

مقاله پژوهشی

بررسی اثر دوز پایین مت‌آمفتامین بر سیکل سلولی در سلول‌های آستروسیت انسانی
تیمار شده با آمیلوئید بتابیبا سلطانیان^۱، مرضیه دهقان شاسلطنه^{۲*}، غلامحسین ریاضی^۳، ناهید مسعودیان^۱

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

۳- مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک (IBB)، دانشگاه تهران، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: dehghan@znu.ac.ir

DOI: 10.22034/ascij.2022.1936883.1282

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۱۰

چکیده

آستروسیت‌ها فراوان‌ترین و مهم‌ترین سلول‌های کمک‌کننده به نورون‌ها هستند، در بقا سلول‌های عصبی و در هموستاز یونی و اسمزی و همچنین در شکل‌گیری سیناپس و کمک به رشد آکسون‌ها و دندریت‌ها نقش دارند، در بیماری آلزایمر مارکرهای فعال‌کننده سیکل سلولی افزایش می‌یابد. از مارکرهای سیکل سلولی Cdk1 و CE2 می‌باشد. با توجه به اینکه مت‌آمفتامین در دوزهای غیرسمی باعث کاهش ظرفیت تقسیم خودبه‌خودی و هدایت سلول به سمت تمایز می‌شود در این مطالعه، سیکل سلولی و مارکرهای آن در سلول‌های آستروسیت انسانی تیمار شده با آمیلوئید بتا و با دوز پایین مت‌آمفتامین درمان شدند مورد مطالعه قرار داده و میزان بیان ژن‌های cdk1 و CE2 و سیکل سلولی میزان توقف در G1، G2 و S در گروه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. ۵ گروه مختلف جهت بررسی مورد استفاده قرار گرفت ۱- سلول‌های مجاور با آمیلوئید بتا ۲- سلول‌های مجاور با مت‌آمفتامین، ۳- سلول‌های مجاور با آمیلوئید و سپس مت‌آمفتامین، ۴- سلول‌های مجاور با مت‌آمفتامین سپس با آمیلوئید بتا ۵ - گروه کنترل، هر گروه ۳ بار تکرار شد. میزان بیان cdk1 در گروه ۳ یا گروه درمان کاهش داشته ولی در گروه ۴ یا پیشگیری افزایش داشته و میزان بیان CE2 در هر ۲ گروه کاهش داشته و همچنین میزان توقف سلول در G1، G2 و S بررسی شد که میزان توقف در G1 در گروه ۳ یا گروه درمان کاهش داشته ولی در گروه ۴ یا پیشگیری افزایش داشته است. نتیجه با توجه به این که از اولین علائم آلزایمر تغییرات در سیکل سلولی می‌باشد. دوز پایین مت‌آمفتامین می‌تواند بر مارکرهای فعال‌کننده سیکل سلول اثر کاهشی داشته و همچنین تقسیم سلول و رفتن به سمت مرگ سلولی را کاهش دهد.

کلمات کلیدی: آستروسیت، سیکل سلولی، سیکلین کیناز ۱، سیکلین E2، مت‌آمفتامین.

مقدمه

معمولاً بتدریج ایجاد می‌شود. علت بیماری حضور دو نوع غیرمعمول نوروفیبریل‌های در هم تنیده و پلاگ‌ها هستند. این فیبریل‌ها متشکل از میکروتوبول‌ها بوده که با تاو پروتئین مرتبط است. از نقش‌های مهم میکروتوبول‌ها، شرکت در ساختار سلول و شبکه‌های

آلزایمر یک اختلال عملکردی در مغز می‌باشد که در این بیماری فرد به تدریج توانایی‌های ذهنی از دست می‌دهد، از مشخصه‌های این بیماری ظهور تجمعات نوروفیبریلی و بتا آمیلوئید می‌باشد. از مهم‌ترین علائم آن زوال عقل و اختلال حافظه می‌باشد. اختلال حافظه

به G1 و Cd2 مارکر عبور از مرحله S به G2 می‌باشد (۱۴). سلول‌های عصبی آسیب‌پذیر در آلزایمر به جای ورود به مرحله تمایز تمایل به ورود به چرخه سلولی دارند (۱۲).

از نشانه‌های اولیه بیماری آلزایمر، ورود مجدد به چرخه سلولی و استرس اکسیداتیو می‌باشد (۲۵). سلول‌های عصبی تمایز یافته در سیستم عصبی بزرگسالان ذاتا توانایی تقسیم ندارند و در صورت ورود به چرخه سلولی در مرحله G1 توقف می‌کنند و موجب برهم‌خوردن هماهنگی چرخه سلول می‌شود (۸). نورون‌ها معمولا در فاز غیرتقسیمی G0 باقی می‌مانند انتقال از G0 به G1 در حالت نرمال در نورون‌های تحت استرس و در معرض آپوپتوز اتفاق می‌افتد (۲۱).

محرک‌های آپوپتوز در آلزایمر شامل تجمع آمیلوئید بتا، اختلال در متابولیسم و اختلال در عملکرد میتوکندری و آسیب DNA باشد (۱۳).

مت آمفتامین یک داروی محرک بسیار اعتیادآور است مطالعات گسترده‌ای در زمینه اثرات منفی مت آمفتامین بر سیستم اعصاب مرکزی گزارش شده است به عنوان مثال حجم هیپوکامپ در افراد با سوء مصرف مت آمفتامین کاهش می‌یابد، که با عملکرد ضعیف‌تر حافظه ارتباط تنگاتنگ دارد (۲۴، ۲۹).

علیرغم موارد ذکر شده شواهدی نیز وجود دارد که تجویز دوز پایین مت آمفتامین بر افزایش تمرکز و سرعت پردازش حافظه موثر می‌باشد. مت آمفتامین در دوزهای غیرسمی باعث کاهش ظرفیت تقسیم خودبه‌خودی در سلول‌های بنیادی و هدایت سلول به سمت تمایز می‌شود و انتقال از G0 به G1 را به تاخیر انداخته و باعث کاهش سیکلین E می‌شود و همچنین القاء آپوپتوز را مهار می‌کند (۳).

