

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 Davar<sup>1</sup>, Iraj Jafari Anarkooli<sup>1</sup>, Mohammad Javad Fridonir<sup>1</sup>, \*Alireza Abdanipour<sup>1</sup>

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



**Citation** Davar Z, Jafari Anarkooli I, Fridonir MJ, Abdanipour 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 Scientific Medical Journal*. 2022; 21(1):138-151. <https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.1.2815>

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



Received: 08 Oct 2021  
Accepted: 19 Jan 2022  
Available Online: 01 Mar 2022

**Keywords:**

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

**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.

**\* Corresponding Author:**

Alireza Abdanipour

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

Tel: +98 (912) 5467309

E-Mail: [abdani.anatomy@yahoo.com](mailto:abdani.anatomy@yahoo.com)

## Extended Abstract

### Introduction

**S**tudies 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 ( $\alpha$ ) and beta ( $\beta$ ), and some G protein-coupled receptors. There are at least two subtypes of receptors in each class:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  and  $\beta 2$ . In the present study, we hypothesized that norepinephrine stimulates proliferation or apoptosis of neural stem cells (NSCs) through  $\alpha$  and  $\beta$  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% CO<sub>2</sub> 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  $\mu$ 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  $\mu$ M propranolol for 4 hours plus optimum concentration of norepinephrine for 2 hours), Prazosin (NSCs were treated with 0.1  $\mu$ 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  $\mu$ M concentration ( $180.44 \pm 6.32$ ) after 2 hours of exposures to norepinephrine and after 24 hours in the serum-free DMEM/F12 medium. Therefore, 100  $\mu$ 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 ( $290.88 \pm 24.56$ ) in the control group compared to other experimental groups ( $75.47 \pm 10.93$ ,  $126.36 \pm 13.06$ , and  $138.15 \pm 7.30$  for propranolol, prazo-

sin, and propranolol/prazosin groups, respectively). In addition, a significant increase in the expression of Stk4 ( $8.19 \pm 0.94$ ) and Caspase-3 ( $8.30 \pm 0.93$ ) genes were observed in the groups with prazosin, as a selective antagonist of  $\alpha 1$  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  $\alpha$  and  $\beta$  adrenergic receptors. We found that norepinephrine activates the proliferation of hippocampus-derived NSCs through both  $\alpha$  and  $\beta$  adrenergic receptors (especially  $\beta$  adrenergic receptor). Significant increase in the expression of Stk4, as pro-apoptotic gene, and Caspase-3 gene were observed by blocking  $\alpha$  adrenergic receptor. It should be mentioned that we defined a novel role for  $\beta$  adrenergic receptors in induction of apoptosis by norepinephrine. To the best of our knowledge, this is the first report on induction of apoptosis by  $\beta$  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 stressful 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 آپوتوتیک و تکثیری در سلول‌های بنیادی عصبی مشتق از هیپوکامپ تیمارشده با نوراپی نفرین

زکيه داور<sup>۱</sup>، ایرج جعفری انارکولی<sup>۱</sup>، محمد جواد فریدونی<sup>۱</sup>، \*علیرضا عبدانی پور<sup>۱</sup>

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

Use your device to scan and read the article online

**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 Scientific Medical Journal*. 2022; 21(1):???. <https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.1.2815> <https://doi.org/10.32598/JSMJ.21.1.2815>

## چکیده

**زمینه 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 صحرایی استخراج و برای تولید نوروسفر در محیط عاری از سرم و مکمل‌ها کشت داده شدند. به منظور تأیید سلول‌های بنیادی عصبی القا شده، از آنتی‌بادی نستین استفاده شد. میزان تکثیر سلولی و سمیت 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 پروپرانولول و سپس نوراپی نفرین)، Pra (پیش تیمارشده با مسدودکننده گیرنده آلفا پرازوسین و سپس نوراپی نفرین) و Syn (پیش تیمارشده با پروپرانولول و پرازوسین و سپس نوراپی نفرین) تقسیم شدند. میزان بیان ژن‌های Stk4، Caspase-3 و Sox2 با استفاده از تکنیک Real-time RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج فلوسایتومتری بیان ژن نستین را تأیید کرد. بررسی کمی ژن‌ها نشان 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 افزایش داشت.

**نتیجه‌گیری:** 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 دو لبه منجر به تکثیر یا آپتوز در سلول‌های بنیادی عصبی شود.

تاریخ دریافت: ۱۶ مهر ۱۴۰۰

تاریخ پذیرش: ۲۹ دی ۱۴۰۰

تاریخ انتشار: ۰۱ فروردین ۱۴۰۱

## کلیدواژه‌ها:

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

## \* نویسنده مسئول:

علیرضا عبدانی پور

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

تلفن: ۰۹ ۵۴۶۷۳۰۹ (۹۱۲) +۹۸

رایانامه: [abdani.anatomy@yahoo.com](mailto:abdani.anatomy@yahoo.com)

