اثر آلومینیوم بررشد سلولهای آستروسیت جنین انسان در محیط کشت و بیان ژنهای درگیردرآپوپتوز

نجمه امینی زاده *[۱]، سعید رجبعلیان[۲]، رفعت حسین[۳]

۱) کارشناس ارشد علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکیو عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد کرمان

۲) کارشناس ارشد بیولوژی سلولی و ملکولی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

۳) کارشناس میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

تاریخ دریافت:۸۶/۸/۸ **تاریخ پذیرش:۸۷/٤/۱۲**

چکیده

مقدمه: آلومینیوم به لحاظ فراوانی سومین عنصر کره زمین است. این عنصر در بعضی بیماریهای دژنره شدن سیستم عصبی مانند آلزایمر نقش دارد.در مطالعه حاضر ما اثر آلومینیوم بر سلولهای آستروسیت جنین انسان را بررسی کردیم.

*مواد و روش ها:*در این مطالعه تجربی اثرات مجاورت باغلظتهای مختلف آلومینیوم به مدت۳، ۹ و۱۲ روز بر رشد آستروسیتها با روش سنجش MTT بررسی شد. سپس اثر آلومینیوم بر بیان ژنهای درگیر در خودکشی سلولی با روش ایمنو سیتوشیمی (ICC) ارزیابی گردید. نتایج توسط نرم افزار آماری Stata مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته های پژوهش: نتایج نشان داد که آلومینیوم با غلظت یک و یک و نیم میلی مولار در مدت ۳ روز سبب کاهش رشد سلولهای آستروسیت شد(به ترتیب$P<۰/۰۱$ و $P<۰/۰۳$)، اما در غلظتهای کمتر (۱۰۰ و۵۰۰ میکرومولار) برای ایجاد سمیت ، به زمان مجاورت بیشتری نیاز بود. (۹ روز برای غلظت ۵۰۰ و۱۲ روز برای غلظت ۱۰۰ میکرومولار) ($P=۰/۰۰۰$). آلومینیوم بیان ژنهای درگیر در خودکشی سلولی را تغییر نداد.

بحث و نتیجه گیری: آلومینیوم در مجاورت طولانی مدت حتی در غلظتهای کم نیز برای سلولهای آستروسیت جنین انسان سمی است ولی به نظرمی رسد بیان ژنهای درگیر در خودکشی سلولی را تغییر نمی دهد.

واژه های کلیدی: آلومینیوم، سمیت سلولی، آستروسیت، جنین انسان

***نویسنده مسئول:** کارشناس ارشد علوم تشریحی ، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

E-mail: Najmeh_aminizade@yahoo.com

مقدمه

آلومینیوم به لحاظ فراوانی سومین عنصر کره زمین است که ۸ درصد آن را تشکیل می دهد. با اینکه عملکرد بیولوژیک شناخته شده ای ندارد، مرتباً از طریق خاک، آب(در موارد تصفیه آب با ترکیبات آلومینیوم) غذاها و داروها وارد بدن موجودات زنده می شود،(۴،۳،۲،۱). آلومینیوم برای سیستم اسکلتی، هماتولوژی و عصبی سمی است،(۵). اگرچه سد خونی مغزی مانع ورود آلومینیوم به مغز می شود، قرار گرفتن در معرض مقادیر زیاد آلومینیوم یا افزایش غلظت سرمی آلومینیوم به دلیل نارسایی عملکرد کلیه ممکن است به تجمع آلومینیوم در مغز منجر شود، به علاوه با افزایش سن نیز آلومینیوم در مغز تجمع می یابد(۶)، زیرا نیمه عمر آن بالا است،(۹،۸،۷). تخمین زده می شود که هر ساله ۶ میکروگرم آلومینیوم در مغز رسوب کند،(۱۰). در حیوانات آزمایشگاهی قرار گرفتن در معرض آلومینیوم علائم کلینکی و پاتولوژی شبیه آلزایمر ایجاد می کند،(۱۲،۱۱). مطالعات اپیدمیولوژیک هم نشان داده اند بین افزایش مقدار آلومینیوم آب آشامیدنی و بیماری آلزایمر ارتباط وجود دارد،(۱۳).

