DOI: 10.22122/jims.v37i520.11536 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و هفتم/شماره‌ی ۵۲۰/هفته‌ی چهارم اردیبهشت ۱۳۹۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۲/۲۰ تاریخ چاپ: ۱۳۹۸/۲/۲۲

ارزیابی سطح مالون دی‌آلدئید در حضور سیالیک اسید در آستروگلیای انسانی

رحیم مرادی[۱]، زهرا ناظری[۱]، شیرین عزیزی دوست[۲]، مریم چراغزاده[۳]، علیرضا خیراله[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: سیالیک اسید در غشای سلولی همه‌ی مهره‌داران وجود دارد و میزان آن در مغز انسان، نسبت به سایر بافت‌ها بیشتر است. مطالعات نشان داده‌اند که علاوه بر استرس‌های اکسیداتیو، افزایش میزان سیالیک اسید نیز می‌تواند زمینه‌ساز بروز بیماری‌های عصبی نظیر بیماری آلزایمر شود. از این رو، مطالعه‌ی حاضر به منظور بررسی اثر سیالیک اسید بر میزان مالون دی‌آلدئید (Malondialdehyde یا MDA) که محصول پراکسیداسیون لیپیدی می‌باشد، در آستروگلیای انسانی طراحی و اجرا گردید.

روش‌ها: آستروگلیای انسانی در محیط Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) حاوی ۱۰ درصد Fetal bovine serum (FBS) کشت داده و سلول‌ها با غلظت‌های مختلف سیالیک اسید تیمار شدند. میزان MDA تولید شده با استفاده از روش تیوباربیتوریک اسید اندازه‌گیری شد و نتایج حاصل با استفاده از نرم‌افزار SPSS واکاوی گردید.

یافته‌ها: تولید MDA در سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر سیالیک اسید نسبت به گروه شاهد به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت. همچنین، در غلظت ۲۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر سیالیک اسید در زمان‌های ۱۲، ۱۶ و ۲۴ساعت نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: مطالعات زیادی در ارتباط با بیماری‌های عصبی انجام شده است، اما با این وجود، مکانیسم ایجاد آن‌ها هنوز به طور کامل مشخص نشده است. با توجه به نقش سیالیک اسید در ایجاد التهاب، نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که سیالیک اسید با ایجاد شرایط پاتولوژیک و استرس اکسیداتیو، به احتمال زیاد موجب افزایش MDA می‌شود که در بروز بیماری‌های عصبی همانند بیماری آلزایمر مؤثر می‌باشد. نقش سیالیک اسید و اثرات آن نیازمند مطالعات بیشتری است.

واژگان کلیدی: سیالیک اسید، استرس اکسیداتیو، مالون دی‌آلدئید، آستروگلیای انسانی

ارجاع: مرادی رحیم، ناظری زهرا، عزیزی دوست شیرین، چراغزاده مریم، خیراله علیرضا. **ارزیابی سطح مالون دی‌آلدئید در حضور سیالیک اسید در آستروگلیای انسانی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۸؛ ۳۷ (۵۲۰): ۲۶۹-۲۶۳

مقدمه

سیالیک اسید یا N-Acetylneuraminic acid (NANA)، یکی از مشتقات استیله نورامینیک اسید می‌باشد که به طور گسترده در بافت‌ها و مایعات بدن پستانداران حضور دارد. این ترکیب، اغلب به شکل‌های متصل به پروتئین و متصل به لیپید دیده می‌شود و تنها مقدار ناچیزی از آن به فرم آزاد وجود دارد. سیالیک اسیدها، منوساکاریدهایی ۹ کربنه هستند که به ان-استیل گالاکتوز آمین، گالاکتوز و یا دیگر سیالیک اسیدهای واقع در بخش انتهایی زنجیره‌ی کربوهیدراتی گلیکوپروتئین، گلیکولیپیدها، الیگوساکاریدها و پلی‌ساکاریدها متصل می‌شوند. نخستین بار توسط بیوشیمیست سوئدی به نام Gunner Blix در سال ۱۹۵۲ مطرح شد و بالاترین میزان آن در سطح غشای سلول‌های مغز انسان به ویژه در غشای نورون‌ها، سلول‌های گلیا و آستروسیت‌ها وجود دارد (۱). سیالیک اسید، همچنین در موارد متعددی نظیر نقل و انتقالات عصبی، ساختار گانگلیوزیدها، پلی‌سیالیک‌ها و همچنین، در فرایندهای سیناپتوژنز و شکل گرفتن حافظه ایفای نقش می‌کند (۳-۲).

