DOI: 10.22122/jims.v36i482.9989 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و ششم/شماره‌ی ۴۸۲/هفته‌ی دوم مرداد ۱۳۹۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۴/۱۳ تاریخ چاپ: ۱۳۹۶/۵/۸

اثر ۲۴- هیدروکسی کلسترول در تولید گونه‌های فعال اکسیژن در آستروسیت‌های کشت داده شده تیمار شده با آمیلوئید بتا

زهرا ناظری[۱]، شیرین عزیزی دوست[۲]، مریم چراغزاده[۳]، بهار سپیانی[۱]، علیرضا خیراله[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: بیماری آلزایمر، یک بیماری Neurodegenerative می‌باشد که با تجمع خارج سلولی پلاک‌های آمیلوئید بتا و کلسترول و فرم هایپرفسفریله‌ی Tau در داخل سلول مشخص می‌شود. آمیلوئید بتا، در پاتوژنز آلزایمر و القای گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species یا ROS) درگیر می‌باشد. از آن جایی که ۲۴- هیدروکسی کلسترول به عنوان یک متابولیت قطبی می‌تواند کلسترول اضافی را از مغز خارج کند، در این مطالعه، نقش تنظیمی ۲۴- هیدروکسی کلسترول بر سطح گونه‌های فعال اکسیژن القا شده توسط کلسترول خارجی و آمیلوئید بتا مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌ها: سلول‌های آستروسیت از مغز موش‌های یک روزه با نژاد C57BL/6 استخراج و در محیط Fetal bovine serum (FBS) ۱۰ درصد + Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) کشت داده شدند. میزان گونه‌های فعال اکسیژن درون سلولی در حضور غلظت‌های مختلف کلسترول و همچنین، در سلول‌های تیمار شده با آمیلوئید بتا در حضور و عدم حضور ۲۴- هیدروکسی کلسترول با استفاده از دستگاه فلوریمتری اندازه‌گیری و نتایج با استفاده از روش ANONA و نرم‌افزار SPSS واکاوی گردید.

یافته‌ها: تولید ROS در سلول‌های تیمار شده با آمیلوئید بتا و کلسترول خارجی نسبت به گروه شاهد به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت؛ در حالی که میزان ROS افزایش یافته توسط آمیلوئید بتا، به طور قابل ملاحظه‌ای در حضور ۲۴- هیدروکسی کلسترول کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: بر اساس گزارش‌های فراوان، آمیلوئید بتا موجب افزایش کلسترول در بیماران دچار آلزایمر می‌شود. از طرف دیگر، ۲۴- هیدروکسی کلسترول، یک عامل مهم در تنظیم هموستاز کلسترول مغز می‌باشد که با کاهش کلسترول می‌تواند نقش مؤثری در کاهش تولید ROS در شرایطی همانند آلزایمر داشته باشد.

واژگان کلیدی: آلزایمر، آمیلوئید بتا، ۲۴- هیدروکسی کلسترول، کلسترول، گونه‌های فعال اکسیژن

ارجاع: ناظری زهرا، عزیزی دوست شیرین، چراغزاده مریم، سپیانی بهار، خیراله علیرضا. **اثر ۲۴- هیدروکسی کلسترول در تولید گونه‌های فعال اکسیژن در آستروسیت‌های کشت داده شده تیمار شده با آمیلوئید بتا.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۷؛ ۳۶ (۴۸۲): ۶۱۳-۶۰۷

مقدمه

بیماری آلزایمر (Alzheimer's disease)، یک بیماری Neurodegenerative است که به صورت دمانس یا زوال عقل آشکار می‌شود (۱). وجود دو نوع رسوب غیر طبیعی مانند پلاک‌های آمیلوئیدی خارج سلولی حاصل از رسوب پروتئین آمیلوئید بتا (Amyloid beta) و کلافه‌های نوروفیبریلاری درون سلول‌های عصبی، موجب کاهش شدید عملکرد نورونی می‌شود (۲). برای این بیماری، فرضیه‌های مختلفی در نظر گرفته شده است که از آن جمله، می‌توان به فرضیه‌ی کولینرژیک، فسفریلاسیون پروتئین تائو (Tau)، متابولیسم کلسترول، فرضیه‌ی آبشار آمیلوئیدی و استرس اکسیداتیو اشاره کرد (۳). یکی از مهم‌ترین این فرضیه‌ها، فرضیه‌ی آبشار آمیلوئیدی است که طبق این فرضیه، بیماری آلزایمر توسط پلاک‌های پیری که متشکل از آمیلوئید بتا هستند، توصیف می‌شود (۴). اولیگومرهای آمیلوئید بتا، انعطاف‌پذیری سیناپسی را در مغز و ارتباط

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران

۲- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران

۳- دکتری ژنتیک مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، اهواز، ایران

۴- دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: علیرضا خیراله

Email: akheirollah@ajums.ac.ir

بین سلول‌های عصبی را مختل می‌کنند و مانع از تقویت هیپوکامپی بلند مدت می‌شوند، که این پدیده، یکی از مکانیسم‌های اصلی اختلال حافظه در مراحل اولیه‌ی آلزایمر می‌باشد (۴). تجمع آمیلوئید بتا در میتوکندری، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species یا ROS) را القا می‌نماید.