پروتئین‌های محرک چرخه سلولی در مغز افراد مبتلا به آلزایمر باعث ورود مجدد سلول‌های عصبی

انتقالی نوروترانسمیترها می‌باشد (۲). تجمع آمیلوئید بتا و فیبریل باعث القاء ورود کلسیم به داخل سلول و فعال شدن کینازهای وابسته به کلسیم می‌شود که در نهایت منجر به هیپرفسفروریلاسیون تاو می‌شود. افزایش هیپرفسفروریلاسیون تاو موجب ناپایداری میکروتوبول‌ها، و هدایت سلول‌ها به سمت مرگ می‌شوند (۱۱). سیکل سلولی شامل چهار مرحله اصلی G1، S و G2 می‌باشد. اکثر سلول‌ها در طول دوره زندگی ۴۰ تا ۶۰ بار این سیکل را طی می‌کنند در حالیکه نورون‌ها در یک مرحله غیرتقسیم شونده G0 باقی می‌مانند. نورون‌ها سیکل سلولی را آغاز کرده اما کامل نمی‌کنند. فرضیه‌ای وجود دارد که بیماری آلزایمر نیز مانند سرطان ناشی از اختلال در چرخه سلول‌های عصبی می‌باشد دو فرضیه وجود دارد فرضیه اول مبنی بر جلوگیری از آلزایمر با ورود مجدد سلول به چرخه سلولی و آپوپتوز نورون‌ها می‌باشد و فرضیه دوم که بیان کننده پیشرفت آلزایمر و تولید پلاگ می‌باشد نشان می‌دهد که استرس اکسیداتیو مزمن مانع از آپوپتوز و منجر به جاودانگی نورون‌ها می‌شود مشابه سلول‌های توموری و فرایند پیری می‌باشد (۲۰).

در آلزایمر مارکرهای فعال‌کننده سیکل سلولی مانند مارکر افزایش فعالیت میتوکندری و همچنین آبشار-های کینازی مربوطه منجر به فسفروریلاسیون تاو می‌شوند که منجر به ورود نورون‌های مستعد به آلزایمر به مرحله G1 می‌شود (۲۶). سیکلین سرین ترئونین کینازها CdK در سلول‌های در حال تقسیم افزایش می‌یابد فعال‌سازی CdK1، Cdk2 و CdK5 با فسفروریلاسیون تاو و تجمع آن ارتباط دارند (۴، ۲۲). Cdk5 یک کیناز غیرمتعارف است که عمدتا در سلول‌هایی مانند نورون‌ها بعد از میتوز بیان می‌شود بیان بیش از حد CdK5 در سلول‌های عصبی منجر به مرگ سلول می‌شود. Cdk1 مارکر عبور از مرحله G0

مجاورت سلول باقی ماند (سلول‌های آستروسیت از بین یاخته هدیه گرفته شد).

تعیین دوز سمی مت آمفتامین: سلول‌های آستروسیت را در چاهک‌های ۹۶ خانه‌ای در حضور غلظت‌های مختلف مت آمفتامین (۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵، ۳/۱، ۱/۵۶، ۰/۶۸) به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و میزان بقاء سلول‌ها در حضور غلظت‌های ذکر شده مت آمفتامین به روش MTT بررسی شد غلظتی که در آن کاهش ۵۰ درصد در رشد نشان داده شده است دوز IC_{50} می‌باشد (مت آمفتامین از دانشگاه تهران هدیه گرفته شد).

آماده‌سازی آمیلوئید بتا: مقدار ۳۰ ماکرولیتر از غلظت ۱۰۰ میکرومولار آمیلوئید بتا که ۷۲ ساعت در ۳۷ درجه باقی مانده و رشته‌های فیبریل تولید شده بود به ۲۷۰ ماکرولیتر محیط کشت DMEM+F12 بدون FBS اضافه و مخلوط شد و سپس به چاهک‌های مورد نظر افزوده شد و کاملاً مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت در مجاورت سلول‌ها باقی ماند.

درمان سلولی: به ترتیب در ۵ گروه مورد بررسی کشت سلول و مجاورت با غلظت مشخص دارو را انجام داده و هر گروه جهت هر تست ۳ بار تکرار شد. **استخراج RNA:** پس از انجام مراحل درمان سلولی بعد از مدت زمان ۴۸ ساعت سلول‌ها را تریپسینه و از کف چاهک جدا و جهت استخراج RNA مورد استفاده قرار داده شد. استخراج total RNA از سلول‌ها با استفاده از کیت Roche و طبق دستور کار کیت انجام شد. این کیت حاوی اجزایی بافر لیز، آنزیم DNase I، بافر انکوباسیون DNase، بافرهای شستشو، بافر الوشن و فیلترهای استریل است که کلیه مراحل استخراج بر روی این فیلترها انجام می‌پذیرد. اساس کلی کیت، لیز نمونه‌ها در حضور نمک‌های کائوتروپیک و انتقال آن به فیلتر، اتصال اختصاصی جهت هضم DNA ژنومی در حضور آنزیم DNase I،

تمایزناپذیر به چرخه سلولی می‌شود که باعث از بین رفتن سلول‌های عصبی می‌شود که این روند زودتر از شروع تظاهرات بالینی در آلزایمر آغاز می‌شود به همین دلیل در مطالعه حاضر تاثیر درمانی دوز کم مت آمفتامین بر روی چرخه سلول مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

