

## بررسی بیان ژن‌های Bax و Bcl2 متعاقب اثرات نانوذره اکسید روی بر بهبود ایسکمی گذرا بواسطه تاثیر بر القا آپوپتوز در موش ویستار

عنایت اله صیدی<sup>۱</sup>، مهرداد هاشمی<sup>۲</sup>، مهدیه بوربور<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی البرز

<sup>۲</sup> هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران

<sup>۳</sup> کارشناسی ارشد رشته سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران

### چکیده

ایسکمی مغزی سومین عامل مرگ و میر در کشورهای غربی است بعد از سکتة مغزی، بسیاری از نوروها در مرز ایسکمی متحمل آپوپتوز می شوند. ایسکمی مغزی بعنوان یک معضل بزرگ جهانی شناخته شده است. سکتة مغزی مهمترین دلیل ایسکمی مغزی است که بعد از انفارکتوس میوکارد و سرطان سومین عامل مرگ و میر در کشورهای غربی است. همچنین امروزه فناوری نانوذره حال توسعه بوده و اثرات قابل توجهی در صنعت و جامعه و محیط زیست و پزشکی داشته است. اکسید روی از جمله نانو ذراتی است که دارای خواص ضد سرطانی و ضد ویروسی و... را دارد. بررسی تست‌های سلولی و بیان ژن‌های Bcl2 و Bax متعاقب اثر نانوذره اکسید روی بر بهبود ایسکمی بواسطه تاثیر بر القا آپوپتوز در موش ویستار. این مطالعه تجربی در شرایط استاندارد بر روی ۱۲ سر موش نروبیستار با محدوددهی وزنی متوسط ۲۸۰-۳۰۰ گرم انجام شد ابتدا ایسکمی ایجاد شد سپس نانو ذره اکسید روی به مقدار ۷۰۰ میکرولیتر دریک نوبت به صورت صفاقی تزریق شد. در نهایت موشها پس از ۴ روز ذبح و مغز آنها جدا گردید و برای رنگ آمیزی H&E آماده گردید. همچنین تست‌های سلولی و بیان ژن‌های BAX و BCL2 بررسی گردید. در آزمون MTT فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز و همچنین در گلوکوتاتیون احیا در گروه ایسکمی با نانوذره نسبت به گروه ایسکمی کاهش یافت، در اندازه گیری میزان ROS و تغییرات پتانسیل غشای سلولی در گروه ایسکمی با نانو نسبت به گروه ایسکمی افزایش یافت؛ و همچنین در آزمون آسیب وارده به غشای لیزوزوم و گلوکوتاتیون اکسید در گروه ایسکمی با نانوذره نسبت به گروه ایسکمی افزایش داشت. نتایج حاصل از آزمایش Real-Time PCR افزایش نسبت بیان ژن Bax به Bcl2 را در سلول‌های بافت دارای نانوذره اکسید روی نسبت به سلول‌های ایسکمی نشان داد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که هنگامی که نانوذره اکسید روی به موش تزریق می‌شود این نانوذرات در سلول‌های ایسکمی موش ژن‌های آپوپتوزی را فعال کرده و همانطور که از نتایج Real-Time PCR مشخص است از طریق نسبت بیان Bax به Bcl2 مرگ برنامه ریزی شده سلول را افزایش می‌دهد.

**واژه‌های کلیدی:** ایسکمی بافت مغز، نانوذرات اکسید روی، القای آپوپتوز، بیان ژن‌های Bax و Bcl2

## مقدمه

فناوری نانو بهره برداری از ویژگی‌هایی فیزیکی و شیمیایی و زیستی مواد در اندازه کمتر از صد نانو متر در علوم و صنایع مختلف می‌باشد. یافته‌های اخیر نشان داده است اگر یک ماده به ماده خاص در حد چند نانومتر کوچک شود ذرات این ماده ویژگی‌های متفاوتی با ذرات اولیه خواهند داشت که از جمله می‌توان به فضای سطحی بزرگ انحلال پذیری و سطح تحرک بالاتر اشاره کرد. نانو ذرات به واسطه ابعاد بسیار کوچک از طرق مختلف مانند عصب بویایی، استنشاق، گردش خون و تزریق به اندامهای مختلف وارد می‌شوند و در صورتی که سمی باشند اثرات بسیار مخربی را بر ارگان‌های زیستی می‌گذارند. [۱]

آپتوز یا مرگ برنامه ریزی شده یک فرایند طبیعی و فعال مرگ سلولی در هنگام تکامل بوده که بعد از مواجه شدن سلول‌ها با عوامل سیتوتوکسیک رخ می‌دهد. مشخصات اصلی آپتوز شامل چروکیدگی سلول، آسیب به غشا، متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن سلول DNA می‌باشد. تنظیم آپتوز بسیار پیچیده بوده و پروتئین‌های مختلف در آن دخیل هستند. خانواده پروتئینی Bcl2 که شامل پروتئین‌های مهار کننده و پیش برنده آپتوز هستند از تنظیم کننده‌های اساسی این فرایند به شمار می‌روند. [۸] ایسکمی مغزی بعنوان یک معضل بزرگ جهانی شناخته شده است. سکنه مغزی مهمترین دلیل ایسکمی مغزی است که بعد از انفارکتوس میوکارد و سرطان سومین عامل مرگ و میر در کشورهای غربی است. از مهمترین دلایل دیگر ایسکمی، می‌توان به ایست قلبی، ترومبوآمبولیت و کاهش شدید فشار خون در جریان اعمال جراحی قلبی - ریوی اشاره نمود. ایسکمی مغزی می‌تواند منجر به اختلالات حرکتی، حسی، بینایی، اختلال تکلم و ... گردد. [۲]

استرس اکسیداتیو و نیترات رخ می‌دهد زمانی که تولید رادیکال‌های آزاد مانند گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن / نیتروژن (ROS / RNS) بیش از ظرفیت دفع زود هنگام سیستم‌های دفاع آنتی اکسیدان است. [۲۵] شواهد تجربی حاکی از آن است که در تمامی انواع آسیب‌های سکنه مغزی، تشکیل رادیکال آزاد افزایش یافته است [۲۶،۲۷] و هر دو مولکول ROS و RNS به وضوح نشان داده شده‌اند که واسطه‌های مهم آسیب بافت در سکنه مغزی ایسکمیک حاد اند. [۲۸،۲۹] در طی ایسکمی، چندین مکانیسم منجر به تشکیل رادیکال‌های آزاد، از جمله سمیت ناشی از بیش از حد فراوانی  $Ca^{2+}$  اختلال عملکرد میتوکندری و فعال سازی سنتاز اکسید نیتریک می‌شود [۳۰-۳۳] گونه‌های فعال اکسیژن بیش از حد باعث تخریب ماکرومولکول‌های سلولی می‌شود و فرآیندهای سیگنالینگ منجر می‌شود که باعث مرگ سلولی آپوپتوتیک می‌شود. [۳۴]

## تاثیرات نانو ذرات بر سلول‌ها در محیط In Vivo

نانو ذرات به علت اندازه منحصر به فردشان با خصوصیات فیزیکی و شیمیایی ویژه بسیاری تولید می‌شوند و می‌توانند خطرات پیش بینی نشده‌ای را برای سلامتی انسان داشته باشند. [۳۰] عوامل کلیدی در ارزیابی خطر بعد از مواجهه با نانو ذرات شامل: اندازه، ذره، ویژگی سطح، انحلال پذیری و روش‌های مواجهه می‌گردد. [۳۵]

## پروتئین‌های Bcl2 و Bax

پروتئین Bcl2 به عنوان سرکوب گر آپتوز عمل می‌کند در حالی که Bax پیش برنده فرایند آپتوز است. پروتئین Bcl2 از طریق اتصال به کانال‌های موجود بر روی غشا خارجی میتوکندری موجب حفظ یکپارچگی این غشا می‌شود. ژن Bcl2 یک پروتئین ۲۶ کیلو دالتونی را رمزگذاری می‌کند که می‌تواند مسیر آپتوز را تنظیم کند. Bcl2 با افزایش عمر سلول‌های اپی تلایالی که دارای پتانسیل تمایز هستند موجب پرولیفراسیون، تمایز و در نهایت مورفونژنیز می‌شود. فعالیت این ژن در

جوانه‌های دندانی آمولوبلاستوما و کیست‌های دانتی ژور و همچنین در برخی تومورها به اثبات رسیده است. ژن Bcl2 اثر ضد آپوپتوزی دارد و بنابراین تظاهر بیش از حد آن ممکن است با ممانعت از آپوپتوز و افزایش بقای سلولی به ایجاد تومور منجر شود. [۲۵]

### مطالعات گذشته

در مطالعات حوزه سم شناسی نانو ذرات اندازه، شکل، ویژگی‌های سطح، شرایط مغناطیسی، بار و توزیع آن از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است. گسترش فناوری نانو در سطح جهانی و استفاده روز افزون از تولیدات حاصل از این فناوری اهمیت آن را در عرصه‌های مختلف درمان نشان می‌دهد. نانو ذرات ممکن است از مسیرهای متفاوت وارد بدن شوند و این موضوع تعیین خطرات مربوط به هر ماده را با دشواری روبرو می‌کند. اغلب تحقیقات برای ارزیابی تأثیرات سمی نانو ذرات در سیستم تنفسی گزارش شده است. در حوزه نانوذرات اندازه هر ذره بسیار با اهمیت است که نقش کلیدی در تعیین ویژگی‌های نهایی نانو ذره دارد. اندازه ذره می‌تواند ویژگی‌های فیزیکی - شیمیایی آن را تغییر دهد و احتمال جذب و تعامل با بافتهای بیولوژیکی را افزایش دهد. امروزه نتیجه بررسی‌ها نشان می‌دهد که فعالیت بیولوژیکی نانو ذرات با کاهش اندازه آن‌ها افزایش می‌یابد. [۱۲]

طبق گفته متخصصان نانوذرات از طریق دهان و بینی وارد بدن انسان و سایر موجودات و سیستم گوارشی آنها می‌شود و به بافتهای بدن نفوذ می‌کند. پیش بینی می‌شود نانو مواد می‌تواند با اجزای زیستی برهم کنش داشته باشد و اثرات زیادی بر رفتار و خصوصیات سلول و بدن موجود زنده بگذارد. قابل توجه ترین روش قرارگرفتن در معرض نانوذرات، روش تنفسی است. در حالی که مصرف خوراکی و پوست عمدتاً از دیگر مسیرهای ورود به بدن می‌باشد. پوست بزرگترین سیستم دفاعی در بدن ما بوده و بطور مستقیم در تماس با بسیاری از عوامل سمی است. استنشاق به عنوان یک راه ورود بزرگ برای ذرات ریز محسوب می‌شود. تنفس عمیق نانوذرات ممکن است سبب فرار این ذرات از فاگوسیت‌ها و غشاهای سلولی ریه شده و به دیگر بخش‌های بدن انتشار یافته و باعث اثرات سیستماتیک گردد [۱۰]

