

Research Paper:

Effect of Alpha and Beta Adrenergic Receptors on the Expression of Stk4, Caspase-3, and Sox2 Genes in Neural Stem Cells Derived From the Hippocampus and Treated With Norepinephrine in Rats



Zakiye Davar¹, Iraj Jafari Anarkooli¹ , Mohammad Javad Fridonir¹ , *Alireza Abdaniipour¹

1. Department of Anatomy, School of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.



Citation Davar Z, Jafari Anarkooli I, Fridonir MJ, Abdaniipour A. [Effect of Alpha and Beta Adrenergic Receptors on the Expression of Stk4, Caspase-3, and Sox2 Genes in Neural Stem Cells Derived From the Hippocampus and Treated With Norepinephrine in Rats (Persian)]. *Jundishapur Journal of Medical Sciences*. 2022; 21(1):138-151. <https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.1.2815>



<https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.1.2815>



ABSTRACT

Background and Objectives Uncontrolled stress affects hippocampal-dependent memory through altering the morphology and the proliferation rate of hippocampal progenitor cells.

Subjects and Methods In this experimental study, neural stem cells (NSCs) were isolated from the hippocampus of newborn rats and cultivated in a serum-free medium to generate neurosphere. To confirm the induced NSCs, immunocytochemistry and antibody nestin were used. The rate of cell proliferation and cytotoxicity caused by norepinephrine were measured by the MTT assay. NSCs were assigned in the following groups: Control (untreated NSCs), norepinephrine (NSCs treated with norepinephrine), propranolol (NSCs treated with beta receptor blocker propranolol plus norepinephrine), prazosin (NSCs treated with Alfa receptor blocker prazosin plus norepinephrine), and propranolol/prazosin (NSCs treated with both propranolol and prazosin plus norepinephrine). Real-time PCR was conducted to measure the expression levels of Stk4, Caspase-3 and Sox2 genes.

Results The flow cytometry study revealed that NSCs were nestin positive. Real-time PCR results showed that the expression level of Sox2 gene increased by norepinephrine. In addition, the expression level of Stk4 and Caspase-3 genes increased in the groups treated with prazosin.

Conclusion The effect of norepinephrine on hippocampus-derived NSCs is receptor-dependent. The increase of norepinephrine under chronic stress can lead to either cell proliferation or apoptosis in NSCs; it acts as a double-edged sword.

Keywords:

Stk4, Caspase-3, Sox2,
Neural stem cells,
Norepinephrine

*** Corresponding Author:**

Alireza Abdaniipour

Address: Department of Anatomy, School of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

Tel: +98 (912) 5467309

E-Mail: abdani.anatomy@yahoo.com

Extended Abstract

Introduction

Studies have shown that chronic stress changes neuronal morphology reduce cell proliferation rate in the dentate gyrus as well as hippocampal volume. Stress activates the noradrenergic locus coeruleus (LC), but its precise mechanism has not been completely elucidated. Different brain circuits are involved in interactions between corticotropin-releasing factor and norepinephrine during stress. Norepinephrine, also called noradrenaline, is an important catecholamine neurotransmitter which is secreted in brain by LC. The amount of norepinephrine reaches its highest level under stress conditions, and its distribution throughout the mammalian brain is now recognized as a contributor to various aspects of cognition, including attention and memory. Norepinephrine in brain acts as neuromodulator and regulates the activity of neuronal and glial cells in various ways. It modulates some vital functions such as synapses plasticity, memory, metabolic rate, and glutamate and potassium balance. The glutamate and GABA receptors regulate the proliferation of adult hippocampal progenitor cells. Norepinephrine plays an important role in optimizing and facilitating rapid changes in neuronal connectivity and excitability. In fact, norepinephrine modulates many physiological and pathological conditions in the several pathways. Norepinephrine elicits its effects on two types of adrenergic receptors, alpha (α) and beta (β), and some G protein-coupled receptors. There are at least two subtypes of receptors in each class: α_1 , α_2 , β_1 and β_2 . In the present study, we hypothesized that norepinephrine stimulates proliferation or apoptosis of neural stem cells (NSCs) through α and β adrenoceptors.

Methods

In this study, NSCs were isolated from the hippocampus of rats aged 5-10 days, purchased from Razi Vaccine and Serum Research Institute. After anesthesia, their brains were removed and collected tissues were exposed to a solution of dispase II and accutase. Then cells were put in T25 plastic flasks containing Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)/F-12 enriched with neural stem cell culture medium 2% B27, 20 ng/mL basic fibroblast growth factor, 20 ng/mL epidermal growth factor, and then incubated at 37°C in 5% CO₂ for 6 days to form neurospheres. To confirm the characteristics of NSCs, immunocytochemistry and nestin antibody were used. The NSCs in the third passage were used to analyze the specific markers of NSCs/progenitors using flow cytometry method.

For assessing the effect of norepinephrine concentrations (0.1, 1, 10, 100 and 1000 μ M), MTT assay was used. The cells were assigned to five groups: Control (untreated NSCs), Norepinephrine (NSCs were treated with optimum concentration of norepinephrine for 2 hours), Propranolol (NSCs were treated with 2 μ M propranolol for 4 hours plus optimum concentration of norepinephrine for 2 hours), Prazosin (NSCs were treated with 0.1 μ M prazosin for 4 hours plus optimum concentration of norepinephrine for 2 hours), and Propranolol/Prazosin (NSCs were treated with both propranolol and prazosin for 4 hours plus optimum concentration of norepinephrine for 2 hours). Real-time PCR was carried out on cDNA prepared from experimental groups to quantify mRNA levels of Stk4, Caspase-3 and Sox2 genes. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as an internal control for normalization.

Results

During the first 24 hours after cultivation, cells had a clear appearance and spherical shape with clear borders. On day 3, multipolar cell bodies with typical neuron phenotype were developed. After the third passage, NSCs were placed in uncoated 6-well plates for making neurosphere. After 24 hours, small spherical colonies with clear borders were observed. There was a significant increase in the diameter of cell colonies six days after culture ($219.71 \pm 15.40 \mu\text{m}$) compared to day 3 ($139.91 \pm 6.66 \mu\text{m}$) and 1 ($45.40 \pm 4.46 \mu\text{m}$). It seems that some cells were separated from the primary colonies; then, proliferated and formed secondary colonies. It was found that the NSCs derived from colonies were highly active in the production and secretion of Nestin. The flow cytometry analysis showed that NSCs were nestin positive (77.50%).

MTT assay was used to determine the optimal dose of norepinephrine and its effect on NSCs. Norepinephrine caused an increase in the number of living NSCs and the proliferation rate in a dose-dependent manner. We observed the increase of cell proliferation at 100 μ M concentration (180.44 ± 6.32) after 2 hours of exposures to norepinephrine and after 24 hours in the serum-free DMEM/F12 medium. Therefore, 100 μ M of norepinephrine was considered as the best dose for further studies.

The results of Real-time PCR showed that treatment with norepinephrine significantly increased the expression of Sox2 gene (290.88 ± 24.56) in the control group compared to other experimental groups (75.47 ± 10.93 , 126.36 ± 13.06 , and 138.15 ± 7.30 for propranolol, prazo-

sin, and propranolol/prazosin groups, respectively). In addition, a significant increase in the expression of Stk4 (8.19 ± 0.94) and Caspase-3 (8.30 ± 0.93) genes were observed in the groups with prazosin, as a selective antagonist of α_1 adrenergic receptor.

Discussion

The current study was conducted to evaluate the effect of norepinephrine on the proliferation or apoptosis of NSCs by considering the importance of α and β adrenergic receptors. We found that norepinephrine activates the proliferation of hippocampus-derived NSCs through both α and β adrenergic receptors (especially β adrenergic receptor). Significant increase in the expression of Stk4, as pro-apoptotic gene, and Caspase-3 gene were observed by blocking α adrenergic receptor. It should be mentioned that we defined a novel role for β adrenergic receptors in induction of apoptosis by norepinephrine. To the best of our knowledge, this is the first report on induction of apoptosis by β adrenergic receptor.

Norepinephrine is secreted by specific brain cells under stressful conditions. The effect of norepinephrine on hippocampus-derived NSCs is receptor-dependent. Regarding the effect of norepinephrine on cell proliferation and neurogenesis, it can be said that individuals who live under stressfull conditions are more intelligent than those living with no stress; however, hyperexcitability of hippocampal neural cells can lead to apoptosis and impaired memory. Therefore, stress and, consequently, norepinephrine secretion act like a double-edged sword.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

The research was conducted in accordance with the rules and regulations of the Ethics Committee of [Zanjan University of Medical Sciences](#).

Funding

The present study was funded by [Zanjan University of Medical Sciences](#) with the number A12-973-8.

Authors' contributions

Designer, responsible author, analysis of results and supervisor: Alireza Abdanipour; Supervisor and advisor: Iraj Jafari Anarkooli; Advisor: Mohammad Javad Faridouni; Program manager: Zakia Davar.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

Thanks are given to Mrs. Farzaneh Fakheri for her remarkable efforts in this study.

مقاله پژوهشی:

تأثیر مسدودکننده‌های گیرنده‌های آلفا و بتا آدرنرژیک بر بیان ژن‌های آپوپتوتیک و تکثیری در سلول‌های بنیادی عصبی مشتق از هیپوکامپ تیمارشده با نور اپی نفرین

زکیه داور^۱، ایرج جعفری انارکولی^۱، محمد جواد فریدونی^۱، علیرضا عبدالانی پور^۱

۱. گروه علوم تشریح، دانشکده پژوهشی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران.



