

سمیت سلولی نانوذرات در محیط invitro

مهدی کمالی^۱، علی اکبر رستمی^۲، هما محسنی کوچصفهانی^{۳*}

۱. دکتری قارچ شناسی پزشکی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله، مرکز تحقیقات نانو بیوتکنولوژی، تهران، ایران
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی تکوین، دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، تهران، ایران. باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد، واحد تربت حیدریه
۳. دکتری زیست شناسی تکوین، دانشیار دانشگاه خوارزمی، دانشکده علوم زیستی، تهران، ایران

چکیده :

سابقه و هدف: کاربرد نانوذرات در شاخه های مختلف پزشکی و علوم پایه نسبت به گذشته رشد بیشتری داشته است. کوچک بودن این ذرات باعث شکل گیری سطح فعال بالا می گردد، که این امر خواص شیمیایی، فیزیکی و بیولوژی منحصر به فردی را به آنها می دهد. این ذرات در عبور از سد های بیولوژیکی درون بدن با مشکل چندانی مواجه نمی شوند. از این رو می توانند به عنوان حامل هایی برای انتقال هدفمند داروها و سایر مواد به درون سلول های هدف مورد استفاده قرار گیرند. همین کاربرد روز افزون می طلبد تا اثرات سمی ممکن آنها علیه سلول های هدف و سلول های مجاور آنها بیشتر مورد بررسی قرار گیرد. در این مطالعه سعی ما بر این بوده تا اثرات مختلف ذرات در محیط invitro را مرور کنیم.

مواد و روش ها: مقالات مرتبط با این مطالعه مروری از منابع Pub Med, Elservier science, Google با استفاده از کلمات کلیدی نانوذرات، سمیت، رشد و تمایز استخراج شدند.

یافته ها: بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش، نانوذرات قادرند تا هم اثرات مثبت و هم منفی از خود بر جای گذارند. تجربیات invitro نشان می دهد مکانیسم اصلی عملکرد آنها بر پایه تغییر دادن سطح ROS درون سلول ها است.

نتیجه گیری: نتایج برگرفته از مطالعات گزارش شده نشان می دهند که نانوذرات قادرند تا سطح ROS درون سلول را تغییر دهند و رشد و تمایز انواع سلول ها را تحت تاثیر قرار دهند.

کلمات کلیدی: کاربرد نانوذرات، سمیت سلولی، رادیکال های آزاد

مقدمه

بزرگ (بالا رفتن فعالیت های فیزیکی و شیمیایی و زیستی)، انحلال پذیری و سطح تحرک بالاتر اشاره کرد (۱۵ و ۱۰). نانو تکنولوژی امروزه با سرعت بالایی در حال رشد است و نانوذرات به عنوان اجزای اصلی این علم نیز بیشتر تولید می شوند و بالطبع انسان نیز نسبت به گذشته بیشتر در معرض این ذرات قرار می گیرد. به عنوان مثال نانوذرات در صنایع الکترونیکی، بیوسنسورها، صنایع غذایی، رنگرزی، کرم های ضد آفتاب و ... کاربرد دارند. استفاده روز افزون نانوذرات مختلف که اکثر آنها نیز با سیستم های زیستی در ارتباط اند به این نیاز دارد تا

فناوری نانو (Nanotechnology)، بهره برداری از ویژگی های فیزیکی، شیمیایی و زیستی مواد در این مقیاس اندازه های کمتر از ۱۰۰ نانومتر در علوم و صنایع مختلف می باشد. یافته های اخیر نشان داده است اگر ذرات یک ماده خاص در حد چند نانومتر کوچک شوند، این ذرات ویژگی های متفاوتی با ذرات اولیه خواهند داشت که از جمله می توان به فضای سطحی

آدرس نویسنده مسئول: کرج-کرج-حصارک دانشگاه خوارزمی

Email : aliakbarrostami6616@yahoo.com

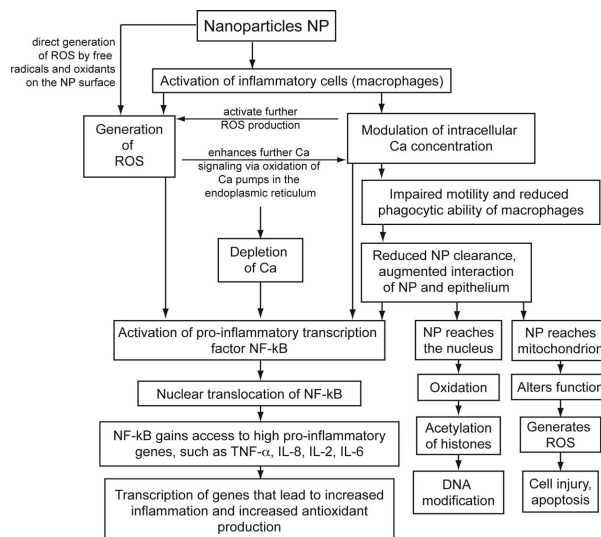
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳/۱۲/۹۱

