دانشگاه خوارزمی

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد رشته سلولی تکوینی جانوری

دانشکده علوم زیستی

عنوان:

بررسی اثر میکروپارتیکل تاکرین متصل به کایتوسان مغناطیسی بر تخریب بافت مغزی ناشی از Streptozotocin از طریق رسپتور موسکارینی در رت نر نژاد ویستار

اساتید راهنما:

دکتر هما محسنی کوچصفهانی

دکتر غلامرضا حسن زاده

استاد مشاور:

دکتر محمد شریف زاده

نگارش:

کوثر حاج محمد اسماعیل نوری

سال 1391

تقدیم به پدر و مادر و خانواده‌ام به پاس عاطفه سرشار و گرمای امیدبخش وجودشان که در این سردترین روزگاران بهترین پشتیبان است.

تقدیم به پدر و مادر همسرم به پاس محبت های بی‌دریغشان که هرگز فروکش نمی‌کند.

به پاس قدردانی از قلبی آکنده از عشق و معرفت که محیطی سرشار ازسلامت و امنیت و آرامش و آسایش برای من فراهم آورده است؛

همدلی که با واژه‌ی نجیب و مغرور تلاش آشنایی دارد و تلاش راستین را می‌شناسد و عطر رویایی آن را استشمام می‌کند و مرا در راه رسیدن به اهداف عالی یاری می‌رساند؛

همو که حس تعهد و مسئولیت را در زندگی‌مان تلالو داده است؛ این پایان نامه تقدیم به همسرم مهربانم می‌گردد.

تقدیم به فرزند دلبندم، شادی‌آفرین زندگیم .....غزل..... که سختی های همراه با من را تحمل نمود.

تقدیم به دوستانم طاهره و مهری و همه کسانی که در این امر مرا یاری نمودند.

با تشکر از زحمات بی‌دریغ، تلاش های بی‌وقفه و راهنمایی های ارزشمند اساتید محترم، سرکار خانم دکتر کوچصفهانی و جناب آقای دکتر حسن زاده که هر دو با وجود مشغله‌ی بسیار همیشه در کنارم حضور داشتند.

با تشکر از مشاوره و زحمات جناب آقای دکتر محمد شریف زاده.

با تشکر از جناب آقای دکتر نبیونی که زحمت داوری این پایان نامه را بر عهده داشتند.

با تشکر از اساتید و پرسنل محترم آزمایشگاه جنین شناسی و داروسازی دانشگاه تهران: جناب آقای دکتر کاشانی، خانم قاسمی، آقای غلامی و آقای کلانتری که نهایت همکاری را در طول انجام این پایان نامه داشتند.

با تشکر از کمک های بی‌ریای دوستانم طاهره و مهری.

و در نهایت تشکر می‌کنم از خانواده و همسرم به خاطر یاری های بی‌دریغشان.

چکیده:

بیماری آلزایمر یک بیماری نورودژنریتیو پیشرونده و کشنده است که با آسیب به حافظه و شناخت، آشکار می‌شود. یکی از تغییرات مهم در این بیماری نقص در سیستم کولینرژیک مرکزی که نقش مهمی در حافظه و یادگیری دارد، است. در واقع یک نقص در نوروترنسمیتر آمینواسید تحریکی در این بیماری به همراه نقش مهم سیستم کولینرژیک دیده می‌شود. با توجه به نقش سیستم کولینرژیک به عنوان یک تعدیل کننده‌ی نوروترنسمیتر تحریکی روش های درمانی بر اساس جبران سیستم کولینرژیک پیش سیناپسی به وجود آمده است. فرضیه‌ی کولینرژیک دژنره شدن نورون های پیش سیناپسی کولینرژیک در بازال فوربرین و از بین رفتن انتقال کولینرژیک در کورتکس مغز و هیپوکامپ و دیگر نواحی را به عنوان اختلال شناختی در بیماری آلزایمر معرفی می‌کند که به دنبال آن کاهش شدید در مارکرهای پیش سیناپسی کولینرژیک به وجود می‌آید. ارتباط بین نقص در عملکرد کولینرژیک و بیماری آلزایمر یک دلیل منطقی برای استفاده‌ی درمانی از ممانعت کننده های استیل کولین استراز را ارائه می‌دهد. تاکرین با فرمول شیمیای 4،3،2،1-تتراهیدرو-9-آمینو-آکریدین (THA)، اولین داروی مورد تأیید برای درمان علائم بیماری آلزایمر، یک ممانعت کننده استیل کولین استراز برگشت پذیر به همراه چندین خاصیت فارماکولوژیکی چون برهم کنش با رسپتور های استیل کولینی نیکوتینی و موسکارینی افزایش سنتز و رهاسازی استیل کولین در کورتکس مغز رت و... است. اما به دلیل اثرات جانبی تاکرین مثل سمیت کبدی، در این آزمایش با استفاده از سیستم تحویل داروی هدفمند تاکرین در شکل دارویی جدید تاکرین متصل به کایتوسان مغناطیسی ساخته شد. از طرفی برای ایجاد مدل آلزایمری از تخریب مغزی به وسیله‌ی Stz ، استفاده شد. تزریق Stz به صورت درون بطن جانبی مغز رت، مدلی با ویژگی های افزایش فعالیت استیل کولین استراز، کاهش میزان استیل کولین، افزایش مقاومت به انسولین در مغز، کاهش استفاده از گلوکز و کاهش متابولیسم انرژی و تولید پلاک های آمیلوئیدی پس از سه ماه، ایجاد می‌کند که می‌تواند به عنوان یک مدل خوب برای آلزایمر در آزمایشات استفاده شود. در این مطالعه‌ی تجربی با توجه به اثرات احتمالی تاکرین از طریق رسپتور های موسکارینی (چه از طریق افزایش غلظت استیل کولین و چه از طریق برهم‌کنش مستقیم خود تاکرین با رسپتور

