

بررسی شاخص اکسیدان - آنتی اکسیدان در کبد جنین موش های صحرایی القا شده با نانوذرات نقره

فاطمه هنرور^۱، غلامحسن واعظی^۱، محمدرضا نورانی^{۲*}، آصفه کامرانی^۳، احسان صادق نژاد^۴

۱- گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران.

۲- مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... اعظم (عج)، تهران، ایران.

۳- گروه زیست شناسی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پرند، پرند، ایران.

۴- دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: از نانو نقره به عنوان یک ماده ضد عفونی کننده استفاده می شود، اما بررسی سمیت این ماده کم تر مورد توجه قرار گرفته است. هدف این مطالعه بررسی اثر های نانو نقره بر بافت کبد جنین موش صحرایی و تعیین مقدار MDA به عنوان شاخص اکسیدان و میزان سطح بیان آنزیم اکسیدان SOD می باشد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی ۱۶ سر موش صحرایی باردار از نژاد ویستار (چهار گروه چهار تایی) با نانو ذره نقره ۲۰ نانومتر در مقدارهای ۱۲۵، ۷۵۰ و ۱۵۰۰ میلی گرم/کیلوگرم/روز و کنترل به صورت خوراکی به مدت ۱۸ روز تیمار شدند. برای بررسی تغییرهای درون سلولی کبدی، پس از ۱۸ روز موش ها را سزارین کرده و بافت کبد موش های هر گروه را جدا و برای سنجش مقدار MDA از روش Satoh و بیان ژن SOD از روش semi quantitative RT-PCR استفاده شد.

یافته ها: بیش ترین میزان کاهش مقدار MDA مربوط به تیمار ۷۵۰ میلی گرم/کیلوگرم/روز می باشد که معادل تقریبی ۶۸ درصد نسبت به تیمار کنترل کاهش غلظت نشان داد. نانو ذرات نقره به علت درگیر شدن در فرایند استرس اکسیداتیو به واسطه تولید رادیکال آزاد با آنزیم های آنتی اکسیدان از جمله سوپر اکسید دیسموتاز ارتباط دارد. بیش ترین میزان بیان ژن سوپر اکسید دیسموتاز مربوط به تیمار ۷۵۰ میلی گرم/کیلوگرم/روز می باشد که معادل تقریبی ۲۲/۴ درصد نسبت به تیمار کنترل افزایش نشان داد و کم ترین میزان کاهش بیان ژن سوپر اکسید دیسموتاز مربوط به تیمار ۱۲۵ میلی گرم/کیلوگرم/روز با معادل تقریبی ۵/۷۵ درصد نسبت به تیمار کنترل نشان داده شد.

بحث: این مطالعه نشان داد که سیستم آنتی اکسیدانی به عنوان یکی از فرایندهای مهم درون سلولی در کبد جنین موش های صحرایی به شمار می رود که می تواند در تقابل با تغییرات محیطی از جمله غلظت های مختلف نانو ذره نقره واکنش نشان دهد.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که فرایندهای درون سلولی به ویژه استرس اکسیداتیو در کبد جنین موش های صحرایی در یک روند وابسته به دوز از غلظت های مختلف نانو ذره نقره تحت تاثیر قرار میگیرند.

کلمات کلیدی: نانوذره نقره، موش صحرایی، کبد جنین، استرس اکسیداتیو

نویسنده مسئول :

دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... اعظم (عج)، مرکز تحقیقات نانوبیوتکنولوژی،

تهران، ایران

پست الکترونیکی: r.nourani@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۳/۰۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۶/۱۱

مقدمه

فناوری نانو (Nanotechnology)، بهره برداری از ویژگی های فیزیکی، شیمیایی و زیستی مواد در مقیاس اندازه های کم تر از ۱۰۰ نانو متر 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 بزرگ (بالا رفتن فعالیت های فیزیکی و شیمیایی و زیستی)، انحلال پذیری و سطح تحرک بالاتر اشاره کرد. (۲۷) با وجود 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 چندان برای عبور از سد های فیزیولوژیکی درون بدن مواجه نیستند و بنابراین به طور موثر از طریق جریان سیستم عروقی در بافت های بدن توزیع می گردند. (۶،۲۰)

بعضی گزارش ها در زمینه های پزشکی و بیولوژیکی ثابت کرده اند که بسیاری از وسایل پزشکی نقره دار، یون های نقره آزاد می کنند که وارد خون می شوند و در کبد، کلیه، ریه و مغز انباشته شده و باعث سمی شدن آن ها و در نهایت منجر به مرگ می شود (۲۱)، بنابراین نانو ذرات نقره ممکن است اثر های سمی داشته باشند که مکانیسم سمیت آن ها روشن نیست و نگرانی های زیادی را در ارتباط با استفاده در طبیعت برای سلامتی انسان ها به وجود آورده است (۲۵).

