©2017 ASP Ins., *Afarand Scholarly Publishing Institute, Iran*
ISSN: 2252-0805 *Horizon of Medical Sciences 2017;23(4):293-299. DOI: 18869/acadpub.hms.23.4.293*

Effect of Crocin on Bax/Bcl-2 Ratio, Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes Activity in Liver Tissue of Chick Embryo Treated with Silver Nanoparticles

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Sadoughi S.D.* *PhD*

How to cite this article

Sadoughi S D. Effect of Crocin on Bax/Bcl-2 Ratio, Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes Activity in Liver Tissue of Chick Embryo Treated with Silver Nanoparticles. Horizon of Medical Sciences. 2017;23(4):293-299.

ABSTRACT

Aims Silver nanoparticles, through free radical production, can cause oxidative stress. The purpose of this study was to determine the effect of crocin on Bax/Bcl-2 ratio, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in liver tissue of chick embryo treated with silver nanoparticles.

Materials & Methods In this experimental study, 45 Ross 308 Fertilized chicken eggs were randomly divided into five groups (control and experimental groups). On day 10 of incubation, the control group received 0.5 ml of saline solution in an amniotic sac of embryos and experimental groups 1, 2, 3 and 4 were treated with one injection of 0.5 ml of silver nanoparticle 200 ppm and a size of 60 nm. On day 12 of incubation, the experimental groups 2, 3 and 4 were treated with crocin 0.5 mg/ml in concentrations of 100, 200 and 300 µg/ml. On day 20 of incubation, levels of Bax, Bcl-2, malondialdehyde (MDA) and antioxidant enzymes of the liver tissue were measured. Data were analyzed by SPSS 20 software, using one-way ANOVA and Tukey's post hoc test.

Findings In the group of silver nanoparticles compared to the control group, the levels of Bcl-2 and antioxidant enzymes decreased and Bax and malondialdehyde levels increased. In groups of silver nanoparticles with concentrations of 100, 200 and 300 µg/ml of crocin compared to the group of silver nanoparticles alone, the levels of Bcl-2 and antioxidant enzymes increased in dose-dependent manner, and Bax and malondialdehyde levels decreased in dose-dependent manner ($p<0.05$).

Conclusion Dose-dependent injection of crocin decreases oxidative stress, lipid peroxidation and apoptosis in liver tissue of chick embryo by decrease of toxicity of silver nanoparticles.

Keywords Nanoparticles; Apoptosis; Oxidative Stress; Crocin; Liver

CITATION LINKS

[1] Exposure, tissue biodistribution ... [2] Molecular toxicity mechanism ... [3] Cytotoxic effect of nanosilver particles on testicular ... [4] Status of biological evaluation on ... [5] Influence of nano-silver on graffian ... [6] Structural and functional hepatocyte ... [7] Oxidative stress, free radicals and ... [8] Free radicals, reactive oxygen species ... [9] Oxidative activation of antioxidant ... [10] Lipid peroxidation: Mechanisms ... [11] Role of oxidative stress and ... [12] The role of antioxidants and ... [13] Effects of alcoholic extract of Peganum ... [14] Molecular mechanisms of liver injury ... [15] The secret life of Bcl-2: Apoptosis ... [16] Environmental toxicity, oxidative ... [17] Control of Bcl-2 expression by ... [18] Crocus sativus biological active ... [19] The protective effects of Saffron ... [20] Study of protective effects of ... [21] Cancer chemopreventive and tumoricidal ... [22] Antinociceptive and anti-inflammatory ... [23] Evaluation of the effects of crocin on ... [24] Investigating the synergic effects of ... [25] In ovo injection of nano silver ... [26] The effect of aqueous extracts ... [27] The effect of breast milk odor on Effects of ... [28] Toxicity investigating of silver nanoparticles ... [29] Antioxidant status of rats administered ... [30] Oxidant/Antioxidant index evaluation ... [31] Histopathological studies and ... [32] Cytotoxic effect and apoptosis induction ... [33] Cytotoxicity and genotoxicity of silver ... [34] Effects of nanotoxicity on female ... [35] Evaluation of the cytotoxicity and ... [36] Expression of genes related to oxidative ... [37] Apoptotic effects of silver nanoparticles ... [38] Expression of apoptosis-Related genes ... [39] Protective effect of crocin on kidney ... [40] Protective Effect of Crocin on DNA ... [41] Nanostructured lipid dispersions ... [42] Safranal, aconstituent of Crocus ... [43] Crocin mitigates carbon tetrachloride-induced liver ... [44] Mitochondria in human pluripotent stem cell ... [45] Crocin protects against doxorubicin-induced myocardial...

*Young Researchers and Elite Club, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran

Correspondence
Address: Biology Department, Sciences Faculty, Payam-e-Noor University, 71 Mo'allem Boulevard, Mashhad, Iran. Post Box: 91735-433
Phone: +98 (51) 38683900
Fax: +98 (51) 38683001
damoon.sadoughi@mshdiau.ac.ir

Article History
Received: January 28, 2016
Accepted: August 08, 2017
ePublished: September 28, 2017

Copyright© 2017 ASP Ins. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

اثر کروسین بر نسبت Bax/Bcl-2، پراکسیداسیون لیپیدی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت کبد جنین جوجه تحت تیمار با نانوذرات نقره

سیددامون صدوقی* PhD
باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

چکیده

اهداف: نانوذرات نقره با تولید رادیکال آزاد سبب ایجاد استرس‌اکسیداتیو می‌شود هدف پژوهش حاضر، تعیین اثر کروسین بر نسبت Bax/Bcl-2، پراکسیداسیون لیپیدی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بافت کبد جنین جوجه تحت تیمار با نانوذرات نقره بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ٤٥ تخم‌مرغ نطفه‌دار نژاد راس ۳۰۸ به‌طور تصادفی به پنج گروه شاهد و گروه‌های تجربی تقسیم شدند. در روز ۱۰ انکوباسیون، گروه شاهد با یک‌بار تزریق ۰/۵میلی‌لیتر محلول سالین در کیسه آمنیون جنین‌ها و گروه‌های ۱، ۲، ۳ و ٤ تجربی با یک‌بار تزریق ۰/۵میلی‌لیتر نانوذره نقره ۲۰۰ppm و اندازه ٦۰نانومتر تیمار شدند. سپس گروه‌های ۲، ۳ و ٤ تجربی در روز ۱۲ انکوباسیون با یک‌بار تزریق ۰/۵میلی‌لیتر کروسین با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر تحت تیمار قرار گرفتند. در روز ۲۰ انکوباسیون، سطوح Bax، Bcl-2، مالون‌دی‌آلدئید و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بافت کبد سنجش شد. داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS 20 و آزمون‌های آنالیز واریانس یک‌طرفه و تعقیبی توکی تحلیل شدند.