## مقدمه

بیان دارد. این ژن کدکننده یک فاکتور رونویسی مؤثر در ایجاد و پایداری خاصیت چند توانی سلول‌های بنیادین پستانداران از جمله سلول‌های بنیادی عصبی است و موجب حفظ خاصیت نوزایی<sup>۴</sup> سلول‌های پیش‌ساز عصبی<sup>۵</sup> در شرایط درون تنی<sup>۶</sup> و همچنین برون تنی<sup>۷</sup> می‌شود. بیان این ژن در سلول‌های بنیادی عصبی منجر به کاهش قدرت تمایز آن‌ها به نورون و سلول‌های گلیال می‌شود [۲۲، ۲۳]. استرس به‌طور قابل توجهی منجر به افزایش رادیکال‌های آزاد، آزاد شدن هورمون‌ها و ایجاد تغییرات زیستی و شیمیایی در بدن می‌شود. استرس اکسیداتیو، به‌عنوان یک اختلال در تعادل بین تولید گونه‌های اکسیژن (رادیکال‌های آزاد) و اثرات حفاظتی آنتی‌اکسیدان‌ها تعریف می‌شود [۲۴] که حضور بیش‌ازحد رادیکال‌های آزاد منجر به مرگ آپوپتوتیک در سلول می‌گردد. آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی‌شده، فرآیندی است که در شرایط فیزیولوژیک نیز رخ می‌دهد و برای تکامل و بقای موجودات زنده ضروری است. اختلال در روند ایجاد و کنترل آپوپتوز می‌تواند منجر به بروز بیماری‌های خود ایمنی، بیماری‌های تحلیل برنده عصبی و سرطان شود [۲۵]. در مطالعه حاضر، بر آن شدیم تا اثر تنظیمی نوراپی نفرین بر سلول‌های بنیادی عصبی مشتق از هیپوکامپ را با در نظر گرفتن گیرنده‌های آلفا و بتا آدرنرژیک بررسی کنیم. بر این اساس، فرض بر آن بود که نوراپی نفرین تکثیر و یا آپوپتوز سلول‌های بنیادی عصبی را از طریق گیرنده‌های آلفا و بتا آدرنرژیک تحریک می‌کند.

## مواد و روش‌ها

## جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی عصبی

به منظور استخراج سلول‌های بنیادی عصبی، از نوزادهای ۵ تا ۱۰ روزه موش نژاد ویستار خریداری شده از مؤسسه تحقیقات واکنش و سرم‌سازی رازی کرج استفاده شد. مراقبت و نگهداری از موش‌ها منطبق بر آیین‌نامه مصوب کار با حیوانات آزمایشگاهی تصویب شده در دانشگاه علوم پزشکی زنجان انجام شد. پس از بیهوشی کامل با استفاده از تزریق داخل صفاقی ترکیب کتامین (۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، مغز حیوانات خارج شده، هیپوکامپ‌ها جدا شدند و بلافاصله در محلول نمکی بافر فسفات (PBS, Gibco) غنی شده با ۴/۵ گرم بر لیتر گلوکز شست‌وشو داده شدند. به منظور هضم آنزیمی، بافت‌های جمع‌آوری شده به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای اتاق در معرض ۴۰ U/ml محلول دیسپاز (Sigma Aldrich) III و ۱ میلی لیتر آکوتاز<sup>۸</sup> قرار گرفتند. در مرحله بعدی مخلوط سلولی از یک صافی سلولی ۷۰ میکرومتری (Falcon) عبور داده شد و به مدت ۱۰ دقیقه و در ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۰۰۰

هیپوکامپ به‌عنوان بخش اصلی تشکیل حافظه در مغز، هدف هورمون‌های استرس است [۱]. استرس کنترل نشده بر عملکردهای حافظه وابسته به هیپوکامپ تأثیر می‌گذارد [۲]. مطالعات نشان داده‌اند استرس مزمن مورفولوژی نورون‌ها را تغییر و سرعت تکثیر شکنج دندان‌های را کاهش می‌دهد و موجب کاهش هیپوکامپ نیز می‌شود [۲-۴]. استرس همچنین لوکوس سرولئوس نورآدرنرژیک را فعال می‌کند [۵]، اما مکانیسم دقیق فعال‌سازی لوکوس سرولئوس ناشی از استرس همچنان به‌طور کامل مشخص نشده است [۶]. مدارهای مغزی متعددی در تعاملات بین نوراپی نفرین و عامل آزادکننده کورتیکوتروپین در طول استرس دخیل هستند [۷]. نوراپی نفرین<sup>۱</sup>، همچنین نورآدرنالین<sup>۲</sup> نامیده می‌شود، یک انتقال‌دهنده عصبی کاتکول آمین مهم است [۸] که در مغز توسط لوکوس سرولئوس ترشح می‌شود [۹]. مقدار نوراپی نفرین در شرایط استرس به بالاترین میزان خود می‌رسد [۱۰] و انتشار آن در سرتاسر مغز پستانداران اکنون به‌عنوان عاملی در جنبه‌های مختلف شناخت، از جمله توجه و حافظه معرفی می‌شود [۱۱]. نوراپی نفرین در مغز به‌عنوان تعدیل‌کننده عصبی عمل می‌کند و فعالیت سلول‌های عصبی و گلیال را از مسیرهای مختلف تنظیم می‌کند. برخی از عملکردهای حیاتی مانند شکل‌پذیری سیناپس‌ها، حافظه، سرعت متابولیک، و تعادل گلوتامات و پتاسیم را تنظیم می‌کند [۱۲]. گیرنده‌های گلوتامات و گابا یا گاما آمینوبوتیریک اسید<sup>۳</sup> تکثیر سلول‌های پیش‌ساز هیپوکامپ بالغ را تنظیم می‌کنند [۱۳] و نوراپی نفرین نقش مهمی در بهینه‌سازی و تسهیل تغییرات سریع در اتصال عصبی و تحریک‌پذیری دارد [۱۲، ۱۴]. در واقع، نوراپی نفرین بسیاری از وقایع فیزیولوژیک و پاتولوژیک را در چندین مسیر تعدیل می‌کند [۹]. علی‌رغم این ویژگی‌های منحصر به فرد، خصوصیات مرتبط با خواص سمیت عصبی نوراپی نفرین نیز در مطالعات مختلف به اثبات رسیده است [۱۵، ۱۶]. Stk4 یکی از ژن‌های اصلی پرو آپوپتوز است که فعال شدن کاسپاز-۳ را تحریک می‌کند [۱۷]. در توصیف عملکردهای پیش آپوپتوتیک Stk4 تنها بسترهای سلولی فیزیولوژیک و آبشارهای سیگنال‌دهی آن‌ها مشخص شده است. Stk4 در القای آپوپتوز شرکت می‌کند که پس از برش کاسپاز واسطه وارد هسته می‌شود و از طریق تکه‌تکه شدن DNA باعث تخریب کروماتین می‌شود [۱۸، ۱۹]. نوراپی نفرین اثرات خود را بر روی ۲ دسته از گیرنده‌های آدرنرژیک آلفا و بتا و دسته‌ای از گیرنده‌های جفت‌شده با G پروتئین اعمال می‌کند [۲۰]. علاوه بر این، حداقل ۲ زیر گروه گیرنده  $\alpha 1$ ،  $\alpha 2$ ،  $\beta 1$  و  $\beta 2$  در هر دسته وجود دارد [۲۱]. ژن SOX2 به‌عنوان یک فاکتور رونویسی در سلول‌های بنیادی افزایش

