



Caspase inhibition in neuroinflammation induced by soluble β amyloid monomer, protects cells from abnormal survival and proliferation, via attenuation of NF κ B activity

Azadeh Abdi¹, Fatemeh Mohagheghi¹, S. Homayoon Sadraie², Leila Dargahi¹, Leila Khalaj¹, Abolhassan Ahmadiani^{1*}

1. Dept. Pharmacology, Neuroscience Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Dept. Anatomy, School of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 18 May 2010

Accepted: 24 July 2010

Abstract

Introduction: Evidence suggests that neuronal apoptosis in neurodegenerative diseases is correlated with inflammatory reactions. The beneficial or detrimental role of apoptosis in neuroinflammation is unclear. Elucidating this question may be helpful in management of neurodegenerative diseases. Since TNF- α is able to induce apoptosis as well as increased viability of the cells by activation of caspases or NF- κ B, respectively, the question is what will happen if the balance between the two pathways is disturbed by inhibition of apoptosis.

Methods: In this study, we used β -amyloid peptide (soluble A β monomer) injection into the Wistar male rat prefrontal cortex for induction of neuroinflammation in the hippocampus. Levels of TNF- α and caspase-3 were determined via western blot analysis. Using chronic intracerebroventricular administration of caspase inhibitors, z-VAD-fmk and z-DEVD-fmk, we inhibited apoptosis. Exploring consequences of apoptosis inhibition, activity of NF- κ B was evaluated via western blotting.

Results: After β -amyloid peptide injection we observed an increase in TNF- α and caspase3 as an inflammatory cytokine and apoptotic marker, respectively ($P < 0.001$ and $P < 0.0001$, respectively). As a consequences of apoptosis inhibition, nuclear NF- κ B was decreased and cytosolic NF- κ B was increased and these changes were significant compared to A β -injected group ($P < 0.001$ and $P < 0.05$, respectively).

Conclusion: Caspase inhibition as an initiator of apoptosis, probably by attenuation of NF- κ B activity, protect cells from abnormal survival and proliferation.

Key words: neuroinflammation, apoptosis, NF- κ B, caspase-3, cell proliferation

*Corresponding author e-mail: aahmadiani@yahoo.com
Available online at: www.phypha.ir/ppj

مهار کاسپاز طی التهاب عصبی القا شده توسط محلول مونومر آمیلوئید بتا (A β)، از طریق کاهش فعالیت NF κ B، سلولها را در قبال افزایش غیر طبیعی توان زیستی و تکثیرشان حفاظت می کند

آزاده عبدی^۱، فاطمه محققی^۱، سید همایون صدرایی^۲، لیلا درگاهی^۱، لیلا خلج^۱، ابوالحسن احمدیانی^{۱*}
۱. مرکز تحقیقات علوم اعصاب، گروه فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران
۲. گروه آناتومی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

پذیرش: ۲ مرداد ۸۹

دریافت: ۲۸ اردیبهشت ۸۹

چکیده

مقدمه: شواهد حاکی از آن است که در بیماریهای نورودژنراتیو، آپتوز با واکنشهای التهابی مقارن است. نقش بهبودبخشی و یا تخریبی آپتوز در التهاب عصبی نامعلوم است. بنابراین روشن شدن این مطلب می تواند در مدیریت بیماریهای نورودژنراتیو موثر باشد. از آنجا که TNF α می تواند هم آپتوز و هم توان زیستی سلولها را به ترتیب توسط کاسپاز و فعال شدن NF κ B القا کند، این سوال که اگر تعادل بین این دو مسیر توسط مهار آپتوز به هم بخورد چه رخ می دهد، مطرح می شود.

روشها: در این مطالعه به منظور القای التهاب عصبی در هیپوکمپ از تزریق محلول مونومر آمیلوئید بتا (A β) به کورتکس پری فرونتال رتهای نر از نژاد ویستار استفاده شد. پس از تزریق، میزان TNF α و کاسپاز ۳ توسط وسترن بلات تعیین شد. در گروهی دیگر پس از تزریق A β تجویز مزمن داخل بطنی مهار کننده های کاسپاز شامل Z-VAD-fmk و Z-DEVD-fmk به مغز به منظور مهار کاسپاز ۳ صورت گرفت. برای بررسی عواقب مهار آپتوز، فعالیت NF κ B توسط وسترن بلات ارزیابی شد.

یافتهها: پس از تزریق A β به کورتکس پری فرونتال، افزایش TNF α و کاسپاز ۳ به ترتیب به عنوان سیتوکین التهابی و مارکر آپتوز دیده شد (به ترتیب $P < 0.001$ و $P < 0.0001$). پس از مهار کاسپاز ۳، سطح NF κ B هسته ای کاهش و سطح NF κ B سیتوزولی افزایش یافت که این تغییرات از لحاظ آماری در مقابل گروهی که تنها تزریق A β داشتند معنی دار بود (به ترتیب $P < 0.001$ و $P < 0.05$).

نتیجه گیری: احتمالاً مهار کاسپاز به عنوان عامل آغازگر آپتوز، از طریق کاهش فعالیت NF κ B، سلولها را در قبال افزایش غیر طبیعی توان زیستی و تکثیرشان حفاظت می کند.

