مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۴، شماره ۲، تابستان ۹۳، صفحات ۸۸ تا ۹۴

Original Article

بررسی میزان فسفریلاسیون GSK3 β تحت تاثیر Dihydroepiandrosterone (DHEA) در سلول‌های پروژنیتور عصبی جدا شده از کورتکس مغز جنین موش نژاد Balb/c

سمیه ابراهیمی باروق[۱]، کاظم پریور[۲]

[۱] دکتری زیست‌شناسی سلولی تکوینی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اردبیل، عضو باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان اردبیل
[۲] استاد ، گروه زیست شناسی جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران

چکیده

سابقه و هدف: *بررسی های مختلف نشان داده است که هر گونه اختلال در مسیر سیگنالینگ wnt با بیماری آلزایمر ارتباط مستقیم دارد. یکی از مولکول های مهم دخیل در فعال سازی یا غیرفعال سازی این مسیر مولکول GSK3β (Glycogen synthase kinase 3β) است. هدف اصلی در این تحقیق بررسی میزان فسفریلاسیون GSK3β تحت تاثیر Dihydroepiandrosterone (DHEA) است که یک نورواستروئید مغزی است و با افزایش سن ترشح این نورواستروئید در مغز کاهش پیدا می‌کند.*

روش بررسی: *در این مطالعه تجربی، به منظور بررسی میزان فسفریلاسیون GSK3β تحت تاثیر DHEA، سلول های پروژنیتور عصبی از کورتکس مغز جنین موش استخراج شده و سپس با غلظت ۱میکرومولار از DHEA به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. بعد از ۴۸ ساعت میزان فسفریلاسیون GSK3β به روش ایمنوسیتوشیمی مورد بررسی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *در گروه تیمار، DHEA موجب افزایش فسفریلاسیون GSK3β نسبت به گروه شاهد شد.*

نتیجه‌گیری: *فسفریلاسیون GSK3β منجر به غیر فعال شدن GSK3β می گردد که همراه با فعال شدن مسیرسیگنالینگ **wnt** است که می‌تواند یک راهکار مناسب برای درمان بیماری آلزایمر محسوب شود.*

واژگان کلیدی: *سلول‌های پروژنیتور عصبی، آلزایمر، GSK3β، DHEA*

مقدمه

بیماری آلزایمر یکی از انواع دمانس یا زوال عقل است. زوال عقل یک بیماری پیش رونده و مزمن است که موجب تحلیل سلول‌های مغزی شده و به اختلال شناختی در بیمار منجر می شود. فرد مبتلا در طول بیماری در شناخت زمان و مکان دچار اختلال شده و حافظه نزدیک شخص از کار می‌افتد. دلیل این بیماری از نظر علمی شناخته شده نیست اما دانشمندان به این نتیجه رسیده‌اند که عوامل ژنتیکی، ارثی و شکستن نوعی پروتئین بنام آیلوئید بتا در مغز که به ایجاد رسوب و پلاک‌های پیری منجر می‌شود، می‌توانند موجب بروز این بیماری شوند. بیماری آلزایمر یکی از بیماری های نورودژنرتیو است که با دو مشخصه اصلی همراه است: ۱- تشکیل پلاک های آمیلوئیدی ۲- تشکیل Neurofibrilary tangles(NFTs) بر اثر هایپرفسفریلاسیون پروتئین tau که در نهایت با از بین رفتن نورون ها و تحلیل رفتن مغز همراه است. (۱،۲)

سیگنالینگ wnt در بلوغ بافت‌ها و همئوستازیس و چندین بیماری در بدن نقش مهمی را دارد (۳). در CNS، این سیگنالینگ در القاء نورونی و الگوبندی اولیه آن در مراحل جنین‌زایی درگیر بوده و مطالعات نشان داده‌اند این سیگنالینگ مرتبط با تعدادی از بیماری های نورودژنرتیو است

آدرس نویسنده مسئول: اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اردبیل، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، سمیه ابراهیمی باروق (**email**: s_ebrahimi100@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۹۲/۲/۳۱
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۲/۸/۵

Archive of SID
www.SID.ir

(۳). شواهد نشان داده است که مختل شدن و از بین رفتن این مسیر منجر به ایجاد بیماری آلزایمر می‌شود. در اوایل سال ۲۰۰۰ رابطه بین غیر فعال شدن مسیر سیگانالینگ Wnt وبیماری آلزایمر مشخص شد (۳). مطالعات گذشته ارتباط بین نوروتوکسیسیتی ایجاد شده توسط آمیلوئید بتا (Aβ)، سطوح پایین سیتوپلاسمی β-catenin و از بین رفتن مسیر سیگنالینگ Wntرا نشان داده‌اند (۴). مطالعات انجام شده بر روی لیتیم نشان داده است که این عنصر منجر به مهار GSK3β شده و نورون‌های هیپوکامپی را از آسیب‌های ایجاد شده توسط آمیلوئید حفظ می‌کند.این نتایج منجر به شکل گیری این فرضیه شد که از بین رفتن عملکرد سیگنالینگ wnt ممکن است در دژنره شدن نورونی توسط Aβ در بیماری آلزایمر نقش داشته باشد (۵).

