

خون

فصلنامه علمی پژوهشی

دوره ۱۲ شماره ۲ تابستان ۹۴ (۱۲۴-۱۱۱)

مقاله پژوهشی

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

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

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) پیش شرطی شدند و اثرات درمانی پیش شرطی 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 (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 پیش شرطی شده با ۲۵ میکرومولار H_2O_2 به مدت ۲۴ ساعت ۹۰٪ و لی بقای گروه کنترل ۱۵٪ بود. سه روز پس از سلول درمانی، میزان آنزیم‌های کبدی مانند آسپارتات آمینو‌ترانسفراز (AST) در موش‌های آسیب حاد کبدی دریافت کننده سلول‌های پیش شرطی شده با موش‌های نرمال دریافت کننده سلول نرمال، اختلاف معنادار نداشت و نزدیک به سطح طبیعی این آنزیم بود ($value > 122 \pm 31 \text{ IU/L}$ و $154 \pm 38 \text{ IU/L}$). نتایج بافت‌شناسی در موش‌های تحت درمان با مزانشیم پیش شرطی شده، سطوح درمانی بالاتری نسبت به سایر گروه‌ها نشان داد.

نتیجه‌گیری

پیش شرطی کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی با استرس اکسیداتیو، کارآیی آن‌ها را در سلول درمانی آسیب حاد کبدی بهبود می‌بخشد.

کلمات کلیدی: پیش شرطی کردن ایسکمیک، استرس اکسیداتیو، تراکلرید کربن، آسیب حاد کبدی

تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۱۱

تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۱۲

۱- کارشناس ارشد زیست فن‌آوری پژوهشی - 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 پژوهشی - 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: ۱۴۶۵-۱۱۵۷

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 کارآیی 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، 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(۱۷). در پیش شرطی کردن، از استفاده از هپاتوتوكسین شناخته شده‌ای به نام تراکلرید 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 قبیل 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

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، داروهای 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، اغما 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 نخواهد بود. بیماری‌های حاد کبدی، فراوانی قابل توجهی ندارند و آنچه پرداختن به این بیماری‌ها را حائز 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 مatasفانه تعداد کم اندام‌های اهدایی، عوارض مربوط به داروهای سرکوبگر ایمنی در شخص گیرنده و پیچیدگی‌های عمل جراحی، این گزینه را محدود ساخته است(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 کاربرد سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان (MSCs) در پیوندهای اتلولوگ و رفع (Mesenchymal Stem Cell

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 ۰.۵٪ CO_2 دور از نور نگهداری شدند. سپس جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الیزاخوان خوانده شده و نتایج تفسیر گردید. تمام مراحل آزمایش فوق به صورت دو تایی (دابلیکیت) انجام شد.

حیوانات تحت مطالعه:

این مطالعه تجربی در موش‌های نر ۸ هفت‌های نژاد NMRI تهیه شده از دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام شد. NMRI = Naval Medical Research Institute موش‌های سوئیسی کوچک و سفید آزمایشگاهی می‌باشد که از نظر ظاهر مشابه گونه موش‌های بالبُسی (سیاه رنگ) هستند و امروزه به عنوان یک مدل متدالو در مطالعات آزمایشگاهی در زمینه سم‌شناسی، تراولوژی، فارماکولوژی و فیزیوفارماکولوژی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۱-۲۲). 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 برداریم.

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 تراکم‌ریزکریز:
جهت القای نارسایی حاد کبدی، ابتدا موش‌ها به ۷ گروه

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 می‌شود) در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه‌ای حاوی ۱۰۰ میکROLیتر محیط DMEM Low Glucose (سیگما، آمریکا) همراه با ۱۰٪ FBS (اینوتیروژن، آمریکا)، پنی‌سیلین ۱٪ و استرپو‌ماکسین ۰.۱٪ (سیناژن، ایران) به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد دار، کشت داده شدند. پس از این مدت سلول‌ها با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۴۰، ۵۰، 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 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.

