

تحقیقی

اثر سمیت نانو لوله‌های کربن چنددیواره بر عملکرد و ساختار بافت کلیه موش‌های صحرایی

زهرا پورمحمدمطوری^۱، دکتر علی نوری^{۲*}^۱ - کارشناس ارشد علوم جانوری گرایش فیزیولوژی جانوری، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.^۲ - استادیار گروه زیست شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: با توجه به خواص منحصر به فرد نانو لوله‌های کربن که در زمینه‌های پزشکی، بیولوژیک و صنعتی کاربرد دارد؛ همزمان باعث در معرض قرارگیری انسان و جانداران شده و احتمال ایجاد اثر سمی بر سلامت انسان و محیط زیست وجود دارد. این مطالعه به منظور تعیین اثر سمیت نانو لوله‌های کربن چنددیواره بر عملکرد و ساختار بافت کلیه موش‌های صحرایی انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی ۵۰ سر موش صحرایی ماده بالغ نژاد ویستار به ۵ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. گروه شاهد سرم فیزیولوژی و توپین و گروه‌های تیمار غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم از نانولوله کربن چنددیواره عامل دار شده با گروه کربوکسیل با قطر کمتر از ۸ نانومتر و طول ۳۰ میکرومتر را طی ۸ مرحله به صورت یک روز در میان و به روش درون صفاقی دریافت کردند. خونگیری در دو مرحله (یک روز پس از آخرین تزریق و ۲۰ روز پس از آخرین تزریق) انجام شد و میزان اوره، اسیداوریک، کراتینین و مالون‌دی‌آلدنید در سرم خون اندازه گیری گردید. همچنین با تهیه مقاطع بافتی از کلیه چپ موش‌ها در هر گروه با رنگ آمیزی همتوکسیلین-انوزین، ساختار بافتی کلیه بررسی شد.

یافته‌ها: در مرحله اول (یک روز پس از آخرین تزریق) فقط در میزان اسیداوریک با غلظت‌های ۲/۵ و ۵ میلی گرم بر کیلوگرم کاهش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد و سایر گروه‌های تیمار مشاهده شد ($P < 0/05$). در مرحله دوم (۲۰ روز پس از آخرین تزریق) کاهش معنی‌داری در میزان اسیداوریک و اوره در تمام غلظت‌ها نسبت به گروه شاهد و کاهش معنی‌دار کراتینین در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم مشاهده شد ($P < 0/05$). مطالعات بافت‌شناسی، تجمع مواد شبه هیالینی حاصل از فعالیت انوزینوفیل‌ها و تجمع سلول‌های التهابی (بازوفیل‌ها و نوتروفیل‌ها) را در بخش قشری و مدولای کلیه، دژنره شدن گلوامرول، اتساع کپسول بومن و دژنره شدن دیواره لوله‌های پیچیده نزدیک را در بخش قشری کلیه نشان داد که این اختلالات به صورت وابسته به دوز افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: نانو لوله‌های کربنی چنددیواره عامل دار شده با گروه‌های کربوکسیل حتی در مقادیر کم (۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم) و با گذشت ۲۰ روز از تزریق، باعث سمیت در ساختار بافتی و عملکرد کلیه می‌شود.

کلید واژه‌ها: نانولوله‌های کربن چنددیواره، بافت کلیه، مالون دی‌آلدنید، اسیداوریک

* نویسنده مسؤول: دکتر علی نوری، پست الکترونیکی alinoori55@gmail.com

نشانی: اصفهان، فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، تلفن ۰۳۱-۳۷۴۲۰۱۳۵، نامبر ۳۷۴۳۰۱۴۵

وصول مقاله: ۱۳۹۵/۱۱/۲۰، اصلاح نهایی: ۱۳۹۶/۵/۴، پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۶/۸

مقدمه

نانومتر هستند و ساختارشان نزدیک به حالت تک بعدی است؛ ولی CNTs چند دیواره بزرگ تر بوده و چندین لوله تک دیواره تودرتو دارند (۲). CNTs دارای چندین ویژگی فیزیکی و شیمیایی خاص هستند. این مواد در بسیاری از صنایع نظیر الکترونیک، انتشار و مواد کمپوزیت به کار می‌روند (۳). علاوه بر این دارای بسیاری از کاربردهای بیولوژیک و پزشکی هستند. CNTs دارای قدرت جذب نور نزدیک به مادون قرمز هستند که قابل استفاده در سنسورهای بیولوژیک است (۴). CNTs دارای ویژگی‌های ممتاز بوده که به نظر می‌رسد کاربرد آنها را به عنوان پروب (کاوشگر) در

فناوری نانو، واژه‌ای کلی است که به تمام فناوری‌های پیشرفته در عرصه کار با مقیاس نانو اطلاق می‌شود. منظور از مقیاس نانو، ابعادی در حدود ۱۰۰-۱ نانومتر است. هرچه اندازه نانوذرات کوچک تر باشند؛ خصوصیات و فعالیت‌های جدید و متفاوت تری از خود نشان می‌دهند (۱). یکی از پرکاربردترین ساختارهای مورد بحث در فن آوری نانو که به عرصه علوم زیستی وارد شده است؛ نانولوله‌های کربنی (carbon nanotubes=CNTs) است. CNTs تک دیواره صفحات گرافن پیچ خورده با نسبت طول به قطر ۱۰۰۰

اخلاقی انجمن بین‌المللی مطالعه درد (International Association for Study of Pain) در مورد حیوانات آزمایشگاهی انجام شد (۱۳).

