

اثرات ترمیمی سلول‌های بنیادی مزانشیمی پیش‌شرطی شده با پراکسید هیدروژن در موش‌های مدل نارسایی حاد کبدی

فاطمه نصیری^۱، فاطمه امیری^۲، مهشید محمدی‌پور^۳، صدیقه مولایی^۱، مهریار حبیبی رودکنار^۴، محمد علی جلیلی^۵

چکیده

سابقه و هدف

سلول‌های بنیادی مزانشیمی، جهت سلول درمانی مورد توجه قرار گرفته‌اند، ولی بقای پایین آن‌ها کاربردشان را محدود کرده است. در این مطالعه، سلول‌های بنیادی مزانشیمی با دوز غیر کشنده پراکسید هیدروژن (H_2O_2) پیش‌شرطی شدند و اثرات درمانی پیش‌شرطی کردن در موش‌های مدل آسیب حاد کبدی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان پاساژ چهارم با غلظت‌های مختلف H_2O_2 به مدت ۲۴ ساعت مواجه شده، با دوز کشنده ۵۰۰ میکرومولار H_2O_2 تیمار شده، سپس بقای آن‌ها با روش water soluble tetrazolium-1 ارزیابی شد. مدل آسیب حاد کبدی با استفاده از تتراکلرید کربن در موش (۷ گروه ۶ تایی) ایجاد شد. گروه‌های مختلف سلولی به موش‌ها (۴ گروه ۱۰ تایی) تزریق شده و قدرت ترمیمی سلول‌ها با آزمایش‌های بیوشیمیایی و بافت‌شناسی مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها

بقای سلول‌های پیش‌شرطی شده با ۲۵ میکرومولار H_2O_2 به مدت ۲۴ ساعت ۹۰٪ ولی بقای گروه کنترل ۱۵٪ بود. سه روز پس از سلول درمانی، میزان آنزیم‌های کبدی مانند آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) در موش‌های آسیب حاد کبدی دریافت‌کننده سلول‌های پیش‌شرطی شده با موش‌های نرمال دریافت‌کننده سلول نرمال، اختلاف معنادار نداشته و نزدیک به سطح طبیعی این آنزیم بود (154 ± 38 IU/L و 122 ± 31 IU/L). نتایج بافت‌شناسی در موش‌های تحت درمان با مزانشیم پیش‌شرطی شده، سطوح درمانی بالاتری نسبت به سایر گروه‌ها نشان داد.

نتیجه‌گیری

پیش‌شرطی کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استرس اکسیداتیو، کارایی آن‌ها را در سلول درمانی آسیب حاد کبدی بهبود می‌بخشد.

کلمات کلیدی: پیش‌شرطی کردن ایسکمیک، استرس اکسیداتیو، تتراکلرید کربن، آسیب حاد کبدی

تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۱۱

تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۱۲

- ۱- کارشناس ارشد زیست فن‌آوری پزشکی - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۲- PhD هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۳- دانشجوی PhD ژنتیک - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۴- PhD زیست فن‌آوری پزشکی - دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
- ۵- مؤلف مسؤول: PhD شیمی دارویی - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

مقدمه

کبد به عنوان ارگان مرکزی نقش حیاتی در متابولیسم، سم‌زدایی و ایمنی بدن دارد. موقعیت استراتژیک کبد سبب شده است که این عضو، هدف توکسین‌های گوناگون و مستعد بیماری‌های بسیاری باشد (۱). بیماری‌های کبدی شامل ایجاد آسیب یا التهاب در بافت کبد به گونه‌ای که عملکرد کبد را تحت تاثیر قرار دهد می‌باشند و در حالت کلی به دو دسته حاد و مزمن تقسیم می‌شوند. بیماری حاد کبدی شامل نکروز وسیع و غیر قابل برگشت بافت کبدی است و اغلب به صورت ناگهانی ایجاد می‌گردد (۲). عفونت‌ها، داروها، سموم و مواد شیمیایی مهم‌ترین عوامل ایجاد کننده این نوع بیماری‌های کبدی هستند که در آن اختلال شدید عملکرد سلول‌های کبدی در نتیجه آسیب شدید، به سرعت منجر به آنسفالوپاتی کبدی، تغییر سطح هوشیاری، اغمما و اغلب مرگ می‌گردد (۳، ۴). کبد از طریق سه منبع سلولی متفاوت چون هپاتوسیت‌های بالغ، سلول‌های بنیادی داخل کبدی و سلول‌های بنیادی خارج کبدی توانایی خود بازسازی مناسبی دارد (۵، ۶). با وجود چنین مکانیسم‌های ترمیمی، در صورتی که آسیب جدی به کبد وارد شود، مجموعه این فرایندهای بازسازی قادر به ترمیم نخواهند بود. بیماری‌های حاد کبدی، فراوانی قابل توجهی ندارند و آنچه پرداختن به این بیماری‌ها را حایز اهمیت می‌کند، مرگ و میر ۸۰ تا ۹۰ درصد علیرغم درمان‌های گسترده در افراد مبتلاست (۷، ۸).

در حال حاضر پیوند کبد اصلی ترین راه درمان این بیماری‌هاست (۹). اما متأسفانه تعداد کم اندام‌های اهدایی، عوارض مربوط به داروهای سرکوبگر ایمنی در شخص گیرنده و پیچیدگی‌های عمل جراحی، این گزینه را محدود ساخته است (۹، ۱۰). امروزه روش‌های مبتنی بر سلول درمانی (Cell therapy) در حال توسعه و به عنوان یک جایگزین مناسب برای پیوند اندام کامل مطرح می‌باشند (۱۱-۱۳). با شناسایی سلول‌های بنیادی در کبد آسیب دیده انسان و جوندگان، امیدهایی جهت استفاده درمانی از این سلول‌ها در بافت کبد ایجاد شده است. با توجه به کار برد سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (MSCs: Mesenchymal Stem Cell) در پیوندهای اتولوگ و رفع

موانعی چون سرکوب سیستم ایمنی، رد پیوند، مسایل اخلاقی و کمبود منبع سلولی، شاید بتوان آن‌ها را به عنوان یکی از بهترین گزینه‌ها جهت کاربرد در سلول درمانی انتخاب کرد (۱۴). با این وجود به علت شرایط نامساعد محیط گیرنده پیوند از جمله نبود اکسیژن و وجود رادیکال‌های آزاد اکسیژن، قسمت اعظم سلول‌های بنیادی مزانشیمی پیوند شده در روزهای ابتدایی پس از پیوند از بین رفته که این خود موجب کاهش کارایی آن‌ها می‌شود (۱۵). بنابراین اعمال درمان‌های مکمل در کنار سلول درمانی در آسیب کبدی الزامی است (۱۶). با این هدف، مطالعه‌های زیادی در زمینه دست ورزی ژنتیکی این سلول‌ها با عوامل محافظت کننده سلولی انجام شده ولی به علت خطر جهش زایی، ایمن بودن این روش هنوز مورد تردید است و کاربرد بالینی پیدا نکرده است. یکی از روش‌های دیگر که طی سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته است، استفاده از پیش شرطی کردن (Preconditioning) می‌باشد (۱۷). در پیش شرطی کردن، از عوامل استرس‌زا مانند کمبود اکسیژن (هایپوکسی)، H_2O_2 و دیگر موارد استفاده می‌شود که سلول‌ها به صورت دوره‌ای با غلظت‌های بهینه آن‌ها مواجه می‌شوند و باعث بیان ژن‌های محافظت سلولی و در نتیجه بقای سلول‌های پیوندی می‌گردد (۱۸). در این مطالعه سعی شده است با استفاده از هپاتوتوکسین شناخته شده‌ای به نام تتراکلرید کربن، ابتدا مدل تایید شده‌ای از آسیب حاد کبدی در موش NMRI القاء شود و پس از پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی پیش شرطی شده با غلظت بهینه H_2O_2 به موش‌های مبتلا، میزان بقای سلول‌ها و روند بهبود بیماری حاد کبدی مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها**آماده‌سازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی:**

در این مطالعه تجربی، از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان انسانی که از قبل در مرکز تحقیقات انتقال خون موجود بوده و مارکرهای سطحی اختصاصی آن‌ها به وسیله فلوسایتومتری مورد تایید قرار گرفته بودند، استفاده شد. از طرفی پس از یخ‌زدایی و کشت مجدد

سلول‌ها، خصوصیات ریخت‌شناسی آن‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس مورد بررسی و تایید قرار گرفت.