سنجرش درصد سلول‌های زنده با استفاده از روش تریپان‌بلو:

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 ۰/۰۴٪ (سیگما، آمریکا) مخلوط و پس از ۳-۵ دقیقه درصد سلول‌های زنده با استفاده از شمارش سلولی در زیر میکروسکوپ نوری و لام نویار تخمین زده شد.

سنجرش درصد بقای سلولی با استفاده از معرف WST-1: پس از اتمام مراحل پیش‌شرطی کردن، محیط چاهک‌ها خارج شد و ۱۰ میکROLیتر از محلول water (WST-1)

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

ارزیابی بافت‌شناسی:

نمونه‌های کبدی تا چهار روز بعد از تزریق تراکلرید 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 ۶ تا ۴ میکرون از آن‌ها تهیه شد. اسلامیدهای تهیه شده با روش هماتوکسیلین و ائوزین E (جهت بررسی میزان نکروز) رنگ‌آمیزی و مورد بررسی قرار گرفت. در اسلامیدهای 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 متشر هپاتوسیت‌ها به صورت پل‌های نکروتیک بین لوبولی همراه با واکنش التهابی و سه: از بین رفتن کامل لوبول‌ها، نکروز متشر هپاتوسیت‌ها همراه با واکنش التهابی متشر 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 تراکلرید کربن به صورت منظم از نظر میزان مرگ و میر مورد ارزیابی قرار گرفته و اطلاعات مربوطه ثبت گردید.

ارزیابی دوز مناسب ایجاد کننده نارسایی حاد کبدی: دوز تزریقی تراکلرید 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 تراکلرید 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 تراکلرید 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 تراکلرید 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 تراکلرید 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 تراکلرید کربن تزریق شده به آن‌ها

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

آزمون بیوشیمیایی سرمی: ۹۶ و ۷۲، ۴۸ ساعت پس از تزریق تراکلرید کربن، نمونه خون از قلب موش‌ها تحت بیهوشی عمیق با کتابخانه (۱۵۰ mg/kg) و گزیلازین (۱۵ mg/kg) (آلفاسان، هلند) اخذ و درون لوله‌های فاقد ماده ضد انعقاد به آزمایشگاه به منظور اندازه‌گیری آنزیم‌های آسپارتات 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 بھینه H_2O_2 محلول در ۲۰۰ میکرولیتر PBS به آنها تزریق شد.	ALF-MSCs-Pre

پیش شرطی شده بودند، در مقایسه با سلول‌های کنترل (بدون پیش شرطی) در مواجهه با دوز کشنده ۵۰۰ میکرومولار از H_2O_2 ، تقریباً به طور متوسط به میزان چهار برابر افزایش یافت اما میزان مرگ و میر در سلول‌های پیش شرطی شده با غلظت ۱ میلی مولار 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 پیش شرطی کردن با H_2O_2 با WST-1 نیز بررسی شد (نمودار ۱). بر طبق نمودار ۱، درصد بقای سلول‌های پیش شرطی شده با غلظت‌های ۲۰ و ۲۵ میکرومولار به میزان قابل توجهی افزایش یافته است.

تراکلرید 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 تراکلرید کربن 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 تراکلرید کربن باعث افزایش قابل توجه ALT و AST سرمی نسبت به گروه‌های Sham (تزریق روغن زیتون) و کنترل (بدون هیچ تزریقی) شد.