در مطالعه‌ای که بوسیله اسلامی و شریفی ۱۳۹۱ صورت گرفت عملکرد Bax و Bcl2 در روند آپوپتوز ناشی از مورفین در سلولهای PC12 مطالعه گردید. این مطالعه نشان داد که پروتئین Bax نقش مهمی در آپوپتوز ناشی از مورفین در سلولهای PC12 احتمالاً از طریق مسیر میتوکندریایی ایفا می‌کند؛ اما در بیان پروتئین Bcl2 در این تحقیق تفاوت معناداری مشاهده نشد. [۱۱]

گروس بیان میکند که با تاثیر محرکهای مختلف (شیمیائی و ویروسها و ...) بر سلولها و با آزاد شدن ترکیبات پروتئینی Bax در داخل سلول این مواد بر روی میتوکندری‌ها اثر گذاشته و فاکتور ایجاد کننده مرگ سلولی (AIF) از میتوکندری‌ها شده و این مواد با فعال کردن آنزیم کاسپاز از سیستمین پروتئاز لیزوزوم باعث مرگ برنامه ریزی شده سلول می‌شوند. ترکیبات Bax علاوه بر تاثیر بر میتوکندریها با تاثیر بر لیزوزومها مستقیماً باعث تغییرات در غشاء و ماده زمینه لیزوزومها شده و باعث آزاد شدن آنزیمهای لیزوزومی شده و این آنزیم باعث بوجود آمدن یکسری از تغییرات ساختمانی در سلول و شروع پدیده مرگ سلولی می‌شود. در تحقیق انجام شده توسط گروس تغییرات ایجاد شده در جدار لیزوزومها و ماده زمینه Bax مشابه تاثیر + Ca بر روی لیزوزوم می‌باشد. [۱۲]

در مطالعه‌ای که توسط Fang و همکاران در سال ۲۰۱۲ در چین انجام شد، نتایج مطالعه نشان داد بین تجویز وراپامیل و کاهش میزان آسیب به سد خونی- مغزی متعاقب ایسکمی مغزی در مدل حیوانی و همچنین محیط کشت، ارتباط معناداری ( $P=0.05$ ) وجود دارد. [۱۳]

در مطالعه El-Zammar و همکاران که در سال ۲۰۱۲ در آمریکا بر روی ۴۰ بیمار مبتلا به سکته مغزی انجام گرفت، نتایج نشان داد که درمان داخل شریانی (intra-arterial therapy) با وراپامیل در مقایسه با گروه کنترل اختلاف آماری معناداری ( $P=0.07$ ) ندارد. [۱۴]

Liu و همکاران در سال ۲۰۱۰ در ارتباط با اثر حفاظتی داروی وراپامیل در سیستم عصبی و اثرات ضد التهابی آن ثابت نمودند که این دارو با کم کردن اثرات التهابی، از ضایعات مغزی جلوگیری می‌کند. آنها همچنین اعلام میکنند که کاهش TNF- $\alpha$  و نیتریک اکساید بوسیله درمان با این دارو، ایجاد یک مکانیزم حفاظتی می‌کند.

Ginsberg و همکاران در سال ۲۰۰۸ اعلام کردند که درمان با کلسیم بلوکرها باعث بهبود عملکرد الکتریکی مغز متعاقب ایسکمی فراگیر گذرا گشته و خاطر نشان می‌کند که این اثر دارو در ارتباط با ممانعت از ورود کلسیم به داخل سلول عصبی می‌باشد [۱۵]

Li و همکاران در سال ۲۰۰۷ ادعا کردند که کاهش جریان کلسیم باعث کاهش معنادار ( $P=0.05$ ) مرگ سلولی در هیپو کامپ رت‌هایی که تحت ایسکمی گذرا قرار گرفتند می‌شود. [۱۶]

Pagnussat و همکارانش در سال ۲۰۰۷ با یکسری بررسی عنوان میکنند که ایسکمی- رپرفیوژن باعث افزایش ترشح واسطه های شیمیایی تحریکی گشته و نهایتاً مرگ تأخیری نورون‌ها را در بر دارد. این امر که در نتیجه عملکرد میتوکندری میباشد، باعث آپوپتوز و نکروز سلولی می‌شود. آنها همچنین با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نشان دادند که مرگ سلول های هرمی ناحیه CA1 هیپوکامپ، ۱۰ دقیقه بعد از ایسکمی فراگیر گذرا و رپرفیوژن متعاقب آن اتفاق می‌افتد. [۱۷]

Zhou و همکاران در سال ۲۰۰۴ با استفاده از وراپامیل از مرگ سلولی ناشی از متامفتامین جلوگیری کردند و ادعا کردند که به دلیل بلوک ورود کلسیم می‌باشد. [۱۸]

در مطالعه Liu و همکاران در سال ۲۰۰۲ که بر روی اثرات محافظتی نیمودپین بر روی ایسکمی فوکال مغزی در مدل حیوانی انجام گرفت، نتایج مطالعه نشان داد تجویز نیمودپین به طور معناداری ( $P=0.01$ ) موجب کاهش ایسکمی مغزی در لوب‌های فرونتال می‌شود. [۱۹]

Kobayashi و همکاران در سال ۱۹۹۸ پس از ایجاد یک ایسکمی مغزی توسط بستن شریان های کاروتید مشترک و مغزی میانی، اثر حفاظتی کلسیم بلوکرها را نشان دادند و ادعا نمودند که این داروها میتواند نقش مهمی در بیماری که دچار ایسکمی مغزی شده‌اند داشته باشد. [۲۰]

در مطالعه‌ای که توسط Hosaka و همکاران در سال ۱۹۹۱ در کانادا بر روی موش‌های آزمایشگاهی انجام شد، نتایج نشان داد میزان ایسکمی مغزی در گروهی که تحت درمان با وراپامیل بوده اند در مقایسه با گروه کنترل کاهش معناداری ( $P=0.05$ ) داشته‌اند [۲۱]

**اهداف اصلی:** بررسی بیان ژنهای BaX و BCL2 متعاقب اثر نانو ذره اکسید روی بر بهبود ایسکمی بواسطه القا آپوپتوز  
**اهداف کاربری:** بررسی میزان اثرات نانو ذره اکسید روی بر روی بافت‌های آسیب دیده که کلیه مراکز خدمات درمان و نیز مراکز بهداشت و مراکز تصویر برداری می‌توانند از موارد مذکور استفاده نمایند.

## روش‌ها و تکنیک‌های مورد استفاده

### روش جراحی

جراحی تحت شرایط استریل انجام شد. گروه شاهد: موش هاتوسط پنتوباریتال سدیم (۴۰ mg/kg) بی‌هوش شدند. گروه ایسکمی: بعد از بی‌هوش کردن موش هاتوسط پنتوباریتال سدیم (۴۰ mg/kg) شریان‌های کاروتید مشترک دو طرف به مدت ۲۰ دقیقه بسته شد. سپس رپرفیوژن انجام شد. این گروه ۴ روز بعد از ایسکمی/رپرفیوژن، ذبح و مغز آن‌ها به منظور رنگ آمیزی (H&E) آماده سازی می‌گردد. رنگ آمیزی H & E به منظور بررسی کلی بافت عصبی انجام می‌گردد. گروه آزمایشی: تزریق نانو به صورت داخل صفاقی یک ساعت بعد از ایسکمی انجام گرفت. ایسکمی به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. سپس رپرفیوژن انجام گرفت و موش هابعد از ۴ روز ذبح و مغز آن‌ها به منظور رنگ آمیزی H&E آماده سازی شد. گروه موش‌های سالم با نانو: تزریق نانو به صورت داخل صفاقی انجام گرفت. موش هابعد از ۴ روز ذبح و مغز آن‌ها به منظور رنگ آمیزی H&E آماده سازی شد.

### پاتولوژی

انجام پاتولوژی شامل شش مرحله جداگانه است.

- (۱) فیکساسیون که باید به گونه‌ای باشد که درباخت و رنگ آمیزی خللی ایجاد نکند. معمول ترین فیکساتور مورد استفاده فرمالین ۱۰٪ می‌باشد.
- (۲) نمونه برداری یا پاس دادن
- (۳) آگیری و آغشتگی که توسط دستگاه تیشوپروسور که حاوی محلول‌های مختلف (فرمالین- متانول- گزلیول- پارافین) می‌باشد انجام شد.
- (۴) قالب گیری
- (۵) رش یا میکروتوم
- (۶) رنگ آمیزی روتین توسط هماتوکسیلین - ائوزین انجام شد که در آن هسته بنفش و سیتوپلاسم به رنگ صورتی در می‌آید.

### بررسی بیان ژن

سنتز cDNA: با استفاده از روش‌های استاندارد سنتز cDNA مثل کیت سنتز تاکارا کلیه mRNA ها به cDNA تبدیل شده و سپس جهت تایید مراحل استخراج و تبدیل آن به cDNA ها بیان ژن یکی از انواع Reference gene بررسی می‌شود. یکی از مهم ترین عوامل در تولید cDNA با کیفیت مناسب به دست آوردن RNA تام با خلوص و انسجام مناسب است.

Real-time PCR: این تکنیک در بررسی‌های مولکولی پر کاربرد است؛ که در حقیقت تلفیق دو روش سنجش میزان نور فلئورسنت و PCR است. به این صورت که میزان محصول PCR با استفاده از سنجش نور فلئورسنت اندازه گیری می‌شود تکثیر قطعه هدف زمانی توسط دستگاه قابل تشخیص است که شدت نور تابش شده از محصول بیش تر از نور تابش شده از زمینه باشد. به این مرحله زمانی واکنش سیکل آستانه یا CT می‌گویند که هر چه میزان بیان ژن بیشتر باشد تعداد سیکل‌های

کمتری برای تولید محصول بیشتر نیاز است و در نتیجه CT کمتر خواهد بود. در هر مورد "±S.D. میانگین" محاسبه خواهد شد.

### واکنش کنترل cDNA (RT-PCR)

پس از اینکه cDNA سنتز شد جهت اطمینان از صحت عملکرد کیت سنتز cDNA و تخمینی از کیفیت RNAهای بدست آمده بوسیله پرایمرهای کنترل RT-PCR GAPDH انجام شد.

جهت انجام چندین واکنش به صورت موازی و نیز به منظور کاهش خطای احتمالی ابتدا یک Master Mix کلی که شامل Water و cDNA و Master Mix PCR Amplicon است را به ازای تعداد واکنشها و یک نمونه اضافی کنترل منفی طبق جدول زیر آماده شد.

کنترل منفی از آب پرایمرها و Master Mix PCR Amplicon و cDNA تشکیل شده است که برای اطمینان از عدم آلودگی مسترمیکس تهیه شده بعنوان یک نمونه در کنار نمونه‌های دیگر در داخل PCR گذاشته شد.

