ارزیابی قابلیت حیات قطعات نخاع موش بالغ به وسیلهٔ سنجش MTT

حمید رضا مومنی* ، ملک سلیمانی مهرنجانی، محمد حسین آبنوسی و پروا نسیمی

اراک، دانشگاه اراک، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۸۷/۷/۲۲ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۰/۷

چکیده

کشت قطعات نخاع پستانداران یکی از تکنیکهای مهم برای مطالعه آسیبهای نخاع، ارزیابی قابلیت حیات و همچنین مکانیسمهای دخیل در مرگ سلولی می باشد. هدف از این پژوهش با تأکید بر ایجاد یک مدل آزمایشگاهی (*in vitro*) رای کشت قطعات نخاع، ارزیابی قابلیت حیات قطعات تازه تهیه شده و قطعات کشت شده نخاع با استفاده از سنجش MTT 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)] است. در این تحقیق، ناحیه سینه ایی نخاع موشهای بالغ به وسیله دستگاه قطعه کننده بافت (tissue chopper) به طور عرضی به قطعات ۳۰۰ تا ٦۰۰ میکرونی بریده شد. این قطعات به دو محیط کشت مختلف (واجد سرم و فاقد سرم) انتقال یافت و برای زمانهای مختلف انکوبه شدند. سپس با استفاده از روش MTT قابلیت حیات آنها سنجش گردید. نتایج نشان داد که پس از ٢٤ ساعت، قطعات کشت شده ٤۰۰ میکرونی به طور معنی داری ($P< ۰/۰۱$) قابلیت حیات بیشتری را نسبت به قطعات نازکتر و ضخیم تر نشان دادند. همچنین در این زمان، قطعات کشت شده در محیط واجد سرم افزایش معنی داری($P< ۰/۰۰۱$) را در قابلیت حیات نسبت به قطعات مشابه در محیط کشت فاقد سرم نشان دادند. نتایج حاصل از سنجش کیفی MTT همچنین بیانگر شدت رنگ در ماده ی خاکستری و سفید در قطعات تازه تهیه شده (لحظه صفر) بود، در حالی که بعد از گذشت ٢٤ ساعت شدت رنگ در این قطعات و بخصوص در قطعات کشت شده در محیط فاقد سرم کاهش یافت. نتایج حاضر پیشنهاد می کند که سنجش MTT یک روش مفید برای ارزیابی قابلیت حیات قطعات نخاع موش بالغ است و علاوه بر آن ضخامت قطعات و حضور سرم در محیط کشت می توانند قابلیت حیات این قطعات را مورد تأثیر قرار دهند.

واژه های کلیدی: سنجش MTT، قطعات نخاع، موش بالغ.

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۲۷٦۵۰۰۳-۰۸٦۱، پست الکترونیک: h-momeni@araku.ac.ir

مقدمه

کشت قطعات نخاع گرفته شده از جنین و یا نوزادان تازه متولد شده پستانداران، تکنیک مهمی برای مطالعه آسیبهای نخاع، دژنره شدن نورونها و رژنره شدن آکسون نورونهای حرکتی می باشد (۱، ٤ و ١٤). مدلهایی که در آنها قطعات گرفته شده از نخاع جانوران بالغ مورد استفاده قرار می گیرند، می تواند برای مطالعه ارزیابی قابلیت حیات و مکانیسمهای دخیل در مرگ سلولی مفید باشد. بیشتر سیستمهای بیولوژیکی به عنوان مثال سلولهای پستانداران نیازمند روشی هستند که بتواند قابلیت حیات سلولی را اندازه گیری نماید و استفاده از سنجش MTT ، [3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)] به عنوان یک روش رنگ سنجی می تواند ابزار مناسبی به این منظور در نظر گرفته شود. MTT، یکی از نمکهای تترا زولیوم، به رنگ زرد و محلول در آب است که می تواند به وسیله دهیدروژنازهای موجود در میتوکندریهای فعال سلولی احیا شده و سپس به شکل کریستالهای فورمازان (MTT فورمازان) و غیر محلول در آب در سلولهای زنده رسوب نماید. این کریستالها به رنگ

