

بررسی اثر نوروپروتکتیو آدنوزین بر بقای سلول‌های بنیادی عصبی در شرایط آسیب اکسیداتیو با پراکسید هیدروژن

معصومه قلی‌نژاد^۱، دکتر علیرضا عبدانی‌پور^۲، دکتر امیرحسین تارمچی^۳، دکتر ایرج جعفری انارکولی^۴، علی نیک‌فر^۵

نویسنده‌ی مسئول: گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان abdanipour@zums.ac.ir

دریافت: ۹۵/۶/۴ پذیرش: ۹۵/۸/۲۴

چکیده

زمینه و هدف: تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد در طی استرس‌های اکسیداتیو می‌تواند به بیومولکول‌های مهم بدن آسیب‌های جدی وارد نموده و مسیرهای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی را در بدن فعال نماید. مرگ سلول‌های عصبی باعث بروز بسیاری از بیماری‌های مخرب سیستم عصبی می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر آدنوزین بر مهار آپوپتوز در آسیب اکسیداتیو ناشی از هیدروژن پراکسید در سلول‌های بنیادی عصبی مشتق از سلول‌های استرومایی مغز استخوان بود.

روش بررسی: سلول‌های بنیادی عصبی مشتق از سلول‌های استرومایی مغز استخوان با دوزهای مختلف آدنوزین برای مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند سپس به مدت ۳۰ دقیقه در معرض ۱۲۵ میکرومولار هیدروژن پراکسید قرار گرفتند. با روش *MTT* و رنگ آمیزی تانل تاثیر آدنوزین در بقای سلول‌ها و میزان آپوپتوز نسبت به گروه کنترل بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که در شرایط آسیب اکسیداتیو، میزان آپوپتوز در سلول‌های بنیادی عصبی مشتق از مغز استخوان تیمار شده با ۶ میکرومولار آدنوزین در مقایسه با گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: یافته‌های ما نشان داد که آدنوزین از مرگ سلول‌های بنیادی عصبی در برابر آسیب‌های اکسیداتیو محافظت می‌کند. احتمالاً این دارو می‌تواند برای بقای سلول‌های عصبی و درمان بیماری‌های سیستم عصبی کاندید مناسبی باشد.

واژگان کلیدی: سلول‌های بنیادی عصبی، آدنوزین، آپوپتوز

مقدمه

در حالت ردوکس سلول، ممکن است از طریق تولید پراکسید یا رادیکال‌های آزاد که باعث آسیب به ساختارهای زیر سلولی از جمله پروتئین، چربی و DNA می‌شود، اثرات توکسیک ایجاد کند. همه این عوامل به‌عنوان عوامل کلیدی

استرس اکسیداتیو با عدم توانایی سلول برای از بین بردن یا ترمیم آسیب ناشی از تولید گونه‌های اکسیژن فعال مانند سوپراکسید (O_2)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و یا رادیکال‌های هیدروکسیل (OH) ایجاد می‌شود. عدم تعادل

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی، گروه بیوتکنولوژی و نانوفناوری پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان

۲- دکترای تخصصی علوم تشریح، استادیار گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان

۳- دکترای بیوتکنولوژی پزشکی، استادیار گروه بیوتکنولوژی و نانوفناوری پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان

۴- دکترای تخصصی علوم تشریح، دانشیار گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان

۵- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک انسانی، گروه ژنتیک و پزشکی مولکولی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان

اثرات کوتاه مدت داشته و اکثراً روند بیماری را کند و یا متوقف نمی‌کنند. (۸). بنابراین حفاظت سلول‌های عصبی در برابر آسیب اکسیداتیو از طریق آنتی اکسیدانت‌ها به‌عنوان روش مطلوبی برای کاهش و محدودسازی پیشبرد آسیب‌های نورونی، به‌شمار می‌آید (۹). یکی از این آنتی اکسیدان‌های مطرح شده آدنوزین می‌باشد. آدنوزین یک نوکلئوزید پورین یوبی کوئینه است که از سلول‌های فعال از نظر متابولیسم آزاد می‌شود. آدنوزین یک نوکلئوزید متصل شونده به G-پروتئین‌هاست که عملکرد خود را با تعامل با ۴ نوع گیرنده A1, A2a, A2b و A3 اعمال می‌نماید (۱۰). سلول‌های بنیادی عصبی، گیرنده‌های آدنوزین A1 و A2b را بیان می‌کنند. در واقع آدنوزین نوکلئوزیدی طبیعی است که به مقدار زیاد در مناطق مختلفی از مغز بیماران مبتلا به پارکینسون، مولتیل اسکروزیس، ایسکمی، تروما و صرع آزاد می‌شود (۱۱). این مولکول عملکردهای مختلفی را در سیستم عصبی مرکزی دارد که شامل مهار فعالیت‌های انتقال عصبی و محافظت نورون‌های عصبی در شرایط پاتولوژیک است. تصور می‌شود اثرات نوروپروتکتیو آدنوزین، از طریق تعامل با گیرنده آدنوزین A1 انجام می‌شود. بنابراین آدنوزین و رسپتورهای آن به‌ویژه گیرنده A1 نقش عملکردی را در ترمیم آسیب‌های وارد شده به سیستم عصبی مرکزی را دارند (۱۲). تلاش‌های زیادی در جهت کشف و شناسایی عوامل محافظت‌کننده در برابر آسیب اکسیداتیو صورت گرفته که ممکن است در درمان بیماری‌های عصبی به کار گرفته شوند. هدف مطالعه‌ی حاضر، بررسی اثر نوروپروتکتیو آدنوزین بر روی تکثیر و بقای سلول‌های بنیادی عصبی مشتق شده از سلول‌های استرومایی مغز استخوان در شرایط آسیب اکسیداتیو می‌باشد.

روش بررسی

کشت سلول‌های استرومایی مغز استخوان (BMSC):

در تسریع روند پیری و توسعه اختلالات عصبی شناخته شده‌اند و علاوه بر این در روند آپوپتوز دخالت دارند. استرس اکسیداتیو به‌عنوان عامل اصلی در بیماری‌های تخریب‌کننده سیستم عصبی گزارش شده است (۱). در این حالت، اختلال در تعادل ردوکس سلولی و دفاع آنتی آپوپتوتیکی سلولی، منجر به تغییراتی در اکسیداسیون مولکول‌های زیستی و آسیب سلولی می‌گردد (۲). بیماری‌های عصبی، به‌عنوان گروه ناهمگنی از اختلالات، با از بین رفتن تدریجی و پیشرونده سلول‌های عصبی مشخص می‌شوند (۱). علت بیماری‌های عصبی هنوز به‌طور کامل مشخص نشده است، با این حال افزایش استرس اکسیداتیو به‌عنوان یکی از علل شایع بالقوه در بیماری‌های مختلف عصبی پیشنهاد شده است (۳). هر ساله بیماری‌های عصبی میلیون‌ها نفر را تحت تاثیر قرار می‌دهند که این آمار با افزایش سن، رو به رشد است. به‌همین دلیل در طول چند دهه‌ی گذشته مطالعات گسترده‌ای در زمینه‌ی بیماری‌های وابسته به سن که مرتبط با کاهش آنتی اکسیدان‌ها و همچنین افزایش آسیب اکسیداتیو به پروتئین‌ها، DNA و لیپیدها هستند، صورت گرفته است (۴). استرس اکسیداتیو در دیگر بیماری‌های مخرب سیستم عصبی مثل بیماری پارکینسون، هانتینگتون و آمیوتروف لاترال اسکروزیز و آلزایمر نیز دیده شده است. این بیماری‌های مخرب باعث کاهش تصاعدی عملکرد فیزیکی و تشخیصی سیستم عصبی در فرد بیمار می‌شوند (۵). آسیب سلولی در نهایت منجر به مرگ سلول می‌شود. در صورت تداوم آسیب به سلول، آسیب غیرقابل برگشت ایجاد می‌شود (۶). پروتئین‌ها و مسیرهای بسیاری در کنترل فرایند آپوپتوز نقش دارند، بنابراین با کنترل بیان ژن‌های ضد آپوپتوزی و پیش آپوپتوزی می‌توان روند آپوپتوز و در نهایت ایجاد و پیشروی بیماری‌های مخرب سیستم عصبی را کنترل نمود (۷).

