

## مقاله پژوهشی

بررسی اثر نانوذره اکسید منیزیم بر بیان ژن *Gad2* در هیپوکامپ موش‌های صحرایی نر در حضور و عدم حضور استرس محدودیت حاد حرکتیمعصومه اسمعی پور<sup>۱</sup>، زهره ولی‌زاده<sup>۲\*</sup>

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد دزفول، دانشگاه آزاد اسلامی، دزفول، ایران

۲- گروه پرستاری و مامایی، واحد دزفول، دانشگاه آزاد اسلامی، دزفول، ایران

\*مسئول مکاتبات: z.valizadeh@iaud.ac.ir

DOI: 10.22034/ascij.2021.687844

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۳۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۲۰

## چکیده

استرس حالت عصبی است که با روند مولکولی اعصاب تمامی ارگانیسم‌ها را درگیر می‌کند. نانواکسید منیزیم در کاهش و تسکین رفتارهای مشابه اضطراب و درد موثر می‌باشد، ولی مکانیسم اثر نانواکسید منیزیم بر روی تسکین درد و استرس هنوز مورد مطالعه قرار نگرفته است. ژن *Gad2* یکی از ایزوفرم‌های گلوتامات دکربوکسیلاز را کد می‌کند، آنزیمی که، گلوتامیک اسید را به گابا (گاما آمینو بوتیریک اسید) تبدیل می‌کند. در مطالعه حاضر به بررسی اثر نانو ذره اکسید منیزیم بر بیان ژن *Gad2* در هیپوکامپ موش صحرایی نر در حضور و عدم حضور استرس حاد حرکتی پرداخته شد. چهار گروه موش صحرایی نر نژاد ویستار (کنترل، دریافت کننده استرس + سالین، دریافت کننده ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذره اکسید منیزیم، دریافت کننده استرس + ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانو ذره اکسید منیزیم) مورد مطالعه قرار گرفتند. RNA از بافت هیپوکامپ آنها استخراج شد. سپس سنتز cDNA و ریل تایم برای تمامی گروه‌ها انجام شد. نتایج نشان داد بیان ژن *Gad2* به طور معنی‌داری ( $p < 0/01$ ) در حضور نانواکسید منیزیم به ویژه در گروه با استرس حاد حرکتی نسبت به سایر گروه‌های افزایش داشت. بنا بر نتایج حاصل می‌توان گفت نانواکسید منیزیم منجر به تقویت سیستم عصبی مهاری با افزایش آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز در هیپوکامپ می‌گردد. مطالعات بیشتر در این زمینه روشن‌گر هر چه بیشتر این ارتباط مولکولی خواهد بود.

کلمات کلیدی: استرس، هیپوکامپ، نانواکسید منیزیم، ژن *Gad2*.

## مقدمه

هیپوکامپ کاهش می‌یابد (۱۱). استرس یا اضطراب به عنوان یک پدیده رفتاری معمول در بین جمعیت‌های انسانی به شمار می‌رود که اگر به صورت مزمن ادامه پیدا کند، می‌تواند زندگی روزمره افراد را تحت شعاع خود قرار داده و آن را مختل کند (۱۲). از سوی دیگر درد یک مکانیسم دفاعی و محافظتی بدن است

هیپوکامپ به عنوان یکی از بخش‌های مغز، در رفتارهای اضطرابی و درد نقش مهمی دارد. در جوندگان درد نوروپاتی مزمن در عملکردهای مرتبط با هیپوکامپ اختلال ایجاد می‌کند و به دنبال درد نوروپاتی مزمن، میزان ترس و اضطراب افزایش می‌یابد. در حالی که حجم و میزان نورون‌زایی

اکسید شده در حوزه پزشکی و داروسازی جایگاه قابل توجهی را به خود اختصاص داده است (۴). تجویز حاد و مزمن نانو ذرات عناصر اکسید روی و اکسید منیزیم در مقادیر مشخص به عنوان مکمل‌های حاوی یون‌های روی و منیزیم می‌توانند سبب تغییر رفتارهای اضطرابی در معروف‌ترین مدل اضطراب سنجی (ماز به علاوه مرتفع) گردند (۹، ۱۰). همچنین نشان داده شده است که کاربرد نانوذرات اکسید منیزیم در کنار کتامین به عنوان آنتاگونیست غیر اختصاصی گیرنده NMDA (N-Methyl-D-aspartic acid) سبب افزایش اثر ضد دردی این نانوذرات می‌گردد (۸). نکته قابل تامل در کاربرد نانوذرات عناصر اکسید شده این است که در پاسخ‌های رفتاری سنجیده شده در حیوانات آزمایشگاهی کاربرد مقادیر یکسان این نانوذرات در مقایسه با شکل معمولی آنها به مراتب اثرات قویتری را اعمال کرده‌اند (۵). ختلال در تعادل برخی از عناصر ضروری بدن از جمله یون‌های روی و منیزیم نیز می‌توانند در بروز رفتارهای اضطرابی و یا پاسخ به درد، نقش به‌سزایی داشته باشند (۶، ۱۶). کمبود یون منیزیم می‌تواند با اثر بر عملکرد محور هیپوتالاموس - هیپوفیز-آدرنال (HPA) منجر به افزایش رفتارهای شبه اضطرابی در مدل‌های آزمایشگاهی شود. درحالی‌که مصرف برخی از مکمل‌های منیزیم از جمله سولفات منیزیم می‌تواند، از ایجاد اضطراب جلوگیری کند (۱۵، ۱۷). از طرفی یون منیزیم اثرات مدولاتوری بر گیرنده NMDA دارند، به گونه‌ای که یون منیزیم به عنوان مسدودکننده گیرنده NMDA عمل می‌کند و به این شکل یون منیزیم به عنوان یک آنتاگونیست فیزیولوژیک برای کلسیم در کانال NMDA به شمار می‌رود به شکلی که می‌تواند به صورت نامحدودی جلوی جذب کلسیم را بگیرد و می‌توان انتظار داشت که با این کار می‌تواند باعث کاهش استرس شود. موارد بیان شده نشان می‌دهند

که احساس ناخوشایندی را در زندگی ایجاد می‌کند و همواره مطالعات بسیاری برای کاهش آن صورت گرفته است (۱۳). بین مسیرهای درد و اضطراب ارتباط متقابل وجود دارد به گونه‌ای که درد مزمن سبب افزایش اضطراب می‌شود و سطح اضطراب، نشان دهنده پیش‌بینی شدت دردهای حاد و مزمن می‌باشد. در پدیده اضطراب و درد، چندین قسمت از مغز و چندین میانجی عصبی درگیر می‌باشند و تأثیر متقابل و هماهنگ چندین سیستم نوروترانسمیتری در مغز، اساس و پایه پدیده‌های اضطراب و درد را شکل می‌دهند (۱۴). گابا یک انتقال‌دهنده‌ی عصبی مهارتی و گلوتامات یک انتقال‌دهنده‌ی عصبی تحریکی در هیپوکامپ محسوب می‌گردند و تعادل بین مهار توسط گابا و تحریک توسط گلوتامات می‌تواند پاسخ‌های فیزیولوژیک و یا رفتاری مرتبط با اضطراب را تنظیم کند (۲). افزایش تحریک‌پذیری نورون‌های گلوتاماترژیک، باعث افزایش اضطراب شده و عواملی که باعث کاهش تحریک‌پذیری این نورون‌ها می‌شوند اثرات ضد اضطرابی دارند (۳).