گلیکوژن سینتاز کیناز3β (GSK3β) یکی از آنزیم‌هایی است که در سیگنالینگ درون سلولی، تنظیم پلاستیسیتی نورونی، کنترل بیان ژن و زنده ماندن سلول نقش مهمی را ایفا می‌کند و همچنین آنزیم کلیدی برای شروع مرگ سلولی است و با بیماری آلزایمر ارتباط مستقیمی دارد (۷). مطالعات نشان داده است که آمیلوئید بتا باعث فعال شدن GSK3β شده و منجر به مرگ سلول ها در یک مسیر وابسته به GSK3β می گردد. از طرف دیگر خود GSK3β فعال شده منجر به تولید آمیلوئید بتا بیشتری می‌شود (۶).

بررسی‌ها نشان داده‌اند که GSK3β فعال شده (معروف به TauکینازI) در جسم سلولی نورون‌ها و نوریت‌های مغز بیماران آلزایمری یافت می‌شود (۷). فعالیت آنزیم GSK3β منجر به هایپرفسفریله شدن پروتئین Tau و از بین رفتن شبکه میکروتوبولی می‌گردد (۷). دیده شده است که بلوکه کردن فعالیت GSK3β، از هایپرفسفریله شدن Tau جلوگیری نموده و اتصال آن را به شبکه میکروتوبولی به پیش می‌برد (۸). امروزه دانشمندان با توجه به این یافته ها به این نتیجه رسیده‌اند که استفاده از داروهایی که منجر به فسفریلاسیون سرین ۹ GSK3β و در نتیجه غیر فعال شدن آن می‌گردند می‌توانند به بهبود بیماری آلزایمر و جلوگیری از پیشرفت آن کمک کنند (۹). یکی از روش‌های مورد استفاده جهت درمان بیماری آلزایمر بهره گیری از ترکیباتی مانند Memantin است که از مرگ سلولی ناشی از فعالیت رسپتورهای NMDA (N-methyl-D-aspartate) جلوگیری می‌کنند که تحت این ترکیبات عنوان آنتاگونیست‌های این رسپتور مطرح هستند (۹). مطالعات نشان داده‌اند که مهار این رسپتور توسط آنتاگونیست آن یعنی Memantin می‌تواند منجر به فسفریلاسیون GSK3β و فعال شدن مسیر سیگنالینگ wnt گردد (۱۰). یکی دیگر از آنتاگونیست‌های رسپتور NMDA، نورواستروئیدی بنام Dihydroepiandrosterone (DHEA) است که علاوه بر نورون‌ها از قسمت قشری فوق کلیه و حتی تخمدان و بیضه ها نیز ترشح می‌شود (۱۱). نورواستروئیدها توسط نورون‌ها و گلیاها در سیستم عصبی، بوسیله آنزیم‌های خاص سنتز شده در آنها، تولید می‌شوند. مشاهده شده است که میزان نورواستروئیدهای مغزی با افزایش سن و تحت شرایط استرس‌زا مثل استرس‌های فیزیولوژیکی، التهاب و بیماری‌های نورودژنرتیو کاهش می‌یابد (۱۲). یکی از اثرات مهم نورواستروئیدها اثر ضد آپاپتوزی آنها است. آپاپتوز در مرحله انتهایی چندین بیماری مثل آلزایمر، پارکینسون و ALS دیده می‌شود و در واقع آپاپتوز نورون‌های هیپوکامپ و کورتکس نشانه اصلی بیماری آلزایمر است (۱۳). یکی از مکانیسم‌های عمل این نورواستروئیدها برای جلوگیری از آپاپتوز، اثر بر روی رسپتورهای NMDA است که به عنوان آنتاگونیست رسپتورهای NMDA عمل می‌کنند (۱۴). مطالعات نشان داده‌اند که DHEA منجر به فعال شدن مسیر PKC می‌گردد که این مسیر می‌تواند منجر به فسفریلاسیون GSK3β گردد (۱۵). علاوه بر اثرات neuroprotective، DHEA دارای اثرات نوروژنز نیز می باشد. در جنین جونده DHEA اثرات مهمی را بر روی رشد نورون‌ها نشان داده‌اند (۱۷). این ماده در غلظت‌های نانومولار دراز شدن اکسون‌های نورونی را به پیش می‌برد و همچنین تشکیل سیناپس نخاعی را در نورون های هیپوکامپ القا می‌کند (۱۶). DHEA تعداد نورون‌های تازه تشکیل شده در dentate gyrus هیپوکامپ رت را افزایش می‌دهد (۱۸). مشخص شده که DHEA از طریق رسپتورهای Sigma-1 و NMDA منجر به نوروژنز می‌شود. این یافته‌ها نشان داده‌اند که DHEA در تکوین مغز از طریق جلوگیری از آپاپتوز و افزایش تکثیر و تمایز سلول‌های عصبی نقش دارد (۱۸). با توجه به اینکه DHEA آنتاگونیست رسپتور NMDA است و تاکنون مطالعه‌ای برای ایجاد ارتباط بین عملکرد DHEA بر روی فسفریلاسیون GSK3β صورت نگرفته است، لذا هدف مطالعه حاضر بررسی میزان فسفریلاسیون GSK3β تحت تاثیر DHEA در سلول‌های پروژنیتور عصبی جدا شده از مغز جنین موش می‌باشد.