نقره خالص بالاترین ضریب انتشار الکتریکی و انتقال حرارتی را نسبت به فلزات دیگر دارا میباشد. استفاده از نقره کلئیدی برای اولین بار توسط Lee در سال ۱۸۸۹ برای پزشکی به کار گرفته شد (۸). در جنگ جهانی اول از نقره برای پانسمان زخم و به عنوان ماده ضد عفونی کننده استفاده می شد، اما بعد ها توسط پنی سیلین جایگزین شد. امروزه، کاربرد نانوذرات نقره در علوم مختلف و به خصوص پزشکی، در سراسر جهان دیده می شود. به عنوان مثال، در بیمارستان ها برای زخم های خارجی و سوختگی ها می توان از آن استفاده کرد (۱۱،۱۷). استفاده از تکنولوژی نانو مانند بقیه فناوری ها معایب متعددی را می تواند به دنبال داشته باشد. به عنوان مثال: کارشناسان هنوز در این مورد که آیا نانوذرات نقره اثر های تخریبی بر روی بافت و سلول ها به جا می گذارند، اطلاعات کافی ندارند. در دفع بسته بندی این امکان وجود دارد که ذرات نانو احتمالا عواقب بدی را برای محیط زیست و سلامتی انسان ها به همراه داشته باشد. انتشار این ذرات در محیط زیست و تاثیرات مختلف آن ها بر تمام ارگانیسم های

بدن انسان، موضوعی است که باید بر روی آن تحقیقات گسترده و دقیقی صورت پذیرد (۱۰). از طرفی نانوذرات ممکن است سیستم ایمنی بدن و میزان گلبول های خونی را تغییر داده و استفاده نابجا از آن ها برای بدن ضرر داشته باشد. در بسیاری از مطالعه های، یون های نقره (در قالب نیترات نقره) اثر هایی مشابه اثر های نانوذرات نقره می گذارند، اگرچه یون های نقره در غلظت های پایین دارای فعالیت می باشند (۷). از سوی دیگر، نانوذرات نقره باعث تولید بیش تر رادیکال های آزاد (ROS) نسبت به یون های نقره می شوند (۱۹)، و این حاکی از آن است که تولید ROS فقط به دلیل وجود یون نیست بلکه یکی از ویژگی های نانوذرات نقره می باشد. البته نحوه ی انتشار نقره نسبت به حضور یون های نقره می تواند به عنوان یک عامل مهم در تولید ROS موثر باشد. با توجه به این که بیشتر سموم در کبد متابولیز می شوند و از طریق بررسی تغییرات آنزیم های کبدی می توان میزان سمیت را بررسی کرد.

در این مطالعه، اثر های فیزیولوژیک نانوذرات نقره بر روی تغییرات میزان حضور مالون دی آلدئید (MDA) به عنوان شاخص اکسیدان و سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) با ویژگی آنتی اکسیدان بر روی کبد جنین موش صحرایی مورد بررسی قرار گرفته است. با توجه به اهمیت و جدید بودن تحقیقات در حوزه نانو بیوتکنولوژی و با توجه به تاثیرات قطر و اندازه نانوذرات در خواص شان، لذا در این مطالعه، از نانوذرات نسل اول نقره به صورت کلئیدی، کروی و با میانگین قطر ۲۰ نانومتر جهت ایجاد مدل حیوانی استفاده شد.

روش کار

تهیه و نگهداری حیوانات

موش های صحرایی مورد مطالعه در این آزمایش از نژاد ویستار با ۱۰ هفته سن در مرکز علوم تحقیقاتی حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله اعظم (عج)، تحت شرایط نور مصنوعی از ساعت ۷ صبح تا ۷ شب با رطوبت نسبی ۴۰ و در دمای اتاق ۲۳ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. جهت بررسی های آزمایشگاهی بر روی جنین موش های صحرایی، ۳ سر رت ماده به همراه ۱ سر رت نر به مدت یک شب در یک قفس برای انجام عمل جفت گیری نگهداری شدند. برای اطمینان حاصل از جفت گیری موش های صحرایی، تهیه ی اسمیر از واژن صورت گرفت و وجود اسپرم این جفت گیری را تایید کرد. ۱۶ سر موش صحرایی ماده باردار برای مطالعه انتخاب و به ۴ گروه آزمایشی تقسیم شدند. هر گروه با ۴ تکرار در غلظت های مختلف ۱۲۵، ۷۵۰ و ۱۵۰۰ میلی گرم/کیلوگرم/روز از نانوذره نقره به همراه

تیمار کنترل جهت مطالعه های بعدی استفاده شد.

