

## Histopathological Effects of Multiwall Carbon Nanotubes on Rat Liver

Vajiheh Nasajpour<sup>1</sup> , Ali Noori<sup>2\*</sup> , Hashem Nayeri<sup>3</sup> 

<sup>1</sup>Flavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

<sup>2</sup>Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

<sup>3</sup>Department 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.

## اثرات هیستوپاتولوژیک نانولوله‌های کربن چند دیواره بر کبد موش صحرایی

وجیهه نساج پور<sup>۱</sup>، علی نوری<sup>۲\*</sup>، هاشم نیری<sup>۳</sup>

### چکیده

**زمینه و هدف:** کاربرد نانولوله‌های کربن در پزشکی، ممکن است سمیت این ترکیبات را به همراه داشته باشد. در تحقیق حاضر اثرات نانولوله‌های کربن بر بافت کبد همراه با ایجاد فشارهای اکسیداتیو مورد بررسی قرار گرفت.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی، غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانولوله‌های کربن چند دیواره عامل دار شده با گروه‌های کربوکسیل (۲۰-۱۰ نانومتر) طی ۲۱ مرحله، به صورت درون صفاقی به رت‌های نر تزریق شد و گروه شاهد سرم فیزیولوژیک را دریافت کردند. خونگیری و تشریح حیوانات در دو مرحله (۲۴ و ۱۴۴ ساعت پس از آخرین تزریق) انجام گرفت. مقاطع بافتی با رنگ آمیزی هماتوکسیلین - اتوزین از کبد تهیه و به وسیله میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. غلظت گروه‌های تیول و مالون دی‌آلدئید اندازه گیری شد و با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** مطالعات بافت‌شناسی اختلالاتی نظیر پرخونی در سیاهرگ مرکز لوبولی، تجمع سلول‌های التهابی، بی‌نظمی سینوزوئیدها و واکوئله شدن هپاتوسیت‌ها را نشان داد که در دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم 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 میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به سایر گروه‌ها افزایش ( $p < 0/05$ ) یافت و در دومین مرحله، مقدار مالون دی‌آلدئید در هر دو دوز نسبت به شاهد، افزایش معنی داری نشان داد ( $p < 0/05$ ).

**نتیجه گیری:** احتمالاً، نانولوله‌های کربن ضمن تجمع و اتصال با اجزای مختلف سلولی در کبد و ایجاد فشارهای اکسیداتیو سبب اختلال در بافت کبد می‌شوند، اما با توجه به عدم مرگ و میر در حیوانات، این اختلالات ممکن است با گذشت زمان کاهش یابند.

**کلید واژه‌ها:** نانولوله‌های کربن؛ کبد - سمیت؛ سمیت بافتی؛ استرس اکسیداتیو.

<sup>۱</sup> واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

<sup>۲</sup> گروه زیست‌شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

<sup>۳</sup> گروه بیوشیمی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

\* 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

لطفاً به این مقاله به صورت 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



کاهش در بقای سلولی و سطوح افزایش یافته سیتوکین‌های پیش‌التهابی و اینترلوکین‌ها نشان می‌دهد MWCNT می‌تواند سبب پاسخ التهابی در کراتینوسیت‌های انسانی در دوز ۰/۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر شوند (۱۲). همچنین فشارهای اکسیداتیو سبب اختلال در عملکرد میتوکندری و زنجیره انتقال الکترون شده و آپوپتوز سلولی را نیز به همراه دارند (۱۳). از مکانیسم‌های دیگر، اثر نانولوله‌های کربن بر سلول‌ها، فعل و انفعال مستقیم آن‌ها با مواد ژنتیکی و در نتیجه آسیب در سطح DNA یا کروموزوم است (۱۴). از تکنیک‌هایی که تاحدی سمیت نانولوله‌های کربن و ایمنی زیستی آن‌ها را کاهش می‌دهند، ایجاد تغییرات سطحی با افزودن گروه‌های عاملی نظیر آمونوم، پلی‌اتیلن گلاکول، هیدروکسیل، کربوکسیل و ... می‌باشد که سطوحی را برای اتصال انواع مختلف ماکرومولکول‌های زیستی و غیرزیستی جهت کاربرد این نانوساختارها فراهم می‌کند (۱۵). با این وجود، در گزارش‌های متعددی به سمیت نانولوله‌های کربن اشاره شده که معمولاً همراه با ایجاد واکنش‌های التهابی است. در این میان، سلول‌های فاگوسیتوزکننده، به‌ویژه نوتروفیل‌ها و ماکروفاژها با حضور در اکثر بافت‌های بدن قادرند نانوذرات را جذب کنند، اما اندام‌های خاصی از جمله 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 به‌صورت 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. آزمایش‌ها با تأیید

ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی مواد می‌تواند با کاهش اندازه آن‌ها در محدوده نانو به‌طور ناگهانی تغییر کند. کوچک شدن اندازه به‌معنای جای‌گیری و استقرار متفاوت اتم‌های سطحی بوده که این امر، فیزیک و شیمی اشیا را تغییر می‌دهد (۱). یک نانولوله تک‌دیواره‌ای (Single Wall Carbon Nanotube, SWCNT) با پیچیدن یک ورقه گرافن به دور خود و ایجاد یک استوانه به‌وجود می‌آید و بسته به اینکه این ورقه گرافنی در چه جهتی به‌دور خود پیچیده شود؛ اشکال نانولوله‌های به‌وجودآمده متفاوت خواهد بود و در صورتی که تعداد ورقه‌های گرافن بیشتر باشد، نانولوله چنددیواره (Multi Wall Carbon Nanotube, Mwcnt) به‌وجود می‌آید (۲). همچنین می‌توان فضای درون لوله‌ها را با مواد گوناگونی نظیر فلزات و برخی پروتئین‌ها پر کرد (۳)، و مواد فلورسنت، آنزیم‌ها، ژن‌ها یا داروهای مختلف را در آن‌ها جاسازی و به‌بافت‌ها و سلول‌های هدف هدایت کرد یا در تکنیک‌های تصویربرداری زیستی از آنها استفاده نمود (۴،۵). در این میان، برخی عوامل ممکن است سبب سمیت نانولوله‌های کربن شوند؛ به‌عنوان مثال خلوص شیمیایی ماده، عامل مهمی در ایمنی زیستی نانوذرات است. نانولوله‌های کربن معمولاً دارای ناخالصی‌های فلزی از جمله آهن، نیکل و کبالت هستند که می‌تواند بر چگونگی واکنش و پاسخ بیولوژیکی اثر بگذارد (۶،۷). از طرفی، شکل ذره بر رفتار جذب و جایگزینی ذره در محیط‌های بیولوژیکی از طریق اثرگذاری بر رفتار کانال‌های یونی در غشای سلول‌ها مؤثر است (۸). همچنین افزایش نسبت سطح به حجم، کیفیت شیمی سطح و بارالکتریکی سطحی باعث افزایش بسیار شدید تعداد گروه‌های فعال در واحد جرم و در نتیجه افزایش واکنش‌پذیری کلی نانولوله‌های کربن و افزایش توانایی آن‌ها در تعاملات بیولوژیکی شده که معمولاً در سیستم گیرنده‌دهنده الکترونی اختلال ایجاد می‌کند و سبب تولید رادیکال‌های آزاد و در نتیجه ایجاد فشارهای اکسیداتیو می‌گردد (۹،۱۰). سلول‌های در معرض CNT به دلیل القای اکسیدان‌ها، دستخوش استرس اکسیداتیو می‌شوند که در پی آن با فعال کردن مسیرهای سیگنالینگ، پروتئین‌کیناز و سیتوکین‌های پیش‌التهابی سبب آپوپتوز و سمیت سلولی می‌شوند (۱۱).



تولید می‌شود. آنیون، نتریو تیو بنزوات زرد رنگ بوده و در طول موج ۴۱۲ نانومتر دارای ماکزیم جذب است (۱۹).

یکی از روش‌های اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپیدها در سرم، اندازه‌گیری محصولات ناشی از شکسته شدن هیدروپراکسیدها، به‌ویژه آلدئیدها بوده که شامل مالون‌دی‌آلدئید نیز می‌باشد. آلدئیدهای گوناگونی از جمله MDA (مالون‌دی‌آلدئید) با تیوباریتوریک اسید (TBA) در PH اسیدی و دمای بالا واکنش می‌دهد. در واکنش تست TBA، یک مولکول از MDA با ۲ مولکول از TBA (MDA-TBA<sub>2</sub>) با تولید رنگدانه‌های صورتی (با جذب ماکزیم در ۵۳۵-۵۳۲ نانومتر)، واکنش نشان می‌دهند (۲۰). جهت بررسی ساختار بافت کبد، از هر گروه، 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 هماتوکسیلین-انوزین رنگ آمیزی شدند. لام‌ها به‌وسیله 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 عکس برداری 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 (۱۴، ۱۸). مقاطع بافتی از نظر هیستولوژیک (وضعیت طناب‌های هپاتوسیستی، سینوزوئیدها و تجمع سلول‌های التهابی) در گروه‌های تیمار در مقایسه با گروه شاهد، بررسی شدند. میانگین مقدار مالون‌دی‌آلدئید و گروه‌های تیول در گروه‌های تیمار و شاهد به کمک آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و تست دانکن با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ مقایسه گردید. سطح معنی‌داری،  $p < 0.05$  در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

در این مطالعه، غلظت مالون‌دی‌آلدئید، ۲۴ ساعت پس از تیمار (پس از آخرین تزریق)، اختلاف معنی‌داری را در گروه‌های تیمار نسبت به گروه شاهد نشان نداد، اما پس از گذشت ۱۴۴ ساعت (۱۹) در هر دو غلظت ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، میانگین مقدار مالون‌دی‌آلدئید، افزایش معنی‌داری نشان داد ( $p < 0.05$ )

شورای پژوهشی دانشگاه و طبق دستورالعمل‌های اخلاقی انجمن بین‌المللی مطالعه درد در مورد حیوانات آزمایشگاهی (International Association for Study of Pain) انجام شد (۱۷).

