



ISMJ 2016;19(2): 185-193

دوماهنامه طب جنوب

پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر

سال نوزدهم، شماره ۲، صفحه ۱۹۳-۱۸۵ (خرداد و تیر ۱۳۹۵)

بررسی بیان ژن‌های وابسته به آپوپتوز bcl-2 و bax در هیپوکامپ مغز موش‌های صحرایی به دنبال تزریق نانوقره به صورت درون صفاقی

مریم قوشچیان^۱، پروین خدارحمی^{۱*}، فرزانه تفویضی^۱

^۱ گروه زیست شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران

(دریافت مقاله: ۹۳/۱۱/۲۰- پذیرش مقاله: ۹۴/۳/۲۵)

چکیده

زمینه: نانو ذرات نقره، موادی در مقیاس کمتر از ۱۰۰ نانومتر بوده و کاربردهای زیادی در تکنولوژی مواد غذایی و پزشکی دارد. داده‌ها نشان داده است که اثرات نورووتوکسیکی نانو ذرات نقره، به علت استرس اکسیداتیو ناشی از تولید رادیکال‌های آزاد، تغییر در بیان ژن‌های تولید کننده آپوپتوز و نوروتوکسیتوسی ایجاد می‌شود. در این مطالعه اثرات آپوپتوتیک نانوذرات نقره را بر بیان ژن‌های وابسته به آپوپتوز bcl-2 و bax در هیپوکامپ مغز موش‌های صحرایی، که در حافظه و یادگیری درگیر است، بررسی شد.

مواد و روش‌ها: تعداد ۲۸ سرموش صحرایی نر نژاد ویستار به ۴ گروه، کنترل و سه گروه تیمار تقسیم گردید. گروه اول، سالین و ۳ گروه تیمار نانوذرات نقره در دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ ppm به صورت درون صفاقی دریافت نمودند. ۱۰ روز بعد از آخرین تزریق، بافت هیپوکامپ خارج و بیان ژن‌های bcl-2 و bax با روش RT-PCR نیمه کمی و دانسیتومتری مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: بیان ژن آنتی آپوپتوتیک bcl-2 در تمامی گروه‌های درمانی نسبت به گروه کنترل کاهش یافت. در مقابل، بیان ژن پروآپوپتوتیک bax در تمامی گروه‌های درمانی نسبت به گروه کنترل افزایش یافت. این اثرات آپوپتوتیک، در دوزهای بالاتر بیشتر بود.

نتیجه‌گیری: داده‌ها نشان داد نانوذرات نقره ممکن است به وسیله تغییر در بیان ژن‌های دخیل در آپوپتوز در سلول‌های ناحیه هیپوکامپ موش صحرایی، تولید آپوپتوز کند.

واژگان کلیدی: نانو ذرات نقره، ژن bcl-2، ژن bax، RT-PCR نیمه کمی، دانسیتومتر

*پرند، گروه زیست شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران

مقدمه

نانوتکنولوژی مجموعه‌ای از فناوری‌هایی است که به مطالعه‌ی ابعادی در حدود ۱ تا ۱۰۰ نانومتر می‌پردازد. یکی از کاربردی‌ترین نانو مواد، نانو ذرات نقره می‌باشد که به علت اثرات مفید زیادی که دارد، بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد. نقره در ابعاد بزرگ فلزی با خاصیت واکنش‌دهی کم می‌باشد، ولی زمانی که به ابعاد کوچک‌تر در حد نانومتر تبدیل می‌شود اثرات متفاوتی دارد (۱).

به نظر می‌رسد در آینده از این تکنولوژی در حوزه‌ی پزشکی و سلامت استفاده‌ی بیشتری شود. بعضی از گزارشات ثابت کردند که بسیاری از وسایل پزشکی نقره‌ای، یون‌های Ag^+ را آزاد می‌کنند که این یون‌ها می‌توانند در گردش خون جای گیرند. از این رو، نگرانی‌هایی در مورد امنیت بیولوژیکی نانوذرات نقره وجود دارد (۲). بنابراین بررسی اثرات این نانو ذرات و مطالعه این اثرات در مدل‌های حیوانی و تعمیم این گونه پژوهش‌ها به انسان می‌تواند هشدار دهنده و استفاده کنترل شده از این نانو ذرات را مطرح کند. هیپوکامپ داخلی‌ترین بخش قشر تمپورال (کورتکس لوب گیجگاهی) است. هیپوکامپ به عنوان یک مرکز مهم در حافظه و یادگیری است (۳).

