

A Comparative Study of Neuroprotective Effects of Human Adipose and Dental Pulp Derived Stem Cells on Hypoxic SH-SY5Y Cells Exposed to CoCl₂

Farahnaz Ahmadi¹,
Hoda Jorre²,
Elham Hadipour³,
Ezzatollah Rezaei⁴,
Zahra Tayarani-Najaran⁵,
Zahra Salmasi^{6,7}

¹ PhD Student in Toxicology, Medical Toxicology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

² Pharmacy Student, Medical Toxicology Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

³ Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Plastic Surgery, Endoscopic and Minimally Invasive Surgery Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

⁵ Professor, Targeted Drug Delivery Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

⁶ Assistant Professor, Nanotechnology Research Center, Pharmaceutical Technology Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

⁷ Department of Pharmaceutical Nanotechnology, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

(Received January 5, 2021 ; Accepted February 27, 2022)

Abstract

Background and purpose: Recent studies have demonstrated the promising effects of mesenchymal stem cells (MSCs) in some neurodegenerative diseases and proved their neuroprotective effects. But, the detailed pathways and the ability of MSCs from various sources has not been fully investigated.

Materials and methods: Here, we isolated MSCs from two sources; adipose tissue and dental pulp, and compared the neuroprotective effects of adipose derived stem cells-conditioned media (ADSCs-CM) and dental pulp derived stem cells-conditioned media (DPSCs-CM) on SH-SY5Y cells exposed to Cobaltous chloride (CoCl₂) as a model of hypoxia-induced neural damage. SH-SY5Y cells exposed to CoCl₂ were treated with ADSCs-CM and DPSCs-CM and the cell viability, apoptosis, and cellular damage were determined by AlamarBlue® assay, propidium iodide (PI) test, and lactate dehydrogenase (LDH) assay, respectively.

Results: According to AlamarBlue® results, both ADSCs-CM and DPSCs-CM showed protective effects on SH-SY5Y cells exposed to CoCl₂ at 0.6 mM for 12 and 24 h. Furthermore, ADSCs-CM could protect SH-SY5Y cells against hypoxic condition more intensively at all CoCl₂ concentrations and various incubation periods ($P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively). However, there were no significant differences between ADSCs-CM and DPSCs-CM. Also, ADSCs-CM and DPSCs-CM could considerably reduce the LDH release and apoptotic cells when SH-SY5Y cells were exposed to 0.6 mM CoCl₂ for 24 h.

Conclusion: The study indicated that both ADSCs-CM and DPSCs-CM have neuroprotective effects on hypoxic SH-SY5Y cells through reduction of apoptotic cells and release of LDH.

Keywords: adipose derived stem cells, dental pulp derived stem cells, neuroprotective effect, hypoxia, cobaltous chloride

J Mazandaran Univ Med Sci 2022; 31 (206): 1-13 (Persian).

* **Corresponding Author:** Zahra Salmasi- Nanotechnology Research Center, Pharmaceutical Technology Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. (E-mail: Salmasiz@mums.ac.ir)

مطالعه مقایسه‌ای اثرات محافظت عصبی سلول‌های بنیادی انسانی مشتق شده از بافت چربی و پالپ دندان بر روی سلول‌های SH-SY5Y تحت شرایط هیپوکسی در معرض کلرید کبالت

فرحناز احمدی¹
هدی جره²
الهام هادی پور³
عزت الله رضایی⁴
زهره طیرانی نجاران⁵
زهره سلماسی^{6,7}

چکیده

سابقه و هدف: مطالعات اخیر اثرات امیدبخش سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) را در بیماری‌های تخریب‌کننده عصبی نشان داده‌است و اثرات محافظت عصبی آن‌ها را به اثبات رسانده است. با این حال مسیرهای دقیق و توانایی محافظت این سلول‌ها از منابع مختلف به طور کامل بررسی نشده است.

مواد و روش‌ها: MSCs از بافت چربی و پالپ دندان انسان جدا شد و اثرات محافظت عصبی محیط‌های کشت به‌دست آمده از سلول‌های بنیادی مشتق از چربی (ADSCs-CM) و پالپ دندان (DPSCs-CM) بر روی سلول‌های SH-SY5Y مواجه شده با کلرید کبالت، به‌عنوان مدلی از آسیب عصبی، مقایسه شد. این سلول‌ها با ADSCs-CM و DPSCs-CM تیمار شدند و میزان زنده ماندن سلول‌ها، آپوپتوز و صدمه سلولی به ترتیب با از تست‌های آلاماربلو، پروپودیوم یداید و لاکتات دهیدروژناز بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج آلامار بلو نشان داد که هر دو تیمار در زمان‌های 12 و 24 ساعت و غلظت 0/6 کلرید کبالت اثرات محافظتی دارند. همچنین می‌توان نتیجه گرفت که ADSCs-CM می‌تواند به‌طور معناداری اثرات محافظتی در تمام غلظت‌های کلرید کبالت و زمان‌های مختلف ایجاد کند ($P < 0/001$ و $P < 0/01$) ولی تفاوت آماری بین ADSCs-CM و DPSCs-CM دیده نشد. در ضمن تیمار با ADSCs-CM و DPSCs-CM توانست به‌طور قابل توجهی آزادسازی LDH و درصد سلول‌های دچار آپوپتوز را در زمان 24 ساعت و غلظت 0/6 کلرید کبالت کاهش دهد.

استنتاج: بر اساس یافته‌های این مطالعه، هر دو ADSCs-CM و DPSCs-CM از طریق کاهش درصد سلول‌های دچار آپوپتوز و کاهش آزادسازی LDH، اثرات محافظت عصبی را بر سلول‌های SH-SY5Y تحت شرایط هیپوکسیک نشان می‌دهند.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی مشتق از چربی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از پالپ دندان، اثرات محافظتی عصبی، هیپوکسی، کلرید کبالت

مقدمه

در مطالعات مختلف به خوبی نشان داده شده است که سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) علاوه بر توانایی

منحصر به فرد در تمایز می‌توانند فرایندهای رگزایی و نورورژنز را با ترشح سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد

E-mail: Salmasiz@mums.ac.ir

مؤلف مسئول: زهره سلماسی مشهد: دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مرکز تحقیقات نانوفناوری دارویی

1. دانشجوی دکتری سم شناسی، مرکز تحقیقات سم شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
2. دانشجوی دکتری حرفه ای داروسازی، مرکز تحقیقات سم شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
3. استادیار، گروه بیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
4. دانشیار، گروه جراحی پلاستیک، مرکز تحقیقات آندوسکوپی و جراحی کم تهاجمی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
5. استاد، مرکز تحقیقات دارورسانی هدفمند، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
6. استادیار، مرکز تحقیقات نانوفناوری، پژوهشکده فناوری های نوین دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
7. گروه نانوفناوری دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: 1400/10/15 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1400/10/28 تاریخ تصویب: 1400/12/8