Archive of SID

www.SID.ir

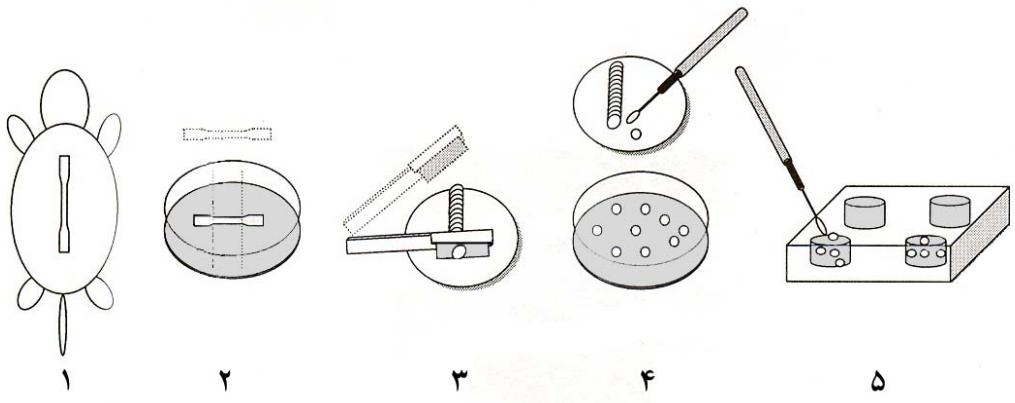
بنفش بوده و میزان رنگ بنفش ایجاد شده متناسب با فعالیت سلولی و تعداد سلولهای زنده می باشد (٦). سنجش MTT در ابتدا توسط Mosmann (۱۳) در سال ۱۹۸۳ برای سنجش قابلیت حیات و همچنین تزاید لنفوسیتهای موش مورد استفاده قرار گرفت. اخیراً این سنجش در بیشتر مطالعات مربوط به ارزیابی قابلیت حیات در انواع مختلف سلولها مورد استفاده قرار گرفته است (۲، ٦، ۱۳ و ۱۷). علاوه بر این، سنجش MTT به عنوان یک روش معتبر برای ارزیابی قابلیت حیات قطعات سیستم اعصاب مرکزی به کار برده شده است. اخیراً Connely و همکارانش (٤) این روش را برای قطعات مغز، ساقه مغز و نخاع در نوزادان موش صحرایی استفاده و قابلیت حیات را در این قطعات که توسط MTT رنگ شده بود به طور کیفی مورد ارزیابی قرار دادند. در یک مدل آسیب قطعه نخاع، Krassioukov و همکارانش (۹)، سنجش MTT را جهت مشخص نمودن سلولهای زنده در قطعات نخاع موش بالغ که توسط تکنیک weight drop آسیب دیده بود را مورد استفاده قرار دادند. با این وجود، هیچ گونه تحقیقی که در آن سنجش MTT به طور کمی و دقیق برای ارزیابی قابلیت حیات قطعات نخاع جانور بالغ مورد استفاده قرار گرفته باشد وجود ندارد. بنابراین در این تحقیق تلاش شد که برای اولین بار با تغییراتی در روش MTT بتوان ضمن ایجاد یک مدل in vitro مناسب برای کشت قطعات نخاع موش بالغ، به طور کمی و کیفی قابلیت حیات این قطعات را مورد ارزیابی قرار داد. همچنین می توان به این سئوال که آیا ضخامت این قطعات و همچنین وجود سرم در محیط کشت می تواند قابلیت حیات این قطعات را مورد تأثیر قرار دهد پاسخ داد.

مواد و روشها

حیوانات: در این تحقیق موشهای ماده بالغ Balb/c با میانگین وزنی ۳±۲۲ گرم که از انستیتو پاستور ایران، تهران خریداری شده بود، مورد استفاده قرار گرفتند. حیوانات در قفسهای پلاستیکی در اتاق حیوانات با درجه حرارت ۲۰ درجه سانتی گراد و نور کنترل شده ۱۲ ساعت تاریکی– ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری و با غذای استاندارد حیوانات آزمایشگاهی تغذیه و آب به اندازه کافی در اختیار آنها قرار گرفت.