آنزیم‌های گلوتامات دکربوکسیلاز (GAD) برای تبدیل گلوتامات به گابا، انتقال‌دهنده‌ی عصبی مهارتی در سیستم عصبی مرکزی ضروری هستند. دو پروتئین GAD در گونه‌های مهره‌داران یافت شده است؛ GAD65 و GAD67 که از ژن‌های پارالوگ GAD1 و ژن GAD2 کد می‌شوند. با اینکه هر دوی GAD1 و ژن GAD2 گابا سنتز می‌کنند و در اغلب مهره‌داران با هم بیان می‌شوند، GAD1 گابا سیتوپلاسمی را برای اهداف متابولیک و خارج سیناپسی و ژن GAD2 ذخیره وزیکولی گابا برای رهاسازی را سنتز می‌کند (۱). عدم عملکرد صحیح ژن GAD2 منجر به برخی بیماری‌های عصبی می‌گردد. از این جمله می‌توان سندروم SPS (Stiff person syndrome) را عنوان کرد (۳). با توسعه نانوداروها، مصرف نانو عناصر

استفاده شد. در این روش موش‌ها را در دستگاه استرس حرکتی ثابت می‌کنند تا از تحرک آن‌ها ممانعت به عمل آید. نانوذره اکسید منیزیم از شرکت USnano، امریکا تهیه گردید. سوسپانسیون نانوذره منیزیم با سونیکاسیون به مدت ۱۵ دقیقه در حمام اولتراسونیک آماده‌سازی شد و قبل از هر تزریق به مدت ۱ دقیقه تکان شدید داده شد (۱۹).

**استخراج RNA:** لیز کامل نمونه‌های بافت هیپوکامپ جدا شده از گروه‌های موش مورد نظر با استفاده از TRIzol در دمای اتاق به مدت ۱۰-۵ دقیقه انجام گرفت. ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به نمونه لیز شده با تریزول افزوده گردید. سپس میکروتیوب در دور ۱۲۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. در اثر سانتریفیوژ سه فاز ایجاد می‌شود. RNA در فاز بالایی، پروتئین و DNA در فاز میانی و پایینی حضور دارند. به همین دلیل، جهت جلوگیری از آلودگی با پروتئین و DNA، حدود ۹۰ درصد فاز بالایی به آرامی به تیوب جدید منتقل گردید. ایزوپروپانل به اندازه‌ی حجم مایع انتقال یافته اضافه شد و به آرامی مخلوط گردید و به مدت ۲۰ دقیقه در فریزر -۲۰- انکوبه شد. سپس نمونه در دور ۱۲۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. تخلیه‌ی فاز رویی افزودن امیلی لیتر اتانول ۷۵ درصد (تهیه شده با آب تیمار شده با DEPC) و ورتکس یا پیپتاژ مخلوط تا کنده شدن رسوب ته میکروتیوب انجام شد. نمونه در دور ۷۸۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ دقیقه سانتریفیوژ گردید. تخلیه-ی محلول و خشک نمودن نسبی رسوب در دمای اتاق به مدت چند دقیقه صورت گرفت. (خشک شدن کامل رسوب حلالیت آن را کاهش می‌دهد). حل رسوب در آب تیمار شده با DEPC و انکوباسیون نمونه‌ها در دمای ۶۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه حل گردید. نمونه‌های RNA به فریزر -۸۰- درجه سانتی-

که گابا در تکوین و انعطاف‌پذیری سیستم عصبی نقش اساسی دارد. همچنین نشان داده شده است که نانوذرات اکسید روی و منیزیم می‌توانند در تعدیل پاسخ‌های مرتبط با درد و التهاب در جوندگان موثر باشند (۱۸، ۱۹). در سال‌های اخیر مشخص شده است نانوذرات در محیط‌های زیستی می‌توانند با عبور از سد‌های مختلف و نفوذ به درون سلول‌های زنده در سطح بیان ژن‌ها نیز موثر واقع شوند (۲۰). لذا در این تحقیق به بررسی اثر نانو ذرات اکسید منیزیم بر بیان ژن GAD2 در هیپوکامپ موش‌های صحرایی نر در حضور و عدم حضور استرس محدودیت حاد حرکتی پرداخته شده است.

#### مواد و روش‌ها

موش‌های صحرایی نر بالغ با میانگین وزنی  $20 \pm 250$  گرم از مرکز تکثیر حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز خریداری شد و در قفس‌های گروهی با درجه حرارت ۲۳ درجه سانتی‌گراد و سیکل ۱۲ ساعت روشنایی- تاریکی نگهداری شدند و هیچگونه محدودیتی از نظر مصرف آب و غذا نداشتند ( $n = 4$ ). حیوانات به طور کلی به شکل زیر گروه‌بندی شدند: گروه اول: کنترل (دریافت کننده سالیان)، گروه دوم: موش‌های دریافت کننده استرس + سالیان، گروه سوم: موش‌های دریافت کننده ۵ میلی‌گرم نانوذره اکسید منیزیم، گروه چهارم: موش‌های دریافت کننده استرس + ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذره اکسید منیزیم می‌باشند.

تمامی تزریقات به میزان ۵ میلی‌گرم از نانوذره بر کیلوگرم وزن موش به صورت درون صفاقی صورت گرفت برای گروه کنترل سالیان ۰/۹ درصد در حجم ۱ میلی‌لیتر بر کیلوگرم وزن موش تزریق گردید. جهت القاء استرس در حیوانات از روش استرس محدود کننده حرکت (۱۹) به مدت ۹۰ دقیقه یک مرتبه

**واکنش RT-PCR:** پس از واکنش رونویسی معکوس به منظور صحت انجام واکنش ابتدا واکنش PCR معمولی روی محصول RT انجام گرفت. سپس از واکنش Real time RT-PCR و سیستم SYBR green برای سنجش کمی بیان ژن‌ها استفاده شد. جهت طراحی پرایمر از نرم‌افزار AlleleID 6.0 استفاده شد. جهت بررسی اختصاصیت عمل پرایمرها نیز از Primer BLAST پایگاه داده NCBI استفاده گردید که در جدول ۱ نشان داده شده است.

آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism5 و آنالیز آماری با استفاده از روش Unpaired T-test و one-way ANOVA بین نمونه‌ی کنترل و تیمار انجام شد. نرمال‌سازی تغییرات سطوح بیانی mRNA ژن مورد نظر در مقایسه با سطوح بیانی اندوژنوس ژن اکتین انجام شد.

گراد منتقل شد. پس از استخراج RNA کمیت و کیفیت آن با روش‌های UV اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز بررسی گردید.

الف) بررسی غلظت RNA با روش اسپکتروفتومتری یا نانودراپ یک روش کمی بوده و می‌توان غلظت و خلوص نمونه RNA را با استفاده از جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰، ۲۸۰ و ۲۳۰ نانومتر بدست آورد. ابتدا دستگاه بلنک شد و سپس ۱/۵ میکرولیتر از نمونه مورد نظر توسط دستگاه نانودراپ مورد سنجش قرار گرفت. نمونه RNA ای که از نظر شیمیایی دست نخورده باشد و از نظر زیستی کیفیت استاندارد داشته باشد، الگوی باند ویژه‌ی روی ژل آگارز نشان می‌دهد. حضور باندهای RNA ریپوزومی ۱۸s و ۲۸s نشان‌دهنده‌ی سالم و دست نخورده بودن RNA است.

جدول ۱- پرایمرهای مورد استفاده در RT-PCR

ژن	پرایمر	موقعیت کروموزومی	ترادف	طول قطعه تکثیری (bp)
ژن Gad2	پیش‌رو	q12.317	TCTGGCTTTTGGTCCTTC	۱۵۰
	بازگشت		TGGCTTCTCAGAGTCTCC	
β-actin	پیش‌رو	p1112	TATCGGCAATGAGCGGTTC	۱۵۰
	بازگشت		AGCACTGTGTTGGCATAGAGG	

## نتایج

پروتئین، فنول و نمک‌های آلی می‌باشد که در شکل ۱ نشان داده شده است.

بر روی ژل آگارز سه باند ۵s، ۱۸s و ۲۸s RNA ریپوزومی که نشان دهنده‌ی عدم تجزیه‌ی RNA و اسمیر مشاهده شده بین آن‌ها، بیانگر حضور mRNA سالم در نمونه‌های استخراج شده می‌باشد. این نتایج به‌دست‌آمده حاکی از بالا بودن سطح کیفی و کمی RNA استخراج شده برای استفاده‌ی مطمئن در مراحل بعدی است که در شکل ۲ نشان داده شده است.

RNA استخراج شده قبل از هر استفاده‌ای در دو حالت کمی و کیفی مورد بررسی قرار گرفت، در این پژوهش میزان جذب RNA استخراج شده از نظر کمی در طول موج‌های ۲۶۰ به ۲۸۰ و ۲۶۰ به ۲۳۰ توسط دستگاه نانودراپ و از نظر کیفی در ژل یک درصد آگارز مورد بررسی قرار گرفت و به شرح زیر می‌باشد. در بررسی با نانودراپ، نسبت جذب ۲۶۰/۲۳۰ و ۲۶۰/۲۸۰ بین بازه ۱/۸ تا ۲ بودند که نشان دهنده‌ی خلوص بالای RNA و عدم آلودگی با

تائید اختصاصیت پرایمرها: به منظور بررسی هرچه بیشتر اختصاصیت پرایمرها، محصولات Real time PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد بارگذاری شد. بدین منظور برای هر ژن یک نمونه توموری و یک نمونه نرمال انتخاب گردید. مشاهده تک باند اختصاصی برای هر کدام از ژن‌ها نشان‌دهنده‌ی عملکرد اختصاصی پرایمرها و عدم حضور باند دایمری و فرعی است (شکل ۸).

بررسی کارایی پرایمرها به وسیله نرم‌افزار LinRegPcr: به منظور سنجش کارایی مناسب پرایمرها، داده‌های مربوط به تکثیر ژن‌ها در Real time PCR را به وسیله نرم‌افزار LinRegPcr مورد بررسی قرار داده شد. بهترین کارایی زمانی است که Efficiency برابر ۲ و به R برابر ۱ باشد. نتایج حاصله در جدول ۲ آورده شده است.

الگوی بیان ژن GAD2: پس از انجام بهینه‌سازی شرایط تکثیر قطعه موردنظر بیان نسبی ژن‌های ژن GAD2 با استفاده از واکنش Real time PCR در ۴ گروه مورد مطالعه اندازه‌گیری شد و داده‌های حاصل برای تمام نمونه‌ها با استفاده از روش  $\Delta Ct$  و نسبت به ژن کنترل داخلی  $\beta$ -actin نرمال‌سازی شد. آزمون آماری ANOVA برای مقایسه بیان ژن مذکور در گروه‌های مورد مطالعه با استفاده از نرم‌افزارهای GraphPad Prism 7 در سطح معنی‌داری ۹۵ درصد ( $p = 0/05$ ) انجام شد که در شکل ۹ گزارش شده است.

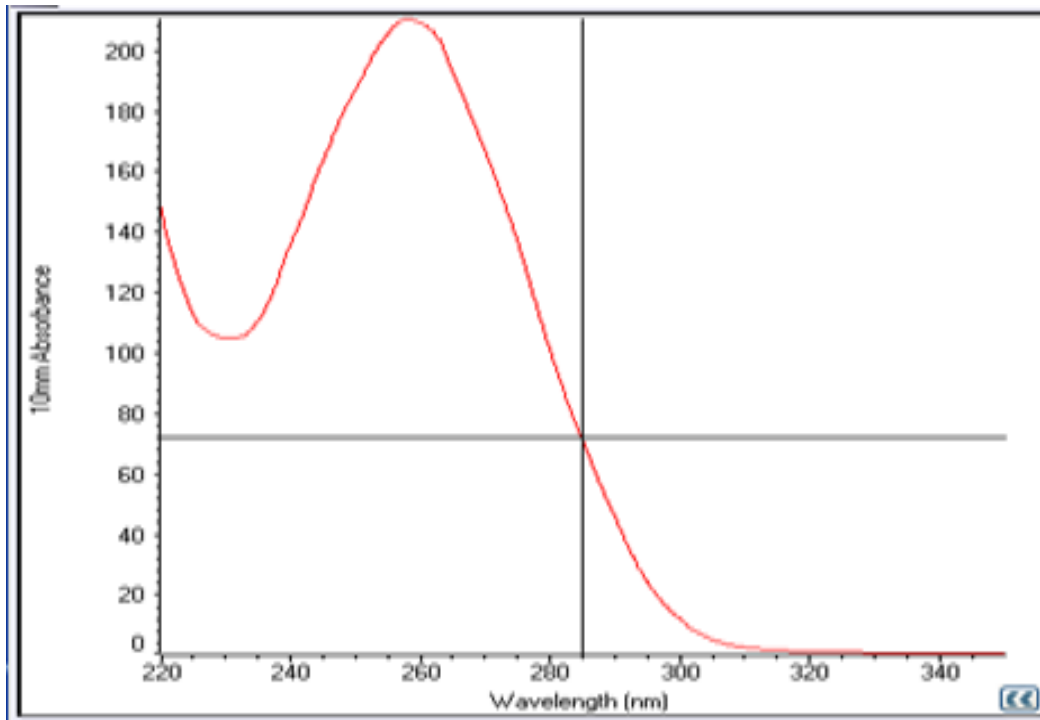
واکنش RT-PCR برای ژن Gad2 و  $\beta$ -actin: واکنش RT-PCR نیمه کمی برای ژن‌های  $\beta$ -actin و ژن Gad2 انجام شد، تا از صحت عملکرد پرایمرها اطمینان حاصل شود. در این واکنش دمای اتصال پرایمرها ۶۲ درجه سانتی‌گراد تعیین شد که پس از انجام RT-PCR نتایج هر ژن روی ژل آگارز برده شد، اندازه قطعه‌ی تکثیرشده برای هر ژن طبق جدول ۱ مطابق با اندازه‌های مورد انتظار ۱۵۰ جفت باز بود که در شکل ۳ گزارش شده است.