تقویت کنند، در نتیجه سبب بهبود عملکرد سیستم عصبی در بیماری‌هایی مانند انفارکتوس میوکارد و سکته‌های مغزی شوند (1). مکانیسم‌های دیگری از اثرات حفاظتی سلول‌های بنیادی بر سلول‌های عصبی به‌طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است. یکی از مهم‌ترین آن‌ها تشکیل مدارهای عصبی جدید در بافت‌های آسیب دیده به دنبال پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی است. با این حال، مسیرهای دقیق و توانایی MSC‌های مختلف از منابع مختلف به‌طور کامل بررسی نشده است (2). سلول‌های بنیادی اثرات مضر فعالیت تشدید شده پاسخ ایمنی را با تنظیم سیتوکین‌های ضد التهابی کاهش می‌دهند و بیان اینترلوکین-1 (IL-1)، اینترلوکین-6 (IL-6) و فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF- α) را به عنوان سیتوکین‌های پیش التهابی در مراحل اولیه حمله ایسکمیک مغزی کاهش می‌دهند (3). اثر ضد آپوپتوز سلول‌های بنیادی، مکانیسم دیگری است که نقش مهمی در کاهش آپوپتوز سلول‌های عصبی و بهبود آسیب‌های عصبی دارد (4). سلول‌های بنیادی مزانشیمی اغلب از بافت‌های مختلف و همچنین از خون محیطی، بند ناف، مغز استخوان، پالپ دندان، خون بندناف (Umbilical cord blood: UCB) و بافت چربی جدا می‌شوند (5). سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی (Adipose derived stem cells: ADSCs)، در شرایط آزمایشگاهی توانایی تمایز به انواع متعدد سلول‌ها شامل سلول‌های چربی، کندروسیت‌ها، استئوبلاست‌ها، کاردیومیوسیت‌ها، سلول‌های عصبی و سلول‌های اندوتلیال عروقی را دارند. مشخص شده است که این سلول‌ها خود تجدید شونده هستند و به راحتی از لیپوساکشن به دست می‌آیند که دسترسی سریع را در تعداد زیاد فراهم می‌کند (6). ADSCs دارای فعالیت تعدیل‌کننده ایمنی، بدون تحریک سیستم ایمنی هستند که این ویژگی آن‌ها را گزینه مناسبی برای کاربردهای بالینی کرده است (7). مطالعات نشان داده است که تمایز ADSCs به سلول‌های شبه عصبی می‌تواند توسط برخی از سیتوکین‌ها، فاکتورهای شیمیایی، فاکتورهای رشد و

عوامل رونویسی از جمله فاکتور رونویسی SOX2 (SRV-Box Transcription Factor 2) القا شود (8). سلول‌های بنیادی مشتق از پالپ دندان (Dental pulp derived stem cells: DPSCs) به عنوان سلول‌های بنیادی کلونوژن و تکثیر شونده شناخته شده‌اند که قادر به تولید کلنی‌های کلسیفیه متراکم هستند. علاوه بر این، خواصی از جمله انعطاف‌پذیری، توانمندی چند پتانسیلی، تمایز به انواع مختلف سلول، سهولت برداشت بافت و عملکرد تعدیل‌کنندگی سیستم ایمنی، آن‌ها را به عنوان گزینه مفید برای کاربردهای بالینی مختلف معرفی می‌کند (9). اعتقاد بر این است که بافت پالپ دندان انسان از سلول‌های تاج عصبی مشتق شده است و بنابراین ممکن است تحت شرایط محیطی مناسب دارای پتانسیل عصبی با ظرفیت تمایز به سلول‌های عصبی عملکردی باشد (10). شواهد زیادی در چندین مطالعه از اثر محافظت‌کننده عصبی ADSCs و DPSCs حمایت می‌کند (11، 12). مطالعات اخیر نشان داده‌اند که کاندیشن‌مدیوم (Conditioned medium: CM) به‌دست آمده از کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاوی فاکتورهای رشد و سیتوکین‌های ترشح شده توسط سلول‌های بنیادی مزانشیمی است که آن‌ها را جایگزین جذابی برای درمان با سلول‌های بنیادی می‌کند (13). در یک مطالعه دیگر، غنی‌سازی محیط کشت پایه با کاندیشن‌مدیوم حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسان، سبب بهبود خواص فیزیولوژیکی مانند زنده‌مانی و ذخیره‌سازی گلیکوژن در کشت هپاتوسیت‌های اولیه شد (14).

لذا هدف از مطالعه حاضر ارزیابی و مقایسه اثرات حفاظت عصبی ADSCs-CM (Adipose derived stem cells-conditioned medium) و DPSCs-CM (Dental pulp derived stem cells-conditioned medium) بر روی سلول‌های SH-SY5Y در معرض کلرید کبالت به‌عنوان مدل مناسب آسیب عصبی هیپوکسیک می‌باشد. رده سلولی SH-SY5Y به عنوان مدلی برای

اختلالات نورودژنراتیو در مطالعات تجربی مختلف عمل می کند (15).

مواد و روش ها

مواد شیمیایی

فسفات بافر سالین (PBS)، کلاژناز نوع یک، سرم جنین گاوی (FBS) تهیه شده از شرکت Gibco (ایالات متحده آمریکا)، محیط کشت (DMEM)، محیط کشت (α -MEM)، کلرید کبالت، آلامار بلو، تریتون X100 و PI از سیگما (آلمان)، آمفوتریسین B از سیمین تاک (ایران)، آنتی بادی های CD34 FITC، CD45 FITC، CD44 FITC، CD29 FITC، CD34 FITC، CD45 FITC، CD44 FITC و CD90 FITC از Cell signaling (ایالات متحده آمریکا) فراهم شد.

جداسازی سلول های بنیادی چربی

داوطلبان سالم با شاخص توده بدنی (BMI) بیش تر از 30 کیلوگرم بر مترمربع (kg/m^2)، طبق روش های تایید شده توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مشهد (با شناسه اخلاق IR.MUMS.PHARMACY.REC.1397.087 و با رضایت آگاهانه تحت عمل لیپوساکشن قرار گرفتند. مطابق مطالعه پیشین ما، بافت چربی زیر جلدی از افراد، تحت شرایط استریل استخراج و به آزمایشگاه کشت سلولی منتقل شد (16). بافت چربی با PBS حاوی 1 درصد پنی سیلین / استرپتومایسین شسته شد؛ همچنین با کلاژناز نوع یک با غلظت (0/5 mg/ml) به مدت 45 دقیقه به صورت آنزیمی هضم شد. سپس محیط کشت حاوی 10 درصد FBS برای خنثی کردن هضم آنزیمی اضافه شد. سوسپانسیون سلولی در 500 g به مدت 5 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. مایع رویی تخلیه شده و 1 میلی لیتر محیط کشت DMEM با محتوای گلوکز پایین به پلت سلولی اضافه گردید و سپس به فلاسک کشت T25 حاوی محیط

DMEM همراه با 10 درصد FBS، 1 درصد پنی سیلین / استرپتومایسین، 0/01 درصد آمفوتریسین B منتقل شد و در دمای 37 درجه و 5 درصد CO2 انکوبه گردید (16).

