

مقاله پژوهشی

مونو فسفوریل لیپید-آ میکروگلیاها را به سمت ترشح کموکاین سوق می دهد

بهار خشکرودیان، محمد سیاح*، حمید غلامی پور بدیع*

گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

پذیرش: ۲۰ مرداد ۱۴۰۰

دریافت: ۲۰ تیر ۱۴۰۰

چکیده

زمینه و هدف: رایج ترین اشکال بتآمیلوئید در مرحله اولیه بیماری آلزایمر اولیگومرهای بتآمیلوئید هستند که برای سلول های عصبی بسیار سمی هستند و می توانند عملکرد سیناپسی و حافظه را مختل کنند. از طرفی توانایی آن ها برای فعال کردن میکروگلیاها بحث برانگیز است. لیگاندهای قوی و ضعیف گیرنده های شبه تول (TLR) میتوانند میکروگلیاها را در ایجاد پروفایل سایتوکاینی و کموکاینی متفاوتی تحریک نمایند. در این مطالعه میزان بیان سیتوکاین اینترلوکین-۶ و کموکاین پروتئین القاء شده با اینترفرون گاما-۱۰ (IP-10) از رده سلولی میکروگلیایی BV-2 در حضور و عدم حضور بتآمیلوئید مورد بررسی قرار گرفت.

روش ها: سلول های رده BV-2 در پلیت ۲۴ خانه تحت درمان با دوزهای مختلف (۱/۰، ۱ و ۱۰ میکروگرم) مونوفسفوریل لیپید آ (MPL) و لیپوپلی ساکارید (LPS) به عنوان لیگاند گیرنده TLR4 و پم-۳-سیس به عنوان لیگاند گیرنده TLR2 به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. سپس محیط رویی جمع گردید و سلول ها با محیط حاوی یک میکرومول اولیگومر بتآمیلوئید به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. بیان اینترلوکین-۶ و IP-10 به روش الایزا در محیط رویی در شرایط حضور و عدم حضور بتآمیلوئید اندازه گیری شد.

یافته ها: مطالعه ما نشان داد که هر سه لیگاند در دوز ۱۰ میکروگرم/میکرولیتر باعث ترشح معنی دار اینترلوکین-۶ شدند و MPL در تمام دوزها دارای کمترین اثر بر ترشح اینترلوکین-۶ از سلول های BV-2 میکروگلیا بود. از طرفی پیش درمان سلول های BV-2 با MPL به عنوان یک لیگاند ضعیف TLR4 باعث آزادسازی مقدار قابل توجه کموکاین IP-10 از سلول های BV-2 قبل از مواجهه با بتآمیلوئید شد.

نتیجه گیری: می توان گفت با سوق دادن میکروگلیاها برای ایجاد پروفایل پیش التهابی کمتر و ترشح کموکاینی بیشتر و احتمالاً افزایش قدرت فاگوسیتوزی این سلول ها بتوان از رسوب بتآمیلوئید و در نهایت از پیشرفت بیماری آلزایمر جلوگیری کرد.

واژه های کلیدی: بتآمیلوئید، بیماری آلزایمر، گیرنده شبه تول، مونوفسفوریل لیپید آ، میکروگلیا

مقدمه

و مهارت های ذهنی را درگیر می کند و موجب اختلال در عملکرد سیناپس ها می شود. تحقیقات مختلفی پیتیدهای دخیل در بروز بیماری آلزایمر را مورد بررسی قرار داده اند از جمله این پیتیدها بتآمیلوئید می باشد. مطالعات ژنتیکی نشان می دهند که تولید بیش از حد بتآمیلوئید در مغز از ضروریات اولیه بیماری آلزایمر می باشد [۱]. بیماری آلزایمر دارای دو مشخصه آسیب نوروئی است که یکی تجمع غیر طبیعی پروتئین بتآمیلوئید در

بیماری آلزایمر یکی از شایع ترین بیماری های تحلیل برنده دستگاه عصبی می باشد که در دوران پیری شیوع بالایی دارد. در حال حاضر تخمین زده می شود بیش از ۵۰ میلیون نفر از مردم در سراسر جهان دچار این بیماری باشند. این تعداد تقریباً هر ۲۰ سال دو برابر می شود و در سال ۲۰۵۰ به ۱۳۱ میلیون نفر خواهد رسید [۱]. از نظر بالینی، بیماری آلزایمر یک نوع اختلال پیش رونده و تحلیل برنده عملکرد مغز است که حافظه

* نویسندگان مسئول مکاتبات: sayyahm2@pasteur.ac.ir (ORCID ID: 0000-0003-0603-2444)

h_gholamipour@pasteur.ac.ir (ORCID ID: 0000-0002-7634-7428)

سیگنالینگ داخل سلولی از طریق TLR منجر به تولید مولکول‌های پیش التهابی می‌شود. TLR2 و TLR4 نقش مهمی در پاتوژنز بیماری آلزایمر ایفا می‌کنند. در این راستا، سطوح بالایی از TLR2 mRNA و TLR4 در محل رسوب پلاک‌های آمیلوئیدی در مغز بیماران آلزایمری مشاهده شده است [۶، ۷]. فعال‌سازی میکروگلیاها از طریق گیرنده‌های TLR2 می‌تواند سبب راه‌اندازی و شروع فاگوسیتوز بتا‌آمیلوئید شود [۶]. کموکاین CXCL10 که به عنوان پروتئین القاء‌شده با اینترفرون گاما-۱۰ (IP-10) نیز شناخته می‌شود یک پروتئین ۸/۷ کیلوالتونی است که در انسان توسط ژن CXCL10 رمز گذاری می‌شود. IP-10 یک کموکاین قوی برای فعالیت فاگوسیتی میکروگلیاها می‌باشد [۸].