در مورد اثرات نوروتوکسیک آلومینیوم، بررسی ها و تحقیقات زیادی انجام شده است و اغلب به اثرات آن بر نورونها توجه شده است، ولی یافته های اخیر نشان می دهد که هدف اولیه عملکرد سمی آلومینیوم آستروسیتها هستند،(۱۴،۱۵،۱۶،۱۷). این سلولها نقش مهمی در بقا و عملکرد نورونها دارند(۱۸) و در تعدادی از بیماریهای دژنراتیو سیستم عصبی نیز نقش دارند،(۱۹). نتایج تحقیقات انجام شده در مورد اثر آلومینیوم بر سلولهای آستروسیت متناقض است. بعضی نتایج اذعان دارند که آلومینیوم تغییری معنی دار در مرفولوژی و بقای آنها ایجاد نمی کند،(۲۰). در حالیکه در بعضی مطالعات نشان داده شده است که آلومینیوم سبب ایجاد تغییرات زیادی در مرفولوژی و بقای این سلولها می شود،(۱۷). به علاوه تا کنون در مورد اثر آلومینیوم بر سلولهای آستروسیت انسانی هیچ مطالعه ای انجام نشده است. هدف ما در این تحقیق بررسی اثر آلومینیوم بر رشد و تکثیر سلولهای آستروسیت جنین انسانی بود و اینکه آیا اثر آلومینیوم بر سلولهای آستروسیت انسانی با دیگر گونه ها متفاوت است.

برای بررسی اثر آلومینیوم باید در جمعیت سلولی که در معرض آلومینیوم قرار داده شده، بقاء سلولی محاسبه شود، به این منظور از روشهای مختلفی استفاده می شود:

از جمله بررسی فعالیت آنزیم LDH (Lactate dehydrogenase)(۲۱) استفاده از Quick cell proliferation assay kit (۲۲) و استفاده از روش سنجش MTT(۱۶).

بخشی از اثرات مخرب ترکیبات شیمیایی از جمله فلزات سنگین از طریق افزایش یا کاهش پروتیئنهای درگیر در خودکشی سلولی(آپوپتوز) اعمال می شود،(۲۳). آلومینیوم در نورونها سبب افزایش بیان ژن caspase3 و bax و کاهش بیان bcl2 می شود،(۲۴). تزریق آلومینیوم به مغز خرگوش نیز سبب القاء آزاد شدن سیتوکروم C از میتوکندری، کاهش مقدار bcl2 در میتوکندری و شبکه اندوپلاسمیک، انتقال bax به میتوکندری، فعال شدن caspase3 و قطعه قطعه شدن DNA می شود،(۲۵).

اثر آلومینیوم بر بیان ژنهای درگیر در خودکشی سلولی در سلولهای آستروسیت بررسی نشده است. هدف دیگر ما در این تحقیق بررسی اثر آلومینیوم بر بیان ژنهای p53,Activated caspase3,bcl2,bax بوده است.

مواد و روش ها

کیت ایمونوپراکسیداز و آنتی بادی های مونوکلونال از کمپانی DAKO دانمارک خریداری شد. محیط کشت (Dulbeco's modified DMEM/F12 Eaggle medium: nutrient mixture F-12)، کلرید آلومینیوم، تریپسین و MTT از کمپانی Sigma آمریکا خریداری شد. فلاسک کشت سلول، پلیتهای ۹۶ خانه ای، پلیتهای ۳۵ میلیمتری و لوله های سانتریفوژ از کمپانی NuNc و FaLcon دانمارک تهیه شد. سرم جنین گاوی (Fcs) از کمپانی serumed آلمان خریداری شد. سلولهای آستروسیت از مغز جنین ۱۴ هفته ای انسان تهیه شد،(۲۶). جنین با همکاری بخش زنان و زایمان و اتاق عمل بیمارستان افضلی پور کرمان و با

رضایت نامه کتبی والدین تهیه گردید. به دلیل نارسایی قلبی مادر، سقط درمانی انجام شد.

