دانشور پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌وهفتم – شماره ۱۴۱
تیر ۱۳۹۸

نقش کانال‌های کلسیمی TRPM7 و مسیر PI3K/Akt kinase در اثر حفاظتی فاکتور رشد آندوتلیوم عروقی در مدل سلولی بیماری آلزایمر القاء شده با بتا آمیلوئید

نویسندگان: ژیلا مهرابی[1]، مهرداد افتخار اردبیلی[2]، مونا امیری[1]، توراندخت بلوچ‌نژاد مجرد[1]*

۱. مرکز تحقیقات فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

۲. گروه روانپزشکی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: توراندخت بلوچ‌نژاد مجرد E-mail: tmojarad@yahoo.com

دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۰۸
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۸/۰۳/۲۸
پذیرش: ۱۳۹۸/۰۴/۰۵

چکیده

مقدمه و هدف: بیماری آلزایمر، یک اختلال نورودژنراتیو پیشرونده است که درآن مرگ نورون‌های قشر مغز و هیپوکامپ هدف اصلی دژنراسیون نورونی هستند. علاوه برفرضیه‌های تجمع بتا آمیلوئید خارج سلولی و تولید کلافه های رشته ای عصبی، یکی از عوامل موثر در پاتولوژی بیماری آلزایمر، آسیب عروقی در افراد سالخورده از جمله اختلال در عملکرد فاکتور رشد آندوتلیال عروقی (Vascular Endothelial Growth Factor یا VEGF) است. مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر پیش درمان مدل سلولی بیماری آلزایمر القا شده توسط Aβ با غلظت‌های مختلف VEGF انجام شد.

مواد و روش‌ها: سلول های نوروبلاستمای انسانی (SH-SY5Y) پس از کشت و پاساژ، در گروه‌های کنترل، کنترل پیش تیمار شده با غلظت های ۰/۵، ۱، و ۲ نانومولار VEGF، بتا آمیلوئید، بتا آمیلوئید پیش تیمار شده با غلظت های ۰/۵، ۱، و ۲ نانومولار VEGF، بتا آمیلوئید پیش تیمار شده با موثرترین غلظت VEGF و آنتاگونیست کانال های TRPM7 (2-APB)، یا مهار کننده Akt بررسی شدند. برای بررسی بقای سلول، از تست سنجش بقای سلولی (MTT assay) استفاده شد.

نتایج: نتایج این مطالعه نشان داد که تیمار با بتا آمیلوئید، بقای سلولی را بطور معنی‌دار کاهش داد ($P<0/001$)، پیش تیمار با VEGF بطور وابسته به غلظت و در حد معنی‌دار موجب افزایش بقای سلولی گردید، و این اثر سودمند در حضور آنتاگونیست کانال‌های TRPM7 یا مهار کننده Akt مشاهده نشد.

نتیجه گیری: بطور کلی نتایج این مطالعه نشان داد که VEGF می‌تواند از کاهش بقای سلولی بر اثر بتا آمیلوئید جلوگیری نماید و اثر سودمند آن از طریق کانالهای TRPM7 و مسیر سیگنالینگ PI3K/Akt انجام می‌شود.

واژگان کلیدی: بیماری آلزایمر، بتا آمیلوئید، فاکتور رشد آندوتلیال عروقی، کانال TRPM7، PI3K/Akt