تیمار کردن حیوانات

در این مطالعه، نانو ذره نقره با اندازه ذرات ۲۰-۱۰ نانومتر، روزانه به صورت گاوآژ از روز ششم حاملگی به موش های صحرایی ماده باردار در غلظت های ۱۲۵، ۷۵۰ و ۱۵۰۰ میلی گرم/کیلوگرم/ روز خورانده شد. وزن بدن مادر در روزهای ۰-۶-۹-۱۲-۱۵-۱۷-۱۹ اندازه گیری و مادر ها هر روز از لحاظ سلامت ظاهری (اسهال و ...) بررسی شدند.

جمع آوری جنین ها

در روز ۱۹ حاملگی سزارین انجام شد. در طی این عمل ابتدا موش های صحرایی باردار در اثر استنشاق کلروفرم بیهوش و با باز کردن شکم آن ها، جنین ها جداسازی شدند. سپس کبد هر یک از جنین ها جهت بررسی در این مطالعه در داخل میکروتیوپ ۱.۵ ml داخل فلاسک حاوی ازت مایع قرار داده و در دمای ۸۰- نگهداری شد.

استخراج RNA و بررسی بیان ژن توسط Semi quantitative RT-PCR

برای استخراج RNA مقدار ۵۰ میلی گرم بافت منجمد کبد با روش هموژنیزه کردن پودر شد و مورد استفاده قرار گرفت. به منظور جداسازی RNA، از کیت Total RNA purification از شرکت Bioneer آلمان، طبق دستور العمل شرکت سازنده استفاده گردید و سپس کیفیت محلول RNA استخراج شده به وسیله ی الکتروفورز روی ژل آگارز بررسی شد. از هریک از نمونه ها، مقدار ۱۰۰۰ نانوگرم از RNA به عنوان الگو جهت سنتز cDNA^۱ استفاده شد. در این پژوهش برای سنتز cDNA از کیت CycleScript RT PreMix (dN6) از شرکت Bioneer استفاده شد. به این صورت که برای ساخت cDNA از آغازگر(پرایمر) اولیگو dt که به دم پلی آدنین mRNA متصل می شود، استفاده گردید. سطح نسبی mRNA ژن SOD در کبد با روش RT-^۲ PCR اندازه گیری شد. این روش به کمک پرایمر اختصاصی SOD انجام شد. برای کنترل تکثیر این ژن از پرایمر اختصاصی β actin استفاده شد. ژن بتا اکتین، ژن خانه دار نامیده می شود که همیشه بیان می شود و می تواند شاهد خوبی برای بررسی بیان ژن باشد. ترادف پرایمرهای به کار گرفته شده و نیز بهترین دمای اتصال برای هر جفت پرایمر که از طریق گرادیان دمای تعیین شده به شرح جدول ۱ می باشد.

نام ژن	نوع پرایمر	توالی پرایمر	دمای اتصال	طول قطعه (bp)
S O D C u / (Zn)	F	ggacctcattttaatcctcactcta	۵۸	۲۲۸
	R	Cttgtactttctcattccacct		
β -ACT	F	aggatgcagaaggagattactgc	۵۳	۲۱۹
	R	Aaaacgcagctcagtaacagtc		

جدول ۱. توالی پرایمرها و اطلاعات مربوط به آن ها.

مراحل PCR شامل: (۱) واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه (۲) سیکل که به ترتیب شامل: (a) واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه. (b) اتصال در دمای مناسب برای هر پرایمر ۶۸-۴۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه. (c) طویل سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه بود. (۳) طویل سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه بود.

در نهایت محصول PCR برای تشخیص و بررسی بیان ژن SODCuZn بروی ژل آگاروز ۱.۵٪ حاوی اتیدیوم بروماید الکتروفورز شد.

اندازه گیری شدت باند ها و آنالیز آماری

برای کمی کردن نتایج کیفی بدست آمده از شدت باند ها، از نرم افزار ImageJ استفاده شد. اطلاعات جمع آوری شده با استفاده از نرم افزار SPSS17 و آنالیز واریانس یک طرفه One Way Anova انجام گردید تا اختلاف بین گروه ها توسط LSD به صورت مجزا تعیین گردد. تمام تحلیل ها با توجه به سطح معنی دار $P < 0.05$ انجام شد. داده ها به صورت (Mean) میانگین بیان گردید.

