methodologies for better assessment of nanoparticles impact on human health.

The aim of this study was *in vitro* and *in vivo* assessment of biocompatibility of single wall carbon nanotubes (SWNT).

Materiały i metody

Przedmiotem badań były jednościenne nanorurki węglowe (SWNT) (NanoCraft Inc.). Średnica nanorurek wynosiła od 2 do 3nm zaś długość zawarta była w granicach od 30 do 50nm. Rozwinięcie powierzchni wynosiło ok. 192,44m²/g.

Badania *in vitro*

Żywotność komórek (ludzka linia osteoblastyczna - hFOB1.19) w kontakcie z nanorurkami oznaczana była po 7 dniach hodowli. Nanorurki węglowe zawieszono w medium hodowlanym odpowiednio w ilości: 0,8mg/ml i 2mg/ml. W 12 dołkowych płytkach hodowlanych umieszczono po 1ml roztworu nanorurek i dodano 2cm² zawiesiny komórek w medium hodowlanym. Hodowla prowadzona w inkubatorze w temperaturze 37°C w powietrzu zawierającym 5%CO₂. Chemiluminescencja mysich makrofagów w PMI z 15% surowicą bydlęcą oznaczana była za pomocą luminometru Lucy 1 (Athos, Salzburg, Austria) w celu określenia czy nanomateriał węglowy nie indukuje makrofagów do produkcji wolnych rodników.

Przeprowadzono również badanie nanorurek węglowych w kontakcie z ludzkimi osteoblastami z linii MG63 (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK). Jednościenne nanorurki węglowe zawieszono w buforze fosforanowym (PBS) odpowiednio w ilości 0,4mg/ml i 4mg/ml. Po 1ml roztworu nanorurek umieszczano w 24 dołkowych płytkach hodowlanych i zasiedlono komórkami. Każdy dołek hodowlany zawierał 1700 komórek/cm², inkubacja przeprowadzona została w 2ml medium Eagle (Sigma, USA) z dodatkiem 10% surowicy bydlęcej (Seback GmbH, Aldenbach, Germany) w inkubatorze, w atmosferze powietrza z dodatkiem 5%CO₂. Komórki hodowano odpowiednio przez 1, 3 i 7 dni, a następnie poddano trypsynizacji i zliczaniu w komorze Bürkera.

Badania *in vivo*

Nanorurki węglowe (4mg SWNT) implantowano do mięśnia szkieletowego szczura (4 zwierzęta w serii). Odpowiednio po 7, 30 i 90 dniach po implantacji, zwierzęta uśmiercano, a implantowany materiał wraz z otaczającą go tkanką pobierano do badań. Pobrane próbki mrożono i cięto za pomocą mikrotomu na kawałki o grubości 8µm. Na otrzymanych skrawkach przeprowadzono badania histologiczne i histochemiczne w celu oceny procesu regeneracji tkanki.

Wyniki

Badania biologiczne wykazały, iż żywotność osteoblastów z linii hFOB1.19 w kontakcie z SWNT zależy od stężenia nanocząstek w medium hodowlanym (RYS.1). Żywotność osteoblastów w kontakcie z większą ilością SWNT (2mg/ml) była niższa (ok. 62%) w porównaniu z żywotnością komórek w próbce kontrolnej (ok. 100%). Natomiast przeżywalność komórek w kontakcie z mniejszą ilością SWNT (0,8mg/ml) była porównywalna żywotnością komórek w próbce kontrolnej (ok.100%).

Ilość komórek MG63 po kontakcie z SWNT po 1,3 i 7 dniu hodowli była różna i zależała również od stężenia SWNT w medium hodowlanym (RYS.2). Najmniejszą ilość komórek MG63 zaobserwowano dla próbki zawierającej 4mg/ml SWNT (41099,8±2409,9 komórek/cm² po 7 dniach), podczas gdy dla próbki zawierającej 0,4mg/ml SWNT wartość ta była prawie dwa razy wyższa (80312,4±2731,6 komórek/cm²). Jednakże, ilość komórek zarówno po kontakcie

Materials and methods

Single wall carbon nanotubes (SWNT) examined in this study were received from NanoCraft, Inc. of Renton (USA). Nanotubes were 2 to 3nm in diameter and 30 to 50nm in length. The surface area of SWNT was about 192,44m²/g.

In vitro examination

The cellular viability was determined after 7 days seeding in order to get an initial evaluation of the biocompatibility of single wall carbon nanotubes. A human osteoblastic line of hFOB1.19 was used in this experiment. Single wall carbon nanotubes were suspended in a culture medium at concentration of 0,8mg/ml and 2mg/ml respectively. Solutions of SWNT (1ml) were placed in 12-well culture plates, and 2cm² of the cells suspension in culture medium were added to these samples. Cultures were grown in the incubator with 5% CO₂/95% air atmosphere at a temperature of 37°C.