مقدمه

بیماری آلزایمر یک اختلال نورودژنراتیو برگشت ناپذیر و پیشرونده است که در آن علائمی مانند از دست رفتن حافظه، رفتارهای غیرمعمول، تغییرات شخصیتی و اختلالات شناختی که منجر به aphasia، apraxia، agnosia، اختلال در بینایی و علائم ثانویه از جمله پرخاشگری، توهم، افسردگی و بی تفاوتی می‌گردد، دیده می شود. این بیماری دارای علائم مختلفی است، که براساس معیارهای تقسیم بندی انستیتو ملی نقائص عصبی آمریکا، به صورت علائم مشخص، علائم احتمالی و علائم ممکن تقسیم‌بندی می‌شود. بطور کلی علامتهای بارز پاتولوژیکی بیماران آلزایمری شامل رسوبات آمیلوئید در پلاکهای پیری و در کلافهای نوروفیبرلاری و دیواره عروق خونی، نوریتیس دیستروفیک و از دست دادن سیناپسهای عصبی است (۱, ۲). موتاسیونها در پیش سازهای پروتئین آمیلوئید، منجر به ظهور زودرس بیماران آلزایمری می‌شود. همه موتاسیونهای مرتبط با بیماران آلزایمری تولید Aβ را افزایش می‌دهند؛ به نظر می‌رسد که تولید آنتی‌بادیهای آنتی آمیلوئید در انسان مبتلا به بیماران آلزایمری پروسه بیماری را بهبود می‌بخشد. تشکیل کلافهای نوروفیبریلی، اکسیداسیون و پراکسیداسیون چربی، اگزوتوکسیسیتی گلوتاماترژیک، التهاب و فعال شدن آبشار مرگ سلولی در اثر آپوپتوز، بعنوان دومین پیامد تولید و رسوب Aβ در نظر گرفته می شوند (۳-۵). فرضیه‌هایی برای پاتولوژی بیماران آلزایمری در نظر گرفته شده است که تأکید آنها بیشتر بر روی نقش بالقوه آنومالیهای پروتئینtau ، فلزات سنگین، فاکتورهای عروقی و عفونتهای وایرال است (٦, ۷). مغز در بالغین دارای قابلیت تولید نورون‌های جدید است اما این قابلیت با توجه به دسترسی ناکافی به فاکتورهای رشد محدود می‌شود (۸, ۹). نه تنها نوروتروفین‌ها بلکه فاکتورهای رشد آنژیوژنیک و هماتوپویتیک با تعاملی که با نورون‌ها و سایر سلول‌های مغزی دارند سیستم عروقی مغز را تحت تاثیر قرار می‌دهند (۸, ۹). عدم تعادل میزان این فاکتورهای رشد میان خون و مایع مغزی –نخاعی می‌تواند بیانگر اختلال سیستم عروقی در بیماران آلزایمر باشد (۸, ۹). یک واحد نورووازکولار یک سیستم پیچیده سلولی است که از پریسیت‌ها، سلول‌های آندوتلیال، آستروسیت‌ها، نورون‌ها و ماتریکس خارج سلولی تشکیل شده است. اختلال در سد خونی-مغزی سهم عمده ای در پیری و رخداد مراحل اولیه بیماری آلزایمر دارد (۲, ۱۰). براساس نظریه Bell اختلال در عملکرد عروقی و هیپوپرفیوژن مغز مقدم بر نورودژنراسیون در بیماری آلزایمر است. اختلال عروقی منجر به افزایش نفوذپذیری سد خونی-مغزی، ادم مغز و در نتیجه اختلال در عملکرد نورون ها می شود (۱۱, ۱۲). در بیماری آلزایمر، بتا آمیلوئید و فرم فسفریله پروتئین Tau به ساختمان سد خونی- مغزی آسیب می‌رساند و نفوذپذیری سلول‌های آندوتلیالی عروق را افزایش می‌دهد، در نتیجه تبادل میان خون و فاکتورهای CSF افزایش می‌یابد (۱۱, ۱۲). VEGF یکی از مهمترین فاکتورهای رشد پیش آنژیوژنیک است که در شرایط هیپوکسی با استفاده از فاکتور نسخه‌برداری HIF-1 القا می‌شود. VEGF با فراخوانی سلول‌های میلوئیدی گردش خونی و سلول‌های پروژنیتور مشتق از مغز استخوان موجب وازکولاریزاسیون جدید می‌شود. این فاکتور رشد موجب رشد اکسون، افزایش بقای سلول‌های عصبی و تکثیر سلول‌های شوان در گانگلیون‌های ریشه پشتی نخاع و گانگلیون فوقانی گردن می‌شود. VEGF نورون‌های حرکتی را در برابر ایسکمی محافظت کرده و نورون‌ها را در برابر توکسیسیتی مشتق از گلوتامات محافظت می کند (۱۳, ١٤). یکی از مهمترین ایزوفرم های VEGF که مطالعات زیادی در مورد آن انجام شده است VEGF-A است که شرایط هیپوکسی بیان این ایزوفرم را بیش از سایر ایزوفرم‌ها افزایش می‌دهد (۱۳, ١٤). ادم و هیپرمیا منتج از ایسکمی می‌تواند به راحتی به سیستم اعصاب مرکزی آسیب برساند ولی VEGF-A بدلیل داشتن اثرات آنتی سایتوتوکسیک بر روی نورون‌ها بعنوان یک عامل نوروپروتکتیو آندوژن می‌تواند

از آسیب‌های ایسکمیک جلوگیری کند (۱۳, ۱٤). مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر پیش درمان با غلظت‌های مختلف VEGF در مدل سلولی بیماری آلزایمر القا شده توسط Aβ و نقش کانالهای کلسیمی TRPM7 و مسیر PI3K/Akt kinase انجام شد.

مواد و روش ها

رده سلولی نوروبلاستمای انسان از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و در مخلوط Ham,s F-12 و مدیوم Dulbecco,s modified Eagle (DMEM/F12) همراه با سرم ۱۰ درصد Fetal bovine، ۲ میلی مول L-glutamine و 100U/ml پنی‌سیلین G در ۱۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر استرپتومایسین ، در درجه حرارت۳۷°C و ۵ درصد گاز کربنیک نگه داری شدند.