برای درمان بیماری‌های مخرب سیستم عصبی از داروهای مختلفی استفاده می‌شود، اما این داروها به جز موارد معدودی،

ابتدا سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان حاصل از موش نژاد ویستار (۲۰۰ تا ۳۰۰ گرم)، در محیط کشت DMEM، همراه با ۱۵ درصد سرم گاوی (Gibco, FBS)، ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین کشت داده شدند. سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و CO₂ ۵ درصد در فلاسک پلاستیکی ۲۵ سانتی‌متر مربع به مدت ۲ روز انکوبه شدند و سلول‌های غیرچسبنده با تعویض محیط کشت حذف شدند. محیط کشت تا زمان رسیدن سلول‌ها به حالت اشباع، یک روز در میان عوض شد. پس از رسیدن به حالت اشباع، سلول‌ها توسط trypsin EDTA برداشت شده و تا چهار بار پاساژ داده شدند.

تشکیل و گسترش نوروسفر: سلول‌های BMSC موش با تریپسین-EDTA جدا شده و بر روی فلاسک‌های پلاستیکی ۲۵ سانتی‌متر مربع منتقل شدند (۱۰^۵ سلول در هر میلی‌لیتر) و در محیط کشت DMEM/F12 همراه با دو درصد B27 (Gibco)، ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد فیروبلاستی bFGF (Invitrogen)، ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد اپیدرمی EGF (Invitrogen)، ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین قرار گرفتند. محیط کشت و فاکتورهای رشد هر ۲ روز عوض شدند. پس از چند روز، ساختارهای شبه نوروسفری مشاهده شد. نوروسفرهای شناور به‌وسیله‌ی سانتریفیوژ در ۱۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه جمع‌آوری شدند. سپس محیط رویی تخلیه و توده‌های سلولی با استفاده از آنزیم تریپسین از هم جدا شده و به‌صورت سلول‌های منفرد در آمدند. در ادامه پس از خنثی‌سازی آنزیم تریپسین با FBS و سانتریفیوژ مجدد، سلول‌های حاصله به فلاسک سلولی پوشانده شده از پلی‌ال-لیزین (سیگما آلدریج) منتقل و با استفاده از محیط کشت حاوی فاکتورهای رشد و در شرایطی مشابه با مرحله تشکیل نوروسفر، به مدت یک هفته کشت داده شدند و تا سه بار پاساژ داده شدند (۱۳). برای تایید هویت این سلول‌ها،

ارزیابی ایمونوسیتوشیمی با مارکر Nestin انجام شد. ایمونوسیتوشیمی؛ نشانگر اختصاصی سلول‌های بنیادی عصبی، نستین می‌باشد، به همین دلیل برای اطمینان از ماهیت سلول‌های کشت شده، وجود نشانگر اختصاصی نستین در سلول‌های کشت داده شده با استفاده از روش ایمونوسیتوشیمی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، از سلول‌های پاساژ چهارم با تراکم ۷۰ درصد استفاده گردید، به‌طوری‌که پس از شستشو با PBS سلول‌ها توسط پارافرمالدهید ۴ درصد به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق تثبیت شدند. برای رنگ آمیزی عناصر سیتوپلاسمی، سلول‌ها برای مدت ۳۰ دقیقه در معرض تریتون ۰/۳ درصد نیز قرار گرفتند تا از هم پاشیدگی غشای سلولی منجر به افزایش نفوذ آنتی‌بادی‌ها به داخل سلول‌ها گردد. در مرحله‌ی بعد، با اضافه کردن سرم جنینی گوساله ۱۰ درصد از واکنش‌های غیراختصاصی جلوگیری شد. سپس سلول‌ها به مدت ۱۲ ساعت و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد در معرض آنتی‌بادی اولیه Mouse anti- nestin, monoclonal antibody قرار گرفتند. پس از گذشت این زمان، سلول‌ها ۳ مرتبه با PBS شستشو و در ادامه به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق و همچنین محیط تاریک در معرض آنتی‌بادی ثانویه ضد موشی کونزوگه با FITC با غلظت ۱/۱۰۰ قرار گرفتند. به منظور مشخص شدن هسته‌ی سلول‌ها در هنگام شمارش، از محلول اتیدیوم بروماید ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به مدت یک دقیقه استفاده گردید. در نهایت سلول‌ها توسط میکروسکوپ فلورسنت اینورت مورد بررسی قرار گرفتند. از هر چاهک، تعداد پنج ناحیه به‌طور تصادفی انتخاب و درصد سلول‌های مثبت ارزیابی گردید.

تیمار سلول‌ها با سوپر اکسید هیدروژن و آدنوزین: برای القای استرس اکسیداتیو، از محلول H₂O₂ تازه تهیه شده از محلول استوک ۳۰ درصد استفاده شد. از پاساژ سوم سلول‌هایی که تمایز آنها تایید شده بود، استفاده شد. سلول‌ها با شرایط کشتی که در بالا عنوان شد، در پلیت‌های شش خانه قرار گرفته و

ایمونوسیتوشیمی: سلول‌های بنیادی عصبی مشتق از سلول‌های استرومایی مغز استخوان، برای فیکس شدن به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق در پارافرمالدهید ۴ درصد و به دنبال آن به مدت ۳۰ دقیقه درون متانول ۱۰۰ درصد قرار گرفتند. برای ایمونوفلورسانس، سلول‌ها با آنتی‌بادی مونوکلونال ضد Nestin CD90 (برای سلول‌های BMSC) و آنتی بادی ضد Nestin (برای NSC های مشتق از BMSC) (هر دو از Abcam) انکوبه شده و به دنبال آن انکوباسیون این سلول‌ها با آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با فلئورسین ایزوتیوسیانات (Millipore) (FITC) صورت گرفت. هسته‌ی سلول‌ها با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد. در نهایت سلول‌ها توسط میکروسکوپ فلورسانس اینورت مورد بررسی قرار گرفتند. از هر چاهک، تعداد پنج ناحیه به‌طور تصادفی انتخاب و درصد سلول‌های مثبت ارزیابی گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: تمامی آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۵ انجام پذیرفت و کلیه داده‌ها به‌صورت انحراف معیار $\pm$ میانگین ارائه شد. مقایسه‌ی آماری بین گروه‌ها با استفاده از آزمون (ANOVA) (آزمون تعقیبی Tukeys post hoc test) و آزمون تی مستقل تجزیه و تحلیل و $P < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