تهیه قطعات نخاع : شکل ۱ به طور شماتیک تهیه و آماده سازی قطعات نخاع را جهت کشت این بافت نشان می دهد. ابتدا موشها توسط تزریق سدیم پنتوباربیتال (mg/ ٦۰kg) کاملاً بیهوش و سرانجام توسط شکافتن قلب کشته شدند. پس از باز نمودن ناحیه پشت حیوان، نخاع خارج و در بافر فسفات نمکی (PBS, pH=۷ /٤) قرار گرفت. سپس ناحیه سینه ای نخاع (۱۱) توسط دستگاه قطعه کننده بافت (tissue chopper، استولتینگ، آمریکا) به طور عرضی به قطعات ۳۰۰، ٤۰۰، ۵۰۰ و ٦۰۰ میکرونی بریده شده و این قطعات در پلیتهای پلاستیکی استریل چهارخانه که حاوی ٤۵۰ میکرولیتر محیط کشت بود قرار گرفتند (در هر خانه ٤ قطعه و در مجموع ۱۲ قطعه برای هر گروه). در این مطالعه دو نوع محیط کشت مورد استفاده قرار گرفت: ۱– محیط کشت واجد سرم با pH= ۷/۳–۷/٤ شامل۵۰ درصد(MEM (minimum essential medium، ۲۵درصدHBSS (Hanks Balanced Salt Solution)، ۲۵ درصد سرم اسب، ۲۵ میلی مولار N-2-hydroxy ethyl piperazine-n´-2-ethane sulfonic acid (HEPES)، ٦ گرم در لیتر گلوکز و یک درصد پنیسیلین–استرپتومایسین. ۲– محیط کشت فاقد سرم (RPMI 1640 + یک درصد پنی سیلین– استرپتومایسین) با pH=۷ /۳–۷/٤ . سپس قطعات نخاع در یک انکوباتور Co_2 دار در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد و برای زمانهای مختلف انکوبه شدند.

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱- خلاصه ای شماتیک از مراحل تهیه و کشت قطعات نخاع. ۱) پس از باز نمودن ناحیه پشتی حیوان، نخاع از محل خود خارج شد. ۲) نخاع در محلول بافر فسفات نمکی (PBS) سرد قرارگرفته و ناحیه سینه ای نخاع بریده شد. ۳) نخاع توسط دستگاه قطعه کننده بافت(tissue chopper) به قطعات عرضی بریده شد. ٤) قطعات نخاع به درون محیط کشت وارد و از یکدیگر جدا شدند. ٥) بهترین قطعات نخاع به درون پلیت چهارخانه که حاوی محیط کشت بود وارد و در انکوباتور Co_2 دار در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند.

سنجش قابلیت حیات سلولی: برای ارزیابی قابلیت حیات سلولی در قطعات نخاع، سنجش MTT مورد استفاده قرار گرفت. MTT (سیگما، آمریکا) به صورت محلول غلیظ ۵ mg/ml در PBS تهیه و به دور از نور در یخچال نگهداری شد. برای سنجش، ۵۰ میکرولیتر از محلول غلیظ به ٤۵۰ میکرولیتر محیط کشت اضافه شد و پلیتها برای مدت ۲۰ دقیقه در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. پس از آن محیط کشت خارج و قطعات نخاع توسط محلول پارافرمالدیید ٤ درصد در۰/۲ مولار بافر فسفات (pH =۷/۲) برای حداقل ۳۰ دقیقه فیکس شدند. سپس قطعات به درون پلیت ۹٦ خانه که حاوی ۲۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکسید (DMSO، مرک آلمان) بود انتقال تا رنگ بنفش فورمازان را استخراج نماید. سرانجام پس از ۳۰ دقیقه، قطعات از محلول DMSO خارج و رنگ بنفش توسط دستگاه ELISA reader با طول موج ۵۰۵ نانومتر سنجش شد. قابلیت حیات قطعات نخاع از طریق نسبت بین چگالی نور(Optical density) نمونه های کشت شده به میانگین چگالی نور نمونه های تازه تهیه شده (لحظه صفر) محاسبه و به صورت درصد بیان شد.