جداسازی سلول های بنیادی پالپ دندان

دندان های مولر سوم نهفته طبیعی افراد بزرگسال (18-30 ساله) (N=3) پس از کشیدن دندان به دلایل ارتودنسی در کلینیک دندانپزشکی موسسه دندانپزشکی و جامعه و صورت دانشگاه علوم پزشکی مشهد بر اساس تاییدیه اخلاقی موسسه تهیه شد. طبق مطالعه پیشین ما، سطوح دندانی با پیویدون آلود این تمیز شد و سه مرتبه با بافر فسفات سالین شستشو داده شد. بافت پالپ از طوقه و ریشه به آرامی جدا شده و به قطعات 2-3 میلی متری خرد شد و سپس در محلول کلاژناز 3 میلی گرم بر میلی لیتر (3mg/ml) و محلول دیسپاز 4 میلی گرم بر میلی لیتر (4mg/ml) با نسبت 1:1 به مدت 45 دقیقه در 37 درجه سانتی گراد هضم شد (17). پس از آن، به مدت 5 دقیقه در 500 g سانتریفیوژ شدند و سپس به فلاسک کشت T25 حاوی محیط کشت (α -MEM) محتوی 10 درصد FBS، 1 درصد پنی سیلین / استرپتومایسین، 0/01 درصد آمفوتریسین B منتقل و در دمای 37 درجه سانتی گراد (5 درصد CO2) انکوبه شدند. محیط رویی سلول ها هر سه روز یک بار تعویض شد تا زمانی که تراکم سلولی، 70 درصد فلاسک را پر کند (18).

مشخصه یابی سلول ها با استفاده از فلوسایتومتری

سلول های ADSCs و DPSCs در سومین پاساژ برای تشخیص نشانگرهای سطحی انسانی مرتبط با دودمان مزانشیمی و خونساز مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. سوسپانسیون تک سلولی (10^6 سلول در میلی لیتر) با آنتی بادی های مونوکلونال برای ADSC ها به شرح زیر نشاندار شد و در مکان تاریک در دمای 4 درجه سانتی گراد به مدت 30 دقیقه نگهداری شد. آنتی بادی موشی ضد انسانی CD34 FITC، CD45 FITC، CD44 FITC و

CD90 FITC، و برای DPSCها: آنتی بادی موشی ضد انسانی CD44 FITC، CD45 FITC، CD34 FITC و CD29 FITC. فلوسیتومتری با استفاده از دستگاه USA، CA، BD Biosciences انجام شد. داده ها با استفاده از نرم افزار FlowJo 7.6 آنالیز گردید (18، 19).

جمع آوری MSCs-CM

سلول های بنیادی مزانشیمی در پاساژهای سوم تا پنجم در فلاسک کشت T75 با تراکم 1×10^6 سلول کشت داده شده و به مدت 24 ساعت انکوبه شدند، سپس به طور کامل با بفر فسفات سالین شستشو داده شده و محیط کشت با محیط کشت بدون سرم گاوی جایگزین شد. دوباره به مدت 24 ساعت انکوباسیون انجام گردید. سپس مایع رویی جمع آوری شد و در 500 g در دمای 4 درجه سانتی گراد به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ شد تا بقایای سلولی حذف شود. CM تا زمان استفاده در دمای منفی 80 درجه سانتی گراد نگهداری شد (20).

القا شرایط هیپوکسیک در سلول های SH-SY5Y

طبق پروتوکول، از کلرید کبالت برای القای شرایط هیپوکسی در غلظت های 0/6 و 1/2 میلی مولار و مدت زمان های مختلف (6، 12، 24 و 48 ساعت) برای تعیین وضعیت بهینه و ایجاد هیپوکسی برای آزمایش های بعدی استفاده شد (21). به طور خلاصه، سلول های SH-SY5Y با دانسیته 1×10^4 cell/cm² در پلیت 96 خانه و در محیط کشت α -MEM، کشت داده شدند. پس از 24 ساعت انکوباسیون، جهت ایجاد هیپوکسی، در معرض کلرید کبالت با غلظت های 0/6 و 1/2 میلی مولار در زمان های مختلف هیپوکسی (6، 12، 24 و 48 ساعت) قرار گرفتند. بعد از گذشت این زمان ها، جهت بررسی میزان بقای سلول ها، مقدار مشخصی از رنگ رزاورین، به هر چاهک اضافه و بعد از حدود چهار ساعت میزان جذب هر چاهک با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج های 540 و 600 نانومتر خوانده شد.

ارزیابی اثرات حفاظتی ADSCs-CM و DPSCs-CM بر روی سلول های SH-SY5Y در شرایط هیپوکسیک
سلول های SH-SY5Y در محیط کشت α -MEM حاوی 10 درصد FBS با تراکم 10^4 سلول در هر چاهک در پلیت 96 خانه کشت داده شدند. پلیت ها به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد در انکوباتور حاوی 5 درصد دی اکسید کربن انکوبه شدند. سپس سلول ها در معرض کلرید کبالت (0/6 و 1/2 میلی مولار) قرار گرفتند و همزمان با ADSCs-CM یا DPSCs-CM تیمار شدند و به مدت 6، 12، 24 و 48 ساعت انکوبه شدند (22). درصد زنده ماندنی سلول ها با استفاده از رنگ آمیزی آلامارلو اندازه گیری شد. به طور خلاصه، 20 میکرولیتر رنگ آلامار بلو به هر چاهک اضافه شد و در دمای 37 درجه سانتی گراد به مدت 4 ساعت انکوبه شد. شدت فلورسانس توسط دستگاه الیزا ریدر (Biotech, USA) اندازه گیری شد (23، 24).

اندازه گیری لاکتات دهیدروژناز ترشح شده سلول ها

آسیب سلولی با روش بررسی میزان لاکتات دهیدروژناز آزاد شده از سلول ها ناشی از شرایط هیپوکسی ارزیابی شد (25). به طور خلاصه، 10^5 سلول SH-SY5Y در هر چاهک از پلیت 12 خانه کاشته شد. پس از 24 ساعت، ADSCs-CM و DPSCs-CM در چاهک های جداگانه اضافه شدند و سپس با کلرید کبالت همان طور که در بالا توضیح داده شد، انکوبه شدند. مایع رویی در لوله های جداگانه جمع آوری شد و به مدت 30 دقیقه با معرف واکنش LDH در دمای اتاق مخلوط شد. سپس جذب در طول موج 490 نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا ریدر خوانده شد (17).