اولیگومرهای محلول بتا‌آمیلوئید به تنهایی قادر به تحریک میکروگلیا نیستند اما برای سلول‌های عصبی سمی هستند. نشان داده شده است که تحریک میکروگلیاها از طریق گیرنده‌ها TLR2 و TLR4 می‌تواند آن‌ها را نسبت به الیگومرهای بتا‌آمیلوئید حساس نماید [۹]. در مطالعه قبلی ما دریافتیم که MPL^۲ به عنوان آگونیست نسبی TLR4 می‌تواند قدرت فاگوسیتوزی به اندازه LPS^۳ ایجاد کند [۹]. ممکن است که این لیگاند میکروگلیاها را به سمت افزایش ترشح کموکاینی و در نهایت فاگوسیتوز بیشتر سوق داده باشد. به این ترتیب، هدف از این مطالعه بررسی میزان رهاسازی سیتوکاینی و کموکاینی توسط سلول‌های میکروگلیایی تیمار شده با الیگومر بتا‌آمیلوئید در حضور و عدم حضور لیگاند‌های TLR نوع ۲ و ۴ بود.

مواد و روش‌ها

آماده سازی بتا‌آمیلوئید

بتا‌آمیلوئید اولیگومریک مورد استفاده در این تحقیق از بتا‌آمیلوئید ۱-۴۲ سنتتیک (ساخت شرکت ابکم، آمریکا) ساخته شد. به‌طور خلاصه ابتدا بتا‌آمیلوئید در یک میلی لیتر هگزا فلوئورو ایزوپروپانول^۴ (ساخت شرکت سیگماآلدריך، آلمان) حل شد و سپس به مدت یک شب در دمای محیط قرار گرفت تا خشک شود و بعد در دمای منفی ۷۰ درجه تا زمان استفاده نگهداری شد. روز قبل از آزمایش دی متیل سولفوکساید (DMSO) (ساخت شرکت سیگماآلدריך، آلمان) به استوک‌های بتا‌آمیلوئید

خارج سلول و دیگری تجمع پروتئین تائو در داخل سلول می‌باشد. تجمعات پروتئینی تشکیل شده در خارج و داخل سلول‌های عصبی سبب ایجاد اختلال در ارتباطات شبکه نورونی و نهایتاً تخریب نورون‌های خاصی در مغز می‌شود [۲]. روند آمیلوئیدوژنز (آبشار تولید آمیلوئیدی) باعث تولید مونومرهای بتا‌آمیلوئید می‌شود. با توجه به داشتن خاصیت آگریز، تکرشته‌های این پپتید با هم واکنش داده و فرم‌های دایمر، الیگومر و فیبریل را می‌سازند و به تدریج در مراحل پیشرفته‌تر بیماری فیبریل‌های آمیلوئید و پلاک‌ها در پارانشیم مغز رسوب می‌کنند [۳]. رسوب بتا‌آمیلوئید باعث فعال شدن میکروگلیاها برای تولید انواع سایتوکاینها و التهاب عصبی می‌شود و پروفایل کشنده را برای سلول‌های عصبی ایجاد می‌کند.

میکروگلیاها بخشی از ساختار حمایتی دستگاه عصبی مرکزی را تشکیل می‌دهند و ماکروفاژهای ساکن سیستم عصبی مرکزی هستند. میکروگلیاها ۵ تا ۲۰ درصد کل جمعیت سلول‌های گلیایی را تشکیل می‌دهند [۳]. آن‌ها به عنوان یک سد دفاعی مهم در برابر آسیب‌زایی مغز و نورون‌ها عمل می‌کنند و در نواحی آسیب دیده مغز تجمع پیدا می‌کنند. مطالعات صورت گرفته نشان داده است که پپتیدهای بتا‌آمیلوئید با فعال کردن میکروگلیاها تولید سایتوکاین‌ها و کموکاین‌ها را موجب می‌شوند که آن‌ها نیز به نوبه خود با ایجاد التهاب عصبی باعث تخریب نورون‌های مغزی می‌شوند. اما این سلول‌ها از سوی دیگر در پاکسازی بتا‌آمیلوئید نقش مفیدی دارند. میکروگلیاها فعال شده توانسته‌اند با فاگوسیتوز بتا‌آمیلوئید از تجمع آن کم کنند. چندین گیرنده میکروگلیایی برای فعال‌سازی و پاکسازی بتا‌آمیلوئید پیشنهاد شده است. یکی از این‌ها گیرنده پیوند دهنده پروتئین G به نام گیرنده پپتید فرمیل (FPR) است که باعث فعالیت کموتاکتیک در میکروگلیاها می‌شود [۴]. یکی دیگر از گیرنده‌های میکروگلیایی، گیرنده‌های شبه تول (TLR)^۱ هستند که از خانواده‌ی پروتئین‌های غشایی بیان شونده توسط میکروگلیاها هستند.

