Original Article

Histopathological Effects of Multiwall Carbon Nanotubes on Rat Liver

Vajiheh Nasajpour¹ (10), Ali Noori^{2*} (10), Hashem Nayeri³ (10)

¹Flavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

²Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

³Department of Biochemistry, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

**Corresponding Author:* Ali Nouri; Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Email: ali.noori55@gmail.com

Received: 8 Mar, 2018 Accepted: 25 Jun 2018

Abstract

Background and Objectives: Application of carbon nanotubes in medicine may bring about toxicity of these compounds. In the present study, the effects of carbon nanotubes were studied on liver tissue through creating oxidative stress.

Methods: In this experimental study, concentrations of 10 and 20mg/kg of multiwall carbon nanotubes functionalized with carboxyl groups (10-20nm), were intraperitoneally injected into male rats in 21 stages and the control group received normal saline. Blood sampling and animal dissection were performed in two stages (24hours and 144hours after the last injection). Histological sections were prepared from the liver by hematoxylin-eosin staining and examined by optical microscopy. The concentration of thiol groups and malondialdehyde were measured and analyzed using one way ANOVA test.

Results: Histological studies revealed disorders, such as hyperemia in the centrilobular vein, accumulation of inflammatory cells, abnormalities of sinusoids and vacuolation of hepatocytes, which were significantly higher with the dose of 20mg/kg and 144 hours after the treatment compared to the other groups. In the first blood collection, the plasma levels of thiol groups significantly increased with the dose of 10mg/kg (p<0.05) compared to other groups and in the second stage, the level of malondialdehyde showed a significant increase in both doses compared to the control group (p<0.05).

Conclusion: Carbon nanotubes probably cause liver tissue disorder by aggregation and binding to various cellular components in the liver and creating oxidative stress; but, given the lack of mortality in animals, these disorders may decrease over time.

Keywords: Carbon nanotubes; Liver toxicity; Tissue toxicity; Oxidative stress.

12

مقاله پژوهشی (Original Article)

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم دوره دوازدهم، شماره نهم، آذر ۹۲ صفحه ۱۲ الی ۲۵

اثرات هیستوپاتولوژیک نانولولههای کربن چند دیواره بر کبد موش صحرایی

وجیهه نساج پور ២، علی نوری 🍽 ، هاشم نیری ២

فشارهای اکسیداتیو مورد بررسی قرار گرفت.

چکندہ

^۱واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

^۳گروه زیستشناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

^۳گروه بیوشیمی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، غلظتهای ۱۰ و ۲۰ میلیگرم برکیلوگرم نانولولههای کربن چنددیواره عاملدارشده با گروههای کربوکسیل (۲۰–۱۰ نانومتر) طی ۲۱ مرحله، بهصورت درونصفاقی به رتهای نر تزریق شد و گروه شاهد سرم فیزیولوژیک را دریافت کردند. خونگیری و تشریح حیوانات در دو مرحله (۲۴ و ۱۴۴ساعت پس از آخرین تزریق) انجام گرفت. مقاطع بافتی با رنگآمیزی هماتوکسیلین – ائوزین از کبد تهیه و به وسیله میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. غلظت گروههای تیول و مالون دی آلدئید

زمینه و هدف: کاربرد نانولولههای کربن در پزشکی، ممکن است سمّیت این ترکیبات را

به همراه داشته باشد. در تحقیق حاضر اثرات نانولوله های کرین بر بافت کبد همراه با ایجاد

یافتهها: مطالعات بافتشناسی اختلالاتی نظیر پرخونی در سیاهرگ مرکز لوبولی، تجمع سلولهای التهابی، بی نظمی سینوزوئیدها و واکوئله شدن هپاتوسیتها را نشان داد که در دوز ۲۰ میلی گرم برکیلو گرم و زمان ۱۴۴ ساعت پس از تیمار، به طور معنی داری نسبت به گروههای دیگر بیشتر بود. در اولین خونگیری، مقدار گروههای تیول پلاسما در دوز ۱۰ میلی گرم برکیلو گرم نسبت به سایر گروهها افزایش (۵۰/۰۰) یافت و در دومین مرحله، مقدار مالوندی آلدئید در هر دو دوز نسبت به شاهد، افزایش معنی داری نشان داد (۵۰/۰۰).

نتیجه گیری: احتمالاً، نانولوله های کربن ضمن تجمع و اتصال با اجزای مختلف سلولی در کبد و ایجاد فشارهای اکسیداتیو سبب اختلال در بافت کبد می شوند، اما با توجه به عدم مرگومیر در حیوانات، این اختلالات ممکن است با گذشت زمان کاهش یابند.

کلید واژهها: نانولولههای کربن؛ کبد – سمّیت؛ سمّیت بافتی؛ استرس اکسیداتیو.

اندازه گری شد و با استفاده از آنالیز واریانس یکط فه تجزیه و تحلیل شدند.

لطفاً به این مقاله بهصورت زیر استناد نمایید:

Nasajpour N, Noori A, Nayeri H. Histopathological effects of multiwall carbon nanotubes on rat liver. Qom Univ Med Sci J 2018;12(9):12-25. [Full Text in Persian]

International License Creative Commons Attribution License 4.0



مجله دانشگاه علوم پزشکی قم/ دوره دوازدهم، شماره نهم، آذر ۱۳۹۷

*نویسنده مسئول مکاتبات: علی نوری؛ گروه زیستشناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