تاریخ پذیرش: ۱۵/۴/۹۲

اثرات سوء ممکن آنها مورد مطالعه قرار گیرد. Donaldson و همکارانش در سال ۲۰۰۴ با معرفی علم سم شناسی نانو مواد تحولی در زمینه سم شناسی ایجاد نمودند (۱۶). علیرغم کاربرد وسیع نانو مواد، اطلاعات بسیار اندکی در رابطه با تاثیر نانو مواد مهندسی شده در سلامت انسان و محیط وجود دارد. نانو ذرات به علت اندازه فوق العاده کوچک خود به نظر می رسد با مشکل چندانی برای عبور از سد های فیزیولوژیکی درون بدن مواجه نیستند و بنابراین بطور موثر از طریق جریان سیستم عروقی در بافت های بدن توزیع می گردند (۱۳ و ۱۸ و ۳۲).

تاثیر نانو ذرات در invitro

مکانیسم اصلی عملکرد نانوذرات هنوز شناخته نشده است اما مطالعات مختلف در محیط های invitro و in vivo پیشنهاد می کنند که آنها قادرند گونه های فعال اکسیژن (ROS) را تولید کنند و بنابراین روی غلظت کلسیم درون سلولی، فعال نمودن فاکتورهای رونویسی و ایجاد تغییر در سایتوکین ها می توانند نقش داشته باشند. ROS از روش های مختلفی نظیر: آسیب رساندن به DNA، تداخل با مسیرهای سیگنالینگ سلولی، تغییرات در روند رونویسی ژن ها و... می توانند به سلول ها آسیب وارد کنند. (۱۳) (شکل شماره ۱)



شکل شماره ۱: در این تصویر اثرات مختلف نانو ذرات در سلول ها نشان داده شده است. (۱۳)

رادیکال های آزاد، ترکیبات شیمیایی حد واسط با طول عمر کوتاه بوده که دارای یک یا چندین الکترون جفت نشده در

لایه آخر الکترونی خود هستند. به همین علت بسیار واکنش پذیر بوده و برای بدست آوردن الکترون به مولکول های پایدار مجاور خود حمله کرده و سبب اکسایش آنها می شوند. مولکولی که الکترون خود را از دست داده، خود تبدیل به یک رادیکال آزاد شده و این چرخه همچنان ادامه می یابد. هنگامیکه یک الکترون از یک عنصر یا ترکیب غیر رادیکال جدا شود و یا یک الکترون به آن اضافه شود آن عنصر یا ترکیب غیر رادیکال به یک رادیکال تبدیل می شود. بعلاوه اگر در هنگام شکست یک پیوند کووالان، جفت الکترون به اشتراک گذاشته شود - بطور مساوی بین اتم های تشکیل دهنده پیوند تقسیم شود به نحوی که با هر اتم یک الکترون باقی بماند (شکست همولیتیک) - یک جزء غیر رادیکال تشکیل خواهد شد (۴۲). اکسیژن برای بقا لازم است اما متابولیت های آن مانند ROS باید مدام غیر فعال شوند تا فقط میزان کم آن که برای عملکرد نرمال سلول ضروری است باقی بماند. بنابراین یک سری از انواع مختلف آنتی اکسیدان ها بر علیه اکسیدان ها عمل حفاظت را انجام می دهند. (۲۸)

چگونگی عمل رادیکال های آزاد

الف) یک رادیکال ممکن است به یک مولکول دیگر اضافه شود و یک ترکیب رادیکالی دیگر را بوجود آورد.

ب) یک رادیکال ممکن است به عنوان یک عامل احیا کننده عمل کند و یک تک الکترون را به یک غیر رادیکال اهدا کند. پذیرنده این تک الکترون یک تک الکترون جفت نشده خواهد داشت.

ج) یک رادیکال ممکن است به عنوان یک عامل اکسید کننده عمل کند و یک تک الکترون را از یک غیر رادیکال دریافت کند. دهنده این تک الکترون دارای یک الکترون جفت نشده خواهد بود.

