

## تأثير أنابيب الكربون النانوية متعددة الجدار في نسج الرئة وتركيز أنزيم الكاربونيك انهيدريز Carbonic anhydrase في الأرناب النيوزلندية البيض

فرح محمد غزال الحياي<sup>1</sup>، منى حسين جاتكير<sup>2</sup>، حافظ ابراهيم السعدي<sup>3</sup>

<sup>1</sup> فرع العلوم التمريضية الأساسية، كلية التمريض، جامعة الموصل، الموصل، العراق

<sup>2</sup> قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة الموصل، الموصل، العراق

<sup>3</sup> فرع الأمراض، كلية طب الأسنان، جامعة الموصل، الموصل، العراق

### الملخص

هدف هذا البحث إلى التعرف على مدى تأثير الجرعة المختلفة 1 و 3 و 5 ملغم/مل/كغم من وزن الجسم من مادة أنابيب الكربون النانوية متعددة الجدار Multi Walled Carbon Nanotubes (MWCNTs) على وزن الرئة، وتأثيرها في تركيز أنزيم الكاربونيك انهيدريز Carbonic anhydrase (CA) والتغيرات المظهرية و النسجية المرضية في رئة ذكور الأرناب النيوزلندية البيض، إذ استخدم في هذه الدراسة 40 ذكراً من الأرناب النيوزلندية البيض تراوحت أعمارهم ما بين (12-18) شهراً، وزعت عشوائياً إلى أربعة مجاميع بواقع 10 أرناب لكل مجموعة. وتم حقنها بالمادة النانوية داخل الرغامى Intratracheal instillation، وجمعت عينات الدم ونسج الرئة والرغامى بعد مرور 7 و 90 يوماً من التجريب ولكل مجموعة.

أدى التجريب بأنابيب الكربون النانوية متعددة الجدار إلى إحداث ارتفاعاً معنوياً عند مستوى احتمال ( $P < 0.05$ ) في وزن الرئة لكافة المجاميع بزيادة الجرعة وفترة التجريب مقارنة مع مجموعة السيطرة، أما تأثير أنابيب الكربون النانوية في وظيفة الرئة فتمثل بتقدير تركيز أنزيم الكاربونيك انهيدريز (CA) في مصل الدم، إذ أدت إلى إحداث ارتفاع معنوي في تركيز الأنزيم لكافة المجاميع مقارنة مع مجموعة السيطرة، ودرس تأثير أنابيب الكربون النانوية متعددة الجدار MWCNTs على التغيرات المظهرية و النسجية في رئة الأرناب المجرعة مقارنة مع مجموعة السيطرة، إذ لوحظ حدوث تغييرات مظهرية و نسجية في رئة الأرناب المجرعة بعد مرور 7 أيام من التجريب، فقد تضمنت ابيضاض السطح الخارجي للفصوص، ارتشاح كثيف للخلايا الالتهابية المختلطة (أحادية ومتعددة أشكال النواة)، فرط تنسج، ضخامة الطبقة العضلية للقصبات وتليف هذه المنطقة، أما بعد مرور 90 يوماً من التجريب، فقد كانت التغيرات النسجية مشابهة لتلك التي حدثت بعد مرور 7 أيام إلا أنها أكثر وضوحاً. وهكذا يبين تأثير نسج الرئة بهذه الأنابيب والذي يؤكد الفحص النسجي للرئة.

### المقدمة

بعد الاستشاق من أكثر الطرائق شيوعاً لتعرض الإنسان والحيوان للجسيمات النانوية المحمولة بالهواء في موقع العمل والبيئة. ومعظم الدراسات التي أجريت حول تأثيراتها، تضمنت نماذج رئوية Pulmonary models في القوارض، ونفذت عن طريق تقطير Inhalation أو رشف Aspiration أو استنشاق CNTs [1]. وتعد الدراسة التي أجراها الباحثون [2] في الفئران أول دراسة في هذا الإطار، إذ عوملت الفئران بالتقطير بجرع 0.1 و 0.5 ملغم من CNTs بداخل الرغامى Intratracheally، وعوملت مجموعة السيطرة السالبة بالكربون الأسود والسيطرة الموجبة بالكوارتز Quartz، وتم متابعة التغيرات المرضية الرئوية التي تظهر بعد مرور 7 و 90 يوماً من المعاملة. وأحدثت كافة منتجات الأنابيب النانوية التهابات ورمية حبيبية ظاهرية Epithelioid granulomas اعتماداً على الجرعة، وفي بعض الحالات التهاب خلالي Interstitial inflammation، وكان أكثر شدة في المجموعة التي تم تشريحها بعد مرور 90 يوماً. وأظهرت بعض الحيوانات التهاب حول القصبات Peribronchial inflammation ونخر Necrosis امتد إلى الحواجز السنخية Alveolar septa. واستناداً إلى نفس الوزن

تتألف أنابيب الكربون النانوية CNTs بشكل تام من الكربون، ويمكن وصف هذه الأنابيب النقية على شكل صفيحة مفردة من الكرافيت (شكل من الكربون أسود طري تصنع منه أقلام الرصاص) لتكون أسطوانة بدون درز Seamless cylinders وهناك نوعان من هذه الأنابيب CNTs: أنابيب كربون نانوية مفردة الجدار Single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) وأنابيب كربون متعددة الجدار Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs)، والأخيرة هي الأكبر وتتألف من العديد من الأنابيب المفردة المكدسة بعضها بداخل البعض الآخر. وبشكل عام تمتلك أنابيب الكربون النانوية مواصفات فريدة تجعلها ذات مزايا وتطبيقات متعددة في التقنيات النانوية والبصريات والإلكترونيات وعلوم المواد، إضافة إلى الفنون المعمارية ومجالاتها، ولها خصائص قوة لا متناهية، وخصائص كهربائية فريدة وموصلات فعالة للحرارة. إذ تستخدم في صناعة مضارب لعبة كرة القاعدة Base ball، مضارب التنس Rockets ball والملابس الرياضية، أجزاء السيارات، أجهزة التلفاز و البطاريات، دروع الحماية من الرصاص، الصناعات الفضائية والدارات الكهربائية.

