بررسی اثر فرم پایدار گلوتامین بر تمایز عصبی سلول‌های رده PC12 در محیط کشت دوبعدی و سه‌بعدی

سید مجید جلالیان حسینی[۱]، جواد بهارآرا[۲]، شهربانو عریان[۳]، محمد امین کراچیان[۴،۵]

۱- گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه زیست شناسی و مرکز تحقیقات بیولوژی کاربردی تکوین جانوری، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران

۳- گروه جانورشناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

۴- مرکز تحقیقات ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

۵- گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، مشهد، ایران

سید مجید جلالیان حسینی: jalalian_m@yahoo.com

چکیده

هدف: گلوتامین (Gln) یک اسیدآمینه ضروری با طیف وسیعی از عملکردهای سلولی بوده و برای تکثیر سلولی ضروری است. معمولاً به شکل ال-گلوتامین به محیط کشت اضافه می‌شود که بسیار ناپایدار است و در طول دوره کشت به روشی وابسته به دما تجزیه می‌شود. اگرچه گلوتامین برای سلول‌ها مفید است، اما تجزیه آن باعث تولید آمونیاک می‌شود که سمی است و بر کشت سلولی تأثیر منفی می‌گذارد. سلول‌های فئوکروموسیتوم (PC-12) از سلول‌های سرطانی غده فوق‌کلیوی موش بزرگ آزمایشگاهی منشأ می‌گیرند و به‌عنوان مدل مناسبی برای بررسی اثرات تمایز عوامل مختلف در نظر گرفته می‌شوند. مطالعات انجام شده اهمیت گلوتامین را در رشد طبیعی و تمایز سلول‌ها نشان داده است. آلژینات یکی از بیومولکول‌هایی است که در حال حاضر به‌عنوان داربست طبیعی برای القای تمایز عصبی استفاده می‌شود.

مواد و روش‌ها: در تحقیق تجربی حاضر، اثر سطوح پایدار و بالای گلوتامین بر تمایز عصبی سلول‌های PC-12 تحت شرایط کشت ۲ بعدی و ۳ بعدی (بیدهای هیدروژل آلژینات سدیم) مقایسه شد. بقای سلول‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی سلول‌های زنده/مرده توسط آکریدین نارنجی/پروپیدیوم یداید و تست ۳-(۵،۴-دی‌متیل تیازول-۲-یل)-۵،۲-دی‌فنیل تترازولیوم (MTT)، بین گروه‌های تجربی تعیین و مقایسه شد. علاوه بر این، سلول‌ها با استفاده از کرزیل‌ویوله برای تشخیص اجسام نیسل رنگ‌آمیزی شدند. القای تمایز با استفاده از تجزیه و تحلیل ایمونوسیتوشیمی پروتئین‌های Nestin و β-Tubulin III تأیید شد و هسته سلول‌ها با ۴'،۶-دی‌آمینو-۲-فنیل ایندول رنگ‌آمیزی گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که غلظت بالای گلوتامین می‌تواند باعث تمایز عصبی در سلول‌های PC-12 در هر دو شرایط کشت ۲ بعدی و ۳ بعدی شود و بیان نشان‌گرهای پیش‌ساز عصبی و بالغ Nestin و β-Tubulin III را به‌ترتیب افزایش دهد.

واژه‌های کلیدی: تمایز عصبی، گلوتامین، سلول‌های PC-12، آلژینات

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-03-20]

Investigating the Effect of Glutamine on the Neuronal Differentiation of PC-12 Cells

Seyed Majid Jalalian Hosseini[1], Javad Baharara[2], Shahrbanoo Oryan[3], Mohammad Amin Kerachian[4,5]
1- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- University, Department of Biology and Research Center for Animal Development Applied Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad, Mashhad, Iran
3- Department of Zoology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran
4- Medical Genetics Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
5- Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Seyed Majid Jalalian Hosseini: jalalian_m@yahoo.com

Introduction: Glutamine (Gln) is an essential amino acid with a wide range of cellular functions and is necessary for cell proliferation. It is usually added to the culture media in the form of L-glutamine, which is highly unstable and degrades in a temperature-dependent manner during the culture period. Although, Gln is beneficial for the cells, its degradation produces ammonia which is toxic and negatively affect cell culture. Pheochromocytoma cells (PC-12), originating from cancerous cells of the rat adrenal gland, are considered as a suitable model to study the differentiating effects of different factors. Previous studies showed the importance of Gln in the normal growth and differentiation of the cells. Alginate is one of the biomaterials currently used as a natural scaffold for the induction of neuronal differentiation.

Methods and Materials: In the present experimental research, the effect of stable and elevated levels of Gln on the growth and neuronal differentiation of PC-12 cells was compared under 2D- and 3D- (sodium alginate hydrogel beads) culture conditions. The cells' viabilities were determined and compared between experimental groups using live/dead cell staining by Acridine orange/Propidium iodide (AO/PI), and the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test. Furthermore, cells were stained using cresyl violet to detect neuronal Nissl bodies. The induction of differentiation was confirmed using immunocytochemical analysis of Nestin and β-tubulin III proteins and Cells' nuclei were counterstained with 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

Results: Results showed that high concentration of Gln can induce neuronal differentiation in PC-12 cells under both 2D- and 3D- culture conditions and increases the expression of progenitor and mature neuronal markers nestin and β-tubulin III, respectively.

Keywords: Neural differentiation, Glutamine, PC-12 cells, Alginate

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-03-20]