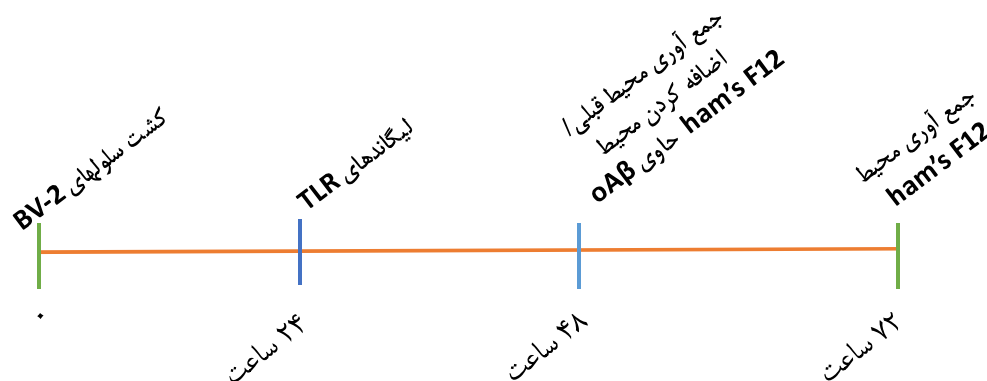
خانواده TLR دارای ۱۱ زیرواحد هستند که به محض فعال شدن می‌توانند باعث راه‌اندازی فاگوسیتوز و رهاسازی سایتوکاین‌های التهابی شوند [۵]. بتا‌آمیلوئید با راه‌انداختن

² Monophosphoryl lipid A

³ Lipopolysaccharide

⁴ Hexafluoroisopropanol

¹ Toll-like receptor



شکل ۱- برنامه زمانی کشت سلولهای BV-2 و درمان با لیگاند TLR و بتا آمیلوئید.

اولیگومریزه شده انکوبه شدند. محیط رویی جمع‌آوری شد و مانند قبل در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند (شکل ۱).

اندازه‌گیری غلظت با روش الایزا

غلظت اینترلوکین-۶ و IP-10 در محیط رویی قبل و بعد از تیمار سلول‌ها با الیگومرهای بتا‌آمیلوئید توسط کیت‌های الایزا (ساخت شرکت ای‌بیوساینس، اتریش) و با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده اندازه‌گیری شدند.

آنالیز داده‌ها

برای تجزیه و تحلیل آماری و مقایسه بین گروه‌ها از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (One way ANOVA) استفاده شد. به دنبال مقدار F معنی دار، از تست متعاقب توکی مقایسه بین گروه‌ها استفاده شد. داده‌ها بصورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد نمایش داده شدند. عدد پی کمتر از ۰/۰۵ به‌عنوان معنی دار در نظر گرفته شد. رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Graphpad prism نسخه ۶ انجام شد.

یافته‌ها

آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که تفاوت معنی‌داری در میزان آزادسازی IL-6 از سلول‌های BV-2 بین گروه کنترل و بتا‌آمیلوئید وجود ندارد. همچنین پیش‌تیمار با غلظت ۰/۱ میکروگرم بر لیتر هر سه لیگاند TLR تغییراتی در میزان رهایش IL-6 یا IP-10 ایجاد نکرد (نمودارهای ۱ و ۲).

خشک شده اضافه گردید تا به غلظت ۵ میلی‌مول برسد. سپس به آن‌ها محیط کشت Hams-F-12 فاقد سرم جنین گاوی (FBS) اضافه شد تا به غلظت نهایی ۱۰۰ میکرومول برسد. این محلول به مدت ۲۴ ساعت در دمای یخچال نگهداری شد.

کشت سلول BV-2 و درمان با لیگاند TLR و بتا‌آمیلوئید

سلول‌های میکروگلیا از نوع BV-2 (ساخت شرکت ICLC AT03001، ایتالیا) در محیط کشت (DMEM)^۵ حاوی ۱۰ درصد FBS، ۲ میلی‌مول آل-گلوتامین، ۱۰۰ U/ml پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین کشت داده شد و در دی‌اکسیدکربن ۵ درصد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس آن‌ها را در یک پلیت ۲۴ خانه با غلظت صدهزار سلول/میلی‌لیتر/چاهک ریخته و بعد از ۲۴ ساعت با MPL (ساخت شرکت سیگماآلدریج، آلمان)، Pam3cys^۶ (ساخت شرکت ابکم، آمریکا) و LPS (ساخت شرکت سیگماآلدریج، آلمان) به مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار قرار گرفتند. غلظت‌های استفاده شده برای لیگندهای TLR ۰/۱، ۱ و ۱۰ بود. سپس محیط رویی جمع‌آوری در تانک ازت منجمد و در دمای منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد. سلول‌های BV-2 با بافر فسفات تحت شست‌وشو قرار گرفتند و به مدت ۲۴ ساعت با ۳۰۰ میکرولیتر از Hams-F-12 حاوی یک میکرومول از بتا آمیلوئید-۴۲