#### جدول (۱): مقادیر بکار گرفته شده جهت کنترل ساخته شده cDNA

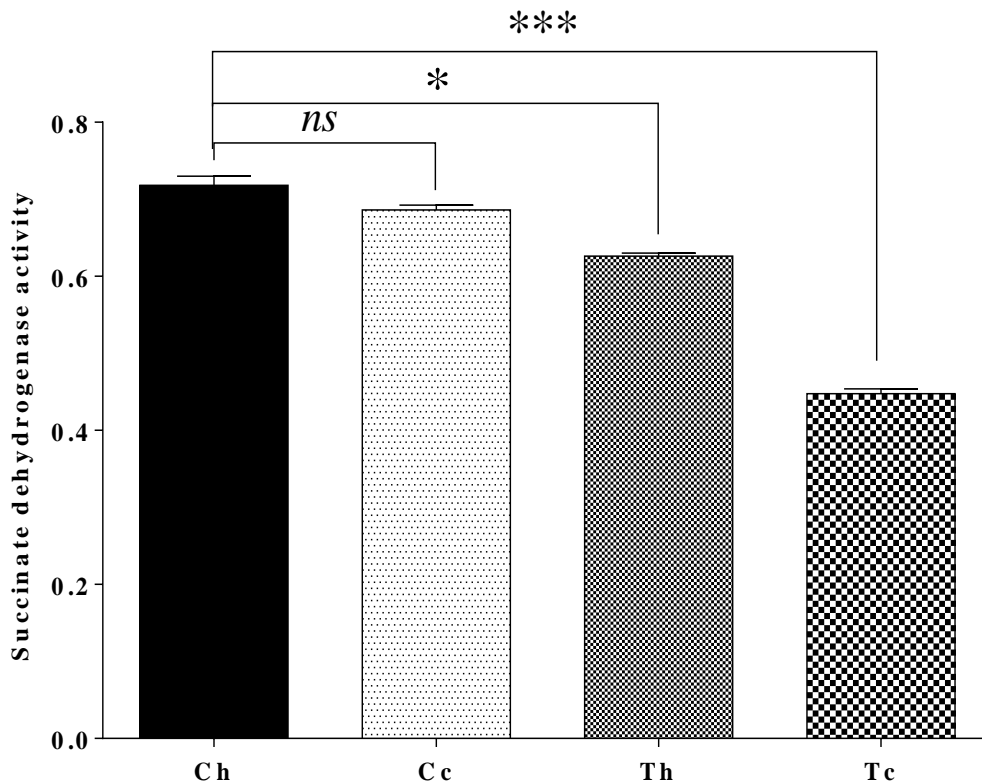
Master Mix PCR Amplicon	10µl
Template cDNA	2µl
Nuclease-free water	8µl

### روشها و ابزار تجزیه و تحلیل داده ها

آنالیز نتایج توسط آزمون ANOVA یک طرفه و Tukey توسط نرم افزار Prism انجام گرفت. نتایج بصورت میانگین سه آزمایش جداگانه  $\text{mean} \pm \text{SD}$  گزارش شد. مطالعات برون تنی براساس فرمول N آمار Sampling و کل نمونه آماری تعیین می‌گردد.

### فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز

پس از یک ساعت تماس سلول‌های جدا شده از بافت مغز با استفاده از رنگ MTT سنجیده شد که در گروه ایسکمی نانوذره دریافت نموده با کاهش معناداری در فعالیت متابولیکی آنزیم سوکسینات دهیدروژناز در تبدیل MTT به ملح فومازونی مشاهده شد ( $P < 0,001$ ). در گروه ایسکمی که نانوذره دریافت نموده است اختلاف معناداری را با گروه کنترل سالم مشاهده کردیم. همچنین اختلاف آماری را در گروه سلول‌های برگرفته از بافت مغز سالم که نانوذره دریافت نموده است مشاهده نمودیم. همچنین در گروه ایسکمی که نانوذره را دریافت کرده نسبت به گروه ایسکمی که نانو ذره دریافت نکرده کاهش معناداری ( $P < 0,001$ ) مشاهده شد. در گروه سالمی که نانو ذره دریافت کرده نسبت به گروه سالمی که نانوذره دریافت نکرده کاهش مشاهده کردیم.



نمودار (۱): مقایسه فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز در نمونه‌های تجربی و شاهد.

Tc: گروه ایسکمی بانانوTh: گروه سالم با نانو Cc: گروه ایسکمی Ch: گروه سالم

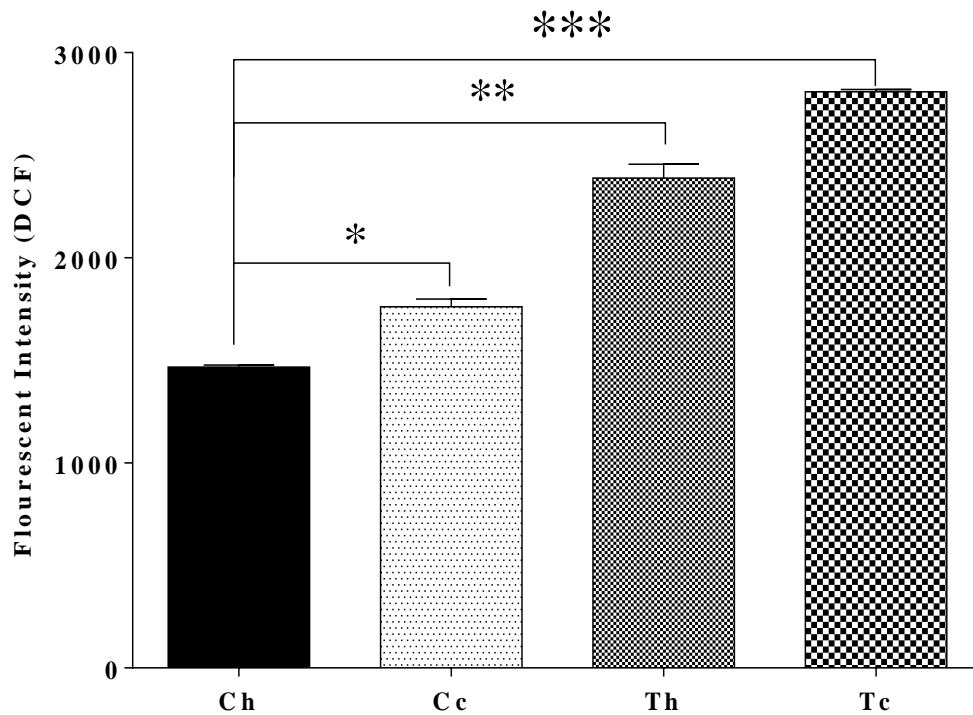
نتایج به صورت  $\text{mean} \pm \text{SD}$  حاصل از سه بار تکرار آزمایش گزارش شده است.

\*\* نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل است ( $P < 0.01$ )

\*\*\* نشان دهنده اختلاف معنادار با گروه کنترل است ( $P < 0.001$ )

### اندازه گیری ROS

همان گونه که نشان داده شده است، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) به طور مشخصی در سلول‌های استخراج شده از بافت مغز ایسکمی شده در موش‌های تحت آزمایش که نانوذره دریافت نموده است نسبت به گروه کنترل سالمی که نانوذره دریافت ننموده است افزایش پیدا کرده است ( $P < 0.001$ ). تولید در گروه ایسکمی نیز نسبت به گروه سالمی که نانوذره دریافت نکرده است نیز معنادار می‌باشد در گروه سالم نانوذره دریافت کرده اختلاف معناداری نسبت به کنترل سالم وجود داشت. ( $P < 0.01$ ). همچنین گروه ایسکمی که نانوذره دریافت نموده نسبت به گروه ایسکمی که نانو ذره دریافت نکرده است افزایش پیدا کرده است و گروه سالم که نانو ذره دریافت کرده نسبت به گروه سالمی که نانو ذره دریافت نکرده است افزایش معناداری پیدا کرده است.



نمودار (۲): مقایسه تولید گونه‌های فعال اکسیژن در نمونه‌های تجربی و شاهد.

Tc: گروه ایسکمی بانانوTh: گروه سالم با نانو Cc: گروه ایسکمی Ch: گروه سالم

تولید ROS توسط پروب DFCH-DA با کمک دستگاه اسپکترو فلوریمتر اندازه گیری شده که در بخش مواد و روش‌ها توضیح داده شده است. در نمودارها mean±SD (n=3) نمایش داده شده است.

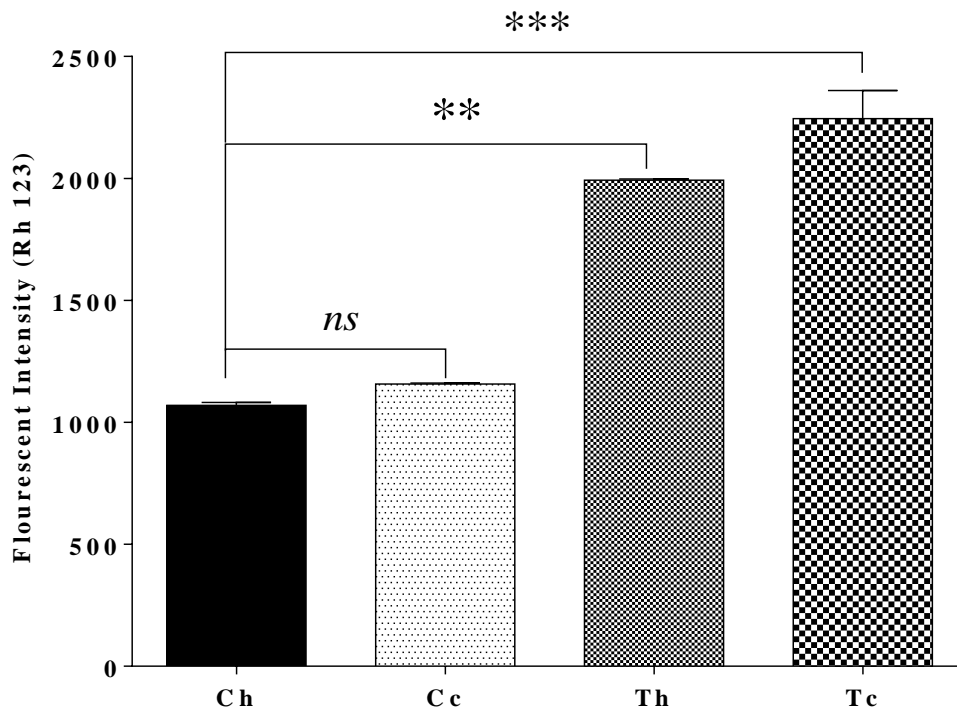
\*\* نشان دهنده‌ی اختلاف معنادار با گروه کنترل است ( $P < 0.01$ )

\*\*\* نشان دهنده‌ی اختلاف معنادار با گروه کنترل است ( $P < 0.001$ )

#### اندازه گیری پتانسیل غشا

همان گونه که نشان داده شده است، تغییر پتانسیل غشا (mmp) به طور مشخصی ( $P < 0.001$ ) در سلول‌های استخراج شده از بافت ایسکمی شده در موش‌های تحت آزمایش که نانوذره دریافت نموده است نسبت به گروه کنترل سالمی که نانوذره دریافت ننموده است افزایش پیدا کرده است. تغییر پتانسیل غشا در گروه ایسکمی نیز نسبت به گروه سالمی که نانوذره دریافت نکرده است نیز معنادار ( $P < 0.001$ ) می‌باشد اما در گروه سالم که نانوذره دریافت کرده اختلاف معناداری نسبت به کنترل سالم وجود نداشت. در گروه ایسکمی که نانوذره را دریافت کرده نسبت به گروه ایسکمی که نانوذره دریافت نکرده است پتانسیل غشا افزایش پیدا کرده است. همچنین گروه سالمی که نانوذره دریافت کرده نسبت به گروه سالمی که نانوذره دریافت نکرده اختلاف معناداری وجود داشت. نتایج به صورت mean±SD حاصل از سه بار تکرار آزمایش گزارش شده است.





