

JAMS

مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک

دوره بیست و یک، شماره سه، خرداد و تیر ۱۳۹۷

journal homepage: <http://jams.arakmu.ac.ir>



مقاله پژوهشی

تأثیر نانوذرات اکسید آهن و میدان مغناطیسی بر رگ‌زایی و تغییر بیان ژن Vegfa بعد از ایسکمی ریپرفیوژن در رت

مینا قاسمی^۱، زینب خزائی کوهپیر^{۱*}، مجتبی فلاحتی^۲

۱. گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران.
۲. گروه نانو تکنولوژی، دانشکده علوم و فن‌آوری‌های نوین، واحد علوم دارویی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: ایسکمی طولانی در اندام‌های با نرخ متابولیک بالا هم‌چون مغز و قلب اثرات زیان باری را به همراه دارد. بنابراین، نشر مواد غذایی به واسطه رگ‌زایی بعد از ایسکمی برای ترمیم ناحیه آسیب دیده بافت ضروری است. در این مطالعه، اثرات نانوذرات اکسید آهن و میدان مغناطیسی در رگ‌زایی بعد از ایسکمی ریپرفیوژن (IR) در مدل رت بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، پنجاه رت نر با سن بین ۶ تا ۷ هفته در وزن ۲۲۰ تا ۲۵۰ گرم از دانشگاه تهران خریداری شدند. حیوانات در ۵ گروه شم (مدل ایسکمی ریپرفیوژن)، کنترل، تحت تیمار با نانوذرات اکسید آهن، در معرض میدان مغناطیسی و درمان ترکیبی با نانوذرات اکسید آهن و در معرض میدان مغناطیسی تقسیم بندی شدند. رگ‌زایی در هیپوکامپ پنج گروه بعد از ۴ روز به روش رنگ آمیزی H&E ارزیابی شد. بیان ژن Vegfa در پنج گروه به صورت کمی به روش Q-RT-PCR مطالعه شد.

یافته‌ها: نانوذرات اکسید آهن همین‌طور میدان مغناطیسی رگ‌زایی را در حیوانات بعد از ایسکمی ریپرفیوژن (IR) در طول ۴ روز القا کردند ($p < 0/05$)، اما درمان ترکیبی آن‌ها تفاوت معنی‌داری را در مقایسه با 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 (IR) مشاهده شد. اما افزایش بیان ژن Vegfa در درمان ترکیبی نسبت به مدل ایسکمی ریپرفیوژن (IR) معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد نانوذرات اکسید آهن و میدان مغناطیسی به صورت جداگانه بتوانند دو روش مؤثر در رگ‌زایی بعد از ایسکمی ریپرفیوژن (IR) باشند.

اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۷/۱۰

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۲/۰۵

تاریخ انتشار: ۹۷/۰۳/۰۱

واژگان کلیدی:

نانوذرات اکسید آهن

ایسکمی ریپرفیوژن

میدان مغناطیسی

Q-RT-PCR

Vegfa

*نویسنده مسئول:

زینب خزائی کوهپیر

آدرس پستی: ایران، تنکابن، دانشگاه آزاد

اسلامی واحد تنکابن، دانشکده علوم زیستی،

گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی.

تلفن: +98 911 392 6684

نمابر:

E-mail: khazaei@toniau.ac.ir

۱. مقدمه

سکته مغزی یکی از مهم‌ترین علل ناتوانی در سنین بزرگسالی در دنیا محسوب می‌شود. شایع‌ترین علت سکته مغزی، ایسکمی است که در اثر انسداد عروق مغزی (۱) به مدت چند دقیقه تا چند ساعت ایجاد شده و با بازگشت خون به بافت، ریپرفیوژن رخ می‌دهد. میزان آسیب به بافت، به مدت زمان ایسکمی بستگی داشته و هر چه زمان ریپرفیوژن سریع‌تر باشد آسیب بافتی کمتری رخ می‌دهد (۲). انسداد عروق بعد از ایسکمی، باعث هایپوکسی سلولی و کاهش تولید ATP و در نتیجه اختلال در عملکرد پمپ‌های یونی و تجمع یون‌های سدیم (Na^+)، کلسیم (Ca^{2+}) و هیدروژن (H^+) با افزایش اسیدیته سلول می‌شود. این امر منجر به افزایش گلائیولیسی بی‌هوازی به منظور تولید انرژی می‌گردد. تولید فرم‌های فعال اکسیژن (ROS) بعد از ایسکمی افزایش یافته و عملکرد زنجیره انتقال الکترون دچار اختلال می‌گردد. همچنین، در نتیجه استرس اکسیداتیو حاصل از انسداد عروق نکرروز و اپوپتوز در سلول‌های بافت مورد نظر القا می‌شود. از سوی دیگر، به واسطه هایپوکسی، متورم شدن سلول‌های اندوتلیال عروق و در نتیجه کاهش قطر عروق در زمان بازگشت دوباره خون بعد از انسداد رخ می‌دهد. این امر باعث بازگشت ناقص مواد تغذیه‌ای به بافت آسیب دیده بعد از ریپرفیوژن می‌گردد. در ادامه، با کاهش تولید ROS، سطح تولید اکسیدان‌ها افزایش یافته و به عنوان مولکول‌های پیام‌رسان باعث القای فاکتورهای رشد و افزایش تکثیر، تمایز و مهاجرت سلولی و در نتیجه رگ‌زایی می‌شوند (۱).

