

## مقاله پژوهشی

# تأثیر ورتمانین بر بیان ژن‌های سیتوکین‌های محافظت کننده نورونی در آستروسیت‌های کشت شده در شرایط آزمایشگاهی

امیر یزدان پناه<sup>۱</sup> و وحید حمایت خواه جهرمی<sup>۱\*</sup>

<sup>۱</sup> دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه زیست شناسی، جهرم، ایران

\* (نویسنده مسئول مکاتبات): Dr. Hemayatkh@yahoo.com

تاریخ دریافت: شهریور ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: آذر ۱۴۰۰

## چکیده

بررسی گیاهان زراعی در شرایط تنش می‌تواند منجر به بهبود صفات مرتبط با تحمل و افزایش رشد و عملکرد آنها در شرایط کم‌آبی شود. بنابراین نحوه و نوع روش آبیاری بر گیاهان اهمیت دارد. به‌منظور بررسی تأثیر مقادیر مختلف آبیاری بر کیفیت الیاف و عملکرد پنبه رقم گلستان با هدف تکثیر بذر برای مزارع دیم، آزمایشی بر اساس تامین نیاز رطوبتی خاک در ۴ سطح (دیم (بدون آبیاری)، ۳۳، ۶۶ و ۱۰۰ درصد) به صورت اسپلیت پلات در قالب طرح بلوک کامل تصادفی در سه تکرار طی سال‌های زراعی ۹۸-۱۳۹۵ اجرا شد. پس از رسیدگی فیزیولوژیکی، عملکرد و صفات کیفی الیاف ارزیابی شدند. در این پژوهش ویژگی‌های پروتئینی و فیلوژنتیکی آنزیم cellulose synthase A (CesA) و endotransglucosylase (XET1) توسط ابزارهای بیوانفورماتیک مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بیشترین عملکرد چین اول، در تیمار آبیاری ۶۶ درصد مشاهده شد. بیشترین مقدار وزن الیاف چین اول در تیمار آبی ۶۶ درصد و کمترین مقدار در شرایط دیم مشاهده شد. بذرهایی که در شرایط ۶۶ درصد آبیاری رشد کردند، باعث تولید بذر بالقوه با الیاف باکیفیت شدند. همچنین آنالیز بیوانفورماتیک مشخص کرد که محل درون سلولی آنزیم‌های CesA و XET1 به ترتیب غشای پلاسمایی و دیواره سلولی می‌باشند. آنزیم CesA و XET1 به ترتیب از خانواده‌ی پروتئینی ترنسفرازها و هیدرولازها پیشبینی شد. در بررسی درخت فیلوژنتیکی مشخص شد که توالی هر دو آنزیم در گیاه پنبه به همراه گیاهان هم‌خانواده، در شاخه‌های یک کلاد قرار گرفتند. به طور کلی، تکثیر بذر با تامین ۶۶ درصد نیاز آبی، ضمن دستیابی به عملکرد مطلوب می‌تواند با القا مکانیسم‌های تحمل نسبت به تنش کم آبی پایدارتر باش زمینه و هدف: بیماری‌های نورودژنراتیو با تأثیر بر روی سیستم عصبی مرکزی باعث القا آپوپتوزیس در نورون‌ها می‌گردد. سلول‌های گلیا نقش بسیار مهمی در جلوگیری از پیشرفت این بیماری‌ها و افزایش بقای نورونی دارند. مهم‌ترین عملکرد سلول‌های گلیا در بقای نورون‌ها ترشح فاکتورهای محافظت کننده نورونی می‌باشد. از فاکتورهای محافظت کننده نورونی که توسط آستروسیت‌ها ترشح می‌گردد. می‌توان به BDNF، GDNF، TGFβ2، TGFβ1 و NT3 اشاره کرد. در این مطالعه نقش احتمالی ورتمانین در بیان فاکتورهای محافظت کننده نورونی BDNF و NT3 مترشح از میکروگلیاها و الیگودندروسیت‌ها در محیط *in vitro* مورد بررسی قرار گرفت. برای کشت

سلول‌های آستروسیت از نوزاد ۱-۲ روزه موش صحرایی Wistar استفاده شد. بدین ترتیب پس از ضد عفونی پوست بدن و دست‌های نوزادان با پنبه آغشته به الکل ۷۰ درصد، با قیچی پوست روی سر کاملاً برداشته و جمجمه از ناحیه گردن به طرف پیشانی شکافته شد تا کورتکس مغز آشکار گردد. سپس مغز را از جمجمه جدا و در بافر هنکس قرار داده شد. غلظت‌های ۸، ۱۲، ۱۶ مول بر لیتر ورتمانین به وسیله ی سمپلر به سلول‌های آستروسیت کشت داده شده در پلیت‌های well-۶ اضافه شد و میزان بیان فاکتورهای محافظت‌کننده نورونی از طریق R-T PCR اندازه گیری شد. سلول‌های آستروسیت تیمار شده بوسیله ورتمانین از لحاظ مورفولوژی تغییرات قابل ملاحظه ای را نشان دادند. این در حالی بود که تغییرات مورفولوژیکی در سلول‌های کنترل در مقایسه با سلول‌های تیمار شده بسیار کمتر مشاهده شد.

**کلیدواژه‌ها:** آستروسیت، BDNF، NT3، ورتمانین، بیماری‌های نورودژنراتیو.

## مقدمه

فاکتورهایی هستند که توسط آستروسیت‌ها در طی گلیوزیس ترشح می‌گردند [۳].