با افزایش ROS، کمپلکس ۴ میتوکندری دچار اختلال می‌شود و فعالیت آن کاهش می‌یابد (۵). در نتیجه، تولید Adenosine triphosphate (ATP) مهار می‌شود و سطح انرژی افت می‌کند. مغز، یکی از اعضای مهم بدن است که برای عملکرد خود به انرژی نیاز دارد. اختلال در زنجیره‌ی انتقال الکترون توسط ROS القا شده توسط آمیلوئید بتا سبب مختل شدن عملکرد صحیح زنجیره برای تولید انرژی و در نهایت، تخریب نورون‌ها می‌شود (۶). ROS مولکول‌های کوچک و بسیار واکنش‌پذیری هستند و تجمع آن‌ها منجر به استرس اکسیداتیو می‌شود (۷). در حالت عادی، تولید ROS در تعادل با ظرفیت آنتی‌اکسیدان می‌باشد، که در صورت عدم تعادل میزان تولید ROS بیشتر می‌شود که در پی آن استرس اکسیداتیو و بیماری آلزایمر ایجاد می‌شود (۸).

علاوه بر فرضیه‌ی آبشار آمیلوئیدی مطالعات نشان داده‌اند که متابولیسم و هموستاز کلسترول در مغز نیز می‌تواند در ایجاد این بیماری مؤثر باشد و با توجه به ارتباط بین بیوسنتز کلسترول و بیماری آلزایمر تنظیم هموستاز کلسترول از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد (۹). کلسترول، به عنوان یک ترکیب اصلی غشای پلاسمایی، نقش مهمی در برقراری ارتباط بین نورون‌ها دارد. در نتیجه، تجمع کلسترول منجر به نقص در عملکرد نورون‌ها می‌شود (۱۰). کلسترول سنتز شده در آستروسیت، نمی‌تواند از سد خونی- مغزی عبور کند. بنابراین، کلسترول سنتز شده در آستروسیت‌ها بعد از انتقال به نورون‌ها، توسط آنزیم سیتوکروم اکسیداز P_{450} کلسترول ۲۴ هیدروکسیلاز ($CYP_{46}A_1$) به ۲۴- هیدروکسی کلسترول تبدیل می‌شود که می‌تواند از سد خونی- مغزی عبور کند (۱۱)؛ به طوری که در بیماران دچار آلزایمر، کاهش بیان ۲۴- هیدروکسی کلسترول مشاهده شده است (۱۲). تغییر در متابولیسم کلسترول و کاهش ۲۴- هیدروکسی کلسترول، سبب افزایش اتصال آمیلوئید بتا با سلول‌های مغزی می‌شود (۱۳).

مکانیسم‌های مولکولی ایجاد کننده‌ی بیماری آلزایمر، هنوز به طور کامل شناخته شده نیست، اما گفته شده است که استرس اکسیداتیو ناشی از ROS القا شده توسط آمیلوئید بتا، سبب عدم عملکرد سیناپسی و در نهایت، مرگ نورونی می‌شود (۱۴). آستروسیت‌ها، سلول‌های اصلی حمایت کننده‌ی سنتز کلسترول در بافت مغز در دوران بعد از تولد می‌باشند. از آن جایی که در بیماری آلزایمر، هموئوستاز کلسترول در بافت مغز مختل می‌شود و مشاهده شده است که در مدل‌های موشی آلزایمر، سنتز کلسترول در آستروسیت‌ها کاهش می‌یابد، بنابراین در مطالعه‌ی حاضر، به بررسی تأثیر احتمالی ۲۴- هیدروکسی کلسترول در سلول‌های آستروسیت به عنوان سلول‌های اصلی حمایت کننده‌ی سنتز کلسترول در بافت مغز بر ایجاد ROS القا شده توسط کلسترول و آمیلوئید بتا پرداخته شد.

روش‌ها

در این مطالعه، ۲۴- هیدروکسی کلسترول از شرکت Sigma، آمیلوئید بتا از شرکت Sigma، ۷٬۲ دی کلروفلورسین دی‌استات (Dichlorofluorescin diacetate-٬۷٬۲ یا H2DCF) از شرکت Sigma، آمفوتریسین A2411 از شرکت Sigma، آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین از شرکت Atocell، Fetal bovine serum (FBS) از شرکت Gibco، محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) و آنزیم Trypsin/Ethylenediaminetetraacetic acid (trypsin/EDTA) از شرکت Bio-idea خریداری شدند.