آدرس پست الکترونیکی: ali.noori55@gmail.com

> تاریخ دریافت: ۹۶/۱۲/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۷/۴/۴

مقدمه

ویژگیهای فیزیکی و شیمیایی مواد می تواند با کاهش اندازه آنها در محدوده نانو بهطور ناگهانی تغییر کند. کوچک شدن اندازه بهمعنای جای گیری و استقرار متفاوت اتم های سطحی بوده که این امر، فیزیک و شیمی اشیا را تغییر می دهد (۱). یک نانولوله تکديوار ماي (Single Wall Carbon Nanotube, SWCNT) تککديوار ماي ييچيدن يک ورقه گرافن به دور خود و ايجاد يک استوانه بهوجود می آید و بسته به اینکه این ورقه گرافنی در چه جهتی بهدور خود ییچیده شود؛ اشکال نانولولههای بهوجود آمده متفاوت خواهد بود و درصورتی که تعداد ورقههای گرافن بیشتر باشد، نانولوله جندديواره (Multi Wall Carbon Nanotube, Mwcnt) به وجود میآید (۲). همچنین می توان فضای درون لوله ها را با مواد گوناگونی نظیر فلزات و برخی پروتئین ها پر کرد (۳)، و مواد فلورسنت، آنزیمها، ژنها یا داروهای مختلف را در آنها جاسازی و به بافتها و سلولهای هدف هدایت کرد یا در تکنیکهای تصویربرداری زیستی از آنها استفاده نمود (۵،۴). در این میان، برخی عوامل ممکن است سبب سمّیت نانولوله های کربن شوند؛ بهعنوان مثال خلوص شيميايي ماده، عامل مهمي در ايمني زيستي نانو ذرات است. نانو لوله های کرین معمو لاً دارای ناخالصی های فلزي ازجمله آهن، نيکل و کبالت هستند که مي تواند بر چگونگي واکنش و پاسخ بیولوژیکی اثر بگذارد (۷،۶). از طرفی، شکل ذره بر رفتار جذب و جایگزینی ذره در محیطهای بیولوژیکی از طریق اثر گذاری بر رفتار کانالهای یونی در غشای سلولها مؤثر است (۸). همچنین افزایش نسبت سطح به حجم، کیفیت شیمی سطح و بارالكتريكي سطحي باعث افزايش بسيار شديد تعداد گروههاي فعال در واحد جرم و در نتیجه افزایش واکنش پذیری کلی نانولولههای کربن و افزایش توانایی آنها در تعاملات بیولوژیکی شده که معمولاً در سیستم گیرندهدهنده الکترونی اختلال ایجاد می کند و سبب تولید رادیکالهای آزاد و در نتیجه ایجاد فشارهای اکسیداتیو می گردد (۱۰،۹). سلولهای در معرض CNTها به دلیل القای اکسیدانها، دستخوش استرس اکسیداتیو می شوند که در پی آن با فعال کردن مسیرهای سیگنالینگ، یروتئین کیناز و سیتوکین های پیش التهابی سبب آپوپتوز و سمّیت سلولی می شوند .(11)

کاهش در بقای سلولی و سطوح افزایش یافته سیتوکین های پیش التهابی و اینترلوکین ها نشان میدهد MWCNTها می توانند سبب پاسخ التهابی در کراتینوسیتهای انسانی در دوز ۴/۰ میلی گرم برمیلی لیتر شوند (۱۲). همچنین فشارهای اکسیداتیو سبب اختلال در عملکرد میتوکندری و زنجیره انتقال الکترون شده و آپویتوز سلولی را نیز به همراه دارند (۱۳). از مکانیسمهای دیگر، اثر نانولوله های کربن بر سلول ها، فعل و انفعال مستقیم آن ها با مواد ژنتیکی و در نتیجه آسیب در سطح DNA یا کروموزوم است (۱۴). از تکنیکهایی که تاحدی سمّیت نانولولههای کربن و ايمني زيستي آنها را كاهش ميدهند، ايجاد تغييرات سطحي با افزودن گروه های عاملی نظیر آمونیوم، پلی اتیلن گلایکول، هیدروکسیل، کربوکسیل و ...، میباشد که سطوحی را برای اتصال انواع مختلف ماكرومولكولهاي زيستي و غيرزيستي جهت کاربرد این نانوساختارها فراهم میکند (۱۵). با این وجود، در گزارشهای متعددی به سمّیت نانولولههای کربن اشاره شده که معمولاً همراه با ایجاد واکنش های التهابی است. در این میان، سلولهای فاگوسیتوزکننده، بهویژه نوتروفیلها و ماکروفاژها با حضور در اکثر بافت های بدن قادرند نانوذرات را جذب کنند، اما اندامهای خاصی ازجمله کبد، طحال و گرههای لنفاوی دارای تعداد فراوانی از این سلولها بوده که در نتیجه معمولاً این اندامها محل تجمع انواع مختلف نانوذرات در بدن هستند (۱۶).

در مطالعه حاضر اختلالات بافتی کبد در اثر تزریق مکرر نانولولههای کربن چنددیواره کربوکسیلدار در ارتباط با ایجاد استرس اکسیداتیو در رتها مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

این تحقیق به صورت تجربی بر روی ۴۸ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با میانگین متوسط وزن ۲۰۰ گرم (خریداری شده از مرکز انستیتو پاستور تهران) انجام گرفت. حیوانات در شرایط آزمایشگاهی استاندارد (دمای ۲۵–۲۰ درجه سانتیگراد و ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی) در لانه حیوانات دانشگاه آزاد فلاورجان نگهداری شدند. آزمایش ها با تأیید



شورای پژوهشی دانشگاه و طبق دستورالعملهای اخلاقی انجمن بینالمللی مطالعه درد در مورد حیوانات آزمایشگاهی (۱۲). (۱۷). (۱۷).

ابتدا نانولوله های کربن چند دیواره عامل دارشده با گروه کربو کسیل (با قطر خارجی ۲۰–۱۰ نانومتر، قطر داخلی ۱۰–۵ نانومتر، طول ۲–۵/۰ میکرومتر، درجه خلوص بالای ۹۵٪ با محتوای 2004 وزنی و سطح ویژه ۲۰۰ مترمربع برگرم) از شرکت نوترینو در تهران خریداری شد. غلظت های ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلو گرم وزن بدن در تویین ۸۰٪ و سرم فیزیولوژیک (نسبت ۱ به ۱۰۰) به عنوان حلال تهیه گردید (۱۰). استفاده از تویین و قراردادن مخلوط حاصل در دستگاه اولتر اسونیک با دمای ۴ درجه سانتیگراد و دامنه ۴۰٪ برای مدت ۳۰ دقیقه، به تهیه محلول نسبتا یکنواخت و هموژن از نانولوله های کربن کمک می کند (۱۴). حیوانات به صورت تصادفی به ۶ گروه ۸ تایی تقسیم شدند:

گروههای تیمار که نانولولههایکربن را (با دوزهای ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلو گرم) به صورت درون صفاقی و یک روز در میان، طی ۲۱ مرحله دریافت کردند (دو گروه تیمار با دوز ۱۰ میلی گرم برکیلوگرم و دو گروه تیمار با دوز ۲۰ میلیگرم برکیلوگرم با زمان خونگیری متفاوت) و دو گروه شاهد که سرم فیزیولوژی به همراه توئین به آنها تزریق شد (۱۳). با استناد به گزارش های قبلی مبنی بر عدم اثر گذاری شوک حاصل از تزریق سرم فیزیولوژیک بر حیوانات آزمایشگاهی (۱۸)، گروه کنترل در نظر گرفته نشد و گروه شاهد با گروههای تجربی (گروههایی که نانولولههای کربن دریافت کردند) مقایسه گردید. خونگیری در دو مرحله زمانی (۲۴ساعت پس از آخرین تزریق و ۱۴۴ ساعت پس از آخرین تزریق) (۱۹) مستقیماً از قلب گروههای تیمار به طور مجزا به عمل آمد. حيوانات قبل از اولين تزريق و قبل از خونگيري، وزن شدند. بهمنظور بررسی میزان فشار اکسیداتیو، غلظت گروههای تیول و مالوندی آلدئید در سرم خون اندازه گیری شد. اساس اندازه گیری گروههای تیول، واکنش گروههای سولفیدریل با معرف Elman بود. از واكنش (dithiobis 2nitrobenzoic acid, DTNB) بود. از واكنش بین گروههای دیسولفیدی معرف و گروههای تیولی، یک مول nitro - 5thiobenzoate (بهازای هر مول سولفیدریل)

تولید می شود. آنیون، نتیرو تیو بنزوات زردرنگ بوده و در طول موج ۴۱۲ نانومتر دارای ماکزیمم جذب است (۱۹).

یکی از روشهای اندازه گیری پراکسیداسیون لیپیدها در سرم، اندازه گیری محصولات ناشی از شکسته شدن هیدرویراکسیدها، بەويژە آلدئيدها بودە كە شامل مالوندى آلدئيد نيز مىباشد. آلدئيدهاى گوناگونى ازجمله MDA (مالوندى آلدئيد) با تیوباربیتوریک اسید (TBA) در PH اسیدی و دمای بالا واکنش میدهد. در واکنش تست TBA، یک مولکول از MDA با ۲ مولکول از MDA-TBA₂) TBA) با تولید رنگدانه های صورتی (با جذب ماکزیمم در ۵۳۵–۵۳۲ نانومتر)، واکنش نشان میدهند (۲۰). جهت بررسی ساختار بافت کبد، از هرگروه، سه رت پس از خونگیری تشریح شد و بخشی از کبد در فرمالین ۱۰٪ قرار گرفت. سپس از هر نمونه کبد، سه لام تهیه گردید (۹ عدد لام از هر گروه و در مجموع ۵۴ لام از ۶ گروه مورد مطالعه) و با روش هماتوكسيلين-ائوزين رنگآميزي شدند. لامها بهوسيله میکروسکوپ نوری Olympus CX22LED مجهز به دوربین Canon Eos 760D 18 (ساخت کشور ژاپن) با بزرگنمایی ۱۰۰ و ۴۰۰، بررسی و از نقاط مختلف آنها عکسبرداری شد. جهت مطالعه کیفی لامها و اطمینان از نتایج حاصل از مطالعه آنها، لازم بود تعداد زیادی از مقاطع بافتی تهیه و مورد بررسی بافتشناسی قرار گیرد (۱۸،۱۴). مقاطع بافتی از نظر هیستولوژیک (وضعیت طنابهای هپاتوسیتی، سینوزوئیدها و تجمع سلولهای التهابی) در گروههای تیمار در مقایسه با گروه شاهد، بررسی شدند. میانگین مقدار مالوندی آلدئید و گروههای تیول در گروههای تيمار و شاهد به کمک آزمون آناليز واريانس يکطرفه و تست دانکن با استفاده از نرمافزار SPSS نسخه ۲۲ مقایسه گردید. سطح معنیداری، p<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

يافتهها

در این مطالعه، غلظت مالون دی آلدئید، ۲۴ ساعت پس از تیمار (پس از آخرین تزریق)، اختلاف معنی داری را در گروه های تیمار نسبت به گروه شاهد نشان نداد، اما پس از گذشت ۱۴۴ ساعت (۱۹) در هر دو غلظت ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلو گرم، میانگین مقدار مالون دی آلدئید، افزایش معنی داری نشان داد (۵-/۰۰)

International License Creative Commons Attribution License 4.0

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم/ دوره دوازدهم، شماره نهم، آذر ۱۳۹۷

 \sim

 \odot

(جدول شماره ۱).مقدار گروههای تیول پلاسما با استفاده از منحنی استاندارد GSH در طول موج ۴۱۲ نانومتر تعیین گردید که پس از گذشت ۲۴ساعت از تیمار، مقدار آن تنها در دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلو گرم نسبت به سایر گروهها، به طور معنی داری افزایش نشان داد (۹-(۰/۰)، اما با گذشت ۱۴۴ساعت (۶ روز) از تیمار، مقدار گروههای تیول پلاسما، اختلاف معنی داری

را بین گروههای مختلف نشان نداد؛ به عبارت دیگر، در دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلو گرم نیز به حالت نرمال باز گشت (جدول شماره ۲).