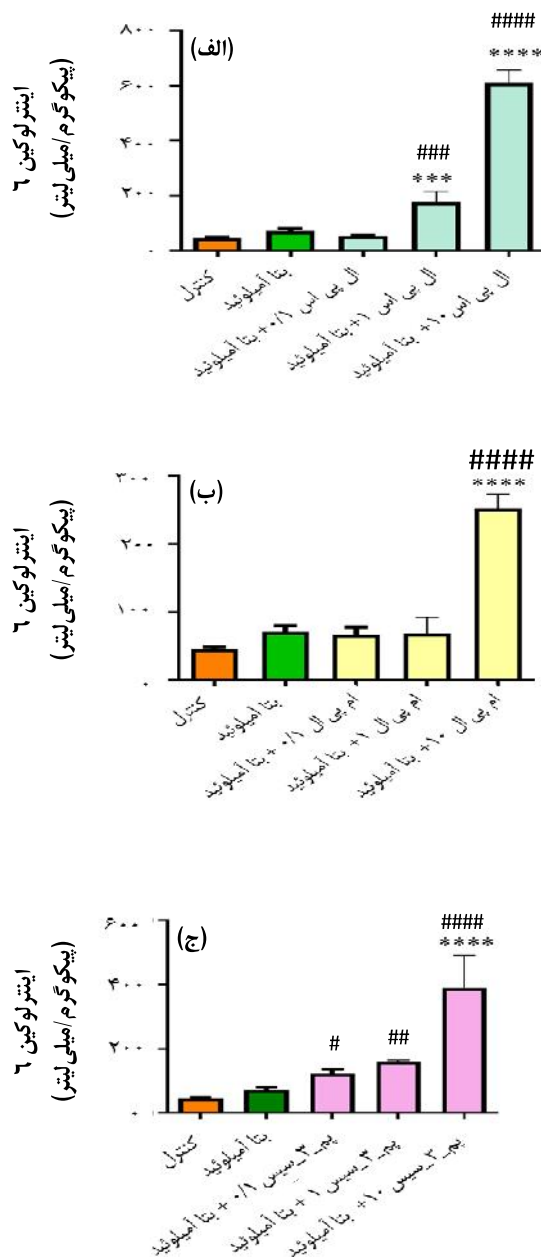
^۵ Dulbecco's Modified Eagle Medium

^۶ tri-palmitoyl-S-glyceryl-cysteine

درحالی که سلول‌های BV-2 پیش تیمار شده با غلظت ۱ ($p < 0.01$) و ۱۰ ($p < 0.01$) میکرو گرم بر میکرولیتر LPS و Pam3Cys در پاسخ به بتا آمیلوئید سطوح بالایی از IL-6 آزاد کردند (نمودار ۱). در حالی که MPL فقط در غلظت ۱۰ میکرو گرم بر میکرولیتر سلول‌های BV-2 را وادار به آزادسازی سطح معنی دار IL-6 نمود ($p < 0.001$) (نمودار ۱ب). بنابراین در میان این سه لیگاند، MPL دارای اثر ضعیف‌تری در تحریک سلول‌های BV-2 بر آزادسازی IL-6 بود. همچنین نمودار ۲ نشان می‌دهد که سلول‌های تیمار شده با بتا آمیلوئید به تنهایی مقدار کمی کموکاین IP-10 ترشح کرده‌اند، درحالی که این سلول‌ها که ۴۸ ساعت قبل در معرض غلظت ۱ میکرو گرم بر میکرولیتر MPL و Pam3Cys قرار گرفته بودند مقدار IP-10 متفاوتی نسبت به گروه کنترل یا بتا آمیلوئید نداشتند (نمودار ۲). این در حالی است که پیش درمانی با غلظت ۱ و ۱۰ میکرو گرم بر میکرولیتر LPS توانست به طور معنی داری آزاد سازی IP-10 را افزایش دهد ($p < 0.01$) (نمودار ۲الف). نمودار ۳ میزان IL-6 (الف) و IP-10 (ب) در محیط رویی جمع شده از سلول‌های BV-2 تیمار شده با ۱۰ میکرو گرم بر میکرولیتر LPS، MPL و Pam3Cys به مدت ۲۴ ساعت را نشان می‌دهد. LPS باعث آزادسازی معنی دار IL-6 و IP-10 نسبت به گروه کنترل شد. شایان توجه است که در اینجا هنوز سلول‌ها در معرض بتا آمیلوئید قرار نگرفته‌اند. Pam3Cys و MPL باعث افزایش غیرمعنی دار IL-6 شدند اما میزان بیان IP-10 را به طور بارزی نسبت به گروه کنترل افزایش دادند. این نتیجه نشان می‌دهد که MPL مانند LPS باعث افزایش ترشح کموکاین IP-10 می‌شود درحالی که در القاء بیان IL-6 ضعیفتر از LPS عمل می‌کند و نتوانست به طور معنی دار بیان این سایتوکاین را القاء نماید (نمودار ۳).

بحث

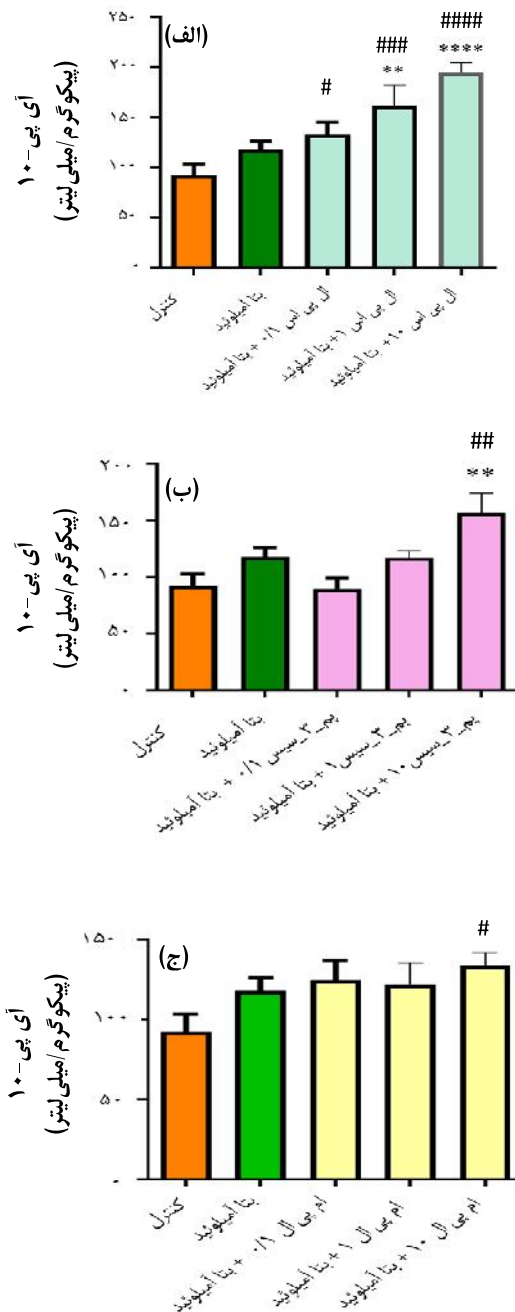
مطالعه ما نشان داد که LPS در مقایسه با Pam3cys و MPL به عنوان لیگاند اختصاصی TLR2 و TLR4 پاسخ التهابی بیشتری در سلول‌های BV-2 میکروگلیا ایجاد می‌کند و از طرفی MPL کمترین اثر التهابی را دارد. اولیگومر بتا آمیلوئید به تنهایی نتوانست سلول‌های BV-2 را وادار به آزادسازی IL-6