واژه های کلیدی: التهاب عصبی، آپتوز، NF κ B، کاسپاز ۳، تکثیر سلولی

مقدمه

آبشاری از واکنشهای سلولی و شیمیایی هماهنگ است. در پدیده التهاب سایتوکاینهای مختلفی تولید می شوند که با القاء بیان ژنهای ویژه ای می توانند روی سرنوشت سلول نقش داشته باشند. التهاب نورونی حاد که به دنبال سکتة یا تروما ایجاد می شود، با افزایش میزان مرگ نورونی می تواند

التهاب، پاسخ فیزیولوژیکی به انواع مختلف آسیبهای بافتی،

aahmadiani@yahoo.com

www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

می تواند القای تومور را افزایش دهد [۱، ۱۲] و NFκB التهاب و سرطان را به هم مربوط می سازد. با توجه به ژنهای هدف NFκB می توان پیش بینی کرد که رابطه تنگاتنگی بین این فاکتور رونویسی و سرطان وجود دارد به طوری که در مدل‌های موشی مختلفی وابستگی فعالیت NFκB و پیشرفت تومور و متاستاز به خوبی نشان داده شده است [۱، ۱۲، ۱۷].

در مطالعه ای دیگر مشخص شد که TNFRI می تواند هم آپتوز و هم توان زیستی سلول را القا کند. به طوری که سیگنال فعال شده با TNFα، دو گروه پروتئین آداپتور و فاکتورهای رونویسی را درگیر می کند، TRAF-2 (TNF receptor associated factor-2) و RIP (receptor interactive protein) که این دو مسیرهایی را القا می کنند که به ترتیب منجر به فعال شدن MAPkinase و NFκB می شوند. مطالعات در موشها و انسانها نشان داده که NFκB یک متوقف کننده برای آپتوز است، هر چند که MAPK ممکن است آپتوز را مهار و یا القا کند [۹]. برخی از مطالعات نیز به این موضوع پرداخته اند که فعال شدن NFκB ممکن است به عنوان فاکتور پیش برنده آپتوز عمل کند [۱۳، ۲۵]. در واقع سیتوکینهای متعدد پیش برنده التهاب و کموکینهایی مثل TNFα، IL-1، IL-6 و IL-8 وابسته به مسیر فعال شدن NFκB و پیشرفت تومور هستند [۱، ۱۲].

بنابراین به طور کلی TNFα دو مسیر را فعال می کند، یکی آپتوز و دیگری NFκB و در نهایت تکثیر و القای توان زیستی سلول. سوالی که اینجا مطرح می شود این است که چه رابطه ای بین این دو مسیر وجود دارد و آیا مسدود کردن یک مسیر می تواند مسیر دیگر را تشدید کند؟ برای مشخص کردن این موضوع در این مطالعه از طریق مهار کننده های کاسپاز، روند آپتوز مهار شد و فعالیت NFκB اندازه گرفته شد.

مواد و روشها

رت‌های بالغ نر از نژاد ویستار (۲۸۰-۳۳۰ گرم) از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهیه و در دوره دوازده ساعته روشنایی-تاریکی (روشنایی بین ساعات ۲۰-۸) به تعداد سه رت در یک قفس با دسترسی آزاد آب و غذا نگهداری شدند. پس از یک هفته عادت حیوانها به

آسیبهای نورونی را توسعه دهد. از طرفی توانایی پلاستی سیتی نورونها را نیز افزایش داده و می تواند تا حدی عملکرد نورونها را بهبود بخشد. در حالیکه التهاب نورونی مزمن، به دلیل مرگ سلولی بیشتر و وسیعتر، منجر به بروز شرایط پاتولوژیک از قبیل بیماریهای خودایمنی (از جمله اسکروزیم متعدد) و بیماریهای نورودژنراتیو (مثل آلزایمر) می شوند [۵].

التهاب مغزی وابسته به سنتز و ترشح ملکولهای نورواکتیو، خصوصا از سلولهای گلیال فعال شده، شامل سیتوکینها (TNFα، IL-1β و...)، رادیکالهای آزاد واکنشی اکسیژن و نیتروژن، پروتئینهای کمپلمان، آمینواسیدهای تحریکی، پروتازها و ... می باشد [۸]. به طور کلی، التهاب از نظرایجاد محدودیت زندگی و تکثیر پاتوژن حمله کننده، شروع توان زیستی بافت، ترمیم، بهبود و حفظ انرژی به نفع موجود زنده می باشد. هرچند که التهاب وسیع و کنترل نشده می تواند بسیار مخرب باشد [۴].

پپتید آمیلوئید بتا (Aβ)، به خصوص Aβ(۱-۴۲) برای نورونها سمی است و بنابراین شدیداً با فقدان عملکرد مغزی طی بیماری آلزایمر همراه است. این امر سبب فعال شدن و مهاجرت آستروسیتها و میکروگلیاها می شود که خود مسیرهای سیتوتوکسیک نورونی را واسطه گری می کنند. در سالهای اخیر بیشتر مطالعات بر فعال شدن میکروگلیاها توسط Aβ با توجه به ترشح سیتوکینهای التهابی مانند TNFα و IL-β، فعال شدن فاکتورهای کمپلمان و رها شدن رادیکالهای آزاد متمرکز شده اند [۸، ۲۱].

TNFα می تواند هم سبب القای تومورهایی چون سرطان پروستات و هم سبب القای مرگ سلولی از نوع آپتوز شود [۲۴]. یکی از دلایل این امر آن است که TNFα از طریق دو رسپتور اعمال بیولوژیکی خود را بروز می دهد (TNFRI) P55 و TNF Receptor (TNFRII) P57. TNFRI حاوی بخش درون سلولی به نام "دومین مرگ" است و در مرگ سلولی دخالت دارد در حالیکه TNFRII نقشی تروفیک و حفاظتی در توان زیستی نورونها دارد [۲، ۶].