وجيهه نساج پور و همكاران

جدول شماره ۱: تغییرات مقدار مالوندیآلدئید ۲۶ و ۱٤٤ ساعت پس از آخرین تزریق نانولولههای کربن چنددیواره کربوکسیلدار، با استفاده از آزمون واریانس یکطرفه

گرودها	گرودهای تیمار ۲٤ ساعته	گروههای تیمار ۱٤٤ ساعته
غلظت نانولولههای کربن (میلیگرم برکیلوگرم)	MDA (میکرومولار)	MDA (میکرومولار)
کنترل (شاهد)	۲/۵۹±۰/۲۷	۲/۴۵±۰/۲۱
۱۰	۲/۶۹±•/۱۶	۲/۸۸±•/٣۲*
۲.	۲/۷۶±۰/۳۷	۲/ ۷ ۹±۰/۳۳ [°]
f	•/٧۶•	4/227
р	•/۴۸۰	• / • ٣

*:افزایش مقدار مالوندی آلدئید نسبت به گروه شاهد (p<٠/٥)

ربن چنددیواره کربو کسیلدار، با	ن تزریق نانولولههای 7	ٔ ساعت پس از آخری	تیول ۲۶ و ۱٤٤	غلظت گرودهای	جدول شماره ۲:
	ں یکطرفه	اده از آزمون واریانس	استفا		

گرودهای تیمار ۱٤٤ ساعته	گرودهای تیمار ۲۶ ساعته	گرودها
گرودهای تیول پلاسما (میلیمولار)	گرودهای تیول پلاسما (میلیمولار)	غلظت نانولولههای کربن (میلی گرم بر کیلو گرم)
·/٣٢±·/·٢	۰/۳۴±۰/۰۵	کنترل (شاهد)
·/٣\±·/·٢	•/ F 1±•/• F *	۱.
۰/٣ . ±./.٣	۰/٣٨±٠/٠٢	۲.
•/٩ ١ ٧	۵/۵۷۴	f
•/410	•/• 11	р

***: افزایش مقدار گرودهای تیول نسبت به گروه شاهد(p<۰/۰۵)**

مطالعات بافتشناسی بهصورت کیفی بر روی نمونهها و تعداد زیادی از لامهای تهیهشده از کبد گروه تیمار در مقایسه با شاهد انجام گرفت تا اطمینان از ایجاد اختلالات بافتی به دست آید (۱۸،۱۴). در گروه شاهد، وضعیت مورفولوژیک بافت کبد، نرمال بود.

همچنین طنابهای هپاتوسیتی و سینوزوئیدها منظم، هسته هپاتوسیتها بزرگ و مشخص، سیاهرگهای مرکز لوبولی با دیوارهای سالم و فضای پورت (شامل: سرخرگ، سیاهرگ کبدی و مجرای صفراوی)، حالتی نرمال داشتند و هیچ گونه تراکمی از سلولهای التهایی مشاهده نشد (شکل ۳–۱).



شکل شماره ۱: گروه شاهد: مقطع بافت کبد با رنگ آمیزی H&E و بزرگنمایی ۲۰۰. CV سیاهرگ مرکز لوبولی، هپاتوسیتها و سینوزوئیدها.

International License Creative Commons Attribution License 4.0



شکل شماره ۲: گروه شاهد: مقطع بافت کبد با رنگ آمیزی H&E و بزرگنمایی ۱۰۰.

فضای پورت: A سرخرگ کبدی، B مجرای صفراوی.



شکل شماره ۳: گروه شاهد: مقطع بافت کبد با رنگ آمیزی H&E و بزرگنمایی ٤٠٠. وضعیت نرمال سینوزوئیدها و هپاتوسیتها، سیاهر گ مر کز لوبولی با دیواردای ناز ک (cv).

همچنین نسبت به گروه شاهد تجمع سلولهای التهابی (نوتروفیلها و بازوفیلها) و لیز شدن هپاتوسیتها در برخی نقاط بهخوبی مشهود بود (شکل شماره ۵–۴).

> در مقاطع بافتی مربوط به غلظت ۱۰ میلی گرم برکیلو گرم پس از ۲۴ ساعت، در برخی سیاهر گهای مرکز لوبولی و سینوزوئیدها، احتقان یا تجمع خون دیده شد.



شکل شماره ٤: غلظت ١٠ میلی گرم بر کیلو گرم ٢٤ ساعت پس از تزریق: مقطع بافت کبد با رنگ آمیزی H&E و

International License Creative Commons Attribution License 4.0

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم/ دوره دوازدهم، شماره نهم، آذر ۱۳۹۷

 \odot



شکل شماره ۵: غلظت ۱۰ میلی گرم بر کیلو گرم، ۲۵ساعت پس از تزریق: مقطع بافت کبد با رنگ آمیزی H&E و بزر گنمایی ٤٠٠. تجمع سلول های التهایی در فضای پورت (فلش ناز ک) و هپاتوسیت های لیزشده (فلش ضخیم).

همچنین تغییرات جدیدی در مقاطع بافتی این گروه بهصورت تورم و واکوئله شدن هپاتوسیتها مشاهده گردید؛ بهطوری که فضاهای سینوزوئیدی ناپدید شده بود. این تغییرات معمولاً با آتروفی شدید هسته هپاتوسیتها در برخی نقاط همراه بود (شکل ۸–۶).

اختلالات بافتی (شامل: تجمع شدید سلولهای التهابی، اتساع و بینظمی شدید سینوزوئیدها، لیز شدن تعداد بیشتری از هپاتوسیتها) در غلظت ۲۰ میلیگرم برکیلوگرم نسبت به ۱۰ میلیگرم برکیلوگرم بهطور قابل توجهی بیشتر بود.



شکل شماره ٦: غلظت ٢٠ میلیگرم بر کیلوگرم، ٢٤ ساعت پس از تزریق: مقطع بافت کبد با رتگآمیزی H&E و بزرگنمایی ٤٠٠. تجمع شدید سلولهای التهایی در فضای پورت بهخوبی مشهود است.



شکل شماره ۷: غلظت ۲۰ میلی گرم بر کیلو گرم، ۲۶ ساعت پس از تزریق: مقطع بافت کبد با رنگ آمیزی H&E و بزر گنمایی ٤٠٠ هپاتوسیت های لیزشده و فاقد هسته (فلش ناز ک) اتساع سینوزوئیدها (فلش ضخیم). International License Creative Commons Attribution License 4.0



شکل شماره ۸: غلظت ۲۰ میلی گرم بر کیلو گرم، ۲٤ ساعت پس از تزریق: مقطع بافت کبد با رتگ آمیزی H&E و بزر گنمایی ٤٠٠ تورم و واکوئله شدن سیتوپلاسم هپاتوسیتها (فلش ضخیم)، آتروفی هسته هپاتوسیتها (فلش ناز ک). سینوزوئیدها نامشخص هستند.