فاکتورهای رشد که نقش بسیار مهمی در تکثیر، تمایز و بقای نورون‌ها دارند به میزان زیادی توسط آستروسیت‌ها ترشح می‌شوند [۴].

فاکتورهای محافظت‌کننده نورونی ترشح شده توسط آستروسیت‌ها با مسیرهای سیگنال دهی مختلفی در ارتباط می‌باشد از جمله این مسیرهای سیگنال دهی، مسیری سیگنال دهی wnt است [۵].

ورتمانین با فرمول شیمیایی  $C_{23}H_{24}O$  یک ترکیب شیمیایی می‌باشد. ورتمانین نوعی استروئید ضروری برای متابولیسم است که مانع عملکرد PI3K در سلول‌ها می‌شود. کارکرد برون تنی (in vitro) این ماده برای کلاس‌های ۱ و ۲ و ۳ از PI3K مشابه است و همینطور مکانیزم ممانعت مشابهی در مورد انزیم‌های مرتبط با PI3K مثل DNA-PK، mTOR یا MAPK در غلظت‌های زیاد می‌شود. این ماده با بتا-استرادیول و تاموکسیفن به عنوان فعال‌کننده مسیر سیگنال دهی مسیر wnt شناخته می‌شود. ورتمانین مورد استفاده از شرکت از میلیکس تهیه شد.

مسیر Wnt در روندهای مختلف تکوین جنینی و بروز بسیاری از بیماری‌ها نظیر سرطان و بیماری‌های نورودژنراتیو مانند آلزایمر و اختلالات دو قطبی دخالت می‌کند [۵].

هدف از این تحقیق بررسی نقش ورتمانین بر بیان ژن‌های سیتوکین‌های محافظت‌کننده نورونی در آستروسیت‌های کشت شده در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

سیستم عصبی در پستانداران از دو نوع سلول اصلی نورون و گلیا تشکیل شده است. در مغز پستانداران تعداد گلیاها حدود ده برابر نورون‌هاست. هر چند این سلول‌ها از لحاظ ساختاری و عملکردی متفاوت هستند ولی منشاء اجدادی یکسانی دارند. سلول‌های پیش‌ساز نورون و گلیا از ناحیه شکمی لوله عصبی منشاء می‌گیرند. نورال کرس‌ها از جمله سلول‌هایی هستند که تحت تاثیر فاکتوری بنام فاکتورهای رشد گلیایی به سلول‌های گلیا تبدیل می‌گردند [۱].

سلول‌های گلیا را به دو نوع میکروگلیا و ماکروگلیا تقسیم بندی کرده اند. آستروسیت هابخش اعظم سلول‌های گلیا را تشکیل می‌دهند و تعداد آنها ۳-۱۰ برابر نورون‌هاست [۲].

در حالت نرمال فاکتورهای رشد در نورون‌ها و آستروسیت‌ها و تا حدی در میکروگلیاها بیان می‌گردد. با شروع آسیب دیدگی سطح آنها به میزان بالایی در آستروسیت‌هایی که در محل آسیب دیدگی هستند افزایش می‌یابد. تزریق FGF-2 به مغز موش صحرایی می‌تواند موجب گلیوزیس گردد. رسپتورهای FGF-2 در سطح آستروسیت‌ها از روز دوم پس از آسیب دیدگی شروع به افزایش می‌کند که بر روی مهاجرت، تکثیر و هیپرتروفی آستروسیت‌ها اثر می‌گذارد. FGF-2 همچنین در سنتز اجزای ماتریکس خارج سلولی مانند تناسین C و ترشح فاکتورهای نوروتروفیک توسط آستروسیت‌ها اثر می‌گذارد. نوروتروفین‌ها، TGF و فاکتور رشد اپیدرمال از دیگر

## مواد و روش‌ها

## مراحل کشت سلول‌های آستروسیت

پس از انجام ضد عفونی با پنبه آغشته به الکل ۷۰ درصد، با قیچی شماره یک سر نوزادها بریده شد، با قیچی شماره دو پوست روی سر کاملاً برداشته و با قیچی شماره سه مجموعه از ناحیه گردن به طرف پیشانی شکافته شد تا کورتکس مغز آشکار گردد. سپس مغز از مجموعه جدا و در بافر هنکس قرار داده شد.

در مرحله بعدی پس از جداسازی کامل شبکه مویرگی و پرده مننژ، لوب‌های بویایی و مخچه با استفاده از پنس‌ها کاملاً جداسازی و حذف گردید. سپس کورتکس باقی مانده و بدون مننژ در محیط کشت DMEM حاوی FBS ۱۰ درصد در یک پلیت استریل شیشه‌ای قرار گرفت و با استفاده از پیپت‌های پاستور استریل با پیپتاژ پیوسته و مداوم به قطعات خیلی ریزتر تبدیل گردید و در انتها قطعات ریز شده کورتکس را از سرنگ ۲ سی‌سی عبور داده شد تا جداسازی سلول‌ها به طور کامل صورت گیرد که به این روش Trituration اطلاق می‌شود [۶].

## خالص کردن آستروسیت‌ها در محیط کشت

یکی از روش‌های خالص کردن آستروسیت‌ها در محیط کشت استفاده از روش تریپسینه کردن می‌باشد. به دلیل مقاومت نسبتاً کم این سلول‌ها به تریپسین EDTA در مدت کوتاهی (۳-۴ دقیقه) پس از تریپسینه شدن از کف فلاسک جدا می‌شوند. سپس سلول‌ها وارد فلاسک جدید حاوی محیط کامل می‌شوند.