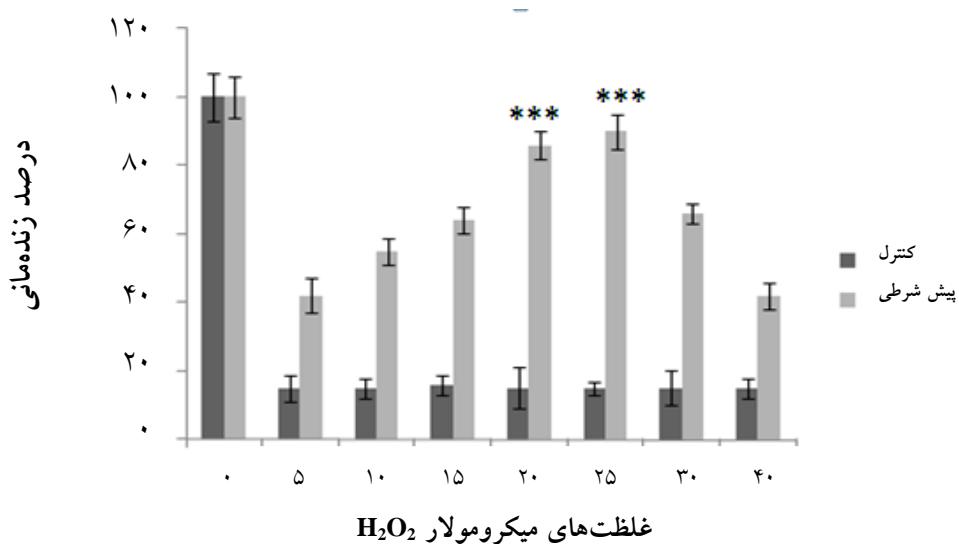
پیوند سلولی در گروه‌های حیوانی مدل نارسایی حاد کبدی: به موش‌های مدل نارسایی حاد کبدی ایجاد شده با دوز مناسب تتراکلرید کربن از مرحله قبل، گروه‌های متفاوت سلولی از طریق ورید دمی تزریق گردید. جهت انجام مطالعه موش‌ها به چهار گروه ده تایی تقسیم‌بندی شدند (جدول ۲). سپس طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از سلول درمانی،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

بررسی‌های آماری:

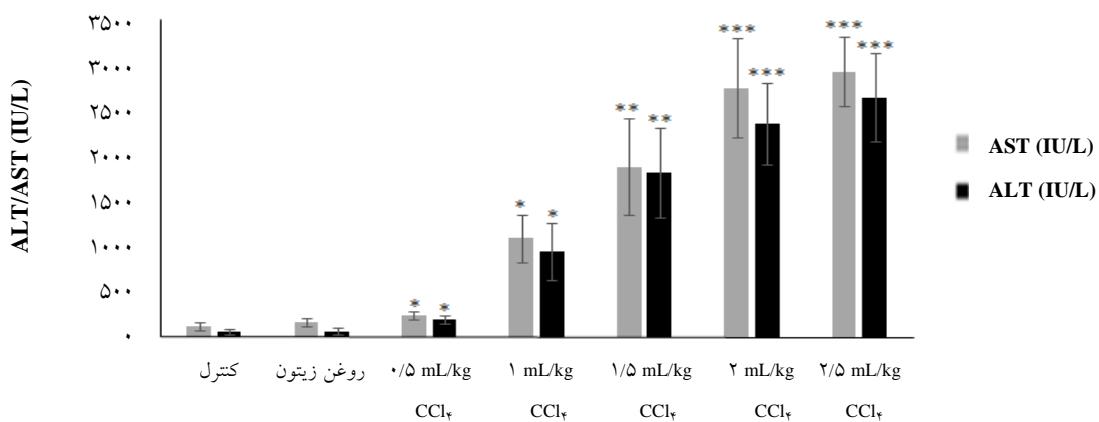
داده‌های کمی با استفاده از برنامه نرم افزاری SPSS ۱۹ و روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل آماری واقع شدند. در آنالیز واریانس، معناداری اختلاف در سطح ۰/۰۵ یا ۰/۰۱ میان گروه‌ها با استفاده از آزمون Games- Howell و یا Tukey تعیین گردید.

یافته‌ها

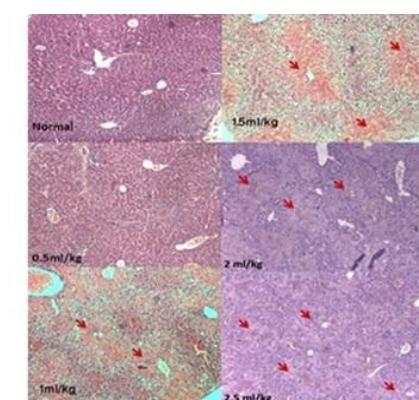
سلول‌های بنیادی مزانشیمی پیش شرطی شده با H_2O_2 در برابر مقادیر کشنده این ماده مقاوم‌تر بودند: به منظور سنجش میزان زنده‌مانی سلول‌های پیش شرطی شده، این سلول‌ها تحت شرایط مقادیر کشنده H_2O_2 کشت داده شده و با تریپان‌بلو رنگ آمیزی شدند. میزان زنده‌مانی سلول‌هایی که با محدوده غلظت بین ۲۰ تا ۲۵ میکرومولار