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که سهم قابل توجهی از سیالوگلیکان‌های مغز متعلق به دو دسته‌ی گانگلیوزیدها و پلی‌سیالیک

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران

۲- دانشجوی دکتری، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی پزشکی، کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران

۳- استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران

۴- 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

اسیدها هستند. گانگلیوزیدها، به طور گسترده‌ای حاوی سیالیک اسید در ترکیب خود می‌باشند که به مقدار فراوان در مغز یافت می‌شوند و در متابولیسم آکسون و میلین، ثبات آکسون، بازسازی و تحریک پذیری سلول‌های عصبی نقش مهمی دارند. این ترکیبات، در افراد سالم در مقایسه با بیماران درگیر اختلالات عصبی به مقدار ناچیز در سرم و یا بافت مغز دیده می‌شود، اما در مطالعات مختلفی گزارش شده است که به دنبال آسیب و التهاب مغزی، این ترکیبات افزایش نشان می‌دهد و همچنین، شواهدی وجود دارد که این ترکیبات، در بیماری‌های نورودژنراتیو التهابی نظیر بیماری آلزایمر نقش دارند (۶-۴).

استرس اکسیداتیو ناشی از عدم ظرفیت آنتی‌اکسیدانی است که با افزایش تولید رادیکال آزاد همراه می‌باشد. دو نوع دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی وجود دارد که دفاع آنتی‌اکسیدانی آنزیمی شامل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز و دفاع آنتی‌کسیدانی غیر آنزیمی مشتمل بر مولکول‌های کوچک نظیر ویتامین E، اسکوربات و گلوتاتیون می‌باشد (۷).

شرایط استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی، باعث بروز و پیشرفت بیماری‌های نورودژنراتیو می‌شود. یکی از محصولات تولید شده تحت شرایط اکسیداتیو، آلدئیدها می‌باشد که گفته می‌شود در بدن طی واکنش با پروتئین‌ها، DNA و لیپیدها با ایجاد سمیت سبب بروز پاسخ‌های بیولوژیک و پاتولوژیک می‌شوند. همچنین، شواهد حاکی از اختلال در تعادل اکسیداسیون- احیا در مغز بیماران مبتلا به بیماری آلزایمر می‌باشد (۹-۸).

افزایش تولید رادیکال‌های آزاد، باعث تخریب اکسیداسیونی سلولی اسیدهای چرب با چند پیوند دوگانه‌ی موجود در ساختمان غشای سلولی می‌گردد و به عنوان پراکسیداسیون لیپید شناخته می‌شود. چنانچه این تخریب اکسیداسیونی شروع شود و به طور زنجیروار ادامه پیدا کند، MDA تولید می‌شود. همچنین، افزایش سطح مالون دی‌آلدئید باعث تخریب و آسیب سلولی می‌شود (۱۰).

مطالعات متعدد نشان می‌دهند که ایجاد پلاک‌های بتا-آمیلوئید، موجب القای استرس اکسیداتیو در سیستم عصبی مرکزی می‌شود. همچنین، مطالعه‌ی افرا مبتلا به بیماری آلزایمر، نشان می‌دهد که نشانگرهای استرس اکسیداتیو در خون این بیماران نسبت به افراد سالم افزایش معنی‌دار و چشم‌گیری دارد. این نشانگرها، شامل مالون دی‌آلدئید، آلبومین اکسیده و پروتئین‌های کربونیله می‌باشند (۱۱). همچنین، مطالعات دیگر نشان می‌دهند که آسیب اکسیداتیو می‌تواند از طریق افزایش نفوذپذیری غشای سلول عصبی به یون کلسیم و سایر یون‌های دو ظرفیتی دیگر، تجمع کلسیم را در داخل سلول عصبی القا کند و از این طریق، منجر به سمیت عصبی و در نتیجه، اختلال در عملکرد سلول گردد. اگر چه مکانیسم‌های مولکولی درگیر در تغییرپذیری غشای سلول‌ها و سمیت عصبی ناشناخته مانده است (۱۲). طبق فرضیه‌ی اکسیداتیو، نشانگرهای استرس اکسیداتیو حتی می‌توانند زودتر از تغییرات پاتولوژیکی در بیماری آلزایمر دیده شوند. مطالعات زیادی در انسان و حیوانات آزمایشگاهی نشان داده‌اند که استرس‌های اکسیداتیو به عنوان عامل پیش برنده در پاتوژنز برخی بیماری‌های تحلیل برنده‌ی معمول نظیرنوروپاتی‌ها، بیماری آلزایمر، دیابت نوع ۲، سرطان و فرایندهایی همچون پیری محسوب می‌شوند (۱۵-۱۳).