امروزه محققین به دنبال راه‌کارهای مناسب‌تر و مؤثرتر جهت درمان عوارض حاصل از سکته‌های مغزی هستند. نانو ذرات با ابعاد کمتر از ۳۰ نانومتر با توان عبور از سد خونی مغزی، آن‌ها را به عنوان ابزار درمانی مناسب جهت استفاده در بهبود علائم حاصل از سکته‌های مغزی می‌سازد (۳). از نانوذرات اکسید آهن با اهداف مختلفی چون ردیابی سلولی یا ردیابی داروهای ضد سرطانی به همراه تصویربرداری رزونانس مغناطیسی (MRI) به میزان زیادی استفاده می‌شود (۴، ۵). همچنین به

نظر می‌رسد از این نانوذرات بتوان در آینده نزدیک در درمان بیماری‌های سیستم اعصاب مرکزی هم‌چون تومورهای مغزی، سکته مغزی و مالتیپل اسکلروزیز (MS) به دلیل عبور از سد خونی-مغزی استفاده نمود (۶). به نظر می‌رسد هدایت داروها، آنزیم‌ها و آنتی‌بادی‌ها به واسطه نانوذرات اکسید آهن تحت تأثیر یک میدان مغناطیسی به بافت یا موضع سرطانی بتواند از دیگر کاربردهای درمانی آن باشد (۷). مشخص شده که نانو ذرات اکسید آهن توان بالایی در تبادل مواد بین بافت و خون پس از ایسکمی و محافظت سلولی دارند (۸). از سوی دیگر، در مطالعات مختلف استفاده از میدان‌های مغناطیسی باعث ایجاد تغییراتی در نفوذپذیری غشاء سلولی شده و اثر آن در تبدلات یونی و تأثیر آن بر پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک باعث افزایش تکثیر سلولی شده است (۹، ۱۰). همچنین مشخص شده که میدان مغناطیسی باعث هدایت بهتر نانوذرات اکسید آهن به ناحیه دچار ایسکمی و در نتیجه افزایش اثرات درمانی آن می‌گردد (۱۱).

بنابراین به نظر می‌رسد استفاده از میدان مغناطیسی و نانوذرات اکسید آهن در بهبود عوارض سکته‌های مغزی مؤثر باشد. از این رو، در این تحقیق یکی از جنبه‌های این تأثیر، اثر این دو عامل به تنهایی و یا به صورت ترکیبی بر رگ‌زایی پس از ایسکمی ریپرفیوژن (IR)، در موش صحرایی (رت) بررسی شد. VEGF یا فاکتور رشد اندوتلیال عروق یک پروتئین القاکننده رگ‌زایی است که در شرایط هایپوکسی در بافت‌های مختلف از جمله مغز، در رگ‌زایی نقش دارد (۱۲). رگ‌زایی در اثر افزایش بیان چند ژن از جمله Vegf رخ می‌دهد (۱۳). ایسکمی مغزی باعث القای این پروتئین و در نتیجه ایجاد عروق مغزی جدید می‌شود. استفاده موضعی از این پروتئین با توان بالقوه درمانی در سطح مغز می‌تواند باعث کاهش اندازه انسداد رگی و استفاده از آن به صورت تزریقی می‌تواند باعث افزایش پاسخ‌های نورولوژیک شود (۱۲).

جهت اطمینان از اثر تیمارها، در رگ‌زایی بیان ژن Vegfa در سطح رونویسی به روش Q-RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲. ملاحظات اخلاقی

این تحقیق در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی تهران دارای تاییدیه به شماره iauz.REC.1393.45 می‌باشد.

۳. مواد و روش‌ها

حیوانات

به منظور بررسی اثر ایسکمی، پنجاه سر موش صحرایی نر نژاد ویستار(رت) (۱۴) به وزن ۲۲۰ تا ۲۵۰ گرم از دانشگاه تهران (گروه فارماکولوژی) خریداری گردید. موش‌ها در اتاقی با دوره روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته و دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و با تغذیه کافی نگه‌داری شدند.

طرح آزمایش

موش‌ها برای سازگاری با محیط جدید، قبل از آغاز مطالعه به مدت یک هفته در قفس‌های فایبرگلاس مخصوص در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و در دمای 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد و دسترسی آزاد به مقادیر دلخواه آب و غذای پودر شده استاندارد نگهداری شدند. موش‌ها به طور تصادفی در پنج گروه ۱۰ تایی تقسیم‌بندی شدند شامل: (۱) کنترل: حیوانات سالم (۲) شم: حیوانات مدل ایسکمی ریپرفیوژن که تنها با محلول نمکی تیمار شدند (۳) گروه آزمایشی یک: حیوانات مدل ایسکمی ریپرفیوژن مغزی (IR) 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 میلی‌گرم بر کیلوگرم از نانو ذره اکسید آهن تیمار شده و روزانه تحت تأثیر میدان مغناطیسی به قدرت ۱ تسلا قرار گرفتند.

القای بیهوشی در حیوانات

ترکیب داروهای زایلازین (شرکت Alfasan، هلند) و کتامین (شرکت Rotexmedica، آلمان) جهت القای بیهوشی در موش‌ها به کار گرفته شد. ترکیب دارویی با نسبت ۱:۵ (۵

میلی‌لیتر از کتامین + ۱ میلی‌لیتر زایلازین) تهیه شد و به مقدار ۱۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی (IP) تزریق گردید.

