نقش نانوذرات اکسیدآهن و میدان مغناطیسی بر آپوپتوز و بیان ژن Bax در هیپوکامپ رت متعاقب ایسکمی ریپرفیوژن

شقایق باقری طاری (MSc)^۱، زینب خزائی کوهپر (PhD)^۱*، مجتبی فلاحتی (PhD)^۲

۱– گروه زیست شناسی سلولی ومولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاداسلامی ۲– گروه نانو تکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، واحد علوم دارویی تهران، دانشگاه آزاداسلامی

دریافت:۹۶/۴/۱۶، اصلاح: ۹۶/۷/۳۰، پذیرش: ۹۶/۹/۲۱

خلاصه

سابقه و هدف: سکته مغزی دومین علت منجر به مرگ در جهان است. بعد از سکته مغزی، بسیاری از نورون ها در مرز ایسکمی متحمل آپوپتوز میشوند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات نانوذرات اکسیدآهن و میدان مغناطیسی در کاهش آپوپتوز بعد از ایسکمی ریپرفیوژن در مدل رت می باشد.

مواد و روشها: در این مطالعه تجربی، ۵۰ سر رت نر نژاد ویستار(۲۵۰–۲۲۰ گرم) بطور تصادفی به ۵ گروه ده تایی شامل کنترل، شم (ایسکمی ریپرفیوژن)، ایسکمی ریپرفیوژن+تحت تیمار با نانوذرات اکسیدآهن (۱۰ mg/kg)، ایسکمی ریپرفیوژن+میدان مغناطیسی(۱ تسلا، ۲۰ دقیقه روزانه به مدت ۴ روز) و ایسکمی ریپرفیوژن+استفاده از نانو ذره اکسید آهن و میدان مغناطیسی به طور همزمان تقسیم شد. تزریقها به روش درون صفاقی انجام شد. بعد از چهار روز، هیپوکامپها از مغز موشها جهت مطالعه القاء آپوپتوزیس (به روش TUNEL) و تغییرات بیان ژن Bax (به روش PCR)جدا شده و مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: بعد از القاء ایسکمی ریپرفیوژن، تعداد سلولهای تانل مثبت تحت تیمار با نانوذرات اکسیدآهن (۲±۷) و یا میدان مغناطیسی (۲±۱۲) در طول ۴ روز کاهش معنی داری نسبت به گروه ایسکمی ریپرفیوژن (۲۷±۵) نشان داد (۲۰(۱۰)). اما تیمار همزمان با نانوذرات و میدان مغناطیسی (۲/±۲/۶) تفاوت معنیداری در مقایسه با گروه ایسکمی ریپرفیوژن (۵±۲۷) در طول ۴ روز نشان نداد. بعلاوه بیان ژن *Bax* در گروه تحتتیمار با نانوذرات اکسیدآهن (۲۲+(۲/۴±۰/۳) یا در گروه در معرض میدان مغناطیسی (۲۳(±۲/۳)به طور معنیداری(۹</۱/۲) در مقایسه با مدل ایسکمی ریپرفیوژن (۲۵(۲۰±۵/۳) کاهش داشت.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج این مطالعه، به نظر می رسد که نانوذرات اکسیدآهن، همینطور میدان مغناطیسی دو روش مؤثر در کاهش آپوپتوز بعد از ایسکمی ریپرفیوژن باشند.

واژه های کلیدی: Bax اکسیدآهن، ایسکمی ریپرفیوژن ، میدان مغناطیسی، نانوذرات.