مطالعه‌ی دیگری نشان می دهد که استرس اکسیداتیو در محیط سلولی منجر به تشکیل لیپید پراکسیدهای ناپایدار و واکنشگر می‌شود. تجزیه‌ی پراکسیدهای ناپایدار و مشتق شده از اسیدهای چرب غیر اشباع منجر به تشکیل MDA می‌شود (۷). غلظت دقیق MDA با کروماتوگرافی تعیین می‌شود. همچنین، می‌توان میزان MDA را با روش کلرومتری و بر اساس واکنش با اسید تیوباربیتوریک اندازه‌گیری نمود (۱۶).

با توجه به نقش استرس اکسیداتیو در پاتولوژی بیماری‌های نورودژنراتیو و همچنین، اهمیت سیالیک اسید، مطالعات در زمینه‌ی سیالیک اسید و پوشش‌های قندی سطح سلول و اثرات آن‌ها بر سیستم‌های بیولوژیک و تغییرات آن‌ها در بیماری‌های مختلف نظیر بیماری‌های عصبی محدود می‌باشد. از این رو، هدف اصلی از انجام این مطالعه، بررسی تغییرات میزان MDA به عنوان یکی از شاخص‌های استرس اکسیداتیو و محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدی، در آستروگلیای انسانی تیمار شده با غلظت‌های مختلف سیالیک اسید بود. با این امید که بتوان گامی در جهت روشن شدن مکانیسم‌های بروز و پیش‌روی این دسته از بیماری‌ها برداشت.

روش‌ها

مواد: در این مطالعه، پودر سیالیک اسید (A0812)، آنتی‌بیوتیک‌های Pen-strep، Amphotericin A241 و تیوباربیتوریک اسید از شرکت Sigma، Fetal bovine serum (FBS) از شرکت Gibco و همچنین، محیط کشت سلولی Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)، آنزیم Trypsin/Ethylenediaminetetraacetic acid (Trypsin/EDTA) از شرکت Bio-idea و رده‌ی سلولی آستروگلیای انسانی از مؤسسه‌ی پاستور ایران (NCBI Code:C118) خریداری شدند.

کشت سلول: طی مطالعه‌ای پایه‌ای و تجربی (آزمایشگاهی)، به بررسی ارتباط بین میزان تولید MDA در حضور غلظت‌های مختلف سیالیک اسید پرداخته شد. رده‌ی سلولی مورد استفاده در این آزمایش، رده‌ی سلولی آستروگلیای انسانی (NCBI Code:C118) بود. سلول‌های مورد بررسی جزء سلول‌های چسبنده به سطح هستند.

رده‌ی سلولی مورد نظر در محیط کشت DMEM (Low glucose) و FBS ۱۰ درصد، استرپتومایسین، پنی‌سیلین و آمفوتریسین ۱ درصد در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، CO_2 ۵ درصد و میزان رطوبت ۹۵ درصد، در فلاسک‌های ۷۵ سی‌سی کشت و انکوبه شد. تعویض محیط سلول‌ها، هر ۳ روز یک بار انجام شد.

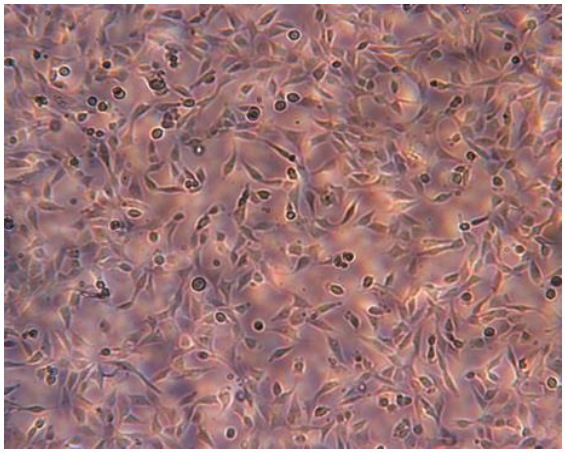
همچنین، جهت پاساژ سلولی، از آنزیم T rypsin/EDTA ۰/۰۱ درصد استفاده شد. در ادامه، شمارش سلولی انجام گرفت و تعداد مشخصی از سلول‌ها، به ازای هر پتری دیش با شعاع ۷ سانتی‌متر، ۳–۲/۵ میلیون سلول، جهت تیمار کردن گروه‌های مختلف با غلظت های ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر سیالیک اسید، در نظر گرفته شد. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم مناسب ۷۵ درصد، سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. جهت آماده‌سازی پودر سیالیک اسید، از محیط کشت DMEM به عنوان حلال استفاده گردید (۱۷). جهت تیمار سلول‌ها در بازه‌های زمانی مختلف ۳۰ دقیقه، ۱، ۶، ۱۲، ۱۶ و ۲۴ ساعت از غلظت ۲۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر سیالیک اسید استفاده شد. بعد از مدت زمان ۲۴ ساعت از تیمار سلول‌ها جهت بررسی میزان MDA محیط کشت سلول‌ها جمع‌آوری و برای اندازه‌گیری MDA استفاده شد. یک گروه سلولی تیمار شده با محیط DMEM فاقد سیالیک اسید نیز به عنوان شاهد مطالعه در نظر گرفته شد. همچنین، غلظت‌های مورد استفاده بر اساس تعیین میزان زیست‌پذیری سلول‌های تیمار شده با سیالیک اسید طبق مطالعات پیشین انجام شده توسط این گروه انتخاب گردید (۱۸). همچنین، آزمایش‌ها به صورت سه بار تکرار انجام شد.