مواد و روشها

جداسازی سلول‌های پروژنیتور عصبی

در این پژوهش تجربی، از موش‌های نژاد Balb/c استفاده گردید. با مشاهده پلاک واژنی، روز اول حاملگی مشخص گردید. سپس از جنین موش‌ها در روز ۱۴ جنینی برای به

Archive of SID

www.SID.ir

دست آوردن سلول‌های پروژنیتور عصبی استفاده شد. مغز جنین‌ها خارج شده و درپلیت حاوی PBS و پنی سیلین-استرپتومایسین ۱٪ بر روی یخ قرار داده شد و به زیر هود منتقل گردید. بافت مغزی به دست آمده به مدت ۱۵دقیقه در تریپسین EDTA (۰/۱٪-۰/۲۵٪) در دمای اتاق انکوبه شد. بعد از گذشت این مدت زمان محیط DMEM همراه با مکمل N2 به بافت اضافه شده و پیپتاژ گردید. سپس سلول‌ها با دور ۱۲۰۰RPM به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سلول‌ها به درون ظرف‌های ۶ خانه‌ای منتقل شدند. محیط کشت مورد استفاده شامل DMEM همراه با EGF(40ng/ml) و bFGF (20ng/ml) بود (۱۹). محیط کشت سلول‌ها بعد از ۲۴ ساعت تعویض گردید و از محیط کشت جدید همراه با فاکتورهای ذکر شده به مدت یک هفته استفاده گردید. پس از گذشت ۲۴ ساعت تولید نوروسفر توسط سلول‌ها مشاهده شد. کلیه مواد مورد استفاده از Sigma تهیه گردید.

تعیین دوز مناسب DHEA توسط بررسی میزان زنده ماندن (viability) سلول‌ها با روش MTT

برای تعیین دوز مناسب DHEA جهت تیمار سلولی، ۲ میلی گرم از DHEA(Merck, Germany) در۶/۹ میلی لیتر الکل مطلق حل شد تا غلظت 10^{-3} مولار از محلول به دست آید. سپس از محلول استوک غلظت های مختلف به دست آمد. سلول ها در ابتدا با غلظت های ۰/۵ µM، ۱، ۲، ۳، ۴ مورد آزمایش قرار گرفتند. به این منظور ابتدا سلول ها را با تراکم 3×10^{4} سلول در میلی‌لیتر در پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای کوت شده با Poly-D-Lysine، حاوی محیط کشت DMEM و FBS ۱۰٪ کشت داده شدند. بعد از یک شب انکوباسیون DHEA در غلظت‌های مذکور به هر خانه اضافه شد، سپس نتایج در ۲۴ ساعت بعد تیمار با MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. در این روش دهیدروژنازهای موجود در میتوکندری سلول‌های زنده MTT را به فورمازان (formazan) آبی رنگ تبدیل می‌کنند و سبب تغییر رنگ محیط می‌شوند که این تغییر رنگ را می‌توان با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری با طول موج ۵۷۰nm اندازه گیری کرد (۲۰). غلظت مناسب از DHEA با کشندگی پایین برآورده شده و برای بررسی فسفریلاسیون GSK3 β مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی تاثیر DHEA بر روی فسفریلاسیون GSK3 β در سلول‌های عصبی کشت داده شده

سلول‌ها در دانستیه 5×10^{4} cell /ml به پلیت ۲۴ خانه‌ای حاوی ۰/۵ میلی لیتر محیط کشت DMEM حاوی FBS ۱۰٪ منتقل گردید. پس از گذشت ۲۴ ساعت محیط کشت القایی که شامل DMEM به همراه غلظت ۱ µM از DHEA بود به سلول‌ها اضافه گردید (۱۲). به عنوان گروه شاهد، به یک سری از چاهک‌ها محیط فاقد DHEA اضافه شد. بعد از ۴۸ ساعت سلول ها با محلول پارافرماالدئید ۴٪ فیکس شده و برای ایمنوسیتوشیمی آماده شدند.