ابتدا نانولوله‌های کربن چنددیواره عامل دارشده با گروه کربوکسیل (با قطر خارجی ۲۰-۱۰ نانومتر، قطر داخلی ۵-۱۰ نانومتر، طول ۲-۰/۵ میکرومتر، درجه خلوص بالای ۹۵٪ با محتوای ۲% COOH وزنی و سطح ویژه ۲۰۰ مترمربع بر گرم) از شرکت نوترینو در تهران خریداری شد. غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در توپین ۸٪ و سرم فیزیولوژیک (نسبت ۱ به ۱۰۰) به‌عنوان حلال تهیه گردید (۱۰). استفاده از توپین و قراردادن مخلوط حاصل در دستگاه اولتراسونیک با دمای ۴ درجه سانتیگراد و دامنه ۴۰٪ برای مدت ۳۰ دقیقه، به تهیه محلول نسبتاً یکنواخت و هموژن از نانولوله‌های کربن کمک می‌کند (۱۴).

حیوانات به‌صورت تصادفی به ۶ گروه ۸ تایی تقسیم شدند:

گروه‌های تیمار که نانولوله‌های کربن را (با دوزهای ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به‌صورت درون‌صفافی و یک‌روز در میان، طی ۲۱ مرحله دریافت کردند (دو گروه تیمار با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و دو گروه تیمار با دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم با زمان خونگیری متفاوت) و دو گروه شاهد که سرم فیزیولوژی به همراه توپین به آن‌ها تزریق شد (۱۳). با استناد به گزارش‌های قبلی مبنی بر عدم اثرگذاری 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 (۲۴ ساعت پس از آخرین تزریق و ۱۴۴ ساعت پس از آخرین تزریق) (۱۹) مستقیماً از قلب گروه‌های تیمار به‌طور مجزا به‌عمل آمد. حیوانات قبل از اولین تزریق و قبل از خونگیری، وزن شدند.

به‌منظور بررسی میزان فشار اکسیداتیو، غلظت گروه‌های تیول و مالون‌دی‌آلدئید در سرم خون اندازه‌گیری شد. اساس اندازه‌گیری گروه‌های تیول، واکنش گروه‌های سولفیدریل با معرف Elman (5,5-dithiobis 2nitrobenzoic acid, DTNB) بود. از واکنش بین گروه‌های دی‌سولفیدی معرف و گروه‌های تیولی، یک مول 2-nitro - 5thiobenzoate (به‌ازای هر مول سولفیدریل)

را بین گروه‌های مختلف نشان نداد؛ به عبارت دیگر، در دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نیز به حالت نرمال بازگشت (جدول شماره ۲).

(جدول شماره ۱). مقدار گروه‌های تیول پلاسما با استفاده از منحنی استاندارد GSH در طول موج ۴۱۲ نانومتر تعیین گردید که پس از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار، مقدار آن تنها در دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به سایر گروه‌ها، به‌طور معنی‌داری افزایش نشان داد ( $p < 0.05$ )، اما با گذشت ۱۴۴ ساعت (۶ روز) از تیمار، مقدار گروه‌های تیول پلاسما، اختلاف معنی‌داری

جدول شماره ۱: تغییرات مقدار مالون‌دی‌آلدئید ۲۴ و ۱۴۴ ساعت پس از آخرین تزریق نانولوله‌های کربن چنددیواره کربوکسیل‌دار، با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه

| گروه‌ها                                      | گروه‌های تیمار ۲۴ ساعته | گروه‌های تیمار ۱۴۴ ساعته |
|--|-------------------------|--------------------------|
| غلظت نانولوله‌های کربن (میلی‌گرم بر کیلوگرم) | MDA (میکرومولار)        | MDA (میکرومولار)         |
| کنترل (شاهد)                                 | ۲/۵۹±۰/۲۷               | ۲/۴۵±۰/۲۱                |
| ۱۰   | ۲/۶۹±۰/۱۶               | ۲/۸۸±۰/۳۲*               |
| ۲۰   | ۲/۷۶±۰/۳۷               | ۲/۷۹±۰/۳۳*               |
| f  | ۰/۷۶۰                   | ۴/۵۳۷                    |
| p  | ۰/۴۸۰                   | ۰/۰۲۳                    |

\*: افزایش مقدار مالون‌دی‌آلدئید نسبت به گروه شاهد ( $p < 0.05$ )

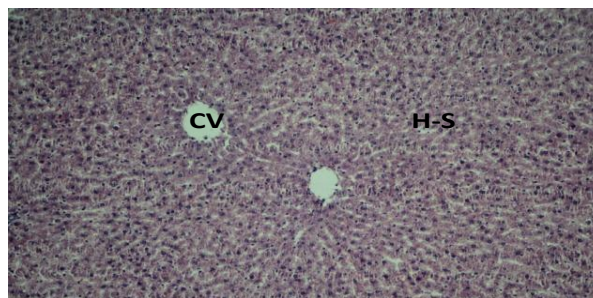
جدول شماره ۲: غلظت گروه‌های تیول ۲۴ و ۱۴۴ ساعت پس از آخرین تزریق نانولوله‌های کربن چنددیواره کربوکسیل‌دار، با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه

| گروه‌ها                                      | گروه‌های تیمار ۲۴ ساعته           | گروه‌های تیمار ۱۴۴ ساعته          |
|--|-----------------------------------|-----------------------------------|
| غلظت نانولوله‌های کربن (میلی‌گرم بر کیلوگرم) | گروه‌های تیول پلاسما (میلی‌مولار) | گروه‌های تیول پلاسما (میلی‌مولار) |
| کنترل (شاهد)                                 | ۰/۳۴±۰/۰۵                         | ۰/۳۲±۰/۰۲                         |
| ۱۰   | ۰/۴۱±۰/۰۴*                        | ۰/۳۱±۰/۰۲                         |
| ۲۰   | ۰/۳۸±۰/۰۲                         | ۰/۳۰±۰/۰۳                         |
| f  | ۵/۵۷۴                             | ۰/۹۱۷                             |
| p  | ۰/۰۱۱                             | ۰/۴۱۵                             |