اندازه‌گیری میزان MDA به روش TBA: اساس این روش، واکنش Thiobarbituric acid (TBA) با لیپیدهای پراکسیده می‌باشد. این اسید، مولکول‌های لیپیدی را در MDA می‌شکند و سپس، MDA با TBA واکنش می‌دهد و ترکیبی آزاد می‌شود که با روش اسپکتروفتومتری قابل اندازه‌گیری است. جهت اندازه‌گیری میزان MDA پس از گذشت مدت زمان ۲۴ ساعت تیمار سلول‌ها، محیط کشت رویی سلول‌ها جمع‌آوری شد. در ادامه، به ۴۵۰ میکرولیتر از محیط کشت جمع‌آوری شده، تری‌کلرواستیک اسید ۲۰ درصد اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دور g ۲۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. آن گاه، به محلول رویی، ۱۷۰ میکرولیتر از محلول TBA ۰/۱۲ مولار و تریس ۰/۲۶ مولار با pH معادل ۷، اضافه گردید و نمونه‌های مورد نظر در دمای ۱۰۰–۹۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. پس از آن، نمونه‌ها به سرعت سرد شدند و جذب نوری آن‌ها در طول موج ۵۳۲ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد (۱۹).

واکاوی آماری داده‌ها: در این مطالعه، داده‌ها وارد نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۴ (version 24, IBM Corporation, Armonk, NY) شدند و با استفاده از آزمون One-way ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey مورد واکاوی قرار گرفتند. نتایج بررسی آماری به صورت میانگین ± انحراف معیار ارایه شد و $P < ۰/۰۵۰$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

الف: کشت آستروگلیای انسانی: سلول‌های آستروگلیای انسانی در شرایط پیش‌گفته کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت، سلول‌ها با میکروسکوپ معکوس مورد ارزیابی قرار گرفتند. تصویر کشت این سلول‌ها بعد از ۲۴ ساعت در شکل ۱ آمده است.

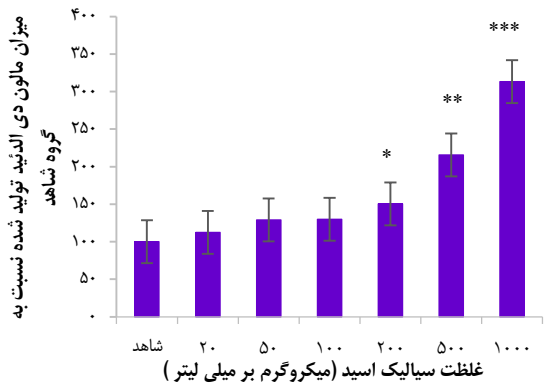


شکل ۱. سلول‌های آستروگلیای انسانی بعد از ۲۴ ساعت کشت سلولی (بزرگ‌نمایی ۱۰ ×)

ب- MDA تولید شده پس از تیمار با غلظت‌های مختلف سیالیک اسید: نتایج حاصل از تیمار آستروگلیای انسانی با غلظت‌های مختلف سیالیک اسید، روند افزایشی مقدار MDA را در تمامی غلظت‌ها نشان داده است، اما این افزایش مقدار در غلظت‌های ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر از سیالیک اسید در مقایسه با گروه شاهد از لحاظ آماری معنی‌دار بود. این افزایش در غلظت ۵۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر به بیش از دو برابر ($P^{**} < ۰/۰۱۰$) و در نهایت، در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر به بیش از سه برابر ($P^{***} < ۰/۰۰۱$) در مقایسه با گروه شاهد از لحاظ آماری رسید که می‌تواند ناشی از به هم خوردن تعادل سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی باشد (شکل ۲).