د) یک رادیکال ممکن است اتم هیدروژن را از یک پیوند هیدروژنی برباید و اسکلت کربنی را با یک الکترون جفت نشده باقی گذارد. از آنجا که اکثر مولکول های زیستی غیر رادیکال اند تولید یک رادیکال فعال مانند هیدروکسیل در محیط invitro، معمولاً با یکسری از واکنش های زنجیره ای همراه خواهد بود.

از تکنیک هایی مانند کمی لومینسانس (chemiluminescence) (۱)، واکنش تیوباربیتوریک اسید (C4H4N2O2S) (۳۷)، رنگ آمیزی با نیترو بلو تترازولیوم (۱۹)، و روش فلوسیتومتری (۲۹) استفاده می شود.

آنتی اکسیدانت ها

آنتی اکسیدانت ها عواملی هستند که سبب از بین رفتن رادیکال های آزاد و دیگر انواع واکنش پذیر شده و به عنوان سد دفاع سلول، در برابر استرس اکسیداتیو عمل می کنند. مجموعه دفاع آنتی اکسیدانتی را می توان در چهار گروه تقسیم بندی کرد:

الف) عواملی که به طور آنزیمی سبب حذف رادیکال های آزاد و دیگر انواع واکنش پذیر اکسیژن می شوند. به عنوان مثال می توان از آنزیم های سوپر اکساید دیسموتاز، کاتالاز، پر اکسیداز و آنتی اکسیدانت های اختصاصی برای گروه تیول نام برد.

ب) پروتئین هایی که سبب کاهش دسترسی سلول به پیش-اکسیدانت هایی چون یون آهن، مس و هم می شوند. مهم ترین این پروتئین ها عبارتند از: ترانس فرین، هاپیوگلوبین، هموپکسین و متالوتیونین.

ج) پروتئین هایی که مولکول های زیستی را در برابر آسیب های اکسیداتیو حفظ می کنند. مانند پروتئین های شوک حرارتی.

د) مولکول هایی که دارای وزن مولکولی پایین بوده و قادرند ROS و RNS را به دام اندازند. همانند: گلوکاتیون و اسید اوریک.

باید توجه داشت که مجموعه دفاع آنتی اکسیدانتی، از بافتی به بافت دیگر و از یک سلول به سلول دیگر متفاوت است. به علاوه مایعات خارج سلولی نیز دارای سیستم دفاعی متفاوت از درون سلول ها هستند.

مکانیسم های دفاع آنتی اکسیدانتی شامل سه سطح حفاظتی است:

سطح ۱: جلوگیری از ایجاد انواع واکنش پذیر اکسیژن

سطح ۲: از بین بردن انواع واکنش پذیر اکسیژن

بیشترین ROS رایج که در سیستم های زیستی مطرح می شوند شامل: آنیون سوپر اکسید (O₂⁻)، پر اکسید هیدروژن (H₂O₂)، رادیکال های پر اکسیل (ROO⁻) و رادیکال های واکنش دهنده هیدروکسیل (OH⁻) می باشند (۳۱). وسعت آسیب ایجاد شده بوسیله ROS نه تنها به نوع و مقدار ROS بستگی دارد بلکه به زمان و مدت قرار گرفتن در معرض ROS و به عوامل خارجی سلول مانند دما، فشار اکسیژن و آرایش محیط اطراف شامل یون ها، پروتئین ها و میزان زدوده شدن ROS نیز بستگی دارد (۱۷).

منابع استرس اکسیداتیو

چندین سیستم آنزیمی شامل NAD(P)H اکسیداز، اکسیژنازهای وابسته به سیتوکروم P450 و گزانتین اکسیداز، در تولید درون سلولی ROS دخالت دارند. ROS به صورت غیر آنزیمی عمدتاً در میتوکندری به ویژه در کمپلکس های I و III انتقال الکترون میتوکندریایی به وجود می آید. آنیون سوپر اکسید سریعاً به صورت خود به خودی و یا آنزیمی، توسط آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز به پراکسید هیدروژن و اکسیژن تبدیل می شود. هیدروژن پراکسید یک رادیکال آزاد نیست، اما می تواند به راحتی از غشاهای زیستی عبور کند و باعث آسیب شدید به ماکرومولکول های ضروری شود. هیدروژن پراکسید در حضور فلزاتی مانند آهن و مس، رادیکال های بسیار فعال هیدروکسیل را تولید می کند. علاوه بر ROS، رادیکال های فعال نیتروژن (RNS) مانند نیتریک اکسید (NO) و پراکسی نیتريت (PN) نیز، در مکانیسم استرس اکسیداتیو نقش مهمی دارند. ترشح ROS و RNS به وسیله میکروگلیاهای فعال شده یک منبع مضاعف برای رادیکال های آزاد در نورودژنراسیون می باشد (۷ و ۲۱).