نتایج بررسی کمی بیان ژن‌ها با Real Time PCR: تکثیر ژن‌های  $\beta$ -actin و ژن Gad2 در طی مراحل مختلف انجام واکنش Real Time PCR طی ۴۵ سیکل انجام شد. منحنی مربوط به هر ۲ ژن در اشکال ۴ تا ۵ نمایش داده شده است، که نشان‌دهنده تکثیر مناسب قطعات موردنظر است.

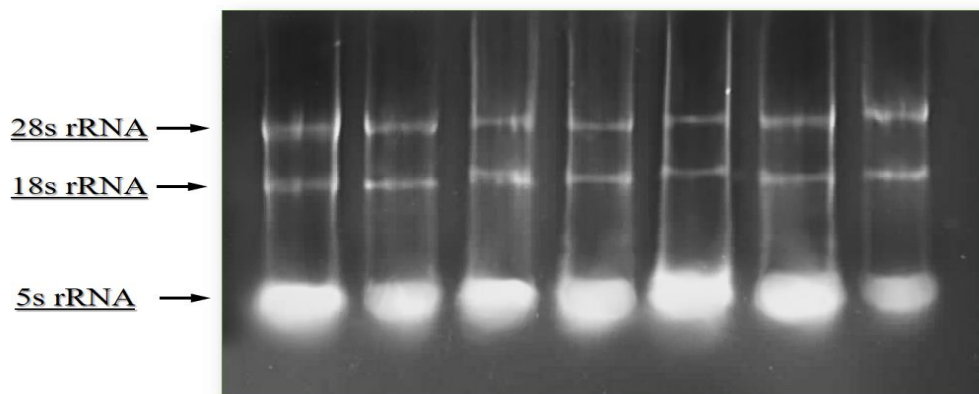
بررسی نمودار منحنی ذوب (Melting Curve): منحنی ذوب محصولات Real Time PCR نشان‌دهنده‌ی تکثیر اختصاصی پرایمرها برای هر ژن است که در این پژوهش منحنی ذوب هر ژن برای هر یک از نمونه بافت‌ها به دست آمد و با بررسی این منحنی‌ها عدم وجود پرایمر دایمر و آلودگی به DNA تائید گردید. شکل ۶ که نشان‌دهنده‌ی دمای ذوب ژن  $\beta$ -actin است. دمای ذوب (Tm) ۸۴/۳ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. شکل ۷ که نشان‌دهنده‌ی دمای ذوب ژن Gad2 است. دمای ذوب ۸۷/۹ درجه سانتی‌گراد تعیین شد.

جدول ۲- کارایی و R مربوط به ژن‌های استفاده‌شده در Real time PCR

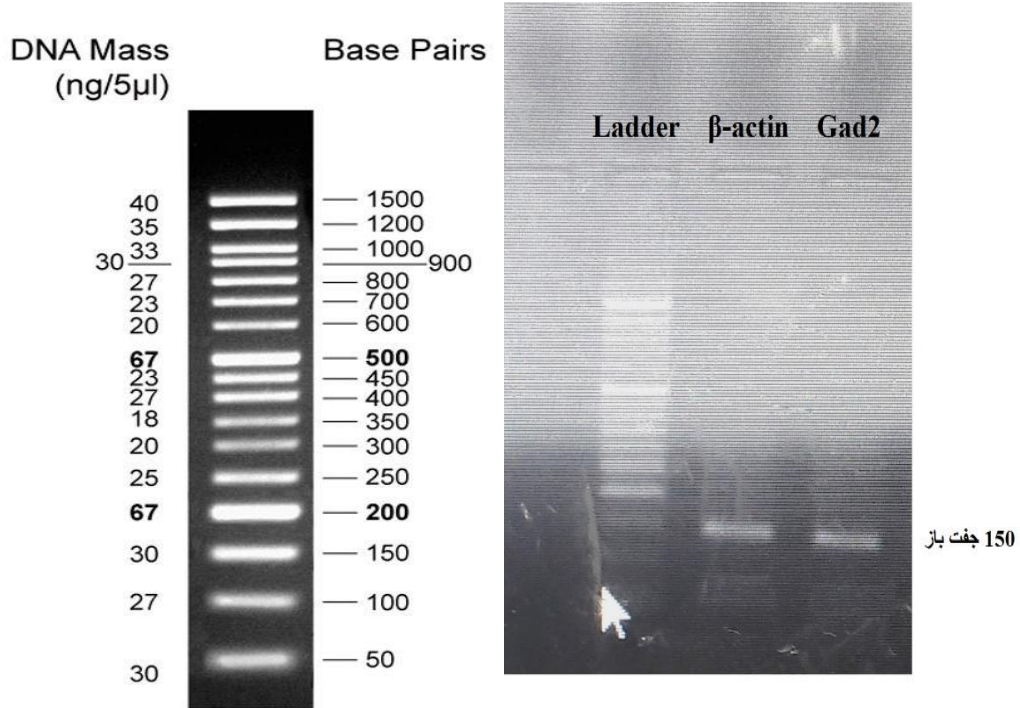
R	کارایی (Efficiency)	ژن
۰/۹۹۹۶	۱/۹۵	$\beta$ -actin
۰/۹۹۹۷	۲/۰۲	ژن Gad2



