



## طراحی و تولید نانوذره آهن سوپرپارامغناطیس جهت هدایت مغناطیسی سلول‌های بنیادی مزانشیمی

ستاره قاسمی<sup>۱</sup>، محمدمهدی دهقان<sup>۱،۲</sup>، غلامرضا نیکبخت‌بروجنی<sup>۳</sup>، سیدحسین مرجمهر<sup>۴</sup>، علیرضا وجهی<sup>۱</sup>،  
محمدرضا مخبردزفولی<sup>۲</sup>، سپیده خویی<sup>۵</sup>، معصومه جباری‌فخر<sup>۲</sup>، محمدرضا کریمی<sup>۵</sup>

<sup>۱</sup> گروه جراحی و رادیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

<sup>۲</sup> پژوهشکده تحقیقات زیست‌پزشکی دانشگاه تهران، دانشگاه تهران، تهران، ایران

<sup>۳</sup> گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

<sup>۴</sup> گروه پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

<sup>۵</sup> گروه شیمی پلیمر، دانشکده شیمی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۲۸ بهمن ماه ۱۳۹۹، تاریخ پذیرش: ۸ اردیبهشت ماه ۱۴۰۰

doi 10.22059/jvr.2019.286113.2952

<https://dorl.net/dor/20.1001.1.20082525.1400.76.2.9.9>

### چکیده

**زمینه مطالعه:** هدایت مغناطیسی سلولی، روشی نوین و غیرتهاجمی جهت توزیع هدفمند سلول در بدن است. این روش به جایگزینی و بقای سلول‌های بنیادی در بافت آسیب دیده کمک می‌کند. یکی از اصلی‌ترین مراحل این روش، اتصال نانوذرات اکسید آهن سوپرپارامغناطیس به سلول‌ها است. انتخاب نوع ذرات و روش اتصال آن‌ها به سلول بسیار حائز اهمیت است.

**هدف:** مطالعه حاضر جهت تولید نانوذرات اکسید آهن سوپرپارامغناطیس با قابلیت اتصال به سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمی انجام شد.

**روش کار:** نانوذرات اکسید آهن سوپرپارامغناطیس به روش هم رسوبی در اتمسفر نیتروژن، با پلیمر دکستران پوشش داده شدند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی، از مغز استخوان بازوی خرگوش سفید نیوزلندی نر اخذ و کشت داده شدند. پادتن تک‌بنیانی CD44 خرگوشی در سطح نانوذرات قرار گرفت و ترکیب نهایی به سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمی متصل شد. پوشش دهی توسط دکستران به روش طیف سنجی مادون قرمز، اندازه نانوذرات توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی، کمیت اتصال پادتن به سطح نانوذرات به روش پروتئین سنجی و اتصال نانوذرات به سطح سلول‌ها با رنگ آمیزی پروسین بلو، ایمونوفلورسنت و میکروسکوپ الکترونی روبشی ارزیابی شدند. برای تمام ارزیابی‌ها حداقل ۳ تکرار انجام شد.

**نتایج:** پیک نمودار طیف سنجی مادون قرمز در  $3200 \text{ cm}^{-1}$  و  $2922$  نشان دهنده حضور دکستران در ترکیب نهایی است. قطر متوسط ذرات  $56/13 \pm 6/67$  نانومتر اندازه‌گیری شد. متوسط کمیت اتصال پادتن به سطح نانوذرات  $77/78 \pm 6/35$  درصد محاسبه شد. میانگین درصد سلول‌های بنیادی مزانشیمی که در رنگ آمیزی پروسین بلو و تصویربرداری ایمونوفلورسنت به ترکیب نهایی متصل بودند به ترتیب  $71/57 \pm 2/53$  و  $95/04 \pm 0/95$  بود. این اتصال در تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نیز تأیید شد.

**نتیجه‌گیری نهایی:** بر اساس نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر، سلول‌های بنیادی مزانشیمی به خوبی به نانوذرات اکسید آهن سوپرپارامغناطیس متصل به پادتن CD44 متصل شدند. این ترکیب جهت ارزیابی‌های آزمایشگاهی و بالینی، قابل استفاده است.

**کلمات کلیدی:** هدایت مغناطیسی سلول، دکستران، پادتن تک‌بنیانی، پادتن CD44، نانوذرات اکسید آهن سوپرپارامغناطیس

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

**نویسنده مسئول:** محمدمهدی دهقان، گروه جراحی و رادیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

پست الکترونیکی: [mdehghan@ut.ac.ir](mailto:mdehghan@ut.ac.ir)

## مقدمه

تغییر سطح دارند که می‌توان پادتن، پپتید و مشتقات کوچک مولکول را به آن‌ها متصل کرد، نیمه عمر آن‌ها در جریان خون مناسب است و زیست سازگارند (۷،۲۷).

هدف اکثر مطالعات پیشین در زمینه هدایت مغناطیسی سلول، وارد کردن نانوذرات اکسید آهن به داخل سیتوپلاسم سلول‌ها از طریق انتقال غیر فعال و اندوسیتوز (فاگوسیتوز و ماکروپینوسیتوز) بوده است (۷). در حال حاضر تمرکز محققین به جای اندوسیتوز نانوذرات، بر اتصال نانوذرات به سطح سلول‌ها است، زیرا در اندوسیتوز احتمال آزاد شدن آهن در داخل سلول وجود دارد که خود مانع مهمی برای زیست‌سازگارپذیری روش است (۲،۵،۲۶).

هدف از انجام مطالعه حاضر تولید نانوذره آهن پوشش داده شده با دکستران و متصل به پادتن تک‌بنیانی است که قادر به اتصال به سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمی هستند. پوشش دهی دکستران، اندازه نانوذرات، کمیت اتصال پادتن به سطح نانوذرات و اتصال نانوذرات به سطح سلول‌های هدف مورد ارزیابی قرار گرفتند.