استخراج و کشت سلول‌های استرومایی مغز استخوان: نتایج حاصل از کشت BMSC نشان داد که در ساعت‌های اولیه، سلول‌ها گرد و شناور و با هسته غیر قابل تشخیص بودند. این سلول‌ها، ۶ تا ۸ ساعت بعد، شروع به اتصال به سطح فلاسک کردند. سلول‌های چسبیده در ابتدا ظاهر نامنظمی را نشان دادند و پس از آن به سرعت رشد کرده و اشکال شبه فیروبلاستی را ایجاد کردند که توانایی تقسیم را دارند (شکل 1-A). در طی یک هفته بعد از شروع کشت، از سلول‌های چسبیده اشباع شده اولین پاساژ سلولی انجام شد.

پس از رسیدن به حالت اشباع با ۱۲۵ میکرومولار H_2O_2 به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند. یک سری از سلول‌ها نیز، به‌منظور بررسی اثرات حفاظتی آدنوزین، ۲۴ ساعت قبل از تیمار با H_2O_2 ، با غلظت‌های مختلف آدنوزین (۰، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میکرومولار) تیمار شدند.

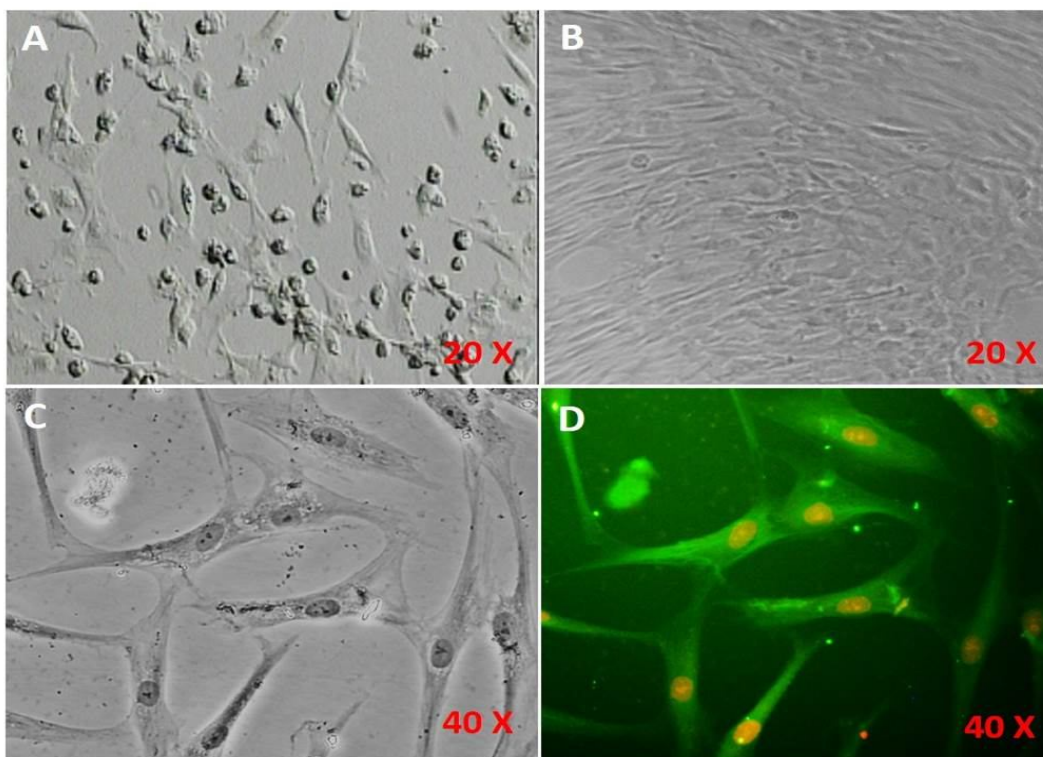
ارزیابی تکثیر سلولی (آزمون MTT): برای ارزیابی میزان تکثیر و بقا از روش 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT) استفاده شد که بر اساس تبدیل ماده MTT به کریستال‌های فورمازان است (۱۴). سلول‌های تیمار شده با H_2O_2 و غلظت‌های مختلف آدنوزین مرحله‌ی قبل، با دوز یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر MTT به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شدند. سپس، محلول رویی سلول‌ها به آهستگی برداشته شد و برای حل شدن کریستال‌های فورمازون ایجاد شده در اثر واکنش با MTT، ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر خانه اضافه گردید. پس از چند دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق و حل شدن کامل کریستال‌ها، جذب در ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا خوانده شد. برای بررسی دقیق‌تر، آزمون هر غلظت ۵ بار تکرار گردید. بقای سلول‌ها با فرمول زیر محاسبه گردید:

جذب سلول‌های تیمار شده در ۵۷۰ نانومتر / جذب سلول‌های تیمار نشده در ۵۷۰ نانومتر $\times (100)$

شناسایی سلول‌های آپوپتوتیک (آزمون TUNEL): پس از تیمار، سلول‌ها با پارافرمالدهید ۴ درصد و در بافر فسفات سالین (Gibco, PBS) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (RT) فیکس شدند. سپس آزمون TUNEL با استفاده از کیت In Situ Cell Death Detection Kit (Roche, Germany) و براساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. سلول‌های تانل مثبت با استفاده از دی آمینوبنزیدن (DAB) به‌عنوان کروموژن رنگی و همتوکسیلین رنگ آمیزی شدند و سپس درصد سلول‌های تانل مثبت، برای هر خانه در پلیت محاسبه شد.

مزانشیمی بودن سلول‌ها، از مارکر CD90 با روش ایمنوسیتوشیمی استفاده شد و $98/7 \pm 3/2$ سلول‌ها مثبت بودند (شکل 1-C,D).