ایمنو سیتو شیمی (Immunocytochemistry)

آنتی‌بادی GSK3β-P (abcam, USA) برای تعیین تاثیر DHEA بر روی فسفریلاسیون GSK3β-P در ۴۸ ساعت بعد از تیمار سلول‌ها، مورد استفاده قرار گرفت. ایمنوسیتوشیمی به روش زیر انجام گردید: سلول‌ها با محلول پارافرماالدئید ۴٪ به مدت ۱۰ دقیقه تثبیت شدند، با محلول تریتون X100، ۰/۲٪ به مدت ۳۰دقیقه در دمای اتاق نفوذپذیر شدند. بعد از این مرحله محلول بلوکه کننده حاوی Goat serum ۵٪ حل شده در بافر سالین به مدت ۳۰ دقیقه به سلول‌ها اضافه گردید. سپس آنتی بادی اولیه GSK3β-P (با غلظت ۱:۲۰۰ در محلول بلوکه کننده) به مدت ۲ ساعت به سلول‌ها اضافه گردید. سپس از آنتی بادی ثانویه(Goat anti- mouse (abcam, USA IgG FITC (غلظت ۱:۵۰۰) بر علیه انتی بادی اولیه استفاده شده و به مدت ۱ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. هسته سلول‌ها با DAPI رنگ آمیزی گردید. در نهایت عکسبرداری از سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلوئورسنت معکوس انجام شد.

تحلیل آماری

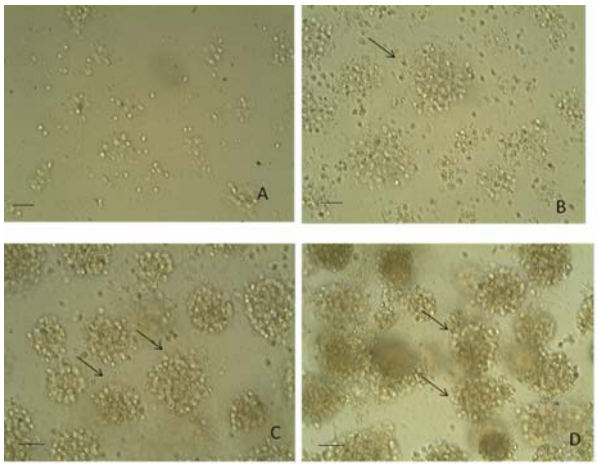
نتایج با استفاده از نرم افزار تحلیل داده‌های آماری SPSS ویراست ۱۳و آزمون‌های آماری T-test و ANOVA به صورت میانگین ± خطای معیار مورد ارزیابی قرار گرفت. رسم نمودارها در نرم افزار Excel انجام گرفت. مقادیر $p<0/001$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از کشت اولیه سلول های پروژنیتور عصبی از کورتکس مغز جنین‌های موش

سلول‌های کورتکس مغز بعد از ایزوله شدن در محیط کشت مناسب برای رشد سلول‌های عصبی کشت داده شد. پس از دو روز کشت سلول‌ها توده ای شده و نوروسفرها را ایجاد نمودند. نتایج کشت اولیه این سلول ها در شکل ۱ نشان داده شده است.

Archive of SID
www.SID.ir



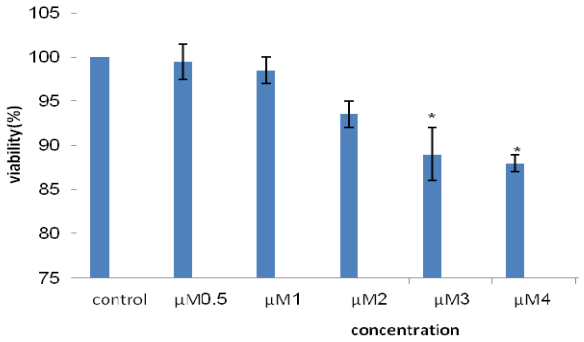
شکل ۱. فتومیکروگراف از سلول‌های عصبی کشت داده شده در روزهای صفر و ۱و۲. پیکان ها نوروسفرها را نشان می دهد که ۲روز بعد از کشت کاملا تشکیل شده اند. A: سلول‌های عصبی کشت داده شده در روز صفر B: سلول‌های عصبی ۱ روز بعد از کشت اولیه که نوروسفرها در حال تشکیل هستند. C و D: سلول‌های عصبی ۲ روز بعد از کشت اولیه که نوروسفرها تشکیل شده اند. scale bar:100µm