یافته‌ها: در گروه نانوذرات نقره در مقایسه با گروه شاهد، سطوح Bcl-2 و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاهش و سطح بافتی Bax و مالون‌دی‌آلدئید افزایش یافت. در گروه‌های نانوذرات نقره با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر کروسین در مقایسه با گروه نانوذرات نقره به‌تنهایی، سطوح Bcl-2 و آنزیم‌های آنتی‌کسیدانی به‌صورت وابسته به دوز افزایش و سطح بافتی Bax و مالون‌دی‌آلدئید به‌صورت وابسته به دوز کاهش یافت (p<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: تزریق وابسته به دوز کروسین با کاهش سمیت ناشی از نانوذرات نقره موجب کاهش استرس‌اکسیداتیو، کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش آپوپتوز در بافت کبد جنین جوجه می‌شود.

کلیدواژه‌ها: نانوذرات، آپوپتوزیس، استرس‌اکسیداتیو، کروسین، کبد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۰۹
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۱۷
*نویسنده مسئول: damoon.sadoughi@mshdiau.ac.ir

مقدمه

نانوذرات نقره، ذرات کوچکی از فلز نقره با اندازه‌ای بین یک تا ۱۰۰نانومتر هستند و امروزه کاربردهای گسترده‌ای در علوم مختلف، به‌ویژه بیولوژی و پزشکی پیدا کرده‌اند. نانوذرات نقره دارای خواص ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدویروسی و ضدپروتوزوئرها هستند. همچنین نانوذرات نقره دارای خواص حرارتی، مکانیکی، مغناطیسی و نوری منحصربه‌فردی هستند که می‌توانند به‌منظور تحقیقات زیست‌پزشکی و بسیاری از بخش‌های صنعتی به‌طور گسترده مورد استفاده قرار گیرند[1]. با توجه به استفاده گسترده از نانوذرات نقره، نگرانی در مورد اثرات بیولوژیک آنها بر محیط زیست و سلامت انسان به‌وجود آمده است[2].

طی تحقیقات انجام‌شده نانوذرات نقره موجب کاهش فعالیت میتوکندری و افزایش معنی‌دار سطح سرمی لاکتات‌دهیدروژناز می‌شوند که این امر نشان‌دهنده تخریب سلولی است. همچنین می‌توانند با تغییر در مورفولوژی و نفوذپذیری غشا وارد سلول شده و با تاثیر در زنجیره تنفسی، تغییر ماده ژنتیکی و اختلال در تقسیم سلولی، سبب مرگ سلول‌ها شوند[3]. مشخص شده است نانوذرات نقره پس از ورود به جریان خون، در بافت‌های مختلف انباشته شده و موجب آسیب کبدی، کلیوی و نیز موجب آسیب بافت بیضه می‌شوند[4]. تحقیقات نشان داده است نانوذرات نقره دارای اثرات سمی بر بافت تخمدان بوده و با فعال‌کردن کاسپاز۳ در اثر افزایش رادیکال‌های آزاد حاصل از نانوذرات نقره، مسیر داخلی آپوپتوزیس را فعال می‌کنند. بنابراین فعال‌شدن مسیر آپوپتوزیس و ایجاد شرایط استرس‌اکسیداتیو تخمک‌گذاری را تحت تاثیر قرار می‌دهد[5].

کبد، اندام مرکزی برای تجزیه، سم‌زدایی و دفع مواد زاید از بدن است. طی عمل سم‌زدایی، فعال‌سازی میکروزوم‌های کبدی توسط آنزیم‌های سیتوکروم P450، سبب ایجاد متابولیت‌های ثانویه سمی و فعال می‌شود. این ترکیبات می‌توانند موجب آسیب بافت‌های مختلف از جمله کبد شوند[6]. رادیکال‌های آزاد طی واکنش‌های بیوشیمیایی متابولیزم طبیعی بدن تولید می‌شوند. همچنین می‌توانند منشا خارجی داشته باشند[7]. گونه‌های فعال اکسیژن به‌عنوان یکی از انواع رادیکال‌های آزاد که در اصطلاح عوامل اکسیدان خوانده می‌شوند، بسیار واکنش‌پذیر بوده و به غشای سلولی و اندامک‌های حیاتی مانند میتوکندری آسیب می‌رسانند[8]. همچنین رادیکال‌های آنیون سوپراکسید با شرکت در واکنش‌های سلولی سبب افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه مانند پراکسید هیدروژن می‌شوند که سمیت بیشتری در مقایسه با سایر رادیکال‌های آزاد دارد[8]. در صورت توقف مکانیزم‌های کنترلی و نیز تضعیف سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن، رادیکال‌های آزاد می‌توانند برای سلول و در نتیجه بافت‌ها مخرب باشند. همچنین عدم تناسب تولید رادیکال‌های آزاد و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی، شرایط را برای ایجاد استرس‌اکسیداتیو مهیا می‌کند[9]. تجمع درون‌سلولی رادیکال‌های آزاد موجب پراکسیدشدن لیپیدهای غشا، تغییر ساختار غشای سلولی و در نتیجه موجب اختلال در عملکرد طبیعی سلول می‌شود. محصول نهایی ناشی از پراکسیداسیون لیپیدها، مالون‌دی‌آلدئید (MDA) است[10].

آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که موجب غیرفعال‌شدن رادیکال‌های آزاد می‌شوند. همچنین می‌توانند غشاهای سلولی و اندامک‌های درون‌غشایی را در مقابل اکسیدان‌ها محافظت نمایند[11]. در تمام سلول‌ها و بافت‌ها ترکیباتی به‌نام آنتی‌اکسیدان برای حفظ هموستاز اکسیداتیو و مقابله با استرس‌اکسیداتیو وجود دارد. از جمله آنزیم‌های سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌توان به سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، گلوتاتیون‌پراکسیداز (GPX) و کاتالاز (CAT) اشاره کرد[12]. آنیون سوپراکسید توسط سوپراکسیددیسموتاز به اکسیژن و پراکسیدهیدروژن تبدیل می‌شود. آنزیم کاتالاز و گلوتاتیون‌پراکسیداز موجب تبدیل پراکسیدهیدروژن به آب و اکسیژن می‌شوند. تری‌پپتید گلوتاتیون، تیول غیرپروتئینی اصلی موجودات هوازی و فراوان‌ترین آنتی‌اکسیدان غیرآنزیمی داخل‌سلولی است[13].