**3- المجموعة الثالثة:**

تم تجريع هذه المجموعة بجرعة 1مل/كغم من وزن الجسم من أنابيب الكاربون النانوية بتركيز 3 ملغم/مل.

**4- المجموعة الرابعة:**

تم تجريع هذه المجموعة بجرعة 1مل/كغم من وزن الجسم من أنابيب الكاربون النانوية بتركيز 5 ملغم/مل.

وأجريت عملية حقن الأرناب بمادة أنابيب الكاربون النانوية متعددة الجدار بعد تخديرها بمادة الكتامين Ketamine بجرعة 1مل داخل عضلة الفخذ [4] وتم تثبيت القصبه الهوائية وحقن بداخلها 1مل من تراكيز المادة النانوية المحضرة مسبقاً، وتم جمع عينات الدم ونسج الرئة والرغامي بعد مرور فترة على التجريع 7 أيام و 90 يوماً كل على حدى، وحفظ الدم في أنابيب بلاستيكية نظيفة ذات أغشية محكمة جافة وخالية من أية مواد مانعة للتخثر، وتركت في درجة حرارة الغرفة لمدة 20 دقيقة لحين تخثر الدم، ومن ثم اجري لها عملية طرد مركزي على السرعة 3000 دورة / دقيقة ولمدة 15 دقيقة لغرض الحصول على مصلى الدم، وحفظ مصلى الدم بالتجميد عند درجة -20 م° لحين إجراء الفحوصات الكيموحيوية، ووضعت النماذج النسيجية في مثبت الفورمالين بتركيز 10% لمدة ثلاث ساعات ثم اجريت عليها الخطوات التالية: الغسل، الانكاز، الترويق، التشريب والطر، التشذيب والقطع بسلك 4-5 مايكروميتر، ثم صبغت باستخدام صبغة الهيماتوكسيلين والايوسين [5]، وأجري الفحص المجهرى باستخدام المجهر الضوئي ثنائي العدسات وتصويرها بكاميرا رقمية .

**تقدير تركيز أنزيم الكاربونيك انهايديرز**

حدد تركيز انزيم الكاربونيك انهايديرز في المصل، باستخدام عدة التحاليل المجهزة من شركة My Bio Source الأمريكية، باستخدام تقنية الإمتزاز المناعي المرتبط بالأنزيم Enzyme Linked Immune Sorbent Assay (ELISA)، وقيست شدة اللون عند الطول الموجي 450 نانوميتر، وبالرجوع إلى المنحنى القياسي تم تقدير تركيز CA وبوحدة (نانوغرام/مل).

وتم تحليل النتائج إحصائياً باستخدام اختبار دنكن Duncan عند مستوى معنوية ( $p < 0.05$ ).

**النتائج والمناقشة****التأثير في اوزان الرئة**

أوضحت النتائج في الجدول (1) حصول ارتفاع معنوي في وزن الرئة للأرناب النيوزلندية البيض مقارنة مع مجموعة السيطرة وبطريقة معتمدة على كل من الجرعة وفترة التجريع خلال مدة البحث، إذ أظهرت مجموعة الأرناب المجرعة بأنابيب الكاربون النانوية متعددة الجدار ارتفاعاً معنوياً في وزن الرئة في المجاميع المختلفة مقارنة مع مجموعة السيطرة، إذ كان أكثر ارتفاعاً في وزن الرئة للمجموعة المجرعة بـ 5 ملغم/مل/كغم من وزن الجسم بعد مرور 90 يوماً من التجريع بمعدل ( $0.28 \pm 9.68$ ) غم مقارنة مع مجموعة السيطرة بمعدل ( $0.15 \pm 6.91$ ) غم.

الأساسي، فان CNTs بعد وصولها إلى الرئتين، وجد بأنها أكثر سمية من الكاربون الأسود ومن الكوارتز .

يهدف البحث إلى تحديد الأليات المسؤولة عن التغيرات المرضية الناجمة عن المعاملة التجريبية لأنابيب الكاربون متعددة الجدار MWCNTs في الرئة من خلال متابعة تقدير تركيز أنزيم الكاربونيك انهايديرز CA.

**المواد وطرائق العمل****الحيوانات المستخدمة**

استخدم في هذه الدراسة 40 ذكراً من الأرناب *Oryctolagus cuniculus* من النوع النيوزلندي الأبيض، بوزن (1500-2000) غم، ويعمر (12-18) شهراً، تم الحصول عليها من الأسواق المحلية، ووضعت في أقفاص معدنية صنعت خصيصاً لهذا الغرض، وتحت ظروف ملائمة من درجة حرارة (25-28) م°، فترة إضاءة بمعدل 14 ساعة يومياً و تهوية جيدة، وقدمت العليقة القياسية والماء للأرناب باستخدام أواني مصنوعة من الألمنيوم بكميات متساوية ويتسلسل ثابت لجميع المعاملات.

**أنابيب الكاربون متعددة الجدار**

جهزت مادة أنابيب الكاربون النانوية متعددة الجدار MWCNTs من شركة (Sigma-Aldrich/ المملكة المتحدة) عن طريق الشركة العراقية للتقنيات الحياتية IRAQ Biotech- Leading the Laboratory revolution، وحضر المحلول القياسي لأنابيب الكاربون النانوية متعددة الجدار بتركيز 10ملغم/مل، وذلك بإذابة 70ملغم من المادة في 7مل من محلول الفوسفات المنظم -PBS Tween80 1%، وأجري عليها عملية سحن ومجانسة باستخدام جهاز السحن الذاتي والمجانسة الكهربائية Hemogenizer والمصنع من شركة IKA-T10 Ultra-TURRAX الألمانية لمدة 30 دقيقة وبسرعة 400 دورة/دقيقة مع فترات توقف لمدة دقيقتين كل 5 دقائق، وكانت أنبوية الجهاز مغمورة في الثلج المبروش أثناء عملية المجانسة، ثم تم تعريضها إلى الترددات فوق الصوتية باستخدام جهاز الترددات فوق الصوتية [3]، وبعدها تم تحضير التراكيز 1 و 3 و 5 ملغم/مل لغرض استخدامها في البحث.

