

## بررسی میزان فسفریلاسیون $GSK3\beta$ تحت تاثیر Dihydroepiandrosterone (DHEA) در سلول‌های پروژنیاتور عصبی جدا شده از کورتکس مغز جنین موش نژاد Balb/c

سمیه ابراهیمی باروق<sup>۱</sup>، کاظم پریور<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> دکتری زیست‌شناسی سلولی تکوینی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اردبیل، عضو باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان اردبیل  
<sup>۲</sup> استاد، گروه زیست‌شناسی جانوری، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران

### چکیده

**سابقه و هدف:** بررسی‌های مختلف نشان داده است که هرگونه اختلال در مسیر سیگنالینگ *wnt* با بیماری آلزایمر ارتباط مستقیم دارد. یکی از مولکول‌های مهم دخیل در فعال‌سازی یا غیرفعال‌سازی این مسیر مولکول  $GSK3\beta$  (Glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ) است. هدف اصلی در این تحقیق بررسی میزان فسفریلاسیون  $GSK3\beta$  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  $GSK3\beta$  تحت تاثیر DHEA، سلول‌های پروژنیاتور عصبی از کورتکس مغز جنین موش استخراج شده و سپس با غلظت ۱ میکرومولار از DHEA به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. بعد از ۴۸ ساعت میزان فسفریلاسیون  $GSK3\beta$  به روش ایمنوسیتوشیمی مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** در گروه تیمار، DHEA موجب افزایش فسفریلاسیون  $GSK3\beta$  نسبت به گروه شاهد شد.

**نتیجه‌گیری:** فسفریلاسیون  $GSK3\beta$  منجر به غیرفعال شدن  $GSK3\beta$  می‌گردد که همراه با فعال شدن مسیر سیگنالینگ *wnt* است که می‌تواند یک راهکار مناسب برای درمان بیماری آلزایمر محسوب شود.

**واژگان کلیدی:** سلول‌های پروژنیاتور عصبی، آلزایمر،  $GSK3\beta$ ، DHEA.

### مقدمه

پروتئین بنام آیلوئید بتا در مغز که به ایجاد رسوب و پلاک‌های پیری منجر می‌شود، می‌تواند موجب بروز این بیماری شوند. بیماری آلزایمر یکی از بیماری‌های نورودژنراتیو است که با دو مشخصه اصلی همراه است: ۱- تشکیل پلاک‌های آمیلوئیدی ۲- تشکیل Neurofibrillary tangles (NFTs) بر اثر هایپرفسفریلاسیون پروتئین tau که در نهایت با از بین رفتن نورون‌ها و تحلیل رفتن مغز همراه است. (۱، ۲)

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

بیماری آلزایمر یکی از انواع دمانس یا زوال عقل است. زوال عقل یک بیماری پیش‌رونده و مزمن است که موجب تحلیل سلول‌های مغزی شده و به اختلال شناختی در بیمار منجر می‌شود. 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

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

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 بیضه‌ها نیز ترشح می‌شود (۱۱). نورواستروئیدها توسط نورون‌ها و گلایها 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 نورودژنراتیو 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 GSK3 $\beta$  گردد (۱۵). علاوه بر اثرات neuroprotective، DHEA دارای اثرات نوروزن نیز می‌باشد. 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 نورون‌های 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 نوروزن 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 GSK3 $\beta$  صورت نگرفته است، لذا هدف مطالعه حاضر بررسی میزان فسفریلاسیون GSK3 $\beta$  تحت تاثیر DHEA در سلول‌های پروژنیاتور عصبی جدا شده از مغز جنین موش می‌باشد.

## مواد و روشها

### جداسازی سلول‌های پروژنیاتور 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

(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 سیگنالینگ Wnt و بیماری آلزایمر مشخص شد (۳). مطالعات گذشته ارتباط بین نوروتوکسیسیتی ایجاد شده توسط آمیلوئید بتا (A $\beta$ )، سطوح پایین سیتوپلاسمی  $\beta$ -catenin و از بین رفتن مسیر سیگنالینگ Wnt را نشان داده‌اند (۴). مطالعات انجام شده بر روی لیتیم نشان داده است که این عنصر منجر به مهار GSK3 $\beta$  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 A $\beta$  در بیماری آلزایمر نقش داشته باشد (۵).