Citation Davar Z, Jafari Anarkooli I, Fridonir MJ, Abdanipour A. [The Effect of Alpha- and Beta-adrenergic Receptor Blocker on Stk4, Caspase-3, and Sox2 mRNA Expression in the Hippocampus-derived Neural Stem Cells Treated With Norepinephrine (Persian)]. *Jundishapur Journal of Medical Sciences*. 2022; 21(1):?:?. <https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.1.2815>

doi <https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.1.2815>

چکیده

مینه و هدف: استرس کنترل نشده از طریق تغییر مورفولوژی و میزان تکثیر سلول‌های پیش‌ساز هیپوکامپ بر حافظه وابسته به هیپوکامپ تأثیر می‌گذارد.

روش بررسی در این مطالعه تجربی، سلول‌های بنیادی عصبی مشتق از هیپوکامپ نوزاد موش صحرابی استخراج و برای تولید نورووسفر در محیط عاری از سرم و مکمل‌ها کشت داده شدند. به منظور تأیید سلول‌های بنیادی عصبی القاشده از آنتی‌بادی نستین استفاده شد. میزان تکثیر سلولی و سمتیت سلولی ناشی از تأثیر نوراپی نفرین با روش MTT بررسی شد. سلول‌های بنیادی عصبی در گروه‌های آزمایشی کنترل (تیمارشده)، NE (تیمارشده با نوراپی نفرین)، Pro (پیش تیمارشده با مسدودکننده گیرنده بتا پروپر انولول و سپس نوراپی نفرین)، Pra (پیش تیمارشده با مسدودکننده گیرنده آلفا پرازوسین و سپس نوراپی نفرین) و Syn (پیش تیمارشده با پروپر انولول و پرازوسین و سپس نوراپی نفرین) تقسیم شدند. میزان بیان ژن‌های Stk4، Caspase-3، Sox2 و Stk4، Caspase-3 مورد Real-time RT-PCR با استفاده از تکنیک مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌های نتایج فلوسایتومتری بیان ژن نستین را تأیید کرد. بررسی کمی ژن‌هایانشان داد نوراپی نفرین، میزان سطح بیان ژن Sox2 را افزایش می‌دهد. همچنین، در گروه‌هایی که با پرازوسین تیمارشده بودند، میزان بیان ژن‌های Stk4 و Caspase-3 داشت. نتیجه گیری اثر نوراپی نفرین بر سلول‌های بنیادی عصبی مشتق از هیپوکامپ وابسته به گیرنده است و افزایش نوراپی نفرین در اثر استرس مزمن می‌تواند مانند یک تیغ دوله منجر به تکثیر یا آپوپتوز در سلول‌های بنیادی عصبی شود.

تاریخ دریافت: ۱۶ مهر ۱۴۰۰

تاریخ پذیرش: ۱۹ دی ۱۴۰۰

تاریخ انتشار: ۱۴۰۱ فروردین

کلیدواژه‌ها:

Stk4، Caspase-3،
Sox2، سلول‌های
بنیادی عصبی، نوراپی
نفرین

* نویسنده مسئول:

علیرضا عبدالانی پور

نشانی: زنجان، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، دانشکده پژوهشی، گروه علوم تشریح.

تلفن: +۹۸ (۵۴۶) ۷۳۰-۹

ایمیل: abdani.anatomy@yahoo.com

بيان دارد. اين ژن کدکننده يك فاكتور رونويسى مؤثر در ايجاد و پايداري خاصيت چند تواني سلول هاي بنويادي پستانداران از جمله سلول هاي بنويادي عصبى است و موجب حفظ خاصيت نوزائي^۳ سلول هاي پيش ساز عصبى^۴ در شرایط درون تنى^۵ و همچنین برون تنى^۶ مى شود. بيان اين ژن در سلول هاي بنويادي عصبى منجر به كاهش قدرت تميز آنها به نورون و سلول هاي گلiali مى شود [۲۲، ۲۳]. استرس به طور قابل توجهى منجر به افزایش راديكال هاي آزاد، آزاد شدن هورمون ها و ايجاد تغيرات زيستي و شيميايى در بدن مى شود. استرس اكسيداتيو، به عنوان يك اختلال در تعادل بين توليد گونه هاي اكسيريزن (راديكال هاي آزاد) و اثرات حفاظتى آنتى اكسيدان هاتعريف مى شود [۲۴] که حضور بيش از حد راديكال هاي آزاد منجر به مرگ آپوپتوسيک در سلول مى گردد. آپوپتوز يا مرگ برنامه ريز شده، فرآيندي است که در شرایط فيزيولوژيک نيز رخ مى دهد و برای تکامل و بقاي موجودات زنده ضروري است. اختلال در روند ايجاد و کنترل آپوپتوز مى تواند منجر به بروز بيماري هاي خود ايمى، بيماري هاي تحليل برند عصبى و سرطان شود [۲۵]. در مطالعه حاضر، بر آن شديم تا اثر تنظيمى نوراپي نفرین در سلول هاي بنويادي عصبى مشتق از هيپوكامپ رابا در نظر گرفتن گيرنده هاي آلفا و بتا آدرنرژيک بررسى کنيم. بر اين اساس، فرض بر آن بود که نوراپي نفرین تکثیر و يا آپوپتوز سلول هاي بنويادي عصبى را از طريق گيرنده هاي آلفا و بتا آدرنرژيک تحريك مى کند.

مواد و روش ها

جاداسازی و کشت سلول هاي بنويادي عصبى

به منظور استخراج سلول هاي بنويادي عصبى، از نوزاده هاي ۵ تا ۱۰ روزه موش نزاد ويستار خريدارى شده از مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازى كرج استفاده شد. مراقبت و نگهدارى از مoshها منطبق بر آينين نامه مصوب کار با حيوانات آزمایشگاهى تصويب شده در دانشگاه علوم پزشكى زنجان انجام شد. پس از بيهوشى کامل با استفاده از تزریق داخل صفاقى ترکيب کتامین (۱۰۰ ميلى گرم بر كيلو گرم) و زايلزین (۱۰ ميلى گرم بر كيلو گرم)، مغز حيوانات بر كيلو گرم) و زايلزين (۱۰ ميلى گرم بر كيلو گرم)، مغز حيوانات خارج شده، هيپوكامپها جدا شدند و بلا فاصله در محلول نمکي با فر فسفات (PBS، Gibco) غنى شده با ۴/۵ گرم بر ليتر گلوكز شست و شو داده شدند. به منظور هضم آنزيمى، بافت هاي جمع آوري شده به مدت ۳۰ دقيقه و در دماي اتفاق در مععرض ml U/۴۰ محلول ديپساز (Sigma Aldrich) و ۱ ميلى ليتر آکوتاز^۷ قرار گرفتند. در مرحله بعدی مخلوط سلولی از يك صافى سلولی ۷۰ ميكرومترى (Falcon) (Falcon) عبور داده شد و به مدت ۱۰ دقيقه در درجه سانتى گراد با دور

مقدمه

هيپوكامپ به عنوان بخش اصلی تشکيل حافظه در مغز، هدف هورمون هاي استرس است [۱]. استرس کنترل نشده بر عملکردهای حافظه وابسته به هيپوكامپ تأثير مى گذارد [۲]. مطالعات نشان داده اند استرس مزمن مورفو لوژي نورون ها را تغيير و سرعت تکثیر شکنج دندانهای را كاهش مى دهد و موجب كاهش هيپوكامپ نيز مى شود [۴]. استرس همچنین لوکوس سرولئوس نورا درنرژيک را فعال مى کند [۵]. اما مکانيسم دقيق فعال سازی لوکوس سرولئوس ناشی از استرس همچنان به طور کامل مشخص نشده است [۶]. مدارهای مغزی متعددی در تعاملات بين نوراپي نفرین و عامل آزاد کننده کورتيکوتروپين در طول استرس دخیل هستند [۷]. نوراپي نفرین، همچنین نورا در نالين^۸ ناميده مى شود، يك انتقال دهنده عصبى کاتكول آمين مهم است [۸] که در مغز توسيط لوکوس سرولئوس ترشح مى شود [۹]. مقدار نوراپي نفرین در شرایط استرس به بالاترين ميزان خود مى رسد [۱۰] و انتشار آن در سرتاسر مغز پستانداران اکنون به عنوان عاملی در جنبه های مختلف شناخت، از جمله توجه و حافظه معرفی مى شود [۱۱]. نوراپي نفرین در مغز به عنوان تعديل کننده عصبى عمل مى کند و فعالیت سلول هاي عصبى و گلiali را از مسیرهای مختلف تنظیم مى کند. برخی از عملکردهای حیاتی مانند شکل پذيري سیناپس ها، حافظه، سرعت متابوليک، و تعادل گلوتامات و پتاسيوم را تنظيم مى کند [۱۲]. گيرنده هاي گلوتامات و گابا يا گاما آمينوبوتيريك اسيد^۹ تکثیر سلول هاي پيش ساز هيپوكامپ بالغ را تنظيم مى کند [۱۳] و نوراپي نفرین نقش مهمی در بهينه سازی و تسهيل تعديلات سريع در اتصال عصبى و تحريك پذيري دارد [۱۴، ۱۲]. در واقع، نوراپي نفرین بسياري از واقعی فيزيولوژيک و پاتولوژيک را در چندين مسیر تعديل مى کند [۹]. على رغم اين ويزگي هاي منحصر به فرد، خصوصيات مرتبط با خواص سمیت عصبی نوراپي نفرین نیز در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است [۱۶، ۱۵]. Stk4 يكى از ژن های اصلی پرو آپوپتوز است که فعل شدن کاسپاز-۳ را تحريك مى کند [۱۷]. در توصيف عملکردهای پيش آپوپتوسيک Stk4 تنها بسترهاي سلولی فيزيولوژيکي و آبشارهای سیگنال دهنده آنها مشخص شده است. Stk4 در القای آپوپتوز شرکت مى کند که پس از برش کاسپاز واسطه وارد هسته مى شود و از طريق تكه تكه شدن DNA باعث تخريب کروماتين مى شود [۱۹، ۱۸]. نوراپي نفرین اثرات خود را بر روی ۲ دسته از گيرنده هاي آدرنرژيک آلفا و بتا و دسته اى از گيرنده هاي جفت شده با G پروتئين اعمال مى کند [۲۰]. علاوه بر اين، حداقل ۲ زير گروه گيرنده α1، α2، β1 و β2 در هر دسته وجود دارد [۲۱]. ژن SOX2 به عنوان يك فاكتور رونويسى در سلول هاي بنويادي افزایش

