DOI: 10.22122/jims.v36i472.9566 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و ششم/شماره‌ی ۴۷۲/هفته‌ی چهارم اردیبهشت ۱۳۹۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱/۲۸ تاریخ چاپ: ۱۳۹۷/۲/۲۲

بررسی اثر سیالیک اسید بر رشد و بقای سلول‌های آستروسیت موشی و آستروگلیای انسانی

مریم چراغ‌زاده[۱]، شیرین عزیزی‌دوست[۲]، زهرا ناظری[۳]، صادق صارمی[۴]، حمید گله‌داری[۵]، علیرضا خیراله[۶]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سطح سلول‌های تمامی مهره‌داران با زنجیره‌های قندی نظیر سیالیک اسید پوشیده شده است که مقادیر زیادی از آن به صورت سیالوگلیکان در مغز مهره‌داران یافت می‌شود. شواهدی بسیاری به دست آمده است که نشان می‌دهد تغییر در میزان سیالوگلیکان، منجر به بیماری‌های نورودژنراتیو و روان‌شناختی می‌گردد. با توجه به افزایش روزافزون این دسته از بیماری‌ها و اثر تعیین کننده‌ی سیالیک اسید در فرایند ایجاد و پیشرفت بیماری‌های نوروژنیک، تعیین غلظت سمی این ماده بر سلول‌های مغزی جهت طراحی بررسی‌های درون‌تن و برون‌تن حایز اهمیت می‌باشد. از این رو، پژوهش حاضر با هدف تعیین غلظت مطلوب سالیک اسید بر رده‌ی سلول‌های مغزی انجام شد.

روش‌ها: آستروگلیای انسانی و آستروسیت‌های موشی با سریال رقتی از سیالیک اسید تیمار شد و با استفاده از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای و روش MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] یا تیازول آبی] حد توکسیک سیالیک اسید برای سلول‌های کشت داده شده محاسبه گردید.

یافته‌ها: غلظت مهاری ۵۰ درصد (Half maximal inhibitory concentration یا IC_{50}) برای سلول‌های آستروگلیای انسانی و آستروسیت موشی به ترتیب ۱۲۷۳/۳و ۳۷۵۰ میکرومولار به دست آمد.

نتیجه‌گیری: سیالیک اسید، اثر مهاری وابسته به غلظت بر روی رشد سلول‌ها دارد؛ به طوری که در غلظت‌های بالاتر از IC_{50}، رشد سلول‌ها محدود شد و مرگ گسترده‌ای از این سلول‌ها مشاهده گردید. همچنین، نتایج حاصل بین دو رده‌ی سلول انسان و موش اختلاف معنی‌داری نشان داد و بر این اساس، پیشنهاد می‌شود برای به دست آوردن نتایج قابل تعمیم به انسان به جای مدل موشی، از رده‌ی سلول‌های مغزی انسانی استفاده شود.

واژگان کلیدی: کشت سلولی، سیالیک اسید، آستروگلیا، آستروسیت، تیازول آبی

ارجاع: چراغ‌زاده مریم، عزیزی‌دوست شیرین، ناظری زهرا، صارمی صادق، گله‌داری حمید، خیراله علیرضا. **بررسی اثر سیالیک اسید بر رشد و بقای سلول‌های آستروسیت موشی و آستروگلیای انسانی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۷؛ ۳۶ (۴۷۲): ۲۶۹-۲۶۴

مقدمه

سیالیک اسید یا N- استیل نورامینیک اسید (N-Acetylneuraminic acid یا NANA) که در سطح سلولی تمامی مهره‌داران وجود دارد، واکنش‌های متنوعی نظیر تحریک یا مهار پاسخ ایمنی، فعال‌سازی سیستم کمپلمان و پیام‌رسانی سلولی را ایجاد می‌کند. از این رو، نقش مهمی در تنظیم فرایندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک در سطح سلول ایفا می‌کند. سیالیک اسید، به طور عمده به پروتئین‌ها و لیپیدها متصل می‌شود و یکی از مهم‌ترین گلیکان‌های سطح سلول را تشکیل می‌دهد (۳-۱). در مهره‌داران، پلی‌سیالیک اسید می‌تواند به مولکول‌های چسبان نورونی (Neural adhesion molecule یا NCAM) متصل شود و این مولکول‌ها، می‌توانند چسبندگی، نقل و انتقال وزیکول‌های سیناپتیک و پیام‌رسانی سلولی را فراهم کنند که در نهایت، منجر به تمایز، بلوغ و عملکرد سلول‌های عصبی می‌شود (۴). مدارک زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد تغییرات پاتولوژیک در ارتباط با نورون‌ها