جداسازی و کشت آستروسیت: نوزاد موش یک روزه‌ی نژاد C57BL/6 از مرکز تکثیر و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی اهواز خریداری شد و به منظور این مطالعه‌ی تجربی به آزمایشگاه منتقل گردید. حیوانات در شرایط کنترل شده با دسترسی آزاد و آسان به آب و غذا و ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. تمامی مراحل کار با حیوانات آزمایشگاهی، بر اساس مجوز کمیته‌ی اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز انجام شد. پس از بیهوش کردن موش‌ها با کتامین/زایلزین به نسبت ۱۰:۱، پوست سر نوزاد موش یک روزه باکمک پنس و ایجاد برش شکافته و جدا گردید. سپس، با برداشت جمجمه، مغز نوزاد موش با استفاده از اسپاتول به آرامی از درون حفره‌ی جمجمه خارج و جهت شستشو به پتری‌دیش حاوی بافر Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) انتقال داده شد.

کشت اولیه و ثانویه‌ی سلول‌های آستروسیت: پس از شستشوی نمونه‌ها در بافر PBS، منتز جدا شده و تکه‌های ریز شده‌ی مغز به لوله‌ی فالکون ۱۵میلی‌لیتری منتقل شد. سپس، تکه‌های ریز شده‌ی مغز جهت تشکیل سلول‌های مجزا به مدت ۳ دقیقه با محلول تریپسین ۰/۰۱ درصد در دمای محیط انکوبه شدند. پس از خنثی کردن اثر تریپسین، سلول‌ها در محیط کشت DMEM low glucose حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد پنی‌سیلین- استرپتومایسین (Pen/Sterp) و ۱ درصد آمفوتریسین B در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن به مدت ۷ روز کشت داده

شدند. سه روز پس از کشت اولیه و به منظور خالص‌سازی آستروسیت ها، فلاسک های حاوی سلول به مدت ۴۵ دقیقه با شتاب ۱۵۰ دور در دقیقه انکوبه شدند. سپس، محیط کشت فلاسک به همراه سلول‌های شناور، شامل سایر سلول‌های گلیا، به طور کامل خارج شد و به سلول های خالص شده ی آستروسیت، محیط کشت جدید اضافه گردید. کلیه‌ی مراحل کشت سلول، خالص‌سازی و تعیین خلوص سلول‌ها طبق شیوه‌نامه‌ی چاپ شده در مقاله‌ی پیشین (۱۵) انجام شد.

کشت ثانویه و تیمار سلول های آستروسیت در حضور و عدم حضور ۲۴- هیدروکسی کلسترول: ۷ روز پس از کشت ثانویه، سلول‌ها پاساژ داده شدند. سلول‌های پاساژ اول با تراکم ۵×۱۰^۴ سلول در هر چاهک پلیت ۱۲ خانه کشت داده شدند. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم سلولی ۸۰-۷۰ درصد، سلول‌های گروه تیمار با غلظت‌های ۵ ماکرومولار ۲۴- هیدروکسی کلسترول و ۱ ماکرومولار آمیلوئید بتا به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن انکوبه شدند. در پایان زمان انکوباسیون، با اضافه کردن محلول ۲۵ ماکرومولار دی‌هیدرو کلروفلورسین دی‌استات میزان ROS آن اندازه‌گیری شد.

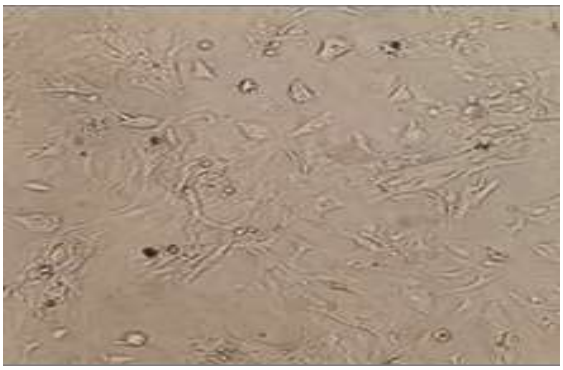
تیمار سلول‌های آستروسیت با غلظت‌های مختلف کلسترول: پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم سلولی ۸۰-۷۰ درصد سلول‌های گروه تیمار با غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰ و ۷۰ نانوگرم/میلی‌لیتر کلسترول به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن انکوبه شدند. در پایان زمان انکوباسیون، با اضافه کردن محلول ۲۵ ماکرومولار دی‌هیدرو کلروفلورسین، میزان ROS آن اندازه‌گیری شد.