مقدمه

سکته مغزی دومین علت مرگ (۱) و یکی از شایع ترین دلایل ناتوانی (۲) بالغین در دنیا محسوب می شود. برای درمان بخش های آسیب دیده مغز ناشی از سکته مغزی روش های درمانی مختلفی برای نورون زایی، رگ زایی، افزایش طول آکسونی و سیناپتوژنز می باشد؛ از جمله پیوند سلول های بنیادی عصبی، مزنشیمال، جنینی و یا سلول های بنیادی چند توانه وجود دارد (۱). با توجه به نقش کلیدی هیپوکامپ در یادگیری و حافظه (۳)، کاهش آسیب وارده به این بخش و ترمیم آن در آسیبهای ناشی از سکته مغزی دارای اهمیت ویژه ای می باشد. استفاده از به بطول های بنیادی موجود در هیپوکامپ به منظور ترمیم ضایعات عصبی امروزه به عنوان سیاستی مهم و کارآمد در درمان بیماریهای عصبی محسوب می گردد (۴). بطوریکه القاء، تکثیر و تمایز سلول های بنیادی عصبی می موجود در لایه زیر بطنی منجر به افزایش بهبود و ترمیم ضایعات عصبی می گردد(۵). امروزه از نانوذرات

اکسیدآهن با اهداف مختلفی چون ردیابی سلولی یا ردیابی داروهای ضد سرطانی به همراه MRI (Magnetic Resonance Imaging) استفاده می شود (۶). هدایت داروها، آنزیمها و آنتی بادیها با نانوذرات اکسید آهن تحت تأثیر یک میدان مغناطیسی به اندام، بافت یا موضع سرطانی می تواند یکی دیگر از کاربردهای درمانی آن باشد(۲). مزیت بالقوه نانوذرات اکسیدآهن در درمان ضایعات عصبی، توان بالای آنها در تبادل مواد بین بافت و خون پس از ایسکمی است (۸). همچنین مشخص شده که میدانهای مغناطیسی منجر به ایجاد تغییراتی ور نفوذپذیری غشاء سلولی و بر هم کنش با یونها و مولکولهای آلی مثل توجه به اینکه ایسکمی باعث آسیبهای جبران ناپذیری به بافت مغز میشود، در این مطالعه، تأثیر نانوذرات اکسیدآهن و میدان مغناطیسی بر مغز موش بعد از ایسکمی ریپرفیوژن (Ischemic Reperfusion=IR) بر کاهش آپوپتوز و بیان ژن Bax مورد ارزیابی قرار گرفته است.

آدرس: تنکابن، دانشگاه آزاداسلامی واحدتنکابن، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی. تلفن: ۵۴۲۷۱۱۰۵

[🔳] این مقاله حاصل پایان نامه شقایق باقری طاری دانشجوی کارشناسی ارشد رشته علوم سلولی و مولکولی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن می باشد.

^{*} مسئول مقاله: دكتر زينب خزائي كوهپر

مواد و روشها

حیوانات: این مطالعه تجربی پس از تصویب در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی تهران به شماره iauz.REC.۱۳۹۳.۴۵ بر روی ۵۰ سرموش صحرایی نر، نژاد ویستار به وزن ۲۵۰–۲۲۰ گرم از دانشگاه تهران (گروه فارماکولوژی) انجام شد. موشها در اتاقی با دوره روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته و دمای ۲±۲۵ درجه سانتیگراد و تأمین آب و غذا نگهداری شدند.

موش ها در پنج گروه ۱۰ تایی ۱) کنترل: حیوانات سالم، ۲) شم: حیوانات مدل ایسکمی ریپرفیوژن (IR)که تنها با محلول نمکی نرمال (حلال) تیمار شدند، mg/kg آزمایشی یک : حیوانات مدل ایسکمی ریپرفیوژن مغزی که با mg/kg ۱۰ 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 روزانه تحت تأثیر میدان مغناطیسی به قدرت ۱ تسلا قرار گرفتند، تقسیم شدند. روزانه تحت تأثیر میدان مغناطیسی به قدرت ۱ تسلا قرار گرفتند، تقسیم شدند. سپس برای القاء بیهوشی در حیوانات از ترکیب داروهای زایلازین (شرکت Alfasan ملند) و کتامین (شرکت Rotexmedica، آلمان) استفاده گردید. که با نسبت ۱۰ (۵ میلی لیتر از کتامین+ ۱ میلی لیتر زایلازین) تهیه و به مقدار Mg/kg بر ایسی ۱۰ (۱ میلی از هر حیوان به صورت داخل صفاقی تزریق گردید.