گلیکوژن سینتاز کیناز  $\beta$ 3 (GSK3 $\beta$ ) 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 GSK3 $\beta$  شده و منجر به مرگ سلول‌ها در یک مسیر وابسته به GSK3 $\beta$  می‌گردد. از طرف دیگر خود GSK3 $\beta$  فعال شده منجر به تولید آمیلوئید بتا بیشتری می‌شود (۶).

بررسی‌ها نشان داده‌اند که GSK3 $\beta$  فعال شده (معروف به Tau کیناز I) در جسم سلولی نورون‌ها و نوریت‌های مغز بیماران آلزایمری یافت می‌شود (۷). فعالیت آنزیم GSK3 $\beta$  منجر به هایپرفسفریله شدن پروتئین Tau و از بین رفتن شبکه میکروتوبولی می‌گردد (۷). دیده شده است که بلوکه کردن فعالیت GSK3 $\beta$ ، از هایپرفسفریله شدن Tau جلوگیری نموده و اتصال آن را به شبکه میکروتوبولی به پیش می‌برد (۸). امروزه دانشمندان با توجه به این یافته‌ها به این نتیجه رسیده‌اند که استفاده از داروهایی که منجر به فسفریلاسیون سرین ۹ GSK3 $\beta$  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 فعالیست 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 GSK3 $\beta$  و فعال شدن مسیر سیگنالینگ

۱۰٪ منتقل گردید. پس از گذشت ۲۴ ساعت محیط کشت القایی که شامل DMEM به همراه غلظت  $1 \mu\text{M}$  از DHEA بود به سلول ها اضافه گردید (۱۲). به عنوان گروه شاهد، به یک سری از چاهک ها محیط فاقد DHEA اضافه شد. بعد از ۴۸ ساعت سلول ها با محلول پارافرمالدئید ۴٪ فیکس شده و برای ایمنوسیتوشیمی آماده شدند.

#### ایمنوسیتوشیمی (Immunocytochemistry)

آنتی بادی (abcam, USA)  $\text{GSK3}\beta\text{-P}$  برای تعیین تاثیر DHEA بر روی فسفریلاسیون  $\text{GSK3}\beta\text{-P}$  در ۴۸ ساعت بعد از تیمار سلول ها، مورد استفاده قرار گرفت. ایمنوسیتوشیمی به روش زیر انجام گردید: سلول ها با محلول پارافرمالدئید ۴٪ به مدت ۱۰ دقیقه تثبیت شدند، با محلول تریتون X100، ۰/۲٪ به مدت ۳۰ دقیقه 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 سلول ها اضافه گردید. سپس آنتی بادی اولیه  $\text{GSK3}\beta\text{-P}$  (با غلظت ۱:۲۰۰ در محلول بلوکه کننده) به مدت ۲ ساعت به سلول ها اضافه گردید. سپس از آنتی بادی ثانویه (abcam, USA) Goat anti-mouse IgG FITC (غلظت ۱:۵۰۰) بر علیه آنتی بادی اولیه استفاده شده و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. هسته سلول ها با DAPI رنگ آمیزی گردید. در نهایت عکسبرداری از سلول ها با استفاده از میکروسکوپ فلوروسنت معکوس انجام شد.

#### تحلیل آماری

نتایج با استفاده از نرم افزار تحلیل داده های آماری SPSS ویراست ۱۳ و آزمون های آماری T-test و ANOVA به صورت میانگین  $\pm$  خطای معیار مورد ارزیابی قرار گرفت. رسم نمودارها در نرم افزار Excel انجام گرفت. مقادیر  $p < 0/01$  معنی دار در نظر گرفته شد.

#### یافته ها

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

دست آوردن سلول های پروژنیاتور عصبی استفاده شد. مغز جنین ها خارج شده و در پلیت 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 ۱۵ دقیقه در تریپسین EDTA (۰/۲۵-۰/۱٪) 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 سلول ها با دور RPM ۱۲۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سلول ها به درون ظرف های ۶ خانه ای منتقل شدند. محیط کشت مورد استفاده شامل DMEM همراه با EGF(40ng/ml) و bFGF (20ng/ml) بود (۱۹). محیط کشت سلول ها 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 سلول ها مشاهده شد. کلیه مواد مورد استفاده از Sigma تهیه گردید.