نانولوله‌های کربن چنددیواره عامل دار شده با گروه کربوکسیل (قطر کمتر از ۸ نانومتر و طول ۳۰ میکرومتر) و درجه خلوص ۹۵ درصد از شرکت نوترینو در تهران خریداری شد. برای به دست آوردن محلولی نسبتاً یکنواخت از CNTs، از توئین ۸۰ درصد و سرم فیزیولوژیک (نسبت یک به صد) به عنوان حلال استفاده گردید و دوزهای ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن تهیه شد (۱۴). از توئین برای تهیه سوسپانسیون یکنواخت استفاده گردید. به طوری که عدم وجود توئین و صرفاً استفاده از سرم فیزیولوژیک سبب رسوب فوری نانولوله‌ها شده و امکان تزریق و تهیه محلول یکنواخت و هموزن وجود ندارد.

حیوانات به صورت تصادفی به ۵ گروه ۱۰ تایی شامل گروه شاهد: دریافت کننده سرم فیزیولوژی به همراه توئین؛ گروه تجربی اول: دریافت کننده دوز ۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از نانولوله کربن؛ گروه تجربی دوم: دریافت کننده دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از نانولوله کربن؛ گروه تجربی سوم: دریافت کننده دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از نانولوله کربن و گروه تجربی چهارم: دریافت کننده دوز ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از نانولوله کربن تقسیم شدند. نانولوله کربن به صورت درون صفاقی به مدت ۸ روز، یک روز در میان تزریق شد (۱۵ و ۱۶).

حیوانات قبل از تزریق و قبل از خونگیری وزن شدند. خونگیری در مرحله اول یک روز پس از آخرین تزریق (از گوشه چشم) و در مرحله دوم ۲۰ روز پس از آخرین تزریق (مستقیماً از قلب) انجام شد.

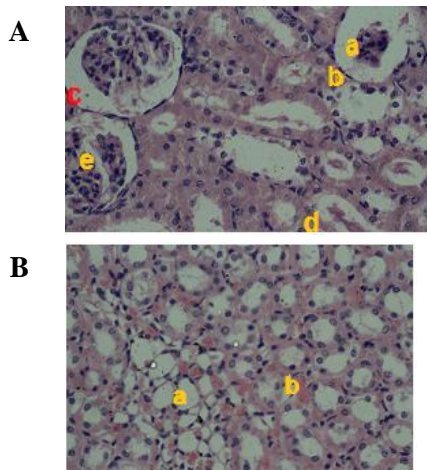
برای ارزیابی اثر سمیت نانولوله‌های کربنی بر فعالیت کلیه، مقادیر اوره (mg/dl)، اسیداوریک (mg/dl) و کراتینین (mg/dl) توسط کیت‌های بیوشیمیایی monobind (ساخت آمریکا) و توسط دستگاه mindreyB800 مورد سنجش قرار گرفت. با اندازه‌گیری میزان مالون‌دی‌آلدئید در نمونه‌های بیولوژیک مختلف می‌توان به میزان پراکسیداسیون چربی‌ها پی برد و از آن به عنوان یک نشانگر برای اندازه‌گیری سطح استرس اکسیداتیو در یک موجود زنده استفاده نمود (۱۷). میزان مالون‌دی‌آلدئید (nmol/ml) در نمونه‌های خونی ۲۰ روزه (مرحله دوم) با استفاده از کیت MDA (ساخت آلمان) و به روش اسپکتروفتومتری تیوباریتوریک اسید اندازه‌گیری گردید. لازم به ذکر است میزان مالون‌دی‌آلدئید فقط در مرحله دوم خونگیری مورد بررسی قرار گرفت. برای مطالعات بافت‌شناسی کلیه چپ (۳ سر موش صحرایی از هر گروه) پس از تشریح با فرمالین ۱۰ درصد فیکس شد. مقاطع بافتی با ضخامت ۴ میکرون توسط میکروتوم دستی (cut 4062 manual، ساخت آلمان) تهیه شد. از