موسکارینی) تأثیر بلوک رسپتور های موسکارینی بر عملکرد بهبود دهنده‌ی این شکل جدید تاکرین به صورت سیستم تحویل داروی هدفمند در مدل آلزایمری شده به وسیله‌ی تزریق درون بطن مغزی Stz بررسی شد. بدین منظور از رت های نر نژاد ویستار با وزن تقریبی 30±280 گرم استفاده شد. تزریق Stz به صورت درون بطن مغزی (3mg/kg) و در دو مرحله به فاصله‌ی 48 ساعت، تزریق داروی تاکرین متصل به کایتوسان مغناطیسی به صورت درون ورید دمی و پس از اولین تزریق Stz است که پس از آن یک آهنربای مناسب بر روی سر حیوان به مدت یک ساعت قرار می‌گیرد. برای بلوک رسپتورهای موسکارینی از Scopolamine (0.1mg/kg) و به صورت درون صفاقی و در سه مرحله 2، 12 و 24 ساعت پس از تزریق تاکرین متصل به کایتوسان مغناطیسی استفاده شد. تست های مورد استفاده در این مطالعه آزمایش رفتاری ماز آبی موریس (بررسی حافظه‌ی فضایی) پس از 14 روز از اولین تزریق Stz، Real time-PCR (بررسی میزان بیان ژن app و seladine) پس از 21 روز از اولین تزریق Stz، رنگ آمیزی های تانل (برای بررسی سلول های دچار آپوپتوز شده) و کنگورد (بررسی میزان آمیلوئید)، هر دو 90 روز پس از اولین تزریق Stz، می‌باشد.

تزریق Stz (3mg/kg) زمان و مسافت پیموده شده برای رسیدن به سکوی پنهان در آزمایش ماز آبی موریس را به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد، که کاهش یادگیری حافظه‌ی فضایی را اثبات می‌کند. همچنین این مدل آلزایمری باعث افزایش آپوپتوز در ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ با استفاده از تست تانل می‌شود. تزریق تاکرین متصل به کایتوسان مغناطیسی این کاهش در یادگیری حافظه‌ی فضایی را بهبود می‌بخشد و همچنین میزان آپوپتوز را در تست مذکور کاهش می‌دهد. اما استفاده از اسکوپولامین (بلوکر رسپتور های موسکارینی) در گروه تیمار شده‌ی آلزایمری باعث جلوگیری اثرات درمانی داروی آنتی اکسیدان در دو شاخص بهبود یادگیری حافظه‌ی فضایی و کاهش میزان آپوپتوز می‌شود. یافته ها در مورد تست Real time-PCR نشان می‌دهد که داروی آنتی اکسیدان در مدل آلزایمری بیان ژن seladin-1 (4.18 برابر) را به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد. اما میزان بیان ژن app در مقایسه با گروه Saline اختلاف معنی‌داری نشان نمی‌دهد. استفاده از اسکوپولامین در گروه آلزایمری تیمار شده باعث کاهش معنی‌داری در

میزان بیان هر دو ژن seladin-1 و app در مقایسه با گروه Saline نشان می‌دهد. نتایج حاکی از عملکرد تاکرین متصل به کایتوسان مغناطیسی در افزایش بیان ژن seladin از طریق رسپتورهای موسکارینی دارد. اما به طور قطع نمی‌توان گفت این آنتی اکسیدان از طریق رسپتور موسکارینی میزان ژن app را در حد معمول حفظ می‌کند چرا که تفاوت معنی‌داری با گروه Saline نشان نمی‌دهد. در گروه Stz و با رنگ آمیزی کنگورد پلاک آمیلوئیدی در ناحیه‌ی CA1 در هیپوکامپ مشاهده شد. اما در گروه آلزایمری تیمار شده و در گروه آلزایمری تیمار شده به همراه استفاده از اسکوپولامین پلاک آمیلوئیدی دیده نشد.