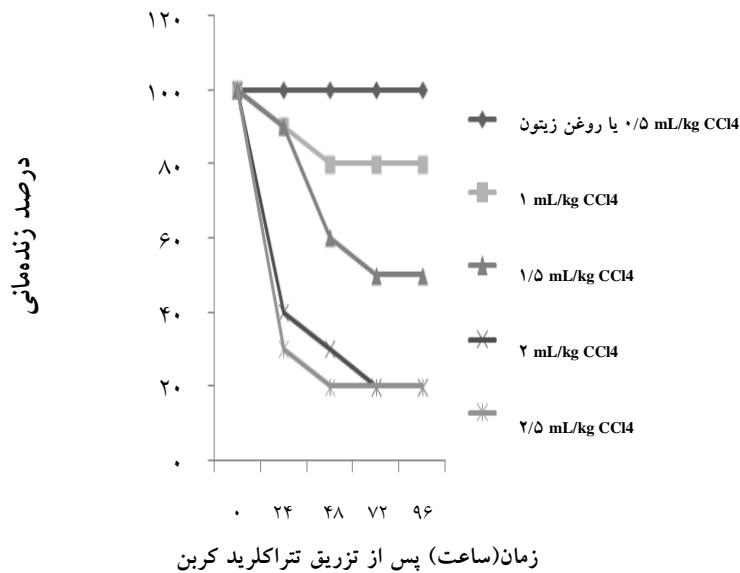
نمودار ۱: میزان بقای سلول‌های پیش‌شرطی شده با دوزهای مختلف H_2O_2 پس از تیمار ۲۴ ساعته با غلظت ۵۰۰ میکرومولار این ماده در مقایسه با گروه کنترل (سلول‌های بنیادی مزانشیمی نرمال بدون تیمار یا پیش‌شرطی کردن). با استفاده از WST-1: درصد زنده‌مانی سلول‌های پیش‌شرطی شده با غلاظت‌های ۲۰ و ۲۵ میکرومولار H_2O_2 به میزان قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت (عدد صفر غلاظت صفر H_2O_2 یا شرایط بدون حضور این ماده را نشان می‌دهد). داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند ($p < 0.001$). ***: $p < 0.001$.



نمودار ۲: اندازه‌گیری سطح سرمی آنزیم‌های AST و ALT ۲۴ ساعت بعد از تزریق دوزهای مختلف تراکلرید 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 ($p < 0.01$ و ***: $p < 0.001$).



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



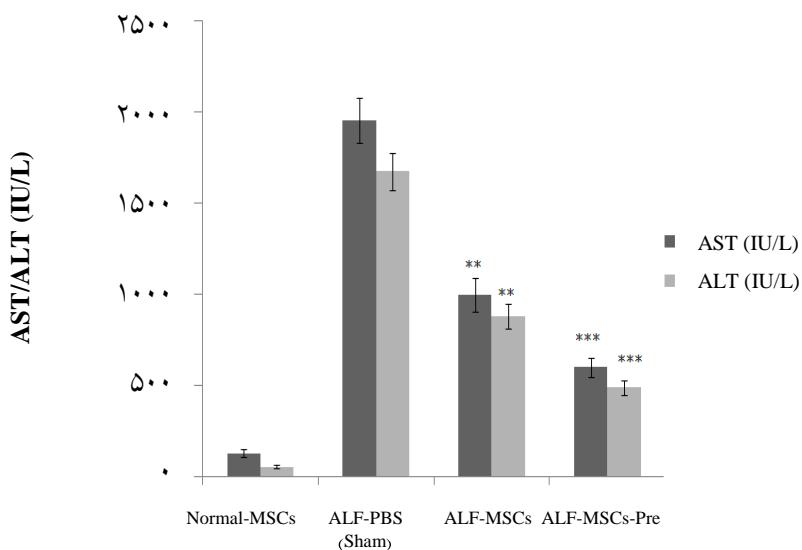
نمودار ۳: بررسی میزان زنده‌مانی موش‌ها در گروه دوز $1/5 \text{ mL/kg}$ تراکلرید کربن ۷۲ ساعت بعد از تزریق میزان زنده‌مانی ۵۰٪ بود و بعد از آن موش‌ها زنده ماندند.