کشت سلولهای آستروسیت مغز جنین انسان: این مطالعه به روش تجربی در آزمایشگاه کشت سلول مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان انجام شد. جنین در PBS(Phosphate buffered saline) استریل سریعاً به آزمایشگاه منتقل شد. استخوان جمجمه پس از شستشو با الکل ۷۰ درصد برش داده شد. قطعه مناسبی از لوب قدامی مغز در لوله های سانتریفوژ ۵۰ میلی لیتری حاوی ۲۰ میلی لیتر محلول تریپسین ۰/۲ درصد، EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid) ۰/۰۴ درصد به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد،(۲۷). پس از هضم بافت و شستشو، سلولها در محیط کشت DMEM/F12 حاوی ۱۰ درصد FCS (fetal calf serum)،۱۰۰ میکروگرم درمیلی لیتر استرپتومایسین، ۱۰۰ واحد در میلی لیتر پنی سیلین (محیط کشت کامل) و ۵ درصد سرم اسب، در فلاسکهای ۷۵ و ۲۵ سانتی متر در اتمسفر مرطوب در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد دارای ۵ درصد دی اکسید کربن انکوبه شدند. بعد از اینکه سلولها بیش از ۸۰ درصد سطح فلاسک را پوشاندند، کشتها به فلاسکهای جدید واکشت شدند. سلولها پس از واکشت دوم در محیط کشت حاوی ۱۰ درصد DMSO(dimethylsulfoxide) در ویالهای متعدد در ازت مایع ذخیره شدند،(۲۷).

مجاورت سلولها با آلومینیوم: ابتدا سوسپانسیونهای سلولی معادل صد هزار سلول در میلی لیتر در محیط کشت حاوی ۱۰ درصد FCS تهیه شد. ۰/۱(یک دهم) میلی لیتر از سوسپانسیونها به چاهکهای پلیتهای ۹۶ خانه ای افزوده شد و پلیتها به مدت یک شب انکوبه شدند. درون چاهکهای حاشیه پلیت آب مقطر استریل ریخته شد. به محض پایان انکوباسیون رقتهای ۳۰ میکرومولار تا چهار و نیم میلی مولار کلرید آلومینیوم در محیط کشت DMEM/F12 حاوی ۱۰ درصد FCS تهیه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از هر رقت به شش چاهک مربوطه وارد شد. کشت سلول در محیط کشت فاقد آلومینیوم حاوی ده درصد FCS به عنوان کنترل رشد و تکثیر سلول در نظر گرفته شد. مجاورت سلولها با آلومینیوم به مدت ۳ ، ۹ و۱۲ روز ادامه یافت. در موارد مجاورت بیش از ۳ روز هر ۷۲ ساعت یک بار محیط کشت کهنه تخلیه و محیط کشت جدید افزوده شد. تمامی مراحل آزمون سه مرتبه تکرار گردید.

تعیین رشد و تکثیر سلول: رشد و تکثیر سلولها و سمیت سلولی آلومینیوم به روش سجش MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) بررسی شد،(۱۶). بدین منظور پس از پایان انکوباسیون، ۳۰ میکرولیتر محلول MTT (۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر PBS) به تمامی چاهکها افزوده شده و پلیت به مدت دو ساعت دیگر انکوبه گردید. در پایان پس از تخلیه آرام محیط کشت، کریستالهای رنگ فورمازان راسب شده در سیتوپلاسم سلولها با افزودن ۱۰۰ میکرو لیتر DMSO به هر چاهک حل شد. شدت رنگ با دستگاه ثبت الیزا در طول موج ۴۹۲ نانومتر و رفرانس ۶۳۰ نانومتر ثبت گردید.

پردازش داده ها وآنالیزآماری: داده ها به وسیله آزمون میانگین درصدها در چند گروه(آنالیز واریانس یکطرفه) تجزیه و تحلیل شدند. برای مشخص نمودن گروههایی که سبب معنی دار شدن گردیده اند از آزمون Post Hoc (Bonferroni) استفاده شد. نتایج به صورت $mean \pm S.D.$ گزارش شده و با $p<۰/۰۵$ معنی دار در نظر گرفته شد. آنالیز آماری به وسیله نرم افزار Stata انجام شد. درصد رشد سلول نسبت به کنترل با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد} = \frac{\text{شدت جذب در مجاورت آلومینیوم}}{\text{شدت جذب در گروه کنترل}} \times ۱۰۰$$

