مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۲۰، شماره ۲/ خرداد و تیر ۱۳۹۷/ ۵۸-۵۱

مقاله پژوهشی

بررسی سمیت نانو ذرات اکسید سیلیس بر روی سلول‌های عصبی تمایزیافته PC12 در شرایط *In vitro*

الهام یکتادوست[۱]، مجتبی فلاحتی[۲]، سویار ساری[۳]، فرنوش عطار[۴*]

گروه علوم سلولی- مولکولی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران؛ [۲]گروه نانوتکنولوژی، دانشگاه آزاد علوم دارویی، تهران، ایران؛ [۳]گروه علوم سلولی مولکولی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران؛ [۴]گروه پژوهشی بیولوژی، پژوهشکده صنایع غذایی و کشاورزی، پژوهشگاه استاندارد، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۶/۱/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۲۷

چکیده:

زمینه و هدف: **نانو ذرات اکسید سیلیس علاقه زیادی از محققین را در بیوتکنولوژی و زمینه‌های دارویی جلب کرده است. اینکه نانو ذرات اکسید سیلیس می‌توانند سمیت سلولی در سلول‌های طبیعی را القا کنند، به‌خوبی ثابت‌شده است. بااین‌حال، تا به امروز سمیت سلولی نانو ذرات اکسید سیلیس در برابر سلول‌های سیستم عصبی مورد بررسی قرار نگرفته است.**

روش بررسی: **در این مطالعه فعالیت کاسپاز ۸ و ٦ در سلول‌های PC12 تیمار شده با غلظت‌های مختلف نانو ذرات اکسید سیلیس در شرایط *In vitro* و با استفاده از دستگاه الایزاریدر مورد سنجش قرار گرفت. داده ها با استفاده از برنامه آماری SPSS و آزمون One-way ANOVA و Student t-test مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.**

یافته‌ها: **نتایج نشان داد که فعالیت کاسپاز ۸ و ٦ به‌صورت وابسته به غلظت نانو ذرات افزایش‌یافته است. درواقع، فعالیت کاسپاز ۸ و ٦ بعد از قرار گرفتن در معرض ۱ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نانو ذرات اکسید سیلیس القا شد. بااین‌حال، نانو ذرات اکسید سیلیس در غلظت ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر سمیت کمی نشان داد ($P<0/05$).**

نتیجه‌گیری: **یک مسیر وابسته به میتوکندری فعال شده توسط کاسپاز ۸ و ٦ ممکن است در آپوپتوز ناشی از نانو ذرات و درنتیجه سمیت سلولی در سلول‌های PC12 نقش داشته باشد.**

واژه‌های کلیدی: **نانو ذرات اکسید سیلیس، سمیت سلولی، آپاپتوز، کاسپاز.**

مقدمه:

توجه دانشمندان به سازگاری زیستی نانو ذرات و اثرات مضر احتمالی آن‌ها بر سلول‌ها، به این واقعیت برمی‌گردد که در سال‌های اخیر با افزایش روزافزون کاربردهای نانو ذرات در صنعت و حضور بیشتر آن‌ها در محیط، ارتباط معنی داری بین آن‌ها و برخی بیماری‌ها پیدا شده است (۱). در طی نیم قرن فناوری نانو به میزان قابل‌توجهی تبدیل به پایه و اساس کاربردهای صنعتی شده است و رشد تصاعدی در این زمینه داشته است. به‌عنوان‌مثال نانو ذرات سیلیس در زمینه‌های تحقیقاتی دارویی تأثیر زیادی بر روی دستگاه‌های پزشکی مانند حسگرهای زیستی، سیستم‌های تحویل دارو و پروب های عکس‌برداری داشته است (۱).