4. Self-renewal

5. Neural progenitor cells

6. In vivo

7. In vitro

8. Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, USA

1. Norepinephrine

2. Noradrenaline

3.  $\gamma$ -Amino butyric acid (GABA)

کشت داده شدند (۵×۱۰۴ سلول در هر خانه). سپس سلول‌ها به مدت ۲ ساعت در معرض غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار نوراپی نفرین قرار گرفتند و تعویض محیط هر ۳۰ دقیقه انجام شد. سپس سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محیط DMEM/F۱۲ عاری از سرم قرار گرفتند. سلول‌های بنیادی عصبی بدون هیچ‌گونه تیمار با نوراپی نفرین (صفر میکرومولار) به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند. سپس سلول‌ها با محلول ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر  $10^{10}$  MTT به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. محیط کشت حذف و در ادامه، ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید<sup>۱۱</sup> جایگزین محیط کشت در هر خانه شد تا بلورهای فورمازان حل شود. سپس میزان فورمازان طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا<sup>۱۲</sup> محاسبه شد. درصد بقای سلول‌ها با استفاده از فرمول شماره ۱ به دست آمد [۲۶]:

۱.

$100 \times \frac{A_{570} \text{ نمونه‌های تیمار شده}}{A_{570} \text{ نمونه‌های تیمار نشده}}$

تیمار با نوراپی نفرین و طراحی مطالعه تجربی

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

گروه کنترل:

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

گروه نور اپی نفرین (Sigma; AY۲۵۷):

سلول‌های بنیادی عصبی تیمار شده با غلظت بهینه نوراپی نفرین به مدت ۲ ساعت،

گروه پروپرانولول<sup>۱۳</sup> (Sigma; P۰۸۸۴):

سلول‌های بنیادی عصبی پیش تیمار شده با ۲ میکرومولار پروپرانولول به مدت ۴ ساعت و سپس در معرض غلظت بهینه نوراپی نفرین به مدت ۲ ساعت،

گروه پرازوسین<sup>۱۴</sup> (Sigma; P۷۷۹۱):

سلول‌های بنیادی عصبی پیش تیمار شده با ۰/۱ میکرومولار پرازوسین به مدت ۴ ساعت و سپس در معرض غلظت بهینه نوراپی نفرین به مدت ۲ ساعت،

سانتریفیوژ شد. پس از شست‌وشوی رسوب سلولی به دست آمده در PBS، جهت تشکیل نوروسفرها، سلول‌ها در فلاسک‌های پلاستیکی ۲۵ دارای محیط کشت DMEM/F۱۲ غنی شده با محیط کشت سلول‌های بنیادی عصبی و فاکتورهای رشد و تکثیر سلول‌های عصبی (B27, Gibco; Thermo Fisher Scientific, Inc.) ۲٪، ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد فیبروبلاستی (bFGF; Invitro-gen; Thermo Fisher Scientific, Inc.)، ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد اپیدرمی (EGF; Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.) ۱۰۰ U/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین (Sigma-Aldrich) در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO<sub>2</sub> در 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 حاوی محیط کشت DMEM/F۱۲ غنی از ۲ درصد B۲۷، ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد فیبروبلاستی، ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد اپیدرمی و ۳ درصد سرم جنین گاوی (PBS, Gibco) به مدت یک هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تا پاساژ سوم کشت داده شد. به منظور تأیید خصوصیات سلول‌های بنیادی عصبی، از روش ایمونوسیتوشیمی و آنتی‌بادی مونوکلونال بر علیه نستین (ab6142; 1:300; Abcam FITC) (Milli-) (pore, Billerica, MA, USA, AP307F) با رقت ۱ به ۳۰۰ استفاده شد. به این ترتیب که سلول‌ها در پارافرمالدهید ۳ درصد به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق تثبیت 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 اتیديوم بروماید به مدت ۳۰ ثانیه در دمای اتاق برای رنگ‌آمیزی هسته سلول‌ها استفاده شد. سرانجام تصویربرداری با استفاده از میکروسکوپ فلورسنس Olympus BX51<sup>۹</sup> انجام شد. همچنین از سلول‌های بنیادی عصبی در پاساژ سوم برای ارزیابی مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی/پیش‌ساز عصبی با استفاده از روش فلوسایتومتری استفاده شد. کلیه پروتکل‌های این مطالعه تجربی مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی زنجان قرار گرفته است.

تعیین زمان و غلظت مناسب نوراپی نفرین

برای این منظور، سلول‌های بنیادی عصبی پاساژ سوم در پلیت‌های ۹۶ خانه حاوی محیط کشت DMEM/غنی از B۲۷ ۲ درصد، ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد فیبروبلاستی، ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد اپیدرمی به مدت ۲۴ ساعت

10. Sigma Aldrich, Germany  
11. DMSO  
12. BioTek  
13. Propranolol (Pro)  
14. Prazosin (Pra)

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 | GGAACAGTTGCTACCAGAGTGTCCAG | 137 |
| Sox2      | NM_001109181       | ACAGCATGTCTACTCGCAG      | CTGATCATGTCCCGGAGGTC       | 157 |
| Caspase-3 | NM_012922.2        | CGCACCCGGTTACTATTCTGG    | TGGCCACCTCCGGTTAACAC       | 132 |
| GAPDH     | NM_017008.4        | TTGTCAGCAATGCATCCTGCAC   | GTCTGGGATGGAATTGTGAG       | 158 |

مجله علمی پزشکی  
جندی شاپور

### گروه پروپرانولول / پرازوسین:

سلول‌های بنیادی عصبی پیش تیمار شده 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/F۱۲ انکوبه شدند.

