

کارایی برون تنی نانولیپوزوم‌های آگماتین بر تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی عصبی مغز موش نر بالغ

مهرزاد جعفری برمک^۱، حسن بردانیا^۲، امیر قنبری^{۳*}

^۱ مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، ^۲ مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران، ^۳

تاریخ وصول: ۱۴۰۳/۰۶/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: نوروژنایی در طول زندگی هر فرد باید مداوم و پویا بوده تا کارایی قسمت‌های مختلف مغز دچار ضعف و ناکارآمدی نگردد. از طرفی حفاظت از نوروژن‌های قدیمی نیز می‌تواند راهگشا باشد؛ بنابراین مواد سنتتزی که بتواند هم‌زمان هر دو عملکرد حفاظت و نوروژنایی را داشته باشد، می‌تواند گزینه مناسبی برای دارو رسانی هدفمند در بیماری‌های مغزی و پیری باشد. به طور خاص، آگماتین به دلیل نقش آن به عنوان یک پیش ساز پلی آمین و توانایی آن در عبور از سد خونی مغزی و در عین حال مهار اکسید نیتریک سنتاز مفید و داشتن نقش حفاظتی و نوروژنایی گزارش شده، می‌تواند گزینه مناسبی در دارو رسانی هدفمند در محافظت و نوروژنایی باشد. لذا هدف از این تحقیق تعیین و کارایی برون‌تنی نانولیپوزوم‌های آگماتین بر تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی عصبی مغز موش نر بالغ بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی - آزمایشگاهی که در سال ۱۴۰۲ انجام شد، ابتدا سلول‌های بنیادی عصبی را از ناحیه ساب و نتریکولار مغز موش بالغ جداسازی کرده و در حضور فاکتور رشد اپیدرمی و فاکتور رشد فیبروبلاستی، تکثیر و نروسفرها ایجاد شدند. زنده مانی سلولی در شش گروه شامل گروه کنترل، گروه نانولیپوزوم، گروه آگماتین با غلظت‌های (۲۵ و ۵۰) و گروه‌های نانولیپوزوم تیمار با آگماتین با غلظت‌های (۲۵ و ۵۰) میکرومولار به روش MTT انجام شد. همچنین تعداد نروسفر، تعداد سلول‌های منتج از هر نروسفر و تعداد سلول‌های عصبی و گلیال بدنبال تمایزشمارش شدند. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه و تعقیب توکی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: زنده مانی سلول‌های بنیادی عصبی در گروه‌های آگماتین به صورت وابسته به دوز افزایش یافت به طوری که در گروه ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار نسبت به گروه آگماتین ۱۰ میکرومولار افزایش معنی‌داری داشت ($p < 0.01$). میانگین تعداد نروسفرها در گروه‌های نانولیپوزوم - آگماتین ۵۰ میکرومولار در مقایسه با گروه‌های لیپوزوم و کنترل افزایش معنی‌داری ($p < 0.01$) و $p < 0.05$ نشان دادند. میانگین تعداد سلول‌های نورونی در گروه‌های نانولیپوزوم - آگماتین ۲۵ و ۵۰ در مقایسه با گروه‌های لیپوزوم و کنترل، افزایش معنی‌داری ($p < 0.001$) نشان دادند.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که آگماتین و نانولیپوزوم حاوی آگماتین تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی را افزایش می‌دهند. این افزایش در روش هدفمند با لیپوزوم، در غلظت پایین‌تری از آگماتین مؤثرتر است که نشان‌دهنده هدفمندی و ارزشمندی سامانه لیپوزومی است.

واژه‌های کلیدی: آگماتین، سلول‌های بنیادی عصبی، نوروژنایی، نانولیپوزوم

* نویسنده مسئول: امیر قنبری، یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی

Email: amirghanbari52@yahoo.com

"نشریه علمی پژوهشی ارمغان دانش وابسته به دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یک نشریه با دسترسی آزاد است و تمامی مقالات منتشر شده در این نشریه به صورت دسترسی آزاد منتشر می‌شوند."

مقدمه

سلول‌های بنیادی عصبی در تولید انواع مختلف سلول از جمله سلول‌های عصبی و گلیال مؤثر هستند و می‌توانند در شرایط طبیعی و پاتولوژیک جایگزین سلول‌های از دست رفته شوند (۱-۳). موقعیت استراتژیک و محیط منحصر به فرد آنها باعث می‌شود که آنها به طور قابل توجهی تحت تأثیر ساختارهای شیمیایی اعم از درمانی یا غیردرمانی قرار گیرند. علاوه بر این، محیط اطراف سلول‌های بنیادی عصبی نقش مهمی در بقا، تکثیر و تمایز آنها ایفا می‌کند. مولکول‌های سیگنالینگ مختلف و اجزای ماتریکس خارج سلولی به حفظ رده سلولی و ظرفیت بازسازی آنها کمک می‌کنند (۴ و ۵). سلول‌های عصبی از محدود سلول‌های بدن است که به محیط خارج سلولی حساس می‌باشد، و محیط اطراف آنها می‌بایست کنترل شده باشد، لذا محافظت از این سلول‌ها و ایجاد نوروهای جدید تضمین کننده عملکرد طبیعی مغز هست. اختلال در کنترل محیط پیرامون، به ویژه از طریق مداخلات دارویی یا قرار گرفتن در معرض عوامل تخریبی، می‌تواند منجر به کاهش تعداد سلول‌های عصبی و اختلال در مکانیسم‌های ترمیم شود. بررسی‌ها نشان داده‌اند که قرار گرفتن طولانی مدت در معرض درمان‌هایی که مانع از تکثیر، تمایز و تقسیم سلولی می‌گردد، نه تنها جمعیت این سلول‌ها را کاهش می‌دهد، بلکه بر قابلیت‌های عملکردی آن‌ها نیز تأثیر منفی می‌گذارد و در نتیجه نتایج بهبود ضعیفی در مدل‌های آسیب عصبی به همراه دارد. همان‌طور که پژوهش‌ها

برای آشکار کردن پیچیدگی‌های سلول‌های بنیادی ادامه دارد، درک تعامل بین مداخلات درمانی و ویژگی‌های ذاتی سلول‌های بنیادی عصبی برای توسعه استراتژی‌های مؤثر برای محافظت از سیستم عصبی و بازسازی در محیط‌های بالینی بسیار مهم است (۶-۹).