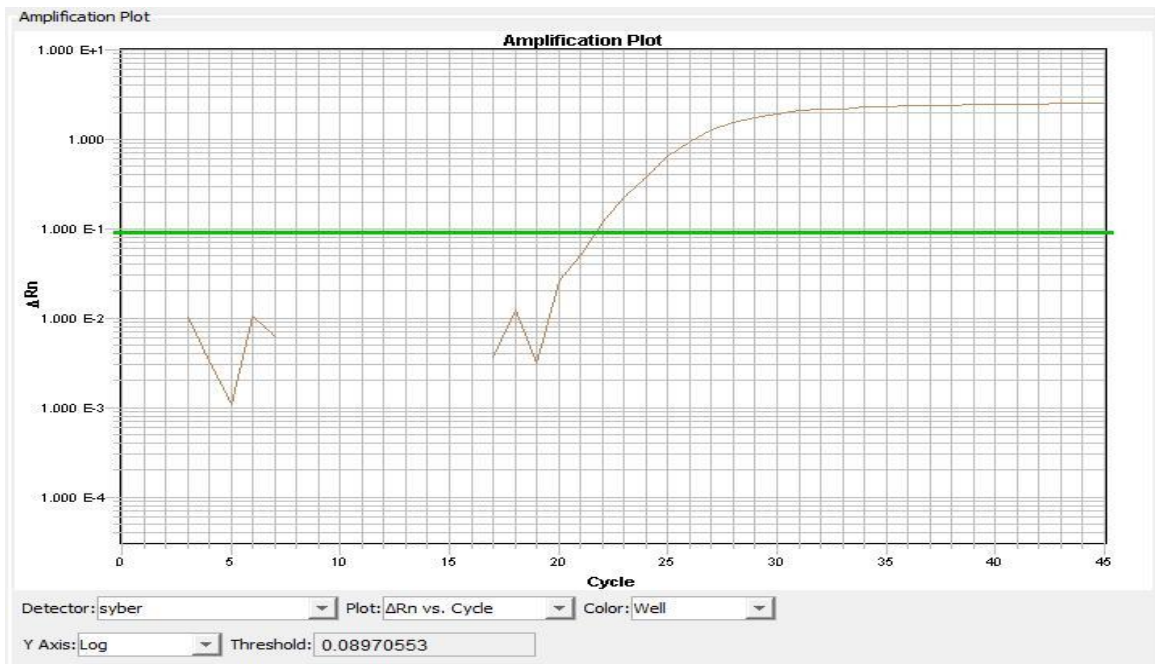
شکل ۱- نمودار نانودراپ، بررسی دو جذب ۲۶۰/۲۳۰ و ۲۶۰/۲۸۰



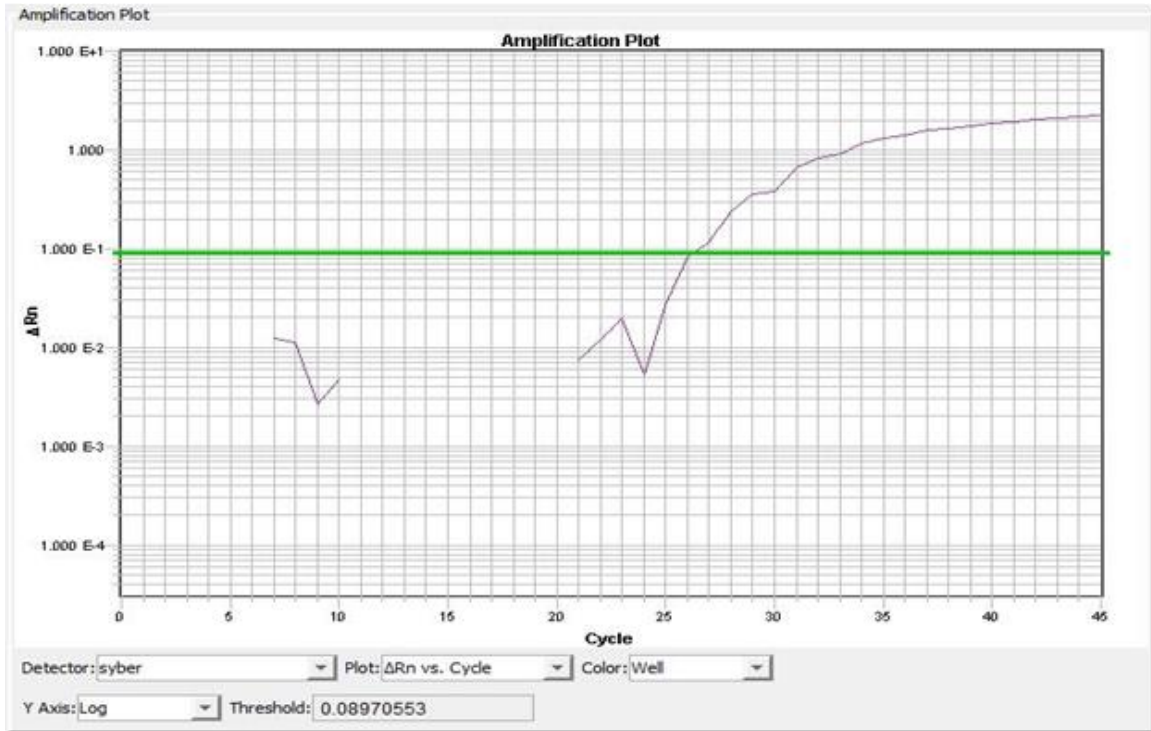
شکل ۲- RNA تام استخراج شده از بافت روی ژل آگارز یک درصد.



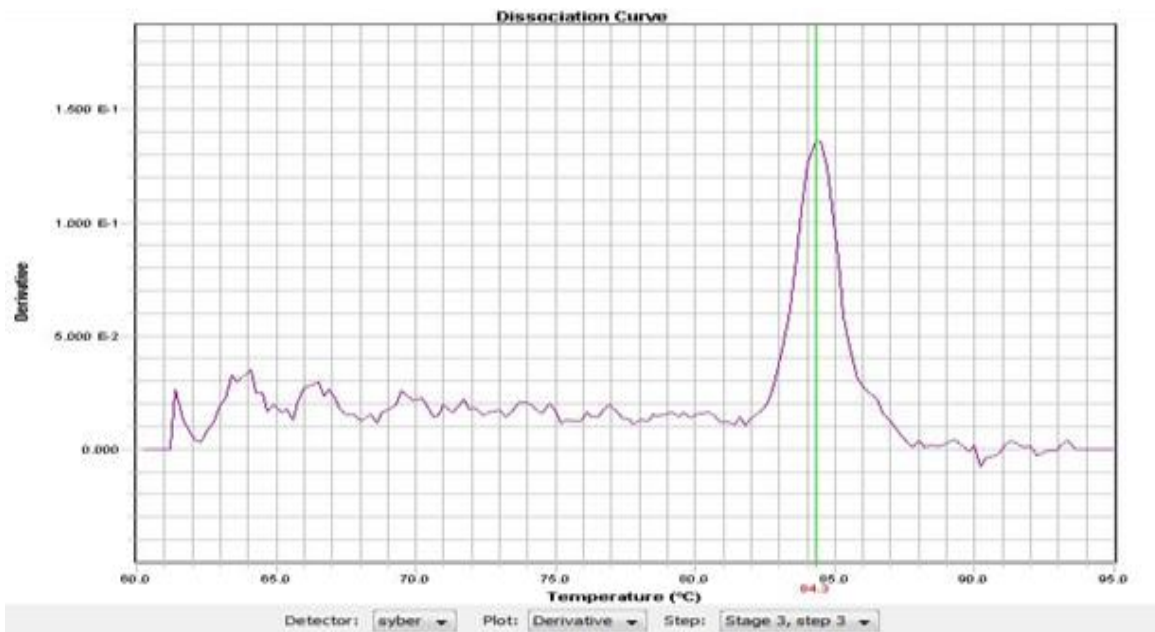
شکل ۳- واکنش RT-PCR نیمه کمی برای ژن‌های  $\beta$ -actin و ژن Gad2 انجام شد، تا از صحت عملکرد پرایمرها اطمینان حاصل شود.