میکروسکوپ‌های اسکینینگ و روش‌های دستکاری سلولی میسر سازد (۵). فضا‌های خالی درون CNTs شاید برای سیستم حمل دارو قابل استفاده باشد (۶). با توجه به جذابیت نانولوله‌ها هم در علوم پایه و هم در علوم کاربردی اثرات خطرناک در معرض قرارگیری انسان و اکوسیستم‌ها غیرقابل کنترل بوده و مسیرهای تماس مستقیم و غیرمستقیم با این مواد اجتناب ناپذیر است (۷). اکثر کنش‌ها و واکنش‌ها بین CNTs و سلول‌ها شامل جذب نانولوله‌ها، اثر بر سلول به روش‌های مختلف، اثر بر سیگنال‌های سلولی، به هم‌ریختگی غشاء، تولید سیتوکین‌ها، کموکین‌ها و گونه‌های فعال اکسیژن (reactive oxygen species: ROS) و واکنش‌های سمی آشکار، آپوپتوز و سمیت‌های غیرقابل مشاهده است (۸). CNTs چنددیواره با نسبت ابعاد بالا بر ریه موش‌های صحرایی، سبب افزایش نوتروفیل‌ها و التهاب و واکنش‌های فیبروزی شده است (۹). تزریق درون سیاهرگی نانولوله‌های تک دیواره عامل دار شده با diethylenetriaminepentaacetic نشان داده که این نانولوله‌ها در ادرار ترشح و دفع نشده و به نظر می‌رسد چسبندگی و اتصال بالایی با پروتئین‌های پلازما دارد. نیمه عمر بالای CNTs پس از تزریق درون رگی نشان‌دهنده کنش و اتصال قوی آنها با پروتئین‌های خونی است (۱۰). چنین نانولوله‌هایی با دارا بودن سطح کاتیونی جهت هدایت و انتقال DNA پلاسمید به سلول‌ها در شرایط *in vitro* مناسب بوده و نیز برای انتقال ژن کاربرد دارد. به‌طور کلی تغییرات سطحی با استفاده از گروه‌های عاملی مختلف سبب تغییرات زیادی در زیست‌سازگاری، حلالیت، کلیرنس کلیوی (دفع کلیوی)، نیمه‌عمر حضور در گردش خون و تغییر در سمیت CNTs می‌شود (۱۱). تزریق درون صفاقی CNTs تک دیواره عامل دار شده با گروه کربوکسیل، تخریب سلول‌های کبدی و آتروفی شدن بافت کبد را به علت تولید رادیکال‌های آزاد و ایجاد فشارهای اکسیداتیو در دوزهای بالا نشان داده است (۱۲). این مطالعه به منظور تعیین اثر سمیت نانولوله‌های کربن چنددیواره بر عملکرد و ساختار بافت کلیه موش‌های صحرایی انجام شد.

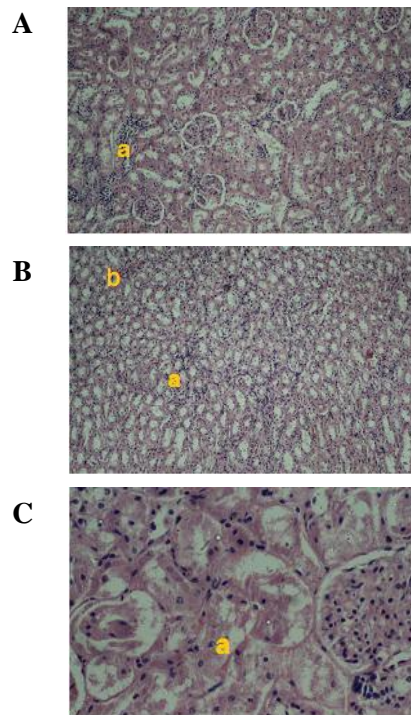
روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۵۰ سر موش صحرایی ماده بالغ نژاد ویستار در آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان - اصفهان طی سال ۱۳۹۵ انجام شد.

حیوانات با میانگین متوسط وزن ۱۸۰ گرم از دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان خریداری شدند و در شرایط آزمایشگاهی با دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی به منظور سازگاری با محیط نگهداری شدند. موش‌ها در طول مطالعه دسترسی کافی به آب و غذا داشتند. آزمایشات مورد تایید شورای پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان - اصفهان قرار گرفت و بر طبق دستورالعمل‌های



شکل ۱: مقاطع بافتی کلیه گروه تجربی دریافت کننده دوز ۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن از نانولوله کربن رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین، بزرگ نمای $\times 400$ a (A): دژنره شدن و تحلیل رفتن گلومرول؛ c: اتساع و گشادگی کپسول بومن؛ e: تخریب و دژنره شده گلومرول؛ d: تجمع مواد شبه هیالینی؛ a (B): بخش نازک لوله هنله؛ b: تجمع مواد شبه هیالینی در بخش مرکزی کلیه (مجاری لوله های هنله)



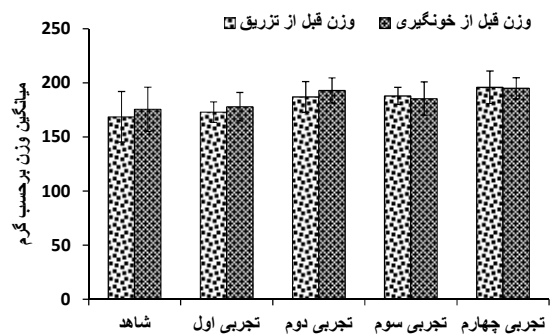
شکل ۲: مقاطع بافتی کلیه گروه تجربی دریافت کننده دوز ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن از نانولوله کربن رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین a (A): التهاب و تجمع شدید سلول های التهابی (بازوفیل ها و نوتروفیل ها)؛ a (B): تجمع شدید سلول های التهابی در بخش مرکزی کلیه؛ b: تجمع مواد شبه هیالینی؛ بزرگ نمای $\times 100$ a (C): دژنره شدن شدید دیواره لوله های پیچیده نزدیک همراه با لیز شدن سلول ها و رها شدن هسته؛ بزرگ نمای $\times 400$

