

نشان‌دار کردن و ردیابی *in vivo* سلول‌های بنیادی ماتریکس بند ناف انسان با استفاده از MRI

رضا احدی **M.Sc.**، مهرداد بختیاری **Ph.D.**، محمدتقی جغتایی **Ph.D.**، مهدی مهدی‌زاده **Ph.D.**، سمیده خوبی **Ph.D.**،
عبداله‌ادی دانشی **M.D.**

* مرکز علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، ایران
** گروه آناتومی دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
*** گروه فیزیک پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران
**** بیمارستان شهدای هفتم تیر دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، ایران
تاریخ دریافت: خرداد ماه ۹۰ تاریخ پذیرش: شهریور ماه ۹۰

چکیده

هدف: نشان‌دار کردن و ردیابی سلول‌های بنیادی بند ناف با MRI

مواد و روش‌ها: بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون سلول‌های بنیادی ماتریکس بند ناف انسان از طریق اندوسیتوز با ماده‌ای به نام USPIO (ultra supra para magnetic iron oxide) که اکسید آهن سوپر پارا مغناطیسی است نشان‌دار شدند و رنگ‌آمیزی اختصاصی پروسین بلو و آزمایش جذب اتمی برای تایید نانو ذرات آهن در داخل سلول‌ها انجام شد. نانو ذرات اکسید آهن را در سلول‌ها نشان داد و بعد از تزریق به مغز خرگوش باتصاویر MRI magnetic resonance imaging در یک دوره زمانی ردیابی شد.

یافته‌ها: نشان داده شد که این سلول‌های بنیادی با ماده USPIO قابل نشان‌دار شدن بوده و رنگ‌آمیزی اختصاصی پروسین بلو وجود نانو ذرات آهن USPIO را داخل سیتوپلاسم این سلول‌ها تأیید نمود. پارامترهای T2 تصویربرداری MRI در دستگاه ۱/۵ تسلا به ترتیب ۶۶۰ و ۱۲۰ میلی‌ثانیه به دست آمد و نواحی با سیگنال متغیر در تصویربرداری T2 تا یک هفته قابل ردیابی و مشاهده است و بعد از هفته اول این تغییرات کاهش یافته و از بین می‌رود.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که سلول‌های بنیادی ماتریکس بند ناف انسان قابل نشان‌دار شدن با ماده USPIO و قابل ردیابی و مشاهده هستند و این یک روش کاملاً غیرتهاجمی و قابل قبول است و در دوره زمانی محدود است.

کلید واژه‌ها: سلول بنیادی، USPIO، MRI سلولی، نشان‌دار کردن *in vivo*، ردیابی سلولی

مقدمه

حیوانی و استفاده از رنگ‌آمیزی‌ها و آنتی‌بادی‌های مختلف اشاره کرد. در اغلب این روش‌ها تعداد و محل سلول‌های بنیادی پیوندی در غالب بافت‌ها و به‌ویژه در سیستم عصبی (مغز) با

در درمان با سلول‌های بنیادی از روش‌های متعددی برای ارزیابی میزان بقا و مهاجرت سلول‌ها در محل پیوند استفاده می‌شود. از آن‌جمله می‌توان به آنالیز بافت شناسی در مدل‌های

آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، مرکز علوم اعصاب،
صندوق پستی: ۱۹۸۳۹۶۳۱۱۳
Email: reza7ahadi@yahoo.com

کشتن مدل حیوانی و تهیه مقاطع بافتی و آنالیز بافت‌شناسی در مدل‌های حیوانی آن هم یک‌بار قابل بررسی است. بنابراین روش‌های جدیدتری ابداع شده که استفاده از آن‌ها را در یک بازه زمانی طولانی و برای چند بار در حیوان یا انسان زنده سرنوشت، تعداد، مهاجرت یا مرگ سلول‌های بنیادی پیوندی قابل بررسی می‌سازد. مهاجرت و سرنوشت سلول‌هایی بنیادی پیوندی با

استفاده از دستگاه‌های MRI اسکنر 7T، 9.4T یا 11.4T به صورت سریالی قابل انجام است [۱ و ۲]. دستگاه‌های Experimental MRI تصاویری با وضوح بالا و در مقاطع ریز برای مطالعه و ردیابی سلول‌های نشان‌دار شده فراهم می‌نماید هرچند که نیاز به زمان اسکن طولانی‌تری دارد. البته امروزه از اسکنرهای MRI با قدرت مغناطیسی بالا استفاده بالینی نمی‌شود و محدود به تحقیقات آزمایشگاهی است. با نشان‌دار کردن سلول‌های بنیادی جدا شده از منابع مختلف بدن انسان مثل بند ناف انسان می‌توان آن‌ها را در محل‌های پیوند نشان داده و به صورت سریالی در یک بازه زمانی با MRI تصویر برداری و ردیابی نمود. هدف در این طرح استفاده از اسکنر MRI (1.5T) مدل (GE, EXITE 2 -USA) آواتو و سیمفونی برای ردیابی سلول‌های بنیادی استخراج شده از ماتریکس بند ناف انسان و نشان‌دار شده با نانو ذرات اکسید آهن سوپراپارا مغناطیسی است که به داخل مغز خرگوش تزریق شده است.