\*: افزایش مقدار گروه‌های تیول نسبت به گروه شاهد ( $p < 0.05$ )

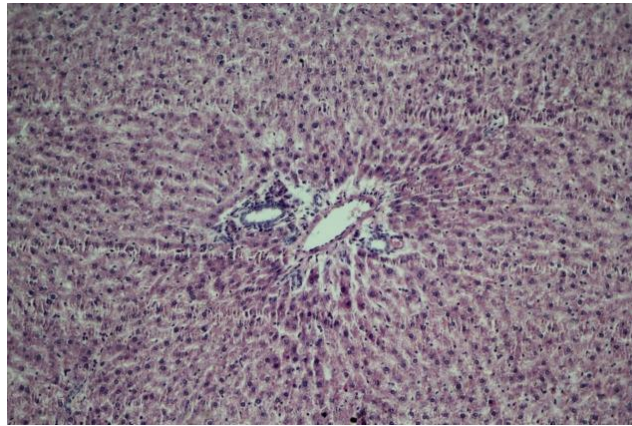
همچنین طناب‌های هیپاتوسیستی و سینوزوئیدها منظم، هسته هیپاتوسیت‌ها بزرگ و مشخص، سیاهرگ‌های مرکز لوپولی با دیواره‌ای سالم و فضای پورت (شامل: سرخرگ، سیاهرگ کبدی و مجرای صفراوی)، حالتی نرمال داشتند و هیچ‌گونه تراکمی از سلول‌های التهابی مشاهده نشد (شکل ۳-۱).

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.

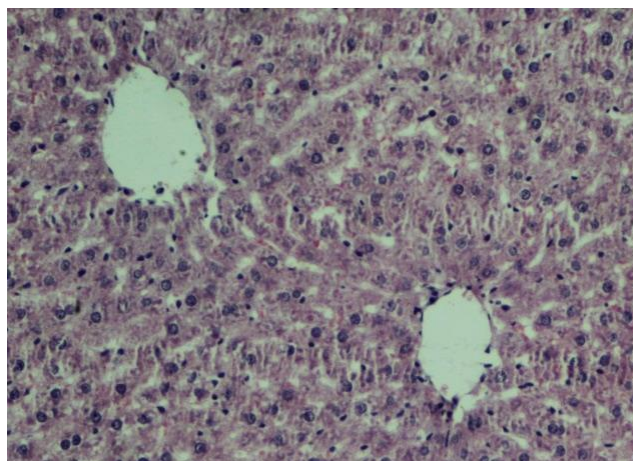


شکل شماره ۱: گروه شاهد: مقطع بافت کبد با رنگ آمیزی H&E و بزرگنمایی ۱۰۰. CV سیاهرگ مرکز لوپولی، H-S هیپاتوسیت‌ها و سینوزوئیدها.





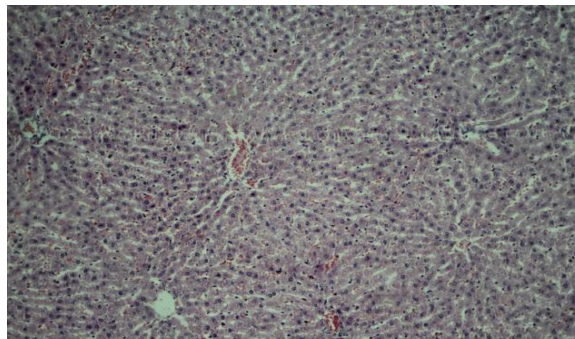
شکل شماره ۲: گروه شاهد: مقطع بافت کبد با رنگ آمیزی H&E و بزرگنمایی ۱۰۰. فضای پورت: A سرخرگ کبدی، B مجرای صفراوی.



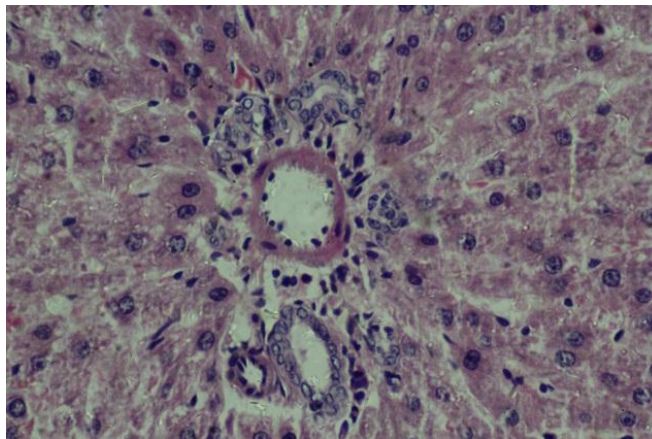
شکل شماره ۳: گروه شاهد: مقطع بافت کبد با رنگ آمیزی H&E و بزرگنمایی ۴۰۰. وضعیت نرمال سینوزوئیدها و هپاتوسیت‌ها، سیاهرگ مرکز لوبولی با دیواره‌ای نازک (cv).

