جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله پزشکی نور
دوره ۱۰، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۴
صفحات ۷۹-۸۸

اثر آگونیست‌ها و آنتا گونیست‌های گیرنده‌های نیکوتینی استیل کولین بر بیان آنزیم استیل کولین استراز در سلول‌های SHSY5Y

حسینعلی مهرانی * Ph.D. ، دیوید اسمال ** Ph.D.

چکیده

هدف: پیدا کردن مکانیزم ارتباط عملکردی بین پروتئین آمیلوئید β، گیرنده‌های نیکوتینی و آنزیم استیل کولین استراز (AChE) دخیل در بیماری آلزایمر .

روش بررسی: در این مطالعه تجربی از سلول‌های نرو-بلاستوما SHSY5Y و فئوکروموسیتوما PC12 انسانی استفاده شد. سلول ها در محیط کشت سلولی کشت داده شدند و اثر پروتئین آمیلوید β_{1-42}، آگونیست های گیرنده های نیکوتینی و آنتاگونیست های گیرنده های نیکوتینی بربیان آنزیم استیل کولین استراز و میزان گیرنده های نیکوتینی α7 مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج حاصل نشان داد که پروتئین آمیلوئید β منجر به افزایش معنی‌داری در بیان آنزیمAChE در سلول‌های SHSY5Y گردید. اثر پروتئین آمیلوئید β در حضور توام نیکوتین آگونیست گیرنده‌های نیکوتینی و آلفا بونگارو توکسین (α-Bungarotoxin) که آنتاگونیست انتخابی گیرنده‌های نیکوتینی α7 است آن را کاهش داده و بیان آنزیم AChE به سطح طبیعی بازگشت. نیکوتین به تنهایی بر روی بیان آنزیم اثری نداشت، در صورتی‌که استیل کولین، کولین، و کاربامویل کولین منجر به افزایش معنی‌داری در میزان آنزیم کولین استراز در سلول‌های SHSY5Y شدند. آنتاگونیست‌های گیرنده‌های نیکوتینی نظیر آلفا بونگارو توکسین، متیل لایکا کونیتین (MLA) ، میکامیل آمین و دهیدرو – بتا اریتروئیدین (DHβE) هیچگونه تاثیری بر بیان آنزیم کولین استراز نداشتند. برعکس، آلفا-بونگاروتوکسین، آنتا گونیست اختصاصی گیرنده نیکوتینی α7 توام با ۱۰ میکرومولار نیکوتین بطور معنی‌داری بیان آنزیم استیل کولین استراز را در این سلول‌ها افزایش دادند. در صورتی که آنتاگونیست غیرα7 نظیر DHβE در حضور ۱۰ میکرومولار نیکوتین فاقد این اثر بود. این اثرات در سلول‌های فئوکروموسیتوما (PC12) انسانی مشاهده نشد. استیل کولین موجب افزایش گیرنده‌های نیکوتینی α7 در سطح سلول‌های SHSY5Y گردید، در صورتی که نیکوتین فاقد این اثر بود.

نتیجه‌گیری: این یافته‌ها نشان می‌دهند که افزایش بیان آنزیم استیل کولین استراز در این سلول‌ها وابسته به گیرنده‌های نیکوتینی α7 است.

واژه‌های کلیدی: استیل کولین، استیل کولین استراز، گیرنده های نیکوتینی α7 ، پروتئین آمیلوئید β سلول‌های SHSY5Y و PC12

دریافت مقاله: ۸۳/۸/۲۶، پذیرش مقاله: ۸۴/۳/۹

* *نویسنده مسئول: استاد گروه بیوشیمی و مرکز آسیب‌های شیمیایی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی بقیه‌اله «عج»، تهران - ایران ،* ** *بخش نوروبیولوژی مولکولی، گروه بیوشیمی و بیولوژی مولکولی، دانشگاه موناش استرالیا*
آدرس پست الکترونیک: h.mehrani@bmsu.ac.ir

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مـقدمـه

استیل کولین استراز (AChE) آنزیمی است که هیدرولیز سریع استیل کولین در سیستم عصبی محیطی و مرکزی را به عهده دارد. این آنزیم به فرم‌های مختلف مولکولی موجود است که در C- ترمینال و در اتصال به غشاهای سلولی و اجزای سلولی تفاوت دارند. (۲،۱) مشاهده شده است که بیان این آنزیم در سلول‌های مغزی قبل از انتقالات پیامهای بین سیناپسی و رشد پایانه‌های عصبی شروع می‌شود. احتمالاً این اثر از طریق عملکرد غیرکولینرژیک این آنزیم اعمال می‌شود. (۳)