نمودار (۳): مقایسه تغییرات پتانسیل غشادر نمونه‌های تجربی و شاهد.

Tc: گروه ایسکمی بانانوTh: گروه سالم با نانو Cc: گروه ایسکمی Ch: گروه سالم

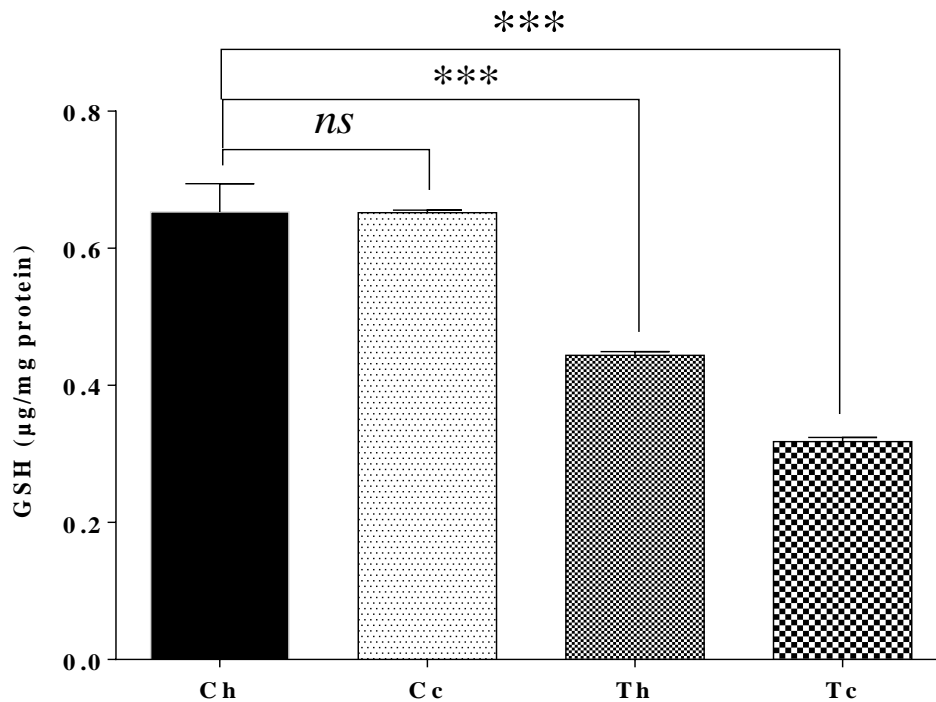
ns: نشان دهنده‌ی عدم اختلاف معنادار با گروه کنترل است. \*\*: نشان دهنده‌ی اختلاف معنادار با گروه کنترل است ( $P < 0.01$ )

\*\*\*: نشان دهنده‌ی اختلاف معنادار با گروه کنترل است ( $P < 0.001$ )

### گلو تاتیون احیا

سطوح GSH در سلول‌های ایزوله شده با دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد؛ که در این سنجش DTNB به عنوان نشانگر GSH به سلول‌های دریافت شده از هر چهار گروه افزوده گردید. همانگونه که نشان داده شده است. سطوح GSH بعد از انکوباسیون سلول‌هایی که از بافت ایسکمی نانوذره دریافت کرده به طور معنادار نسبت به گروه کنترل سالم کاهش یافته بود ( $p < 0.001$ ) در گروه سالم نانوذره دریافت نموده اختلاف معناداری وجود نداشت؛ اما گروه ایسکمی دارای اختلاف معناداری نسبت به گروه کنترل سالم بوده است. در گروه ایسکمی که نانوذره دریافت کرده نسبت به گروه ایسکمی که نانوذره دریافت نکرده است سطح GSH کاهش معناداری پیدا کرده است و در گروه سالم با نانوذره نسبت به گروه سالم که نانوذره دریافت نکرده است کاهش معناداری وجود دارد.

گلو تاتیون احیا توسط پروب DTNB با کمک دستگاه الیزا ریدر اندازه گیری شده که در بخش مواد و روش‌ها توضیح داده شده است. در نمودارها  $mean \pm SD$  ( $n=3$ ) نمایش داده شده است.



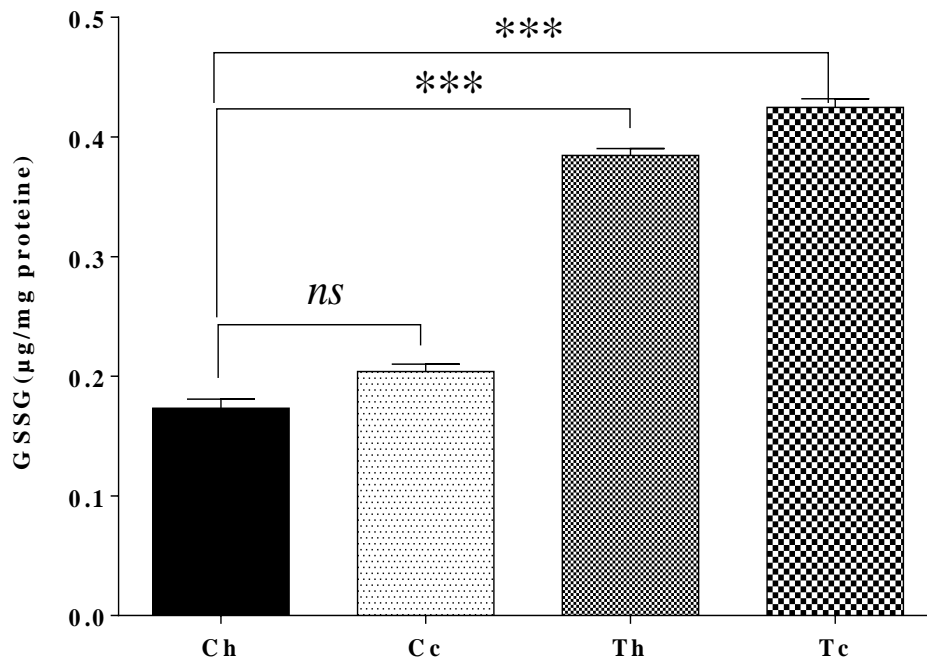
نمودار (۴): مقایسه سطوح گلو تاتیون احیادار نمونه‌های تجربی و شاهد.

Tc: گروه ایسکمی بانانوTh : گروه سالم با نانو Cc: گروه ایسکمی Ch: گروه سالم

ns: نشان دهنده‌ی عدم اختلاف معنادار با گروه کنترل است.\*\*\*: نشان دهنده‌ی اختلاف معنادار با گروه کنترل است (  $P < 0.001$  )

#### گلو تاتیون اکسید

سطوح GSSG در سلول‌های ایزوله شده با دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد؛ که در این سنجش NEM به عنوان نشانگر GSSG به سلول‌های دریافت شده از هر چهار گروه افزوده گردید. همانگونه که نشان داده شده است. سطوح GSSG بعد از انکوباسیون سلول‌هایی که از بافت ایسکمی نانو ذره دریافت کرده به طور معنادار نسبت به گروه کنترل سالم افزایش یافته بود (  $p < 0.001$  ) اما در گروه سالم نانوذره دریافت نموده اختلاف معناداری وجود داشت (  $p < 0.01$  ). همچنین در گروه ایسکمی که نانوذره دریافت نموده است نسبت به گروه کنترل سالم اختلاف معناداری وجود داشت (  $p < 0.001$  ). در گروه ایسکمی که نانوذره دریافت کرده نسبت به گروهی که نانو ذره دریافت نکرده است سطح GSSG افزایش معنادار پیدا کرده است (  $p < 0.001$  ). در گروه سالمی که نانوذره دریافت کرده نسبت به گروه سالمی که نانو ذره دریافت نکرده است اختلاف معناداری وجود دارد. گلو تاتیون اکسید توسط پروب NEM با کمک دستگاه الیزاریدر اندازه گیری شده که در بخش مواد و روش‌ها توضیح داده شده است. در نمودارها  $mean \pm SD$  (  $n=3$  ) نمایش داده شده است.



نمودار (۵): مقایسه سطوح گلوکوتاتیون اکسید در نمونه‌های تجربی و شاهد.