نتایج بدست آمده از بررسی غلظت های مختلف DHEA بر روی سلول‌ها

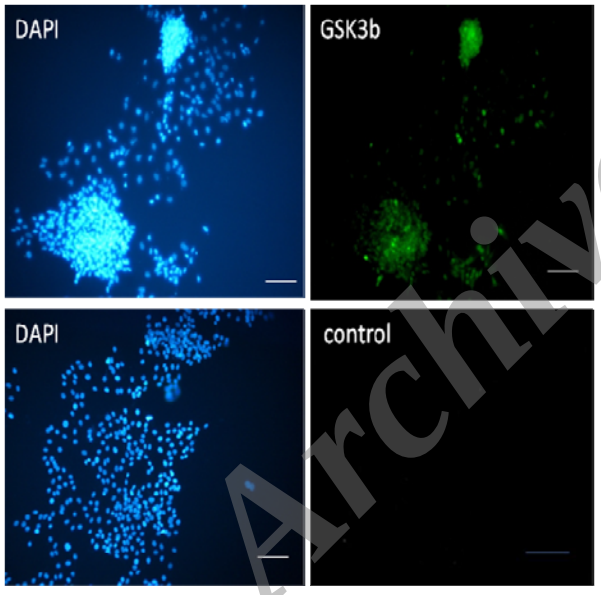
بررسی اثر غلظت‌های ۰،۱،۲،۳،۴/۵µM از DHEA بر روی viability سلول‌ها به روش MTT انجام شد. نتایج نشان داد که غلظت‌های ۰/۵ µM و ۱ غلظت‌های مناسبی جهت تیمار سلول‌ها مناسب به حساب می‌آیند. در بررسی‌های مختلف جهت تمایز این سلول‌ها به نورون از غلظت ۱ µM استفاده شده است (۱۵). نتایج در نمودار ۱ نشان داده شده است.

بررسی تاثیر DHEA بر روی میزان فسفریلاسیون GSK3 β به روش ایمنوسیتوشیمی

پس از ۴۸ ساعت تیمار سلول‌ها با DHEA در غلظت ۱µM،از نظر مورفولوژیکی تغییرات خاصی در نمونه تیمار شده نسبت به نمونه شاهد مشاهده نشد. بعد از ۴۸ ساعت تیمار با DHEA در غلظت ۱µM، سلول‌ها به روش ایمنوسیتوشیمی جهت بررسی فسفریلاسیون GSK3 β مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج نشان داد که در نمونه‌های تیمار شده DHEA موجب فسفریلاسیون GSK3 β شده است، در حالی که در گروه شاهد بیان GSK3 β فسفریله شده مشاهده نشد. درصد سلول‌های بیان کننده GSK3β-p در گروه تیمار شده با شمارش هسته سلول‌ها و سلول های بیان کننده GSK3β-p به دست آمد. نتایج نشان دهنده بیان GSK3β به میزان ۲۴/۱٪ نسبت به گروه شاهد بود. میزان بیان GSK3b در گروه شاهد صفر و در گروه تیمار شده با DHEA (٪) در سلول‌های عصبی کشت داده شده ۴۸ساعت بعد از تیمار ۱/۵±۲۱/۴ به دست آمد. نتایج در شکل ۲ آمده است.



نمودار ۱. مقایسه اثرغلظت های مختلف DHEA .µM۱،۲،۳،۴و ۰/۵بر درصد بقاء (viability) سلول های عصبی کشت داده شده ۲۴ ساعت بعد از تیمار باDHEA به روش MTT assay. نتایج نشان داد که غلظت‌های µM ۰/۵ و ۱ غلظت‌های مناسبی جهت تیمار سلولها به حساب می‌آیند.