آپوپتوزیس مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی است و به‌طور کلی دو مسیر در تحریک آن نقش دارد. مسیر بیرونی که به‌واسطه تحریک گیرنده‌های غشایی مرگ فعال می‌شود و مسیر درونی یا مسیر میتوکندریایی که توسط اعضای خانواده Bcl-2 تنظیم می‌شود[14]. Bcl-2 به‌عنوان متوقف‌کننده فرآیند آپوپتوزیس شناخته می‌شود. Bcl-2 یکی از پروتئین‌های مهم غشای خارجی میتوکندری است و با توجه به نقش سیتوکروم C سیتوزولی برای شروع آپوپتوزیس، بیان بیش از حد Bcl-2 سبب ممانعت از انتشار سیتوکروم C به خارج میتوکندری می‌شود که فرآیند آپوپتوزیس را مهار می‌کند.

لازم به ذکر است فرآیند آپوپتوزیس تحت تاثیر ژن‌های خانواده Bcl-2 شامل Bcl-2، Bcl-Xl، Bax، Bad و خانواده کاسپاز تنظیم می‌شود[15]. مطالعات نشان داده است شرایط استرس‌اکسیداتیو می‌تواند محرکی برای شروع فرآیند آپوپتوزیس باشد. همچنین مشخص شده است افزایش گونه‌های اکسیژن فعال با القای استرس‌اکسیداتیو و آسیب اکسیداتیو DNA می‌تواند موجب شروع فرآیند آپوپتوزیس شود[16]. مشخص شده است که Bcl-2 خود فعالیت آنتی‌اکسیدانی انجام نمی‌دهد، اما ممکن است اثر غیرمستقیمی در افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی داخل سلول داشته باشد. بنابراین افزایش پروتئین Bcl-2 به سلول‌ها اجازه مقابله بهتر با رادیکال‌های آزاد را می‌دهد و این امر در نتیجه افزایش فعالیت آنزیم‌های سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی به‌دست می‌آید[17]. با توجه به نقش رادیکال‌های آزاد در القای آپوپتوزیس و ایجاد شرایط استرس‌اکسیداتیو، ترکیباتی که بتوانند موجب مهار رادیکال‌های آزاد در سلول‌ها شوند، از اهمیت بالایی برخوردار هستند.

زعفران با نام علمی *کروکوس ساتیووس* (*Crocus sativus L*) گیاهی چندساله و از خانواده زنبق (ایریداسه) است. قسمت مورد استفاده این گیاه، انتهای خامه و کلاله سه‌شاخه آن است. طعم تلخ زعفران ناشی از وجود ماده‌ای به‌نام پیکروکروسین است. این ماده طی فرآوری به آلدئیدی معطر به‌نام سافرانال تبدیل می‌شود. کروسین گلیکوزیدی متشکل از کاروتنوئیدی به‌نام کروستین و قند است که رنگ زعفران را ایجاد می‌کنند. کروسین، کروستین و سافرانال به‌عنوان جزء بیولوژیک اصلی و فعال زعفران شناخته می‌شوند[18] که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بوده و قابلیت ازبین‌بردن رادیکال‌های آزاد را دارند و می‌توانند منجر به کاهش قابل ملاحظه آسیب‌های اکسیداتیو در بافت‌های ایسکمیک شوند[19].

مشخص شده است کروسین با اثر محافظتی و آنتی‌اکسیدانی خود موجب کاهش آسیب بافت بیضه ناشی از تزریق سیکلوفسفامید می‌شود[20]. زعفران بر طیف وسیعی از تومورها از جمله لوکمی، کارسینوم تخمدان و پستان، آدنوکارسینوم روده بزرگ، رابدومیوسارکوما، پاپیلوما و کارسینوم سلول سنگفرشی اثر مهاری دارد[21]. همچنین تحقیقات، اثرات ضددرد و ضدالتهاب عصاره زعفران را نشان داده است[22]. کروسین در بیماری دیابت و کاهش عوارض کلیوی دارای نقش حفاظتی بوده و سطوح سرمی گلوکز، اوره و کراتینین را در موش‌های صحرایی دیابتی کاهش می‌دهد. به‌نظر می‌رسد اثرات ضددیابتی کروسین ناشی از خواص آنتی‌اکسیدانی آن است[23].

با توجه به روند رو به رشد استفاده از گیاهان دارویی و خواص آنتی‌اکسیدانی کروسین، پژوهش حاضر با هدف تعیین اثر کروسین بر نسبت Bax/Bcl-2، پراکسیداسیون لیپیدی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت کبد جنین جوجه تحت تیمار با نانوذرات نقره انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، ۴۵ عدد تخم‌مرغ نطفه‌دار نژاد راس ۳۰۸ با میانگین وزنی ۴/۲۲±۸٤/۱۵گرم به‌طور تصادفی به پنج گروه ۹تایی شاهد و گروه‌های تجربی تقسیم شدند. نمونه‌های گروه شاهد در روز ۱۰ انکوباسیون با یک‌بار تزریق ۰/۵میلی‌لیتر محلول سالین تحت تیمار قرار گرفتند. تمامی گروه‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ تجربی در مرحله اول در روز ۱۰ انکوباسیون با یک‌بار تزریق ۰/۵میلی‌لیتر نانوذره نقره (سیگما- آلدریچ؛ آلمان) ۲۰۰ppm (۲۰۰ قسمت در میلیون) و اندازه ۶۰نانومتر تیمار شدند. سپس گروه‌های ۲، ۳ و ۴ تجربی در روز ۱۲ انکوباسیون با یک‌بار تزریق ۰/۵میلی‌لیتر کروسین (سیگما- آلدریچ؛ فرانسه) به ترتیب با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر تحت تیمار قرار گرفتند.

لازم به ذکر است غلظت ۹۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر کروسین به‌عنوان LD50 (دوز کشندگی) در نظر گرفته شد. همچنین ED50 (دوز موثر) کروسین در محدوده بین ۵۰ تا ۴۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. به همین دلیل غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر برای تیمار انتخاب شدند.