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

در مقاطع بافتی مربوط به غلظت ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم پس از ۲۴ ساعت، در برخی سیاهرگ‌های مرکز لوبولی و سینوزوئیدها، احتقان یا تجمع خون دیده شد.



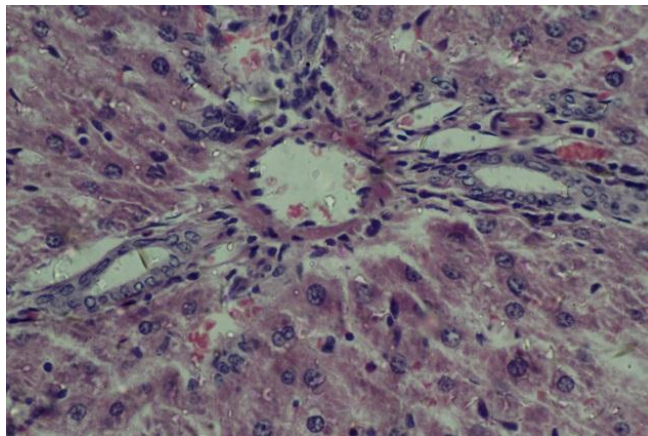
شکل شماره ۴: غلظت ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم ۲۴ ساعت پس از تزریق: مقطع بافت کبد با رنگ آمیزی H&E و



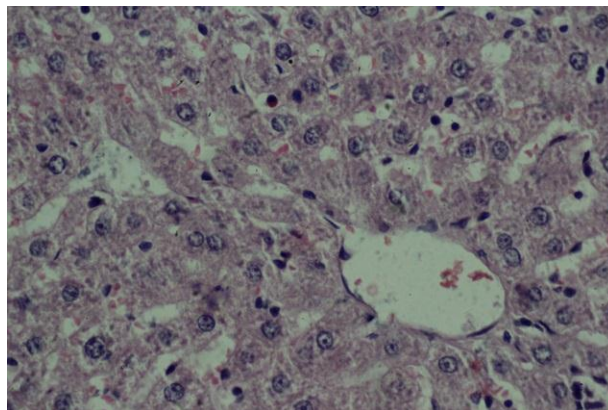
شکل شماره ۵: غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ۲۴ ساعت پس از تزریق: مقطع بافت کبد با رنگ آمیزی H&E و بزرگنمایی ۴۰۰. تجمع سلول‌های التهابی در فضای پورت (فلش نازک) و هیپاتوسیت‌های لیز شده (فلش ضخیم).

همچنین تغییرات جدیدی در مقاطع بافتی این گروه به صورت تورم و واکوئل شدن هیپاتوسیت‌ها مشاهده گردید؛ به طوری که فضاهای سینوزوئیدی ناپدید شده بود. این تغییرات معمولاً با آتروفی شدید هسته هیپاتوسیت‌ها در برخی نقاط همراه بود (شکل ۶-۸).

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

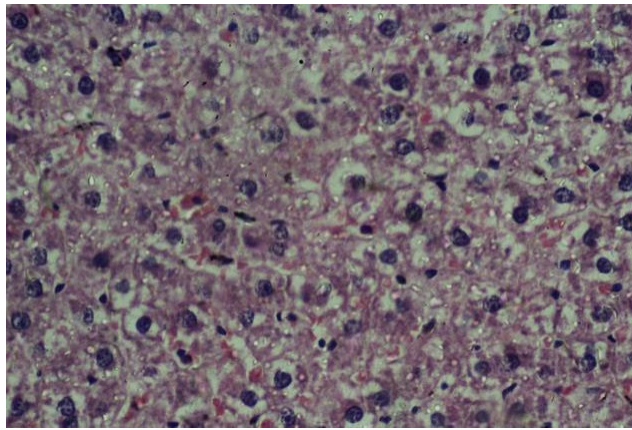


شکل شماره ۶: غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ۲۴ ساعت پس از تزریق: مقطع بافت کبد با رنگ آمیزی H&E و بزرگنمایی ۴۰۰. تجمع شدید سلول‌های التهابی در فضای پورت به خوبی مشهود است.



شکل شماره ۷: غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ۲۴ ساعت پس از تزریق: مقطع بافت کبد با رنگ آمیزی H&E و بزرگنمایی ۴۰۰. هیپاتوسیت‌های لیز شده و فاقد هسته (فلش نازک) اتساع سینوزوئیدها (فلش ضخیم).