۱- دکترای ژنتیک مولکولی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران
۲- دانشجوی دکتری، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران
۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران
۴- مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران
۵- استاد، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
۶- دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: علیرضا خیراله
Email: akheirollah@ajums.ac.ir

و کاهش پلاستیسیتی مغز، می‌تواند باعث مرگ نورون‌ها و پیشرفت بیماری‌های عصبی شود (۵). همچنین، شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد NANA در بیماری‌های نورودژنراتیو التهابی نقش دارد. میزان این ترکیب، در مغز مهره‌داران بالاترین دز را در بین تمامی بافت‌ها، به خصوص در دوران جنینی، دارد. در انسان، میزان سیالیک اسید تام به طور تقریبی ۸۹۰ میکروگرم به ازای هر گرم از بافت مغز می‌باشد که ۴-۲ برابر سایر پستانداران است. مولکول‌های NCAM سیالیله شده در مغز جنین به وفور یافت می‌شوند، اما در مغز افراد بالغ فقط در پیاز بویایی و هیپوکامپ وجود دارند (۶).

دستگاه عصبی، از دو نوع سلول تشکیل شده است. یک نوع سلول عصبی به نام نورون (Neuron) که واحد عملی دستگاه عصبی است و نوع دیگر، سلول غیر عصبی به نام نوروگلیا (Neuroglia) که سلول پشتیبان محسوب می‌شود و به آن گلیال و یا به زبان ساده‌تر گلیا می‌گویند. این سلول‌ها در انتقال پیام عصبی نقشی ندارند. وظیفه‌ی این سلول‌های غیر عصبی، ترمیم و تغذیه و همچنین، حفاظت و پشتیبانی از سیستم عصبی است و شامل آستروسیت‌ها، الیگودندروسیت‌ها، میکروگلیا و سلول‌های شوان می‌باشد (۷). سیستم اعصاب مرکزی، ساختار بسیار انعطاف پذیری دارد، اما بازسازی آن پس از آسیب‌ها بسیار محدود است. بیماری‌های نورودژنراتیو از جمله بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی هستند که به از دست دادن پیش‌رونده‌ی سلول‌های عصبی (به دلایلی مبهم)، نقص در عملکردهای شناختی و اختلالات حرکتی منجر می‌شوند (۵). بیماری‌های نورودژنراتیو از جمله Multiple sclerosis (MS)، بیماری آلزایمر (Alzheimer's disease یا AD)، بیماری پارکینسون (Parkinson's disease یا PD) و اسکلروزیس جانبی آمیوتروفیک (Amyotrophic lateral sclerosis یا ALS) دارای جنبه‌های پاتولوژیکی مشترک و مختلفی هستند (۸).

یکی از مولکول‌هایی که به تازگی در بیماری‌های نورودژنراتیو بسیار مورد توجه قرار گرفته است، اولیگوساکارید ۹ کربنه‌ی سیالیک اسید می‌باشد که یکی از مهم‌ترین گلیکان‌های بیان شده در سطح سلول‌ها است (۴). به دلایل ناشناخته، مغز عضوی با بالاترین سطح سیالیک اسید در بدن می‌باشد و مشخص شده است که غشاهای سلول های عصبی، ۲۰ برابر بیشتر از سایر غشاها سیالیک اسید دارند (۶). این مولکول، نقش بسیار مهمی در نقل و انتقالات عصبی، ساختار گانگلیوزیدها و پدیده‌های تشکیل سیناپس (synaptogenesis) دارد که بیان کننده‌ی نقش مهم سیالیک اسید در ساختار عصبی است (۹).