> در اثر تزریق نانولولههای کربن چنددیواره کربوکسیلدار با غلظت ۱۰میلیگرم برکیلوگرم پس از گذشت ۱۴۴ ساعت از آخرین تزریق، تغییرات شدیدتری در بافت کبد نسبت به گذشت زمان ۲۴ ساعت ایجاد شد. این اختلالات علاوه بر تجمع

هپاتوسیتها بود که منجر به اتساع قابل توجه سینوزوئیدها گردید (شکل شماره ۹). همچنین در برخی مقاطع، تورم و تشکیل واکوئل در سیتوپلاسم هپاتوسیتها دیده شد که ناپدید شدن سینوزوئیدها را به همراه داشت (شکل شماره ۱۰)، که این حالت در زمان ۲۴ساعت پس از تیمار دیده نشد.

سلول،



شکل شماره ۹: غلظت ۱۰ میلی گرم بر کیلو گرم ۱٤٤ساعت پس از تزریق: مقطع بافت کبد با رنگ آمیزی H&E و بزر گنمایی ٤٠٠. هپاتوسیتهای لیزشده (فلش نازک)، اتساع سینوزوئیدها (فلش ضخیم) و هستههای آتروفیشده (فلش سمت چپ).



شکل شماره ۱۰: غلظت ۱۰ میلی گرم بر کیلو گرم، ۱٤٤ساعت پس از تزریق: مقطع بافت کبد با رنگ آمیزی H&E و بزرگنمایی ٤٠٠ در اکثر نقاط هپاتوسیتهای واکوئله و متورم دیده میشود (فلش) و سینوزوئیدها قابلمشاهده نیستند. International License Creative Commons Attribution License 4.0

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم/ دوره دوازدهم، شماره نهم، آذر ۱۳۹۷

 \odot \odot

تورم و تشکیل حفره (واکوئل) در سیتوپلاسم هپاتوسیتها نسبت به گروههای قبلی با شدت و وضوح بالاتری در تعداد بیشتری از لامهای مورد بررسی دیده شد (شکل شماره ۱۱).

وجيهه نساج پور و همكاران



شکا ، شماده ۱۱: غلظت ۲۰ میله ، گرم و کیله گرم، ۱٤٤ساعت بس از تزریق: مقطع بافت کبد با رنگ آمیزی H&E و بزر گنمایی ٤٠٠. همچنین دژنره شدن و بی نظمی شدید طناب های هپاتوسیتی تنها در به وضوح قابل مشاهده است (فلش). اين گروه قابل تشخيص بود كه منجر به تغيير مورفولوژيك معنى دارى در بافت كبد شد (شكل شماره ۱۲).



شکل شماره ۱۲: غلظت ۲۰ میلی گرم بر کیلو گرم، ۱٤٤ساعت پس از تزریق: مقطع بافت کبد با رنگ آمیزی H&E و بزر گنمایی ٤٠٠. اتوسیتی. به تغییرات شدید مورفولوژیک توجه کنید.

در برخی مقاطع بافتی نیز تخریب و ناهنجاری در جداره سیاهرگ

مرکز لوبولی علاوه بر تغییرات قبلی مشاهده گردید (شکل شماره ۱۳).

International License Creative Commons Attribution License 4.0



شکل شماره ۱۳: غلظت ۲۰ میلی گرم بر کیلو گرم، ۱٤٤ساعت پس از تزریق: مقطع بافت کبد با رنگ آمیزی H&E و بزر گنمایی ٤٠٠. فلش تخریب دیواره سیاهر گ مرکز لوبولی را نشان میدهد.

بحث

مالوندى آلدئيد، از محصولات نهايي پراكسيداسيون ليپيدي است که از آن بهطور وسیع بهعنوان شاخص استرس اکسیداتیو استفاده می شود (۲۱). در مطالعه حاضر تزریق نانولوله های کربنی ۲۴ ساعت پس از تیمار، بر میزان این فاکتور بی تأثیر بود، اما در مرحله دوم خونگیری (۱۴۴ ساعت پس از آخرین تزریق)، افزایش معنی دار فاکتور مالون دی آلدئید در هر دو دوز ۱۰ و ۲۰ میلی گرم برکیلوگرم نسبت به گروه شاهد به دست آمد. نتایج نسبتاً مشابهی در اثر کاربرد نانولولههای کربن تکدیواره DNAدار توسط Muresan و همکاران در سال ۲۰۱۰ (۱۹) و نانولولههای کربن چند دیواره DNAدار توسط Clichici و همکاران در سال ۲۰۱۲ (۲۲)، در غلظتهای مختلف به صورت افزایش مقدار MDA در ساعات مختلف یس از تیمار به دست آمد که الگوی نایایدار و متغیر افزایش فشارهای اکسیداتیو را نشان میداد. همچنین در مطالعات Patlolla و همکاران در سال ۲۰۱۱، افزایش هيدرويراكسيدازها همراه با اثرات هياتوتوكسيك نانولولههای کربن چنددیواره کربوکسیلدار مشاهده گردید (۱۴)، که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت. برخی مطالعات invitro نیز بر روی ردههای مختلف سلولی، اثرات سمّی وابسته به قطر و طول نانولولههای کربن چنددیواره را بهصورت افزایش MDA همراه با آپوپتوز سلولی، مهار چرخه سلولی و افزایش سطح تنش های اکسیداتیو نشان دادهاند (۲۴،۲۳). گروههای تیول پلاسما نیز یکی دیگر از نشانگرهای آسیب رادیکالهای آزاد است که این عوامل به آسیب اکسیداتیو حساس بوده و در نتیجه

این آسیبها کاهش مییابند، درحالی که در تحقیق حاضر ۲۴ ساعت پس از تیمار، در مقدار تیول (دوز ۱۰) افزایش معنی دار و پس از ۱۴۴ساعت تغییری ایجاد نشد که با نتایج مطالعه Muresan و همکاران در سال ۲۰۱۰ پس از گذشت ۴۸ ساعت از تیمار موشها، همخوانی داشت (۱۹). در تحقیق حاضر، عدم کاهش گروههای تیول ممکن است به دلیل غلبه آنتی اکسیدان های طبیعی بدن بر ROS تولیدشده در اثر نانولولههای کربن باشد.