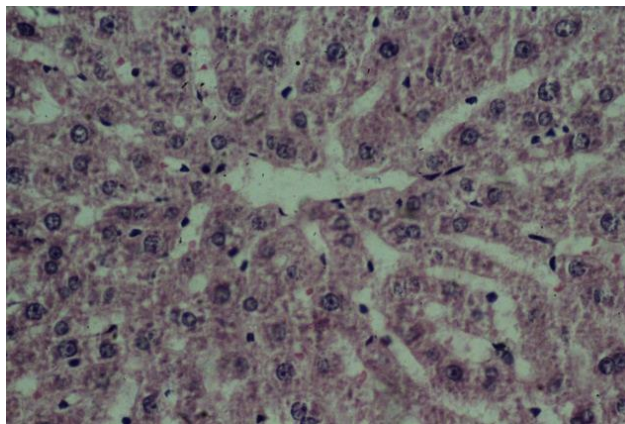




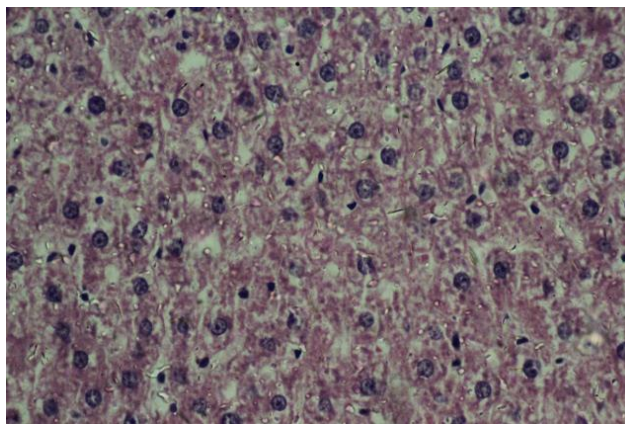
شکل شماره ۸: غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ۲۴ ساعت پس از تزریق: مقطع بافت کبد با رنگ آمیزی H&E و بزرگنمایی ۴۰۰. تورم و واکوئل شدن سیتوپلاسم هیاتوسیت‌ها (فلش ضخیم)، آتروفی هسته هیاتوسیت‌ها (فلش نازک). سینوزوئیدها نامشخص هستند.

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

در اثر تزریق نانولوله‌های کربن چنددیواره کریوکسیل‌دار با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم 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 سلول‌



شکل شماره ۹: غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ۱۴۴ ساعت پس از تزریق: مقطع بافت کبد با رنگ آمیزی H&E و بزرگنمایی ۴۰۰. هیاتوسیت‌های لیز شده (فلش نازک)، اتساع سینوزوئیدها (فلش ضخیم) و هسته‌های آتروفی شده (فلش سمت چپ).

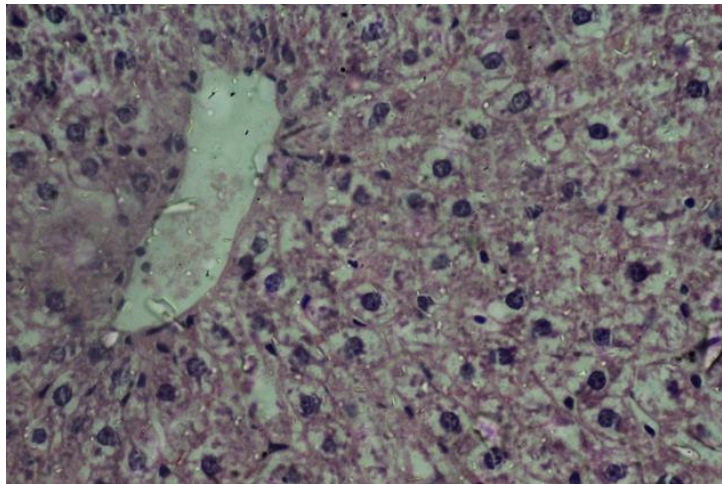


شکل شماره ۱۰: غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ۱۴۴ ساعت پس از تزریق: مقطع بافت کبد با رنگ آمیزی H&E و بزرگنمایی ۴۰۰. در اکثر نقاط هیاتوسیت‌های واکوئل و متورم دیده می‌شود (فلش) و سینوزوئیدها قابل مشاهده نیستند.

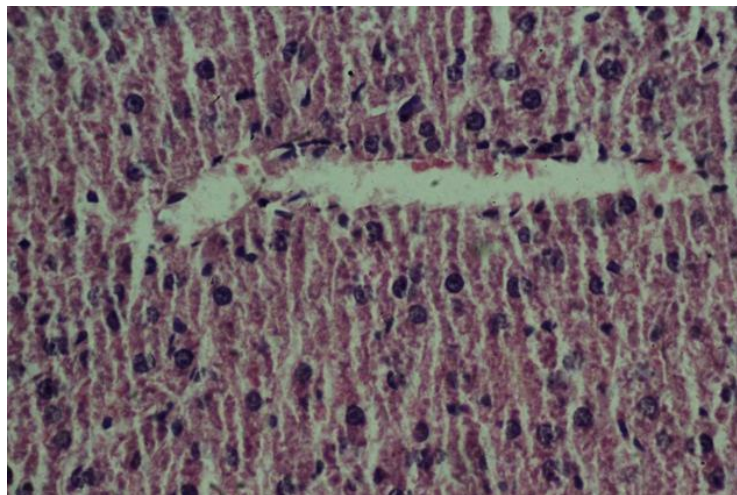


شدیدترین اختلالات بافتی در اثر تزریق نانولوله‌های کربن چنددیواره عامل دارشده با گروه کربوکسیل (با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) پس از گذشت ۱۴۴ ساعت از آخرین تزریق مشاهده گردید.