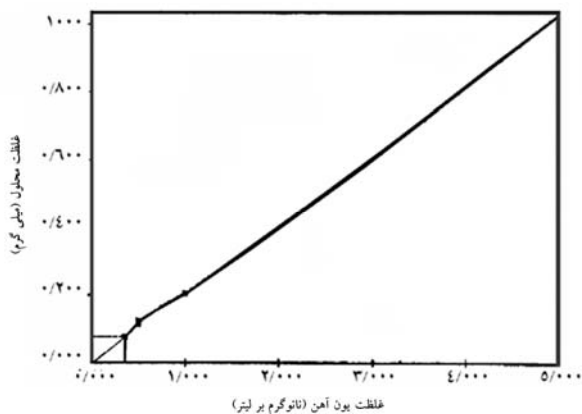
سطح بند ناف با PBS به دقت شسته شد تا خون و سایر آلودگی سطحی آن کاملاً پاک شود. سپس بند ناف را درون یک ظرف استریل گذاشته و با استفاده از الکل ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه سطح آن را استریل نموده و دو انتهای آن بریده و دور انداخته شد. با استفاده از یک تیغ بیستوری پنس و قیچی استریل قسمت باقی مانده آن به قطعات ۳-۵ سانتی متری خرد و به صورت طولی برش داده شد و عروق آن با دقت به وسیله پنس جدا و ماتریکس باقی مانده به کمک تیغ به قطعات ریزتر خرد شد و در دو لوله فالكون حاوی ۱۰ میلی لیتر محلول محیط کشت سلول و ۰/۴ میلی گرم بر میلی لیتر آنزیم کلاژناز فیلتر شده به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه داخل انکوباتور نگهداری شد تا هضم بافتی صورت گیرد. بعد از طی این زمان انکوباسیون لوله فالكون حاوی بافت‌های تقریباً هضم شده و محلول آنزیمی با سرعت ۸۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. از محیط رویی به میزان ۲ میلی لیتر برداشته شد و به مابقی آن ۲ میلی لیتر تریپسین اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور قرارداد شد تا هضم بافتی کامل شود. سپس لوله فالكون‌ها جداگانه با سرعت ۸۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد و محیط رویی در محیط حاوی DMEM (Hyclone) با افزودن FBS (Mediatech) ۱۰ درصد کشت داده شد و قسمت زیرین نیز جداگانه کشت داده شد. هر ۲ روز محیط کشت فلاسک‌ها را دور ریخته و بعد از شستشو با PBS محیط جدید اضافه شد تا مقدار تراکم سلولها در کف فلاسک به حدود ۸۰ درصد برسد [۳].

مواد و روش‌ها

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی بند ناف انسان

بند ناف انسان از نوزادان کامل، رسیده و سالم به‌دست می‌آید [۳]. در تحقیق حاضر بند ناف انسان از نوزادان سالم از اتاق عمل بخش زنان، زایمان بیمارستان میلاد از موارد زایمان سزارین و با رعایت نکات اخلاقی و نکات مربوط به ضد عفونی تهیه شد بعد از تولد نوزاد توسط جراح بند ناف انسانی از بدن مادر و جنین جدا و در ظرف استریل حاوی سرم فیزیولوژیک، نرمال سالین ۰/۹ درصد در دمای ۴ درجه

آنجایی که نمونه‌ها مایع یا جامد هستند برای این کار اتم‌ها یا یون‌ها باید به بخارات گازی تبدیل شوند. برای تایید وجود نانو ذرات یون‌های آهن از اسوسپانسیون سلولی نشاندار شده و نمونه محلول و سلول‌های نشاندار نشده آزمون اسپکتروسکوپی جذب اتمی همراه با کنترل مثبت و منفی استفاده شد و وجود نانوذرات یون‌های آهن تأیید شد (شکل ۱).



شکل ۱. نمودار پاسخ آزمون اسپکتروسکوپی جذب اتمی

گروه‌های مورد مطالعه

این تحقیق روی ۱۲ سر خرگوش بالغ نژاد نیوزیلندی با وزن تقریبی ۳۵۰۰ تا ۵۵۰۰ گرم انجام گرفت و به طور تصادفی به ۳ گروه تقسیم شدند. این پنج گروه عبارتند از:

گروه اول: این گروه شامل ۴ سر خرگوش بالغ نژاد نیوزیلندی بود که در آنها بدون ایجاد ضایعه مغزی، MRI ساده برای بررسی و به دست آوردن پارامترهای تصویری و آناتومیکی صورت گرفت.

گروه دوم: این گروه شامل ۴ سر خرگوش بود که در آنها ضایعه مغزی صورت گرفت و یک هفته بعد از ضایعه، فقط MRI ساده برای بررسی محل و وسعت ضایعه مغزی و مقایسه با مقاطع بافتی ماکروسکوپی انجام شد.

گروه سوم شامل ۴ سر خرگوش بود که در آنها ضایعه مغزی به وسیله لیزر صورت گرفت و سلول‌ها به محل ضایعه تزریق شد. MRI در یک دوره زمانی برای بررسی موقعیت

مواد کنتراست در تصویر برداری MRI

در تصویر برداری MRI از نانو ذرات سوپراپارامغناطیس با پایه اکسید آهن (USPIO) (micro mode، آلمان) استفاده شد که دارای یک هسته مرکزی با دیامتر ۲۰ نانومتر و یک پوشش کربوکسی دکستران بود که دیامتر کلی آن را به ۳۰-۵۰ نانومتر می‌رساند. این نانو ذرات سوپراپارامغناطیس زمان استراحت T2 را کمتر کرده و شدت سیگنال (SI) را کاهش می‌دهد (مواد کنتراست منفی). این نانو ذرات با دوز ۵ میلی‌گرم به ازای هر میلی‌لیتر استفاده شد [۴ و ۵].

