

اثر نانوذرات اکسید آهن و میدان مغناطیسی در عصب‌زایی و بیان ژن Nestin بعد از ایسکمی ریپرفیوژن در موش

آیشین باقری بوسچین: دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاداسلامی، تنکابن، ایران.
***زینب خزان‌کوهپر:** استادیار و متخصص زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاداسلامی، تنکابن، ایران (*نویسنده مسئول). khazaei@toniau.ac.ir
مجتبی فلاحتی: استادیار و متخصص بیوفیزیک، گروه نانو تکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، واحد علوم دارویی تهران، دانشگاه آزاداسلامی، تهران، ایران.

تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۱۵

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: سکتة مغزی ایسکمیک یک علت شایع ناتوانی بالغین و مرگ در کل جهان است که منجر به آسیب شبکه‌ها و عروق عصبی و توقف عملکردهای مغزی می‌گردد. در این مطالعه اثر نانوذرات اکسید آهن و میدان مغناطیسی در عصب‌زایی بعد از ایسکمی ریپرفیوژن (IR) در مدل رت بررسی شد.

روش کار: در این مطالعه تجربی، ۵۰ سر موش نر نژاد ویستار (۲۵۰-۲۲۰ گرم) به طور تصادفی به ۵ گروه ده تایی شامل کنترل، شم (ایسکمی ریپرفیوژن)، IR + تیمار با نانوذرات اکسید آهن (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، IR + میدان مغناطیسی (۱ تسلا، ۲۰ دقیقه روزانه به مدت ۴ روز) و IR + استفاده از نانو ذره اکسید آهن و میدان مغناطیسی به طور هم زمان تقسیم شد. تزریق‌ها به روش IP انجام شد. عصب‌زایی در هیپوکامپ ۵ گروه بعد از ۴ روز به روش رنگ آمیزی H&E ارزیابی شد. بیان ژن Nestin در ۵ گروه به صورت کمی به روش Real-time PCR بررسی شد.
یافته‌ها: در این مطالعه آشکار شد که نانوذرات اکسید آهن و همینطور میدان مغناطیسی نرخ عصب‌زایی را بعد از ایسکمی ریپرفیوژن در طول ۴ روز افزایش می‌دهند ($p < 0.05$). بیان ژن Nestin در گروه تحت تیمار با نانوذرات اکسید آهن و در گروه در معرض میدان مغناطیسی به طور معنی‌داری ($p < 0.05$) در مقایسه با مدل ایسکمی ریپرفیوژن افزایش داشت. هرچند درمان ترکیبی آن‌ها تفاوت معنی‌داری در مقایسه با گروه شم در طول ۴ روز نشان نداد.
نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه پیشنهاد می‌کند که نانوذرات اکسید آهن و میدان مغناطیسی بصورت جداگانه بتوانند دو روش مؤثر در درمان ایسکمی باشند.

کلیدواژه‌ها: نانوذرات اکسید آهن، ایسکمی ریپرفیوژن، میدان مغناطیسی، Nestin، Real-time PCR

مقدمه

هیپوکامپ نقش حیاتی در تشکیل حافظه و تجزیه و تحلیل اطلاعات فضایی ایفا می‌کند. با توجه به نقش حیاتی هیپوکامپ، کاهش آسیب وارده به این ارگان و افزایش ترمیم آن در آسیب‌های ناشی از سکتة مغزی و ایسکمی/ریپرفیوژن مغزی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

سلولهای بنیادی توان تکثیر، نورون‌زایی و تمایز به انواع رده‌های سلولی را دارا می‌باشند. لذا بهره‌گیری از این سلول‌ها به منظور ترمیم ضایعات عصبی امروزه به‌عنوان سیاستی مهم و کارآمد به منظور افزایش بازده در درمان بیماری‌های عصبی محسوب می‌گردد (۶). مطالعات نشان داده که القاء تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی عصبی موجود در لایه زیر بطنی (SVZ)، منجر به بهبود و ترمیم

سازمان سلامت جهانی در سال ۲۰۱۳ اعلام کرد که سکتة مغزی (۱۰٪/۱۶) دومین عامل مرگ و میر در جهان بعد از بیماری‌های قلبی (۱۱٪/۲) محسوب می‌شود. در ایران این اختلال جزء ده علت اول و اصلی مرگ و میر شناخته شده (۱) و در امریکا به عنوان سومین علت گزارش شده است (۲). مطالعات اپیدمیولوژیک نشان می‌دهد که بروز سکتة همراه با بالا رفتن سن افزایش می‌یابد که بر این اساس حدود دوسوم همه موارد سکتة در افراد بالای ۶۵ سال اتفاق می‌افتد. همچنین وقوع آن در مردان بیشتر از زنان (۳) و در افراد سیاه پوست بیشتر از افراد سفید پوست گزارش شده است (۴). در زنان یائسه نیز خطر بروز سکتة مغزی بیشتر از موارد قبل از یائسگی است (۵).

سپس برای القاء بیهوشی در حیوانات از ترکیب داروهای زایلازین (شرکت Alfasan، هلند) و کتامین (شرکت Rotexmedica، آلمان) استفاده گردید. که با نسبت ۱:۵ (۵ میلی لیتر از کتامین + ۱ میلی لیتر زایلازین) تهیه و به مقدار ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم بر اساس وزن هر حیوان به صورت داخل صفاقی تزریق گردید.