The growth and proliferation of human osteoblast-like cells of the line MG63 (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK) on carbon nanotubes were studied. Single wall carbon nanotubes were suspended in a PBS at concentration of 0,4mg/ml and 4mg/ml respectively. Solutions of carbon nanotubes (1ml) were inserted into polystyrene multidishes (24 wells) and seeded with osteoblast-like cells. Each dish contained 17000cells/cm² was incubated in 2ml of Dulbecco-modified Eagle Minimum Essential Medium (Sigma, USA) supplemented with 10%Fetal Bovine Serum (Seback GmbH, Aldenbach, Germany) in humidified air atmosphere containing 5% of CO₂. Cells were cultured for 1, 3 and 7 days and after these days the cells were harvested by trypsin and counted in a Bürker's chamber.

The chemiluminescence of mouse peritoneum macrophages in RPMI with 15%foetal bovine serum was examined using a luminometer Lucy 1 (Athos, Salzburg, Austria), in order to check production of free radicals by macrophages in contact with single wall carbon nanotubes. 50µg of nanotubes and opsonized with the mouse serum-zymosan- were added to the cells (at a concentration of 5×10⁵) and photon emission was measured over a period of 60min.

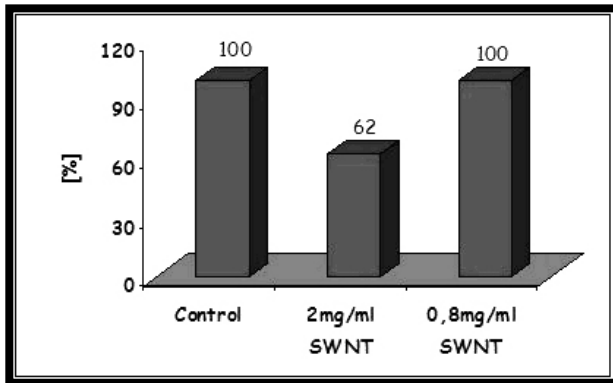
In vivo examination

Carbon nanotubes were implanted into the skeletal muscle of adult rats. Each animal received 4mg of SWNT placed into the gluteal muscle. At 7, 30, 90 day after implant surgery, 4 (at each time point) animals were sacrificed and tissue specimens containing the implanted material were excised. The samples were frozen in liquid nitrogen and next cut into 8µm thick slides in cryostat microtome. To estimate the processes of tissue regeneration histological and histochemical reactions were carried out on the obtained slides.

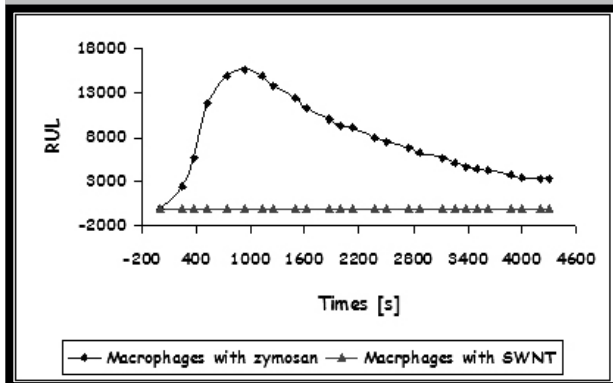
Results

The biological study indicated that the osteoblast-like cells (hFOB1.19) viability in contact with single wall carbon nanotubes depend on concentration of nanoparticles in culture medium (FIG.1). The osteoblast viability in contact with higher concentration (2mg/ml) of SWNT is lower (about 62%) as compared with control samples (about 100%). However, the osteoblast survivability in contact with lower concentration (0,8mg/ml) of SWNT was the same value as control sample (about 100%).

On day 1, 3 and 7 after seeding the number of osteoblast-like cells MG63 on examination samples were different



RYS.1. Żywotność osteoblastów (hFOB1.19) w kontakcie z SWNT.
FIG.1. Osteoblast-like cells (hFOB1.19) viability in contact with SWNT.



RYS.3. Chemiluminescencja makrofagów stymulowanych zymosan oraz nanorurkami węglowymi.
FIG.3. Chemiluminescence of macrophages stimulated with zymosan and carbon nanotubes.

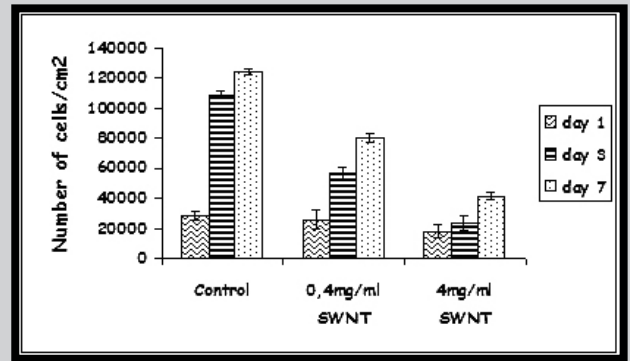
z próbkami zawierającymi 0,4mg/ml i 4mg/ml SWNT była niższa w porównaniu z próbką kontrolną ($124138,3 \pm 1839,1$ komórek/cm²).

