

SID



سرویس های ویژه



سرویس ترجمه تخصصی



کارگاه های آموزشی



بلاگ مرکز اطلاعات علمی



سامانه ویراستاری STES



فیلم های آموزشی

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی



مقاله نویسی علوم انسانی

مقاله نویسی علوم انسانی



اصول تنظیم قراردادها

اصول تنظیم قراردادها



آموزش مهارت های کاربردی در تدوین و چاپ مقاله

آموزش مهارت های کاربردی در تدوین و چاپ مقاله

اثر نانو ذرات نقره در بیان ژن‌های کاسپاز ۸، Bax و Bcl2 بر تکوین مغز رات

ز. طاهریان، س.ج. مشتاقیان*، ا. اسماعیلی

گروه زیست‌شناسی دانشگاه اصفهان

*پست الکترونیک نویسنده مسئول: jmoshtaghian@sci.ui.ac.ir

چکیده: استرس اکسیداتیو ناشی از القاء آپوپتوز در سلول‌های عصبی موش در اثر ذرات نانو گزارش شده است. این پژوهش برای بررسی اثر نانو ذرات نقره (NS) بر روی سه ژن درگیر در آپوپتوز در مغز رات طرح شد. ژن‌های Bax و Bcl2 شاخص‌های مسیر داخلی و ژن کاسپاز ۸ نشانگر مسیر خارجی آپوپتوز منظور شدند. برای توالی‌های mRNA از وبگاه NCBI استفاده شد و آغازگرها با نرم افزار Beacon Designer طراحی شدند. سه گروه پنج‌تایی رات‌های باردار از روز اول بارداری دوزهای ۰، ۱ یا ۱۰ پی‌پی‌ام NS از طریق آب آشامیدنی دریافت نمودند. پس از تولد و در حال بی‌هوشی، مغز نوزادها جدا و منجمد نگهداری شد. بیان میزان بالای کاسپاز ۸ ناشی از دوز ۱۰ پی‌پی‌ام NS در هر دو جنس نر و ماده مشاهده شد که این وضعیت می‌تواند با فعال شدن مسیر خارجی آپوپتوز در تکوین طبیعی مغز تداخل داشته باشد.

کلیدواژه: Bcl2، Bax، Caspase 8، Brain، Rat، Nanosilver

Effect of nanosilver particles on expressions of caspase 8, Bax and Bcl2 genes in developing rat brains

Z. Taherian, S. J. Moshtaghian*, A. Esmaeili
Department of Biology, University of Isfahan

Abstract

Apoptosis induced oxidative stress in mice nerve cells treated with nanoparticles has been reported. This study was designed to investigate the effects of nano silver particles (NS) on expression of three genes involved in apoptosis in developing rat brain. Bax and Bcl2 genes as markers of internal pathway and caspase 8 as an external marker of apoptosis were considered. RNA sequences from NCBI site were used and primers were designed using Beacon Designer software. At day zero of pregnancy, three groups of five pregnant rats each received 0, 1 or 10 ppm NS respectively via drinking water. Each newborn rat was anesthetized and its brain was dissected, then kept frozen to perform real time PCR to determine the levels of gene expressions. High levels of caspase 8 expressions were caused by 10 ppm NS in both males and females which could interfere with brain development through activating the external pathway of apoptosis.

*Corresponding Author:

Dr. Jamal Moshtaghian

Hezarjerib Avenue, University of Isfahan, Department of Biology

Isfahan 81746-73441, Iran

Phone: +983117932465

Cell phone: +989133299187

Fax: +983117932456

Email: jmoshtaghian@sci.ui.ac.ir

سلول تخریب و ساختارهایی به هم فشرده محصور در غشا ایجاد می‌شوند که اجسام آپوپتوتیک نام دارند (۴). کاسپازها آغاز کنندگان مرکزی آپوپتوز، پیش‌آنزیم‌های پروتئاز (زیموژن) هستند که در شبکه پیام‌های آپوپتوز نقش مرکزی ایفا می‌نمایند. کاسپازها در تمام سلول‌ها ساخته شده و در پاسخ به محرک‌های پروآپوپتوز فعال می‌شوند و شامل پروکاسپاز ۲، ۸، ۹ و ۱۰ می‌باشند. کاسپازهای اجرایی نیز شامل کاسپازهای ۳، ۶ و ۷ می‌باشند. (۷). خانواده Bcl2 گروه دیگری از پروتئین‌های درگیر در فرآیند آپوپتوز هستند. اعضای این خانواده دو گروه تسهیل‌کننده و مهارکننده آپوپتوز هستند و نسبت بیان این دو گروه است که تعیین کننده زنده ماندن یا مرگ سلول است (۱).

۲- مواد و روش‌ها

پانزده رات ماده باردار به صورت نیمه تصادفی به سه گروه پنج‌تایی توزیع و از روز اول بارداری تحت تیمار قرار گرفتند. گروه اول (کنترل) تا پایان دوران بارداری دسترسی آزاد به آب و غذای رژیم پایه داشتند. گروه دوم NS با غلظت ۱ پی‌پی‌ام را تا پایان دوران بارداری از طریق آب آشامیدنی دریافت کردند. گروه سوم مانند گروه دوم ولی NS با غلظت ۱۰ پی‌پی‌ام دریافت نمود. هر نوزاد بلافاصله بعد از تولد روی یخ کاملاً بی‌هوش شده و مغز آن جدا شده و پس از شستشو با سرم فیزیولوژی استریل به تیوب مشخص انتقال و در دمای 70°C - نگهداری شد.

برای استخراج RNA کل سلول، طبق ضوابط دستورالعمل کیت استخراج RNARNX-Plus از شرکت سیناژن به ترتیب هموژنیزه کردن بافت، استخراج RNA، رسوب RNA و شستشوی RNA انجام گرفت. برای ارزیابی مقدار RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. پس از استخراج RNA، جهت سنتز cDNA، RNA تحت تیمار آنزیم قرار گرفت و از هر گونه آلودگی به DNA و آنزیم‌های تخریب کننده RNA پاک سازی شد. با توجه به اینکه کیت سنتز cDNA (Vivantis) برای حجم مشخص RNA طراحی

۱- مقدمه

گرچه فناوری نانو به عنوان علمی مدرن شناخته می‌شود ولی سابقه‌ای طولانی دارد و عبارت است از طراحی، تولید و کاربرد مواد در مقیاس نانومتر. یعنی، دستکاری و استفاده از مواد مختلف که حد اقل یک بعد آن‌ها کمتر از ۱۰۰ نانومتر باشد برای بهره‌مندی از خواص فیزیکی و شیمیایی متفاوت در مقیاس نانو (۹). ساختارهای نانو با نسبت سطح به حجم خیلی بالا، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خارق‌العاده‌ای دارند و امروزه استفاده از آن‌ها در زمینه‌های مختلف گسترش یافته است (۹). نقره عنصری کم‌یاب، کمی سخت‌تر از طلا و بسیار رسانا و چکش‌خوار است (۶). نانو ذرات نقره (NS) ساختارهای در اندازه نانو هستند که از اتم‌های نقره با اتصال فلزی تشکیل شده اند. واکنش NS با باکتری‌ها و ویروس‌ها به خاطر اندازه بسیار کوچک و شکل خاص آنها است (۳). از جمله خواص NS پایداری، استحکام زیاد، تحمل شرایط سخت و به ویژه خاصیت ضد باکتریایی آن است (۸). مکانیسم مسمومیت ناشی از نانو ذرات نقره و اثر آن در افزایش القای آپوپتوز به طور قطعی شناسایی نشده است. ایجاد گونه‌های اکسیژن واکنش پذیر (ROS) و استرس اکسیداتیو ناشی از آن، مکانیسم احتمالی گزارش شده است (۵). ذرات نانو به خاطر تولید بیش از حد ROS و تجمع آن در سلول، مکانیسم دفاعی را از بین می‌برند و در نهایت منجر به مرگ سلول یا آپوپتوز می‌شوند. در اثر تجزیه اکسیداتیو لیپید غشاء سلول نیز آپوپتوز القا می‌شود. این فرآیند زمانی رخ می‌دهد که با نفوذ ذرات نانو به غشا و تعامل آن‌ها با پروتئین‌های آنتی‌اکسیدانت، ROS، رادیکال‌های آزاد و استرس‌های اکسیداتیو در غشاء سلول صورت گرفته و در نتیجه آپوپتوز القا می‌شود (۲). منظور از آپوپتوز فرآیندهایی است که واقعه تخریب سلول را کنترل می‌کند (۱۲). در این فرآیند سلول تغییر شکل یافته و تماس با سلول‌های مجاور را از دست می‌دهد و کروماتین آن فشرده می‌گردد. از غشای سلول جوانه‌هایی جدا شده و در نهایت