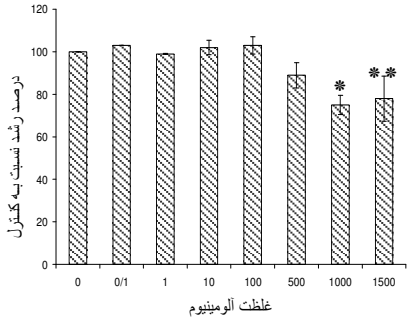
بررسی ایمنوسیتوشیمی: تاثیر آلومینیوم برالگوی بیان ژنهای ActivatedCaspase-3,P53,bcl2,bax درکشت سلولهای آستروسیت به روش ایمونوسیتوشیمی بررسی شد. همچنین درصد حضور سلولهای آستروسیت در کشتهای سلولی با روش فوق تعیین شد. ابتدا سوسپانسیون سلولی معادل ۱۰۰/۰۰۰ سلول در میلی لیتر در محیط کشت DMEM/F12 حاوی ده درصد FCS و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر استرپتومایسین و ۱۰۰ واحد در میلی لیتر پنی سیلین تهیه شد. سپس یک

دهم میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی در مرکز پلیتهای ۳۵ میلی متری ریخته شد. (مرکز پلیتها با دایره به قطره یک سانتی متر در پشت آنها مشخص شد). پلیتها در بطریهای ۶۰ میلی متری استریل حاوی آب مقطر استریل به مدت ۲۴ ساعت در شرایط استاندارد انکوبه شدند. به محض پایان انکوباسیون، محیط کشت پلیت ها تخلیه شده و یک و نیم میلی لیتر محیط کشت DMEM/F12 کامل حاوی ۰/۰۱ و ۰/۱ و ۱ و ۱۰ میکرومولار آلومینیوم به هر پلیت افزوده شد. محیط کشت تعدادی از پلیتها (به عنوان گروه کنترل) با محیط کشت DMEM/F12 کامل تعویض شد. پلیتها به مدت ۷۲ ساعت در شرایط استاندارد انکوبه شدند، سپس لایه سلولی پس از شستشو با PBS، با متانول سرد حاوی سه درصد استون به مدت ده دقیقه فیکس شد. در ادامه جهت افزایش نفوذ پذیری غشاهای سلولی، اسمیرهای سلولی با تریتون ۰/۲ درصد به مدت ۱۰ دقیقه پوشانده شدند. در هر مرحله شستشو با PBS انجام شد. سپس اسمیرسلولی با آلبومین سرم گاوی (BSA) دو درصد به مدت ۱۰ دقیقه پوشانده شد. درادامه پس از برداشتن BSA(bovine serum albumine)، اسمیرهای سلولی با یکی از آنتی بادیهای مونوکلونال bax (رقت ۱به ۱۵۰) ,Activated Caspase (۱ به ۵۰۰)، bcl2(۱به ۵۰)، p53(۱به ۵۰) یا پلی کلونال GFAP(۱به ۵۰) به مدت یک شب در چهار درجه سانتیگراد انکوبه شدند به عنوان کنترل منفی، لایه سلولی به جای انکوباسیون با آنتی بادی اختصاصی اولیه با PBS انکوبه شد. در پایان رنگ آمیزی ویژه ایمونوسیتوشیمی با روش Avidin–Biotin Complex Immuno Peroxidase طبق دستورالعمل کارخانه سازنده کیت انجام شد. تمامی مراحل آزمون سه بار تکرار شد و در هر مرتبه نتایج به صورت تصاویر میکروسکپی جمع آوری گردید.

یافته های پژوهش

اثر آلومینیوم بررشد وتکثیر آستروسیتها: درصد رشد سلولهای آستروسیت که به مدت ۳ روز در مجاورت غلظتهای مختلف آلومینوم قرار گرفته بودند در مقایسه با گروه کنترل محاسبه و در نمودار ۱ نشان داده شده است. غلظتهای کمتر از ۱۰۰۰ میکرومولار آلومینیوم بر رشد سلولهای آستروسیت تاثیری نداشت. اماغلظتهای ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکرومولار آلومینوم به ترتیب کاهش رشد معادل ۲۵ و ۲۲ درصد ایجاد کرد، که این کاهش رشد از نظر آماری معنی دار است،(به ترتیب P<0.01 و P<0.03). غلظتهای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار آلومینیوم در ۹ روز مجاورت با سلولهای آستروسیت کاهش رشد معادل ۵۷ و ۶۴ درصد ایجاد کرد. غلظتهای کمتر از ۵۰۰ میکرومولار بر رشد سلولهای آستروسیت تاثیر نداشت.