بیماری با دوز $1/5$ میلی لیتر بر کیلوگرم تراکلرید کربن انجام شد.

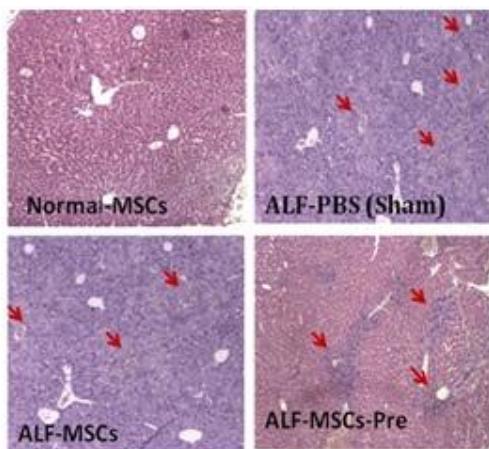
سلول درمانی با گروه‌های مختلف MSCs در مدل نارسایی حاد کبدی باعث کاهش سطح سرمی آنزیم‌های کبدی، بهبود بافت کبد و افزایش میزان بقای موش‌ها طی سه روز پس از پیوند شد.

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 مقاطعه 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 بیوشیمیابی ساخته شده 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 تراکلرید کربن و کاهش مرگ هپاتوسيت‌ها و آزادسازی این آنزیم‌ها به خون است (نمودار ۴ و شکل ۲).

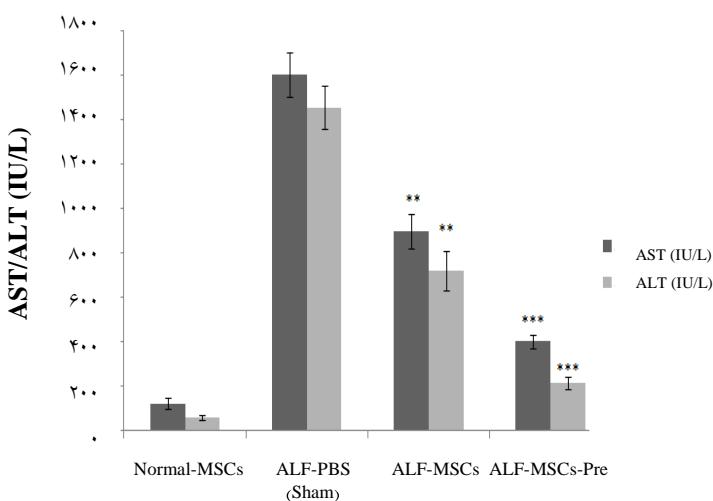
این نتایج حاکی از القای آسیب به غشای هپاتوسيت‌ها و آزادسازی این آنزیم‌ها به خون است که ۲۴ ساعت بعد از تزریق به شدت افزایش یافته ولی به تدریج در ساعت‌های بعد دچار کاهش شد (نمودار ۲). مطالعه‌های بافت‌شناسی کبد نیز حاکی از القای آسیب کبدی درجه ۲ و بیشتر در ناحیه مرکز لوبولی همراه با تشکیل پل‌های نکروتیک بین لوبولی و التهاب درجه ۲ در دوز $1/5$ میلی لیتر بر کیلوگرم تراکلرید کربن بود. از طرفی میزان آسیب کبدی تا ۴ روز بعد از تزریق تراکلرید کربن هم چنان یکسان باقی ماند، هر چند که در ۷۲ ساعت بعد از تزریق، نشانه‌هایی مبنی بر ترمیم بافتی در مقاطعه بافت‌شناسی مشاهده شد. درجه آسیب در دوزهای بالاتر تراکلرید 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 $1/5$ میلی لیتر بر کیلوگرم تراکلرید کربن، زنده‌مانی در موش‌ها تا ۷۲ ساعت بعد از تزریق ۵۰٪ بود، از ۷۲ ساعت به بعد کل موش‌ها زنده ماندند 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