اندازه گیری و تعیین غلظت مالون دی آلدئید MDA

برای تعیین محصول نهایی پراکسیداسیون لیپید ها با نام مالون دی آلدئید (MDA) از روش Satoh استفاده شد (۲۴). غلظت مالون دی آلدئید با استفاده از ۳، ۳، ۱۰، ۱ تترا اتوکسی پروپان به عنوان استاندارد تعیین شد.

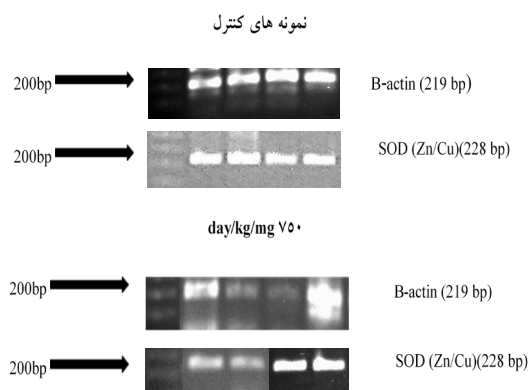
یافته ها

تغییرات مقدار MDA در تیمارهای غلظتی مختلف نانو ذره نقره نسبت به تیمار کنترل

دراین مطالعه مقدار MDA بر روی کبد جنین موش های صحرایی تیمار شده با نانو ذرات نقره بررسی شدند که در گروه تیمار شده با نانوذرات نقره کاهش معنی داری در غلظت مالون

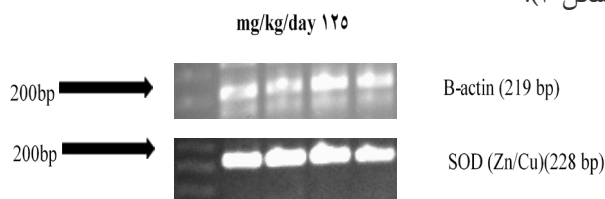
1complementary DNA
2Reverse transcription polymerase chain reaction

دی آلدئید صورت گرفت ($P \text{ value} < 0,05$) (نمودار ۱). بیش ترین میزان کاهش مقدار MDA مربوط به تیمار ۷۵۰ میلی گرم/کیلوگرم/روز می باشد که معادل تقریبی ۶۸ درصد نسبت به تیمار کنترل کاهش غلظت نشان داد و کم ترین میزان کاهش مقدار MDA مربوط به تیمار ۱۲۵ میلی گرم/کیلوگرم/روز با معادل تقریبی ۴۸ درصد نسبت به تیمار کنترل نشان داده شد. این در حالی است که میزان کاهش مقدار MDA در کبد جنین موش های صحرایی تیمار شده با غلظت های ۷۵۰ و ۱۵۰۰ (۶۳٪ و ۶۸٪ به ترتیب) نسبت به هم دیگر معنی دار نبود.



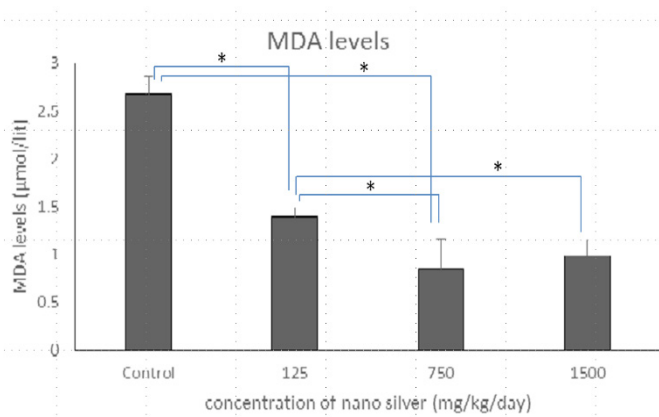
شکل ۲. آنالیز نیمه کمی RT-PCR ژن SOD برای کبد جنین موش های صحرایی تیمار شده با غلظت ۷۵۰ میلی گرم/کیلوگرم/روز و موارد کنترل. محصول PCR برای ژن β اکتین به عنوان ژن کنترل درونی با طول ۲۱۹ و ژن SOD با طول ۲۲۸ bp و لدر با طول ۲۰۰ bp در شکل مشخص گردید. تعداد ۴ باند مربوط به تکرارهای هر تیمار می باشد.

کم ترین میزان کاهش بیان ژن سوپر اکسید دیسموتاز مربوط به تیمار ۱۲۵ میلی گرم/کیلوگرم/روز با معادل تقریبی ۵,۷۵ درصد نسبت به تیمار کنترل نشان داده شد. نتایج حاصل از آنالیز نیمه کمی RT-PCR نشان داد که هیچ تفاوت معنی داری بین کبد جنین موش های صحرایی تیمار شده با غلظت ۱۲۵ میلی گرم/کیلوگرم/روز و موارد کنترل از نظر بیان ژن SOD وجود ندارد (شکل ۳).