TNFα تولید شده در اطراف سلولهای توموری و یا دچار التهاب می تواند توان زیستی سلولهای توموری را توسط کد کردن ژنهای ضد آپتوز وابسته به NFκB مانند Bcl-x1، CIAP ۱ و ۲ افزایش دهد [۱۵، ۱۸]. در حقیقت التهاب مزمن

جهت بررسی تغییرات بیان پروتئین‌ها آنالیز وسترن بلات بر بخش هیپوکمپ مغزهای حیوانات تحت مطالعه صورت گرفت. به منظور تحصیل عصاره سیتوزولی هیپوکمپ رت‌ها در یک بافر لیز کننده (۵۰ میلی مولار Tris-HCl، ۱۵۰ میلی مولار NaCl، Triton x-100 ۰/۱ درصد، sodium deoxy cholate ۰/۲۵ درصد، SDS ۰/۱ درصد، ۱ میلی مولار EDTA و کوکتیل مهار کننده‌های پروتئاز ۱ درصد) هموژن شده سپس بافت‌های هموژنه در ۴ °C و ۱۳۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. غلظت‌های پروتئینی هر نمونه مطابق روش برادفورد تعیین شدند. و میزانی معادل ۸۰ میکروگرم از پروتئین کل هر نمونه جهت الکتروفورز SDS-PAGE در نظر گرفته شد. پروتئین‌ها بر روی غشاهای PVDF بر طبق راهنمایی‌های شرکت Bio-Rad منتقل شدند. غشاهای توسط انکوباسیون در شیر خشک بدون چربی ۲ درصد (Amersham, Ecl Advance TM blocking agent, cpk1075) در TBST به مدت ۱ ساعت و ۱۵ دقیقه اشباع شدند. سپس توسط آنتی بادی‌های زیر در دمای ۴ درجه سلسیوس به صورت overnight انکوبه شدند:

Anti-caspase3 (cell signaling, 1/1000 v/v), anti-NFκB (cell signaling, 1/1000 v/v), anti-TNFα (cell signaling, 1/1000 v/v)

تمام آنتی بادی‌های اولیه و ثانویه در محلول TBST در شیر خشک بدون چربی ۲ درصد حل شدند. غشاهای ۳ بار با TBST شستشو داده شده و سپس با آنتی بادی‌های ثانویه anti-rabbit مجاور شدند (cell signaling, 1/3000 v/v). سپس غشاهای مجدداً با TBST شسته شده و در نهایت باندهای پروتئینی بر روی فیلم‌های عکاسی و با کمک کیت ECL (Amersham, Ecl Advance TM western blotting) (detection kit, RPN21354) ظاهر گشتند. فیلم‌ها اسکن شده و توسط نرم افزار Image J کمی شدند. پس از جداسازی عصاره سیتوزولی به روش بالا، سوپرناتانت حاوی پروتئین‌های سیتوزولی است که جدا شده و در دمای ۷۰- نگهداری می‌شود. اما پلت حاوی پروتئین‌های هسته مجدداً لیز شده (Hepes/KOH [pH 7.9] ۲۰ میلی مولار، MgCl₂ ۱/۵ میلی مولار، EDTA ۰/۲ میلی مولار، NaCl ۶۵۰ میلی مولار، گلیسرول ۲۵ درصد ۰/۷، DTT ۱ میلی مولار، PMSF ۰/۵

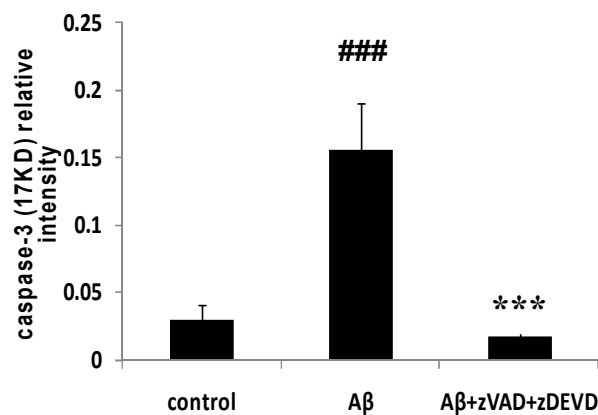
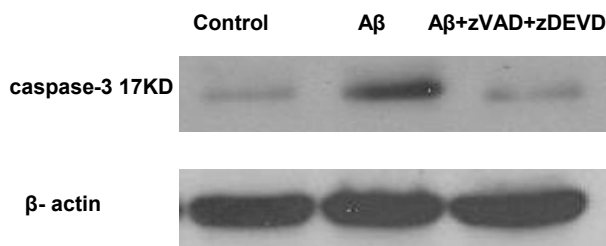
محیط، رت‌ها در گروه‌های آزمایشی قرار گرفتند. تمام پروتکل‌های آزمایشی مطابق با دستور العمل‌های شورای جامعه اروپایی 86/609/EEC صورت گرفت و تلاش بر آن بود که آزار و تعداد حیوانات به کار برده شده به حداقل برسد. در هر گروه چهار رت برای وسترن بلات و سه رت برای تست تانل استفاده گردید.

محلول مونومر آمیلوئید بتای (۱-۴۲) Aβ, Sigma, (A9810) با غلظت ۰/۱ mg/ml در حلال سالین استریل به میزان ۱۰ برابر تهیه و سپس در ویال‌های ۱۰ μl در C ۲۰- نگهداری شدند. و در دمای ۲۰- سلسیوس تا زمان مصرف نگهداری می‌شد. ۳ μl از این محلول (۱۰ ng/μl) برای هر تزریق استفاده می‌شد (۳۰ ng Aβ در هر طرف). رت‌های گروه کنترل سالین استریل دریافت می‌کردند. رت‌ها با کتامین (۱۵۰ mg/kg) و زایلین (۸ mg/kg) بیهوش می‌شدند. سپس با کمک دستگاه استریوتاکس Aβ و یا حامل آن به کورتکس فرونتال عمقی (۳/۲ mm AP، ۲ mm DV) با توجه به برگما (۳ mm عمق) طبق مطالعه قبلی تزریق می‌شد [۲۶]. تزریق به صورت دو طرفه انجام می‌شد. هر تزریق (۳ μl) سه دقیقه توسط یک سرنگ ۱۰ μl هامیلتون طول می‌کشید. پس از اتمام تزریق و پیش از بیرون کشیدن، سوزن به مدت یک دقیقه در محل خود نگه داشته می‌شد.