نتایج نشان می‌دهد تاکرین متصل به کایتوسان مغناطیسی با استفاده از مسیر سیگنالینگ رسپتورهای موسکارینی در مدل آلزایمری شده با استفاده از تزریق درون بطن مغزی استرپتوزوتوسین، باعث بهبود یادگیری حافظه‌ی فضایی، کاهش مرگ سلولی و همچنین افزایش بیان ژن seladin-1 و app نسبت به مدل آلزایمری می‌شود.

کلمات کلیدی: آلزایمر، استرپتوزوتوسین، تاکرین متصل به کایتوسان مغناطیسی، اسکوپولامین، رسپتورهای موسکارینی، یادگیری حافظه‌ی فضایی، تست تانل و رنگ آمیزی کنگورد.

فهرست مطالب

چکیده.....1

1- مقدمه

1-1 بیماری آلزایمر.....5

1-1-1 آمیلوئید بتا.....6

1-1-1-1 تنظیم تولید آمیلوئید بتا.....6

1-1-2 تائو.....7

1-1-2-1 تنظیم فسفریلاسیون تائو.....7

1-1-3 از بین رفتن نورون های کولینرژیک.....7

1-1-4 اثر آمیلوئید بتا بر عوامل دیگر.....8

1-1-4-1 نقش آمیلوئید بتا در هایپرفسفریله شدن پروتئین تائو.....8

1-1-4-2 تعدیل کولینرژیک توسط آمیلوئید بتا.....8

الف) اثرات کوتاه مدت آمیلوئید بتا بر کشت نورون های کولینرژیک.....8

ب) اثرات طولانی مدت آمیلوئید بتا بر کشت نورون های کولینرژیک.....9

ج) اثرات آمیلوئید بتا بر نورون های کولینرژیک در محیط in vivo.....10

د) نقش آمیلوئید بتا در هایپراکتیویتی هیپوکامپ.....10

1-1-5 اثر تنظیم کولینرژیک در پردازش APP.....12

1-1-6 نقش ژن seladine-1.....13

1-1-7 فرضیه های مطرح شده درباره‌ی علت ایجاد بیماری آلزایمر.....14

1-1-7-1 فرضیه‌ی آبشار آمیلوئید.....14

1-1-7-2 فرضیه‌ی کولینرژیک.....14

1-1-7-3 فرضیه‌ی نقص PKC (نقش PKC در ایجاد آلزایمر).....14

1-1-7-4 فرضیه‌ی پاتولوژی سیناپسی 16
الف) مکانیسم پاتولوژی سیناپسی 16
ب) پاتولوژی سیناپسی و ارتباط آن با آمیلوئید بتا 17
1-1-7-5 فرضیه‌ی مقاومت به انسولین 18
1-2 استرپتوزوتوسین 18
1-3 یادگیری و حافظه 20
1-4 آناتومی یادگیری و حافظه 21
1-4-1 هیپوکامپ 21
1-4-2 میانجی های عصبی CA1 23
1-4-3 سیستم کولینرژیک به عنوان یک میانجی عصبی دخیل در یادگیری و حافظه 23
1-5 هیپوکامپ و حافظه‌ی فضایی 23
1-6 ماز آبی موریس (Morris Water Maze) 24
1-7 آپوپتوز 25
1-7-1 سیگنالینگ رسپتور موسکارینی در حفاظت از مرگ سلولی 28
1-8 سیستم کولینرژیک 29
1-8-1 استیل کولین 30
1-8-2 رسپتور های استیل کولین 30
1-8-3 رسپتور موسکارینی 30
1-8-4 تقسیم بندی فارماکولوژیکال انواع رسپتور های موسکارینی 31
1-8-5 مسیرهای سیگنالینگ درون سلولی 31
1-9 تغییرات استیل کولین و رسپتور موسکارینی در بیماری آلزایمر 32
1-9-1 نوروترنسمیتر استیل کولین و تغییرات آن در بیماری آلزایمر 32

1-9-2 رسپتور موسکارینی استیل کولین و تغییرات آن در بیماری آلزایمر..... 32
1-10 تاکرین..... 34
1-11 رسپتور موسکارینی استیل کولین و اثر تاکرین بر آن..... 35
1-12 سیستم تحویل داروی هدفمند..... 36
1-12-1 روش تحویل دارو..... 36
1-12-2 هدفمند سازی دارو..... 37
1-13 تاکرین متصل به کایتوسان مغناطیسی..... 37
1-13-1 اکسید آهن..... 38
1-13-2 کایتوسان..... 38
1-14 هدف و فرضیه..... 39
2- مواد و روش ها
2-1 حیوانات..... 42
2-2 ابزار..... 42
2-3 مواد..... 44
2-4 روش ها..... 44
2-4-1 جراحی حیوانات..... 45
2-4-2 تزریق دارو..... 48
الف) تزریق Stz..... 48
ب) تزریق داروی تاکرین متصل به کایتوسان مغناطیسی و قرار دادن آهنربا..... 50
ج) تزریق Scopolamine..... 50
2-4-3 روش آزمایش..... 51
2-4-4 روش کار با ماز آبی موریس..... 51