## استفاده از سلول‌های آستروسیتی و کشت مجدد آن‌ها

ویال‌های حاوی سلول از دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد خارج و در داخل آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد گذاشته می‌شوند. به منظور جلوگیری از آلودگی، انتقال ویال‌ها بایستی با دقت کامل انجام شوند. قبل از ذوب شدن کامل محیط فریز، سلول‌ها به فالكون ۱۵ حاوی ۴ml محیط کامل منتقل شده و به منظور خارج کردن DMSO عمل سانتیفریوژ با مدت زمان ۵-۴ دقیقه و دور ۱۵۰۰ انجام شد و

سپس سلول‌ها وارد فلاسک جدید حاوی محیط کامل شد [۳].

## شمارش سلول

عمل شمارش و سنجش viability با استفاده از رنگ تریپان بلو انجام شد. سلول‌های مرده به رنگ آبی درمی‌آیند و از سلول‌های زنده قابل تشخیص می‌باشند [۷].

بیان مارکر آستروسیتی در سلول‌های آستروسیتی مشتق از کورتکس مغز

برای بررسی بیان مارکر آستروسیتی (Glial fibrillary acidic protein) GFAP از تکنیک ایمونوسیتوشیمی استفاده شد [۷].

## بررسی بیان ژن‌ها با روش RT-PCR

به منظور بررسی کمی بیان ژن‌ها از روش نسخه‌برداری معکوس واکنش زنجیره‌ای پلی مرآز (RT-PCR) استفاده شد.

## استخراج RNA از سلول‌های آستروسیت

RNA از سلول‌های آستروسیت تیمار شده با غلظت‌های  $8, 12, 16 \mu\text{mol/L}$  و رتمانین به مدت ۷۲ ساعت با استفاده از کیت Roche، استخراج گردید [۸].

## نسخه برداری معکوس

با استفاده از روش نسخه برداری معکوس (RT:Reverse Transcriptase) از روی RNA cDNA ساخته می‌شود. به این منظور از پرایمر هگزامر تصادفی (Random Hexamer) استفاده گردید و DNA مکمل ساخته شد. این پرایمر از شرکت دنایست آسیا تهیه گردید.

## روش انجام Real Time PCR

بیان ژن‌های BDNF و NGF، NT3 در سلول‌های آستروسیتی با استفاده از تکنیک Real-time PCR کمی بررسی گردید. مزیت استفاده از روش Real time PCR این است که میزان DNA به کار گرفته شده در مرحله اولیه

میکروسکوپ فلورسنس بصورت سبز درخشان ناشی از بیان GFAP ظاهر می‌شوند. سلول‌هایی که آنتی‌بادی اختصاصی GFAP را دریافت نکرده بودند (کنترل منفی) در زیر میکروسکوپ فلورسنس رنگ نشده بودند.

سلول‌های آستروسیت از کورتکس مغز نوزاد ۲ روزه جدا و پس کشت در محیط DMEM، بیان پروتئین GFAP (نشان‌گر سلول‌های آستروسیتی) با بکارگیری آنتی‌بادی اختصاصی GFAP و آنتی‌بادی ثانویه کانژوگه شده با FITC مورد بررسی قرار گرفت.

A, B: آستروسیت‌های ستاره‌ای شکل با زواید چندگانه که با آنتی‌بادی اختصاصی GFAP بصورت سبز درخشان دیده می‌شوند.

C, D: بدون استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی آستروسیت‌ها یعنی GFAP و انجام سایر مراحل ایمونوسیتوشیمی.

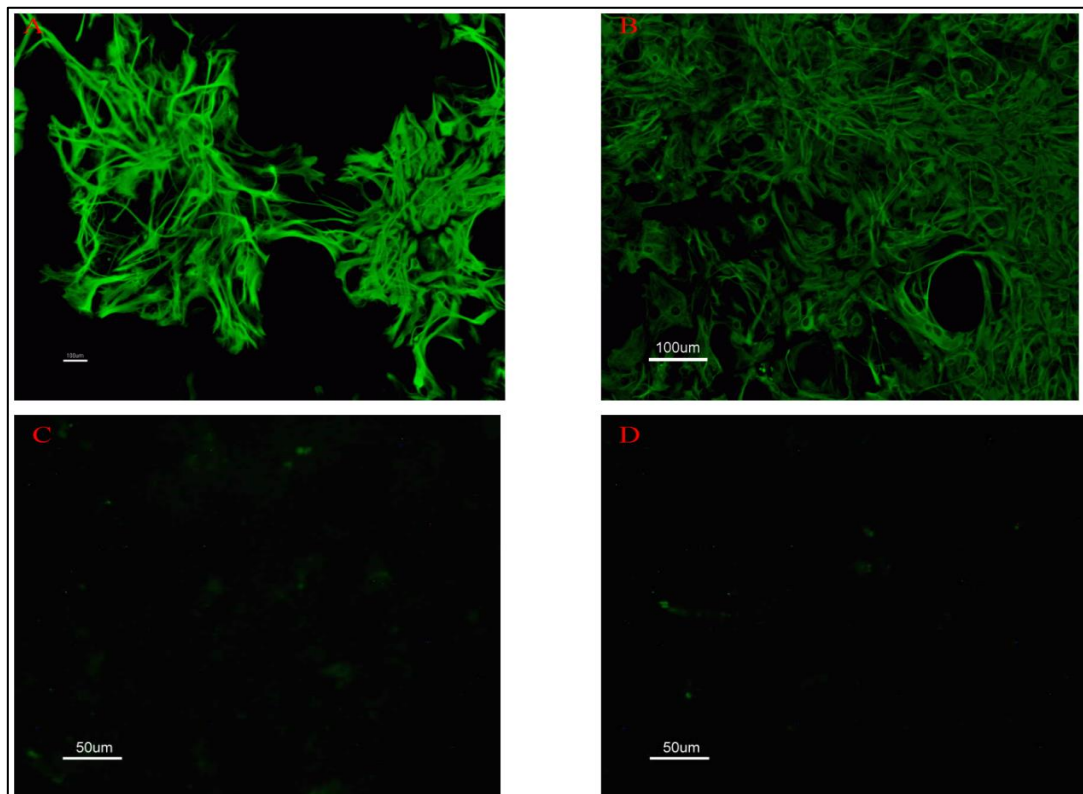
فاز لگاریتمی PCR مورد سنجش قرار گرفت. در حالیکه در روش‌های دیگر محصول نهایی PCR مورد ارزیابی قرار می‌گیرد ولی در روش Real time امکان بررسی محصول در هر کدام از سیکل‌های PCR وجود دارد. اساس این روش بر تغییر در میزان فلورسانس است.