روش های اندازه گیری انواع ROS

برای اندازه گیری سطح ROS دو روش مستقیم و غیر مستقیم وجود دارد که در روش مستقیم از اسپکتروسکوپی تشدید الکترون-اسپین استفاده می شود (۹ و ۴۱). در روش غیر مستقیم

سطح ۳: بر طرف کردن آسیب های ایجاد شده توسط انواع واکنش پذیر اکسیژن (۳۸ و ۷)

تأثیرات نانوذرات بر سلول ها در محیط *invivo*

استرس اکسیداتیو می تواند به عنوان پاسخی برای آسیب سلولی در نظر گرفته شود (۳۴). استرس اکسیداتیوی که در اثر نانوذرات ایجاد می شود می تواند چندین علت داشته باشد:

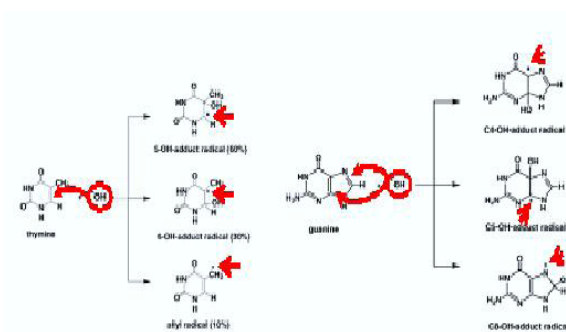
۱- ROS می تواند مستقیماً در زمانی که هم اکسیدان ها و هم رادیکال های آزاد روی سطح ذرات حضور دارند از سطح نانوذرات ایجاد شوند (۳۰)

۲- از طریق ورود به میتوکندری. مطالعات متعددی نشان داده اند که نانوذرات خیلی کوچک قادرند تا به میتوکندری وارد شوند و آسیب های فیزیکی را که منجر به استرس اکسیداتیو می گردد ایجاد نمایند (۳۵).

۳- فعال نمودن سلول های التهابی مانند ماکروفاژها و نوتروفیل های کیسه های هوایی که در روند فاگوسیتوز نانوذرات دخالت دارند. این کار می تواند به تولید گونه های فعال اکسیژن و نیترژن منجر گردد (۲۷).

۴- نانوذرات فلزی (آهن، مس، کروم، وانادیوم و...) می توانند باعث تولید ROS شوند.

به عنوان مثال واکنش $O_2 + H_2O_2(Fe) \rightarrow OH + OH + O_2$ باعث تولید رادیکال هیدروکسیل می گردد که بطور چشم گیری فعال است (۲۶). سیب DNA: تولید ROS در نتیجه حضور نانوذرات می توانند آسیب های جدی و قابل وراثت را به DNA وارد کند. به عنوان مثال تغییرات شیمیایی در هیستون ها یا دیگر پروتئین هایی که در شکل دهی ساختار DNA نقش دارند ساختار مارپیچی DNA را از هم باز می کند و DNA را در معرض هر گونه تغییر قرار می دهد (۳۵ و ۳۸). (شکل شماره ۲)



شکل شماره ۲: نحوه تغییر ساختار بازهای DNA توسط نانوذرات (۲۰)

ژنوم میتوکندری بطور چشم گیری نسبت به حمله اکسایشی آسیب پذیر است (۳۴). Agarwal. و همکارانش در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که سطح بالای ROS باعث شکسته شدن غشا خارجی و داخلی میتوکندری شده و در نتیجه منجر به رها شدن پروتئین سیتوکروم c از میتوکندری و فعال شدن آپتوز و قایع و تحریک آپتوز می گردد و بنابراین در فرایند آپتوز ROS به عنوان یک میانجی عمل می کند (۳). رها سازی پروتئین های میتوکندری مانند سیتوکروم c توسط اعضای پروتئینی خانواده bcl2 کنترل می شود. در حال حاضر ۱۵ پروتئین از این نوع خانواده در پستانداران شناسایی شده اند که همگی حداقل دارای یکی از چهار ناحیه محافظت شده به نام دامنه همولوژی bcl2 می باشند. اعضای این خانواده می توانند هر دو نقش ضد آپتوزی و پرو آپتوزی را فعال کنند (۴). میتوکندری از جایگاه های اصلی تولید ROS در سلول است. به همین علت هم DNA آن در معرض حمله اکسایشی قرار دارد (۶). در مطالعه ای که بوسيله Agarwal در سال ۲۰۰۳ صورت گرفت رابطه منفی بین میزان ROS با پتانسیل غشا میتوکندری نشان داده شده است بطوریکه هر چه میزان ROS افزایش یابد پتانسیل غشا میتوکندری کاهش می یابد (۳). Fen. و Wang همکارانش در سال ۲۰۰۹ به بررسی اثر اکسیداتیو نانو ذره اکسید سیلیکا (SiO₂) بر روی سلول های کلیه جنینی انسان (HEK293) پرداختند (۳۹). در این کار گروهی از دو قطر ۲۰ و ۳۰ نانومتری نانو ذره استفاده شد. این رده سلولی همواره برای بررسی اثرات سمی مواد مختلف بر روی سلول ها مدل مناسبی بوده است (۳۶ و ۲۶). استرس اکسیداتیو سلولی با بالا رفتن سطح ROS، کاهش بیان GSH و افزایش یافتن لیپید پراکسیداسیون