القاء ایسکمی / ریپرفیوژن مغزی: بعد از بیهوشی موش، سپس یک برش عمودی در ناحیه گردن داده شد و به دنبال آن شریان های کاروتید مشترک هر دو سمت در معرض دید قرار گرفت و پس از جداسازی عصب واگ، توسط کلامپ میکروسرجری به مدت ۲۰ دقیقه مسدود شده و خونرسانی به مغز متوقف شد. در طول زمان ایسکمی درجه حرارت بدن حیوان مرتباً بررسی شد و پس از ۲۰ دقیقه کلامپ ها برداشته شده و گردش خون مجدداً برقرار گردید. پس از القاء ایسکمی، ماهیچه های جدا شده در محل آناتومیک خود قرار داده شد و بخش برش داده شده بخیه گردید.

سوسپانسیون نانو ذرات اکسید آهن: نانو ذرات اکسید آهن (Fe₂O₃) (II & III) Magnetic Nanoparticles powder (به صورت پودر در ابعاد ۱۰ نانومتر از شرکت سیگما-آلدریچ (آلمان) خریداری شد. سپس نانو ذرات اکسید آهن با غلظت نهایی ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر در محلول نمکی در درجه حرارت ۳۵-۴۰ درجه سانتی گراد حل شده و به مدت ۵ دقیقه به منظور تهیه سوسپانسیون ورتکس گردید.

تیمار حیوانات: به منظور تیمار حیوانات در گروه های مختلف، پس از گروه بندی و جراحی حیوانات، گروه ها با الگوی زیر تیمار گردیدند. گروه ۱ (گروه کنترل): حیوانات سالمی بودند که ۲۰ دقیقه پس از ایجاد شکاف در ناحیه گردن با محلول نمکی نرمال (حلال نانوذره) به صورت داخل صفاقی تیمار شدند، سپس بدون القاء ایسکمی ریپرفیوژن، پوست حیوانات بخیه شد. گروه ۲ (گروه شم): در این گروه، ۲۰ دقیقه پس از القاء آسیب مغزی حیوانات با محلول نمکی نرمال تیمار شدند. گروه ۳ (گروه تحت تیمار با

ضایعات عصبی به میزان بیشتری می گردد (۷) و (۸).

Nestin به عنوان یک پروتئین رشته ای حد واسط در سلول های عصبی در رشد شعاعی آکسون ها نقش دارد (۹). در افراد دچار سکته مغزی، بیان ژن Nestin جهت ترمیم و تولید نورون ها افزایش می یابد (۱۰). به نظر می رسد برای افزایش میزان تحریک سلول های بنیادی عصبی و القاء عصب زایی در بافت های آسیب دیده بتوان علاوه بر فاکتورهای رشد از نانو ذرات خاص نیز استفاده نمود. در مطالعات نشان داده شده که میدان مغناطیسی در افزایش تأثیر نانو ذرات آهن در ترمیم نورون های آسیب دیده نقش دارد و این امر استفاده از آن را جهت بهبود سریع تر بیماران پیشنهاد می کند (۱۱). هدف از این مطالعه بررسی اثر نانوذرات اکسید آهن به همراه میدان مغناطیسی بر تمایز سلول های بنیادی عصبی در مغز موش های دچار سکته مغزی بود.

روش کار

حیوانات: در این مطالعه تجربی ۵۰ سرموش صحرایی نر، نژاد ویستار به وزن ۲۵۰-۲۲۰ گرم از دانشگاه تهران (گروه فارماکولوژی) تهیه شد. موش ها در اتاقی با دوره روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته و دمای ۲۵±۲ درجه سانتی گراد و تأمین آب و غذا نگهداری شدند. موش ها در پنج گروه ۱۰ تایی مورد بررسی قرار گرفتند (گروه های ۱) کنترل: حیوانات سالم، ۲) شم: حیوانات مدل ایسکمی ریپرفیوژن (IR) که تنها با محلول نمکی نرمال (حلال) تیمار شدند، ۳) گروه آزمایشی یک: حیوانات مدل ایسکمی ریپرفیوژن مغزی که با ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم از نانو ذره اکسید آهن تیمار شدند، ۴) گروه آزمایشی دو: حیوانات مدل ایسکمی ریپرفیوژن مغزی که روزانه (به مدت ۴ روز) تحت تأثیر میدان مغناطیسی به قدرت ۱ تسلا قرار گرفتند و ۵) گروه آزمایشی سه: شامل حیوانات مدل ایسکمی ریپرفیوژن مغزی که با ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم از نانو ذره اکسید آهن تیمار شده و روزانه تحت تأثیر میدان مغناطیسی به قدرت ۱ تسلا قرار گرفتند.

قرار داده شد. جهت بررسی تعداد سلول های نورونی قابل شمارش در گروه های مختلف، ناحیه CA1 هیپوکامپ مغز حیوانات بعد از رنگ آمیزی H&E مورد بررسی و عکسبرداری با میکروسکوپ نوری (Nikon، سوئیس) قرار گرفت. از هر نمونه ۸ فتومیکروگراف به صورت تصادفی انتخاب شد. سپس سلول های سالم در ناحیه CA1 هیپوکامپ شمارش شده و میانگین تعداد سلول ها در ناحیه CA1 در هر گروه محاسبه گردید. برای شمارش سلول ها از نرم افزار Image Tool 2 استفاده شد.