هر کلیه سه لام و در مجموع ۴۵ لام آماده و به روش هماتوکسیلین-انوزین رنگ آمیزی گردید و با میکروسکوپ نوری (CX 22 LED Olympus، ساخت ژاپن) مجهز به دوربین مورد بررسی قرار گرفت.

داده ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS-17 و آزمون های آنالیز واریانس یک طرفه و تست دانکن در سطح معنی داری کمتر از ۰/۰۵ تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها

میانگین وزن حیوانات در تمام گروه ها قبل و بعد از تیمار اختلاف آماری معنی داری نشان نداد (نمودار یک).



نمودار ۱: میانگین وزن موش های صحرائی در غلظت های مختلف قبل از تزریق و قبل از خونگیری گروه شاهد دریافت کننده سرم فیزیولوژی به همراه توئین؛ گروه های تجربی اول تا چهارم به ترتیب دریافت کننده درون صفاقی دوزهای ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن از نانولوله کربن به مدت ۸ روز، یک روز در میان

میانگین میزان اسیداوریک در مرحله اول در گروه های تجربی اول و دوم نسبت به گروه شاهد بیشترین کاهش معنی دار را نشان داد ($P < 0/01$). در حالی که میانگین مقدار اوره و کراتینین در گروه های تیمار نسبت به گروه شاهد اختلاف آماری معنی دار نشان نداد (جدول یک). در مرحله دوم تغییرات میانگین مقادیر عوامل کلیوی نسبت به مرحله اول بیشتر بود. به طوری که کاهش معنی دار میزان اسیداوریک و اوره ($P < 0/01$) در تمام گروه ها نسبت به گروه شاهد مشاهده شد. همچنین کاهش معنی دار ($P < 0/01$) در میانگین مقدار کراتینین در گروه های تجربی دوم و سوم و افزایش معنی دار ($P < 0/01$) در گروه تجربی چهارم نسبت به گروه شاهد به دست آمد (جدول یک). مالون دی آلدئید (nmol/ml) در گروه شاهد $13/45 \pm 2/22$ و گروه تجربی اول $8/25 \pm 3/35$ گروه تجربی دوم $11/91 \pm 6/22$ ، گروه تجربی سوم $10/60 \pm 6/82$ و گروه تجربی چهارم $10/73 \pm 6/96$ تعیین شد که تغییر آماری معنی داری بین گروه های مختلف یافت نشد.

بررسی هیستولوژیک لام ها نشان داد که تزریق CNTs چنددیواره کربو کسلیک اختلالات و تغییرات قابل توجهی در

جدول ۱: میانگین تغییرات اسیداوریک، اوره و کراتینین در دو مرحله خونگیری گروه‌های مورد مطالعه

زمان خونگیری	گروه‌ها	اسیداوریک	اوره	کراتینین
یک روز پس از آخرین تزریق	شاهد	۲/۹۰±۰/۴۸	۲۳/۵±۵/۸۳	۰/۴۳±۰/۰۳
	تجربی اول	۱/۷۵±۰/۲۷*	۲۳/۹۰±۱/۷۹	۰/۴۴±۰/۰۳
	تجربی دوم	۲/۳۲±۰/۵۰**	۲۴/۰±۲/۱۶	۰/۴۶±۰/۰۲
	تجربی سوم	۲/۷۷±۰/۷۰	۲۱/۹۰±۲/۹۶	۰/۴۴±۰/۰۳
	تجربی چهارم	۲/۶۵±۰/۶۸	۲۲/۸۰±۳/۸۲	۰/۴۷±۰/۰۳
	F	۶/۹۳۹	۰/۵۹۳	۱/۶۷
	P-value	P<۰/۰۰۱	P>۰/۰۵	P>۰/۰۵
۲۰ روز پس از آخرین تزریق	شاهد	۲/۲۹±۰/۶۹	۱۸/۱۹±۲/۹۸	۰/۴۷±۰/۰۲
	تجربی اول	۱/۳۸±۰/۵۱ †	۷/۳۴±۲/۲۵ *	۰/۴۶±۰/۰۴
	تجربی دوم	۰/۸۳±۰/۴۱ *	۹/۴±۱/۹۹ *	۰/۳۴±۰/۰۸ *
	تجربی سوم	۰/۶۹±۰/۳۴ *	۷/۵۸±۱/۰۳ *	۰/۳۴±۰/۰۷ *
	تجربی چهارم	۱/۶۱±۰/۵۲ †	۷/۲۶±۲/۰۴ †	۰/۵۴±۰/۰۳ †
	F	۱۵/۹۸	۴۷/۳۱۷	۲۳/۱۹
	P	P<۰/۰۰۱	P<۰/۰۰۱	P<۰/۰۰۱