در این تحقیق از روش SYBR Green استفاده شد. اساس روش SYBR Green بر استفاده از رنگ‌های فلورسانسی است که تنها به DNA دو رشته‌ای متصل می‌شوند و بعد از اتصال تابش آن‌ها افزایش می‌یابد [۹].

## نتایج

### خلوص سلول‌های آستروسیت

با استفاده از تکنیک ایمونوسیتوشیمی بیان پروتئین GFAP که بعنوان مارکر اختصاصی سلول‌های آستروسیتی شناخته شده است، بررسی شد. همانطور که در (شکل ۱) مشاهده می‌گردد سلول‌های خالص شده در زیر



شکل ۱: ایمونوراکتیویته GFAP در سلول‌های آستروسیت با استفاده از تکنیک ایمونوسیتوشیمی.

**B:** سلول‌های آستروسیت تیمار شده با غلظت  $8 \mu\text{mol/L}$  از ورتمانین. آستروسیت‌ها در مقایسه با سلول‌های کنترل زواید بیشتری از خود نشان می‌دهند.

**C:** سلول‌های آستروسیت تیمار شده با غلظت  $12 \mu\text{mol/L}$  از ورتمانین. آستروسیت‌ها در مقایسه با تصاویر A و B زواید بیشتری را نشان می‌دهند.

**D:** سلول‌های آستروسیت تیمار شده با غلظت  $16 \mu\text{mol/L}$  از ورتمانین که دارای زواید آستروسیتی بیشتری نسبت به غلظت‌های پایین‌تر ورتمانین می‌باشد.

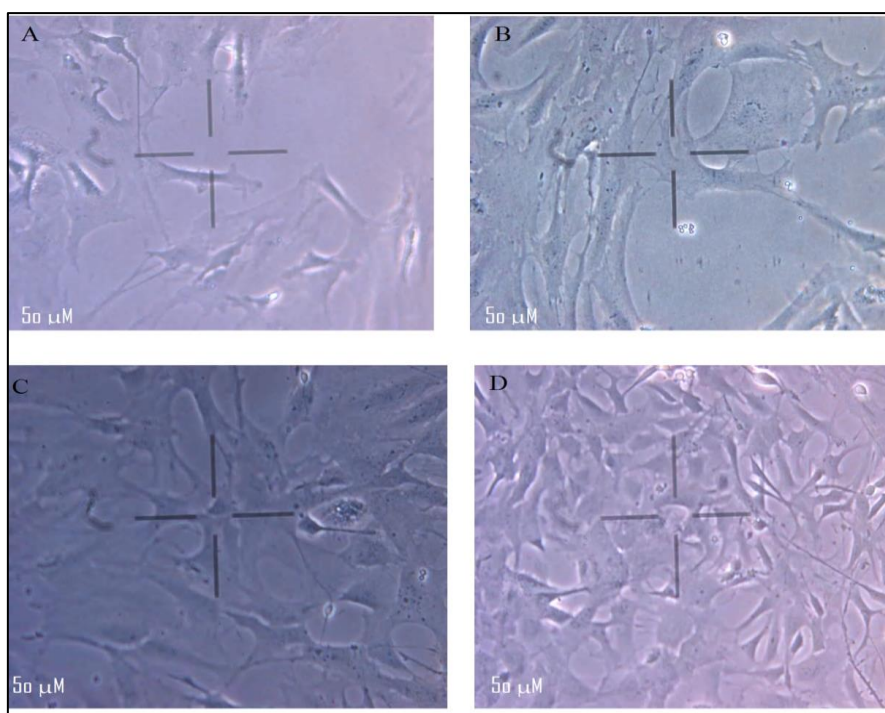
سنجش بیان فاکتورهای **NT3**، **NGF** و **BDNF** به روش تکنیک **RT-PCR**

به این منظور ابتدا RNA از سلول‌های کنترل و تیمار شده با ورتمانین (با غلظت‌های  $8, 12, 16 \mu\text{mol/L}$ ) به مدت ۷۲ ساعت) استخراج، cDNA سنتز و سپس با استفاده از پرایمرهای اختصاصی **NT3**، **NGF** و **BDNF**، PCR انجام شد. در این بررسی بتا اکتین بعنوان ژن رفرنس (Housekeeping) در نظر گرفته شد. (شکل ۳)