پروتکل شمارش سلولی با استفاده از تریپان بلو

جهت کاشت سلول، به شمارش و برداشت تعداد مشخصی سلول از سوسپانسیون تهیه شده نیاز داشتیم. در روش شمارش مستقیم، غلظت سوسپانسیون سلولی به کمک رنگ تریپان بلو و لام هموسایتومتر مشخص می‌گردد. سلولهای سالم به دلیل داشتن غشای سالم از ورود رنگ آبی تریپان بلو به داخل سلول ممانعت می‌کند و در زیر میکروسکوپ نوری به صورت شفاف دیده می‌شوند. در حالیکه سلولهای مرده بصورت آبی رنگ و با اندازهٔ درشت تر مشاهده می‌گردند.

شمارش سلولی به صورت زیر انجام شد:

۱- از سوسپانسیون سلولی تهیه شده، ۲۰ میکرولیتر با کمک سمپلر برداشته و با ۲۰ میکرولیتر تریپان بلو مخلوط کرده و ۲۰ میکرولیتر از ترکیب حاصل به آرامی و به گونه‌ای که حباب تشکیل نشود، بر روی لام هموسایتومتر منتقل گردید.

۲- سلولهای زنده در حداقل ٤ بخش لام (مربع وسط و ٤ مربع کناری) در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ٤۰ X شمارش شدند.

گروه‌های مورد مطالعه

سلولهای SH- SY- 5Y به تعداد ۱۵۰۰۰ در حجم ۱ میلی لیتر محیط کشت کامل در هر چاهک در یک پلیت ٤۸ چاهکی کاشته شد و ۳ چاهک برای هر گروه مورد مطالعه در نظر گرفته شد. گروهها به شرح زیر بودند:

۱- گروه کنترل: در این گروه هیچ گونه تیماری بر روی سلول‌ها صورت نگرفت. چاهک‌های حاوی سلول‌های SH- SY- 5Y تنها با ۱ میلی لیتر محیط کشت پر شدند و به مدت ٤۸ ساعت انکوبه شدند.

۲- گروه کنترل پیش تیمار شده با VEGF- A 165b: در این گروه به هر چاهک 10 µl از غلظت‌های مورد نظر VEGF- A 165b (۱۰۰ و ۲۰۰ نانومولار) افزوده شد و به مدت ۲٤ ساعت انکوبه شدند.

۳- گروه β آمیلوئید: در این گروه به منظور ایجاد مدل سلولی آلزایمر، به هر چاهک 10 µl از محلول حاوی β آمیلوئید ٤۲ -۱ افزوده شد و به مدت ۲٤ ساعت انکوبه شد.

٤- گروه β آمیلوئید پیش تیمار شده با VEGF- A 165b: به چاهکهای این گروه ۲٤ ساعت پس از پیش تیمار سلولها با غلظت های مختلف (۱۰۰ و ۲۰۰ نانومولار)، β آمیلوئید ٤۲ -۱ (۲۰ میکرومولار) افزوده شد و مجدداً به مدت ۲٤ ساعت انکوبه شدند.

۵- گروه β آمیلوئید پیش تیمار شده با VEGF- A 165b و مهار کننده Akt(Akt. در این گروه ۲٤ ساعت پس از پیش تیمار سلولها با VEGF- A 165b (با غلظت ۲۰۰ نانومولار)، به هر چاهک LY- 294 10 µl به مدت ۱ ساعت پیش از افزودن β آمیلوئید، اضافه شد و مجدداً به مدت ۲٤ ساعت انکوبه شد.

٦- گروه β آمیلوئید پیش تیمار شده با VEGF- A 165b و آنتاگونیست کانال TRPM7: در این گروه ۲٤ ساعت پس از پیش تیمار سلولها با VEGF- A 165b (با غلظت ۲۰۰ نانومولار)، به هر چاهک 2 10 µl APB (۱۰ میکرومولار) به مدت ۱ ساعت پیش از افزودن β آمیلوئید ٤۲ -۱، اضافه شد و مجدداً به مدت ۲٤ ساعت انکوبه شد.

۷- گروه β آمیلوئید ٤۲ -۱ و مهار کننده Akt: در این گروه ۱ ساعت پیش از افزودن β آمیلوئید ٤۲ -۱ به

سلولها، به هر چاهک 10 µl LY- 294 (۱ میکرومولار) اضافه شد و به مدت ۲٤ ساعت انکوبه شد.

۸- گروه β آمیلوئید ٤۲ -۱ و آنتاگونیست کانال TRPM7: در این گروه ۱ ساعت پیش از افزودن β آمیلوئید ٤۲ -۱ به سلولها، به هر چاهک 10 µl 2 APB (۱۰ میکرومولار) اضافه شد و به مدت ۲٤ ساعت انکوبه شد. در تمامی چاهکها، یکسان سازی حجم توسط PBS صورت گرفت.