پیش‌شرطی کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی با H_2O_2 :

سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسانی پاساژ چهار، پس از انجام آزمایش‌های مختلف جهت بهینه‌سازی تعداد سلول‌ها به میزان ۱۴۰۰۰ سلول (تعداد کمتر سلول جهت انجام آزمایش‌های بعدی ناکافی بوده و تعداد بیشتر باعث اثرات نامطلوب هم‌چون فشار بر یکدیگر و مرگ پیش از موعد سلول‌ها می‌شد) در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط DMEM Low Glucose (سیگما، آمریکا) همراه با ۱۰٪ FBS (اینویتروژن، آمریکا)، پنی‌سیلین ۱٪ و استرپتومایسین ۱٪ (سیناژن، ایران) به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد CO_2 دار، کشت داده شدند. پس از این مدت سلول‌ها با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ میکرومولار H_2O_2 (سیگما، آمریکا) مجاور شده و ما بقی سلول‌ها به عنوان کنترل باقی ماندند. پلیت‌ها به مدت ۱۲ ساعت به انکوباتور منتقل شدند. سپس با تعویض محیط کشت و انکوباسیون به مدت ۷ ساعت، سلول‌ها ریکاور شده و در نهایت تحت شرایط کشندگی (غلظت‌های ۵۰۰ میکرومولار و ۱ میلی مولار H_2O_2) به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند.

سنجش درصد سلول‌های زنده با استفاده از روش تریپان بلو:

پس از اتمام مراحل پیش‌شرطی کردن، سلول‌ها با استفاده از تریپسین جدا شده و سوسپانسیون سلولی حاصل به نسبت یک به یک با محلول تریپان بلو ۰/۴٪ (سیگما، آمریکا) مخلوط و پس از ۳-۵ دقیقه درصد سلول‌های زنده با استفاده از شمارش سلولی در زیر میکروسکوپ نوری و لام نئوبار تخمین زده شد.

سنجش درصد بقای سلولی با استفاده از معرف WST-1:

پس از اتمام مراحل پیش‌شرطی کردن، محیط چاهک‌ها خارج شد و ۱۰ میکرولیتر از محلول (WST-1) water

soluble tetrazolium-1 (رئوش، آلمان) به همراه ۹۰ میکرولیتر از محیط DMEM Low Glucose بر روی سلول‌های موجود در هر چاهک اضافه و پلیت‌های حاوی سلول و WST-1 به مدت ۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵٪ CO_2 دور از نور نگهداری شدند. سپس جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزاخوان خوانده شده و نتایج تفسیر گردید. تمام مراحل آزمایش فوق به صورت دوتایی (دپلیکیت) انجام شد.

حیوانات تحت مطالعه:

این مطالعه تجربی در موش‌های نر ۸ هفته ای نژاد NMRI تهیه شده از دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام شد. (Naval Medical Research = NMRI Institute) موش‌های سوئیسی کوچک و سفید آزمایشگاهی می‌باشد که از نظر ظاهر مشابه گونه موش‌های بالبیسی (سیاه رنگ) هستند و امروزه به عنوان یک مدل متداول در مطالعات آزمایشگاهی در زمینه سم‌شناسی، تراتولوژی، فارماکولوژی و فیزیوفارماکولوژی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۱-۱۹). ما نیز در مطالعه خود از این گونه موش با توجه به اندازه کوچک و سهولت در مدیریت و استفاده، سازگاری بالا با محیط در فضای آزمایشگاهی نسبت به گونه‌های مشابه، وزن‌گیری سریع و مقرون به صرفه بودن از نظر نیروی انسانی و اقتصادی بهره بردیم.

از آن جا که موش‌ها به محیط استریل و تجهیزات خاص جهت نگهداری نیاز نداشتند، این حیوانات یک هفته قبل از شروع آزمایش در قفسه‌های مخصوص به همراه ظرف آب مخصوص و غذای مناسب به اتاق نگهداری حیوانات در ساختمان پالایشگاه منتقل و در شرایط استاندارد از نظر نور (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی)، غذا و آب نگهداری شدند. دستورالعمل این تحقیق مطابق قوانین بین‌المللی رفتار با حیوانات آزمایشگاهی انجام گردید.

ایجاد نارسایی کبدی حاد با تتراکلرایدکربن:

جهت القای نارسایی حاد کبدی، ابتدا موش‌ها به ۷ گروه

(AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) که از مهم‌ترین شاخص‌های نارسایی کبدی هستند، ارسال گردید.

ارزیابی بافت‌شناسی:

نمونه‌های کبدی تا چهار روز بعد از تزریق تتراکلرید کربن، پس از انجام کالبدگشایی در فرمالین ۱۰٪ (مرک، آلمان) ثابت شدند. نمونه‌های تهیه شده از بافت کبدی مطابق روش‌های معمول پردازش شده و پس از قالب‌گیری با پارافین، برش‌هایی با ضخامت ۴ تا ۶ میکرون از آن‌ها تهیه شد. اسلایدهای تهیه شده با روش هماتوکسیلین و ائوزین H&E (جهت بررسی میزان نکروز) رنگ‌آمیزی و مورد بررسی قرار گرفت. در اسلایدهای H&E میزان نکروز به صورت نیمه کمی براساس وسعت نکروز و انتشار سلول‌های التهابی به صورت زیر درجه بندی شد: صفر: عدم وجود ضایعه، یک: وجود نکروز خفیف هپاتوسیت‌ها همراه با واکنش التهابی خفیف، دو: نکروز منتشر هپاتوسیت‌ها به صورت پل‌های نکروتیک بین لوبولی همراه با واکنش التهابی و سه: از بین رفتن کامل لوبول‌ها، نکروز منتشر هپاتوسیت‌ها همراه با واکنش التهابی منتشر لوبول‌ها.

ارزیابی میزان زنده‌مانی موش‌ها:

در این مرحله از تحقیق نیز ۷ گروه ۱۰ تایی از موش‌ها طبق جدول ۱ مورد مطالعه قرار گرفتند. کلیه حیوانات در این مرحله تا ۴ روز پس از تزریق دوزهای مختلف تتراکلرید کربن به صورت منظم از نظر میزان مرگ و میر مورد ارزیابی قرار گرفته و اطلاعات مربوطه ثبت گردید.

ارزیابی دوز مناسب / ایجادکننده نارسایی حاد کبدی:

دوز تزریقی تتراکلرید کربن باید در عین ایجاد سطح مناسبی از نارسایی حاد کبدی، میزان زنده‌مانی مطلوب به منظور هرگونه اقدام درمانی را نیز ایجاد کند. لذا کلیه نتایج حاصل از بافت‌شناسی و اندازه‌گیری آنزیم‌های سرمی در گروه‌های تحت تزریق مقادیر مختلف تتراکلرید کربن در مرحله اول و هم چنین میزان زنده‌مانی موش‌ها در گروه‌های مختلف در مرحله دوم مورد بررسی قرار گرفت.

۶ تایی به صورت تصادفی تقسیم شدند (جدول ۱). سپس تتراکلرید کربن (مرک، آلمان) محلول در روغن زیتون با مقادیر ذکر شده در جدول ۱ به صورت داخل صفاقی در دوزهای مختلف تزریق شدند (لازم به ذکر است که واحد غلظت حجمی تتراکلرید کربن mL/kg است و وزن موش‌ها به گرم و در نهایت غلظت حجمی ذکر شده در حجم تزریقی ۰/۲ میلی لیتر به هر موش تنظیم می‌شد). گروه ۱ نیز به عنوان کنترل سالم در نظر گرفته شد و به موش‌های گروه ۲ (Sham) نیز حلال تتراکلرید کربن (روغن زیتون) تزریق گردید. حجم همه تزریق‌ها به موش‌ها یکسان و مقدار آن ۰/۲ میلی لیتر به ازای هر ۲۵ گرم موش بود (از آنجا که در این مطالعه از موش با وزن ۲۵ گرم استفاده می‌شد، حجم نهایی تزریق به هر موش ۰/۲ میلی لیتر بود).