1. Norepinephrine
2. Noradrenaline
3. γ-Amino butyric acid (GABA)

4. Self-renewal
5. Neural progenitor cells
6. In vivo
7. In vitro
8. Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, USA

کشت داده شدند $10 \times 5 \times 4$ سلول در هر خانه). سپس سلول‌ها به مدت ۲ ساعت در معرض غلظت‌های $100 \times 100 \times 100$ میکرومولار نوراپی‌نفرین قرار گرفتند و تعویض محیط هر ۳۰ دقیقه انجام شد. سپس سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محیط DMEM/F12 عاری از سرم قرار گرفتند. سلول‌های بنیادی عصبی بدون هیچ‌گونه تیمار با نوراپی‌نفرین (صفر میکرومولار) به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. سپس سلول‌ها با محلول ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر^{۱۰} MTT به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. محیط کشت حذف و در ادامه، ۱۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکساید^{۱۱} جایگزین محیط کشت در هر خانه شد تا بلورهای فورمازان حل شود. سپس میزان فورمازان طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا^{۱۲} محاسبه شد. درصد بقای سلول‌ها با استفاده از فرمول شماره ۱ به دست آمد [۲۶]:

۱.

$A_{570} - A_{650}$ نمونه‌های تیمارشده $\times 100$ نمونه‌های تیمارشده

تیمار با نوراپی‌نفرین و طراحی مطالعه تجربی

در این مطالعه، سلول‌ها به ۵ گروه آزمایشی تقسیم شدند:

گروه کنترل:

سلول‌های بنیادی عصبی بدون هیچ‌گونه تیمار با نوراپی‌نفرین (صفر میکرومولار)،

گروه نوراپی‌نفرین (Sigma; A۷۲۵۷)

سلول‌های بنیادی عصبی تیمارشده با غلظت بهینه نوراپی‌نفرین به مدت ۲ ساعت،

گروه پروپرانولول (Sigma; P۰۸۸۴۳)

سلول‌های بنیادی عصبی پیش تیمارشده با ۲ میکرومولار پروپرانولول به مدت ۴ ساعت و سپس در معرض غلظت بهینه نوراپی‌نفرین به مدت ۲ ساعت).

گروه پرازوپسین (Sigma; P۷۷۹۱)

سلول‌های بنیادی عصبی پیش تیمارشده با ۰/۱ میکرومولار پرازوپسین به مدت ۴ ساعت و سپس در معرض غلظت بهینه نوراپی‌نفرین به مدت ۲ ساعت،

10. Sigma Aldrich, Germany

11. DMSO

12. BioTek

13. Propranolol (Pro)

14. Prazosin (Pra)

سانتریفیو شد. پس از شستشوی رسوب سلولی به دست آمده در PBS، جهت تشکیل نوروسفرهای سلول‌ها در فلاسک‌های پلاستیکی T25 دارای محیط کشت DMEM/F12 غنی‌شده با محیط کشت سلول‌های بنیادی عصبی و فاکتورهای رشد و تکثیر سلول‌های عصبی (Inc.) ۲% B27, Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.) ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد فیبروبلاستی- (bFGF; Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.) ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد اپیدرمی (EGF; Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.) ۱۰۰ میلی‌لیتر استرپتومایسین (Sigma-Aldrich) در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و 5 CO_2 درصد به مدت ۶ روز کشت داده شدند. سپس با استفاده روش آنزیمی (trypsin-EDTA, 0.25%; Sigma-Aldrich) و مکانیکی (پیپت کردن) به شکل سلول‌های منفرد جدا شدند. سوسپانسیون سلولی سلول‌های بنیادی عصبی در پلیت‌های ۶ خانه غنی‌شده DMEM/F12 ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد اپیدرمی و ۳ درصد سرمه جنین گاوی (PBS, Gibco) به مدت یک هفتۀ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تا پاساز سوم کشت داده شد. به منظور تأیید خصوصیات سلول‌های بنیادی عصبی، از روش ab6142 (1:۳۰۰؛ Abcam) و به دنبال آن انکوباسیون با آنتی‌بادی ضد موش FITC خرگوش کونژوگه شده با فلورسین ایزوتوپیوسیانات (-) (Milli-FITC) شد. به این ترتیب که سلول‌ها در پارافرمالدهید ۳ درصد به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق ثابت شدند. سپس، مرحله نفوذپذیری با استفاده متانول ۱۰۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انجام شد. در ادامه، سلول‌ها در حضور آنتی‌بادی اولیه به مدت یک شب و در معرض آنتی‌بادی ثانویه به مدت ۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. از اتیدیوم برومايد به مدت ۳۰ ثانیه در دمای اتاق برای رنگ‌آمیزی هسته سلول‌ها استفاده شد. سرانجام تصویربرداری با استفاده از میکروسکوپ فلورسنس Olympus BX51 انجام شد. همچنین از سلول‌های بنیادی عصبی در پاساز سوم برای ارزیابی مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی/پیش‌ساز عصبی با استفاده از روش فلوسايتومتری استفاده شد. کلیه پروتکلهای این مطالعه تجربی مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی زنجان قرار گرفته است.

تعیین زمان و غلظت مناسب نوراپی‌نفرین

برای این منظور، سلول‌های بنیادی عصبی پاساز سوم در پلیت‌های ۹۶ خانه حاوی محیط کشت DMEM/GN غنی از B27 درصد، ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد فیبروبلاستی، ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد اپیدرمی به مدت ۲۴ ساعت

9. Olympus BX51, Tokyo, Japan

جدول ۱. لیست توالی‌های پرایمر

Gene	Gene Accession no.	Sense 5 → 3	Anti-sense 5 → 3	bp
Stk4	NM_001107800.1	GCTAAAGTGAAGTGGACGGATACC	GGAACAGTTGCTACCAGAGTGTCA	137
Sox2	NM_001109181	ACAGCATGTCCTACTCGCAG	CTGATCATGTCGGAGGTC	157
Caspase-3	NM_012922.2	CGCACCCGGTTACTATTCTGG	TGGCACCTCCGGTTAACAC	132
GAPDH	NM_017008.4	TTGTCAGCAATGCATCCTGCAC	GTCTGGGATGGAATTGTGAG	158

مجله علمی پژوهشی
جندي شاپور

تحلیل‌های آماری

تجزیه و تحلیل‌های آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۵ انجام شد. تمام نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین رایه شد. برای مقایسه داده‌ها بین گروه‌ها از تحلیل واریانس یک طرفه و سپس تست تعقیبی توکی^{۱۶} استفاده شد. سطح معناداری نیز $P \leq 0.05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

کشت سلول‌های بنیادی عصبی

نتایج بدست‌آمده از کشت و بررسی خصوصیات سلول‌های بنیادی عصبی در تصویر شماره ۱ رایه شده است. در طول ۲۴ ساعت اولیه پس از کشت، سلول‌ها نمایی شفاف داشتند و مورفولوژی کروی با مرز مشخص را بروز دادند (تصویر شماره ۱ قسمت A). در روز سوم پس از کشت، جسم سلولی چند قطبی با فنوتیپ معمول سلول‌های عصبی ایجاد شد (تصویر شماره ۱ قسمت B). به منظور تولید نوروسفر، پس از سومین پاساز (تصویر شماره ۱ قسمت C)، سلول‌های بنیادی عصبی در پلیت‌های ۶ خانه فاقد پوشش قرار گرفتند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، کلونی‌های کروی کوچک با مرزهای مشخص مشاهده شد (تصویر شماره ۱ قسمت D). پس از گذشت ۶ روز از کشت سلولی، ۲۱۹/۷۱ ± ۱۵/۴۰ میکرومتر، در قطر کلونی‌های سلولی (۰/۵) میکرومتر، در مقایسه با روز سوم (۱۳۹/۹ ± ۶/۶۶ میکرومتر) و روز اول (۴۵/۴۰ ± ۴/۴۶ میکرومتر) مشاهده شد.