مرگ سلولی مرحله نهایی آسیب سلول است (۴). در صورت تداوم آسیب به سلول، آسیب غیرقابل برگشت می‌شود (۵). آپوپتوز یک نوع مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی است. مسیرهای درگیر در تحریک فرایند آپوپتوز را به دو دسته تقسیم می‌کنند: ۱- مسیر بیرونی (رسپتورهای مرگ) (۶ و ۷). ۲- مسیر درونی (یا مسیر میتوکندریایی). مسیر درونی به وسیله‌ی اعضای خانواده‌ی bcl-2 کنترل می‌شود و با فعال‌سازی bak/bax منجر به نفوذپذیری غشای میتوکندری و آزاد شدن سیتوکروم C می‌گردند (۸-۱۰). از آنجایی که نانوذرات نقره قابلیت

عبور از سد خونی مغزی را داشته و منجر به آپوپتوز در سلول‌های در معرض می‌شود (۱۱) و نانو ذرات نقره تأثیر منفی بر سلول‌های هیپوکامپ و بیان ژن‌ها داشته و منجر به مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی می‌شود (۱۲)، لذا در این مطالعه اثر نانو ذرات نقره بر بیان ژن‌های خانواده bcl-2 مورد بررسی قرار گرفت.

حیوانات آزمایشگاهی

این مطالعه به صورت تجربی بر روی ۲۸ سر موش صحرایی نر بالغ نژاد ویستار با سن ۸ هفته و با وزن تقریبی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم تهیه شده از حیوان‌خانه دانشگاه شهید بهشتی انجام شده است. موش‌ها در حیوان‌خانه دانشگاه آزاد واحد تهران مرکزی در دمای ۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد و ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری و با غذای تجاری مخصوص جوندگان تغذیه شدند. بعد از ۲ هفته سازش حیوانات با محیط جدید، به طور تصادفی به ۴ گروه ۸ تایی کنترل و گروه‌های تجربی تقسیم شدند. در این مطالعه تمامی نکات پروتکل بین‌المللی کار بر روی حیوانات رعایت گردید.

دارو و روش تزریق

نانو ذرات نقره با اندازه ۲۰ نانومتر از شرکت نانو مواد ایرانیان خریداری شد (US Research Nanomaterials). در ابتدا غلظت‌های مورد نظر از کلئوئید نانونقره به وسیله آب مقطر دیونیزه و با روش سری رقت (Serial Dilution) تهیه شد (۱۳). سپس در شرایط استریل تزریق انجام شد. روش تزریق درون صفاقی و میزان تزریق با حجم هر دوز اسی سی بود. به گروه کنترل سالین، و به گروه‌های تجربی نانوذرات نقره با غلظت‌های ۴۰۰ ppm، ۲۰۰، ۱۰۰ به مدت ۵ روز تزریق شد. سپس ۱۰ روز بعد از آخرین تزریق، موش‌ها در

دسیکاتور با کلروفرم بیهوش شدند. با انجام جراحی، سر جدا شد و سپس خارج سازی مغز و به دنبال آن هیپوکامپ انجام گرفت. بافت مذکور تا انجام آزمایشات بعدی در فریزر -70°C نگهداری شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

برای بررسی بیان ژن‌های آپوپتوتیک از ۸ سر موش در هر گروه استفاده شد. مقدار 0.14 گرم از بافت هیپوکامپ جداسازی شده و با استفاده از محلول تریزول RNX Plus شرکت سیناژن استخراج RNA انجام شد. با دستگاه نانو دراپ کیفیت و خلوص RNAهای استخراج شده تعیین و نسبت جذب نوری (Optical Density: OD) در طول موج‌های 260 نانومتر به 280 نانومتر سنجیده شد. در این مطالعه از نمونه‌هایی که نسبت جذب نوری 260 به 280 نانومتر آن‌ها بین $1/8$ تا 2 بود، برای سنتز cDNA استفاده گردید. سنتز cDNA، با استفاده از کیت مخصوص (Fermentas) و بر اساس دستورالعمل آن انجام گرفت. ابتدا 16 ماکرولیتر RNA با 2 ماکرولیتر از پرایمرهای random hexamer و oligo dT برای 5 دقیقه با دمای 70°C در داخل

ترموسایکلر قرار داده شد. بعد از آن مخلوطی از Revert, dNTP, Ribo Lock, Reaction Buffer Aid را به محلول اولیه اضافه کرده و آن را برای 5 دقیقه در دمای 25°C ، 60 دقیقه در دمای 42°C قرار داده در آخر یک گرمای 70°C برای 5 دقیقه به محلول وارد شد.