مطالعات بالینی و مدل‌های حیوانی و همچنین، مطالعات کشت سلول نشان داده‌اند که گلیکان‌های متصل به پروتئین و چربی‌ها، نقش مؤثری در فرایندهای دژنراتیو مغز دارند (۱۱-۱۰). به عنوان مثال، در بیماری آلزایمر دیده شده است که حذف پلاک‌های بتا آمیلوئیدی توسط میکروگلیا صورت می‌گیرد و در صورتی که پلاک‌ها توسط سیالیک اسید پوشیده و ماسک شوند، حذف و پاک‌سازی پلاک‌ها کاهش می‌یابد (۱۴-۱۲).

همچنین، هدف قرار دادن آنزیم مسیر ساخت سیالیک اسید در مدل موشی آلزایمر، باعث افزایش حذف و پاک‌سازی پلاک‌های آمیلوئیدی می‌شود (۱۵). در بیماری ALS که به واسطه‌ی تخریب نورون‌های حرکتی به وجود می‌آید نیز مشاهده شده است که بیان Polysialylated-neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) در نورون‌های حرکتی نخاعی افزایش می‌یابد (۱۷-۱۶). در ارتباط با بیماری MS نیز بیان PSA-NCAM در مناطقی از آکسون‌ها که غشای میلین خود را از دست داده‌اند، مشاهده شده است و شاید عامل مهاری تشکیل مجدد غشای میلین در اکسون‌ها، حضور سیالیک اسید در این مناطق باشد که به واسطه‌ی تغییر در مسیرهای پیام‌رسانی التهابی در سلول رخ می‌دهد (۱۸).

با توجه به نقش سیالیک اسید در فرایندهای زیستی و تغییر میزان بیان این ماده در برخی بیماری‌ها نظیر بیماری‌های نورودژنراتیو که نشان دهنده‌ی اهمیت این ماده در مغز می‌باشد، بررسی مسیرهای پیام‌رسانی این ماده در سلول‌های مغزی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است که شاید کمتر مورد توجه محققین واقع شده است. هر چه دانش ما در زمینه‌ی ترمیم و بازسازی مغز و شناسایی مولکول‌هایی که این فرایند را راه‌اندازی می‌کنند، بیشتر شود، می‌توانیم امیدوار باشیم که راه‌های درمانی جدید، نویدبخش آینده‌ای روشن در زمینه‌ی درمان بیماری‌های نورودژنراتیو باشد. از این رو، پژوهش حاضر، با هدف یافتن دز مؤثر سیالیک اسید بر زیست‌پذیری سلول‌های مغزی نظیر سلول‌های گلیال انجام پذیرفت تا بتوان در آینده جهت انجام مطالعات سلولی و مولکولی، از داده‌های این پژوهش بهره برد.

روش‌ها

در این مطالعه، پودر سیالیک اسید A0812 و آمفوتریسین A2411 از شرکت Sigma، پودر Ethylenediaminetetraacetic acid (MTT) (کد ABM-21P1) و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین از شرکت Atocell، Fetal bovine serum (FBS) از شرکت Gibco، محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) و Trypsin/ Ethylenediaminetetraacetic acid (Trypsin/EDTA) از شرکت Bio-Idea خریداری شدند.

کشت سلول: دودمان سلول آستروگلیا: رده‌ی سلولی آستروگلیای انسانی تهیه شده از انستیتو پاستور ایران (NCBI code: C118) در

محیط کشت (Low glucose) DMEM و FBS ۱۰ درصد، پنی‌سیلین و استرپتومایسین و آمفوتریسین ۱ درصد و شرایط دمایی ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و CO_2 ۵ درصد و میزان رطوبت ۹۵ درصد انکوبه گردید. تعویض محیط هر سه روز یک بار انجام شد تا سلول‌ها از نظر تعداد به حد مطلوب (Confluent) برسند، سپس سلول‌ها در تراکم ۸۰ درصد توسط آنزیم Trypsin/EDTA ۰/۰۱ درصد پاساژ (Passage) داده شدند.