سنجش ROS: سنجش ROS با روش فلوریمتری و با استفاده از پروب H_2DCF انجام شد. مبنای این روش، تبدیل H_2DCF به DCF است که H_2O_2 تولید شده توسط نمونه باعث این تبدیل می‌شود. DCF تولید شده، با تابش نور فلورسانس در محدوده‌ی تابش ۴۸۸ نانومتر و بازتابش آن در محدوده‌ی ۶۰۰-۵۰۰ نانومتر با روش فلوریمتری سنجیده شد. بدین منظور، ۵۰ هزار سلول در پلیت ۱۲ خانه کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت از زمان کشت سلول‌ها، سلول‌ها با مقادیر ۱ میکرومولار آمیلوئید بتا برای ۲۴ساعت و در ۳ ساعت آخر با ۵ میکرومولار، ۲۴- هیدروکسی کلسترول تیمار شدند. در پایان زمان انکوباسیون و شستن سلول‌ها با PBS، محلول ۲۵ ماکرومولار H_2DCF به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. در پایان ۳۰ دقیقه تابش فلورسانس، نمونه در محدوده‌ی برانگیختگی ۴۸۸ نانومتر و انتشار ۶۰۰-۵۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

واکاوی داده‌ها: واکاوی یافته‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۰ (version 20, IBM Corporation, Armonk, NY) انجام شد. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شد و داده‌ها با استفاده از آزمون Unpaired t برای دو گروه واکاوی شدند. $P < ۰/۰۵۰$ به عنوان سطح معنی‌داری داده‌ها در نظر گرفته شد.

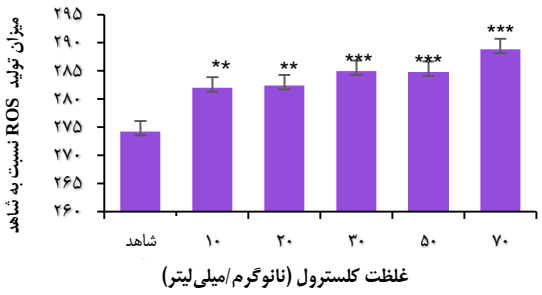
یافته‌ها

الف- میزان ROS تولید شده‌ی درون سلولی پس از تیمار سلول‌ها با کلسترول: نتایج تغییر در میزان ROS تولید شده‌ی درون سلولی در سلول‌های آستروسیت موشی کشت داده شده (شکل ۱)، بر اثر تیمار با غلظت‌های مختلف کلسترول در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۱. سلول‌های آستروسیت موشی (بزرگ‌نمایی ۱۰ ×)

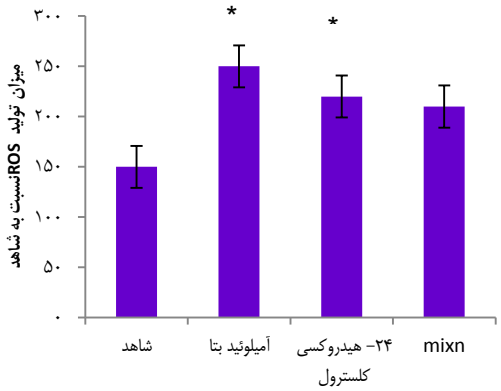
به منظور بررسی اثر کلسترول بر میزان ROS تولید شده، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف کلسترول (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰ و ۷۰ نانوگرم/میلی‌لیتر) تیمار و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند.



شکل ۲. تغییرات میزان Reactive oxygen species (ROS) تولید شده در سلول‌های آستروسیت تحت تیمار با غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰ و ۷۰ نانوگرم/میلی‌لیتر کلسترول. کلیه‌ی مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده‌اند و $P < ۰/۰۵۰$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شده است.

نتایج به دست آمده،حاصل نشان داد که میزان ROS تولید شده در گروه تیمار در مقایسه با گروه شاهد به صورت معنی‌داری افزایش یافت ($P < ۰/۰۰۳$) که تأیید کننده‌ی اثر کلسترول بر افزایش تولید ROS می‌باشد.

ب- سنجش ROS تولید شده در سلول‌های تیمار شده با ۱ میکرومولار آمیلوئید بتا در حضور و عدم حضور ۲۴- هیدروکسی کلسترول: نتایج نشان دادند زمانی که آستروسیت‌ها در معرض آمیلوئید بتا قرار می‌گیرند، میزان جذب فلورسانس و در نتیجه ROS نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد که در صورت اضافه کردن ۲۴- هیدروکسی کلسترول، این اثر افزایشی به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد (شکل ۳). اگر چه، تیمار سلول‌ها با ۲۴- هیدروکسی کلسترول نیز موجب افزایش ROS شد، اما این افزایش از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. شکل ۳، میزان ROS القا شده در سلول‌های تحت تیمار با آمیلوئید بتا، ۲۴- هیدروکسی کلسترول و تیمار همزمان آمیلوئید بتا و ۲۴- هیدروکسی کلسترول نسبت به گروه شاهد پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون را نشان می‌دهد.