استخراج RNA: جهت استخراج RNA کل از بافت هیپوکامپ، از محلول RNX-Plus شرکت سیناژن (تهران، ایران) استفاده گردید. سپس غلظت و خلوص RNA بوسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر نانودراپ (Thermo، امریکا) تعیین شد.

بررسی بیان ژن Nestin به روش Real-Time PCR کمی: برای بررسی بیان ژن Nestin از واکنش Real-Time PCR به صورت کمی (Q-RT-PCR) استفاده شد. به این منظور بعد از استخراج RNA، سنتز cDNA به کمک کیت Revert Aid First Strand cDNA Synthesis (Fermentas Co، امریکا) صورت گرفت. سپس برای سنتز cDNA از دستگاه ترموسایکلر Applied Biosystems 2720 (Thermo Fisher Scientific، امریکا) استفاده شد. در ادامه تفاوت سطح بیان ژن Nestin، در گروه های مورد مطالعه به روش Q-RT-PCR به کمک کیت SYBR Green Master Mix (یکتا تجهیز، ایران) نسبت به ژن رفرنس β -actin مقایسه شد. واکنش در دستگاه Corbett Rotor Gene 6000 (سیدنی، استرالیا) طبق برنامه زیر انجام شد: یک مرحله واسرشت شدن ابتدایی در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه و ۴۰ سیکل در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۵ ثانیه، ۵۹ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه، و گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه بود. توالی پرایمر های مورد استفاده در جدول ۱ ذکر شده است. از ژن β

نانوذرات اکسید آهن): حیوانات ۲۰ دقیقه پس از القاء آسیب مغزی با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم از نانو ذره اکسید آهن به صورت داخل صفاقی تیمار شدند. گروه ۴ (گروه در معرض میدان مغناطیسی): سر حیوانات در حالت بیهوشی ۲۰ دقیقه پس از القاء آسیب مغزی، به مدت ۴ روز در میدان مغناطیسی ۱ تسلا (هر ۲۴ ساعت یکبار و هر بار به مدت ۲۰ دقیقه) قرار داده شد (شکل ۱). گروه ۵ (گروه در معرض میدان مغناطیسی و نانوذرات اکسید آهن): تیمار حیوانات، ۲۰ دقیقه پس از القاء آسیب مغزی با نانوذره اکسید آهن (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) به صورت داخل صفاقی صورت گرفت و سپس سر حیوانات در حالت بیهوشی، به مدت ۴ روز در میدان مغناطیسی ۱ تسلا (هر ۲۴ ساعت یکبار و هر بار ۲۰ دقیقه) قرار داده شد. در روز چهارم بعد از تیمارهای مختلف، حیوانات در تمامی گروه ها بیهوش شده و پس از جداسازی سر، مغز موش ها در محلول نمکی سرد قرار داده شد.

پس از برشی طولی در مرکز مغز که مغز را به دو قسمت پشتی و جلویی تقسیم می کرد بخشی از مغز به منظور تهیه لام و رنگ آمیزی H&E در فرمالین ۱۰٪ قرار داده شد و بخشی دیگر از مغز (هیپوکامپ) جهت بررسی میزان بیان ژن به روش Real Time PCR به میکروتیوب های RNase and DNase free منتقل شده و بلافاصله در تانک نیتروژن قرار داده شد و تا زمان بررسی در فریزر ۸۰- نگهداری گردید.

تهیه بلوک از مغز، برش دهی و رنگ آمیزی: تهیه برش های بافتی از مغز جهت رنگ آمیزی طبق مراحل زیر انجام شد. به این منظور بافت مغز موش از فرمالین ۱۰٪ به محلول فیکساتور بوئن (فرمالدهید، اسید پیکریک اشباع و گلوکز) انتقال یافته و به مدت ۱۲ ساعت در فیکساتور نگه داری شد. بعد از پارافینه کردن بافت، قالب گیری و برشگیری در اندازه ۵-۲ میکرومتر با استفاده از میکروتوم (DID SABZ، ایران) صورت گرفت. همچنین جهت رنگ آمیزی H&E (هماتوکسیلین و ائوزین) برش ها، لام ها ۴۵ دقیقه در جار حاوی هماتوکسیلین و ۱۵ دقیقه در ظرف حاوی ائوزین



شکل ۱- تصویر مولد میدان مغناطیسی و نحوه قراردگی جمجمه حیوانات در میدان مغناطیسی ۱ تسلا به مدت ۲۰ دقیقه در روز

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

نام ژن	توالی 5'→3'	طول محصول	
Nestin	Forward	5'-TGCAGGCCACTGATAAGTTCCA-3	۵۲ bp
	Reverse	5'-TTCTCCTGCTCCAGGGCTTCCA-3	
β-actin	Forward	5'-TCCTGTGGCATCCACGAAACT-3	۱۸۵ bp
	Reverse	5'-GGAGCAATGATCTTGATCTTC-3	

سالم در ناحیه CA1 نوروں ها با هسته های گرد، هستک های برجسته و سیتوپلاسم واضح قابل مشاهده می باشند. در صورتی که نوروں ها در ناحیه CA1 از گروه IR در مقایسه با گروه کنترل سالم واضح نیستند.