نشاندار کردن سلول‌های بنیادی بند ناف انسان

در یک ظرف مخصوص کشت که دارای شش چاهک است به تعداد تقریباً مساوی از سلول‌ها در هر چاهک کشت داده و به چاهک‌ها ۵ میلی‌گرم به ازای هر میلی‌لیتر از نانوذرات (Micro mode) USPIO افزوده و ۴۸ ساعت انکوبه شد تا این نانو ذرات از طریق اندوسیتوز به داخل سلول‌ها جذب شود. بعد از ۴۸ ساعت، محیط کشت حاوی USPIO را عوض نموده و با PBS سه بار هر بار ۵ دقیقه شستشو داده شد تا نانو ذرات USPIO از محیط بیرون سلول و داخل چاهک کاملاً پاک شده و فقط در داخل سلول‌ها باقی بماند [۶ و ۷].

رنگ‌آمیزی سلول‌های بنیادی نشاندار شده با روش

پروسین بلو (Prussian Blue)

رنگ‌آمیزی پروسین بلو برای مقادیر بسیار کم یون‌های آهن در بافت‌هایی همانند کبد و مغز استخوان و داخل سلول‌های دیگر به کار می‌رود. در این رنگ‌آمیزی یون‌های آهن در در سیتوپلاسم سلول‌های نشاندار شده به صورت پیگمان‌های آبی تیره دیده می‌شود.

آزمون اسپکتروسکوپی جذبی (AAS)

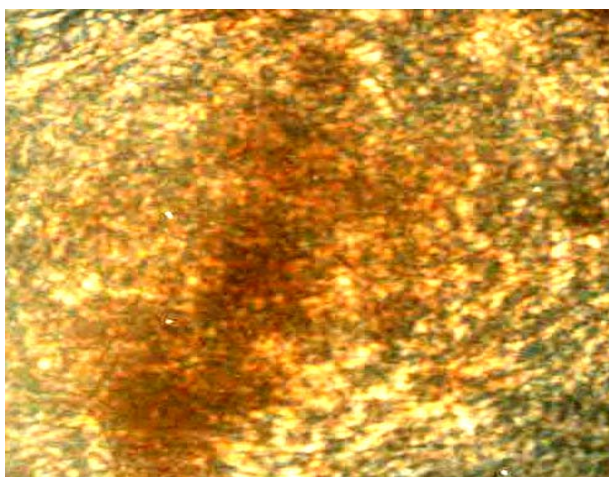
Atomic-absorption spectroscopy

در آزمون اسپکتروسکوپی جذبی از میزان جذب نور برای اندازه‌گیری غلظت اتم‌ها در حالت گازی استفاده می‌شود. از

حجمه خرگوش ایجاد شده بود توسط سوزن انسولین به محل ضایع قبلی تزریق شد. بعد از ریختن یک میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک جنتامایسین برای جلوگیری از عفونت دوباره بخیه انجام شد. [۱۱]

یافته‌ها

این تحقیق نشان داد که سلول‌های ژله وار تون بند ناف را میتوان نشاندار و ردیابی نمود. این سلول‌ها همانند برخی دیگر از سلول‌های بنیادی آلكالین فسفاتاز را بیان می‌کنند (شکل ۲).



شکل ۲. بیان آلكالین فسفاتاز در سلول‌های ماتریکس بند ناف، بزرگنمایی: $\times 300$

رنگ‌آمیزی پروسین بلو برای مقادیر بسیار کم یون‌های آهن در بافت‌هایی همانند کبد و مغز استخوان و داخل سلول‌های دیگر به کار می‌رود. در این رنگ‌آمیزی یون‌های آهن در سیتوپلاسم سلول‌های نشان‌دار شده به صورت پیگمان‌های آبی رنگ تیره دیده می‌شود (شکل ۳).

تصویربرداری MRI

برای تصویربرداری ابتدا خرگوش‌ها با رعایت نکات اخلاقی کار با حیوانات برای ایجاد بی‌حرفی در میدان مغناطیسی اسکنر با کتامین-زیلوزین