مواد بیولوژیکی نظیر پلی‌آمین‌هایی مانند؛ پوترسین، اسپرمین و اسپرمیدین نقش اساسی در بدن دارند و با خواص جوان‌گرایی و ضد پیری مرتبط هستند. این متابولیت‌ها از آگماتین که از آمینواسید آرژنین تشکیل می‌شود، مشتق شده‌اند. آگماتین برای درمان درد مزمن و آسیب مغزی نویدبخش است. این به طور رقابتی تمام ایزوفرم‌های نیتریک اکسید سنتاز را مهار می‌کند و با تنظیم سیتوکروم P450 از بدن در برابر نیتریک اکساید بیش از حد مقابله می‌کند (۱۰). بررسی‌های اخیر نشان می‌دهد که آگماتین، یک واسطه در بیوسنتز پلی‌آمین، همچنین به عنوان یک انتقال دهنده عصبی مهم در پستانداران عمل می‌کند. در مغز تولید می‌شود، در وزیکول‌های سیناپسی تجمع می‌یابد، پس از دپلاریزاسیون آزاد می‌شود و به وسیله آگماتیناز غیرفعال می‌شود. آگماتین به گیرنده‌های آلفا ۲-آدرنژیک و محل‌های اتصال ایمیدازولین متصل می‌شود، در نتیجه کانال‌های گیرنده NMDA و دیگر کانال‌های کاتیونی با لیگاند را مسدود می‌کند (۱۱ و ۱۲). علاوه بر این، نیتریک اکسید سنتاز را مهار می‌کند و باعث آزاد شدن برخی هورمون‌های

پپتیدی می شود. آگماتین به عنوان یک پیش ساز پلی آمین، مزایای مهارى در برابر تهدیدات سلول های سالم از جمله سلول های بنیادی ارایه می دهد. آگماتین ترکیبی است که به نورونز، تولید نورون های جدید در مغز کمک می کند (۱۶-۱۳). آگماتین مسیرهای آپوپتوز را در سلول های مغز مهار می کند، مسيرمولکولى HIF-1 α را فعال نموده و تولید رادیکال های آزاد را متوقف می کند که همه این ها به خواص محافظت کننده عصبی آن کمک می کند (۱۸ و ۱۷). پژوهش ها نشان می دهد که آگماتین تکثیر و تمایز سلول های پیش ساز را در هیپوکامپ، منطقه ای که برای یادگیری و حافظه بسیار مهم است، افزایش می دهد. آگماتین مسیرهای خاصی مانند ERK1/2 را فعال می کند و در عین حال مسیرهای دیگری مانند BMP 2,4 و SMAD 1,5,8 را سرکوب می کند. این نشان دهنده کاربردهای درمانی بالقوه آن برای شرایط عصبی، از جمله بیماری آلزایمر است (۱۰). با توجه به این نقش در این مطالعه ضروری به نظر رسید که اثربخشی آگماتین به صورت هدفمند بررسی شود که امروزه برای دارو رسانی هدفمند می توان از نانو حامل های مختلف مانند لیپوزوم برای انتقال مواد بیولوژیکی به درون سلول ها استفاده نمود. نانولیپوزوم ها ساختار کروی که می تواند حامل دارو باشد و رویکردی منحصر به فرد برای انتقال مواد درمانی ارایه می دهند. این وزیکول های چربی کروی که از گروه های فسفولیپیدی تشکیل شده اند، دارای یک غشای دولایه هستند که یک

حفره آبی مرکزی را در بر می گیرد. قابل ذکر است که نانولیپوزوم ها زیست سازگاری استثنایی و حداقل اثرات حساس کننده را نشان می دهند و واکنش های تبزا و آنتی ژنی را به حداقل می رسانند (۱۵-۱۳). توانایی قابل توجه آنها در کپسوله کردن مواد به عنوان سپری در برابر اثرات نامطلوب دارو عمل می کند و به طور هم زمان از داروهای محصور شده در برابر تخریب به وسیله محیط فیزیولوژیکی بدن محافظت می کند. علاوه بر این، ترکیب ساختاری آنها امکان کپسوله کردن داروهای آبدوست و آبگریز را فراهم می کند و یک راه حل همه کاره برای تحویل دارو را ارایه می دهد. لذا هدف از این تحقیق تعیین و کارایی برون تنی نانولیپوزوم های آگماتین بر تکثیر و تمایز سلول های بنیادی عصبی مغز موش نر بالغ بود.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی - آزمایشگاهی، برای تهیه سلول از چهارسر موش بالغ بالغ سب سی استفاده شد. موش ها در شرایط استاندارد نگهداری تا به سن ۴ تا ۵ هفتهگی برسند، سپس هر کدام از موش ها با استفاده از مخلوطی از ۳-۴ درصد گاز ایزوفلوران و اکسیژن بیهوش شدند. پس از بیهوشی و در رفتگی گردنی مغز موش ها تشریح و از جمجمه خارج شد و با بافر سرد شسته شد تا خون و موهای چسبیده جدا گردد. سپس در زیر استریو میکروسکوپ و هود لامینار، ناحیه ساب و نتریکولار مغز موش جداسازی و به قطعات بافتی کوچکتری تقسیم شد و پس از تیمار

با انزیم و مهار کننده آن، قطعات بافتی در محیط کشت مناسب حاوی گلو تاماکس، پنی سیلین -استرپتومایسین و محیط کشت اصلاح شده و مغذی (DMEM)^(۱) همراه با فاکتور رشد اپیدرمی^(۲)، فاکتور رشد فیبروبلاست^(۳) و هپارین ۰/۰۲ درصد کشت داده شد. محیط کشت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO₂ به مدت هفت روز انکوبه شدند تا نوروسفرهای اولیه شکل بگیرند. نوروسفرهای تشکیل شده جمع‌آوری و سانتریفیوژ شده و پس از دور ریختن مایع رویی، ۱ میلی‌لیتر تریپسین به مدت پنج دقیقه در انکوباتور به سلول‌ها اضافه شد. سپس یک مهارکننده تریپسین اضافه گردید و سلول‌ها به مدت پنج دقیقه با سرعت ۱۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. به دنبال آن مایع رویی را برداشته و سلول‌ها در محیط جدید به مدت پنج روز در انکوباتور کشت داده شدند تا تعداد سلول‌های مناسب برای گروه‌های مورد مطالعه به دست آید(۷).