واکنش RT-PCR نیمه کمی

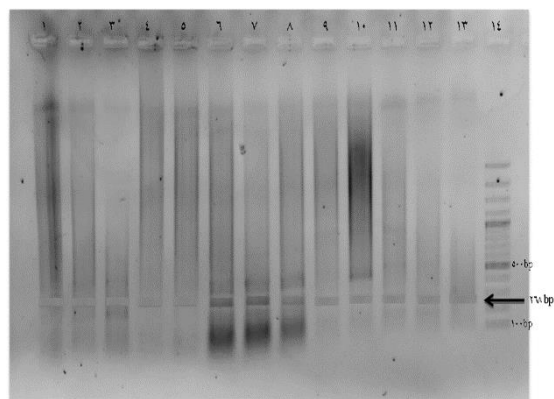
برای تعیین میزان mRNA ژن‌های bcl-2 و bax، RT-PCR نیمه کمی به طور جداگانه برای هر ژن انجام شد. مخلوط RT-PCR برای هر ژن در حجم نهایی 25 میکرولیتر، شامل 5 میکرولیتر cDNA، $12/5$ میکرولیتر Amplicon master mix red (شرکت ویراژن)، 0.4 میکرومولار (Reverse و Forward) ژن‌های bcl-2 و bax در نظر گرفته شد. از پرایمر ژن بتاگلوبین به عنوان کنترل داخلی استفاده شد و PCR آن مشابه ژن‌های bcl-2 و bax انجام شد. پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق از شرکت تکاپو زیست تهیه شدند. توالی پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱) توالی، اندازه و دمای اتصال پرایمر ژن‌های بتا-گلوبین، bcl-2 و bax (۱۴)

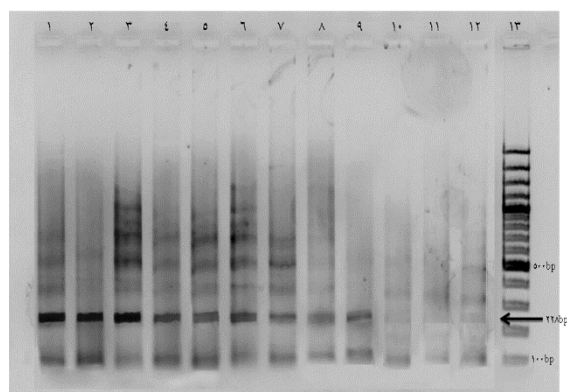
ژن	پرایمر	اندازه	دمای اتصال
Beta-globin	F: GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC R: CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC	bp 268	53°C
Bcl-2	F: CTG GTG GAC AAC ATC GCT CTG R: GGT CTG CTG ACC TCA CTT GTG	bp 228	54°C
Bax	F: TTC ATC CAG GAT CGA GCA GA R: GCA AAG TAG AAG GCA ACG	bp 263	$49/44^{\circ}\text{C}$

bax، $49/44^{\circ}\text{C}$ به مدت 40 ثانیه و پرایمر بتاگلوبین 53°C مدت 40 ثانیه و دمای تکثیر 72°C به مدت 40 ثانیه در دستگاه ترموسایکلر (Biorad, USA) در نظر گرفته شد. الکتروفورز محصول در ژل آگارز $1/5$ درصد انجام شد. سپس عکس برداری از ژل انجام گرفت. پس از تهیه

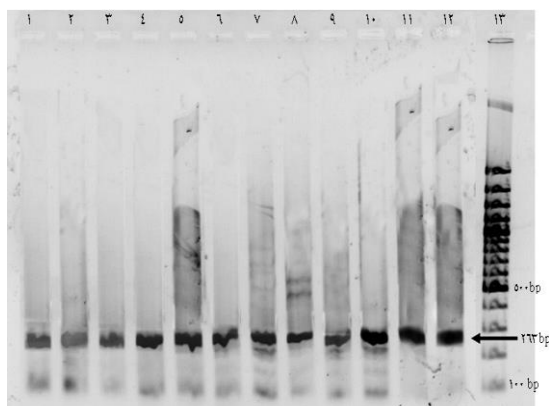
دستورالعمل حرارتی جهت انجام RT-PCR نیمه کمی به شرح زیر بهینه شد: دناتوراسیون اولیه در دمای 95°C به مدت 3 دقیقه، 45 سیکل تکثیری شامل مرحله دناتوراسیون در دمای 95°C به مدت 30 ثانیه، دمای اتصال برای پرایمر bcl-2، 54°C به مدت 40 ثانیه، پرایمر