۳- نتیجه‌گیری

پس از استخراج RNA مطابق دستور کیت RNX-Plus و تعیین مقدار آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر، جهت اطمینان از صحت استخراج و دستیابی به میزان مطلوب RNA، نمونه بر روی ژل الکتروفورز بارگذاری شد. سه باند مربوط به RNA ریوزومی ۲۸S، ۱۸S و ۵S در شکل ۱ نشان داده شده است. به دلیل بازدارنده‌های موجود در محصول واکنش ساخت cDNA، به کار بردن مقادیر رقیق نشده cDNA به میزان بیشتر از ۱۰ درصد حجم نهایی واکنش، حساسیت واکنش PCR را تحت تأثیر قرار داده و یا ممکن است واکنش را متوقف کند. در غلظت‌های پایین نیز ممکن است به علت کم بودن الگوی اولیه، سیگنال‌های ناشی از پرایمر دایمرها و توالی‌های غیر اختصاصی افزایش یابد و توالی هدف به صورت مطلوب تکثیر نشود. بررسی باند محصول PCR نمونه اصلی و نمونه‌های رقیق شده بر روی ژل الکتروفورز نشان داد که در مقیاس نانوگرم غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ مناسب‌ترین حالت برای تنظیم کردن آزمایش اصلی Real-Time هستند. با این حال بنا به دلایل ذکر شده و نیز محدودیت میزان cDNA نمونه‌ها، غلظت ۵۰ ng که بین غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ ng بود به عنوان غلظت مناسب انتخاب گردید.

دستگاه PCR توسط نرم‌افزار 3 Opticon Monitor بر اساس شدت فلورسنس تابش شده برای هر نمونه یک منحنی مجزا با رنگ متفاوت ترسیم می‌کند که در نهایت با توجه به Ct منحنی و مقایسه‌ی Ct گروه‌ها با یکدیگر می‌توان افزایش یا کاهش بیان ژن مورد نظر را بررسی نمود (شکل ۲). در منحنی دمای ذوب، شدت فلورسنس در برابر دمای ذوب DNA بصورت منحنی دورشته‌ای ترسیم می‌گردد و با توجه به آن می‌توان به اتصال اختصاصی پرایمر، همچنین به وجود یا عدم وجود پرایمر دایمر پی برد. منحنی‌های ذوب حاصل، نشان دهنده‌ی تکثیر مطلوب ژن‌های *Gapdh*، *Cas8*، *Bax* و *Bcl2* و نیز عدم وجود پرایمر دایمر می‌باشد که نشان‌دهنده‌ی اختصاصیت مناسب پرایمرها می‌باشد (شکل ۳). به منظور تجزیه و تحلیل نتایج به

شده، با استفاده از دو دستور کیت DNAase I RNase-free و کیت سنتز cDNA حجم RNA برای سنتز cDNA تعیین شد. تعیین کیفیت ساخت cDNA با انجام واکنش PCR پس از سفارش پرایمرهای اختصاصی، استخراج RNA و تبدیل آن به cDNA، کنترل اتصال اختصاصی پرایمرها به توالی هدف، تنظیم دمای مناسب Annealing با توجه به T_m همه پرایمرهای طراحی شده و حتی پرایمر ژن خانه گردان می‌باشد که منجر به تولید محصول مناسب طی PCR می‌گردد. برای این منظور یک PCR معمولی با استفاده از پرایمرهای مورد نظر و اعمال دمای میانگین (با توجه به T_m همه پرایمرها) انجام گردید و برای مشاهده محصولات حاصل از واکنش PCR از روش ژل الکتروفورز آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد.