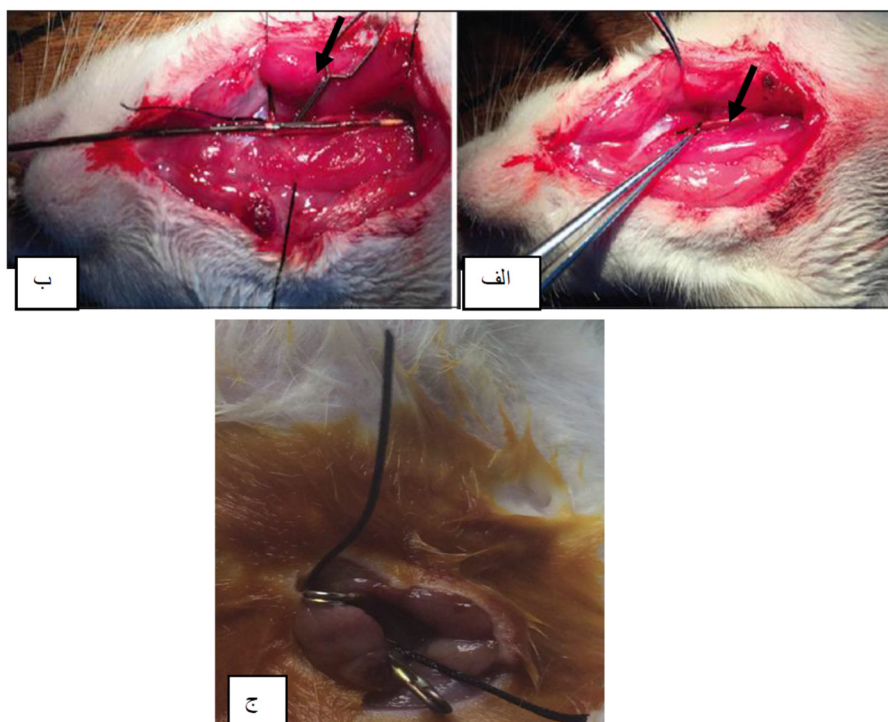
نتایج این مطالعه نشان می دهد که ایجاد IR (Ischemic reperfusion) باعث کاهش معنی دار تعداد نوروں ها نسبت به گروه سالم شد. نانوذرات اکسید آهن با غلظت ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم باعث افزایش معنی دار تعداد نوروں ها نسبت به گروه IR شد. همچنین میدان مغناطیسی با شدت ۱ تسلا باعث افزایش معنی دار تعداد نوروں ها نسبت به گروه IR شد. استفاده همزمان از میدان مغناطیسی با شدت ۱ تسلا و نانوذرات اکسید آهن با غلظت ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه IR تفاوت آماری قابل توجهی در افزایش تعداد نوروں ها نداشت. اما استفاده همزمان از میدان مغناطیسی با شدت ۱ تسلا و نانوذرات اکسید آهن با غلظت ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم باعث کاهش معنی دار تعداد نوروں ها در مقایسه با اثر نانوذرات اکسید آهن با غلظت ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم به تنهایی و یا میدان مغناطیسی با شدت ۱ تسلا به تنهایی شد. در مقایسه بین اثر نانوذرات اکسید

اکتین به عنوان ژن مرجع استفاده شد. همه آزمایش ها حداقل سه بار تکرار شد و نتایج به کمک معادله $2^{-\Delta\Delta CT}$ آنالیز گردید.

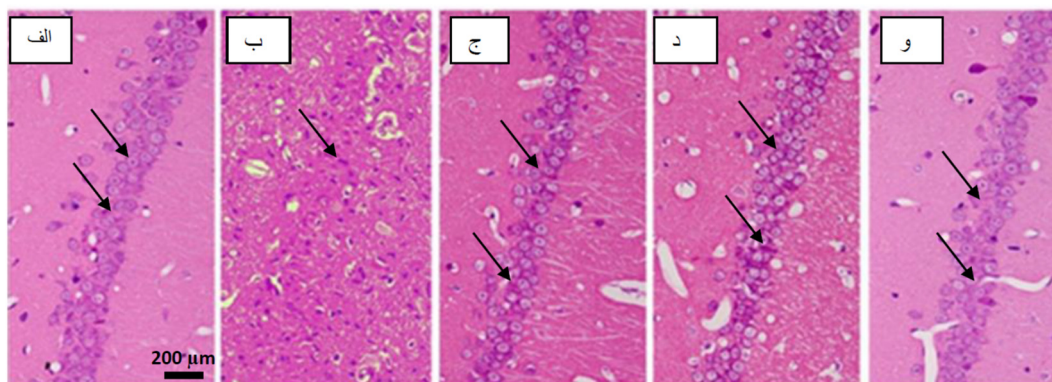
آنالیز آماری: نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه گردید. برای تجزیه و تحلیل داده ها و رسم نمودارها به ترتیب از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۸ و Excel استفاده شد. توزیع نرمال داده ها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. سپس از آزمون های آماری t-test، one way ANOVA و تست تکمیلی Tukey استفاده گردید. $P < 0.05$ به عنوان معیار معنی دار بودن سطح اختلاف ها در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

تأثیر تیمارهای مختلف بر مغز موش: مطابق شکل ۲ جهت ایجاد ایسکمی مغزی در موش های مورد مطالعه بعد از برش عمودی در ناحیه گردن، خونرسانی در شریان های کاروتید متوقف گردید. همچنین نوروں های موجود در ناحیه CA1 هیپوکمپ در گروه های مختلف مورد مطالعه بعد از رنگ آمیزی H&E در شکل ۳ نشان داده شده است. در بررسی هیستوپاتولوژیک در گروه کنترل



شکل ۲- ایجاد ایسکمی در موش. الف) نمای آناتومی و موقعیت شریان کاروتید. ب و ج) کلامپ میکروسرجری به منظور مسدود کردن شریان های کاروتید.