شکل ۲. بررسی بیان GSK3β فسفریله شده در سلول های گروه شاهد و تیمار شده با DHEA به روش ایمنوسیتوشیمی پس از گذشت ۴۸ ساعت. نتایج نشان دهنده بیان GSK3β در گروه تحت تاثیر قرار گرفته با DHEA بعد از ۴۸ ساعت می باشد. همان طور که در شکل دیده می شود در گروه شاهد بیان GSK3β دیده نشد. Scal bar :100µm

بحث

فرایند پیری همراه با بروز تغییراتی در سیستم عصبی مرکزی است. مطالعات MRI نشان می‌دهد که افزایش سن همراه با کاهش در حجم لوب‌های temporal و frontal نیمکره‌های

Archive of SID
www.SID.ir

مغز، کوچک‌تر شدن هسته‌های ساب کورتیکال و بزرگ شدن فضای ونتریکولار می‌باشد (۲۱). تمامی این علایم مربوط به بیماری‌های نورودژنراتیو مثل آلزایمر، پارکینسون، ALS، MS، هانتینگتون و صدمات وارده به مغز و Stroke می‌باشند (۲۱). فرایند نوروژنز در مغز بالغ مشابه با فرایندهایی است که در دوران جنینی رخ می‌دهد و باید یک تعادل و هماهنگی بین سیگنال‌های مختلف وجود داشته باشد تا منجر به نوروژنزیز و گلیکوژنزیز وخودنوزایی self- renewal سلول‌های بنیادی در مغز گردد. فاکتورهای مهمی در خودنوزایی بودن سلول‌های بنیادی نقش دارد و در واقع سرنوشت این سلول‌ها توسط ارتباطات بین فاکتورهای رونویسی، کنترل اپی ژنتیکی، تنظیم کننده‌های miRNA و سیگنال‌های خارج سلولی مشخص می‌شود (۲۲). به نظر می‌رسد که سیگنال‌های خارج سلولی مهم شامل Wnt, EGF, FGF نقش سرنوشت سازی را در کنترل سرنوشت سلول های بنیادی عصبی ایفا می‌کنند (۲۲). دیده شده است که یک سری مولکول‌های اندوژن و نورواستروئیدها نیز بر روی این مسیرها اثر گذاشته و بر روی سرنوشت سلول‌های بنیادی عصبی موثر هستند و این مسئله دیدگاه جدیدی را برای درمان بیماری های نورودژنرتیو ایجاد نموده است (۲۳). بنابراین دانستن مکانیسم‌های ملکولی درگیر در فعالیت‌های حفاظت نورونی و آنتی آپاپتوزی نورواستروئیدها ممکن است به انتخاب صحیح و بهتر این نورواستروئیدها برای درمان بیماری‌های مرتبط با نورودژنرتیو حاصل از افزایش سن کمک کند. برای مثال DHEA و آنالوگ‌های آن می‌توانند به عنوان یک داروی هدف برای بیماری‌های نورودژنراتیو به کار روند. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که این نورواستروئیدها به صورت وابسته به غلظت عمل می‌کنند و غلظت‌های مختلف از این ترکیبات اثرات مختلفی را ایجاد می‌کنند (۲۳). در این مطالعه ابتدا غلظتهای مختلف ۰/۵ μM ،۱،۲،۳،۴ بر روی میزان زنده ماندن سلول‌ها به روش MTT مورد بررسی قرار گرفت تا غلظتی که کمترین اثر کشندگی را بر روی سلول‌ها داشته باشد، مورد انتخاب قرار گیرد. نتایج حاصل از تست MTT نشان داد که غلظت‌های ۰/۵ μM و ۱ کمترین کشندگی را نشان دادند. در مطالعات مختلف از غلظت ۱ μM برای نوروژنز استفاده شده است و این غلظت به دست از این تحقیق مشابه نتایج به دست آمده از مطالعات انجام شده توسط Maninger و همکاران در سال ۲۰۰۹ و Belelli وهمکاران در سال ۲۰۰۵ بود (۱۲،۱۵). در این تحقیق نیز از غلظت ۱ μM استفاده گردید تا اثر این غلظت از DHEA بر روی میزان فسفریلاسیون GSK3β مورد بررسی قرار گیرد. نتایج بررسی‌های ایمنوسیتوشیمی در این مطالعه نشان داد که این نورواستروئید دارای قدرت فسفریلاسیون GSK3β در سلول‌های تیمار شده می‌باشد.

در مغز بیماران آلزایمری فعالیت آنزیم GSK3β منجر به هایپرفسفریله شدن پروتئین Tau و از بین رفتن شبکه میکروتوبولی می‌گردد (۲۴). بلوکه کردن فعالیت GSK3β از هایپرفسفریله شدن Tau جلوگیری کرده و اتصال آن را به شبکه میکروتوبولی به پیش می‌برد و استفاده از داروها و ترکیباتی که بتوانند چنین اثری را داشته باشند می‌توانند برای درمان بیماری آلزایمر مفید واقع گردند (۲۴).