Makrofagi pełnią bardzo znaczącą rolę w reakcji zapalnej, dlatego też badano oddziaływanie makrofagów z jednościennejmi nanorurkami węglowymi w celu oceny ich cytotoksyczności. Metoda chemiluminescencyjna pozwala na sprawdzenie czy makrofagi ulegają pobudzeniu do produkcji wolnych rodników w kontakcie z materiałem. Uzyskane wyniki wskazują iż makrofagi nie indukują powstawania wolnych rodników w kontakcie z nanomateriałem (SWNT) (RYS.3).

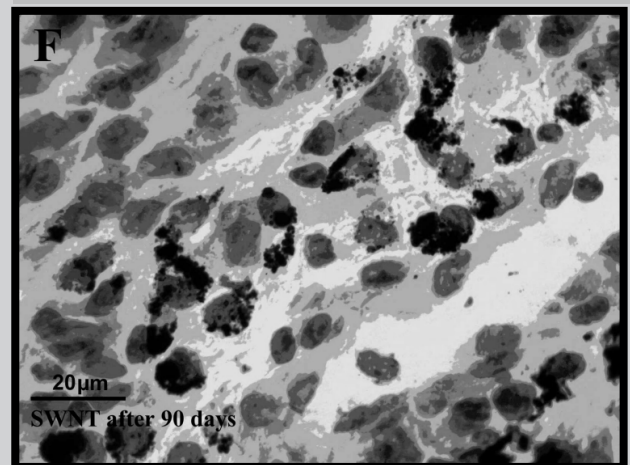
W warunkach *in vivo* nanorurki (SWNT) były jednorodnie rozproszone w mięśniu szkieletowym szczura i dobrze fagocytowane przez makrofagi (RYS.4). Fagocytowane nanorurki wyprowadzane były przez makrofagi z miejsca implantacji i akumulowane w okolicznych węzłach chłonnych. W pobliżu implantowanego materiału zaobserwowano naczynia krwionośne oraz regenerujące włókna mięśniowe z na ogół prawidłowym poziomem enzymu OCC (oksydaza cytochromu C) (RYS.5).

Wnioski

Wyniki badań odpowiedzi biologicznej na nanomateriał w warunkach *in vivo* i *in vitro* nie są spójne i charakteryzują się zarówno wynikami świadczącymi o wysokiej biogodności materiału jak i toksyczności.



RYS.2. Wzrost ilość komórek MG63 w kontakcie z różną koncentracją SWNT oraz PS po 1,3, i 7 dniu hodowli.
FIG.2. Number of MG63 cells grown for 1,3 and 7 days on PS and different concentration SWNT.



RYS.4. Przekrój przez mięsień zawierający SWNT. Barwienie histologiczne May-Grünwald-Giemsa (MGG).
FIG.4. The cross-section through the muscle with SWNT. Histological staining: May-Grünwald-Giemsa (MGG).

and depend on concentration of SWNT (FIG.2). The lowest number of MG63 cells was observed on the samples containing 4mg/ml SWNT ($41099,8 \pm 2409,9$ cells/cm² after 7 day) for the samples containing 0,4mg/ml SWNT the number of cells was almost twice higher compare with samples containing 4mg/ml SWNT. However, the number of cells both the samples containing 0,4mg/ml SWNT and the samples containing 4mg/ml SWNT was considerably lower in comparison with control samples (PS – polystyrene).

Macrophages play a prominent role in regulation of inflammatory response, their interactions with single wall carbon nanotubes were determined for preliminary toxicological assessments of nanomaterials. The chemiluminescence method was used in order to check whether the macrophages might undergo activation and release free radicals in contact with single wall carbon nanotubes. The obtained results indicate that SWNT did not activate the macrophages to release free radicals, which could be toxic for the surrounding cells and tissues (FIG.3).