شکل ۳. آنالیز نیمه کمی RT-PCR ژن SOD برای کبد جنین موش های صحرایی تیمار شده با غلظت ۱۲۵ میلی گرم/کیلوگرم/روز و موارد کنترل. محصول PCR برای ژن β اکتین به عنوان ژن کنترل درونی با طول ۲۱۹ و ژن SOD با طول ۲۲۸ bp و لدر با طول ۲۰۰ bp در شکل مشخص گردید. تعداد ۴ باند مربوط به تکرارهای هر تیمار می باشد.

میزان بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز در گروه اول به عنوان گروه کنترل از کبد جنین موش های صحرایی معادل ۱,۰۴۹ گزارش شد که در گروه سوم با تیمار ۷۵۰ mg/kg/day میانگین سطح بیان ژن سوپراکسید دیسموتاز معادل ۱,۲۸۴ می باشد که نسبت به گروه کنترل افزایش معنی دار نشان داد (نمودار ۲). با استفاده از β اکتین به عنوان ژن کنترل درونی، الگوی بیان ژن SOD در کبد جنین موش های صحرایی تیمار شده در غلظت ۱۵۰۰ میلی گرم/کیلوگرم/روز نانو نقره نسبت به تیمار کنترل متفاوت بود.



نمودار ۱. سنجش مقدار MDA در غلظت های مختلف نانو ذره نقره

تغییرات بیان ژن سوپر اکسید دیسموتاز در تیمار های غلظتی مختلف نانو نقره نسبت به تیمار کنترل

بیان ژن SOD بر روی کبد جنین موش های صحرایی تیمار شده با نانو ذرات نقره مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت که در گروه تیمار شده با نانو ذرات نقره تغییرات معنی داری در سطح بیان ژن سوپر اکسید دیسموتاز مشاهده شد.

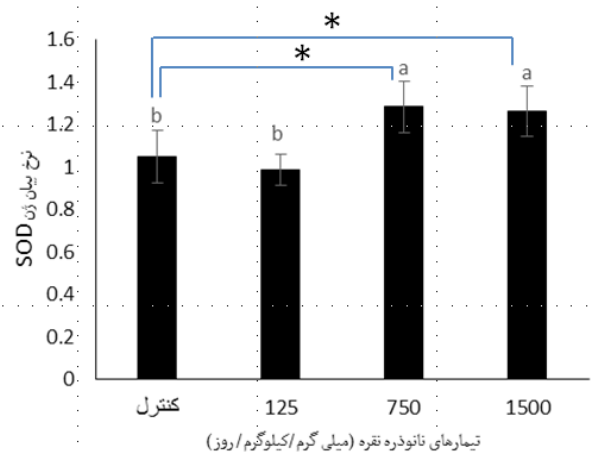
نتایج حاصل از آنالیز نیمه کمی RT-PCR نشان داد که تفاوت معنی داری بین بیان ژن سوپر اکسید دیسموتاز کبد جنین موش های صحرایی تیمار شده با غلظت ۷۵۰ میلی گرم/کیلوگرم/روز و موارد کنترل وجود دارد و بیش ترین میزان بیان ژن سوپر اکسید دیسموتاز مربوط به تیمار ۷۵۰ میلی گرم/کیلوگرم/روز می باشد که معادل تقریبی ۲۲,۴ درصد افزایش نسبت به تیمار کنترل بود (شکل ۲).

صحرائی دریافت کننده نانو ذره نقره پس از تیمار غلظت های مختلف نانوذره نقره در طول مدت ۱۸ روز مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس مطالعه های حاضر، کاهش مقدار MDA در کبد جنین گروه های دریافت کننده نانو ذرات نقره در مقایسه با گروه کنترل به صورت معنی داری مشاهده گردید.