شکل ۱) تصویر الکتروفورز ژن بتا-گلوبین (ژن کنترل داخلی) بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد که در آن به ترتیب از چپ به راست چاهک‌های ۱-۳، گروه کنترل (تزریق سالین)، چاهک‌های ۴-۶ نانو ذرات نقره با دز ۱۰۰ppm، چاهک‌های ۷-۹ گروه با دز ۲۰۰ppm و چاهک‌های ۱۰-۱۳ گروه با دز ۴۰۰ppm می‌باشد. چاهک ۱۳، کنترل منفی. چاهک ۱۴، DNA ladder ۱۰۰bp می‌باشد.



شکل ۲) تصویر الکتروفورز ژن bcl-2 بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد که در آن به ترتیب از چپ به راست چاهک‌های ۱-۳، گروه کنترل (تزریق سالین)، چاهک‌های ۴-۶ نانو ذرات نقره با دز ۱۰۰ppm، چاهک‌های ۷-۹ گروه با دز ۲۰۰ppm و چاهک‌های ۱۰-۱۳ گروه با دز ۴۰۰ppm، چاهک ۱۳، DNA ladder ۱۰۰bp می‌باشد.



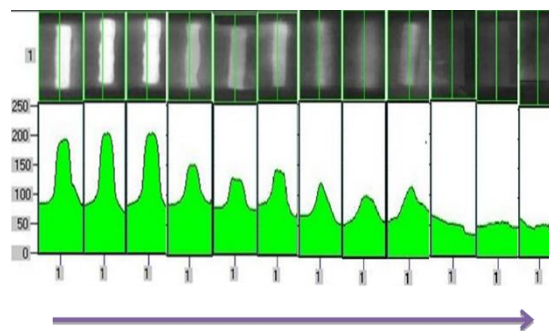
شکل ۳) تصویر الکتروفورز ژن bax بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد که در آن به ترتیب از چپ به راست چاهک‌های ۱-۳، گروه کنترل (تزریق سالین)، چاهک‌های ۴-۶ نانو ذرات نقره با دز ۱۰۰ppm، چاهک‌های ۷-۹ گروه با دز ۲۰۰ppm و چاهک‌های ۱۰-۱۳ گروه با دز ۴۰۰ppm، چاهک ۱۳، DNA ladder ۱۰۰bp می‌باشد.

عکس از ژل، میزان تراکم و شدت باندها توسط نرم افزار Fire Reader Gel Doc، دانسیتومتری یا تراکم سنجی شدند و با استفاده از روش Semi quantity PCR (نیمه کمی) مقایسه بین گروه ها انجام گردید