تخم‌مرغ‌ها به‌مدت ۲۰ روز در دستگاه انکوباسیون (دستگاه جوجه‌کشی) مدل M-32 (طیوران صنعت فاخته؛ ایران)، در دمای ۳۸°C و رطوبت نسبی ۶۵% قرار داده شدند[24]. در روز ۱۰ و ۱۲ انکوباسیون، ابتدا محل کیسه آمنیون جنین با استفاده از روش نوربینی مشخص شد و تمام تزریقات یک‌بار و توسط سرنگ با سوزن شـماره ۲۵ به مایع آمنیوتیک انجام شد. ابتدا محل تزریق با الکل ضدعفونی و سپس تزریق صورت گرفت. در گام بعد برای جلوگیری از ورود میکروب‌ها، محل تزریق توسط پارافین مسدود شد[25]. در روز ۲۰ انکوباسیون، جنین جوجه از تخم‌مرغ‌ها خارج و سپس بافت کبد از بدن جنین‌ها خارج شد که پس از شست‌وشو با محلول سالین به‌همراه بافر تریس (سیگما- آلدریچ؛ آلمان) به‌مدت ۵ دقیقه با دستگاه هموژنایزر مدل T25 digital ULTRA-TURRAX (IKA؛ آلمان) با ۵۰۰۰ دور در دقیقه هموژنیزه شد. محلول هموژنیزه‌شده توسط دستگاه سانتریفوژ یخچال‌دار مدل Z366 (Hermle؛ آلمان) سانتریفوژ شد. برای جلوگیری از تخریب آنزیم‌ها و پروتئین‌ها، تمامی مراحل در دمای ۴°C (سانتریفوژ یخچال‌دار) انجام شد و از محلول ۰/۵میلی‌مولار فنیل‌متیل‌سولفونیل‌فلوراید (سیگما- آلدریچ؛ آلمان) به‌عنوان مهارکننده پروتئازها استفاده شد[26]. پس از انجام سانتریفوژ، محلول رویی شفاف از بخش زیرین رسوب‌کرده تفکیک شد و برای سنجش پارامترهای Bcl-2، Bax، سوپراکسیددیسموتاز، گلوتاتیون‌پراکسیداز، کاتالاز و مالون‌دی‌آلدئید مورد استفاده گرفت.

سطح سیتوپلاسمی Bcl-2 با حساسیت ۹/۳۷۵پیکوگرم بر میلی لیتر و محدوده ۱۰۰۰-۱۵/۶۲۵پیکوگرم بر میلی‌لیتر، Bax با حساسیت ۰/۱۸۸نانوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده ۲۰-۰/۳۱۲نانوگرم بر میلی‌لیتر، SOD با حساسیت ۹/۳۷۵پیکوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده ۱۰۰۰-۱۵/۶پیکوگرم بر میلی‌لیتر، GPX با حساسیت ۱۸/۷۵پیکوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده ۲۰۰۰-۳۱/۲۵پیکوگرم بر میلی‌لیتر، CAT با حساسیت ۱۸/۷۵میلی‌واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر و محدوده ۲۰۰۰-۳۱/۲میلی‌واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر و نیز میزان MDA با حساسیت ۱۸/۷۵نانوگرم بر میلی‌لیتر و محدوده ۲۰۰۰-۳۱/۲۵نانوگرم بر میلی‌لیتر در بافت کبد توسط روش الایزا با استفاده از دستگاه الایزاریدر مدل 2100 (Stat Fax؛ ایالات متحده) و کیت‌های مخصوص (Finetest؛ چین) سنجش شد. لازم به ذکر است سنجش‌ها براساس روش موجود در دفترچه راهنمای شرکت سازنده کیت صورت گرفت.

اطلاعات به‌دست‌آمده توسط نرم‌افزار آماری SPSS 20 تجزیه و تحلیل شد. با توجه به اینکه نتایج به‌دست‌آمده کمی بود، فرض طبیعی‌بودن توزیع داده‌ها توسط آزمون کولموگروف- اسمیرنوف مورد بررسی قرار گرفت. برای مقایسه میانگین‌ها بین گروه‌های مورد مطالعه از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و برای مقایسه زوج

گروه‌ها از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. همچنین داده‌ها به‌صورت میانگین آماری (میانگین±انحراف‌معیار) گزارش شد.

یافته‌ها

در گروه تحت تیمار با نانوذرات نقره ۲۰۰ppm در مقایسه با گروه شاهد، سطوح Bcl-2 و آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز، گلوتاتیون‌پراکسیداز و کاتالاز بافت کبد به‌طور معنی‌داری کاهش و سطح بافتی Bax و مالون‌دی‌آلدئید به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<۰/۰۵$).

در گروه‌های تحت تیمار با نانوذرات نقره ۲۰۰ppm همراه با غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر کروسین در مقایسه با گروه تحت تیمار با نانوذرات نقره ۲۰۰ppm، سطوح Bcl-2 و آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز، گلوتاتیون‌پراکسیداز و کاتالاز بافت کبد به‌صورت وابسته به دوز تزریقی افزایش و سطح بافتی Bax و مالون‌دی‌آلدئید به‌صورت وابسته به دوز تزریقی کاهش پیدا کرد ($p<۰/۰۵$؛ جدول ۱).

جدول ۱) مقایسه میانگین سطوح Bax، Bcl-2، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و مالون‌دی‌آلدئید در بافت کبد جنین جوجه در گروه شاهد و گروه‌های تجربی