القاء ایسکمی ریپرفیوژن مغزی در موش: بعد از بیهوشی، یک برش عمودی در ناحیه گردن داده شد و به دنبال آن عروق کاروتید مشترک در هر دو سمت قابل مشاهده گردید. پس از جداسازی عصب واگ، عروق کاروتید توسط کلامپ میکروسرجری به مدت ۲۰ دقیقه مسدود شدند و خونرسانی به مغز متوقف گردید. در زمان ایسکمی درجه حرارت بدن حیوان مرتباً بررسی شد و پس از ۲۰ دقیقه کلامپها برداشته شده و گردش خون مجدداً برقرار گردید. پس از القاء ایسکمی، ماهیچههای جدا شده در محل آناتومیک خود قرار داده شد و بخش برش داده شده، بخیه گردید.

Iron) (Fe2O3) سوسپانسیون نانوذرات اکسیدآهن (Fe2O3)) بصورت پودر رودر Oxide(II III) Magnetic Nanoparticles powder) بصورت پودر در ابعاد ۱۰ نانومتر از شرکت سیگما-آلدریچ (آلمان) خریداری شد. نانوذرات اکسیدآهن با غلظت نهایی۱۰ mg/ml به محلول نمکی در درجه حرارت ۴۰–۳۵ درجه سانتی گراد اضافه 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، گروهها 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 نانوذرات اکسیدآهن): حیوانات ۲۰ دقیقه پس از القاء آسیب مغزی با دوز ۱۰ mg/kg از نانو ذره اکسیدآهن 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 بمدت ۲۰ دقیقه) قرارداده شد (شکل۱).

گروه ۵ (گروه در معرض میدان مغناطیسی و نانوذرات اکسیدآهن): تیمار حیوانات، ۲۰ دقیقه پس از القاء آسیب مغزی با نانوذره اکسیدآهن (۱۰ mg/kg) 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) قرارداده شد. در روز چهارم بعد از تیمارهای مختلف، حیوانات در تمامی گروهها بیهوش شده و پس از جداسازی سر، مغز موشها در محلول نمکی سرد قرار داده شد.



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

برش فروزن از مغز و رنگ آمیزی TUNEL: به منظور بررسی میزان آپوپتوز در نورونها بعد از القاء ایسکمی ریپرفیوژن و تغییر در میزان مرگ بعد از تیمارهای مختلف از رنگ آمیزی اختصاصی آپوپتوز (رنگ آمیزی TUNEL) استفاده شد. به این منظور ابتدا از بافت مغز نگه داری شده در فریزر [°]۰۸- ، بلوک پارافینه تهیه و در نیتروژن مایع قرار داده شد. سپس هر بلوک در دستگاه میکروتوم فروزن قرار داده شده و برشهایی در ابعاد μm ۵-۳ از این بافت تهیه شد و بر روی لام حاوی محلول OCT قرار داده شد.

برای مشخص نمودن سلولهای آپوپتوتیک، رنگ آمیزی تانل با استفاده از دستورالعمل کیت Abcam) (TUNEL) مورت گرفت. ابتدا Assay Kit (TUNEL) مانگلستان) صورت گرفت. ابتدا برش های تهیه شده از بافت به ترتیب با محلول پروتئیناز K به مدت ۵۰–۱۵ دقیقه در دمای ۳۷–۲۱ درجه سانتیگراد انکوبه و سپس با PBS شستشو داده شد. مواجهه بافت با هیدروژن پراکساید ۳٪ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی مواجهه بافت با هیدروژن پراکساید ۳٪ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی انجام شد و سپس با PBS شستشو داده شد. به منظور افزایش میزان نفوذپذیری بافت مورد نظر، قطعات بافتی بر روی یخ به مدت دو دقیقه قرار داده شد و بعد بافت مورد نظر، قطعات بافتی بر روی یخ به مدت دو دقیقه قرار داده شد و بعد بافت مورد نظر، قطعات افتی بر روی یخ به مدت دو دقیقه قرار داده شد و بعد PBS انجام شد. بدبابل آن، محلول Converter-POD, 3