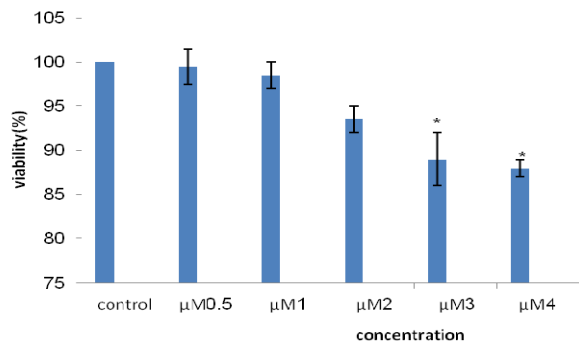
#### تعیین دوز مناسب DHEA توسط بررسی میزان زنده ماندن (viability) سلول ها با روش MTT

برای تعیین دوز مناسب DHEA جهت تیمار سلولی، ۲ میلی گرم از DHEA (Merck, Germany) در ۶/۹ 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  $0/5$ ،  $1$ ،  $2$ ،  $3$ ،  $4$  مورد آزمایش قرار گرفتند. به این منظور ابتدا سلول ها را با تراکم  $3 \times 10^4$  سلول در میلی لیتر در پلیت های ۲۴ خانه ای کوت شده با Poly-D-Lysine، حاوی محیط کشت DMEM و FBS ۱۰٪/۱ کشت داده شدند. بعد از یک شب انکوباسیون DHEA در غلظت های 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 سلول های زنده MTT را به فورمازان (formazan) آبی رنگ تبدیل می کنند و سبب تغییر رنگ محیط می شوند که این تغییر رنگ را می توان 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  $\beta$  GSK3 مورد استفاده قرار گرفت.

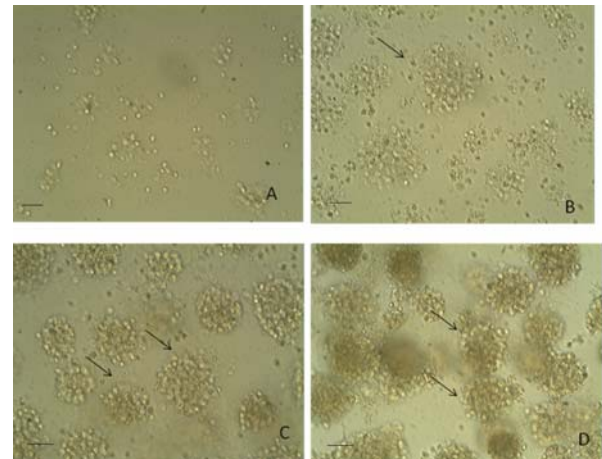
#### بررسی تاثیر DHEA بر روی فسفریلاسیون $\beta$ GSK3 در سلول های عصبی کشت داده شده

سلول ها در دانستیه  $10^4 \times 5$  به پلیت ۲۴ خانه ای حاوی ۰/۵ میلی لیتر محیط کشت DMEM حاوی FBS

گروه تیمار شده با DHEA (٪) در سلول‌های عصبی کشت داده شده ۴۸ ساعت بعد از تیمار  $21/4 \pm 1/5$  به دست آمد. نتایج در شکل ۲ آمده است.



**نمودار ۱.** مقایسه اثر غلظت‌های مختلف DHEA  $0.5, 1, 2, 3, 4 \mu\text{M}$  و  $0.5$  بر درصد بقاء (viability) سلول‌های عصبی کشت داده شده ۲۴ ساعت بعد از تیمار با DHEA به روش MTT assay. نتایج نشان داد که غلظت‌های  $0.5 \mu\text{M}$  و  $1 \mu\text{M}$  مناسبی جهت تیمار سلولها به حساب می‌آیند.