گروه شاهد	گروه نانوذرات نقره ۲۰۰ppm	گروه نانوذرات نقره+کروسین۱۰۰	گروه نانوذرات نقره+کروسین۲۰۰	گروه نانوذرات نقره+کروسین۳۰۰	سطح معنی‌داری
Bax (نانوگرم بر میلی‌لیتر)					
۰/۸۵±۰/۰۹	^{a}۲/۳۸±۰/۱۵	^{b}۱/۶۲±۰/۰۸	^{bc}۱/۳۸±۰/۱۱	^{bcd}۱/۰۵±۰/۱۳	۰/۰۰۵
Bcl-2 (پیکوگرم بر میلی‌لیتر)					
۷۸/۰۵±۴/۱۶	^{a}۲۳/۸۵±۲/۵۶	^{b}۳۸/۰۵±۴/۲۴	^{bc}۵۵/۴۳±۲/۸۷	^{bcd}۶۷/۸۲±۵/۲۰	۰/۰۰۹
سوپراکسیددیسموتاز (پیکوگرم بر میلی‌لیتر)					
۴۸/۱۱±۲/۶۳	^{a}۱۶/۸۸±۱/۵۳	^{b}۲۵/۱۴±۳/۰۵	^{bc}۳۲/۰۸±۲/۶۴	^{bcd}۴۰/۰۷±۳/۳۵	۰/۰۱۲
گلوتاتیون‌پراکسیداز (پیکوگرم بر میلی‌لیتر)					
۱۱۲/۵۱±۵/۵۳	^{a}۴۴/۷۱±۴/۷۸	^{b}۵۸/۲۲±۴/۱۷	^{bc}۷۳/۰۳±۵/۰۵	^{bcd}۸۸/۱۵±۳/۳۵	۰/۰۰۸
کاتالاز (میلی‌واحد بین‌المللی بر میلی‌لیتر)					
۱۲۰/۵۲±۴/۱۴	^{a}۳۵/۰۴±۳/۶۲	^{b}۶۳/۷۰±۳/۴۰	^{bc}۸۰/۳۶±۵/۱۱	^{bcd}۹۲/۱۸±۴/۳۰	۰/۰۰۳
مالون‌دی‌آلدئید (نانوگرم بر میلی‌لیتر)					
۳۶/۴۲±۴/۲۵	^{a}۹۳/۵۲±۳/۸۸	^{b}۷۰/۱۴±۵/۳۰	^{bc}۵۷/۱۸±۳/۷۸	^{bcd}۴۸/۷۳±۳/۰۹	۰/۰۱۱

a: $p<۰/۰۵$ در مقایسه با گروه شاهد؛ b: $p<۰/۰۵$ در مقایسه با گروه تحت تیمار با نانوذرات نقره؛ c: $p<۰/۰۵$ در مقایسه با گروه تحت تیمار با نانوذرات نقره+کروسین۱۰۰؛ d: $p<۰/۰۵$ در مقایسه با گروه تحت تیمار با نانوذرات نقره+کروسین۲۰۰

بحث

پژوهش حاضر به بررسی اثر کروسین بر نسبت Bax/Bcl-2، پراکسیداسیون لیپیدی و فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز، گلوتاتیون‌پراکسیداز و کاتالاز در بافت کبد جنین جوجه تحت تیمار با نانوذرات نقره پرداخت.

در این مطالعه مشخص شد سطح Bcl-2 و آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز، گلوتاتیون‌پراکسیداز و کاتالاز بافت کبد در گروه تحت تیمار با نانوذرات نقره ۲۰۰ppm در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. همچنین سطح بافتی Bax و مالون‌دی‌آلدئید به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. در پژوهشی که به بررسی اثر نانوذرات نقره بر پراکسیداسیون لیپیدی و کیفیت پارامترهای اسپرم در موش‌های نر پرداخت، گزارش شد نانوذرات نقره با افزایش پراکسیداسیون لیپیدی سبب کاهش شاخص‌های لقاحی اسپرم می‌شود و اثرات سمی آن به میزان دوز تزریقی وابسته است[27]. مطالعه‌ای دیگر نشان داد نانوذرات نقره با تولید رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن سمیت ایجاد می‌کند و سبب آسیب بافت کبد می‌شود. همچنین عنوان شد رادیکال‌های آزاد حاصل از نانوذرات نقره با پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش سیالیت غشا و ازبین‌رفتن ساختمان و عملکرد آن سبب آسیب بافت کبد و متعاقباً منجر به افزایش غلظت آنزیم‌های کبدی در خون می‌شوند[28].

طی تحقیقات انجام‌شده تجویز خوراکی غلظت‌های ۱۰۰، ۱۰۰۰ و ۵۰۰۰میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات نقره به‌صورت وابسته به دوز سبب افزایش سطح سرمی مالون‌دی‌آلدئید و کاهش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسیددیسموتاز و گلوتاتیون‌پراکسیداز شد. همچنین مشخص شد غلظت‌های مذکور سبب بروز ناهماهنگی بین آنزیم‌ها و تضعیف سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌شود[29]. مطالعه‌ای به بررسی شاخص اکسیدان- آنتی‌اکسیدان و پراکسیداسیون لیپیدی در کبد جنین موش‌های صحرایی تحت تیمار با نانوذرات نقره پرداخت و گزارش کرد نانوذرات نقره به‌واسطه تولید رادیکال‌های آزاد با فرآیند استرس‌اکسیداتیو و تغییر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مرتبط است. همچنین مشخص شد نانوذرات نقره موجب افزایش پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود و فرآیندهای درون‌سلولی استرس‌اکسیداتیو را در کبد جنین موش‌های صحرایی در یک روند وابسته به دوز تحت تاثیر قرار می‌دهد[30]. در مطالعه‌ای دیگر گزارش شد نانوذرات نقره سبب کاهش معنی‌دار سطح آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسیددیسموتاز و گلوتاتیون‌پراکسیداز در کبد مدل ماهی تیلاپیا می‌شود[31].

مطالعات اخیر نشان می‌دهد رادیکال‌های آزاد حاصل از مکانیزم کاتالیستی نانوذرات نقره از طریق فرآیند پراکسیداسیون لیپیدی به اسیدهای چرب اشباع‌نشده موجود در فسفولیپیدهای غشا آسیب می‌رساند و موجب پیرشدن سلول یا فعال‌شدن مسیر داخلی آپوپتوز می‌شود[32]. پژوهشی به بررسی تاثیر نانوذرات نقره سنتزشده به‌روش احیای شیمیایی بر فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و گلوتاتیون‌پراکسیداز پلاسما در مدل موش صحرایی پرداخت. نتایج گویای کاهش وابسته به دوز سطح سرمی آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و گلوتاتیون‌پراکسیداز بود[13]. به‌منظور یافتن این موضوع که نانوذرات نقره چه تغییری در سطح سرمی آنزیم‌های کبدی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و پراکسیداسیون لیپیدی گلبول‌های قرمز ایجاد می‌کند، مطالعه‌ای صورت گرفت و گزارش شد در موش‌های تحت تیمار با نانوذرات نقره افزایش معنی‌داری در غلظت سرمی آنزیم‌های کبدی و مالون‌دی‌آلدئید مشاهده می‌شود. همچنین نانوذرات نقره موجب کاهش معنی‌داری در میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گلوتاتیون‌پراکسیداز

گلبول‌های قرمز خون می‌شود. بنابراین محققان به این نتیجه رسیدند که نانوذرات نقره از طریق تولید رادیکال آزاد سبب تخریب سلول‌های خونی و کبدی می‌شود[33].