دقیقه در دمای ۳۷ درجه انکوبه شده و سپس با استفاده از PBS شستشو داده شد. پس از شستشو، به بافتها ماده کروموژن DAB افزوده شدو به مدت ۱۰–۵ دقیقه در دمای ۲۵–۱۵ درجه انکوبه گردید و سپس با استفاده از PBS شستشو داده شد. در نهایت از هر گروه سه لام به صورت تصادفی انتخاب و در هر لام پنج فیلد با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰۸ مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی نمونههای بافتی از نظر میزان آپوپتوز: درتمامی بافتهای تهیه شده به منظور بررسی میزان آپوپتوز در ناحیه CA1 هیپوکامپ از رنگ آمیزی TUNEL استفاده شد. در این نوع رنگ آمیزی، سلولهای دچار آپوپتوز (TUNEL⁺) دارای هسته پر رنگ (مشکی تا قهوه ای رنگ) با ساختاری قطعه قطعه بوده و سلولهای سالم فاقد این ساختارها هستند. تعداد کل سلولهای TUNEL⁺ (اجسام آپوپتوتیک) در ناحیه CA1 مغز حیوانات نشان دهنده میزان آپوپتوز در این بخش از مغز حیوانات می باشد. شمارش سلولهای ⁺TUNEL به کمک نرم افزار Image Tools انجام شد.

استخراج RNA: به منظور استخراج RNA از ناحیه CA1 هیپوکامپ، از کیت RNX-Plus Solution (سیناژن، ایران) استفاده شد. RNA استخراج شده از نمونه های مختلف از نظر کمی به کمک اسپکتروفوتومتر نانودراپ ۲۰۰۰ (Thermo، آمریکا) و از نظر کیفی در ژل آگارز ۱٪ بررسی شد.

بررسی بیان ژن Bax به روش Q-PCR؛ برای بررسی متغیر بیان ژن Bak از واکنشQ-PCR استفاده شد. در ابتدا سنتز cDNA به کمک RNA استخراج شده و کیت CDNA Synthesis Kit در ایتدا منتز RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (cDNA Synthesis Kit، مواد تهیه شده در میکروتیوپ به منظور سنتز cDNA داخل Thermo Fisher)Applied Biosystems 2720

Scientific آمریکا)قرار داده شد. در ادامه تفاوت سطح بیان ژن *Bax* در گروه های مورد مطالعه به روش Q-PCR نسبت به ژن رفرنس β-actin کمک کیت SYBR Green Master Mix (یکتا تجهیز،ایران) مقایسه شد. واکنش در دستگاه Syber Greet Master IQTM Real-TimePCR Detection واکنش در دستگاه Biorad) System آبتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۴۰ سیکل واکنش تکثیر شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ ثانیه و اتصال پرایمرها/طویل سازی در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳ ثانیه و شرایط دمایی مرحله تشکیل منحنی ذوب شامل ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵۱ ثانیه و شرایط دایی مرحله تشکیل منحنی ذوب شامل ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۱۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه مدت ۱۵ ثانیه و شرایط

توالی پرایمر های 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 t- کمک معادله $2^{-\Delta\Delta CT}$ آنالیز گردید. داده ها با استفاده از آزمونهای آماری t-کمک معادله Tukey و تحلیل one way ANOVA .test شدندو p<۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

تتایج رنگ آمیزی لام های مربوط به گروه های مورد مطالعه با استفاده از کیت TUNEL: تصاویر گرفته شده از ناحیه CA1 هیپوکامپ رت در گروه های مورد مطالعه با رنگ آمیزی تانل در شکل ۲ نشان داده شده است. این روش برای ارزیابی کمّی آپوپتوز بطور گسترده ای بکار می رود.