نمودار ۱



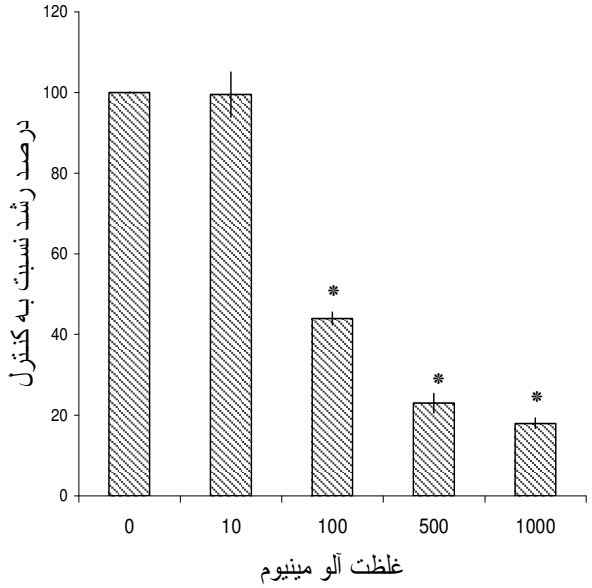
نمودار شماره ۱. اثر مجاورت ۳ روزه غلظتهای مختلف آلومینیوم بر رشد سلولهای آستروسیت: نتایج به صورت $mean \pm S.D$ درصد رشد نسبت به کنترل ارائه شده است. غلظتهای ۱۰۰۰و۱۵۰۰ آلومینیوم سبب کاهش رشد معنی دار سلولهای آستروسیت می شود. غلظتهای کمتر از ۱۰۰۰ رشد سلولهای آستروسیت را بطور معنی دار تغییر نمی دهد.

P<0.01*

P<0.03 **

نتایج مربوط به درصد رشد سلولهایی که به مدت ۱۲ روز در مجاورت غلظتهای مختلف آلومینیوم قرار گرفتند، در نمودار ۲ نشان داده شده است. غلظتهای کمتر از ۱۰۰میکرومولار بر رشد سلولهای آستروسیت تاثیر نداشت. غلظت ۱۰۰ میکرومولار کاهش رشد معادل ۵۶ درصد، غلظت۵۰۰ میکرومولار ۷۷ درصد و غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار ۸۲ درصد کاهش رشد ایجاد کرد. این نتایج از نظر آماری معنی دار است،(P=0.000).

نمودار ۲



نمودار شماره ۲. اثر مجاورت ۱۲ روزه غلظتهای مختلف آلومینیوم بر رشد سلولهای آستروسیت: نتایج به صورت $mean \pm S.D$ درصد رشد نسبت به کنترل ارائه شده است .غلظتهای۵۰۰،۱۰۰ و ۱۰۰۰ آلومینیوم سبب کاهش رشد معنی دار سلولهای آستروسیت می شود. اما غلظتهای کمتر از ۱۰۰ در مقایسه با گروه کنترل رشد سلولها را به طور معنی دار تغییر نمی دهد.

P=0.000 *

ماهیت کشت های سلولی: مطالعه ایمونوسیتوشیمی حضور پروتئین GFAP (fibrillary Glial acidic protein)- جزء اصلی اسکلت سلولی آستروسیتها- را در سیتوپلاسم بیش از ۹۰ درصد از سلولها در پاساژ دوم نشان داد. در کشت کنترل منفی که به جای آنتی بادی GFAP با PBS انکوبه شده بود رنگ اختصاصی مشاهده نشد.

اثر آلومینیوم بر بیان ژنها: حضور پروتینهای Bax،Bcl2،P53 و Activated Caspase3 در سلولهای آستروسیت با روش ایمنوسیتوشیمی بررسی شد. نتایج رنگ آمیزی در غلظتهای مختلف در مورد همه پروتئینهای مورد بررسی، مشابه کشت های کنترل(بدون آلومینیوم) بود.

بحث و نتیجه گیری

نتایج ما برای اولین بار نشان داد که آلومینیوم سبب دژنره شدن وسیع سلولهای آستروسیت جنین انسان می شود. غلظتهای۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکرومولار آلومینیوم پس از ۳ روز مجاورت با سلولهای آستروسیت، رشد این سلولها را حدود ۲۵ درصد کاهش داد که این تغییر در مقایسه با گروه کنترل معنی دار بود، اما در غلظتهای پایین تر کاهش معنی داری در رشد آستروسیتها ایجاد نشد. هماهنگ با این نتایج، Sass و همکارانش گزارش دادند که غلظت ۱۰۰ میکرومولار آلومینیوم پس از ۳ روز مجاورت تغییر در مورفولوژی و بقاء سلولهای آستروسیت ندارد،(۲۰). David و همکارانش نیز نشان دادند که مجاورت سلولهای آستروسیت با غلظت ۱۰۰ میکرومولار آلومینیوم به مدت ۲ روز تغییری در بقاء این سلولها ایجاد نمی کند،(۲۲).