در مواد غذایی و لوازم‌آرایشی استفاده از نانو ذرات سیلیس به‌طور چشمگیری برای بهبود تولید، بسته‌بندی و عمر مفید مورد استفاده قرار می‌گیرد. نانو ذرات سیلیس فعالیت ضدمیکروبی در برابر باکتری‌های ناشی از مواد غذایی نشان می‌دهند و امروزه نانو ذرات سیلیس به‌عنوان حسگرهایی برای تشخیص کیفیت و سلامت غذا مورد استفاده قرار می‌گیرند. این امر مراکز علمی و تحقیقاتی را بر آن داشته است تا به بررسی

***نویسنده مسئول:** کرج- پژوهشگاه استاندارد- پژوهشکده صنایع غذایی و کشاورزی- گروه پژوهشی بیولوژی- تلفن: ۰۹۱۲۶۲۱۰۸۹۲،*
E-mail: f.attar@standard.ac.ir

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 1:12 +0430 on Tuesday June 19th 2018

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 1:12 +0430 on Tuesday June 19th 2018

اساسی تأثیر نانو ذرات بر سلول بپردازند. علی‌رغم مطالعاتی که در ابتدا نشان می‌داد که نانو ذرات و هم خانواده‌های آن تأثیر چندانی بر ریخت‌شناسی، رشد و تکثیر سلولی ندارند، امروزه مشخص شده است که شاخص‌هایی چون ابعاد فیزیکی، مساحت، دوز، نسبت طول به قطر، زمان، خلوص و وجود عوامل شیمیایی متصل به سطح، هر یک به‌نوبه خود در ایجاد اثرات سلولی نانو ذرات موثرند (۲).

هر یک از مطالعات صورت گرفته روی یکی از متغیرهای مذکور تمرکز بیشتری دارند اما به نظر می‌رسد که دوز، خلوص و حضور دنباله‌ی شیمیایی متصل به سطح از موارد مهم‌تر باشند. به‌طور مثال برخی مطالعات نشان داده‌اند که آستانه اثر کشندگی نانولوله برای نانولوله‌های چند دیواره و تک دیواره حدود ۳/۰۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر است که این رقم در برابر فولرین که تا ۲۲۶ میکروگرم در میلی‌لیتر نیز اثر کشندگی برای سلول ندارد، رقمی قابل‌توجه است. جدیدترین مقاله منتشرشده در این زمینه توسط انجمن شیمی آمریکا در مقایسه‌ی بین اثرات سلولی نانولوله تک دیواره، چند دیواره، کوارتز و فولرن به ترتیب توان کشندگی این مواد برای سلول را به‌این‌ترتیب بیان می‌کند: فولرن < کوارتز < نانولوله چند دیواره < نانولوله تک دیواره (۳).

نتایج نشان می دهد که نانو ذرات سیلیس می‌توانند القاکننده استرس اکسیداتیو و تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در سیستم تنفسی موجودات زنده باشند. گزارشات متعدد حاصل از مطالعات زیست سازگاری و سمیت سلولی نانو ذرات سیلیس منجر به بحث برانگیز بودن آن شده است (۴). تأثیر نانو ذرات سیلیس بر روی سلول‌های کراتینوسیت بررسی شده است که منجر به سمیت پوستی با افزایش میزان استرس اکسیداتیو، تغییرات مورفولوژیکی و نوسان در زنده ماندن سلول‌ها شده است (۵).

مطالعات بر روی سلول‌های کلیه جنین انسانی نشان داده که نانو ذرات سیلیس با القای آپاپتوز و کاهش توانایی چسبندگی سلول‌ها باعث جلوگیری از رشد سلول‌ها شده است (۶). مطالعات تکمیلی نشان دادند که نانو ذرات سیلیس می‌توانند از سد خونی- مغزی گذر کنند و بر سیستم عصبی مرکزی اثر بگذارند و مطالعات کمی تخمین اثر مستقیم نانو ذرات سیلیس بر سیستم عصبی را مورد بررسی قرار داده‌اند. به‌طور رایج پذیرفته شده است که آپاپتوز نورون‌های دوپامینرژیک فاکتور اصلی القای بیماری پارکینسون است که یکی از بیماری‌های عصبی بسیار شایع است؛ بنابراین بررسی برهم‌کنش بین نانو ذرات سیلیس و سلول‌های عصبی بسیار حائز اهمیت است (۸،۷).

نکروز یا مرگ سلولی غیر کنترل‌شده نهایتاً به تحلیل سلول و پاسخ های التهابی (در اثر نشت مواد داخل به خارج سلول که خود در اثر از بین رفتن توانایی غشا بر کنترل آب و یون‌ها به وجود می آید) منجر می شود؛ اما بالعکس آپاپتوز فرایندی است که در آن سلول‌ها به‌صورت فعال در مرگ خود دخالت دارند. به همین دلیل گاهی، به آن خودکشی سلولی نیز گفته می شود (۹).