### بررسی کمی بیان ژن‌ها

در این تکنیک RNA تام از بافت هیپوکامپ توسط تریزول در ۱۰۰۰ نانوگرم RNA خالص برای سنتز ۲۰ میکرولیتر cDNA مطابق با دستورالعمل کیت سنتز cDNA (Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Germany)) استفاده شد. از cDNA برای بررسی کمی تغییرات سطوح mRNA ژن‌های Stk4، کاسپاز-۳ و Sox2 استفاده شد. همچنین از گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به عنوان کنترل داخلی برای نرمال سازی استفاده شد. لیست توالی‌های پرایمر در جدول شماره ۱ ارائه شده است.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ۱۵ در حجم واکنش نهایی ۱۲/۵ میکرولیتری حاوی پرایمرهای رفت و برگشت (هر کدام ۲۰۰ نانومولار)، cDNA (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 پلیمرز بر روی الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد تأیید شد.

### تحلیل‌های آماری

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

### یافته‌ها

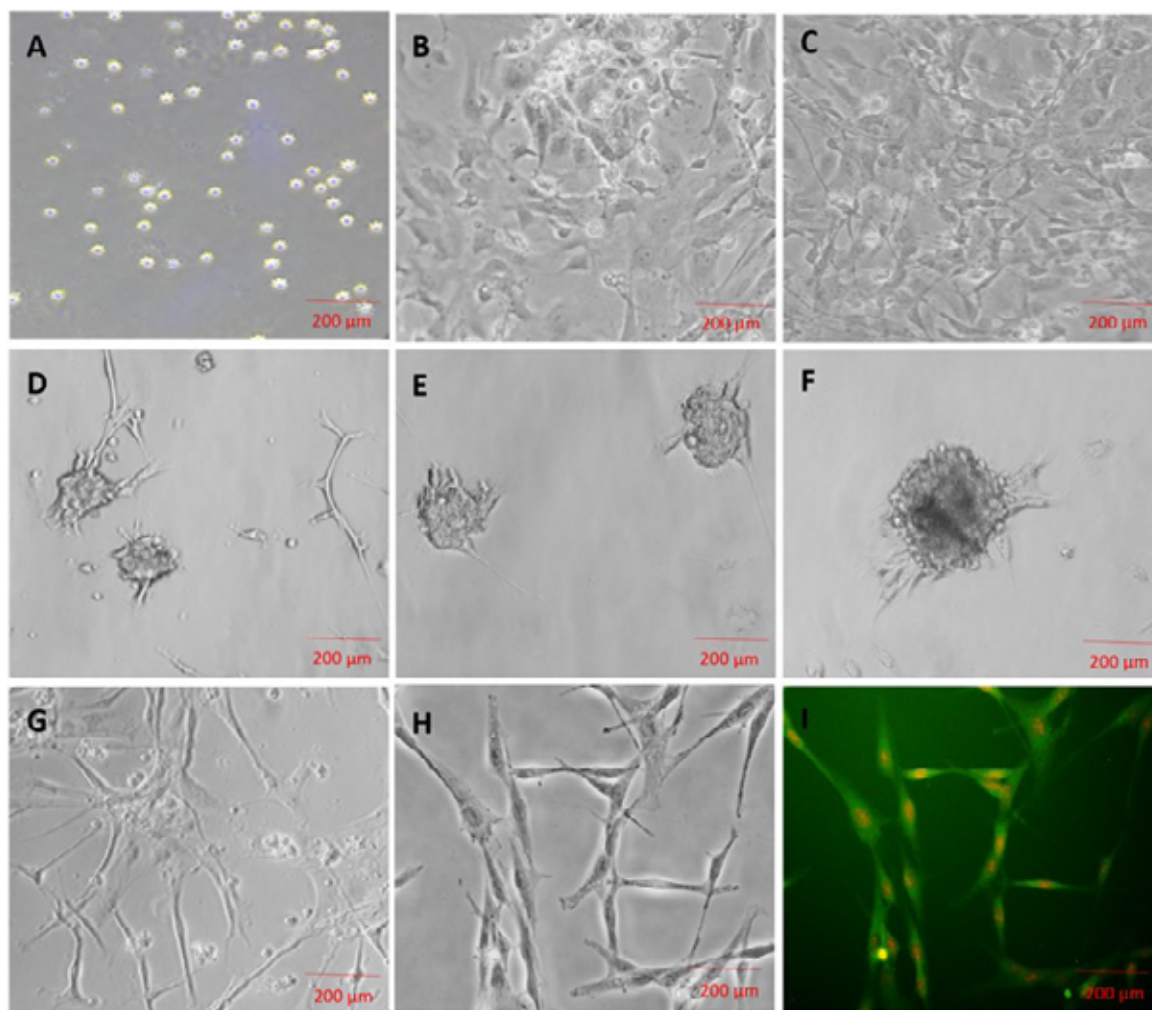
#### کشت سلول‌های بنیادی عصبی

نتایج به دست آمده از کشت و بررسی خصوصیات سلول‌های بنیادی عصبی در تصویر شماره ۱ ارائه 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 نروسفر، پس از سومین پاساژ (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، افزایش قابل توجهی در قطر کلونی‌های سلولی ( $219/71 \pm 15/40$  میکرومتر) در مقایسه با روز سوم ( $139/91 \pm 6/66$  میکرومتر) و روز اول ( $45/40 \pm 4/46$  میکرومتر) مشاهده شد.

نتایج مشاهدات در تصویر شماره ۱ قسمت D-F و تصویر شماره ۲ قسمت A ارائه 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).