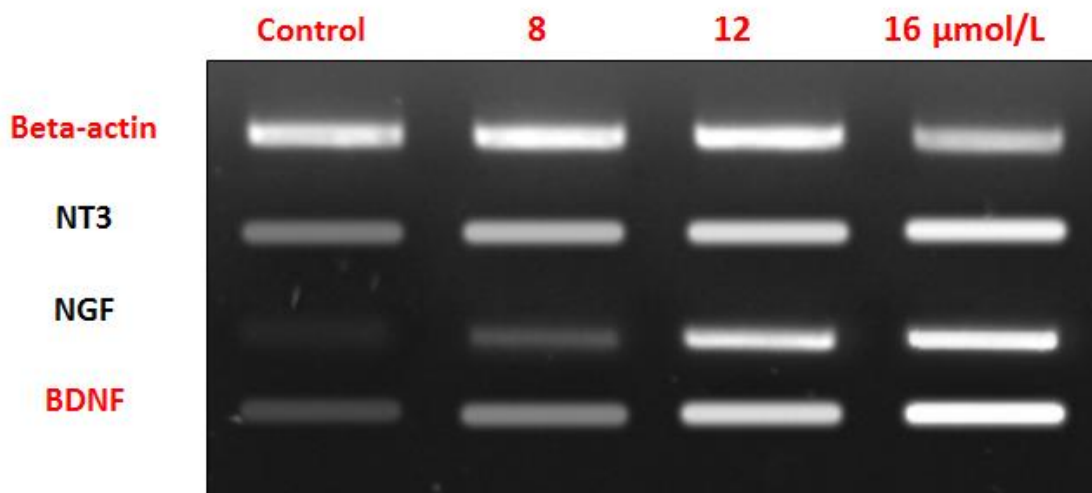
تاثیر ورتمانین بر مورفولوژی و عملکرد محافظت نورونی سلول‌های آستروسیت

به منظور تعیین نقش **GSK3 $\beta$**  در عملکرد محافظتی آستروسیت‌ها، اثر ورتمانین بعنوان مهارکننده‌های **GSK3 $\beta$**  مورد بررسی قرار گرفت. سلول‌های آستروسیت دو بار پاساژ داده شده و پس از شمارش (تعداد  $850000$  سلول) در فلاسک‌های  $75 \text{cm}^2$  کشت داده شده و به سه گروه تقسیم شدند و با غلظت‌های  $8, 12, 16 \mu\text{mol/L}$  ماده ورتمانین به مدت ۷۲ ساعت تیمار شدند (شکل ۲) و گروه سوم را سلول‌های کنترل تشکیل می‌دادند که تحت تیمار قرار نگرفتند (شکل A ۲).

سلول‌های آستروسیت تیمار شده بوسیله ورتمانین از لحاظ مورفولوژی تغییرات قابل ملاحظه‌ای را نشان دادند. به عبارت دیگر به تناسب افزایش غلظت‌های ورتمانین زواید آستروسیتی افزایش قابل توجهی یافته بودند. این در حالی بود که تغییرات مورفولوژیکی در سلول‌های کنترل در مقایسه با سلول‌های تیمار شده بسیار کمتر مشاهده شد (شکل ۲-۳).  
A سلول‌های آستروسیت در حالت کنترل زواید کمتری در مقایسه با سلول‌های تیمار شده دارند.



شکل ۲- مورفولوژی سلول‌های آستروسیت گروه شاهد و تیمار شده با ورتمانین با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست. سلول‌های آستروسیت پس از دو بار پاساژ با غلظت‌های مختلف ورتمانین به مدت ۷۲ ساعت تیمار و سپس مورد بررسی مورفولوژیک قرار گرفتند.



شکل ۳: اثر ورتمانین بر بیان ژن‌های فاکتورهای محافظت‌کننده نورونی NT3 و NGF و BDNF.

میزان محصول PCR برای ژن NT3 در نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۸  $\mu\text{mol/L}$ ، ۱۲  $\mu\text{mol/L}$  و ۱۶  $\mu\text{mol/L}$  از ورتمانین به ترتیب ۳/۷، ۶/۶۴ و ۸/۱۶ برابر افزایش نسبت به نمونه کنترل نشان می‌دهند. ( $P < .001$ )

میزان محصول PCR برای ژن NGF در نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۸  $\mu\text{mol/L}$ ، ۱۲  $\mu\text{mol/L}$  و ۱۶  $\mu\text{mol/L}$  از ورتمانین به ترتیب ۴/۴۳، ۷/۱۱، ۸/۷۳ برابر افزایش نسبت به نمونه کنترل نشان می‌دهند ( $P < .001$ )

میزان محصول PCR برای ژن BDNF در نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۸  $\mu\text{mol/L}$ ، ۱۲  $\mu\text{mol/L}$  و ۱۶  $\mu\text{mol/L}$  از ورتمانین به ترتیب ۷/۸۶، ۱۱/۴۹، ۱۲/۰۳ برابر افزایش نسبت به نمونه کنترل نشان می‌دهند ( $P < .001$ )

### بحث و نتیجه‌گیری

بیماری‌های نورودژنراتیو از قبیل آلزایمر، پارکینسون و... سالانه باعث مرگ افراد زیادی می‌گردد [۲]. این بیماری‌ها با تاثیر بر سیستم عصبی مرکزی باعث القا آپوپتوزیس در نورون‌ها می‌گردد. از مکانیسم‌های فیزیولوژیک برای مقابله با اثرات تحلیل نورونی در این بیماری‌ها، می‌توان فعال شدن سلول‌های گلیا و مسیرهای سیگنال‌دهی مختلف فعال شده توسط این سلول‌ها را نام برد. تاکنون محققین به نقش

سلول‌های آستروسیت با غلظت‌های  $\mu\text{mol/L}$  ۸، ۱۲، ۱۶ ماده ورتمانین به مدت ۷۲ ساعت تیمار شدند و سپس RNA سلول‌ها استخراج و آنالیز با RT-PCR انجام گرفت. همانطور که مشاهده می‌شود به تناسب افزایش غلظت‌های ورتمانین سلول‌های آستروسیت تیمار شده در مقایسه با سلول‌های شاهد میزان بیشتری از فاکتورهای محافظت‌کننده نورونی NT3 و NGF و BDNF بیان می‌کنند. تیمار با ورتمانین تاثیری بر بیان ژن بتا اکتین نداشته است.