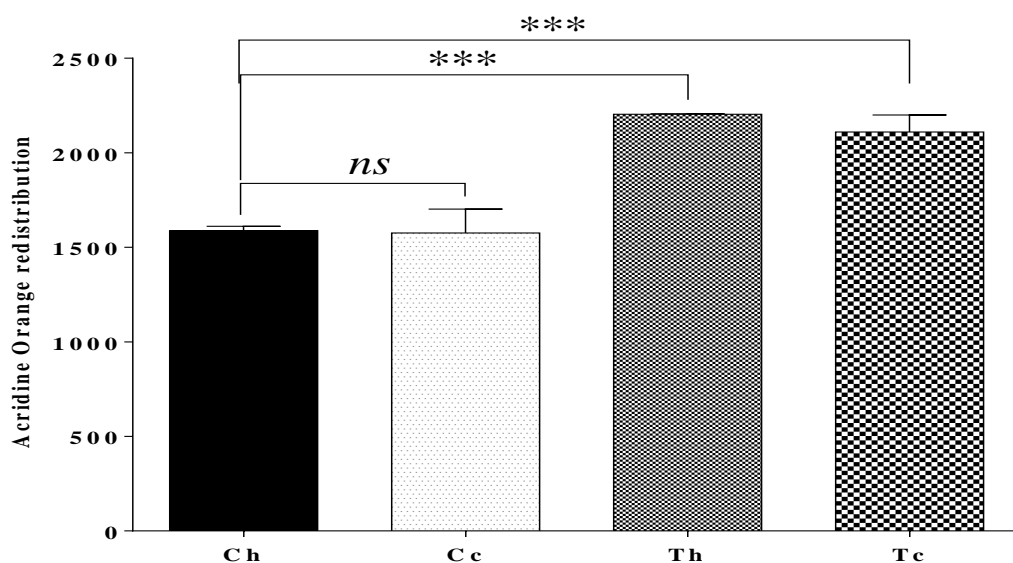
Tc: گروه ایسکمی بانانوTh: گروه سالم با نانو Cc: گروه ایسکمی Ch: گروه سالم

NS: نشان دهنده‌ی عدم اختلاف معنادار با گروه کنترل است. \*\*: نشان دهنده‌ی اختلاف معنادار با گروه کنترل است

( $p < 0.01$ ) \*\*\*: نشان دهنده‌ی اختلاف معنادار با گروه کنترل است ( $p < 0.001$ )

#### آسیب به غشای لیزوزومی

میزان آسیب به غشای لیزوزومی در سلول‌های ایزوله شده با دستگاه فلوریمتری اندازه گیری شد؛ که در این سنجش از آکریدین اورنج به عنوان نشانگر آسیب به غشای لیزوزومی به سلول‌های دریافت شده از هر چهار گروه افزوده گردید. همانگونه که نشان داده شده است. سطوح فلوروسانس تهییج یافته بعد از انکوباسیون سلول‌هایی که از بافت ایسکمی نانوذره دریافت کرده به طور معنادار نسبت به گروه کنترل سالم افزایش یافته بود ( $p < 0.001$ ) اما در گروه سالم نانوذره دریافت نموده عدم اختلاف معناداری وجود داشت. و گروه ایسکمی که نانوذره دریافت نموده بود نسبت به گروه کنترل سالم اختلاف معناداری مشاهده شد. ( $p < 0.001$ ). در گروه ایسکمی که نانوذره دریافت کرده است نسبت به گروه ایسکمی که نانوذره دریافت نکرده است آسیب به غشا لیزوزومی افزایش یافته است. گروه سالم دریافت کننده نانوذره نسبت به گروه سالم که نانوذره دریافت نکرده است افزایش معنا داری پیدا کرده است. آسیب به غشای لیزوزومی توسط پروب آکریدین اورنج با کمک دستگاه فلوریمتری اندازه گیری شده که در بخش مواد و روش‌ها توضیح داده شده است. در نمودارها  $mean \pm SD$  ( $n=3$ ) نمایش داده شده است.



نمودار (۶): مقایسه میزان آسیب به غشای لیزوزومی در نمونه‌های تجربی و شاهد.  
Tc: گروه ایسکمی بانانو؛ Th: گروه سالم با نانو؛ Cc: گروه ایسکمی؛ Ch: گروه سالم

ns: نشان دهنده‌ی عدم اختلاف معنادار با گروه کنترل است.

\*\*\*: نشان دهنده‌ی اختلاف معنادار با گروه کنترل است ( $P < 0.001$ )

### استخراج RNA

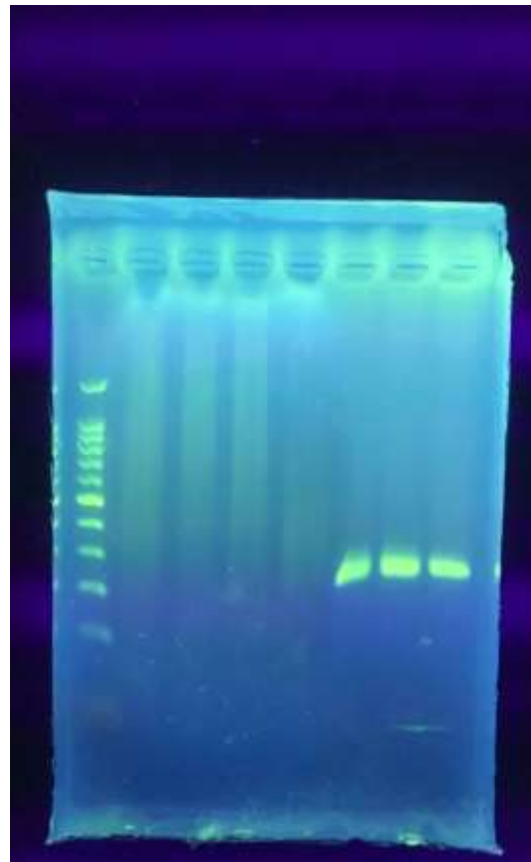
نانوذرات اکسید روی به موش‌ها تزریق شد و پس از زمان ۱۰ روز از بافت آن‌ها RNA استخراج شد؛ که نتایج بدست آمده از استخراج RNA به شکل زیر است و میتوان از این RNAها برای سنتز cDNA استفاده کرد.

جدول (۲): نتایج بدست آمده از آنالیز RNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ.

نسبت ۲۶۰/۲۹۰	نسبت ۲۶۰/۲۸۰	غلظت ng/μl	گروه آزمایشی
۱/۸	۱/۸	۱۲۰۰	گروه شماره ۱
۱/۸	۱/۸	۱۲۰۰	گروه شماره ۲
۱/۷	۱/۸	۲۳۰۰	کنترل

### نتیجه ژل الکتروفورز محصول Pcr برای ژن GAPDH

پس از cDNA سنتز از روی این نمونه برای پرایمر ژن GAPDH انجام شد و نتایج بدست آمده نشان داد که cDNA بخوبی سنتز شده و پرایمر دایمر وجود ندارد که درواکنش Real Time PCR اختلال ایجاد کند.



Ladder

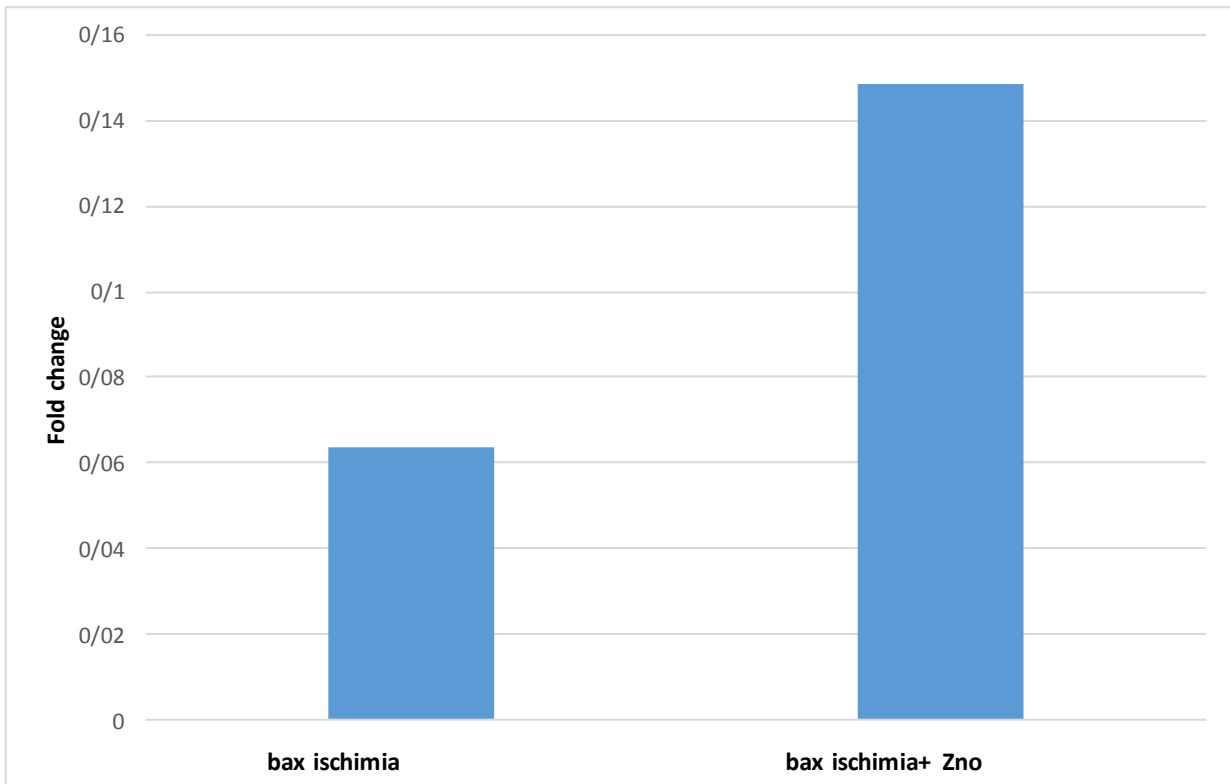
هر ۳ باند مربوط  
به GAPDH  
می باشد

← bp ۲۱۲ →

نمودار (۷): نتایج حاصل از ژل الکترو فورز. اندازه ژن ۲۱۲ تعیین شد bp

### نتایج حاصل از آزمایش Real-Time PCR ژن Bax در نمونه های RNA

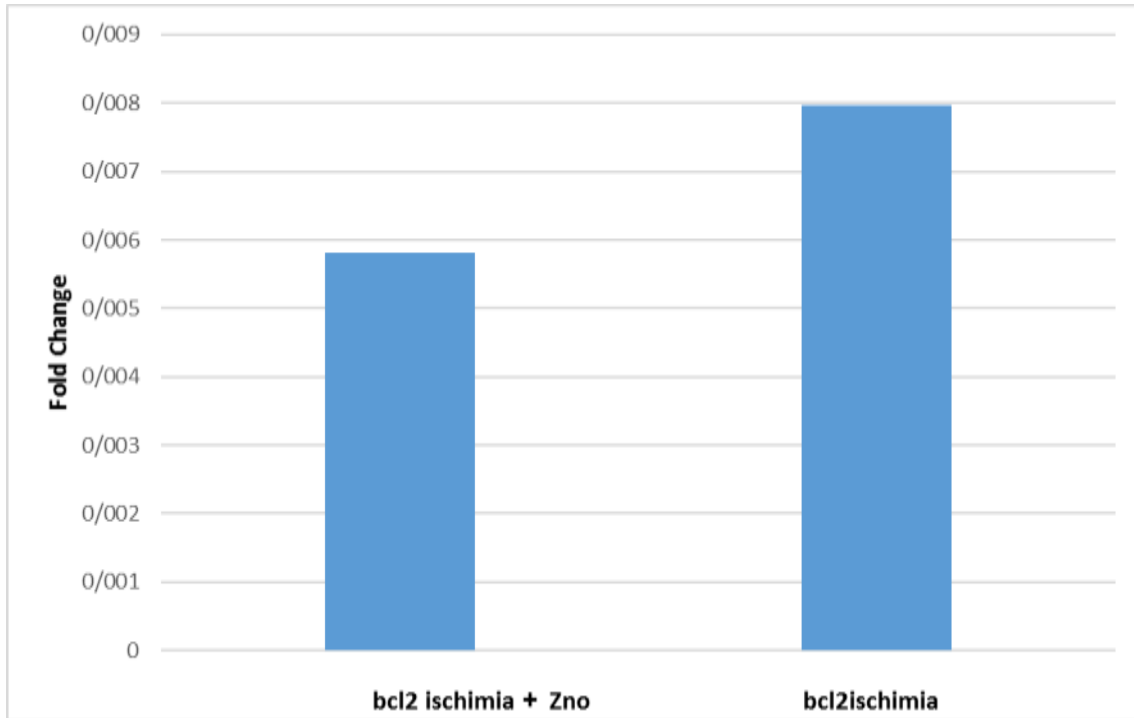
از cDNA سنتز شده برای بررسی میزان بیان ژن های Bax, Bcl2 استفاده شد. نتایج حاصل از آزمایش Real-Time PCR برای ژن Bax نشان می دهد که بیان این ژن در نمونه های ایسکمی دریافت کننده نانوذره نسبت به نمونه های ایسکمی بدون نانوذره کمتر بوده است.