القای ایسکمی ریپرفیوژن مغزی

بعد از بیهوشی، یک برش عمودی در ناحیه گردن موش داده شد. به این ترتیب شریان‌های کاروتید مشترک هر دو سمت در معرض دید قرار گرفت که بعد از جداسازی عصب واگ، این شریان‌ها توسط کلامپ میکروسرجری به مدت ۲۰ دقیقه مسدود شدند و خون‌رسانی به مغز متوقف گردید. در طول زمان ایسکمی درجه حرارت بدن حیوان به طور منظم بررسی و پس از ۲۰ دقیقه کلامپ‌ها برداشته شده و گردش خون مجدداً برقرار گردید. پس از القای ایسکمی، ماهیچه‌های جدا شده در محل آناتومیکی خود قرار داده شد و بخش برش داده شده بخیه گردید.

سوسپانسیون نانو ذرات اکسید آهن

نانو ذرات اکسید آهن (Fe_2O_3) به صورت پودر در اندازه ۲۰ نانومتر از شرکت سیگما-آلدریج (آلمان) خریداری شد. نانو ذرات اکسید آهن با غلظت نهایی ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در محلول نمکی نرمال در درجه حرارت ۳۵ تا ۴۰ درجه سانتی-گراد حل شد و به منظور تهیه سوسپانسیون به مدت ۵ دقیقه با دور RPM ۲۵۰ مخلوط گردید.

روش تیمار حیوانات

به منظور تیمار حیوانات در گروه‌های مختلف، پس از گروه-بندی و جراحی حیوانات، مدل‌ها با استفاده از نانو ذرات اکسید آهن و میدان مغناطیس با الگوی زیر تیمار گردید: گروه (۱) حیوانات سالمی که ۲۰ دقیقه پس از ایجاد شکاف در ناحیه گردن با محلول نمکی نرمال (حلال نانو ذره) به صورت داخل صفاقی تیمار شدند، سپس بدون القای ایسکمی/ریپرفیوژن (IR)، پوست حیوانات بخیه شد (گروه کنترل). گروه (۲) ۲۰ دقیقه پس از القای ایسکمی ریپرفیوژن (IR) حیوانات با محلول نمکی نرمال تیمار شدند (گروه شم). گروه (۳) حیوانات ۲۰ دقیقه پس از القای IR با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از نانو ذرات اکسید آهن به صورت داخل صفاقی تیمار شدند. گروه

شدند. جهت بررسی تعداد سلول‌های اندوتلیال در گروه‌های مختلف، ناحیه ی CA1 هیپوکامپ مغز حیوانات بعد از رنگ آمیزی H&E (هماتوکسیلین و ائوزین) با عکس‌برداری به کمک میکروسکوپ نوری (Nicon، سوئیس) مورد مطالعه قرار گرفت.

استخراج RNA

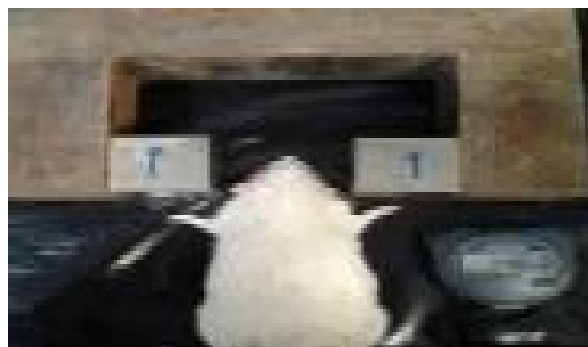
جهت استخراج RNA از بافت هیپوکامپ گروه‌های مختلف تیمار شده و تیمار نشده با نانوذرات اکسید آهن و میدان مغناطیسی، از کیت RNX-Plus شرکت سیناژن (تهران، ایران) استفاده شد. جهت سنجش کمیته RNAی استخراج شده از فتونانومتر (IMPLEN GmbH، آلمان) استفاده گردید.

سنتز cDNA و انجام واکنش Q-RT-PCR

جهت بررسی کمی بیان ژن Vegfa، سنتز cDNA به کمک rRNA استخراج شده و کیت Revert Aid First Strand cDNA Synthesis شرکت فرمنتاز صورت گرفت. سپس واکنش Q-RT-PCR به کمک کیت SYBR Green Master Mix (یکتا تجهیز، ایران) با استفاده از دستگاه Corbett Rotor Gene 6000 (سیدنی، استرالیا) انجام شد. برنامه دمایی واکنش Q-RT-PCR شامل یک مرحله واسرشت شدن اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۴۰ سیکل واکنش تکثیر شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه، اتصال پرایمرها/طویل سازی در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۱ ثانیه، شرایط دمایی تشکیل منحنی ذوب در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه بود.

توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ ذکر شده است. از ژن β اکتین به عنوان ژن مرجع استفاده شد. همه آزمایشات حداقل سه بار تکرار شد و نتایج به کمک معادله $2^{-\Delta\Delta CT}$ تحلیل گردید.

۴) سر حیوانات در حالت بیهوشی ۲۰ دقیقه پس از القای ایسکمی ریپرفیوژن (IR)، به مدت ۴ روز در میدان مغناطیسی ۱ تسلا (هر ۲۴ ساعت یک‌بار و هر بار ۲۰ دقیقه) قرار داده شد (شکل ۱). گروه ۵) تیمار حیوانات ۲۰ دقیقه پس از القای آسیب مغزی با نانو ذرات اکسید آهن (۱۰ میلی‌گرم 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 گروه‌ها بیهوش شده و پس از جداسازی سر، مغز موش‌ها در محلول نمکی نرمال سرد قرار داده شد.