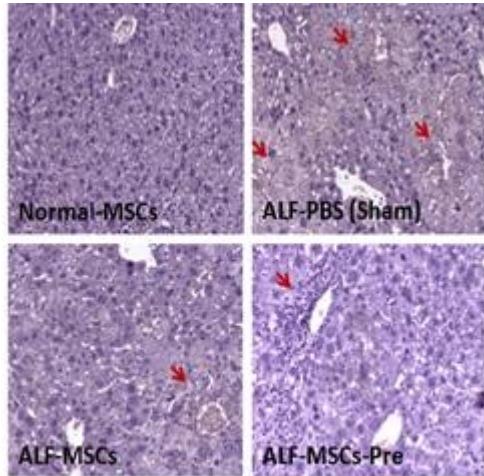
نمودار ۴: بررسی سطح سرمی آنزیم‌ها. سطح آنزیم‌های AST و ALT در گروه‌های تحت درمان نسبت به sham به صورت معناداری پایین است ($p < 0.01$). (**: $p < 0.01$ و ***: $p < 0.001$).



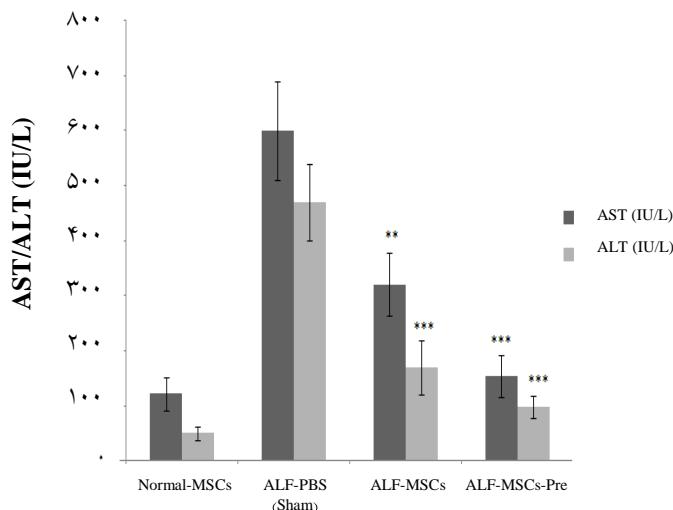
شکل ۲: بررسی تغییرات بافت‌شناسی کبد با رنگآمیزی هماتوکسیلین و ائوزین H&E. گروه ALF-PBS (Sham): نکروز درجه ۲ و پل‌های نکروتیک بین لوپولی (نوک پیکان). گروه ALF-MSCs: نکروز درجه ۲ و پل‌های نکروتیک بین لوپولی با وسعت کاهش یافته (نوک پیکان). گروه ALF-MSCs-Pre: نکروز درجه ۱ و پل‌های نکروتیک پراکنده بین لوپولی (نوک پیکان) (بزرگنمایی $\times 40$).



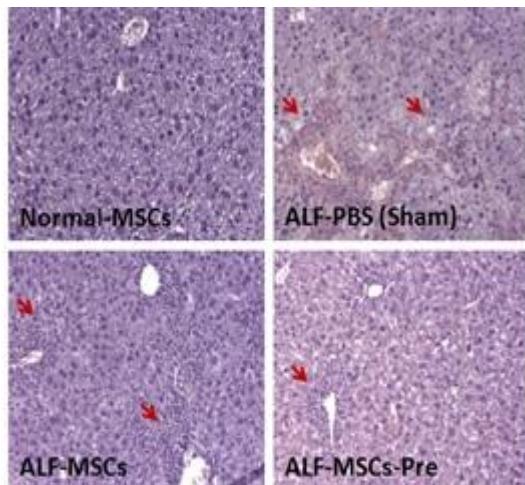
نمودار ۵: بررسی سطح سرمی آنزیم‌ها. روند کاهش سطح آنزیم‌های AST و ALT میان گروه‌های درمانی مختلف نسبت به هم از یک سو و گروه sham از سوی دیگر، تفاوت بسیاری نشان می‌دهد ($p < 0.01$: ** و ***: $p < 0.001$).