سنجش آپوپتوز سلولی با فلوسایتومتری

شرایط هیپوکسی در سلول های SH-SY5Y طبق پروتکلی که قبلاً توضیح داده شد، القا شد و با ADSCs-CM و DPSCs-CM در چاهک های جداگانه

انکوبه شد. پس از 24 ساعت، سلول ها (10^5) سلول در چاهک) با PBS شسته شدند، سپس تریپسین شدند و به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ شدند. پلت های سلولی مجدداً در PBS معلق شدند و با پروپدیوم آیوداید به مدت 30 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی گراد در محیط تاریک رنگ آمیزی شدند و سپس با فلوسیتومتری تجزیه و تحلیل شدند (26,17).

تحلیل آماری

همه داده ها حداقل 3 بار جمع آوری و به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شدند. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از Graph Pad Prism نسخه 8 انجام شد و از آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA برای ارزیابی تفاوت های معنی دار بین گروه های تجربی استفاده شد. مقایسه ADSCs-CM و DPSCs-CM با استفاده از آنالیز واریانس دو طرفه و اندازه گیری های مکرر توسط هر دو عامل انجام شد. $P < 0/05$ به عنوان یک تفاوت آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

تعیین خصوصیات DPSC و ADSC

طبق مطالعات قبلی ما، DPSCs و ADSCs به ترتیب از پالپ دندان و بافت چربی با استفاده از هضم آنزیمی جدا شدند (16,17). سلول های کشت شده به راحتی در شرایط آزمایشگاهی گسترش یافتند و مورفولوژی فیروبلست را در زیر میکروسکوپ معکوس نشان دادند. نشانگرهای سطح سلولی برای مشخص کردن جمعیت های DPSC و ADSC مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل فلوسیتومتری بیان قوی نشانگرهای سلول های بنیادی مزانشیمی مانند CD90، CD44، CD29 برای DPSCs و CD90، CD44 برای ADSCs را نشان داد، در حالی که هر دوی آنها برای نشانگرهای سلولی خونساز، CD45 و CD34 منفی بودند.

اثرات حفاظتی ADSCs-CM و DPSCs-CM در شرایط هیپوکسیک

اثرات محافظتی ADSCs-CM و DPSCs-CM بر روی سلول های SH-SY5Y در معرض کلرید کبالت ابتدا با استفاده از روش آلامار بلو ارزیابی شد. تیمار سلول های SH-SY5Y با ADSCs-CM باعث افزایش معنی داری در زنده ماندن این سلول ها در شرایط هیپوکسیک در مقایسه با سلول های هیپوکسیک بدون تیمار پس از 6، 12، 24 و 48 ساعت با غلظت های 0/6 و 1/2 میلی مولار کلرید کبالت شد (نمودار شماره 1(A)) ($P < 0/01^{**}$ و $P < 0/001^{***}$).

همچنین افزایش قابل توجهی در میزان زنده ماندن سلول های SH-SY5Y تیمار شده با DPSCs-CM به مدت 12 و 24 ساعت انکوباسیون با غلظت 0/6 میلی مولار کلرید کبالت در مقایسه با سلول های هیپوکسیک مشاهده شد (نمودار شماره 1(B)).

با توجه به نمودار شماره 1(A) و 1(B)، هر دو ADSCs-CM و DPSCs-CM اثرات محافظتی بر سلول های SH-SY5Y در معرض CoCl_2 در غلظت 0/6 میلی مولار برای 12 و 24 ساعت را نشان دادند. علاوه بر این، می توان نتیجه گرفت که ADSCs-CM می تواند سلول های SH-SY5Y را در برابر شرایط هیپوکسیک در تمام غلظت های کلرید کبالت و زمان های مختلف انکوباسیون با شدت بیش تری محافظت کند ($P < 0/01^{**}$ و $P < 0/001^{***}$). همان طور که در نمودار شماره 1(C) نشان داده شده است، هیچ تفاوت آماری بین ADSCs-CM و DPSCs-CM وجود نداشت.

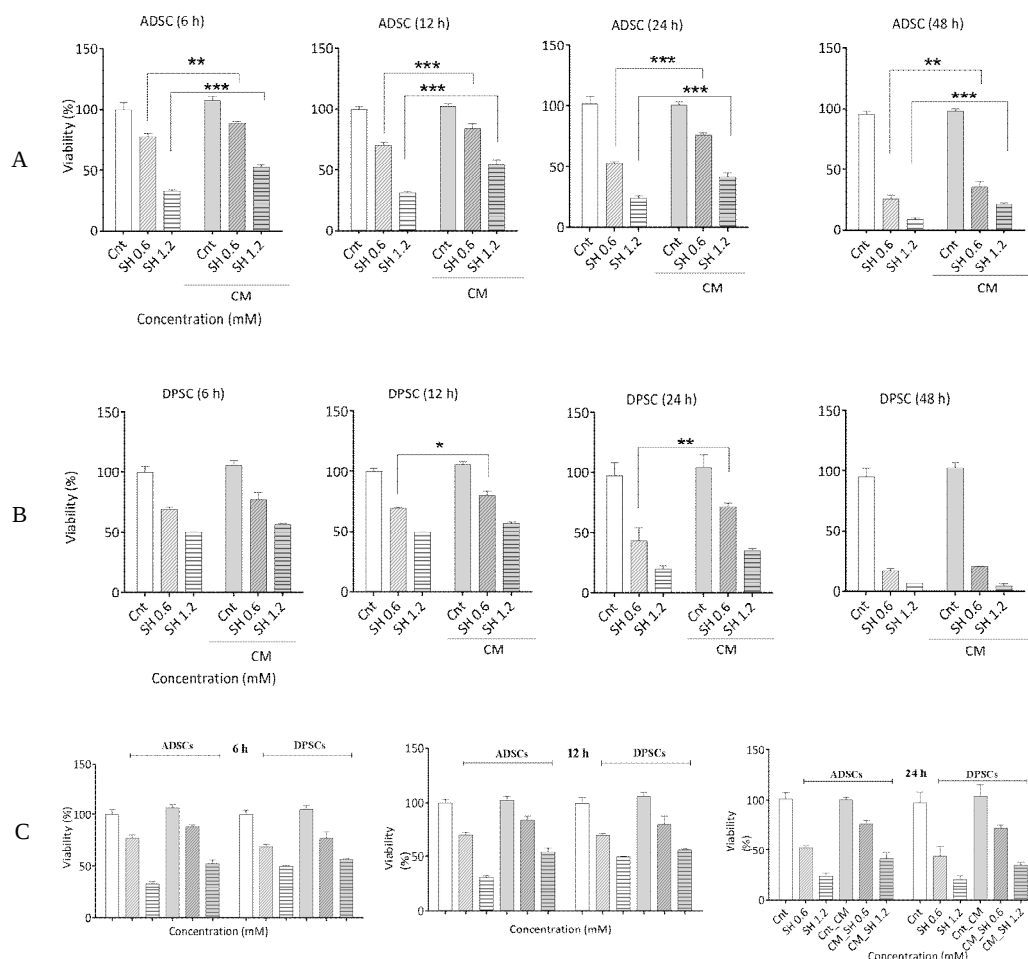
اثرات حفاظتی ADSCs-CM و DPSCs-CM بر میزان ترشح و آزادسازی لاکتات دهیدروژناز