کشت اولیه‌ی سلول‌های آستروسیت موش: نوزاد موش یک روزه، از مرکز حیوانات دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز تهیه گردید و پس از استریل کردن با الکل ۷۰ درصد و کشتن موش‌ها، از طریق جدا کردن سر، مغز موش‌ها به بافر Phosphate buffered saline (PBS) سرد منتقل و منتز آن‌ها با دقت جدا گردید. مغزهای جدا شده پس از خرد شدن، با تریپسین ۰/۰۱ درصد هضم شد و پس از سانتریفیوژ محتوای ته‌نشین شده در لوله، به فلاسک حاوی محیط DMEM به همراه ۱۰ درصد FBS و پنی سیلین/استرپتومایسین و آمفوتریسین ۱ درصد منتقل و کشت داده شد. سلول‌ها، در انکوباتور در شرایط دمایی ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، CO_2 ۵ درصد و میزان رطوبت ۹۵ درصد نگهداری شدند. سه روز پس از کشت اولیه و به منظور خالص‌سازی آستروسیت‌ها، فلاسک‌های حاوی سلول به مدت ۴۵ دقیقه با شتاب ۱۵۰ دور در دقیقه انکوبه شدند. سپس، محیط کشت فلاسک به همراه سلول‌های شناور، شامل سایر سلول‌های گلیا، به طور کامل خارج شد و به سلول‌های خالص شده‌ی آستروسیت، محیط کشت جدید اضافه گردید. کلیه‌ی مراحل کشت سلول در شرایط استریل و طبق شیوه‌نامه‌ی مطالعات گذشته انجام شد (۱۹).

تیمار با سیالیک اسید و روش MTT: از پودر سیالیک اسید تهیه شده از شرکت Sigma، محلولی با غلظت ۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر با pH معادل ۷/۴ ساخته شد و پس از استریل کردن، رقیق‌سازی با استفاده از محیط کشت DMEM جهت تیمار سلول‌ها صورت پذیرفت. سریال رقت سیالیک اسید بین ۱۴۰۰–۲۰ میکروگرم به ازای هر میلی‌لیتر تهیه شد. جهت انجام روش MTT، در هر یک از خانه‌های پلیت ۹۶ خانه سلول‌ها با تراکم ۷۰۰۰ سلول همراه با ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM کشت داده شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت و اتصال سلول‌ها به کف چاهک‌ها، محیط رویی سلول‌ها حذف و سلول‌ها ۲۴ ساعت در معرض ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی غلظت‌های مورد نظر سیالیک اسید قرار گرفتند. یک گروه سلولی تیمار شده با محیط فاقد سیالیک اسید نیز به عنوان شاهد مطالعه در نظر گرفته شد. از هر گروه رقت، ۸ تکرار (۸ خانه) برای تیمار در نظر گرفته شد.

جهت بررسی اثر سمیت سیالیک اسید از روش رنگ‌سنجی MTT استفاده شد. در ادامه‌ی کار، جهت انجام روش MTT، انکوباسیون ۴ ساعته با محلول MTT با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر انجام و پس از آن جهت حل کردن کریستال‌های فورمازان، ۲۰۰ میکرولیتر حلال قطبی DMSO اضافه گردید و پس از انکوباسیون ۲۰ دقیقه‌ای بر روی دستگاه Shaker، میزان جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه خوانش Enzyme-linked immunosorbent assay (Biotech, ELX 800 ELISA reader,) خوانده شد و درصد بقای سلول طبق فرمول مربوط محاسبه گردید.

۱۰۰ × (جذب نوری سلول شاهد/جذب نوری سلول‌های تیمار شده) = درصد بقای سلولی

آنالیز آماری: آنالیز آماری این مطالعه بر اساس میانگین ± انحراف معیار و آزمون One-way ANOVA با معنی‌داری $P < ۰/۰۵$ با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism6.07 انجام شد. تمام داده‌ها بر اساس سه تکرار به دست آمد.