نتایج مشاهدات در تصویر شماره ۱ قسمت D-F و تصویر شماره ۲ قسمت A رایه شده است. به نظر می‌رسد برخی از سلول‌ها از کلونی‌های اولیه جدا شده، تکثیر می‌شوند و کلونی‌های ثانویه را تشکیل می‌دهند (تصویر شماره ۱ قسمت G). همچنین، سلول‌های بنیادی عصبی جدا شده از کلونی‌ها به شدت در تولید و ترشح نستین فعال هستند (تصویر شماره ۱ قسمت H و I). بر این اساس، ارزیابی فلوسایتومتری نشان داد این سلول‌ها نستین مثبت هستند (۷۷/۵ درصد) (تصویر شماره ۲ قسمت C).

گروه پروپرانولول / پرازووین:

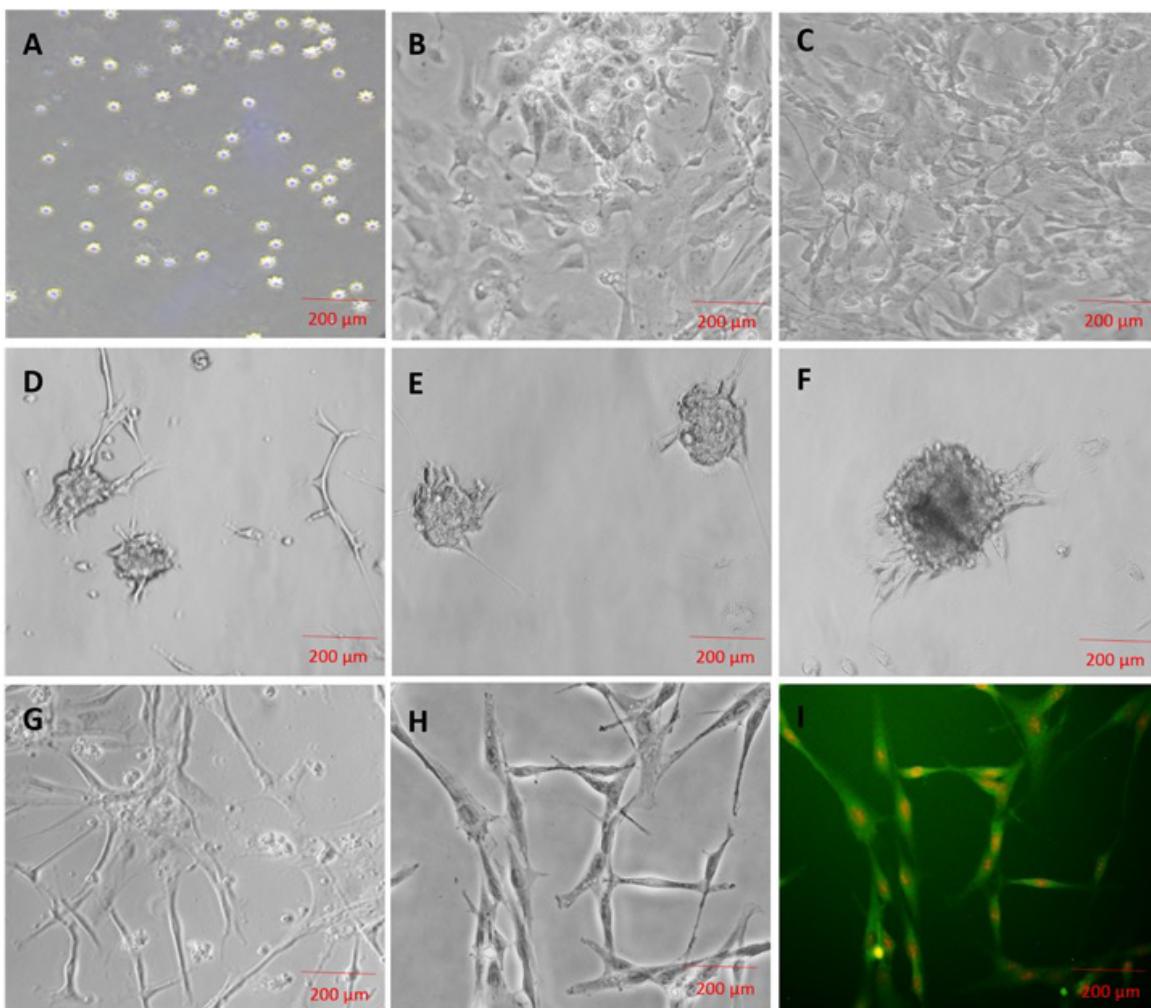
سلول‌های بنیادی عصبی پیش تیمارشده با هر ۲ مسدود‌کننده گیرنده به مدت ۴ ساعت و سپس در معرض غلظت بهینه نوراپی نفرین به مدت ۲ ساعت.

تمام گروه‌های مورد آزمایش به مدت ۲۴ ساعت با محیط کشت عاری از سرم DMEM/F12 انکوبه شدند.

بررسی کمی بیان ژن‌ها

در این تکنیک RNA Tam از بافت هیپوکامپ توسط ترایزول TRIzol® (Invitrogen/Life Technologies) ۱۰۰۰ نانوگرم RNA خالص برای سنتز ۲۰ میکرولیتر cDNA مطابق با دستورالعمل کیت سنتز cDNA(Aid™ First Strand Synthesis Kit) Fermentas, Germany شد. از cDNA برای بررسی کمی تغییرات سطوح mRNA شد. از ژن‌های Stk4، کاسپاز-۳ و Sox2 مطابق با دستورالعمل کیت سنتز cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Germany) استفاده شد. همچنین از گلیسرآلدهید-۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به عنوان کنترل داخلی برای نرمال‌سازی استفاده شد. لیست توالی‌های پرایمر در جدول شماره ۱ رایه شده است.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز^{۱۵} در حجم واکنش نهایی ۱۲/۵ میکرولیتری حاوی پرایمرهای رفت و برگشت (هر کدام ۲۰۰ نانومولار)، ۰/۵ میکرولیتر از ۲۵ نانوگرم RNA نمونه‌های موردنظر، SYBR® Green I (Fermentas; Thermo Fisher Scientific, Inc.) ۶/۵ میکرولیتر و آب فاقد نوکلئاز تا حجم نهایی برای ۴۰ چرخه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و سپس در ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد. تغییرات نسبی سطوح mRNA ژن‌های موردنظر با استفاده از روش $\Delta\Delta Cq$ ارزیابی شد. آزمایشات به صورت ۳ بار تکرار انجام شد. همچنین اندازه محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر روی الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد تأیید شد.



جندي شاپور

تصویرهای A-C: کشت این سلول‌ها در فلاسک چسبنده منجر به اتصال سلول‌ها به بستر کشت و ایجاد سلول‌های دوکی‌شکل با زوائد سیتوپلاسمی گردید: A: روز اول، B: روز هفتم-پاساز سلولی اول، C: روز هجدهم-پاساز سلولی سوم. نوروسفرهای شناور حاصل از سلول‌های بنیادی عصبی تصویرهای D-F: در زمان‌های ۱ روز، ۳ روز، ۶ روز، F: بعد از کشت. تشکیل نوروسفرهای ثانویه، تصویر G: اینتوستوشیمی نشانگر اختصاصی نستین در سلول‌های بنیادی عصبی.

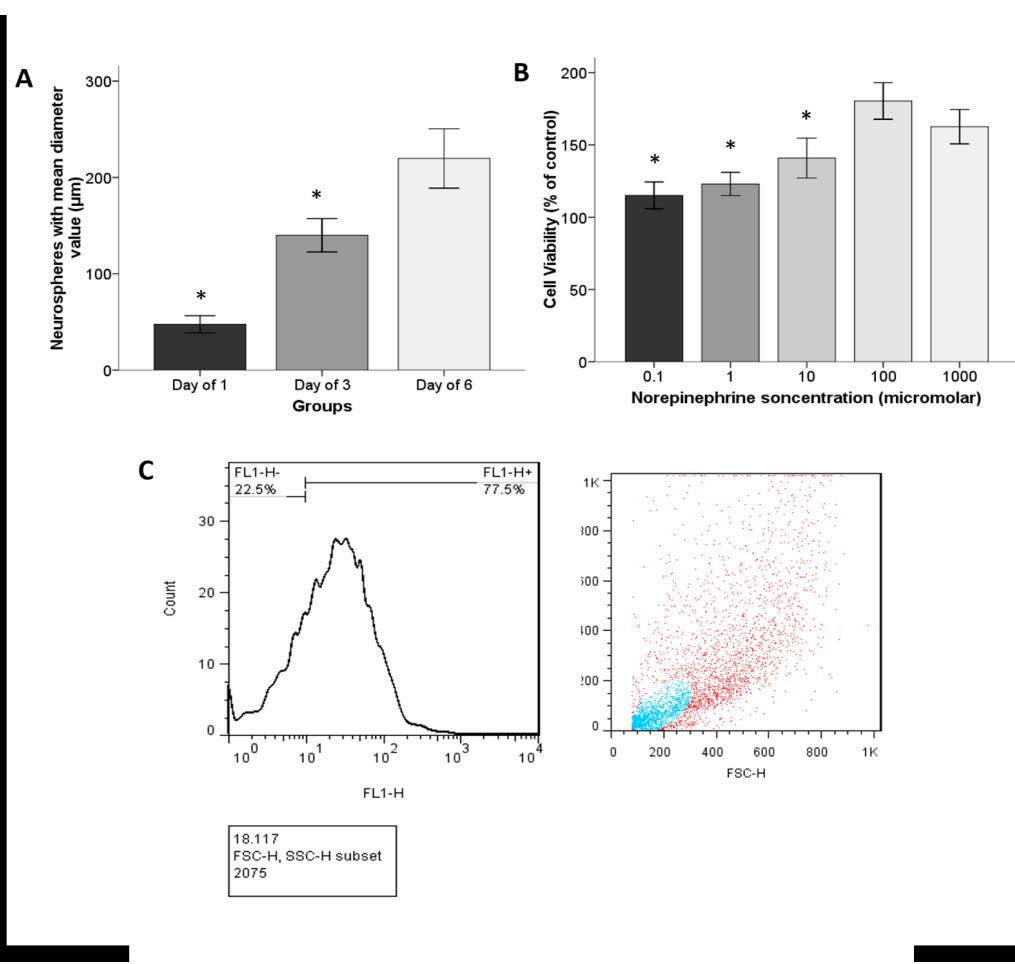
تصویرهای H-I: واکنش مثبت سلول‌های بنیادی عصبی کشت داده شده به نستین را نشان می‌دهند. در تصویرهای تهیه شده از آنتی‌بادی ثانویه کونزوگه به رنگ سبز FITC استفاده شد و جهت شمارش سلولی، هسته‌ها با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شدند. بزرگنمایی ۲۰۰ برابر.