PKC از طریق فسفریله کردن موقعیت Ser9 موجب مهار GSK3β می‌گردد (۲۵). غیر فعال شدن GSK3β منجر به افزایش β-catenin سیتوپلاسمی شده و در نتیجه موجب فعال شدن رونویسی ژن‌های هدف wnt مثل engrailed و cyclin-D1 خواهد شد (۲۵). Wnt-3a و لیتیم فعالیت PKC را تقلید می‌کنند و تنظیم تعدادی از اجزا مسیر سیگنالینگ wnt توسط ایزوفرم های PKC وابسته به کلسیم ممکن است در کنترل فرایند نوروتوکسیسیتی القا شده توسط Aβ مهم باشد. بنابراین پیشنهاد شده است که فعال سازی مسیر wnt می‌تواند یک مسیر درمانی برای AD باشد (۲۶).

DHEA علاوه بر تاثیر بر زنده ماندن نورون ها و حفاظت از آنها، در تمایز نورونی هم نقش دارد (۱۲). بررسی‌ها نشان داده‌اند که DHEA باعث تمایز سلول های بنیادی عصبی استخراج شده از dentate gyrus هیپوکامپ رت به نورون‌ها می‌گردد (۲۷). همچنین دیده شده است که DHEA منجر به تمایز و زنده ماندن سلول‌های بنیادی عصبی انسان در محیط حاوی EGF, LIF می‌شود (۲۸). مطالعات نشان داده‌اند که سطوح این نورواستروئیدها در مغز با افزایش سن کاهش می‌یابد و در نتیجه نوروژنز کاهش یافته و آپاپتوز سلولی افزایش می‌یابد که همان علایم دیده شده در بیماری آلزایمر است (۲۳). بنابراین نتایج این پژوهش نقش مهم نورواستروئیدها را در تکثیر سلول های عصبی در مغز را نشان می‌دهند. DHEA احتمالا منجر به فعال شدن PKC می‌گردد که این پروتئین کیناز به عنوان یک پروتئین کلیدی برای فسفریلاسیون GSK3β به شمار می‌رود (۲۹). تاکنون در مورد تاثیر DHEA بر روی این مسیر مطالعه‌ای صورت نگرفته است. دراین مطالعه با بررسی‌های ایمنوسیتوشیمی نشان داده شد که DHEA منجر به فسفریلاسیون GSK3β می‌گردد و با توجه به اینکه Alkon و همکارانش در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که یک مسیر برای فسفریلاسیون GSK3β فعال شدن مسیر PKC می باشد،

Archive of SID

www.SID.ir

فسفریلاسیون GSK3β در مطالعه حاضر احتمالا می‌تواند از طریق فعال سازی PKC رخ داده باشد (۲۵). به هر حال نیاز به بررسی‌های بیشتری است تا به یقین گفته شود که DHEA از طریق فعال سازی PKC و رسپتورهای NMDA منجر به فسفریلاسیون GSK3β می‌گردد. این مسئله از این نظر حائز اهمیت است که مهم‌ترین مسیری که اختلال در آن منجر به بیماری آلزایمر می شود مسیر Wnt است. Inestrosa و همکارانش در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که غیر فعال شدن مسیر سیگنالینگ Wnt باعث ایجاد علائم آلزایمر مثل تشکیل آمیلوئید بتا می‌گردد (۳). بنابراین هر ترکیب و دارویی که بتواند این مسیر را فعال کند، می‌تواند در درمان بیماری آلزایمر موثر واقع شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل که در اجرا و تامین مالی این تحقیق کمک نمودند، تشکر و قدر دانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Annaert W, De Strooper B. A cell biological perspective on Alzheimer's disease. Annu Rev Cell Develop Biol 2002; 18:25–51.
2. Crouch P J, Harding S, White A R, Camakaris J, Bush A I. Masters. Mechanisms of Aβ mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease. Int J Bioch Cell Biol 2008; 40: 181–98.
3. Inestrosa NC, Toledo EM. The role of *Wnt* signaling in neuronal dysfunction in Alzheimer's disease. Mol Neurodeg 2008; 3:9-15.
4. Ferrari G, Chaco M, Barrı´a MI, Garrido JL, Godoy JA, Olivares G, et al. Activation of Wnt signaling rescues neurodegeneration and behavioral impairments induced by β-amyloid fibrils. Mol Psych 2003; 8: 195–208.
5. Alvarez G, Munoz-Montano JR, Satrustegui J, Avila J, Bogonez E, Diaz-Nido J. Regulation of tau phosphorylation and protection against β -amyloid-induced neurodegeneration by lithium. Possible implications for Alzheimer's disease. Bipolar Disord 2002; 4:153–65.
6. Hoshi M, Sato M, Matsumoto S, Noguchi A, Yasutake K, Yoshida N. Spherical aggregates of β-amyloid (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3β. Proc Natl Acad Sci 2003;100: 6370–75.
7. Wei H, Leeds PR, Qian Y, Wei W, Chen R, Chuang D. β-Amyloid peptide-induced death of PC 12 cells and cerebellar granule cell neurons is inhibited by long-term lithium treatment. Eur J Pharmacol 2000;392:117–23.
8. Phiel CJ, Wilson CA, Lee VM, Klein PS.GSK-3β regulates production of Alzheimer's disease amyloid-β peptides. Nature 2003; 423:435–39.
9. Reisberg B, Doody R, Stoffler A, Schmitt F, Ferris S, Mobius HJ. Memantine in moderate-to-severe Alzheimer's disease. N Engl J Med 2003;348:1333–41.
10. Sarno P, Bijur N, Zmijewska A, Li X, Jope R. In vivo regulation of GSK3 phosphorylation by cholinergic and NMDA receptors. Neurobiol Aging 2006; 27:413–22.
11. Rogawski MA, Wenk GL. The neuropharmacological basis for the use of memantine in the treatment of Alzheimer's disease. CNS Drug Rev 2003; 9:275–308.
12. Maninger N, Wolkowitz OM, Reus V, Epel E, Mellon S. Neurobiological and neuropsychiatric effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate (DHEAS). Front in Neuroendocrin 2009; 30: 65–91.
13. Esler M. The influence of aging on the human sympathetic nervous system and brain norepinephrine turnover. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2002; 282: 909–16.
14. Krantic S. Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. Trends Neurosci 2005; 28: 670–76.
15. Belelli D, Lambert JJ. Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. Nat Rev Neurosci 2005; 6: 565–75.
16. Kimonides VG. Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (DHEAS) protect hippocampal neurons against excitatory amino acid-induced neurotoxicity. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 1852–57.
17. Suzuki M. Mitotic and neurogenic effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on human neural stem cell cultures derived from the fetal cortex. Proc Natl Acad Sci USA 2004;101: 3202–207.
18. Lockhart EM. Allopregnanolone attenuates N-methyl-Daspartate-induced excitotoxicity and apoptosis in the human NT2 cell line in culture. Neurosci Lett 2002; 328: 33–36.