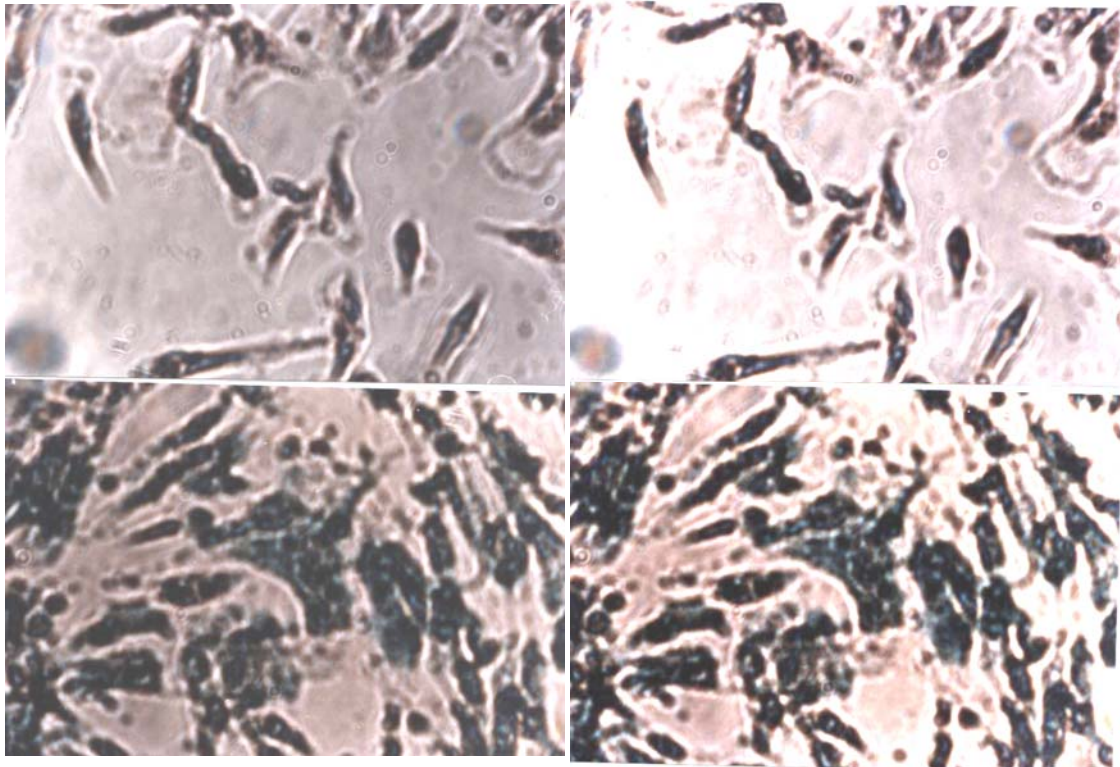
سلول‌ها و میزان تغییرات شدت سیگنال انجام شد.

ایجاد مدل حیوانی ضایعه مغزی با استفاده از لیزر

برای ایجاد مدل از خرگوش‌های نژاد نیوزیلندی استفاده شد و با رعایت نکات اخلاقی کار با حیوانات، برای ایجاد یک ضایعه کوچک مغزی با کتامین-زیلوزین (Alfasan-woerden) بیهوش شدند. بعد از تراشیدن موی سر خرگوش‌ها پوست ناحیه کاملاً با محلول بتادین ضد عفونی شد. یک برش ۱/۵ سانتی‌متری روی ناحیه بین دو گوش داده شد و استخوان حجمه رویت شد. سپس با مته برقی استخوان حجمه در حد فاصل بین درزهای لامدا و برگما به ابعاد $0/5 \times 0/5$ برداشته و سخت شامه دست نخورده رویت شد. سپس از حیوان یک سی تی اسکن سه بعدی به عمل آمد و تحت هدایت سی تی اسکن یک آنژیوکت خاکستری به داخل حجمه و مغز هدایت شد. موقعیت نوک آنژیوکت با اسکن مشاهده و پس از مطمئن شدن از عمق و محل نوک آنژیوکت سوزن آنرا بیرون آورده و فیبر لیزر به اندازه تعیین شده به داخل فرستاده شد و دستگاه لیزر روشن و به میزان ۱۲۰-۱۵۰ ژول انرژی داده شد. (۱۰,۹,۸) و دوباره با اسکن، محل و میزان ضایعه کنترل شد. برای پیشگیری از ایجاد ادم مغزی ناشی از دست کاری و تابش لیزر به حیوان دگزامتازون (۱ میلی‌گرم) تزریق شد. برای کنترل محل ضایعه بعد از کشتن حیوان از مغز مقاطع ماکروسکوپیکی تهیه و کنترل انجام شد.

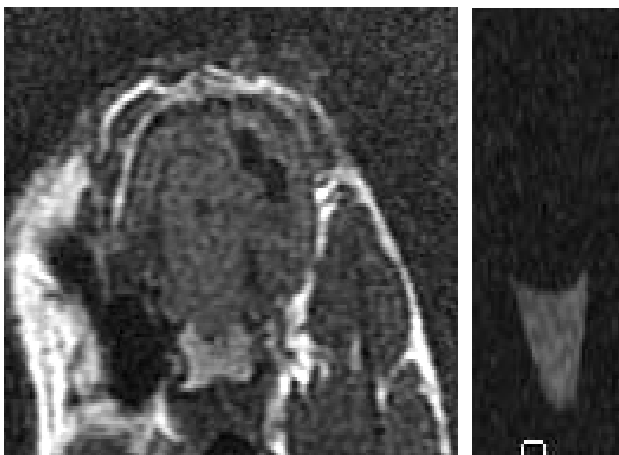
ترانسپلنت نمودن سلول‌ها

سلول‌های UCM به دست آمده پس از نشان دار شدن ابتدا به صورت سوسپانسیون در آمد. سلول‌ها با مش نایلونی که قطر منافذ آن ۷۰ میکرومتر است، صاف کرده و توده‌های سلولی جدا شد. سپس با استفاده از لام نئوبار تعداد سلول‌ها شمارش شده و ۲/۵ میلیون سلول زنده در ۰/۵ سانتی‌متر مکعب PBS حل شد و از طریق سوراخی که قبلاً در استخوان



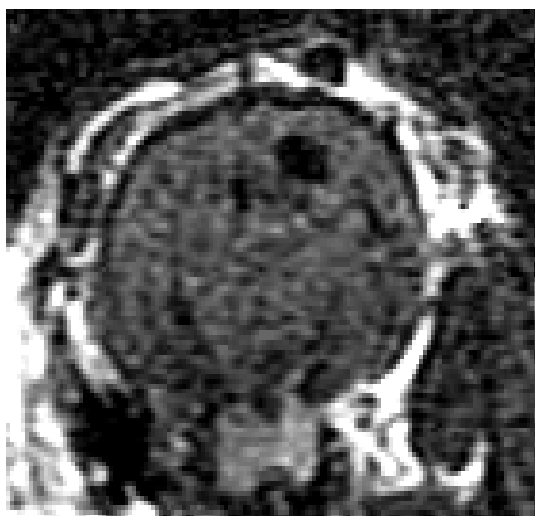
شکل ۳. بعد از رنگ‌آمیزی پروسین بلو. نقاط آبی داخل سلول ذرات آهن رنگ گرفته است. بزرگنمایی: ۲۰۰×

محلول نانو ذرات اکسید آهن در کنار سر حیوان تغییرات شدت در تصاویر مربوط به آن‌ها نیز برای کنترل مثبت مشاهده شد (شکل‌های ۶-۴).