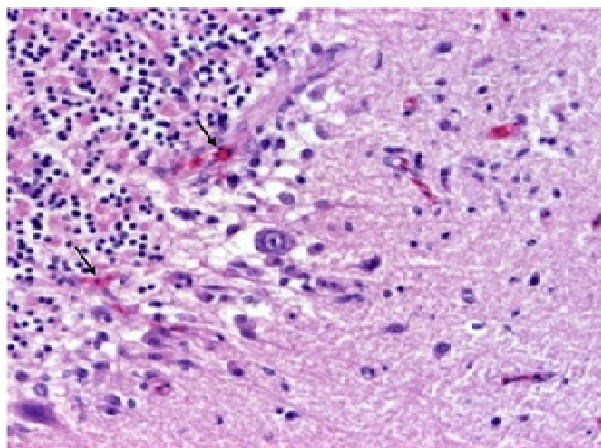
شکل ۱. تصویر مولد میدان مغناطیسی و نحوه قراردادی مجسمه حیوانات در میدان مغناطیسی ۱ تسلا (هر ۲۴ ساعت یک‌بار و هر بار ۲۰ دقیقه).

تهیه بلوک از مغز، برش‌دهی و رنگ‌آمیزی

بافت مغز موش بعد از انجام تیمارهای مختلف، در فرمالین قرار داده شد. سپس در محلول فیکساتور بوئن (فرمالدهید، اسید پیکریک اشباع و گلوکز) به مدت ۱۲ ساعت نگه داری شد. به دنبال آن بافت‌ها به مدت ۱۲ ساعت در معرض جریان آب قرار گرفت. سپس به ترتیب مرحله آب‌گیری در درجات صعودی الکل و مرحله شفاف سازی با گزلیل انجام شد. بعد از پارافینه شدن بافت، قالب گیری و برش‌گیری در اندازه‌های ۲ تا ۵ میکرومتر با استفاده از میکروتوم (DID SABZ، ایران) صورت گرفت. برش‌ها بر روی لام آل‌بومینه قرار داده شده و پارافین‌زدایی انجام گرفت. به منظور رنگ آمیزی H&E (هماتوکسیلین و ائوزین)، لام‌ها ۴۵ دقیقه در جار حاوی هماتوکسیلین و ۱۵ دقیقه در ظرف حاوی ائوزین قرار داده

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

نام ژن	توالی	طول محصول
Vegfa	پیشرو 5- CTGACATGAAGGAAGAGGAG -3	bp ۱۹۶
	معکوس 5- GTGTCTACAGGAATCCCAGA -3	
β -actin	پیشرو 5-TCCTGTGGCATCCACGAAACT-3	bp ۱۸۵
	معکوس 5-GGAGCAATGATCTTGATCTTC-3	



شکل ۲. نمای میکروسکوپی از عروق ناحیه هیپوکامپ در مغز موش‌های تحت تیمار با نانو ذرات اکسید آهن با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم. فلش‌ها نشان دهنده سلول‌های اندوتلیال در نواحی آسیب دیده مغز موش می‌باشد.

نتایج این مطالعه نشان داد که ایجاد ایسکمی ریپرفیوژن (IR) باعث افزایش معنی‌دار تعداد سلول‌های اندوتلیال در ناحیه مذکور نسبت به گروه سالم شد. استفاده از نانوذرات اکسید آهن با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث افزایش معنی‌دار تعداد سلول‌های اندوتلیال نسبت به گروه ایسکمی ریپرفیوژن (IR) شد. همچنین میدان مغناطیسی با شدت ۱ تسلا باعث افزایش معنی‌دار تعداد سلول‌های اندوتلیال نسبت به گروه ایسکمی ریپرفیوژن (IR) شد. استفاده همزمان از میدان مغناطیسی با شدت ۱ تسلا و نانوذرات اکسید آهن با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه ایسکمی ریپرفیوژن (IR) تفاوت آماری قابل توجهی در افزایش تعداد سلول‌های اندوتلیال نشان نداد. استفاده از نانوذرات اکسید آهن یا میدان مغناطیسی به تنهایی باعث افزایش معنی‌داری در تعداد سلول‌های اندوتلیال نسبت به استفاده همزمان از این دو تیمار گردید. همچنین در این آزمون مشخص شد که نانوذرات اکسید آهن توانایی بیشتری نسبت به میدان مغناطیسی در افزایش تعداد سلول‌های اندوتلیال دارد (نمودار ۱).

تحلیل آماری

نتایج این مطالعه به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده است. برای مقایسه تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های مورد مطالعه از آزمون‌های آماری تی تست، آنوای یک طرفه و تست تکمیلی توکی و نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ استفاده شد. معیار معنی‌دار بودن تفاوت بین گروه‌ها $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

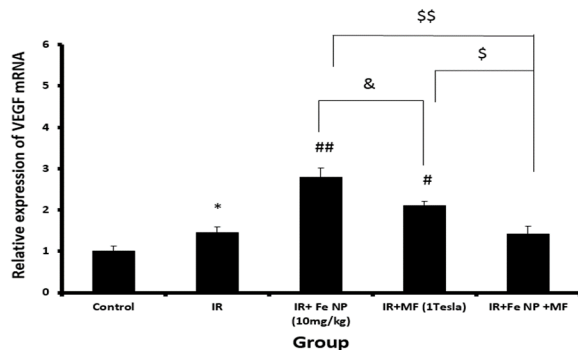
۴. یافته‌ها

بررسی تعداد سلول‌های اندوتلیال پس از رنگ‌آمیزی H&E در گروه‌های مختلف

به منظور بررسی میزان و مقدار رگ زایی درون مغز در گروه‌های مطالعاتی مختلف تحت ایسکمی ریپرفیوژن (IR)، میزان رگ زایی درون بافت هیپوکامپ حیوانات با استفاده از رنگ آمیزی H&E (هماتوکسیلین و ائوزین) مورد مطالعه قرار گرفت. مطابق شکل ۲ در برخی از مناطق علامت‌گذاری شده نماهایی از رگ‌زایی به وضوح قابل مشاهده است که این امر در خصوص تیمار با نانوذرات اکسید آهن با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌باشد.

در خصوص حیوانات در معرض میدان مغناطیسی به تنهایی میزان تشکیل عروق نیز تغییرات مشابهی را نسبت به گروه ایسکمی ریپرفیوژن (IR) نشان داده است. اما بین نمونه‌های تیمار شده به صورت همزمان با ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از نانوذرات اکسید آهن و میدان مغناطیسی تفاوت معنی‌داری نسبت به گروه ایسکمی ریپرفیوژن (IR) مشاهده نشد.

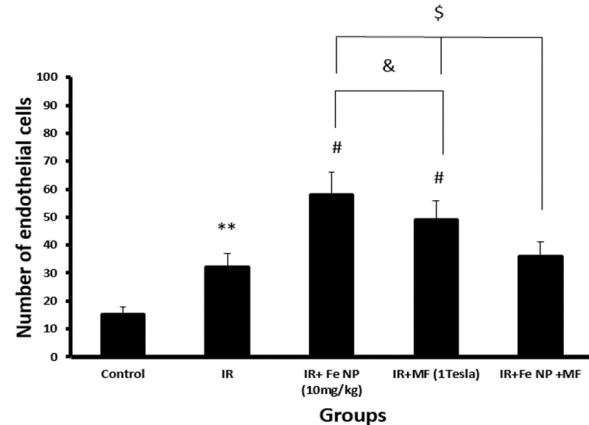
شد که نانوذرات اکسید آهن به تنهایی باعث بیان بیشتر ژن Vegfa نسبت به میدان مغناطیسی گردید (نمودار ۲).



نمودار ۲. مقایسه بیان ژن Vegfa در گروه‌های مختلف مورد مطالعه (میانگین \pm انحراف معیار). مقایسه بیان ژن Vegfa در گروه ایسکمی ریپرفیوژن (IR) نسبت به گروه سالم ($p < 0.05$; *), در گروه تحت تیمار با نانوذرات اکسید آهن (FeNP) ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم نسبت به گروه IR ($p < 0.01$; ##)، در گروه تحت تأثیر میدان مغناطیسی (MF) (۱ تسلا) نسبت به گروه ایسکمی ریپرفیوژن (IR) ($p < 0.05$; #)، در گروه تحت تأثیر همزمان میدان مغناطیسی (۱ تسلا) و نانوذرات اکسید آهن (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) نسبت به گروه ایسکمی ریپرفیوژن (IR) تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد، در گروه تحت تأثیر همزمان میدان مغناطیسی (۱ تسلا) و نانوذرات اکسید آهن (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) در مقایسه با گروه تحت تیمار با نانوذرات اکسید آهن به تنهایی ($p < 0.01$; \$\$) و یا میدان مغناطیسی به تنهایی ($p < 0.05$; \$) و در گروه تحت تیمار با نانوذرات اکسید آهن نسبت به گروه تحت تأثیر میدان مغناطیسی ($p < 0.05$; &).

۵. بحث

با توجه به شیوع بالای مرگ‌های حاصل از سکته مغزی، هم‌چنین ناتوانی بعد از سکته، محققین به دنبال یافتن راه-کارهای درمانی جدید برای کاهش عوارض حاصل از این بیماری هستند. هم‌چنین محققان به دنبال روش‌هایی برای نوروژن زایی، رگ‌زایی، افزایش طول آکسونی و سیناپتوژن نیز می‌باشند (۱۵). فقدان اکسیژن و مواد غذایی در پی ایسکمی باعث ضایعاتی در مغز می‌شود که بسته به زمان ریپرفیوژن، شدت آن متفاوت است. بنابراین راه‌کارهای درمانی با هدف خون‌رسانی سریع‌تر به مغز می‌تواند باعث کاهش ضایعات حاصل از ایسکمی شود (۱۶، ۱۷). در مطالعات مشخص شده که نانو ذرات اکسید آهن در محافظت از سلول‌های عصبی در برابر استرس‌های اکسیداتیو در ضایعات نخاعی نقش دارند (۱۸). در این مطالعه، اثر نانو ذرات اکسید آهن و میدان



نمودار ۱. مقایسه تعداد سلول‌های اندوتلیال در گروه‌های مختلف تحت تیمار (میانگین \pm انحراف معیار). مقایسه تعداد سلول‌های اندوتلیال در گروه ایسکمی ریپرفیوژن (IR) نسبت به گروه سالم ($p < 0.01$; **), در گروه تحت تیمار با نانوذرات اکسید آهن (FeNP) (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) نسبت به گروه ایسکمی ریپرفیوژن (IR) ($p < 0.05$; #)، در گروه تحت تأثیر میدان مغناطیسی (MF) (۱ تسلا) نسبت به گروه ایسکمی ریپرفیوژن (IR) ($p < 0.05$; #)، در گروه تحت تأثیر همزمان میدان مغناطیسی (۱ تسلا) و نانوذرات اکسید آهن (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) نسبت به گروه ایسکمی ریپرفیوژن (IR) (عدم وجود تفاوت معنی‌دار). در گروه تحت تأثیر همزمان میدان مغناطیسی (۱ تسلا) و نانوذرات اکسید آهن (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) در مقایسه با گروه تحت تیمار با نانوذرات اکسید آهن به تنهایی ($p < 0.05$; \$) و یا میدان مغناطیسی به تنهایی ($p < 0.05$; \$) و در گروه تحت تیمار با نانوذرات اکسید آهن نسبت به گروه تحت تأثیر میدان مغناطیسی ($p < 0.05$; &).