مشخص می گردد. از طرفی حضور آنزیم لاکتات دهیدروژناز در سیتوپلاسم که از سری آنزیم های اختصاصی میتوکندری است نیز می تواند به عنوان شاخصی برای نکروز محسوب گردد. در این تحقیق سطح این آنزیم در داخل سیتوپلاسم سلول هایی که با نانوذرات سیلیکا تیمار شدند به طور چشمگیری افزایش یافت. بعلاوه اکثر سلول هایی که در معرض نانوذرات سیلیکا بودند چروکیده شدند و متراکم شدن هسته که از نشانه های آپوپتوز است را بطور چشمگیری نشان دادند. مکانیسم های مختلفی برای توجیه اعمال آسیب رسان نانوذرات مطرح می شوند که در این میان بالا بردن سطح ROS درون سلولی از اهمیت بیشتری برخوردار است. سوپر اکسید ها، هیدروژن پراکسید ها، هیدروکسیل ها و سایر رادیکالهای اکسیژن قادرند که بطور مستقیم به DNA، پروتئین ها و لیپید های سلول آسیب وارد کنند (۲). کاهش GSH و تولید ROS می تواند باعث ناهماهنگی هایی در عملکرد میتوکندری و همچنین تغییراتی در بیان ژن ها و در نتیجه مسیر هایی که در روند های التهابی و آپوپتوز نقش دارند شامل MAPK/ERK Kinase، MIP-2، کاسپاز ۳، BCL2، گردد. بنابراین آپوپتوزی که توسط SiO_2 القا می شود در ابتدا بالا بردن ROS و کاهش دادن GSH را القا می کند و در مرحله بعد به میتوکندری، DNA و همچنین افزایش بیان ژن های مربوط به گیرنده ها و لیگاند های دخیل در فرآیند مرگ سلولی منجر می شود (۳۳) Ying-Chan و همکارانش در سال ۲۰۱۰ اثر نانو ذره مغناطیسی آهن (ferucarbutran) را بر روند تمایز استئوژن و مکانیسم های سیگنالینگ آن در سلول های بنیادی مزانشیمی انسان را بررسی کردند (۱۲). مطالعات مختلف نشان می دهد که MMP (Matrix metalloproteinase protein) نقش مهمی در تحرک سلول های بنیادی و همچنین در تمایز استئوژن ایفا می کند. در این مطالعه هم MMP2 در روند مهاجرت و تمایز سلول های بنیادی دخیل است. مسیری که SPIO (superpara magnetic iron oxide) می تواند در روند مهاجرت و تمایز استئوژن دخالت داشته باشند از طریق مسیر wnt است. این مسیر سیگنالی که اغلب توسط بتا کتینین فعال می گردد در بسیاری از فرآیندهای سلولی همچون تکثیر، تعیین سرنوشت و مهاجرت دخیل است (۱۲و۵). در سلول های بنیادی مزانشیمی انسان مسیر wnt می تواند تکثیر و متابولیسم شدن