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



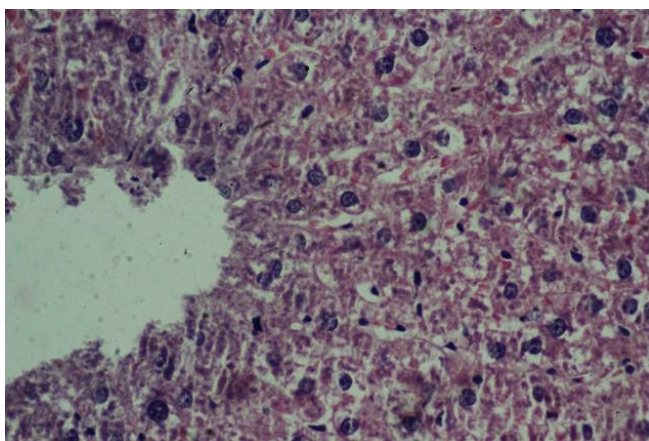
شکل شماره ۱۱: غلظت ۲۰ میلی‌گرم به کله‌گرم، ۱۴۴ ساعت پس از تزریق: مقطع بافت کبد با رنگ آمیزی H&E و بزرگنمایی ۴۰۰. همچنین دژنره‌شدن و بی‌نظمی شدید طناب‌های هپاتوسیتی تنها در به‌وضوح قابل مشاهده است (فلش). این گروه قابل تشخیص بود که منجر به تغییر مورفولوژیک معنی داری در بافت کبد شد (شکل شماره ۱۲).



شکل شماره ۱۲: غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ۱۴۴ ساعت پس از تزریق: مقطع بافت کبد با رنگ آمیزی H&E و بزرگنمایی ۴۰۰.

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).



شکل شماره ۱۳: غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، ۱۴۴ ساعت پس از تزریق: مقطع بافت کبد با رنگ آمیزی H&E و بزرگنمایی ۴۰۰. فلش تخریب دیواره سیاهرگ مرکز لوپولی را نشان می‌دهد.

## بحث

مالون‌دی‌آلدئید، از محصولات نهایی پراکسیداسیون لیپیدی است که از آن به‌طور وسیع به‌عنوان شاخص استرس اکسیداتیو استفاده می‌شود (۲۱). در مطالعه حاضر تزریق نانولوله‌های کربنی ۲۴ ساعت پس از تیمار، بر میزان این فاکتور بی‌تأثیر بود، اما در مرحله دوم خونگیری (۱۴۴ ساعت پس از آخرین تزریق)، افزایش معنی‌دار فاکتور مالون‌دی‌آلدئید در هر دو دوز ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه شاهد به دست آمد. نتایج نسبتاً مشابهی در اثر کاربرد نانولوله‌های کربن تک‌دیواره DNA دار توسط Muresan و همکاران در سال ۲۰۱۰ (۱۹) و نانولوله‌های کربن چند دیواره DNA دار توسط Clichici و همکاران در سال ۲۰۱۲ (۲۲)، در غلظت‌های مختلف به‌صورت افزایش مقدار MDA در ساعات مختلف پس از تیمار به دست آمد که الگوی ناپایدار و متغیر افزایش فشارهای اکسیداتیو را نشان می‌داد. همچنین در مطالعات Patlolla و همکاران در سال ۲۰۱۱، افزایش هیدروپراکسیدازها همراه با اثرات هیپاتوتوکسیک نانولوله‌های کربن چنددیواره کربوکسیل‌دار مشاهده گردید (۱۴)، که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت. برخی مطالعات *invitro* نیز بر روی رده‌های مختلف سلولی، اثرات سمی وابسته به قطر و طول نانولوله‌های کربن چنددیواره را به‌صورت افزایش MDA همراه با آپوپتوز سلولی، مهار چرخه سلولی و افزایش سطح تنش‌های اکسیداتیو نشان داده‌اند (۲۳، ۲۴). 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، درحالی‌که در تحقیق حاضر ۲۴ ساعت پس از تیمار، در مقدار تیول (دوز ۱۰) افزایش معنی‌دار و پس از ۱۴۴ ساعت 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 آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بدن بر ROS تولیدشده در اثر نانولوله‌های کربن باشد.

در همین زمینه، نتایج تحقیق دیگری نشان داد تجمع نانولوله‌های کربن تک‌دیواره در ریه‌ها پس از تزریق درون‌رگی، استرس اکسیداتیو (افزایش ROS)، اکسیداسیون لیپیدها و تشکیل MDA را همزمان با افزایش میزان GSH (یک آنتی‌اکسیدان قوی است که می‌تواند به محافظت سلول‌ها و بافت‌ها در مقابل ROS کمک کند) به همراه دارد که تأییدکننده اثرات بازدارنده آنتی‌اکسیدان‌ها هنگام افزایش فشارهای اکسیداتیو در بدن است و هنگامی‌که در اثر افزایش بیش از حد رادیکال‌های آزاد، تعادل بین سطوح MDA و GSH از بین برود، اختلالات بافتی و عملکردی در ریه‌ها آغاز می‌شود (۲۵، ۲۶)؛ بنابراین در تحقیق حاضر، افزایش موقت میزان گروه‌های تیول پلاسما پس از گذشت ۲۴ ساعت، ممکن است نشان‌دهنده تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی جهت محافظت سلول‌ها و بافت‌ها از اثرات ROS باشد.