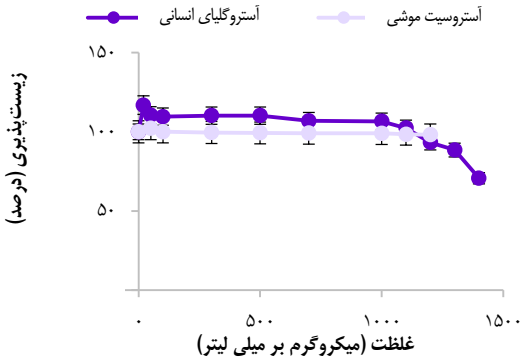
یافته‌ها

آستروسیت مغز موش و آستروگلیای انسانی به روش‌های پیش‌گفته کشت داده شد و ریخت‌شناسی سلول‌ها با میکروسکوپ معکوس مورد ارزیابی واقع گردید. شکل ۱، سلول‌های آستروسیت موشی و آستروگلیای انسانی را نشان می‌دهد (شکل ۱).

شکل ۱. سلول‌های الف) آستروسیت موشی و ب) آستروگلیای انسانی. سلول‌ها در شرایط دمایی ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، CO_2 ۵ درصد و میزان رطوبت ۹۵ درصد و در عدم حضور سیالیک اسید می‌باشند. بزرگ‌نمایی ۱۰ ×.

برای بررسی اثر سیالیک اسید بر زیست‌پذیری آستروسیت موشی و آستروگلیای انسانی، پس از کشت سلولی و در تراکم ۸۰ درصد، سلول‌ها با سیالیک اسید تیمار شدند و پس از ۲۴ ساعت، میزان بقای سلول‌ها با روش MTT به روش رنگ‌سنجی، ارزیابی گردید. درصد سلول‌های زنده بر اساس فرمول پیش‌گفته محاسبه گردید. در انتها، نتایج ارزیابی و میزان غلظت مهاری ۵۰ درصد

(IC_{50} یا Half maximal inhibitory concentration) پس از رسم منحنی و حاصل شدن معادله‌ی خط، با به کارگیری غلظت‌های سیالیک اسید و درصد سلول‌های زنده محاسبه و به صورت نمودار ارایه شد (شکل ۲). میزان IC_{50} سیالیک اسید در رده‌ی سلولی آستروگلیای انسانی و سلول‌های آستروسیت موشی به ترتیب ۱۲۷۳/۳ و ۳۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد و روند مهار رشد وابسته به غلظت را نشان می‌داد. لازم به ذکر است که اعداد به دست آمده برای IC_{50} با کمک معادله ی خط و فرمول IC_{50} به دست آمده‌اند و در مورد آستروسیت موشی، این مقدار بالاتر از محدوده‌ی غلظت استفاده شده جهت تیمار می‌باشد که نمایانگر مقاومت بالای آستروسیت موشی در برابر سیالیک اسید است.



شکل ۲. میزان زیست‌پذیری سلول‌های آستروسیت موشی و آستروگلیای انسانی در انکوباسیون ۲۴ ساعته از غلظت‌های سریالی سیالیک اسید

بحث

با وجود اهمیت سیالیک اسید در سلامتی و بیماری، مطالعات زیادی در ارتباط با میزان سیالیک اسید در گونه‌های مختلف جانداران انجام نشده است. این پژوهش، با هدف یافتن غلظت مناسب و مطلوب سیالیک اسید و اندازه‌گیری بقا، رشد و تکثیر سلول‌های مغزی در دو گونه‌ی انسان و موش انجام شد. نتایج حاصل از پژوهش نشان داد که سلول‌های گلیای انسانی و موشی در تیمار با سیالیک اسید رفتار مشابهی نشان می‌دهند؛ به صورتی که میزان زیست‌پذیری آن‌ها با غلظت سیالیک اسید نسبت عکس دارد. البته، میزان مقاومت آن‌ها در برابر این ماده مشابه نیست و سلول‌های موشی IC_{50} بیشتری دارند.