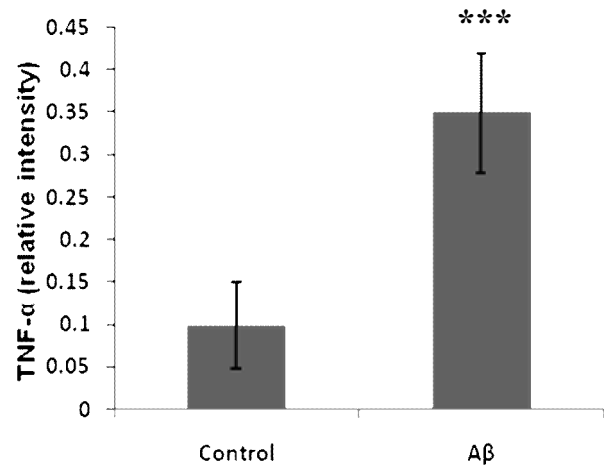
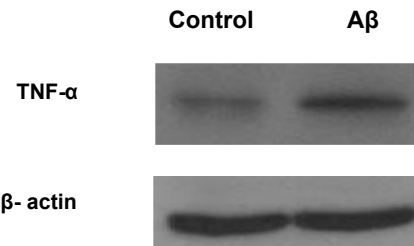
z-VAD fmk (V-116, Sigma) یک مهار کننده غیر اختصاصی کاسپاز و z-DEVD fmk (CO605, Sigma) مهار کننده اختصاصی کاسپاز ۳ به ترتیب با دوزهای ۲۰۰۰ و ۴۰۰ نانوگرم تزریق می‌شدند. z-VAD fmk در DMSO یک درصد و z-DEVD fmk در DMSO ۰/۵ درصد حل می‌شد، سپس در یک سرنگ هامیلتون ۲۵ میکرولیتری ۶ μl از z-VAD fmk (۳۳۳/۳ ng/μl) و ۷ μl از z-DEVD fmk (۱۰۷/۱۴ ng/μl) مخلوط و به صورت داخل بطنی (icv) تزریق می‌شد (۰/۴ mm AP، ۱/۶ mm DV) با توجه به برگما (۴ mm عمق). گروه کنترل DMSO یک درصد را به صورت icv دریافت می‌کردند. تزریق از طریق کانول گذاری (سوزن ۲۳ G) که در بطن جاگذاری و توسط سیمان آکرلیک محکم شده بود) در روزهای ۰، ۱، ۵ و ۷ پس از جراحی تکرار شد. در روز ۱۳ رت‌ها قربانی و هیپوکمپ آنها جدا و در ۲۰- نگهداری شد.

عنوان یک سیتوکین التهابی در هیپوکمپ در مقایسه با گروه کنترل شد ($P < 0.001$). شکل ۱.

تزریق تک دوز $A\beta$ (۱-۴۲) با غلظت $60 \text{ ng}/\mu\text{l}$ به کورتکس پری فرونتال به صورت دو طرفه، سبب افزایش پروتئین کاسپاز ۳ در هیپوکمپ رتهایی که در روز ۱۳ قربانی شده بودند در مقابل گروه کنترل شد ($P < 0.001$). اما در گروههایی که در روز ۲۵ پس از تزریق $A\beta$ قربانی شده بودند کاسپاز ۳ به سطح اولیه خود بازگشته بود، بنابراین این رتها در این مطالعه پیگیری نشدند (داده ها نشان داده نشده است). اما تزریق $z\text{-VAD fmk}$ و $z\text{-DEVD fmk}$ در روزهای ۰ (۵ دقیقه قبل از تزریق $A\beta$)، ۱، ۵ و ۷ پس از جراحی سبب کاهش معنی دار کاسپاز ۳ در مقایسه با گروهی که تنها تزریق $A\beta$ در آنها صورت گرفته بود، گردید ($P < 0.001$). شکل ۲.



شکل ۲ (A, B) - تزریق تک دوز $A\beta$ در داخل کورتکس پرفرونتال بعد از ۱۳ روز، caspase-3 را در هیپوکمپ رت افزایش داد. A: تغییرات بیان caspase-3 (17KD) در پروتئینهای سیتوپلاسمی هیپوکمپ و توسط روش وسترن بلاتینگ بررسی شد. B: باندهای ظاهر شده بر روی فیلم های x-ray ابتدا scan شده سپس توسط نرم افزار J Image دانسیتومتري شدند. از بررسی پروتئین بتا اکتین (43KD) به عنوان استاندارد داخلی استفاده شد. داده ها به صورت relative intensity نشان داده شده اند که بیان گر نسبت caspase-3/ β -actin می باشد. one-way ANOVA, post hoc Tukey, mean \pm SE. $P < 0.001$ (در مقایسه با گروهی که تنها $A\beta$ دریافت کرده) ، $P < 0.001$ (در مقایسه با گروه کنترل).