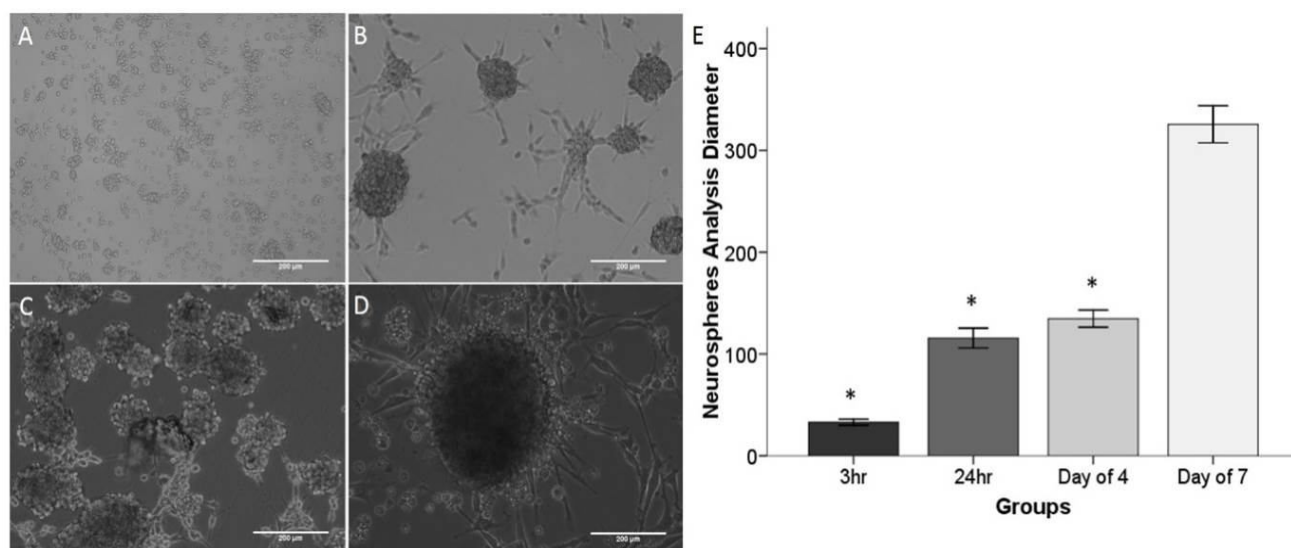
در ادامه‌ی کار هر ۳ الی ۴ روز سلول‌ها به پاساژ بعدی رسیدند. در پاساژ چهارم و پنجم سلول‌ها به جمعیت هموژن و یک دستی رسیدند (شکل B-1). برای تعیین هویت



شکل ۱: کشت سلول‌های استرومایی مغز استخوان؛ (A) ۲۴ ساعت بعد از شروع کشت سلول‌های چسبیده به ظرف با نمای کروی دیده می‌شوند. (B) سلول‌های یک‌دست بعد از پاساژ چهارم سلولی. (C) سلول‌های دوکی شکل نمای فاز کتراست. (D) نمای فلورسنت از تصویر C و نمایش سلول‌های مثبت با مارکر CD90 (نشانگر مزانشیمی). رنگ سبز نشان‌دهنده نشانگر CD90 و رنگ قرمز نشان‌دهنده ی هسته سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم پروماید می‌باشد. بزرگنمایی برای تصاویر (A و B) ۲۰۰ برابر و برای تصاویر (C و D) ۴۰۰ برابر.

شده و کلونی‌های بزرگتر را تشکیل می‌دهند. تکثیر سلول‌ها نیز عامل دیگری بر افزایش اندازه‌ی نوروسفرها بود. همچنین به نظر می‌رسد که برخی از سلول‌ها از اسفروئیدهای اولیه جدا شده، تکثیر کرده و اسفروئیدهای ثانویه را ایجاد کردند. این نتایج نشان دادند که قطر نوروسفرها در روز هفتم $(325/6 \pm 9/09)$ به‌طور معناداری نسبت به نوروسفرهای ۳ ساعت $(32/92 \pm 1/74)$ ، یک روز $(115/59 \pm 4/88)$ و ۴ روز $(134/69 \pm 21/4)$ افزایش داشت (شکل 2-C, D, E).

تمایز سلول‌های BMSC به نوروسفر و سلول‌های بنیادی عصبی: سلول‌های BMSC با قرار گرفتن در پلیت غیر چسبنده و محیط کشت القایی مناسب به‌صورت شناور در محیط در آمدند. این سلول‌ها در ساعات اولیه در کنار هم قرار گرفتند و کلونی‌های کوچک، نامنظم و شناور در محیط به نام نوروسفر ایجاد کردند (شکل A, B-2). اندازه‌گیری قطر نوروسفرها در زمان‌های ۳ ساعت، ۱، ۴ و ۷ روز پس از کشت، نشان داد که کلونی‌های کوچک به مرور با هم متحد



شکل ۲: نوروسفرهای شناور مشتق از سلول‌های بنیادی عصبی در زمان‌های (A) ۳ ساعت، (B) ۱ روز، (C) ۴ روز و (D) ۷ روز پس از کشت. (E) نمودار مقایسه قطر نوروسفرها در زمان‌های مختلف. * نشان دهنده اختلاف معنی‌دار با روز هفتم ($P < 0.05$)

مختلف آدنوزین در معرض هیدروژن پراکساید قرار گرفتند، بررسی‌های انجام شده با آزمون MTT حاکی از افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی تیمار شده با آدنوزین (برای مدت ۲۴ ساعت) در مقایسه با گروه کنترل بود (گروهی که آدنوزین و هیدروژن پراکساید دریافت نکرده بودند). همچنین نتایج نشان داد که آدنوزین منجر به حفاظت سلول‌ها در برابر سمیت هیدروژن پراکساید شده است. سلول‌های تیمار شده با غلظت ۶ میکرومولار از آدنوزین ($90/0.2 \pm 0.24$) بالاترین درصد سلول‌های زنده را داشتند که نسبت به سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های ۲ میکرومولار ($67/44 \pm 0.5$)، ۴ میکرومولار ($78/73 \pm 0.17$) و ۸ میکرومولار ($82/36 \pm 0.19$) اختلاف معنی‌داری داشت ($P < 0.05$) (شکل ۴).

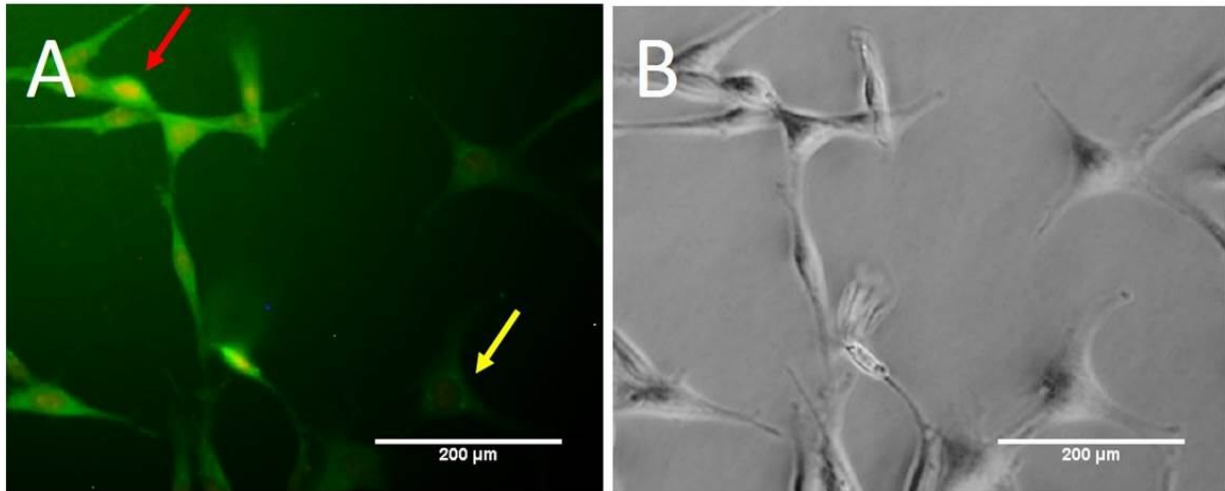
نتایج آزمون تانل: نتایج حاصل از آزمون تانل جهت ارزیابی اثر آنتی‌آپوپتوزی آدنوزین در سلول‌های بنیادی عصبی مشتق شده از سلول‌های استرومایی مغز استخوان تیمار شده با هیدروژن پراکساید نشان داد که هیدروژن پراکساید منجر به القای آپوپتوز در سلول‌ها می‌شود (شکل A-D 5). مقایسه