In vivo condition SWNT were uniformly dispersed into the muscle tissue of rat and well phagocytosed by macrophages (FIG.4). The phagocytosed particles of SWNT were carried out by macrophages from the place of implantation and accumulation inside the nodes. Numerous regenerating mus-

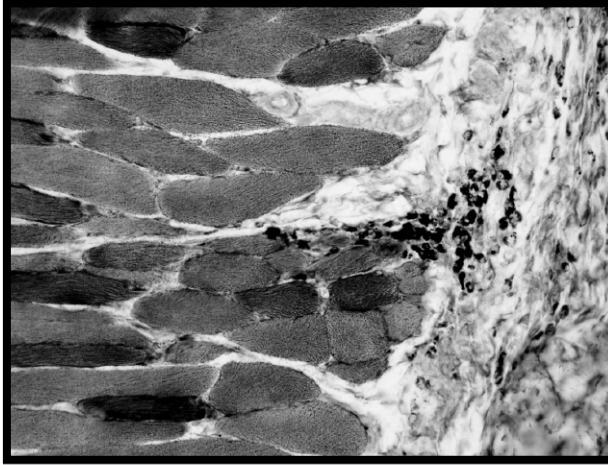
Badania w środowisku *in vitro* wykazały iż żywotność oraz proliferacja osteoblastów zależy od ilości jednościennej nanorurek węglowych. Jednocześnie, badania *in vitro* wykazały, że komórki w kontakcie z SWNT wykazują normalny wzrost i morfologię bez efektu cytotoksycznego. Dodatkowo zaobserwowano brak aktywacji makrofagów do produkcji wolnych rodników świadcząca o braku toksyczności nanorurek węglowych SWNT.

Odpowiedź tkanek w warunkach *in vivo* na implantowany nanomateriał węglowy jest złożona. Transport SWNT, przez makrofagi z miejsca implantacji do lokalnych węzłów chłonnych może świadczyć o niepożądanych efektach związanych z cytotoksycznością. Podczas gdy brak tkanki łącznej otaczającej implant oraz szybka regeneracja tkanki jest czynnikiem świadczącym o biogodności materiału.

Nanomateriały wykazują szereg charakterystycznych właściwości takich jak duża ilość powierzchni w przeliczeniu na masę materiału oraz wysoka energia powierzchniowa. Dlatego wydaje się, że kluczem do zrozumienia specyfiki reakcji nanomateriału z biologicznym środowiskiem jest analiza procesów zachodzących na powierzchni nanocząstek. Wysoka (najprawdopodobniej) absorpcja białek na powierzchni nanocząstek, zawartych w medium hodowlanym może zmieniać znacząco jego skład chemiczny co przypuszczalnie wpływa na wzrost komórek w warunkach *in vitro*. Natomiast odpowiedź biologiczna *in vivo*, jest o wiele trudniejsza do wytłumaczenia. Adsorpcja białek na powierzchniach nanorurek czyni je z jednej strony niewidzialnymi dla układu obronnego, jednocześnie obserwuje się intensywne wnikanie nanocząstek do wnętrza komórek i transport do węzłów chłonnych.

Podziękowania

Praca finansowana przez Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektu 3763/T02/2006/31



RYS.5. Przekrój przez mięsień zawierający SWNT. Reakcja histochemiczna na obecność.
FIG.5. The cross-section through the muscle with SWNT implants. The reaction for the OCC activity.

cle fibres with different activity of metabolic enzyme (OCC) and blood vessels were observed in contact with carbon nanotubes (FIG.5).

Conclusion

This preliminary *in vitro* study suggest that the viability and proliferation of the osteoblast like cells depends on the concentration of SWNT. Simultaneously, *in vitro* studies found that human osteoblast – like cells response to carbon nanotubes demonstrated normal cellular growth and morphology, without

cytotoxicity effect. The lack of macrophages activation to produce free radicals in contact with SWNT indicate absence toxicity effect for surrounding cells.

In vivo analysis of tissue response to such nano-sized carbon forms led to ambiguous results. The presence of the translocation of SWNT from implant sites to lymph nodes may suggest undesirable effects related to cytotoxicity. Whereas the absence of connective tissue capsule around the implants and fast tissue and blood vessel regeneration are characteristic symptoms of biocompatible materials. Results of our *in vitro* and *in vivo* investigations encourage to further careful study in order to a better understanding of the interactions between cells, living body and carbon nanotubes.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Polish Ministry of Science and Higher Education, grant no 3763/T02/2006/31

Piśmiennictwo

- [1] Harrison BS, Atala A. Carbon nanotube applications for tissue engineering. *Biomaterials* 2007; 28: 344–353.
- [2] K. Soto, K.M. Garza, L.E. Murr, Cytotoxic effect of aggregated nanomaterials, *Acta Biomaterialia* 3 (2007) 351-358
- [3] S. Fiorito, A.Serafino, F. Andreola, P. Bernier, Effect of fullerenes and single-wall carbon nanotubes on murine and human macrophages, *Carbon* 44 (2006) 1100-1105

References

- [4] V.E. Kagan, H. Bayir, A.A. Shvedova, Nanomedicine and nanotoxicology: two sides of the same coin, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 1 (2005) 313-316.
- [5] M.N. Moore, Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment?, *Environment International* 32 (2006) 967-976.
- [6] L. Palkmans, A.Helenius, Endocytosis via caveolae, *Traffic* 2002; 3:311-20.