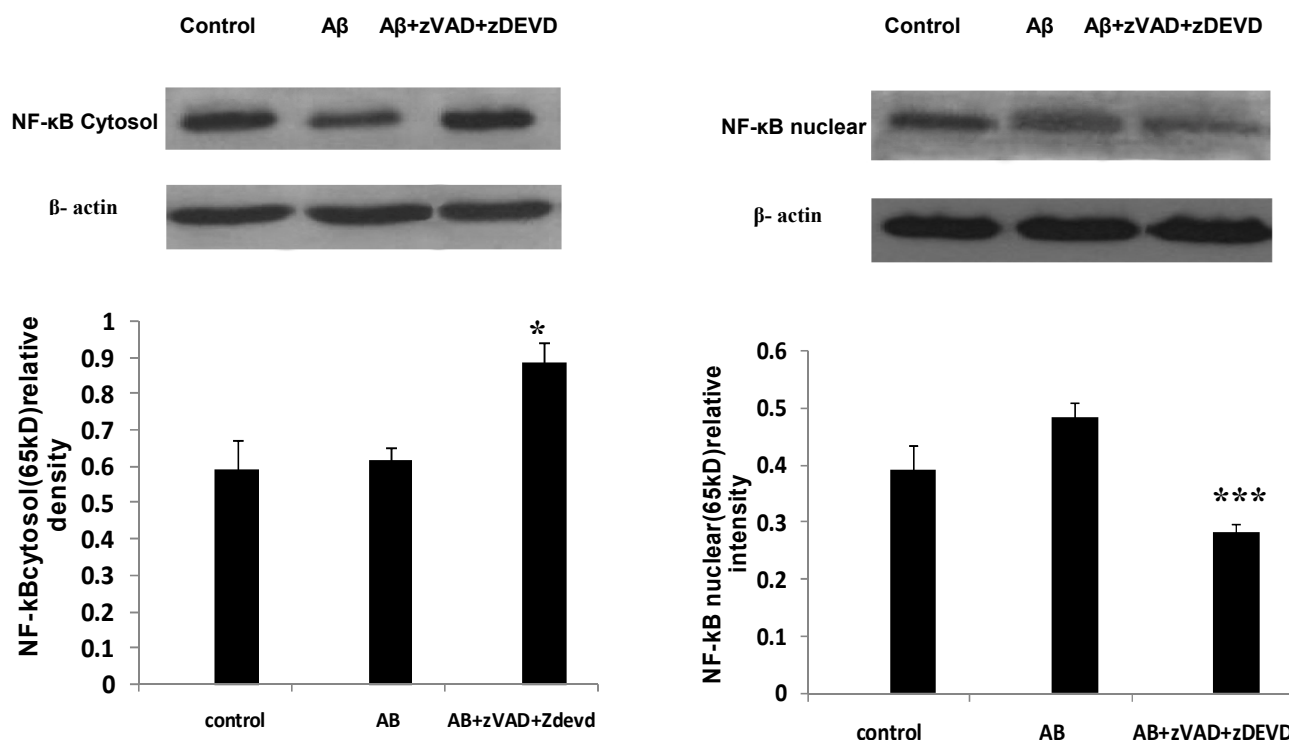


شکل ۱ (A, B) - تزریق تک دوز $A\beta$ در داخل کورتکس پرفرونتال بعد از ۱۳ روز، TNF- α را در هیپوکمپ رت افزایش داد. A: تغییرات بیان TNF- α (15KD) در پروتئینهای سیتوپلاسمی هیپوکمپ و توسط روش وسترن بلاتینگ بررسی شد. B: باندهای ظاهر شده بر روی فیلم های x-ray ابتدا scan شده سپس توسط نرم افزار J Image دانسیتومتري شدند. از بررسی پروتئین بتا اکتین (43KD) به عنوان استاندارد داخلی استفاده شد. داده ها به صورت relative intensity نشان داده شده اند که بیان گر نسبت TNF- α / β -actin می باشد. Independent samples T- Test, mean \pm SE. $P < 0.001$ (***) .

میلی مولار و مهار کننده پروتئاز) و بافتهای هموزنه در 4°C و 13000 rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. سوپرناتانت حاوی پروتئینهای هسته ای است که جدا شده و در -70°C ذخیره گردید. کاسپاز ۳، NF κ B، در میان سه گروه توسط آزمون آماری ANOVA یکطرفه (Tukey post hoc) با هم مقایسه شدند. TNF α بین دو گروه با استفاده از آزمون T-test مقایسه شد. داده ها به صورت Mean \pm SEM نمایش داده شده اند و $P < 0.05$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شده است.

یافته ها

تزریق $A\beta$ (۱-۴۲)، به میزان ۳۰ نانو گرم در کورتکس پری فرونتال در هر نیمکره موجب افزایش معنی دار TNF α به



شکل ۴ (A, B) - مهار آپوپتوز سطح NF-κB سیتوپلاسمی را در هیپوکمپ رت افزایش داد. A: تغییرات بیان NF-κB (65KD) در پروتئینهای سیتوپلاسمی هیپوکمپ و توسط روش وسترن بلاتینگ بررسی شد. B: باندهای ظاهر شده بر روی فیلم های x-ray ابتدا scan شده سپس توسط نرم افزار Image دانسیتومتری شدند. از بررسی پروتئین بتا اکتین (43KD) به عنوان استاندارد داخلی استفاده شد. داده ها به صورت relative intensity نشان داده شده اند که بیان گر نسبت NF-κB(cytosolic) /β-actin می باشد. one-way , ANOVA, post hoc Tukey , mean ± SE (* P<0.05).