نتایج حاصل از بیان ژن Vegfa در گروه‌های مختلف نتایج بررسی بیان ژن Vegfa به روش کمی Q-RT-PCR نشان داد که ایجاد ایسکمی ریپرفیوژن (IR) باعث افزایش معنی‌دار بیان این ژن نسبت به گروه سالم شد. هم‌چنین افزایش معنی‌دار بیان ژن Vegfa در گروه تحت تیمار با نانوذرات اکسید آهن (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) نسبت به گروه ایسکمی ریپرفیوژن (IR) مشاهده شد. تأثیر میدان مغناطیسی (MF) به میزان ۱ تسلا نیز باعث افزایش معنی‌دار بیان این ژن نسبت به گروه ایسکمی ریپرفیوژن (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 ایسکمی ریپرفیوژن (IR) نشان نداد. از سوی دیگر، استفاده از نانوذرات اکسید آهن به تنهایی و یا میدان مغناطیسی به تنهایی نسبت به تیمار همزمان افزایش معنی‌داری را در بیان ژن Vegfa نشان داد. هم‌چنین مشخص

را در محل آسیب ایسکمی ریپرفیوژن (IR) نشان داد. بر طبق این نتایج می‌توان نقش میدان مغناطیسی را در بهبود آسیب حاصل از سکته مغزی تأیید نمود. هرچند اثر نانوذرات اکسید آهن در رگ‌زایی بیشتر از میدان مغناطیسی نشان داده شد، اما به نظر می‌رسد استفاده از هر کدام از این دو روش بتواند راه‌کار درمانی مناسبی برای کاهش عوارض حاصل از سکته مغزی باشد. از این‌رو، برای افزایش اثربخشی میدان مغناطیسی در درمان این گروه از بیماران لازم است تأثیر شدت‌های مختلف میدان مغناطیسی با مدت زمان متفاوت بر حیوانات دچار IR مغزی بررسی شود تا مناسب‌ترین وضعیت برای درمان پیشنهاد گردد.

در مطالعه لی و همکاران در سال ۲۰۱۳ نانوذرات اکسید آهن با پوشش سیلیکا (SiO₄@SPIONs) به تنهایی قادر به افزایش تکثیر، مهاجرت و تشکیل لوله سلول‌های اجدادی اندوتلیالی (EPCs) نبود. اما ترکیب آن با میدان مغناطیسی باعث بهبود رفتارهای نورولوژیک، کاهش میزان آتروفی مغزی، افزایش رگ‌های کوچک و افزایش بیان Vegfa در ناحیه پریفوکال ایسکمی شد (۱۱).

با این حال در مطالعه حاضر استفاده همزمان میدان مغناطیسی و نانوذرات اثر درمانی چندانی نداشت و مشابه با شرایط گروه شم بود. بنابراین می‌توان تصور کرد که میدان مغناطیسی با شدت استفاده شده در این پژوهش ممکن است اثر نانوذرات را کاهش دهد. به طوری که به جای افزایش رگ‌زایی، کاهش رگ‌زایی در موش‌های تحت تیمار مشاهده گردید. به نظر می‌رسد با تغییر شدت و مدت زمان استفاده از میدان مغناطیسی بتوان اثر نانوذرات اکسید آهن را در رگ‌زایی افزایش داد.

هم‌چنین بر خلاف مطالعه لی و همکاران، در این مطالعه از نانوذرات اکسید آهن بدون پوشش استفاده شده که ممکن است وجود یک پوشش خاص نظیر سیلیکا باعث محافظت بهتر نانوذرات و در نتیجه افزایش اثرات ترکیبی این دو تیمار گردد. در مطالعه داس و همکاران افزایش بیان VEGF به

مغناطیسی در رگ‌زایی در موش‌های دچار ایسکمی در ناحیه هیپوکامپ مغز تأیید گردید.

امروزه در تحقیقات مختلف اثرات درمانی نانوذرات اکسید آهن مورد بررسی قرار می‌گیرد. در مطالعه مارگولیس و همکاران در سال ۲۰۱۵ از نانوذرات حاوی سلوکسیب (Celecoxib) (که عموماً اثر مهارکنندگی رگ‌زایی آن شناخته شده است) در موش‌های سالم و دچار ایسکمی قلبی استفاده کردند و شاهد افزایش رگ‌زایی در هر دو گروه تحت تیمار شدند (۱۹). مطالعه ماروزیک-ساسنوسکا و همکاران در سال ۲۰۱۵ اثر رگ‌زایی نانوذرات مس را در جنین مرغ نشان داد.

در این مطالعه افزایش بیان Vegfa در روز بیستم تحت تیمار با نانوذرات مس در مقایسه با سولفات مس مشاهده شد (۲۰). در مطالعه حاضر، استفاده از نانوذرات اکسید آهن در بافت دچار ایسکمی ریپرفیوژن باعث رگ‌زایی شد. در حالی که از این ترکیب معمولاً در تشخیص سرطان‌ها یا ردیابی داروها در بدن بهره برده می‌شد (۴). در مطالعه داس و همکاران در سال ۲۰۱۵ مشخص شد که نانوذرات اکسید سریم از طریق تنظیم اکسیژن درون سلولی باعث رگ‌زایی می‌شوند. (۲۱).