به تازگی، Piao همکاران (۲۰۱۱) (۲۳) گزارش دادند که AgNPs باعث القا تولید ROS می شوند و GSH داخل سلولی در سلول های کبدی چانگ انسان کاهش می یابد که منجر به آسیب اجزای سلولی شده است. نتایج این مطالعه های به وضوح نشان می دهد که قرار گرفتن در معرض AgNP در شرایط *in vitro* باعث سمیت سلولی از طریق استرس اکسیداتیو در سلول های کبدی شده است. مطالعه حاضر نیز نشان داد که تیمار AgNPs از موش های باردار باعث افزایش بیان SOD در دوزهای ۷۵۰ و ۱۵۰۰ میلی گرم/کیلوگرم/روز و کاهش در محتوای MDA با دوز ۱۲۵ و ۷۵۰ میلی گرم/کیلوگرم/روز شده است. بر خلاف مطالعه های آزمایشگاهی، مطالعه های *in vivo* در مورد نوع و شدت سمیت کبدی توسط AgNPs شواهد متناقضی را ارائه کردند. با توجه به سمیت خوراکی AgNPs در موش ۲۸ روزه (۱۶)، حداقل سمیت کبدی، از جمله افزایش میزان سرم ALP و کلسترول و افزایش بروز تغییرات آسیب شناسی مانند هیپرپلازی مجاری صفراوی، ارتشاح سلول های التهابی، و اتساع رگ مرکزی در دوزهای ۳۰۰ میلی گرم/کیلوگرم/روز مشاهده شد. اثر های جزئی از AgNPs در کبد موش ۹۰ روز و در دوز ۱۲۵ میلی گرم/کیلوگرم/روز یافت شد (۱۵)، اما میزان ALP و کلسترول مشاهده شده در گروه های تیمار در حدود تنوع زیستی طبیعی مشاهده گردید (۱۸، ۲۲، ۲۸) و با هیچ شاخص دیگری از اختلال عملکرد کبدی همراه نبود. گزارش مطالعه های Hadrup و همکاران (۲۰۱۲) (۹) در موش ۲۸ روزه و با دوز AgNPs ۹ میلی گرم/کیلوگرم/روز، هیچ اثری از سمیت کبدی نشان نداد. در مطالعه Yu و همکاران (۲۰۱۴) (۲۹)، اگر چه دوز خوراکی ۱۰۰ میلی گرم/کیلوگرم/روز از AgNPs به موش های باردار در طی ۱۴ روز باعث افزایش در استرس اکسیداتیو کبد شد اما هیچ عوارض ناشی از تیمار، از جمله علائم بالینی، تغییرات وزن بدن، مصرف مواد غذایی، و یا بیوشیمی سرم مشاهده نشد.

در این مطالعه تغییر هایی در سیستم تدافعی آنتی اکسیدانی و میزان بیان ژن SOD بافت کبد جنین موش های صحرائی متعاقب تیمار با نانو ذره نقره مشاهده شد. کاهش فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز شاخصی حساس برای آسیب سلول های کبدی است. این آنزیم یکی از مهم ترین عوامل در سیستم تدافعی

نتایج حاصل از آنالیز نیمه کمی RT-PCR نشان داد که تفاوت معنی داری بین کبد جنین موش های صحرائی تیمار شده با غلظت ۱۵۰۰ میلی گرم/کیلوگرم/روز و موارد کنترل از نظر بیان ژن SOD وجود دارد. این در حالی است که میزان افزایش بیان ژن سوپر اکسید دیسموتاز در کبد جنین موش های صحرائی تیمار شده با غلظت های ۷۵۰ و ۱۵۰۰ (۲۲، ۴)٪ و ۲۰، ۴٪ به ترتیب نسبت به هم دیگر معنی دار نبود.



نمودار ۲. مقایسه بیان ژن سوپر اکسید دیسموتاز در تیمار های مختلف بر حسب میلی گرم/کیلوگرم/روز

بحث

سمی بودن AgNPs به طور گسترده در طول دهه اخیر در سیستم های *in vitro* و *in vivo* مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۳، ۲۶). مکان اصلی تجمع AgNP به طور عمده در کبد می باشد که تحقیق ها بر روی این اندام هدف در شرایط *in vivo* و *in vitro* متمرکز شده است. با توجه به گزارش Hussain و همکاران (۲۰۰۵) (۱۲)، قرار گرفتن در معرض AgNP سبب آسیب غشاء، کاهش سطح GSH و افزایش تولید ROS در سلول های کبدی موش صحرائی شده است. علاوه بر این تیمار AgNP در سلول تومور کبدی انسانی منجر به کاهش در محتوای DNA شد (۲). کیم و همکاران (۲۰۰۹) (۱۴) گزارش دادند که AgNPs برای سلول های تومور کبدی انسان سمی هستند و سمیت سلولی در درجه اول ناشی از استرس اکسیداتیو است. بر اساس مطالعه های گذشته و از مقایسه گروه های دریافت کننده نانوذره نقره با گروه کنترل می توان فهمید که گروه دریافت کننده نانو ذرات نقره از طریق تولید رادیکال آزاد سبب پراکسیداسیون لیپیدی و تولید مالون دی آلدئید MDA می شود (کرم سیچانی و همکاران، ۱۳۹۱).