اندازه‌گیری قطر نوروسفرها بر مبنای میکرومتر و با نرم‌افزار Image J انجام شد. پس از شکست نوروسفرها و کشت آنها در فلاسک، سلول‌های بنیادی عصبی به کف فلاسک چسبیده و زوائد و استتاله‌هایی در آنها ایجاد گردید که گاهی چند برابر جسم سلولی و در ارتباط با سلول‌های اطراف بودند. سلول‌ها دارای قدرت تقسیم بودند و از نظر مورفولوژی، ویژگی‌های سلول شبه عصبی را به دست آوردند. بعد از چند ساعت از آغاز کشت، سلول‌های شبه عصبی، با زائده‌های چند قطبی و ویژگی‌های مخروطی مانند ظاهر شدند که تعیین هویت آنها با استفاده از نشانگر Nestin انجام شد. حدود $86/21 \pm 1/0.3$ درصد از سلول‌های بنیادی عصبی مشتق شده از سلول‌های استرومایی مغز استخوان نسبت به مارکر نستین (نشانگر سلول‌های پیش ساز عصبی) مثبت بودند (شکل A, B 3-).

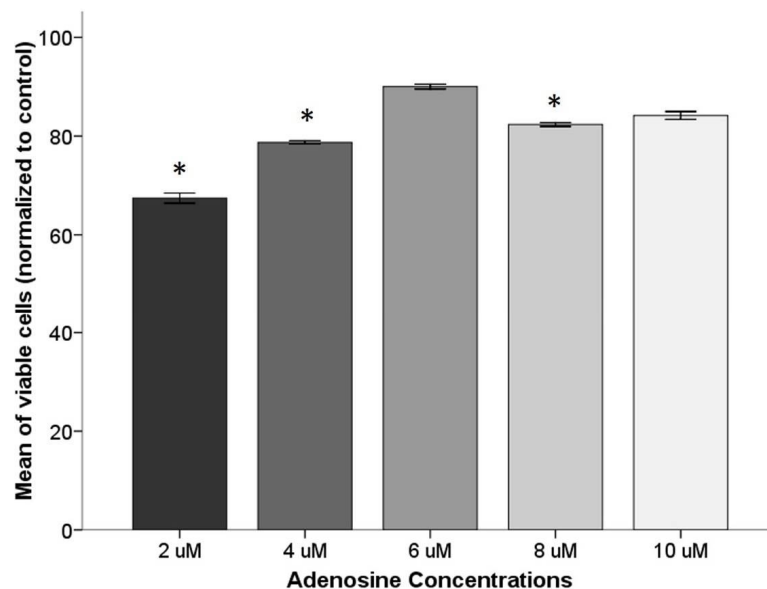
تعیین غلظت بهینه آدنوزین به روش MTT: به منظور بررسی اثر حفاظتی آدنوزین، سلول‌های بنیادی عصبی مشتق شده از سلول‌های استرومایی مغز استخوان پس از تیمار با غلظت‌های

هیدروژن پراکساید برای مدت ۳۰ دقیقه ($53/19 \pm 1/12$) حاکی از وجود اختلاف معناداری بود که این امر نشان‌دهنده اثر حفاظتی آدنوزین بر روی سلول‌های بنیادی عصبی در برابر آپوپتوز می‌باشد (شکل ۵ E).

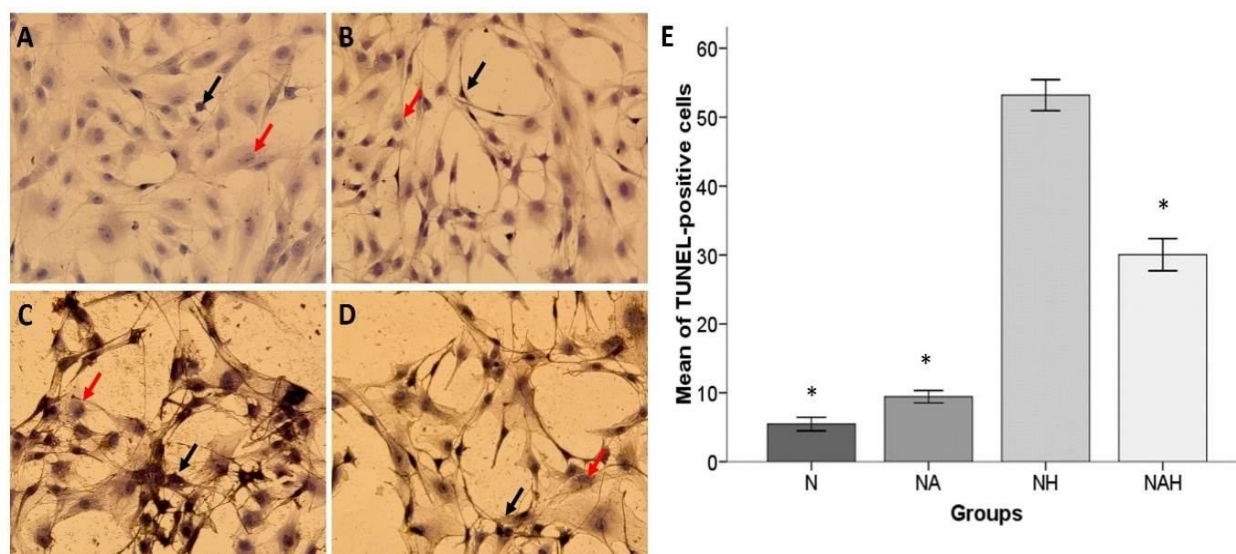
درصد سلول‌های آپوپتوتیک ناشی از هیدروژن پراکساید در گروه NAH (تیمار شده با آدنوزین برای مدت ۲۴ ساعت و ۱۲۵ میکرومولار هیدروژن پراکساید برای مدت ۳۰ دقیقه) ($30/04 \pm 0/48$) و گروه NH (تیمار شده با ۱۲۵ میکرومولار



شکل ۳. A و B) ایمونوسیتوشیمی برای نشانگر نستین (*Nestin*). تصویر A فلورسنت و تصویر B فاز کنتراست در همان ناحیه تهیه شده است. رنگ سبز نشان‌دهنده‌ی نشانگر نستین (*Nestin*) و رنگ قرمز نشان‌دهنده‌ی هسته سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید می‌باشد.