در همین زمینه، نتایج تحقیق دیگری نشان داد تجمع نانولولههای کربن تک دیواره در ریهها پس از تزریق درون رگی، استرس اکسیداتیو (افزایش ROS)، اکسیداسیون لیپیدها و تشکیل MDA را همزمان با افزایش میزان GSH (یک آنتی اکسیدان قوی است که می تواند به محافظت سلولها و بافتها در مقابل ROS کمک کند) به همراه دارد که تأییدکننده اثرات بازدارنده آنتی اکسیدانها هنگام افزایش فشارهای اکسیداتیو در بدن است و هنگامی که در اثر افزایش بیش از حد رادیکالهای آزاد، تعادل بین سطوح MDA و GSH از بین برود، اختلالات بافتی و عملکردی در ریهها آغاز می شود (۲۶،۲۵)؛ بنابراین در تحقیق حاضر، افزایش موقت میزان گروههای تیول پلاسما پس از گذشت ۲۴ ساعت، ممکن است نشاندهنده تقویت سیستم آنتی اکسیدانی جهت محافظت سلولها و بافتها از اثرات ROS

در مطالعه حاضر نتایج بافتشناسی، تغییرات و ناهنجاریهای قابل توجهی (شامل: پرخونی، تراکم سلولهای التهابی، بینظمی سینوزوئیدها، تخریب و واکوئله شدن هپاتوسیتها) را در ساختار

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم/ دوره دوازدهم، شماره نهم، آذر ۱۳۹۷

International License Creative Commons Attribution License 4.0

وجيهه نساج پور و همكاران

وابسته به دوز و زمان نشان داد. در گزارش های متعدد توسط محققین مختلف نیز اختلالات نسبتاً مشابهی در اثر کاربرد نانولوله های کربن در ساختار بافت کبد مشاهده شده که برخی از آن ها شامل: اختلالات سلول های کبدی، واکوئله شدن، کاریومگالی و تخریب نسبی ورید مرکزی همراه با تجمع نانولوله های کربن در کبد می باشد (۲۷،۱۴). همچنین Lacerda و همکاران در سال ۲۰۰۸، اختلالات مشابهی را در کبد حتی در دوز پایین (۵ میلی گرم بر کیلو گرم) گزارش کردند که با افزایش دوز (۲۰ و ۴۰ میلی گرم بر کیلو گرم) به طور معنی دار شدت یافته بود (۲۸).

در مطالعات متعدد، علت تغییرات و ناهنجاریهای بافتی در اثر تزریق نانولولههای کربن، نفوذ و تجمع آنها در اندامهای مختلف نظیر کبد و ایجاد فشارهای اکسیداتیو نشان داده شده است؛ به طوری که اثرات مضر ROS بر روی سلول ها اغلب به صورت آسیب DNA، اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع در لیپیدها (پراکسیداسیون لیپیدی، اکسیداسیون اسیدهای آمینه در پروتئین ها و غیرفعالسازی آنزیمهای خاص در اثر اکسیداسیون كوفاكتورها) گزارش شده است (۱۴). مطالعات مختلف نشان دادهاند نانولولههای کربن می توانند به درون سلول نفوذ کرده و موجب ایجاد اختلالات درونسلولی، تغییرات در اتصالات غشایی، چند بخش شدن هسته، حتی ایجاد اجسام آپوپتوزی و در نهایت، مرگ سلول شوند (۲۹). در تحقیقات اخیر نیز مشخص شده است این نانومواد هنگام ورود به سلولهای زنده با به كارانداختن مكانيسم هاى التهابي، همچنين ايجاد راديكال هاى آزاد اکسیژن، به هسته و DNA سلول آسیب رسانده و موجب ایجاد سمّیت، تغییر کارکرد و در نهایت، مرگ سلولی می شوند (۳۰). نوتروفیلها سیستم ایمنی اندامها در برابر مواد خارجی هستند که قادر به تجمع در رگهای بسیار ریز کبد بوده و همزمان واسطه های التهابی نظیر MIP-2 ، IL1 ، MIP-2 و PAF را افزایش میدهند (۳۲،۳۱)، مشخص شده است عادی ترین واسطه گری نوتروفیل ها در ایجاد پاسخ ایمنی در کبد، از طریق اتصال به هپاتوسیتها بوده که باعث تشکیل ROS توسط NADPH شده و ممکن است تخریب و لیز شدن هپاتوسیتها را

نیز به همراه داشته باشد (۳۳،۳۱).