شکل ۳. میزان Reactive oxygen species (ROS) تولید شده‌ی درون سلولی در سلول‌های آستروسیت تیمار شده با آمیلوئید بتا (Amyloid beta یا AB) و ۲۴- هیدروکسی کلسترول در مقایسه با گروه شاهد. کلیه‌ی مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده‌اند و $P < ۰/۰۵۰$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

بحث

در این مطالعه، سلول‌های آستروسیت به مدت ۲۴ ساعت در معرض آمیلوئید بتا و ۲۴- هیدرکسی کلسترول قرار داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان تیمار، سلول‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با محلول DHCFDA در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند و در پایان مدت زمان انکوباسیون، میزان ROS تولید شده‌ی درون سلولی آن‌ها اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر نشان داد که میزان ROS تولید شده‌ی درون سلولی در گروه تیمار شده با آمیلوئید بتا نسبت به گروه شاهد افزایش چشم‌گیری داشته است. اگر چه مکانیسم کلی بیماری آلزایمر هنوز به طور کامل مشخص نشده است، اما آمیلوئید بتا و هموستاز کلسترول، نقش مهمی در پاتوژنز بیماری آلزایمر ایفا می‌کنند (۱۶). مکانیسم دقیق سمیت (Toxicity) ناشی از آمیلوئید بتا همچنان مجهول می‌باشد. فرضیه‌های مختلفی وجود دارد مبنی بر این که استرس اکسیداتیو ناشی از القای ROS توسط آمیلوئید بتا و تجمع کلسترول، در مرگ نورونی نقش دارد (۱۷).

مکانیسم تجمع خارج سلولی آمیلوئید بتا به دلیل عدم تعادل بین تولید و پاک‌سازی آن می‌باشد، که در نتیجه‌ی تجمع آن، ROS افزایش می‌یابد و این امر، منجر به استرس اکسیداتیو می‌شود که یکی از عوامل ایجاد کننده‌ی بیماری آلزایمر است (۱۴). تجمع آمیلوئید بتا، سبب اختلال در زنجیره‌ی انتقال الکترونی، تولید ATP و متابولیسم اکسیژن می‌گردد. در نتیجه‌ی آن، میزان رادیکال‌های آزاد اکسیژن افزایش می‌یابد و استرس اکسیداتیو ایجاد می‌شود که در نهایت، به مرگ نورونی سلول‌ها منجر می‌شود (۷).

یافته‌های مطالعه‌ی Refolo و همکاران بر روی اثر هیپرکلسترولمی و ارتباط آن با آمیلوئید بتا در بیماران دچار آلزایمر نشان داد که تجمع آمیلوئید بتا به میزان کلسترول در سیستم مغزی ارتباط دارد. بنابراین، افزایش کلسترول باعث تجمع آمیلوئید بتا و افزایش سرعت ابتلا به بیماری آلزایمر می‌شود (۱۸). همچنین، مطالعه‌ی Bogdanovic و همکاران در مورد بررسی ارتباط بین بیماری آلزایمر و متابولیسم کلسترول، نشان داد که میزان بیان CYP46A1 که ژن کد کننده ی ۲۴- هیدروکسیلاز است، در بیماران دچار آلزایمر در نورون‌ها کاهش می‌یابد و در آستروسیت افزایش می‌یابد؛ این امر، نشان دهنده‌ی تغییرات متابولیسم کلسترول می‌باشد (۱۹). نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر نشان داد زمانی که سلول‌ها در معرض آمیلوئید بتا قرار می‌گیرند، ROS در آن‌ها افزایش می‌یابد که این تغییرات، افزایش ROS در سلول‌های تیمار شده با آمیلوئید بتا نسبت به گروه شاهد افزایش چشم‌گیری داشته‌اند.

علاوه بر فرضیه‌ی آبشار آمیلوئیدی و نقش آمیلوئید بتا در تولید ROS (۲۰)، تغییر هموستاز کلسترول از جمله عوامل مهم دیگری است که در بیماری آلزایمر نقش دارد. تنظیم هموستاز کلسترول، امری ضروری می‌باشد؛ چرا که در صورت نقص در متابولیسم کلسترول، اختلال در کارایی مغز ایجاد می‌شود (۲۱). مطالعات زیادی نشان داده است که تجمع کلسترول در مغز، منجر به تشکیل و رسوب پلاک‌های آمیلوئید می‌شود که در نتیجه‌ی آن نیز ROS تولید خواهد

شد (۷). نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر نیز نشان داد که میزان ROS تولید شده‌ی درون سلولی در سلول‌های آستروسیت تیمار شده با دزهای مختلف کلسترول، به میزان قابل توجهی نسبت به گروه شاهد افزایش داشته است. کلسترول، قادر به عبور از سد خونی- مغزی نمی‌باشد و همچنین، تجزیه نمی‌شود. در پی افزایش غلظت کلسترول، کریستال‌هایی تشکیل می‌شود که برای سلول‌ها به خصوص نورون‌ها توکسیک می‌باشد (۱۰).