نمودار ۱- آزاد سازی IL-6 از سلول‌های BV-2 پیش تیمار شده با لیگاندهای TLR. بتا آمیلوئید ۱ میکرومولار به تنهایی موجب ترشح معنی دار IL-6 نشد. در دوز ۱ میکرو گرم فقط ال پی اس توانست سطح IL-6 را به طور معنی دار نسبت به گروه بتا آمیلوئید افزایش دهد (الف). اما ام پی ال و پم-۳-سیس در دوز یک میکرومولار موجب ترشح معنادار IL-6 نشدند (ب، ج). پیش تیمار میکروگلیاها با هر سه لیگاند در دوز ۱۰ میکرومولار باعث افزایش معنی دار سطح این سایتوکاین در پاسخ به بتا آمیلوئید شد. تفاوت معنی دار با گروه بتا آمیلوئید با $p < 0.01$: **, $p < 0.001$: #، تفاوت معنی دار با گروه کنترل با $p < 0.05$: #، $p < 0.01$: ##، $p < 0.001$: ###، $p < 0.0001$: #### و $p < 0.0001$: #####.

کند اما سلول‌های آماده شده^۷ با لیگاند های TLR توانستند IL-6 و IP-10 بیشتری در پاسخ به بتا آمیلوئید آزاد کنند. از طرفی، پیش تیمار سلول‌های BV-2 با لیگاندهای TLR2 و TLR4 باعث آزاد سازی مقدار زیادی کموکاین IP-10 شد. می‌توان گفت MPL در تمام دوزها دارای کمترین اثر بر ترشح اینترلوکین-۶ از سلول‌های BV-2 میکروگلیا بود. از طرفی پیش تیمار سلول‌های BV-2 با MPL (به عنوان یک لیگاند ضعیف TLR4) باعث آزاد سازی مقدار قابل توجه کموکاین IP-10 از سلول‌های BV-2 در زمان مواجهه با بتا آمیلوئید شد.

مطالعات از قبل انجام شده در سال ۲۰۱۴ نشان داده است که فعال سازی میکروگلیاها باعث فاگوسیتوزیته شدن یا تجزیه پلاک‌های بتا آمیلوئید در مدل موشی آلزایمر شده است [۱۰]. اختلال در عملکرد سیناپس‌ها یکی از مهمترین خصوصیت بیماری آلزایمر است. نشان داده شده است که در طی بیماری‌هایی مانند آلزایمر میکروگلیاها فعال می‌شوند. می‌توان با قطعیت بیان کرد که فعالیت میکروگلیاها موجب تولید مقادیر زیادی از رادیکال‌های آزاد از جمله سوپر اکسید، پراکسید هیدروژن و سایتوکین‌های پیش التهابی از جمله IL-1 β ، TNF- α و IL-6 می‌شوند که به نوروپاتولوژی آسیب رسانده و موجب مرگ نورونی می‌شوند [۱۱]. مطالعه مونس^۸ نشان داده است که در بیماری آلزایمر افزایش تعداد میکروگلیاها و ترشح سایتوکاین‌ها موجب ایجاد پاسخ التهابی شده است [۱۲]. هاردی^۹ و همکاران نیز در سال ۱۹۹۱ گزارش کردند که میکروگلیا در پاسخ به فیبریل و پلاک‌های آمیلوئیدی فعال شده و این فعالیت موجب آزاد سازی نورو توکسین‌ها و سایتوکاین‌های پیش التهابی می‌شود [۱۳]. بتا آمیلوئید می‌تواند تنظیم افزایشی TLR2 و TLR4 در میکروگلیاها را موجب شود و فعال سازی TLR2 و TLR4 می‌تواند جذب بتا آمیلوئید به وسیله میکروگلیاها را افزایش دهد. در همین راستا، با مطالعات ایمونوهیستوشیمی صورت گرفته توسط فرانک^{۱۰} در سال ۲۰۰۹ نشان داده شد که TLR2 موجود در سلول‌های میکروگلیا ارتباط زیادی با پلاک‌های آمیلوئیدی موجود در موش‌های ترانسژنیک APP23 دارد [۷]. همچنین در یک