در تحقیق حاضر یکی از مهمترین و شایعترین اختلالات بافتی کبد، به صورت لیز شدن هپاتوسیت ها مشاهده گردید. در مطالعات متعدد دیگری نیز اثرات ROS ناشی از کُنش نانوذرات با سلولها بهصورت فعال شدن سلول.های ایمنی، اختلال در تنفس میتوکندریایی و سیستم اکسیدازی NADPH، القای تخریب و آسیب اکسیداتیو در ماکرومولکولهای سلولی؛ از قبیل پروتئینها، آنزیمها، لیپیدها و DNA گزارش شده است (۳۴)، که با توجه به تعداد و فعالیت گسترده میتوکندریها و فعالیت زنجیرههای انتقال الکترونی در هپاتوسیتها، بهنظر میرسد در مطالعه حاضر بخشی از آسیبهای مشاهدهشده در بافت و سلولهای کبدی به دلیل اثرات سوءرادیکالهای آزاد تولیدشده و ایجاد استرس اکسیداتیو بر این اندام باشد. همچنین نتایج پاتوفیزیولوژیک، آسیبهای حاصل از استرس اکسیداتیو را بهصورت تخریب غشای سلولی، پروکسیداسیون لیپیدها، دناتوره شدن پروتئینها و اختلال در هموستازی کلسیم نشان دادهاند (۳۵)، و در برخی گزارشها نیز ROS حاصل از نانولولههای کربن، سبب فعال شدن مسیرهای سیگنالینگ سلولی، فاکتورهای رونویسی، آزادسازی واسطههای سیتوکینی و آپویتوز شده است (۳۶)؛ حتی سمّیت ریوی نانولولههای کربن که در بسیاری از مطالعات به اثبات رسیده، ناشی از القاى استرس اكسيداتيو بهوسيله اين نانوذرات ميباشد (٣٧). بنابراین بهنظر میرسد مهمترین عامل ایجاد اثرات سمّی و مخرب بهوسیله نانولولههای کربن بر اندامها، بافتها و جانداران، ناشی از ایجاد استرس اکسیداتیو است که با ویژگیهای فیزیکوشیمیایی القاکننده واکنش های سطحی، اندازه نانوذرات، بار سطحی، ترکیب شیمیایی و حضور فلزات حدواسط در ترکیب نانولولههای کربن به عنوان ناخالصی، رابطهای بسیار معنی دار دارد و منجر به طيف گستردهای از اثرات ژنوتوکسيک، التهاب، فيبروزيس و کارسینوژنیک میشود (۳۸)؛ لذا دلیل اطلاع از این ویژگیهای گسترده و مؤثر بر فعالیت نانوذرات، برای طراحی و ساخت نانولولههای کربن دارای ایمنی زیستی، بسیار اهمیت دارد. در مطالعات آینده لازم است فاکتورهای متعدد مربوط به استرس اکسیداتیو علاوه بر گروههای تیول و مالوندی آلدئید، همچنین

International License Creative Commons Attribution License 4.0

وجيهه نساج پور و همكاران

با این حال با توجه به عدم مرگومیر حیوانات در طی مدت

مذکور، ممکن است با گذشت زمان بیشتر، سیاری از اختلالات

رخ داده برطرف گردد که اثبات آن نیاز به انجام مطالعات بیشتری

بدین وسبله نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد

اسلامي، واحد فلاور حان كمال تشكر را دارند.

بررسی نفوذ و تجمع نانولولههای کربن در بافت کبد همراه با مطالعات بافتشناسی در مدت زمان طولانی از ۱۴۴ساعت نیز

بررسی گردد تا اطمینان بیشتری از اثرات سمّی یا سمّیت ناچیز این نانوذرات به دست آید. همچنین ضروری است برای پایداری و ایمنی زیستی بالاتر، بر گروههای عاملی مورد استفاده و ویژگیهای سطحی نانولولههای کربن، تمرکز بیشتری صورت گیرد.

نتیجه گیری نتایج تحقیق حاضر با کاربرد دوزهای نسبتاً پایین نانولولههای کربن چنددیواره کربو کسیل دار نشان داد اختلالات بافت کبد به احتمال قوی در ارتباط با افزایش معنی دار مالون دی آلدئید و ایجاد استرس اکسیداتیو است که حاصل تجمع احتمالی این نانوذرات در بافت کبد بوده و این اثرات تا ۶ روز پس از تیمار ادامه دارد؛

References:

 \odot

1. Jin R, Cao Y, Mirkin CA, Kelly KL, Schatz GC, Zheng JG. Photoinduced conversion of silver nanospheres to nanoprisms. Science 2001;294(5548):1901-3. Link

دارد.

تشكر و قدرداني

- 2. Andreoni W, Editor. The physics of fullerene-based and fullerene-related materials. Netherlands: Springer Netherlands; 2000. p. 331-79. PubMed
- 3. Monthioux M. Filling Single- walled carbon nanotubes. Carbon 2002;40(10):1809-23. Link
- 4. Welsher K, Liu Z, Daranciang D, Hongjie D. Selective probing and imaging of cells with single walled carbon nanotubes as near-infrared fluorescent molecules. Nano Lett 2008;8(2):586-90. Link
- 5. Hong G, Tabakman SM, Welsher K, Chen Z, Robinson J T, Wang H, et al. Near infrared fluorescence enhanced molecular imaging of live cells on gold substrates. Angew Chem Int Ed 2011;50(20):1-6. Link
- Liu J, Legros S, Ma G, Veinot JG, Von der Kammer F, Hofmann T. Influence of surface functionalization and particle size on the aggregation kinetics of engineered nanoparticles. Chemosphere 2012;87(8):918-24. Link
- Ying Liu Y, Yuliang Zhao Y, Baoyun Sun B, Chunying Chen C. Understanding the toxicity of carbon nanotubes. Acc Chem Res 2013;46(3):702-13. Link
- Park KH, Chhowalla M, Iqbal Z, et al. Single-walled carbon nanotubes are anew class of ion channel blockers. J Biol Chem 2003;278(20):50212-26. PubMed
- 9. Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, Roach DH, Reynolds GA, Webb TR. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. Toxicol Sci 2004;77(1):117-25. PubMed
- 10. Firme CP, Bandaru PR. Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems. Nanomedicine 2010;6(2):245-56. PubMed

International License Creative Commons Attribution License 4.0

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم/ دوره دوازدهم، شماره نهم، آذر ۱۳۹۷