16. Tukey

15. Polymerase Chain Reaction (PCR)



### جندی شاپور

**تصویر ۱.** سلول‌های بنیادی عصبی، کشت اولیه سلول‌های بنیادی عصبی تصویرهای A-C: کشت این سلول‌ها در فلاسک چسبیده منجر به اتصال سلول‌ها به بستر کشت و ایجاد سلول‌های دوکی شکل با زوائد سیتوپلاسمی گردید: A: روز اول، B: روز هفتم-پاساژ سلولی اول، C: روز هجدهم-پاساژ سلولی سوم. نوروسفرهای شناور حاصل از سلول‌های بنیادی عصبی. تصویرهای D-F: در زمان‌های ۱ روز D: ۳ روز، E: ۶ روز، F: بعد از کشت. تشکیل نوروسفرهای ثانویه، تصویر G: ایمنوسیتوشیمی 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 کونژوگه به رنگ سبز FITC استفاده شد و جهت شمارش سلولی، هسته‌ها با اتیديوم رنگ‌آمیزی شدند. بزرگ‌نمایی ۲۰۰ برابر.

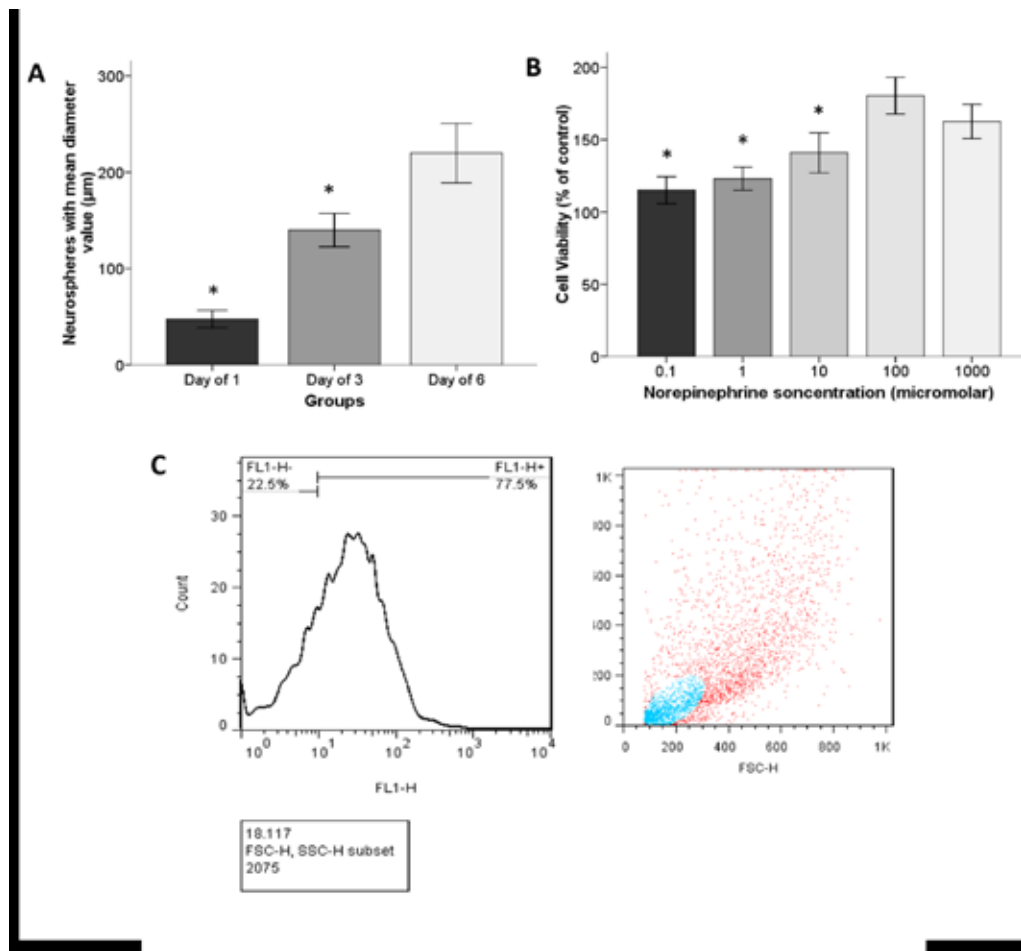
### فنونتیپ عصبی

برای بررسی اثر نورایی نفرین بر مورفولوژی سلولی، سلول‌های بنیادی عصبی با غلظت ۱۰۰ میکرومولار نورایی 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 فنونتیپ عصبی در حضور نورایی نفرین به وضوح مشاهده شد. همچنین، استفاده از مسدودکننده‌های گیرنده‌های آلفا و بتاآدرنرژیک، به تنهایی و یا هر ۲ به شکل هم‌زمان، منجر به کاهش قابل توجه فنونتیپ عصبی شد. نتایج در تصویر شماره ۳ ارائه شده است.

### سنجش MTT

از روش MTT برای تعیین دُز بهینه نورایی نفرین و تأثیر آن بر سلول‌های بنیادی عصبی استفاده شد. همان‌طور که در تصویر شماره ۲ قسمت B نشان داده شده است، نورایی نفرین باعث افزایش تعداد سلول‌های بنیادی عصبی زنده و همین‌طور افزایش تکثیر این سلول‌ها البته به صورت وابسته به دُز می‌شود. باتوجه به نتایج، افزایش میزان تکثیر سلولی در غلظت ۱۰۰ میکرومولار ( $180/44 \pm 6/32$ ) برای مدت ۲ ساعت مواجهه با نورایی نفرین و پس از ۲۴ ساعت در محیط کشت DMEM/F۱۲ بدون سرم مشاهده شد. بنابراین، نورایی نفرین با غلظت ۱۰۰ میکرومولار به عنوان دُز بهینه برای مطالعات و آزمایشات بعدی در نظر گرفته شد (تصویر شماره ۲ قسمت B).