**تصميم التجربة****تأثير أنابيب الكاربون النانوية متعددة الجدار**

وزعت الحيوانات المستخدمة عشوائياً إلى 4 مجاميع وبواقع 10 أرناب لكل مجموعة، وبعد انتهاء المدة التمهيديّة تم البدء بتجريع الأرناب بمادة أنابيب الكاربون النانوية متعددة الجدار وعلى النحو التالي:

**1- المجموعة الأولى (مجموعة سيطرة):**

تم تجريع هذه المجموعة بجرعة 1مل/كغم من وزن الجسم من محلول الفوسفات المنظم 1% Tween80 +PBS وعدت كمجموعة سيطرة.

**2- المجموعة الثانية:**

تم تجريع هذه المجموعة بجرعة 1مل/كغم من وزن الجسم من أنابيب الكاربون النانوية بتركيز 1ملغم/مل.

توصل اليه كل من [6] و [7] و [8] إلى حدوث ارتفاع معنوي في وزن الرئة للجرذان الذكور والإناث المجرعة بأنابيب الكربون النانوية متعددة الجدار بزيادة الجرعة وفترة التجريع.

أدى تجريع الأرناب بأنابيب الكربون النانوية متعددة الجدار إلى ارتفاع معنوي في وزن الرئة، إذ كانت هذه النتائج متطابقة مع ما توصل اليه [3]، إذ أشاروا إلى حدوث ارتفاع معنوي في وزن الرئة للجرذان المجرعة بأنابيب الكربون النانوية مفردة الجدار بزيادة الجرعة، ومع ما

الجدول(1): تأثير جرع مختلفة من أنابيب الكربون المتعددة الجدار (MWCNTs) في اوزان الرئة(غم) للأرناب المجرعة بعد مرور (7)

90			7**			فترة المعاملة (باليوم)	مجاميع المعاملة	ملغم/مل/كغم من وزن الجسم جرعة MWCNTs
% للتغير	% للتركيز	المعدل ± الخطأ القياسي	% للتغير	% للتركيز	المعدل ± الخطأ القياسي			
-	100	<sup>a</sup> 0.15±6.91	-	100	<sup>a</sup> 0.13±7.09	مجموعة السيطرة		
12	112	<sup>ab</sup> 0.21±7.73	3	103	<sup>a</sup> 0.46±7.29	1		
18	118	<sup>bc</sup> 0.10±8.18	23	123	<sup>c</sup> 0.29±8.75	3		
40	140	<sup>d</sup> 0.28±9.68	24	124	<sup>c</sup> 0.40±8.82	5		

\* المعدل والخطأ القياسي هو لخمسة تكرارات .

\*\* الأرقام المتبوعة بأحرف مختلفة تدل على وجود فروقات معنوية بينها عند مستوى احتمال ( $P < 0.05$ ) والعكس صحيح بحسب اختبار دنكن (Duncun Test) .

في المجموعة المجرعة بجرعة 5 ملغم/مل/كغم من وزن الجسم بعد مرور 90 يوماً من التجريع، ، بينما أظهرت المجموعة المجرعة بأنابيب MWCNTs بجرعة 1 ملغم/مل/كغم من وزن الجسم بعد مرور 90 يوماً من التجريع، ارتفاعاً معنوياً بنسبة 4% مقارنة مع مجموعة السيطرة عند مستوى احتمال ( $P < 0.05$ ).

التأثير في تركيز أنزيم الكاربونيك انهايديرز يوضح الجدول (2) تركيز أنزيم الكاربونيك انهايديرز CA في مصل دم الأرناب النيوزلندية البيض للمجاميع المجرعة مقارنة مع مجموعة السيطرة، إذ لوحظ ارتفاع معنوي في تركيز أنزيم CA في مصل دم الأرناب المجرعة بأنابيب MWCNTs مقارنة مع مجموعة السيطرة عند مستوى احتمال ( $P < 0.05$ )، فقد كانت أعلى نسبة ارتفاع 61%

الجدول (2): تأثير جرعة مختلفة من أنابيب الكربون المتعددة الجدار (MWCNTs) في تركيز أنزيم الكاربونيك انهايديرز CA (نانوغرام/مل) في مصد دم الأرانب المجرعة بعد مرور (7) و(90) يوماً

90			**7			مدة المعاملة (باليوم)	مجاميع المعاملة	ملغم/مل/كغم من وزن الجسم جرعة MWCNTs
% التغير	% التركيز	المعدل ± الخطأ القياسي	% التغير	% التركيز	المعدل ± * الخطأ القياسي			
-	100	<sup>ab</sup> 0.22±8.76	-	100	<sup>a</sup> 0.20±6.24	مجموعة السيطرة		
4	104	<sup>ab</sup> 0.20±9.10	19	119	<sup>ab</sup> 0.15±7.44	1		
8	108	<sup>b</sup> 0.60±9.43	39	139	<sup>ab</sup> 0.18±8.70	3		
61	161	<sup>c</sup> 2.49±14.14	41	141	<sup>ab</sup> 0.71±8.82	5		

\* المعدل والخطأ القياسي هو لخمسة تكرارات .

\*\* الأرقام المتبوعة بأحرف مختلفة تدل على وجود فروقات معنوية بينها عند مستوى احتمال ( $P < 0.05$ ) والعكس صحيح بحسب اختبار دنكن (Duncan Test) .

المبطنة للقصبات، واحتقان الأوعية الدموية وبؤر التهابية (ارتشاح خلايا أحادية النواة) في الغلالة، كما شوهد نخر سطح الظهارة المبطن للقصبات واحتقان الأوعية الدموية وارتشاح كثيف للخلايا الالتهابية المختلطة (متعددة أشكال النواة وأحادية النواة) في الطبقة تحت المخاطية للقصبات وفرط تنسج وضخامة الطبقة العضلية للقصبات وتليف هذه الطبقة كما مبين في الأشكال (2 و3 و4 و5).