2-4-5 پرفیوژن قلبی (Transcardially Perfusion) 51
2-4-6 مطالعه‌ی میزان بیان ژن با روش Real time-PCR 53
2-4-6-1 نمونه‌گیری 53
2-4-6-2 تخلیص RNA : (RNA purification) 53
الف) خلاصه ای از اساس جداسازی RNA 53
ب) مواد و معرفهای مورد نیاز 53
ج) دستگاههای مورد نیاز 54
د) روش کار استخراج و تخلیص RNA 54
2-4-6-3 تولید cDNA 56
الف) وسایل و مواد مورد نیاز 56
2-4-6-4 مراحل تولید cDNA 57
2-4-6-5 تعیین غلظت cDNA و رقیق سازی 60
2-4-6-6 طراحی پرایمر 60
2-4-6-7 مرحله عملی واکنش Real-Time-PCR 62
الف) مقدمه‌ای در مورد دستگاه Real-Time PCR 62
2-4-6-8 موادشیمایی و رنگ‌های فلورسنت در دستگاه Real-time PCR 62
2-4-6-9 رنگ اینترکاله (SYBR-Green I) 62
2-4-6-10 پرایمر دایمر 63
2-4-6-11 Threshold Cycle (CT) 64
2-4-6-12 دما و زمان 64
2-4-6-13 آنالیز داده های کمی 65
الف) روش ارزیابی نسبی 65

2-4-6-14 منحنی تکثیر 66
2-4-6-15 وسایل و مواد مورد نیاز 68
2-4-7 روش آماری برای تحلیل داده ها 68
2-4-8 مطالعه‌ی میزان آپوپتوز در هیپوکامپ با استفاده از کیت TUNEL 69
الف) مرحله‌ی اول: آماده سازی بافت مغز (Tissue processing) 69
ب) مرحله‌ی دوم: رنگ آمیزی با استفاده از کیت تانل 70
ج) کنترل مثبت 73
د) کنترل منفی 73
2-4-9 مطالعه میزان تشکیل رسوبات آمیلوئیدی با استفاده از رنگ آمیزی Congo Red 73
3- نتایج
بخش اول: نمودار های حاصل از تست رفتاری 78
3-1 آزمایش اول (نتایج حاصل از تزریق دوطرفه درون بطنی-مغزی حلال Saline، تزریق درون صفاقی scopolamine و تزریق درون وریدی دارو در مقایسه با گروه surgery) 79
3-2 آزمایش دوم (بررسی اثر تجویز دو طرفه درون بطنی Stz بر حافظه فضایی در مقایسه با گروه Saline) 87
3-3 آزمایش سوم (یافتن دز مؤثر داروی مگنتیک کایتوسان تاکرین به همراه استفاده از آهنربا در رت های دریافت کننده‌ی Stz) 94
3-4 آزمایش چهارم: (مطالعه‌ی اثر بلوک رسپتور موسکارینی با استفاده از Scopolamine بر میزان بهبودی داروی تاکرین متصل به کایتوسان مغناطیسی با هدفدار کردن به وسیله‌ی قرار دادن آهنربا بر روی سر در رت های تخریب مغزی شده با Stz) 102
بخش دوم: عکس های میکروسکوپی از قسمت هیپوکامپ،
رنگ آمیزی شده به روش تانل و کنگورد 110

شکل های تانل 111

شکل های کنگورد.....113

بخش سوم: نتایج حاصل از Real time-PCR.....115

4- **بحث** 120

5- **پیشنهادات** 129

6- **منابع** 131

فهرست اشکال، نمودارها و جداول

شکل 1. تغییرات نوروشیمیایی مختلف در بیماری آلزایمر که منجر به مرگ سلولی و در نهایت آسیب شناختی می‌شوند.....20

شکل 2. نحوه‌ی قرار گرفتن رت در دستگاه استریوتاکس.....45

شکل 3. نحوه‌ی شکاف دادن و برداشتن پوست سر حیوان.....46

شکل 4. نمایش محل کانول گذاری در بطن های جانبی.....47

شکل 5. نحوه‌ی کانول گذاری و چسباندن آن ها.....48

شکل 6. نحوه‌ی تزریق محلول Stz به وسیله‌ی سرنگ همیلتون.....49

شکل 7. مراحل ساخت cDNA.....59

جدول 1. مراحل تولید cDNA.....59

جدول 2: توالی پرایمر ها، دمای اتصال به رشته‌ی الگو و طول محصول نهایی cDNA برای دو ژن seladin-1 و app.....61

شکل 8. رنگ های اینترکاله، نظیر SYBR-Green I(SG) به مولکول دو رشته‌ای DNA متصل می‌شوند.....63