میزان محصول PCR برای ژن NT3 در نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۸  $\mu\text{mol/L}$ ، ۱۲  $\mu\text{mol/L}$  و ۱۶  $\mu\text{mol/L}$  از ورتمانین به ترتیب ۳/۷، ۶/۶۴ و ۸/۱۶ برابر افزایش نسبت به نمونه کنترل نشان می‌دهند. ( $P < .001$ )

### محاسبه نسبت

با قرار دادن تفاضل Ct نمونه‌های تیمار شده و کنترل نسبت به تفاضل Ct‌های ژن رفرانس در نمونه‌های تیمار شده و کنترل و لحاظ کردن Efficiency در فرمول Pfaffl میزان افزایش در میزان محصول PCR در ژن تحت آزمون نسبت به کنترل مشخص می‌شود. بررسی معنی دار بودن این تغییرات با انجام حداقل ۳ تکرار صورت گرفت و میانگین نتایج فوق با استفاده از آزمون ANOVA مورد ارزیابی واقع شد.

جدول ۱- میزان Ratio در تکرارهای مختلف مربوط بیان ژن ۳NT در سلول‌های تیمار شده.

غلظت‌های ورتمانین	Ratio						میانگین	SE
	3.16	4.92	4.22	2.19	5.98	1.75		
8 $\mu\text{mol/L}$	3.16	4.92	4.22	2.19	5.98	1.75	3.7033	.66662
12 $\mu\text{mol/L}$	5.58	6.27	8.54	7.01	6.81	5.64	6.6417	.44856
16 $\mu\text{mol/L}$	7.26	8.13	9.05	8.6	7.9	8.03	8.1617	.25041

جدول ۲- میزان Ratio مربوط بیان ژن NGF در سلول‌های تیمار شده با ورتمانین.

غلظت‌های ورتمانین	Ratio			میانگین	SE
	3.46	4.93	4.94		
8 $\mu\text{mol/L}$	3.46	4.93	4.94	4.4433	.49168
$\mu\text{mol/L}$ 12	8.42	7.11	5.82	7.1167	.75056
16 $\mu\text{mol/L}$	8.95	9.38	7.87	8.7333	.44916

جدول ۳- میزان Ratio مربوط بیان ژن BDNF در سلول‌های تیمار شده با ورتمانین.

غلظت‌های ورتمانین	Ratio			میانگین	SE
	4.46	2.3	1.1		
8 $\mu\text{mol/L}$	4.46	2.3	1.1	7.86	.49168
$\mu\text{mol/L}$ 12	1.42	5.21	4.82	11.49	.75056
16 $\mu\text{mol/L}$	3.95	3.5	4.57	12.03	.44916

که پیوسته در سلول فعال بوده و از طریق فسفریله شدن کنترل و مهار می‌گردد. مطالعات نشان می‌دهد در بیماری‌های نورودژنراتیو مانند آلزایمر فعالیت  $\text{GSK-3}\beta$  افزایش می‌یابد

نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که آنزیم  $\text{GSK3}\beta$  در سلول‌های آستروسیت به صورت فعال وجود دارند و استفاده از مهارکننده‌های این آنزیم در سلول‌های آستروسیت منطقی به نظر می‌رسد [۱۳، ۱۷، ۲۱].

فعال شدن مسیر سیگنال دهی Wnt،  $\text{PI}_3$  کیناز، فسفولیپاز C و پروتئوکوزنهای Ras توسط این فاکتورها صورت می‌گیرد. مسیر سیگنال دهی Wnt یکی از مهمترین مسیرهای سیگنال دهی درون سلولی دخیل در پروسه‌هایی نظیر تقسیم سلولی، آپوپتوزیس، مهاجرت سلولی، بقا سلولی و تعیین سرنوشت سلولی است. این مسیر بر دو نوع اصلی و فرعی بوده و مطالعات نشان داده که اختلال در این مسیر سیگنال‌دهی اصلی باعث پیشرفت سریع‌تر بیماری‌های نورودژنراتیو می‌گردد. فعال شدن این مسیر از طریق مهار آنزیم گلیکوژن سنتازکیناز ( $\text{GSK-3}\beta$ ) که یک سرین- ترئونین کیناز و مولکول کلیدی مسیر سیگنال دهی Wnt است صورت می‌گیرد.  $\text{GSK-3}\beta$  پیوسته در سلول فعال بوده و از طریق فسفریله شدن کنترل و مهار می‌گردد.

سلول‌های آستروسیت و مسیر سیگنال‌دهی Wnt در جلوگیری از پیشرفت این بیماری‌ها و افزایش بقای نورونی پی برده‌اند [۱۸، ۱۰]. مطالعات *in vitro* نشان داده است که آستروسیت‌ها مقاومت زیادتری نسبت به نوروها در مقابل آسیب دیدگی دارند. به محض شروع آسیب دیدگی در سیستم عصبی مرکزی، آستروسیت‌های فعال شده جهت بهبود ناحیه آسیب دیده وارد عمل می‌شوند [۱۱، ۲۰].