شکل ۴. تصویر کرونال مغز قبل از تزریق و نمونه محلول حاوی سلول‌های نشان‌دار شده

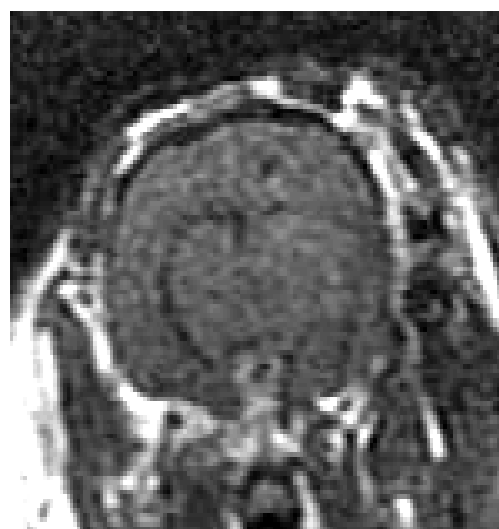
(Rotexmedica Trittau, Germany) بیهوش شدند. سپس حیوان در محفظه‌ای قرار داده شد و با استفاده از کویل‌های زانو و مچ دست با پارامترهای زیر برای رسیدن به بهترین وضوح تصویری ممکن اسکن شد. با روش اسپین اکو تصاویر T2 weighted spin echo pulse sequence با زمان تکرار ۳۷۷۵ میلی‌ثانیه و زمان اکو ۸۵ میلی‌ثانیه و ضخامت مقاطع ۲ میلی‌متری تهیه و T1 weighted spin echo pulse sequence با زمان تکرار ۴۰۰ میلی‌ثانیه و زمان اکو مینیمم و ضخامت مقاطع ۲ میلی‌متری و همچنین از روش اسکن flow attenuated inversion recovery (FLAIR) با زمان تکرار ۶۰۰۰ میلی‌ثانیه و زمان اکو ۹۴ میلی‌ثانیه با inversion time و ۱۵۰۰ میلی‌ثانیه ضخامت مقاطع ۳ میلی‌متری استفاده شد (۱۱-۱۳). با قرار دادن لوله فالکون‌های حاوی سلول‌های نشان‌دار شده و لوله فالکون‌های حاوی خود



شکل ۶. تصویر کروئال مغز ۱۰ روز بعد از تزریق که کاهش تغییرات شدت سیگنال در ناحیه ضایعه دیده می‌شود.



شکل ۵. تصویر کروئال مغز یک روز بعد از تزریق که تغییر شدت سیگنال در ناحیه ضایعه دیده می‌شود.



بمٹ

در ماتریکس یا ژله وارتون بند ناف انسان میزان کمی سلول بنیادی وجود دارد و به طور متوسط در یک بند ناف ۵۰ سانتی‌متری به میزان ۳۰۰ تا ۶۰۰ هزار سلول بنیادی وجود دارد. هر چه فاصله زمانی جداسازی بند ناف از رحم و نوزاد تا زمان کشت کوتاه‌تر باشد مقدار سلول‌های بیشتری کشت خواهند شد. سلول‌های بنیادی ماتریکس بند ناف در پاساژهای اولیه سلولی در هفته اول بعد از کشت همانند سلول‌های مزانشیمال مغز استخوان فیبروبلاست شکل هستند. این سلول‌های بنیادی طی پاساژهای بعدی و هفته دوم آلکالین فسفاتاز را بیان می‌کنند و در پاساژ پنجم برای آزمایش آلکالین فسفاتاز استفاده می‌شوند. برای فریز کردن سلول‌های بنیادی از سلول‌هایی که در فاز رشد خود هستند استفاده می‌شود.

نانوذرات مغناطیسی غیر یونی گونه‌ای از ذرات است که با غشای پلاسمایی سلول‌ها به صورت غیر اختصاصی و با تمایل بسیار زیاد وارد واکنش شود و یکی از علل آن بار موجود در سطح غشای سلول‌هاست. برای نشان دار نمودن، نانوذرات سوپرا پارا مغناطیسی USPIO با پوشش دکستران

الکترونیکی قابل کنترل برای ایجاد ضایعه استفاده می‌کنند و سایر مدل‌های موجود که از میکروویو، اولترا سونیک یا RF بسیار بهتر است (شکل ۷)



شکل ۷. مشاهده ماکروسکوپی محل و اندازه ضایعه ایجاد شده در مغز خرگوش با استفاده از فیبر لیزر

بررسی حاضر نشان داد که انکوباسیون ۴۸ ساعته سلول‌های بنیادی با نانوذرات سوپراپارا مغناطیسی اجازه آشکارسازی و قابل مشاهده نمودن سلول‌ها را در تصاویر MRI می‌دهد. استفاده از دستگاه‌های experimental MRI با قدرت تسلاهای بالا (بالا تر از تسلا) برای ردیابی و مشاهده سلول‌های بنیادی در چندین مقاله گزارش شده است [۶، ۲ و ۱۳] که تصاویری با وضوح بالا در حد