نمودار (۸): بررسی میزان بیان ژن **Bax** همانطور که دیده می‌شود بیان این ژن در نمونه‌های دریافت کننده نانوذره دارای ایسکمی نسبت به نمونه‌های ایسکمی بدون نانوذره افزایش یافته است.

### نتایج حاصل از آزمایش Real-Time PCR ژن Bcl2 در نمونه‌های RNA

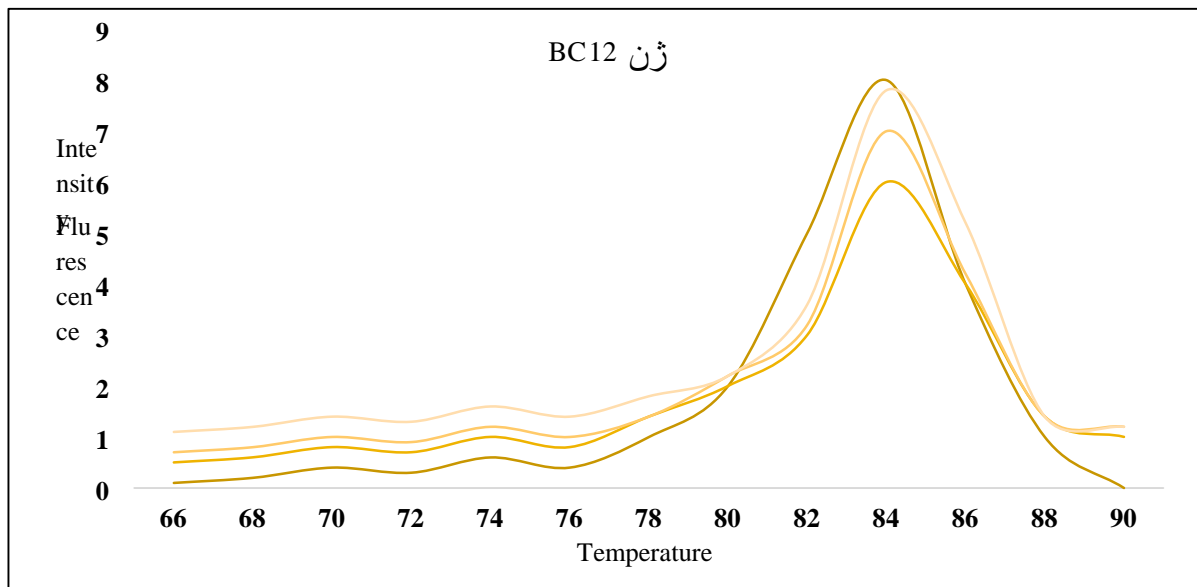
از cDNA سنتز شده برای بررسی میزان بیان ژن‌های Bcl2، Bax استفاده شد. نتایج حاصل از آزمایش Real-Time PCR برای ژن Bcl2 نشان می‌دهد که بیان این ژن در نمونه‌های ایسکمی دریافت کننده نانوذره نسبت به نمونه‌های ایسکمی بدون نانوذره کاهش یافته است.



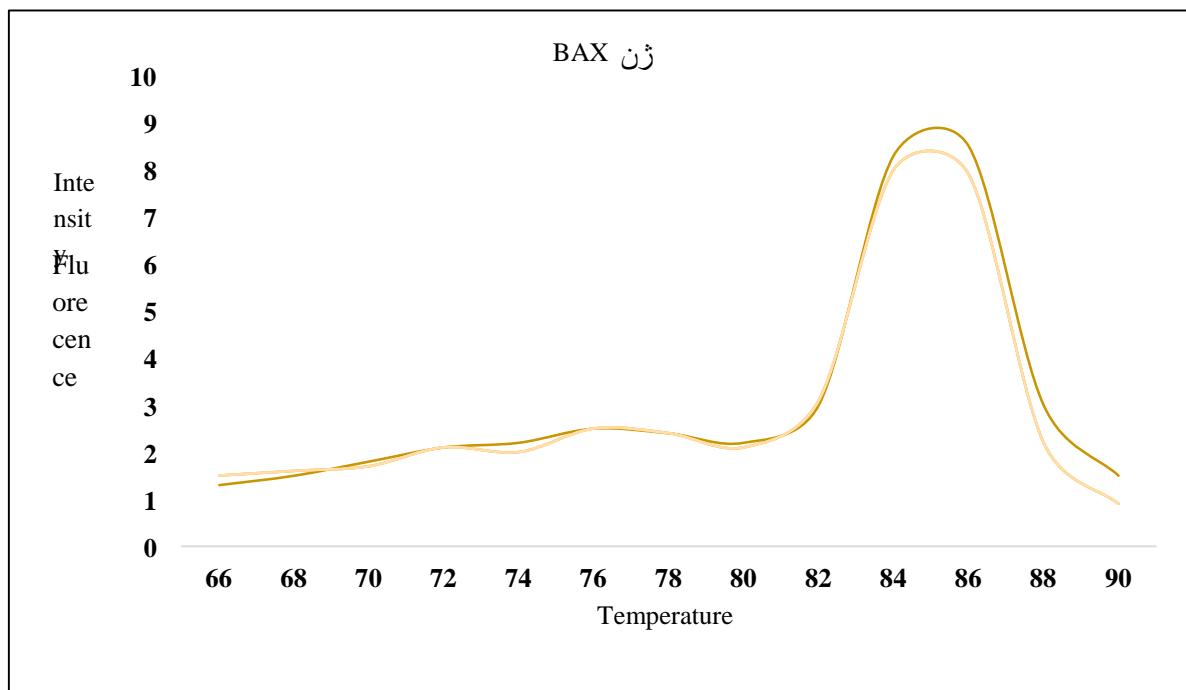
نمودار (۹): بررسی میزان بیان ژن Bcl2 همانطور که مشاهده می‌شود بیان این ژن در نمونه‌های ایسکمی دریافت کننده نانوذره نسبت به نمونه‌های ایسکمی کاهش یافته است

### منحنی‌های ذوب

نمودارهای زیر منحنی‌های ذوب ژن های Bcl2 و Bax است که نشان دهنده اتصال اختصاصی پرایمر می‌باشد. از ژن GAPDH به عنوان مرجع استفاده شد.

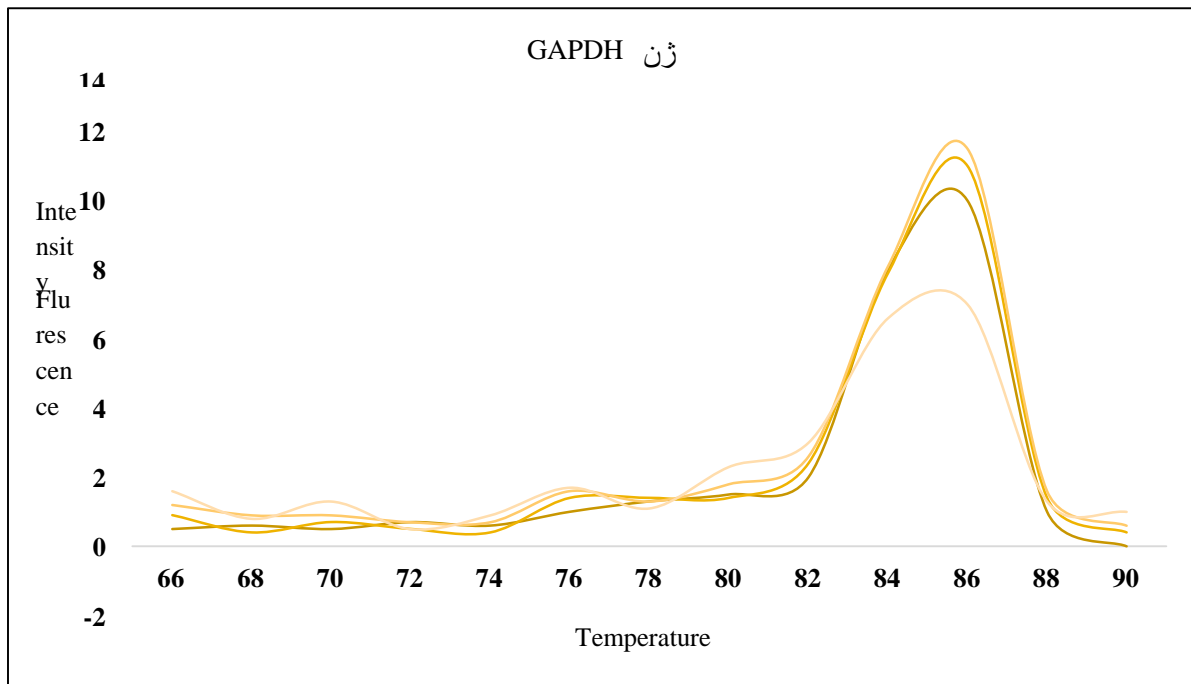


نمودار (۱۰): بررسی منحنی ذوب ژن Bcl2 از آنجایی که نمودار تک قله می‌باشد پرایمرها اختصاصی متصل شده‌اند



نمودار (۱۱): بررسی منحنی ذوب ژن Bax از آنجایی که نمودار تک قله می‌باشد پرایمرها اختصاصی متصل شده‌اند.