جدول ۱. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

شکل۲. ناحیه CA1 از هیپوکامپ رت در ۵گروه مورد مطالعه . رنگ آمیزی تانل، بزرگنمایی ۴۰۰× (فلش مشکی: سلولهای دچار آپوپتوز (اجسام آپوپتوتیک)و فلش قرمز: سلولهای سالم را نشان می دهد .A)گروه سالم، B) گروه IR+ Magnetic field (D ، اگروه IR+Fe2O3 field و E) گروه IR+Fe2O3 + Magnetic

بررسی میزان آپوپتوز در گروه های مختلف آزمایشی: نتایج تست TUNEL نشان داد که ایجاد ایسکمی ریپرفیوژن (IR) منجر به افزایش معنی دار (p<-//١) تعداد سلول.های TUNEL⁺) نسبت به گروه سالم mg/kg) شد. در گروه تحت تیمار با نانوذرات اکسیدآهن با غلظت mg/kg ۱۰ کاهش معنیدار(p<٠/٠١) تعداد سلولهای +TUNEL نسبت به گروه IR (۲۷±۵) مشاهده شد. در گروه در معرض میدان مغناطیسی با شدت ۱ تسلا (به مدت ۲۰ دقیقه طی ۴ روز) کاهش معنیدار(p<۰/۰۱) تعداد سلولهای ۲۷) انسبت به گروه IR (۲۲±۵) رخ داد. در گروه با تیمار ترکیبی (۲۲±۵+) TUNEL شامل نانوذرات اکسیدآهن و میدان مغناطیسی (۲/۶±۲۲) تفاوت آماری قابل توجهی نسبت به گروه IR (۲۷±۵) در کاهش تعداد سلولهای +TUNEL مشاهده نشد. اما افزایش معنی دار تعداد سلول های +TUNEL در مقایسه همین گروه (تیمار ترکیبی) (۲/۶±۲۲) با گروه تحت تیمار با نانوذرات اکسیدآهن به تنهایی (۲±۲) (p<۰/۰۱) و یا میدان مغناطیسی(t±۲) (p<۰/۰۵) مشاهده شد. همچنین نتایج این آزمایش نشان داد که گروه تحت تیمار با نانوذرات اکسیدآهن(۲±۲) نسبت به گروه در معرض میدان مغناطیسی (۲±۲۱)، تعداد سلولهای +TUNEL کمتری داشتند (p<٠/٠٥) (نمودار ۱).



نمودار ۱. اجسام اپوپتوتیک در ناحیه CA1 هیپوکامپ در گروه های مختلف مورد آزمایش. حروف غیریکسان: تفاوت معنی دار است

بررسی بیان ژن Bax درگروه های مورد مطالعه: بعد از اطمینان از صحت RNA استخراجشده (شکل ۳)، بیان ژن Bax در گروههای مختلف آزمایشی بصورت کمی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از محاسبات آماری نشان داد که ایجاد ایسکمی ریپرفیوژن (IR) باعث افزایش معنیدار (p<٠/٠١) بیان ژن (۵/۲۱ ±۰/۷۳) شد. در حالیکه تیمار موشها با (۵/۲۱ ±۰/۷۳) شد. در حالیکه تیمار موشها با نانوذرات اکسیدآهن (۱۰mg/kg) منجر به کاهش معنی دار بیان ژن Bax (۲/۴۶±۰/۲۲) در مقایسه با موشهای دچار IR (۵/۲۱±۰/۷۳) شد. همچنین در گروه IR بعد از مواجهه با میدان مغناطیسی(MF) (۱ تسلا، به مدت ۴ روز و هر روز ۲۰ دقیقه) کاهش معنی دار(p<٠/٠٥) بیان ژن Bax (۳/۲۸±۰/۳۳) نسبت به گروه دچار IR (۵/۲۱±۰/۷۳) مشاهده شد. استفاده همزمان از میدان مغناطیسی با شدت ۱ تسلا و نانوذرات اکسیدآهن با غلظت ۱۰mg/kg (۴/۱۷±۰/۵۹) تفاوت آماری قابل توجهی با گروه IR(۰/۲±۰/۷۳) نشان نداد. در حالیکه کاهش معنی دار (p<٠/٠٥) بیان ژن Bax در گروه تحت تیمار با نانوذرات اکسیدآهن به تنهایی (۲۲+±۲/۴۶) و یا در مواجهه با میدان مغناطیسی به تنهایی (۳/۲۸±۰/۳۳)، در مقایسه با گروه تحت یمار همزمان آن دو (۴/۱۷±۴/۱۷) بیشتر مشهود بود. همچنین نرخ کاهش بیان ژن Bax در گروه تحت تیمار با نانوذرات

اکسیدآهن به تنهایی(۲/۲۶±۰/۲۲) بیشتر از نرخ کاهش بیان ژن Bax درگروه در معرض میدان مغناطیسی(۳۲۸±۰/۳۳) بود (۹<۰/۰۵) (نمودار ۲).