مجله علمی پزشکی

## جندی شاپور

تصویر ۲. نمودار مقایسه اندازه قطر نوروسفرها در روزهای مختلف

**A:** محور عمودی نشان‌دهنده قطر نوروسفرها برحسب 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 تیمار شده با غلظت‌های مختلف نوراپی نفرین به روش MTT. محور عمودی بیانگر درصد سلول‌های زنده نرمال‌سازی با میزان سلول‌های زنده در گروه تیمار نشده و محور افقی نشان‌دهنده غلظت‌های مختلف نوراپی نفرین است. \* نشان‌دهنده اختلاف معنادار با غلظت ۱۰۰ میکرومولار نوراپی نفرین است.

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

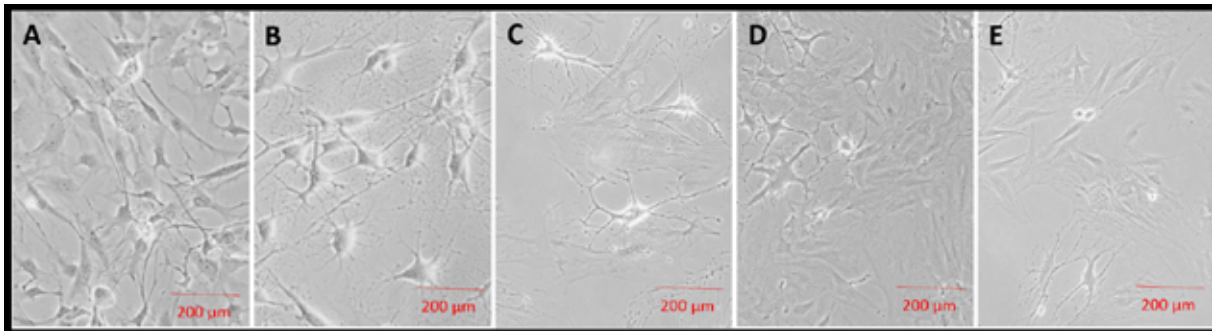
## بیان ژن

گروه‌های تیمار شده با پرازوسین، به‌عنوان آنتاگونیست انتخابی گیرنده آلفا-۱ آدرنژیک مشاهده شد. علاوه‌براین، در بررسی ژل الکتروفورز، باندهای به‌دست‌آمده کاملاً مشهود بود (تصویر شماره ۴ قسمت D-F).

## بحث

براساس مطالعات انجام‌شده، اثر نوراپی نفرین بر سلول‌های پیش‌ساز عصبی مانند یک شمشیر دولبه عمل می‌کند. بر این اساس، این مطالعه به منظور ارزیابی تأثیر نوراپی نفرین بر فرایندهای تکثیر و آپوپتوز سلول‌های بنیادی عصبی با تکیه بر اهمیت گیرنده‌های آلفا و بتا آدرنژیک انجام شد. در مطالعه حاضر، مشخص شد نوراپی نفرین تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی مشتق از هیپوکامپ را از طریق هر ۲ گیرنده آلفا و بتا آدرنژیک

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 به‌دست‌آمده، نسبت به گروه کنترل (سلول‌های بنیادی عصبی تیمار نشده) ارائه شد (تصویر شماره ۴ قسمت A-C). داده‌ها نشان داد استفاده از نوراپی نفرین به‌صورت قابل توجهی بیان mRNA ژن Sox2 ( $290/88 \pm 24/56$ ) را در مقایسه با سایر گروه‌های آزمایشی افزایش می‌دهد ( $75/47 \pm 10/93$ ). مقایسه با گروه پیش تیمار شده با پروپرانولول،  $126/36 \pm 13/06$  مقایسه با گروه پیش تیمار شده با پرازوسین و  $13/15 \pm 7/30$  مقایسه با گروه پیش تیمار شده با پروپرانولول/پرازوسین. همچنین، افزایش معنادار سطوح mRNA ژن Stk4 ( $119 \pm 0/94$ ) و کاسپاز-۳ ( $130 \pm 0/93$ ) در