تست سنجش بقای سلولی (MTT assay)

در تست MTT میزان بقاء سلولی با تعیین کمّی یک محصول متابولیک مورد ارزیابی قرار می‌گیرد، که نشان دهندهٔ فعالیت میتوکندری سلولها می باشد و رابطهٔ مستقیم با رشد سلولها و متعاقباً بقاء آنها دارد. MT یک نمک تترازولیوم زرد رنگ می‌باشد که توسط آنزیم دهیدروژناز موجود در میتوکندری فعال سلول‌های زنده احیا می‌شود. و به ماده‌ای ارغوانی رنگ بنام فورمازان که کریستالی و نامحلول می باشد، تبدیل می شود. این کریستالهای تشکیل شده در حلال مناسب خود (معمولاً DMSO) حل شده و شدت جذب نوری محلول رنگی حاصل توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج nm 600 -500 اندازه گیری می شود. در مواردی که سلولهای زنده بیشتر باشد، در اثر فعالیت آنزیم ردوکتاز میتوکندری MTT بیشتر به فورمازان تبدیل می‌شود، و در نتیجه رنگ ارغوانی بیشتری تولید می‌گردد، به عبارت دیگر وجود رنگ ارغوانی بیشتر بیانگر میزان سلول زنده بیشتر می‌باشد. در این تحقیق، سنجش MTT بصورت زیر انجام شد:

پس از شمارش سلول‌ها بوسیله لام نئوبار تعداد ۲۰۰۰۰ از انها در هر چاهک پلیت ۹٦ چاهکی ریخته شد. به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر محیط DMEM کامل اضافه گردید. پلیت حاوی سلولها به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور نگهداری شدند تا سلولها به کف آن بچسبند. بعد از اعمال تیمارهای مورد نظر، پودر MTT حل شده در PBS که با نسبت mg/ mg ۵ بود، به هر چاهک مقدار ۰.۵ میلی‌گرم MTT اضافه گردید. بعد از MTT پلیت حاوی سلولها به مدت ۲ ساعت در انکوباتور نگهداشته شدند. سپس تمامی مایع موجود در چاهکها تخلیه شد و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد. (DMSO با نفوذپذیر کردن غشای سلولی و انحلال فورمازان در خود باعث می‌شود رنگ ارغوانی آن در محیط چاهکها پخش گردد). سپس پلیت چند بار به آرامی تکان داده شده تا رنگ ارغوانی کاملاً در محیط چاهک پخش گردید. جذب نوری رنگ ارغوانی چاهکها بوسیله دستگاه الایزا ریدر در طول موج ٤۹۰ نانومتر خوانده شد.

آنالیز آماری

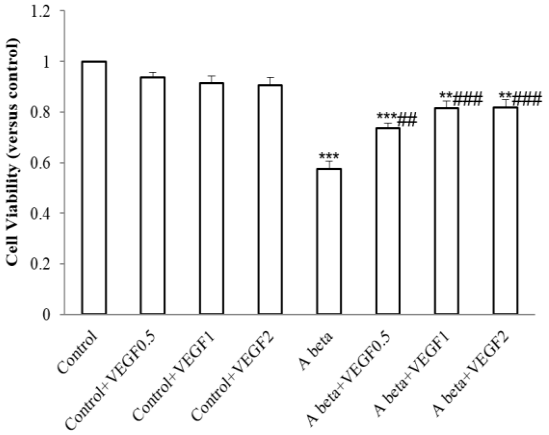
تمامی آزمایشات بصورت Triplicate انجام شد. نتایج بصورت میانگین± خطای استاندارد بیان گردیده است. برای مقایسه متغیرها بین گروه‌های مورد مطالعه از روش آنالیز واریانس یکطرفه (One Way ANOVA) و همچنین آزمون تکمیلی توکی استفاده گردید. معیار معنی‌دار بودن تفاوت‌ها $P< 0.05$ در نظر گرفته شد. محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS، Version 23، صورت گرفت.

نتایج

بررسی بقای سلولی(MTT، 3,4,5 Dimethyl Thiazol 2yl 2,5 Diphenyl Tetrazolium Bromide) در سلولهای SH-SYS5Y در معرض β آمیلویید ٤۲-۱ در حضور غلظت‌های متفاوت VEGF و A-165b

در بررسی انجام شده، پس از پیش تیمار سلولهای SH-SY-5Y با VEGF A-165b با غلظتهای ۰.۵، ۱ و ۲ نانومولار و در معرض قرار دادن آنها با β آمیلویید، میزان بقای سلولی بررسی گردید. نتایج بدست آمده نشان داد که سلولهایی که در معرض β آمیلویید قرار گرفته بودند، کاهش معنی‌دار و قابل ملاحظه‌ای در بقای سلولی در مقایسه با گروه کنترل داشتند ($P<0.001$). بعلاوه پیش تیمار سلول‌های SH-SY-5Y در معرض β آمیلویید ٤۲-۱ با غلظت‌های مختلف VEGF و به صورت وابسته به غلظت در مقایسه با گروه β آمیلویید باعث افزایش قابل ملاحظه‌ای در بقای سلولی شد ($P<0.01$-

(P<0.001) (نمودار ۱).