سلولی را بالا برده و در عوض تمایز استئوژن را مهار کند. این مطالعات پیشنهاد می کنند که تحریک متابولیسم شدن سلول در نتیجه بیان MMP2 بواسطه فعال شدن wnt با آهن است که نقش مهمی در تکثیر سلولی و مهار تمایز دارد. علاوه بر این چندین آنتی ژن CT (cancer/testis) همانند SSX, NY, ESO-1, N-RAGE در سلول های بنیادی مزانشیمی تمایز نیافته بیان می شوند و بعد از تمایز استئوژن کاهش بیان می یابند. کاهش یافتن SSX در سلول های بنیادی مزانشیمی انسان بعد از تمایز کاهش یافتن مهاجرت سلولی و سطح MMP2 را نیز به همراه دارد، و این حالت پیشنهاد می کند که SSX یک نقش مثبت در مهاجرت سلولی و بیان MMP2 و از طرفی هم یک نقش منفی در تمایز استئوژن ایفا می کند. در نهایت مشخص گردید که ferucarbutran در یک روند وابسته به غلظت باعث افزایش بیان SSX می گردد (۱۴). اخیرا مطالعه ای نشان داده که بالا رفتن سطح آهن درون سلولی توانسته است تا سیگنالینگ wnt را فعال کند و تکثیر سلولی را افزایش دهد (۸). در سال ۲۰۱۱ wang و همکارانش آزمایشی را طراحی کردند تا اثرات نانو تک لوله های تک جداره کربنی را روی رده سلولی PC12 بررسی کنند. سلول های PC12 از مدولای فوق کلیه موش استخراج می شوند. این سلول ها در پاسخ به NGF به سلول های گانگلیونی شکل سمپاتیکی تمایز می یابند. رده PC12 همواره نمونه ای مناسب برای مطالعات نوروبیولوژی و نوروشیمیایی در نظر گرفته می شود. مشاهدات این آزمایش نشان می دهد که سلول هایی که در معرض nanotube (single-walled carbon) قرار گرفته بودند یک کاهش در میزان توان زیستی (viability) را از خود نشان می دهند. چرخه سلولی سلول های pc12 در فاز G2/M متوقف می گردد و در یک روند وابسته به دز آپوپتوز را القا می کنند. در اینجا نیز میتوکندری یکی از اندامک های خاص تحت تاثیر است و پتانسیل غشا میتوکندری کاهش می یابد. بعلاوه میزان تولید لیپید پراکسید و سطح فعال شدن SOD (superoxide dismutase) را کاهش می دهد. تمامی این تغییرات را شاید بتوان با بالا رفتن سطح ROS درون سلولی مربوط دانست که در یک روند وابسته به دز و زمان سطح گلوکاتایون پراکسیداز، کاتالاز و گلوکاتایون را پایین می آورد (۴۰). البته همیشه نباید ابعاد منفی نانوذرات را مدنظر قرار

نقش ROS ایجاد شده در حضور نانوذرات در تحریک فعالیت NGF می باشد (۳۲) .

با توجه به یافته ها می توان استنباط نمود که اثرات منفی نانو ذرات نسبت به اثرات مثبت آنها چشم گیر تر است. ولی به طور کلی صرف نظر از تاثیرات دو گانه مکانیسم عملکرد آنها تا حدودی مشابه هستند. در جنبه های منفی نانوذرات، سطح رادیکال های آزاد را در داخل سلول بالا برده و در بعد مثبت نانو به عنوان کاهش دهنده های رادیکال ها عمل می کنند.

داد، مطالعات متعدد حاکی از آن است که نانوذرات قادر اند تا تمایز و یا تکثیر سلولی را در رده های مختلف سلولی افزایش دهند (۲۳و۲۶) . Dong ming و همکارانش در سال ۲۰۰۹ اثر نانو ذره آهن را بر سلول های بنیادی مزانشیمی انسان مورد بررسی قرار دادند. این گروه تحقیقاتی نشان دادند که ferucarbutran این توانایی را دارد تا باعث افزایش رشد سلول های بنیادی مزانشیمی انسان گردد که این عمل تحریکی خود را با کاهش دادن سطح H_2O_2 درون سلولی انجام می دهد (۲۶) . این نانوذرات با تولید Fe آزاد می توانند عوامل موثر در چرخه سلولی را تحت تاثیر قرار دهند. برای مشخص نمودن این توزیع از رنگ PI و آنالیز جریان سیتوپلاسمی استفاده شد و مشخص گردید که بعد از تیمار یک افزایش چشمگیر در فاز های S و G2/M مشاهده می گردد. تاثیر نانوذرات بر روند چرخه سلولی می تواند به صورت کنترل بیان پروتئین های تنظیم کننده چرخه نیز صورت بگیرد. محققان در این مطالعه به این نتیجه رسیدند که Fe می تواند بیان کینازهای وابسته به سایکلین (CDK) بخصوص $CDK2$ و $CDK4$ را افزایش و بیان پروتئین های مهار کننده CDK یعنی CDI را کاهش دهد (۲۴) . اخیرا نیز Gao و همکارانش به این نتیجه رسیدند که نانوذرات مغناطیسی خاصیت پراکسیدازی ذاتی دارند و قادرند H_2O_2 را کاتالیز کنند (۲۲) . Jeong Ah Kim و همکارانش در سال ۲۰۱۱ اثر نانو ذره آهن را بر روی سلول های PC 12 مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه آشکار شد که نانو ذره اکسید آهن قادر است تا رشد رو به خارج سلول های عصبی را بالا ببرد. این تاثیر مثبت نانو آهن در یک روند وابسته به غلظت انجام گرفت بطوریکه با بالا رفتن غلظت میزان تمایز هم بالا رفت. نانو ذره اکسید آهن در این فرآیند نه تنها باعث بالا رفتن بیان مارکرهای سلول های عصبی گردد، بلکه باعث افزایش بیان در مولکول های چسباننده سطح سلولی که با ماتریکس واکنش می دهند می شود. نانو ذره اکسید آهن قادر است تا مسیر MAPK را فعال کند. مطالعات متعددی در این زمینه هنوز در حال انجام است اما هنوز مکانیسم های دخیل در این فرآیند شناخته نشده اند (۲۶). نشان داده شده که Mn این توانایی را دارد تا حتی در عدم حضور NGF نیز باعث رشد سلول های عصبی گردد. از جمله فرضیاتی که در این زمینه مطرح است