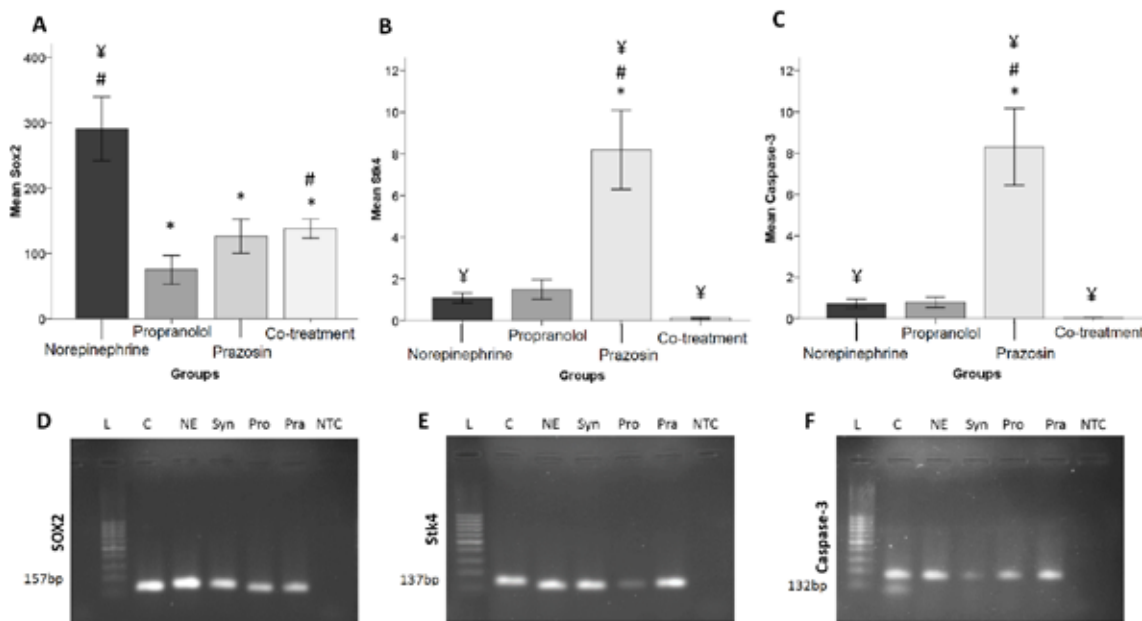


### جنیدی شاپور

مجله علمی پزشکی

تصویر ۳. تصویرهای فاز کنتراست از مورفولوژی سلول‌های بنیادی عصبی

A: سلول‌های بنیادی عصبی تیمار شده بدون نوراپی نفرین،  
 B: گروه کنترل، سلول‌های بنیادی عصبی تیمار شده با نوراپی نفرین (۱۰۰ میکرومتر) به مدت ۲ ساعت،  
 C: گروه NE، سلول‌های بنیادی عصبی تیمار شده با نوراپی نفرین (۱۰۰ میکرومتر) + پروپرانولول (۲ میکرومتر)،  
 D: گروه NE/Pro، سلول‌های بنیادی عصبی تیمار شده با نوراپی نفرین (۱۰۰ میکرومتر) + پرازوسین (۰/۱ میکرومتر)،  
 E: گروه NE/Pra، سلول‌های بنیادی عصبی تیمار شده با نوراپی نفرین + پرازوسین و پروپرانولول (گروه Syn).



### جنیدی شاپور

مجله علمی پزشکی

تصویر ۴. نمودار میزان بیان ژن Sox2 در گروه‌های مورد آزمون در مقایسه با گروه کنترل

A: بیان ژن Sox2 میان گروه‌های نوراپی نفرین با سایر گروه‌های مورد آزمون اختلاف معناداری وجود داشت ( $P=0/00$ ). \* نشانه اختلاف معنادار با گروه نور اپی نفرین است. # نشانه اختلاف معنادار با گروه پروپرانولول است. † نشانه اختلاف معنادار با گروه پرازوسین است.  
 B: نمودار میزان بیان ژن Stk4 در گروه‌های مورد آزمون در مقایسه با گروه کنترل. بیان ژن Stk4 میان گروه پرازوسین با سایر گروه‌های مورد آزمون اختلاف معناداری وجود داشت ( $P=0/000$ ). \* نشانه اختلاف معنادار با گروه نوراپی نفرین است. # نشانه اختلاف معنادار با گروه پروپرانولول است. † نشانه اختلاف معنادار با گروه پرازوسین است.  
 C: نمودار میزان بیان ژن Caspase-3 در گروه‌های مورد آزمون در مقایسه با گروه کنترل. بیان ژن Caspase-3 میان گروه‌های پرازوسین با سایر گروه‌های مورد آزمون اختلاف معناداری وجود داشت ( $P=0/000$ ). \* نشانه اختلاف معنادار با گروه نوراپی نفرین 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 به نوبه خود منجر به افزایش تعداد نوروسفرها می‌شود [۳۳]. در مطالعه حاضر، نشان داده شد در گروه تحت درمان با پرازوسین، بیان ژن SOX2 کاهش یافته است. این نتیجه احتمالاً بیانگر این موضوع است که نوع گیرنده آلفا در تحریک تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی مؤثر است. همچنین گزارش شده است درمان با آگونیست‌های گیرنده آلفا-۲ آدرنژیک موجب بهبود عملکردهای مرتبط با حافظه و توجه می‌شود [۳۴]. در حالی که تجویز آنتاگونیست‌های گیرنده آلفا-۲ آدرنژیک حافظه فعال را سرکوب می‌کند [۳۵]. علاوه بر این، لویو و همکاران گزارش دادند که مسیر پروتئین کیناز نوع ۲ وابسته به کلسیم/کالمودیولین در تکثیر سلولی با واسطه گیرنده آدرنژیک  $\alpha 1A$  دخیل است [۳۶].

همچنین، مطالعه اخیری که لی‌یو و همکاران انجام دادند، نشان داد نوراپی نفرین قادر به تحریک فعالیت گیرنده آدرنژیک  $\alpha 1D$  و همچنین افزایش تکثیر سلول‌های عضلات صاف شریان ریوی است و این اثر از طریق مسیر ERK-1/2 انجام می‌شود [۳۷]. بنابراین، می‌توان بیان کرد که استفاده از آگونیست‌های گیرنده آلفا منجر به تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی می‌شود. 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 آدرنژیک را ارائه 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  $\beta$ -AR می‌شود. در این مطالعه همچنین گزارش شده است نوراپی نفرین موجب افزایش تعداد سلول‌های در حال تکثیر می‌شود و از سوی دیگر، از طریق مسیر سیگنالینگ  $\alpha 1$ -AR باعث القای آپوپتوز می‌شود [۳۹]. مشخص شده است که در شرایط فیزیولوژیک که منجر به افزایش ترشح نوراپی نفرین می‌شود، تعادل بین فعالیت گیرنده‌های آلفا-۲ و بتا آدرنژیک، فعالیت سلول‌های پیش‌ساز و همچنین نوروزنر هیپوکامپ را تنظیم می‌کند [۳۸]. در این مطالعه، سطوح mRNA ژن Stk4 و کاسپاز-۳ در گروه‌های پیش‌تیمار شده با پرازوسین افزایش معناداری داشت. Stk4 به‌طور مستقیم و غیر مستقیم با کاسپاز-۳ در ارتباط است. آپوپتوز در طیف وسیعی از پاسخ‌ها شرکت می‌کند. Stk4، سرین/ترونین-پروتئین کیناز می‌تواند با استرس فعال 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 دندریتها در ناحیه CA3 هیپوکامپ می‌شود و نوروزنر نورون‌های گرانول دار شکنج دندانه‌ای را سرکوب می‌کند [۴۱]. افزایش فعالیت ناشی از استرس در لوکوس سرولئوس و همچنین افزایش تولید تیروزین هیدروکسیلاز تا حدی با افزایش