گروه‌بندی: گروه‌های درمانی به پنج گروه مختلف تقسیم شد: گروه ۱: سلول‌های آستروسیت انسانی کشت شده که با آمیلوئید بتا مجاور شده (فرم آلزایمری شده)، گروه ۲: سلول‌های آستروسیت انسانی کشت شده که با دوز مناسب مت آمفتامین مجاور شده، گروه ۳: سلول‌های آستروسیت انسانی کشت شده که با آمیلوئید بتا ۲۴ ساعت مجاور شده و سپس بعد از خروج آمیلوئید بتا از محیط با دوز مناسب مت آمفتامین مجاور شده، گروه ۴: سلول‌های آستروسیت انسانی کشت شده که با دوز مناسب مت آمفتامین مجاور شده سپس بعد از خروج مت آمفتامین از محیط با دوز مناسب آمیلوئید بتا مجاور شده و گروه ۵: گروه کنترل

کشت سلول: سلول‌های آستروسیت را در پلیت ۶ خانه کشت داده و سپس بعد از مدت زمان ۲۴ ساعت از کشت سلول زمانیکه تراکم سلول در کف پلیت به ۷۰ درصد رسید، ۲ بار سطح پلیت را با فسفات بافر شستشو داده و سپس حجم معادل با غلظت IC_{50} داروی مت آمفتامین و آمیلوئید بتا را طبق بند گروه بندی که در بالا ذکر شده به چاهک‌های مورد نظر اضافه شد، مقدار ۱۲/۵ ماکرولیتر از غلظت یک میکرومولار مت آمفتامین که قبلاً تهیه و فیلتر شده، برداشته و به یک میلی‌لیتر محیط کشت حاوی FBS اضافه و به آرامی به سطح چاهک اضافه و با تکان دادن پلیت کاملاً مخلوط شد و به مدت ۲۴ ساعت در

هگزامر و ۱۲ ماکرولیتر آب مخلوط حاصل به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه انکوبه کرده و سپس ۱ ماکرولیتر ریبوبلاک و ۲ ماکرولیتر از چهار نوع نوکلئوتید و ۱ ماکرولیتر آنزیم ترانس کریپتاز معکوس و ۶ ماکرولیتر بافر مربوطه جهت سنتز به مدت ۵ دقیقه در ۲۵ درجه و به دنبال آن ۶۰ دقیقه در ۴۲ درجه و محصول جهت RT-PCR مورد استفاده قرار گرفت.

مراحل انجام Real time PcR: ۱۲/۵ ماکرولیتر مستر میکس و ۱ ماکرولیتر از پرایمر فوروارد و ۱ ماکرولیتر از پرایمر ریورس و آب برای هر گروه درمانی cDNA سنتز شده را در میکروتیوب ریخته و مراحل دمایی زیر انجام شد ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد و سپس ۱۵-۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی گراد و ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی گراد و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد قرار داده شده این سیکل‌ها به تعداد ۳۵ بار تکرار شد و کلیه مراحل در دستگاه Qia gene rotorgen انجام شد و جهت نرمال‌سازی داده‌ها از ژن مرجع GAPDH استفاده شد.

بررسی محتوای DNA و بررسی چرخه سلولی (پروپیدیوم دیدید): رنگ‌آمیزی DNA با رنگ فلورسنت و اندازه‌گیری شدت آن می‌تواند مشخصات چرخه سلولی یک نمونه را تعیین کند. در این روش DNA را با روش استوکومیتری رنگ‌آمیزی می‌کنند که باعث تمایز سلول‌ها در G0, G1, S, G2, M می‌شود. در این روش سلول‌های آستروسیت که قبلاً پروسه درمان بر روی آنها انجام گرفت را تریپسینه کرده و با PBS شستشو داده و نمونه حاصل با دور ۲۰۰۰Rpm به مدت ۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ و سپس مجدداً سلول حاصل را با PBS مجدداً حل و سپس با پروپیدیوم دیدید و تریتون ۱۰۰x به نسبت حجمی ۱/۱ با هم مخلوط و سلول‌ها رنگ‌آمیزی شد. سپس محصول حاصل در دمای ۲۰ تا ۳۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه به دور از نور انکوبه و سپس با

شستشو و جداسازی RNA از نمک‌ها، پروتئین‌ها و DNA ژنومی تجزیه شده انجام شد و در انتها RNA خالص از فیلتر شسته شد.

حذف DNA ژنومی: به یک ویال Rnase free ۱ میکروگرم RNA اضافه کرده سپس از بافر واکنش گر که حاوی منیزیم کلراید می‌باشد. یک ماکرولیتر اضافه کرده و سپس یک ماکرولیتر DNase و سپس ۱۰ ماکرولیتر آب اضافه کرده و در ۳۷ درجه به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه کرده و پس از مدت زمان انکوباسیون یک ماکرولیتر EDTA ۵۰ میلی‌مولار اضافه کرده و در ۶۵ درجه به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد. این RNA به عنوان الگو مورد استفاده قرار گرفت.

ارزیابی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده: نمونه‌های حاصل از استخراج RNA در درمان‌های مختلف جهت تایید استخراج بر روی ژل آگارز برده شد مشاهده باند 28S, 18S, 5S نشانه تایید استخراج RNA است.

طراحی پرایمر: جهت طراحی این پرایمرها ابتدا توالی DNA ژن‌ها از بانک ژن گرفته شد و سپس در سایت primer3 پرایمرها طراحی شد برای اطمینان از صحت توالی پرایمرها و عدم اتصال آن‌ها به توالی‌های غیراختصاصی در بخش‌های دیگر ژنوم، پرایمر BLASTPRIMER (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) استفاده شد.

بررسی صحت توالی پرایمر و عدم اتصال به توالی غیراختصاصی: جهت بررسی صحت عملکرد پرایمر CDK1, CE2 پس از انجام PCR محصول PCR بر روی ژل آگارز برده شد و مشاهده تک‌باند اختصاصی نشانه این است که اتصال اختصاصی بوده و باند از نظر سایز باید با سایز طراحی کرده یکسان باشد.