شکل 9. پرایمر دایمر.....64
شکل 10. منحنی تکثیر.....67
جدول 3. مراحل مختلف tissue processor.....70
جدول 4. مراحل شفاف سازی و آب دهی.....71
جدول 5. مراحل مختلف آب گیری و شفاف سازی.....72
جدول 6. مراحل مختلف شفاف سازی و آب دهی.....75
جدول 7. مراحل آب گیری و شفاف سازی.....76
نمودارهای حاصل از تست رفتاری آزمایش اول.....81
نمودارهای حاصل از تست رفتاری آزمایش دوم.....88
نمودارهای حاصل از تست رفتاری آزمایش سوم.....96
نمودارهای حاصل از تست رفتاری آزمایش چهارم.....104
شکل 12. بررسی میزان آپوپتوز در سلول های هیپوکامپ در مقایسه با گروه Saline.....111
شکل 13. مشاهده میزان آپوپتوز در سلول های هیپوکامپ در مقایسه با گروه Saline.....112
شکل 14. بررسی میزان پلاک های آمیلوئید در سلول های هیپوکامپ درمقایسه با گروه Saline.
.....113
شکل 15. بررسی میزان پلاک های آمیلوئید در سلول های هیپوکامپ درمقایسه با گروه Saline.
.....114
جدول 8. میزان بیان ژن seladin-1 با روش Real time-PCR، نسبت به گروه Saline.....116
نمودار 25-3: میزان بیان ژن seladin-1 با روش Real time-PCR.....117
جدول 9. میزان بیان ژن app با روش Real time-PCR، نسبت به گروه Saline.....118
نمودار 26-3: میزان بیان ژن app با روش Real time-PCR.....119

فصل اول

مقدمه

1-1 بیماری آلزایمر

بیماری آلزایمر 10% افراد بالاتر از 65 سال و 50% افراد بیشتر از 85 سال را درگیر می‌کند. زنان تقریبا" 1/5 برابر بیشتر از مردان دچار آلزایمر می‌شوند. این بیماری 15 میلیون نفر را در سرتاسر جهان مبتلا می‌کند. تخمین زده می‌شود آلزایمر 4/5 میلیون آمریکایی را متأثر کرده است.

بیماری آلزایمر یک بیماری نورودژنریتیو پیشرونده و کشنده است که با آسیب به حافظه و شناخت، تخریب پیشرونده‌ی فعالیت های روزانه، طیفی از انواع روانپریشی و اختلالات رفتاری آشکار می‌شود. ویژگی این بیماری آتروفی کورتکس مغزی و از بین رفتن نورون های قشری است. ویژگی های نوروپاتولوژی آلزایمر که در انسان پس از مرگش مورد بررسی قرار گرفته شامل: پلاک های غنی از آمیلوئید، نوروفیبریلاری تنگل ها و دژنره شدن نورون ها است. تخریب حافظه‌ی کوتاه مدت ویژگی اولیه‌ی آلزایمر است. همانطور که این شرایط پیشرفت می‌کند، توانایی های شناختی بیشتری تخریب می‌شود. (1)

بیماری آلزایمر از نظر کلینیکی منحصر به فرد است چرا که تنها عضوی از بیماری های زوال عقل است که معمولا" با از دست دادن حافظه‌ی اخیر و در غیاب نقص های شناختی دیگر شروع می‌شود. دیگر گونه های زوال عقل، مثل آن هایی که در نتیجه‌ی کمبود ویتامین B_{12} ایجاد می‌شود، بیماری های پارکینسون، کره‌ی هانتینگتون و یا سکته‌ی مغزی با علائم حرکتی مرتبط است. بیماری آلزایمر با سه عامل پاتولوژیک در ارتباط است: پلاک های آمیلوئیدی خارج سلولی، نوروفیبریلاری تنگل ها که در داخل سلول هستند و از بین رفتن نورون های کولینرژیک بازال فوربرین.

این بیماری به دو شکل familial (FAD) و sporadic (SAD) دیده می‌شود. در فرم اولیه‌ی آن یک ارتباط ژنتیکی قوی بین ویژگی های پاتولوژی در این بیماری و موتاسیون در ژن پروتئین پیش ساز آمیلوئید (APP)، ژن پرسنیلین 1 و 2 (PS-1, PS-2) وجود دارد. (2)

شکل Sporadic آلزایمر یک بیماری چند فاکتوری است که دارای هم فاکتور های ژنتیکی و هم فاکتور های غیر ژنتیکی است. فاکتور های ژنتیکی اثبات شده برای این نوع ApoE، آلل epsilon 4 و پلی مورفیسم پروموتور PS-2 است. داده های جمع‌آوری شده نشان می‌دهد که اختلال در چندین جنبه از