## مواد و روش کار

**تولید و پوشش‌دهی SPIONs با دکستران:** در مطالعه حاضر، نانوذرات مگنتیت ( $Fe_3O_4$ ) با روش هم رسوبی (Co-precipitation) در اتمسفر نیتروژن تولید شدند. بدین ترتیب که نمک‌های  $FeCl_2$  و  $FeCl_3$  (نسبت مولی ۱:۲) در آب دیونیزه (DIW) حل شدند. سپس محلول دکستران در DIW اضافه و به شدت در اتمسفر نیتروژن هم زده شدند. پس از آن محلول آمونیاک ۲۵ درصد به ترکیب اضافه شد و ترکیب به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۰-۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در نهایت برای جداسازی پلیمر اضافه و سایر ناخالصی‌ها، ترکیب نهایی در معرض دیالیز قرار گرفت. محلول مغناطیسی نهایی در ۳۵۰۰ g به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد تا مایع مغناطیسی خالص به دست آید. pH ترکیب نهایی ۷/۴-۷/۲ بود (۲۲). موفقیت پوشش دهی با دکستران به کمک طیف سنجی مادون قرمز (FT-IR) مورد بررسی قرار گرفت. همچنین ابعاد ذرات DSPIONs به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM, Hitachi, S4160) اندازه‌گیری شد.

: به منظور اتصال DSPIONs اتصال پادتن به سطح

به سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمی، از پادتن DSPIONs mouse anti rabbit CD44 monoclonal antibody (BioRad, MCA806GA) در سطح استفاده شد.

هدایت مغناطیسی سلولی یک روش جدید و نوید بخش برای رساندن هر چه مؤثرتر سلول‌ها به کانون بافت آسیب دیده می‌باشد (۲۳). این روش طی ۲۰ سال اخیر جهت ارتقای توزیع و احتباس سلول‌ها در بافت هدف به کار رفته است و مکمل تزریق سیستمیک سلول‌های درمانی است. هدایت مغناطیسی سلول بر دو مرحله اصلی استوار است، شامل: اتصال ذرات آهن‌ربایی به سلول و اعمال میدان مغناطیسی بر بافت هدف تا سلول‌های متصل به ذرات آهن‌ربایی را پس از تزریق گیر انداخته و در بافت هدف نگه دارد. از میان همه اجزای آهن‌ربایی موجود، نانوذرات اکسید آهن سوپراپارامگناطیس (SPIONs)، کاربردی‌ترین گزینه برای هدایت مغناطیسی هستند. چند دلیل برای این امر وجود دارد که عبارتند از: قیمت مناسب، در دسترس بودن، زیست سازگاری، جذب سلولی قابل تنظیم و سمیت کم (۶).

ذرات اکسید آهن با ابعاد نانو ویژگی‌هایی دارند که کار کردن با آن‌ها را دشوار می‌کند؛ از جمله: ناپایداری ذاتی در مجاورت هوا که باعث اکسید شدن آن‌ها می‌شود. به علاوه، از آنجایی که آهن به شکل فیزیولوژیک در بدن وجود دارد، بدن قادر به متابولیسم و حذف آن از بافت هدف می‌باشد. غلظت بالای یون آهن قادر به عبور از دیواره میتوکندری و هسته بوده و سمی است؛ و آهن آزاد در میتوکندری قادر به تولید رادیکال‌های هیدروکسیل و یون‌های فریک است که به شدت واکنش دهنده و مخرب هستند (۸،۱۸،۲۵). در نتیجه به منظور به حداقل رساندن این ویژگی‌ها، هسته‌های آهن را به کمک پلیمرهای ارگانیک یا غیر ارگانیک پوشش می‌دهند. بدین ترتیب، علاوه بر افزایش زیست سازگاری این ذرات، امکان اتصال لیگاند‌های مختلف از جمله پادتن به سطح آن‌ها فراهم می‌شود (۷).

اگرچه مطالعات زیادی در خصوص پوشش‌های مختلف SPIONs انجام شده است (اکسیدان‌های ضعیف، سورفاکتانت، فلزات گران بها، سیلیکا، پوشش‌های کربنی، سلولز، چیتوزان)، عمده آن‌ها بر سه پوشش اصلی تمرکز دارند که عبارتند از: نشاسته، پلی اتیلن گلیکول (PEG) و دکستران که هر یک ویژگی‌هایی دارند. لیکن خصوصیت مشترک آن‌ها، افزایش زیست سازگاری و پایداری نانوذرات و کاهش سمیت آن‌هاست (۷،۸،۲۵).

در این میان، دکستران به دلیل زیست سازگاری بالا، به شکل گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته است و SPIONs پوشش داده شده با دکستران (DSPIONs) در ترکیب داروهای تجاری مورد تأیید سازمان غذا و دارو (FDA) و خصوصاً به عنوان مواد حاجب تصویر برداری MRI وجود دارند (۷). همچنین، DSPIONs قابلیت

گرفتند. بدین ترتیب سلول‌های تک هسته‌ای از گلبول‌های قرمز جدا شد و پس از مخلوط شدن با DMEM، ۲ بار و هر مرتبه به مدت ۵ دقیقه در ۴۰۰ سانتی‌فیوژ شدند. در نهایت محلول رویی حذف شد و پلت سلولی حاصل در محیط حاوی ۸۰ درصد DMEM، ۲۰ درصد FBS (Fetal Bovine Serum) و ۱ درصد آنتی بیوتیک پنیسیلین استریتومایسین در فلاسک ۲۵ سانتی متر مربع، در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵ درصد دی اکسید کربن و ۹۷ درصد رطوبت مورد کشت قرار گرفت. سلول‌ها تا پاساژ سوم کشت داده شدند و ماهیت مزانشیمی آن‌ها با استفاده از پادتن‌های فایکواریت‌ترین-کنزوگه متمایل به CD45، CD90، CD34 و CD29 مورد بررسی قرار گرفت. همچنین توان تمایز این سلول‌ها به رده استخوانی، غضروفی و چربی مورد سنجش قرار گرفت (۱۷).

**اتصال ADSs به MSCs:** بدین منظور، ۱ سی سی تریپسین روی سلول‌های فلاسک ۲۵ سانتی متر مربع ریخته شد و فلاسک به مدت ۳ دقیقه در انکوباتور قرار گرفت. پس از اطمینان از جدا شدن سلول‌ها از کف فلاسک، از ۲۰ درصد FBS برای خنثی کردن تریپسین استفاده شد. سلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در معرض ADSs با غلظت ۶۰ میکروگرم آهن به ازای ۱۰<sup>۶</sup> سلول در انکوباتور قرار داده شدند و در این مدت ۳-۴ مرتبه روی لرزاننده قرار گرفتند.