شکل ۳. نتیجه الکتروفورز پنج نمونه RNA استخراج شده از گروههای مختلف آزمایشی. در ژل آگارز ۱٪. وجود سه باند واضح (rRNA 18s ، rRNA28s و rRNA و rRNA 5s) در ژل آگارز نشان دهنده صحت فرآیند تخلیص و عدم تخریب نمونههای RNA می باشد



نمودار۲. مقایسه بیان ژن *Bax* در گروه های مختلف مورد مطالعه .حروف غیریکسان:تفاوت معنی دار است

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه مشخص شد که نانوذرات اکسیدآهن و میدان مغناطیسی بطور جداگانه نقش مؤثری در کاهش آپوپتوز بعد از القاء ایسکمی ریپرفیوژن در هیپوکامپ موش دارند. Kim و همکاران در مطالعه خود مشاهده کردند که میزان بقاء و اتصالات سلولهای عصبی تحت تیمار با این نانوذرات در شرایط Invitro به طور معنی داری افزایش می یابد (۱۱).

در مطالعه حاضر نیز کاهش مرگ سلولهای هیپوکامپ و به عبارتی افزایش بقای سلولهای تحت تیمار با نانوذرات اکسیدآهن مشاهده شد. پس از ایسکمی با بازگشت جریان خون، سطح بالایی از رادیکالهای آزاد تولید می شوند که باعث آسیب به اندامکها و در نتیجه سلولهای عصبی می شود(۱۲). به نظر می رسد نانوذرات اکسیدآهن با کاهش رادیکالهای آزاد باعث کاهش آپوپتوز و افزایش بقای سلول شوند. در مطالعه Estevez و همکاران مشاهده شد که استفاده از نانوذرات اکسیدسریوم به دلیل توانایی قوی در مهار رادیکالهای آزاد باعث کاهش عوارض ناشی از ایسکمی در مغز موش و کاهش مرگ نورونها بعد از ایسکمی می شود (۱۲). بنابراین به نظر می رسد نانوذرات اکسیدآهن نیز با داشتن توان مهار رادیکالهای آزاد در بقای سلولهای عصبی نقش داشته باشند. بطوریکه در مطالعه Apopa و همکاران مشخص شد که نانوذرات اکسیدآهن توان بالقوه ای

در افزایش نفوذ پذیری اندوتلیال عروقی دارند. بر اساس نتایج این مطالعه، این نانوذرات از طریق تولید فرمهای اکسیژن فعال (ROS=species) و تثبیت میکروتوبولها منجر به افزایش نفوذپذیری عروق می گردند. این نتایج پیشنهاد می کند که از نانوذرات اکسیدآهن بتوان جهت افزایش کارآیی درمانهای سیستم اعصاب مرکزی استفاده نمود (۸).

در مطالعه حاضر نانوذرات اکسیدآهن به تنهایی قادر به کاهش مرگ سلولهای عصبی بودند بطوریکه نتایج آزمون TUNEL و بیان ژن Bax کاهش مرگ برنامهریزی شده سلولها را بعد از القا ایسکمی تأیید نمود. مطالعه Palizvzn و همکاران نشان داد که نانو ذرات اکسیدآهن توان بالایی در افزایش حفاظت عصبی و ترمیم ضایعات عصبی دارد (۱۳). همچنین استفاده از میدان مغناطیسی در این مطالعه اثر کاهش مرگ سلولهای عصبی بعد از ایسکمی را نشان داد؛ هرچند تأثیر آن کمتر از نانوذرات به تنهایی بود. به نظر میرسد میدان مغناطیسی با تغییر در نفوذپذیری غشاء از طریق برهـمکنش با یون ها و مولکولهای آلی مثل پروتئینها و نوکلئیک اسیدها منجر به رشد افزایش فعالیت میتوکندریایی در موشهای مبتلا به پارکینسون را داشتند (۱۴). بنابراین میتوانند به این روش مانع اثر رادیکالهای آزاد بر میتوکندری و موجب کاهش القاء مرگ سلولی حاصل از ایسکمی شوند.