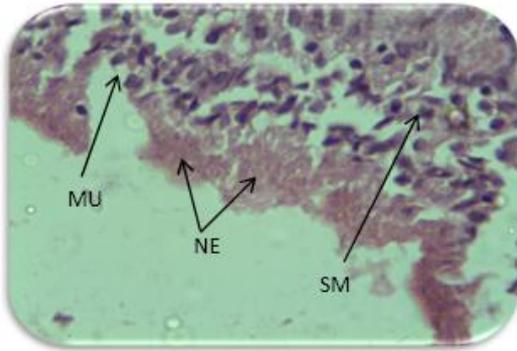
وشوهد في النسيج الرئوي تكتلات سوداء اللون (MWCNTs) في جوف القصبات والقصبيات وفي الحويصلات السنخية كما مبين الشكل (6). وشوهد أيضاً وجود النفاخ الرئوي وتغيرات وعائية دموية (احتقانات و نزف) وتثخن الأوعية الدموية وتثخن القصبيات وفرط تنسج وضخامة الطبقة العضلية للقصبيات وبؤر متعددة من الأورام الحبيبية Multifocal granulomas. وضمت الآفات المجهرية الأخرى تليف النسيج الخلافي Interstitial fibrosis وفرط تنسج الظهارة المبطن للقصبات وارتشاح خلايا التهابية أحادية النواة حول القصبيات مع التليف كما مبين في الشكل (7). ومن اهم الآفات الأخرى كانت حدوث ورم الطبقة المتوسطة Mesothelioma في النسيج تحت غشاء الجنب Subpleural tissue كما مبين في الشكل (8).

أما بعد مرور 90 يوماً بعد إعطاء جرعة 1 ملغم/مل/كغم من وزن الجسم من أنابيب MWCNTs فقد كانت التغيرات المرضية مشابهة لتلك التي تم وصفها بعد مرور 7 أيام إلا أنها كانت أكثر وضوحاً.

أثبتت العديد من الدراسات أن أنزيم CA موجود في الخلايا البطانية للأوعية الدموية الرئوية وكذلك في النسيج الطلائية للحوصلات الهوائية. فتجريع الأرانب بجرع مختلفة من أنابيب الكربون النانوية المفردة والمتعددة الجدار أدى إلى حدوث كرب تأكسدي، أي لها تأثيرات هدمية، مما يؤدي إلى ازدياد تحرر جذور الأوكسجين الحرة التي تؤثر على الأغشية الخارجية للنسج من خلال رفع مستوى بيروكسدة الدهن نتيجة لتحتطم الأغشية الخلوية في الرئة [9]، أي حدوث الأذى لخلايا الرئة وتغير قابلية النفاذية الانتقائية، وتحرر كميات كبيرة من أنزيم CA إلى خارج الخلية ومن ثم إلى مصد دم الأرانب المجرعة، فضلاً عن حدوث نقص الأوكسجين Hypoxia [10]. وهذه تتفق مع نتائج الدراسة الحالية وسوف توضح هذه التأثيرات من خلال المقاطع النسجية للرئة.

#### التغيرات النسجية المرضية في الرئة

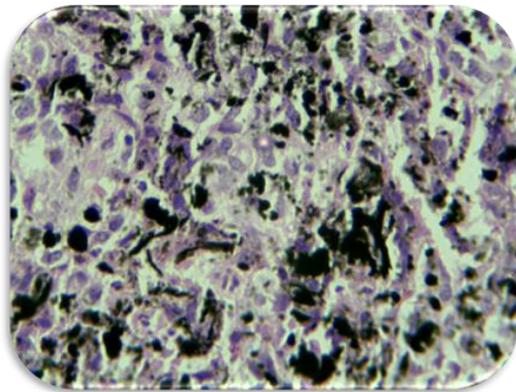
بعد مرور 7 أيام من تجريع الأرانب بجرعة 1 ملغم/مل/كغم من وزن الجسم من أنابيب الكربون النانوية متعددة الجدار (MWCNTs) لوحظ ابيضاض السطح الخارجي للفصوص الرئوية واحتقان السطح السداخلي، كما لوحظ تورم واحمرار العقيد اللمفية المنصفية Mediastinal lymph nodes كما مبين في الشكل (1). مجهرياً شوهدت تكتلات سوداء اللون Black agglomerates (يفترض بأنها MWCNTs) في الطبقة المخاطية والأوعية الدموية للغلالة Adventitia والنسيج اللمفي المرتبط بالقصبات BALT وشوهد أيضاً ارتشاح كثيف للخلايا الالتهابية مختلفة الأنوية في المخاطية



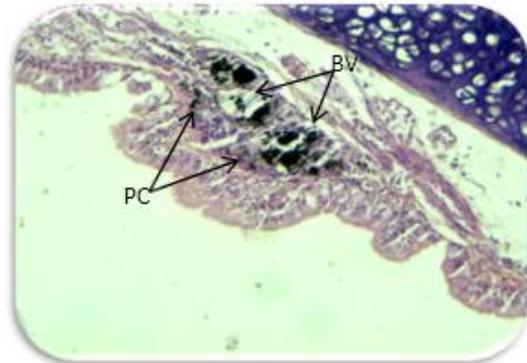
الشكل(4): مقطع عرضي في رغامى أرنب مجرع بأنابيب MWCNTs بجرعة 1ملغم/مل/كغم من وزن الجسم بعد مرور 7 أيام، يوضح نخر الطبقة السطحية من مخاطية الرغامى (NE) وارتشاح خلايا التهابية أحادية النواة في الطبقتين المخاطية (MU) وتحت المخاطية (SM). صبغة الهيماتوكسيلين و الايوسين . قوة التكبير 400X.