**ارزیابی ترکیب MSCs-ADSs:** جهت بررسی و تأیید اتصال ADSs به MSCs از سه روش ارزیابی رنگ آمیزی اختصاصی آهن پروسین بلو، آنالیز ایمونوفلورسنت و ارزیابی SEM استفاده شد. **رنگ آمیزی اختصاصی آهن:** تعداد ۵۰۰۰۰ سلول در هر گوده از پلیت ۶ گوده قرار گرفت و پس از ۲۴ ساعت (ایجاد چسبندگی به کف گوده‌ها)، سه گروه کنترل منفی، DSPION و ADS در نظر گرفته شد. در گروه‌های DSPIONs و ADS، سلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در معرض ترکیب‌های هم نام با غلظت ۶۰ میکروگرم آهن به ازای ۱۰<sup>۶</sup> سلول (حجم نهایی ۵۰۰ میکرولیتر در PBS) انکوبه شدند و در گروه کنترل حجم مشابه PBS اضافه شد. برای هر گروه سه تکرار در نظر گرفته شد. در نهایت، شست و شو با PBS صورت گرفت و سلول‌ها در پارافرمالدهید ۴ درصد تثبیت شدند. رنگ آمیزی اختصاصی Prussian Blue که در آن سیتوپلاسم سلول‌ها به رنگ صورتی و رسوبات آهن به رنگ آبی دیده می‌شوند انجام شد (۱۳). تعداد هسته‌ها در یک نمای میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰× شمارش و درصد سلول‌های متصل به ذرات آهن تخمین زده شد. این اندازه‌گیری سه مرتبه تکرار شد.

**آنالیز ایمونوفلورسنت:** جهت انجام این بررسی، پس از تریپسین کردن سلول‌ها، پلت سلولی روی لام گسترش داده شد و

سلول‌های رده‌های مختلف سلولی، مارکرهای اختصاصی وجود دارد و شناخته شده MSCs به عنوان یک مارکر فنوتیپی مثبت CD44 Chen بر اساس روش DSPIONs است. اتصال پادتن‌ها به سطح و همکاران در سال ۲۰۰۶ صورت گرفت (۳). بر این اساس، ۰/۷۵ در ۰/۵ میلی لیتر محلول نمک فسفات با DSPIONs میلی گرم از ( حل شد. سپس ۱۵ میکروگرم pH=۷/۴، PBS=۷/۴ خاصیت بافری ) سدیم متا-پریدات اضافه و ترکیب در دمای اتاق در تاریکی به مدت ۵ ساعت روی همزن مغناطیسی انکوبه شد. در مرحله بعد، ۵۰ میکروگرم فعال اضافه و محلول به مدت ۱۶ DSPIONs به CD44 پادتن ساعت در تاریکی در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه شد. احیاء ترکیب نهایی با اضافه کردن ۱۵ میکروگرم سدیم سیانو بوروهیدرید در تاریکی و در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت صورت گرفت. در ( به کمک ADSs متصل به پادتن (DSPIONs) نهایت نانوذرات آهن‌ریا در کف ویال نگه داشته و محلول رویی تخلیه شد و جهت سنجش کیفیت اتصال مورد ارزیابی قرار گرفت. این واکنش ۴ مرتبه تکرار شد.

**ارزیابی روند تولید ADSs:** جهت ارزیابی کمی اتصال نانوذرات آهن به پادتن از روش اسپکتروفوتومتری با معرف برادفورد استفاده شد. بدین منظور، نمودار استاندارد طبق دستور العمل کیت پروتئین سنجی برادفورد (کالازیس) ترسیم و پروتئین سنجی در محلول رویی تولید شده که حاوی پادتن‌های آزاد (غیر متصل به نانوذرات) بود، در طول موج ۵۹۵ نانومتر انجام شد ( Eppendorf, Netheler, Hinz GmbH, 613101427). میزان پادتن متصل به نانوذرات آهن در هر مرحله، از تفاضل مقدار پروتئین موجود در محلول رویی از مقدار کلی آنتی‌بادی مورد استفاده محاسبه شد (۵).

**استخراج و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان:** جهت استخراج و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی، از رهیافت استاندارد مورد استفاده در پژوهش‌های تحقیقات زیست پزشکی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران استفاده شد (۱۲). بدین منظور، نمونه مغز استخوان از استخوان بازو خرگوش سفید نیوزلندی نر بالغ با وزن تقریبی ۲/۵ تا ۳ کیلوگرم اخذ شد. به ازای هر ۳ میلی لیتر مغز استخوان، ۱۰۰۰ واحد هیپارین مورد استفاده قرار گرفت. سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه سلول‌های بنیادی و مهندسی بافت دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران منتقل و روند استخراج سلولی در شرایط آسپتیک ادامه یافت. نمونه‌ها با حجم مساوی DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) مخلوط شدند. بعد از جداسازی لخته‌های احتمالی موجود، به شکل دو فاز روی فایکول ریخته شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در سانتریفیوژ ۴۰۰ قرار

$3200\text{ cm}^{-1}$  و  $2922\text{ cm}^{-1}$  به ترتیب نشان دهنده فرکانس ارتعاشی کششی هیدروکسیل و C-H دکستران هستند. نواری که در ناحیه  $1608\text{ cm}^{-1}$  دیده می‌شود نشان دهنده پیوند هیدروژنی بین آب و دکستران است. (تصویر ۱.A) قطر تقریبی نانوذرات پوشش داده شده با دکستران به کمک میکروسکوپ الکترونی SEM حدود  $56.6 \pm 13.67$  نانومتر اندازه‌گیری شد (تصویر ۱.B).

**ارزیابی میزان اتصال پادتن به DSPIONs:** تولید ترکیب ADSs در ۴ مرحله و هر مرتبه با ۵۰ میکروگرم آنتی‌بادی اولیه انجام شد. بر اساس نتایج سنجش با استفاده از معرف برادفورد، متوسط درصد پادتن متصل به DSPIONs معادل  $77.57 \pm 6.35$  اندازه‌گیری شد.