تعداد قطعات به کار برده شده برای هر گروه مورد آزمایش ۱۲ عدد که با سه موش متفاوت تکرار شد.

آنالیز آماری: نتایج کسب شده به صورت Mean ±SD بیان و از طریق آنالیز واریانس(ANOVA) مورد ارزیابی قرار گرفت. در تمام حالات P< ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد.

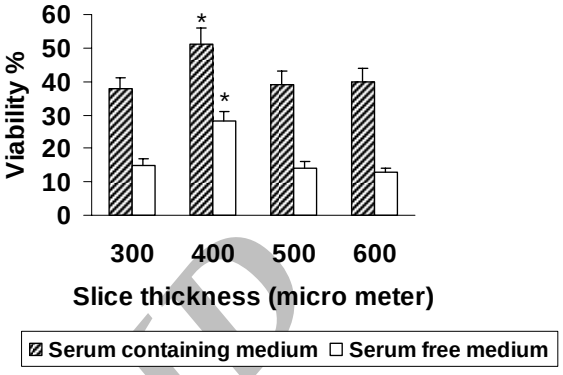
نتایج

تأثیر قابلیت حیات قطعات نخاع با ضخامت متفاوت (ارزیابی کمی): سنجش MTT نشان داد که پس از ۲٤ ساعت در محیط کشت درصد قابلیت حیات قطعات نخاع با ضخامت ٤۰۰ میکرون به طور معنی داری (P< ۰/۰۱) نسبت به قطعات نازکتر و ضخیم تر در محیط کشت واجد و فاقد سرم (شکل ۲) بیشتر بود.

تأثیر قابلیت حیات قطعات نخاع در حضور سرم در محیط کشت(ارزیابی کمی): نتایج نشان داد که پس از ۲٤ ساعت در محیط کشت، درصد قابلیت حیات قطعات ٤۰۰ میکرونی نخاع در محیط کشت واجد سرم (۵۱ درصد) نسبت به این قطعات در محیط کشت فاقد سرم (۲۸ درصد) به طور معنی داری(P<۰/۰۰۱) افزایش یافت. با این

Archive of SID
www.SID.ir

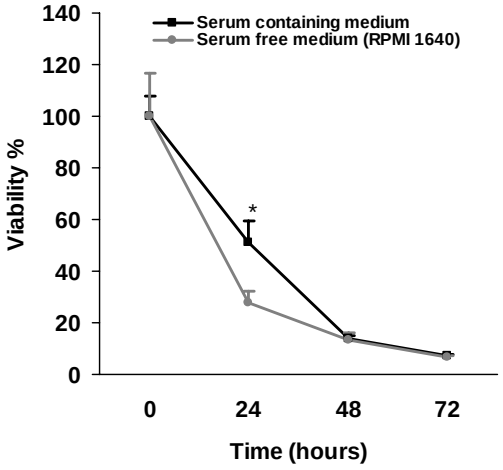
وجود، تفاوت معنی داری در قابلیت حیات قطعاتی که برای مدت ٤٨ و ٧٢ ساعت در هر دو محیط کشت شده بودند مشاهده نشد (شکل۳).