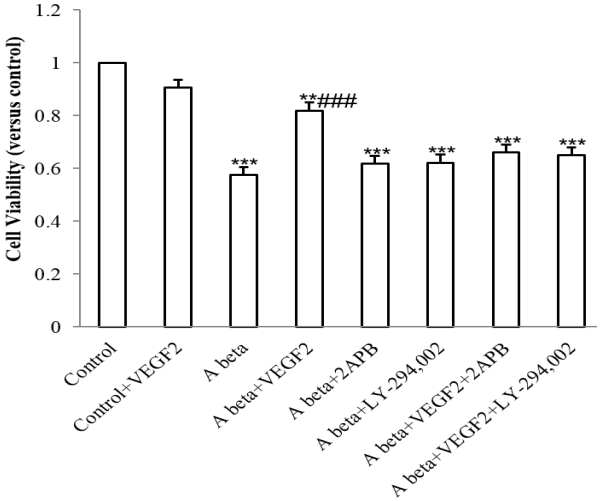
نمودار ۱. اثر غلظت‌های مختلف VEGF- A 165b بر میزان بقای سلولی در سلول‌های SH- SY 5Y در حضور β آمیلوئید ۴۲ -۱.

VEGF در غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ نانومولار و آمیلوئید بتا در غلظت ۲۰ میکرومولار استفاده شد.

** p<0.01، *** p<0.001 (در مقایسه با کنترل)

p<0.01، ### p<0.001 (در مقایسه با A beta)

در این بررسی، پس از پیش تیمار سلولهای SH-SY-5Y با VEGF A-165b با غلظت ۲ نانومولار و در معرض قرار دادن آنها با β آمیلویید، میزان بقای سلولی در حضور آنتاگونیست کانال های TRPM7 (2APB) یا مهار کننده Akt (LY-294) نیز بررسی گردید. نتایج بدست آمده نشان داد که سلولهایی که در معرض β آمیلویید قرار گرفته بودند، کاهش معنی دار و قابل ملاحظه‌ای در بقای سلولی در مقایسه با گروه کنترل داشتند (P<0.001). بعلاوه، پیش تیمار سلولهای SH-SY-5Y در معرض β آمیلویید ۴۲-۱ با غلظت ۲ نانومولار VEGF در مقایسه با گروه β آمیلویید باعث افزایش قابل ملاحظه‌ای در بقای سلولی شد (P< 0.001). همچنین در گروه‌های 2 APB و LY 294 که با VEGF A-165b پیش تیمار شدند، در مقایسه با گروه کنترل، کاهش معنی‌دار و چشمگیری در بقای سلولی مشاهده شد (P<0.001). در این خصوص اثرات سودمند VEGF A-165b در حضور آنتاگونیست کانال‌های TRPM7 (2APB) یا مهار کننده Akt (LY-294) بدست نیامد (نمودار ۲).



نمودار ۲. اثر آنتاگونیست کانال‌های TRPM7 (2APB) یا مهار کننده Akt (LY-294) در حضور VEGF- A 165b و β آمیلوئید ۴۲ -۱بر میزان بقای سلولی در سلول‌های SH- SY 5Y.

VEGF در غلظت ۲ نانومولار و آمیلوئید بتا در غلظت ۲۰ میکرومولار استفاده شد.

** p<0.01، *** p<0.001 (در مقایسه با کنترل)

p<0.001 (در مقایسه با A beta)

بحث

یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که VEGF می تواند از کاهش بقای سلولی بر اثر بتا آمیلوئید جلوگیری نماید و اثر سودمند آن از طریق کانال‌های TRPM7 و مسیر سیگنالینگ PI3K/Akt انجام می شود.