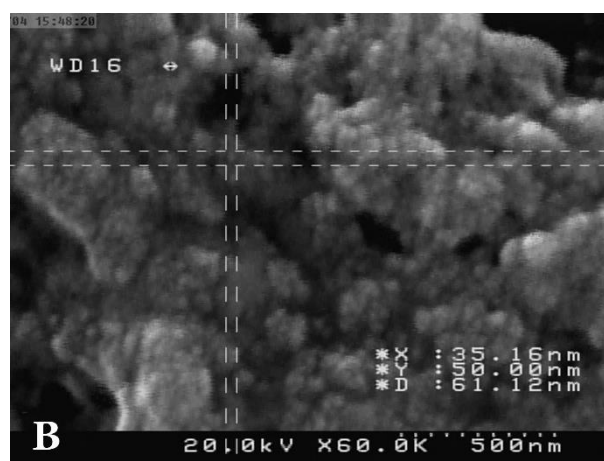
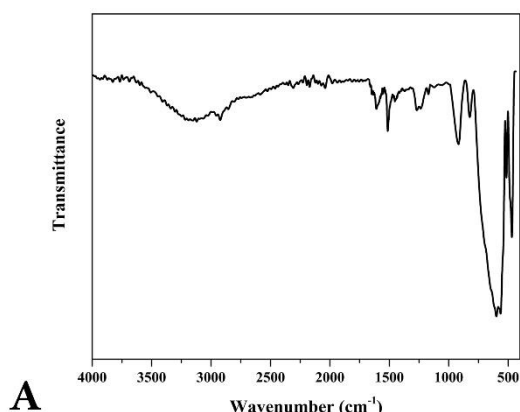
**اتصال ADSs به سلول‌های بنیادی مزانشیمی:** در رنگ‌آمیزی اختصاصی آهن، حضور آهن در گوده‌های گروه ADS به خوبی قابل مشاهده بود و به طور میانگین، از هر ۱۰۰ سلول، رنگ آبی نانوذرات آهن در مجاورت  $71.57 \pm 2.53$  سلول دیده شد. همچنین در گوده‌های DSPION نیز مقادیر کمی رسوب آهن به شکل تجمع کانونی در چند قسمت از پلیت وجود داشت. لیکن در گروه کنترل هیچ ذره آهنی دیده نشد (تصویر ۲). تصاویر آنالیز ایمونوفلورسنت هم حضور آنتی‌بادی‌های مربوطه در سطح سلول‌ها را با کیفیت اتصال  $95.04 \pm 0.95$  درصدی نشان داد (تصویر ۳). همچنین اتصال ADSs به MSCs توسط میکروسکوپ الکترونی SEM به تصویر کشیده شد (تصویر ۴).

تثبیت با استون ۸۰ درصد در DIW، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. سپس سلول‌ها ۳ مرتبه با PBS شسته شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در معرض ADS قرار گرفتند. در نهایت پس از شست و شو با PBS، آنتی‌بادی ثانویه FITC Goat anti mouse antibody (Abcam, Ab6785) با رقت  $1/2000$  در تاریکی به سطح گسترش اضافه و ۲۰ دقیقه زمان داده شد. در نهایت شست و شو با PBS انجام و سلول‌ها توسط میکروسکوپ فلورسنت (Olympus Optical Co; LTD, BH2-RFL-T3) دیده شدند. درصد سلول‌هایی که رنگ فلورسنت را نشان می‌دادند، در سه نمای میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۴۰ محاسبه شد.

**آنالیز SEM:** سلول‌های تریپسینه شده به مدت ۳۰ دقیقه در معرض ADS قرار گرفتند و پس از طی مراحل آماده‌سازی طبق دستورالعمل‌های استاندارد مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک (IBB) دانشگاه تهران، از آنالیز SEM جهت به تصویر کشیدن ترکیب MSCs-ADSs استفاده شد.

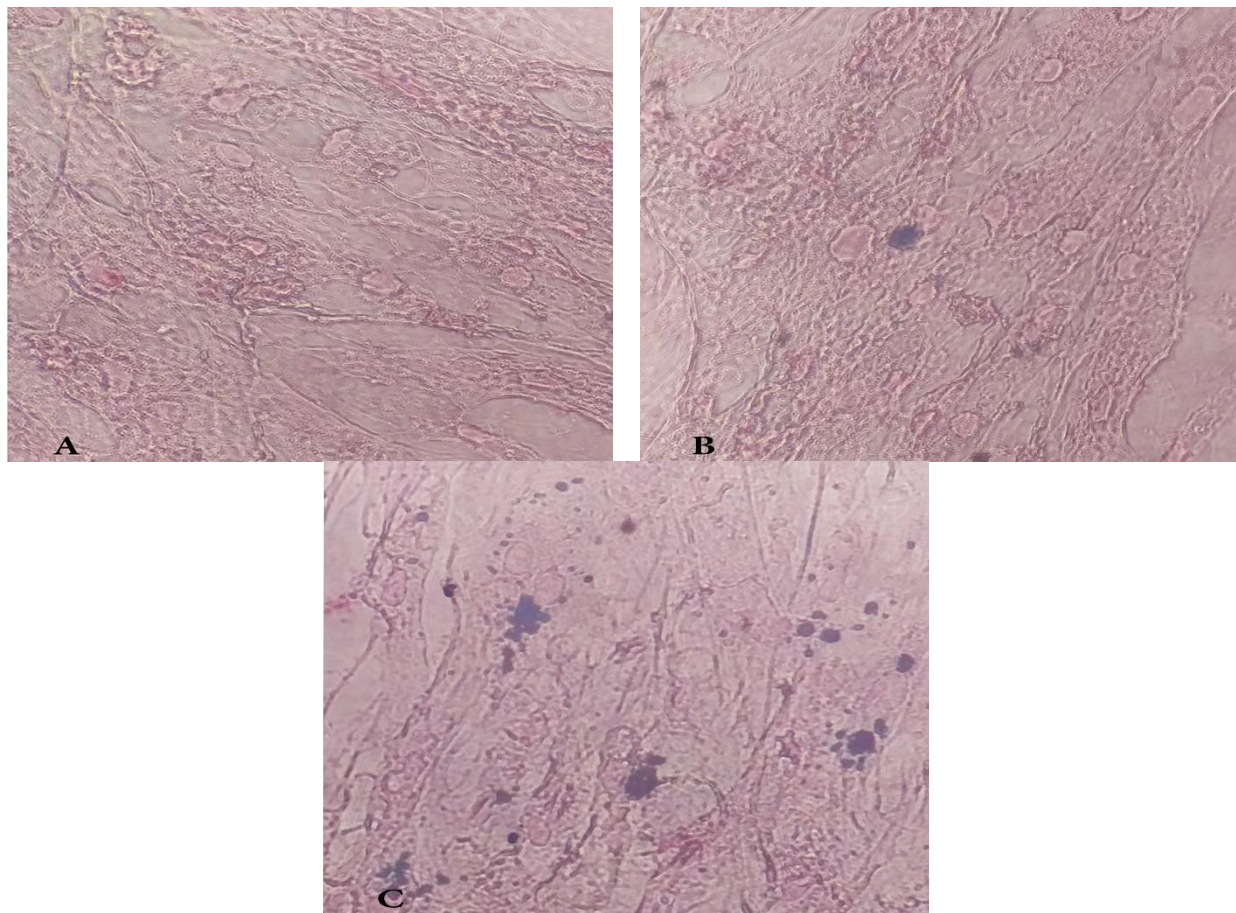
## نتایج

**بررسی ابعاد نانوذرات و موفقیت پوشش دهی با دکستران:** به منظور بررسی پوشش دهی نانوذرات آهن با دکستران، FT-IR اسپکتروسکوپی انجام شده و ساختار شیمیایی نانوذرات با توجه به حضور گروه‌های شیمیایی مربوطه در ترکیب مورد مطالعه به تأیید رسید. فرکانس ارتعاشی کششی Fe-O در ترکیب  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  به شکل یک قله در  $588\text{ cm}^{-1}$  نشان داده شده است. همچنین، قله‌های