اثرات محافظتی ADSCs-CM و DPSCs-CM بر روی سلول های SH-SY5Y مجاور شده با کلرید کبالت، با استفاده از میزان رهاسازی لاکتات دهیدروژناز نیز مشخص گردید. نتایج نشان داد که پس از 24 ساعت

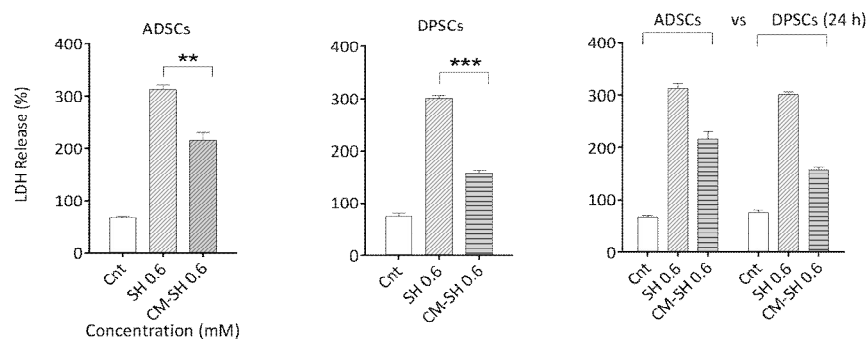
رنگ آمیزی شده با PI نشان داد که قرار گرفتن در معرض کلرید کبالت (0/6 میلی مولار) به مدت 24 ساعت باعث افزایش سلول‌های آپپتوز (95/4 و 83/2 درصد) در مقایسه با شاهد (18 و 3/99 درصد) در ناحیه sub-G1 شد. همان‌طور که در نمودار شماره 3 نشان داده شده است، تیمار سلول‌های SH-SY5Y با ADSCs-CM و DPSCs-CM تحت شرایط هیپوکسی منجر به کاهش قابل توجه درصد سلول‌های دچار آپپتوز (به ترتیب 45/1 و 26/2 درصد) شد.

ADSCs-CM و DPSCs-CM به‌طور قابل توجهی آزادسازی لاکتات دهیدروژناز را در سلول‌های هیپوکسیک در مقایسه با سلول‌های هیپوکسیک تیمار نشده کاهش می‌دهند (نمودار شماره 2). همان‌طور که در نمودار شماره 2 نشان داده شده است، هیچ تفاوت آماری بین ADSCs-CM و DPSCs-CM وجود نداشت.

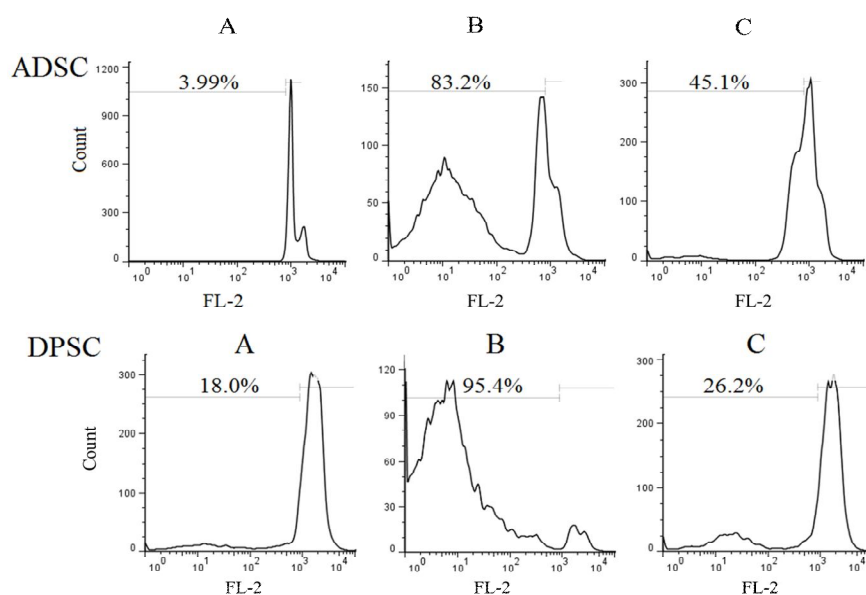
اثرات ضد آپپتوتیک ADSCs-CM و DPSCs-CM
آنالیز فلو سایتمتری سلول‌های SH-SY5Y



نمودار شماره 1: اثرات محافظتی ADSCs-CM (A) و DPSCs-CM (B) بر روی سلول‌های SH-SY5Y در معرض COC12 (0/6 و 1/2 میلی مولار) در زمان‌های 6، 12، 24 و 48 ساعت، (C) مقایسه اثرات محافظتی DPSCs-CM در مقابل ADSCs-CM. مقدار ارائه شده به صورت mean $\pm$ SEM (n=3) است. *P<0.05، **P<0.01، ***P<0.001.



تصویر شماره 2: میزان آزادسازی LDH از سلول های SH-SY5Y تیمار شده با ADSCs-CM و DPSCs-CM تحت شرایط هیپوکسیک (0/6 میلی مولار از کلرید کبالت) به مدت 24 ساعت. مقدار به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ (n=3) می باشد. $P < 0.01$: ** ، $P < 0.001$: ***.



تصویر شماره 3: ارزیابی فلوئوسیتومتری سلول های SH-SY5Y با رنگ آمیزی PI انجام شد. سلول های SH-SY5Y به عنوان گروه کنترل (A)، سلول های SH-SY5Y در معرض 0/6 میلی مولار کلرید کبالت به مدت 24 ساعت (B)، سلول های SH-SY5Y تیمار شده با ADSCs-CM یا DPSCs-CM تحت شرایط هیپوکسیک (C) می باشد.

بحث

ساعت و غلظت 0/6 کلرید کبالت کاهش دهد. سلول های بنیادی مزانشیمی سلول های بنیادی چند توانی هستند که اثرات محافظتی بالقوه آن ها بر آسیب سلول های عصبی و بیماری های عصبی در مطالعات حیوانی و بالینی مختلف نشان داده شده است (18). امروزه بافت چربی و پالپ دندان به عنوان منابع در دسترس برای استخراج و جداسازی سلول های بنیادی بیش تر مورد توجه قرار گرفته اند (23). سهولت استفاده و دسترسی از مزایای ADSCs و DPSCs

در این مطالعه، نتایج آزمایشات نشان داد که ADSC-CM می تواند زنده مانی سلول های SH-SY5Y را در شرایط هیپوکسیک در تمام غلظت های کلرید کبالت و زمان های مختلف انکوباسیون (6، 12، 24 و 48 ساعت) افزایش دهد. همچنین تیمار با ADSCs-CM و DPSCs-CM توانست به طور قابل توجهی آزادسازی LDH و درصد سلول های دچار آپوپتوز را در زمان 24