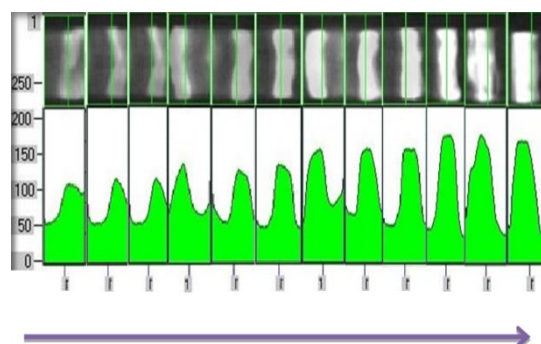
یافته‌ها

بررسی یافته‌های این مطالعه مشخص نمود که افزایش نانوذرات نقره تزریق شده روی بیان ژن‌های *bcl-2* و *bax* تأثیرگذار است. پس از بهینه سازی واکنش PCR برای ژن بتا-گلوبین، تمامی نمونه‌ها از نظر PCR ژن بتا-گلوبین مورد آزمون قرار گرفتند و قطعه‌ی ۲۶۸bp در تمامی نمونه‌ها تکثیر شد که حاکی از صحت RNA استخراج شده و سنتز cDNA مربوط بوده است. تصویر الکتروفورز قطعه ۲۶۸bp مربوط به ژن بتا-گلوبین در شکل ۱ نمایش داده شده است. نتایج تحقیق، حاکی از بیان ژن‌های *bcl-2* و *bax* در همه گروه‌ها ولی با نسبت‌های مختلف بود. الکتروفورز ژن *bcl-2* در شکل ۲ نمایش داده شده است. با افزایش غلظت نانو ذرات نقره تزریقی، بیان ژن *bcl-2* و شدت باند مربوط به قطعه‌ی ۲۲۸bp، به طور معناداری کاهش نشان داد (شکل ۲). تصویر قطعه‌ی ۲۶۳bp حاصل از تکثیر ژن *bax* در شکل ۳ نمایش داده شده است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود با افزایش دوز، شدت باند ۲۶۳bp حاصل از تکثیر ژن *bax*، افزایش چشمگیری داشته است. نتایج دانسیتومتری ژن‌های *bcl-2* و *bax* نیز با نتایج RT-PCR نیمه کمی مطابقت کامل داشت (شکل ۴ و ۵). افزایش غلظت نانو ذرات نقره تزریق شده، منجر به کاهش تراکم باندها در ژن *bcl-2* و افزایش تراکم باندها در ژن *bax* شد. تجزیه و تحلیل دقیق‌تر این مطالعه نشان داد که افزایش غلظت نانو ذرات تزریقی موجب افزایش بیان ژن *bax* و جلوگیری از فعالیت طبیعی ژن *bcl-2* و کاهش فعالیت آن شده است.

پوستی می‌توانند یک تهدید مهم برای سلامتی جوامع انسانی باشند. استفاده‌ی دراز مدت از این مواد بدون در نظر گرفتن عواقب آن می‌تواند زندگی موجودات زنده را تحت تأثیر قرار دهد (۱۶ و ۱۷). نل (Nel) و همکاران وی نشان دادند که بسیاری از پارامترها شامل یونیزاسیون، شکل، اندازه و ساختار کریستالی در توزیع سمیت نانو ذرات مؤثر می‌باشند (۱۸). تحقیقات گسترده‌ی دیگری نشان داده است که هر چه قطر نانو ذرات کمتر باشد، سطح آن‌ها بیشتر شده و قدرت نفوذ آن‌ها به سلول‌ها و اثرات مولکولی آن بر مکانیسم‌های داخل سلولی افزایش می‌یابد (۱۹ و ۲۰). تانگ (Tang) و همکاران وی گزارش کردند که نانو ذرات وارد جریان خون شده و در بافت‌هایی مانند مغز انباشته می‌شوند (۲۱) و تزریق زیر پوستی نانو نقره به رت، باعث عبور این ذرات از سد خونی مغزی و تجمع آن‌ها در مغز می‌شود (۱۱). المفتی (Almofti) و همکاران وی در سال ۲۰۰۳ بیان کردند که نانو ذرات نقره با تولید ROS از طریق اختلال یونی موجب جاری شدن الکترون در سراسر غشای میتوکندری شده که در نهایت منجر به اختلال در شیب الکتروشیمیایی می‌شود (۲۲). گروهی از محققان معتقدند که نانوذرات نقره موجب بهم خوردن تعادل میان تولید رادیکال‌های آزاد و سیستم‌های ضد اکسایشی بدن می‌شود. بیشترین اثر تخریبی رادیکال‌های آزاد متوجهی غشا ارگانل‌های داخل سلولی نظیر غشاء میتوکندری‌هاست (۲۳). اکسیا (Xia) و همکاران وی نشان دادند که تولید بالای ROS، بر دفاع آنتی اکسیدانی سلولی غلبه می‌کند و سبب کاهش عملکرد میتوکندری می‌شود. این وقایع استرس اکسیداتیو را افزایش داده و منجر به آسیب سلولی از جمله آپوپتوز میتوکندریایی می‌شود (۲۴). همچنین نشان داده شد که نانو ذرات نقره تزریق شده تأثیر منفی بر سلول‌های هیپوکامپ و بیان ژن‌ها داشته و منجر به مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی می‌شود (۱۲).



شکل ۴) پیک‌های ایجاد شده در دانسیتومتری ژن *bcl-2* (همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش دوز روند کاهشی است) (از چپ به راست).



شکل ۵) پیک‌های ایجاد شده در دانسیتومتری ژن *bax* (همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش دوز روند افزایشی است) (از راست به چپ).