نتایج این مطالعه و دیگر مطالعات نشان میدهد که نانوذرات اکسیدآهن به تنهایی و میدان مغناطیسی به تنهایی باعث کاهش القاء مرگ بعد از ایسکمی در هیپوکمپ مغز موش میشوند. هرچند کاهش القاء آپوپتوز در سلولهای آسیبدیده مغزی تحت تیمار با نانوذرات اکسیدآهن بسیار بیشتر از مجاورت مغز با میدان

مغناطیسی بود. به نظر میرسد این امر نتیجه افزایش تکثیر سلولها در موضع آسیب، کاهش اثرات زیانبار رادیکالهای آزاد و افزایش بقای اجزای مهم سلولی در اثر رسانش بیشتر مواد حیاتی به درون سلول به واسطه نانوذرات اکسیدآهن در مقایسه با میدان مغناطیسی باشد. از سوی دیگر استفاده همزمان این دو تیمار اثر عکس داشته و تغییر چندانی نسبت به سلولهای آسیب دیده مغزی بدون تیمار نشان نداد. لازم است برای افزایش اثر همزمان این دو تیمار همانند مطالعه Pita-Thomas و همکاران از ولتاژهای متفاوت و یا تغییر در زمان مجاورت با میدان مغناطیسی استفاده نمود (۱۵) تا اثربخشی نانوذرات را افزایش دهد. از سوی دیگر در تیمار همزمان با نانوذرات و میدان مغناطیسی بیان ژن پیش آپوپتوزی Bax كمتر از مدل موشى دچار ايسكمى بود كه اين نتيجه مؤيد اين امر است كه Bax ادامه تیمارها با نانوذرات میدان مغناطیسی به مدت طولانی تر یا با ولتاژهای متفاوت ممكن است باعث كاهش مرگ سلوليو افزايش حفاظت كنندگي و ترميم نورونها بعد از القاء ایسکمی گردد. یافتههای این مطالعه نشان داد که غلظت ۱۰mg/kg از نانوذرات اکسیدآهن و میدان مغناطیسی به شدت ۱ تسلا (۲۰ دقیقه) به مدت ۴ روز به تنهایی قادرند باعث کاهش مرگ سلولی بعد از القاء ایسکمی ریپرفیوژن در موش صحرایی شوند.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از آقای دکتر احمدرضا دهپور ریاست آزمایشگاه بیمارستان امام خمینی و پرسنل آزمایشگاه که در انجام تحقیق همکاری داشتند، تشکر و قدردانی می گردد.

The Role of Iron Oxide Nanoparticles and Magnetic Field on Apoptosis and Bax Gene Expression in Rat Hippocampus after Ischemic Reperfusion

Sh. Bagheri Tari (MSc)¹, Z. Khazaei Koohpar (PhD)^{*1}, M. Falahati (PhD)²

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

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

> J Babol Univ Med Sci; 20(2); Feb 2018; PP: 42-8 Received: Jan 7th 2017, Revised: Oct 22th 2017, Accepted: Dec 12th 2017.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: Stroke is the second leading cause of mortality in the worldwide. After a stroke, many neurons in the ischemic penumbra will undergo apoptosis. The aim of this study was investigation of effects of iron oxide nanoparticles and magnetic field on apoptosis reduction after ischemic reperfusion in rat model.

METHODS: In this experimental study, 50 male Wistar rats weighing 220-250g were randomly divided into five groups of 10 rats each: including control, sham (ischemic reperfusion model), ischemic reperfusion + iron oxide nanoparticles (10mg/kg), ischemic reperfusion +magnetic field (1 Tesla, 20 min in 4 days), and ischemic reperfusion + iron oxide nanoparticles and magnetic field groups. Injections were performed intraperitoneally. After Four days, the hippocampi were removed for studying of Apoptosis Induction (by TUNEL technique) and changes in *Bax* gene expression (by Q-PCR method).