تحقیقات نشان داد نانوذرات نقره می‌تواند از طریق گردش خون به جنین منتقل شده و سبب افزایش ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن شود و با افزایش سایتوکاین‌های التهابی اختلالات تراتوژنیک ایجاد نماید. همچنین گزارش شد نانوذرات نقره می‌تواند با ماکرومولکول‌های زیستی وارد واکنش شده و با اختلال در هموستاز داخل‌سلولی سبب القای فرآیند آپوپتوز شود[34]. در مطالعه‌ای دیگر عنوان شد نانوذرات نقره با تغییر در بیان یك سری پروتئین‌های داخل‌سلولی بافت بیضه سبب القای آپوپتوز و آسیب DNA در اسپرم موش صحرایی می‌شود. همچنین شدت تغییرات ایجادشده بستگی به دوز نانوذرات داشته و با افزایش غلظت افزایش می‌یابد[35]. تحقیقات روی مغز تعدادی موش تحت تیمار با نانوذرات نقره نشان داد نانوذرات با تضعیف سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی مغز سبب القای استرس‌اکسیداتیو می‌شود. این امر موجب تغییر در بیان ژن‌ها، القای آپوپتوز و ایجاد سمیت در سلول‌های مغزی می‌شود[36].

در بررسی اثرات آپوپتوتیك نانوذرات نقره پوشش‌دارشده با عصاره برگ آویشن شیرازی بر رده سلول‌های هپاتوکارسینوم مشخص شد در هسته سلول‌های تحت تیمار با نانوذرات نقره تغییرات موفولوژیك مانند تراکم کروماتین‌ها و تغییرات در غشای سلول‌ها دیده می‌شود که این تغییرات در انتها منجر به القای آپوپتوز می‌شود. همچنین گزارش شد در سلول‌هایی که دچار مرگ آپوپتوزی شده‌اند تغییرات مورفولوژیك متعددی از جمله انقباض سلولی، ازدست‌دادن چسبندگی به ماتریکس خارج‌سلولی، تراکم کروماتین‌ها، ازهم‌گسیختگی هسته و قطعه‌قطعه‌شدن هسته مشاهده می‌شود[37]. در پژوهشی که به بررسی اثرات آپوپتوتیک تزریق داخل‌صفاقی نانوذرات نقره بر مغز موش‌های آزمایشگاهی پرداخت، مشخص شد نانوذرات نقره سبب القای آپوپتوز در سلول‌های مغزی می‌شود. این اثر با افزایش دوزهای تزریقی نانوذرات نقره افزایش می‌یابد، ولی وابسته به طول مدت تزریق نیست. همچنین عنوان شد نانوذرات نقره می‌تواند آنزیم‌های میتوکندریایی کاسپازی به‌ویژه کاسپاز۳ را فعال و سبب القای فرآیند آپوپتوز شود[37]. تحقیقات نشان داد نانوذرات نقره با تغییر در بیان ژن‌های دخیل در فرآیند آپوپتوز در سلول‌های هیپوکامپ موش صحرایی آپوپتوز را القا می‌کند. همچنین مشخص شد نانوذرات نقره می‌تواند موجب افزایش بیان ژن آنتی‌آپوپتوتیک Bcl-2 و کاهش بیان ژن پروآپوپتوتیک Bax در هیپوکامپ موش‌های تحت تیمار با نانوذرات نقره شود[38].

در این مطالعه مشخص شد سطح Bcl-2 و آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز، گلوتاتیون‌پراکسیداز و کاتالاز بافت کبد در گروه‌های تحت تیمار با نانوذرات نقره ۲۰۰ppm و غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر کروسین در مقایسه با گروه تحت تیمار با نانوذرات نقره ۲۰۰ppm به‌صورت وابسته به دوز افزایش یافت. همچنین سطح بافتی Bax و مالون‌دی‌آلدئید به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. در مطالعه‌ای که به بررسی اثر محافظتی کروسین بر عملکرد کلیه موش‌های صحرایی دیابتی پرداخت، مشخص شد مصرف وابسته به دوز کروسین می‌تواند موجب کاهش سطح سرمی مالون‌دی‌آلدئید در موش‌های صحرایی دیابتی شود. همچنین گزارش شد کروسین از طریق مهار استرس‌اکسیداتیو و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در کاهش آسیب کلیوی ناشی از نفروپاتی دیابتی موثر است[39]. در پژوهشی دیگر عنوان شد کروسین، غلظت بافتی مالون‌دی‌آلدئید را در بافت ایسکمیك کورتکس مغز به‌طور معنی‌داری کاهش و میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و گلوتاتیون‌پراکسیداز را به‌طور معنی‌داری افزایش می‌دهد. همچنین گزارش شد کروسین دارای اثرات محافظتی در مقابل آسیب اکسیداتیو ایسکمیك و ادم مغزی در مدل ایسکمی مغزی موش صحرایی است. این اثر احتمالاً از طریق افزایش ظرفیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش تولید رادیکال‌های آزاد اعمال می‌شود[19].

پژوهشی با هدف تعیین اثر محافظتی کروسین بر آسیب DNA اسپرم موش‌های صحرایی تحت تیمار با سیکلوفسفامید انجام شد و نتایج گویای توانایی کروسین در کاهش میزان مالون‌دی‌آلدئید و کاهش آسیب اکسیداتیو DNA بود. همچنین گزارش شد کروسین با کاهش رادیکال‌های آزاد ناشی از سیکلوفسفامید، اسیدهای چرب غیراشباع موجود در غشای اسپرم را محافظت کرده و از شروع مجموعه‌ای از واکنش‌های شیمیایی تحت عنوان پراکسیداسیون لیپیدی جلوگیری می‌کند[40]. در پژوهشی دیگر مشخص شد کروسین می‌تواند با افزایش آنزیم آنتی‌اکسیدانی سوپراکسیددیسموتاز و کاهش مالون‌دی‌آلدئید سبب بهبود تغییرات هیستوپاتولوژیک بیضه در موش‌های سوری تحت تیمار با سیکلوفسفامید شود[20]. همسو با نتایج پژوهش حاضر مشخص شد کروسین پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش می‌دهد و موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسیددیسموتاز، گلوتاتیون‌پراکسیداز و کاتالاز می‌شود. این اثرات به توانایی کروسین در تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی بدن نسبت داده شد[41]. تحقیقات نشان داد عصاره زعفران می‌تواند موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپراکسیددیسموتاز، گلوتاتیون‌پراکسیداز و کاتالاز در مدل ایسکمی مغزی حاد موش صحرایی به‌دنبال بستن شریان میانی مغز شود. گزارش شد خواص آنتی‌اکسیدانی کروسین موجب مهار مرگ نورون‌ها به‌دنبال ایسکمی مغزی می‌شود. همچنین کروسین آنتی‌اکسیدانی است که می‌تواند از مرگ نرون‌ها بر اثر عوامل آپوپتوتیک داخلی و خارجی جلوگیری کند[42]. گزارش شده است کروسین آسیب اکسیداتیو کبد را در مدل موش‌های صحرایی دیابتی کاهش می‌دهد و با کاهش استرس‌اکسیداتیو آپوپتوز را مهار می‌کند[43].