(micro mode) استفاده شد که دارای پایه اکسید آهن (USPIO) (micro mode، آلمان) بود یک هسته مرکزی با دیامتر ۲۰ نانومتر و یک پوشش کربوکسی دکستران داشت و دیامتر کلی آن را به ۳۰-۵۰ نانومتر می‌رساند. این نانو ذرات سوپراپارامغناطیس زمان استراحت T2 را کمتر کرده و شدت سیگنال (SI) را کاهش می‌دهد (مواد کنتراست منفی) [۱۴]. از این نانو ذرات با دوز ۵ میلی‌گرم به ازای هر میلی‌لیتر استفاده شد. نانوذرات افزوده شده بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون از طریق اندوسیتوز به داخل سلول‌ها جذب شد و نشان داده شد که برای جذب نانوذرات نیاز به هیچ‌گونه ماده ترانسفکتان وجود ندارد. آنالیزهای میکروسکوپی و رنگ‌آمیزی نشان داد که این نانوذرات و محلول آن در دوزهای تعیین شده اثر سمی نداشته و بیش از ۹۵ درصد سلول‌ها زنده ماندند.

استفاده از لیزر در ایجاد ضایعه مغزی لوکال

برای مشابه‌سازی ضایعات مغزی انسانی در حیوانات آزمایشگاهی مدل‌های مختلفی پیشنهاد شده است. یک طبقه وسیعی از مدل‌های حیوانی که شامل ایجاد ضایعات (contusion) در موش صحرایی بود طراحی شده است هیچ‌کدام از آن‌ها به‌طور کامل ضایعات مغزی انسانی را مشابه‌سازی نمی‌کند. با پیشرفتی بزرگ در پزشکی، جراحان اعصاب در فرانسه و ایران موفق به درمان تومورهای مغزی با استفاده از لیزر و تنها با استفاده از سوراخی کوچک در جمجمه، بدون بیهوشی بیمار شدند. محققان حاضر از این روش در ایجاد ضایعه موضعی در مغز استفاده نمودند. مزایای این روش عبارتند از دقت بالا در ایجاد ضایعه موضعی، حداقل آسیب به بافت‌های اطراف، قابل کنترل بودن وسعت ضایعه، قابلیت ایجاد ضایعه در هر نوع بافت از جمله استخوان و سایر بافت‌های نرم، عوارض حداقل و احتمال عفونت کمتر اشاره کرد و نسبت به ضایعات مغزی ایجاد شده توسط دستگاه‌های دیگر که از یک پیستون پنوماتیک

میکروسکوپی می‌دهد [۱۶ و ۱۵]. آشکارسازی و قابل مشاهده نمودن سلول‌ها در experimental MRI برای رسیدن به یک نسبت سیگنال به نویز قابل قبول و وضوح مناسب نیاز به زمان بیشتری دارد [۱۷].

بر اساس ماده اصلی تشکیل دهنده مواد کنتراست MRI را به سه گروه تقسیم می‌کنند:

۱- مواد کنتراست پارامغناطیس با پایه گادولینیوم

۲- مواد کنتراست پارامغناطیس با پایه منگنز

۳- مواد کنتراست سوپرا پارامغناطیس با پایه اکسید آهن.

مواد پارامغناطیس دارای گادولینیوم و منگنز زمان استراحت T1 را کمتر کرده و شدت سیگنال (SI) را افزایش می‌دهد و مواد سوپرا پارامغناطیس با پایه اکسید آهن (SPIO) زمان استراحت T2 را کمتر کرده و شدت سیگنال (SI) را کاهش می‌دهد (مواد کنتراست منفی) [۵ و ۷].

همچنین آن‌ها را بر اساس نحوه انتشار بافتی این مواد در بدن انسان هم تقسیم‌بندی می‌کنند. مواد کنتراستی که در فضای خارج سلولی بافت‌ها وارد می‌شوند و ماده Gd-DTPA (مگنویست - شرینگ آلمان) معروف‌ترین ماده از این نمونه است. پارامغناطیس با مولکول‌های خطی و حلقوی شلات می‌شود. همچنین در بازار DOTA Gd - (دوتارم - گریب فرانسه)، Gd-DTPA-BMA (امنی اسکن - آمرشام انگلستان) و Gd-HP-DO3A (پروهنس - براکو ایتالیا) Gd-DTPA-BMEA (اپتیمارک - مالدینکروت آمریکا) Gd-DO3A-Butriol (گادوویست - شرینگ آلمان) موجود است. ذرات SPIO آشکارسازی ضایعات کوچک را (که در اسکن‌های ساده دیده نشده) ممکن می‌سازد. مواد SPIO خیلی ریز (USPIO) قابلیت بالایی در بهبود افتراق بین گره‌های لنفاوی التهابی و متاستاتیک را دارد. مطالعات متعددی برای مقایسه و تعیین تفاوت‌ها و شباهت‌ها و آثار جانبی USPIO و SPIO انجام شده و هنوز هم در حال انجام