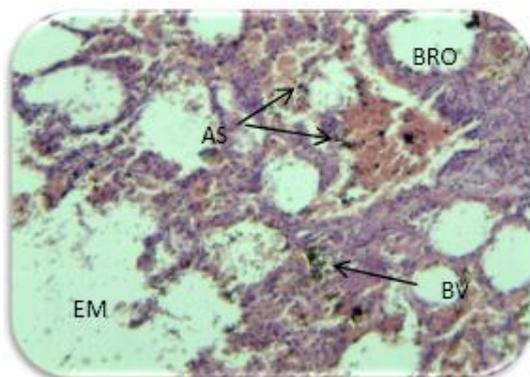
الشكل(1): الجهاز التنفسي لأرنب مجرع بأنابيب MWCNTs بجرعة 1 ملغم/مل/كغم من وزن الجسم بعد مرور 7 أيام، ويلاحظ شحوب الجزء العلوي من الفصوص واحتقان الأجزاء السفلية وتورم واحمرار العقد اللمفية المنصفية.



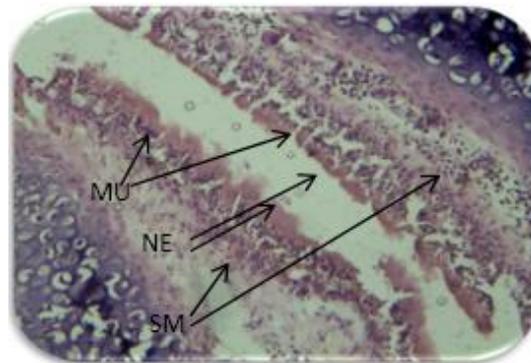
الشكل(5): مقطع عرضي في النسيج اللمفي المرتبط مع القصبات لأرنب مجرع بأنابيب MWCNTs بجرعة 1ملغم/مل/كغم من وزن الجسم بعد مرور 7 أيام، يوضح اختلاف أحجام وأشكال الأنابيب المترسبة في النسيج اللمفي . صبغة الهيماتوكسيلين والايوسين . قوة التكبير 400X.



الشكل(2): مقطع عرضي في رغامى أرنب مجرع بأنابيب MWCNTs بجرعة 1ملغم/مل/كغم من وزن الجسم بعد مرور 7 أيام، ويلاحظ تجمع مواد سوداء اللون (MWCNTs) في جدران الأوعية الدموية (BV) وفي الخلايا البلعمية (PC) في الطبقة تحت المخاطية. صبغة الهيماتوكسيلين والايوسين. قوة التكبير 100X.

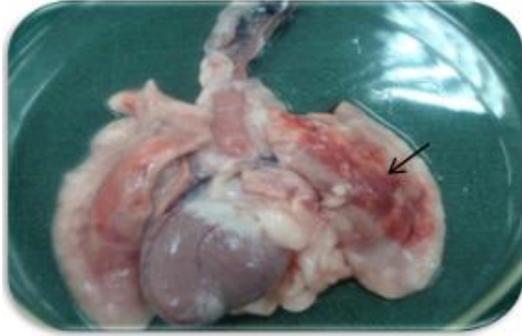


الشكل(6): مقطع عرضي في رئة أرنب مجرع بأنابيب MWCNTs بجرعة 1ملغم/مل/كغم من وزن الجسم بعد مرور 7 أيام، يوضح ترسب الأنابيب على شكل كتل سوداء اللون في جدران الأوعية الدموية (BV) والقصيبات والحواجز السنخية (AS) مع وجود النفاخ الرئوي (EM). صبغة الهيماتوكسيلين والايوسين . قوة التكبير 100X.

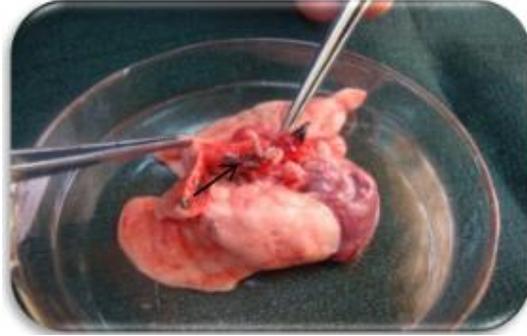


الشكل(3): مقطع عرضي في رغامى أرنب مجرع بأنابيب MWCNTs بجرعة 1ملغم/مل/كغم من وزن الجسم بعد مرور 7 أيام، يوضح نخر (NE) الطبقة السطحية من مخاطية الرغامى وارتشاح كثيف للخلايا الالتهابية مختلفة الأنوية في الطبقتين المخاطية (MU) وتحت المخاطية (SM). صبغة الهيماتوكسيلين والايوسين. قوة التكبير 100X.

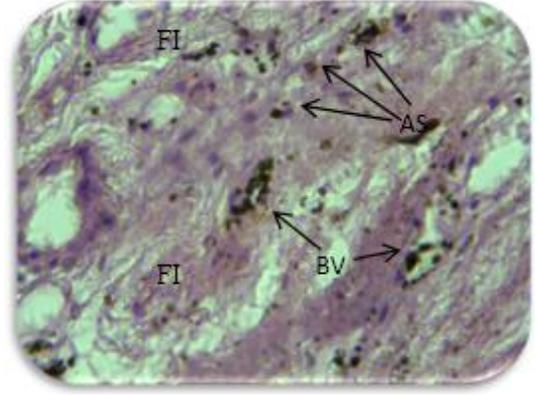
وبعد مرور 7 أيام من إعطاء جرعة 5 ملغم/مل/كغم من وزن الجسم من أنابيب MWCNTs شوهد عياناً احتقان شديد للرئتين مع وجود بؤر سوداء داكنة في المتن الرئوي. واكتسبت الرئتين مظهراً عقيدياً إذ شوهدت عقيدات بيضاء صغيرة ومتعددة في المتن الرئوي. ولوحظ أيضاً تورم العقد اللمفية المنصفية كما مبين في الشكل (11). أما بعد مرور 90 يوماً من إعطاء جرعة 5 ملغم/مل/كغم من وزن الجسم من MWCNTs لوحظ وجود باحات من الاحتقان الشديد للنسيج الرئوي واكتساب الرئتين مظهراً عقيدياً ووجود باحة سوداء في جدار الرغامى مع تورم واحتقان العقد اللمفية المنصفية كما مبين في الشكل (12). ومجهرياً كانت الآفات المرضية مماثلة لتلك التي تمت مشاهدتها بعد إعطاء الجرعة 1 ملغم/مل/كغم من وزن الجسم إلا أنها كانت أكثر شدة.