شکل ۴. نمودار مقایسه سلول‌های بنیادی عصبی تیمار شده با غلظت‌های مختلف آدنوزین به روش *MTT*. * نشان دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار با غلظت ۶ میکرومولار ($P < 0/05$)



شکل ۵: (A) میکروگراف‌های آزمون تانل مربوط به گروه N، (B) گروه NA، (C) گروه NH و (D) گروه NAH. پیکان‌های سیاه نشان‌دهنده سلول‌های تانل مثبت و پیکان‌های قرمز نشان‌دهنده سلول‌های تانل منفی می‌باشند. بزرگنمایی ۲۰۰ برابر. (E) نمودار مقایسه درصد سلول‌های تانل مثبت در گروه‌های N (سلول‌های بنیادی عصبی)، NH (سلول‌های بنیادی عصبی تیمار شده با هیدروژن پراکساید)، NA (سلول‌های بنیادی عصبی تیمار شده با آدنوزین) و NAH (سلول‌های بنیادی عصبی پیش‌تیمار شده با آدنوزین و تیمار شده با هیدروژن پراکساید). * نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه NH ($P < 0.05$).

بحث

مطالعه‌ی حاضر، اثر حفاظتی آدنوزین بر روی سلول‌های عصبی مشتق شده از مغز استخوان را مورد بررسی قرار داد، به این صورت که این سلول‌ها با غلظت‌های مختلف آدنوزین تیمار شدند. نتایج بررسی، افزایش میزان بقا و کاهش آپوپتوز و در کل اثر نوروپروتکتیو آدنوزین را در شرایط آسیب اکسیداتیو نشان داد. درصد سلول‌های زنده، وابسته به غلظت آدنوزین در محیط کشت سلول‌ها بود. این در حالی است که در غلظت‌های بالاتر از ۶ میکرومولار درصد سلول‌های زنده کاهش داشت که این امر احتمالاً به دلیل غلظت بالا و افزایش سمیت ناشی از آدنوزین و متعاقباً مرگ سلول‌ها بود. بنابراین از غلظت ۶ میکرومولار به عنوان دوز بهینه برای مراحل بعدی این مطالعه استفاده گردید. محافظت نورونی آدنوزین، در

غلظت ۶ میکرومولاری این دارو صورت گرفت. همان‌طور که ذکر شد، آسیب اکسیداتیو یکی از عوامل ایجاد کننده بیماری‌های تحلیل برنده عصبی می‌باشد. دو عامل عمده در به وجود آمدن آسیب اکسیداتیو دخیل هستند که عبارتند از افزایش تولید اکسیدان‌های سلولی و نقص در مکانیسم‌های حفاظتی در برابر اکسیدان‌ها. اکسیدان‌های سلولی طی تنفس سلولی و اکسیداسیون مواد در بدن ایجاد شده و بر حسب میزان تولیدشان می‌توانند مفید یا مضر باشند. در واقع رادیکال‌های آزاد در غلظت‌های فیزیولوژیک برای عملکرد طبیعی سلول‌ها ضروری هستند و در تنظیم مسیرهای پیام‌رسانی اهمیت قابل ملاحظه‌ای دارند (۱۵). این واکنشگرها با فعال کردن برخی مسیرهای پیام‌رسانی، رونویسی از ژن‌های مربوط به آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، پروتئین‌های ترمیم کننده

DNA و پروتئین‌های ضد آپوپتوز را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۱۶). این در حالی است که افزایش بیش از حد رادیکال‌های آزاد می‌تواند به بیومولکول‌های مهم در بدن مانند لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA آسیب‌های جدی وارد کرده و در نهایت منجر به تخریب سلول‌ها و ایجاد بیماری‌های مزمن شوند. مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که رادیکال‌های آزاد با تأثیر روی اسیدهای نوکلئیک می‌توانند صدمات خطرناک و غیرقابل برگشتی در ساختمان این ماکرومولکول‌های حیاتی ایجاد نمایند. آسیب اکسیداتیو با ایجاد تغییرات دائمی در ماده ژنتیکی می‌تواند باعث بروز جهش، سرطان و پیری گردد (۱۷). تحقیقات انجام شده بر روی فرآیند پیری، جهش‌های ژنتیکی و عوامل محیطی مستعد کننده آن حاکی از این است که افزایش استرس اکسیداتیو در نهایت می‌تواند باعث آپوپتوز در سلول‌های عصبی شود. در واقع، اگر شرایط اکسیداتیوی که به وجود آمده است برای سلول‌های عصبی غیر قابل تحمل باشد، مرگ برنامه‌ریزی شده یا آپوپتوز در این سلول‌ها اتفاق می‌افتد (۱۸). در آپوپتوز مجموعه‌ای از اتفاقات به صورت سیستماتیک و پی‌درپی رخ می‌دهند. پروتئین‌ها و مسیرهای بسیاری در کنترل فرایند آپوپتوز نقش دارند. بنابراین با تداخل در بیان ژن‌های پروآپوپتیک و آنتی‌آپوپتیک می‌توان در روند آپوپتوز تغییراتی را به وجود آورد و در راستای درمان این بیماری‌ها اقدام نمود (۷). از آنجایی که مغز بزرگترین مصرف کننده اکسیژن در بدن است، استرس‌های اکسیداتیو بیشترین تأثیر را روی این قسمت از بدن دارند. تمرکز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از قبیل گلوکاتیون پراکسیداز و کاتالاز در مغز کم است و این میزان در افراد سالخورده نیز کمتر خواهد شد، بنابراین یک ناهماهنگی بین این آنتی‌اکسیدان‌ها و استرس اکسیداتیو پیش می‌آید و روند تخریب سیستم عصبی را آغاز می‌نماید (۱۹). یکی از این آنتی‌اکسیدان‌ها داروی آدنوزین است. آدنوزین نوکلئوزیدی طبیعی است که در مقادیر زیاد در انواع مکان‌های پاتولوژیک مغز مثل بیماری پارکینسون، ام

اس، و آسیب‌های مغزی، مانند ایسکمی، تروما و صرع در نواحی درگیر دیده شده و بسیاری از عملکردهای سیستم عصبی مرکزی شامل مهار انتقال عصبی و عملکردهای محافظت نورونی را در شرایط پاتولوژیک انجام می‌دهد (۲۰). آدنوزین به دلیل اینکه در وزیکول‌های سیناپسی ذخیره نمی‌شود نقش اتوکرینی و اندوکرینی مهمی دارد. همچنین آدنوزین در مهار تولید سوپراکسیدها در نوتروفیل‌ها نقش دارد (۲۱). در سیستم عصبی، آدنوزین باعث کاهش رهاسازی گلوتامات، تداخل با سیستم آزادسازی وزیکول‌ها، فعال شدن کانال‌های پیش‌سیناپسی و مهار گیرنده‌های NMDA (گیرنده‌های سیستم گلوتاماترژیک) می‌شود (۲۲). در مطالعه‌ای دیگر مشاهده شد که افزایش آدنوزین کیناز و در ادامه افزایش آدنوزین در سلول‌های مغز و نخاع تأثیر چشمگیری را در پیشگیری از بیماری صرع دارد (۲۳). مورنو و همکاران بر روی مدل‌های حیوانی با بیماری ام اس نشان داد که این مولکول می‌تواند از سد خونی-مغزی عبور کند و به طور موثری در درمان بیماری‌های مخرب سیستم عصبی مورد استفاده قرار گیرد (۲۴). عملکرد بیولوژیکی آدنوزین وابسته به بیان نسبی و عملکرد سیگنال‌دهی هر کدام از گیرنده‌ها و همچنین به غلظت خارج سلولی آدنوزین است. همه‌ی انواع گیرنده‌های آدنوزینی در مغز بیان می‌شوند، با این حال، توزیع آنها در مکان‌ها و سلول‌های مختلف، متفاوت است (۲۵). آدنوزین اثر حفاظتی خود را تا حد زیادی از طریق گیرنده‌های آدنوزینی A1 اعمال می‌کند (۲۶). علاوه بر این، مهار دارویی گیرنده‌های آدنوزینی A2 توسط آنتاگونیست‌ها باعث حفاظت عصبی می‌شود، چون این دو سیگنال تأثیرات متضاد هم را دارا می‌باشند (۲۷). در این راستا، ان جی و همکاران در مطالعه‌ی خود متوجه شدند که کاهش ۵۰ درصدی در میزان رسپتورهای A2a، به‌طور قابل توجهی باعث محافظت این سلول‌ها شده و پیشرفت بیماری را در این مدل‌های موشی به تأخیر می‌اندازد (۲۸). میجیتا و