کاسپاز ۸ آنزیم کلیدی است که در تمام مسیرهای فرایند آپوپتوز فعالیت دارد و مسئول فعال و یا غیرفعال کردن طیف گسترده‌ای از زیست مولکول‌ها و ایجاد خصوصیات ویژه این فرآیند در سلول است. بررسی تغییر فعالیت کاسپاز ۸ می‌تواند به‌عنوان نشانگرهای مهمی برای ورود سلول‌ها به مسیر مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی تلقی گردد و در آزمون‌های سلولی جهت بررسی کمی اثر فعال کننده‌ها و مهارکننده‌های مرگ سلولی استفاده گردد. کاسپاز ۸ فعال، باعث فعال شدن کاسپاز اجرایی ۶ می‌گردد و درنتیجه این کاسپاز اجرایی روی سوبسترای خود عمل کرده و فرایند آپوپتوز صورت می‌گیرد. برای صحت این عمل، فعالیت کاسپاز اجرایی ۶ بررسی گردید. در حال حاضر درک و کنترل اندرکنش‌ها و تجمعات سلول- نانوذات از این رو مورد توجه قرار گرفته است که این اندرکنش‌ها از یکسو نقش کلیدی در زمینه‌های زیست پزشکی دارند و از سوی دیگر به دنبال تولید و توسعه ساختارهای نانو بحث سمیت آن‌ها مطرح است. بدیهی است پرداختن به هر دو

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 1:12 +0430 on Tuesday June 19th 2018

جنبه در کنار یکدیگر در جهت بهره‌برداری مطلوب‌تر از توانمندی‌های بالقوه نانو ذرات موثرتر خواهد بود. بنابراین در این مطالعه بر آن شدیم تا سمیت نانو ذرات اکسید سیلیس بر روی سلول‌های عصبی تمایز یافته PC12 را بررسی کنیم.

روش بررسی:

سلول‌های PC12 از بانک سلولی پاستور تهران، ایران خریداری شد. نانو ذرات اکسید سیلیس با قطر تقریبی ۳۰ نانومتر از شرکت US-nano آمریکا و نمک‌های مربوطه به بافر فسفات (Na_2HPO_4 و NaH_2PO_4) از شرکت مِرک تهیه شدند.

برای تعیین قطر نانو ذرات اکسید سیلیس، از میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) با مشخصات (Zeiss-EM10C-80KV, Germany) استفاده شد. در این مطالعه *In vitro* از رده سلول‌های PC12، تهیه شده از بانک سلولی پاستور استفاده شد. این سلول‌ها از دودمان سلولی شبه نورونی نورآدرنالین زای کولونال منشأ گرفته از سرطان قابل کاشت فئوکروموسیتومای موش صحرایی است که از بخش شبه نخاعی غده آدرنال استخراج شده است. رفتار ظاهری آن‌ها شبیه سلول‌ها سمپاتیک می‌باشد. ویال حاوی سلول منجمد به سرعت از ازت مایع خارج و بلافاصله به داخل بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. سپس به زیر هود کشت که قبلاً توسط UV و الکل استریل شده بود، منتقل شد. محلول سلولی به درون لوله‌آزمایش استریل منتقل و تقریباً هم حجم آن قطره‌قطره محیط کشت یا محلول PBS اضافه و خوب مخلوط گردید. سپس در دور پائین (کمتر از ۱۰۰۰ rpm) به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. بعد از سانتریفوژ، محلول رویی را برداشته و یک میلی‌لیتر محیط کشت سلولی کامل محتوی ۵٪ سرم جنین گوساله و ۱۰٪ سرم اسبی اضافه گردید. سلول‌ها سپس به ظروف کشت سلولی محتوی محیط کشت کامل اضافه و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO_2 انکوبه شدند. معمولاً پس از یک یا چند بار پاساژ سلول‌ها به‌صورت کاملاً فعال و زنده آماده انجام آزمایش‌ها لازم گردیدند (۸).