مطالعات و شواهد زیر نشان می‌دهند که آنزیم استیل کولین استراز به نوعی در بیماری آلزایمر و بیماری‌های مشابهی که منجر به فراموشی می‌گردند دخالت دارد:

استیل کولین استراز موجب افزایش سنتز و رسوب پروتئین آمیلوئید β در سلول‌های مغزی می‌شود. (۴) استیل کولین استراز تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی را تشدید می‌کند. (۵) در مقایسه با موش طبیعی، در موش ترانسژنیک که استیل کولین استراز بیشتری را بیان می‌کند، پلاک‌های آمیلوئیدی تشکیل شده بزرگتر هستند (۶) و بطور کلی بیان آنزیم استیل کولین استراز در سلول‌های مغزی بیماران آلزایمری کاهش یافته است، در صورتی که در پلاک‌های آمیلوئیدی رسوب داده در مغز این بیماران، مقدار آنزیم بیشتر است. (۸،۷)

گیرنده‌های نیکوتینی استیل کولین از نظر فارماکولوژی و فیزیولوژی متفاوت از گیرنده‌های موسکارینی استیل کولین هستند. اگرچه استیل کولین و آگونیست‌های مشابه نظیر کاربامویل کولین بر هر دو دسته گیرنده اثر می‌گذارند، گیرنده‌های نیکوتینی دارای تنوع عملکرد فیزیولوژیکی بیشتری هستند. در سال‌های اخیر لیگاندهای نیکوتینی در درمان دردهای مختلف و بیماری‌های ضایعات مغزی و روانی کاربرد گسترده ای پیدا کرده اند. (۱۰،۹) گیرنده‌های نیکوتینی نوع α7 از ۵ زیر واحد مشابه تشکیل یافته است و از نظر فارماکولوژیکی عملکرد متفاوت از سایر گیرنده‌های نیکوتینی دارند. در مقایسه با سایر گیرنده‌های نیکوتینی این نوع گیرنده میل ترکیبی بیشتری نسبت به آنتاگونیست آلفا- بونگارو توکسین دارد. این گیرنده‌ها از سینیتیک بالایی برخوردارند که سریعاً تحریک و خیلی زود غیر حساس می‌شوند. همچنین این نوع گیرنده‌ها نسبت به انواع دیگری گیرنده‌های نیکوتینی به یون کلسیم (Ca^{2+}) تراوایی بیشتری دارند. با تغییر میزان کلسیم درون سلولی این گیرنده‌ها می‌توانند مسیرهای وابسته به کلسیم نظیر پیام رسان‌های ثانویه و القای بیان ژن‌های وابسته به سیگنال‌های کلسیم را فعال نمایند. (۱۱)

اخیراً محققین نشان داده‌اند که پروتئین آمیلوئید β_{1-42} دارای توالی خاصی است که با میل ترکیبی بالایی به گیرنده‌های نیکوتینی α7 متصل می‌شود. (۱۳،۱۲) علاوه بر این در پلاک‌های مغزی بیماران آلزایمر این دو پروتئین بطور متحد شناسایی شده اند. همچنین مشاهده شده است پروتئین آمیلوئید β موجب مهار عمل کرد سلول نسبت به عمل گیرنده‌های نیکوتینی می‌شود. (۱۵،۱۴) شواهد دیگر گویای این است که رسوب آمیلوئیدی در مغز موش آلزایمری بیان ژن‌های گیرنده‌های نیکوتینی را تغییر می‌دهد. (۱۶) مشاهده شد که متعاقب درمان با نیکوتین در سلول‌های SHSY5Y بیان ۱۷ ژن مختلف تغییر می‌کند. توبوکورارین آنتاگونیست عمومی گیرنده‌های نیکوتینی بجز از بیان دو ژن، اثرات نیکوتینی مشاهده شده بر ۱۵ ژن دیگر را برطرف کرد. این تحقیق نشان داد که بیان این ژنها وابسته به گیرنده‌های نیکوتینی هستند. (۱۷) این محققین در یافتند اثر توام آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های نیکوتینی بر روی این گیرنده‌ها متفاوت از عملکرد آگونیست و آنتاگونیست به تنهایی است. درموش‌های ترانسژنیک که استیل کولین استراز بیشتری تولید می‌کنند بیان گیرنده‌های نیکوتینی افزایش می‌یابد. این عمل احتمالاً یک مکانیزم جبرانی نسبت به افزایش آنزیم استیل کولین استراز است. (۱۸)