شکل ۴- منحنی تکثیر ژن  $\beta$ -actin

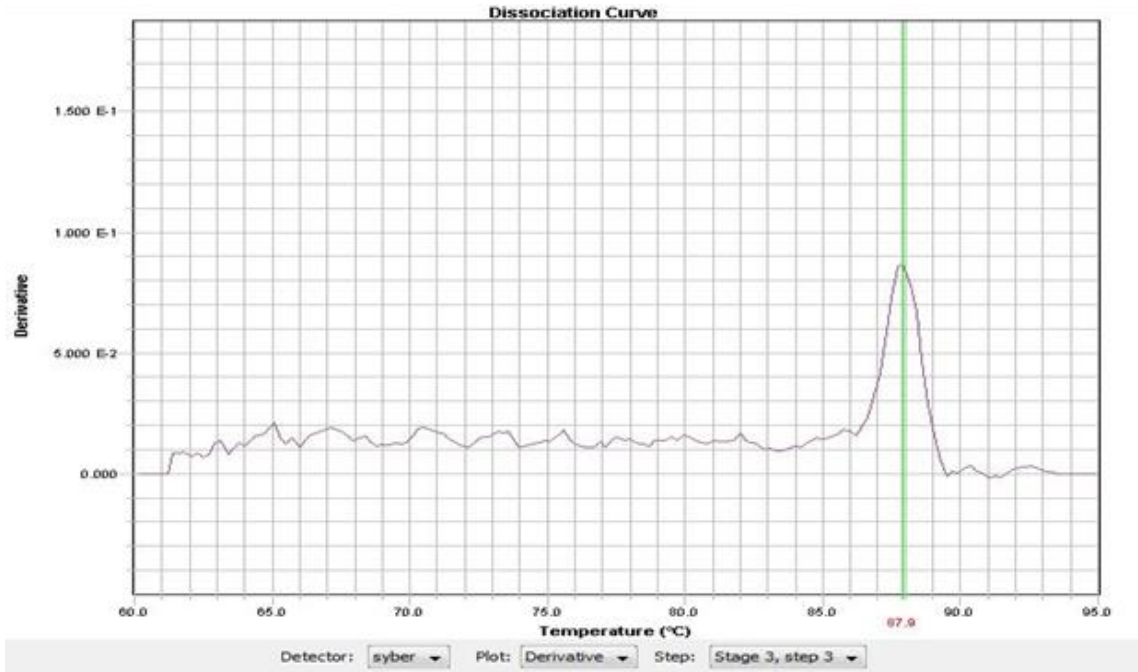


شکل ۵- منحنی تکثیر ژن Gad2

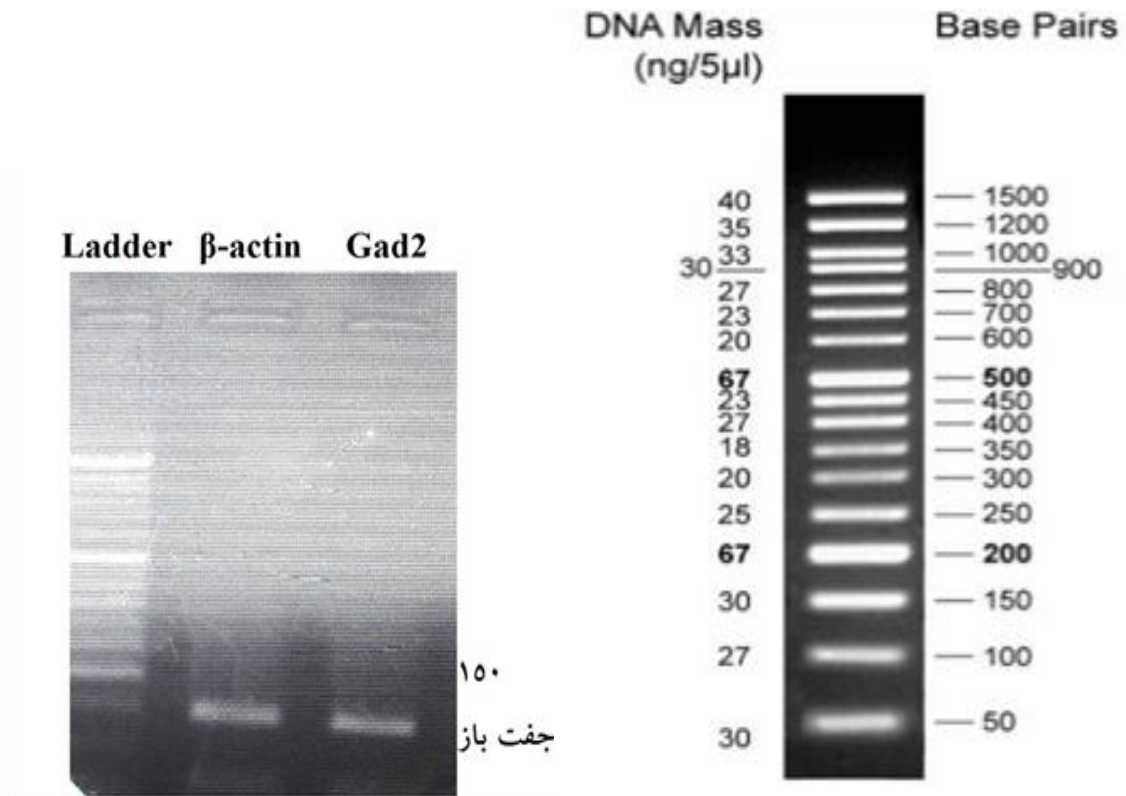


شکل ۶- منحنی دمای ذوب ژن β-actin

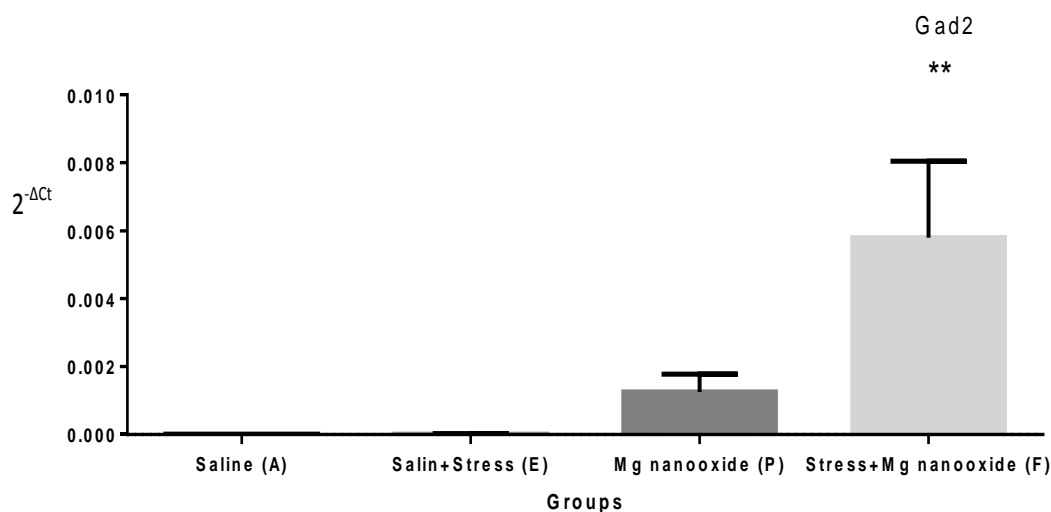




شکل ۷- منحنی دمای ذوب ژن Gad2



شکل ۸- محصولات Real time PCR بر روی ژل آگارز ۲ درصد



شکل ۹- مقایسه بیان ژن Gad2 در بین گروه‌ها (نتایج به صورت Mean ± SEM نمایش داده شده است) بیان ژن Gad2 با  $p=0/0081$  تغییر می‌یابد. این تغییر به طور معناداری در گروه F و P به طور افزایشی است.

#### بحث

که می‌توانند پاسخ‌های فیزیولوژیکی و یا رفتاری مرتبط با اضطراب را تنظیم کند. گابا انتقال دهنده‌ی عصبی مهم در سیستم عصبی مرکزی، که از گلوتامات توسط آنزیم گلوتامیک اسید دکربوکسیلاز یا GAD ایجاد می‌شود. آنزیم‌های گلوتامات دکربوکسیلاز برای تبدیل گلوتامات به گابا ضروری هستند (۲۲). در مطالعه‌ی حاضر به بررسی اثر نانوآکسید منیزیم بر روی بیان ژن GAD2 در هیپوکامپ موش صحرائی تحت استرس حاد پرداخته شد. نتایج نشان داد: الف) نانوآکسید منیزیم منجر به افزایش بیان ژن GAD2 در هیپوکامپ می‌گردد. انتقال عصبی گاباآرژیک بسیار انعطاف پذیر است و تحت تغییرات دینامیک فراوانی در پاسخ به محیط، از جمله استرس حاد و مزمن است. داده‌های تحقیق حاضر نشان داد گروه‌های دریافت کننده نانو ذره اکسید منیزیم به طور معنی داری بیان بالاتری از رونوشت‌های mRNA ژن GAD2 را نسبت به گروه‌های کنترل نشان می‌دهند. قابل توجه است که

استرس، هموستازی فیزیولوژیکی را در انسان و حیوان به هم می‌ریزد. همچنین استرس حاد و اضطراب، تخریب فعالیت‌های حرکتی را در مدل‌های حیوانی به دنبال دارند. استرس سطح عناصری از جمله آهن، روی، کلسیم و منیزیم را در بدن تغییر می‌دهد. از طرفی هموستازی عناصر در بدن نقش مهمی در پاسخ‌های عصبی-رفتاری و تعادل بیوشیمیایی در بدن دارد (۲۱، ۲۲). مطالعات قبلی نشان داده است؛ استفاده نانوآکسید منیزیم و نانوآکسید روی