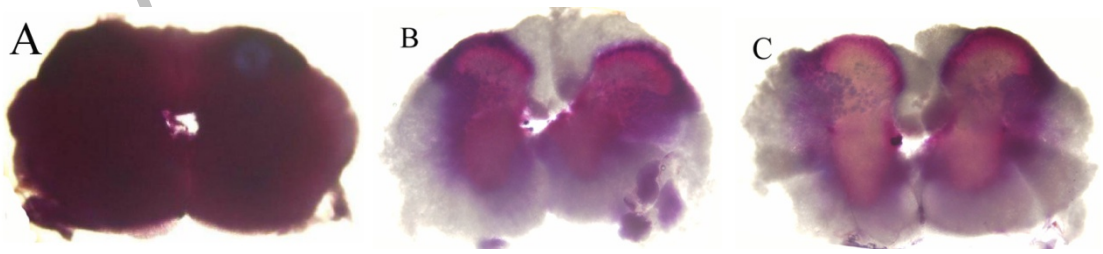
شکل ۲- اثر ضخامت بر قابلیت حیات قطعات نخاع. قطعات نخاع با ضخامتهای متفاوت ۳۰۰، ٤۰۰، ٥۰۰ و ٦۰۰ میکرونی برای ٢٤ ساعت در محیط کشت واجد و فاقد سرم باقی و قابلیت حیات آنها با نمونه های کشت نشده (لحظه زمانی صفر) توسط روش MTT سنجش شد. قطعات ٤۰۰ میکرونی به طور معنی داری قابلیت حیات بیشتری را نسبت به قطعات نازکتر و ضخیم تر در محیط کشت واجد و فاقد سرم نشان دادند. برای هر گروه n=۱۲ با تکرار بر روی سه موش. Mean±SD ,P< ۰/۰۱ *

توزیع رنگ MTT در قطعات نخاع (ارزیابی کیفی):

علاوه بر سنجش کمی، روش MTT برای ارزیابی کیفی قابلیت حیات قطعات نخاع نیز مورد استفاده قرار گرفت. شکل ٤، منظری از توزیع رنگ MTT را در قطعات ٤۰۰ میکرونی نخاع موش بالغ نشان می دهد. در قطعات تازه تهیه شده (لحظه ی صفر)، شدت رنگ بنفش MTT در ماده ی خاکستری وسفید قابل ملاحظه بود (شکل A-٤)، در حالی که پس از ٢٤ ساعت کاهش شدت رنگ در ماده سفید قطعات کشت شده در هر دو محیط کشت کاملاً مشهود بود (شکل B-٤). در همین زمان شدت رنگ در ماده خاکستری قطعات کشت شده در محیط واجد سرم بیشتر از نواحی مشابه در قطعات کشت شده در محیط فاقد سرم بود (شکل C-٤).



شکل ۳- اثر سرم بر قابلیت حیات قطعات نخاع. قطعات ٤۰۰ میکرونی نخاع در دو محیط کشت شامل محیط واجد سرم و فاقد سرم برای مدت ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت کشت شدند. سنجش MTT نشان داد که پس از ٢٤ ساعت، قابلیت حیات در قطعات کشت شده در محیط واجد سرم به طور معنی داری نسبت به قطعات کشت شده در محیط فاقد سرم بیشتر بود. برای هر گروه n=۱۲ با تکرار بر روی سه موش. Mean±SD , P< ۰/۰۰۱ *



شکل ٤- ارزیابی کیفی قطعات نخاع توسط سنجش MTT. (A) توزیع رنگ بنفش (MTT فورمازان) در قطعات نخاع موش در لحظه صفر(کنترل). توزیع رنگ بنفش قطعه ای از نخاع که به مدت ٢٤ ساعت در محیط کشت واجد سرم (B) و محیط کشت فاقد سرم (C) کشت شده بودند.

Archive of SID
www.SID.ir

توزیع پر رنگ بنفش فورمازان در قطعه نخاع بیانگر نواحی با فعالیت متابولیکی زیاد که به عنوان نواحی زنده تلقی می شود، در حالی که نواحی بنفش کم رنگ و یا سفید در ماده خاکستری و سفید نمایانگر نواحی در حال مرگ و یا مرده می باشد.

بحث

در مطالعه حاضر، ضمن ایجاد یک مدل آزمایشگاهی (*in vitro*) مناسب برای کشت قطعات نخاع ارزیابی قابلیت حیات قطعات تازه تهیه شده و کشت شده با استفاده از سنجش MTT انجام گرفت. نتایج نشان داد که ضخامت و همچنین وجود سرم در محیط کشت قادر است قابلیت حیات این قطعات را مورد تأثیر قرار دهد.