بیماری آلزایمریک اختلال نورودژنراتیو است که استرس اکسیداتیو یک عامل کلیدی آن می‌باشد. اتیولوژی این بیماری مولتی فاکتوریال است. هر دو فاکتور ژنتیک و محیط بعنوان فاکتورهای خطر AD در نظر گرفته می‌شوند. چندین عامل استرس اکسیداتیو در طی سال‌ها شناخته شده‌اند. نقش اولیه برعهده میتوکندری است که باعث تولید و تجمع رادیکال‌های آزاد اکسیژن میشود. علاوه بر میتوکندری، التهاب نیز آسیب اکسیداتیو را القاء می‌کند، بویژه از طریق میکروگلیا، که این میکروگلیاها در پیدایش بیماری مهم هستند. در این بیماری هر دو عملکرد میتوکندریال و پاسخ التهابی تحت تأثیر قرار می‌گیرند که منتهی به

افزایش تشکیل ROS و آسیب اکسیداتیو به لیپیدها، پروتئینها و اسیدهای نوکلئیک می‌شود. رادیکال‌های آزاد، گونه‌های شیمیایی هستند، با یک تک الکترون که در طی مراحل فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی تشکیل شده‌اند. اگرچه گونه‌های اکسیژن واکنش‌پذیر (ROS) یک نقش محوری در چندین مسیر سلولی و سیگنالینگ در غلظت‌های فیزیولوژیکی (تنظیم سیکل سلولی، فاگوسیتوز و فعالیت آنزیمی) بازی می‌کند، تولید بیش از حد ROS منجر به چندین اثر مضر شامل آسیب DNA، لیپیدها و پروتئینها میشود (۱۵–۱۷). ROS، اگرچه بوسیله مکانیسم‌های دفاعی شناخته شده تحت عنوان آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی پدید می‌آیند، یک عدم تعادل در این شرایط اکسیدان- آنتی‌اکسیدان می‌تواند وسعت آسیب را تعیین کند. عملکرد میتوکندریال و آپوپتوز همراه با یک شرایط ضعیف آنتی‌اکسیدانی، مکانیسم‌های پاتوژنز برای AD هستند (۱۵–۱۷). La Bras و همکارانش نشان دادند که بالا رفتن ROS از طریق افزایش نفوذپذیری غشای میتوکندری، آزادسازی کلسیم، تخلیه فاکتورهای تقویت کنندل آپوپتوز از میتوکندری، فعالسازی کاسپاز و آسیب DNA می‌تواند موجب مرگ سلولی شود (۱۵, ۱٦). مطالعات قبلی نقش آنیون سوپر اکساید، رادیکال هیدروکسیل، پراکسید هیدروژن و نیتریک اکساید در نورودژنراسیون بیماری آلزایمر بواسطه استرس اکسیداتیو را نشان داده‌اند. فعالیت میکروگلیا منجر به آسیبهای نورونی می‌شود که تولید رادیکال‌های سوپر اکساید را بیش از حد می‌کنند (۱۸–۲۰). تقاضای متابولیک بیشتر و خصلت Postmitotic سلولهای گلیال و نورونها، آنها را نسبت به استرس اکسیداتیو آسیب پذیرتر می‌کند. میزان پایین رژنراسیون مغز و پتانسیل ناکافی آنتی‌اکسیدانی در مغز، اثر استرس اکسیداتیو را در ان بیشتر می‌کند (۱۸–۲۰). مشخص شده است که Aβ1-42 یک فاکتور کلیدی در نورودژنراسیون در بیماران مبتلا به آلزایمر است و اثرات آسیب‌رسان آن از طریق القاء استرس اکسیداتیو در مغز وساطت می‌شود یک ارتباط مثبت بین پلاک آمیلویید و مارکرهای پراکسیداسیون لیپید مانند ٤-هیدروکسی نوننال و مالون دی آلدئید نشان داده شده است. مرگ سلولی در نتیجه تغییرات در مولکولهای لیپیدی غشاء، سیالیت، سختی، نفوذپذیری و انتقال با واسطهٔ گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن رخ می‌دهد. در نظر گرفته شده است که کورتکس انتورینال و ناحیهٔ CA1 هیپوکامپ دو ناحیهٔ اصلی مغزی مستعد برای استرس اکسیداتیو هستند. آسیب میتوکندری در بیماری آلزایمر می‌تواند به تولید بیش از اندازه ROS و تولید کمتر ATP منتهی شود (۲۱–۲٤). در مطالعه حاضر، پس از اضافه نمودن بتا آمیلوئید ٤۲ –۱ به سلولهای SH- SY-5Y، بقای سلولی کاهش بارز و معنی دار نشان داد که این در مطالعات قبلی نیز نشان داده شده است (۲۵–۲۷). بعلاوه، اضافه نمودن آنتاگونیست کانال‌های TRPM7 (2APB) یا مهار کننده Akt (LY-294) موجب حذف اثر سودمند پیش تیمار سلول‌های SH-SY5Y با VEGF گردید. در تایید این یافته، محققان نشان داده اند که فاکتور رشد اندوتلیوم عروقی قادر است بیان TRPV1 را از طریق مسیر PI3K/Akt تنظیم نماید (۲۸). با این حال، انجام مطالعات بیشتر در این زمینه توصیه می شود.