هدف از این مطالعه یافتن مکانیزم ارتباط عمل بین پروتئین آمیلوئید β ، گیرنده‌های نیکوتینی و آنزیم استیل کولین استراز در سلول‌های نروبلاستومای انسان (SHSY5Y) بود. نتایج

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تحقیق حاکی از این است که آنتاگونیست انتخابی گیرنده‌های نیکوتینی α7 به تنهایی قادر به افزایش بیان آنزیم استیل کولین استراز نیست، بلکه این آنتاگونیست توام با نیکوتین بیان این آنزیم را در این سلول‌ها افزایش می‌دهد.

روش بـــررســـی

محیط کشت . مواد مورد نیاز کشت سلولی و سلول‌های SHSY5Y و PC12 همه از شرکت گیبکو و (Invetrogen) استرالیا تهیه شد. پلیت‌های کشت از شرکت نانک امریکا خریداری شد. کیت اندازه‌گیری تکثیر و بقای سلولی از شرکت پرومیگا خریداری شد. آگونیست‌ها، آنتاگونیست‌ها و سایر مواد شیمیایی از شرکت سیگما - آلدریچ تامین شد. پروتئین آمیلوئید β طبق روش Mok و همکاران سنتز شد. (۱۹) محلول استوک با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در دی‌متیل‌سولفوکسید تهیه و در ۸۰°C- نگهداری شد. جهت بررسی اثر پروتئین آمیلوئید بتا، بایستی این پروتئین در مرحله ساختاری خاصی باشد که پیرشدگی یا (aging) می‌نامند. لذا برای این منظور محلول استوک این پروتئین بیست برابر در آب مقطر دی یونیزه رقیق شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷°C و ۵٪ CO_2 انکوبه شد.

نحوه کشت سلول‌های SHSY5Y و PC12 . کشت استوک این سلول‌ها در محیط DMEM:Ham's F12(1:1) که حاوی ۱۰٪ FCS ، ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین بود در دمای ۳۷° C و ۵٪ CO_2 در هوای مرطوب در فلاکس‌های ۷۵ سانتیمتر مربع انجام شد. کشت استوک سلول‌ها به نسبت ۱/۴ هر دوهفته یک بار انجام می‌گرفت. جهت ساب کالچر از فلاکس‌های T25، پلیت‌های ۶ خانه و یا ۹۶ خانه‌ای استفاده می‌شد. زمانی که سلول‌ها به ۸۰٪ کانفلوئنسی می‌رسیدند به مدت ۴۸ ساعت با آگونیست‌ها، آنتا گونیست‌ها و یا پروتئین آمیلوئید β مورد تیمار قرار می‌گرفتند. پس از این مدت سلول‌ها به روش زیر هموژن و میزان آنزیم استیل کولین استراز مورد بررسی قرار می‌گرفت. لازم به یاد آوری است که زمان تیمار ۴۸ ساعته زمان اپتیمایز شده‌ای بود که توسط آزمون‌های متفاوت حاصل شد.

لیز و هموژنه کردن سلول ها . سلول‌های کشت داده شده به روش زیر لیز شدند. ابتدا توسط ساکشن الکتریکی محیط کشت از سلول‌ها جدا می‌شد و سپس سلول‌ها دو بار با بافر نمکی فسفات (PBS) سرد شسته می‌شدند. جهت تعلیق سلول‌ها از تریپسین استفاده می‌شد و اثر تریپسین با آنتی‌تریپسین خنثی می‌شد. سلولها مجدداً دو بار با استفاده از بافر نمکی فسفات جهت حذف تریپسین و آنتی تریپسین با استفاده از سانتریفیوژ در ۸۰۰g به مدت ۵ دقیقه شسته می‌شدند. سلول‌های رسوب داده شده در یک میلی لیتر بافر لیز (تریس-هیدروکلرید ۵۰ میلی مولار، NaCl ۵۰۰ میلی مولار، EDTA ۵ میلی مولار، حاوی کاکتیل پروتئازها و تریتون X100 ۰/۲٪ ، pH برابر ۷/۵) لیز می‌شدند. لیز سلول‌ها را به مدت ۳۰ دقیقه در یخ قرار داده و با استفاده از سونیکاتور حاوی یخ به فواصل ۵ دقیقه به مدت ۱۰ ثانیه هموژنه می‌شدند. سپس محلول هموژن را به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g در دمای ۴°C سانتریفیوژ نموده و سوپرناتانت برای اندازه گیری فعالیت آنزیم استیل کولین استراز بکار می‌رفت.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم استیل کولین استراز . فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در دمای ۲ ± ۲۲ درجه سانتیگراد به روش تغییر یافته المن اندازه‌گیری شد. (۲۰)