به‌منظور کمی نمودن میزان فعالیت کاسپاز ۸ و ۶ در عصاره سلول‌های تیمار شده با نانوذره در مقایسه با نمونه کنترل، از کیت سنجش فعالیت کاسپاز ۸ و ۶ (Abcam) استفاده شد. در این کیت از pNA-IETD به‌عنوان سوبسترای آنزیم کاسپاز ۸ و VEID-pNA به‌عنوان سوبسترای آنزیم کاسپاز ۶ استفاده گردید. آبکافت آنزیمی موجب رهاسازی pNA در آن و افزایش جذب در طول موج ۴۰۵ نانومتر می‌گردد. میزان جذب ایجاد شده بر اثر شکست پروتئولیتیک سوبسترای کاسپاز، میزان فعالیت کاسپاز ۸ و ۶ را در عصاره سلولی استخراج شده نشان می‌دهد. ابتدا سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت با غلظت‌های متفاوت نانو ذرات تیمار شدند. پس از تیمار سلول‌ها با تریپسین/EDTA از کف ظرف جداشده و با دور ۱۵۰۰ RPM به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس محلول رویی دور ریخته شد و بافر لیز کننده به سلول‌ها اضافه گردید. بعد از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در یخ، سلول‌ها در دور ۱۰۰۰۰ g به مدت یک دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس ۱۰۰ ماکرولیتر از محلول سوبسترای تازه تهیه شده به همراه DTT به چاهک‌ها افزوده و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. مایع رویی حاوی مقادیر مشخصی از سوبسترای برش خورده و pNA آزادشده است و درنتیجه میزان شدت جذب آن، معرف فعالیت آنزیم در عصاره سلولی می باشد. میزان جذب pNA آزادشده توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر، با تهییج نمونه در طول موج تحریکی ۴۰۵ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت.

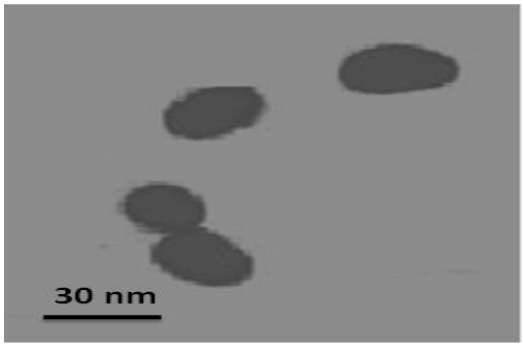
در این مطالعه با استفاده از برنامه آماری SPSS و آزمون One-way ANOVA غلظت‌های مختلف نانو ذرات مورد استفاده بر روی میزان فعالیت کاسپازها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. جهت بررسی و تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از Student t-test استفاده

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 1:12 +0430 on Tuesday June 19th 2018

شده است و نتایج به‌صورت درصدی نسبت به سلول‌های کنترل بیان شده است.

یافته‌ها:

تصویر گرفته شده با میکروسکوپ الکترونی گذاره، قطر تقریبی حدود ۳۰ نانومتر را برای نانو ذرات اکسید سیلیس نشان می‌دهد (تصویر شماره ۱). این تصویر همچنین میزان یکنواختی نانو ذرات اکسید سیلیس را نیز بیان می‌کند.

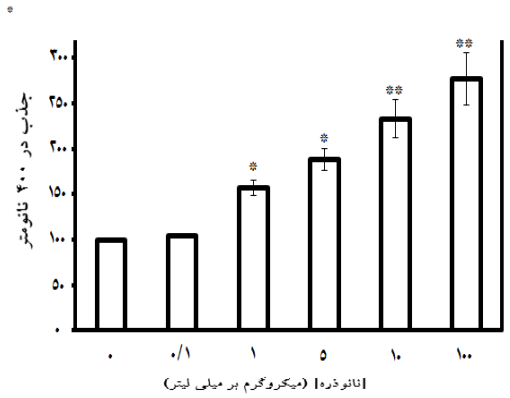


تصویر شماره ۱: تصویر گرفته شده با میکروسکوپ الکترونی گذاره

یکنواختی و قطری حدود ۳۰ نانومتر را برای نانو ذرات اکسید سیلیس نشان می‌دهد.