- 1) Aitken RJ, Buckingham D. Enhanced detection of reactive oxygen species produced by human spermatozoa with 7-dimethyl amino-naphthalin-1,2-dicarboxylic acid hydrazide. *Int Androl*. 1992;15:211-219
- 2) Aitken RJ. Free radicals lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction, Reprod Fertil Dev.* 1995;7(4):659-668
- 3) Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproductive. *Fertile Steril*. 2003;79(4):829-43
- 4) Archer S, Gombert-Maitland M, Maitland M, Rich S, Garcia J, Weir E. Mitochondrial metabolism, redox signaling, and fusion: a mitochondria-ROS-HIF-1-Kv1.5 O₂-sensing pathway at the intersection of pulmonary hypertension and cancer. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008, 294: H570-H578.
- 5) Bai X, Li di, Bai J. Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF- κ B. *Biophysics and biophysical research communications*. 2004;314:197-207
- 6) Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies Morel MC. The effect of reactive oxygen species on equine sperm mobility viability acrossomal integrity mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *J Androl*. 2000; 21(6):895-902
- 7) Bhattacharya K, Davoren M, Boertz J, Schins R, Hoffmann E, Dopp E. Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. *Particle and Fibre Toxicology*. 2009, 6:17
- 8) Brookes MJ, Boulton J, Roberts K, Cooper B, Hotchin N, Matthews G, Iqbal T, Tselepis C. A role for iron in Wnt signalling. *Oncogene*. 2008;27, 966-975
- 9) Buettner GR. Spin trapping: ESR parameters of spin adducts free radical. *Bio Med*. 1987;3:259-303
- 10) Buzza C, Blandino I, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases vol 2*. 2007. MR17 - MR172.
- 11) Chen H, Feng Y, Zhang M, Chao W, Josephson L, Shaw S, Sosnovik D. Protective Effect of the Apoptosis-Sensing Nanoparticle AnxCLIO-Cy5.5. *Nanomedicine*. 2011.
- 12) Chen Y, Hsiao J, Liu H, Lai I, Yao M, Hsu S, Ko B, Chen Y, Yang C, Huang D. The inhibitory effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticle (ferucarbutran) on osteogenic differentiation and its signaling mechanism in human mesenchymal stem cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2010;245:272-279
- 13) Cristina B, Ivan I, Pache Co, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*. 2007;2, No 4
- 14) Cronwright G, Le B, Götherström C, Darcy P, Ehnman M, Brodin B. Cancer/ testis antigen expression in human mesenchymal stem cells: down-regulation of SSX impairs cell migration and matrix metalloproteinase 2 expression. *Cancer Res*. 2005; 65, 2207-2215.
- 15) David B. How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization? *Toxicol sciences*. 2008;101:183-185
- 16) Donaldson K. Nanotoxicology. *Occup Environ Med*. 2004;61:727-8
- 17) Donaldson K, Stone V. Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles. *Ann Ist super sanita*. 2003;39(3):405-10
- 18) Elder A, Gelein R, Silva V, Feikert T, Opana Shukl, Carter J, Potter R, Maynard A, Ito Y, Finkelstein J, Oberdorster G. Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide nanoparticles to the central nervous system. *Environ health perspect*. 2006;114:1172-8
- 19) Esfandiari N, Sarma RK, Saleh RA, Thomas AJ, Agarwal A. Utility of the nitroblue tetrazolium reduction test for assessment of reactive oxygen species production by seminal leukocytes and spermatozoa. *J Androl*. 2003;24:862-870
- 20) Evans M, Dizdaroğlu M, Scooke M. Oxidative DNA damage and disease repair and significance. *Mutation Res*. 2004; 567:1-61
- 21) Florea AM, Spletstoesser F, Büsselberg D. Arsenic trioxide (As₂O₃) induced calcium signals and cytotoxicity in two human cell lines: SY-5Y neuroblastoma and 293 embryonic kidney (HEK). *Toxicology and Applied Pharmacology* 2007;220, 292-301
- 22) Gao L, Zhuang J, Nie L, Zhang J, Zhang Y, Gu N, et al. Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles. *Nat Nanotechnol*. 2007;(9):577-83
- 23) Hajipour M and et al. Antibacterial properties of nanoparticle. *Trend in biotechnology*. 2012;130:499-511
- 24) Huang D, Hsiao J, Chen Y, Chien L, Yao M and et al. The promotion of human mesenchymal stem cell proliferation by superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*. 2009;30:3645-3651
- 25) Hussain S.M, Hess K, Gearhart J, Geiss K, Schlager J. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in Vitro*. vol 19. 2005;975-983
- 26) Kim J, Lee N, Kim B, Rhee W, Yoon S, Hyeon T, Park T. Enhancement of neurite outgrowth in PC12 cells by iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*. 2011;32:2871-2877
- 27) Jiaen Li, Muralikrishnan S, Ng Ch, Lanry Yung L, Bay B. Nanoparticle-induced pulmonary toxicity. *Experimental Biology and Medicine*. 2010;235: 1025 - 1033
- 28) Urata K, Navahara H, Tanaka Y, Egashira T, Tayama F, Miakawa I. Effect of endotoxin induced reactive oxygen species on sperm mobility. *Syst Biol Reprod Med*. 2001, 76:163-166
- 29) Lampiao F, Strijdom H, SS Du plessis. Reactive oxygen species measurement in human spermatozoa by flow cytometry using the fluorescent probe, 2,7-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA). *Medical technology SA*. 2006;20:7-8
- 30) Larrisa M, Hempel M. Recent Advances in Intracellular and In Vivo ROS Sensing: Focus on Nanoparticle and Nanotube Applications. *Int. J. Mol. Sci*. 2012;13:10660-10679.