است. برخی از نتایج به دست آمده بدین شرح است؛ در یک مطالعه در سال ۲۰۰۷ که با نشان دار کردن سلول‌های مونوسیت با هردو این نانوذرات انجام شد، گزارش شده که مونوسیت‌ها با SPIO بسیار بهتر از USPIO نشان‌دار می‌شوند. دیامتر بزرگتر نانوذرات SPIO (۱۵۰ نانومتر) در مقایسه با اندازه کوچکتر ذرات USPIO (۳۰ نانومتر) منجر به جذب سلولی بهتر و بیشتر توسط مونوسیت‌ها می‌شود. مطالعات قبلی نشان داه که جذب فاگوسیتیک اکسید آهن با افزایش اندازه ذرات بیشتر می‌شود. مطالعات مشابهی درباره اندوسیتوز ماکروفاژی نانوذرات SPIO توسط ماکروفاژهای پریتونئال موش‌ها گزارش کرده‌اند و پیشنهاد شده که جذب SPIO به صورت اندوسیتوز میانجی‌گری شده از طریق Scavenger receptor است. هرچند که مطالعات نشان دار کردن مونوسیت‌ها با SPIO نشان می‌دهد که این ماده برای نشان دار کردن *in vitro* بسیار مناسب است. از طرفی نیمه عمر طولانی USPIO در خون باعث می‌شود که در نشان دار کردن *in vivo* از آن بیشتر استفاده شود [۱۴، ۱۸ و ۱۹]. روش نشان دار کردن *in vivo* با استفاده از USPIO در مدل‌های حیوانی و بیماری‌های چون مولتیپل اسکلروزیس و سکتی مطالعه شده است. در انسان نیمه عمر خونی USPIO بیش از ۲۴ ساعت تعیین شده در حالی که نیمه عمر خونی SPIO کمتر از ۶ دقیقه است و این نیمه عمر کوتاه امکان آن را برای نشان دار کردن اندوژنی مونوسیت‌ها در جریان خون محدود می‌کند. در یک مطالعه محققین با حذف ماکروفاژهای خون زمان سیرکولاسیون SPIO را افزایش داده و به نتایجی مشابه نشان‌دار کردن با USPIO رسیدند. مطالعات نشان می‌دهد که میزان زنده ماندن سلول‌ها در نشان دار کردن با هردو این نانوذرات تقریباً مساوی است [۱۴ و ۱۵]. بارنت (Barnett) و همکارانش نشان دادند که میزان جذب SPIO با استفاده از روش

مقاطع ۲ میلی متری و همچنین از روش اسکن FLAIR با زمان تکرار ۶۰۰۰ میلی ثانیه و زمان اکو ۹۴ میلی ثانیه با inversion time، ۱۵۰۰ میلی ثانیه ضخامت مقاطع ۳ میلی متری استفاده شد و نشان داد که این سیستم قادر به ردیابی سلول‌های بنیادی است. این تصاویر در یک بازه زمانی کوتاه حدود ۱۰ روز انجام شد و بعد از این دوره زمانی تغییرات شدت مربوط به وجود نانوذرات در تصاویر مربوط به آن‌ها مشاهده نشد که می‌تواند به دلایلی چون مهاجرت سلول‌ها و پراکندگی آن‌ها، مرگ سلول‌ها و فاگوسیت شدن آن‌ها باشد با این حال اسکنرها با قدرت مغناطیسی بالا و مجهز به نرم‌افزارهای آنالیزی بهتر یکی از بهترین روش‌ها برای ردیابی و پایش سلول درمانی است.

محدودیت‌های متعددی در استفاده از اسکنرهای ام آر آی برای مطالعه روی حیوانات در ایران و اغلب کشورها وجود دارد به علت اینکه اسکنرهای ام آر آی آزمایشگاهی با قدرت تسلا بالاتر و نویز کمتر برای تهیه تصاویر با وضوح بهتر وجود ندارد و با اسکنرهای ام آر آی کلینیکی هم امکان انجام طرح‌های مشابه بررسی حاضر با محدودیت روبروست و از طرفی کارشناسان کار آزموده برای تصویربرداری حیوانی بسیار کم است.

بسیاری از این بیماران نیز دارای وسایلی از قبیل دریاچه‌های مصنوعی، پیس میکرو یا پروتزهایی هستند که با محیط مغناطیسی سازگار نیست. بنابراین از این روش در این بیماران نمی‌توان بهره گرفت. امید است در سال‌های آینده با افزایش مواد و آلیاژهای سازگار با محیط مغناطیسی در این بیماران هم بتوان از این روش استفاده کرد.

References

1. Kim DE, Schellingerhout D, Ishii K, Shah K, Weissleder R. Imaging of stem cell recruitment to ischemic infarcts in a murine model. *Stroke* 2004;

Magneto-electroporation به اندازه سلول‌ها بستگی دارد. به طور مثال سلول‌های بنیادی مزانشیمال MSC سیتوپلاسم بیشتری دارد. و می‌تواند چندین برابر سلول‌های بنیادی کوچکتر SPIO جذب کند. علاوه بر توانایی نشان دار کردن سریع سلول‌ها روش MEP نیاز به مواد ترانسفکتان هم ندارد [۵]. بنابراین معایب ضرر بالقوه این مواد را حذف می‌نماید. خوشبختانه SPIO توسط سلول‌های غیر فاگوسیتی کمتر جذب می‌شود و سیگنال‌های خارج از سلول‌های نشان دار شده آگزوژن بسیار محدودتر است. در این جا باید به این نکته اشاره شود که روش نشان دار کردن باید توانایی تمایز Hypointensity ناشی از را از سایر علل آن نظیر خونریزی، هوا، فلز را داشته باشد که به علت استفاده از لیزر هیچ کدام از این موارد دیده نشد. وندن (Vanden) و همکارانش نشان دادند که سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسان نشان دار شده با SPIO که به مرده‌ها تزریق شد از نواحی خونریزی و انسداد عروق ریز و انفارکتوس در سکتة میوکارد قابل افتراق نبود [۷]. از پروتامین سولفات و پلی-ال-لیزین به عنوان مواد ترانسفکتان برای جذب مواد به داخل سلول‌ها استفاده می‌شود ولی به علت سیتوتوکسیسیته این دو ماده از این‌ها در این طرح استفاده نشد. بدون استفاده از این مواد ترانسفکتان هم آزمون وجود یون‌های آهن را در داخل سلول‌ها نشان داد.