بحث

بر اساس نتایج به دست آمده در این مطالعه، نانو ذرات نقره منجر به تغییراتی در بیان ژن‌های آپوپتوتیک *bcl-2* و *bax* می‌شود. مقایسه‌ی بیان ژن‌های *bcl-2* و *bax* نشان داد که سطح بیان ژن *bax* در تیمار با دوزهای بالاتر نانو ذرات نقره افزایش می‌یابد، در حالی که سطح بیان ژن *bcl-2* با افزایش دوز نانو ذرات تزریقی کاهش یافت. در راستای نتایج به دست آمده در این مطالعه، در فرایند آپوپتوز، *bax* به عنوان یک ژن پیش برنده و *bcl-2* به عنوان ژن متوقف کننده‌ی آپوپتوز شناخته می‌شود (۱۵).

در سال ۲۰۰۵ و ۲۰۰۸، سوتو (Soto) و همکاران بعد از انجام آزمایشات گسترده اعلام کردند که برخی نانو مواد (به ویژه نانوذرات نقره) و داروهایی که از آن ساخته می‌شوند چه به صورت خوراکی و چه به صورت تماس

در راستای نتایج به دست آمده در این مطالعه، گزارشات زیادی نشان داده است که افزایش بیان *bax* می‌تواند آپوپتوز را در سلول‌ها، هم در شرایط *in vitro* و هم در شرایط *in vivo* القا کند (۲۵). به‌علاوه، مطالعات دیگری نشان داده‌اند که در شرایط استرس اکسیداتیو مانند دیابت میزان بیان *mRNA* افزایش می‌یابد (۲۶ و ۲۷) که می‌تواند توسط افزایش بیان ژن *bax* و کاهش بیان *bcl-2* باعث القای آپوپتوز در هیپوکامپ موش‌های دیابتی شود (۲۸).

تعدادی از آزمایشات، دخالت *AgNPS* را در اعمال سلولی که منجر به تولید گونه‌های اکسیژن فعال (*ROS*) و القای استرس اکسیداتیو و در نهایت باعث سیتوتوکسیتی می‌شود نشان داده است (۲۹). تغییر در بیان ژن‌های مختلف تحت تأثیر نانو نقره در مناطق مختلف مغز توسط رحمان و همکاران مطرح شده است، به طوری که نانو ذرات نقره موجب تولید *ROS* و القای استرس اکسیداتیو و در نهایت منجر به آسیب اکسیداتیو *DNA* می‌شود (۲۰). کروسمر (*Korosmeyer*) و همکاران معتقدند که به نظر نمی‌رسد *bcl-2* تأثیری در تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن داشته باشد، اما این ژن سلول را از آسیب‌های اکسیداتیو سلولی محافظت می‌کند (۳۰). همچنین هیلدمن (*Hildeman*) و همکاران نشان دادند که بیان بالای *bcl-2* می‌تواند سلول‌ها را از آپوپتوز حاصل از *ROS* محافظت کند. با این حال مکانیسمی که *bcl-2* توسط آن سلول را از آپوپتوز به وجود آمده به وسیله *ROS* محافظت می‌کند را ناشناخته ارزیابی کردند. این محققان، معتقد بودند که *bcl-2* خود فعالیت آنتی اکسیدانی انجام نمی‌دهد اما ممکن است که فعالیت غیرمستقیمی در افزایش سطوح و یا فعالیت‌های آنتی اکسیدانی در داخل سلول داشته باشد و بنابراین بیان بالای *bcl-2* به سلول‌ها اجازه‌ی مقابله‌ی بهتر با اثرات *ROS* را می‌دهد و این اجازه به وسیله‌ی افزایش در آنزیم‌های آنتی اکسیدانی به دست می‌آید (۳۱). پروتئین‌های خانواده‌ی *Bcl-2*

یکپارچگی غشا خارجی میتوکندری را حفظ می‌کند و از اعضای آنتی آپوپتوتیک و پروآپوپتوتیک تشکیل شده‌اند. این خانواده آزاد شدن سیتوکروم *C* به درون سیتوزول و در نتیجه فعال شدن *Caspase-3* را تنظیم می‌کنند (۳۲) و (۳۳). در این مطالعه نیز ممکن است با افزایش ژن *bax* از طرفی کاهش بیان ژن *bcl-2* بعد از تیمار با نانو ذرات نقره، ناپایداری غشاء میتوکندری افزایش یافته و در نتیجه نفوذپذیری آن نسبت به سیتوکروم *C* افزایش پیدا کرده است. لذا احتمال می‌رود که تزریق نانو ذرات نقره باعث آسیب غشا میتوکندری و در نتیجه ایجاد آپوپتوز از طریق مسیر داخلی در هیپوکامپ موش صحرایی شده است. هر چند که مطالعات بعدی برای یافتن مسیرهایی که نانو ذرات نقره در آن‌ها دخالت می‌کند، مورد نیاز است.