جهت تعیین بهترین غلظت ژن‌ها، ۵ غلظت مختلف از cDNA مربوط به یکی از نمونه‌ها تهیه شد شامل غلظت اولیه و غلظت‌های ۱/، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱ و ۰/۰۰۰۱. از هر یک از ۵ تیوب غلظت‌های فوق با دو تکرار، ۲ μl به تیوب‌های ۱-۱۰ RT PCR اضافه گردید که هر کدام حاوی مقدار ۱۰ μl SYBR Green، ۱ μl پرایمر پیشرو، ۱ μl پرایمر برگشت و ۶ μl آب دو بار تقطیر بودند. برای تهیه کنترل به تیوب دیگری به جای cDNA آب دو بار تقطیر اضافه گردید. سپس، با توجه به Ct و پیک‌های به دست آمده و با مشاهده باندهای ایجاد شده روی ژل آگارز الکتروفورز بهترین غلظت برای انجام آزمایشات انتخاب و واکنش-ها بر اساس آن تنظیم شد. مقدار مساوی cDNA رات‌های نوزاد متعلق به هر گروه از ۳ نوزاد نر و ۳ نوزاد ماده به طور نیمه تصادفی انتخاب و جداگانه در میکروتیوب‌های اختصاصی قرار داده شد. جهت مقایسه و بررسی کمی نتایج در تکنیک RT PCR نیاز به ژن خانه‌گردان است. متناسب با هر نمونه از ژن مورد بررسی واکنش PCR برای ژن خانه‌گردان *Gapdh* نیز تکرار گردید. ضمناً نیاز به کنترل منفی (NTC) بود که محتوی تمام مواد به غیر از cDNA می‌باشد.

قرار گرفته است و تغییرات بیان ۳ ژن درگیر در فرایند آپوپتوز به عنوان شاخصی از اثرات تداخلی نانو ذرات نقره مطرح شده است. ۲ ژن *Bax* و *Bcl2* به عنوان شاخصی برای بررسی مسیر داخلی آپوپتوز و ژن کاسپاز ۸ برای بررسی مسیر خارجی آپوپتوز انتخاب شده است. همان طور که در بخش نتایج مشاهده شد، بیان ژنهای خانواده *Bcl2* در هر دو غلظت مورد بررسی در مغز نوزادان رت تیمار تفاوت معنی داری با گروه کنترل نشان ندادند ولی در مورد ژن کاسپاز ۸ در غلظت ۱۰ ppm در هر دو جنس نر و ماده میزان بالائی از بیان را نسبت به گروه کنترل نشان داد. این مشاهدات بر این موضوع دلالت می کند که نانو ذرات نقره سطح اولیه پیشرفت آپوپتوز یعنی بیان ژن را بواسطه عبور از سد خونی مغزی در یک روش وابسته به غلظت تحت تأثیر خود قرار داده و این القا نامناسب آپوپتوز می تواند بر روند تکوین طبیعی مغز جنین تداخل ایجاد کند. اما تفسیری که از این مشاهده می توان داشت از این قرار است که نانو ذرات نقره اثر خود را از بیرون سلول و از طریق واسطه گری گیرنده های مرگ و فعال شدن کاسپاز ۸ اعمال می کنند، به عبارت دیگر طبق نتایج این پژوهش مسیر خارجی حائز اهمیت می باشد.