نویسندگان این مقاله از سرکار خانم دکتر محمودزاده در مرکز تحقیقات ژنومیکس دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... به دلیل همکاری در انجام این پروژه تحقیقاتی کمال تشکر و قدردانی را دارند.

آنتی اکسیدانی آنزیماتیک است. سوپراکسید دیسموتاز آنیون سوپراکسید را از طریق تبدیل آن به پراکسید هیدروژن زدوده و بدین ترتیب اثر های سمی آن را کاهش می دهد (۵).

در مطالعه های گذشته، میزان سوپراکسید دیسموتاز در موش های صحرایی تیمار شده با نانو ذره نقره به دلیل تشکیل فراوان آنیون های سوپر اکسید، به طور معنی داری افزایش یافت که در پی آن فعالیت آنزیم های زداینده پراکسید هیدروژن یعنی کاتالاز^۴ و گلووتاتیون پراکسیداز^۵ نیز در این موش های صحرایی به طور معنی داری افزایش یافته بود (۴). کاتالاز با تجزیه پراکسید هیدروژن بافت ها را در برابر رادیکال های بسیار فعال هیدروکسیل محافظت می کند. بنابراین، کاهش فعالیت کاتالاز ممکن است منجر به برخی اثر های مخرب ناشی از رادیکال سوپراکسید و پراکسید هیدروژن گردد (۳). گلووتاتیون ردوکتاز یک آنزیم سیتوزولی کبدی است که به عنوان محصول نهایی فعالیت، (GSSG) در کاهش گلووتاتیون اکسید دخالت دارد (۱۴).

سمیت نانو ذره نقره که به صورت خوراکی در دوز های ۱۲۵، ۷۵۰ و ۱۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به موش صحرایی داده شد، در مقایسه با گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از آن نشان داد که فرایندهای درون سلولی به ویژه استرس اکسیداتیو تحت تاثیر غلظت های مختلف نانو ذره نقره است. بررسی های بیان ژن سوپر اکسید دیسموتاز حاکی از آن است که در یک روند وابسته به دوز نانو ذره مقدار بیان آن تغییر می کند، چرا که با افزایش دوز میزان بیان آن به طور معنی داری افزایش یافت. علاوه بر این اثر نانو ذرات بستگی به عوامل زیادی دارد که شامل اندازه، شکل، ترکیب شیمیایی، حلالی، مساحت سطح و بار سطحی می باشند (۱). ذرات ریز، سطح فعال وسیع تری نسبت به ذرات درشت تر دارند و برای ایجاد پاسخ های بیولوژیکی یا توکسیکولوژی فعال تر هستند (۹).

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که سیستم آنتی اکسیدانی به عنوان یکی از فرایندهای مهم درون سلولی در کبد جنین موش های صحرایی به شمار می رود که می تواند تحت تاثیر غلظت های مختلف نانو ذره نقره قرار گیرد. بررسی های در زمینه تغییرات بیان ژن سوپر اکسید دیسموتاز حاکی از آن است که مقدار بیان در یک روند وابسته به دوز نسبت به گروه شاهد رو به افزایش است.