به نظر می‌رسد نانوذرات اکسید آهن و دیگر ترکیبات ذکر شده در مطالعات قبلی بتوانند از طریق نفوذ به سلول‌ها، باعث تحریک تولید عوامل رگ‌زایی شوند. به طوری که در این مطالعه در فرآیند مشابهی با مطالعه داس و همکاران رگ‌زایی در بافت دچار ایسکمی ریپرفیوژن (IR) ممکن است از طریق تغییر در میزان اکسیژن درون سلولی و در نتیجه تنظیم بیان ژن‌های خاصی چون Vegfa رخ داده باشد.

در مطالعه یوان و همکاران در سال ۲۰۱۰ مشخص شد که میدان مغناطیسی قادر به القای رگ‌زایی در مدل‌های موشی بعد از انفارکتوس قلبی می‌باشد (۲۲). در مطالعه هائو و همکاران مشخص شد که استفاده از میدان مغناطیسی می‌تواند باعث لوله‌ای شدن سلول‌های اندوتلیال رگی ناف در شرایط برون تنی و هم‌چنین افزایش ترشح فاکتور رگ‌زایی VEGF شود (۲۳). در مطالعه حاضر استفاده از میدان مغناطیسی هم در سطح سلولی و هم مولکولی افزایش رگ‌زایی

همراه رگ زایی در سلول‌های تحت تیمار با نانوذرات اکسید سریم نسبت به سلول‌های کنترل مشاهده شد (۲۱). در مطالعه ماروزیک-ساسنوسکا و همکاران نانوذرات مس باعث افزایش بیان VEGF به همراه رگ‌زایی در جنین مرغ در مقایسه با سولفات مس شد (۲۰).

۶. نتیجه‌گیری

افزایش بیان Vegfa یکی از فاکتورهای رشد مؤثر در رگ‌زایی در گروه‌های تحت تیمار نشان دهنده اثر نانوذرات اکسید آهن و میدان مغناطیسی به تنهایی در رگ زایی بعد از سکتة مغزی است و می‌توان انتظار داشت که این دو تیمار بتوانند در بهبود فرد بعد از سکتة مغزی از طرق مختلف چون رگ زایی و نورون زایی و کاهش مرگ سلولی مؤثر واقع شوند.

۷. تقدیر و تشکر

این مقاله تحقیقاتی حاصل پایان‌نامه دانشجوی کارشناسی ارشد علوم سلولی و مولکولی است. نویسندگان مقاله از آقای دکتر احمدرضا دهپور ریاست محترم آزمایشگاه بیمارستان امام خمینی و پرسنل محترم آزمایشگاه که دست‌اندرکاران این پژوهش را یاری نموده اند کمال تشکر و قدردانی را دارند.

۸. سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهادات کمیته بین المللی ناشران مجلات پزشکی را دارا بودند.

۹. تضاد منافع

بدین‌وسیله نویسندگان تصریح می‌نمایند که هیچ‌گونه تضاد منافی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

References

1. Kalogeris T, Bao Y, Korthuis RJ. Mitochondrial reactive oxygen species: a double-edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning. *Redox biology*. 2014; 2:702-14.
2. Chouchani ET, Pell VR, James AM, Work LM, Saeb-Parsy K, Frezza C, et al. A Unifying Mechanism for Mitochondrial Superoxide Production during Ischemia-Reperfusion Injury. *Cell metabolism*. 2016; 23(2):254-63.
3. Lockman PR, Koziara JM, Mumper RJ, Allen DD. Nanoparticle surface charges alter blood-brain barrier integrity and permeability. *Journal of drug targeting*. 2004; 12(9-10):635-41.
4. Revia RA, Zhang M. Magnetite nanoparticles for cancer diagnosis, treatment, and treatment monitoring: recent advances. *Mater Today (Kidlington)*. 2016; 19(3):157-68.
5. Mao X, Xu J, Cui H. Functional nanoparticles for magnetic resonance imaging. *Wiley interdisciplinary reviews Nanomedicine and nanobiotechnology*. 2016; 8(6):814-41.
6. 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. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2010; 30(1):15-35.
7. 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. *Chemical reviews*. 2008; 108(6):2064-110.
8. Apopa PL, Qian Y, Shao R, Guo NL, Schwegler-Berry D, Pacurari M, et al. Iron oxide nanoparticles induce human microvascular endothelial cell permeability through reactive oxygen species production and microtubule remodeling. *Particle and fibre toxicology*. 2009; 6:1.
9. Hunt RW, Zavalin A, Bhatnagar A, Chinnasamy S, Das KC. Electromagnetic biostimulation of living cultures for biotechnology, biofuel and bioenergy applications. *International journal of molecular sciences*. 2009; 10(10):4515-58.
10. Veisheh O, Gunn JW, Zhang M. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Advanced drug delivery reviews*. 2010; 62(3):284-304.
11. Li Q, Tang G, Xue S, He X, Miao P, Li Y, et al. Silica-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles targeting of EPCs in ischemic brain injury. *Biomaterials*. 2013; 34(21):4982-92.
12. Sun Y, Jin K, Xie L, Childs J, Mao XO, Logvinova A, et al. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *The Journal of clinical investigation*. 2003; 111(12):1843-51.
13. Talwar T, Srivastava MV. Role of vascular endothelial growth factor and other growth factors in post-stroke recovery. *Annals of Indian Academy of Neurology*. 2014; 17(1):1-6.
14. Mohajeri D, Rezaie A, Mousavi G, Mazani M, Rezaei-Moghadam A. Protective Effects of Crocin on Hepatic Steatosis in the Rats Fed with High Fat Diet. *Journal of Ardabil University of Medical Sciences*. 2012; 12(2):173-89.
15. Marlier Q, Verteneuil S, Vandenbosch R, Malgrange B. Mechanisms and Functional Significance of Stroke-Induced Neurogenesis. *Frontiers in neuroscience*. 2015; 9:458.
16. Arenillas JF, Sobrino T, Castillo J, Davalos A. The role of angiogenesis in damage and recovery from ischemic stroke. *Current treatment options in cardiovascular medicine*. 2007; 9(3):205-12.
17. Greenberg DA. Cerebral angiogenesis: a realistic therapy for ischemic disease? *Methods in molecular biology*. 2014; 1135:21-4.
18. Han J, Kim B, Shin JY, Ryu S, Noh M, Woo J, et al. Iron oxide nanoparticle-mediated development of cellular gap junction crosstalk to improve mesenchymal stem cells' therapeutic efficacy for myocardial infarction. *ACS nano*. 2015; 9(3):2805-19.
19. Margulis K, Neofytou EA, Beygui RE, Zare RN. Celecoxib Nanoparticles for Therapeutic Angiogenesis. *ACS nano*. 2015; 9(9):9416-26.
20. Mroczek-Sosnowska N, Sawosz E, Vadalasetty KP, Lukaszewicz M, Niemiec J,