دست آمده از PCR، در این پژوهش از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ استفاده شد به شرح زیر:

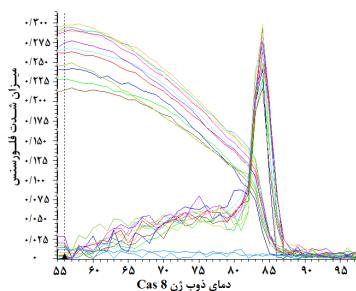
$$\Delta Ct = Ct \text{ (نمونه)} - Ct \text{ (ژن خانه گردان)}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ نمونه} - \Delta Ct \text{ کنترل}$$

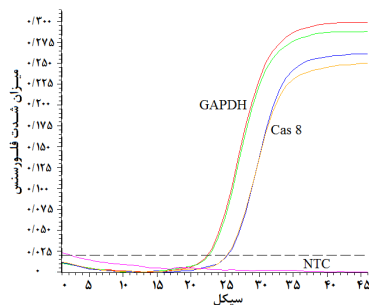
$$2^{-\Delta\Delta Ct} = \text{میزان بیان ژن}$$

داده ها بصورت $\pm SEM$ با استفاده از آزمونهای مدل جنرال لینیئر (GLM)، *Tukeys*، *Post hoc*، *Punnet*، *Lsd* و مورد تحلیل آماری قرار گرفت. معنی دار بودن تفاوت بین گروه های مورد آزمون در سطح $p \leq 0.05$ در نظر گرفته شد. بررسی القاء بیان نسبی ژنهای *Bcl2* و *Bax*، *Cas8* در مغز نوزادان رت که از طریق آلوده شدن مادر به NS با غلظت های ۱ و ۱۰ ppm بود در نمودارهای شماره ۴ تا ۹ مشخص شده است. همانگونه که مشهود است، افزایش آماری معنی داری در بیان ژن پروکسپاز ۸ در غلظت ۱۰ ppm برای هر دو جنس در مقایسه با کنترل وجود دارد. در حالی که تفاوت معنی داری در بیان ژنهای *Bax* و *Bcl2* بین گروه های تیمار و کنترل وجود ندارد.

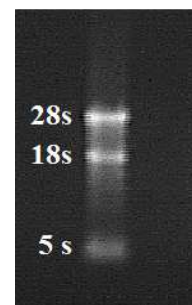
در بررسی انجام شده در این مطالعه اثر نانو ذرات نقره صرف نظر از شکل آنها با در نظر گرفتن غلظت های متفاوت و چگونگی در معرض قرار دادن تیمارها با نانو ذرات مورد توجه



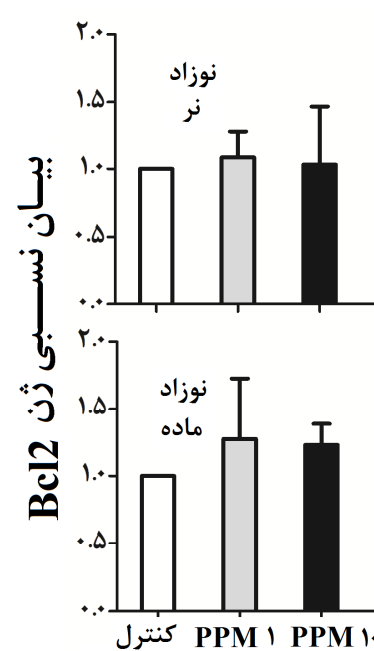
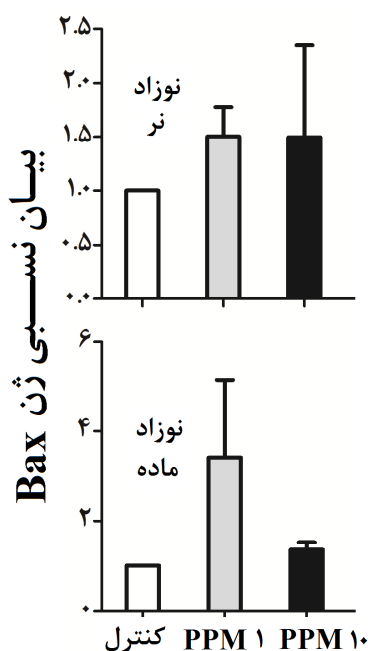
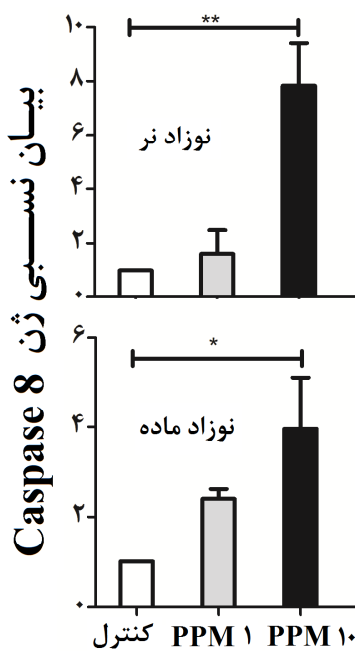
شکل ۳- منحنی ذوب ژن Caspase 8 و عدم تشکیل محصول نا مطلوب □