برای تهیه لایه نازکی از لیپوزوم با استفاده از روش هیدراتاسیون، فسفولیپیدهای لیوفیلیزه و ماده آگماتین در ۱ میلی‌لیتر بافر تریس حل شدند. سپس این محلول به یک فلاسک ته گرد منتقل و تحت خلأ در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۵۰ دور در دقیقه تبخیر شد. در این فرآیند یک لایه لیپیدی در کف فلاسک تشکیل و با بافر فسفات سالین، حاوی آگماتین هیدراته شده به دست آمد(۱۹). در نهایت، نانولیپوزوم‌ها برای ایجاد وزیکول‌های تک لایه کوچک، سونیک شدند و با دور ۲۹۰۰۰ گرم به مدت

۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند، تا داروهای بدون لیپوزوم حذف شوند(شکل ۱). برای سنجش مقدار داروی بارگذاری شده از آزمایش پیکریل سولفونیک استفاده شد.

برای بررسی زنده مانی، حدود ده هزار سلول به چاهک‌ها حاوی محیط کشت به صورت تصادفی ساده اضافه و به گروه‌های کنترل، نانولیپوزوم، آگماتین با دوزهای (۲۵ و ۵۰) و گروه‌های نانولیپوزوم همراه با آگماتین با دوزهای (۲۵ و ۵۰) میکرومولار تقسیم و پس از تیمار انکوبه شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت، مقدار ۱۰ میکرولیتر محلول (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) MTT به هر چاهک اضافه و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به چاهک‌ها اضافه و به مدت نیم ساعت در تاریکی قرار گرفتند. جذب نوری محلول بنفش رنگ چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الیزا ریدر خوانش شدند. اثر هر غلظت دارو به صورت سه تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت.

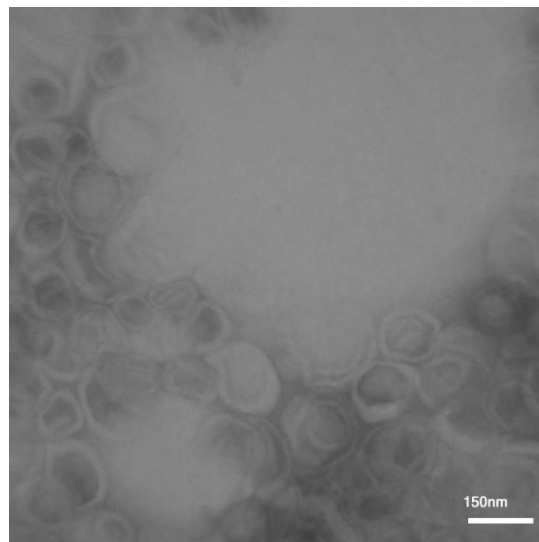
در ادامه برای شمارش تعداد سلول‌ها و نوروسفرها تعداد بیست هزار سلول در چاهک‌ها ۲۴ خانه‌ای و به دنبال تیمار با غلظت‌های مختلف آگماتین به مدت ۶ روز در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. سپس تعداد نوروسفرهای هر چاهک شمارش گردید و به دنبال آن نوروسفرهای هر چاهک جمع‌آوری و برای مجزا کردن توده سلول‌های نوروسفر از تریپسین استفاده شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون

سلولی با ۹۰ میکرولیتر محلول رنگی تریپان بلو مخلوط شده و سلول ها در زیر میکروسکوپ اینورت شمارش شدند (۲۰).

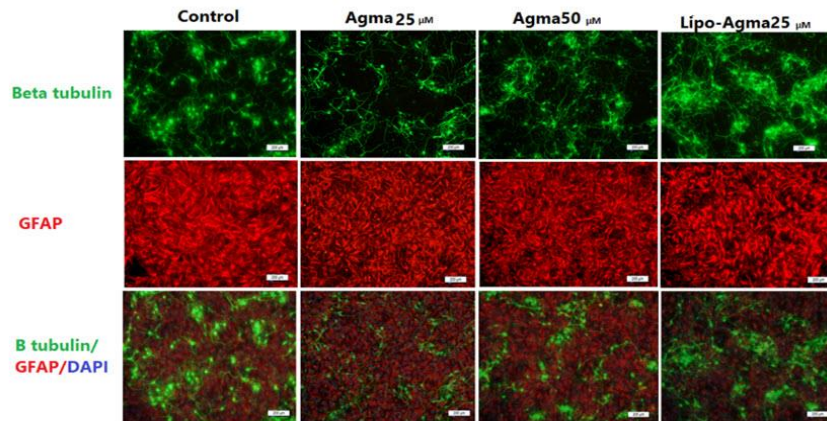
برای شناسایی سلول های عصبی تمایز یافته به نورو و گلیال از روش ایمونوسیتوشیمی استفاده شد. تعداد یک میلیون سلول بنیادی عصبی در چاهک های ۱۲ خانه ای طبق گروه بندی های گفته شده در محیط تمایزی چسپنده بدون فاکتور رشد به مدت ۶ روز در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. سپس محیط رویی سلول ها برداشته شد و به هر چاهک سلولی ۱ میلی لیتر پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت ۲۰ دقیقه برای فیکس سلول اضافه شد. سپس به روش استاندارد ایمونوسیتوشیمی و استفاده از انتی بادی

علیه بتا-توبولین (۱/۱۰۰۰ رقیق شده) برای یک شب به چاهک ها اضافه و در درجه حرارت ۴ درجه و متعاقب آن آنتی بادی ثانویه اضافه و به مدت یک ساعت رنگ آمیزی شدند (شکل ۲). بعد از شستشو با میکروسکوب فلوروسنت از سلول های رنگ گرفته عکس تهیه شد و تصاویر به دست آمده از سلول های نرونی و آستروسیتی مثبت با استفاده از Image J شمارش شدند (۲۱).