FINDINGS: After induction of ischemic reperfusion, TUNEL⁺ cells number treated with iron oxide nanoparticles (7 ± 2) and or the magnetic field (12 ± 2) had significant decrease (p<0.01) relative to ischemic reperfusion group (27±5) during 4 days. But simultaneous treatment with nanoparticles and magnetic field (23±2.6) did not show significant difference compared to ischemic reperfusion group (27±5) during 4 days. Furthermore *Bax* gene expression decreased in iron oxide nanoparticles treated group (2.46±0.22) or the magnetic field exposed group (3.28±0.33) significantly (p<0.01)compared to ischemic reperfusion model (5.21±0.73).

CONCLUSION: It seems that iron oxide nanoparticles as well as magnetic field to be two effective methods in decrease of apoptosis after ischemic reperfusion.

KEY WORDS: Bax, Iron Oxide, Ischemia, Magnetic Field, Nanoparticles, Reperfusion

Please cite this article as follows:

Bagheri Tari Sh, Khazaei Koohpar Z, Falahati M. The Role of Iron Oxide Nanoparticles and Magnetic Field on Apoptosis and Bax Gene Expression in Rat Hippocampus after Ischemic Reperfusion. J Babol Univ Med Sci. 2018;20(2):42-8.

*Corresponding Author; Z. Khazaei Koohpar (PhD)

Address: Department of Cellular and Molecular Biology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Faculty of Biological Sciences, Tonekabon, I.R.Iran
Tel: +98 11 54271105
E-mail: khazaei@toniau.ac.ir

References

1.Marlier Q, Verteneuil S, Vandenbosch R, Malgrange B. Mechanisms and functional significance of stroke-induced neurogenesis. Front Neurosci. 2015;9:458.

2.Rabiei Z, Bigdeli M, Lorigooini Z. A review of medicinal herbs with antioxidant properties in the treatment of cerebral ischemia and reperfusion. J Babol Univ Med Sci. 2015;17(12):47-56. [In Persian]

3.Jamali s, Abbasnejad M, Esmaeili mahani S, Badoei-Dalfard A, Kooshki R. Learning and memory impairment induced by the injection of ascorbic acid and ascorbate oxidase into the hippocampus in the morris water maze. J Babol Univ Med Sci. 2015;17(4):36-43. [In Persian].

4.Ohira T, Shahar E, Chambless LE, Rosamond WD, Mosley TH, Folsom AR. Risk factors for ischemic stroke subtypes: the Atherosclerosis Risk in Communities study. Stroke. 2006;37(10):2493-8.

5.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.

6.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.

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. Chem Rev. 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. Part Fibre Toxicol. 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. Int J Mol Sci. 2009;10(10):4515-58.

10.Veiseh O, Gunn JW, Zhang M. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. Adv Drug Deliv Rev. 2010;62(3):284-304.

11.Kim JA, Lee N, Kim BH, Rhee WJ, Yoon S, Hyeon T ,et al. Enhancement of neurite outgrowth in PC12 cells by iron oxide nanoparticles. Biomat. 2011;32(11):2871-7.

12.Estevez AY, Pritchard S, Harper K, Aston JW, Lynch A, Lucky JJ, et al. Neuroprotective mechanisms of cerium oxide nanoparticles in a mouse hippocampal brain slice model of ischemia. Free Radic Biol Med. 2011;51(6):1155-63.

13.Palizvzn M, Khademi S, Ghazavi A, Mosayebi G. Correlation of two way active avoidance learning with Nitric Oxide and Ferric reduction/antioxidant power in rats. Arak Med Univ J. 2006;9(4):1-8.[In Persian].

14.Umarao P, Bose S, Bhattacharyya S, Kumar A, Jain S. Neuroprotective potential of superparamagnetic iron oxide nanoparticles along with exposure to electromagnetic field in 6-ohda rat model of parkinson's disease. J Nanosci Nanotechnol. 2016;16(1):261-9.

15.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.