در مقایسه با سایر منابع سلول‌های بنیادی مزانشیمی است. علاوه بر خودنوزایی، تکثیر کافی در شرایط آزمایشگاهی، توانایی تمایز به دودمان‌های سلولی متعدد، تمایز DPSCs و ADSCs به سلول‌های عصبی، آن‌ها را برای درمان بیماری‌های تخریب‌کننده عصبی مناسب کرده است (27). گزارش شده است که پس از پیوند ADSCs به موش‌های مبتلا به اسکروز جانبی آمیوتروفیک (ALS)، سطوح فاکتورهای نوروتروفیک مانند BDNF، NGF و فاکتور رشد شبه انسولین (IGF) افزایش یافته است که منجر به تاخیر در شروع علائم بیماری و افزایش طول عمر موش‌ها شد (28). نشان داده شده است که پیوند ADSCs در موش‌های مدل بیماری پارکینسون، توانایی‌های حرکتی با بازگشت تعداد سلول‌های دوپامینرژیک به سطح نرمال پس از 22 روز درمان، بهبود بخشیده می‌شود (29). در یک مطالعه دیگر نشان داده شده است که پیوند داخل مغزی ADSCs به موش‌های تراریخته مدل بیماری آلزایمر، منجر به کاهش رسوب پپتید β -آمیلوئید ($A\beta$) و بازگرداندن عملکرد یادگیری و حافظه در موش‌ها شده است (30). به طور کلی DPSCs سطح بالاتری از فاکتورهای تغذیه ای شامل فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)، BDNF، نوروتروفین-3 (NT-3)، فاکتور نوروتروفیک مشتق از سلول گلیال (GDNF)، NGF و فاکتور رشد مشتق از پلاکت (PDGF) را نسبت به BMSCs و ADSCs بیان می‌کنند (31).

همچنین نشان داده شد که DPSCs در مقایسه با BMSCs تیر بیش‌تری از BDNF و GDNF ترشح می‌کنند. برخی از مطالعات درون‌تنی توانایی DPSCs را در بهبود سکنه نشان دادند. به عنوان مثال، نشان داده شد که پیوند داخل مغزی DPSCs به مناطق ایسکمیک مغز به طور قابل توجهی عملکرد حرکتی حسی اندام جلویی را در 4 هفته پس از درمان در مدل جوندگان بهبود می‌بخشد (32). علاوه بر این، درمان ترکیبی DPSCs با BDNF در نواحی ایسکمیک انسداد شریان مغزی میانی (MCAO) در موش‌ها، عملکرد عصبی را به‌طور موثرتری

نسبت به BDNF یا DPSCs به تنهایی افزایش داد (2). بنابراین، به نظر می‌رسد DPSCs-CM و ADSCs-CM قادر به محافظت از سلول در برابر سمیت سلولی هستند. با این حال، اثرات محافظت عصبی DPSCs-CM و ADSCs-CM در برابر آسیب عصبی ناشی از هیپوکسی هنوز مورد مطالعه و مقایسه قرار نگرفته است.

در این مطالعه هدف ما، بررسی و مقایسه اثرات محافظتی ADSCs-CM و DPSCs-CM بر سلول‌های SH-SY5Y تحت شرایط هیپوکسی ناشی از کلرید کبالت با استفاده از ارزیابی میزان زنده‌مانی، ترشح لاکتات دهیدروژناز و درصد آپوپتوز سلول‌های SH-SY5Y بوده است.

رده سلولی SHSY5Y، برای اولین بار در سال 1970 از بیوپسی مغز استخوان یک بیمار مبتلا به نوروبلاستوما جدا شد. این رده سلولی از اوایل دهه 1980 به‌طور گسترده به عنوان مدل آزمایشگاهی سلول‌های عصبی مورد استفاده قرار گرفته است زیرا این سلول‌ها واجد بسیاری از ویژگی‌های بیوشیمیایی و عملکردی سلول‌های عصبی هستند. این رده سلولی بیان گیرنده‌های موسکارینی، اپیوئیدی، فاکتورهای رشد عصبی و به‌طور خاص برداشت نوراپی نفرین و عملکرد آنزیم‌های عصبی مانند تیروزین و دوپامین- β -هیدروکسیلاز را نشان می‌دهد. در نتیجه استفاده از رده سلولی SHSY5Y در مطالعات عصبی آزمایشگاهی از جمله تمایز عصبی، متابولیسم و عملکرد مربوط به فرآیندهای عصبی و تحریک عصبی، سمیت عصبی و محافظت عصبی رایج است (33). بنابراین با استفاده از غلظت‌های مختلف کلرید کبالت در زمان‌های مختلف مواجهه، شرایط هیپوکسی را القا کردیم. نتایج حاصل از تست آلامار بلو نشان داد که میزان زنده ماندن سلول‌های SH-SY5Y در معرض کلرید کبالت به‌طور قابل توجهی کم‌تر از سلول‌های SH-SY5Y تیمار شده با ADSCs-CM یا DPSCs-CM می‌باشد.

با توجه به تصویر شماره 1A و 1B، ADSC-CM نسبت به گروه هیپوکسی بدون تیمار می‌تواند سلول‌های

SH-SY5Y را در برابر شرایط هیپوکسیک در تمام غلظت‌های کلرید کبالت و زمان‌های مختلف انکوباسیون (6، 12، 24 و 48 ساعت) به‌طور معناداری ($P \leq 0/01$) و DPSCs-CM ($P \leq 0/001$) محافظت کند در صورتی که تنها در زمان‌های 12 ساعت با غلظت 0/6 میلی‌مولار ($P \leq 0/05$) و زمان 24 ساعت با غلظت 0/6 میلی‌مولار ($P \leq 0/01$) توانسته است به‌طور معناداری اثرات محافظتی داشته باشد. از آن‌جا که هر دو ADSCs-CM و DPSCs-CM اثرات محافظتی قابل توجهی در وضعیت غلظت 0/6 میلی‌مولار کلرید کبالت و انکوباسیون 24 ساعته نشان دادند، تصمیم گرفتیم این شرایط را برای سایر آزمایشات انتخاب کنیم. هنگامی که بافت‌ها آسیب می‌بینند، لاکتات دهیدروژناز در جریان خون آزاد می‌شود و این ویژگی، آن را به یک شاخص مهم برای شناسایی آسیب‌ها و بیماری‌های رایج در بدن تبدیل می‌کند (22). نتایج سنجش لاکتات دهیدروژناز اثرات محافظت‌کننده عصبی ADSCs-CM و DPSCs-CM بر روی سلول‌های SH-SY5Y در برابر شرایط هیپوکسی تایید کرد. هیچ تفاوتی در میزان لاکتات دهیدروژناز بین سلول‌های SH-SY5Y تیمار شده با ADSCs-CM و DPSCs-CM مشاهده نشد. آپوپتوز نقش مهمی در رشد طبیعی فیزیولوژیکی، متابولیسم، تکامل و هموستاز سیستم عصبی بزرگسالان دارد. آپوپتوز کنترل نشده می‌تواند منجر به تحریک فرآیندهای پاتوفیزیولوژیک تخریب عصبی و شرایط پاتولوژیک مانند سکته مغزی بشود. اثر ضد آپوپتوز سلول‌های بنیادی مزانشیمی در اختلالات عصبی ثابت شده است (34). به عنوان مثال، موفقیت پیوند داخل زجاجیه‌ای DPSCs در کاهش آپوپتوز عصبی و ارتقای بقای نورون در آسیب نخاعی گزارش شده است (12). اثرات عوامل سمی مختلف می‌تواند مرگ سلولی را به طرق مختلف، از جمله مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یا آپوپتوز، القاء کند. تست PI برای بررسی القای آپوپتوز با استفاده از رنگ آمیزی PI و بررسی پیک G1-Sub در فلوئوسیتومتری انجام می‌شود.