در تحقیق حاضر، ۹ روز مجاورت با غلظت ۵۰۰ میکرومولار آلومینیوم، رشد سلولهای آستروسیت را ۵۷ درصد و با غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار ۶۴ درصد کاهش داد، در ۱۲ روز مجاورت با غلظت ۱۰۰، رشد آستروسیتها ۵۶ درصد، غلظت ۵۰۰، ۷۷ درصد و غلظت ۱۰۰۰، ۸۲ درصد کاهش یافت. در حالیکه در مطالعه ای که توسط آقای Suarez–Fernandez و همکارانش انجام شد، غلظت ۱۰۰۰ میکرومولار آلومینیوم بعد از ۱۸ روز مجاورت رشد سلولهای آستروسیت رت را ۵۰ درصد کاهش داد،(۱۷). به نظر می رسد حساسیت سلولهای آستروسیت جنین انسان به آلومینیوم بسیار بیشتر از سلولهای آستروسیت رت است. نتایج تحقیق حاضر نشان می دهد که آلومینیوم بیان ژنهای درگیردر آپوپتوز , P53,Activated Caspase3 bax,bcl2 را در سلولهای آستروسیت تغییر نمی دهد. قبلا در مورد اثر آلومینیوم بربیان این ژنها در سلولهای آستروسیت مطالعه ای انجام نشده، اما در مورد اینکه مرگ سلولهای آستروسیت در نتیجه اثر آلومینیوم به روش نکروز است یا آپوپتوز اختلاف نظر وجود دارد.

Deloncle و همکاران با بررسیهای فراساختاری سلولهای آستروسیت رت هایی که روزانه به صورت زیر جلدی (S.C) آلومینیوم دریافت کرده بودند، نشان دادند که این سلولها دچار نکروز شده اند،(واکوئوله بودن آستروسیتها، سیتوپلاسم ائوزینوفیل، ظاهر متورم و محدوده سلولی نامشخص)(۲۸). Norenberg و همکاران نشان دادند که آلومینیوم در محیط کشت نیز سبب تورم آستروسیتها و اکوئوله شدن سیتوپلاسم آنها می شود،(۲۹). Niu و همکاران نیز در مجاورت سلولهای آستروسیت با آلومینیوم علائم آپوپتوز را مشاهده نکردند،(۳۰). اما نتایج Suarez –Fernandez و همکاران نشان داد که آلومینیوم سبب القاء مرگ در آستروسیتها از طریق آپوپتوز می شود،(۱۷) و نیز GUO و Liang نشان دادند مجاورت آستروسیتها با غلظت ۴۰۰ میکرومولار آلومینیوم به مدت ۶ روز سبب القاء آپوپتوز در سلولهای آستروسیت می شود،(۳۱).

به هر حال بر اساس تحقیق حاضر به نظر می رسد مکانیسم سمیت آلومینیوم در سلولهای آستروسیت، تغییر بیان ژنهای آپوپتوتیک نیست. مکانیسم عملکرد آلومینیوم ممکن است از طریق گسسته شدن سیستم سیتواسکلتی(۳۲)، مهار پروتئولیزیس(۳۳)، واکنش با گروههای فسفات و کربوکسیلات(۳۴)، و اختلال در مسیرهای تنظیمی متکی بر فسفریله شدن پروتئین اعمال شود. آلومینیوم همچنین ممکن است سبب تغییر در خصوصیات غشاء شود،(۳۵). در رابطه با مکانیسم عملکرد آن در سلولهای آستروسیت نیاز به انجام مطالعات بیشتر است.