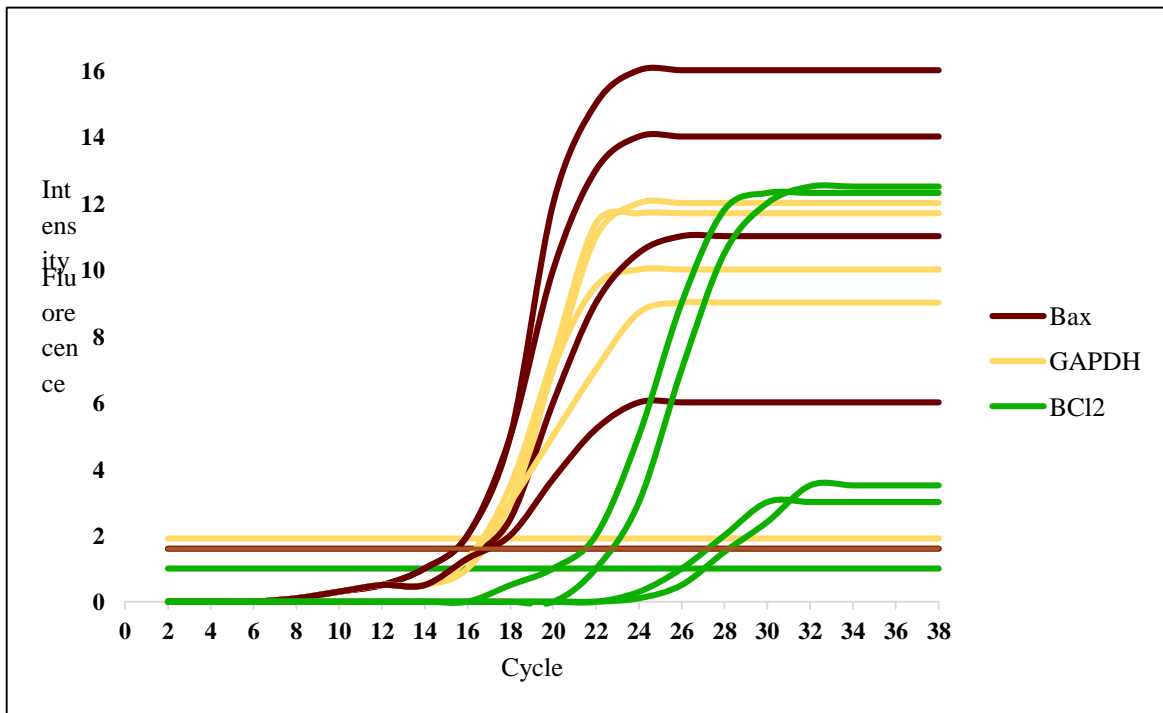




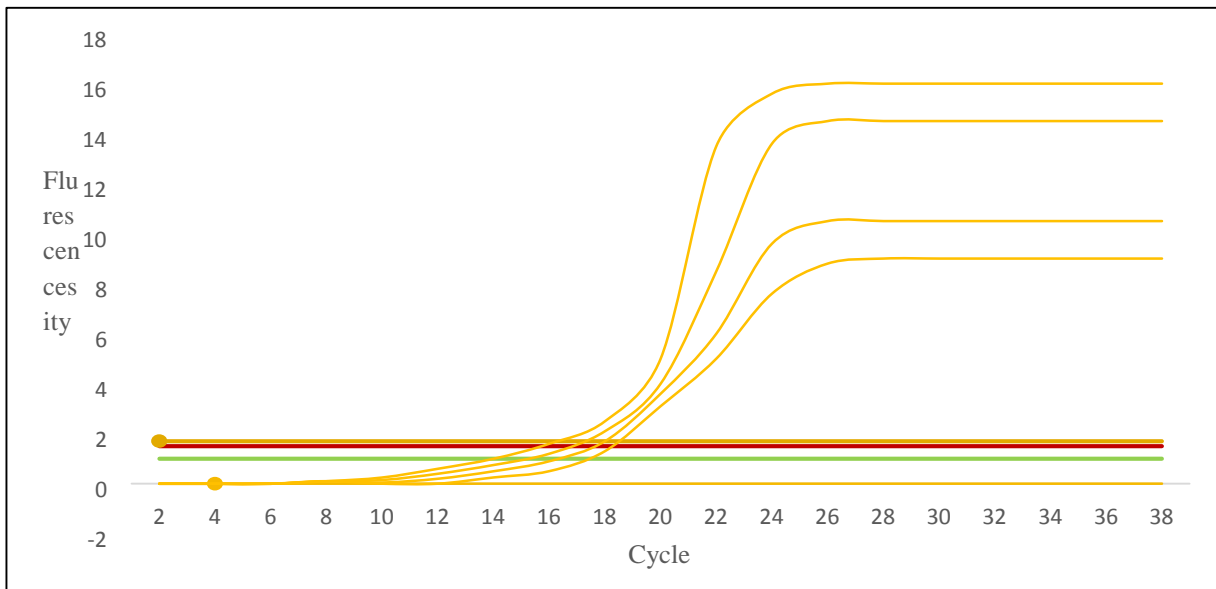
نمودار (۱۲): منحنی ذوب برای GAPDH

## منحنی‌های تکثیر

نمودار زیر منحنی‌های تکثیر ژن‌های Bcl2 و Bax است که نشان می‌دهد در کدام سیکل محصول دوبرابر شده است. شد ژن Bax در نمونه‌های دریافت کننده نانوذره در سیکل پایین تری نسبت به نمونه‌های شاهد و نیز GAPDH به فاز اکسپوننشال رسید و از آنجایی که سیکلی که در آن واکنش وارد فاز اکسپوننشال می‌گردد به میزان DNA الگوی اولیه بستگی دارد بنابراین میزان ژن Bax در نمونه‌های مورد آزمایش افزایش پیدا کرده است. همچنین منحنی‌های تکثیر کاهش بیان ژن Bcl2 را در نمونه‌های ایسکمی دریافت کننده نانوذره نشان داد؛ که این نشان دهنده تاثیر به القای آپوپتوز توسط نانوذرات اکسید روی می‌باشد.



نمودار (۱۳): منحنی تکثیرهای ژن های **Bax** و **BCI2** که نشان می دهد در نمونه های مورد آزمایش بیان ژن **Bax** افزایش و بیان ژن **BCI2** کاهش یافته است.



نمودار (۱۴): منحنی تکثیر ژن **Bax**

## بحث و نتیجه گیری

تحقیقات نشان داده است که نانوذرات خواص بیولوژیکی متعددی از جمله ضد ویروسی و ضد میکروبی داشته باشند. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که هنگامی که نانو ذره اکسید روی به موش تزریق شد این نانو ذرات در سلولهای ایسکمی شده بافت مغز موش ژن‌های آپتوزی را فعال کرده و همانطور که از نتایج Real-Time PCR مشخص است از طریق افزایش نسبت بیان BAX به BC 12 مرگ برنامه ریزی شده سلول را افزایش می‌دهد با افزایش نسبت BAX/BC12 غلظت پروتئینهای BAX افزایش می‌یابد واز سیتوپلاسم به غشای میتوکندری انتقال می‌یابد در نتیجه باعث آزاد سازی سیتو کروم شده و کاسپاز ۹ را فعال کرده و با فعال کردن کاسپاز ۳ باعث آسیب DNA شده و آپتوز را القاء می‌کند.

در این تحقیق در گروه ایسکمی که نانو ذره دریافت کرده بود کاهش چشمگیری در فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز در تبدیل MTT به ملح فورمازونی مشاهده شد که نشان دهنده افزایش مرگ سلولی در گروه مورد نظر بود. گلوکاتایون احیا که به دلیل خاصیت آنتی اکسیدانی قوی که دارند باعث حفاظت از اجزای سلولی در برابر گروه‌های عامل اکسیژن دار مانند رادیکالهای آزادی می‌شود بنابراین کاهش سطح GSH نسبت به GSSG باعث کاهش مقاومتی آنتی اکسیدانی می‌شود در این آزمایش سطح GSH بعد از انکوباسیون سلولهایی که از بافت ایسکمی نانو ذره دریافت کرده نسبت به گروه کنترل سالم کاهش پیدا کرده بود.

سطوح GSSG بعد از انکوباسیون سلولهایی که از بافت ایسکمی نانو ذره دریافت کرده نسبت به گروه کنترل سالم افزایش پیدا کرده بود.

تغییر پتانسیل غشای سلول در سلولهای استخراج شده از بافت مغز ایسکمی شده در موشهای تحت آزمایش که نانو ذره دریافت نموده است نسبت به گروه کنترل سالمی که نانو ذره دریافت ننموده است افزایش پیدا کرده است.

در تولید گونه‌های فعال اکسیژن ((ROS در سلولهای استخراج شده از بافت مغز ایسکمی شده در موشهای تحت آزمایش که نانو ذره دریافت نموده است نسبت به گروه کنترل سالمی که نانو ذره دریافت ننموده است افزایش پیدا کرده است.

بنابر این با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق و تحقیقات گذشته نتیجه گیری می‌شود که اغلب نانو ذرات دارای سمیت سلولی هستند که این سمیت ایجاد شده از طریق آسیب به غشای سلول و تولید رادیکالهای آزاد می‌باشد که مرگ سلولی را القا می‌کند همچنین نانوذرات باعث آسیب به اندامک‌های داخل سلولی مانند میتوکندری و آسیب به کروموزوم و DNA که باعث القای سمیت ژنی می‌شود.

نتایج این تحقیق نتایج تحقیقات گروه‌های دیگر را نیز تأیید می‌کند. نام آوری و همکاران (۱۳۸۵) به بررسی بیان BAX پس از القای شوک سرمایی بر کورتکس حسی - حرکتی مغز موش بالغ و درمان با کلرید منیزیم پرداختند. به بیان آنها در این تحقیق پس از ایجاد شوک سرمایی به بررسی آپتوز در سلولهای عصبی پرداخته شد و برای بررسی سلولهای آپتوزی از آنتی بادی BAX استفاده شد و نتایج نشان داد که BAX در موشهای مدل (موشهایی که شوک سرمایی به آنها وارد شد اما دارو دریافت نکردند) به میزان زیادی بیان شد و در گروه درمان (موشهایی که شوک سرمایی به آنها وارد شد و دارو دریافت کردند) بیان آن کمتر بود؛ بنابراین میتوان نتیجه گرفت که شوک سرمایی باعث القای آپتوز شده است یعنی استرس اکسیداتیو ناشی از ادم مغزی سبب

فعال شدن BAX سلولهای بافت مغزی شده است. [۱۲]

محمدی گرجی و کریم پور ۱۳۹۲ اثر داروی داکسوروبیسین بر بیان ژنهای آپوپتوز BCL2 و BAX در قلب موش صحرایی بررسی کردند. داکسوروبیسین با تولید رادیکالهای آزاد اکسیژن موجب آسیب به غشاء میتوکندری آزاد شدن سیتوکروم C و در نتیجه القاء آپوپتوز در کاردیومیوسیتها می‌شود. آزاد شدن سیتوکروم C به وسیله خانواده پروتئینهای BCL2 که در غشاء داخلی میتوکندری واقع شده‌اند کنترل می‌شود. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که داکسوروبیسین باعث اتساع حفرات قلبی در مقایسه با گروه کنترل می‌شود. به علاوه مطالعه مشخص کرد که سه هفته بعد از اتمام تزریق داکسوروبیسین میزان فیبروز در فضای بافتی قلب افزایش معنی داری نسبت به گروه کنترل پیدا نموده است. در این مطالعه داکسوروبیسین باعث افزایش بیان ژن پرو آپوپتوتیک BAX و در عین حال موجب کاهش بیان ژن BCL2 در مقایسه با گروه کنترل گردید. با افزایش بیان ژن BAX و کاهش بیان ژن BCL2 بعد از تزریق داکسوروبیسین ناپایداری غشاء میتوکندری افزایش یافت و در نتیجه نفوذ پذیری آن نسبت به سیتوکروم C افزایش پیدا کرد. لذا میتوان نتیجه گرفت که تزریق داکسوروبیسین باعث آسیب غشاء میتوکندری و در نتیجه ایجاد آپوپتوز از طریق مسیر داخلی در میوکارد موش صحرایی شده است. [۱۳]

همچنین در تحقیق دیگر وانگ و همکاران در سال (۲۰۱۴) نشان دادند که نانوذرات اکسید روی در سلول‌های اریتروسیت از طریق افزایش نسبت بیان ژنهای BAX/ BCL2 در این سلول‌ها باعث آپوپتوز می‌شود که نتایج این تحقیق با نتایج حاصل از بررسی میزان بیان ژنهای BAX و BCL2 تحقیق ما سازگاری دارد.