گروه شاهد دریافت کننده سرم فیزیولوژی به همراه توئین؛ گروه‌های تجربی اول تا چهارم به ترتیب دریافت کننده درون صفاتی دوزهای ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن از نانولوله کربن به مدت ۸ روز، یک روز در میان $P<۰/۰۰۱$ * $P<۰/۰۵$ ** $P<۰/۰۱$ † در گروه‌های تجربی نسبت به گروه شاهد

بدن) کاهش اسیداوریک معنی دار نبود. عدم تغییر معنی دار میزان اسیداوریک در دوزهای بالا ممکن است به علت بالا بودن تراکم نانولوله‌ها و آگلومره شدن آنها پس از تزریق باشد که سبب عدم جذب احتمالی CNTs به گردش خون و عدم ورود آنها به کلیه‌ها شده باشد (۳). میزان اسیداوریک در مرحله دوم خونگیری (۲۰ روز پس از آخرین تزریق) در تمام دوزها کاهش معنی داری نشان داد. به نظر می‌رسد با گذشت زمان به مدت ۲۰ روز از تزریق، نه تنها اثرات CNTs از بین نمی‌رود؛ بلکه بر عملکرد کلیه اثرات جانبی بیشتری اعمال کرده است که ممکن است به علت جذب و تجمع بیشتر آنها در کلیه باشد (۱۲). با توجه به مطالعات انجام شده نظیر مطالعه Wang و همکاران تزریق نانولوله کربن تک دیواره هیدروکسیله نیز باعث تغییرات معنی دار در میزان اسیداوریک گردید (۲۰) که این اثرات به دلیل تولید انواع رادیکال‌های فعال اکسیژن و در نتیجه ایجاد استرس اکسیداتیو در کلیه است (۲۱). برخلاف اسیداوریک، میزان کراتینین و اوره خون در گروه‌های مختلف تیمار در خونگیری مرحله اول تغییرات معنی داری نداشتند. در حالی که بررسی میزان کراتینین سرم در مرحله دوم خونگیری کاهش معنی دار در غلظت‌های ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن و افزایش معنی دار در گروه تیمار با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدنرا نسبت به گروه شاهد نشان داد. همچنین کاهش معنی داری در میانگین مقدار اوره سرم خون در همه گروه‌های تیمار نسبت به گروه شاهد دیده شد. در واقع میزان کراتینین و اوره خون ۲۰ روز پس از آخرین تزریق تحت تاثیر CNTs قرار گرفته است. این نتایج همچنین نشان می‌دهد که ظاهراً اثرات سمی CNTs عامل دار شده با گروه کربوکیسل با گذشت زمان ۲۰ روز از تیمار

غلظت‌های مختلف در بافت کلیه ایجاد کرده است و شدت این تغییرات به صورت وابسته به دوز افزایش نشان داد. در ۳۰ درصد مقاطع تهیه شده گروه تجربی اول دژنره شدن و تخریب گلومرول، اتساع کیسول بومن و تجمع مواد شبه‌هیالینی مشاهده شد (شکل یک). در گروه تجربی چهارم التهاب و تجمع شدید سلول‌های التهابی (بازوفیل‌ها و نوتروفیل‌ها) در اکثر نقاط بافت در هر دو بخش قشری و مرکزی کلیه مشاهده شد که نسبت به دیگر گروه‌های تجربی بیشتر بود. در حالی که این پدیده در دوزهای پایین تر، فقط در بخش قشری با شدت کمتر به وجود آمد. همچنین تجمع مواد شبه‌هیالینی در هر دو بخش کلیه با شدت بیشتر و دژنره شدن شدید دیواره لوله‌های پیچیده نزدیک همراه با لیز شدن سلول‌ها و رها شدن هسته در این گروه مشاهده شد (شکل ۲).

بحث

در مطالعه حاضر تغییرات وزن موش‌های صحرایی قبل و پس از تزریق CNTs هیچگونه تغییر معنی داری را در مقایسه با گروه شاهد نشان نداد که با دیگر مطالعات (۱۸ و ۱۹) همراستا بود. در مطالعه حاضر و خونگیری اول (یک روز پس از آخرین تزریق) دوزهای پایین CNTs (۲/۵ و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) سبب کاهش معنی دار اسیداوریک نسبت به سایر گروه‌ها گردید و این کاهش در دوز ۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن شدیدتر بود. این نتیجه بیانگر آن است که CNTs چنددیواره عامل دار با گروه کربوکیسل پس از ۸ بار تزریق حتی در کمترین غلظت و گذشت زمان ۲۴ ساعت از آخرین تزریق، موجب تغییراتی در میزان اسیداوریک می‌شود. به طوری که این تغییرات وابسته به دوز بوده و در غلظت‌های بالاتر (۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن

شدت یافته است. احتمال می‌رود تخریب سلول‌های گلمرولی و لوله‌های نفرونی تحت تاثیر رادیکال‌های آزاد تولید شده توسط CNTs سبب آسیب غشایی این سلول‌ها شده و در عملکرد کلیه و در نتیجه میزان عوامل کلیوی اثر داشته است (۲۲).