داده های جمع آوری شده با استفاده از نرم افزار Graph Pad Prism و آزمون های آماری واریانس یک طرفه و تست تعقیب توکی تجزیه و تحلیل شدند.



شکل ۱: تصویر میکروسکوپ الکترونی نانو لیپوزوم را نشان می دهد (بزرگنمایی ۱۵۰ نانومتر)



شکل ۲: تصاویر ایمنو سیتوشیمی تمایز سلول‌های نورونی و آستروسیت در گروه‌های آگماتین ۲۵ و ۵۰ و گروه لیپوزوم - آگماتین ۲۵ را نشان می‌دهد (بزرگنمایی ۲۰۰ میکرو متر)

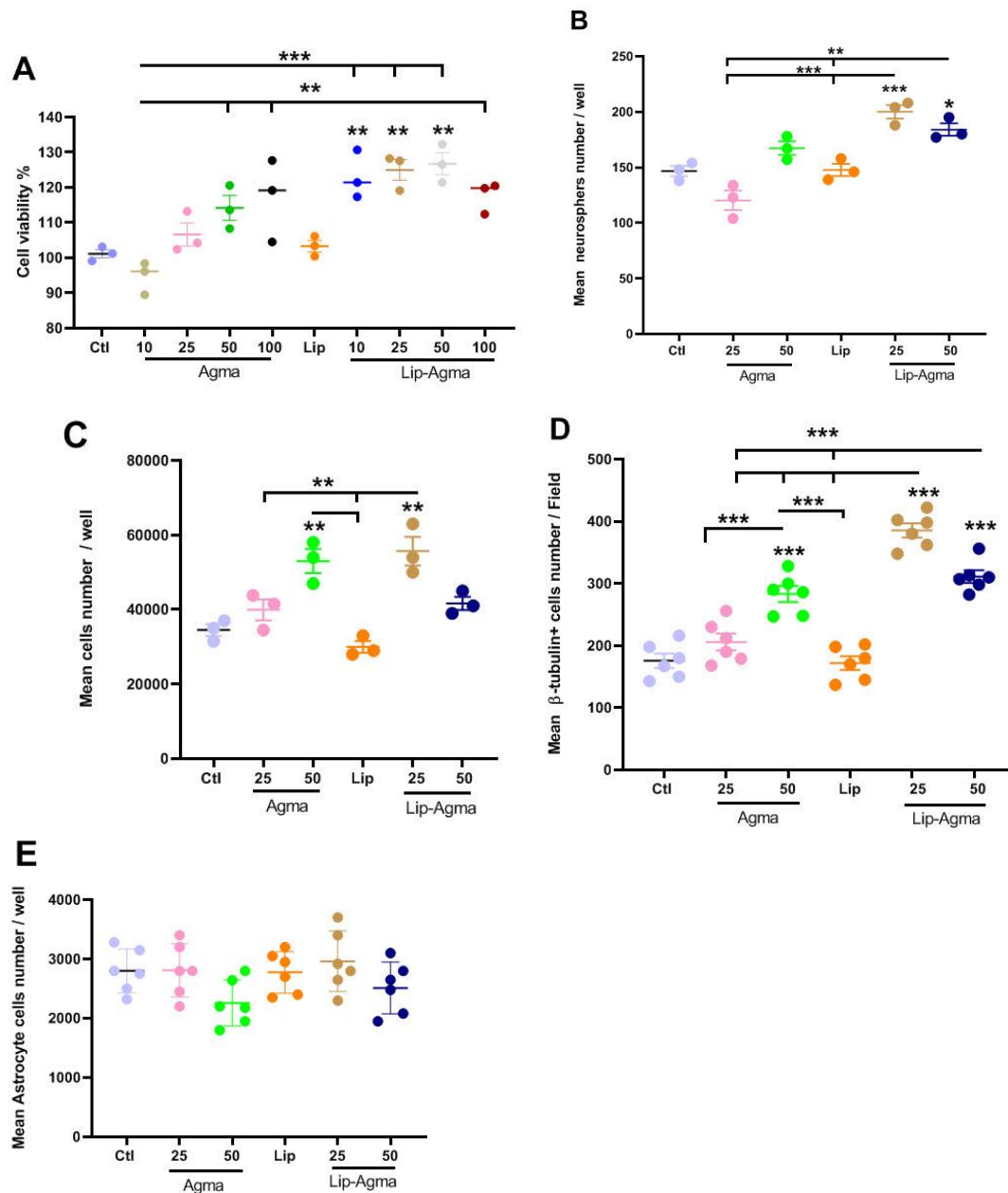
یافته‌ها

زنده مانی سلول‌های بنیادی عصبی در گروه‌های آگماتین به صورت وابسته به دوز افزایش یافت به طوری که در گروه ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار نسبت به گروه آگماتین ۱۰ میکرومولار افزایش معنی‌داری داشت ($p < 0.01$). همچنین زنده مانی در گروه‌های نانولیپوزوم - آگماتین ۱۰ و ۲۵ و ۵۰ میکرومولار در مقایسه با گروه‌های لیپوزوم و گروه کنترل افزایش معنی‌داری ($p < 0.01$) نشان دادند. در راستای این داده‌ها نقش معنی‌داری لیپوزوم توأم با آگماتین (۱۰، ۲۵، ۵۰) در قیاس با گروه آگماتین ۱۰ میکرومولار، به خوبی دیده می‌شود ($p < 0.001$) (شکل ۳A). میانگین تعداد نوروسفرها در گروه‌های نانولیپوزوم - آگماتین با غلظت ۲۵ و ۵۰ میکرومولار در مقایسه با گروه‌های لیپوزوم و کنترل افزایش معنی‌داری ($p < 0.01$) و ($p < 0.05$) نشان دادند (شکل ۳B). همچنین قیاس بین گروهی نشان داد نانولیپوزوم - آگماتین با غلظت ۲۵ و ۵۰ میکرومولار در مقایسه با گروه ۲۵ میکرومولار آگماتین افزایش معنی‌داری در تعداد نورسفر