بطور کلی، داده‌های این مطالعه نشان میدهد که فاکتور رشد اندوتلیوم عروقی (VEGF- 165B) موجب کاهش آسیب سلولی ناشی از بتا آمیلوئید ۱– ٤۲ در سلولهای SH-SY5Y بعنوان یک مدل in vitro بیماری آلزایمر می‌شود و اثر سودمند آن از طریق کانال‌های TRPM7 و مسیر سیگنالینگ PI3K/Akt انجام می‌پذیرد.

تقدیر و تشکر

این مقاله مستخرج از پایان نامه دانشجوی کارشناسی ارشد ژیلا مهرابی می‌باشد که با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی ایران (گرنت شماره ۲٦۹٤۱–۳۰–۰۵–۹٤) انجام شده است.

تضاد منافع

وجود ندارد

منابع

1. Su XQ, Wang J, Sinclair AJ. Plasmalogens and Alzheimer's disease: a review. Lipids in Health and Disease 2019;18(1):100.
2. Wong KH, Riaz MK, Xie Y, Zhang X, Liu Q, Chen H, et al. Review of Current Strategies for Delivering Alzheimer's Disease Drugs across the Blood-Brain Barrier. International Journal of Molecular Sciences 2019;20.
3. Anand A, Patience AA, Sharma N, Khurana N. The present and future of pharmacotherapy of Alzheimer's disease: A comprehensive review. European journal of pharmacology 2017 ; 364: 815-75.
4. Tzioras M, Davies C, Newman A, Jackson R, Spires-Jones T. Invited Review: APOE at the interface of inflammation, neurodegeneration and pathological protein spread in Alzheimer's disease. Neuropathology and Applied Neurobiology 2019;45: 327-46.
5. Umar T, Hoda N. Alzheimer's Disease: A Systemic Review of Substantial Therapeutic Targets and the Leading Multi-functional Molecules. Current Topics in Medicinal Chemistry 2017;17(31):3370-89.
6. Andrade S, Ramalho MJ, Loureiro JA, Pereira MDC. Natural Compounds for Alzheimer's Disease Therapy: A Systematic Review of Preclinical and Clinical Studies. International Journal of Molecular Sciences 2019;20.
7. Hill E, Goodwill AM, Gorelik A, Szoeke C. Diet and biomarkers of Alzheimer's disease : a systematic review and meta-analysis. Neurobiology of Aging 2019;76:45-52.
8. Paillard T, Rolland Y, de Souto Barreto P. Protective Effects of Physical Exercise in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease: A Narrative Review. Journal of Clinical Neurology (Seoul, Korea) C2015;11(3):212-9.
9. Seifan A, Schelke M, Obeng-Aduasare Y, Isaacson R. Early Life Epidemiology of Alzheimer's Disease--A Critical Review. Neuroepidemiology 2015;45(4):237-54.
10. Garwood CJ, Ratcliffe LE, Simpson JE, Heath PR, Ince PG, Wharton SB. Review: Astrocytes in Alzheimer's disease and other age-associated dementias: a supporting player with a central role. Neuropathology and Applied Neurobiology 2017;43(4):281-98.
11. Liu Y, Braidy N, Poljak A, Chan DKY, Sachdev P. Cerebral small vessel disease and the risk of Alzheimer's disease: A systematic review. Ageing Research Reviews 2018;47:41-8.
12. Zhan X, Stamova B, Sharp FR. Lipopolysaccharide Associates with Amyloid Plaques, Neurons and Oligodendrocytes in Alzheimer's Disease Brain: A Review. Frontiers in Aging Neuroscience 2018;10:42.
13. Karaman S, Leppanen VM, Alitalo K. Vascular endothelial growth factor signaling in development and disease. Development (Cambridge, England) 2018;145.(١٤)
14. Melincovici CS, Bosca AB, Susman S, Marginean M, Mihu C, Istrate M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. Romanian Journal of Morphology and Embryology 2018;59(2):455-67.
15. Angeloni C, Barbalace MC, Hrelia S. Icariin and Its Metabolites as Potential Protective Phytochemicals Against Alzheimer's Disease. Frontiers in Pharmacology 2019;10:271.
16. Bahn G, Jo DG. Therapeutic Approaches to Alzheimer's Disease Through Modulation of NRF2. Neuromolecular Medicine 2019;21(1):1-11.
17. Goschorska M, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, Metryka E, Skorka-Majewicz M, Chlubek D. Potential Role of Fluoride in the Etiopathogenesis of Alzheimer's Disease. International Journal of Molecular Sciences 2018;19).
18. Bisht K, Sharma K, Tremblay ME. Chronic stress as a risk factor for Alzheimer's disease: Roles of microglia-mediated synaptic remodeling, inflammation, and oxidative stress. Neurobiology of Stress 2018;9:9-21.
19. Du X, Wang X, Geng M. Alzheimer's disease hypothesis and related therapies. Translational Neurodegeneration 2018;7:2.
20. Pinto A, Bonucci A, Maggi E, Corsi M, Businaro R. Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory Activity of Ketogenic Diet: New Perspectives for Neuroprotection in Alzheimer's Disease. Antioxidants (Basel, Switzerland) 2018;7.(٥)
21. Bjorklund G, Aaseth J, Dadar M, Chirumbolo S. Molecular Targets in Alzheimer's Disease. Molecular Neurobiology 2019.
22. Kubis-Kubiak AM, Rorbach-Dolata A, Piwowar A. Crucial players in Alzheimer's disease and diabetes mellitus: Friends or