شکل ۱. فتومیکروگراف از سلول‌های عصبی کشت داده شده در روزهای صفر و ۱ و ۲. پیکان‌ها نوروسفرها را نشان می‌دهد که ۲ روز بعد از کشت کاملاً تشکیل شده‌اند. 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 شده‌اند. scale bar:  $100 \mu\text{m}$

### نتایج بدست آمده از بررسی غلظت‌های مختلف DHEA

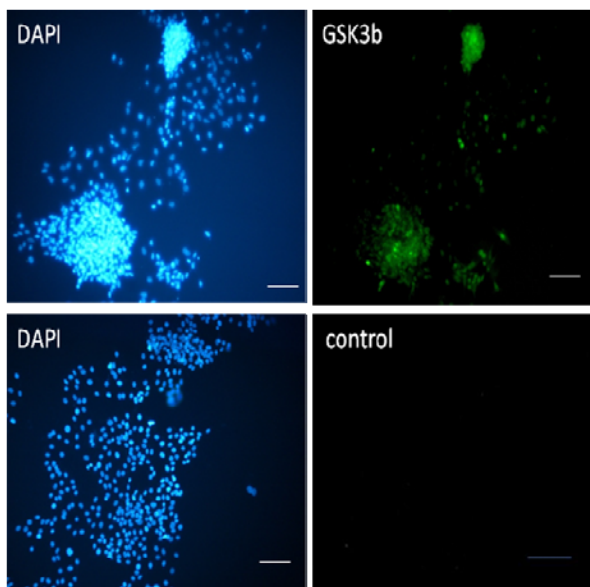
#### بر روی سلول‌ها

بررسی اثر غلظت‌های  $0.5, 1, 2, 3, 4, 5 \mu\text{M}$  از DHEA بر روی viability سلول‌ها به روش MTT انجام شد. نتایج نشان داد که غلظت‌های  $0.5 \mu\text{M}$  و  $1 \mu\text{M}$  مناسبی جهت تیمار سلول‌ها مناسب به حساب می‌آیند. در بررسی‌های مختلف جهت تمایز این سلول‌ها به نوروون از غلظت  $1 \mu\text{M}$  استفاده شده است (۱۵). نتایج در نمودار ۱ نشان داده شده است.

### بررسی تاثیر DHEA بر روی میزان فسفریلاسیون

#### GSK3β به روش ایمونوسیتوشیمی

پس از ۴۸ ساعت تیمار سلول‌ها با DHEA در غلظت  $1 \mu\text{M}$  از نظر مورفولوژیکی تغییرات خاصی در نمونه تیمار شده نسبت به نمونه شاهد مشاهده نشد. بعد از ۴۸ ساعت تیمار با DHEA در غلظت  $1 \mu\text{M}$ ، سلول‌ها به روش ایمونوسیتوشیمی جهت بررسی فسفریلاسیون GSK3β مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج نشان داد که در نمونه‌های تیمار شده DHEA موجب فسفریلاسیون GSK3β شده است، در حالی که در گروه شاهد بیان GSK3β فسفریله شده مشاهده نشد. درصد سلول‌های بیان کننده GSK3β-p در گروه تیمار شده با شمارش هسته سلول‌ها و سلول‌های بیان کننده GSK3β-p به دست آمد. نتایج نشان دهنده بیان GSK3β به میزان  $24/1$ ٪ نسبت به گروه شاهد بود. میزان بیان GSK3b در گروه شاهد صفر و در



**شکل ۲.** بررسی بیان GSK3β فسفریله شده در سلول‌های گروه شاهد و تیمار شده با DHEA به روش ایمونوسیتوشیمی پس از گذشت ۴۸ ساعت. نتایج نشان دهنده بیان GSK3β در گروه تحت تاثیر قرار گرفته با DHEA بعد از ۴۸ ساعت می‌باشد. همان طور که در شکل دیده می‌شود در گروه شاهد بیان GSK3β دیده نشد. Scal bar:  $100 \mu\text{m}$

### 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

مغز، کوچک تر شدن هسته های ساب کورتیکال و بزرگ شدن فضای و نتریکولار می باشد (۲۱). تمامی این علائم مربوط به بیماری های نورودژنراتیو مثل آلزایمر، پارکینسون، MS، ALS، هانتینگتون و صدمات وارده به مغز و Stroke می باشند (۲۱).