اندازه گیری حیات، رشد و تکثیر سلول‌ها، کاربردهای مختلفی در تحقیقات دارد. رنگ‌آمیزی سلول‌ها با تریپان‌بلو، یکی از قدیمی‌ترین روش‌ها می‌باشد که حساسیت آن پایین است و نیاز به بررسی میکروسکوپی دارد. اندازه‌گیری میزان تام اسیدهای هسته‌ای و پروتئین دریافته (Cell lysis) سلولی نیز از دقت کافی برخوردار نمی‌باشند. همچنین، با وجود دقت و حساسیت بالای روش‌های مبتنی بر اندازه‌گیری جذب مواد رادیواکتیو توسط سلول‌های در حال رشد، وقت‌گیر بودن این روش‌ها و مشکلات مربوط به کار با مواد رادیواکتیو، باعث شده است که کمتر مورد توجه واقع شوند (۲۰). در سال ۱۹۸۳، آزمایش MTT به عنوان روشی ساده‌تر و ایمن‌تر، جایگزین روش‌های رادیواکتیو گردید. تمامی مراحل آزمایش در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ی کشت سلولی انجام شده و نتایج با دستگاه ELISA reader خوانده می‌شود. از این رو، با امکانات موجود در اغلب آزمایشگاه‌ها قابل انجام می‌باشد (۲۱). در روش MTT، ارزیابی اثر داروها در برون‌تن (In vitro) بر اساس IC_{50} محاسبه می‌شود که عبارت از غلظتی از دارو می‌باشد که سبب مهار رشد سلولی تا میزان ۵۰ درصد می‌شود.

در این پژوهش، نتایج مربوط به اثرات سمی ماده‌ی سیالیک اسید بر رده‌های سلولی آستروگلیای انسانی و آستروسیت موشی به روش رنگ‌سنجی MTT ارایه شده است. این که پژوهشگران برای سالیان متمادی از موش به عنوان ارگانیسم مدل استفاده کرده‌اند، به دلیل شباهت بسیار زیاد موش و انسان در جنبه‌های زیستی می‌باشد، اما یافته‌های جدید که بر اساس آنالیز و مقایسه‌ی ژنوم انسان و موش به دست آمده است، حاکی از این حقیقت می‌باشد که یافته‌های به دست آمده از مدل موشی، همیشه منعکس کننده‌ی جنبه‌ی زیستی انسانی نیست. طرح ENCODE موش، با هدف بررسی و مقایسه‌ی ژنوم انسان و موش انجام گردید و بخش‌های کد کننده و غیر کد کننده‌ی پروتئین، مناطق تنظیمی و کنترل کننده‌ی ژن‌ها را در سلول‌ها و بافت‌های مختلف مورد مقایسه قرار داد. یافته‌ها حاکی از این حقیقت است که شبکه‌های تنظیمی بین موش و انسان حفاظت شده است، اما جزئیات آن‌ها با هم تفاوت دارد. به عنوان مثال، عوامل تنظیمی و فعالیت ژن‌های سیستم ایمنی، فرایندهای متابولیک و پاسخ به استرس‌ها، از جمله مواردی هستند که بین دو گونه تفاوت نشان می‌دهند (۲۲). فهم بیشتر و بهتر این تفاوت‌ها، کمک می‌کند تا پژوهشگران بدانند در کدام جنبه‌های زیستی می‌توان از موش به عنوان یک مدل مناسب استفاده کرد. از این رو، در پژوهش حاضر نیز سلول‌های گلیال موش و انسان تحت تأثیر غلظت‌های ۱۴۰۰-۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر سیالیک اسید قرار گرفت.

اختلاف معنی‌دار به دست آمده بین IC_{50} سلول‌های موشی و انسانی، شاید مؤید این موضوع باشد که نتایج حاصل از آزمایش بر روی سلول آستروسیت موش در حضور سیالیک اسید، جهت تعمیم دادن به انسان نیاز به پژوهش‌های بیشتری دارد و شاید بهتر باشد از مدل حیوانی موش در این زمینه استفاده نگردد. همچنین، نتایج حاصل از روش MTT assay بر روی سلول‌های تیمار شده با سیالیک اسید نشان داد که بقای سلول‌ها در غلظت‌های بالاتر از IC_{50} به کمتر از ۵۰ درصد می‌رسد؛ به گونه‌ای که حساسیت و مرگ گسترده‌ای از این سلول‌ها مشاهده شد.