آلزایمر مطالعه شده اند، شامل IL-1β، IL-6، TNFα، IL-8، TGF-β (Transforming growth factor-β) و MIP-1α (macrophage inflammatory protein1α) در بیماری آلزایمر افزایش می یابند [۲، ۱۰، ۲۳].

واکنش التهابی القا شده توسط آمیلوئید بتا در سیستم عصبی مرکزی موجب رها شدن فاکتورهای تخریبی مثل سیتوکینها (TNFα)، نیتریک اکسید (NO) و گونه های واکنشی اکسیژن (ROS) می شود. TNFα یکی از اولین مدیاتورهای فرایندهای نورودژنراتیو القا شده با Aβ می باشد [۴، ۶، ۲۰].

داده های این مطالعه تایید می کند که Aβ التهاب را القا می کند. در این مطالعه TNFα، به عنوان یک سیتوکین التهابی، به طور معنی داری در گروهی که Aβ به آنها تزریق شده بود افزایش یافت. شکل ۱.

التهاب فاکتوری اساسی در تومورهای مختلف انسانی از

شکل ۳ (A, B) - مهار آپوپتوز سطح NF-κB هسته ای را در هیپوکمپ رت کاهش داد. A: تغییرات بیان NF-κB (65KD) در پروتئینهای هسته ای هیپوکمپ و توسط روش وسترن بلاتینگ بررسی شد. B: باندهای ظاهر شده بر روی فیلم های x-ray ابتدا scan شده سپس توسط نرم افزار Image دانسیتومتری شدند. از بررسی پروتئین بتا اکتین (43KD) به عنوان استاندارد داخلی استفاده شد. داده ها به صورت relative intensity نشان داده شده اند که بیان گر نسبت NF-κB(nuclear) /β-actin می باشد. one-way , ANOVA, post hoc Tukey , mean ± SE (***P<0.001).

پس از تزریق Aβ، NFκB هسته ای افزایش یافت اما این افزایش در برابر گروه کنترل از لحاظ آماری فاقد معنی بود. پس از تزریق مهار کننده های کاسپاز z-VAD fmk و z-DEVD (fmk) با پنج تکرار، NFκB هسته ای در مقابل گروهی که تنها تزریق Aβ داشتند به طور معنی دار کاهش پیدا کرد (P<۰/۰۰۱). شکل ۳. برای تایید این نتیجه، میزان NFκB سیتوزولی نیز اندازه گیری شد و نتایج نشان داد که تزریق Aβ نتوانست تغییر معنی داری در سطح NFκB سیتوزولی به وجود بیاورد. اما به دنبال مهار کاسپاز، میزان NFκB در مقایسه با گروهی که تنها تزریق Aβ داشتند به طور معنی داری افزایش را نشان داد (P<۰/۰۵). شکل ۴.

بحث

به نظر می رسد تمام سیتوکینها و کموکینهایی که در

است [۲۲، ۲۷].

در مطالعه حاضر، ۱۳ روز پس از تزریق (۱-۴۲) $A\beta$ کاسپاز ۳ فعال شده در مقایسه با گروه کنترل به طور معناداری افزایش یافت (حدود ۴ برابر) که می توان آن را احتمالا معادل آپتوز در نظر گرفت. شکل ۲.

از آنجا که هدف این مطالعه احتمال وجود رابطه بین آپتوز و فعالیت NF κ B و همچنین نقش آپتوز در التهاب عصبی بود، روند آپتوز توسط مهار کاسپاز متوقف و سپس فعالیت NF κ B سنجیده شد. برای دستیابی به این هدف، برای مهار آپتوز از تزریق *z-VAD fmk* (مهار کننده غیر اختصاصی کاسپازها) و *z-DEVD fmk* (مهار کننده اختصاصی کاسپاز ۳) استفاده شد. نتیجه آن که تجویز $A\beta$ هر چند سبب افزایش NF κ B شد اما این افزایش در قیاس با گروه کنترل معنی دار نبود. اما پس از مهار کاسپاز ۳، سطح NF κ B هسته ای به طور معنی دار و تا حدود ۲ تا ۲/۵ برابر کاهش را نشان داد. شکل ۳.

در اینجا نقش دوگانه فعالیت NF κ B قابل بررسی است. هر چند شواهد متعددی بر آثار حفاظتی NF κ B در سیستم عصبی وجود دارد [۳، ۱۳] مشخص شده که فعال شدن NF κ B ممکن است به عنوان فاکتور پیش برنده آپتوز عمل کند [۱۳، ۲۵] و همچنین فعال شدن مسیر NF κ B-MAPK نقشی مهم در فعال کردن میکروگلیاها طی التهاب دارد که خود نشانگر پاتولوژیکی بیماری آلزایمر است [۱۱، ۱۶].

در مطالعه ای توسط Youn sook song و همکارانش در سال ۲۰۰۴ مشخص شد که طی القای مرگ سلولی توسط $A\beta$ در سلولهای تمایز یافته PC12، NF κ B فعال می شود و در سلولهایی که بیش از حد Bcl2 بیان می کنند فعالیت NF κ B و مرگ سلولی ناشی از $A\beta$ کاهش می یابد. در واقع یکی از دلایل یافت این نتیجه می تواند این باشد که بیان بیش از حد Bcl2 می تواند با کاهش کاسپاز ۳ (که می تواند I κ B را تجزیه کند) فعال شدن NF κ B را مهار کند [۲۵]. بر طبق این مطالعه، کاسپاز ۳ عنصری اساسی در فعال کردن NF κ B است، به طوریکه مهار این آنزیم تجزیه I κ B را کاهش می دهد. I κ B مهار کننده NF κ B است و توسط استقرار آن در سیتوپلاسم مانع فعالیت آن می شود. کاسپاز ۳ می تواند با قطع این ارتباط NF κ B را به صورت فعال در بیاورد.