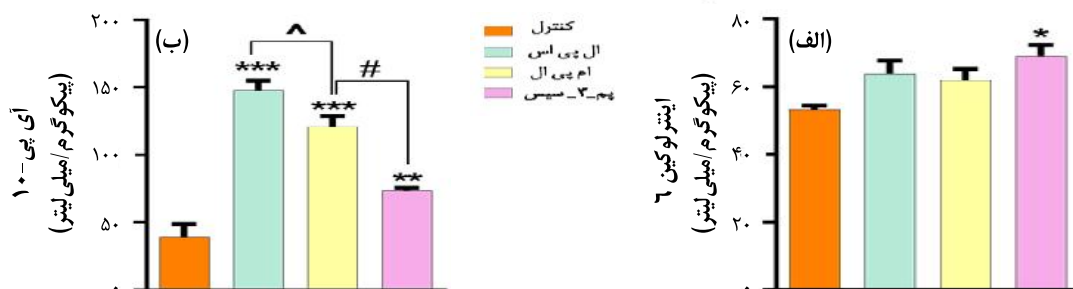
نمودار ۲- آزاد سازی IP-10 توسط غلظت یک میکروگرم/میلی لیتر لیگاندهای TLR در سلول‌های تیمار شده با بتا آمیلوئید. تیمار سلول‌های BV-2 با ۱۰ میکرومولار بتا آمیلوئید باعث ترشح معنی‌دار IP-10 در گروه ال پی اس و پم-۳-سیس گردید (الف و ب). پیش تیمار این سلول‌ها با غلظت یک میکروگرم/میلی لیتر لیگاندهای TLR ام پی ال و پم-۳-سیس تغییری در میزان ترشح این کموکاین نسبت به گروه بتا آمیلوئید ایجاد نکرد (ب و ج). *: تفاوت معنی‌دار با گروه بتا آمیلوئید با $p < 0.01$; **: تفاوت معنی‌دار با گروه بتا آمیلوئید با $p < 0.001$; ***: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل با $p < 0.001$; ****: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل با $p < 0.0001$; #: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل با $p < 0.05$; ##: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل با $p < 0.01$; ###: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل با $p < 0.001$; ####: تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل با $p < 0.0001$.

⁷ prime

⁸ Münch

⁹ Hardy

¹⁰ Frank



نمودار ۳- میزان IL-6 و IP-10 در محیط رویی سلولهای BV-2 انکوبه شده با لیگاندهای TLR. انکوبه کردن سلول های BV-2 به مدت ۲۴ ساعت با Pam3cys اما نه MPL و LPS سبب آزادسازی معنی دار IL-6 شد. (الف). هر سه لیگاند بطور بارزی سطح IP-10 را نسبت به گروه کنترل افزایش دادند (ب). * تفاوت معنی دار با گروه کنترل با $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

که دچار بیماری نورو دژنراتیو می باشند، آستروسیت ها قادر هستند سائتوکاین هایی مانند اینترلوکین-۶ و کموکاینی مانند IP-10 را بیان و فعال کنند [۱۹]. همچنین مطالعاتی که توسط تاکدا^{۱۳} در سال ۲۰۰۴ صورت گرفت نشان داد که LPS به عنوان یک لیپوپلی ساکارید شناخته شده با اتصال به گیرنده TLR4 در میکروگلیاها می تواند با فعال کردن مسیر NF-KB ترشح سائتوکاین ها و کموکاین ها را افزایش دهد [۲۰].

کموکاین ها خانواده ای از سائتوکاین های با اندازه کوچک یا پروتئین های تولید شده توسط سلول ها با چهار سیستم متصل به سولفید هستند. مطالعات صورت گرفته نشان داده است که کموکاین ها در پیشرفت بیماری های دژنراتیو دستگاه عصبی مرکزی دخیل هستند [۱۸]. در التهاب عصبی حاد، نقش CCL2 در سکنه مغزی نشان داده شده است. همچنین نشان داده شده است که بیماری آلزایمر از تجمع پلاک های پیری احاطه شده توسط سلول های ایمنی فعال، ایجاد می شود. سائتوکاین ها و کموکاین ها از جمله CCL2 سهم زیادی در التهاب دارند [۲۱]. بسیاری از سلول های مختلف سیستم اعصاب مرکزی از جمله میکروگلیاها، آستروسیت ها، نورون ها و سلول های اندوتلیال به عنوان منابع کموکاین شناخته شده اند [۲۲]. مطالعات اخیر نشان داده است که سطوح CCL2/MCP-1 و IP10/CXCL10 در مایع مغزی نخاعی بیماران آلزایمری افزایش داشته است [۲۲]. IP-10 یک کموکاین شاخص است که نقش مهمی در پیشرفت بیماری های دژنراتیو سیستم اعصاب مرکزی ایفا می کند [۱۹]. IP-10 در ایجاد برخی از بیماری های التهابی نورولوژیکی و

مدل از موش های APP نشان داده شده که مقادیر زیاد بتا آمیلوئید ارتباط زیادی با کاهش رسپتورهای TLR2 دارد. در سال ۲۰۱۶ مطالعه جانسن^{۱۱} نشان داده است که میکروگلیاها در مراحل اولیه بیماری آلزایمر فعالیت ندارند [۱۴]. اما به تازگی مطالعات با استفاده از اسکن توموگرافی نشر پوزیترون در بیماران دچار بیماری آلزایمر نشان داده است که میکروگلیاها در مراحل اولیه این بیماری فعالیت دارند [۱۵]. با این حال مطالعه غلامی پوربدیع در سال ۲۰۱۸ در ارتباط با نقش بتا آمیلوئید نشان داده است که ۱ میکرومول از بتا آمیلوئید اولیگومریک قادر به تحریک میکروگلیا و تولید سائتوکاین های پیش التهابی نمی شود [۹].