به عنوان منبعی از روی و منیزیم برای تخفیف و تسکین رفتارهای مشابه اضطراب و درد موثر می‌باشد. برخی مطالعات نشان داده‌اند نانوذرات می‌توانند از سد خونی-مغزی عبور کنند و فاکتورهای بیوشیمیایی سیستم عصبی مرکزی را تحت تاثیر قرار دهند (۲۲، ۲۳). پایداری و عملکرد شبکه عصبی به تعادل بین انتقال سیناپسی مهار و تحریکی وابسته است. هیپوکامپ دارای نورون‌های گلوتاماترژیک و گاباآرژیک است

تا بحال بررسی‌های فیزیولوژیکی نشان داده‌اند نانوذره اکسید منیزیم برای رفتارهای عصبی شامل استرس و اضطراب موثر بوده‌اند و نتایج حاصل نیز موافق با نتایج حاصل از آزمون‌های فیزیولوژیکی حاکی از موثر بودن نانو ذره منیزیم در شرایط استرس است (۱۹).

#### نتیجه‌گیری

با توجه به نتیجه‌ی حاضر میزان بیان نسی ژن GAD2 در گروه‌هایی P و F که با نانو اکسید منیزیم تیمار شده بودند به طور معنی‌داری با  $p < 0/01$  نسبت به گروه‌های کنترل A و E افزایش داشت. این افزایش در گروه F نسبت به گروه P بیشتر است. با توجه به اینکه در گروه‌هایی که نانو اکسید منیزیم استفاده نگردیده است تغییر بیان معنی داری در ژن GAD2 مشاهده نگردیده است این نتیجه نشان می‌دهد استفاده از نانو اکسید منیزیم منجر به افزایش بیان ژن GAD2 و به احتمال قوی منتج به افزایش این آنزیم در سیستم عصبی می‌گردد.

#### تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته زیست‌شناسی سلولی و مولکولی است. نویسندگان مقاله بر خود واجب می‌دانند از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دزفول که در انجام این پایان نامه همکاری نمودند قدردانی نمایند.

#### منابع

1. Leinekugel X., Khalilov I., McLean H., Caillard O., Gaiarsa J.L., Ben-Ari Y., Khazipov R. 1999. GABA is the principal fast-acting excitatory transmitter in the neonatal brain. *Advances in Neurology*, 79: 189-201.
2. Maguire J., 2014. Stress-induced plasticity of GABAergic inhibition. *Front Cell Neurosci*, 8: 157-165.