شکل ۳: بررسی تغییرات بافت‌شناسی کبد با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و اوزین 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 ۴: بررسی سطح سرمی آنزیم‌ها. سطح آنزیم‌های ALT و AST در گروه‌های تحت درمان نسبت به sham 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 $p < 0.001$: ***).
(***: $p <$)



شکل ۴: بررسی تغییرات بافت‌شناسی کبد با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و اوزین H&E گروه ALF-PBS (Sham) . گروه ALF-MSCs: نکروز درجه ۲ و پل‌های نکروتیک بین لوپولی همراه با کاهش التهاب سلولی(نوک پیکان). گروه ALF-MSCs-Pre: 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 فرآیندهای ترمیمی (نوک پیکان)(بزرگنمایی $\times 100$).

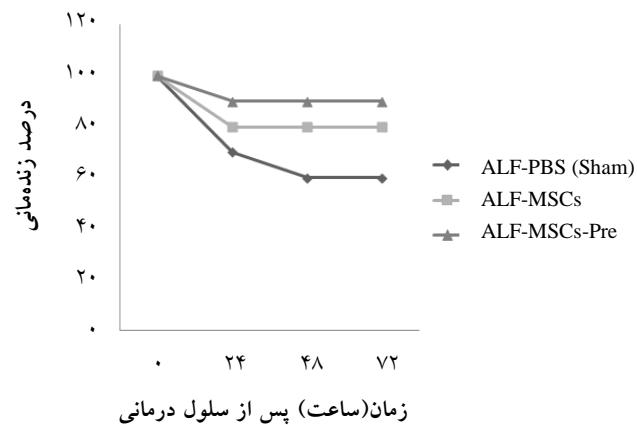
ALF-MSCs-Pre ۹۰٪ بوده و در روزهای بعد موش‌ها زنده ماندند (نمودار ۷).

بحث

نارسایی حاد کبدی، یک ستدرم بالینی است که در آن اختلال شدید عملکرد سلول‌های کبدی در نتیجه نکروز 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 تسريع ترمیم این بافت‌ها می‌شوند (۲۳-۲۵). اما درصد بالایی از آن‌ها پس از تزریق از بین رفته و این خود باعث کاهش کارآیی آن‌ها می‌شود (۲۶، ۱۳).

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 دست ورزی ژنتیکی را به همراه نداشت. در تایید مطالعه 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 همکارانش با MSCs 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 هپاتوتوكسینی 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 نکروز وسیع و گستردۀ 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 توسعه



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 ۴۴ ساعت بعد از سلول درمانی ۸۰٪ و در گروه ALF-MSCs-Pre ۹۰٪ بود و در روزهای بعد موش‌ها زنده می‌مانندند.

مطالعه‌های بافت‌شناسی کبد حاکی از آن بود که در روزهای مختلف بعد از تزریق، گروه‌های سلولی وسعت آسیب و درجه نکروز 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 تزریق کاملاً مشهود بود. بعد از ۷۲ ساعت در گروه Sham نکروز بافتی هم چنان درجه ۲ می‌باشد ولی میزان التهاب هپاتوسیت‌ها در حال کاهش است.

در گروه دریافت کننده سلول مزانشیمی معمولی (ALF-MSCs)، بعد از ۷۲ ساعت نکروز 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) نکروز سلولی کنترل شده و بافت به سمت نرم‌الشدن پیش می‌رود (شکل ۴).