کشت قطعات نخاع در انواع مختلف مطالعات از جمله رژنره شدن آکسون (۱٤ و ۱۵) ، دژنره شدن نورونهای حرکتی (۱۱ و ۱۲) ، آسیب های نخاع (۹) و تأثیر داروها (۱۷) مورد استفاده قرار گرفته است. کشت چنین قطعاتی (کشت بافت عصبی) در مقایسه با کشت سلولهای عصبی مزیتهایی را دارا می باشد که از آن جمله می توان به حفظ تمامیت و سازماندهی آناتومیکی در خصوص ارتباط بین نورونها و سلولهای گلیا وحفظ خصوصیات عملی بافت، مشابه آنچه در شرایط زنده (in vivo) وجود دارد اشاره نمود (۷).

اغلب محققین علاقمند می باشند که از کشت قطعات نخاع گرفته شده از جنین و نوزادان تازه متولد شده برای ارزیابی قابلیت حیات، مرگ سلولی (٤) و همچنین رشد به خارج آکسون نورونها (axonal out growth) (۱ و ۱۵) استفاده نمایند. اما با توجه به این حقیقت که آسیبهای نخاعی و بیماریهای حاصل از دژنره شدن نورونها (neurodegenerative diseases) به طور عمده در افراد بالغ اتفاق می افتد، نیاز جدی برای مدلهای آزمایشگاهی که در آنها نخاع نمونه های بالغ مورد تحقیق قرار گرفته اند وجود دارد. به همین جهت در تحقیق حاضر قطعات نخاع گرفته شده از موش بالغ مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه برای ارزیابی قابلیت حیات قطعات نخاع از سنجش MTT استفاده شد. دلیل انتخاب این روش این بود که در این روش فعالیت متابولیکی سلولها مورد سنجش قرار می گیرد (٤). بر عکس، سایر روشهای بررسی قابلیت حیات سلولی که در آنجا از تریپان بلو (trypan blue) و پروپیدیوم آیوداید (propidium iodide) استفاده می شود، تنها تمامیت غشای سلولها سنجش می شود (۳ و ۱۸) و اطلاعاتی در خصوص میتوکندریها و یا عمل متابولیکی سلول ارائه نمی گردد. در این پژوهش سنجش MTT جهت بررسی ظرفیت میتوکندریهای فعال سلول در قطعات نخاع مورد ارزیابی قرار گرفت. این روش که ناشی از تشکیل بنفش فورمازان به وسیله میتوکندریهای فعال در سلولهای زنده می باشد به طور گسترده جهت ارزیابی قابلیت حیات و تزاید سلولی مورد استفاده قرار می گیرد (۱۳). اگرچه این روش تمامیت میتوکندریایی را سنجش می کند اما بایستی توجه داشت که احیای MTT همچنین می تواند به وسیله دهیدروژنازهای متعلق به دیگر ارگانلهای سلولی مثل لیزوزمها نیز صورت گیرد (۱۰). صرف نظر از اینکه احیای MTT توسط میتوکندریها و یا سایر ساختارهای دیگر سلولی صورت می گیرد، سلولهایی که از نظر متابولیکی فعال می باشند این احیاء را انجام می دهند و می توان گفت که هنوز این روش برای سنجش قابلیت حیات سلولها و قطعات گرفته شده از سیستم اعصاب مرکزی به عنوان یک روش رنگ سنجی معتبر، سریع و ارزان محسوب می شود (٤).

قطعات نخاع تازه تهیه شده که در معرض MTT قرار گرفته بودند، به طور کامل بنفش رنگ شدند که بیانگر فعالیت میتوکندریها و بنابراین زنده بودن تمام سلولهای این قطعات می باشد، در حالی که فقدان یا ضعف رنگ بنفش فورمازان در برخی از نواحی قطعات کشت شده به ویژه در ماده ی سفید نشانگر آن بود که سلولها از جمله نورونها و سلولهای گلیا مرده و یا در حال مرگ می باشند. در ضمن

Archive of SID

www.SID.ir

این روش می تواند جهت مشخص نمودن نواحی مرده در این قطعات نیز مورد استفاده قرار گیرد. حضور نواحی مرده و زنده در کنار یکدیگر در یک قطعه کشت شده نخاع، پیشنهاد می کند که سنجش MTT به عنوان یک روش دقیق برای تمیز نواحی زنده و مرده در قطعه نخاع محسوب می شود و بدین ترتیب اعتبار این روش را برای ارزیابی قابلیت حیات در این قطعات تصدیق می نماید.