بنابراین، زمانی که کلسترول تجمع پیدا می‌کند، باعث تشکیل ROS می‌شود که نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر نیز نشان داد که میزان ROS تولید شده‌ی درون سلولی در آستروسیت تیمار شده با دزهای مختلف کلسترول به میزان قابل توجهی نسبت به گروه شاهد افزایش داشته است. تولید ROS که از تجمع کلسترول ناشی می‌شود، برای سلول‌ها سمی است. یکی از راه‌های خروج کلسترول از سلول، تبدیل کلسترول به ۲۴- هیدروکسی کلسترول می‌باشد که ۲۴- هیدروکسی کلسترول، بر خلاف کلسترول قطبی می‌باشد (۱۱) و می‌تواند از سد خونی- مغزی عبور کند و از تجمع کلسترول درون سلولی جلوگیری می‌کند. تبدیل کلسترول به ۲۴- هیدروکسی کلسترول، از طریق آنزیم CYP46A1 انجام می‌شود. در نتیجه‌ی تبدیل کلسترول به ۲۴- هیدروکسی کلسترول، از تجمع کلسترول جلوگیری می‌شود و میزان ROS درون سلولی کاهش می‌یابد (۲۲، ۷).

در مطالعه‌ی مرتبطی، مشاهده شده است که ۲۴- هیدروکسی کلسترول، باعث افزایش سطح ABCA1، از اعضای خانواده‌ی انتقال دهنده‌های ABCA می‌شود که نقش کلیدی در فرایند انتقال معکوس کلسترول دارد و عنصر اصلی خروج کلسترول و فسفولیپید در عرض غشای سلولی به خارج است که در نتیجه‌ی افزایش بیان حاصل از ABCA1، میزان تولید و یا تجمع آمیلوئید بتا کاهش می‌یابد (۲۳). در سلول‌های آستروسیت تیمار شده با ۲۴- هیدروکسی کلسترول، میزان ROS درون سلولی کاهش می‌یابد.

نکته‌ی قابل توجه، افزایش مختصر میزان ROS تولید شده طی تیمار با ۲۴- هیدروکسی کلسترول در مقایسه با گروه شاهد می‌باشد (شکل ۳) که بر خلاف انتظار است و می‌تواند به علت اتصال ۲۴- هیدروکسی کلسترول به Liver X receptors (LXR) باشد. فعال شدن گیرنده‌های LXR -گیرنده‌ی هسته‌ای که نقش مهمی در تنظیم و هموستاز کلسترول دارد (۲۴)- توسط ۲۴- هیدروکسی کلسترول، منجر به افزایش بیان آپولیپوپروتئین E و همچنین، گیرنده‌ی ABCA1 در آستروسیت می‌شود و در نتیجه، خروج کلسترول افزایش و میزان ROS درون سلولی کاهش می‌یابد (۲۵)، اما در پی خروج کلسترول و کاهش میزان درون سلولی آن، Sterol regulatory element-binding protein (SREBP) به دستگاه گلژی منتقل و توسط پروتئاز تجزیه می‌شود و N- ترمینال این پروتئین که به عنوان یک عامل رونویسی عمل می‌کند، آزاد و وارد هسته می‌شود و سبب افزایش بیان HMGC-R و سنتز کلسترول می‌گردد و میزان اندک افزایش ROS درون سلولی، می‌تواند به دلیل سنتز دوباره‌ی کلسترول باشد (۷).

همچنین، در سلول‌های آستروسیت تیمار شده با مخلوط آمیلوئید بتا و ۲۴- هیدروکسی کلسترول نسبت به گروه تیمار شده با آمیلوئید بتا، به میزان قابل توجهی ROS درون سلولی کاهش پیدا می‌کند و این امر، نشان می‌دهد که ۲۴- هیدروکسی کلسترول، می‌تواند میزان ROS درون سلولی تولید شده توسط آمیلوئید بتا را کاهش دهد.

به طور کلی، در مطالعه‌ی حاضر، مشخص گردید زمانی که سلول‌ها در معرض دزهای مختلف کلسترول یا آمیلوئید بتا قرار گرفتند، میزان ROS درون سلولی به صورت معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش پیدا کرده است. تولید بیش از حد آمیلوئید بتا و کلسترول، نقش مهمی در پیشرفت و پاتوژنز بیماری آلزایمر دارد. از این رو، عواملی که سبب کاهش شکل‌گیری آمیلوئید بتا و حفظ تعادل کلسترول مغزی می‌شوند، با کاهش استرس اکسیداتیو می‌توانند نقش مؤثری در پیش‌گیری از بیماری آلزایمر داشته باشند.