داشت ($p < 0.01$ و $p < 0.05$). میانگین تعداد سلول‌های بنیادی عصبی منتج از نورسفر در گروه‌های نانولیپوزوم - آگماتین ۲۵ و آگماتین ۵۰ میکرومولار در مقایسه با گروه‌های لیپوزوم و کنترل افزایش معنی‌داری ($p < 0.01$) نشان دادند. همچنین مقایسه بین گروهی نشان می‌دهد که تعداد سلول‌های بنیادی عصبی در گروه نانولیپوزوم - آگماتین ۲۵ و آگماتین ۵۰ میکرومولار در مقایسه با گروه آگماتین ۲۵ میکرومولار از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.01$) (شکل ۳C). میانگین تعداد سلول‌های نورونی در گروه‌های نانولیپوزوم - آگماتین ۲۵ و ۵۰ و آگماتین ۵۰ در مقایسه با گروه‌های لیپوزوم و کنترل افزایش معنی‌داری ($p < 0.001$) نشان دادند. همچنین مقایسه بین گروهی نشان می‌دهد که افزایش تعداد سلول نورونی در گروه نانولیپوزوم - آگماتین ۲۵ و ۵۰ و آگماتین ۵۰ میکرومولار در مقایسه با گروه آگماتین ۲۵ میکرومولار از نظر آماری معنی‌دار بوده ($p < 0.01$) (شکل ۳D).

تمامی گروه های نانولیپوزومی و آگماتین تنها تفاوت معنی داری نشان ندادند (شکل ۳).

تمایز و تکثیر سلول های نوروسفر به گلیال ها از جمله آستروسیت در شکل ۲E به خوبی مشاهده می شود و میانگین تعداد سلول های آستروسیت در



شکل ۳: نمودارهای داده های مطالعه، A: زنده مانی گروه های مورد مطالعه، آنالیز داده ها و مقایسه بین گروهی نشان از افزایش آماری معنی دار زنده مانی در گروه نانولیپوزوم - آگماتین ۱۰ و ۲۵ و ۵۰ و کاهش زنده مانی در گروه های تیمار آگماتین ۱۰ می باشد. B: افزایش تعداد سلول های نوروسفر در گروه تیمار با نانولیپوزوم - آگماتین ۲۵ و کاهش تعداد سلول ها در گروه آگماتین ۲۵ و قیاس بین گروهی را نشان می دهد. C: افزایش میانگین تعداد سلول های نورونی در گروه نانولیپوزوم - آگماتین ۲۵ و ۵۰ و همچنین کاهش آماری معنی دار تعداد سلول ها در گروه های کنترل و نانولیپوزوم و قیاس بین گروهی را نشان می دهد. D: افزایش تعداد سلول های عصبی در گروه نانولیپوزوم - آگماتین ۲۵ و کاهش تعداد سلول ها در گروه نانولیپوزوم و قیاس بین گروهی را نشان می دهد. E: میانگین تعداد سلول های آستروسیت در گروه های مورد مطالعه می باشد که از نظر آماری معنی دار نمی باشند ($p < 0.001$ و $p < 0.01$ و $p < 0.05$).

بحث

حفظ سلامت مغز به نورونز مداوم یا محافظت از نورون‌های موجود بستگی دارد. آگماتین، با خواص محافظت‌کننده عصبی و نورونیک خود که ناشی از نقش آن به عنوان پیش‌ساز پلی‌آمین، توانایی عبور از سد خونی - مغزی و فواید گزارش شده است، پتانسیل دارورسانی هدفمند در بیماری‌های مرتبط با سن و مغز را نشان می‌دهد (۲۲ و ۲۳). لذا هدف از این تحقیق کارایی برون تنی نانولیپوزوم‌های آگماتین بر تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی عصبی مغز موش نر بالغ بود.

غلظت‌های مختلف آگماتین برای درمان سلول‌های بنیادی عصبی جنینی، با استفاده از روش‌های ارزیابی چندگانه مانند MTT، شمارش تعداد نوروسفر و شمارش تعداد سلول‌های عصبی و گلیال‌ها به دنبال تمایز برای افزایش قابلیت اطمینان داده‌ها و اعتبارسنجی متقابل آن استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد زنده ماندن و تکثیر سلول‌ها بنیادی عصبی در گروه‌های نانولیپوزوم - آگماتین در مقایسه با همه گروه‌های دیگر افزایش معنی‌داری داشته که به طور قابل توجهی بقای سلولی و تکثیر را بهبود داده است، همچنین تعداد نوروسفرها و سلول‌های بنیادی و پیش‌ساز منتج از نوروسفر را در مقایسه با گروه کنترل و آگماتین آزاد افزایش یافت که این نتایج با پژوهش کائو و همکاران هم‌سو می‌باشد، آنها نشان دادند که با استفاده از آگماتین، نورون‌زایی،

رگ‌زایی و سلول‌های گلیال افزایش یافته و مدل ترومای ایجاد شده در مغز موش صحرایی بهبود یافت (۱۱).