جدول ۱: گروه‌های حیوانی مورد مطالعه به همراه نوع و مقدار ماده تتراکلرید کربن تزریق شده به آن‌ها

گروه ۱	کنترل
گروه ۲	تجویز روغن زیتون (گروه Sham)
گروه ۳	تجویز ۰/۵ mL/kg تتراکلرید کربن محلول در روغن زیتون
گروه ۴	تجویز ۱ mL/kg تتراکلرید کربن محلول در روغن زیتون
گروه ۵	تجویز ۱/۵ mL/kg تتراکلرید کربن محلول در روغن زیتون
گروه ۶	تجویز ۲ mL/kg تتراکلرید کربن محلول در روغن زیتون
گروه ۷	تجویز ۲/۵ mL/kg تتراکلرید کربن محلول در روغن زیتون

آزمون بیوشیمیایی سرم:

۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از تزریق تتراکلرید کربن، نمونه خون از قلب موش‌ها تحت بیهوشی عمیق با کتامین (۱۵۰ mg/kg) و گزیلازین (۱۵ mg/kg) (آلفاسان، هلند) اخذ و درون لوله‌های فاقد ماده ضد انعقاد به آزمایشگاه به منظور اندازه‌گیری آنزیم‌های آسپاراتات آمینوترانسفراز

جدول ۲: گروه‌های حیوانی مورد مطالعه به همراه نوع و مقدار سلول‌های بنیادی مزانشیمی تزریق شده به آن‌ها

گروه موش‌های کنترل سالم که ۱ میلیون سلول بنیادی مزانشیمی محلول در ۲۰۰ میکرولیتر PBS به آن‌ها تزریق شد.	Normal-MSCs
گروه موش‌های تحت نارسایی حاد کبدی که ۲۰۰ میکرولیتر روغن زیتون به آن‌ها تزریق شد.	ALF-PBS (Sham)
گروه موش‌های تحت نارسایی حاد کبدی که ۱ میلیون سلول بنیادی مزانشیمی محلول در ۲۰۰ میکرولیتر PBS به آن‌ها تزریق شد.	ALF-MSCs
گروه موش‌های تحت نارسایی حاد کبدی که ۱ میلیون سلول بنیادی مزانشیمی پیش شرطی شده با دوز بهینه H_2O_2 محلول در ۲۰۰ میکرولیتر PBS به آن‌ها تزریق شد.	ALF-MSCs-Pre

پیش‌شرطی شده بودند، در مقایسه با سلول‌های کنترل (بدون پیش‌شرطی) در مواجهه با دوز کشندگی ۵۰۰ میکرو مولار از H_2O_2 ، تقریباً به طور متوسط به میزان چهار برابر افزایش یافت اما میزان مرگ و میر در سلول‌های پیش‌شرطی شده با غلظت ۱ میلی‌مولار و سلول‌های کنترل یکسان بود و بیش از ۸۵٪ سلول‌ها دچار مرگ شدند. پس غلظت ۵۰۰ میکرومولار به عنوان غلظت کشنده H_2O_2 انتخاب شد. به منظور تایید بیشتر، میزان بقای سلولی پس از پیش‌شرطی کردن با H_2O_2 با WST-1 نیز بررسی شد (نمودار ۱). بر طبق نمودار ۱، درصد بقای سلول‌های پیش‌شرطی شده با غلظت‌های ۲۰ و ۲۵ میکرومولار به میزان قابل توجهی افزایش یافته است.

تتراکلرید کربن با افزایش آنزیم‌های کبدی ناشی از تخریب سلولی و تغییرات بافتی باعث القای نارسایی حاد کبدی شد:

در این مطالعه جهت القای مدل نارسایی حاد کبدی از تتراکلریدکربن استفاده شد. سپس جهت اطمینان از صحت القای مدل، سطح سرمی ALT و AST، بافت‌شناسی مقاطع کبدی و میزان بقای موش‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تیمار حیوانات با دوزهای مختلف تتراکلرید کربن باعث افزایش قابل توجه ALT و AST سرمی نسبت به گروه‌های Sham (تزریق روغن زیتون) و کنترل (بدون هیچ تزریقی) شد.

پیوند سلولی در گروه‌های حیوانی مدل نارسایی حاد کبدی: به موش‌های مدل نارسایی حاد کبدی ایجاد شده با دوز مناسب تتراکلرید کربن از مرحله قبل، گروه‌های متفاوت سلولی از طریق ورید دمی تزریق گردید. جهت انجام مطالعه موش‌ها به چهار گروه ده تایی تقسیم‌بندی شدند (جدول ۲). سپس طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از سلول درمانی، آزمایش‌های بیوشیمیایی، بافت‌شناسی و همچنین پیگیری زنده‌مانی گروه‌های متفاوت همانند روش توصیف شده در بالا مجدداً انجام شد.

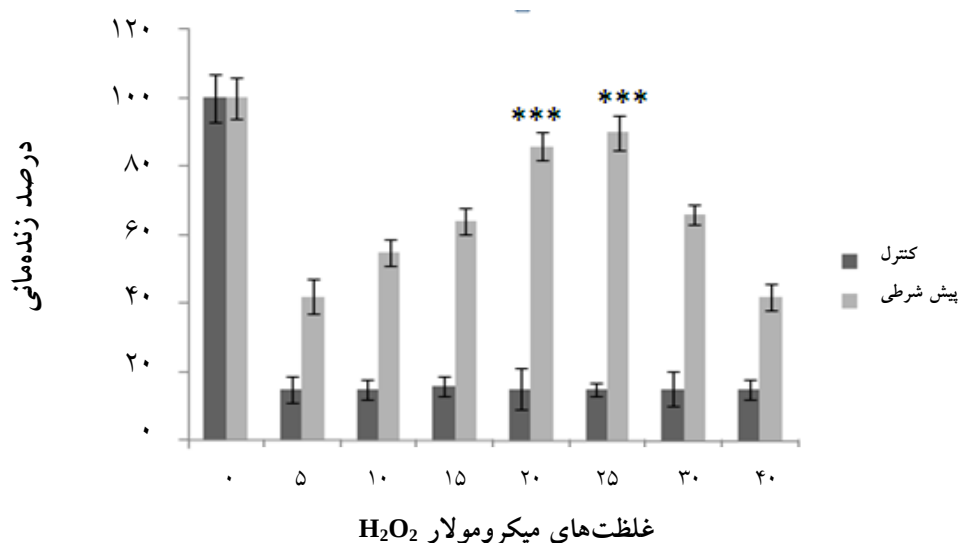
بررسی‌های آماری:

داده‌های کمی با استفاده از برنامه نرم افزاری SPSS ۱۹ و روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل آماری واقع شدند. در آنالیز واریانس، معناداری اختلاف در سطح ۰/۰۵ یا ۰/۰۱ یا ۰/۰۰۱ میان گروه‌ها با استفاده از آزمون Games-Howell و یا تعیین گردید.