رو مطالعات بیشتری در زمینه نقش حفاظتی آدنوزین در شرایط هیپوکسی در سلول‌های عصبی لازم است. مطالعات زیادی برای درک عواملی که در تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی عصبی و همچنین در مورد مکانیسم‌های سیگنال‌دهی آنها صورت گرفته است (۳۲). در یک مطالعه مشاهده شد که یکی از آگونیست‌های آدنوزین به نام CPA و گیرنده آدنوزین A1 باعث افزایش تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی می‌شود و این تکثیر القا شده توسط CPA، به‌وسیله‌ی آنتاگونیست DPCPA تضعیف می‌شود. CPA همچنین فسفریلاسیون ERK kinase و MEK را القا می‌نماید که فسفریلاسیون آنها توسط DPCPA مهار می‌شود. این بررسی‌ها نشان می‌دهد که فعال شدن گیرنده آدنوزین A1 و تحریک تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی از طریق مسیر سیگنالینگ MEK/ERK و Akt رخ می‌دهد. مسیر سیگنال‌دهی Akt نه تنها برای تکثیر، بلکه برای تمایز سلول‌های بنیادی عصبی نیز ضروری است (۳۲). ولی مطالعات نشان داده است که سیگنال‌های القا شده توسط آدنوزین، بر روی تمایز سلول‌های بنیادی عصبی به نوروها، آستروسیت‌ها و الیگودندروسیت‌ها تاثیر ندارد، هر چند در این زمینه مطالعات بیشتری لازم است. آدنوزین می‌تواند از سد خونی مغز عبور کند بنابراین می‌تواند به‌عنوان یک دارو عمل کند که در بقای سلول‌های عصبی درونی یا پیوند شده موثر باشد (۳۳).

نتیجه‌گیری

در یک جمع‌بندی کلی می‌توان گفت، آدنوزین نقش مهمی در محافظت از سلول‌های عصبی که مستعد آسیب‌های اکسیداتیو هستند دارد، به همین دلیل این ترکیب ممکن است به‌عنوان یک داروی کاندید در شرایط اختلالات عصبی ناشی از استرس اکسیداتیو مورد استفاده قرار بگیرد. با توجه به نتایج به دست آمده قابل توجه و تاثیرات مثبت آدنوزین بر روی

همکاران نیز در مطالعه‌ی خود، گیرنده‌های آدنوزینی A1 را به صورت غالب در سلول‌های بنیادی عصبی ایزوله شده از منطقه subventricular مغز موش و تکثیر ناشی از آدنوزین را در این سلول‌ها مشاهده کردند. سازگار با این نتیجه، فعال‌سازی گیرنده‌های آدنوزینی A1 توسط آگونیست‌های مختلف نیز، تکثیر سلول‌های بنیادی عصبی را نشان داد. بنابراین، این نتایج نشان داد که گیرنده A1 آدنوزین ممکن است بر ویژگی تجدیدپذیری سلول‌های بنیادی عصبی در شرایط پاتورنر سیستم عصبی مرکزی تاثیر بگذارد. گیرنده A1 به مقدار زیاد در سلول‌های بنیادی عصبی بیان می‌شود و احتمالاً اثرات حفاظت عصبی مشاهده شده در این مطالعه توسط آدنوزین به دلیل فعال شدن این ریسپتور می‌باشد. سلول‌های بنیادی عصبی، ریسپتورهای A2b را نیز بیان می‌کنند و می‌توانند تاثیرات تکثیری خود را به واسطه‌ی این ریسپتورها در حضور آدنوزین اعمال کنند. ولی احتمال داده می‌شود که تاثیرات تکثیری آدنوزین بر روی سلول‌های بنیادی عصبی بیشتر به واسطه ریسپتورهای A1 است، به این دلیل که تمایل آدنوزین به ریسپتورهای A1 بیشتر از A2b است (۲۹). سلول‌های بنیادی عصبی، سلول‌های پیش‌ساز چندتوان و خود تجدیدپذیری هستند که می‌توانند به سلول‌های عصبی و سلول‌های گلیال تمایز یابند. بنابراین، انتظار می‌رود که استفاده از آنها در درمان اختلالات عصبی مانند بیماری پارکینسون، بیماری ام‌اس، آسیب‌های عصبی و سکته مغزی مفید باشد (۳۰ و ۳۱). مطالعه‌ی حاضر به بررسی بقا و تکثیر سلول‌های عصبی تحت شرایط هیپوکسیک توسط آدنوزین پرداخت ولی مکانیسم‌ها و مسیرهای سلولی که باعث حفاظت این سلول‌ها توسط آدنوزین در شرایط هیپوکسی می‌شود، در این مطالعه مورد بررسی قرار نگرفت. از طرفی اگر نوع ریسپتورهای آدنوزینی فعال شده در این حالت مشخص شود، می‌توان با شناسایی آگونیست‌های موثر، داروهای بهتری را در جهت درمان بیماری‌های مخرب سیستم عصبی یافت. از این

۱۲۱. ZUMS.REC.1394.121) مصوب دانشگاه علوم پزشکی زنجان می‌باشد و با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری و در آزمایشگاه تحقیقات مرکزی دانشکده‌ی پزشکی این دانشگاه انجام گرفته است. نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند از تمامی افرادی که به انجام این مطالعه کمک کردند و نیز معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی زنجان جهت حمایت مالی تشکر و قدردانی نمایند.