تصاویر اسکن T2 با زمان تکرار ۳۷۷۵ میلی ثانیه و زمان اکو ۸۵ میلی ثانیه و ضخامت مقاطع ۲ میلی متری تهیه شد. T1 با زمان تکرار ۴۰۰ میلی ثانیه و زمان اکو مینیمم و ضخامت

35: 952-7.

2. Modo M, Mellodew K, Cash D, Fraser SE, Meade TJ, Price J, et al. Mapping transplanted stem cell

- migration after a stroke: a serial, in vivo magnetic resonance imaging study. *Neuroimage* 2004; 21:311-7.
3. **Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, et al.** Wharton's Jelly mesenchymal cells form neurons and glia. *Stem Cells* 2003; 21: 50-60.
 4. **Nelson GN, Roh JD, Mirensky TL, Wang Y, Yi T, Tellides G, et al.** Initial evaluation of the use of USPIO cell labeling and noninvasive MR monitoring of human tissue-engineered vascular grafts in vivo. *FASEB J* 2008; 22: 3888-95.
 5. **Barnett BP, Arepally A, Karmarkar PV, Qian D, Gilson WD, Walczak P, et al.** Magnetic resonance-guided, real-time targeted delivery and imaging of magnetocapsules immunoprotecting pancreatic islet cells. *Nat Med* 2007; 13:986-91.
 6. **Frank JA, Miller BR, Arbab AS, Zuwicke H, Jordan EK, Lewis BK, et al.** Clinically applicable labeling of mammalian and stem cells by combining superparamagnetic iron oxides and transfection agents. *Radiology* 2003; 228:480-7.
 7. **vanden Bos EJ, Baks T, Moelker AD, Kerver W, van Geuns RJ, vander Giessen WJ, et al.** Magnetic resonance imaging of haemorrhage within reperfused myocardial infarcts: possible interference with iron oxide-labelled cell tracking? *Eur Heart J* 2006; 27:162-6.
 8. **James HE, Schneider S.** mental carbon dioxide laser brain lesions and intracranial dynamics. *Neurosurgery* 1987; 20: 219-21.
 9. **Sirko S, Neitz A, Mittmann T, Horvat-Bröcker A, von Holst A, Eysel UT, et al.** Focal laser-lesions activate an endogenous population of neural stem/progenitor cells in the adult visual cortex. *Brain* 2009; 132: 2252-64.
 10. **Daneshi AH, Taghipour M, Izadi S, Mollahossaini R, Ghaleh-Noyi H, Ghaffari M, et al.** CT-Guided Laser Probe for Ablation of Brain Tumors. *Basic Clin Neurosci* 2009; 1: 24-9.
 11. **Magnitsky S, Watson DJ, Walton RM, Pickup S, Bulte JW, Wolfe JH, et al.** In vivo and ex vivo MRI detection of localized and disseminated neural stem cell grafts in the mouse brain. *Neuroimage* 2005; 26:744-54.
 12. **Zhang Z, Ziang Q, Jaing F, Ding G, Zhang R, Wang L, et al.** In vivo magnetic resonance imaging tracks adult neural progenitor cell targeting of brain tumor. *Neuroimage* 2004; 23: 281-7.
 13. **Bulte JW, Duncan ID, Frank JA.** In vivo magnetic resonance tracking of magnetically labeled cells after transplantation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22: 899-907.
 14. **Sipe JC, Filippi M, Martino G, Furlan R, Rocca MA, Rovaris M, et al.** Method for intracellular magnetic labeling of human mononuclear cells using approved iron contrast agents. *Magn Reson Imaging* 1999; 17:1521-3.
 15. **Hoehn M, Kustermann E, Blunk J, Wiedermann D, Trapp T, Wecker S, et al.** Monitoring of implanted stem cell migration in vivo: a highly resolved in vivo magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:16267-72.
 16. **Zhang ZG, Jiang Q, Zhang R, Zhang L, Wang L, Zhang L, et al.** Magnetic resonance imaging and neurosphere therapy of stroke in rat. *Ann Neurol* 2003; 53: 259-63.
 17. **Stroh A, Faber C, Neuberger T, Lorenz P, Sieland K, Jakob PM, et al.** In vivo detection limits of magnetically labeled embryonic stem cells in the rat brain using high-field (17.6 T) magnetic resonance imaging. *Neuroimage* 2005; 24: 635-45.
 18. **Bulte JW, Zhang SC, van Gelderen P, Herynek V, Jordan EK, Duncan ID, et al.** Neurotransplantation of magnetically labeled oligodendrocyte progenitors: magnetic resonance

tracking of cell migration and myelination. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96: 15256-61.

19. **de Laquintane BD, Dousset V, Solanilla A, Petry**

KG, Ripoche J. Iron particle labeling of haematopoietic progenitor cells: an in vitro study.

Biosci Rep 2002; 22: 549-54.