سنتز cDNA: سنتز cDNA طبق روش کار کیت ترمو انجام شد. معرف‌های زیر به ترتیب در یک میکروتیوب ریخته شد RNA استخراج شده رندوم

دستگاه فلوسایتومتری BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA بررسی گردید. پژوهش SPSS25 و Prism 7 می‌باشد.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده

ژن	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')
Cdk1	TGGATCTGAAGAAATACTTGGATTCTA	CAATCCCCTGTAGGATTTGG
CE2	TCTTTGCTGAGATGGTGACTCGCC	CGGGCCCACTGGGGAAACTTG
GAPDH	CTCTCTGCTCCTCCTGTTCGAC	TGAGCGATGTGGCTCGGCT

نتایج

سایز پرایمر طراحی کرده یکسان است که در اینجا باند Cdk1,CE2 می‌باشد (شکل ۲).

در گروه درمانی Aβ+METH نسبت به فرم آلزایمری شده Aβ کاهش در میزان G1 مشاهده شد اما در گروه METH+AB نسبت به فرم آلزایمری شده گروه Aβ میزان G1 افزایش مشاهده شد که نتایج با جزئیات در مقاله‌ای که قبلاً توسط اینجانبان چاپ شده به صورت کامل آورده شده است (۶) (نمودار ۱).

میزان بیان *Cdk1* در گروه درمان نسبت به گروه اول فرم آلزایمری شده کاهش معناداری داشته است در صورتیکه در گروه چهارم و یا فرم پیشگیری میزان بیان *Cdk1* افزایش غیرمعناداری داشته است (نمودار ۲).

میزان بیان *CE2* در گروه درمانی سوم و همچنین در گروه پیشگیری و یا گروه چهارم افزایش معناداری داشته است (نمودار ۳).

با توجه به زنده بودن ۵۰ درصد سلول‌ها در ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت میزان IC₅₀ برای مت آمفتامین ۱۲/۵ میکرومولار می‌باشد که نتایج با جزئیات در مقاله دیگری که توسط اینجانبان قبلاً چاپ شده به صورت کامل آورده شده است (۵).

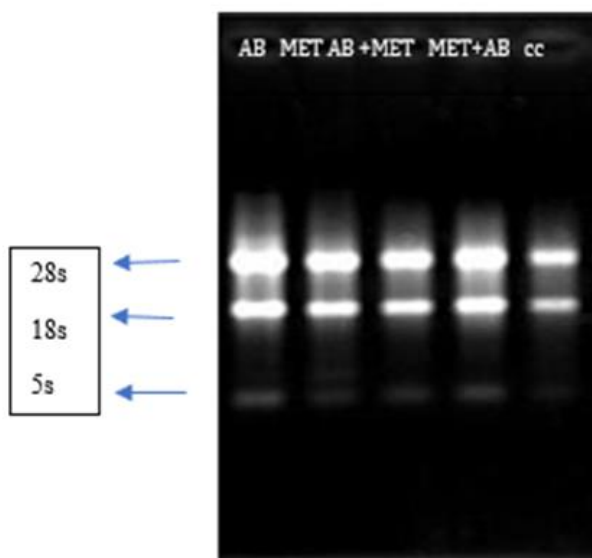
غلظت و خلوص RNA استخراج شده توسط نانودراپ بررسی و جذب نوری (OD) نمونه در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد که این ۲ نسبت باید بین ۲-۱/۸ باشد (جدول ۲).

نمونه‌های حاصل از استخراج RNA در درمان‌های مختلف جهت تایید استخراج بر روی ژل آگارز برده شد و مشاهده باند 5S, 18S, 28S که نشانه تایید استخراج RNA است (شکل ۱).

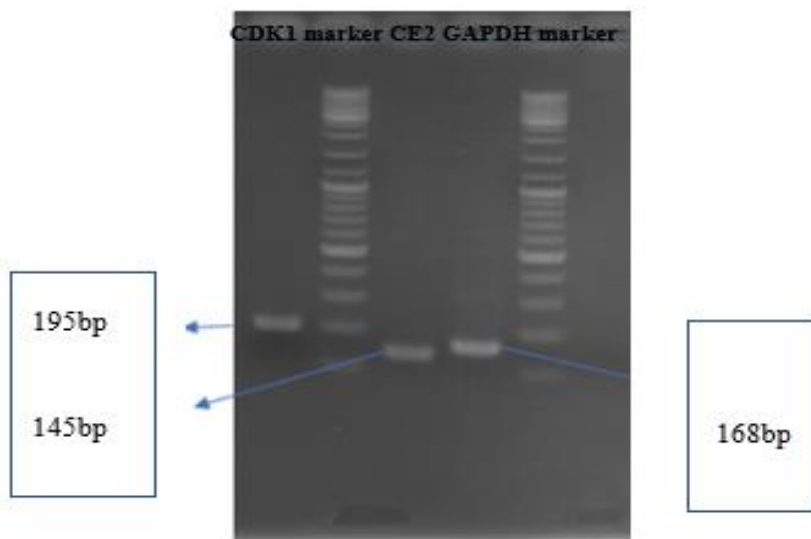
جهت بررسی صحت عملکرد پرایمر Cdk1, Cdk2 پس از انجام PCR محصول PCR بر روی ژل آگارز برده شد و مشاهده تک باند اختصاصی نشانه این است که اتصال اختصاصی بوده و باند از نظر سایز با