متابولیسم سلولی باعث ظهور عوامل پاتولوژیک در نوع Sporadic می‌شود. در بین این موارد افزایش مقاومت به انسولین در مغز، کاهش استفاده از گلوکز و کاهش متابولیسم انرژی، در مراحل اولیه‌ی این بیماری مشاهده می‌شود و در نهایت کمبود (نقص) انرژی، استرس اکسیداتیو و التهاب در بافت نورونی باعث از بین رفتن نورونی در فرم Sporadic بیماری آلزایمر می‌شود. (2)

1-1-1 آمیلوئید بتا

پلاک های آمیلوئیدی از تجمع پروتئین های محلول شناخته شده ی آمیلوئید بتا ($A\beta_{1-42}$) و دیگر گونه های آمیلوئید بتا مثل ($A\beta_{1-40}$) تشکیل می شوند. مونومر های محلول Aβ که اغلب ($A\beta_{1-42}$) هستند، به طور پیشرونده‌ای شروع به الیگومریزه شدن به صورت تجمعات بزرگتر می‌کنند، تا پلاک های آمیلوئیدی را تشکیل دهند. در نتیجه‌ی کلیواژ بتا سکرتاز پروتئین پیش ساز آمیلوئید (APP)، یک قطعه‌ی انتهایی NH_2 تولید می‌شود و کلیواژ بعدی توسط گاما سکرتاز یک پپتید آمیلوئید بتا تولید می‌کند، که دارای 40، 42 و یا 43 آمینواسید است. اما کلیواژ APP توسط آنزیم آلفا سکرتاز در یک سایت دیگر باعث تولید APP به صورت محلول (APPs) می شود که به طور کلی غیر سمی فرض می‌شود، کلیواژ توسط آلفا سکرتاز در سطح سلول انجام می‌شود و باعث انداختن اکتودومین APP به بیرون از سلول می‌شود. (3)

1-1-1-1 تنظیم تولید آمیلوئید بتا

اغلب شواهد پیشنهاد می کنند که تولید APPs به وسیله ی آنزیم آلفا سکرتاز به طور رقابتی تولید Aβ توسط آنزیم های بتا- و گاما- سکرتاز را کاهش می دهد. ایزوزیم های آلفا و زیگما پروتئین کیناز C (PKC) و احتمالا" ایزوزیم های دیگر می توانند یا به طور مستقیم آنزیم آلفا سکرتاز را فعال کنند که این آنزیم هم APP را به صورت APPs شکاف می دهد و یا به صورت غیر مستقیم و از طریق فسفریلاسیون کیناز تنظیم کننده‌ی خارج سلولی (ERK1/2) آنزیم آلفا سکرتاز را فعال کند.

Statin (جزء دارو های پایین آورنده‌ی کلسترول) باعث افزایش رهاسازی sAPP (از طریق آلفا سکرتاز) می شود و استفاده از مهار کننده های PKC و یا ERK1/2 این افزایش را بلوک نمی‌کند، این مسئله نشان می دهد آلفا سکرتاز می تواند توسط مکانیسمی مستقل از PKC و MAPKs فعال شود.

بیشتر Aβ مترشحه احتمالا" در شبکه‌ی ترانس دستگاه گلژی (TGN) تولید می‌شوند، در حالی که $A\beta_{1-42}$ درون سلولی در بخش های حد واسط شبکه‌ی اندوپلاسمی ER-IC تولید می‌شود، هر دو آنزیم آلفا و بتا سکرتاز ظاهرا" در هر دو اندامک ER-IC و TGN و همچنین در غشای پلاسمایی فعال هستند. (3)

1-1-2 تائو

تائو یک پروتئین ساختاری است که به توبولین متصل می‌شود و آن را در میکروتوبول های آکسونی تثبیت می‌کند. تائو در بیماری آلزایمر هایپرفسفریله می‌شود و یک فیلامان جفت هلیکال نامحلول را تشکیل می دهد که در داخل جسم سلولی نورون تجمع پیدا می‌کند. این تجمعات، نوروفیبریلاری تنگل نامیده می شوند که همراه با پلاک های آمیلوئیدی، با از بین رفتن پیشرونده ی نورون ها، سیناپس ها و دمانس ارتباط دارند. (3)

1-1-2-1 تنظیم فسفریلاسیون تائو

اگرچه ERK1/2 که در قسمت بعد شرح داده خواهد شد می تواند باعث هایپرفسفریله شدن تائو شود، اما کیناز اصلی که این عمل را انجام می دهد، GSK-3β است. PKC می تواند از طریق مستقیم با مهار GSK-3β و از طریق غیر مستقیم با اثر بر روی Aβ، فسفریلاسیون تائو و میزان نوروفیبریلاری تنگل ها را کاهش می‌دهد. (3)

1-1-3 از بین رفتن نورون های کولینرژیک

از بین رفتن نورون های کولینرژیک در بازال فوربرین و ازبین رفتن انتقال کولینرژیک در کورتکس مغز و دیگر نواحی مهمترین عامل در تخریب حافظه در بیماری آلزایمر می‌باشد، اگرچه فقدان این نورون ها می تواند در نتیجه‌ی عوامل دیگر چون آمیلوئید بتا، فسفریلاسیون پروتئین تائو و ... ایجاد شود. (3)