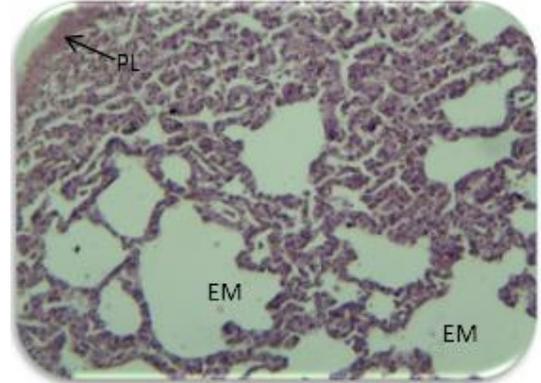
الشكل(9): المظهر العياني لرئة أرنب مجرع بأنابيب MWCNTs بجرعة 3 ملغم/مل/كغم من وزن الجسم بعد 7 أيام، ويلاحظ انكماش الرئتين واحتقانها واكتسابها مظهراً عقيدياً ( ← ) وتورم العقد اللمفية المنصفية.



الشكل(10): المظهر العياني لرئتين أرنب مجرع بأنابيب MWCNTs بجرعة 3 ملغم/مل/كغم من وزن الجسم بعد مرور 90 يوماً، يوضح احتقان الرئتين وظهور التكبد الأحمر مع وجود بقع سوداء اللون في النسيج الرئوي( ← ).



الشكل(7): مقطع عرضي في رئة أرنب مجرع بأنابيب MWCNTs بجرعة 1 ملغم/مل/كغم من وزن الجسم بعد مرور 7 أيام، يوضح ترسبات الأنابيب في جدران الأوعية الدموية (BV) والخلايا اللمفية في الحواجز النسيجية (AS) مع حدوث التليف (FI). صبغة الهيماتوكسيلين والايوسين. قوة التكبير 400X.



الشكل(8): مقطع عرضي في رئة أرنب مجرع بأنابيب MWCNTs بجرعة 1 ملغم/مل/كغم من وزن الجسم بعد مرور 7 أيام، يوضح ورم الخلايا المتوسطة في المنطقة تحت الجنب (PL) من الرئة مع وجود النفاخ الرئوي (EM). صبغة الهيماتوكسيلين والايوسين . قوة التكبير 100X.

أما بعد مرور 7 أيام من إعطاء جرعة 3 ملغم/مل/كغم من وزن الجسم من أنابيب MWCNTs فقد لوحظ عياناً انكماش واحتقان الفصوص الرئوية واكتسابها مظهراً عقيدياً مع تورم واحتقان العقد اللمفية المنصفية كما مبين في الشكل (9). وكانت الآفات المرضية المجهرية مماثلة لتلك التي تمت مشاهدتها في الجرعة السابقة (1 ملغم/مل/كغم من وزن الجسم)، إلا أنها أكثر شدة. وبعد مرور 90 يوماً من إعطاء الجرعة 3 ملغم/مل/كغم من وزن الجسم من أنابيب MWCNTs لوحظ احتقان شديد للرئتين ووجود بؤر سوداء داكنة في المتن الرئوي، وعند قطع النسيج الرئوي لوحظ إصابة الرئتين بالتكبد الأحمر مع وجود كتل سوداء اللون (يفترض بأنها MWCNTs). ولوحظ أيضاً وجود باحات حمراء داكنة في جدار الرغامى وتورم واحتقان العقد اللمفية المنصفية كما مبين في الشكل (10). وكانت التغيرات المرضية المجهرية شبيهة لتلك التي تم وصفها للجرعة 1 ملغم/مل/كغم من وزن الجسم إلا أنها أكثر وضوحاً.

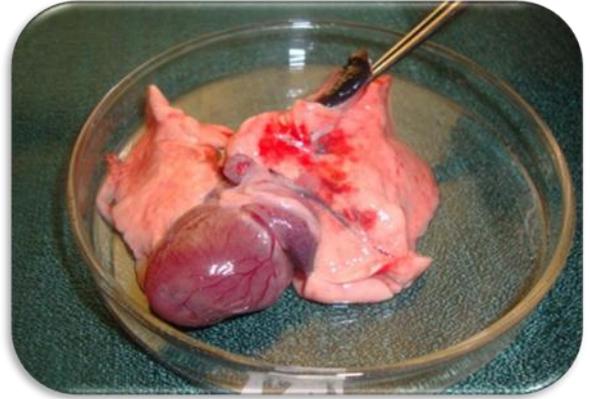
للأنابيب ونوع الحيوان المختبري المستخدم وفترة المتابعة [14].  
وخلاف ذلك فقد اقترح بان الجسيمات النانوية المستخدمة الإستنشاقية [13] هي الياف نانوية مكونة من كاربون مكسد وليس أنابيب MWCNT [15]. وأوضحت دراسة أخرى بأن تعريض الفئران عن طريق الارتشاف Aspiration إلى التهاب رئوي يعتمد على الجرعة وعلى فترة التعريض، إضافة إلى تأثيرات في الجهاز العصبي المركزي [16]. وأظهرت دراسة أخرى بأن العيوب التركيبية Structural defects للأنابيب قد تلعب دوراً هاماً في السمية الرئوية الحادة التي تسببها الأنابيب MWCNT [17]. ولذا يمكن أن تشكل المواصفات الفيزيائية-الكيميائية لأنابيب MWCNT مثل الطول والعرض والعيوب التركيبية والملوثات المعدنية وكيمياء السطح وجهد زيتا Zeta potential المقررات الرئيسية لاستجابة الرئة لأنابيب MWCNT. وفي دراسة فريدة تم التأكد من تغيير الموضع Translocation لأنابيب MWCNT في الفئران بعد إعطاء 14C-aurine- فى MWCNT labelleds والإزقام (التغذية بمسبار معدني) [18]. ففي غضون عشرة دقائق بعد الحقن بداخل الوريد تجمعت أنابيب MWCNT في كل من الكبد والقلب والرئة ولكن ليس في بقية الأعضاء المفحوصة كالدماع والمعدة والعضلة والعظم والأمعاء. وكان الكبد الموقع الرئيس للترسب (80% من جرعة الحقن) وظلت الأنابيب ثابتة بعد مرور 28 يوماً بعد الحقن. وبعد مرور 90 يوماً من الحقن نقصت كمية MWCNT في الكبد بنسبة 20% من جرعة التعريض، بعد التعريض عن طريق الإزقام تم العثور على MWCNT فقط في المعدة والأمعاء والبراز.