فنتوپ عصبی

برای بررسی اثر نوراپی نفرین بر مورفو‌لوزی سلولی، سلول‌های بنیادی عصبی با غلظت ۱۰۰ میکرومولار نوراپی نفرین به مدت ۲ ساعت (بدون و در حضور آنتاگونیست گیرنده‌های آلفا و بتا‌آدرنرژیک؛ یعنی پرازوسین و پروپرانولول به ترتیب) کشت داده شدند. جسم سلولی سلول‌های بنیادی عصبی و همین‌طور افزایش قابل توجه تعداد زوائد عصبی با فنتوپ عصبی در حضور نوراپی نفرین به واضح مشاهده شد. همچنان، استفاده از مسدود‌کننده‌های گیرنده‌های آلفا و بتا‌آدرنرژیک، به تنها‌ی و یا هر ۲ به شکل همزمان، منجر به کاهش قابل توجه فنتوپ عصبی شد. نتایج در تصویر شماره ۳ ارائه شده است.

متی

از روش MTT برای تعیین دُز بهینه نوراپی نفرین و تأثیر آن بر سلول‌های بنیادی عصبی استفاده شد. همان‌طور که در تصویر شماره ۲ قسمت B نشان داده شده است، نوراپی نفرین باعث افزایش تعداد سلول‌های بنیادی عصبی زنده و همین‌طور افزایش میزان تکثیر این سلول‌ها البته به صورتوابسته به دُز می‌شود. با توجه به نتایج، افزایش میزان تکثیر سلولی در غلظت ۱۰۰ میکرومولار ($180/44 \pm 6/32$) برای مدت ۲ ساعت مواجهه با نوراپی نفرین و پس از ۲۴ ساعت در محیط کشت DMEM/F12 بدون سرم مشاهده شد. بنابراین، نوراپی نفرین با غلظت ۱۰۰ میکرومولار به عنوان دُز بهینه برای مطالعات و آزمایشات بعدی در نظر گرفته شد (تصویر شماره ۲ قسمت B).



جندي شاپور

تصویر ۲. نمودار مقایسه اندازه قطر نوروسferها در روزهای مختلف

A: محور عمودی نشان‌دهنده قطر نوروسferها بر حسب میکرومتر و محور افقی بیانگر زمان پس از کشت اولیه سلول‌ها است. نمودارها به ترتیب از چپ به راست زمان‌های ۱ روز، ۳ روز و ۶ روز پس از کشت را نشان می‌دهند. * نشان‌دهنده اختلاف معنادار با روز ششم است.

B: نمودار مقایسه درصد زنده‌مانی سلول‌های بنیادی عصبی تیمارشده با غلظت‌های مختلف نوراپی‌نفرین به روش MTT. محور عمودی بیانگر درصد سلول‌های زنده نرمال‌سازی با میزان سلول‌های زنده در گروه تیمار نشده و محور افقی نشان‌دهنده غلظت‌های مختلف نوراپی‌نفرین است. * نشان‌دهنده اختلاف معنادار با غلظت ۱۰۰ میکرومولار نوراپی‌نفرین است.

C: تعیین ماهیت سلول‌های بنیادی عصبی بهوسیله تعیین درصد نشانگر سطحی نستین از طریق فلوسایتمتری. نشانگر نستین مثبت با درصد بالایی در سلول‌ها شناسایی شد. ($P < 0.05$).

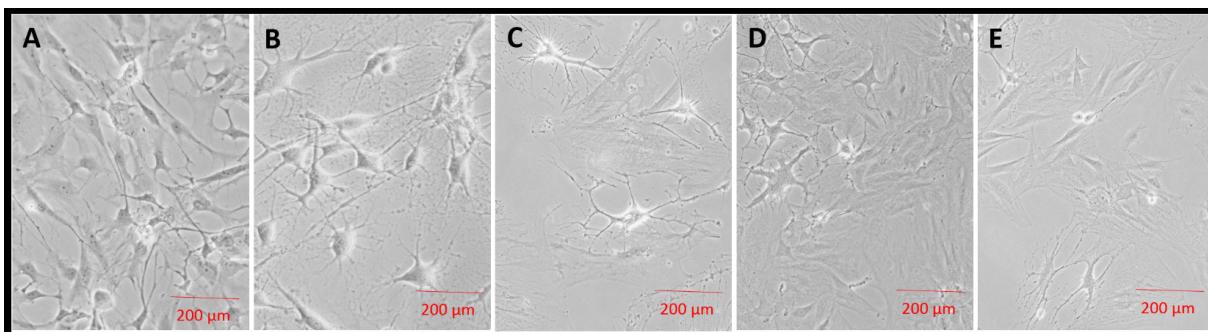
گروه‌های تیمارشده با پرازوسین، به عنوان آنتاگونیست انتخابی گیرنده آلفا-۱ آدرنرژیک مشاهده شد. علاوه بر این، در بررسی ژل الکتروفورز، باندهای به دست آمده کاملاً مشهود بود (تصویر شماره ۴ قسمت D-F).

بحث

براساس مطالعات انجام شده، اثر نوراپی‌نفرین بر سلول‌های پیش‌ساز عصبی مانند یک شمشیر دولیه عمل می‌کند. بر این اساس، این مطالعه به منظور ارزیابی تأثیر نوراپی‌نفرین بر فرایندهای تکثیر و آپوپتوز سلول‌های بنیادی عصبی با تکیه بر اهمیت گیرندهای آلفا و بتا‌آدرنرژیک انجام شد. در مطالعه حاضر، مشخص شد نوراپی‌نفرین تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی مشتق از هیپوكامپ را از طریق هر ۲ گیرنده آلفا و بتا‌آدرنرژیک

بيان ژن

نتایج حاصل از روش real-time RT-PCR به منظور بررسی کمی بیان mRNA مربوط به ژن‌های Stk4 کاسپاز-۳ و SOX2 در گروه‌های مورد مطالعه ارزیابی شد. نتایج به دست آمده نسبت به گروه کنترل (سلول‌های بنیادی عصبی تیمارشده) ارائه شد (تصویر شماره ۴ قسمت A-C). داده‌ها نشان داد استفاده از نوراپی‌نفرین به صورت قابل توجهی بیان ژن SOX2 mRNA را در مقایسه با سایر گروه‌های آزمایشی افزایش می‌دهد ($290/88 \pm 24/56$). مقایسه با گروه پیش تیمارشده با پروپرتوپلول، مقایسه با گروه پیش تیمارشده با پرازوسین و مقایسه با گروه پیش تیمارشده با پروپرتوپلول/پرازوسین. همچنین، افزایش معنادار سطوح Stk4 mRNA ($119 \pm 0/94$) و کاسپاز-۳ mRNA ($830 \pm 0/93$) در



مجله علمی پزشکی
جندي شاپور

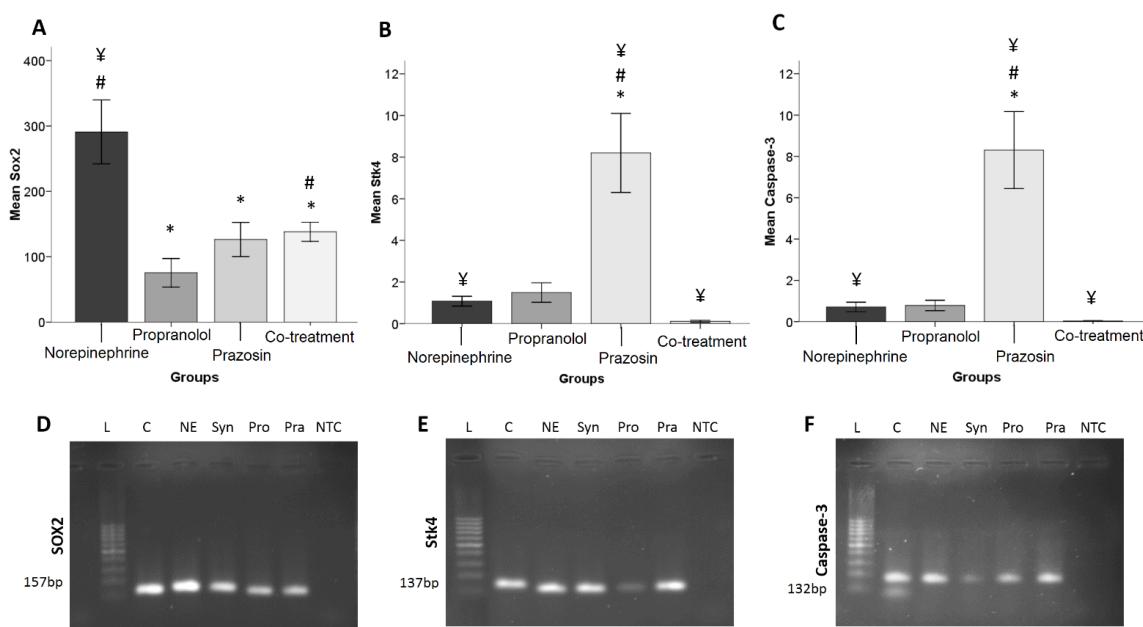
تصویر ۳. تصویرهای فاز کنتراست از مورفولوژی سلول‌های بنیادی عصبی