در سال ۲۰۰۹، کری ثابت کرد که نانوذرات اکسیدروی در محیط کشت منجر به تولید رادیکال آزاد اکسیژن شده و به دنبال آن آسیب اکسیداتیو و التهاب و مرگ سلول می‌شود. [۱۵]

هاوو و چن گزارش دادند که نانوذره اکسید روی باعث کاهش قابل توجهی در فعالیت های آنزیمی گلوکاتایون پراکسیداز و کاتالاز می‌شود. نتایج حاصل از مطالعه ژاوو و همکاران نشان داد که تولید رادیکال های آزاد اکسیژن به طور قابل توجهی در غلظت ۵۰ و ۱۰۰ میلیگرم بر لیتر نانوذرات اکسید روی افزایش یافته بود.

تولید بالای ROS بردفاع آنتی اکسیدانی سلولی غلبه می‌کند و سبب کاهش عملکرد میتوکندری می‌گردد و این وقایع استرس اکسیداتیو را افزایش داده و منجر به آسیب سلولی از جمله آپوپتوز می‌شود. در تحقیق ما نیز افزایش چشم گیری در تولید گونه‌های فعال اکسیژن در گروه‌های ایسکمی که نانوذره رادریافت کرده بودند مشاهده شد که این باعث غلبه بر دفاع آنتی اکسیدانی سلول و در نتیجه کاهش عملکرد میتوکندری و نهایتاً مرگ می‌شود. نتایج این تحقیق با نتایج بدست آمده از اندازه گیری ROS در تحقیق ما مطابقت دارد.

فعال شدن Bax و قرار گرفتن آن در غشاء میتوکندری موجب تغییر پتانسیل این غشا و آزادسازی سیتوکروم می‌شود. در نتیجه کاسپاز ۳ فعال شده و با فعال کردن کاسپاز ۹ موجب آسیب به DNA می‌شود. از طرف دیگر Bax ممکن است از مسیر غیروابسته به کاسپاز، آپیتوز را القا کند. در این حالت فاکتوری به نام AIF باعث متراکم شدن کروماتین و فراگمنتاسیون DNA می‌شود.

### پیشنهادات

(۱) در این تحقیق بیان ژنهای Bax, Bcl2 بررسی شد. به منظور تحقیقات دقیق تر می‌توان بیان ژنهای دیگر مسیر آپوپتوز را در ایسکمی موش‌های تحت تیمار با اکسید روی بررسی کرد.

(۲) بررسی سایر نانوذره‌ها بر روی میزان بیان ژنهای آپوپتوز و ضدآپوپتوز در موش ایسکمی رت ویستار

۳) بیان ژن‌های مسیر اپوپتوز متعاقب اثرات نانوذره اکسید روی در سایربافت‌های موش مانند ریه طحال و ... بررسی شود.

#### منابع

- 1- David B. How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization. *Toxicol Journal*.2008;1(3):23-42
- 2- Movassaghi S, Sharifi ZN, Soleimani M, Joghataii MT, Hashemi M, Shafaroodi H, et al. Effect of Pentoxifylline on Ischemia-induced Brain Damage and Spatial Memory Impairment in Rat. *Iran J Basic Med Sci* 2012;15(5):1083-90.
- 3- Marenco P, Bogousslavsky J, Caplan. Classification of stroke subtypes. *Cerebrovasc Dis*.2009; 27(5):493-501.
- 4- Beal CC. Gender and stroke symptoms: a review of the current literature. *J Neurosci Nurs*.2010; 42(2):80-87.
- 5- Tymianski M, Charlton MP, Carlen PL. Secondary Ca<sup>2+</sup> overload indicates early neuronal injury which precedes staining with viability indicators. *Brain Res*.2003;607(1):319-323.
- 6- Beckman KB, Ames BN. Mitochondrial aging: open questions. *Ann N Y Acad Sci*.1998; 854(1):118-127.
- 7- Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001; 21(1): 2-14.
- 8- Joo F, Klatzo I. Role of cerebral endothelium in brain oedema. *Neurol Res*. 1989; 1(2): 67-75.
- 9- Betz AL, Iannotti F, Hoff J. Brain edema: a classification based on blood-brain barrier integrity. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. 1988; 1(2): 133-54.
- 10- Ayata C, Ropper AH. Ischaemic brain oedema. *J Clin Neurosci*.2002; 9(2): 113-24.
- 11- Hossmann KA, Schuier FJ. Experimental brain infarcts in cats. I. Pathophysiological observations. *Stroke*. 1980; 11(6): 583-92.
- 12- Vannucci RC, Yager JY, Vannucci SJ. Cerebral glucose and energy utilization during the evolution of hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1994;14(2): 279-88.
- 13- Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion – from mechanism to translation. *Nat Med*.2011; 1(7):1391-1401.
- 14- Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *New Engl J Med*. 2009; 3(61): 1570-1583.
- 15- Bhatt I, Tripathi BN. Chemosphere. Interaction of engineered nanoparticles with various components of the environment and possible strategies for their risk assessment. 2011;82(3):308-317.
- 16- Zhou X, Laroche F, Lamers M, Torraca V, Voskamp I, Lu T, Chu F, Herman P, Spaink J, Abrahams. Functionalized white Polyethylenimine (PEI) for Very Efficient Gene Delivery in Cell and Zebrafish Embryos. *Nano Res*.2012; 5(10):703-709.
- 17- Feng L, Zhang S, Liu Z. Graphene based gene transfection. *Nanocsa*.2010; 3(2):1252-1257.

- 18- Li LZ, Zhou DM, Peijnenburg WJ, van Gestel CA, Jin SY, Wang YJ. Toxicity of zinc oxide nanoparticles in the earthworm, *Eisenia fetida* and subcellular fractionation of Zn. *Environ, Int.*2011;37(6):1098-104.
- 19- Gupta SM, Tripathi M. A review of TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Chin Sci Bull.*2011;56(16):1639-1675.
- 20- Weiser M, Ludwig A, Wehner D, Hipler U, Tonzeller M, Lacerda RG. Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Physica E.* 2012; 44(9):1098–1102.
- 21- Rashid TR, Phan DT, Chung GS. Experience from a multicentre stroke register. *Sens Actuators B.* 2013;185(23):777–784.
- 22- Pietruszka R, Witkowski BS, Gieraltowska S, Caban P, Wachnicki L, Zielony E. Effect of Pentoxifylline on Ischemia.2013;15(6) ;1483– 1489.
- 23- Huang J, Yinb Z, Zheng Q. Interaction of engineered nanoparticles with various components of the environment. *Energ Environ Sci.*2011;4(2):38613879.
- 24- Wang ZL, Song J. The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials Science.*2006;312(16):242–256.
- 25- Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. Approaches in the Chemoprevention of Breast Cancer. *Gene Dev.*1999;13(4):1899-1911.
- 26- Li XM, Yang JM, Hu DH, Hou FQ, Zhao M, Zhu XH. Contribution of downregulation of L-type calcium currents to delayed neuronal death in rat hippocampus after global cerebral ischemia and reperfusion. *J Neurosci.*2007;27(19):5249-5259.
- 27- Pagnussat AS, Faccioni-Heuser MC, Netto CA, Achaval M. An ultrastructural study of cell death in the CA1 pyramidal field of the hippocampus in rats submitted to transient global ischemia followed by reperfusion. *J Anat.* 2007;211(5):589-599.
- 28- Zhou JL, Liang JH, Li CL. Inhibition of methamphetamine-induced apoptosis by the calcium channel blocker verapamil in rat cerebellar neurons. *Beijing Da Xue Xue Bao.*2004;36(4):361-365.
- 29- Liu XD, Pan GY, Xie L. Cyclosporin A enhanced protection of nimodipine against brain damage induced by hypoxia-ischemia in mice and rats. *Acta Pharmacologica Sinica.*2002; 23(3):225-229.
- 30- Kobayashi T, Mori Y. Ca<sup>2+</sup> channel antagonists and neuroprotection from cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol.* 1998;363(1):1-15.
- 31- Hosaka T, Yamamoto YL, Diksic M. Efficacy of retrograde perfusion of the cerebral vein with verapamil after focal ischemia in rat brain. *Stroke* 1991;22(12):1562-1566.
- ۳۲- محمدی گرجی س، کریم پور ع. اثر داروی داکسوروبیسین بر بیان ژنهای آپوپتوز Bcl<sub>2</sub>, BAX قلب موش صحرائی. *مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان.* ۱۳۹۲؛ ۴۵(۱۵):۱۹ تا ۲۴.
- 33- Wang B, Zhang Y, Mao Z, Yu D, Gao C, Wang ZL, Song J. The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *J Nanosci Nanotechnol.*2014;14(8):5688-5696.
- 34- Hanley C, Thurber A, Hanna C, Punnoose A, Zhang J, Wingett DG. The influences of cell type and ZnO nanoparticle size on immune cell cytotoxicity and cytokine induction. *Nanoscale research letters.* 2009;4(12):1409-1420.

- 35- Hao L, Chen L. Oxidative stress responses in different organs of carp (*Cyprinus carpio*) with exposure to ZnO nanoparticles. *Ecotoxicology and environmental safety*. 2012;80(2):103-110.
- 36- Zhao X, Wang S, Wu Y, You H, Lv L. Acute ZnO nanoparticles exposure induces developmental toxicity, oxidative stress and DNA damage in embryo-larval zebrafish. *Aquatic toxicology*. 2013; 15(1):136-149.