در مطالعه حاضر میزان مالون‌دی‌آلدئید گروه‌های تیمار تغییر معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد نشان نداد.

در مطالعه Jain و همکاران در رابطه با اثر چند دیواره بر کلیه و کبد، در تمام گروه‌های تیمار، CNTs غیرعامل‌دار، پس از گذشت ۷ روز بیشترین فشار اکسیداتیو را ایجاد نمودند. در مورد نانولوله‌های عامل‌دار (با گروه آمونوم) با هر درجه‌ای از عامل‌دار شدن میزان فشارهای اکسیداتیو طبیعی بود؛ اما پس از گذشت ۲۸ روز از زمان تزریق CNTs، سطح مالون‌دی‌آلدئید در هر دو مورد عامل‌دار و غیرعامل‌دار اختلاف غیرمعنی‌دار را نسبت به کنترل نشان داد. به عبارت دیگر فشارهای اکسیداتیو القا شده در روز ۷، با گذشت ۲۸ روز تقریباً بر طرف شد (۱۹) که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. در واقع ممکن است در مطالعه حاضر، در طول مدت ۲۰ روز، فشارهای اکسیداتیو به حداکثر رسیده و سبب ایجاد اثراتی بر فعالیت کلیه شده و پس از آن میزان مالون‌دی‌آلدئید به حد طبیعی بازگشته باشد. همچنین ممکن است دوز به کار رفته از CNTs کربوکیلیک در مطالعه حاضر ضمن ایجاد فشارهای اکسیداتیو بر میزان مالون‌دی‌آلدئید بی‌تاثیر بوده باشد.

در مطالعه حاضر شدت اختلالات به صورت وابسته به دوز افزایش داشت. این تغییرات به احتمال زیاد با تجمع CNTs در کلیه و ایجاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن ارتباط مستقیم دارد که سبب پراکسیداسیون لیپیدها و تخریب غشاهای مختلف می‌گردد و همچنین تجمع سلول‌های مختلف التهابی را به همراه دارد. از طرفی نانولوله‌ها ضمن تجمع احتمالی در سلول و هسته سبب ایجاد اختلال در عملکرد ژن‌ها نیز شده و اثرات ژنوتوکسیستی ایجاد می‌کنند. البته چنین اثراتی در رابطه با تیمار حیوانات با انواع مختلف نانوذرات مشاهده شده است که همگی از مکانیسم کلی یکسانی برای ایجاد سمیت برخوردارند (۲۳). برخلاف نتایج مطالعه حاضر در دیگر مطالعات با یک بار تزریق CNTs عامل‌دار شده با گروه‌های آمونوم، اکسیژن‌دار، پلی‌اتیلن‌گلایکول و هیدروکسیل، کلیه‌ها گلمرول‌هایی با مورفولوژی طبیعی بدون هیچ تجمع نانولوله یا آسیب بافتی نشان دادند که اثبات کننده غیرسمی بودن CNTs بر این اندام است. همچنین عبور از طریق کلیه هیچ تخریب یا اختلالی را در فیلتراسیون گلمرولی یا تغییرات بافتی ایجاد نکرد که نشانگر انتقال سریع نانولوله‌ها از سیستم خونی کلیه بدون اثرات جانبی بر عملکرد کلیوی است. دلیل این مغایرت را می‌توان به تفاوت در دوزها و تعداد دفعات تزریق شده و به ویژه به قطر CNTs و نوع