قطعه قطعه شدن DNA یکی از رویدادهایی است که در آپوپتوز رخ می‌دهد و طی آن قطعات تک و اولیگونوکلئومی DNA تشکیل می‌شود. وقتی سلول‌ها با استفاده از محلول هیپرتونیک نفوذپذیر شوند، قطعات DNA با وزن مولکولی کم از سلول خارج می‌شود، در نتیجه سلول‌های دچار آپوپتوز دارای DNA کم‌تری هستند و قبل از پیک G1، پیک دیگری که متعلق به آن‌ها است، نشان داده می‌شود که نمایانگر درصد آپوپتوز است. PI به سلول‌های سالم نفوذناپذیر است و چون این رنگ به DNA سلول مرده متصل می‌شود، در نتیجه آپوپتوز را تعیین می‌کند (34). در این مطالعه نتایج فلوئوسیتومتری نشان داد که تیمار با ADSC-CM و DPSC-CM به طور قابل توجهی میزان آپوپتوز سلول‌های SH-SY5Y مجاور شده با کلرید کبالت را کاهش می‌دهد. به‌طور مشابه، در یک مطالعه گزارش شد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان، تعداد سلول‌های آپوپتوز را در سلول‌های اندوتلیال هیپوکسیک کاهش می‌دهند، رگزایی را تحریک می‌کنند و بقای سلولی را افزایش می‌دهند (35). مطالعه دیگری اثرات محافظت‌کننده عصبی ADSC-CM بر روی سلول‌های PC12 در معرض H_2O_2 برای القای استرس اکسیداتیو تایید کرده است (11). علاوه بر این، گزارش شده است که ADSC-CM از آپوپتوز جلوگیری می‌کند و سلول‌های PC12 را در برابر سمیت گلو تامات با تنظیم مهارکننده مرتبط با X پروتئین آپوپتوز (XIAP) از طریق فعال‌سازی فسفوئینوزیتید 3-کیناز PI3K/Akt محافظت می‌کند (36). حدس زده می‌شود که سلول‌های بنیادی مزانشیمی ممکن است آپوپتوز را از طریق مهار بیان $TNF-\alpha$ و $IL-1\beta$ در سلول‌ها به دنبال آسیب هیپوکسیک -ایسکمیک کاهش دهند (37). مطالعات قبلی نشان داده است که تولید سیتوکین‌های محافظ عصبی و مرتبط با رشد مانند PDGF-AA، لیگاند کمو کاین (CXCL-16) (CXC-16)، BDNF، angiopoietin-2 و پروتئین فعال‌کننده نوتروفیل-2 نقش مهمی در بازیابی عصبی دارند. بر اساس نتایج مطالعات

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می کنند که هیچ تضاد منافی ندارند.

منابع مالی

این مطالعه با شماره طرح 970850 و 960882 از سمت معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد حمایت شده است. این مقاله منتج از پایان نامه دکترای عمومی داروسازی از دانشگاه علوم پزشکی مشهد می باشد. بدین وسیله از دانشگاه علوم پزشکی مشهد جهت تامین هزینه های این طرح پایان نامه تشکر و قدردانی به عمل می آید.

سپاسگزاری

نویسندگان از آقای ملائکه بابت بررسی نمونه های تست فلوسایتومتری تشکر می کنند.

مختلف، اثرات محافظتی و ضد آپوپتوز سلول های بنیادی مزانشیمی و کاندیشن مدیوم آن ها ممکن است به دلیل آزادسازی فاکتورهای تغذیه ای باشد.

در پایان می توان نتیجه گیری کرد که به طور کلی، این مطالعه شواهدی را ارائه می دهد که ADSCs-CM و DPSCs-CM از طریق کاهش آپوپتوز و کاهش صدمه سلولی، اثرات محافظت کننده عصبی را در سلول های هیپوکسیک SH-SY5Y اعمال می کنند. مطالعات بیش تر ممکن است اطلاعات بیش تری در مورد مکانیسم اثر ضد آپوپتوزی ADSCs-CM و DPSCs-CM ارائه دهد.

مسائل اخلاقی

این مطالعه با کد اخلاق IR.MUMS.PHARMACY.REC.1397.087 توسط کمیته اخلاق و معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد تایید شده است.

References

1. Hsieh J-Y, Wang H-W, Chang S-J, Liao K-H, Lee I-H, Lin W-S, et al. Mesenchymal stem cells from human umbilical cord express preferentially secreted factors related to neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis. PloS one 2013; 8(8): e72604.
2. Zhang X, Zhou Y, Li H, Wang R, Yang D, Li B, et al. Intravenous administration of DPSCs and BDNF improves neurological performance in rats with focal cerebral ischemia. Int J Mol Med 2018; 41(6): 3185-3194.
3. Zhu Y, Guan Y-m, Huang H-l, Wang Q-s. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cell transplantation suppresses inflammatory responses and neuronal apoptosis during early stage of focal cerebral ischemia in rabbits. Acta Pharmacol Sin 2014; 35(5): 585-591.
4. Xu W, Zheng J, Gao L, Li T, Zhang J, Shao A. Neuroprotective effects of stem cells in ischemic stroke. Stem cells Int 2017; 2017: 4653936.
5. Mukai T, Tojo A, Nagamura-Inoue T. Mesenchymal stromal cells as a potential therapeutic for neurological disorders. Regen Ther 2018; 9: 32-37.
6. Konno M, Hamabe A, Hasegawa S, Ogawa H, Fukusumi T, Nishikawa S, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells and regenerative medicine. Dev Growth Differ 2013; 55(3): 309-318.
7. Mazini L, Rochette L, Amine M, Malka G. Regenerative capacity of adipose derived stem cells (ADSCs), comparison with mesenchymal stem cells (MSCs). Int J Mol Sci 2019; 20(10): 2523.
8. Qin Y, Zhou C, Wang N, Yang H, Gao W-Q. Conversion of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to neural stem cell-