مهار آپوپتوز در سلول‌های بنیادی عصبی، بررسی تاثیر آدنوزین در مدل‌های آزمایشگاهی (بیماری‌های سیستم عصبی) در شرایط In vivo و همچنین بررسی کاسپازها پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مقاله بر اساس پایان نامه دانشجویی (به شماره طرح

References

- 1- Gandhi S, Abramov AY. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev*. 2012; 2012: 428010.
- 2- Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*. 2015; 4: 180-3.
- 3- Jin K, Peel AL, Mao XO, Xie L, et al. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101: 343-7.
- 4- Rafatian G, Khodaghali F, Farimani MM, Abraki SB, et al. Increase of autophagy and attenuation of apoptosis by Salvigenin promote survival of SH-SY5Y cells following treatment with HO. *Mol Cell Biochem*. 2012; 371: 9-22.
- 5- Liebl MP, Kaya AM, Tenzer S, Mittenzwei R, et al. Dimerization of visinin-like protein 1 is regulated by oxidative stress and calcium and is a pathological hallmark of amyotrophic lateral sclerosis. *Free Radic Biol Med*. 2014; 72: 41-54.
- 6- Sankari SL, Masthan KM, Babu NA, Bhattacharjee T, et al. Apoptosis in cancer--an update. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012; 13: 4873-8.
- 7- Tatton WG, Olanow CW. Apoptosis in neurodegenerative diseases: the role of mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1410: 195-213.
- 8- Esposito E, Cuzzocrea S. New therapeutic strategy for Parkinson's and Alzheimer's disease. *Curr Med Chem*. 2010; 17: 2764-74.
- 9- Cacciatore I, Baldassarre L, Fornasari E, Mollica A, et al. Recent advances in the treatment of neurodegenerative diseases based on GSH delivery systems. *Oxid Med Cell Longev*. 2012; 2012: 240146.
- 10- Albrecht-Küpper BE, Leineweber K, Nell PG. Partial adenosine A1 receptor agonists for cardiovascular therapies. *Purinergic Signal*. 2012; 8: 91-9.
- 11- Cunha RA. Neuroprotection by adenosine in the brain: From A(1) receptor activation to A (2A) receptor blockade. *Purinergic Signal*. 2005; 1: 111-34.

- 12- Lusardi TA. Adenosine neuromodulation and traumatic brain injury. *Curr Neuropharmacol*. 2009; 7: 228-37.
- 13- Yang Q, Mu J, Li Q, Li A, et al. A simple and efficient method for deriving neurospheres from bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 8; 372: 520-4.
- 14- Radad K, Rausch WD, Gille G. Rotenone induces cell death in primary dopaminergic culture by increasing ROS production and inhibiting mitochondrial respiration. *Neurochem Int*. 2006; 49: 379-86.
- 15- Aldred S. Oxidative and nitrative changes seen in lipoproteins following exercise. *Atherosclerosis*. 2007; 192: 1-8.
- 16- Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*. 2014; 24: R453-62.
- 17- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39: 44-84.
- 18- Matés JM, Segura JA, Alonso FJ, Márquez J. Oxidative stress in apoptosis and cancer: an update. *Arch Toxicol*. 2012; 86: 1649-65.
- 19- Takahashi S, Takahashi I, Sato H, Kubota Y, et al. Age-related changes in the concentrations of major and trace elements in the brain of rats and mice. *Biol Trace Elem Res*. 2001; 80: 145-58.
- 20- Robertson CL, Bell MJ, Kochanek PM, Adelson PD, et al. Increased adenosine in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children: association with severity of injury and excitotoxicity. *Crit Care Med*. 2001; 29: 2287-93.
- 21- Ramkumar V, Hallam DM, Nie Z. Adenosine, oxidative stress and cytoprotection. *Jpn J Pharmacol*. 2001; 86: 265-74.
- 22- Haas HL, Selbach O. Functions of neuronal adenosine receptors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2000; 362: 375-81.
- 23- Boison D. Adenosine dysfunction in epilepsy. *Glia*. 2012; 60: 1234-43.
- 24- Moreno B, Lopez I, Fernández-Díez B, Gottlieb M, et al. Differential neuroprotective effects of 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine. *PLoS One*. 2014 5; 9: e90671.
- 25- Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, et al. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev*. 2001; 53: 527-52.
- 26- Johansson B, Halldner L, Dunwiddie TV, Masino SA, et al. Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 9407-12.
- 27- Hauser RA, Schwarzschild MA. Adenosine A2A receptor antagonists for Parkinson's disease: rationale, therapeutic potential and clinical experience. *Drugs & aging*. 2005; 22: 471-82.
- 28- Ng SK, Higashimori H, Tolman M, Yang Y. Suppression of adenosine 2a receptor (A2aR)-mediated adenosine signaling improves disease phenotypes in a mouse model of amyotrophic

- lateral sclerosis. *Experimental neurology*. 2015; 267: 115-22.
- 29- Migita H, Kominami K, Higashida M, Maruyama R, et al. Activation of adenosine A1 receptor-induced neural stem cell proliferation via MEK/ERK and Akt signaling pathways. *Journal of neuroscience research*. 2008; 86: 2820-8.
- 30- Breunig JJ, Haydar TF, Rakic P. Neural stem cells: historical perspective and future prospects. *Neuron*. 2011; 70: 614-25.
- 31- Blurton-Jones M, Kitazawa M, Martinez-Coria H, Castello NA, et al. Neural stem cells improve cognition via BDNF in a transgenic model of Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009; 106: 13594-9.
- 32- Kalluri HS, Vemuganti R, Dempsey RJ. Mechanism of insulin like growth factor Immediated proliferation of adult neural progenitor cells: role of Akt. *Europ J Neurosci* 2007; 25: 1041-8.
- 33- Isakovic AJ, Abbott NJ, Redzic ZB. Brain to blood efflux transport of adenosine: blood-brain barrier studies in the rat. *J Neurochemistry*. 2004; 90: 272-86.

Evaluation of Neuroprotective Effect of Adenosine on Neural Stem Cells exposed to Oxidative Stress Condition with H₂O₂

Gholinejad M¹, Abdanipour AR², Taramchi AH¹, Jafari Anarkooli I², Nikfar A³

¹Dept. of Medical Biotechnology and Nanotechnology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

²Dept. of Anatomy, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

³Dept. of Genetics and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

Corresponding Author: Abdanipour AR, Dept. of Anatomy, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran.

E-mail: abdanipour@zums.ac.ir

Received: 25 Aug 2016 **Accepted:** 14 Nov 2016

Background and Objective: Excessive production of free radicals during oxidative stress can cause serious damage to important biomolecules and activate programmed cell death pathways in the body. In the nervous system, neuronal cell death leads to many progressive neurodegenerative disorders. The aim of this study was to evaluate the effects of adenosine on the inhibition of apoptosis in oxidative damage induced by hydrogen peroxide in bone marrow derived neural stem cells (BMSCs-dNSCs).

Materials and Methods: BMSCs-dNSCs were pretreated with different doses of adenosine for 24 hours and then exposed to 125 μM H₂O₂ for 30 minutes. Using MTT and TUNEL assay, we evaluated the effects of adenosine on cell survival and apoptosis in pretreated BMSCs-dNSCs in comparison to control groups.

Results: The results showed that the apoptosis rate in the 6 μM adenosine pretreated BMSCs-dNSCs was significantly decreased compared to the control group in the condition of oxidative stress (P<0.05).

Conclusion: Our findings suggest that adenosine protects NSCs against oxidative stress induced cell death, therefore it may be used to promote the survival rate of NSCs and could be a candidate for the treatment of oxidative stress mediated neurological diseases.

Keywords: Adenosine, Neural stem cells, Apoptosis