ج) میزان MDA تولید شده وابسته به زمان: میزان MDA تولید شده در تیمار سلول‌ها با غلظت ۲۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر سیالیک اسید در شرایط وابسته به زمان، در زمان‌های مختلف

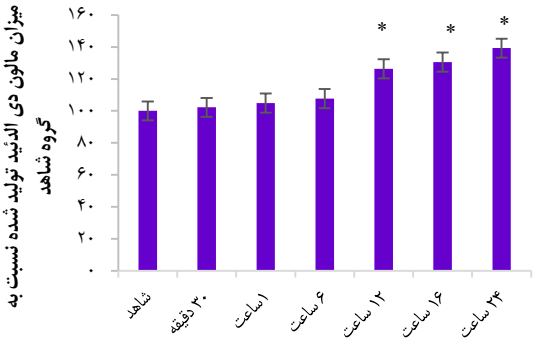
۳۰ دقیقه، ۱ و ۶ ساعت نسبت به گروه شاهد تغییر معنی‌داری نشان نداد، اما در زمان‌های ۱۲، ۱۶ و ۲۴ ساعت تیمار با سیالیک اسید در مقایسه با گروه شاهد مقدار تولید MDA افزایش معنی‌داری نشان داد ($P < ۰/۰۵۰$) که می‌تواند نشان دهنده‌ی افزایش پراکسیداسیون لیپیدی باشد (شکل ۳).



شکل ۲. تغییرات میزان Malondialdehyde (MDA) در آستروگلیای انسانی تیمار شده با سیالیک اسید. نتایج نشان داد که مقدار MDA در غلظت‌های مختلف ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر از سیالیک اسید، به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت ($P < ۰/۰۵۰$*)

بحث

در مطالعه‌ی حاضر، MDA به عنوان یکی از محصولات ناشی از پراکسیداسیون لیپیدی در محیط کشت آستروگلیا تیمار شده با سیالیک اسید اندازه‌گیری شد.



شکل ۳. تغییرات میزان Malondialdehyde (MDA) تولید شده در آستروسیت‌های تیمار شده با غلظت ۲۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر سیالیک اسید در زمان‌های ۳۰ دقیقه، ۱، ۶، ۱۲، ۱۶ و ۲۴ ساعت. واکاوی داده‌های حاصل نشان داد که در زمان‌های ۱۲، ۱۶ و ۲۴ ساعت، مقدار تولید MDA نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری یافت ($P < ۰/۰۵۰$*)

یافته‌های مطالعه‌ی حاضر نشان داد که میزان MDA در گروه‌های مختلف تحت تیمار با سیالیک اسید در مقایسه با گروه شاهد، افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد که می‌تواند شاهدی برای ایجاد استرس اکسیداتیو و در نتیجه، القای پراکسیداسیون لیپیدی در اثر افزایش غلظت سیالیک اسید باشد.

مطالعات متعددی نشان داده‌اند که سیالیک اسید، نقش‌های متعددی در اعمال سلولی در مغز ایفا می‌کند که از جمله‌ی آن‌ها، می‌توان به نقش در اتصال سلولی، متابولیسم آکسون و میلین، ثبات آکسون‌ها، بازسازی و تحریک پذیری سلول‌های عصبی، پلاستیسیتی و بلوغ مغز اشاره کرد. همچنین، مشخص شده است که میزان این قند نه کربنه در بیماری‌های نورودژنراتیو افزایش قابل ملاحظه‌ای دارد (۱). بررسی بافت هیپوکامپ افراد مبتلا به بیماری آلزایمر، افزایش بیان نشانگرهای نورودژنراتیو مانند CD33 یا PSA-NCAM را که از مشتقات سیالیک اسید می‌باشند، نشان می‌دهد که به نظر می‌رسد با شدت بیماری ارتباط مستقیمی دارد (۲۰).

تغییرات ترکیباتی که حاوی سیالیک اسید در ساختار خود می‌باشند، در سرطان و بیماری‌های التهابی و بعد از قرار گرفتن در معرض عوامل نورودژنراتیو مانند استرس، فلزات سنگین، اتانول و مواد مخدر مشخص شده است که به دنبال آن، عدم تعادل نوروترانسمیترها و التهاب عصبی ایجاد می‌شود (۲۲-۲۱، ۲).

نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر نشان داد در تیمار آستروگلیاها با غلظت ۵۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر از سیالیک اسید، میزان MDA تولید شده نسبت به گروه شاهد، افزایش چشم‌گیر دو برابری دارد و در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر، میزان آن به بیش از سه برابر در مقایسه با گروه شاهد رسید. اگر چه مکانیسم دقیق سمیت ناشی از چگونگی اثر سیالیک اسید بر افزایش MDA نامشخص می‌باشد، اما مطالعه‌ی حاضر نشان دهنده‌ی این امر است که سیالیک اسید با القای پراکسیداسیون لیپیدی، باعث افزایش تولید MDA شده است. این نتایج، هم‌راستا با پژوهش Palmer و Burns می‌باشد که به بررسی بیماری آلزایمر و ارتباط آن با استرس اکسیداتیو پرداختند و نشان دادند که مقادیر قابل توجهی از MDA که محصول پراکسیداسیون لیپید می‌باشد، در مغز افراد مبتلا به AD تولید می‌شود (۲۳).

تجمع پپتید آمیلوئید بتا و عدم تعادل در تولید و پاک‌سازی آن، از شاخصه‌های اصلی بیماری آلزایمر می‌باشد که این ترکیب، از طریق مهار آنزیم‌های اصلی میتوکندریایی مانند سیتوکروم C اکسیداز و آنزیم‌های کلیدی چرخه‌ی کربس مانند آلفا-کتوگلوتارات و پیروات دهیدروژناز، می‌تواند اثر سمی بر روی عملکرد میتوکندری‌ها داشته باشد که منجر به اختلال در مکانیسم انتقال الکترونی، ساخت آدنوزین تری‌فسفات (Adenosine triphosphate یا ATP) و متابولیسم

اکسیژن گردد. به دنبال این فرایندها، میزان رادیکال‌های آزاد سوپر اکسید و پراکسید هیدروژن افزایش می‌یابد و استرس اکسیداتیو ایجاد می‌گردد (۲۴). همچنین، با توجه به پژوهش‌های انجام شده، مشخص شده است که افزایش گانگلیوزیدها و پلی‌سیالیک اسید در مغز، می‌تواند یکی از چندین علل ایجاد اختلال در مسیرهای مولکولی گسترش بیماری‌های نورودژنراتیو مختلف باشد. در میان این عوامل متعدد، می‌توان به تأثیر احتمالی آن‌ها بر سیتوکاین‌ها، کیموکاین‌ها، پروستاگلاندین‌ها، Reactive oxygen species (ROS) و نیز از همه جالب‌تر MicroRNAs (miRs) اشاره کرد (۲۵).

یافته‌های مطالعه‌ی Sohn و همکاران با بررسی ارتباط بین گانگلیوزیدها و مرگ سلول‌های عصبی، نشان داد که افزایش گانگلیوزید GM3 باعث افزایش ROS و رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌گردد. در نهایت، گزارش کردند که گانگلیوزیدها با اثر احتمالی بر لیپواکسیژنازها و سیتوکروم و همچنین، با تأثیر احتمالی بر مسیر سیگنالینگ گوانوزین منوفسفات حلقوی (Cyclic guanosine monophosphate یا cGMP) مرگ سلول‌های عصبی را القا می‌کنند (۲۶).

تاکنون مطالعه‌ای در ارتباط با اثر سیالیک اسید و نقش آن در ایجاد استرس اکسیداتیو و تولید محصولات پراکسیداسیون لیپیدی انجام نگرفته است. بدین منظور، در مطالعه‌ی حاضر ارزیابی سطح MDA به عنوان یکی از محصولات ناشی از پراکسیداسیون لیپیدی و شاخص‌های استرس اکسیداتیو اندازه‌گیری شد. به طور کلی، در مطالعه‌ی حاضر، مشاهده شد زمانی که سلول‌ها در معرض دزهای مختلف سیالیک اسید قرار می‌گیرند، میزان MDA درون سلولی در غلظت‌های ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر از سیالیک اسید نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری نشان می‌دهد ($P < ۰/۰۰۱$***). همچنین، در غلظت ۲۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر سیالیک اسید در بازه‌های زمانی مختلف، در زمان‌های ۱۲، ۱۶ و ۲۴ ساعت میزان MDA در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی‌دار آماری نشان داد ($P < ۰/۰۵۰$).

بنابراین، با توجه به یافته‌های مطالعه‌ی حاضر احتمال می‌رود که حضور سیالیک اسید با القای تولید هر چه بیشتر سیتوکاین‌ها و سایر مولکول‌های التهابی، موجب نفوذپذیری هر چه بیشتر غشای سلول‌های عصبی شود؛ همان‌گونه که افزایش گانگلیوزیدها و پلی‌سیالیک‌ها، سبب سمیت عصبی و باعث به هم خوردن سیستم اکسیداتیو می‌شود. البته، برای اثبات این فرضیات پژوهش‌های بیشتر و مطالعه‌ی مسیرهای سیگنالینگ درگیر در فرایندهای التهابی ضروری می‌باشد که مطابق با مطالعه‌ی حاضر، افزایش میزان سیالیک اسید می‌تواند این مسیرها را فعال کند و در نهایت، تولید MDA افزایش می‌یابد.