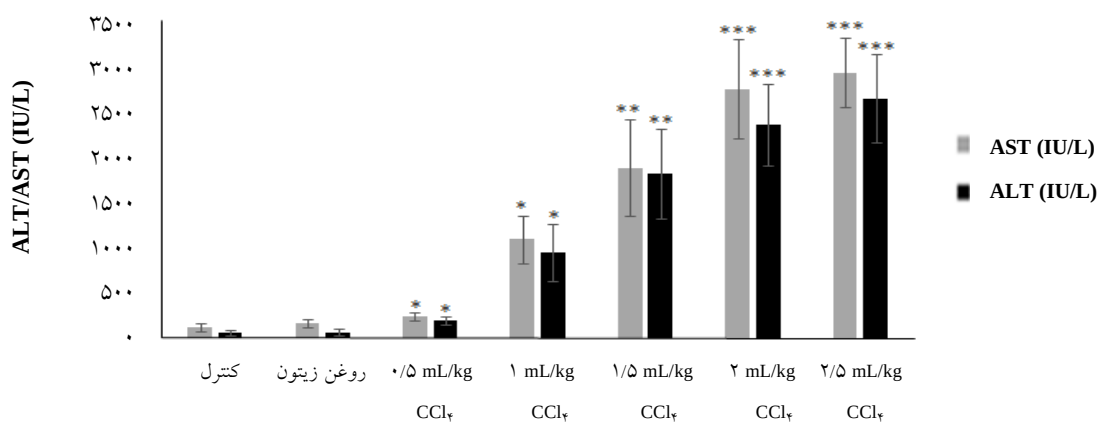
یافته‌ها

سلول‌های بنیادی مزانشیمی پیش‌شرطی شده با H_2O_2 در برابر مقادیر کشنده این ماده مقاوم‌تر بودند:

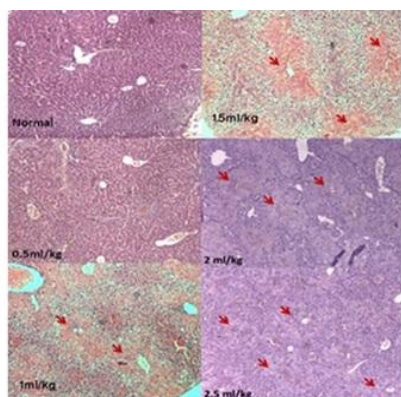
به منظور سنجش میزان زنده‌مانی سلول‌های پیش‌شرطی شده، این سلول‌ها تحت شرایط مقادیر کشنده H_2O_2 کشت داده شده و با تربیان‌بلو رنگ‌آمیزی شدند. میزان زنده‌مانی سلول‌هایی که با محدوده غلظت بین ۲۰ تا ۲۵ میکرو مولار



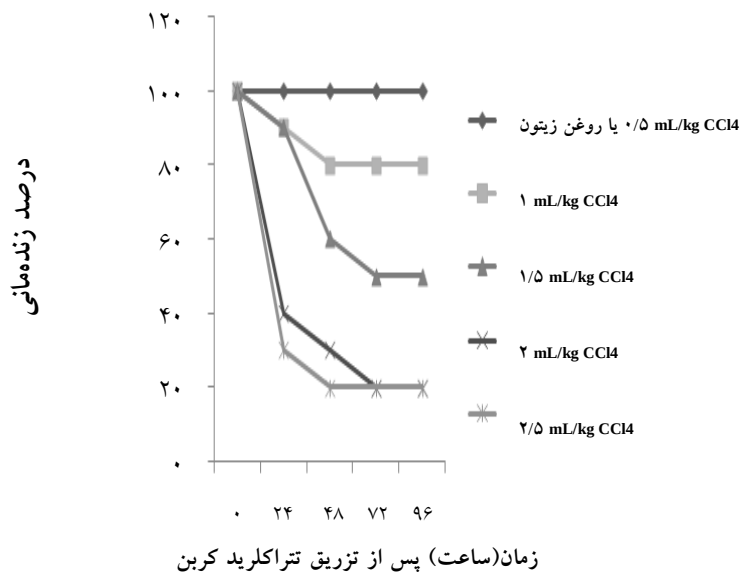
نمودار ۱: میزان بقای سلول‌های پیش‌شرطی شده با دوزهای مختلف H₂O₂ پس از تیمار ۲۴ ساعته با غلظت ۵۰۰ میکرومولار این ماده در مقایسه با گروه کنترل (سلول‌های بنیادی مزانشیمی نرمال بدون هیچ نوع تیمار یا پیش‌شرطی کردن). با استفاده از WST-1: درصد زنده‌مانی سلول‌های پیش‌شرطی شده با غلظت‌های ۲۰ و ۲۵ میکرومولار H₂O₂ به میزان قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت (عدد صفر غلظت صفر H₂O₂ یا شرایط بدون حضور این ماده را نشان می‌دهد). داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند (***: p < ۰/۰۰۱).



نمودار ۲: اندازه‌گیری سطح سرمی آنزیم‌های ALT و AST ۲۴ ساعت بعد از تزریق دوزهای مختلف تتراکلرید کربن. افزایش سطوح سرمی این آنزیم‌ها با توجه به دوز تزریقی نسبت به گروه کنترل معنادار بوده ولی به تدریج در ساعت‌های بعد دچار کاهش شد (p < ۰/۰۱: ** و ***: p < ۰/۰۰۱).



شکل ۱: بررسی تغییرات بافت شناسی کبد با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین H&E. در بافت نرمال و دوزهای کمتر از ۱/۵ mL/kg تتراکلرید کربن هپاتوسیت‌ها به طور منظم در اطراف ورید مرکزی به صورت شعاعی قرار دارند و درجه خفیفی از نکروز مشاهده شد (نوک پیکان). در دوز ۱/۵ mL/kg نکروز درجه ۲ در اطراف ورید مرکزی به همراه پل‌های نکروتیک بین لوبولی مشاهده شد (نوک پیکان). در دوزهای بالاتر نکروز انعقادی حاد چند کانونی مشاهده شد (بزرگ‌نمایی ۴۰x).



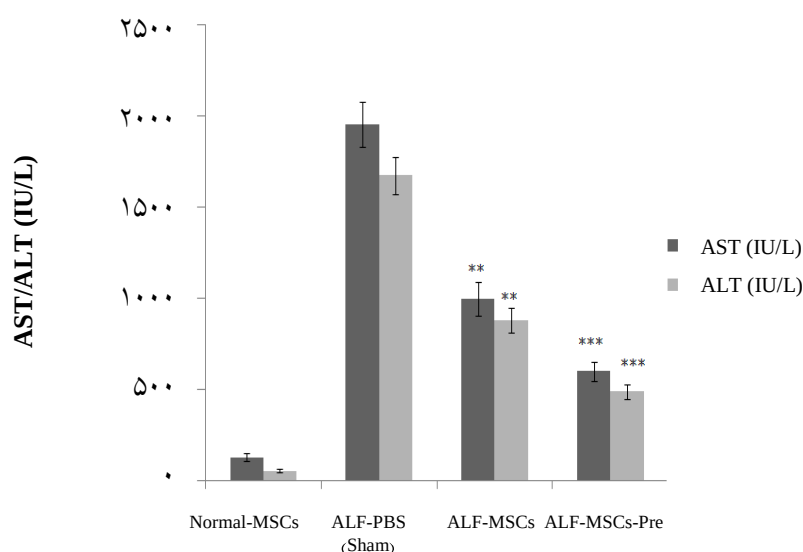
نمودار ۳: بررسی میزان زنده‌مانی موش‌ها. در گروه دوز ۱/۵ mL/kg تتراکلریدکربن ۷۲ ساعت بعد از تزریق میزان زنده‌مانی ۵۰٪ بود و بعد از آن موش‌ها زنده ماندند.

بیماری با دوز ۱/۵ میلی لیتر بر کیلوگرم تتراکلرید کربن انجام شد.

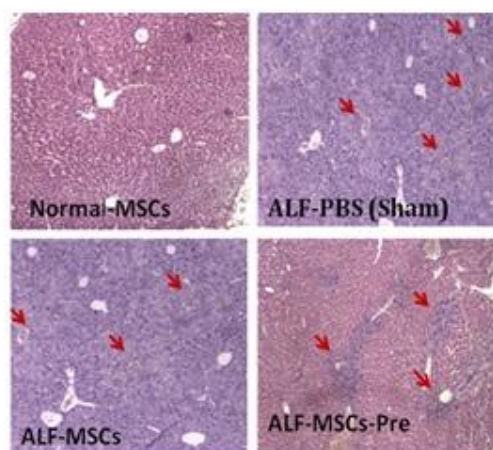
سلول درمانی با گروه‌های مختلف MSCs در مدل نارسایی حاد کبدی باعث کاهش سطح سرمی آنزیم‌های کبدی، بهبود بافت کبد و افزایش میزان بقای موش‌ها طی سه روز پس از پیوند شد.