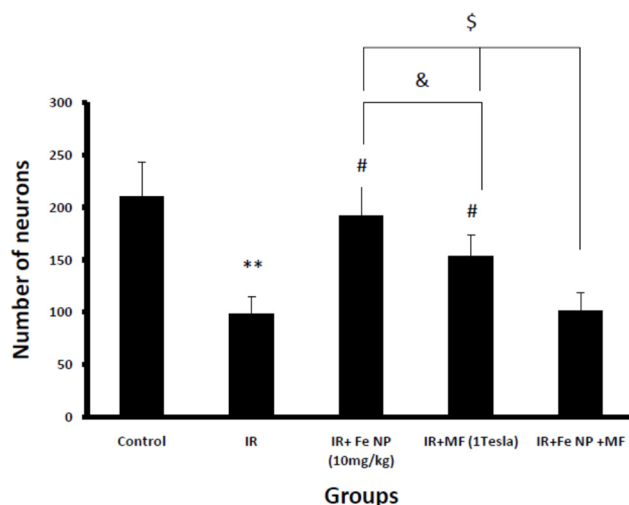


شکل ۳- نمای بافتی از ناحیه CA1 در رنگ امیزی H&E (×200). الف) حیوانات سالم، ب) گروه ایسکمی ریپرفیوژن (IR)، ج) گروه IR+ Fe₂O₃ NP، د) گروه IR+ Fe₂O₃ NP + Magnetic Field و و) گروه IR+ Magnetic Field

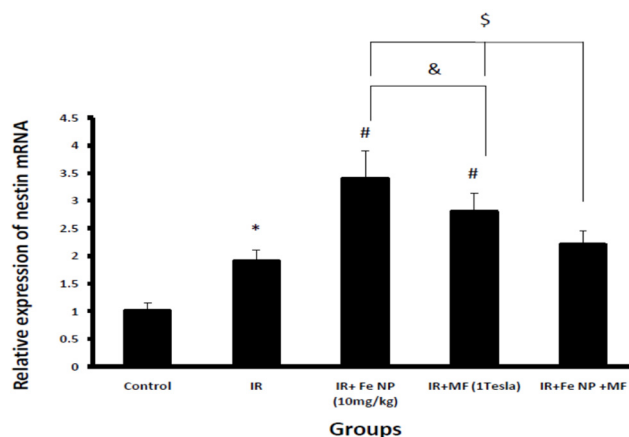
ایسکمی ریپرفیوژن (IR) باعث افزایش معنی دار بیان ژن Nestin نسبت به گروه سالم شد. همچنین افزایش معنی دار بیان ژن Nestin در گروه تحت تیمار با نانوذرات اکسید آهن (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) نسبت به گروه IR مشاهده شد. تأثیر میدان مغناطیسی (MF) (۱ تسلا) نیز باعث افزایش معنی دار بیان این ژن نسبت به گروه IR گردید. اما استفاده همزمان از میدان مغناطیسی (۱ تسلا) و نانوذرات اکسید آهن (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) تفاوت آماری قابل توجهی نسبت به گروه IR نشان نداد. اما استفاده همزمان از میدان

آهن با غلظت ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم و میدان مغناطیسی با شدت ۱ تسلا بر تعداد نورون ها تفاوت معنی داری مشاهده شد؛ بطوریکه تأثیر نانوذرات اکسید آهن با غلظت ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم بر افزایش نورون ها نسبت به میدان مغناطیسی با شدت ۱ تسلا به صورت معنی داری بیشتر بود (نمودار ۱).

بررسی بیان ژن Nestin در نمونه های تحت تیمار: بعد از اطمینان از صحت استخراج RNA شده، بیان ژن Nestin در گروه های مختلف آزمایشی بررسی گردید. نتایج نشان داد که ایجاد



نمودار ۱- نتایج حاصل از بررسی تعداد نورونها (میانگین \pm انحراف معیار). از هر گروه ۸۰ فوتومیکروگراف به صورت تصادفی انتخاب و شمارش شد. شمارش سلول ها با نرم افزار Image Tool انجام گرفت. مقایسه تعداد نورون ها در گروه IR نسبت به گروه سالم (*: P-value<0.01)، در گروه تحت تیمار با نانوذرات اکسید آهن (FeNP) (10 mg/kg) نسبت به گروه IR (#: P-value<0.05)، در گروه تحت تأثیر میدان مغناطیسی (MF) (۱ تسلا) نسبت به گروه IR (#: P-value<0.05)، در گروه تحت تأثیر همزمان میدان مغناطیسی (۱ تسلا) و نانوذرات اکسید آهن (10 mg/kg) نسبت به گروه IR (عدم وجود تفاوت معنی دار)، در گروه تحت تأثیر همزمان میدان مغناطیسی (۱ تسلا) و نانوذرات اکسید آهن (10 mg/kg) در مقایسه با گروه تحت تیمار با نانوذرات اکسید آهن به تنهایی (\$: P-value<0.05) و یا میدان مغناطیسی به تنهایی (\$: P-value <0.05) و در گروه تحت تیمار با نانوذرات اکسید آهن نسبت به گروه تحت تأثیر میدان مغناطیسی (&: P-value <0.05). هر آزمون حداقل سه بار تکرار گردید.