در مطالعه حاضر، به نظر می رسد مهار کننده های کاسپاز

جمله سرطان پروستات در نظر گرفته شده است. در فرایندهای التهابی نقش فاکتورهای متعددی از جمله سیتوکینها، خصوصا TNF α در سرطان پروستات شناخته شده است. تعادل بین آپتوز و تکثیر سلولها در پروستات طبیعی انسان در سرطان پروستات از بین رفته است. داده ها نشان داده که عواملی که نسبت تکثیر به آپتوز را کنترل می کنند در شرایط پاتولوژیک تغییر می یابند [۲۴].

TNF α تولید شده در اطراف سلولهای توموری و یا دچار التهاب می تواند توان زیستی سلولهای توموری را توسط کد کردن ژنهای ضد آپتوز وابسته به NF κ B مانند Bcl-x1، CIAP ۱ و ۲ افزایش دهد [۱۵، ۱۸]. در حقیقت التهاب مزمن می تواند القای تومور را افزایش دهد [۱، ۱۲] و NF κ B التهاب و سرطان را به هم مربوط می سازد. با توجه به ژنهای هدف NF κ B می توان پیش بینی کرد که رابطه تنگاتنگی بین این فاکتور رونویسی و سرطان وجود دارد به طوریکه در مدلهای موشی مختلفی وابستگی فعالیت NF κ B و پیشرفت تومور و متاستاز به خوبی نشان داده شده است [۱، ۱۲، ۱۷].

TNF α می تواند آپتوز را در اولیگودندروسیتها و رده سلولی نورونی در محیط *in vitro* القا کند. آپتوز اولیگودندروسیتها در محیط *in vivo* توسط بیان بیش از اندازه TNFR1 القا می شود [۱۴] و مشخص شده است که کاسپازها در نوتروفیلها فاکتورهای اساسی در آپتوز القا شده توسط TNF α هستند [۷]. مطالعات مختلف نشان داده اند که TNF α دو مسیر آپتوز و تکثیر سلولی به واسطه NF κ B را می تواند به راه بیندازد. نشان داده شده است که مهار NF κ B، قابلیت آپتوتیک بودن TNF α را افزایش می دهد [۷].

نورونهایی که در محیط کشت با $A\beta$ تیمار شده اند افزایش فعالیت JNK (c Jun N terminal Kinase)، کاسپاز ۲ و ۳ را نشان داده اند. مسیری که در اکثر مواقع معرف مرگ نورون است [۲۹]. نورونهایی که در معرض $A\beta$ قرار گرفته اند آپتوزی تبییک شامل متراکم شدن اجسام سلولی و قطعه قطعه شدن DNA را نشان داده اند [۳۰] و در نهایت افزایش P53، Bax، نفوذپذیری گذرای غشای میتوکندری، رها شدن سیتوکروم C و فعال شدن آپتوزوم، سبب فعال شدن کاسپاز می گردد [۱۹]. همچنین $A\beta$ سبب ظهور تعدادی سلول تانل مثبت و فعالیت کاسپاز ۳ در شکنج دندانان ای هیپوکمپ شده

نشان می دهد که مهار کاسپاز، فعالیت NFκB را کاهش می دهد.

در این مطالعه التهاب عصبی توسط تزریق (۱-۴۲) Aβ در هیپوکمپ القا شد. TNFα و کاسپاز ۳ به ترتیب به عنوان مارکرهای التهاب و آپتوز افزایش پیدا کردند. داده های این مطالعه نشان داد که احتمالاً فقدان کاسپاز ۳ عاملی مهمی بر فعال شدن NFκB است زیرا اگر رابطه ای بین این دو وجود نداشت، با انسداد مسیر آپتوز، فعالیت TNFα می بایست از آپتوز به فعال کردن NFκB تغییر پیدا می کرد و تعادل بین آپتوز و توان زیستی سلول به هم می خورد. بنابراین احتمالاً مهار کاسپاز به عنوان عامل آغازگر آپتوز، از طریق کاهش فعالیت NFκB، سلولها را در قبال افزایش غیر طبیعی توان زیستی و تکثیرشان حفاظت می کند.

(z-DEVD fmk و z-VAD fmk) از طریق چینی مکانیسمی NFκB را به صورت غیر فعال در سیتوزول نگه داشته اند و سبب کاهش میزان آن در هسته شده اند.

در صورت فقدان محرک، NFκB توسط مهار کننده اش یعنی IκB (که به P65 متصل است) در سیتوپلاسم به صورت غیر فعال وجود دارد. فقدان IκB سیگنالهای هسته ای را در معرض P65 قرار داده که انتقال دایمر NFκB به هسته را تسهیل می کند. در واقع اندازه گیری NFκB هسته ای، معیاری برای سنجش NFκB فعال است [۲۸].