با توجه به اینکه مسیرهای آپوپتوز در سلول از طریق تغییر در بیان برخی ژن‌ها به‌ویژه نسبت Bax/Bcl-2 تنظیم می‌شود، مقایسه سطح پروتئین‌های Bax و Bcl-2 می‌تواند الگوی آپوپتوز را در سلول‌ها مشخص نماید[44]. در مطالعه حاضر کاهش سطح بافتی پروتئین Bax و افزایش پروتئین Bcl-2 در گروه‌های تحت تیمار با نانوذرات نقره ppm ۲۰۰ و غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰میکروگرم بر میلی‌لیتر کروسین، احتمالاً بیانگر این مطلب است که مسیر آپوپتوز در بافت کبد گروه‌های مذکور غیرفعال شده است. با توجه به اینکه نانوذرات نقره با بیان بیش از حد فاکتور نکروزکننده تومور آلفا موجب التهاب و شروع فرآیند آپوپتوز در بافت‌های مختلف می‌شود[16]، احتمالاً کروسین در کاهش التهاب ناشی از نانوذرات نقره و مهار آپوپتوز موثر است. همچنین کروسین می‌تواند از طریق تنظیم مسیرهای التهابی و مهار آپوپتوز موجب محافظت سلول‌های قلبی در برابر دوکسوروبیسین شود[45]. نتایج مطالعات ذکرشده با نتایج پژوهش حاضر همسو است و نشان‌دهنده اثرات آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌آپوپتوتیک کروسین بر بافت کبد جنین جوجه تحت تیمار با نانوذرات نقره است.

از محدودیت‌های این مطالعه، عدم امکانات لازم به منظور شناخت دقیق مکانیسم مولکولی اثر کروسین در کاهش آپوپتوزیس،

پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت کبد جنین جوجه تحت تیمار با نانوذرات نقره بود.
پیشنهاد می‌شود مطالعات تکمیلی برای شناخت دقیق مسیر مولکولی اثر کروسین در کاهش استرس‌اکسیداتیو و مهار آپوپتوز القاشده توسط نانوذرات نقره در بافت کبد انجام شود.

نتیجه‌گیری

تزریق وابسته به دوز کروسین با کاهش سمیت ناشی از نانوذرات نقره موجب کاهش استرس‌اکسیداتیو، کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و کاهش آپوپتوز در بافت کبد جنین جوجه می‌شود.

تشکر و قدردانی: نویسنده مقاله بر خود لازم می‌داند از باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد کمال تشکر و قدردانی را به‌عمل آورد.

تاییدیه اخلاقی: تمام مراحل این پژوهش براساس دستورالعمل و قوانین بین‌المللی کار با حیوانات آزمایشگاهی زیر نظر باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد در سال ۱۳۹۵ طراحی و اجرا شد.

تعارض منافع: موردی از طرف نویسندگان بیان نشده است.

سهم نویسندگان: سیددامون صدوقی (نویسنده)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیل‌گر آماری/نگارنده بحث (۱۰۰%).

منابع مالی: این پژوهش با حمایت مالی باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی انجام شده است.

منابع

1- Wen R, Hu L, Qu G, Zhou Q, Jiang G. Exposure, tissue biodistribution, and biotransformation of nanosilver. NanoImpact. 2016;2:18-28.
2- McShan D, Ray PC, Yu H. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. J Food Drug Anal. 2014;22(1):116-27.
3- Rezazadeh-Reyhani Z, Razi M, Malekinejad H, Sadrkhanlou R. Cytotoxic effect of nanosilver particles on testicular tissue: Evidence for biochemical stress and Hsp70-2 protein expression. Environ Toxicol Pharmacol. 2015;40(2):626-38.
4- Tang J, Xi T. Status of biological evaluation on silver nanoparticles. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi. 2008;25(4):958-61.
5- Ghorbanzadeh V, Moshtaghian J, Ebadi AG, Bavand Vandechal O. Influence of nano-silver on graffian follicles via intraperitoneal injection in rats. Euro J Exp Biol. 2012;2(4):1367-9.
6- Gissen P, Arias IM. Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease. J Hepatol. 2015;63(4):1023-37.
7- Gebicki JM. Oxidative stress, free radicals and protein peroxides. Arch Biochem Biophys. 2016;595:33-9.
8- Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. Chem Biol Interact. 2014;224:164-75.
9- Winyard PG, Moody CJ, Jacob C. Oxidative activation of antioxidant defence. Trends Biochem Sci. 2005;30(8):453-61.
10- Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. Biochem Biophys Res Commun. 2005;338(1):668-76.
11- Bjorklund G, Chirumbolo S. Role of oxidative stress and antioxidants in daily nutrition and human health. Nutrition. 2017;33:311-21.
12- Limon-Pacheco J, Gonsebatt ME. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. Mutat Res. 2009;674(1-2):137-47.
13- Karam Sichani S, Naghsh N, Razmi N. Effects of alcoholic extract of Peganum harmala L. on malondialdehyde concentration and catalaseand glutathione peroxidase activity in mice treated with nanosilver particles. J Mazandaran Univ Med Sci. 2012;22(95):10-7. [Persian]
14- Wang K. Molecular mechanisms of liver injury: Apoptosis or necrosis. Exp Toxicol Pathol. 2014;66(8):351-6.
15- Laulier C, Lopez BS. The secret life of Bcl-2: Apoptosis-independent inhibition of DNA repair by Bcl-2 family members. Mutat Res. 2012;751(2):247-57.
16- Franco R, Sánchez-Olea R, Reyes-Reyes EM, Panayiotidis MI. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à trois. Mutat Res. 2009;674(1-2):3-22.
17- Hildeman DA, Mitchell T, Aronow B, Wojciechowski S, Kappler J, Marrack P. Control of Bcl-2 expression by reactive oxygen species. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100(25):15035-40.
18- Liakopoulou-Kyriakides M, Kyriakidis DA. Crocus sativus biological active constituents. Stud Nat Prod Chem. 2002;26(G):293-312.
19- Vakili A, Eianali MR, Bandegi AR. The protective effects of Saffron against the oxidative damage in a transient model of focal cerebral ischemia in rats. Tehran Univ Med J. 2011;69(7):405-12. [Persian]
20- Bakhtiary Z, Shahrooz R, Ahmadi A, Malekinejad H, Mostafavi M. Study of protective effects of crocin on testicular histomorphometryand serological parameters incyclophosphamide on treated adult mice. J Urmia Univ Med Sci. 2014;25(7): 663-73. [Persian]
21- Abdullaev FI. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (Crocus sativus L.). Exp Biol Med. 2002;227(1):20-5.
22- Hosseinzadeh H, Younesi HM. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Crocus sativus L. stigma and petal extracts in mice. BMC Pharmacol. 2002;2:7-15.
23- Samadi H, Javadi S, Asri Sh. Evaluation of the effects of crocin on the serum levels of glucose, insulin, urea, creatinine and β2m in healthy and streptozotocin-induced diabetic rats. J Urmia Univ Med Sci.2015;26(9):802-12. [Persian]
24- Sadooghi D, Zafar Balanzhad S, Baharara J, Nezhad Shahrokh Abadi Kh. Investigating the synergic effects of ethanolic extract of allium sativum L and electromagnetic field with low frequency on angiogenesis in chick chorioallantoic membrane (In Vivo). J Shahid Sadoughi Univ Med Sci. 2013;21(4):493-504. [Persian]
25- Saki AA, Salary J. In ovo injection of nano silver, thyme and savory extracts to broiler breeders eggs and their effect on post-hatch immunological parameters. Animal Sci J. 2014;101:71-8. [Persian]
26- Malek-Mohammadi R, Roghani M, Salami M. The effect of aqueous extracts of Melissa officinalis on the oxidative stress indices in the midbrain tissue. Feyz. 2015;19(1):8-14. [Persian]
27- Layali E, Tahmasbpour E, Jorsaraei SGA. Effects of silver nanoparticles on lipid peroxidation and quality of