A: سلول‌های بنیادی عصبی تیمارشده بدون نوراپی‌نفرین،

B: گروه کنترل، سلول‌های بنیادی عصبی تیمارشده با نوراپی‌نفرین (۱۰۰ میکرومتر) به مدت ۲ ساعت،

C: گروه NE، سلول‌های بنیادی عصبی تیمارشده با نوراپی‌نفرین (۱۰۰ میکرومتر) + پروپرانولول (۲ میکرومتر)،

D: گروه NE/Pro، سلول‌های بنیادی عصبی تیمارشده با نوراپی‌نفرین (۱۰۰ میکرومتر) + پرازوسین (۱/۱۰ میکرومتر)، E: گروه NE/Pra سلول‌های بنیادی عصبی تیمارشده با نوراپی‌نفرین + پرازوسین و پروپرانولول (گروه Syn).



مجله علمی پزشکی
جندي شاپور

تصویر ۴. نمودار میزان بیان زن SOX2 در گروههای مورد آزمون در مقایسه با گروه کنترل

A: بیان زن SOX2 میان گروههای نوراپی‌نفرین با سایر گروههای مورد آزمون اختلاف معناداری وجود داشت ($P=0.00$). * نشانه اختلاف معنادار با گروه نوراپی‌نفرین است. # نشانه اختلاف معنادار با گروه پروپرانولول است.

B: نمودار میزان بیان زن Stk4 در گروههای مورد آزمون در مقایسه با گروه کنترل. بیان زن Stk4 میان گروه پرازوسین با سایر گروههای مورد آزمون اختلاف معناداری وجود داشت ($P=0.00$). * نشانه اختلاف معنادار با گروه نوراپی‌نفرین است. # نشانه اختلاف معنادار با گروه پروپرانولول است. ¥ نشانه اختلاف معنادار با گروه پرازوسین است.

C: نمودار میزان بیان زن Caspase-3 در گروههای مورد آزمون در مقایسه با گروه کنترل. بیان زن Caspase-3 میان گروههای پرازوسین با سایر گروههای مورد آزمون اختلاف معناداری وجود داشت ($P=0.00$). * نشانه اختلاف معنادار با گروه نوراپی‌نفرین است. # نشانه اختلاف معنادار با گروه پروپرانولول است. ¥ نشانه اختلاف معنادار با گروه پرازوسین است.

D-F: ژل الکتروفورز محصولات ریل تایم برای جفت پرایمر Sox2, Stk4, Caspase-3

نیز فعال کند که بهنوبه خود منجر به افزایش تعداد نوروسفرها می شود [۳۳]. در مطالعه حاضر، نشان داده شد در گروه تحت درمان با پرازووین، بیان ژن SOX2 کاهش یافته است. این نتیجه احتمالاً بیانگر این موضوع است که نوع گیرنده آلفا در تحریک تکثیر سلول های بنیادی عصبی مؤثر است. همچنین گزارش شده است درمان با آگونیست های گیرنده آلفا-۲ آدرنرژیک موجب بهبود عملکردهای مرتبط با حافظه و توجه می شود [۳۴]. در حالی که تجویز آنتاگونیست های گیرنده آلفا-۲ آدرنرژیک حافظه فعل را سرکوب می کند [۳۵]. علاوه بر این، لویو و همکاران گزارش دادند که مسیر پروتئین کیانز نوع ۲ وابسته به کلسمیم/ کالمودیولین در تکثیر سلولی با واسطه گیرنده آدرنرژیک $\alpha 1A$ دخیل است [۳۶].

همچنین، مطالعه اخیری که لیو و همکاران انجام دادند، نشان داد نوراپی نفرین قادر به تحریک فعالیت گیرنده آدرنرژیک $\alpha 1D$ و همچنین افزایش تکثیر سلول های عضلات صاف شریان ریوی است و این اثر از طریق مسیر ERK ۱/۲-۱ انجام می شود [۳۷]. بنابراین، می توان بیان کرد که استفاده از آگونیست های گیرنده آلفا منجر به تکثیر سلول های بنیادی عصبی می شود. همچنان که مطالعات اخیر شواهدی مبنی بر بهبود یادگیری و حافظه پس از درمان طولانی مدت (بیش از ۹ ماه) با سیرازولین به عنوان یک آگونیست گیرنده آلفا-۱ آدرنرژیک را رانه کرده است [۳۸].

در مطالعه لورنس و همکاران اشاره شده است که نوراپی نفرین موجب کاهش سرعت چرخه سلولی و همچنین کاهش تکثیر سلولی از طریق مسیر سیگنالینگ AR- β - β می شود. در این مطالعه همچنین گزارش شده است نوراپی نفرین موجب افزایش تعداد سلول های در حال تکثیر می شود و از سوی دیگر، از طریق مسیر سیگنالینگ AR- $\alpha 1$ -AR باعث القای آپوپتوز می شود [۳۹]. مشخص شده است که در شرایط فیزیولوژیک که منجر به افزایش ترشح نوراپی نفرین می شود، تعادل بین فعالیت گیرندهای آلفا-۲ و بتا آدرنرژیک، فعالیت سلول های پیش ساز و همچنین نوروژنز هیپوکامپ را تنظیم می کند [۳۸]. در این مطالعه، سطوح mRNA ژن Stk4 و کاسپاز-۳ در گروه های پیش تیمار شده با پرازووین افزایش معادلی داشت. Stk4 به طور مستقیم و غیر مستقیم با کاسپاز-۳ در ارتباط است. آپوپتوز در طیف وسیعی از پاسخ ها شرکت می کند. Stk4، سرین/ترئونین-پروتئین کیانز می تواند با استرس فعل شود. شواهد زیادی برای نقش این آنزیم در آپوپتوز وجود دارد. Stk4 نه تنها هدف خانواده کاسپازها است، بلکه ممکن است مسیر سیگنالینگ آپوپتوز را نیز فعال کند [۴۰].

این موضوع به خوبی روشن شده است که استرس غیرقابل کنترل باعث آتروفی دندانه ها در ناحیه CA3 هیپوکامپ می شود و نوروژنز نورون های گرانول دار شکنچ دندانه های را سرکوب می کند [۴۱]. افزایش فعالیت ناشی از استرس در لوکوس سروکلوس و همچنین افزایش تولید تیروزین هیدروکسیلаз تا حدی با افزایش

و بهویژه از طریق گیرنده بتا آدرنرژیک فعال می کند. همچنین افزایش معنادار سطح بیان ژن Stk4 به عنوان ژن پرو آپوپتویک، و افزایش معنادار سطح mRNA کاسپاز-۳- از طریق مسدود کردن گیرنده آلفا آدرنرژیک مشاهده شد. علاوه بر این در این مطالعه نقش جدیدی برای گیرنده های بتا آدرنرژیک در القای آپوپتوز توسط نوراپی نفرین معرفی شد. برطبق دانسته های ما، این اولین گزارش در مورد القای آپوپتوز از طریق گیرنده های بتا آدرنرژیک است. در پژوهش حاضر، نشان داده شد قطر و تعداد نوروسفرها در یک دوره ۶ روزه افزایش داشته است. این یافته با نتایج حاصل از مطالعات پیشین مطابقت دارد [۲۷]. نتایج رنگ آمیزی ایمونوھیستوشیمی و همچنین مطالعات برون تنی نشان می دهد سلول های بنیادی عصبی القایی به میزان قابل توجهی قادر به تولید و ترشح پروتئین نستین بوده، بنابراین نستین مثبت هستند [۲۸]. ارزیابی اثر نوراپی نفرین بر تکثیر سلول های بنیادی عصبی در غلظت های مختلف نوراپی نفرین انجام شده است. نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر نیز نشان داد میزان تکثیر این سلول ها پس از قرار گرفتن به مدت ۲۴ ساعت در معرض دز های مختلف نوراپی نفرین افزایش می یابد. این نتایج در راستای دیگر مطالعات انجام شده قرار می گیرد [۲۹].