تشکر و قدردانی

این مقاله، برگرفته از بخشی از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد بیوشیمی بالینی می‌باشد. این مطالعه، با شماره‌ی طرح CMRC-9508 و کد اخلاق IR.AJUMS.REC.1395.63 تحت مجوز و حمایت مالی معاونت توسعه‌ی پژوهش و فن‌آوری تحقیقات دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز و در گروه بیوشیمی بالینی دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی این دانشگاه انجام شد. نویسندگان از همه‌ی کسانی که در انجام این طرح همکاری نمودند، سپاسگزاری می‌نمایند.

References

1. Kodamullil AT, Younesi E, Naz M, Bagewadi S, Hofmann-Apitius M. Computable cause-and-effect models of healthy and Alzheimer's disease states and their mechanistic differential analysis. Alzheimers Dement 2015; 11(11): 1329-39.
2. Eufemi M, Cocchiola R, Romaniello D, Correani V, Di FL, Fabrizi C, et al. Acetylation and phosphorylation of STAT3 are involved in the

responsiveness of microglia to beta amyloid. Neurochem Int 2015; 81: 48-56.
3. Lombardo S, Maskos U. Role of the nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease pathology and treatment. Neuropharmacology 2015; 96(Pt B): 255-62.
4. Singh M, Kaur M, Kukreja H, Chugh R, Silakari O, Singh D. Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: from nerve toxins to neuroprotection. Eur J Med Chem 2013; 70: 165-88.
5. Miranda S, Opazo C, Larrondo LF, Munoz FJ, Ruiz F, Leighton F, et al. The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease. Prog Neurobiol 2000; 62(6): 633-48.
6. Spuch C, Ortolano S, Navarro C. New insights in the amyloid-Beta interaction with mitochondria. J Aging Res 2012; 2012: 324968.
7. Murphy RC, Johnson KM. Cholesterol, reactive oxygen species, and the formation of biologically active mediators. J Biol Chem 2008; 283(23): 15521-5.
8. Maciel EN, Vercesi AE, Castilho RF. Oxidative stress in Ca(2+)-induced membrane permeability transition in brain mitochondria. J Neurochem 2001; 79(6): 1237-45.
9. Lecis C, Segatto M. Cholesterol Homeostasis Imbalance and Brain Functioning : Neurological Disorders and Behavioral. Journal of Neurology and Neurological Disorders 2015; 1(1): 1-14.
10. L__tjohann D, Meichsner S, Pettersson H. Lipids in Alzheimer□_ı̈s disease and their potential for therapy. Clinical Lipidology 2012; 7(1): 65-78.
11. Leoni V, Caccia C. 24S-hydroxycholesterol in plasma: a marker of cholesterol turnover in neurodegenerative diseases. Biochimie 2013; 95(3): 595-612.
12. Abildayeva K, Jansen PJ, Hirsch-Reinshagen V, Bloks VW, Bakker AH, Ramaekers FC, et al. 24(S)-hydroxycholesterol participates in a liver X receptor-controlled pathway in astrocytes that regulates apolipoprotein E-mediated cholesterol efflux. J Biol Chem 2006; 281(18): 12799-808.
13. Gibson WW, Eckert GP, Igbavboa U, Muller WE. Amyloid beta-protein interactions with membranes and cholesterol: causes or casualties of Alzheimer's disease. Biochim Biophys Acta 2003; 1610(2): 281-90.
14. Gamba P, Leonarduzzi G, Tamagno E, Guglielmotto M, Testa G, Sottero B, et al. Interaction between 24-hydroxycholesterol, oxidative stress, and amyloid-beta in amplifying neuronal damage in Alzheimer's disease: three partners in crime. Aging Cell 2011; 10(3): 403-17.
15. Ito J, Nagayasu Y, Lu R, Kheirollah A, Hayashi M, Yokoyama S. Astrocytes produce and secrete FGF-1, which promotes the production of apoE-HDL in a manner of autocrine action. J Lipid Res 2005; 46(4): 679-86.
16. Ferrera P, Mercado-Gomez O, Silva-Aguilar M, Valverde M, Arias C. Cholesterol potentiates beta-amyloid-induced toxicity in human neuroblastoma cells: involvement of oxidative stress. Neurochem Res 2008; 33(8): 1509-17.
17. Dasari B, Prasanthi JR, Marwarha G, Singh BB, Ghribi O. Cholesterol-enriched diet causes age-related macular degeneration-like pathology in rabbit retina. BMC Ophthalmol 2011; 11: 22.
18. Refolo LM, Malester B, LaFrancois J, Bryant-Thomas T, Wang R, Tint GS, et al. Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. Neurobiol Dis 2000; 7(4): 321-31.
19. Bogdanovic N, Bretillon L, Lund EG, Diczfalusy U, Lannfelt L, Winblad B, et al. On the turnover of brain cholesterol in patients with Alzheimer's disease. Abnormal induction of the cholesterol-catabolic enzyme CYP46 in glial cells. Neurosci Lett 2001; 314(1-2): 45-8.
20. Angelova PR, Abramov AY. Interaction of neurons and astrocytes underlies the mechanism of Abeta-induced neurotoxicity. Biochem Soc Trans 2014; 42(5): 1286-90.
21. Noguchi N, Saito Y, Urano Y. Diverse functions of 24(S)-hydroxycholesterol in the brain. Biochem Biophys Res Commun 2014; 446(3): 692-6.
22. Sato Y, Bernier F, Yamanaka Y, Aoshima K, Oda Y, Ingelsson M, et al. Reduced plasma desmosterol-to-cholesterol ratio and longitudinal cognitive decline in Alzheimer's disease. Alzheimers Dement (Amst) 2015; 1(1): 67-74.
23. Prasanthi JR, Huls A, Thomasson S, Thompson A, Schommer E, Ghribi O. Differential effects of 24-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol on beta-amyloid precursor protein levels and processing in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Mol Neurodegener 2009; 4: 1.
24. Wang Y, Rogers PM, Su C, Varga G, Stayrook KR, Burris TP. Regulation of cholesterologenesis by the oxysterol receptor, LXRalpha. J Biol Chem 2008; 283(39): 26332-9.
25. Wong J, Quinn CM, Brown AJ. SREBP-2 positively regulates transcription of the cholesterol efflux gene, ABCA1, by generating oxysterol ligands for LXR. Biochem J 2006; 400(3): 485-91.