در مطالعات گوناگون که در آن کشت قطعات نخاع مورد توجه قرار گرفته است، محدوده های متفاوتی از ضخامت این قطعات مورد استفاده قرار گرفته است (۱، ٤، ۸ و ۹). لذا در مطالعه حاضر با هدف یافتن ضخامت مناسبی از قطعات که قابلیت حیات بهتری را نشان می داد، از ضخامتهای متفاوت (۳۰۰، ٤۰۰، ۵۰۰ و ٦۰۰ میکرون) استفاده شد. نتایج نشان داد که ضخامت قطعه نخاع، قابلیت حیات آن را مورد تأ ثیر قرار می دهد، به طوری که قابلیت حیات در قطعات ٤۰۰ میکرونی به طور معنی داری نسبت به سایر ضخامتها بیشتر بود. کاهش قابلیت حیات در قطعات نازک تر ممکن است ناشی از حساسیت بافتی این قطعات به آسیب بافتی در طی مراحل برش گیری باشد. با این وجود، افزایش ضخامت قطعه ها ی بالاتر از ٤۰۰ میکرون، قابلیت حیات را افزایش نداد. توضیح احتمالی برای این نتیجه می توانست ناشی از نفوذ اکسیژن و مواد غذایی از محیط کشت به طرف داخلی ترین لایه های سلولی قطعه باشد که می توانست به عنوان یک عامل محدود کننده در نظر گرفته شود. بنابراین ضخامت ٤۰۰ میکرون به عنوان بهترین ضخامت برای سنجشهای کمی و کیفی MTT پیشنهاد می شود.

تفاوت در پارامترهای محیط کشت می تواند فاکتوری باشد که ممکن است قابلیت حیات را افزایش یا کاهش دهد. سرم قادر است مواد غذایی و فاکتورهای حفاظتی شامل فاکتورهای نوروتروپیک را در محیط کشت فراهم آورد و از این طریق در بقاء سلولها مؤثر باشد (۵). در توافق با نتایج کسب شده از قطعات نخاع و هیپوکامپ گرفته شده از جنین وحیوانات تازه متولد شده (٤ و ۵)، حضور سرم در محیط کشت می توانست به طور قابل ملاحظه ای قابلیت حیات قطعات نخاع موش بالغ را افزایش دهد.

جهت نتیجه گیری می توان اشاره نمود که کشت قطعات نخاع گرفته شده از موش بالغ می تواند مدل مناسبی برای ارزیابی کمی و کیفی قابلیت حیات (با استفاده از سنجش MTT) قطعات تازه تهیه شده و قطعات کشت شده در نظر گرفته شود. در این خصوص نه نتها ضخامت قطعات بلکه حضور سرم در محیط کشت می تواند قابلیت حیات قطعات کشت شده را مورد تأثیر قرار دهد.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از کمکهای سرکار خانم منیره محمودی در مراحل مختلف این تحقیق تشکر و سپاسگزاری می گردد.

منابع

1-Connelly, C.A., L.C. Chen and S.D. Colquhoun, (2000), Metabolic activity of cultured rat brainstem, hippocampal and spinal cord slices. J. Neurosci. Methods 99: 1-7.

2-Mouveroux, J.M., E.A. Lakke and E. Marani, (2001), Lumbar spinal cord explants from neonatal rat display age-related decrease of outgrowth in culture. Neurosci. Lett, 311: 69-72.

3-Arsley, C.P., K.W. Cheng, L. Song and et al. (1998), Thin slice CNS explants maintained on collagen-coated culture dishes. J. Neurosci. Methods, 80: 65-74.

4-Denizot, F. and R. Lang, (1986), Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. J. Immunol. Methods 89:271-277.