Archive of SID

www.SID.ir

19. Xu B, Yang R, Chang F, Chen L, Xie G, Sokabe M, Chen L. Neurosteroid PREGS protects neurite growth and survival of newborn neurons in the hippocampal dentate gyrus of APPswe/PS1dE9 mice. Curr Alzheimer Res 2012; 9:361-72.

20. Alvarez A, Munoz JP, Maccioni RB. A cdk5-p53 stable complex is involved in the beta-amyloid induced degeneration of cdk5 activity in hippocampal neurons. Exp Cell Res 2001; 264:266-74.

21. De Ferrari GV, Chacon MA, Barria MI, Garrido JL, Godoy JA, Olivares G. Activation of Wnt signaling rescues neurodegeneration and behavioral impairments induced by beta-amyloid fibrils. Mol Psychiatry 2003; 8:195–208.

22. Hagg T. Molecular regulation of adult CNS neurogenesis: an integrated view. Trends Neurosci 2005; 28:589-95.

23. Charalampopoulos L, Remboutsika E, Margioris NA, Gravanis A. Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival. Cell 2008;19: 300-307.

24. Jope RS, Johnson GV. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. Trends Biochem Sci 2004; 29:95–102.

25. Alkon D, Sun MK , Nelson TJ. PKC signaling deficits: a mechanistic hypothesis for the origins of Alzheimer's disease. Trends Pharmacol Sci 2007; 28:23-46.

26. Ghribi O, Herman MM, Savory J. Lithium inhibits Aβ-induced stress in endoplasmic reticulum of rabbit hippocampus but does not prevent oxidative damage and tau phosphorylation. J Neurosci Res 2003; 71:853–62.

27. Azizi H, Mehrjardi N, Shahbazi E, Hemmesi K, Bahmani MK, Baharvand H. Dehydroepiandrosterone stimulates neurogenesis in mouse embryonal carcinoma cell- and human embryonic stem cell-derived neural progenitors and induces dopaminergic neurons. Stem cells Dev 2010; 19:809-18.

28. Roh M, Eom TY, Zmijewska AA, De Sarno P, Roth KA. Hypoxia activates glycogen synthase kinase-3 in mouse brain in vivo: protection by mood stabilizers and imipramine. Biol Psychiatry 2005; 57:278–86.

29. Pluchino N, Russo M, Santoro AN, Litta P, Cela V, Genazzani AR. Steroids hormones and BDNF. Neuroscience 2013 ;4522: 62-66.

Archive of SID

www.SID.ir