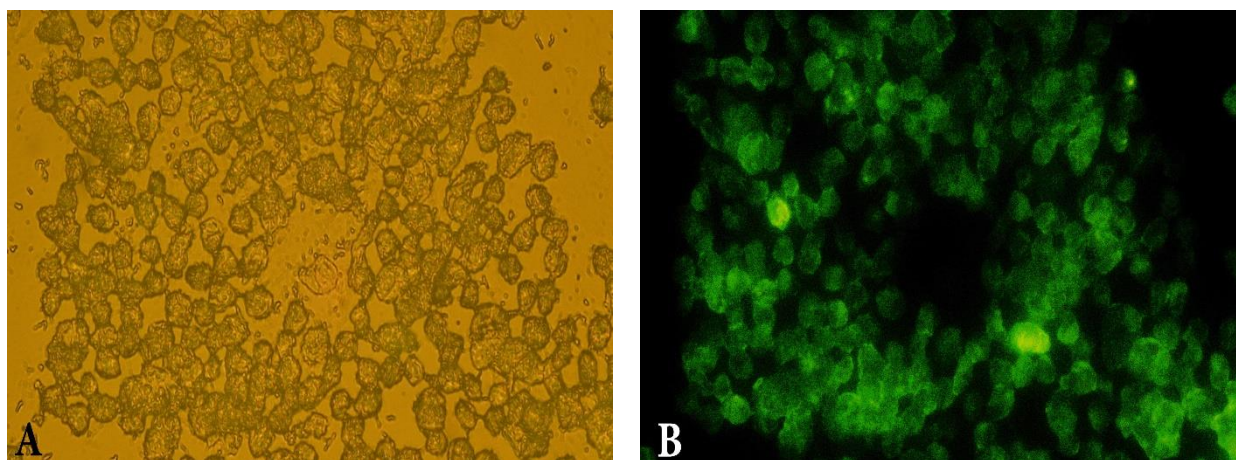


**تصویر ۱.A.** نمودار FT-IR نانوذرات اکسید آهن سوپرپارامگناطیس پوشش داده شده با دکستران. قله‌های  $3200\text{ cm}^{-1}$  و  $2922\text{ cm}^{-1}$  به ترتیب نشان دهنده فرکانس ارتعاشی کششی هیدروکسیل و C-H دکستران هستند. بخش نواری موجود در ناحیه  $1608\text{ cm}^{-1}$  نشان دهنده پیوند هیدروژنی بین آب و دکستران است. **B.** تصویر آنالیز SEM از نانوذرات آهن پوشش داده شده با دکستران.





**تصویر ۲.** رنگ آمیزی پروسین بلو سلول‌های بنیادی مزانشیمی. A. گروه کنترل، نبود نقاط آبی در گوده‌های مربوط به این گروه به معنی عدم وجود ADSs در آن‌ها است؛ B. گروه DSPION، تعداد اندکی نقاط آبی در گوده‌های این گروه دیده شد که نشان دهنده رسوبات آهن است؛ C. گروه ADS، نقاط آبی رنگ به شکل واضح در سرتاسر گوده‌های این گروه دیده شد که تأییدی بر اتصال موفقیت آمیز MSCs به ADSs می‌باشد.



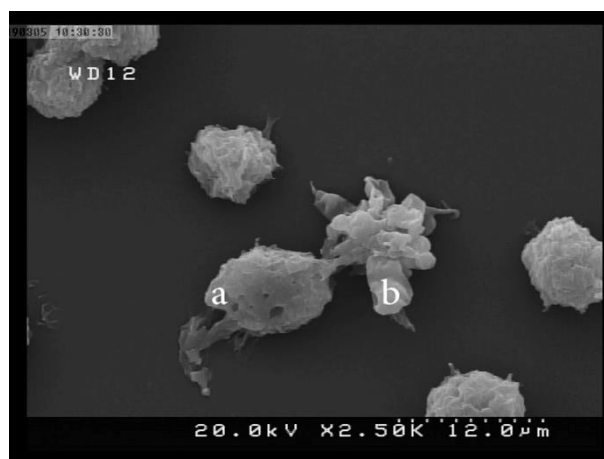
**تصویر ۳.** آنالیز ایمونوفلورسنت ترکیب MSCs-ADSs. A تصویر میکروسکوپ نوری از سلول‌های بنیادی مزانشیمی تریپسینه شده متصل به ADSs؛ و B. نمای فلورسنت جمعیت سلولی تصویر A.

گلايکول در سطح نانوذرات استفاده کردند، کوچک تر است. اندازه ذرات مورد استفاده در مطالعه آن‌ها در دامنه ۹۰ تا ۱۰۰ نانومتر قرار داشت (۲).

سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) بهترین منشأ سلول پیشگام برای درمان‌های مبتنی بر سلول هستند و بنیاد طب بازساختی (regenerative medicine) را تشکیل می‌دهند (۲۳، ۷). در این مطالعه نانوذرات آهن با تمایل اتصال به MSCs تولید شدند و بدین منظور پادتن تک‌بنیانی CD44 با کارآمدی  $77/6 \pm 57/35$  درصدی در سطح ADSs قرار گرفت. این مقدار در مطالعه Cheng و همکاران در سال ۲۰۱۴ که پادتن CD34 را به کمک کیت اختصاصی Poly-link protein coupling kit به سطح نانوذرات فروموکسیتول متصل کردند، ۸۰ درصد گزارش شد (۵).