در مطالعه‌ی مرتبطی، سیالیته شدن آمیلوئید بتا توسط گانگلیوزیدها، مشاهده شد تشکیل پلاک‌های آمیلوئیدی و آمیلوئیدوژنسیس افزایش و در نتیجه، پاک‌سازی و تجزیه‌ی آمیلوئید بتا کاهش می‌یابد و همان‌گونه که این تجمع و عدم پاک‌سازی آمیلوئید بتا با التهاب همراه می‌باشد (۲۷)، می‌تواند سبب اختلال در زنجیره‌ی انتقال الکترونی، تولید ATP و متابولیسم اکسیژن گردد. یافته‌های مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که احتمال می‌رود سیالیک اسید با بر هم زدن تعادل سیستم‌های اکسیداتیو/آنتی‌اکسیداتیو، موجب افزایش استرس اکسیداتیو شود و که این افزایش، یکی از شاخص‌های بیماری‌های نورودژنراتیو می‌باشد. هر چند که نقش‌های سیالیک اسید و اثرات آن بر مکانیسم‌های داخل سلولی و چگونگی افزایش MDA، نیاز به مطالعات بیشتری دارد. پیشنهاد می‌شود کنترل سطوح سیالیک اسید و یا گانگلیوزیدها، می‌تواند روش درمانی قوی در انواع بیماری‌های نورودژنراتیو باشد. هر چند بررسی میزان و اثرات سیالیک اسید در شناخت این بیماری‌ها که همچنان ناشناخته‌اند، مفید خواهد بود.

تشکر و قدردانی

این مقاله‌ی پژوهشی، بخشی از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی با شماره‌ی طرح CMRC-9703 و کد اخلاق IR.AJUMS.REC.1397.127 می‌باشد که با حمایت مالی کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی و معاونت توسعه‌ی پژوهش و فن‌آوری تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز در گروه بیوشیمی بالینی دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی اهواز انجام شده است. از همه‌ی کسانی که در انجام این طرح همکاری نمودند، سپاسگزاری می‌گردد.

References

1. Wang B, Brand-Miller J. The role and potential of sialic acid in human nutrition. Eur J Clin Nutr 2003; 57(11): 1351-69.
2. 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.
3. Rahmann H. Brain gangliosides and memory formation. Behav Brain Res 1995; 66(1): 105-16.
4. Guzel M, Kontas Askar T, Kay G, Atakisi E, Avci G. Serum sialic acids, total antioxidant capacity, and adenosine deaminase activity in cattle with theileriosis and anaplasmosis. Bull Vet Inst Pulawy 2008; 52(2): 227-30.
5. Citil M, Gunes V, Karapehlivan M, Atalan G, Marasli S. Evaluation of serum sialic acid as an inflammation marker in cattle with traumatic reticulo