آلومینیوم در مجاورت طولانی مدت حتی در غلظتهای کم نیز برای سلولهای آستروسیت جنین انسان سمی است، که با توجه به بالابودن نیمه عمر آلومینیوم و قابلیت تجمع آن در مغز(۹،۷،۸) قابل ملاحظه است. آلومینیوم بیان ژنهای درگیر در خودکشی سلولی را تغییر نمی دهد.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان انجام شده است. به این وسیله از اعضاء محترم شورای پژوهشی آن مرکز که امکان انجام آن را فراهم نمودند، تشکر به عمل می آید.

References

1-Crapper Mclachlan DR .Aluminum & Alzheimer's disease. Neurobiol Aging,1986;7:525-32.
2-Kleber C J , Putt M S. Aluminum and dental carries.A review of the literature. Clin. Prev. Dent., 1984; 6:14-25.
3-Alfrey A C, Gary R, Legendre G R , Kaehny W D. The dialysis encephalopathy syndrome. Possible Aluminum intoxication. N. Engl .J.Med. 1976; 294:184-8.
4-Crapper D R , Krishnan S S, Dalton A J. Brain aluminum distribution in Alzheimer's disease & specially neurofibrillary degeneration. Science, 1973; 180: 511-51.
5-ALfrey A C. Aluminum intoxication recognition& treatment. In. Nicolini M, Zatta P, Corain B (Eds). Aluminum in Chemistry. Biology &medicine, Raven Press, New york , 1991:73-8.
6-Dermott M C , Smith J R, Igbai A I , Wisniewski k. Brain aluminum in aging Alzheimer disease. Neurology 1979; 29:809-840.
7-Boni DE, Scott J, Crapper DR. Intra cellular Aluminum binding, a histochemistry study. Histo chem, 1974; l40: 31-37.
8- Priest N D, Newton D, Day J P, Talbot R J, Warner AJ. Human metabolism of aluminum-26 and gallium-67 injected as citrates. Human Exp. Toxicol,1995;14:287–93.
9-Uemura E, Minachi M, lartius R. Enhanced neuritis growth in cultured neuroblastoma cells exposed to aluminum. Neuro sci, lett., 1992; 142: 171-174.
10-Edwardson J. Aluminum in chemistry, Biology& medicine . Raven press, New york, 1991: 80-85.
11-Ramakrishna T ,Vatsala S ,Shobi V, et al. Betaine reverses the toxic effects of Al: implications in Alzheimer's disease & AD - like pathology. Curr. sci , 1998; 75:1153-56.
12-Sreekumaran E ,Ramakrishna T. Spatial memory loss in rat due to AL toxicity is reversed by desferrioxamine pyridoxine. Alzheimer's Rep, 2002; 5:25-28.
13- Flaten T P. Aluminum as a risk factor for Alzheimer's disease , with emphasis on drinking water Brain. Res. Bull, 2001; 55(2):187-96.
14-Campbell A, Hamai D, Bondy S C. Differential toxicity of aluminum salts in human cell lines of neural origin: implications for neuro degeneration . Neurotoxicol, 2001; 22:63-71.
15-Guo-Ross S X, yang E y; Walsh T J, Bondy S C . Decrease of glial fibrillary acidic protein in rat frontal cortex following aluminum treatment .J . Neurochem, 1999;73:1609 – 14.
16-Struys – ponsar C , Guillard O , Van Den Bosch de Aguilar P . Effects of aluminum exposure on glutamate metabolism: a possible explanation for its toxicity . Exp. Neurol, 2000; 163: 157–164.
17-Suarez – Fernandez M B , Soldado A B, Sanz–Medel A , Vega J A, Novelli A, Fernandez M T, Sanche Z. Aluminum induced degeneration of astrocytes occurs via apoptosis and results in neuronal death. Brain Res , 1999; 835: 125 – 136.
18-Hertz L. Neuronal–astrocytic interactions in brain development, brain function & brain disease. In. Timeras P S, Vernadakis A, Lauder J,Private(Eds).Brain differentiation in Aging . Plenum , New york, 1991: 143-59.
19-Ashner A, Kimelberg H K . The use of astrocytes in cultures as model systems for evaluating neuro toxic – induced injury . Neuro toxicol, 1991; 12: 505-518.
20-SaSS J B, Ang L C, Juur BH J. AL Pretreatment impairs the ability of astrocytes to protect neurons from glutamate mediated toxicity. Brain Res. 1993; 621 :207-214.
21-Griffioen K J S, Ghribi O,Fox N;Savory J,Dewitt D. Aluminum Maltolate-induced toxicity in NT2 cells occurs through apoptosis and includes cytochrome c release. Neuro toxicol, 2004;25:859-867.
22-David A, Meshitsuka S . Accumulation of aluminum by primary cultured astrocytes from aluminum amino acid complex Its apoptotic effect .Brain Res., 2005;1031(2):284-96.
23-Robertson J D,Orrenius S .Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals. Crit Rev Toxicol, 2000;30:609-27.
24-Ghribi O, Dewitt D A, Forbes M S, Iterman M, Savdy FJ. Brain Res., 2001; 903: 66-73.