foes? Mechanisms of Ageing and Development 2019;181:7-21.

23. Perez Ortiz JM, Swerdlow RH. Mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: Role in pathogenesis and novel therapeutic opportunities. British Journal of Pharmacology 2019.
24. Sharman MJ, Verdile G, Kirubakaran S, Parenti C, Singh A, Watt G, et al. Targeting Inflammatory Pathways in Alzheimer's Disease: A Focus on Natural Products and Phytomedicines. CNS Drugs 2019;33(5):457-80.
25. Alvarino R, Alonso E, Lacret R, Oves-Costales D, Genilloud O, Reyes F, et al. Caniferolide A, a Macrolide from Streptomyces caniferus, Attenuates Neuroinflammation, Oxidative Stress, Amyloid-Beta, and Tau Pathology in Vitro. Molecular Pharmaceutics 2019; 6: 1456-66.
26. Hettiarachchi N, Dallas M, Al-Owais M, Griffiths H, Hooper N, Scragg J, et al. Heme oxygenase-1 protects against Alzheimer's amyloid-beta(1-42)-induced toxicity via carbon monoxide production. Cell Death & Disease 2014;5:e1569.
27. Liu XY, Zhang LJ, Chen Z, Liu LB. The PTEN inhibitor bpV(pic) promotes neuroprotection against amyloid beta-peptide (25-35)-induced oxidative stress and neurotoxicity. Neurological Research 2017;39(8):758-65.
28. Pan B, Ding H, Cheng Z, Song Z, Xiao D, Guo Q .[Vascular endothelial growth factor antibody attenuates diabetic peripheral neuropathic pain in rats]. Zhong nan da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Central South University. Medical sciences 2018;43(10):1097-102.

Daneshvar

Medicine

Scientific-Research Journal of Shahed University
27th Year, No.141
June- July 2019

Daneshvar(medicine) shahed University/ 27th year/2019 /NO.141

Received: 28/04/2019
Last revised: 18/06/2019
Accepted: 26/06/2019

Involvement of TRPM7 calcium channels and PI3K/AKT kinase pathway in protective effect of vascular endothelial growth factor in amyloid beta-induced model of Alzheimer's disease

Jila Mehrabi[1], Mehrdad Eftekhar Ardebili[2], Mona Amiri[1], Tourandokht Baluchnejadmojarad[1*]

1. Physiology Research Center, Department of Physiology, School of Medicine, Iran Univ. Med. Sci., Tehran, Iran.
2. Department of Psychiatrics, School of Medicine, Iran Univ. Med. Sci., Tehran, Iran.

*** Corresponding author e-mail: tmojarad@yahoo.com**

Abstract

Background and Objective: Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder, in which cortical and hippocampus neurons death is the main target of neurodegeneration. In addition to extracellular beta amyloid accumulation and the production of neural tangles, one of effective factors in the pathology of Alzheimer's disease is vascular injury in the elderly including disturbance in vascular endothelial growth factor (VEGF) function. The present study was conducted to investigate the effect of pre-treatment with different concentrations of VEGF in a cellular model of Aβ-induced Alzheimer's disease.

Materials and Methods: After culturing and passaging human neuroblastoma cells (SH-SY5Y), they were evaluated in control, control pretreated with different concentrations of VEGF (0.5, 1 and 2 nM), amyloid beta, amyloid beta with the same concentrations of VEGF, and amyloid beta pretreated with the most effective concentration of VEGF in addition to TRPM7 channels antagonist (2-APB) or AKT inhibitor. For assessment of cell viability, MTT assay was applied.

Results: Findings of this study showed that amyloid beta significantly reduces cell viability ($p<0.001$), VEGF pretreatment significantly increases cell viability in a concentration-dependent manner, and this beneficial effect was not observed in the presence of TRPM7 channels antagonist or AKT inhibitor.

Conclusion: It is concluded that VEGF could prevent amyloid beta-induced reduction of cell viability and its beneficial effect is mediated through TRPM7 channels and PI3K/Akt signaling.

Keywords: Alzheimer's disease, Amyloid beta, Vascular endothelial growth factor, TRPM7 channel, PI3K/Akt