همچنین در این تحقیق بیان نیمه کمی ژن‌های *Bcl-2* و *bax* در سطح *mRNA* بررسی شد. با توجه به اینکه عملکرد این ژن‌ها وقتی مشخص می‌شود که پروتئین آن‌ها تغییر یابد، بررسی و مقایسه پروتئین‌های مرتبط با آپوپتوز در گروه‌های مورد بررسی پیشنهاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

روش مورد استفاده در این تحقیق، در جهت ارزیابی و اثبات اثرات منفی نانو ذرات نقره، کاملاً توانمند بوده و پیشرفت مناسب و قابل قبولی خصوصاً در نشان دادن اثرات سیتوتوکسیک آن بر روی بیان ژن‌های مورد بررسی، پس از تزریق نانو ذرات نقره داشته است. به طوری که، میزان بیان ژن آنتی آپوپتوتیک *bcl-2* به صورت وابسته به دوز کاهش و برعکس بیان ژن پروآپوپتوتیک *bax* به صورت وابسته به دوز افزایش نشان داد.

سپاس و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه‌ی دانشجو مریم قوشچیان از دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند می‌باشد. بدین وسیله از

همکاری داشتند کمال تشکر را داریم.

مسئولین محترم دانشگاه‌های آزاد واحد تهران مرکزی و علوم تحقیقات و آقای دکتر خیری که در انجام این پروژه

References:

1. Kawata K, Osawa M, Okabe S. In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environ Sci Technol* 2009; 43: 6046-51.
2. Foladband F. Health and nano-technology. *Health Magazine* 2008; 197: 16. (Persian)
3. Anderson P. Organization of hippocampal neurons and their connections: The hippocampus. 1th ed. New York: plenum press, 1975, 155-75.
4. Anderson P, Morris R, Amaral D, et al. The Hippocampus Book. Oxford university press, 2007, 3-853.
5. Sadoul R, Quiquerez AL, Martinou I, et al. p53 protein in sympathetic neurons: cytoplasmic localization and no apparent function in apoptosis. *J Neurosci Res* 1996; 43: 594-601.
6. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281: 1305-8.
7. Bratton SB, MacFarlane M, Cain K, et al. Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-activated apoptosis. *Exp Cell Res* 2000; 256: 27-33.
8. Ashkenazi A. Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonist. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7: 1001-2.
9. D'Amelio M, Tino E, Cecconi F. The Apoptosome: Emerging Insights and New Potential Targets for Drug Design. *Pharm Res* 2008; 25: 740-51.
10. Placzek WJ, Wei J, Kitada S, et al. A survey of the anti-apoptotic Bcl-2 subfamily expression in cancer types provides a platform to predict the efficacy of Bcl-2 antagonists in cancer therapy. *Cell Death Dis* 2010; 1: e40.
11. Tang J, Xiong L, Wang S, et al. Distribution, translocation and accumulation of silver nanoparticles in rats. *J Nanosci Nanotechnol* 2009; 9: 4924-32.
12. Rahman MF, Wang J, Patterson TA, et al. Expression of genes related to oxidative stress in the mouse brain after expression to silver-25 nanoparticles. *Toxicol Lett* 2009; 187: 15-21.
13. Naghsh N, Safari M, Hajmehrabi P. Investing the effect of silver nanoparticles on E.coli growth. *Qom Univ Med Sci* 2012; 6: 65-8.
14. Jafari Anarkooli I, Sankian M, Ahmadpour S, et al. Evaluation of Bcl-2 Family Gene Expression and Caspase-3 Activity in Hippocampus STZ-Induced Diabetic Rats. *Hindawi Publishing Corporation Exp Diabetes Res* 2008; 2008: 638467.
15. Gustavsson M, Wilson MA, Mallard C, et al. Global gene expression in the developing rat brain after hypoxic preconditioning: involvement of apoptotic mechanisms. *Pediatr Res* 2007; 61: 444-50.
16. Soto KF, Carrasco A, Powell TG, et al. Comparative in vitro cytotoxicity assessment of some manufactured nanoparticulate materials characterized by transmission electron microscopy. *J Nanoparticle Res* 2005; 7: 145-69.
17. Soto KF, Murr LE, Garza KM. Cytotoxic Responses and Potential Respiratory Health Effects of Carbon and Carbonaceous Nanoparticulates in the Paso del Norte Airshed Environment. *Int J Environ Res Public Health* 2008; 5: 12-25.
18. Nel A, Xia T, Madler L, et al. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science* 2006; 311: 622-7.
19. Mohanraj VJ, Chen Y. Nanoparticles-A Review. *Tropic J Pharmaceutical Res* 2006; 5: 561-573.
20. Buzea C, Pachec II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases* 2007; 2: 17-71.
21. Tang J, Xi T. Status of biological evaluation on silver nanoparticles. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 2008; 25: 958-61.
22. Almofti MR, Ichikawa T, Yamashita K, et al. Silver ion induces cyclosporine a-insensitive permeability transition in rat liver mitochondria and release of apoptogenic cytochrome c. *J biochem* 2003; 134: 43-9.