5-Mosmann, T., (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 65:55-63.

Archive of SID
www.SID.ir

6-Aziz D.M., (2006), Assessment of bovine sperm viability by MTT reduction assay. Anim. Reprod. Sci 92:1-8.

7-Nasr-Esfahani, M.H, R. Aboutorabi, E. Esfandiari and et al. (2002), Sperm MTT viability assay: a new method for evaluation of human sperm viability. J. Assist. Reprod. Genet. 19:477-482.

8-Krassioukov, A.V., A. Ackery, G. Schwartz and et al. (2002), An in vitro model of neurotrauma in organotypic spinal cord cultures from adult mice. Brain Res. Protoc. 10:60-68.

9-Momeni, H.R. and M. Kanje, (2005), The calpain inhibitor VI prevents apoptosis of adult motor neurons. Neuroreport 16:1065-1068.

10-Mouveroux, J.M., E.A. Lakke and E. Marani, (2002), Intrinsic properties inhibit axonal outgrowth from neonatal rat spinal cord explant. Arch Physiol. Biochem. 110:177-185.

11-Momeni, H.R. and M. Kanje, (2006), Calpain inhibitors delay injury-induced apoptosis in adult mouse spinal cord motor neurons. Neuroreport, 17:761-765.

12-Pizzi M., M. Benarese, F. Boroni, F. Goffi, and et al., (2000), Neuroprotection by metabotropic glutamate receptor agonists on kainate-induced degeneration of motor neurons in spinal cord slices from adult rat. Neuropharmacology, 39(5):903-910.

13-Elliott, J.L., (1999), Experimental models of amyotrophic lateral sclerosis. Neurobiol. Dis. 6:310-320.

14-Bruce, A.J., B. Malfroy and M Baudry, (1996), beta-Amyloid toxicity in organotypic hippocampal cultures: protection by EUK-8, a synthetic catalytic free radical scavenger. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 93:2312-2316.

15-Rennie, S., R.B., Lotto and D.J. Price, (1994), Growth-promoting interactions between the murine neocortex and thalamus in organotypic co-cultures. Neuroscience 61:547-564.

16-Liu Y., D.A. Peterson, H. Kimura and et al. (1997), Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT reduction). J. Neurochem. 69:581-593.

17-Hilton K.J., A.N. Bateson, and A.E. King. (2006), Neurotrophin-induced preprotachykinin-A gene promoter modulation in organotypic rat spinal cord culture. J. Neurochem. 98:690-699.

18-Connor B. and M. Dragunow, (1998), The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain. Brain Res. Brain Res. Rev. 27:1-39.

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation of viability in adult mouse spinal cord slices by MTT assay.

Momeni H.R., Soliemani Mehranjani M., Abnosi M.H. and Nasimi P.

Biology Dept., Faculty of Science, Arak University, Arak, I.R. of IRAN

Abstract

Spinal cord slice culture from mammals is one of important methods for studing spinal cord injury, evaluation of cell viability and cell death mechanisms. The aim of this study was to establish an in vitro model for culturing spinal cord slice by MTT [3 – (4,5-dimethy lthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay. The thoracic region of spinal cord from adult mouse was transversally sliced to 300-600 µm, using a tissue chopper. The slices were incubated with culture media in the presence or absence of serum for different period of time. MTT assay was used to assess the viability of the slices. After 24 h, 400-µm-thick slices displayed a significant increase ($P<0.01$) in viability compared to both thinner and thicker slices. At this time point, a significant increase ($P<0.001$) was found in the viability of slices cultured in serum containing medium compared to serum free medium. Qualitative MTT assay also revealed an intense staining in both gray and white matter of freshly prepared slices. However, after 24 h, the distribution of MTT staining was less pronounced in the slices particularly in slices cultured in serum-free medium compared to serum containing medium. Our results suggest that MTT assay is a useful tool for evaluating adult mouse spinal cord slices and that both slice thickness and the presence of serum into the medium affect viability in such slices.

Keywords: MTT assay, Spinal cord slice, Adult mouse.

Archive of SID

www.SID.ir