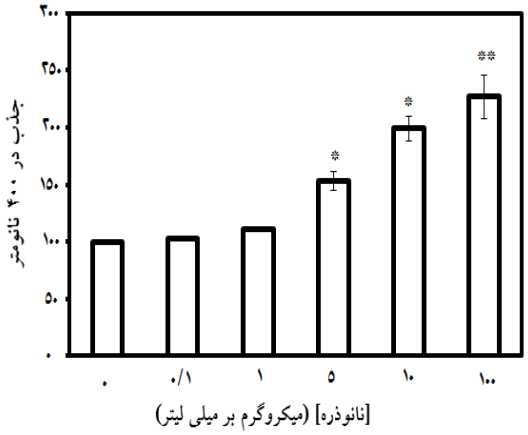
همانطور که در نمودار شماره ۲ مشاهده می‌شود فعالیت کاسپاز ۸ با افزایش غلظت نانوذره اکسید سیلیس افزایش می‌یابد. همانگونه که در این تصویر مشاهده می‌شود، سلول‌های تیمار شده که با غلظت‌های مختلف نانو ذرات اکسید سیلیس (۰/۱، ۱، ۵، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند، نسبت به سلول‌های کنترل (۱۰۰٪)، مقدار به ترتیب ۱۰۴٪، ۱۵۷٪، ۱۸۸٪، ۲۳۳٪ و ۲۷۷٪ آنزیم کاسپاز ۸ را به محیط کشت رها ساخته‌اند.

مطابق نمودار شماره ۳ فعالیت کاسپاز ۶ نیز با افزایش غلظت نانوذره اکسید سیلیس افزایش می‌یابد. در این آزمایش نیز، سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های متفاوت نانو ذرات اکسید سیلیس (۰/۱، ۱، ۵، ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند و همانطور که در تصویر شماره ۳ مشاهده می‌شود، سلول‌های تیمار شده نسبت به سلول‌های کنترل (۱۰۰٪)، مقدار به ترتیب ۱۰۳٪، ۱۱۱٪، ۱۵۳٪، ۱۹۹٪ و ۲۲۷٪ آنزیم کاسپاز ۶ را به محیط کشت رها ساخته‌اند.



نمودار شماره ۲: درصد فعالیت آنزیم کاسپاز ۸ از سلول‌های PC12 قرارگرفته در مجاورت غلظت‌های مختلف نانو ذرات سیلیس به مدت ٤٨ ساعت

*هر آزمایش ۳ بار تکرار شد و نتایج به‌صورت درصد نسبت به سلول‌های تیمار نشده (کنترل) بیان شده است. * نشان دهنده P<۰/۰۵ و ** نشان دهنده P<۰/۰۱ می‌باشد.*



نمودار شماره ۳: درصد فعالیت آنزیم کاسپاز ٦ از سلول‌های PC12 قرارگرفته در مجاورت غلظت‌های مختلف نانو ذرات سیلیس به مدت ٤٨ ساعت

*هر آزمایش ۳ بار تکرار شد و نتایج به‌صورت درصدی نسبت به سلول‌های تیمار نشده (کنترل) بیان شده است. * نشان دهنده P<۰/۰۵ و ** نشان دهنده P<۰/۰۱ می‌باشد.*

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 1:12 +0430 on Tuesday June 19th 2018

بحث:

برای درک اندکنش نانو ذرات اکسید سیلیس با سلول‌های عصبی بررسی فعالیت کاسپازها می‌تواند نقش مهمی در بررسی مسیر سمیت ناشی از نانو ذرات سیلیس داشته باشد. در این مطالعه سعی شد تا سمیت سلولی نانو ذرات اکسید سیلیس در برابر سلول‌های سیستم عصبی مورد بررسی قرار گیرد. کاسپازها سیستئین پروتئازهایی هستند که نقش کلیدی در شروع و انجام آپوپتوز دارند. پس از فعال شدن این آنزیم‌ها و عمل بر روی سوبستراهای منحصر به فرد، تغییرات بیوشیمیایی و سلولی در سلول آپوپتوتیک ایجاد می‌شود. ازجمله این تغییرات می‌توان به چروکیدگی سلول، متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن DNA اشاره کرد؛ بنابراین سنجش فعالیت کاسپاز به‌عنوان یک نشانگر بیوشیمیایی آپوپتوز نقش مهمی در تشخیص آپاپتوز ایفا می‌نماید. شواهد حاکی از آن است که فعال شدن پی در پی کاسپازها در فرایند آپوپتوز، باعث ایجاد مسیر واکنش‌های آبشاری برای کاسپازها می‌گردد. این واکنش‌های آبشاری با فعالیت کاسپازهای آغازگر (پروکاسپاز ۲، ۸، ۹، ۱۰ و ۱۲) شروع شده و سپس باعث فعال شدن کاسپازهای اجرایی (پروکاسپاز ۶، ۳ و ۷) می‌شوند (۱۲-۱۰).