سائتوکاین ها و کموکاین ها که به عنوان پروتئین های ترشحی شناخته می شوند نقش مهمی در تمایز و رشد ایفا می کنند. سائتوکاین ها در فعالیت های التهابی و ضد التهابی آلزایمر نیز درگیر می شوند. همچنین در دستگاه عصبی مرکزی می توانند از طریق مستقیم یا غیرمستقیم تأثیرات خود را اعمال کنند [۱۶]. اینترلوکین-۶ یک سائتوکاین التهابی می باشد که در بیماران آلزایمری بیان زیادی داشته و در این بیماران موجب افزایش رسوب بتا آمیلوئیدی می شود. پژوهش ها نشان داده است که در افرادی که دچار تشنج می شوند ترشح میانجی هایی از جمله IL-1β, IL-6, IL-10 از سلول های گلیا افزایش می یابد [۱۷]. انواعی از کموکاین ها نیز در پیشرفت بیماری آلزایمر دخیل هستند [۱۸]. مطالعاتی که در سال ۱۹۹۹ توسط ژیا^{۱۲} و همکاران صورت گرفت نشان داده است که در افرادی

¹¹ Janssen

¹² Xia

¹³ Takeda

سپاسگزاری

مقاله حاضر بخشی از طرح مصوب انستیتو پاستور ایران می‌باشد. بدینوسیله از آن مرکز بابت پشتیبانی مالی این مطالعه سپاسگزاری می‌گردد.

ملاحظات مالی

این مطالعه از طریق طرح مصوب شماره ۷۰۲ انستیتو پاستور ایران پشتیبانی مالی شده است.

تعارض در منافع

نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

نقش نویسندگان

ب.خ: نگارش مقاله و آنالیز داده‌ها؛ م.س: طراحی، نظارت و ویرایش مقاله؛ ح.غ.پ: انجام مطالعه، آنالیز داده‌ها، نگارش مقاله.

خودایمنی نیز دخیل می‌باشد [۲۳]. IP-10 در بیماری آلزایمر نیز به میزان زیاد از آستروسیت‌ها آزاد می‌شود [۲۴]. تزریق پپتید بتاآمیلوئید درون مغز موش نیز موجب ترشح مقادیر زیادی از IP-10 از آستروسیت‌ها می‌گردد. تغییر رویکرد میکروگلیاها به سمت تولید کموکاین می‌تواند اهمیت بالینی داشته باشد چون از طریق تحریک فاگوسیتوزی کاهش میزان بتاآمیلوئید را به دنبال داشته و بدین وسیله ممکن است روند پیشرفت بیماری را آهسته‌تر نماید [۲۵].

نتیجه‌گیری

آماده‌سازی میکروگلیاها با MPL (به عنوان آگونیست ضعیف TLR4) با اثر التهابی کمتر می‌تواند قدرت کموکاینی و احتمالاً فاگوسیتوزی این سلول‌ها (اما در بازه زمانی کوتاه و معین) را افزایش دهد. با توجه به این‌که در درمان بیماری آلزایمر می‌بایست از یک سو واکنش‌های التهابی را سرکوب نمود و از سوی دیگر با افزایش فعالیت کموکاینی و فاگوسیتوزی میکروگلیاها (در حد معینی که تخریب بافتی ایجاد نکند)، بار بتاآمیلوئید در پارانشیم مغزی را کاهش داد، یافته‌های مطالعه ما می‌تواند در درمان بیماری آلزایمر جالب توجه باشد. با این حال تایید نهایی این دیدگاه نیازمند کارهای تحقیقاتی بیشتر است.

فهرست منابع

- [1] Cummings J, Aisen PS, DuBois B, Frölich L, Jack CR, Jones RW, Morris JC, Raskin J, Dowsett SA, Scheltens P, Drug development in Alzheimer's disease: the path to 2025. *Alzheimers Research Ther* 8 (2016) 1-12.
- [2] O'Brien RJ, Wong PC, Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Ann Rev Neurosci* 34 (2011) 185-204.
- [3] Damani MR, Zhao L, Fontainhas AM, Amaral J, Fariss RN, Wong WT, Age-related alterations in the dynamic behavior of microglia. *Aging Cell* 10 (2011) 263-276.
- [4] Iribarren P, Zhou Y, Hu J, Le Y, Wang JM, Role of formyl peptide receptor-like 1 (FPR1/FPR2) in mononuclear phagocyte responses in Alzheimer disease. *Immunol Res* 31 (2005) 165-176.
- [5] Jin J-J, Kim H-D, Maxwell JA, Li L, Fukuchi K-i, Toll-like receptor 4-dependent upregulation of cytokines in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflamm* 5 (2008) 1-10.
- [6] Chen K, Iribarren P, Hu J, Chen J, Gong W, Cho EH, Lockett S, Dunlop NM, Wang JM, Activation of Toll-like receptor 2 on microglia promotes cell uptake of Alzheimer disease-associated amyloid β peptide. *J Biol Chem* 281 (2006) 3651-3659.
- [7] Frank S, Copanaki E, Burbach GJ, Müller UC, Deller T, Differential regulation of toll-like receptor mRNAs in amyloid plaque-associated brain tissue of aged APP23 transgenic mice. *Neurosci Lett* 453 (2009) 41-44.
- [8] Langmann T, Microglia activation in retinal degeneration. *J Leukoc Biol* 81 (2007) 1345-1351.
- [9] Pourbadie HG, Sayyah M, Khoshkholgh-Sima B, Choopani S, Nategh M, Motamedi F, Shokrgozar MA, Early minor stimulation of microglial TLR2 and TLR4 receptors attenuates Alzheimer's disease-related cognitive deficit in rats: behavioral, molecular, and electrophysiological evidence. *Neurobiol Aging* 70 (2018) 203-216.
- [10] Salem AM, Ahmed HH, Atta HM, Ghazy MA, Aglan HA, Potential of bone marrow mesenchymal stem cells in management of Alzheimer's disease in female rats. *Cell Biol Int* 38 (2014) 1367-1383.
- [11] Ali I, Chugh D, Ekdahl CT, Role of fractalkine-CX3CR1 pathway in seizure-induced microglial activation, neurodegeneration, and neuroblast