37- Khorasani N, Baharara J, Iranbakhsh AR, Ramezani T. Apoptotic effects of silver nanoparticles coated with Zataria multiflora leaves extract on HepG2 cell line. Feyz. 2016;19(6):457-67. [Persian]
38- Ghooshchian M, Khodarahmi P, Tafvizi F. Expression of apoptosis-Related genes bcl-2 and bax in rat brain hippocampus, followed by intraperitoneal injection of nanosilver. Iran South Med J. 2016;19(2):185-93. [Persian]
39- Yaribeygi H, Mohammadi M. Protective effect of crocin on kidney performance in chronic uncontrolled hyperglycemia-induced nephropathy in rat. J Zanjan Univ Med Sci Health Serv. 2017;25(109):36-49. [Persian]
40- Bakhtiari Z, Shahrooz R, Ahmadi A, Soltanali F. Protective Effect of Crocin on DNA Damage of Sperm and in Vitro Fertilization (IVF) in Adult Male Mice Treated with Cyclophosphamide. J Mazandaran Univ Med Sci. 2014;24(118):45-59. [Persian]
41- Esposito E, Drechsler M, Mariani P, Panico AM, Cardile V, Crascì L, et al. Nanostructured lipid dispersions for topical administration of crocin, a potent antioxidant from saffron (Crocus *sativus* L.). Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2017;71:669-77.
42- Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR. Safranal, aconstituent of Crocus sativus (saffron), attenuatedcerebral ischemia induced oxidative damage in rat hippocampus. J Pharm Pharm Sci. 2005;8(3):394-9.
43- Bahashwan S, Hassan MH, Aly H, Ghobara MM, El-Beshbishy HA, Busati I. Crocin mitigates carbon tetrachloride-induced liver toxicity in rats. J Taibah Univ Sci. 2015;10(2):140-9.
44- TeSlaa T, Setoguchi K, Teitell MA. Mitochondria in human pluripotent stem cell apoptosis. Semin Cell Dev Biol. 2016;52:76-83.
45- Elsherbiny NM, Salama MF, Said E, El-Sherbiny M, Al-Gayyar MM. Crocin protects against doxorubicin-induced myocardial toxicity in rats through down-regulation of inflammatory and apoptic pathways. Chem Biol Interact. 2016;247:39-48.
sperm parameters in male rats. J Babol Univ Med Sci. 2016;18(2):48-55. [Persian]
28- Seyedalipour B, Arefifar A, Khanbabaee R, Hoseini S M. Toxicity investigating of silver nanoparticles on ALT, AST, ALP and histopathological changes in NMRI mice. J Mazandaran Univ Med Sci. 2015;25(124):183-93. [Persian]
29- Adeyemi OS, Faniyan TO. Antioxidant status of rats administered silver nanoparticles orally. J Taibah Univ Sci. 2014;9(3):182-6.
30-Honarvar F, Vaezi G, Nourani M, Kamrani A, Sadeghnezhad E. Oxidant/Antioxidant index evaluation in the rat embryo induced by Nano-silver particle. New Cell Mol Biotechnol J. 2016;6(23):53-60. [Persian]
31- Govindasamy R, Rahuman AA. Histopathological studies and oxidative stress of synthesized silver nanoparticles in Mozambique tilapia (Oreochromis mossambicus). J Environ Sci (China). 2012;24(6):1091-8.
32- Miura N, Shinohara Y. Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells. Biochem Biophys Res Commun. 2009;390(3):733-7.
33- AshaRani PV, Low Kah Mun G, Hande MP, Valiyaveettil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. ACS Nano. 2009;3(2):279-90.
34- Sun J, Zhang Q, Wang Z, Yan B. Effects of nanotoxicity on female reproductivity and fetal development in animal models. Int J Mol Sci. 2013;14(5):9319-37.
35- Habibian S, Shadnoush F, Arabi M, Safar B. Evaluation of the cytotoxicity and protein expression alteration induced by nanoparticles of silver in the rat sperm and testis. Shahrekord Univ Med Sci J. 2013;15(4):26-34. [Persian]
36- Rahman MF, Wang J, Patterson TA, Saini UT, Robinson BL, Newport GD, et al. Expression of genes related to oxidative stress in the mouse brain after exposure to silver-25 nanoparticles. Toxicol Lett. 2009;187(1):15-21.