افزایش بیان ژن GAD2 در گروهی که تحت استرس حاد حرکتی قرار گرفته است و تیمار نانو ذره اکسید منیزیم را دریافت نموده بسیار بیشتر از گروهی است که بدون قرار گرفتن در شرایط استرسی تنها نانو ذره اکسید منیزیم را دریافت کرده است. احتمال دارد نانوذره اکسید منیزیم بر روی مسیرهای دیگری که حین استرس اختصاصا فعال می‌گردند و منتج به افزایش ژن Gad2 می‌گردند هم اثرات مثبت داشته باشد. برای مثال پروموتور ژن GAD2 مورد هدف گیرنده‌های استروئیدی ER $\alpha$  و ER $\beta$  قرار می‌گیرد و همچنین فاکتورهای رونویسی دیگری از جمله CREB، هیستون داستیلازها (HDAC)، افزایشده‌ها و تغییرات ساختار کروماتین و اپی‌ژنتیکی بر تنظیم بیان ژن GAD2 اثر دارند و تیمار نانو ذره اکسید منیزیم می‌تواند تا حدودی هر یک از این عوامل را تحت تاثیر قرار داده باشد که نیازمند مطالعات بیشتر در این زمینه است. از این مسیرها به خوبی مشخص شده است استروژن‌ها می‌توانند عملکردهای رفتاری و فیزیولوژیکی را تحت تاثیر قرار دهند. به نظر می‌رسد عملکرد گیرنده‌های ER $\alpha$  و ER $\beta$  به طور متضاد پاسخ‌های استرس را کنترل و سیستم‌های مختلف پپتیدها و انتقال دهنده‌های عصبی را تنظیم می‌کنند. مکانیسم‌های مشخص کننده فرآیندهای تنظیمی در حال بررسی است. هرچند مسیرهای مولکولی به خوبی مشخص نشده‌اند، موش ناک اوت هر دو ژن ERalpha و ERbeta اهمیت این گیرنده‌ها را در پاسخ‌های رفتاری نشان داده است (۲۴، ۲۵).

ب) نانوذره اکسید منیزیم می‌تواند با افزایش ژن GAD2 متعاقبا گابا را افزایش دهد.

پ) نانوذره اکسید منیزیم با تقویت حضور گابا در سیناپس‌های سیستم عصبی مرکزی می‌تواند ترکیب مناسبی جهت کاهش استرس و یا حالاتی مشابه با استرس باشد (۱۹).

- changes in hippocampal/prefrontal circuits in rats: effects of antidepressants. *Cerebral Cortex*, 14(2): 224-229.
13. Ruijter J.M., Ramakers C., Hoogaars W.M., Karlen Y., Bakker O., van den Hoff M.J., Moorman A.F., 2009. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*, 37(6): e45-e45.
14. Sartori S.B., Whittle N., Hetzenauer A., Singewald N., 2012. Magnesium deficiency induces anxiety and HPA axis dysregulation: modulation by therapeutic drug treatment. *Neuropharmacology*, 62(1): 304-312.
15. Shors T.J., Seib T.B., Levine S., Thompson R.F., 1989. Inescapable versus escapable shock modulates long-term potentiation in the rat hippocampus. *Science*, 244(4901): 224-226.
16. Sonavane G., Tomoda K., Makino K., 2008. Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: effect of particle size. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 66(2): 274-480.
17. Szewczyk B., Poleszak E., Sowa-Kucma M., Siwek M., Dudek D., 2008. Antidepressant activity of zinc and magnesium in view of the current hypotheses of antidepressant action. *Pharmacological Reports*, 60(5): 588-599.
18. Torabi M., Kesmati M., Eshagh Harooni H., Najafzadeh Varzi H., 2014. Effect of Intra CA1 and Intraperitoneal Administration of Opioid Receptor Modulating Agents on The Anxiolytic Properties of Nano and Conventional ZnO in Male Rats. *Cell Journal*, 16(2): 163-170.
19. Wang C., Lu J., Zhou L., Li J., Xu J., Li W., 2016. Effects of Long-Term Exposure to Zinc Oxide Nanoparticles on Development, Zinc Metabolism and Biodistribution of Minerals (Zn, Fe, Cu, Mn) in Mice. *PLOS One*, 14(10): 1-14.
3. Mattson M.P., Kater S.B., 1989. Excitatory and inhibitory neurotransmitters in the generation and degeneration of hippocampal neuroarchitecture. *Brain Research*, 478(2): 337-348.
4. Mayer M.L., 2005. Glutamate receptor ion channels. *Current Opinion in Neurobiology*, 15(3): 282-288.
5. Mlyniec K., 2015. Zinc in the Glutamatergic Theory of Depression. *Current Neuropharmacology*, 13(4): 505-513.
6. Mutso A.A., Radzicki D., Baliki M.N., Huang L., Banisadr GH., Centeno M.V., 2012. Abnormalities in hippocampal functioning with persistent pain. *Neuroscience*, 32(17): 5747-5756.
7. Padovan C., Guimaraes F., 2000. Restraint-induced hypoactivity in an elevated plus-maze. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33(1): 79-83.
8. Poleszak E., 2004. Antidepressant- and anxiolytic-like activity of magnesium in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 78(1): 7-12.
9. Pourmotabbed A., Motamedi F., Fathollahi Y., Mansouri F.A. Semnani S., 1998. Involvement of NMDA receptors and voltage-dependent calcium channels on augmentation of long-term potentiation in hippocampal CA1 area of morphine dependent rats. *Brain Research*, 804(1): 125-134.
10. Ramakers C., et al., 2003. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience letters*, 339(1): 62-66.
11. Riaza B.S. C., Perez R.M.M., Vaquero L.C., Baca G.E., 2012. New perspectives in glutamate and anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 100(4): 752-774.
12. Rocher C., Spedding M., Munoz C., Jay T.M., 2004. Acute stress-induced

23. Yamanaka Y., Kitamura N., Shinohara H., Takahashi K., Shibuya I., 2011. Analysis of GABA-induced inhibition of spontaneous firing in chick accessory lobe neurons. *Comparative Physiology A*, 198(3): 229-237.
24. Yu Y. Keita A., Shota I., Shigeharu K., Yo K., 2005. Realization of high strength and high ductility for AZ61 magnesium alloy by severe warm working. *Science and Technology of Advanced Material*, 6(2): 185-194.
25. Zager E., Black P.M., 1985. Neuropeptides in human memory and learning processes. *Neurosurgery*, 17(2): 355-369.
20. Waxman S.G., Cummins T.R., Dib-Hajj S.D., Black J.A., 2000. Voltage-gated sodium channels and the molecular pathogenesis of pain: a review. *Rehabilitation Research and Development*, 37(5): 517-528.
21. Wehry A.M., Beesdo-Baum K., Hennelly M.M., Connolly S.D., Strawn J.R., 2015. Assessment and treatment of anxiety disorders in children and adolescents. *Current Psychiatry Reports*, 17(52): 591-610.
22. Widiger T.A., Clark L.A., 2000. Toward DSM—V and the classification of psychopathology. *Psychological bulletin*, 126(6): 946-963.