گروه‌های عاملی آنها نسبت داد. چون ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی CNTs بسیار تحت تاثیر این عوامل قرار گرفته و بر ماندگاری آنها در گردش خون و سرعت دفع آنها توسط کلیه بسیار موثر است (۱۱و۱۸و۲۰). این در حالی است که Fadel و همکاران نشان دادند CNTs عامل‌دار با گروه‌های اکسیژن‌دار موجب سمیت ریوی و تخریب بافت ریه می‌شود که همراه با ایجاد التهاب ناشی از استرس اکسیداتیو است و با نتایج ما مطابقت دارد. احتمالاً نوع و میزان گروه‌های عاملی در نیمه‌عمر و ماندگاری CNTs موثر بوده و سبب تجمع طولانی‌تر و سمیت بیشتر آنها شده است (۲۴). در مطالعه Rajagopalan و همکاران نیز نمونه‌های دیگر CNTs عامل‌دار شده با هیدروکسیل با نیمه‌عمر بالاتر به مدت ۶/۸ ساعت در گردش خون بررسی شده است. این نانولوله‌ها چسبندگی و اتصال بالایی با پروتئین‌های پلاسما داشتند و در ادرار ترشح و دفع نشدند. تجمعات بزرگی از آنها در سینوزوئیدهای کبد و تجمعات نقطه‌ای کم درطحال مشاهده و موجب اثر سمیت بر بافت کبد وطحال گردید (۱۰). در مطالعه حاضر هم ممکن است حضور گروه‌های عاملی کربوکیلیک بر تجمع و ماندگاری CNTs در کلیه موثر بوده و از طریق ایجاد فشارهای اکسیداتیو اختلالاتی را در بافت و عملکرد کلیه پس از گذشت ۲۰ روز از تیمار ایجاد کرده باشد. پیشنهاد می‌گردد در تحقیقات آینده تجمع CNTs در کلیه با تهیه مقاطع بافتی با رنگ آمیزی‌های اختصاصی مورد بررسی و تایید قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که نانولوله‌های کربنی چنددیواره کربوکیلیک حتی در دوزهای کم (۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) پس از گذشت ۲۰ روز از تزریق‌های مکرر (۸ مرتبه) در کلیه سمیت ایجاد می‌کنند. با این حال اکثر عوامل کلیوی و وزن حیوانات در یک روز پس از تزریق نانولوله‌های کربن تغییرات معنی‌دار به همراه نداشت که احتمالاً نشان‌دهنده عدم سمیت این نانوذرات در زمان کوتاه است. چنانچه با ایجاد تغییراتی در گروه‌های عاملی در جهت زیست سازگار شدن آنها، سریع‌تر از بدن دفع گردند؛ ممکن است با گذشت زمان هم سمیتی در کلیه ایجاد نکنند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه (شماره ۱۰۱۹۹۳۱۰۱۷۲۳۰۵) خانم زهرا پورمحمدطوری برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته علوم جانوری گرایش فیزیولوژی جانوری از دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان بود. بدینوسیله از مسؤولین محترم این دانشگاه قدردانی می‌گردد. همچنین از جناب آقای حسن صادقی به خاطر همکاری در انجام تزریقات و خونگیری سپاسگزاری می‌گردد.

References

- Kumar A, Jakhmola A. RNA-mediated fluorescent Q-Pb nanoparticles. *Langmuir*. 2007; 23(6): 2915-18. doi: 10.1021/la0628975
- Piccinno F, Gottschalk F, Seeger S, Nowack B. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *J Nanopart Res*. 2012; 14: 1109. doi:10.1007/s11051-012-1109-9
- Raffa V, Ciofani G, Vittorio O, Riggio C, Cuschieri A. Physicochemical properties affecting cellular uptake of carbon nanotubes. *Nanomedicine (Lond)*. 2010 Jan;5(1):89-97. doi: 10.2217/nmm.09.95
- Cherukuri P, Bachilo SM, Litovsky SH, Weisman RB. Near-infrared fluorescence microscopy of single-walled carbon nanotubes in phagocytic cells. *J Am Chem Soc*. 2004 Dec;126(48):15638-9. doi: 10.1021/ja0466311
- Stevens RM. New carbon nanotube AFM probe technology. *Materials Today*, 2009 Oct;12(1): 42-5. doi: https://doi.org/10.1016/S1369-7021(09)70276-7
- Liu Z, Fan AC, Rakhra K, Sherlock S, Goodwin A, Chen X, et al. Supramolecular stacking of doxorubicin on carbon nanotubes for in vivo cancer therapy. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2009;48(41):7668-72. doi: 10.1002/anie.200902612
- Lee J, Mahendra S, Alvarez PJ. Nanomaterials in the construction industry: a review of their applications and environmental health and safety considerations. *ACS Nano*. 2010 Jul;4(7):3580-90. doi: 10.1021/nn100866w
- Hillegass JM, Shukla A, Lathrop SA, MacPherson MB, Fukagawa NK, Mossman BT. Assessing nanotoxicity in cells in vitro. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2010 May; 2(3): 219-31. doi: 10.1002/wnan.54
- Poland CA, Duffin R, Kinloch I, Maynard A, Wallace WA, Seaton A, et al. Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat Nanotechnol*. 2008 Jul;3(7):423-8. doi: 10.1038/nnano.2008.111
- Rajagopalan P, Wudl F, Schinazi RF, Boudinot FD. Pharmacokinetics of a water-soluble fullerene in rats. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996 Oct;40(10):2262-5.
- Singh R, Pantarotto D, Lacerda L, Pastorin G, Klumpp C, Prato M, et al. Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb;103(9):3357-62. doi: 10.1073/pnas.0509009103
- Shvedova AA, Kisin ER, Murray AR, Kommineni C, Castranova V, Fadeel B, Kagan VE. Increased accumulation of neutrophils and decreased fibrosis in the lung of NADPH oxidase-deficient C57BL/6 mice exposed to carbon nanotubes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008 Sep;231(2):235-40. doi: 10.1016/j.taap.2008.04.018
- Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 1983 Jun;16(2):109-10.
- Donaldson K, Murphy FA, Duffin R, Poland CA. Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma. *Part Fibre Toxicol*. 2010; 7(5):1-17. doi: https://doi.org/10.1186/1743-8977-7-5
- Ali-Boucetta H, Nunes A, Sainz R, Herrero MA, Tian B, Prato M, et al. Asbestos-like pathogenicity of long carbon nanotubes alleviated by chemical functionalization. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2013 Feb;52(8):2274-8. doi: 10.1002/anie.201207664
- Sun B, Wang X, Ji Z, Wang M, Liao YP, Chang CH, et al. NADPH Oxidase-Dependent NLRP3 Inflammasome Activation and its Important Role in Lung Fibrosis by Multiwalled Carbon Nanotubes. *Small*. 2015 May; 11(17):2087-97. doi: 10.1002/sml.201402859
- Bhattacharya K, Andón FT, El-Sayed R, Fadeel B. Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: focus on pulmonary inflammation. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013 Dec;65(15):2087-97. doi: 10.1016/j.addr.2013.05.012
- 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 (Lond)*. 2008 Apr;3(2):149-61. doi: 10.2217/17435889.3.2.149
- Jain S, Thakare VS, Das M, Godugu C, Jain AK, Mathur R, et al. Toxicity of multiwalled carbon nanotubes with end defects critically depends on their functionalization density. *Chem Res Toxicol*. 2011 Nov; 24(11):2028-39. doi: 10.1021/tx2003728
- Wang B, Feng WY, Wang TC, Jia G, Wang M, Shi JW, et al. Acute toxicity of nano- and micro-scale zinc powder in healthy adult mice. *Toxicol Lett*. 2006 Feb; 161(2):115-23. doi: 10.1016/j.toxlet.2005.08.007
- Georgakilas V, Kordatos K, Prato M, Guldi DM, Holzinger M, Hirsch A. Organic functionalization of carbon nanotubes. *J Am Chem Soc*. 2002 Feb;124(5):760-1.
- Smart SK, Cassady AI, Martin DJ. The biocompatibility of carbon nanotubes. *Carbon*. 2006;44(6): 1034-47. doi: https://doi.org/10.1016/j.carbon.2005.10.011
- Park MV, Neigh AM, Vermeulen JP, de la Fonteyne LJ, Verharen HW, Briedé JJ, et al. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials*. 2011 Dec;32(36):9810-7. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.08.085
- Fadel TR, Sharp FA, Vudattu N, Ragheb R, Garyu J, Kim D, et al. A carbon nanotube-polymer composite for T-cell therapy. *Nat Nanotechnol*. 2014 Aug;9(8):639-47. doi: 10.1038/nnano.2014.154