جدول ۲- نتایج ارزیابی کمی RNA

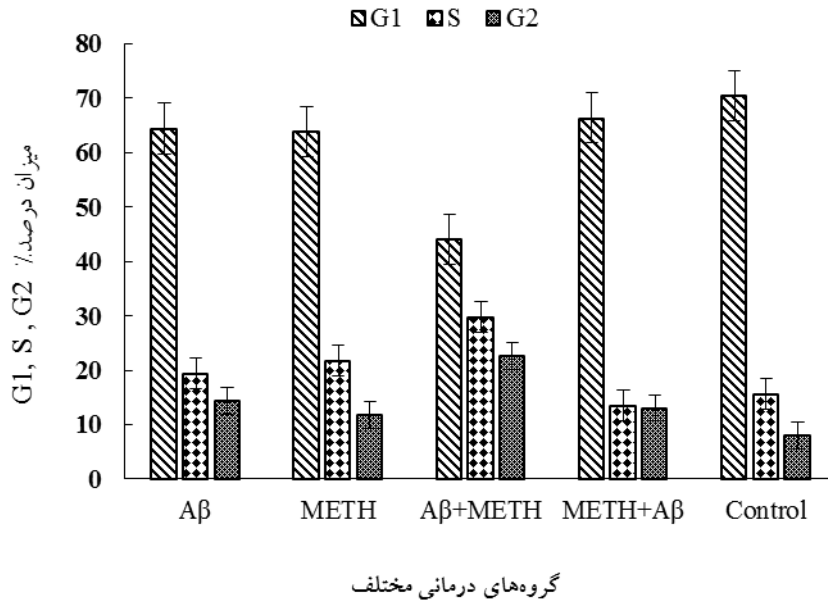
نسبت جذب در ۲۶۰/۲۸۰	نسبت جذب در ۲۶۰/۲۳۰	گروه‌های درمانی مختلف
۲/۱۹	۲/۱۳	Aβ
۲/۰۸	۲/۱۸	METH
۱/۷۹	۲/۰۲	Aβ + METH
۲/۱۰	۲/۱۶	METH + Aβ
۲/۰۹	۲/۲۱	کنترل



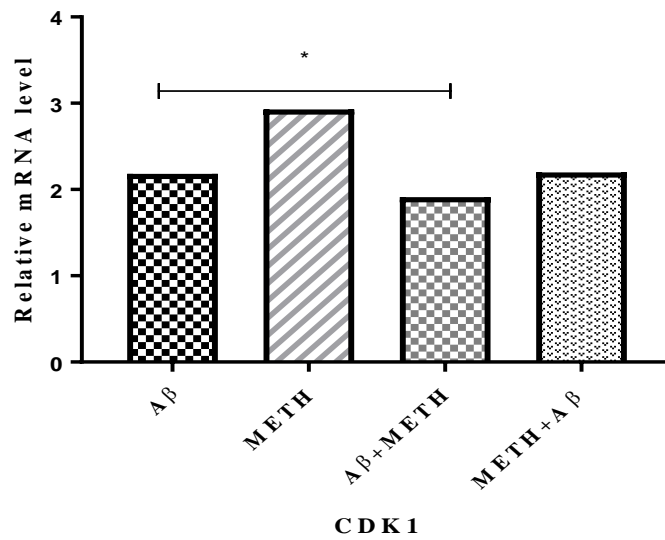
شکل ۱- نتایج ارزیابی کیفی RNA در گروه‌های درمانی مختلف



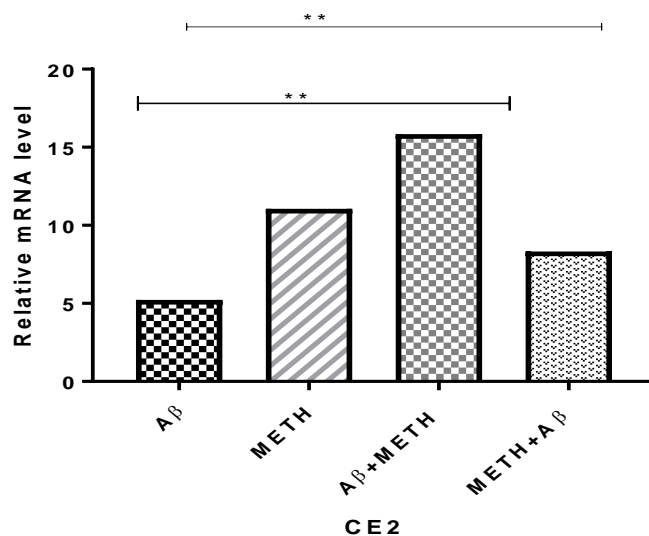
شکل ۲- نتایج بررسی صحت توالی پرایمر CDK1, CE2, GAPDH به روش ژل



نمودار ۱- بررسی سیکل سلولی در گروه‌های Aβ، METH، Aβ+METH، METH+Aβ و کنترل به روش فلوسایتومتری



نمودار ۲- میزان بیان *cdk1* در گروه ۳ یا درمان نسبت به فرم آلزایمری شده کاهش معناداری داشته است اما در گروه پیشگیری و یا گروه ۴ میزان بیان *Cdk1* افزایش داشته که این افزایش معنادار نبوده است.



نمودار ۳- میزان بیان CE2 در گروه ۳ یا گروه درمان و گروه ۴ یا گروه پیشگیری نسبت به فرم آلزایمری شده افزایش معناداری داشته است.

بحث

می‌شود که این روند زودتر از شروع تظاهرات بالینی در بیماری آلزایمر آغاز می‌شود (۲۷). همچنین تحت شرایط استرس نورون‌ها سیکل سلولی خود را فعال می‌کنند و این کار را احتمالاً با افزایش بیان بعضی از ژن‌ها انجام می‌دهند اما پس از فعال شدن سیکل سلولی، نورون‌ها در فاز G2 متوقف می‌شوند و یا به تعبیری میزان G2 افزایش می‌یابد. در بیماری آلزایمر ناحیه‌ای از نورون‌های مغز که تحت تاثیر این بیماری قرار گرفته‌اند سیکل سلولی در آنها به این ترتیب تغییر می‌کند نسبت G1/S کاهش می‌یابد و منجر به همانندسازی DNA و رسیدن نورون‌ها به فاز G2 می‌شود، در نتیجه میزان G2/M افزایش می‌یابد (۳۰). نورون‌های آلزایمری اغلب در فاز G2 متوقف می‌شوند. در این مطالعه، کلیه نقاط S, G2, G1 در تمام گروه‌های درمانی مورد بررسی قرار گرفت. در سلول‌های آلزایمری درمان شده با مت‌آمفتامین در گروه درمان فاز G2 افزایش داشته و میزان فاز G1 در مقایسه با سلول آلزایمری شده کاهش نشان می‌دهد. اما در شکل پیشگیری میزان G2 کاهش و میزان G1