اما مهمترین عملکرد این سلول‌ها کنترل بقای نوروها از طریق ترشح فاکتورهای محافظت کننده نورونی می‌باشد. این فاکتورها نه تنها توسط آستروسیت‌ها بلکه توسط میکروگلیاها و نوروها نیز ترشح می‌گردند اما منبع اصلی این فاکتورها در هنگام آسیب دیدگی آستروسیت‌ها می‌باشند. از فاکتورهای محافظت کننده نورونی که توسط آستروسیت‌ها ترشح می‌گردد می‌توان به  $\text{TGF}\beta 1$ ،  $\text{TGF}\beta 2$ ،  $\text{GDNF}$ ،  $\text{BDNF}$  و  $\text{3NT}$  اشاره کرد. [۱۲، ۱۹]

با توجه به اهمیت مسیرهای سیگنال‌دهی در سنتز فاکتورهای محافظتی و لذا بقای نورونی و از طرف دیگر با توجه به مشترک بودن  $\text{GSK-3}\beta$  در چند مسیر سیگنال دهی، در این پژوهش از ورتمانین بعنوان مهارکننده‌های  $\text{GSK-3}\beta$  استفاده و سنتز فاکتورهای محافظت کننده نورونی مورد سنجش قرار گرفت.  $\text{GSK-3}\beta$  آنزیمی است

می‌توان به نقش این سلول‌ها در نقل و انتقالات سیناپسی و پردازش اطلاعات به وسیله عملکردهای حوزه نورونی اشاره داشت.

### نتیجه‌گیری

با توجه به نقش آستروسیت‌ها در ترمیم و بقای نورونی می‌توان از ترکیباتی استفاده کرد که منجر به بهبود فعالیت آستروسیت‌ها در این زمینه گردد یکی از این ترکیبات ورماتین می‌باشد که با افزایش زوائد آستروسیتی و غیر فعال سازی مسیرهایی جلوی روند تخریب نورونی را می‌گیرد.

### منابع

- [1] Jacobson M, Clonal analysis and cell lineages of the vertebrate central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* (2009) 8, 71–102.
- [2] Nilsson M, Hansson E, Ronnback L, Adrenergic and 5-HT<sub>2</sub> receptors on the same astroglial cell. A microspectrofluorimetric study on cytosolic Ca<sup>2+</sup> responses in single cells in primary culture. *Brain Res. Dev. Brain Res.* (2018) 63:33-41
- [3] Barret, C. P., Guth, L., Donati, E. J. & Krikorian, J. G. *Astroglial reaction in the gray matter of lumbar segments after midthoracic transection of the adult rat spinal cord.* *Exp. Neurol.* (1981) 73, 365–377.
- [4] Bezzi P, Gundersen V, Galbete JL, Seifert G, Steinhauser C, Pilati E, Volterra A *Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate.* *Nat. Neurosci.* (2004) 7:613-620.
- [5] Axelrod, J. D. *Unipolar membrane association of Dishevelled mediates Frizzled planar cell polarity signalling.* (2001). *Genes Dev.* 15, 1182-1187.
- [6] Broer S, Brookes, N. *Transfer of glutamine between astrocytes and neurons.* *J. Neurochem* (2001). 77:705-719.
- [7] Beyer C, Raab H, *Nongenomic effects of oestrogen: embryonic mouse midbrain neurones respond with a rapid release of calcium from intracellular stores.* *Eur. J. Neurosci.* (1998) 10, 255–262.

مطالعات نشان می‌دهد در بیماری‌های نورودژنراتیو مانند آلزایمر فعالیت GSK-3 $\beta$  افزایش می‌یابد که منجر به هیپرفسفریله شدن پروتئینی بنام Tau شده و لذا کلاف‌های نوروفیبریلاری (NFT) (از عوامل مرگ نورونی در بیماری آلزایمر) تشکیل می‌شود. به این ترتیب به نظر می‌رسد که فعال شدن مسیر سیگنال دهی Wnt و مهار فعالیت GSK-3 $\beta$  حداقل یکی از عوامل افزایش بقای نورونی باشد. [14] Joseph و همکارانش در سال ۲۰۰۶ ثابت کردند که اضافه کردن ATP به محیط کشت سلول‌های آستروسیت باعث فسفریله شدن سرین شماره ۹ در GSK3 $\beta$  و کاهش فعالیت آن می‌گردد.

همچنین تحقیقات Krishnan و همکارانش در سال ۲۰۰۳ تاییدی دیگر بر نتایج ارائه شده در این پژوهش می‌باشد. آن‌ها نشان دادند که فعال شدن مسیر سیگنال دهی PI3K/Akt و در واقع مهار GSK3 $\beta$  در سلول‌های اپیتلیال که تحت تأثیر تاموکسیفن قرار گرفته بودند موجب افزایش بیان فاکتورهای رشد می‌گردد [۱۴، ۱۶].

در توافق با نتایج بدست آمده تحقیقات Diviya sinha و همکارانش در سال‌های اخیر نیز نشان می‌دهد که ارتباط مستقیمی بین مهار آنزیم GSK-3 $\beta$  و افزایش بیان فاکتورهای رشد وجود دارد.

Roelofs RF و همکارانش در سال ۲۰۰۵ با مطالعه بر موش‌های ترنسژنیک نشان دادند که بیان GFAP برای عملکرد بسیاری از آستروسیت‌ها ضروری نیست اما برای پروسه reactive astrogliosis و شکلگیری جراحی گلیالی ضروری است. ایزوفرم‌های متفاوتی از GFAP وجود دارد که عبارتند از  $\alpha$ ،  $\beta$ ،  $\gamma$  و  $\kappa$  که به صورت هتروزن در بافتهای نرمال و آسیب دیده بیان میشوند.