در طرح پژوهشی حاضر، اهمیت غلظت را در تعاملات سلولی در شرایط کشت و پیامدهای بالقوه آن برای پژوهش‌های درون تنی نشان می‌دهد. شمارش سلول نوروسفر در گروه‌های تیمار با نانولیپوزوم - آگماتین در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ در مقایسه با گروه کنترل و غلظت ۲۵ تیمار با آگماتین تنها، بیشتر از این یافته حمایت کرد که آگماتین توأم با نانو لیپوزوم تکثیر سلولی را در محیط کشت افزایش می‌دهد. مطالعه والورد و همکاران نشان داد که آگماتین ابتدا و زیکول‌های حاوی فاکتورهای نوروتروپیک را در سیناپس‌های عصبی آزاد نموده و این فاکتور مسیر Akt/mTOR را فعال می‌کند و افزایش قابل توجهی در سطوح Akt فسفریله در سلول‌هایی که با غلظت‌های بهینه آگماتین تیمار شده‌اند، مشاهده گردید، بنابراین با فعال کردن مسیر Akt/mTOR برای تنظیم رشد سلولی و متابولیسم سلول عصبی و گلیالی اثر خود را به احتمال زیاد اعمال نموده و موجب تکثیر سلولی و بهبود زندمانی شده است (۲۵ و ۲۴، ۲۲). سنجش مسیر تمایزی سلول بنیادی عصبی به دنبال تیمار با نانو لیپوزوم آگماتین بدون دخالت عوامل دیگر از اهداف این مطالعه بود که سلول‌های بنیادی عصبی برای تمایز به نورون‌ها و آستروسیت‌ها القا شدند، که این ارزیابی‌های مورفولوژیکی نشان دهنده

انتقال‌دهنده عصبی، به ویژه با تأثیرگذاری بر مسیرهای گلوتامات و سروتونین، می‌تواند به کاهش التهاب عصبی و استرس اکسیداتیو، که عوامل شایع بیماری‌های عصبی است، کمک کند. این یافته‌ها این فرضیه را تقویت می‌کنند که آگماتین ممکن است به عنوان یک درمان کمکی در درمان چنین اختلالاتی عمل کند و به طور بالقوه با داروهای موجود برای افزایش نتایج درمانی هم‌افزایی کند (۳۱ و ۳۰، ۱۸).

در نتیجه، این تحقیق بر نقش دوگانه آگماتین در افزایش بقا و تمایز سلول‌های بنیادی عصبی مشتق‌شده از ناحیه زیر بطنی مغز تأکید می‌کند. اثرات وابسته به غلظت مشاهده شده ضرورت رژیم‌های دوز دقیق را هنگام در نظر گرفتن کاربردهای بالینی برجسته می‌کند. بر اساس این یافته‌ها، پژوهش‌های بیشتری برای کشف مکانیسم‌های زیربنایی اثرات آگماتین بر سلول‌های بنیادی عصبی لازم است. سنجش‌های بعدی بایستی بر مسیرهای سیگنالینگ کلیدی که در تکثیر و بقای سلول نقش دارند، متمرکز گردند. همچنین بررسی‌های آینده برای روشن کردن پیامدهای گسترده تر آگماتین به عنوان یک عامل تکثیر کننده سلول‌های عصبی و پتانسیل آن برای تقویت استراتژی‌های پزشکی احیا کننده برای ترمیم بافت‌های عصبی آسیب دیده ضروری است.

در غلظت‌های کمتر از ۲۵ میکرومولار و بیشتر از ۵۰ میکرومولار، سلول‌ها دچار آپوپتوز شده و بنابراین مراحل کشت مجدد تکرار گشت. همچنین آلودگی در محیط انکوباتور باعث تکرار شد، لذا

افزایش پتانسیل نوروژنیک درمان پس از آگماتین بود. رنگ‌آمیزی ایمنی برای نشانگرهای عصبی، مانند بتا توبولین III و پروتئین اسیدی فیبریلاری گلیال، افزایش قابلیت تمایز سلول‌های بنیادی عصبی را در غلظت‌های پایین‌تر آگماتین به سلول‌های گلیال را تأیید کرد که نشان می‌دهد آگماتین نه تنها تکثیر سلولی را تقویت می‌کند، بلکه بلوغ سلول‌های بنیادی را به دودمان‌های عصبی عملکردی نیز تسهیل می‌کند (۲۸ - ۲۶ و ۱۱). علاوه بر این، مطالعه حاضر پیامدهای طولانی مدت درمان آگماتین را بر روی کشت سلول‌های بنیادی عصبی با انجام پاساژهای مجدد، مورد بررسی قرار داد. نتایج نشان داد که سلول‌های پیش تیمار شده با آگماتین ظرفیت تکثیر خود را در مسیرهای متعدد در مقایسه با گروه‌های کنترل حفظ کردند. این یافته بر پتانسیل آگماتین برای بهبود زنده ماندن و عملکرد سلول‌های بنیادی عصبی و تشکیل نورون‌های جدید در مغز کمک می‌کند و راه را برای کاربردهای درمانی آینده در بیماری‌های عصبی و آسیب‌های مغزی از جمله آلزایمر هموار می‌کند (۲۹ و ۲۷).

بررسی‌ها نشان می‌دهد که افزایش نوروژنز آگماتین ممکن است به محاصره گیرنده NMDA آن نیز مرتبط باشد که تکثیر و تمایز سلول‌های پیش‌ساز در هیپوکامپ را افزایش می‌دهد که برای یادگیری و حافظه ضروری است (۲۴-۲۶). همچنین مسیرهایی مانند ERK1/2 را فعال می‌کند و در عین حال مسیرهایی مانند BMP 2/4 و SMAD 1/5/8 را مهار می‌کند (۲۲ و ۶). آگماتین با تعدیل سیستم‌های

پیشنهاد می‌شود محیط زیر هود لامینار و انکوباتور برای نگهداری کشت سلول مرتباً از نظر آلودگی بررسی و استریل گردد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافعی در خصوص این مقاله وجود ندارد.

نتیجه‌گیری

داده‌های حاصل از این مطالعه نشان داد نانو لیپوزوم حاوی آگماتین موجب افزایش زنده مانی و تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی موش در محیط کشت می‌شود و ارزیابی توانایی در سرنوشت تمایزی سلول‌های بنیادی حاکی از افزایش نوروژن‌زایی در گروه‌های لیپوزومی دارد، ولی تأثیری بر آستروسیت‌زایی ندارد. بنابراین هدفمند کردن آگماتین با نانولیپوزوم می‌تواند در افزایش توانایی آگماتین بر نوروژن‌زایی مؤثر باشد.