براساس گزارشات ارائه شده در پژوهش های پیشین، مشخص شده است نوراپی نفرین در غلظت های پایین قادر به تحریک تکثیر فیبروبلاست های قلبی در محیط کشت است، اما از سوی دیگر، در غلظت های بالا موجب القای آپوپتوز در این سلول ها می شود [۳۰]. علاوه بر این، نوراپی نفرین قادر است تکثیر سلول های بنیادی بالغ پیش ساز عصبی هیپوکامپ را از طریق فعال سازی گیرنده های بتا-۳ آدرنرژیک تحریک کند [۱۳]. بر اساس نتایج بدست آمده، هر ۲ نوع گیرنده های آدرنرژیک می توانند تکثیر سلول های بنیادی عصبی را تحریک کنند که این موضوع بر اهمیت عملکرد این گیرنده های آدرنرژیک تأکید می کند. مطالعات دقیق تر نشان داده است پروپرانولول به عنوان یک مسدود کننده بتا و غیر انتخابی و همچنین پرازووین به عنوان یک مسدود کننده آلفا-۱، هر دو قادر به کاهش بیان ژن SOX2 هستند. مکانیسم های دخیل در تکثیر پیش ساز های هیپوکامپ تا به امروز به طور کامل شناسایی نشده اند. با این حال، این امکان وجود دارد که مکانیسم های موردنظر احتمالاً از طریق فعال سازی آدنیلات سیکلаз و فسفوریل اسیلون وابسته به AMP حلقی در فرایند تکثیر سلولی عمل کنند [۳۲، ۳۱].

مطالعات نشان می دهند استفاده از مسدود کننده های غیر انتخابی بتا آدرنرژیک مانند پروپرانولول از تکثیر سلول های بنیادی / پیش ساز عصبی جلوگیری می کند [۱۳]. به این ترتیب مشخص شد بیان SOX2 به طور معناداری توسط پروپرانولول کاهش یافته است. این موضوع نشان می دهد آنتاگونیست گیرنده های آلفا-۲ آدرنرژیک قادر است پیش ساز های عصبی را

این گیرنده‌ها در فرآیندهای سلولی عصبی بسیار بحث برانگیز است. در عین حال، گیرنده‌های بتا به عنوان گیرنده هدف و اصلی نوروترانسمیتر نوراپی‌نفرین عمل می‌کنند و نقش اساسی در ایجاد اثرات این انتقال‌دهنده عصبی دارند.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

تحقیق انجام شده مطابق با قوانین و مقررات کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی زنجان انجام شده است.

حامی مالی

مطالعه حاضر توسط **دانشگاه علوم پزشکی زنجان** با شماره ۸-۹۷۳-۱۲-A تأمین مالی شد.

مشارکت نویسنده‌گان

طرح، نویسنده مسئول، تحلیل نتایج و استاد راهنمای علیرضا عبدانی پور؛ استاد راهنما و مشاور: ابراج جعفری انارکولی؛ مشاور: محمد جواد فریدونی؛ مجری طرح: زکیه داور.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسنده‌گان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

از سرکار خانم فرزانه فاخری بهدلیل زحمات شایان توجه در این مطالعه، تقدیر و تشکر می‌شود.

فعالیت محور هیپوتalamوس-هیپوفیز-ادرنال و همچنین بافزایش فعالیت مسیرهای عصبی حساس به استرس که مستقیماً بر فعالیت لوکوس سروتوس تأثیر می‌گذارد، در ارتباط است [۴۲]. مطالعات اخیر در این زمینه نشان می‌دهد استرس مزمن باعث القای آتروفی در نورون‌های هرمی و افزایش سطح گلولتمات در ناحیه CA3 هیپوکامپ به دنبال کاهش نوروزن در مناطق مختلف هیپوکامپ در بزرگسالان می‌شود [۴۳، ۴۴] بررسی‌های اخیر و همکاران نشان داد نوراپی‌نفرین از طریق تنظیم فعالیت پروتئین کیناز فعل شده با میتوژن و مسیرهای سیگنالینگ AKT قادر به کاهش بقای سلولی، افزایش آسیب سلولی و همچنین القای آپوپتوز در رده سلولی کاربیومیوسیت جنینی است [۴۴].

از محدودیت‌های پژوهش انجام شده می‌توان به کمبود بودجه پژوهش و محدودیت در انجام زمان پژوهش اشاره کرد.

پیشنهاد می‌شود مطالعات بعدی با در نظر گرفتن طول دوره درمان و نیمه‌عمر آگونیست و آنتاگونیست گیرنده‌های آلفا و بتا آدرنرژیک و بهویژه آنتاگونیست گیرنده‌های آلفا-۱، اثرات این داروها بر تکثیر و یا مرگ سلول‌های عصبی انجام شود.

نتیجه‌گیری

نوراپی‌نفرین تحت شرایط استرس توسط سلول‌های مغزی ترشح می‌شود. اثر نوراپی‌نفرین بر سلول‌های بنیادی عصبی هیپوکامپ وابسته به گیرنده است. با توجه به تأثیر نوراپی‌نفرین بر تکثیر سلولی و نوروزن می‌توان بیان کرد که احتمالاً افرادی که در شرایط استرس‌زا زندگی می‌کنند نسبت به افرادی که زندگی بدون استرس را تجربه می‌کنند، از میزان هوش بالاتری برخوردار هستند.

از سوی دیگر و با در نظر گرفتن یک رویکرد منفی، تحریک‌پذیری بیش از حد سلول‌های عصبی هیپوکامپ می‌تواند منجر به القای آپوپتوز و ایجاد اختلالات مرتبط با حافظه شود. بنابراین، استرس و درنتیجه ترشح نوراپی‌نفرین همیشه مانند یک شمشیر دولبه عمل می‌کند.

باتوجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه و نقش دوسویه نوراپی‌نفرین در ارتباط با سلول‌های بنیادی عصبی، می‌توان گفت نقش نوراپی‌نفرین هم در تکثیر سلول‌ها و هم شروع آپوپتوز حائز اهمیت است. سلول‌هایی که بیش از اندازه تحریک می‌شود و به‌واسطه نوراپی‌نفرین میزان تقسیم آن‌ها افزایش می‌یابد، بهدلیل آفزایش فعالیت و میزان متابولیت سلولی، سبب تولید رادیکال‌های آزاد داخل سلولی می‌شود و این خود می‌تواند سبب شروع آپوپتوز شود. بنابراین استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها در شرایط استرس، می‌تواند از شروع فرآیند آپوپتوز جلوگیری کند. گیرنده‌های آلفا-۱ و بتا آدرنرژیک دارای نقش متفاوت و مهمی در تکثیر سلولی است و از سوی دیگر دخیل در فرآیند آپوپتوز می‌باشند که نقش