و به‌ویژه از طریق گیرنده بتا آدرنژیک فعال می‌کند. همچنین افزایش معنادار سطح بیان ژن Stk4 به عنوان ژن پرو آپوپتوتیک، و افزایش معنادار سطح mRNA کاسپاز-۳ از طریق مسدود کردن گیرنده آلفا آدرنژیک مشاهده شد. علاوه بر این در این مطالعه نقش جدیدی برای گیرنده‌های بتا آدرنژیک در القای آپوپتوز توسط نوراپی نفرین معرفی شد. بر طبق دانسته‌های ما، این اولین گزارش در مورد القای آپوپتوز از طریق گیرنده‌های بتا آدرنژیک 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 رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی و همچنین مطالعات برون تنی نشان می‌دهد سلول‌های 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 سلول‌های بنیادی عصبی در غلظت‌های مختلف نوراپی نفرین انجام شده است. نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نیز نشان داد میزان تکثیر این سلول‌ها پس از قرار گرفتن به مدت ۲۴ ساعت در معرض دزهای مختلف نوراپی نفرین افزایش می‌یابد. این نتایج در راستای دیگر مطالعات انجام شده قرار می‌گیرد [۲۹].

بر اساس گزارشات ارائه شده در پژوهش‌های پیشین، مشخص شده است نوراپی نفرین در غلظت‌های پایین قادر به تحریک تکثیر فیبروبلاست‌های قلبی در محیط کشت است، اما از سوی دیگر، در غلظت‌های بالا موجب القای آپوپتوز در این سلول‌ها می‌شود [۳۰]. علاوه بر این، نوراپی نفرین قادر است تکثیر سلول‌های بنیادی بالغ/پیش‌ساز عصبی هیپوکامپ را از طریق فعال‌سازی گیرنده‌های بتا-۳ آدرنژیک تحریک کند [۱۳]. بر اساس نتایج به دست آمده، هر ۲ نوع گیرنده‌های آدرنژیک می‌توانند تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی را تحریک کنند که این موضوع بر اهمیت عملکرد این گیرنده‌های آدرنژیک تأکید می‌کند. مطالعات دقیق‌تر نشان داده است پروپرانولول به عنوان یک مسدودکننده بتا و غیر انتخابی و همچنین پرازوسین به عنوان یک مسدودکننده آلفا-۱، هر دو قادر به کاهش بیان ژن SOX2 هستند. مکانیسم‌های دخیل در تکثیر پیش‌سازهای هیپوکامپ تا به امروز به‌طور کامل شناسایی نشده‌اند. با این حال، این امکان وجود دارد که مکانیسم‌های مورد نظر احتمالاً از طریق فعال‌سازی آدنیلات سیکلاز و فسفوریلاسیون وابسته به AMP حلقوی در فرایند تکثیر سلولی عمل کنند [۳۱، ۳۲].

مطالعات نشان می‌دهند استفاده از مسدودکننده‌های غیرانتخابی بتا آدرنژیک مانند پروپرانولول از تکثیر سلول‌های بنیادی/پیش‌ساز عصبی جلوگیری می‌کند [۱۳]. به این ترتیب مشخص شد بیان SOX2 به‌طور معناداری توسط پروپرانولول کاهش یافته است. این موضوع نشان می‌دهد آنتاگونیست گیرنده‌های آلفا-۲ آدرنژیک قادر است پیش‌سازهای عصبی را

این گیرنده‌ها در فرآیندهای سلولی عصبی بسیار بحث‌برانگیز است. در عین حال، گیرنده‌های بتا به‌عنوان 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 انجام‌شده 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 A-۱۲-۹۷۳-۸ تأمین مالی شد.

#### مشارکت نویسندگان

طراح، نویسنده مسئول، تحلیل نتایج و استاد راهنما: علیرضا عبدانی‌پور؛ استاد راهنما و مشاور: ایراج جعفری انارکولی؛ مشاور: محمد جواد فریدونی؛ مجری طرح: زکیه داور.

#### تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، 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 هیپوتالاموس-هیپوفیز-آدرنال و همچنین با افزایش فعالیت مسیرهای عصبی حساس به استرس که مستقیماً بر فعالیت لوکوس سرولئوس تأثیر می‌گذارند، در ارتباط است [۴۲]. مطالعات اخیر در این زمینه نشان می‌دهد استرس مزمن باعث القای آتروفی در نورون‌های هرمی و افزایش سطح گلوتامات در ناحیه CA3 هیپوکامپ به دنبال کاهش نورون‌ها در مناطق مختلف هیپوکامپ در بزرگسالان می‌شود [۴۳، ۴]. بررسی‌های اخیر ون و همکاران نشان داد نوراپی‌نفرین از طریق تنظیم فعالیت پروتئین کیناز فعال‌شده با میتوزن و مسیرهای سیگنالینگ AKT قادر به کاهش بقای سلولی، افزایش آسیب سلولی و همچنین القای آپوپتوز در رده سلولی کاردیومیوسیت جنینی است [۴۴].

از محدودیت‌های پژوهش انجام‌شده 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 نورون‌ها، 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 در نتیجه ترشح نوراپی‌نفرین همیشه مانند یک شمشیر دولبه عمل می‌کند.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده 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 افزایش 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] [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] [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] [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] [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] [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] [PMID] [PMCID]
- [10] Mitchell HA, Weinschenker 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] [PMID] [PMCID]
- [11] Borodovitsyna O, Flamini M, Chandler D. Noradrenergic modulation of cognition in health and disease. *Neural Plast.* 2017; 2017:6031478. [DOI: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] [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] [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, İkbāl 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] [PMID]
- [16] Liu M, Wan L, Bin Y, Xiang J. Role of norepinephrine in Aβ-related neurotoxicity: Dual interactions with Tyr10 and SNK (26-28) of Aβ. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2017; 49(2):170-8. [DOI: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] [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] [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, Novitsch 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, Araúz-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] [PMID]
- [24] Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism.* 2000; 49(2 Suppl 1):3-8. [DOI: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]
- [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 dexafaroxan enhances hippocampal neurogenesis by increasing the survival and differentiation of new granule cells. *Neuropsychopharmacology*. 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 Neurol 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]