Abbott NJ و همکارانش در سال ۲۰۰۸ در دانشگاه مشیگان با مطالعه بر روی نقش‌های دیگر آستروسیت‌ها این نتیجه‌گیری کردند که آستروسیت‌ها در ایجاد تظاهرات کلینیکی یا مکانیسم‌های منجر به تغییرات پاتولوژیکی در بافت CNS نقشی ندارند [۳، ۱۵].

Brambilla R و همکارانش در سال ۲۰۱۱ در دانشگاه کمبریج ثابت کردند که آستروسیت‌ها برای عملکردهای پیچیده و ضروری CNS لازم هستند که از جمله آن‌ها



- [8] Nakashima K, Takizawa T, Ochiai W, *et al.* BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2016) 98, 5868–5873.
- [9] Jantzen PT, Connor KE, DiCarlo G, *et al* Microglial activation and betaamyloid deposit reduction caused by a nitric oxide-releasing nonsteroidal(2011)
- [10] Cook, D, M. J. Fry, K. Hughes, R. Sumathipala, J.R. Woodgett, and T.C. Dale. *Wingless inactivates glycogen synthase kinase-3 via an intracellular signaling pathway which involves a protein kinase* (1996) *C. EMBO J.* 15: 4526–4536.
- [11] Akiyama H, Barger S, Barnum S, *et al* *Inflammation in Alzheimer's disease.* (2000) *Neurobiol Aging* 21:383-421.
- [12] Condorelli DF, Conti F, Gallo V, Kirchhoff F, Seifert G, Steinhauser C, Verkhratsky A, Yuan X *Expression and functional analysis of glutamate receptors in glial cells.* (1999)
- [13] Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med.* (2013) Nov1; 182(5): 1545-56.
- [14] Collins JA, Schandl CA, Young KK, Vesely J and Willingham MC. *Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis.* *J Histochem Cytochem.* (1997) Jul; 45(7): 923-34.
- [15] Beyer C, Raab, H, *Nongenomic effects of oestrogen: embryonic mouse midbrain neurons respond with a rapid release of calcium from intracellular stores.* (1998) *Eur. J. Neurosci.* 10, 255–262.
- [16] Nakashima, K., Takizawa, T., Ochiai, W., *et al.* BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. (2016) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 5868–5873.
- [17] Sheldahl, L. C., Slusarski, D. C., Pandur, P., Miller, J. R., Kühl, M. and Moon, R. T. Dishevelled activates Ca<sup>2+</sup> flux, PKC and CamKII in vertebrate embryos. *J. Cell Biol.* (2019). 161, 769-777.
- [18] Shaw, P. C., Davies, A. F., Lau, K. F., Garcia-Barcelo, M., Wayne, M. M., Lovestone, S., Miller, C. C., Anderton, B. H., Isolation and chromosomal mapping of human glycogen synthase kinase-3 alpha and -3 beta encoding genes. *Genome* (2017) 41, 720–727.
- [19] Lutz M, Knaus P. Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network. *Cell Signal* (2002); 14: 977–88.
- [20] Liu, X., Liu, T., Slusarski, D. C., Yang-Snyder, J., Malbon, C. C., Moon, R. T., Wang, H., Activation of a frizzled-2/beta-adrenergic receptor chimera promotes Wnt signaling and differentiation of mouse F9 teratocarcinoma cells via Galphao and Galphat. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* (2016) 96, 14383–14388.
- [21] Jantzen PT, Connor KE, DiCarlo G, *et al* Microglial activation and betaamyloid deposit reduction caused by a nitric oxide-releasing nonsteroidal (2011)

## Effect of wortmanin on the expression of BDNF and NT3 neuroprotective cytokines in cultured Astrocyt

Yadanpanah A.<sup>1</sup>, Hemayatkah Jahromi V.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Islamic Azad University, Jahrom brunch, Department of Biology, Jahrom, Iran.

\* (Corresponding author): Dr. Hemayatkah@yahoo.com

Received: September 2021

Accepted: December.2021

### Abstract

Background and Aim: Neurodegenerative diseases induce apoptosis in neurons by affecting the central nervous system. Glia cells play an important role in preventing the progression of these diseases and increasing neuronal survival. The most important function of glia cells after neuronal survival is the secretion of neuroprotective factors. Neuroprotective factors secreted by astrocytes include TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, GDNF, BDNF, and NT3. In this study, we will investigate the possible role of wortmanine in the expression of neuroprotective factors BDNF and NT3 secreted by microglia and oligodendrocytes in vitro. For this purpose, cultured microglia and oligodendrocytes were treated with concentrations of 8, 12, 16  $\mu$ mol / L for 72 hours. A 1-2-day-old Wistar rat was used to culture astrocyte cells. Thus, after disinfecting the skin of the body and hands of infants with 70% alcohol-soaked cotton, the infant's head was cut with scissors, the scalp was completely removed and the skull was cut from the neck to the forehead. To reveal the cerebral cortex. The brain was then removed from the skull and placed in Hanks buffer. Concentrations of 8, 12, and 16 mol / L of wortmanine are added by sampler to microglia and oligodendrocyte cells cultured in 6-well plates and The expression of neuroprotective factors was measured by R-T PCR. Wortmanine-treated astrocyte cells showed significant morphological changes. However, morphological changes were much less observed in control cells compared to treated cells.

**Keywords:** Astrocyte, BDNF, NT3, Wortmanine, Neurodegenerative Diseases.