بطور خلاصه فعالیت آنزیم به دو روش میکرو و یا سینیتیکی مورد بررسی قرار گرفت. در روش میکرو با استفاده از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای ابتدا آنزیم به مدت ۱۰ دقیقه با معرف DTNB انکوبه می‌شد تا واکنش‌های جانبی گروه‌های سولفوهیدریل انجام بگیرد. در این روش هر خانه پلیت حاوی ۱۰۰ میکرو لیتر بافر پتاسیم فسفات ۰/۱ مولار، با pH برابر ۷/۶ ، DTNB ۱/۲ میلی مولار، ۵۰ میکرولیتر هموژنه حاوی آنزیم و ۵۰ میکرولیتر سوبسترای استیل تیوکولین ۵ میلی مولار بود. با استفاده از پلیت ریدیر بیو رد (Bio-rad) هر ده دقیقه افزایش جذب واکنش در ۴۱۲ نانومتر قرائت می‌شد و

نتایج در کامپیوتر دستگاه ذخیره می‌گردید.

در روش سینیتیکی از اسپکتروفتومتر استفاده می‌شد، با این تفاوت که حجم محلول نهایی با حفظ غلظت‌های اپتیمایز شده قبلی ۲ میلی‌لیتربود. با استفاده از برنامه سینیتیکی دستگاه، هر ۳۰ ثانیه میزان جذب در ۴۱۲ نانومتر به مدت ۱۰ دقیقه قرائت و نتاج در کامپیوتر دستگاه ذخیره می‌شد. در هر دو روش از دو نمونه شاهد (Blank) یکی دارای ۱۰ میکرومولار BW(1,5-bis(4-allyldimethyl-ammoniumphenyl)pentan-3-one dibromide) (مهار کننده آنزیم اختصاصی استیل کولین استراز) جهت حذف فعالیت سایر کولین استرازها و یکی شامل همه مواد بجز هموژنه آنزیم جهت حذف واکنش‌های غیر آنزیمی، استفاده گردید. جذب شاهدها را از جذب نمونه کم کرده و فعالیت آنزیم به صورت نانو مول در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

اندازه‌گیری پروتئین . **مقدار** تام پروتئین در نمونه‌های استخراج شده از سلول‌های کشت یافته با روش فوق‌العاده حساس Bicinchoninic Acid (BCA) اندازه‌گیری و از آلبومین سرم گاوی بعنوان استاندارد استفاده شد. (۲۱)

اندازه گیری میزان زنده ماندن (viability) سلول‌ها . میزان زنده ماندن سلول‌ها در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای با استفاده از کیت Cell Titer 96 Aqueous one solution cell proliferation assay kit اندازه‌گیری شد. در این روش از ماده MTS [۳-(۴، ۵ دی متیل تیازول -۲-ایل (-۵- (۳- کربوکسی متوکسی فنیل (۲-(۴- سولفونیل) ۲H-تترازولیوم] به‌عنوان ماده رنگ‌زا استفاده می‌شود. سلول‌ها با دانسیته حدود ۲۵۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت در حضور و بدون حضور آنتا گونیست‌ها و آگونیست‌های نیکوتین به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند. پس از این مدت سلول‌ها دو بار با PBS شسته شدند. به هرچاهک ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت بدون سرم اضافه شد. سپس به هرچاهک ۲۰ میکرو لیتر از معرف فوق را افزوده و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷°C و ۵٪ CO_2 در دمای مرطوب انکوبه شد. پس از این مدت میزان جذب نمونه‌ها در ۴۹۰ نانومتر با استفاده از پلیت ریدیر قرائت شد.