نمودار ۲- مقایسه بیان ژن Nestin در گروه های مختلف مورد مطالعه. مقایسه بیان ژن Nestin در گروه ایسکمی ریپرفیوژن (IR) نسبت به گروه سالم (*: P-value<0.05)، در گروه تحت تیمار با نانوذرات اکسید آهن (FeNP) (10 mg/kg) نسبت به گروه IR (#: P-value<0.05)، در گروه تحت تأثیر میدان مغناطیسی (MF) (۱ تسلا) نسبت به گروه IR (#: P-value<0.05)، در گروه تحت تأثیر همزمان میدان مغناطیسی (۱ تسلا) و نانوذرات اکسید آهن (10 mg/kg) نسبت به گروه IR تفاوت معنی داری مشاهده نشد، در گروه تحت تأثیر همزمان میدان مغناطیسی (۱ تسلا) و نانوذرات اکسید آهن (10 mg/kg) در مقایسه با گروه تحت تیمار با نانوذرات اکسید آهن به تنهایی (\$: P-value<0.05) و یا میدان مغناطیسی به تنهایی (\$: P-value <0.05) و در گروه تحت تیمار با نانوذرات اکسید آهن نسبت به گروه تحت تأثیر میدان مغناطیسی (&: P-value <0.05). نتایج بصورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده است. هر آزمون حداقل سه بار تکرار گردید.

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه اثر نانوذرات اکسید آهن و میدان مغناطیسی بر عصب زایی در هیپوکمپ مغز موش بعد از ایسکمی تأیید شد. نانوذرات اکسید آهن امروزه با اهداف مختلفی چون تصویربرداری از بخش های مختلف مغز به همراه MRI به منظور ردیابی سلولی یا ردیابی داروهای ضد سرطانی

مغناطیسی (۱ تسلا) و نانوذرات اکسید آهن (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) باعث کاهش معنی دار بیان ژن در مقایسه با اثر نانوذرات اکسید آهن (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) به تنهایی و یا میدان مغناطیسی (۱ تسلا) به تنهایی گردید. همچنین مشخص شد که نانوذرات اکسید آهن به تنهایی باعث بیان بیشتر ژن Nestin نسبت به میدان مغناطیسی می شود (نمودار ۲).

در این مطالعه مشخص شد که نانو ذرات اکسید آهن می توانند تأثیر بسزایی در برهمکنش سلول های عصبی با لایه زیرین و همچنین تنظیم رفتار

های سلولی داشته باشد که این امر منجر به افزایش توان نورولوژیک و کاربرد درمانی نانوذرات می شود (۱۷). در مطالعه نوبرت و همکاران در سال ۲۰۱۵ مشخص شد که استفاده از نانوذرات اکسید آهن باعث افزایش ظرفیت احیاء پذیری نورون ها پس از آسیب مغزی نخاعی می شود (۱۸). مطالعه حاضر نیز افزایش تکثیر سلول های عصبی را مطابق مطالعات کیم و نوبرت نشان داد. در مطالعه پیتا توماس و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر روی سلول های گره عصبی شبکیه، مشخص شد که نانو ذرات اکسید آهن در یک میدان مغناطیسی باعث افزایش ۲۰ برابری طول اکسون ها گردید. سرعت این کشیدگی اکسون ها از طریق کاهش و یا افزایش ولتاژ الکترومغناطیسی قابل کنترل بود. در این مطالعه مشخص شد که نانو ذرات با توجه به پوشش سطحیشان، بار الکتریکی، اندازه و تجمعشان تأثیرات مختلفی بر سلول های مغزی می گذارند (۱۹). لازم است برای افزایش اثر همزمان این دو تیمار همانند مطالعه پیتا توماس از ولتاژهای متفاوت و یا تغییر در زمان مجاورت با میدان مغناطیسی استفاده نمود تا اثربخشی نانوذرات را افزایش دهد.

بعد از سخته مغزی، افزایش سلول های اجدادی یا بنیادی عصبی رخ می دهد (۲۰) و به نظر می رسد این سلول ها توان رفع آسیب حاصل از سخته مغزی را داشته باشند. در مطالعه حاضر افزایش بیان ژن Nestin بعد از استفاده از نانوذرات اکسید آهن یا میدان مغناطیسی در سلول های هیپوکمپ مغز موش به دنبال ایسکمی ریپرفیوژن نشان داده شد. در مطالعه ناکاگومی و همکاران در سال ۲۰۰۹ مشخص شد که سلول های اجدادی یا بنیادی عصبی بعد از ایجاد سخته، خوشه های سلولی شبیه به نوروسفر را تشکیل داده و ژن Nestin را بیان می کنند. چنین سلول هایی توان بازسازی و تمایز به نورون های عملکردی، آستروسیت ها و اولیگودندروسیت های تولید

مورد استفاده قرار می گیرد (۱۲). علاوه بر کاربردهای تشخیصی این نانوذرات، به نظر می رسد در درمان بیماری های سیستم اعصاب مرکزی همچون تومورهای مغزی، سخته مغزی، آترواسکلروز کاروتیدی، مالتیپل اسکلروزیز، ترومای مغزی و صرع بخاطر نفوذ راحت به مغز بتوان در آینده نزدیک از آن ها استفاده نمود (۱۳). کانژوگه کردن داروها، آنزیم ها و آنتی بادی ها با نانوذرات اکسید آهن و هدایت آن ها با استفاده از یک میدان مغناطیسی به اندام، بافت یا موضع سرطانی می تواند یکی از کاربردهای درمانی باشد (۱۴). همچنین انتقال نانوذرات اکسید آهن به تومورهای مغزی و گرما دادن به آن با یک میدان مغناطیسی می تواند باعث از بین رفتن بافت توموری شود (۱۵). بنابراین استفاده از نانوذرات اکسید آهن می تواند به عنوان یک راهکار درمانی مناسب در آینده نزدیک مورد استفاده قرار گیرد.