أظهرت دراسات الزرع في أطباق الزجاج *In vitro* بأن أنابيب MWCNT سببت سمية الخلايا الظهارية الرئوية والخلايا البطانية للأوعية الدقيقة مع زيادات في إنتاج أصناف الأوكسجين الفعالة (ROS) وتأشير NF-KB وتحرر الساييتوكينات وإعادة تنظيم الهيكل الخلوي ونفوذية الخلية البطانية [19,20,21,22,23]، وأشارت دراسات الحقن في الجسم الحي *In vivo* في الفئران والجرذان إلى أن MWCNT يمكن أن تصل إلى المنطقة السنخية للرئة بعد الأرتشاف البلعومي Pharyngeal aspiration وتسبب تفاعل التهابي عابر أعقبه استجابة ليفية متزايدة [12,24,25].

- 1- Ferreira, A.J.; Cemlyn-Jones, J. and Robalo Cordeiro, C. (2012). Nanoparticles, nanotechnology and pulmonary nanotoxicology . Revista Portuguesa de Pneumologia, 19(1): 28-37.
- 2- Lam, C.W.; James, J.T.; McCluskey, R. and Hunter, R.L. (2004). Pulmonary toxicity of single – wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation . Toxicol. Sci., 77: 126-134.
- 3- Warheit, D.B.; Laurence, B.; Reed, K.L.; K.L. ; Roach, D.; Reynolds, G.; and Webb. T. (2004).



الشكل(11): المظهر العياني لرئة أرنب مجرع بأنابيب MWCNTs بجرعة 5 ملغم/مل/كغم من وزن الجسم بعد 7 أيام، يوضح المظهر العقيدي للرئتين وشحوبهما



الشكل(12): المظهر العياني لرئة أرنب مجرع بأنابيب MWCNTs بجرعة 5 ملغم/مل/كغم من وزن الجسم بعد مرور 90 يوماً، ويلاحظ وجود باحات من الاحتقان الشديد واكتساب الرئتين لمظهر عقيدي.

ان الدراسات حول أنابيب الكاربون النانوية متعددة الجدار MWCNT محدودة جداً ونتائجها غير ثابتة [11]. أشارت إحدى الدراسات حول السمية الرئوية لأنابيب MWCNT في الجرذان التي تم تعريضها للتظهير بداخل الرغامى على شكل تام Whole (5.9 مايكروميتر طولاً) أو المطحونة Ground (0.7 مايكروميتر طولاً) إلى أن كلا النموذجين سببا التهاب رئوي حاد عند 3 أو 15 يوماً من التعريض، واحداثاً تليف رئوي بعد مرور 60 يوماً من التعريض [12]. ووجد بأن تعريض الفئران لأنابيب MWCNT عن طريق الاستنشاق لم يؤدي إلى أية سمية رئوية هامة ولو انه سبب تثبيط مناعي Immunosuppression [13]. وتم إعزاز اختلاف نتائج هاتين الدراستين إلى الاختلافات في المساحة السطحية Surface area

#### المصادر

- Comparative pulmonary toxicity assessment of single – wall carbon nanotubes in rats . Toxicol. Sci., 77 (1): 117.
- 4- Tkach, A.V. ; Shurin, G.V.; Shurin , M.R.; Kisin, E.R.; Murray , A.R.; Young, S-H; Star, A.; Fadeel , B.; Kagan, V.E. and Shvedova, A.A. (2011). Direct effects of carbon nanotubes on dendritic cells induce immune suppression upon pulmonary exposure . ACS Nano., 5(7): 5755-5762.

5- الحاج، حميد احمد (2010). التحضيرات المجهرية الضوئية (النظرية والتطبيق). دار المسيرة للطباعة، عمان، الاردن.

6- Ma-Hock, L.; Terumann,s.; Strauss, V.; Brill,S.; Luisi,F.; Mertler, M.; Wiench, k.; Gamer, A.o.; Ravenzwaay , B.V. and Landsiedel, R.(2009). Inhalation Toxicity of Multiwall carbon nanotubes in Rats Exposed for 3 months. *Toxicol. sci.* ,112(2), 468-481.

7- Horie, M.; Stowe, M.; Kambara, T.; Lee B.w.; Endoh, .; Maru, J.; Oyabu, T .; Myojo,T.; Ogami, A. ; Uchida, K.; Yamamoto, K.; Kobayashi, N.; Kuroda, E.; Nakazato, T. and Morimoto, Y.(2012). Pulmonary inflammation of well Dispersed Multi-Wall carbon Nanotubes following intratracheal instillation: Toxicity by fiber of 1-5 Mm in length. *Materials*, 5:2833-2849.

8- Umeda, Y.; Kasai.; Saito, M.; Kondo, H.; Toya, T.;Aiso, S.; Okunda, H.; Nishizawa, T. and Fukushima, S. (2013). Two-week toxicity of multi-walled carbon nanotubes by whole – body inhalation exposure in rats . *J. Toxicol. Pathol.* 2013; 26: 131-140.

9- Fu, P.P.; Xia, Q.; Hwang, H.M. and Ray, P.C. (2014). Mechanism of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species. *J. of Food and Drug analysis*, 22: 64-75.

10-Cheville ,N.F. (1983). “Cell Pathology” 2nd ed. Ames Iowa . Iowa state University press.