نانو ذرات اکسید سیلیس در میان نانو ذرات شناخته شده در کاربردهای پزشکی و دارویی، بسیار مورد توجه قرار گرفته است. این نانو ذرات دارای خواص زیاد و ویژه‌ای هستند که می‌توان آن را به خواصی ازجمله جنس، اثرات سطح و اندازه نسبت داد. اندازه و شکل نانو ذرات دو مشخصه اصلی و خاص هستند که در دو شرایط *In vitro* و *In vivo*، پایداری و تجمع نانو ذرات سیلیسی را کنترل می‌کنند (۱۳). اندازه و جنس نانو ذرات بر روی مکانیسم سلولی تأثیر می‌گذارد. کاهش اندازه نانو ذرات منجر به افزایش سطح و واکنش‌پذیری آن‌ها می‌گردد و این موضوع باعث تغییر در خواص فیزیکی و شیمیایی نانو ذرات و درنتیجه اثرات سمیت سلولی آن‌ها می‌شود (۱۴).

به‌عنوان یک مثال قابل توجه، اندازه ذرات اکسیدهای سیلیس که در این کار انتخاب شد، در حدود ۳۰ نانومتر بود که بر روی سلول‌های PC12 تأثیرگذار بوده و درنتیجه می‌تواند برای کاربردهای پزشکی قابل تأمل باشد. سازگاری زیستی به عوامل مختلفی ازجمله سمیت ذاتی نانوذره ارتباط دارد. واضح است که سمیت ذرات سیلیسی می‌تواند وابسته به عوامل متعددی ازجمله غلظت، ساختار، حلالیت، شیمی سطح و تجزیه بیولوژیکی باشد. برهمکنش بین نانو ذرات و سلول‌های عصبی در درجه اول به جنس نانو ذرات بستگی دارد. در معرض قرار دادن نانو ذرات سیلیسی با سلول‌های عصبی ممکن است باعث تغییراتی در چسبندگی سلول‌های عصبی شود که این تغییرات می‌تواند بر روی شکل و عملکرد سلول مانند مورفولوژی، تمامیت غشا و درنتیجه حفظ بقای سلول نیز تأثیرگذار باشد. البته گروه‌های عاملی موجود بر سطح نانو ذرات همچنین بر روی سمیت سلولی نانو ذرات اثر مهمی دارد (۱۵).

به‌طور مثال نانو ذرات مغناطیسی اکسید آهن (۵۰ نانومتر) پوشیده شده با پلی اتیلن گلیکول، چسبندگی سلول را به میزان ۶۴٪ کاهش می‌دهد (۱۶). این امر می‌تواند به دلیل تفاوت در برهمکنش نانو ذرات با سلول، در حضور یا عدم حضور گروهای عاملی باشد. درنتیجه عملکرد نانو ذرات سیلیسی با گروهای عاملی مختلف نیز متفاوت است. سمیت نانو ذراتی که دارای گروه عاملی هستند، نسبت به نانو ذرات بدون گروه عاملی کمتر است و البته نوع گروه عاملی نیز بر روی سمیت تأثیرگذار است. به‌طور مثال، نانو ذراتی که دارای گروه عاملی پلی اتیلن گلیکول یا آلبومین هستند، سمیت کمتری نسبت به نانو ذراتی دارند که سطح آن‌ها با دکستران عامل دار شده است (۱۷).

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 1:12 +0430 on Tuesday June 19th 2018

تنوع در اندازه نانو ذرات نیز ممکن است اثرات سمیت متفاوتی بر روی سلول‌ها داشته باشد. نانو ذرات سیلیسی ممکن است باعث برخی تغییرات در محیط کشت سلول شود که بر روی سمیت حاصله تأثیرگذار باشد. به‌طور مثال، نانو ذرات اکسید سیلیس در حالت محلول به دلیل جذب یون هیدروکسید دارای پتانسیل سطحی منفی هستند که سبب جذب یون‌های متفاوت و درنتیجه تغییر جذب پروتئین‌ها بر روی آن‌ها شود. علاوه بر این، نانو ذرات سیلیس می‌توانند بر اساس تغییر بار، pH محیط را تغییر دهند (۱۸،۱۹).