- production in the adult rat brain. *Neurobiol Dis* 74 (2015) 194-203.
- [12] Münch G, Schinzel R, Loske C, Wong A, Durany N, Li J, Vlassara H, Smith M, Perry G, Riederer P, Alzheimer's disease—synergistic effects of glucose deficit, oxidative stress and advanced glycation endproducts. *J Neural Transm (Vienna)* 105 (1998) 439-461.
- [13] Hardy J, Allsop D, Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 12 (1991) 383-388.
- [14] Janssen B, Vugts DJ, Funke U, Molenaar GT, Kruijer PS, van Berckel BN, Lammertsma AA, Windhorst AD, Imaging of neuroinflammation in Alzheimer's disease, multiple sclerosis and stroke: Recent developments in positron emission tomography. *Biochim Biophys Acta* 1862 (2016) 425-441.
- [15] Hemonnot A-L, Hua J, Ulmann L, Hirbec H, Microglia in Alzheimer disease: well-known targets and new opportunities. *Front Aging Neurosci* 11 (2019) 233.
- [16] Borish LC, Steinke JW, 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 111 (2003) S460-S475.
- [17] Vezzani A, Epilepsy and inflammation in the brain: overview and pathophysiology: epilepsy and inflammation in the brain. *Epilepsy Curr* 14 (2014) 3-7.
- [18] Baggiolini M, Dewald B, Moser B, Human chemokines: an update. *Ann Rev Immunol* 15 (1997) 675-705.
- [19] Xia M, Hyman BT, Chemokines/chemokine receptors in the central nervous system and Alzheimer's disease. *J Neurovirol* 5 (1999) 32-41.
- [20] Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. In: *Seminars in immunology*, edited by: Elsevier. (2004).
- [21] Bose S, Cho J, Role of chemokine CCL2 and its receptor CCR2 in neurodegenerative diseases. *Arch Pharm Res* 36 (2013) 1039-1050.
- [22] Cartier L, Hartley O, Dubois-Dauphin M, Krause K-H, Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev* 48 (2005) 16-42.
- [23] Antonelli A, Ferrari SM, Corrado A, Di Domenicantonio A, Fallahi P, Autoimmune thyroid disorders. *Autoimmun Rev* 14 (2015) 174-180.
- [24] Xia MQ, Bacskaí BJ, Knowles RB, Qin SX, Hyman BT, Expression of the chemokine receptor CXCR3 on neurons and the elevated expression of its ligand IP-10 in reactive astrocytes: in vitro ERK1/2 activation and role in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol* 108 (2000) 227-235.
- [25] Lee CD, Landreth GE, The role of microglia in amyloid clearance from the AD brain. *J Neural Transm (Vienna)* 117 (2010) 949-960.

Research paper

Monophosphoryl lipid A switches microglia to secrete chemokines

Bahar Khoshkroodian, Mohammad Sayyah*, Hamid Gholami Pourbadie*

Department of Physiology and Pharmacology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Received: 11 July 2021

Accepted: 11 August 2021

Abstract

Background and aims: Soluble amyloid beta (A β) oligomers are the most common forms of A β in early stage of Alzheimer disease (AD). They are highly toxic to the neurons, but their capability to activate microglia remains controversial. Synaptic function and memory performance are disrupted by soluble form of A β . Full and partial toll like receptor (TLR) ligands can stimulate microglia to produce different cytokine and chemokine profiles. This study was designed to investigate the expression of interleukin-6 (IL-6) as a cytokine and protein 10 interferon gamma (IP-10) as a chemokine from BV-2 microglia cell line in the presence and absence of A β .

Methods: The BV-2 cell line was cultured in a 24-well plate, treated for 24 h with different doses (0.1, 1, 10 μ g) of Monophosphoryl lipid A (MPL), Lipopolysaccharide (LPS) as TLR4 ligands, and Pam3cys as a TLR2 ligand. Then supernatant was collected and cells were incubated with 1 μ M A β oligomer for 24 h. IL-6 and IP-10 expression was measured by ELISA in the supernatant before and after A β treatment.

Results: LPS and Pam3cys 10 μ g/ μ l induced a robust release of IL-6 from BV-2 microglia cells. However, MPL at all doses had a lowest effect on secretion of IL-6 from BV-2 microglia cells. On the other hand, pretreatment of BV-2 cells with MPL as a partial TLR4 ligand caused release of significant amount of IP-10 chemokine from BV-2 cells.

Conclusion: It can be said that priming microglia to produce less pro-inflammatory cytokines while showing higher chemokine or phagocytic activity leads to decrease in A β deposition and might prevent AD progression.

Keywords: Beta amyloid, Alzheimer's disease, Toll-like receptor, Monophosphoryl lipid A, Microglia

Please cite this article as follows:

Khoshkroodian B, Sayyah M, Gholami Pourbadie H, Monophosphoryl lipid A switches microglia to secrete chemokines. *Iran J Physiol Pharmacol* 5 (2021) 44-52.

*Corresponding authors: sayyahm2@pasteur.ac.ir (ORCID ID: 0000-0003-0603-2444);
h_gholamipour@pasteur.ac.ir (ORCID ID: 0000-0002-7634-7428)