اندازه‌گیری گیرنده‌های نیکوتینی . **جهت** اندازه‌گیری گیرنده‌های نیکوتینی α7 سلول‌های SHSY5Y با دانسیته ۲۵۰۰ سلول در هر چاهک پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند. پس از این مدت محیط کشت را تخلیه و سلول‌ها دوبار با PBS شسته شدند. غلظت‌های مختلفی از نیکوتین و استیل کولین (۱۰ میکرومولار، ۱۰۰ میکرو مولار و ۱ میلی مولار) به هر ردیف از پلیت ۹۶ خانه‌ای جداگانه افزوده شد. سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت دیگر طبق شرایط ذکر شده در روش کشت سلولی کشت داده شدند. محیط کشت تخلیه و سلول‌ها دو بار با PBS شسته شدند. به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی ۱۰۰ نانومولار آلفا-بونگارو توکسین فلورسانس (Alexa Flour labeled α-bungarotoxin) افزوده ودر دمای ۳۷°C به مدت سه ساعت انکوبه شد. محیط کشت تخلیه و سلول‌ها دوبار با PBS شسته شدند. به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر PBS افزوده و نمونه ها با استفاده از پلیت ریدیر فلورسانس BMG Labtechnologies 96 درطول موج تحریکی ۵۹۰ و نشری ۶۱۵ نانومتر قرائت شدند. سلول‌های گروه شاهد فاقد نیکوتین و استیل کولین بودند. لازم به ذکر است نتایج حاصل در تمام نمونه‌ها میانگین حد اقل ۶ آزمون متفاوت است که در اندازه‌گیری‌ها نیز هر آزمون به صورت چهارتایی تکرار شده اند.

تجزیه و تحلیل آماری . داده‌ها بر حسب میانگین و انحراف استاندارد (mean±SEM) گزارش شده است. مقایسه آماری به روش آنالیز واریانس (ANOVA) و با استفاده از تست Dunnet دوطرفه انجام یافته است.

یافته‌ها

سلول‌هایSHSY5Y طبق قسمت روش‌ها به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند و سپس با مواد مختلف تیمار شدند. بعد از مدت ۴۸ ساعت سلول‌ها لیز و فعالیت آنزیم و میزان پروتئین اندازه‌گیری شد. فعالیت ویژه آنزیم به صورت میزان فعالیت در میلی‌گرم پروتئین گزارش شد. با افزودن

غلظت‌های مختلف از نیکوتین به محیط کشت این سلول‌ها اختلاف معنی‌داری بین گروه شاهد (بدون نیکوتین) و گروه تیمار شده در میزان پروتئین و فعالیت ویژه آنزیم استیل کولین استراز مشاهده نشد (جدول ۱). با وجود این وقتی که این سلول‌ها با آگونیست‌های دیگر نیکوتین نظیر کاربامویل کولین، استیل کولین و کولین (آگونیست انتخابی گیرنده‌های α7 ,EC_{50} = 1.5 mM) تیمار شدند، فعالیت آنزیم استیل کولین استراز نسبت به گروه شاهد در گروه های تیمار شده بطور معنی‌داری ($p<0.01$) افزایش یافت. (نمودار ۱)(۲۲) غلظت موثر این ترکیبات جهت القای آنزیم استیل کولین استراز حدود ۱ میلی‌مولار بود. در غلظت‌های پایین‌تر اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. استیل کولین و کولین افزایش معنی‌دار بیشتری در القای آنزیمی نسبت به کاربامویل کولین نشان دادند ($p<0.05$).

تیمار سلول‌های SHSY5Y به مدت ۴۸ ساعت با ۱۰ میکرومولار پروتئین آمیلوئید ß منجر به افزایش ۲۵ تا ۳۰ درصد در فعالیت آنزیم استیل کولین استراز گردید (نمودار شماره ۲). نیکوتین ۱۰ میکرومولار و آلفا- بونگارو توکسین ۱۰۰ نانومولار فعالیت افزایش یافته توسط پروتئین آمیلوئید β را تا سطح گروه شاهد کاهش دادند. نیکوتین در غلظت‌های کمتر موفق به این کاهش نبود. از آنجایی که پروتئین آمیلوئید ß به گیرنده‌های α7 نیکوتینی متصل و موجب القای آنزیم استیل کولین استراز می‌شود، ما در این مورد بررسی نمودیم آیا آنتا گونیست‌های گیرنده نیکوتینی می‌توانند در بیان آنزیم استیل کولین استراز تغییر ایجاد نمایند؟ توانایی آنتاگونیست‌های نیکوتینی بتنهایی و یا توام با نیکوتین در این زمینه مورد بررسی قرار گرفت. با تیمار ۴۸ ساعته سلول‌های SHSY5Y با آنتا گونیست‌های مختلف گیرنده‌های نیکوتینی، نظیر میکامیل آمین ۱۰ میکرومولار، MLA ۱۰۰ نانومولار، DHβE ۱۰ میکرومولار و آلفا-بونگاروتوکسین ۱۰ نانومولار هرکدام بتنهایی تغییرات معنی‌داری در فعالیت آنزیم استیل کولین استراز مشاهده نشد (نمودار ۳). بر عکس تیمار هر کدام از آگونیست‌های فوق توام با ۱۰ میکرومولار نیکوتین