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که نانو ذرات اکسید آهن بر عصب زایی مؤثر بوده و باعث افزایش معنی دار تعداد نورون ها گردید. از سوی دیگر استفاده از میدان مغناطیسی نیز اثر ترمیمی بر بافت عصبی داشته و به نظر می رسد به عنوان یک نیروی خارجی بتوان از آن در درمان بهره بیشتری برد. با این حال اثر بهبودی و تکثیر سلول های آسیب دیده مغزی تحت تیمار با نانوذرات اکسید آهن بسیار بیشتر از مجاورت مغز با میدان مغناطیسی بود. از سوی دیگر استفاده همزمان این دو تیمار اثر عکس داشته و تغییر چندانی نسبت به سلول های آسیب دیده مغزی بدون تیمار نشان نداد. در مطالعه شارما و همکاران در سال ۲۰۰۰ استفاده از نانوذرات اکسید نیتریک به همراه میدان مغناطیسی باعث افزایش بهبود و ترمیم سلول های عصبی آسیب دیده نخاعی گردید (۱۶). درحالی که در مطالعه حاضر همراهی نانوذرات اکسید آهن و میدان مغناطیسی چنین اثری را نداشت که ممکن است نوع نانوذرات و میزان و مدت زمان میدان مغناطیسی در این نتایج تأثیر داشته باشد. در مطالعه کیم و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان داده شد که نانوذرات اکسید آهن قادرند باعث افزایش رشد نورون ها در سلول های PC12 شوند.

منابع

1. Saadat S, Yousefifard M, Asady H, Moghadas Jafari A, Fayaz M, Hosseini M. The most important causes of death in Iranian population; a retrospective cohort study. *Emerg (Tehran)* 2015;3(1):16-21.
2. Baldwin K, Orr S, Briand M, Piazza C, Veydt A, McCoy S. Acute ischemic stroke update. *Pharmacotherapy* 2010;30(5):493-514.
3. Bushnell CD. Stroke in women: risk and prevention throughout the lifespan. *Neurol Clin.* 2008;26(4):1161-76.
4. Flemming KD, Brown RD, Jr. Secondary prevention strategies in ischemic stroke: identification and optimal management of modifiable risk factors. *Mayo Clinic proceedings.* 2004;79(10):1330-40.
5. Albers GW, Caplan LR, Easton JD, Fayad PB, Mohr JP, Saver JL, et al. Transient ischemic attack-proposal for a new definition. *N Engl J Med.* 2002;347(21):1713-6.
6. Ohira T, Shahar E, Chambless LE, Rosamond WD, Mosley TH, Jr., Folsom AR. Risk factors for ischemic stroke subtypes: the Atherosclerosis Risk in Communities study. *Stroke* 2006;37(10):2493-8.
7. Ong TZ, Raymond AA. Risk factors for stroke and predictors of one-month mortality. *Singapore Med J.* 2002;43(10):517-21.
8. Cheng LC, Pastrana E, Tavazoie M, Doetsch F. miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche. *Nat Neurosci.* 2009;12(4):399-408.
9. Dahlstrand J, Zimmerman LB, McKay RD, Lendahl U. Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments. *J Cell Sci.* 1992;103 (Pt 2):589-97.
10. Li Y, Chopp M. Temporal profile of nestin expression after focal cerebral ischemia in adult rat. *Brain Res.* 1999;838(1-2):1-10.
11. Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL. Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol.* 2001;63(1):29-60.
12. Petters C, Irrsack E, Koch M, Dringen R. Uptake and metabolism of iron oxide nanoparticles in brain cells. *Neurochem Res.* 2014;39(9):1648-60.
13. Weinstein JS, Varallyay CG, Dosa E, Gahramanov S, Hamilton B, Rooney WD, et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: diagnostic magnetic resonance imaging and potential therapeutic applications in neurooncology and central nervous system inflammatory pathologies, a review. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010;30(1):15-35.
14. Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander Elst L, et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. *Chem Rev.* 2008;108(6):2064-110.

کننده میلین را دارند. در مطالعه ناکاگومی و همکاران مشخص شد که سلول های Nestin مثبت از کورتکس مغز به سمت رگ دچار گرفتگی (سکته) حرکت کرده و به سلول های گلیال تمایز می یابند (۲۱). در مطالعه لی و همکاران نیز افزایش بیان ژن Nestin بعد از سکته مغزی در موش و نقش آن در ترمیم بافت عصبی گزارش شد (۱۰). نتایج بیان این ژن در مطالعه حاضر نیز مشابه مطالعات دیگران، با تأثیر تیمارها مطابقت داشت. به طوری که افزایش بیان آن در گروه تیمار با نانوذرات نشان داد که نسبت به دیگر تیمارها، نانوذرات بیشترین اثربخشی را در نوروژن زایی دارد. اما نکته جالب در تیمار همزمان با نانوذرات و مجاورت با میدان مغناطیسی بود که در سطح مولکولی بیان آن نسبت به مدل موشی سالم افزایش نشان داد و این امر مؤید این است که ادامه تیمارها با نانوذرات و میدان مغناطیسی به مدت طولانی تر یا با ولتاژهای متفاوت ممکن است باعث افزایش نوروژن زایی در سطح سلولی گردد.