سپاسگزاری

⁴Catalase

⁵Glutathione peroxidase

منابع

۱. کرم سیچانی س، نقش ن، رزمی ن. تاثیر عصاره الکلی اسپند بر غلظت مالون دی آلدئید و فعاليت کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در موش های تیمار شده با نانو ذرات نقره. مجله علوم پزشکی دانشگاه مازندران، ۱۳۹۱، ۲۲ (۹۵).
2. Babitha S, Banji D, Banji OJ. Antioxidant and hepatoprotective effects of flower extract of *Millingtonia hortensis* Linn. on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity. J Pharm Bioallied Sci, 2012; 4(4): 307.
3. Cha K, Hong HW, Choi YG, Lee MJ, Park JH, Chae HK., ... Myung H. Comparison of acute responses of mice livers to short-term exposure to nano-sized or micro-sized silver particles. Biotechnol Lett, 2008; 30(11): 1893-1899.
4. Chance B, Greenstein DS, Roughton FJW. The mechanism of catalase action. I. Steady-state analysis. Arch Biochem Biophys, 1952; 37(2): 301-321.
5. Coccini T, Gornati R, Rossi F, Signoretto E, Vanetti I, Bernardini G, Manzo L. Gene Expression Changes in Rat Liver and Testes after Lung Instillation of a Low Dose of Silver Nanoparticles. J Nanomed Nanotechnol, 2014; 5(227): 2.
6. Curtis SJ, Moritz M, Snodgrass PJ. Serum enzymes derived from liver cell fractions. Gastroenterology, 1972; 62(1): 84-92.
7. Elder A, Gelein R, Silva, V, Feikert T, Opanashuk L, Carter J, Oberdörster G. Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. Environ Health Perspect, 2006; 1172-1178.
8. Foldbjerg R, Dang DA, Autrup H. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. Arch Toxicol, 2011; 85(7): 743-750.
9. Guan ZZ, Wang YN, Xiao KQ, Dai DY, Chen YH, Liu JL, Dallner G. Influence of chronic fluorosis on membrane lipids in rat brain. Neurotoxicol Teratol, 1998; 20(5): 537-542.
10. Hadrup N, Loeschner K, Bergström A, Wilcks A, Gao X, Vogel U, Mortensen A. Subacute oral toxicity investigation of nanoparticulate and ionic silver in rats. Arch Toxicol, 2012; 86(4): 543-551.
11. Hogstrand C, Wood CM. The toxicity of silver to marine fish. In Proceedings of The 4th International Conference on Transport, Fate and Effects of Silver in the Environment, August; (109-112). 1996.
12. Hori K, Martin TG, Rainey P, Robertson WO. Believe it or not--silver still poisons!. Vet Hum Toxicol, 2002; 44(5): 291-292.
13. Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager JJ. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. Toxicol In Vitro, 2005; 19(7): 975-983.
14. Johnston HJ, Hutchison G, Christensen FM, Peters S, Hankin S, Stone V. A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. Crit Rev Toxicol, 2010; 40(4): 328-346.
15. Kim S, Choi JE, Choi J, Chung KH, Park K, Yi J, Ryu DY. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. Toxicol In Vitro, 2009; 23(6): 1076-1084.
16. Kim YS, Song MY, Park JD, Song KS, Ryu HR, Chung YH, Yu IJ. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. Part Fibre Toxicol, 2010; 7(1), 20.
17. Kim YS, Kim JS, Cho HS, Rha DS, Kim JM, Park JD, Yu IJ. Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. Inhal Toxicol, 2008; 20(6): 575-583.
18. Lagaron JM, Cabedo L, Cava D, Feijoo JL, Gavara R, Gimenez E. Improving packaged food quality and safety. Part 2: Nanocomposites. Food Addit Contam, 2005; 22(10): 994-998.
19. Lee JM, Lee MA, Do HN, Song YI, Bae RJN, Lee HY, Kang JK. Historical control data from 13-week

repeated toxicity studies in Crj: CD (SD) rats. *Lab Anim Sci*, 2012; 28(2): 115-121.

20. Liu J, Sonshine DA, Shervani S, Hurt RH.). Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces. *ACS nano*, 2010; 4(11): 6903-6913.
21. Oravec K, Kalka D, Jeney F, Cantz M, Nagy IZ. Hydroxyl free radicals induce cell differentiation in SK-N-MC neuroblastoma cells. *Tissue Cell*, 2002; 34(1): 33-38.
22. Park EJ, Bae E, Yi J, Kim Y, Choi K, Lee SH, Park K. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2010; 30(2): 162-168.
23. Petterino C, Argentino-Storino A. Clinical chemistry and haematology historical data in control Sprague-Dawley rats from pre-clinical toxicity studies. *Exp Toxicol Pathol*, 2006; 57(3): 213-219.
24. Piao MJ, Kang KA, Lee IK, Kim HS, Kim S, Choi JY, Hyun JW. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicol lett*, 2011; 201(1): 92-100.
25. Satoh K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta*, 1978; 90(1): 37-43.
26. Tang J, Xi T. [Status of biological evaluation on silver nanoparticles]. *Sheng wu yi xue gong cheng xue za zhi*= J. biomedical engineering= Shengwu yixue gongchengxue zazhi, 2008; 25(4): 958-961.
27. Trouiller B, Reliene R, Westbrook A, Solaimani P, Schiestl RH. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. *Cancer res*, 2009; 69(22): 8784-8789.
28. Schrand AM, Dai L, Schlager JJ, Hussain SM. Toxicity testing of nanomaterials. In *New Technologies for Toxicity Testing*, 2012; 58-75. Springer US.
29. Wolford ST, Schroer RA, Gohs FX, Gallo PP, Brodeck M, Falk HB, Ruhren R. Reference range data base for serum chemistry and hematology values in laboratory animals. *J Toxicol Environ Health, Part A Current Issues*, 1986; 18(2): 161-188.
30. Yu WJ, Son JM, Lee J, Kim SH, Lee I.C, Baek HS, Kim JC. Effects of silver nanoparticles on pregnant dams and embryo-fetal development in rats. *Nanotoxicology*, 2014; 8(1): 85-91.