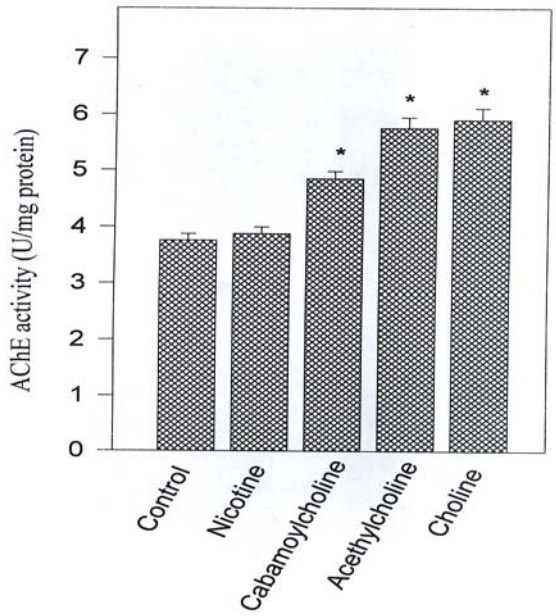
جدول ۱ . اثر نیکوتین بر فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در سلول‌های SHSY5Y در محیط کشت

غلظت نیکوتین (μM)	فعالیت آنزیم استیل کولین استراز (U/mg protein)
۰/۰	۳/۶۵ ± ۰/۱۲
۰/۱	۳/۵۹ ± ۰/۱۰
۱/۰	۳/۷۱ ± ۰/۱۶
۵/۰	۳/۷۴ ± ۰/۲۱
۱۰	۳/۶۸ ± ۰/۱۸
۱۰۰	۳/۷۰ ± ۰/۲۲
۱۰۰۰	۳/۶۵ ± ۰/۲۳

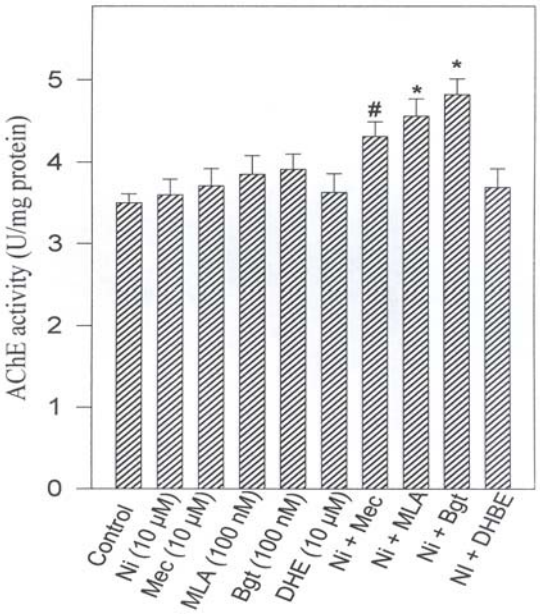
جدول ۲. میزان بقای سلول‌های SHSY5Y تیمار شده در محیط کشت با استفاده از احیای ماده MTS