11-Shvedova , A.A.; Kisin, E.R.; Porter, D.; Schulte, P. Kagan, V.E. and Castranova , .(2009). Mechanisms of pulmonary toxicity and medical applications of carbon nanotubes: two faces of Janus . *Pharmacol. Therap*, 121: 192-204.

12-Muller, J.; Huaux, F.; Moreau, N.; Misson, P.; Heilier, J.F.; Delos, M.; Arras, M.; Fonseca, A.; Nagy, J. B. and Lison, D. (2005).Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicol. App. Pharmacol.*, 207: 221-231.

13-Mitchell, L.A.; Gao, J.;Wal, R.V.; Gigliotti, A.; Burchiel, S.W. and McDonald, J.D. (2007). Pulmonary and systemic immune response to inhaled multiwalled carbon nanotubes- *Toxicol. Sci.*, 100: 203-214.

14- McDonald, h. and Mitchell, L. (2008). To the editor . *Toxicol. Sci.*, 101: 181-182.

15-Lison, D. and Muller, J. (2008). To the editor. *Toxicol. Sci.*, 101: 179-180.

16-Sriram, K.; Porter, D.; Tsuruoka, S.; Endo, M.; Jefferson, A.; Wolfarth, W. (2007).

Neuroinflammatory responses following exposure to engineered nanomaterials. *Toxicologist A* 1390.

17-Fenoglio, I.; Greco, G.; Tomatis , M.; Muller, J.; Raymundo-Pinero, E.; Beguin, E. (2008). Structural defects play a major role in the acute lung toxicity of multiwall carbon nanotubes : physicochemical aspects. *Chem . Res . Toxicol.*, 21: 1690-1697.

18-Deng, X.; Jia, G.; Wang, H.; Sun, H.; Wang, X.; Yang, S. (2007). Translocation and fate of multi-walled carbon nanotubes in vivo. *Carbon* , 45: 1419-1424.

19-Walker, V.G.; Li, Z.; Hulderm, T. and Simenova, P. (2009). Potential in vitro effects of carbon nanotubes on human aortic endothelial cells . *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 236(3): 319-328.

20-Ye, S.F.; Wu, Y.H.; Hou, Z.Q.; Zhang, Q.Q. (2009). Ros and NF-kappa B are involved in upregulation of IL-8 in A549 cells exposed to multi-walled carbon carbon nanotubes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 379: 643-648.

21-He, X.; Young, S.; Schwegler-Berry, D.; Chisholm, W.P.; Fernback, J.E.; Ma, Q. (2011). Multiwalled carbon nanotubes induce a fibrogenic response by stimulating reactive oxygen species production, activating NF-KB signaling, and promoting fibroblast -to- myofibroblast transformation . *Chem. Res. Toxicol.*, 12: 2237-2248.

22-Pacurari, M.; Qian, Y.; Schwegler-Berry, D.; Ding, M.; Castranova, V.; Guo, N.L. (2012). Cell permeability , migration, and reactive oxygen species induced by multi-walled carbon nanotubes in human microvascular endothelial cells. *J. Toxicol. Environ. Health A*, 75(2): 112-128.

23-Srivastava, R.K.; Pant, A.B.; Kashyap, M.P.; Kumar, V.; Lohan, M.; Jonas, L. and Rahman, Q/(2011). Multi-walled carbon nanotubes induce oxidative stress and apoptosis in human lung cancer cell line-A549. *Nanotoxicol.* , 5(2): 195-207.

24-Mercer, R.R.; Hubbs , A.F.; Scabilloni, J.F.; Wang, L.; Castranova, V. and Porter, D. (2010). Distribution and persistence of pleural penetrations by multi-walled carbon nanotubes. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.*, 181: A3102.

25-Mercer, R.R.; Hubbs, A.F.; Scabilloni, H.F.; Wang, L.; Battelli, L.A.; Friend, S.; Castranova, V. and Porter, D.W. (2011). Pulmonary fibrotic response to aspiration of multi-walled carbon nanotubes. *Part. Fibre Toxicol.*, 8: 21. doi: 10.1186/1743-8977-8-21.

## Effect of Multi-Walled Carbon Nanotubes on lung tissue and concentration of enzyme Carbonic anhydrase in the New Zealand white rabbit

Farah M. Ghazal<sup>1</sup>, Muna H. Jankeer<sup>2</sup>, Hafidh I. Al-Sadi<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Basic Science of Nursing , College of Nursing , Mosul University , Mosul , Iraq.

<sup>2</sup>Biology Department , College of Science , Mosul University , Mosul , Iraq.

<sup>3</sup>Pathology Department , College of Dentist , Mousl University , Mousl , Iraq.

### Abstract

The aim of the present study was to investigate the effect of variable doses of Multi Carbon Nanotubes (MWCNTs) 1,3,5 mg/ml/kg body weight on lung weight and their effect on the concentration of Carbonic anhydrase(CA), morphological and histopathological changes of the males New Zealand white rabbits, In this study was used 40 New Zealand white rabbit of males, their ages range between (12-18 months) divided into four groups, ten for each group which intratracheal instillation with Nanoparticles, At days 7 and 90 post exposure, The blood , lung and trachea tissue samples were collected for each group.

The exposure with Multi Walled Carbon Nanotubes led to significant increase in the lung weight of all groups by increasing the dose and the exposure period compared with control group, While the effect of carbon nanotubes in the lung function was represented by estimating the concentration of enzyme Carbonic anhydrase in blood serum that led to significant increase in the concentration of the enzyme for all groups compared with control group, And the effect of carbon nanotubes were studied on morphological and histological changes in each of the lung and trachea of exposure rabbit compared with control group, the morphological and histological changes in the lung and trachea of exposure rabbit with MWCNTs after 7 days of exposure, included whitening the upper surface of the lobes, sever infiltration of the mixed inflammatory cells (mono and polymorphonuclear), hyperatrophy of the tissue, muscular hyperatrophy of bronchi and fibrosis of the region, while after 90 days of exposure, the histological change were similar to that occurred after 7 days of exposure but more clear. Thus it shows that the lung was most affected organ by this tubes, which approved by histological examination of lung.