بر اساس نتایج این مطالعه به نظر می رسد نانوذرات اکسید آهن و میدان مغناطیسی با ولتاژ مشخص هر یک به تنهایی نقش مؤثری در بهبود و ترمیم سیستم عصبی بعد از آسیب وارده بواسطه ایسکمی ریپرفیوژن داشته باشند. در حالی که درمان ترکیبی این دو روش درمانی در این مطالعه نتایج امیدوارکننده ای را در بر نداشت، اما با توجه به افزایش بیان Nestin در گروه درمان ترکیبی نسبت به گروه شم به نظر می رسد تغییر پارامترهایی چون مدت زمان و میزان ولتاژ میدان مغناطیسی به همراه نانوذرات بتواند در بهبودی سیستم عصبی در رت دچار ایسکمی ریپرفیوژن نقش مؤثرتری داشته باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله تحقیقاتی حاصل پایان نامه دانشجوی کارشناسی ارشد می باشد. نویسندگان مقاله از آقای دکتر احمدرضا دهپور ریاست محترم آزمایشگاه بیمارستان امام خمینی و پرسنل محترم آزمایشگاه که دست اندر کاران این پژوهش را یاری نموده اند کمال تشکر و قدر دانی را دارند.

15. Hartman KB, Wilson LJ, Rosenblum MG. Detecting and treating cancer with nanotechnology. *Mol Diagn Ther.* 2008;12(1):1-14.
16. Sharma HS, Drieu K, Alm P, Westman J. Role of nitric oxide in blood-brain barrier permeability, brain edema and cell damage following hyperthermic brain injury. An experimental study using EGB-761 and Gingkolide B pretreatment in the rat. *Acta Neurochir Suppl.* 2000;76:81-6.
17. Kim MJ, Lee J, Seong AR, Lee YH, Kim YJ, Baek HY, et al. Neuroprotective effects of *Eriobotrya japonica* against beta-amyloid-induced oxidative stress and memory impairment. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(4):780-4.
18. Neubert J, Brauer AU. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: promote neuronal regenerative capacity? *Neural Regen. Res* 2015;10(10):1568-9.
19. Pita-Thomas W, Steketee MB, Moysidis SN, Thakor K, Hampton B, Goldberg JL. Promoting filopodial elongation in neurons by membrane-bound magnetic nanoparticles. *Nanomedicine*. 2015;11(3):559-67.
20. Shen CC, Yang YC, Chiao MT, Cheng WY, Tsuei YS, Ko JL. Characterization of endogenous neural progenitor cells after experimental ischemic stroke. *Curr Neurovasc. Res.* 2010;7(1):6-14.
21. Nakagomi T, Taguchi A, Fujimori Y, Saino O, Nakano-Doi A, Kubo S, et al. Isolation and characterization of neural stem/progenitor cells from post-stroke cerebral cortex in mice. *Eur J Neurosci.* 2009;29(9):1842-52.

Effect of iron oxide nanoparticles and magnetic field on neurogenesis and Nestin gene expression after ischemic reperfusion in rat

Ayshin Bagheri Boschin, MSc Student, Department of Cellular and Molecular Biology, School of Biological Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.

***Zeinab Khazaei Koohpar**, PhD, Assistant Professor of Cellular And Molecular Biology, Department of Cellular and Molecular Biology, School of Biological Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran (*Corresponding author). khazaei@toniau.ac.ir

Mojtaba Falahati, PhD, Assistant Professor of Biophysics, Department of Nanotechnology, School of Science and Technology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Background: Ischemic stroke is a common cause of adult disability and death worldwide that leads to damage in neuronal networks and neurovascular units and cessation of brain functions. In this study the effect of iron oxide nanoparticles and magnetic field on neurogenesis after ischemic reperfusion (IR) in rat model was evaluated.

Methods: In this experimental study 50 male Wistar rats weighing 220-250 g were randomly divided into five groups of 10 rats each: including control, sham (ischemic reperfusion model), IR + iron oxide nanoparticles (10mg/kg), IR+magnetic field (1 Tesla, 20 min in 4 days), and IR + iron oxide nanoparticles and magnetic field groups. Injections were performed intraperitoneally. Neurogenesis was evaluated in hippocampus of 5 groups after 4 days by H&E staining method. Nestin gene expression was quantitatively investigated in 5 groups by Real-time PCR.

Results: In this study it was revealed that the iron oxide nanoparticles as well as the magnetic field increase the neurogenesis rate after ischemic reperfusion during 4 days ($p < 0.05$). The expression of Nestin gene increased in iron oxide nanoparticles treated group and the magnetic field exposed group significantly ($p < 0.05$) as compared to ischemic reperfusion model. However, their combined treatment did not show a significant difference compared with the sham group within 4 days.

Conclusion: Our result suggests iron oxide nanoparticles as well as magnetic field separately can be two effective methods in ischemia therapy.

Keywords: Iron oxide nanoparticles, Ischemic reperfusion, Magnetic field, Nestin, Real-time PCR