تیمار سلول‌ها با آنتاگونیست‌ها و آگونیست‌های نیکوتین	میزان جذب MTS در ۴۹۰ نانومتر
سلول‌های شاهد (بدون تیمار)	۰/۴۵۴ ± ۰/۰۲۸
نیکوتین ۱۰ میکرو مولار	۰/۴۴۰ ± ۰/۰۳۵
میکامیل آمین ۱۰ میکرومولار	۰/۴۳۰ ± ۰/۳۴۰
MLA ۱۰۰ نانو مولار	۰/۴۵۳ ± ۰/۰۴۳
آلفا- بونگاروتوکسین ۱۰۰ نانومولار	۰/۴۲۲ ± ۰/۰۴۱
DHßE ۱۰ میکرو مولار	۰/۴۴۵ ± ۰/۰۳۸
میکامیل آمین ۱۰ میکرومولار + نیکوتین ۱۰ میکرومولار	۰/۴۴۸ ± ۰/۰۴۱
MLA ۱۰۰ نانومولار + نیکوتین ۱۰ میکرومولار	۰/۴۵۳ ± ۰/۰۴۳
آلفابونگاروتوکسین۱۰۰ نانومولار + نیکوتین ۱۰ میکرومولار	۰/۴۴۵ ± ۰/۰۳۹
DHßE ۱۰ میکرو مولار + نیکوتین ۱۰ میکرومولار	۰/۴۴۸ ± ۰/۰۳۵

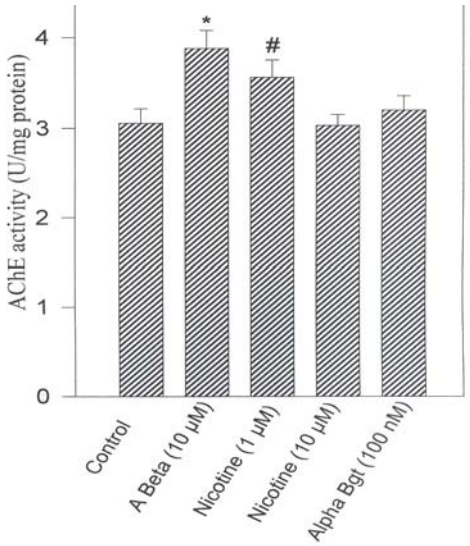
موجب افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم استیل کولین استراز شد. تنها آنتا گونیست DHßE توام با نیکوتین قادر به افزایش فعالیت یا القای آنزیم نشد. اثرات آگونیست‌ها و آنتا گونیست‌های نیکوتین در سلول‌های PC12 که از رده فئوکروموسیتوما هستند نیز مورد بررسی قرار گرفت. گرچه فعالیت طبیعی آنزیم کولین استراز در این سلول‌ها حدود سه برابر بیشتر از سلول‌های SHSY5Y



نمودار ۱. اثر آگونیست‌های گیرنده‌های نیکوتینی بر بیان آنزیم استیل کولین استراز در سلول‌های SHSY5Y. سلول‌ها تا مرحله ۸۰٪ کانفلوئنس کشت داده شدند، سپس به مدت ۴۸ ساعت با غلظت یک میلی‌مولار آگونیست کشت داده شدند. پس از این مدت فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در هموژنه سلول اندازه‌گیری شد. داده ها حاصل پنج آزمون تکراری است. (p<0.01) : *



نمودار ۳ . اثر آنتاگونیست‌های گیرنده‌های نیکوتینی به تنهایی و یا توام با نیکوتین بر بیان آنزیم استیل کولین استراز در سلول‌های SHSY5Y. سلولها با آنتا گونیستهای نیکوتینی به تنهایی و یا توام با نیکوتین (۱۰ میکرومولار) به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند و سپس فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در هموژنه این سلول‌ها اندازه‌گیری شد. (p< 0.05):# , (p<0.01) :*



نمودار ۲. اثر نیکوتین و آلفا-بونگاروتوکسین بر فعالیت آنزیم القا شده توسط پروتئین آمیلوئید $ß_{1-42}$ در سلول‌های SHSY5Y. سلول‌ها با پروتئین آمیلوئید β به تنهایی (۱۰ میکرومولار) و یا توام با نیکوتین (یک و ۱۰ میکرومولار) و یا با آلفا-بونگاروتوکسین (۱۰۰نانومولار) به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند و سپس فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در این سلول‌ها اندازه‌گیری شد. گروه شاهد فاقد پروتئین آمیلوئید ß بود.
(p< 0.05):# , (p<0.01) :*

نمودار ۴. اثرات مقایسه ای نیکوتین، استیل‌کولین و متیل لایکوکونیتین (MLA) بر بیان آنزیم استیل کولین استراز در سلول‌های SHSY5Yو PC12. سلول‌ها طبق روش موجود در بخش مواد وروش ها کشت داده شدند و سپس به مدت ۴۸ ساعت با مواد فوق تیمار شدند.
(p< 0.05):# , (p<0.01) :*