1-1-4 اثر آمیلوئید بتا بر عوامل دیگر

1-1-4-1 نقش آمیلوئید بتا در هایپرفسفریله شدن پروتئین تائو

فیبریل $A\beta_{1-42}$ باعث القای فعالیت ERK1/2 می شود که آن منجر به هایپرفسفریله شدن تائو و نورودژنریشن متعاقب آن می‌شود. علاوه بر این فرم سمی Aβ که می تواند باعث اختلال عمل سیناپسی

شود مرگ سلولی را از طریق فعال کردن مسیر ERK1/2 و کلیواژ پروتئولیتیک تائو القا می‌کند. $A\beta_{1-42}$ همچنین یک فعال کننده‌ی GSK-3β است، که همانطور که گفته شد خود کیناز اصلی تائو است. فرم سمی Aβ با اتصال به PKC باعث جلوگیری از فعالیت این آنزیم می‌شود (3). Aβ به علاوه باعث فعالیت MAPK شده که آن خود یک کیناز برای پروتئین تائو است. (4)

1-1-4-2 تعدیل کولینرژیک توسط آمیلوئید بتا

الف) اثرات کوتاه مدت آمیلوئید بتا بر کشت نورون های کولینرژیک

غلظت های پیکومولار پپتید های Aβ گام های گوناگون سنتز و رهاسازی استیل کولین را بدون ظهور هرگونه نوروتوکسیسیتی، به طور منفی تنظیم می‌کند. پتانسیل بالا و طبیعت برگشت پذیر این اثر، به همراه این واقعیت که غلظت های پیکومولار-نانومولار Aβ به صورت پایدار در سلول های مغز افراد نرمال وجود دارد، پیشنهاد می کند که پپتید های مربوط به Aβ می تواند به عنوان تعدیل کننده‌ی عمل کولینرژیک تحت شرایط نرمال عمل کند. در معرض قرار دادن Aβ در غلظت های پیکومولار-نانومولار می‌تواند از رهاسازی استیل کولین توسط کانال پتاسیم و یا وراتریدین در برش های کورتکس و هیپوکامپ رت جلوگیری کند. این اثر نسبت به تترودوتوکسین حساس نیست که پیشنهاد کننده ی این است که پپتید Aβ ممکن است در سطح ترمینال های کولینرژیک عمل کند. حساسیت نورون های کولینرژیک به Aβ در کورتکس، هیپوکامپ و استریاتوم با نقشه‌ی آسیب پذیری ناحیه ای در بیماری آلزایمر مطابقت می‌کند. (4) مکانیسم های سلولی که Aβ میزان رهاسازی استیل کولین در مناطق خاصی از مغز را کاهش می‌دهد ناشناخته است. گام های گوناگون ضروری برای سنتز و رهاسازی استیل کولین، داخل شدن در وزیکول و... می‌تواند به وسیله ی Aβ تخریب شود. گردش استیل کولین در ترمینال های کولینرژیک تنظیم می‌شود، بنابراین افزایش رهاسازی استیل کولین وابسته به افزایش سنتز آن است. زمانی که برش های مغزی در معرض غلظت های کمتر از میزان حداکثری عوامل دپلاریزه کننده مثل K^+ یا وراتریدین قرار می‌گیرد، سنتز استیل کولین همپای رهاسازی آن از ترمینال صورت می‌گیرد. تولید استیل کولین تحت این شرایط وابسته به چسبندگی کولین بازجذب شده از منابع خارج سلولی به کوآنزیم A و استیل کولین ترنسفراز

درون سلولی است. در دسترس بودن کولین یک سرعت محدود کننده و تعیین کننده برای میزان و سرعت بیوسنتز استیل کولین است، در حالی که در مورد فعالیت استیل کولین ترنسفراز این طور نیست. تیمار کوتاه مدت $A\beta_{1-40/1-42}$ (در غلظت های پیکومولار-نانومولار)، در بافت هوموژنیزه و یا برش های آماده شده ی هیپوکامپ، کورتکس و یا استریاتوم، بر روی فعالیت استیل کولین ترنسفراز اثر ندارد. به طور مشابه گزارش شده که $A\beta_{25-35}$ اثرات شدیدی بر روی فعالیت استیل کولین ترنسفراز در مغز رت های بالغ و یا مسن ندارد. غلظت های نانومولار $A\beta_{1-42}$ و نه $A\beta_{1-40}$، فسفریلاسیون آنزیم استیل کولین ترنسفراز در سلول های نوروبلاستومای انسانی بیان کننده‌ی این آنزیم را به طور شدیدی تنظیم می‌کند. این اثر بر روی فسفریلاسیون آنزیم استیل کولین ترنسفراز در ارتباط با تنظیم انتقال کولینرژیک هنوز روشن نشده است. نتایج نشان می‌دهد که Aβ می‌تواند بر روی رهاسازی حاد استیل کولین اثر بگذارد که در نهایت قسمتی به وسیله‌ی تنظیم میزان چسبندگی کولین باز جذب شده با کوآنزیم A و استیل کولین ترنسفراز انجام می شود.