References

- [1] McEwen BS. Stress and hippocampal plasticity. *Annu Rev Neurosci.* 1999; 22:105-22. [\[DOI:10.1146/annurev.neuro.22.1.105\]](https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.22.1.105) [\[PMID\]](#)
- [2] Kim EJ, Pellman B, Kim JJ. Stress effects on the hippocampus: A critical review. *Learn Mem.* 2015; 22(9):411-6. [\[DOI:10.1101/lm.037291.114\]](https://doi.org/10.1101/lm.037291.114) [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [3] Krugers HJ, Lucassen PJ, Karst H, Joëls M. Chronic stress effects on hippocampal structure and synaptic function: Relevance for depression and normalization by anti-glucocorticoid treatment. *Front Synaptic Neurosci.* 2010; 2:24. [\[PMID\]](#)
- [4] Schoenfeld TJ, Gould E. Stress, stress hormones, and adult neurogenesis. *Exp Neurol.* 2012; 233(1):12-21. [\[DOI:10.1016/j.expneurol.2011.01.008\]](https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.01.008) [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [5] Borodovitsyna O, Joshi N, Chandler D. Persistent stress-induced neuroplastic changes in the locus coeruleus/norepinephrine system. *Neural Plast.* 2018; 2018:1892570. [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [6] Zorrilla EP, Logrip ML, Koob GF. Corticotropin releasing factor: A key role in the neurobiology of addiction. *Front Neuroendocrinol.* 2014; 35(2):234-44. [\[DOI:10.1016/j.yfrne.2014.01.001\]](https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.01.001) [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [7] Dunn AJ, Swiergiel AH, Palamarchouk V. Brain circuits involved in corticotropin-releasing factor-norepinephrine interactions during stress. *Ann N Y Acad Sci.* 2004; 1018:25-34. [\[DOI:10.1196/annals.1296.003\]](https://doi.org/10.1196/annals.1296.003) [\[PMID\]](#)
- [8] Goldstein DS. Catecholamines 101. *Clin Auton Res.* 2010; 20(6):331-52. [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [9] Ferrucci M, Giorgi FS, Bartalucci A, Busceti CL, Fornai F. The effects of locus coeruleus and norepinephrine in methamphetamine toxicity. *Curr Neuropharmacol.* 2013; 11(1):80-94. [\[DOI:10.2174/157015913804999522\]](https://doi.org/10.2174/157015913804999522) [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [10] Mitchell HA, Weinshenker D. Good night and good luck: Norepinephrine in sleep pharmacology. *Biochem Pharmacol.* 2010; 79(6):801-9. [\[DOI:10.1016/j.bcp.2009.10.004\]](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.10.004) [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [11] Borodovitsyna O, Flaminini M, Chandler D. Noradrenergic modulation of cognition in health and disease. *Neural Plast.* 2017; 2017:6031478. [\[DOI:10.1155/2017/6031478\]](https://doi.org/10.1155/2017/6031478) [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [12] O'Donnell J, Zeppenfeld D, McConnell E, Pena S, Nedergaard M. Norepinephrine: A neuromodulator that boosts the function of multiple cell types to optimize CNS performance. *Neurochem Res.* 2012; 37(11):2496-512. [\[DOI:10.1007/s11064-012-0818-x\]](https://doi.org/10.1007/s11064-012-0818-x) [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [13] Jhaveri DJ, Mackay EW, Hamlin AS, Marathe SV, Nandam LS, Vaidya VA, et al. Norepinephrine directly activates adult hippocampal precursors via beta3-adrenergic receptors. *J Neurosci.* 2010; 30(7):2795-806. [\[DOI:10.1523/JNEUROSCI.3780-09.2010\]](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3780-09.2010) [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [14] O'Donnell J, Ding F, Nedergaard M. Distinct functional states of astrocytes during sleep and wakefulness: Is norepinephrine the master regulator? *Curr Sleep Med Rep.* 2015; 1(1):1-8. [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [15] Gepdiremen A, Sönmez S, Kiziltunç A, İkbal M, Erman F, Düzenli S. Effects of norepinephrine on NMDA-induced neurotoxicity in cerebellar granular cell culture of rat pups. *Fundam Clin Pharmacol.* 1998; 12(5):517-20. [\[DOI:10.1111/j.1472-8206.1998.tb00980.x\]](https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.1998.tb00980.x) [\[PMID\]](#)
- [16] Liu M, Wan L, Bin Y, Xiang J. Role of norepinephrine in A β -related neurotoxicity: Dual interactions with Tyr10 and SNK (26-28) of A β . *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2017; 49(2):170-8. [\[DOI:10.1093/abbs/gmw126\]](https://doi.org/10.1093/abbs/gmw126) [\[PMID\]](#)
- [17] Abdanipour A, Nikfar A, Nikbakht Rad M, Jafari Anarkooli I, Mansouri M. Neuroprotective effect of L-deprenyl on the expression level of the Mst1 gene and inhibition of apoptosis in rat-model spinal cord injury. *Iran J Basic Med Sci.* 2022; 25(1):53-9. [\[PMID\]](#)
- [18] Rawat SJ, Chernoff J. Regulation of mammalian Ste20 (Mst) kinases. *Trends Biochem Sci.* 2015; 40(3):149-56. [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [19] Jin X, Zhu L, Xiao S, Cui Z, Tang J, Yu J, et al. MST1 inhibits the progression of breast cancer by regulating the Hippo signaling pathway and may serve as a prognostic biomarker. *Mol Med Rep.* 2021; 23(5):383. [\[DOI:10.3892/mmr.2021.12022\]](https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12022) [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [20] Mustafi D, Palczewski K. Topology of class A G protein-coupled receptors: Insights gained from crystal structures of rhodopsins, adrenergic and adenosine receptors. *Mol Pharmacol.* 2009; 75(1):1-12. [\[DOI:10.1124/mol.108.051938\]](https://doi.org/10.1124/mol.108.051938) [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [21] McCorry LK. Physiology of the autonomic nervous system. *Am J Pharm Educ.* 2007; 71(4):78. [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [22] Bylund M, Andersson E, Novitch BG, Muhr J. Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat Neurosci.* 2003; 6(11):1162-8. [\[PMID\]](#)
- [23] Han DW, Tapia N, Hermann A, Hemmer K, Höing S, Araúzo-Bravo MJ, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by defined factors. *Cell Stem Cell.* 2012; 10(4):465-72. [\[DOI:10.1016/j.stem.2012.02.021\]](https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.02.021) [\[PMID\]](#)
- [24] Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism.* 2000; 49(2 Suppl 1):3-8. [\[DOI:10.1016/s0026-0495\(00\)80077-3\]](https://doi.org/10.1016/s0026-0495(00)80077-3) [\[PMID\]](#)
- [25] Sankari SL, Masthan KM, Babu NA, Bhattacharjee T, Elumalai M. Apoptosis in cancer—an update. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012; 13(10):4873-8. [\[PMID\]](#)
- [26] Prasad S, Sung B, Aggarwal BB. Age-associated chronic diseases require age-old medicine: Role of chronic inflammation. *Preventive Medicine.* 2012; 54:S29-37. [\[DOI:10.1016/j.ypmed.2011.11.011\]](https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2011.11.011)
- [27] Xiong F, Gao H, Zhen Y, Chen X, Lin W, Shen J, et al. Optimal time for passaging neurospheres based on primary neural stem cell cultures. *Cytotechnology.* 2011; 63(6):621-31. [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)

- [28] Bernal A, Arranz L. Nestin-expressing progenitor cells: Function, identity and therapeutic implications. *Cell Mol Life Sci.* 2018; 75(12):2177-95. [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [29] Wang L, Liu H, Chen X, Zhang M, Xie K, Ma Q. Immune sculpting of norepinephrine on MHC-I, B7-1, IDO and B7-H1 expression and regulation of proliferation and invasion in pancreatic carcinoma cells. *PloS One.* 2012; 7(9):e45491. [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [30] Ma M, Wang L, Ma Y, Yang Y, Chen B, Zhu X. [Effects of norepinephrine on proliferation and apoptosis of neonatal cardiac fibroblasts in rats (Chinese)]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi.* 2015; 43(6):542-7. [\[Link\]](#)
- [31] Ursino MG, Vasina V, Raschi E, Crema F, De Ponti F. The Beta3-adrenoceptor as a therapeutic target: Current perspectives. *Pharmacol Res.* 2009; 59(4):221-34. [\[DOI:10.1016/j.phrs.2009.01.002\]](#) [\[PMID\]](#)
- [32] Nakagawa S, Kim JE, Lee R, Malberg JE, Chen J, Steffen C, et al. Regulation of neurogenesis in adult mouse hippocampus by cAMP and the cAMP response element-binding protein. *J Neurosci.* 2002; 22(9):3673-82. [\[DOI:10.1523/JNEUROSCI.22-09-03673.2002\]](#) [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [33] Rizk P, Salazar J, Raisman-Vozari R, Marien M, Ruberg M, Colpaert F, et al. The alpha2-adrenoceptor antagonist dexefaroxan enhances hippocampal neurogenesis by increasing the survival and differentiation of new granule cells. *Neuropharmacology.* 2006; 31(6):1146-57. [\[DOI:10.1038/sj.npp.1300954\]](#) [\[PMID\]](#)
- [34] Cinnamon Bidwell L, Dew RE, Kollins SH. Alpha-2 adrenergic receptors and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Curr Psychiatry Rep.* 2010; 12(5):366-73. [\[DOI:10.1007/s11920-010-0136-4\]](#) [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [35] Kim CH, Ko IG, Kim SE, Shin MS, Kang YH, Cho JW, et al. Alpha1-adrenoceptor antagonists improve memory by activating N-methyl-D-aspartate-induced ion currents in the rat hippocampus. *Int Neurorol J.* 2015; 19(4):228-36. [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [36] Luo Q, Wang X, Liu R, Qiao H, Wang P, Jiang C, et al. Alpha1A-adrenoceptor is involved in norepinephrine-induced proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells via CaMKII signaling. *J Cell Biochem.* 2019; 120(6):9345-55. [\[PMID\]](#)
- [37] Zhang M, Tao W, Yuan Z, Liu Y. Mst-1 deficiency promotes post-traumatic spinal motor neuron survival via enhancement of autophagy flux. *J Neurochem.* 2017; 143(2):244-56. [\[DOI:10.1111/jnc.14154\]](#) [\[PMID\]](#)
- [38] Jhaveri DJ, Nanavaty I, Prosper BW, Marathe S, Husain BF, Kernie SG, et al. Opposing effects of alpha2- and beta-adrenergic receptor stimulation on quiescent neural precursor cell activity and adult hippocampal neurogenesis. *PloS One.* 2014; 9(6):e98736. [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [39] Lorenz J, Schäfer N, Bauer R, Jenei-Lanzl Z, Springorum RH, Grässel S. Norepinephrine modulates osteoarthritic chondrocyte metabolism and inflammatory responses. *Osteoarthritis Cartilage.* 2016; 24(2):325-34. [\[PMID\]](#)
- [40] Yuan F, Xie Q, Wu J, Bai Y, Mao B, Dong Y, et al. MST1 promotes apoptosis through regulating Sirt1-dependent p53 deacetylation. *J Biol Chem.* 2011; 286(9):6940-5. [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [41] Schoenfeld TJ, McCausland HC, Morris HD, Padmanaban V, Cameron HA. Stress and loss of adult neurogenesis differentially reduce hippocampal volume. *Biol Psychiatry.* 2017; 82(12):914-23. [\[DOI:10.1016/j.biopsych.2017.05.013\]](#) [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [42] Makino S, Smith MA, Gold PW. Regulatory role of glucocorticoids and glucocorticoid receptor mRNA levels on tyrosine hydroxylase gene expression in the locus coeruleus during repeated immobilization stress. *Brain Res.* 2002; 943(2):216-23. [\[PMID\]](#)
- [43] Schloesser RJ, Jimenez DV, Hardy NF, Paredes D, Catlow BJ, Manji HK, et al. Atrophy of pyramidal neurons and increased stress-induced glutamate levels in CA3 following chronic suppression of adult neurogenesis. *Brain Struct Funct.* 2014; 219(3):1139-48. [\[DOI:10.1007/s00429-013-0532-8\]](#) [\[PMID\]](#) [\[PMCID\]](#)
- [44] Wan CR, Han DD, Xu JQ, Yin P, Xu XL, Mei C, et al. Jujuboside A attenuates norepinephrine-induced apoptosis of H9c2 cardiomyocytes by modulating MAPK and AKT signaling pathways. *Mol Med Rep.* 2018; 17(1):1132-40. [\[DOI:10.3892/mmr.2017.7938\]](#)