در نهایت اتصال ADSs به MSCs به کمک رنگ آمیزی پروسین بلو، ارزیابی ایمونوفلورسنت و تصاویر SEM به تأیید رسید. به طور مشابه، Sugioka و همکاران در سال ۲۰۰۷، از پادتن CD44 رت استفاده کرده و آن‌ها را به سطح یک بستر متشکل از ذرات مغناطیسی کوچک اندازه (ferri sphere) متصل کردند. بدین ترتیب سلول‌های MSC رت را به سطح بستر مغناطیسی وصل کردند (۲۶). Cheng و همکاران در سال ۲۰۱۴، از سلول‌های رده هماتوپویتیک (HSC) استفاده کردند و جهت نشانه‌گذاری آن‌ها از اتصال پادتن CD34 که اختصاصی این رده سلولی است در سطح SPIONs پوشش داده شده با دکستران استفاده کردند. بر اساس نتایج رنگ آمیزی پروسین بلو و ایمونوفلورسنت، HSCs به خوبی به نانوذرات متصل شدند (۵). Chen و همکاران در سال ۲۰۱۳، از پوشش پلی اتیلن گلايکول در سطح نانوذرات استفاده کردند و همانند Cheng، پادتن CD34 را در سطح آن‌ها متصل کردند. با این وجود، نتایج آن‌ها هم حاکی از نشانه‌گذاری موفقیت آمیز HSC توسط این ذرات بود (۲).

به دلیل ویژگی‌های بیولوژیک SPIONs، ایده هدایت مغناطیسی شکل گرفت و در ابتدا راهکاری برای رساندن مواد مختلف از جمله دارو، پادتن و توکسین به ساختارهای هدف خود بود (۱، ۱۰، ۱۵، ۱۶، ۲۸). از این روش برای مقاصد درمانی مثل هایپرترمی القایی با آهن‌ربا جهت درمان تومورهای بدخیم (۱۱)، یا تشخیصی مثل تشخیص زود هنگام سرطان پروستات (۱) استفاده شد. با پیشرفت دانش و فنون زیست پزشکی، هدایت مغناطیسی سلولی مورد توجه محققین قرار گرفت و در دهه اخیر



تصویر ۴. آنالیز SEM ترکیب MSCs-ADSs. در تصویر فوق، a نشان دهنده سلول بنیادی مزانشیمی و b تصویر ذرات ADSs می‌باشد.

## بحث

در موضوع هدایت مغناطیسی سلولی، ابعاد ذره و شیمی لایه پوشاننده آن عوامل مهمی در توانایی اتصال ذرات به سلول هستند (۶). در این مطالعه، نانوذرات اکسید آهن سوپرپارامغناطیس تولید و توسط پلیمر دکستران پوشش داده شدند. موج‌هایی که در نمودار FT-IR مشاهده می‌شود هر یک نشان دهنده حضور پیوند شیمیایی مشخصی است. بنابر نتایج، در نمودار ترکیب تولید شده در این مطالعه، علاوه بر موج ناحیه  $588 \text{ cm}^{-1}$  که نشان دهنده فرکانس ارتعاشی Fe-O و در واقع تأیید حضور آهن است، موج‌های نواحی  $3200 \text{ cm}^{-1}$ ،  $2922 \text{ cm}^{-1}$  و  $1608 \text{ cm}^{-1}$  به ترتیب به حضور پیوندهای هیدروکسیل، C-H و پیوند هیدروژنی آب-دکستران دلالت دارند و همگی پوشش دهی نانوذرات با دکستران را تأیید می‌کنند. همچنین، در این مطالعه، میانگین اندازه ذرات ADSs حدود  $56/13 \pm 6/67$  نانومتر اندازه‌گیری شد. در بسیاری از مطالعات اندازه بهینه ذرات برای ورود به سلول‌های غیر فاگوسیت کننده، ۲۰ تا ۱۰۰ نانومتر بیان شده است (۶). در مطالعه‌ای که Cheng و همکاران در سال ۲۰۱۴ با هدف اتصال نانوذرات به سطح سلول انجام دادند، فروموکسیتول (یک مکمل آهن تجاری جهت درمان کم خونی ناشی از فقر آهن در بیماران مزمن کلیوی با نام تجاری Feraheme®) به عنوان منشأ نانوذرات آهن پوشش داده شده با دکستران مورد استفاده قرار گرفت که اندازه تقریبی آن حدود ۵۰ نانومتر بود (۵). اندازه ذرات ADSs تولید شده در این مطالعه با موارد فوق هم خوانی دارد و در مقایسه با اندازه ذرات در مطالعه Chen و همکاران در سال ۲۰۱۳ که برای اتصال نانوذرات آهن به سطح سلول‌ها از پوشش پلی اتیلن

## سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه تهران جهت تأمین بخشی از هزینه‌های این طرح در قالب رساله دکتری تخصصی، از پژوهشکده تحقیقات زیست پزشکی واقع در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، جهت تأمین بخش عمده هزینه‌ها و در اختیار قرار دادن تمام مواد و لوازم و تسهیلات مورد نیاز جهت انجام بخش سلولی مطالعه حاضر و نیز از آزمایشگاه شیمی پلیمر واقع در دانشکده شیمی پردیس علوم پایه دانشگاه تهران جهت همکاری در تولید ترکیب نانوذرات آهن سوپراپارامگناطیس تشکر به عمل می‌آید. همچنین از حمایت مالی پارک علم و فناوری دانشگاه تهران از این مطالعه در قالب اعتبار شماره ۵۴۴۱۵۷۴ قدردانی می‌گردد.

## تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

## References

- Abdollahi, M., Shahbazi-Gahrouei, D., Laurent, S., Sermeus, C., Firozian, F., Allen, B.J., Boutry, S., Muller, R.N. (2013). Synthesis and in vitro evaluation of MR molecular imaging probes using J591 mAb-conjugated SPIONs for specific detection of prostate cancer. *Contrast Media Mol Imaging*, 8(2), 175-184. <https://doi.org/10.1002/cmml.1514> PMID: 23281290
- Chen, J., Huang, N., Ma, B., Maitz, M.F., Wang, J., Li, J., Li, Q., Zhao, Y., Xiong, K., Liu, X. (2013). Guidance of stem cells to a target destination in vivo by magnetic nanoparticles in a magnetic field. *ACS Appl Mater Interfaces*, 5(13), 5976-5985. <https://doi.org/10.1021/am400249n> PMID: 23749081
- Chen, J., Wu, H., Han, D., Xie, C. (2006). Using anti-VEGF McAb and magnetic nanoparticles as double-targeting vector for the radioimmunotherapy of liver cancer. *Cancer Lett*, 231(2), 169-175. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.01.024> PMID: 16399221
- Cheng, K., Malliaras, K., Li, T.S., Sun, B., Houde, C., Galang, G., Smith, J., Matsushita, N., Marbán, E. (2012). Magnetic enhancement of cell retention, engraftment, and functional benefit after intracoronary delivery of cardiac-derived stem cells in a rat model of ischemia/reperfusion. *Cell Transplant*, 21(6), 1121-1135. <https://doi.org/10.3727/096368911X627381> PMID: 22405128
- Cheng, K., Shen, D., Hensley, M.T., Middleton, R., Sun, B., Liu, W., De Couto, G., Marbán, E. (2014). Magnetic antibody-linked nanomatchmakers for therapeutic cell targeting. *Nat Commun*, 5, 4880. <https://doi.org/10.1038/ncomms5880> PMID: 25205020
- Connell, J.J., Patrick, P.S., Yu, Y., Lythgoe, M.F., Kalber, T.L. (2015). Advanced cell therapies: targeting, tracking and actuation of cells with magnetic particles. *Regen Med*, 10(06), 757-772. <https://doi.org/10.2217/rme.15.36> PMID: 26390317
- Cores, J., Caranasos, T., Cheng, K. (2015). Magnetically targeted stem cell delivery for regenerative medicine. *J Funct Biomater*, 6(3), 526-546. <https://doi.org/10.3390/jfb6030526> PMID: 26133387
- Cortajarena, A.L., Ortega, D., Ocampo, S.M., Gonzales-Garcia, A., Couleaud, P., Miranda, R., Belda-Iniesta, C., Ayuso-Sacido, A. (2014). Engineering iron oxide nanoparticles for clinical settings. *Nanobiomedicine (Rij)*, 1. <https://doi.org/10.5772/58841> PMID: 30023013
- El Haj, A.J., Glossop, J.R., Sura, H.S., Lees, M.R., Hu, B., Wolbank, S., van Griensven, M., Redl, H., Dobson, J. (2015). An in vitro model of mesenchymal stem cell targeting using magnetic particle labelling. *J Tissue Eng Regen Med*, 9(6), 724-733. <https://doi.org/10.1002/term.1636> PMID: 23281176
- Friedman, D.A., Claypool, S.E., Liu, R. (2013). The smart targeting of nanoparticles. *Curr Pharm Des*, 19(35), 6315-6329. PMID: 23470005
- Gupta, A.K., Gupta, M. (2005). Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26(18), 3995-4021. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.012> PMID: 15626447
- Harrison, R., Markides, H., Morris, R.H., Richards, P., El Haj, A.J., Sottile, V. (2017). Autonomous magnetic labeling of functional mesenchymal stem cells for improved traceability and spatial control in cell therapy applications. *J Tissue Eng Regen Med*, 11(8), 2333-2348. <https://doi.org/10.1002/term.2133> PMID: 27151571
- Heymer, A., Haddad, D., Weber, M., Gbureck, U., Jakob, P.M., Eulert Nöth, U. (2008). Iron oxide labelling of human mesenchymal stem cells in collagen hydrogels for articular cartilage repair. *Biomaterials*, 29(10), 1473-1483. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.12.003> PMID: 18155133



14. Kamei, N., Ochi, M., Adachi, N., Ishikawa, M., Yanada, S., Levin, L.S., Kamei, G., Kobayashi, T. (2018). The safety and efficacy of magnetic targeting using autologous mesenchymal stem cells for cartilage repair. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 26(12), 3626-3635. <https://doi.org/10.1007/s00167-018-4898-2> PMID: 29549388
15. Misri, R., Meier, D., Yung, A.C., Kozlowski, P., Häfeli, U.O. (2012). Development and evaluation of a dual-modality (MRI/SPECT) molecular imaging bioprobe. *Nanomedicine*, 8(6), 1007-1016. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.10.013> PMID: 22100757
16. Mok, H., Zhang, M. (2013). Superparamagnetic iron oxide nanoparticle-based delivery systems for biotherapeutics. *Expert Opin Drug Deliv*, 10(1), 73-87. <https://doi.org/10.1517/17425247.2013.747507> PMID: 23199200
17. Mokhber Dezfouli, M.R., Jabbari Fakhr, M., Sadeghian Chaleshtori, S., Dehghan, M.M., Vajhi, A., Mokhtari, R. (2018). Intrapulmonary autologous transplant of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells improves lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome in rabbit. *Crit Care*, 22(1), 353. <https://doi.org/10.1186/s13054-018-2272-x> PMID: 30572913
18. Ordidge, K. L., Gregori, M., Kalber, T.L., Lythgoe, M.F., Janes, S.M., Giangreco, A. (2014). Coupled cellular therapy and magnetic targeting for airway regeneration. *Biochem Soc Trans*, 42(3), 657-661. <https://doi.org/10.1042/BST20140089> PMID: 24849234
19. Oshima, S., Ishikawa, M., Mochizuki, Y., Kobayashi, T., Yasunaga, Y., Ochi, M. (2010). Enhancement of bone formation in an experimental bony defect using ferumoxide-labelled mesenchymal stromal cells and a magnetic targeting system. *J Bone Joint Surg Br*, 92(11), 1606-1613. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.92B11.23491> PMID: 21037362
20. Oshima, S., Kamei, N., Nakasa, T., Yasunaga, Y., Ochi, M. (2014). Enhancement of muscle repair using human mesenchymal stem cells with a magnetic targeting system in a subchronic muscle injury model. *J Orthop Sci*, 19(3), 478-488. <https://doi.org/10.1007/s00776-014-0548-9> PMID: 24562652
21. Panseri, S., Montesi, M., Sandri, M., Iafisco, M., Adamiano, A., Ghetti, M., Cenacchi, G., Tampieri, A. (2016). Magnetic labelling of mesenchymal stem cells with iron-doped hydroxyapatite nanoparticles as tool for cell therapy. *J Biomed Nanotechnol*, 12(5), 909-921. PMID: 27305814
22. Pradhan, P., Giri, J., Banerjee, R., Bellare, J., Bahadur, D. (2007). Cellular interactions of lauric acid and dextran-coated magnetite nanoparticles. *J Magn Magn Mater*, 311(1), 282-287.
23. Qi, Y., Yang, Z., Ding, Q., Zhao, T., Huang, Z., Feng, G. (2016). Targeted transplantation of iron oxide-labeled, adipose-derived mesenchymal stem cells in promoting meniscus regeneration following a rabbit massive meniscal defect. *Exp Ther Med*, 11(2), 458-466. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2944> PMID: 26893631
24. Riegler, J., Liew, A., Hynes, S.O., Ortega, D., O'Brien, T., Day, R.M., Richards, T., Sharif, F., Pankhurst, Q.A. Lythgoe, M.F. (2013). Superparamagnetic iron oxide nanoparticle targeting of MSCs in vascular injury. *Biomaterials*, 34(8), 1987-1994. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.11.040> PMID: 23237516
25. Sheng-Nan, S., Chao, W., Zan-Zan, Z., Yang-Long, H., Venkatraman, S.S., Zhi-Chuan, X. (2014). Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface coating techniques for biomedical applications. *Chin. Phys. B*, 23(3), 037503. <https://doi.org/10.1088/1674-1056/23/3/037503>
26. Sugioka, T., Ochi, M., Yasunaga, Y., Adachi, N., Yanada, S. (2008). Accumulation of magnetically labeled rat mesenchymal stem cells using an external magnetic force, and their potential for bone regeneration. *J Biomed Mater Res A*, 85(3), 597-604. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31493> PMID: 17806114
27. Tang, J., Shen, D., Zhang, J., Ligler, F.S., Cheng, K. (2015). Bispecific antibodies, nanoparticles and cells: bringing the right cells to get the job done. *Expert Opin Biol Ther*, 15(9), 1251-1255. <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1049944> PMID: 26004388
28. Veiseh, O., Gunn, J.W., Zhang, M. (2010). Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. *Adv Drug Deliv Rev*, 62(3), 284-304. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.11.002> PMID: 19909778
29. Wang, H.H., Wang, Y.X.J., Leung, K.C.F., Au, D.W., Xuan, S., Chak, C.P., Lee, S.K., Sheng, H., Zhang, G., Qin, L. (2009). Durable mesenchymal stem cell labelling by using polyhedral superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Chemistry*, 15(45), 12417-12425. <https://doi.org/10.1002/chem.200901548> PMID: 19834937