نتیجه‌گیری:

در پایان نتیجه‌گیری می‌شود با توجه به مطالعات انجام شده و مطالعه حاضر، نانو ذرات اکسید سیلیس می‌تواند به‌عنوان یک عامل سمی برای سلول‌های عصبی پیشنهاد شوند که این سمیت وابسته به دوز می‌باشد. حتی اگر در شرایط *In vitro* سمیت نانو ذرات سیلیسی بر روی سلول‌های عصبی در برخی غلظت‌ها و زمان‌ها، ایمن بودن این نانو ذرات را تأیید کند، ولی این نتایج تأیید کننده غیر سمی بودن آن‌ها در شرایط *In vivo* نمی‌باشد. درنهایت پیشنهاد می‌شود، تحقیق فوق در شرایط داخل بدن حیوان آزمایشگاهی انجام شده تا میزان سمیت نانو ذرات اکسید سیلیس در شرایط داخل بدن موجود زنده نیز بررسی شود.

تشکر و قدردانی:

این تحقیق حاصل نتایج بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد با کد پایان‌نامه به شماره ۶۰۷۹ می‌باشد که در سال ۱۳۹۵ در آزمایشگاه تحقیقاتی زیست‌شناسی سلولی و مولکولی دانشگاه آزاد واحد علوم دارویی تهران انجام شده است. بدین‌وسیله از کلیه افراد شرکت‌کننده در طرح تحقیقاتی پایان‌نامه تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع:

1. Trewyn BG, Slowing, II, Giri S, Chen HT, Lin VS. Synthesis and functionalization of a mesoporous silica nanoparticle based on the sol-gel process and applications in controlled release. Acc Chem Res. 2007; 40(9): 846-53.
2. Park JH, Gu L, von Maltzahn G, Ruoslahti E, Bhatia SN, Sailor MJ. Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for *in vivo* applications. Nat Mater. 2009; 8(4): 331-6.
3. Magrez A, Kasas S, Salicio V, Pasquier N, Seo JW, Celio M, et al. Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials. Nano Lett. 2006; 6(6): 1121-5.
4. Lin W, Huang YW, Zhou XD, Ma Y. *In vitro* toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. Toxicol Appl Pharmacol. 2006; 217(3): 252-9.
5. Kyung OY, Grabinski CM, Schrand AM, Murdock RC, Wang W, Gu B, et al. Toxicity of amorphous silica nanoparticles in mouse keratinocytes. J Nanopart Res. 2009; 11(1): 15-24.
6. 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. Toxicol *in vitro*. 2009; 23(5): 808-15.
7. Yang Z, Liu ZW, Allaker RP, Reip P, Oxford J, Ahmad Z, et al. A review of nanoparticle functionality and toxicity on the central nervous system. J R Soc Interface. 2010; 7(4): S411-22.
8. Zeinabad HA, Zarrabian A, Saboury AA, Alizadeh AM, Falahati M. Interaction of single and multi wall carbon nanotubes with the biological systems: tau protein and PC12 cells as targets. Sci Rep. 2016; 6: 26508.

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 1:12 +0430 on Tuesday June 19th 2018

9. Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, et al. The mitochondrial permeability transition in cell death: A common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. Biochim Biophys Acta. 1998; 1366(1-2): 177-96.
10. Bahadar H, Maqbool F, Niaz K, Abdollahi M. Toxicity of nanoparticles and an overview of current experimental models. Iran Biomed J. 2016; 20(1): 1-11.
11. Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, et al. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2,-3,-6,-7,-8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. J Cell Biol. 1999; 144(2): 281-92.
12. Helmke C, Raab M, Rodel F, Matthess Y, Oellerich T, Mandal R, et al. Ligand stimulation of CD95 induces activation of Plk3 followed by phosphorylation of caspase-8. Cell Res. 2016; 26(8): 914-34.
13. Rajiv S, Jerobin J, Saranya V, Nainawat M, Sharma A, Makwana P, et al. Comparative cytotoxicity and genotoxicity of cobalt (II, III) oxide, iron (III) oxide, silicon dioxide, and aluminum oxide nanoparticles on human lymphocytes *in vitro*. Hum Exp Toxicol. 2016; 35(2): 170-83.
14. Manshian BB, Abdelmonem AM, Kantner K, Pelaz B, Klapper M, Nardi Tironi C, et al. Evaluation of quantum dot cytotoxicity: interpretation of nanoparticle concentrations versus intracellular nanoparticle numbers. Nanotoxicology. 2016; 10(9): 1318-28.
15. Matuszak J, Baumgartner J, Zaloga J, Juenet M, da Silva AE, Franke D, et al. Nanoparticles for intravascular applications: Physicochemical characterization and cytotoxicity testing. Nanomedicine. 2016; 11(6): 597-616.
16. Meczynska-Wielgosz S, Piotrowska A, Majkowska-Pilip A, Bilewicz A, Kruszewski M. Effect of surface functionalization on the cellular uptake and toxicity of nanozeolite A. Nanoscale Res Lett. 2016; 11(1): 123.
17. Ebrahimi E, Khandaghi AA, Valipour F, Babaie S, Asghari F, Motaali S, et al. *In vitro* study and characterization of doxorubicin-loaded magnetic nanoparticles modified with biodegradable copolymers. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2016; 44(2): 550-8.
18. Takamiya AS, Monteiro DR, Bernabe DG, Gorup LF, Camargo ER, Gomes-Filho JE, et al. *In vitro* and *in vivo* toxicity evaluation of colloidal silver nanoparticles used in endodontic treatments. J Endod. 2016; 42(6): 953-60.
19. Paris JL, de la Torre P, Manzano M, Cabañas MV, Flores AI, Vallet-Regi M. Decidua-derived mesenchymal stem cells as carriers of mesoporous silica nanoparticles. *In vitro* and *in vivo* evaluation on mammary tumors. Acta Biochim. 2016; 33: 275-82.

Journal of Shahrekord University of Medical Sciences
(J Shahrekord Univ Med Sci) 2018; 20(2): 51-58. **Original article**

Investigating the *in vitro* toxicity of silica oxide nanoparticles on differentiated neuronal cells (PC12)

Yektadoost E[1], Falahati M[2], Sari S[3], Attar F[4*]
[1]Molecular and Cellular Sciences Dept., Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University (IAUPS), Tehran, I.R. Iran; [2]Nanotechnology Dept., Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University (IAUPS), Tehran, I.R. Iran; [3]Molecular and Cellular Sciences Dept., Faculty of Advanced Sciences and Technology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran-Iran (IAUPS); [4]Biology Dept., Faculty of Food Industry and Agriculture, Standard Research Institute (SRI), Karaj, I.R. Iran.
Received: 5/Apr/2016 Accepted: 17/Jun/2017

Background and aims: Silica oxide nanoparticles (SiO_2-NPs) have attracted a great interest in biotechnology and medicinal fields. It has been documented SiO_2-NPs can induce cytotoxicity in normal cells. However, until now, the cytotoxicity of SiO_2-NPs against nervous system cells did not examine.
Methods: In this *in vitro* study, the activities of caspase-8 and 6 were analyzed in the PC12 cells treated with different concentrations of silica oxide nanoparticles, and was assessed by Elisa plate reader. Data were analyzed using SPSS software, and by One-way ANOVA and Student t-test.
Results: The results showed that the caspase-8 and 6 activities increased in a concentration dependent manner. Indeed, the activity of caspase-8 and 6 was induced after exposure to 1-100 µM of SiO_2-NPs. However, the SiO_2-NPs showed only slight toxicity in the concentration of 0.1 µM ($P<0.05$).
Conclusion: A mitochondrial-dependent pathway activated by caspase-8 and 6 mediated by SiO_2-NPs may be involved in apoptosis induced by NPs, and therefore, cell cytotoxicity plays a role in PC12 cells.

Keywords: **Silica nanoparticles, Cytotoxicity, Apoptosis, Caspase.**

Downloaded from journal.skums.ac.ir at 1:12 +0430 on Tuesday June 19th 2018

Cite this article as: Yektadoost E, Falahati M, Sari S, Attar F. Investigating the *in vitro* toxicity of silica oxide nanoparticles on differentiated neuronal cells (PC12). J Shahrekord Univ Med Sci. 2018; 20(2): 51-58.

[*]**Corresponding author:**
Biology Dept., Faculty of Food Industry and Agriculture, Standard Research Institute (SRI), Karaj, I.R. Iran. Tel: 00989126210892, E-mail: f.attar@standard.ac.ir