فرایند نوروزن در مغز بالغ مشابه با فرایندهایی است که در دوران جنینی رخ می دهد و باید یک تعادل و هماهنگی بین سیگنال های مختلف وجود داشته باشد تا منجر به نوروزنیز و گلیکوژنیز و خودنوزایی self-renewal سلول های بنیادی در مغز گردد. فاکتورهای مهمی در خودنوزایی بودن سلول های بنیادی نقش دارد و در واقع سرنوشت این سلول ها توسط ارتباطات بین فاکتورهای رونویسی، کنترل اپی ژنتیکی، تنظیم کننده های miRNA و سیگنال های خارج سلولی مشخص می شود (۲۲). به نظر می رسد که سیگنال های خارج سلولی مهم شامل Wnt, EGF, FGF نقش سرنوشت سازی را در کنترل سرنوشت سلول های بنیادی عصبی ایفا می کنند (۲۲).

دید شده است که یک سری مولکول های اندوزن و نورواستروئیدها نیز بر روی این مسیرها اثر گذاشته و بر روی سرنوشت سلول های بنیادی عصبی موثر هستند و این مسئله دیدگاه جدیدی را برای درمان بیماری های نورودژنراتیو ایجاد نموده است (۲۳). بنابراین دانستن مکانیسم های ملکولی درگیر در فعالیت های حفاظت نورونی و آنتی آپاپتوزی نورواستروئیدها ممکن است به انتخاب صحیح و بهتر این نورواستروئیدها برای درمان بیماری های مرتبط با نورودژنراتیو حاصل از افزایش سن کمک کند. برای مثال DHEA و آنالوگ های آن می توانند به عنوان یک داروی هدف برای بیماری های نورودژنراتیو به کار روند. مطالعات مختلف نشان داده اند که این نورواستروئیدها به صورت وابسته به غلظت عمل می کنند و غلظت های مختلف از این ترکیبات اثرات مختلفی را ایجاد می کنند (۲۳). در این مطالعه ابتدا غلظت های مختلف  $0.5, 1, 2, 3, 4, 10 \mu\text{M}$  بر روی میزان زنده ماندن سلول ها به روش MTT مورد بررسی قرار گرفت تا غلظتی که کمترین اثر کشندگی را بر روی سلول ها داشته باشد، مورد انتخاب قرار گیرد. نتایج حاصل از تست MTT نشان داد که غلظت های

$0.5$  و  $1 \mu\text{M}$  کمترین کشندگی را نشان دادند. در مطالعات مختلف از غلظت  $1 \mu\text{M}$  برای نوروزن 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 و همکاران در سال ۲۰۰۵ بود (۱۲، ۱۵). در این تحقیق نیز از غلظت  $1 \mu\text{M}$  استفاده گردید تا اثر این غلظت از DHEA بر روی میزان فسفریلاسیون  $\beta$  GSK3 مورد بررسی قرار گیرد. نتایج بررسی های ایمونوسیتوشیمی در این مطالعه نشان داد که این نورواستروئید در سلول های بنیادی عصبی نقش مهمی دارد (۱۲). بررسی ها نشان داده اند که DHEA باعث تمایز سلول های بنیادی عصبی استخراج شده از dentate gyrus هیپوکامپ رت به نورون ها می گردد (۲۷). همچنین دیده شده است که DHEA منجر به تمایز و زنده ماندن سلول های بنیادی عصبی انسان در محیط حاوی EGF, LIF می شود (۲۸). مطالعات نشان داده اند که سطوح این نورواستروئیدها در مغز با افزایش سن کاهش می یابد و در نتیجه نوروزن کاهش یافته و آپاپتوز سلولی افزایش می یابد که همان علائم دیده شده در بیماری آلزایمر است (۲۳). بنابراین نتایج این پژوهش نقش مهم نورواستروئیدها را در تکثیر سلول های عصبی در مغز را نشان می دهند. DHEA احتمالاً منجر به فعال شدن PKC می گردد که این پروتئین کیناز به عنوان یک پروتئین کلیدی برای فسفریلاسیون  $\beta$  GSK3 به شمار می رود (۲۹). تاکنون در مورد تاثیر DHEA بر روی این مسیر مطالعه ای صورت نگرفته است. در این مطالعه با بررسی های ایمونوسیتوشیمی نشان داده شد که DHEA منجر به فسفریلاسیون  $\beta$  GSK3 می گردد و با توجه به اینکه Alkon و همکارانش در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که یک مسیر برای فسفریلاسیون  $\beta$  GSK3 فعال شدن مسیر PKC می باشد،

مغز، کوچک تر شدن هسته های ساب کورتیکال و بزرگ شدن فضای و نتریکولار می باشد (۲۱). تمامی این علائم مربوط به بیماری های نورودژنراتیو مثل آلزایمر، پارکینسون، MS، ALS، هانتینگتون و صدمات وارده به مغز و Stroke می باشند (۲۱).