- Wierzbicki M, et al. Nanoparticles of copper stimulate angiogenesis at systemic and molecular level. *International journal of molecular sciences*. 2015; 16(3):4838-49.
21. Das S, Singh S, Dowding JM, Oommen S, Kumar A, Sayle TX, et al. The induction of angiogenesis by cerium oxide nanoparticles through the modulation of oxygen in intracellular environments. *Biomaterials*. 2012; 33(31):7746-55.
22. Yuan Y, Wei L, Li F, Guo W, Li W, Luan R, et al. Pulsed magnetic field induces angiogenesis and improves cardiac function of surgically induced infarcted myocardium in Sprague-Dawley rats. *Cardiology*. 2010; 117(1):57-63.
23. Hao CN, Huang JJ, Shi YQ, Cheng XW, Li HY, Zhou L, et al. Pulsed electromagnetic field improves cardiac function in response to myocardial infarction. *American journal of translational research*. 2014; 6(3):281-90.



JAMS

Journal of Arak University of Medical Sciences
2018; 21(3)

Journal Homepage: <http://jams.arakmu.ac.ir>



ORIGINAL RESEARCH

The Effect of Iron Oxide Nanoparticles and Magnetic Field on Angiogenesis and Deregulation of *Vegfa* Gene After Ischemia Reperfusion in Rat

Mina Ghasemi¹, Zeinab Khazaei Koochpar^{*1}, Mojtaba Falahati²

1. Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.

2. Department of Nanotechnology, Faculty of Science and Technology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

ARTICLE INFORMATION

Article history:

Received: 2 October 2017

Accepted: 25 April 2018

Published online: 22 May 2018

Keywords:

Iron oxide nanoparticles

Ischemia reperfusion (IR)

Magnetic field

Q-RT-PCR

Vegfa

ABSTRACT

Background and Aim: Prolonged ischemia in organs with high metabolic rates such as brain and heart is associated with deleterious effects. Therefore, nutritive distribution through angiogenesis after ischemia is necessary for repairing damaged region of tissue. In this study, the effects of iron oxide nanoparticles and magnetic field on angiogenesis after ischemia reperfusion (IR) in rat model have been investigated.

Materials and Methods: In this experimental study, fifty male rats aged between 6 -7 weeks at the 220-250gr weight were purchased from Tehran University. Animals were categorized in 5 groups including sham (ischemia reperfusion model), control, iron oxide nanoparticles-treated, magnetic field-exposed, and combination therapy with iron oxide nanoparticles and magnetic field-exposed groups. Angiogenesis was evaluated in hippocampus of 5 groups after 4 days by H&E staining method. The expression of *Vegfa* gene was studied in 5 groups by Q-RT- PCR.

Findings: Iron oxide nanoparticles as well as the magnetic field induced angiogenesis during 4 days in animals after IR ($p < 0.05$), but their combination therapy did not show any significant difference compared to sham group during 4 days. Upregulation of *Vegfa* gene was observed in iron oxide nanoparticles treated group and the magnetic field exposed group significantly ($p < 0.05$) relative to ischemia reperfusion (IR) model. But overexpression of *Vegfa* gene in combination therapy group was not significant relative to ischemia reperfusion (IR) group.

Conclusion: It seems that iron oxide nanoparticles and magnetic field can separately be two effective methods for angiogenesis after ischemia reperfusion (IR).

* Corresponding Author:

Zeinab Khazaei Koochpar; Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.

Tel: +98 911 392 6684

Fax:

Email: khazaei@toniau.ac.ir

© Copyright (2018) Arak University of Medical Sciences

Cite this article as:

Ghasemi M., Khazaei Koochpar Z., Falahati M. The Effect of Iron Oxide Nanoparticles and Magnetic Field on Angiogenesis and Deregulation of *Vegfa* Gene After Ischemia Reperfusion in Rat. J Arak Uni Med Sci. 2018; 21(3): 83-93.