- 11. Battigelli A, Ménard-Moyon C, Da Ros T, Prato M, Bianco A. Endowing carbon nanotubes with biological and biomedical properties by chemical modifications. Adv Drug Deliv Rev 2013;65(15):1899-920. Link
- 12. Witzmann FA, Monteiro-Riviere NA. Multi-walled carbon nanotube exposure alters protein expression in human keratinocytes. Nanomedicine 2006;2(3):158-68. PubMed
- 13. Pacurari M, Yin XJ, Zhao J, Ding M, Leonard SS, Schwegler-Berry DE, et al. Raw single-wall carbon nanotubes induce oxidative stress and activate MAPKs, AP-1, NF-kB, and akt in normal and malignant human mesothelial cells. Environ Health Perspect 2008;116(9);1211-17. PubMed
- 14. Patlolla A, McGinnis B, Tchounwou P. Biochemical and histopatological evaluation of functionalized single-walled carbon nanotubes in Swiss-Webster mice. J Appl Toxicol 2011;31(1):75-83. Link
- 15. Yola ML, Atar N. A novel voltammetric sensor based on gold nanoparticles involved in p-aminothiophenol functionalized multi-walled carbon nanotubes: Application to the simultaneous determination of quercetin and rutin. Electrochimica Acta 2014;46(11):24-31. Link
- Lasagna-Reeves C, Gonzalez-Romero D, Barria MA, Olmedo I, Clos A, Ramanujam VMS, et al. Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice. Biochem Biophys Res Commun 2010;393(4):649-55. PubMed
- 17. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. Pain 1983;16(2):109-10. PubMed
- 18. Noori A, Parivar K, Modaresi M, Messripour M, Yousefi MH, Amiri GR. Effect of magnetic iron oxide nanoparticles on pregnancy and testicular development of mice. African J Biotechnol 2011;10(7):1221-7. Link
- 19. Muresan A, Clichici S, Mocan T, Filip A, Biris AR, Simon S, et al. Effects of different concentrations of carbon nanotubes upon the pattern of oxidative stress generation after intraperitoneal administration. Acta Physiol 2010;198 Supple 667. Link
- 20. Shvedova AA, Pietroiustic A, Fadeeld A, Kagane VE. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: Focus on oxidative stress. Toxicol Appl Pharmacol 2012;261(2):121-33. Link
- 21. Zheng SW, Li JL, You LQ, Xiao Ko, Li YY, Zi RX. Chitosan nanoparticles attenuate hydrogen peroxide-induced stress injury on mouse macrophage RAW264.7 cells. J Mar Drugs 2013;11(10):3582-600. Link
- 22. Clichici S, Biris AR, Tabaran F, Filip A. Transient oxidative stress and inflammation after intraperitoneal administration of multiwalled carbon nanotubes functionalized with single strand DNA in rats. Toxicol Appl Pharmacol 2012;259(3):281-92. PubMed
- 23. Han YG, Xu J, Li ZG, Ren GG, Yang Z. Invitro toxicity of multi-walled carbon nanotubes in C6 rat glioma cells. Neurotoxicol 2012;33(5):1128-34.Link
- 24. Bo CH, Ying L, Ming SW, Yasuhiko H, Cheng DX, Hua LW. Invitro evaluation of cytotoxicity and oxidative stress induced by multiwalled carbon nanotubes in murine RAW 264.7 macrophages and human A549 lung cells. Biomed Environ Sci 2011;24(6):593-601. Link
- 25. Yang ST, Wang X, Jia G, Gu Y, Wang T, Nie H, Ge C, Wang H, Liu Y. Long term accumulation and low toxicity of single-walled carbon nanotubes in intravenously exposed mice. Toxicol Lett 2008;181(3):182–9. PubMed
- 26. Belyanskaya L, Manser P, Spohn P, Bruinink A, Wick P. The reliability and limits of the MTT reduction assay for carbon nanotubes-cell interaction. Carbon 2007;45(13):2643-8. Link
- 27. Kolosnjaj-Tabi J, Hartman KB, Boudjemaa S, Ananta JS, Morgant G, Szwarc H, et al. Invivo behavior of large doses of ultrashort and full-length single-walled carbon nanotubes after oral and intraperitoneal administration to Swiss mice. Acs Nano 2010;4(3):1481-92. Link

International License Creative Commons Attribution License 4.0

۱۴

- 28. Lacerda L, Ali-Boucetta H, Herrero MA, Pastorin G, Bianco A, Prato M, et al. Tissue histology and physiology following intravenous administration of different types of functionalized multiwalled carbon nanotubes. Nanomedicine 2008;3(2):149-61. PubMed
- 29. Wang J, Sun P, Bao Y, Liu J, An L. Cytotoxicity of single-walled carbon nanotubes on PC12 cells. Toxicol In Vitro 2011;25:242-50. PubMed
- 30. Liu YL, Chen WH, Chang YH. Preparation and properties of chitosan/ carbon nanotube nanocomposites using poly(styrene sulfonic acid)-modified CNTs. Carbohydr Polym 2009;76(2):232-8. link
- 31. Ramaiah SK, Jaeschke H. Role of neutrophils in the pathogenesis of acute inflammatory liver injury. Toxicol Pathol 2007;35(6):456-766. Link
- 32. Bajt ML, Farhood A, Jaeschke H. Effects of CXC chemokines on neutrophil activation and sequestration in hepatic vasculature. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2001;281(5):1188-95. PubMed
- 33. Bautista AP. Netrophilic infiltration in alcoholic hepatitis. Alcohol 2002;27(1):17-21. PubMed
- Manke A, Wang L, Rojanasakul Y. Mechanisms of Nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. BioMed Res Int 2013;13:1-15. Link
- 35. Qu R, Wang X, Wang Z, Wei Z, Wang L. Metal accumulation and antioxidant defenses in the freshwater fish Carassius auratus in response to single and combined exposure to cadmium and hydroxylated multi-walled carbon nanotubes. J Hazard Mater 2014;275:89-98. PubMed
- 36. Zhang J, Cai S, Li J, Xiong L, Tian L, Liu J, et al. Neuroprotective effects of theaflavins against oxidative stressinduced apoptosis in pc12 cells. Neurochem Res 2016;41(12):3364-72. PubMed
- 37. Liu G, Zhang S, Yang K, Zhu L, Lin D. Toxicity of perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid to escherichia coli membrane disruption, oxidative stress, and DNA damage induced cell inactivation and/or death. Environ Pollut 2016;214:806-15. PubMed
- 38. Poulsen SS, Jackson P, Kling K, Knudsen KB, Skaug V, Kyjovska ZO, et al. Multi-walled carbon nanotube physicochemical properties predict pulmonary inflammation and genotoxicity. Nanotoxicology 2016;10(6):1262-75. PubMed