پس از تزریق گروه‌های سلولی مختلف به گروه موش‌های تحت مطالعه، میزان اثرات درمانی و ترمیمی آن‌ها با اندازه‌گیری سطح سرمی آنزیم‌های کبدی و بررسی مقاطع بافتی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که روند کاهش سطح آنزیم‌های AST و ALT طی ساعات مختلف پس از سلول درمانی میان گروه‌های درمانی مختلف، تفاوت بسیاری نشان می‌دهد به طوری که سطوح آنزیم‌های بیوشیمیایی شاخص کبدی در گروه‌های تحت درمان با MSCs پیش شرطی شده (ALF-MSCs-Pre) و گروه MSCs معمولی (ALF-MSCs) در زمان‌های پیگیری شده نسبت به گروه‌های Sham تفاوت معناداری نشان می‌دهد. این نتایج حاکی از مهار شدت آسیب اولیه القا شده توسط تتراکلرید کربن و کاهش مرگ هپاتوسیت‌ها و آزادسازی این آنزیم‌ها به خون است (نمودار ۴ و شکل ۲).

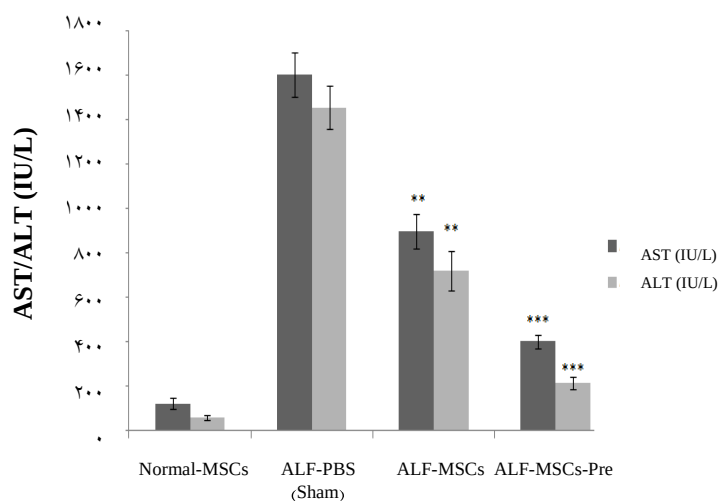
این نتایج حاکی از القای آسیب به غشای هپاتوسیت‌ها و آزادسازی این آنزیم‌ها به خون است که ۲۴ ساعت بعد از تزریق به شدت افزایش یافته ولی به تدریج در ساعات‌های بعد دچار کاهش شد (نمودار ۲). مطالعه‌های بافت‌شناسی کبد نیز حاکی از القای آسیب کبدی درجه ۲ و بیشتر در ناحیه مرکز لوبولی همراه با تشکیل پل‌های نکروتیک بین لوبولی و التهاب درجه ۲ در دوز ۱/۵ میلی‌لیتر بر کیلوگرم تتراکلرید کربن بود. از طرفی میزان آسیب کبدی تا ۴ روز بعد از تزریق تتراکلریدکربن هم‌چنان یکسان باقی ماند، هر چند که در ۷۲ ساعت بعد از تزریق، نشانه‌هایی مبنی بر ترمیم بافتی در مقاطع بافت‌شناسی مشاهده شد. درجه آسیب در دوزهای بالاتر تتراکلرید کربن بسیار شدید بوده و سطوح مقایسه‌ای مناسبی را ایجاد نکرد و از طرفی در دوزهای پایین‌تر نیز سطوح پایینی از آسیب مشاهده شد (شکل ۱). از طرفی در گروه تحت آسیب با دوز ۱/۵ میلی‌لیتر بر کیلوگرم تتراکلرید کربن، زنده‌مانی در موش‌ها تا ۷۲ ساعت بعد از تزریق ۵۰٪ بود، از ۷۲ ساعت به بعد کل موش‌ها زنده می‌ماندند و میزان مرگ و میر پس از آن صفر بود و در گروه‌ها با دوز بالاتر میزان زنده‌مانی تا ۷۲ ساعت بعد از تزریق ۲۰٪ و در دوزهای پایین‌تر درصد زنده‌مانی تا ۸۰٪ مشاهده شد (نمودار ۳). از این رو القای



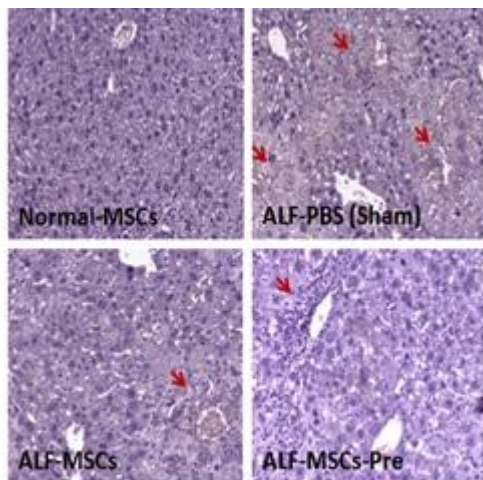
نمودار ۴: بررسی سطح سرمی آنزیم‌ها. سطح آنزیم‌های AST و ALT در گروه‌های تحت درمان نسبت به sham به صورت معنا داری پایین است (**: $p < 0.01$ و ***: $p < 0.001$).



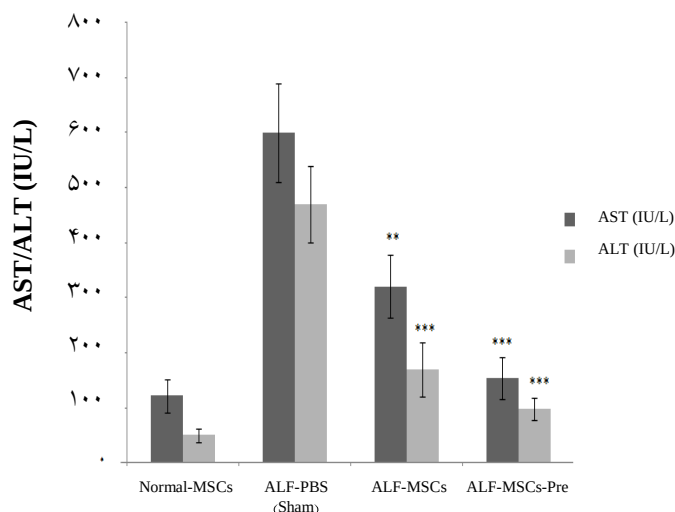
شکل ۲: بررسی تغییرات بافت‌شناسی کبد با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و اتوزین H&E. گروه ALF-PBS (Sham): نکروز درجه ۲ و پل‌های نکروتیک بین لوبولی (نوک پیکان). گروه ALF-MSCs: نکروز درجه ۲ و پل‌های نکروتیک بین لوبولی با وسعت کاهش یافته (نوک پیکان). گروه ALF-MSCs-Pre: نکروز درجه ۱ و پل‌های نکروتیک پراکنده بین لوبولی (نوک پیکان) (بزرگ‌نمایی ۴۰x).



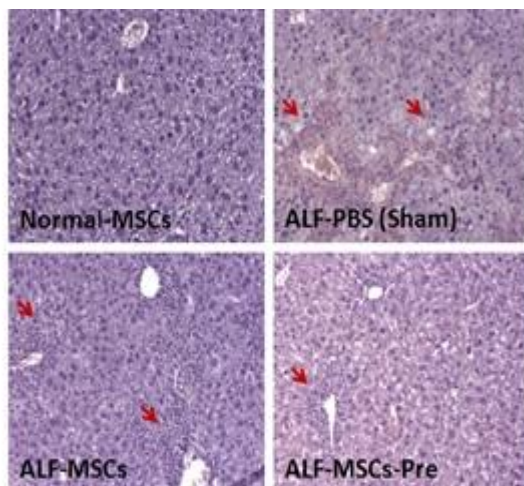
نمودار ۵: بررسی سطح سرمی آنزیم‌ها. روند کاهش سطح آنزیم‌های AST و ALT میان گروه‌های درمانی مختلف نسبت به هم از یک سو و گروه sham از سوی دیگر، تفاوت بسیاری نشان می‌دهد (**: $p < 0.01$ و ***: $p < 0.001$).