علاوه بر این پپتید های Aβ می‌تواند در سطح جسم سلولی برای افزایش تحریک پذیری نورونی عمل کند. نتایج نشان می‌دهد که استفاده از Aβ باعث کاهش در جریان های حساس به ولتاژ در نورون های کولینرژیک می‌شود که با تغییر در جریان های پتاسیمی مرتبط است و با ممانعت کننده های تیروزین کیناز بلوک می‌شود. این نتایج نشان می‌دهد که احتمالا" رسپتور آمیلین اثرات Aβ را در نورون های کولینرژیک بازال فوربرین میانجی می‌کند. (4)

ب) اثرات طولانی مدت آمیلوئید بتا بر کشت نورون های کولینرژیک

تیمار نورون های سپتال با غلظت های نانومولار $A\beta_{1-42}$، تولید ACh و فعالیت آنزیم تولید کننده‌ی استیل کوآنزیم A، پیروات دهیدروژناز را کاهش می‌دهد بدون اثر بر روی فعالیت استیل کولین ترنسفراز یا بقای نورونی. کاهش فعالیت پیروات دهیدروژناز احتمالا" نتیجه‌ی فعالسازی تائو پروتین کیناز I، گلیکوژن سنتاز کیناز-3بتا توسط Aβ است که می‌تواند پیروات دهیدروژناز را فسفریله و غیر فعال کند. این مطالعه نشان می‌دهد که Aβ تولید Ach را با کاهش در دسترس بودن استیل کوآنزیم A کم می‌کند. علاوه بر این Aβ

به صورت محلول انتقال سیگنال رسپتور موسکارینی شبه m1 را مختل می کند. در معرض قرار دادن چهار ساعته با $A\beta_{1-40}$ در غلظت های نانومولار-میکرومولار القای فعالیت GTPase توسط کرباکول (آگونیست غیر انتخابی رسپتور موسکارینی) را در کشت نورون های کورتکس مغز رت کاهش می‌دهد بدون اثر بر روی پارامتر های اتصال لیگاند رسپتور موسکارینی. بنابر نتایج اختلال انتخابی سیگنالینگ موسکارینی وسیله‌ی دیگری برای تأثیر Aβ بر نورون های کولینرژیک است. یافته ها حاکی از آسیب پذیر بودن سلول های بیان کننده‌ی نوروترنسمیتر های کولینرژیک به پپتید های Aβ است. (4)

ج) اثرات آمیلوئید بتا بر نورون های کولینرژیک در محیط in vivo

بعضی مطالعات حاکی از القای کاهش عملکرد کولینرژیک توسط Aβ هستند. تزریق $A\beta_{25-35/1-40}$ در سپتوم میانی کاهش در رهاسازی Ach از هیپوکامپ را موجب می‌شود بدون ایجاد هیچگونه سمیت در هیپوکامپ. یافته‌ی مشابهی نشان می‌دهد که $A\beta_{1-42}$ برای نورون های کولینرژیک سمی است. تزریق موضعی $A\beta_{1-42}$ به نوکلئوس بازالیس مگنوسلولاریس تولید رسوبات کنگوفیلیک و یک پاسخ التهابی قوی که توسط فعال شدن آستروسیت ها و میکروگلی ها و القای فعالیت p38MAP kinase میکروگلایال، مشخص می شود را باعث می شود. این تغییرات همراه می‌شود با کاهش در نورون های کولینرژیک در اطراف رسوبات آمیلوئید و کاهش عملکرد سیستم کولینرژیک کورتکس مغز. (4)

د) نقش آمیلوئید بتا در هایپراکتیویتی هیپوکامپ

بیماری آلزایمر با چندین عامل مخرب، شامل عواملی که پردازش و ذخیره‌ی اطلاعات را انجام می‌دهند مرتبط است. یکی از اصلی ترین نقص های عملی در بیماری آلزایمر کاهش شدید فعالیت نورونی است، این خاموشی گسترده‌ی مدارهای نورونی است که پایه گذار فرضیه‌ی نقص سیناپسی است. به طور جالب توجهی، شواهد اخیر یک نقشه‌ی پیچیده‌ای از نقص نورونی را در این بیماری نشان می‌دهد، که اثبات کننده ی مخلوطی از نورون های هایپراکتیو و هایپواکتیو در مناطق مختلف مغز است. به عنوان مثال، در موش های ترنس ژنیک در APP و PS1، نیمی از نورون ها در لایه ی 2/3 از کورتکس از لحاظ کارکردی تخریب شدند، به همراه یک کاهش در فعالیت نورونی در 29% نورون ها (که در اصطلاح نورون های خاموش گفته