حمایت مالی

محققین از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه که از این طرح حمایت مالی نموده‌اند، کمال تشکر را دارند.

ملاحظات اخلاقی

این مقاله برگرفته از طرح تحقیقاتی از دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، با کد اخلاق IR.YUMS.REC.1398.026 می‌باشد.

مشارکت نویسندگان

امیر قنبری در طراحی موضوع، انجام آزمایشات ایمنوسیتوشیمی و نگارش مقاله، حسن بردانیا انجام نتایج آماری و نگارش مقاله، مهرزاد جعفری بر مک انجام کشت سلولی، زنده مانی سلول و آنالیز آماری مشارکت داشته‌اند.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مطالعه از مسئولین مرکز تحقیقات گیاهان دارویی برای استفاده از امکانات آن مرکز و معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی یاسوج که با ما همکاری داشتند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

REFERENCES:

1. Schwendener RA. Liposomes in biology and medicine. *Bio-Applications of Nanoparticles*: Springer; 2007;117-28.
2. Abroumand Gholami A, Gheybi F, Molavi AM, Tahmasebi F, Papi A, Babaloo H. Effect of polycaprolactone/carbon nanotube scaffold implantation along with liposomal ellagic acid in hippocampal synaptogenesis after spinal cord injury. *Nanomedicine Journal* 2023; 10(3): 197-209.
3. Malaplate C, Poerio A, Huguet M, Soligot C, Passeri E, Kahn CJ, et al. Neurotrophic effect of fish-lecithin based nanoliposomes on cortical neurons. *Marine Drugs* 2019; 17(7): 406.
4. Ghanbari A, Rad F, Shahraki MH, Hosseini E, Barmak MJ, Zibara K. Human mesenchymal stem cells-derived microvesicles increase oligodendrogenesis and neurogenesis of cultured adult neural stem cells. *Neuroscience Letters*. 2024:137951.
5. Taha M, Alzahrani A, Abdelbagi O, Bagadood RM, Qusty NF, Obaid R, et al. Neuroprotective effect of silymarin-loaded nanoliposomes against monosodium glutamate-induced cerebellar motor deficit and Purkinje cell damage in experimental rats via PI3K/AKT pathway activation. *Frontiers in Molecular Biosciences* 2025; 12: 1621240.
6. Barmak MJ, Nouri E, Shahraki MH, Ghalamfarsa G, Zibara K, Delaviz H, et al. Safflower seed oil, a rich source of linoleic acid, stimulates hypothalamic neurogenesis in vivo. *Anatomy & Cell Biology* 2023; 56(2): 219-27.
7. Negintaji K, Foroozanfar M, Jafarinia M, Ghanbari A. The Ability of pregnenolone in proliferation of mouse neural stem cells and reduction of inflammatory and oxidant markers after induction of inflammation with lipopolysaccharide in vitro. *Armaghane Danesh* 2023; 28(5): 621-37.
8. Arsalan Z, Asfaram A, Ghitasi I, Bizhani F, Negintaji K, Jafari Barmak M et al . Empowerment of Balb/C Mouse Neuron and Glial Cells in Steroidogenesis After Activation of the SHH Signaling Pathway and Co-Treatment with Pregnenolone. *Armaghanj* 2022; 27 (3) :321-35.
9. Zhang M, Huang S-s, He W-y, Cao W-j, Sun M-y, Zhu N-w. Nasal Administration of bFGF-Loaded nanoliposomes attenuates neuronal injury and cognitive deficits in mice with vascular dementia induced by repeated cerebral ischemia-reperfusion. *International Journal of Nanomedicine* 2024; 19: 1431-50.
10. Li YF, Chen HX, Liu Y, Zhang YZ, Liu YQ, Li J. Agmatine increases proliferation of cultured hippocampal progenitor cells and hippocampal neurogenesis in chronically stressed mice. *Acta Pharmacologica Sinica* 2006; 27(11): 1395-400.
11. Kuo JR, Lo CJ, Chang CP, Lin KC, Lin MT, Chio CC. Agmatine-promoted angiogenesis, neurogenesis, and inhibition of gliosis-reduced traumatic brain injury in rats. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* 2011; 71(4): E87-E93.
12. Freitas AE, Egea J, Buendía I, Navarro E, Rada P, Cuadrado A, et al. Agmatine induces Nrf2 and protects against corticosterone effects in hippocampal neuronal cell line. *Molecular Neurobiology* 2015; 51: 1504-19.
13. Pourfridoni M, Hedayati-Moghadam M, Fathi S, Fathi S, Mirrashidi FS, Askarpour H, et al. Beneficial effects of metformin treatment on memory impairment. *Molecular Biology Reports* 2024; 51(1): 640.
14. Zamanian MY, Nazifi M, Khachatryan LG, Taheri N, Ivraghi MS, Menon SV, et al. The neuroprotective effects of agmatine on Parkinson's disease: focus on oxidative stress, inflammation and molecular mechanisms. *Inflammation* 2024: 1-15.
15. Wen P, Ren C. Research progress on intranasal treatment for Parkinson's disease. *Neuroprotection* 2024; 2(2): 79-99.
16. Freitas AE, Bettio LE, Neis VB, Moretti M, Ribeiro CM, Lopes MW, et al. Sub-chronic agmatine treatment modulates hippocampal neuroplasticity and cell survival signaling pathways in mice. *Journal of Psychiatric Research* 2014; 58: 137-46.
17. KH H, Swamy AHV. Agmatine as a promising neuroprotective strategy for treating neurological disorders. *International Journal of Pharmaceutical Investigation* 2024; 14(3): 670-80.
18. Olescowicz G, Neis VB, Fraga DB, Rosa PB, Azevedo DP, Melleu FF, et al. Antidepressant and pro-neurogenic effects of agmatine in a mouse model of stress induced by chronic exposure to corticosterone. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2018; 81: 395-407.