شکل ۳: بررسی تغییرات بافت‌شناسی کبد با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و انوزین H&E. گروه ALF-PBS (Sham): نکروز درجه ۲ و پل‌های نکروتیک بین لوپولی (نوک پیکان). گروه ALF-MSCs: نکروز درجه ۱ محدود به نواحی سترال لوپول‌ها بدون پل‌های نکروتیک (نوک پیکان). گروه ALF-MSCs-Pre: نکروز کنترل شده همراه با تراکم بالایی از سلول‌های التهابی در اطراف ورید مرکزی (نوک پیکان) (بزرگ‌نمایی $\times 100$).



نمودار ۶: بررسی سطح سرمی آنزیم‌ها. سطح آنزیم‌های AST و ALT در گروه‌های تحت درمان نسبت به sham به صورت معناداری پایین است و میزان آنزیم در گروه ALF-MSCs-Pre نسبت به سایر گروه‌ها نزدیک به سطح طبیعی آن در موش سالم بود ($p < 0.01$: ** و $p < 0.001$: ***).



شکل ۴: بررسی تغییرات بافت‌شناسی کبد با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و انوزین H&E. گروه ALF-PBS (Sham): نکروز درجه ۲ و پل‌های نکروتیک بین لوپولی همراه با کاهش التهاب سلولی (نوک پیکان). گروه ALF-MSCs: نکروز محدود به نواحی سترال لوپول‌ها و تراکم بالایی از سلول‌های التهابی به منظور شروع فرایندهای ترمیمی. گروه ALF-MSCs-Pre: نکروز مشاهده نشد و کاهش تراکم سلول‌های التهابی در اطراف ورید مرکزی و پیشرفت فرایندهای ترمیمی (نوک پیکان) (بزرگ‌نمایی $\times 100$).

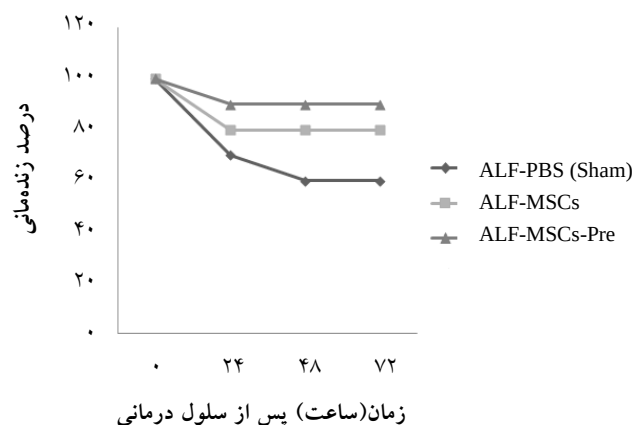
ALF-MSCs-Pre ۹۰٪ بوده و در روزهای بعد موش‌ها زنده می‌ماندند (نمودار ۷).

بحث

نارسایی حاد کبدی، یک سندرم بالینی است که در آن اختلال شدید عملکرد سلول‌های کبدی در نتیجه نکرروز حاد جمعیت کثیری از هپاتوسیت‌ها به طور کاملاً ناگهانی و با پیشروی سریع ایجاد می‌گردد (۲۲). سلول‌های بنیادی مزانشیمی پس از تزریق به سمت بافت‌های آسیب دیده از جمله کبد حرکت کرده و باعث تسریع ترمیم این بافت‌ها می‌شوند (۲۳-۲۵). اما درصد بالایی از آن‌ها پس از تزریق از بین رفته و این خود باعث کاهش کارایی آن‌ها می‌شود (۱۳، ۲۶).

در این مطالعه پیش‌شرطی کردن سلول‌های بنیادی با استفاده از H_2O_2 موجب افزایش مقاومت در سلول‌ها شد که خطرات و نگرانی ناشی از دست‌ورزی ژنتیکی را به همراه نداشت. در تایید مطالب ذکر شده یانگ و همکارانش در سال ۲۰۰۵ در طی مطالعه‌های خود رده سلولی PC12 را از طریق غلظت بهینه H_2O_2 پیش‌شرطی کرده و اثرات محافظتی آن در برابر استرس اکسیداتیو از طریق کاهش آپوپتوز سلولی با مکانیسم‌هایی چون ROS، MMP و Bcl-2 را ثابت کردند (۲۷). در همین راستا لی و همکارانش در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که پیش‌شرطی کردن MSCs با H_2O_2 از طریق افزایش بیان مولکول چسبندگی CXCR4 سبب افزایش بقای سلولی می‌شود (۲۸). مطالعه این گروه آزمایشگاهی و تنها در مرحله *In vitro* بوده و اثرات سلول درمانی این سلول‌های پیش‌شرطی شده در کارآزمایی بالینی بررسی نشده بود.

به منظور ایجاد موش مدل نارسایی حاد کبدی از هپاتوتوکسینی به نام تتراکلرید کربن استفاده شد. با توجه به نتایج به دست آمده مشخص گردید که تزریق ۱/۵ میلی‌لیتر بر کیلوگرم از تتراکلرید کربن منجر به نکرروز وسیع و گسترده و تجمع سلول‌های التهابی در اطراف ورید مرکزی و هم چنین افزایش فعالیت سرمی AST و ALT در حیوانات می‌شود. بیشتر اثرات سمی تتراکلرید کربن در اثر متابولیزه شدن به رادیکال‌های تری‌کلرومتیل توسط



نمودار ۷: بررسی میزان زنده‌مانی موش‌ها طی زمان‌های مختلف پس از پیوند گروه‌های مختلف سلولی به موش‌های مدل نارسایی حاد کبدی. میزان زنده‌مانی در گروه ALF-MSCs ۲۴ ساعت بعد از سلول درمانی ۸۰٪ و در گروه ALF-MSCs-Pre ۹۰٪ بود و در روزهای بعد موش‌ها زنده می‌ماندند.

مطالعه‌های بافت‌شناسی کبد حاکی از آن بود که در روزهای مختلف بعد از تزریق، گروه‌های سلولی وسعت آسیب و درجه نکرروز در گروه‌های تحت درمان نسبت به گروه Sham در حال کاهش است (شکل‌های ۲-۴ و نمودارهای ۴-۶). این ترمیم در زمان ۷۲ ساعت بعد از تزریق کاملاً مشهود بود. بعد از ۷۲ ساعت در گروه Sham نکرروز بافتی هم‌چنان درجه ۲ می‌باشد ولی میزان التهاب هپاتوسیت‌ها در حال کاهش است.

در گروه دریافت‌کننده سلول مزانشیمی معمولی (ALF-MSCs)، بعد از ۷۲ ساعت نکرروز خفیف و تراکم بالایی از سلول‌های التهابی مشاهده شد که نشان‌دهنده شروع فرآیندهای ترمیمی است و در گروه‌های تحت درمان با MSCs پیش‌شرطی شده (ALF-MSCs-Pre) نکرروز سلولی کنترل شده و بافت به سمت نرمال شدن پیش می‌رود (شکل ۴).

روند مرگ و میر در گروه‌های مختلف متفاوت بوده و همان‌طور که مشاهده می‌شود، در تمام گروه‌ها در موش‌هایی که تحت سلول درمانی قرار گرفته‌اند تا ۲۴ ساعت بعد از دریافت گروه‌های مختلف سلولی مرگ و میر مشاهده شد به طوری که میزان زنده‌مانی در گروه ALF-MSCs، ۲۴ ساعت بعد از سلول درمانی ۸۰٪ و در گروه

سیتوکروم P450 ایجاد می شود که منجر به آسیب لیپیدها، اسیدهای نوکلئیک و ترکیبات دیگر سلول ها شده و منجر به القای نکروز در سلول های پارانشیمی کبد می شود (۲۹). این آسیب موجب آزادسازی AST و ALT از مواضعشان در میتوکندری و سیتوزول هپاتوسیت ها و آزاد شدن به خون می گردد (۳۰).