Original Paper

Effect of multi-wall carbon nanotubes toxicity on kidney function and tissue in rats

Zahra Poormohammad Matouri (M.Sc)¹, Ali Noori (Ph.D)^{*2}¹M.Sc in Animal Physiology, Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.²Assistant Professor, Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Abstract

Background and Objective: The unique properties of carbon nanotubes have been used for medical, biological and industrial applications, but it simultaneously exposure to humans and organisms poses a potential for toxic effects on human health and the environment. This study was done to evaluate the effect of multi-wall carbon nanotubes toxicity on kidney function and tissue in rats.

Methods: In this experimental study, 50 mature female Wistar rats were allocated into five groups including: control and experimental groups with dosage of 2.5, 5, 10, 20 mg/kg/bw, respectively. Animals in control group were received physiological saline and Tween. Animals in treatment groups were received 2.5, 5, 10, 20 mg/kg/bw of multi-wall carbon nanotubes functionalized with carboxylic group with diameter less than 8 nm and length 30 micrometers in 8 steps in one day intraperitoneally. Blood samples were conducted in two phases: one day after the last injection and 20 days after the last injection. Urea, uric acid, creatinine and malondialdehyde levels were measured in blood serum. Tissue samples were provided by preparing histological sections of kidney in each group and stain with hematoxylin-eosin. The tissue structure of the kidney was examined by optical microscopy.

Results: In the first stage (one day after the last injection), only the amount of uric acid at concentrations of 2.5 and 5 mg/kg significantly reduced in comparison with controls and other treated groups, respectively ($P < 0.05$). There were no significant changes in the level of other biochemical factors in compared to the control. However, 20 days after the last injection, significant reduction in the level of uric acid and urea was observed in 2.5, 5, 10, 20 mg/kg/bw of multi-wall carbon nanotubes in compared to the control group, although significant reduction in creatinine was seen in dosages of 5 and 10 mg/kg/bw of multi-wall carbon nanotubes in compared to controls ($P < 0.05$). Histological studies showed alterations in treated groups including accumulation of hyaline-like substances derived from the activity of eosinophils and accumulation of inflammatory cells (basophils and neutrophils) in the cortical and medula of the kidney, glomerular degeneration, Bowman capsule dilatation and degeneration of proximal tube wall in the renal cortex which these alterations were dose-dependent.

Conclusion: Multi-wall carbon nanotubes functionalized with carboxyl groups even in low dosage (2.5 mg/kg) and after 20 days of injection cause toxicity in tissue structure and kidney function.

Keywords: Multi-Walled Carbon Nanotubes, Kidney, Tissue, Malondialdehyde, Uric acid

* Corresponding Author: Noori A (Ph.D), E-mail: alinoori55@gmail.com

Received 8 Feb 2017

Revised 26 Jul 2017

Accepted 30 Aug 2017