- 31) Murphy M. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 2009;41-13
- 32) Oravec K, Kalka D, Jeney F, Cantz M, Nagy IZ. 2002 Hydroxyl free radicals induce cell differentiation in SK-N-MC neuroblastoma cells. *Tissue Cell*;34(1):33-8
- 33) Huang D, Hsiao J, Chen Y, Chien L, Yao M, Chen Y, Ko B. The promotion of human mesenchymal stem cell proliferation by superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*. 2009;30:3645-3651
- 34) Sikka Sc, Rajasekaran M, Hellstrom WJ. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. *J Androl* . 1995;16:464-468
- 35) Singh N, Manshian B, Jenkins G, Griffiths S, Williams P, Maffei T, Wright CH, Doak Sh. NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*. 30 (2009) 3891-3914.
- 36) Thomas R, Pisanic II Jennifer D. Blackwell Veronica I. Shubayev Rita R. Finˆones Sungho Jin. Nanotoxicity of iron oxide nanoparticle internalization in growing neurons. *Biomaterials*. 2007;28:2572-2581
- 37) Toyooka T, Amano H, Suzuki Y, Ibuki I. DNA can sediment Tio2 particles and decrease the uptake potential by mammalian cells. *Sci Total Environ*. 2009;407:2143-2150
- 38) Trouiller B, Reliene R, Westbrook A, Solaimani P, Schiestl R. Titanium Dioxide Nanoparticles Induce DNA Damage and Genetic Instability In vivo in Mice. *Cancer Res* .2009; 69: (22).
- 39) Wang F, Gao F, Lan M, Yuan H, Huang Y, Liu J. Oxidative stress contributes to silica nanoparticle-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells. *Toxico invitro*. 2009;123:808-815
- 40) Wang J, Sun P, Bao Y, Liu J, An A. Cytotoxicity of single-walled carbon nanotube on pc12 cells. *Toxicol in Vitro*. 2011;25 : 242-250
- 41) well H. Free radicals in biology and medicine. 1999
- 42) Yoshida Y, Itoh N, Saito Y, Hayakawa M, Niki E. Application of watersoluble radical initiator, 2,2-azobis