پس از تزریق سلول های پیش شرطی شده به موش های مدل نارسایی حاد کبدی، نتایج بافت شناسی حاکی از این بود که پیوند سلول های بنیادی مزانشیمی پیش شرطی شده با دوز بهینه H_2O_2 نسبت به سلول های بنیادی مزانشیمی کنترل (MSCs) معمولی که تحت هیچ گونه فرآیند پیش شرطی کردن قرار نگرفته اند، میزان آسیب اولیه ایجاد شده در بافت کبدی را کاهش داده و فرآیند بهبودی در سطح بالاتری مشاهده می شود و افت آنزیم های شاخص کبدی ALT و AST با سرعت بیشتری انجام می شود و از طرفی باعث شده میزان زنده ماندن موش های تحت بررسی افزایش یابد به طوری که زنده ماندن در موش های دریافت کننده سلول بنیادی مزانشیمی پیش شرطی شده ۹۰٪ و در گروه دریافت کننده سلول مزانشیمی کنترل، ۸۰٪ بود. با بررسی آماری، اختلاف زنده ماندن موش ها در دو گروه یاد شده معنادار نبود. اما تغییرات بیوشیمیایی و بافت شناسی دو گروه قابل توجه بود. به نظر می رسد بررسی و ثبت

زنده ماندن موش ها در بازه زمانی بیشتر یا انجام مطالعه بر روی تعداد بیشتر موش (که در این تحقیق از نظر زمانی و بودجه ای مقدور نبود)، اختلاف زنده ماندن بیشتری را در دو گروه باعث شود. از طرفی اثرات درمانی سلول های بنیادی مزانشیمی در بیماری های کبدی قبلاً هم گزارش شده است، اما به کارگیری روش های مختلف جهت افزایش این اثرات هر چند در مقیاس کم نیز نوید بخش می باشد. که در این تحقیق پیش شرطی کردن سلول های بنیادی مزانشیمی با پراکسید هیدروژن باعث افزایش ۱۰ درصدی زنده ماندن موش ها به علاوه اثرات درمانی سریع تر در بررسی بیوشیمی و بافت شناسی شد. ربانی و همکارانش گزارش کردند که سلول های بنیادی مزانشیمی می توانند سبب کنترل و ترمیم فیروز ناشی از تراکلرید کربن در موش ها شوند (۳۱). مطالعه گروه ربانی بر روی مدل فیروز کبدی و نه بر روی مدل آسیب حاد کبدی انجام شده بود. از طرفی این گروه از سلول های بنیادی نرمال بدون انجام مراحل پیش شرطی استفاده کرده بودند و اثرات پیش شرطی کردن بر قابلیت های درمانی سلول های بنیادی مزانشیمی را بررسی نکرده بودند. مطالعات استوک و همکارانش بیانگر نقش سلول های مزانشیمی مغز استخوان انسانی در بهبود کبدی موش های مدل مسمومیت استامینوفن از طریق جلوگیری از پیشرفت آسیب می باشد (۳۲).

جدول ۳: خلاصه ای از مطالعه های انجام شده در زمینه سلول درمانی بیماری های کبدی

مطالعه	نوع سلول	بیماری کبدی/مدل حیوانی	نتایج
مطالعه اخیر (۲۰۱۴)	سلول بنیادی مزانشیمی پیش شرطی شده مغز استخوان انسان	آسیب حاد کبدی القاء شده با تراکلرید کربن / موش	کنترل نکروز و ترمیم در طی ۷۲ ساعت، کاهش آنزیم کبدی از ۲۴ ساعت پس از پیوند
ربانی (۲۰۱۰) (۳۱)	سلول بنیادی مزانشیمی موش	فیروز کبدی القاء شده با تراکلرید کربن / موش	کاهش فیروز پس از ۴ هفته
استوک (۲۰۱۴) (۳۲)	هپاتوسیت مشتق از سلول بنیادی مزانشیمی انسان	آسیب حاد کبدی القاء شده با استامینوفن / موش	ترمیم آسیب پس از ۷ هفته
میزونو (۲۰۱۴) (۳۳)	سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسان	آسیب حاد کبدی القاء شده با استامینوفن / موش	کاهش آنزیم کبدی و التهاب پس از ۱ هفته
گروتادوریا (۲۰۱۳) (۳۴)	سلول بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرائی	آسیب حاد کبدی القاء شده با تراکلرید کربن / موش صحرائی	کاهش آنزیم کبدی از روز سوم پس از پیوند

در گروه دریافت‌کننده سلول‌های نرمال، نکرورز در نواحی مرکزی لوبول‌های کبدی هنوز مشاهده می‌شد و از طرفی در گروه شم که سلول دریافت نکرده بودند، پل‌های نکروتیک بین لوبولی همراه با التهاب سلولی پایدار مشاهده شد و این دو گروه به زمان بیشتری جهت ترمیم بافت کبد نیاز داشتند.

نتیجه‌گیری

پیش‌شرطی کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی با پراکسید هیدروژن، راهکاری جدید در راستای افزایش بقا و بهبود عملکرد سلول‌های بنیادی مزانشیمی در ترمیم بافت کبد در مدل نارسایی حاد کبدی را جهت بهبود کارایی و کیفیت سلول درمانی در آینده ارایه می‌دهد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق به عنوان پایان‌نامه دانشجویی کارشناسی ارشد خانم فاطمه نصیری از محل بودجه‌های مرکز تحقیقات انتقال خون، مؤسسه عالی آموزشی پژوهشی طب انتقال خون تامین اعتبار گردید. برخی از هزینه‌های مالی این تحقیق از محل صندوق حمایت از پژوهشگران و نخبگان تامین گردید.

هم چنین در مطالعه‌ای مشابه که در سال ۲۰۱۴ انتشار یافت، نشان دادند که سلول‌های مزانشیمی جدا شده از بافت چربی سبب بهبود بقای موش‌های مدل نارسایی حاد کبدی می‌شوند (۳۳). به علاوه، گروتادوریا و همکارانش نیز تصویر کاهش یافته‌ای از میزان آسیب هپاتوسیت‌ها در موش‌های صحرایی مدل نارسایی حاد کبدی به دنبال پیوند اتولوگ سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان را نشان دادند (۳۴). برخی از مطالعه‌های انجام شده در زمینه استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در درمان بیماری‌های کبدی به طور خلاصه در جدول ارایه شده است (جدول ۳).

وجود تفاوت در روش‌های ایجاد مدل مطالعه‌های نارسایی کبدی، نحوه پیوند سلولی، نوع سلول پیوندی و بسیاری از پارامترهای دیگر موجب تنوع در نتایج حاصله از این قبیل مطالعه شده است.