با این اوصاف، انتظار بر این بود که با کاهش NFκB در هسته (کاهش فعالیت آن)، سطح آن در سیتوزول افزایش یابد. داده های این مطالعه نیز نشان داد که مهار کاسپاز ۳، سبب افزایش سطح NFκB سیتوزول می شود. شکل ۴. این نتایج

References

- [1] Aggarwal BB, Nuclear factor-κB: the enemy within. *Cancer Cell* 6 (2004) 203-208.
- [2] Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bardt B, et al., Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 21 (2000)383-421.
- [3] Alexanian AR, Bamburg JR, Neuronal survival activity of S100β is enhanced by calcineurin inhibitors and requires activation of NF-κB. *FASEB* 13 (1999)1611-1620.
- [4] Allan SM, Rothwell NJ, Inflammation in central nervous system injury. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358 (2003)1669-1677.
- [5] Chauveau F, Boutin H, Van Camp N, Dolle F, Tavitian B, Nuclear imaging of neuroinflammation: a comprehensive review of [11C] PK11195 challengers. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 35 (2008) 2304-2319.
- [6] Combs CK, Karlo JC, Kao SC, Landreth GE, β-amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNF-α-dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis. *J Neurosci* 21 (2001) 1179-1188.
- [7] Cowburn AS, White JF, Deighton J, Walmsley SR, Chilvers ER, z-VAD-fmk augmentation of TNF-α-stimulated neutrophil apoptosis is compound specific and does not involve the generation of reactive oxygen species. *Blood* 105 (2005) 2970-2972.
- [8] Gahtan E, Overmier BC, Inflammatory pathogenesis in Alzheimer's disease: biological mechanisms and cognitive sequel. *Neurosci Biohav Rev* 23 (1999) 615-633.
- [9] Gupta S, A decision between life and death during TNF-α-induced signaling. *J Clin Immun* 22 (2002) 185-194.
- [10] Halliday G, Robinson SR, Shepherd C, Kril J, Alzheimer's disease and inflammation: a review of cellular and therapeutic mechanisms. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27 (2000)v 1-8.
- [11] Jang JH, Surh YJ, β-Amyloid-induced apoptosis is associated with cyclooxygenase-2 up-regulation via the mitogen-activated protein kinase-NF-κB signaling pathway. *Free Radical Biol Med* 38 (2005) 1604-1613.
- [12] Karin M, Greten FR, NF-κB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature* 5 (2005) 749-759.
- [13] Kinsky TK, Papaconstantinou J, Perez-Polo JR, Age-associated alterations in hippocampal and basal forebrain nuclear factor kappa B activity. *J Neurosci Res* 48 (1997) 580-587.
- [14] Lee YB, Yune TY, Baik SY, Shin YH, et al., Role of tumor necrosis factor-α in neuronal and glial apoptosis after spinal cord injury. *Exp Neur* 166 (2000) 190-195.

- [15] Lin WW, Karin M, A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest* 117 (2007) 1175-1183.
- [16] Liu Q, Zhang J, Zhu H, Qin C, Chen Q, Zhao B, Dissecting the signaling pathway of nicotine-mediated neuroprotection in a mouse Alzheimer's disease model. *FASEB* 21 (2007) 61-73.
- [17] Luo JL, Kamata H, Karin M, IKK/NF- κ B signaling: balancing life and death- a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest* 115 (2005) 2625-2632.
- [18] Luo JL, Maeda S, Hsu LC, Yagita H, Karin M, Inhibition of NF- κ B in cancer cells converts inflammation-induced tumor growth mediated by TNF- α to TRAIL-mediated tumor regression. *Cell* 117 (2004) 297-305.
- [19] Mattson MP, Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 430 (2004) 631-639.
- [20] Medeiros R, Prediger RDS, Passos GF, Pandolfo P, et al., Connecting TNF- α signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer's disease: relevance for the behavioral and synaptic deficits induced by amyloid β protein. *J Neurosci* 27 (2007) 5394-5404.
- [21] Monsonego A, Imitola J, Zota V, Oida T, Weiner HL, Microglia-mediated nitric oxide cytotoxicity of T cells following amyloid β -peptide presentation to Th1 cells. *J Immunol* 171 (2003) 2216-2224.
- [22] Muller T, Meyer HE, Egensperger R, Marcus K, The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics-relevance for Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiol* 85 (2008) 393-406.
- [23] Padmanabhan J, Levy M, Dickson DW, Potter H, Alpha 1-antichymotrypsin, an inflammatory protein overexpressed in Alzheimer's disease brain, induces tau phosphorylation in neurons. *Brain* 129 (2006) 3020-3034.
- [24] Royuela M, Rodriguete-Berriguete G, Fraile B, Paniagua R, TNF- α /IL-1/NF- κ B transduction pathway in human cancer prostate. *Histopathol* 23 (2008) 1279-1290.
- [25] Song YS, Park HJ, Kim SY, Lee SH, et al., Protective role of Bcl-2 on β -amyloid-induced cell death of differentiated PC12 cells: reduction of NF- κ B and p38 MAP Kinase activation. *Neurosci Res* 49 (2004) 69-80.
- [26] Stelt MV, Mazzola C, Esposito G, Matias I, et al., Endocannabinoids and β -amyloid-induced neurotoxicity in vivo: effect of pharmacological elevation of endocannabinoid levels. *Cell Mol Life Sci* 63 (2006) 1410-1424.
- [27] Stepanichev MY, Zdobnova IM, Yakovlev AA, Onufriev MV, et al., Effects of tumor necrosis factor- α central administration on hippocampal damage in rat induced by amyloid beta-peptide (25-35). *J Neurosci Res* 71 (2003) 110-120.
- [28] Tripathy D, Grammas P, Acetaminophen inhibits neuronal inflammation and protects neurons from oxidative stress. *J Neuroinflamm* 6 (2009) 1-9.
- [29] Troy CM, Rabacchi SA, Xu Z, Maroney AC, et al., β -Amyloid-induced neuronal apoptosis requires c-Jun N-terminal kinase activation. *J Neurochem* 77 (2001) 157-164.
- [30] Xiao XQ, Zhang HY, Tang XC, Huperzine A attenuates amyloid β -peptide fragment 25-35-induced apoptosis in rat cortical neurons via inhibiting reactive oxygen species formation and caspase-3 activation. *J Neurosci Res* 67 (2002). 30-36.