به دلیل اهمیت سیالیک اسید در سلامتی و بیماری، این قند ۹ کربنه مورد توجه محققین قرار گرفته است. تعیین دز مناسب و سازگار با زیست‌پذیری سلول‌ها، یکی از اولین ضرورت‌ها برای انجام مطالعات سلولی و مولکولی بر روی این ماده می‌باشد. بر اساس نتایج پژوهش حاضر، غلظت‌های مناسب این ماده در دو رده‌ی سلولی مغزی انسانی و موشی تعیین شد و کاربرد این غلظت‌ها جهت مطالعات تکمیلی آینده در محیط برون‌تن به منظور بررسی اثر سیالیک اسید بر روی بیان ژن‌ها، همچنین بررسی مکانیزم‌های بیماری‌زایی در بیماری‌های نورودژنراتیو، پیشنهاد می‌شود. با توجه به این موضوع که اثر سمیت سلولی سیالیک اسید برای سلول‌های آستروگلیای انسانی و آستروسیت موشی، وابسته به غلظت می باشد، باید جهت تیمار سلولها با این ترکیب از غلظتهای کمتر از میزان IC_{50} استفاده نمود تا کمترین اثر را بر روی حیات سلول داشته باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله از طرح تحقیقاتی (CMRC-126) استخراج و با حمایت مالی معاونت توسعه پژوهش و فن‌آوری تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز در گروه بیوشیمی بالینی دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم‌پزشکی جندی‌شاپور اهواز انجام شده است.

References

1. Varki A. Sialic acids in human health and disease. Trends Mol Med 2008; 14(8): 351-60.
2. von GS, Simon HU. Sialic acid binding immunoglobulin-like lectins may regulate innate immune responses by modulating the life span of granulocytes. FASEB J 2006; 20(6): 601-5.
3. Linnartz-Gerlach B, Mathews M, Neumann H. Sensing the neuronal glycocalyx by glial sialic acid binding immunoglobulin-like lectins. Neuroscience 2014; 275: 113-24.
4. Schnaar RL, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H. Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. Physiol Rev 2014; 94(2): 461-518.
5. Wielgat P, Braszko JJ. Significance of the cell adhesion molecules and sialic acid in neurodegeneration. Adv Med Sci 2012; 57(1): 23-30.
6. Wang B, Miller JB, McNeil Y, McVeagh P. Sialic acid concentration of brain gangliosides: variation among eight mammalian species. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 1998; 119(1): 435-9.
7. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia AS, McNamara JO, et al. The organization of the nervous system. In: Neuroscience. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia AS, McNamara JO, et al, editors. Sunderland, MA: Sinauer Associates; 2001.
8. Lo EH. Degeneration and repair in central nervous system disease. Nat Med 2010; 16(11): 1205-9.
9. Yoo SW, Motari MG, Susuki K, Prendergast J, Mountney A, Hurtado A, et al. Sialylation regulates brain structure and function. FASEB J 2015; 29(7): 3040-53.
10. Wielgat P, Braszko JJ. The participation of sialic acids in microglia-neuron interactions. Cell Immunol 2012; 273(1): 17-22.
11. Pillai S, Cariappa A, Pirnie SP. Esterases and autoimmunity: the sialic acid acetylesterase pathway and the regulation of peripheral B cell tolerance. Trends Immunol 2009; 30(10): 488-93.
12. Ariga T, McDonald MP, Yu RK. Role of ganglioside metabolism in the pathogenesis of Alzheimer's disease--a review. J Lipid Res 2008; 49(6): 1157-75.
13. Jin K, Peel AL, Mao XO, Xie L, Cottrell BA, Henshall DC, et al. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci U S A 2004; 101(1): 343-7.
14. Yoshimi K, Ren YR, Seki T, Yamada M, Ooizumi H, Onodera M, et al. Possibility for neurogenesis in substantia nigra of parkinsonian brain. Ann Neurol 2005; 58(1): 31-40.
15. Zhang Z, Takeda-Uchimura Y, Foyez T, Ohtake-Niimi S, Narentuya, Akatsu H, et al. Deficiency of a sulfotransferase for sialic acid-modified glycans mitigates Alzheimer's pathology. Proc Natl Acad Sci U S A 2017; 114(14): E2947-E2954.
16. Warita H, Murakami T, Manabe Y, Sato K, Hayashi T, Seki T, et al. Induction of polysialic acid-neural cell adhesion molecule in surviving motoneurons of transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. Neurosci Lett 2001; 300(2): 75-8.
17. Mammana S, Fagone P, Cavalli E, Basile MS, Petralia MC, Nicoletti F, et al. The Role of Macrophages in Neuroinflammatory and Neurodegenerative Pathways of Alzheimer's Disease, Amyotrophic Lateral Sclerosis, and Multiple Sclerosis: Pathogenetic Cellular Effectors and Potential Therapeutic Targets. Int J Mol Sci 2018; 19(3): 1-20.
18. Carratu MR, Steardo L, Cuomo V. Role of polysialic acid in peripheral myelinated axons. Microsc Res Tech 1996; 34(6): 489-91.
19. Ito J, Nagayasu Y, Lu R, Kheirollah A, Hayashi M, Yokoyama S. Astrocytes produce and secrete FGF-1, which promotes the production of apoE-HDL in a manner of autocrine action. J Lipid Res 2005; 46(4): 679-86.
20. Pegg DE. Viability assays for preserved cells, tissues, and organs. Cryobiology 1989; 26(3): 212-31.
21. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983; 65(1-2): 55-63.
22. Yue F, Cheng Y, Breschi A, Vierstra J, Wu W, Ryba T, et al. A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. Nature 2014; 515(7527): 355-64.