هدف اولیه از مطالعه حاضر بررسی اثر دوز کم مت‌آمفتامین در چرخه سلولی در سلول‌های آستروسیت انسانی تیمار شده با آمیلوئید بتا می‌باشد. با توجه به اینکه از اولین نشانه‌های آلزایمر تغییر در سیکل سلولی می‌باشد (۲۷). در مطالعه حاضر بررسی میزان cdk1 و CE2 و سیکل سلولی را در سلول‌های آستروسیت انسانی تحت درمان با دوز کم مت‌آمفتامین مورد بررسی قرار گرفته شد. عدم تنظیم چرخه سلولی به عنوان مکانیسم آپوپتوز در نورون‌ها در بیماری آلزایمر شناخته شده است. به طور معمول، سلول‌های عصبی متمایز تقسیم نمی‌شوند (۱۹، ۳۱). اما مشخص شده است که شروع چرخه سلولی و تکثیر DNA در سلول‌های عصبی در معرض خطر در مغز افراد مبتلا به آلزایمر اتفاق می‌افتد (۱۵). گزارش شده است که پروتئین‌های محرک چرخه سلولی که باعث پیشرفت چرخه سلولی و تحریک میتوز می‌شود، در مغز افراد مبتلا به آلزایمر باعث ورود مجدد سلول‌های عصبی تمایز ناپذیر به چرخه سلولی می‌شود، که باعث از بین رفتن سلول‌های عصبی

نسبت به فرم آلزایمری شده افزایش داشته و این بدان معنی است که مت آمفتامین که به شکل پیشگیری مورد استفاده قرار می‌گیرد موثرتر از درمان است و باعث کاهش میزان استرس سلولی در سلول‌های آلزایمری شده می‌شود، اما در شکل درمانی با مت آمفتامین اثر روی چرخه سلولی نداشته است. توقف چرخه سلولی در فاز G2 با آسیب DNA مرتبط است، آسیب به DNA ممکن است منجر به مرگ برنامه ریزی شده سلول و یا بقاء سلول از طریق اتوفازی شود، آسیب DNA ممکن است با جهش در نقاط کنترلی و یا checkpoint ها مرتبط باشد و یا با پروتئین‌های ضروری دخیل در همانندسازی مرتبط باشد مانند حذف همزمان پروتئین کینازهای شرکت کننده در همانندسازی و یا نقاط کنترلی که باعث تولید ROS و به دنبال آن مرگ برنامه‌ریزی شده سلول و یا اتوفازی می‌شود (۱).

مرگ برنامه‌ریزی شده سلول ناشی از درصد کم آپوپتوز در سلول‌ها در مقایسه با سلول‌های زنده است. در این تحقیق، سلول‌ها احتمالاً به مرحله اتوفازی وارد می‌شوند و این بدان معنی است که سلول‌ها مدت زمان کمتری را در فاز G2 باقی می‌مانند بنابراین فاز G1 در این سلول‌ها افزایش داشته و مرحله G2 در تمام گروه‌ها کاهش می‌یابد. سیکلین E یکی از اجزا چرخه سلولی است که موجب تحریک تکثیر سلول می‌شود که باعث تنظیم و پیشرفت چرخه سلول در فاز ساخت DNA می‌شود میزان بیان سیکلین E در مغز بزرگسالان افزایش نشان می‌دهد سطح سیکلین E در دوران جنینی به اوج خود می‌رسد در زمان تولد کاهش می‌یابد پس از تولد که تمایز سلول‌های عصبی اتفاق می‌افتد افزایش می‌یابد سیکلین E در نوروئیبی که تقسیم نمی‌شوند نقش متفاوتی از نقش آن در چرخه سلولی دارد در موش-هایی که سیکلین E حذف و یا کاهش یافته اختلال در

حافظه، و یادگیری را نشان می‌دهند (۲۳). در این مطالعه، میزان سیکلین E2 در تمام گروه‌های درمانی مورد بررسی قرار گرفت. در سلول‌های آلزایمری درمان شده‌ای که با دوز کم مت آمفتامین درمان شده‌اند و نیز در گروه درمانی که مت آمفتامین اول به محیط اضافه شده و سپس فرم آلزایمری ایجاد شده (فرم پیشگیری) در هر ۲ گروه میزان سیکلین E2 افزایش معنادار نشان داده است. سیکلین E با Cdk5 کمپلکس تشکیل می‌دهد و با مهار فعالیت Cdk5 عملکرد سیناپس را کنترل می‌کند. کاهش سیکلین E منجر به کاهش تعداد سیناپس‌ها و کاهش تعداد دندریت‌ها در سیناپس می‌شود سیکلین E بجز نقش در چرخه سلولی به عنوان یک سیکلین در عملکرد سیناپس و حافظه نقش دارد (۲۳). عملکرد سیکلین E در سلول‌های غیرتکثیری مغز ناشناخته است شواهدی موجود است که در نوروئیبی تمایز یافته سیکلین E در شکل‌گیری سیناپس نقش دارد که با اثر بر Cdk5 و مهار آن در تشکیل و تمایز سیناپس نقش دارد (۱۰). سیکلین E می‌تواند به عنوان ابزار درمانی در این بیماری باشد (۲۷). شواهدی وجود دارد مبنی بر اینکه پروتئین‌های سیکل سلولی حتی در مراحل اولیه بیماری آلزایمر در لئوسیت‌ها افزایش داشته است (۱۷). اکثر سلول‌های عصبی در مغز طبیعی بزرگسالان در مرحله استراحت G0 هستند برخی سلول‌های عصبی ممکن است تحریک شوند تا از مرحله G0 وارد مرحله G1 شوند که این منجر به مرگ سلولی می‌شود (۷، ۱۶). سیکلین‌ها و Cdk ها توسط سیگنال‌های خارج یا داخل سلولی کنترل می‌شوند تنظیمات غیرقابل کنترل چرخه سلولی مربوط به شرایط پاتولوژیک می‌باشد (۲۸). سیکلین E و Cdk2 برای ورود به مرحله S ضروری هستند، و سیکلین B و Cdk1 ورود به فاز M میتوزی را تسریع می‌کند (۷). کاهش cdk1 در سلول‌های