- like cells by a single transcription factor, Sox2. *Cell Reprogram* 2015; 17(3): 221-226.
9. Dave JR, Tomar GB. Dental Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells: Applications in Tissue Engineering. *Crit Rev Biomed Eng* 2018; 46(5): 429-468.
 10. Thesleff I, Aberg T. Molecular regulation of tooth development. *Bone (New York, NY)* 1999; 25(1): 123-125.
 11. Ghorabi MT, Aliaghaei A, Sadeghi Y, Shaerzadeh F, Rad AA, Mohamadi R, et al. Evidence supporting neuroprotective effect of adipose derived stem cells on PC12 cells against oxidative stress induced by H₂O₂. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2017; 63(3): 1-6.
 12. Mead B, Logan A, Berry M, Leadbeater W, Scheven BA. Intravitreally transplanted dental pulp stem cells promote neuroprotection and axon regeneration of retinal ganglion cells after optic nerve injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; 54(12): 7544-7556.
 13. Pawitan JA. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *BioMed Res Int* 2014; 2014: 965849.
 14. Azhdari Tafti Z, Mahmoodi M, Hajizadeh MR, Ezzatizadeh V, Baharvand H, Vosough M, et al. Conditioned Media Derived from Human Adipose Tissue Mesenchymal Stromal Cells Improves Primary Hepatocyte Maintenance. *Cell J* 2021; 23(1): 143-144.
 15. Forster JJ, Köglberger S, Trefois C, Boyd O, Baumuratov A, Buck L, et al. Characterization of differentiated SH-SY5Y as neuronal screening model reveals increased oxidative vulnerability. *J Biomol Screen* 2016; 21(5): 496-509.
 16. Azimifar MA, Salmasi Z, Doosti A, Babaei N, Hashemi M. Evaluation of the efficiency of modified PAMAM dendrimer with low molecular weight protamine peptide to deliver IL-12 plasmid into stem cells as cancer therapy vehicles. *Biotechnol Prog* 2021; 37(4): e3175.
 17. Ahmadi F, Salmasi Z, Mojarad M, Eslahi A, Tayarani-Najaran Z. G-CSF augments the neuroprotective effect of conditioned medium of dental pulp stem cells against hypoxic neural injury in SH-SY5Y cells. *Iran J Basic Med Sci* 2021; 24(12): 1743-1752.
 18. Mehrabani D, Mahdiyar P, Torabi K, Robati R, Zare S, Dianatpour M, et al. Growth kinetics and characterization of human dental pulp stem cells: Comparison between third molar and first premolar teeth. *J Clin Exp Dent* 2017; 9(2): e172-e177.
 19. Tucker HA, Bunnell BA. Characterization of human adipose-derived stem cells using flow cytometry. *Methods Mol Biol* 2011; 702: 121-131.
 20. Ho C-H, Lan C-W, Liao C-Y, Hung S-C, Li H-Y, Sung Y-J. Mesenchymal stem cells and their conditioned medium can enhance the repair of uterine defects in a rat model. *J Chin Med Assoc* 2018; 81(3): 268-276.
 21. Yu X, Lu C, Liu H, Rao S, Cai J, Liu S, et al. Hypoxic preconditioning with cobalt of bone marrow mesenchymal stem cells improves cell migration and enhances therapy for treatment of ischemic acute kidney injury. *PloS one* 2013; 8(5): e62703.
 22. Shologu N, Scully M, Laffey JG, O'Toole D. Human mesenchymal stem cell secretome from bone marrow or adipose-derived tissue sources for treatment of hypoxia-induced pulmonary epithelial injury. *Int J Mol Sci* 2018; 19(10): 2996.
 23. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of cell viability by the alamarBlue assay. *Cold Spring Harb Protoc* 2018; 2018(6): 1-18.

24. Salmasi Z, Mokhtarzadeh A, Hashemi M, Ebrahimian M, Farzad SA, Parhiz H, et al. Effective and safe in vivo gene delivery based on polyglutamic acid complexes with heterocyclic amine modified-polyethylenimine. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2018; 172: 790-796.
25. Feng J, Wang W. Hypoxia pretreatment and EPO-modification enhance the protective effects of MSC on neuron-like PC12 cells in a similar way. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 482(2): 232-238.
26. Hashemi M, Abnous K, Balarastaghi S, Hedayati N, Salmasi Z, Yazdian-Robati R. Mitoxantrone-Loaded PLGA Nanoparticles for Increased Sensitivity of Glioblastoma Cancer Cell to TRAIL-Induced Apoptosis. *J Pharm Innov* 2021.
27. Jin Q, Yuan K, Lin W, Niu C, Ma R, Huang Z. Comparative characterization of mesenchymal stem cells from human dental pulp and adipose tissue for bone regeneration potential. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2019; 47(1): 1577-1584.
28. Kim KS, Lee HJ, An J, Kim YB, Ra JC, Lim I, et al. Transplantation of human adipose tissue-derived stem cells delays clinical onset and prolongs life span in ALS mouse model. *Cell Transplant* 2014; 23(12): 1585-1597.
29. Chi K, Fu R-H, Huang Y-C, Chen S-Y, Hsu C-J, Lin S-Z, et al. Adipose-derived stem cells stimulated with n-butylidenephthalide exhibit therapeutic effects in a mouse model of Parkinson's disease. *Cell transplantat* 2018; 27(3): 456-470.
30. Ma T, Gong K, Ao Q, Yan Y, Song B, Huang H, et al. Intracerebral transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells alternatively activates microglia and ameliorates neuropathological deficits in Alzheimer's disease mice. *Cell Transplant* 2013; 22(1_suppl): S113-126.
31. Luo L, He Y, Wang X, Key B, Lee BH, Li H, et al. Potential roles of dental pulp stem cells in neural regeneration and repair. *Stem Cells Int* 2018; 2018: 1731289.
32. Leong WK, Henshall TL, Arthur A, Kremer KL, Lewis MD, Helps SC, et al. Human adult dental pulp stem cells enhance poststroke functional recovery through non-neural replacement mechanisms. *Stem cells transl Med* 2012; 1(3): 177-187.
33. Xie HR, Hu LS, Li GY. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J* 2010; 123(8): 1086-1092.
34. Shao A, Wang Z, Wu H, Dong X, Li Y, Tu S, et al. Enhancement of Autophagy by Histone Deacetylase Inhibitor Trichostatin A Ameliorates Neuronal Apoptosis After Subarachnoid Hemorrhage in Rats. *Mol Neurobiol* 2016; 53(1): 18-27.
35. Hung SC, Pochampally RR, Chen SC, Hsu SC, Prockop DJ. Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem Cells* 2007; 25(9): 2363-2370.
36. Lu S, Lu C, Han Q, Li J, Du Z, Liao L, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells protect PC12 cells from glutamate excitotoxicity-induced apoptosis by upregulation of XIAP through PI3-K/Akt activation. *Toxicology* 2011; 279(1-3): 189-195.
37. Li F, Zhang K, Liu H, Yang T, Xiao DJ, Wang YS. The neuroprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated through inhibition of apoptosis in hypoxic ischemic injury. *World J Pediatr* 2020; 16(2): 193-200.