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

نیز به همراه داشته باشد (۳۱،۳۳).

در تحقیق حاضر یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین اختلالات بافتی کبد، به صورت لیز شدن هپاتوسیت‌ها مشاهده گردید. در مطالعات متعدد دیگری نیز اثرات ROS ناشی از گنش نانوذرات با سلول‌ها به صورت فعال شدن سلول‌های 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، به نظر می‌رسد در مطالعه حاضر بخشی از آسیب‌های مشاهده شده 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 به صورت تخریب غشای سلولی، پروکسیداسیون لیپیدها، دنا توره 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 آپوپتوز شده است (۳۶)؛ حتی سمیت ریوی نانولوله‌های کربن که در بسیاری از مطالعات به اثبات رسیده، ناشی از القای استرس اکسیداتیو به وسیله این نانوذرات می‌باشد (۳۷). بنابراین به نظر می‌رسد مهم‌ترین عامل ایجاد اثرات سمی و مخرب به وسیله نانولوله‌های کربن بر اندام‌ها، بافت‌ها و جانداران، ناشی از ایجاد استرس اکسیداتیو است که با ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی القاکننده واکنش‌های سطحی، اندازه نانوذرات، بار سطحی، ترکیب شیمیایی و حضور فلزات حدواسط در ترکیب نانولوله‌های کربن به عنوان ناخالصی، رابطه‌ای بسیار معنی‌دار دارد و منجر به طیف گسترده‌ای از اثرات ژنوتوکسیک، التهاب، فیبروزیس 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 مالون‌دی‌آلدئید، همچنین

وابسته به دوز و زمان نشان داد. در گزارش‌های متعدد توسط محققین مختلف نیز اختلالات نسبتاً مشابهی در اثر کاربرد نانولوله‌های کربن در ساختار بافت کبد مشاهده شده که برخی از آن‌ها شامل: اختلالات سلول‌های کبدی، واکوئل شدن، کاربومگالی و تخریب نسبی ورید مرکزی همراه با تجمع نانولوله‌های کربن در کبد می‌باشد (۱۴، ۲۷). همچنین Lacerda و همکاران در سال ۲۰۰۸، اختلالات مشابهی را در کبد حتی در دوز پایین (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) گزارش کردند که با افزایش دوز (۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به طور معنی‌دار 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 سلول‌ها اغلب به صورت آسیب DNA، اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع در لیپیدها (پراکسیداسیون لیپیدی، اکسیداسیون اسیدهای آمینه در پروتئین‌ها و غیرفعال‌سازی آنزیم‌های خاص در اثر اکسیداسیون کوفاکتورها) گزارش شده است (۱۴). مطالعات مختلف نشان داده‌اند نانولوله‌های کربن می‌توانند 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 کار انداختن مکانیسم‌های التهابی، همچنین ایجاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن، به هسته و DNA سلول آسیب رسانده و موجب ایجاد سمیت، تغییر کارکرد و در نهایت، مرگ سلولی می‌شوند (۳۰). نوتروفیل‌ها سیستم ایمنی اندام‌ها در برابر مواد خارجی هستند که قادر به تجمع در رگ‌های بسیار ریز کبد بوده و همزمان واسطه‌های التهابی نظیر MIP-2، IL1، TNF- $\alpha$  و PAF را افزایش می‌دهند (۳۱، ۳۲)، مشخص شده است عادی‌ترین واسطه‌گری نوتروفیل‌ها 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



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

با این حال با توجه به عدم مرگ‌ومیر حیوانات در طی مدت مذکور، ممکن است با گذشت زمان بیشتر، بسیاری از اختلالات رخ داده برطرف گردد که اثبات آن نیاز به انجام مطالعات بیشتری دارد.

بررسی گردد تا اطمینان بیشتری از اثرات سمی یا سمیت 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.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان کمال تشکر را دارند.

### نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر با کاربرد دوزهای نسبتاً پایین نانولوله‌های کربن چنددیواره کربوکسیل‌دار نشان داد اختلالات بافت کبد به احتمال قوی در ارتباط با افزایش معنی‌دار مالون‌دی‌آلدئید 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:

- 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
- Andreoni W, Editor. The physics of fullerene-based and fullerene-related materials. Netherlands: Springer Netherlands; 2000. p. 331-79. PubMed
- Monthieux M. Filling Single-walled carbon nanotubes. *Carbon* 2002;40(10):1809-23. Link
- 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
- 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 a new class of ion channel blockers. *J Biol Chem* 2003;278(20):50212-26. PubMed
- 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
- Firme CP, Bandaru PR. Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems. *Nanomedicine* 2010;6(2):245-56. PubMed



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- $\kappa$ B, 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 histopathological 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
16. 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 Suppl 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. In vitro 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. In vitro 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. In vivo 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

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. Neutrophilic infiltration in alcoholic hepatitis. *Alcohol* 2002;27(1):17-21. PubMed
34. 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 stress-induced 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