25-Othman Ghribi; David A; DewiT T; Micheals Forbes et al. co-involvement of mitochondria endoplasmic reticulum in regulation of apoptosis changes in cytochrome c, Bcl2 & Bax in the hippo campus of aluminum-treated rabbits. Brain Res. 2001; 603: 66-73.

26-Lee S C, Liu W, Brosnan C F, Dickson D W . Characterization of primary human fetal dissociated central nervous system cultures with on emphasis on microglia. Lab. Invest., 1992; 67:456-467.

27-Mattson MP. Human fetal brain cell culture. Methods mol.med,2005;107:163-171.

28-Deloncle R, Huguet F, Fernandez B, et al . Ultra structural study of rat hippocampus after chronic administration of aluminum L-glutamate :an acceleration of the aging process. Experim Gerontol, 2001; 36:231-44.

29-Norenberg M D ,Norenberg L .OB, Cowman GA, et al . Effects of aluminum on astrocytes in primary culture . J Neuropathol. EXP. Neurol, 1989: 48-37.

30-Niu PY, Boscolo P, Zhang QL, et al. How do rat cortical cell cultured with aluminum die: necrosis or apoptosis? Int. J Immunopathol Pharmacol,2008;21(1):107-15.

31-Guo G, Liang Y X. Aluminum induced apoptosis in cultured astrocytes and its effect on calcium homeostasis. Brain Res ,2001; 888:221-26.

32-Shea T B,Balilian P,Beermann M L. Aluminum inhibits neurofilament protein degradation by multiple cytoskeleton-associated proteases. Febs Lett,1992;307(2):195-198.

33-Clauberg M,Joshi J G. Regulation of serine protease activity by aluminum : implication for Alzheimer disease . Proe . Natl.Acad. Sci. USA, 1993;90:1009-12.

34-Martin R B. Aluminum in biological systems ,In. Nicolini M, Zatta P F, Corain B. Aluminum in chemistry,biology and medicine . Ravan Press ,New York,1991:3-20.

35-Yang E Y, Guo- Ross S X, Bondy S C. The stabilization of ferrous iron by a toxic B- amyloid fragment and by an aluminum salt. Brain Res,1999;839:221-6.

Effects of Aluminum on Cultured Human Embryonic Astrocytes and Apoptotic Gene Expression

.Aminizadeh N.[1], Rajabalian S.[2], Hosseini R[3]*

(Received: Accepted:)

Abstract

Introduction: Aluminum is the third most abundant element in the earth's crust .It plays a role in several neurodegenerative conditions including Alzheimer's disease. In this study, we investigated the effects of aluminum on human embryonic astrocytes.

Materials & methods: In this experimental study, we applied MTT techniques to investigate the effects of 3,9, and 12 days exposure to aluminum on astrocyte viability . Then, we used immunocytochemical techniques to identify apoptotic gene expression changes induced by aluminum. We used Stata software to analyze the data.

Findings: Our results showed that 3-days exposure to 1 and 1.5 mM caused a reduction in astrocytes viability, ($P<0.01$, $P<0.03$). Low levels of aluminum (500 and 100 µM) needed long-term exposure to become toxic to astrocytes) ,9 days for 500 and 12 days for 100 µM) ($P=0.000$). Aluminum didn't show any effects on apoptotic gene expression.

Conclusion: Long-term exposure, even to low levels of aluminum, was toxic for human embryonic astrocytes, but it seems that aluminum does not alter apoptotic gene expression.

Key words: aluminum, astrocyte, human embryo, cytotoxicity

1.MSc. in Anatomy, Kerman university of Medical Sciences, Kerman, Iran(corresponding author)
2.MSc. of Cell & Molecular Biology, Nerve Sciences Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran
3.BSc. of Microbiology, Nerve Sciences Research Center, Kerman University of Medical Sciences