مطالعه در گروه درمان، G2 افزایش و G1 نسبت به مدل آلزایمری کاهش یافت، این بدان معنی است که درمان با مت آمفتامین بر روی سلول موثر نیست. با این حال، در گروه پیشگیری، مقدار G2 کاهش و میزان G1 در مقایسه با گروه آلزایمری افزایش می‌یابد. بنابراین، مت آمفتامین در فرم پیشگیری موثرتر از درمان است و همچنین میزان بیان CE2, Cdk5 با روش Realtime PCR مورد بررسی قرار گرفت.

منابع

1. Azzopardi M., Farrugia G., Balzan R., 2017. Cell-cycle involvement in autophagy and apoptosis in yeast. *Mechanisms of Ageing and Development*, 161: 211-224.
2. Bancher C., Brunner C., Lassmann H. 1989. Accumulation of abnormally phosphorylated τ precedes the formation of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Brain Research*, 477: 90-99.
3. Baptista S., Lasgi C., Benstaali C., 2014. Methamphetamine decreases dentate gyrus stem cell self-renewal and shifts the differentiation towards neuronal fate. *Stem Cell Research*, 13: 329-341.
4. Baumann K., Mandelkow E-M, Biernat J., 1993. Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 and cdk5. *FEBS Letters*, 336: 417-424.
5. Soltanian B., Dehghan Shasaltaneh M., Riazi G., Masoudian N., 2022. The Effective Doses Of METH For Evaluation The Extracellular Glutamine In The Reactive Astrocytes Induced By $A\beta$. *Cell Journal*, 24(3): 98.
6. Soltanian B., Dehghan Shasaltaneh M., Riazi G., Masoudian N., 2021. Alteration of Gene Expression in Reactive Astrocytes Induced by $A\beta$ 1-42 Using Low Dose of Methamphetamine. *Molecular Biology Reports*, 48(8): 6103-6112
7. Boonstra J., 2003. Progression through the G1-phase of the on-going cell cycle.

عصبی به عنوان استراتژی جهت حفظ یکپارچگی نوروون است. مهار CdK1 با افزایش نسبت سلول‌های زنده به میزان سلول‌های مرده در سلول‌های عصبی محروم از اکسیژن ارتباط دارد (۱۸).

در مطالعه حاضر میزان بیان Cdk1 در حضور دوز کم مت آمفتامین به تنهایی کاهش داشته در نتیجه دوز کم مت آمفتامین می‌تواند بر روی بیان Cdk1 اثر بگذارد اما در گروه ۳ یا درمان میزان بیان Cdk1 کاهش داشته اما در گروه پیشگیری میزان بیان Cdk1 افزایش نشان داده در اصل در دوز کم مت آمفتامین بر میزان بیان Cdk1 موثر بوده و نقش حفاظتی در فرم درمان داشته است ولی در فرم پیشگیری باعث افزایش میزان Cdk1 شده است. افزایش بیان پروتئین‌های چرخه سلولی در مغز افراد آلزایمری، خصوصا در سلول‌های عصبی که حاوی رشته‌های در هم تنیده نوروفیبریل و یا در مجاورت پلاک‌های آمیلوئید بتا هستند مشاهده شده است (۹).

مارکرهای بیولوژی در بیماری آلزایمر به پزشکان کمک می‌کند تا این بیماری را در مراحل اولیه تشخیص دهند یافته‌های گذشته نشان می‌دهد بی‌نظمی‌های چرخه سلولی زودتر از تظاهرات بالینی بیماری آغاز می‌شود به همین دلیل بررسی مسیر چرخه سلولی و ارتباط آن با مسیر سیکل سلولی در فرم مدل آزمایشگاهی سلول آستروسیت آلزایمر شده می‌تواند کمکی هرچند کوچک در زمینه یافتن راه حل جهت درمان این بیماری باشد.

نتیجه‌گیری

این مطالعه اثر دوز کم مت آمفتامین بر بیان ژن‌های cdk1, CE2 و همچنین بررسی سیکل سلولی در مدل سلول‌های آستروسیت آلزایمری شده را نشان می‌دهد. تعیین اثر دوز کم مت آمفتامین بر چرخه سلولی با روش فلوسایتومتری بررسی گردید. در این