19. Mahmoudi R, Ashraf Mirahmadi-Babaheidri S, Delaviz H, Fouani MH, Alipour M, Jafari Barmak M, et al. RGD peptide-mediated liposomal curcumin targeted delivery to breast cancer cells. *Journal of Biomaterials Applications* 2021; 35(7): 743-53.
20. Marshall GP, Reynolds BA, Laywell ED. Using the neurosphere assay to quantify neural stem cells in vivo. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2007; 8(3): 141-5.
21. Flanagan LA, Ziaieian B, Palmer T, Schwartz PH. Immunocytochemical analysis of stem cells. *Human Stem Cell Manual: Elsevier*; 2007; 108-26.
22. Valverde AP, Camargo A, Rodrigues ALS. Agmatine as a novel candidate for rapid-onset antidepressant response. *World Journal of Psychiatry* 2021; 11(11): 981.
23. Freitas AE, Egea J, Buendia I, Gómez-Rangel V, Parada E, Navarro E, et al. Agmatine, by improving neuroplasticity markers and inducing Nrf2, prevents corticosterone-induced depressive-like behavior in mice. *Molecular Neurobiology* 2016; 53(5): 3030-45.
24. Wei X, Luo L, Chen J. Roles of mTOR signaling in tissue regeneration. *Cells* 2019; 8(9): 1075.
25. Land SC, Scott CL, Walker D. mTOR signalling, embryogenesis and the control of lung development. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2014; 36: 68-78.
26. Barua S, Kim JY, Lee JE. Role of agmatine on neuroglia in central nervous system injury. *Brain & Neurorehabilitation* 2019; 12(1): e2.
27. Song HW, Kumar BK, Kim SH, Jeon YH, Lee YA, Lee WT, et al. Agmatine enhances neurogenesis by increasing ERK1/2 expression, and suppresses astrogenesis by decreasing BMP 2, 4 and SMAD 1, 5, 8 expression in subventricular zone neural stem cells. *Life Sciences* 2011; 89(13-14): 439-49.
28. Song J, Oh Y, Kim JY, Cho KJ, Lee JE. Suppression of microRNA let-7a expression by agmatine regulates neural stem cell differentiation. *Yonsei Medical Journal* 2016; 57(6): 1461-7.
29. Kosonen R, Barua S, Kim JY, Lee JE. Role of agmatine in the application of neural progenitor cell in central nervous system diseases: therapeutic potentials and effects. *Anatomy & Cell Biology* 2021; 54(2): 143-51.
30. Malberg JE. Implications of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant action. *Journal of Psychiatry and Neuroscience* 2004; 29(3): 196.
31. Duman RS, Nakagawa S, Malberg J. Regulation of adult neurogenesis by antidepressant treatment. *Neuropsychopharmacology* 2001; 25(6): 836-44.

Efficacy of Agmatine Nanoliposomes on Proliferation and Differentiation of Adult Mouse Neural Stem Cells

Jafari Barmak M¹, Bardania H², Ghanbari A^{1*}

¹Medicinal Plants Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran, ²Molecular Cell Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

Received Date: 08 Sep 2024 Accepted Date: 16 Dec 2024

Abstract

Background & aim: Neurogenesis throughout the life of each individual must be continuous and dynamic so that the efficiency of different parts of the brain does not become weak and ineffective. On the other hand, protecting old neurons can also be a solution, as a result, synthetic materials that can simultaneously have both protective and neurogenic functions can be an apt option for targeted drug delivery in brain diseases and aging. In particular, agmatine, due to its role as a polyamine precursor and its ability to cross the blood-brain barrier while inhibiting nitric oxide synthase and having a beneficial protective and neurogenic role, has been reported to be a good option for targeted drug delivery in protection and neurogenesis. Therefore, the aim of the present study was to investigate the in vitro efficacy of agmatine nanoliposomes on the proliferation and differentiation of neural stem cells in the brain of adult male mice.

Methods: In the present experimental-in vitro study conducted in 2023, neural stem cells were first isolated from the subventricular zone of the adult mouse brain and proliferated and neurospheres were formed in the presence of epidermal growth factor and fibroblast growth factor. Cell viability was measured in six groups including the control group, a nanoliposome group, an agmatine group with concentrations of (25 and 50) μM , and nanoliposome groups treated with agmatine with concentrations of (25 and 50) μM by the MTT method. Also, the number of neurospheres, the number of cells resulting from each neurosphere, and the number of neuronal and glial cells following differentiation were counted. The collected data were analyzed using a one-way variance test.

Results: The cell survival of neural stem cells in the agmatine groups increased in a dose-dependent manner, with a significant increase in the 50 and 100 μM groups compared to the 10 μM agmatine group (** $p < 0.01$). The mean number of neurospheres in the nanoliposome-agmatine 50 μM groups showed a significant increase compared to the liposome and control groups (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). The mean number of neuronal cells in the nanoliposome-agmatine 25 and 50 groups showed a significant increase compared to the liposome and control groups (*** $p < 0.0001$).

Conclusion: The present study indicated that agmatine and nano-liposomes containing agmatine increased the proliferation and differentiation of stem cells. This increase in the targeted method with liposomes was more effective at lower concentrations of agmatine, indicating the targeting and value of the liposomal system.

Keywords: Agmatine, Neural stem cells, Neurogenesis, Nanoliposome

***Corresponding author:** Ghanbari A, Medicinal Plants Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

Email: amirghanbari52@yahoo.com

Please cite this article as follows: Jafari Barmak M, Bardania H, Ghanbari A. Efficacy of Agmatine Nanoliposomes on Proliferation and Differentiation of Adult Mouse Neural Stem Cells. *Armaghane-danesh* 2025; 30(3): 311-323. The scientific research journal *Armaghan Danesh*, affiliated with Yasuj University of Medical Sciences, is an open-access publication. All articles published in this journal