## Fabrication of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Magnetic Cell Targeting Purposes

Setareh Ghasemi<sup>1</sup>, Mohammad Mehdi Dehghan<sup>1,2</sup>, Gholamreza Nikbakht Brujeni<sup>3</sup>, Seyed Hosein Mardjanmehr<sup>4</sup>, Alireza Vajhi<sup>1</sup>, Mohammad Reza Mokhber Dezfouli<sup>2</sup>, Sepideh Khoei<sup>5</sup>, Massoumeh Jabbari Fakhr<sup>2</sup>, Mohammad Reza Karimi<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Department of Veterinary Surgery and Radiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Institute of Biomedical Research, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>4</sup> Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>5</sup> Department of Polymer, Faculty of Chemistry, College of Sciences, University of Tehran, Tehran, Iran

doi [10.22059/jvr.2019.286113.2952](https://doi.org/10.22059/jvr.2019.286113.2952)

Received: 16 February 2021, Accepted: 28 April 2021

### Abstract

**BACKGROUND:** Magnetic cell targeting is a novel non-invasive cellular delivery technique. It improves stem cell delivery to and retention in the injury site. Labeling cells with superparamagnetic iron oxide nanoparticle (SPION) is one of the most important steps of this technique. Appropriate SPIONs selection is believed to be of vital importance.

**OBJECTIVES:** The current study aimed to produce SPIONs which are capable of attaching to Mesenchymal stem cells surface (MSCs).

**METHODS:** Dextran coated SPIONs were produced following co-precipitation method under N<sub>2</sub> atmosphere. Bone marrow derived MSCs were isolated and cultured from rabbit humerus bone. Anti-rabbit CD44 monoclonal antibody was attached to the surface of SPIONs and MSCs and were labeled with this final product. SPIONs coating process, particle size, and antibody conjugation efficacy were evaluated using FT-IR, SEM, and Bradford protein measurement assay, respectively. Attachment of antibody-linked dextran coated SPIONs to MSCs was accessed utilizing Prussian blue staining, immunofluorescence analysis, and SEM analysis.

**RESULTS:** Peaks of FT-IR at 3200 cm<sup>-1</sup> and 2922 cm<sup>-1</sup> are representative of dextran. The average particle size was 56.13±6.67. The average antibody-SPION conjugation ratio was 77.78±6.35%. The average percentage of the labeled cells in Prussian blue and IF analysis were 71.57±2.53 and 95.04±0.95, respectively. MSCs-SPIONs conjugation was also confirmed via SEM analysis.

**CONCLUSIONS:** In conclusion, it could be inferred that mesenchymal stem cells could successfully be labeled with dextran coated-anti CD44 antibody conjugated- superparamagnetic Iron oxide nanoparticles. This product could be used for further in-vitro and in-vivo evaluations.

**Keywords:** Magnetic targeting, SPIONs, Dextran, Monoclonal antibody, Anti CD44 antibody

Copyright © 2020. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: mdehghan@ut.ac.ir Tel/Fax: 021-89786364/021-61117039

### How to cite this article:

Ghasemi, S., Dehghan, M., Nikbakht Brujeni, G., Mardjanmehr, S., Vajhi, A., Mokhber Dezfouli, M., Khoei, S., Jabbari Fakhr, M., Karimi, M. (2021). Fabrication of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Magnetic Cell Targeting Purposes. J Vet Res, 76(2), 224-232. <https://doi.org/10.22059/jvr.2019.286113.2952>

### Figure Legends and Table Captions

**Figure 1.** A. FT-IR spectrum of dextran coated iron oxide nanoparticles. The peaks of 3200 and 2922 cm<sup>-1</sup> are attributed to the hydroxyl and the C–H stretching vibrations of dextran, respectively. The band in the region of 1608 cm<sup>-1</sup> was due to the hydrogen bond between water and dextran. B. SEM analysis of dextran coated SPIONs.

**Figure 2.** Prussian Blue staining of mesenchymal stem cells. A. Control group, the absence of blue spots indicates the lack of ADSs; B. DSPION group, some blue spots were seen over the culture, which is due to Iron sediments; C. ADS group, blue spots were apparently spread all over the wells, which approves ADSs-MSCs attachment.

**Figure 3.** Immunofluorescence assay of MSCs-ADSs conjugation. A. light microscopy of conjugated trypsinized MSCs; B. Fluorescent view of the same cell population in A.

**Figure 4.** SEM analysis of MSCs-ADSs conjugation. Mesenchymal Stem cell is depicted as 'a' and 'b' represents ADSs particle.