peritonitis. Rev Med Vet 2004; 155(7): 389-92.
6. Yapar K, Kart A, Karapehlivan M, Citil M. Dose-dependent effects of L-carnitine on blood sialic acid, MDA and GSH concentrations in BALB/c mice. Acta Vet 2007; 57(4): 321-7.
7. Davignon J, Jacob RF, Mason RP. The antioxidant effects of statins. Coron Artery Dis 2004; 15(5): 251-8.
8. Martin MG, Perga S, Trovo L, Rasola A, Holm P, Rantamaki T, et al. Cholesterol loss enhances TrkB signaling in hippocampal neurons aging in vitro. Mol Biol Cell 2008; 19(5): 2101-12.
9. Nazeri Z, Azizidoost S, Cheraghzadeh M, Sepiani B, Kheirollah A. The effect of 24-hydroxy cholesterol on production of reactive oxygen species (ROS) in cultured astrocytes treated by beta amyloid. J Isfahan Med Sch 2018; 36(482): 607-13. [In Persian].
10. Rosen P, Du X, Tschope D. Role of oxygen derived radicals for vascular dysfunction in the diabetic heart: prevention by alpha-tocopherol? Mol Cell Biochem 1998; 188(1-2): 103-11.
11. Greilberger J, Koidl C, Greilberger M, Lamprecht M, Schroecksnadel K, Leblhuber F, et al. Malondialdehyde, carbonyl proteins and albumin-disulphide as useful oxidative markers in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. Free Radic Res 2008; 42(7): 633-8.
12. Perry G, Wang X, Smith M, Zhu X. Mitochondrial abnormalities in alzheimer disease. Microscopy and Microanalysis Microsc Microanal 2011; 17(S2): 200-1.
13. Nedeljkovic ZS, Gokce N, Loscalzo J. Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction. Postgrad Med J 2003; 79(930): 195-9.
14. Engin KN, Yemisci B, Yigit U, Agachan A, Coskun C. Variability of serum oxidative stress biomarkers relative to biochemical data and clinical parameters of glaucoma patients. Mol Vis 2010; 16: 1260-71.
15. Strzyzewski KW, Piorunska-Stolzmann M, Majewski W, Kasprzak M, Strzyzewski W. Effect of surgical treatment on lipid peroxidation parameters and antioxidant status in the serum of patients with peripheral arterial disease. Dis Markers 2013; 35(6): 647-52.
16. Tug T, Karatas F, Terzi SM. Antioxidant vitamins (A, C and E) and malondialdehyde levels in acute exacerbation and stable periods of patients with chronic obstructive pulmonary disease. Clin Invest Med 2004; 27(3): 123-8.
17. 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.
18. 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. [In Persian].
19. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol 1978; 52: 302-10.
20. Varki A, Gagneux P. Multifarious roles of sialic acids in immunity. Ann N Y Acad Sci 2012; 1253: 16-36.
21. Sawada M. Neuroprotective and toxic changes in microglia in neurodegenerative disease. Parkinsonism Relat Disord 2009; 15(Suppl 1): S39-S41.
22. Schauer R. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interactions. Curr Opin Struct Biol 2009; 19(5): 507-14.
23. Palmer AM, Burns MA. Selective increase in lipid peroxidation in the inferior temporal cortex in Alzheimer's disease. Brain Res 1994; 645(1-2): 338-42.
24. Babri S, Mohaddes G, Feizi I, Mohammadnia A, Niapour A, Alihemmati A, et al. Effect of troxerutin on synaptic plasticity of hippocampal dentate gyrus neurons in a beta-amyloid model of Alzheimers disease: an electrophysiological study. Eur J Pharmacol 2014; 732: 19-25.
25. Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O. Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. Neuroscience 2009; 158(3): 1021-9.
26. Sohn H, Kim YS, Kim HT, Kim CH, Cho EW, Kang HY, et al. Ganglioside GM3 is involved in neuronal cell death. FASEB J 2006; 20(8): 1248-50.
27. Yanagisawa K, Odaka A, Suzuki N, Ihara Y. GM1 ganglioside-bound amyloid beta-protein (A beta): a possible form of preamyloid in Alzheimer's disease. Nat Med 1995; 1(10): 1062-6.

DOI: 10.22122/jims.v37i520.11536 Published by Vesnu Publications

Journal of Isfahan Medical School Vol. 37, No. 520, 4th Week, May 2019

Received: 11.04.2018 Accepted: 10.05.2019 Published: 12.05.2019

Evaluating the Level of Malondialdehyde (MDA) in Sialic Acid-Treated Human Astroglia

Rahim Moradi[1], Zahra Nazeri[1], Shirin Azizidoost[2], Maryam Cheraghzadeh[3], Alireza Kheirollah[4]

Original Article

Abstract

Background: Sialic acid (SA) is presented in all cells membrane of vertebrates, and its level in the human brain is much higher than other body tissues. Studies have shown that, in addition to oxidative stress, increasing the amount of SA can also lead to the development of neurological diseases including Alzheimer's disease. Therefore, the present study was designed to evaluate the effect of SA on malondialdehyde (MDA) production levels, as a lipid peroxidation product, in human astroglia.

Methods: The human astroglias were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) with 10% fetal bovine serum (FBS), and cells were treated with different doses of SA. MDA was measured using thiobarbituric acid (TBA) protocol, and the results were analyzed using SPSS software.

Findings: The production of MDA in treated cells with 200, 500, and 1000 µg/ml of SA significantly increased compared to the control group. It also significantly increased when the cells were treated with 200 µg/ml of SA at 12, 16, and 24 hours incubation.

Conclusion: Many studies have been conducted on neurological disorders; however their mechanism of occurrence has not yet been fully elucidated. With regard to the role of SA in inflammation, our results suggest that SA can cause pathological conditions and oxidative stress followed by MDA elevation; which is effective in the development of neurological disorders like Alzheimer's. The role of SA and its effects need further studies.

Keywords: Sialic acid, Oxidative stress, Malondialdehyde, Human, Astroglia

Citation: Moradi R, Nazeri Z, Azizidoost S, Cheraghzadeh M, Kheirollah A. **Evaluating the Level of Malondialdehyde (MDA) in Sialic Acid-Treated Human Astroglia.** J Isfahan Med Sch 2019; 37(520): 263-9.

1- MSc Student, 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- Assistant Professor, Department of Biochemistry, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
4- 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