DOI: *10.22122/jims.v36i482.9989* *Published by Vesnu Publications*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 36, No. 482, 2nd Week, August 2018**

Received: 22.04.2018 Accepted: 04.07.2018 Published: 30.07.2018

The Effect of 24-Hydroxy Cholesterol on Production of Reactive Oxygen Species (ROS) in Cultured Astrocytes Treated by Beta Amyloid

Zahra Nazeri[1], Shirin Azizidoost[2], Maryam Cheraghzadeh[3], Bahar Sepiani[1], Alireza Kheirollah[4]

Original Article

Abstract

Background: Alzheimer's disease is a neurodegenerative disorder characterized by the accumulation of beta-amyloid plaques outside the cells, and intracellular hyperphosphorylation of tau protein. Amyloid beta is involved in both the pathogenesis of Alzheimer's disease and induction of reactive oxygen species (ROS). Since 24-hydroxy cholesterol (24-OHCho) as a polar metabolite can eliminate excess cholesterol in the brain, we investigated the regulatory role of 24-hydroxy cholesterol on the level of reactive oxygen species induced by exogenous cholesterol and amyloid beta.

Methods: Astrocytes were isolated from the brain of newborn C57BL/6 mice, and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) + 10% fetal bovine serum (FBS). Intracellular reactive oxygen species were measured in cells treated with various concentration of cholesterol by fluorimeter, and also in the presence of beta amyloid with or without of 24-hydroxy cholesterol. Results were analyzed using ANOVA test via SPSS software.

Findings: The production of reactive oxygen species was significantly increased when astrocytes were treated with exogenous cholesterol or amyloid beta, compare to control. However, treating with 24-hydroxy cholesterol significantly decreased the level of reactive oxygen species in beta-amyloid group.

Conclusion: Based on various reports, beta-amyloid increases cholesterol levels in patients with Alzheimer's disease. On the other hand, 24-hydroxy cholesterol is one of the important factors in regulating cholesterol homeostasis in the brain, and plays an efficient role in reduction of intracellular generation of reactive oxygen species in the case of Alzheimer's disease, by reduction of cholesterol.

Keywords: Alzheimer, Amyloid beta, 24-hydroxy cholesterol, Cholesterol, Reactive oxygen species

Citation: Nazeri Z, Azizidoost S, Cheraghzadeh M, Sepiani B, Kheirollah A. **The Effect of 24-Hydroxy Cholesterol on Production of Reactive Oxygen Species (ROS) in Cultured Astrocytes Treated by Beta Amyloid.** J Isfahan Med Sch 2018; 36(482): 607-13.

1- MSc Student, Department of Biochemistry, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
2- PhD Student, Department of Biochemistry, School of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
3- PhD in Molecular Genetics, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
4- Associate Professor, Department of Biochemistry, School of Medicine, Cellular and Molecular Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
Corresponding Author: Alireza Kheirollah, Email: akheirollah@ajums.ac.ir