23. Foldbjerg R, Olesen P, Hougaard M, et al. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicol Lett* 2009; 190: 156-62.
24. Xia T, Kovochich M, Brant J, et al. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Lett* 2006; 6: 1794-807.
25. Podesta F, Romeo G, Liu WH, et al. Bax is increased in the retina of diabetic subjects and is associated with pericyte apoptosis in vivo and in vitro. *Am J Pathol* 2000; 156: 1025-32.
26. Celik S, Erdogan S. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects brain against oxidative stress and inflammation induced by diabetes in rats. *Mol Cell Biochem* 2008; 312: 39-46.
27. Ischiropoulos H, Zhu L, Beckman JS. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1992; 298: 446-51.
28. Huang X, Wang F, Chen W, et al. Possible link between the cognitive dysfunction associated with diabetes mellitus and the neurotoxicity of methylglyoxal. *Brain Res* 2012; 1469: 82-91.
29. Christen V, Capelle M, Fent K. Silver nanoparticles induce endoplasmic reticulum stress response in Zebrafish. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 272: 519-28.
30. Korsmeyer SJ, Yin XM, Oltvai ZN, et al. Research oxygen species and the regulation of cell death by Bcl-2 gene family. *Biochem Biophys Acta* 1995; 1271: 63-6.
31. Hildeman A, Mitchell T, Aronow B, et al. Control of Bcl-2 expression by reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 15035-40.
32. Chen B, Peng X, Pentassuglia L, et al. Molecular and cellular mechanisms of anthracycline cardiotoxicity. *Cardiovasc Toxicol* 2007; 7: 114-21.
33. Nicholson DW, Thornberry NA. Apoptosis. Life and death decisions. *Science* 2003; 299: 214-5.

Original Article

Expression of apoptosis-Related genes bcl-2 and bax in rat brain hippocampus, followed by intraperitoneal injection of nanosilver

M. Ghooshchian¹, P. Khodarahmi^{1}, F. Tafvizi¹*

¹ Department of biology, Branch of Parand, Islamic Azad University, Parand, Iran

(Received 9 Feb, 2015 Accepted 15 Jun, 2015)

Abstract

Background: Silver nanoparticles are small scale substance (<100 nm) used in food technology and medical industry. The data suggest that nanosilver may produce neurotoxicity by generating free radical-induced oxidative stress and by altering gene expression producing apoptosis and neurotoxicity. In this study, the apoptotic effects of Nano silver on apoptosis- related genes expression bcl-2 and bax on rat hippocampus, which is involved in memory and learning, was investigated.

Materials & Methods: 28 male Wistar rats were divided into four groups of control and three groups of the treatment. The control group received saline and the treatment groups received intraperitoneal injections of silver nanoparticles at doses of 100, 200 and 400ppm. Ten days after the last injection, the hippocampal region was dissected and removed and then the expression of bcl-2 and bax genes was evaluated using semi-qualitative RT-PCR and Densitometry assay.

Results: The expression of anti- apoptotic b-cl2 gene was reduced in the treatment groups compared to the control group. In comparison, the expression of pro- apoptotic bax gene was increased in the treatment groups compared to the control group. This apoptotic affects was increased at higher doses.

Conclusion: The data suggest that silver nanoparticles may produce apoptosis by altering apoptosis- related genes expression, in rat brain hippocampus cells.

Key words: silver nanoparticles, bcl-2 gene, bax gene, semi-qualitative RT-PCR, Densitometry

*Address for correspondence: Department of biology, Branch of Parand, Islamic Azad University, Parand, Iran, Email: khodarahmiparvin@yahoo.com