به طور کلی در این مطالعه پیش‌شرطی کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی با H_2O_2 باعث افزایش بقای آن‌ها پس از تزریق به موش‌های مدل آسیب حاد کبدی شده و کارایی آن‌ها را در ترمیم بافت کبد آسیب دیده در زمان کوتاه‌تر و مناسب افزایش داد. به طوری که ۷۲ ساعت پس از تزریق سلول‌های پیش‌شرطی شده نکرورز بافتی مشاهده نشد ولی

References :

- Mitra V, Metcalf J. Metabolic functions of the liver. *Anaesth Intensive Care Med* 2009; 10(7): 334-5.
- Chiang CH, Chang CC, Huang HC, Chen YJ, Tsai PH, Jeng SY, et al. Investigation of hepatoprotective activity of induced pluripotent stem cells in the mouse model of liver injury. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 219060.
- Kelly JH, Koussayer T, He DE, Chong MG, Shang TA, Whisenand HH, et al. An improved model of acetaminophen-induced fulminant hepatic failure in dogs. *Hepatology* 1992; 15(2): 329-35.
- Palmes D, Spiegel HU. Animal models of liver regeneration. *Biomaterials* 2004; 25(9): 1601-11.
- Nejak-Bowen KN, Monga SP, editors. Beta-catenin signaling, liver regeneration and hepatocellular cancer: sorting the good from the bad. *Semin Cancer Biol* 2011; 21(1): 44-58.
- Sell S. Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology* 2001; 33(3): 738-50.
- Braude S, Gimson AE, Williams R. Progress in the management of fulminant hepatic failure. *Intensive Care Med* 1981; 7(3): 101-3.
- Zakim D, Boyer TD. *Hepatology: A textbook of liver disease*. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1990. p. 469-87.
- Mohamadnejad M, Namiri M, Bagheri M, Hashemi SM, Ghanaati H, Zare Mehrjardi N, et al. Phase 1 human trial of autologous bone marrow-hematopoietic stem cell transplantation in patients with decompensated cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2007; 13(24): 3359-63.
- Nikeghbalian S, Pournasr B, Aghdami N, Rasekhi A, Geramizadeh B, Hosseini Asl SM, et al. Autologous transplantation of bone marrow-derived mononuclear and CD133+ cells in patients with decompensated cirrhosis. *Arch Iran Med* 2011; 14(1): 12-7.
- Bumgardner GL, Chen S, Hoffman R, Cahill DC, So SK, Platt J, et al. Afferent and efferent pathways in T cell responses to MHC class I+, II-hepatocytes. *Transplantation* 1989; 47(1): 163-70.
- Le Blanc K, Rasmuson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004; 363(9419): 1439-41.
- Kuo TK, Hung SP, Chuang CH, Chen CT, Shih YRV, Fang SCY, et al. Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone

- marrow mesenchymal stem cells. *Gastroenterology* 2008; 134(7): 2111-2121, 2121. e1-3.
- 14- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, *et al.* Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med* 2000; 6(11): 1229-34.
 - 15- Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002; 105(1): 93-8.
 - 16- Nasir GA, Mohsin S, Khan M, Shams S, Ali G, Khan SN, *et al.* Mesenchymal stem cells and Interleukin-6 attenuate liver fibrosis in mice. *J Transl Med* 2013; 11(3): 78-97.
 - 17- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74(50): 1124-36.
 - 18- Suzuki YJ, Nagase H, Day RM, Das DK. GATA-4 regulation of myocardial survival in the preconditioned heart. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 37(6): 1195-1203.
 - 19- Headeskou CJ, Capito KC, Islin H, Hansen SE, Thams P. Long-term fat-feeding-induced insulin resistance in normal NMRI mice: postreceptor changes of liver, muscle and adipose tissue metabolism resembling those of type 2 diabetes. *Acta Diabetol* 1992; 29(1): 14-9.
 - 20- Kröger H, Dietrich A, Ohde M, Lange R, Ehrlich W, Kurpiz M. Protection from acetaminophen-induced liver damage by the synergistic action of low doses of the poly (ADP-ribose) polymerase-inhibitor nicotinamide and the antioxidant N-acetylcysteine or the amino acid L-methionine. *Gen Pharmacol* 1997; 28(2): 257-63.
 - 21- Tiegs G, Hentschel J, Wendel A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J Clin Invest* 1992; 90(1): 196-203.
 - 22- Shakil AO, Kramer D, Mazariegos GV, Fung JJ, Rakela J. Acute liver failure: clinical features, outcome analysis, and applicability of prognostic criteria. *Liver Transpl* 2000; 6(2): 163-9.
 - 23- Cho KA, Ju SY, Cho SJ, Jung YJ, Woo SY, Seoh JY, *et al.* Mesenchymal stem cells showed the highest potential for the regeneration of injured liver tissue compared with other subpopulations of the bone marrow. *Cell Biol Int* 2009; 33(7): 772-7.
 - 24- Hong ZF, Huang XJ, Yin ZY, Zhao WX, Wang XM. Immunosuppressive function of bone marrow mesenchymal stem cells on acute rejection of liver allografts in rats. *Transplant Proc* 2009; 4(1): 403-9.
 - 25- Moslem M, Valojerdi MR, Pournasr B, Muhammadnejad A, Baharvand H. Therapeutic Potential of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells in Mice With Lethal Fulminant Hepatic Failure. *Cell Transplant* 2013; 22(10): 1785-99.
 - 26- Li Z, He C, Xiao J, Chen Z. Treating end-stage liver diseases with mesenchymal stem cells: an oak is not felled at one stroke. *Regenerative Med* 2013; 1(1): 3-7.
 - 27- Shao L, Young LT, Wang JF. Chronic treatment with mood stabilizers lithium and valproate prevents excitotoxicity by inhibiting oxidative stress in rat cerebral cortical cells. *Biol Psychiatry* 2005; 58(11): 879-84.
 - 28- Li S, Deng Y, Feng J, Ye W. Oxidative preconditioning promotes bone marrow mesenchymal stem cells migration and prevents apoptosis. *Cell Biol Int* 2009; 33(3): 411-8.
 - 29- Halliwell B, Gutteridge J. Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage. *Lancet* 1984; 23(1): 1396-401.
 - 30- Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 1991; 91(3): 14-22.
 - 31- Rabani V, Shahsavani M, Gharavi M, Piryaee A, Azhdari Z, Baharvand H. Mesenchymal stem cell infusion therapy in a carbon tetrachloride-induced liver fibrosis model affects matrix metalloproteinase expression. *Cell Biol Int* 2010; 34(6): 601-5.
 - 32- Stock P, Brückner S, Winkler S, Dollinger MM, Christ B. Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived Hepatocytes Improve the Mouse Liver after Acute Acetaminophen Intoxication by Preventing Progress of Injury. *Int J Mol Sci* 2014; 15(4): 7004-28.
 - 33- Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. Concise review: Adipose-Derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells* 2012; 30(5): 804-10.
 - 34- Gruttadauria S, Grosso G, Pagano D, Biondi A, Echeverri G, Seria E, *et al.* Marrow-derived mesenchymal stem cells restore biochemical markers of acute liver injury in experimental model. *Transplant Proc* 2013; 45(2): 280-6.

Original Article

H₂O₂-preconditioned mesenchymal stem cell regenerative effects on acute liver failure mice

Nasiri F.¹, Amiri F.¹, Mohammadipour M.¹, Molaei S.¹, Habibi Roudkenar M.¹, Jalili M.A.¹

¹Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran.

Abstract

Background and Objectives

Mesenchymal stem cells (MSCs) are attractive cells for cell therapy. However, the efficacy of MSCs is limited because of low survival rate following translation. In this study, MSCs were preconditioned with sub-lethal doses of H₂O₂. The therapeutic potential of preconditioning MSCs was examined on acute liver failure in mice.

Materials and Methods

In the present experimental study, MSCs were isolated from bone marrow aspirate. Cells from passage four were treated with different concentrations of H₂O₂ for 24 hrs, and then were recovered in fresh medium for 7 hrs followed by exposure to lethal doses of H₂O₂. Cell viability was measured with WST-1 assay. In the *in vivo* phase, acute liver failure was induced by CCl₄; then, the regenerative potential of preconditioned-MSCs was evaluated using biochemical as well as histological methods.

Results

Survival rates were higher in the engrafted mice with preconditioned-MSCs in comparison to those who received normal MSCs. Three days after cell therapy liver enzymes reached the normal level in engrafted group with preconditioned-MSCs. Interestingly, histological results revealed a significant improvement in liver regeneration potential in transplanted groups with preconditioned-MSCs.

Conclusions

Preconditioning of MSCs with H₂O₂ not only enhances their survival but also increases the efficacy of MSC-based cell therapy in liver acute failure.

Key words: Ischemic Preconditioning, Oxidative Stress, CCl₄, Acute Liver Failure

Received: 2 Nov 2014

Accepted: 3 Mar 2015

Correspondence: Jalili MA., PhD of Medicinal Chemistry. Assistant Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82052155; Fax: (+9821) 88601599
E-mail: m.jalili@ibto.ir