فرایند نوروزن در مغز بالغ مشابه با فرایندهایی است که در دوران جنینی رخ می دهد و باید یک تعادل و هماهنگی بین سیگنال های مختلف وجود داشته باشد تا منجر به نوروزنیز و گلیکوژنیز و خودنوزایی self-renewal سلول های بنیادی در مغز گردد. فاکتورهای مهمی در خودنوزایی بودن سلول های بنیادی نقش دارد و در واقع سرنوشت این سلول ها توسط ارتباطات بین فاکتورهای رونویسی، کنترل اپی ژنتیکی، تنظیم کننده های miRNA و سیگنال های خارج سلولی مشخص می شود (۲۲). به نظر می رسد که سیگنال های خارج سلولی مهم شامل Wnt, EGF, FGF نقش سرنوشت سازی را در کنترل سرنوشت سلول های بنیادی عصبی ایفا می کنند (۲۲).

دید شده است که یک سری مولکول های اندوزن و نورواستروئیدها نیز بر روی این مسیرها اثر گذاشته و بر روی سرنوشت سلول های بنیادی عصبی موثر هستند و این مسئله دیدگاه جدیدی را برای درمان بیماری های نورودژنراتیو ایجاد نموده است (۲۳). بنابراین دانستن مکانیسم های ملکولی درگیر در فعالیت های حفاظت نورونی و آنتی آپاپتوزی نورواستروئیدها ممکن است به انتخاب صحیح و بهتر این نورواستروئیدها برای درمان بیماری های مرتبط با نورودژنراتیو حاصل از افزایش سن کمک کند. برای مثال DHEA و آنالوگ های آن می توانند به عنوان یک داروی هدف برای بیماری های نورودژنراتیو به کار روند. مطالعات مختلف نشان داده اند که این نورواستروئیدها به صورت وابسته به غلظت عمل می کنند و غلظت های مختلف از این ترکیبات اثرات مختلفی را ایجاد می کنند (۲۳). در این مطالعه ابتدا غلظت های مختلف  $0.5, 1, 2, 3, 4, 10 \mu\text{M}$  بر روی میزان زنده ماندن سلول ها به روش MTT مورد بررسی قرار گرفت تا غلظتی که کمترین اثر کشندگی را بر روی سلول ها داشته باشد، مورد انتخاب قرار گیرد. نتایج حاصل از تست MTT نشان داد که غلظت های

$0.5$  و  $1 \mu\text{M}$  کمترین کشندگی را نشان دادند. در مطالعات مختلف از غلظت  $1 \mu\text{M}$  برای نوروزن 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 و همکاران در سال ۲۰۰۵ بود (۱۲، ۱۵). در این تحقیق نیز از غلظت  $1 \mu\text{M}$  استفاده گردید تا اثر این غلظت از DHEA بر روی میزان فسفریلاسیون  $\beta$  GSK3 مورد

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.

فسفریلاسیون GSK3 $\beta$  در مطالعه حاضر احتمالاً 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 GSK3 $\beta$  می‌گردد. این مسئله از این نظر حائز اهمیت است که مهم‌ترین مسیری که اختلال در آن منجر به بیماری آلزایمر می‌شود مسیر Wnt است. Inestrosa و همکارانش در سال ۲۰۰۶ نشان دادند که غیر فعال شدن مسیر سیگنالینگ Wnt باعث ایجاد علائم آلزایمر مثل تشکیل

### 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 A $\beta$  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 Neurodegen* 2008; 3:9-15.
4. Ferrari G, Chaco M, Barri'a MI, Garrido JL, Godoy JA, Olivares G, et al. Activation of Wnt signaling rescues neurodegeneration and behavioral impairments induced by  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -amyloid (amylospheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 $\beta$ . *Proc Natl Acad Sci* 2003;100: 6370-75.
7. Wei H, Leeds PR, Qian Y, Wei W, Chen R, Chuang D.  $\beta$ -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-3 $\beta$  regulates production of Alzheimer's disease amyloid- $\beta$  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. Beelli 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.

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 A $\beta$ -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.