- patients. *Journal of the Korean Neurological Association*, 15: 300-308.
17. Kim H., Kwon Y.A., Ahn I.S. 2016. Overexpression of cell cycle proteins of peripheral lymphocytes in patients with Alzheimer's disease. *Psychiatry Investigation*, 13: 127-134.
18. Marlier Q., Jibassia F., Verteneuil S. 2018. Genetic and pharmacological inhibition of Cdk1 provides neuroprotection towards ischemic neuronal death. *Cell Death Discovery*, 4: 1-12.
19. McShea A., Lee H.G., Petersen R.B. 2007. Neuronal cell cycle re-entry mediates Alzheimer disease-type changes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA).Molecular Basis of Disease*, 1772: 467-472.
20. Moh C., Kubiak J.Z., Bajic V.P., 2011. Cell cycle deregulation in the neurons of Alzheimer's disease. *Cell Cycle in Development*, 565-576.
21. Nagy Z., Esiri M., Smith A., 1998. The cell division cycle and the pathophysiology of Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 87: 731-739.
22. Noble W., Olm V., Takata K. 2003. Cdk5 is a key factor in tau aggregation and tangle formation in vivo. *Neuron*, 38: 555-565.
23. Odajima J., Wills Z.P., Ndassa Y.M., 2011. Cyclin E constrains Cdk5 activity to regulate synaptic plasticity and memory formation. *Developmental Cell*, 21: 655-668.
24. P Silva A., Martins T., Baptista S., 2010. Brain injury associated with widely abused amphetamines: neuroinflammation, neurogenesis and blood-brain barrier. *Current drug Abuse Reviews*, 3: 239-254
25. Pogocki D. 2002. Alzheimer's beta-amyloid peptide as a source of neurotoxic free radicals: the role of structural effects. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 63: 131-146.
- Journal of Cellular Biochemistry*, 90: 244-252.
8. Bowser R., Smith M.A., 2002. Cell cycle proteins in Alzheimer's disease: plenty of wheels but no cycle. *Journal of Alzheimer's Disease*, 4(3): 249-254.
9. Coqueret O. 2002. Linking cyclins to transcriptional control. *Gene*, 299: 35-55.
10. Cruz J.C., Tsai L.H., 2004. Cdk5 deregulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends in Molecular Medicine*, 10: 452-458.
11. Eckert A., Keil U., Marques C.A., 2003. Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease. *Biochemical Pharmacology*, 66: 1627-1634.
12. Gerst J.L., Raina A.K., Pirim I. 2000. Altered cell-matrix associated ADAM proteins in Alzheimer disease. *Journal of Neuroscience Research*, 59: 680-684.
13. Harguindey S., Reshkin S.J., Orive G. 2007. Growth and trophic factors, pH and the Na⁺/H⁺ exchanger in Alzheimer's disease, other neurodegenerative diseases and cancer: new therapeutic possibilities and potential dangers. *Current Alzheimer Research*, 4: 53-65.
14. Hernández-Ortega K., Ferrera P., Arias C. 2007. Sequential expression of cell-cycle regulators and Alzheimer's disease-related proteins in entorhinal cortex after hippocampal excitotoxic damage. *Journal of Neuroscience Research*, 85: 1744-1751.
15. Hoozemans J.J., Brückner M.K., Rozemuller A.J. 2002. Cyclin D1 and cyclin E are co-localized with cyclooxygenase 2 (COX-2) in pyramidal neurons in Alzheimer disease temporal cortex. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 61: 678-688.
16. Kang Y., Na D.L., Hahn S., 1997. A validity study on the Korean Mini-Mental State Examination (K-MMSE) in dementia

29. Thompson P.M., Hayashi K.M., Simon S.L., 2004. Structural abnormalities in the brains of human subjects who use methamphetamine. *Journal of Neuroscience*, 24: 6028-6036.
30. Wojsiat J., Prandelli C., Laskowska-Kaszub K., 2015. Oxidative stress and aberrant cell cycle in Alzheimer's disease lymphocytes: diagnostic prospects. *Journal of Alzheimer's Disease*, 46:329-350.
31. Yang Y., Mufson E.J., Herrup K., 2003. Neuronal cell death is preceded by cell cycle events at all stages of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 23: 2557-2563.
26. Raina A.K., Monteiro M.J., McShea A., 1999. The role of cell cycle-mediated events in Alzheimer's disease. *International Journal of Experimental Pathology*, 80: 71-76.
27. Raina A.K., Zhu X., Rottkamp C.A., 2000. Cyclin'toward dementia: cell cycle abnormalities and abortive oncogenesis in Alzheimer disease. *Journal of Neuroscience research*, 61: 128-133
28. Sánchez I., Dynlacht B.D., 2005. New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 16: 311-321.

Evaluation of the Effect of Low Dose of Methamphetamine on the Human Astrocyte Cell Cycle Exposed to Amyloid Beta

Bitá Soltanian¹, Marzieh Dehghan Shasaltaneh^{2*}, Gholamhossein Riazi³, Nahid Masoudian¹

1. Department of Biology, Islamic Azad University, Damghan Branch, Damghan, Iran

2. Department of Biology, Faculty of Science, University of Zanjan, Zanjan, Iran

3. Laboratory of Neuro-Organic Chemistry, Institute of Biochemistry and Biophysics (IBB), University of Tehran, Tehran, Iran

Abstract

Astrocytes are the most important and abundant cells helping neurons. They are involved in the neural survival, ionic, and osmotic homeostasis, as well as in the formation of synapses and growth of the axons and dendrites. Activating markers of the cell cycle increased in Alzheimer's disease. Cyclin dependent kinase 1(Cdk1) and cyclin E2 (CE2) are among the cell cycle markers. Besides, methamphetamine in non-toxic dose reduces the automatic division capacity and leads to cell differentiation. In this study, the human astrocytes exposed to amyloid beta ($A\beta$) and treated with low doses of methamphetamine (METH) and the cell cycle arrest and expression of the Cdk1 and CE2 were assessed in all groups. Five groups were used: 1- The cells expose to $A\beta$, 2- The cells exposed to METH, 3- The cells exposed to $A\beta$ and then METH, 4- the cells exposed to METH and then $A\beta$, 5- The control group. Each group was repeated three times. Cdk1 gene expression decreased in group 3, treatment group, but increased in group 4, prevention group. The CE2 gene expression decreased in both groups. Furthermore, the cell cycle arrest in G1, G2, and S were assessed. In the Group 3, treatment group, G2 decreased; but in group 4, prevention group, it increased. Changes in the cell cycle are the early symptoms of Alzheimer's disease. The low dose of METH can reduce cell cycle activating markers as well as reducing cell division and leading the cells to death.

Keywords: Astrocyte, Cell Cycle, Cyclin Kinase 1, Cyclin E2, Methamphetamine