شکل ۲- منحنی‌های Real Time PCR مربوط به ژن Cas8



شکل ۱- تأیید استخراج RNA



شکل ۴- بیان نسبی ژن‌های Caspase 8، Bax و Bcl2 در مغز رات‌های نوزاد نر و ماده متولد شده از مادرانی که در حین بارداری از طریق آب آشامیدنی تحت اثر ذرات نانو نقره با غلظت‌های 1 PPM و 10 PPM قرار داشتند.

- 1- **Adams, J. M. 2003.** Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev.* 17 (20): 2481-2495.
- 2- **Ahamed, M., Alsalhi, M. S. and Siddiqui, M. K. 2010.** Silver nanoparticle applications and human health. *Clin Chim Acta.* 411 (23-24): 1841-1848.
- 3- **Asharani, P. V., Low Kah Mun, G., Hande, M. P. and Valiyaveetil, S. 2009.** Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano.* 3 (2): 279-290.
- 4- **Blankenberg, F. G. 2008.** In vivo detection of apoptosis. *Nucl Med.* 49: 81-95.
- 5- **Borm, P. J. and Kreyling, W. 2004.** Toxicological hazards of inhaled nanoparticles--potential implications for drug delivery. *Nanosci Nanotechnol.* 4 (5): 521-531.
- 6- **Ferrari, M. 2005.** Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nat Rev Cancer.* 5 (3): 161-171.
- 7- **Los, M., Wesselborg, S. and Schulze-Osthoff, K. 1999.** The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity.* (6): 629-639.
- 8- **Melaiye, A. and Youngs, W. J. 2005.** Silver and its application as an antimicrobial agent. *Expert Opinion on Therapeutic Patents.* 15: 125-130.
- 9- **Moaddab, S., Ahari, H., Shahbazzadeh, D., Motallebi, A. A., Anvar, A. A., Rahman-Nya, J., Shokrgozar, M. R. 2011.** Toxicity study of nanosilver (nanocid®) on osteoblast cancer cell line. *Int. Nano Lett.* 1: 11-16.
- 10- **Pal, D. and Nayak, A. K. 2010.** Nanotechnology for targeted delivery in cancer therapeutics. *Pharmaceutical Sciences Review and Research.* 1 (1): 1-7
- 11- **Park, E. J., Yi, J., Chung, K. H., Ryu, D. Y., Choi, J., Park, K. 2008.** Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicol Lett.* 180 (3): 222-229.
- 12- **Thorburn, A. and Frankel, A. E. 2006.** Apoptosis and anthracycline cardiotoxicity. *Mol Cancer Ther.* 5: 197-199.

SID



سرویس های ویژه



سرویس ترجمه تخصصی



کارگاه های آموزشی



بلاگ مرکز اطلاعات علمی



سامانه ویراستاری STES



فیلم های آموزشی

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی



مقاله نویسی علوم انسانی



اصول تنظیم قراردادها



آموزش مهارت های کاربردی در تدوین و چاپ مقاله