DOI: 10.22122/jims.v36i472.9566 Published by Vesnu Publications

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 36, No. 472, 4th Week, May 2018**

Received: 29.01.2018 Accepted: 17.04.2018 Published: 12.05.2018

The Effect of Sialic Acid on Viability and Growth of Mice Astrocytes and Human Astroglia Cells

Maryam Cheraghzadeh[1], Shirin Azizidoost[2], Zahra Nazeri[3], Sadegh Saremi[4], Hamid Galehdari[5], Alireza Kheirollah[6]

Original Article

Abstract

Background: The surface of all vertebrate cells is covered with sugar chains like sialic acid that are found at high levels in sialoglycan form in vertebrate brain. There are growing evidences that changes in level of sialic acid may cause neurodegenerative and psychotic disorders. Duo to increasing growth of these diseases, and the important role of sialic acid in causing and progression of neurogenic disease, determination of toxic levels of sialic acid is important to design the in-vitro and in-vivo experiments. So, the goal of this research was evaluation of the proper concentration of sialic acid for brain cell lines.

Methods: The human astroglia cells and mice astrocytes were treated with a serial dilution of sialic acid in 96 well plates. Toxic level of sialic acid was examined using MTT assay [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide or thiazolyl blue].

Findings: The half maximal inhibitory concentration (IC50) for astroglia and astrocyte cells were 1273.3 and 3750 µM, respectively.

Conclusion: Sialic acid has a dose-dependent inhibitory effect on brain cell growth with a significant growth limitation at concentrations higher than the IC50. In addition, the results showed significant differences between the two human and mouse cells, and it was suggested that instead of the mouse model, human brain cells should be used to obtain generalized results for humans.

Keywords: Cell culture, Sialic acid, Astroglia, Astrocytes, Thiazolyl blue

Citation: Cheraghzadeh M, Azizidoost S, Nazeri Z, Saremi S, Galehdari H, Kheirollah A. **The Effect of Sialic Acid on Viability and Growth of Mice Astrocytes and Human Astroglia Cells.** J Isfahan Med Sch 2018; 36(472): 264-9.

1- PhD in Molecular Genetics, Department of Biochemistry, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
2- PhD Student, Department of Biochemistry, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
3- MSc Student, Department of Biochemistry, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
4- Cellular and Molecular Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
5- Professor, Department of Genetics, School of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
6- Associate Professor, Department of Biochemistry, School of Medicine AND Cellular and Molecular Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
Corresponding Author: Alireza Kheirollah, Email: akheirollah@ajums.ac.ir