رونده مرگ و میر در گروه‌های مختلف متفاوت بوده و همان طور 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 MSCs ۱۲۰

زنده‌مانی موش‌ها در بازه زمانی بیشتر یا انجام مطالعه بر روی تعداد بیشتر موش (که در این تحقیق از نظر زمانی و بودجه‌ای مقدور نبود)، اختلاف زنده‌مانی بیشتری را در دو گروه باعث شود. از طرفی اثرات درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی در بیماری‌های کبدی قبلاً هم گزارش شده است، اما به کارگیری روش‌های مختلف جهت افزایش این اثرات هر چند در مقیاس کم نیز نوید بخش می‌باشد. که در این تحقیق پیش شرطی کردن سلول‌های بنیادی مزانشیمی با پراکسید هیدروژن باعث افزایش ۱۰ درصدی زنده‌مانی موش‌ها به علاوه اثرات درمانی سریع‌تر در بررسی بیوشیمی و بافت‌شناسی شد. ربانی و همکارانش گزارش کردند که سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌توانند سبب کتترل و ترمیم فیبروز ناشی از تراکلرید کربن در موش‌ها شوند (۳۱). مطالعه گروه ربانی بر روی مدل فیبروز کبدی و نه بر روی مدل آسیب حاد کبدی انجام شده بود. از طرفی این گروه از سلول‌های بنیادی نرمال بدون انجام مراحل پیش شرطی استفاده کرده بودند و اثرات پیش شرطی کردن بر قابلیت‌های درمانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی را بررسی نکرده بودند. مطالعات استوک و همکارانش بیانگر نقش سلول‌های مزانشیمی مغز استخوان انسانی در بهبود کبدی موش‌های مدل مسمومیت استامینوفن از طریق جلوگیری از پیشرفت آسیب می‌باشد (۳۲).

سیتوکروم P450 ایجاد می‌شود که منجر به آسیب لیپیدها، اسیدهای نوکلئیک و ترکیبات دیگر سلول‌ها شده و منجر به القای نکروز در سلول‌های پارانشیمی کبد می‌شود (۲۹). این آسیب موجب آزادسازی AST و ALT از مواضعشان در میتوکندری و سیتوزول هپاتوسیت‌ها و آزاد شدن به خون می‌گردد (۳۰).

پس از تزریق سلول‌های پیش شرطی شده به موش‌های مدل نارسایی حاد کبدی، نتایج بافت‌شناسی حاکی از این بود که پیوند سلول‌های بنیادی مزانشیمی پیش شرطی شده با دوز بهینه H_2O_2 نسبت به سلول‌های بنیادی مزانشیمی کتترل (MSCs) معمولی که تحت هیچ گونه فرآیند پیش شرطی کردن قرار نگرفته‌اند، میزان آسیب اولیه ایجاد شده در بافت کبدی را کاهش داده و فرآیند بهبودی در سطح بالاتری مشاهده می‌شود و افت آنزیم‌های شاخص کبدی ALT و AST با سرعت بیشتری انجام می‌شود و از طرفی باعث شده میزان زنده‌مانی موش‌های تحت بررسی افزایش یابد به طوری که زنده‌مانی در موش‌های دریافت‌کننده سلول بنیادی مزانشیمی پیش شرطی شده ۹۰٪ و در گروه دریافت‌کننده سلول مزانشیمی کتترل، ۸۰٪ بود. با بررسی آماری، اختلاف زنده‌مانی موش‌ها در دو گروه یاد شده معنادار نبود. اما تغییرات بیوشیمیایی و بافت‌شناسی دو گروه قابل توجه بود. به نظر می‌رسد بررسی و ثبت

جدول ۳: خلاصه‌ای از مطالعه‌های انجام شده در زمینه سلول درمانی بیماری‌های 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	کتترل نکروز و ترمیم در طی ۷۲ ساعت، کاهش آنزیم کبدی از ۲۴ ساعت پس از پیوند
ربانی (۲۰۱۰)(۳۱)	سلول بنیادی مزانشیمی موش	فیبروز کبدی القاء شده با تراکلرید کربن / موش	کاهش فیبروز پس از ۴ هفته
استوک (۲۰۱۴)(۳۲)	هپا توسيت 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
گرو تادوریا (۲۰۱۳)(۳۴)	سلول بنیادی مزانشیمی مغز استخوان موش صحرایی	آسیب حاد کبدی القاء شده با تراکلرید کربن / موش صحرایی	کاهش آنزیم کبدی از روز سوم پس از پیوند

در گروه دریافت کننده سلول‌های نرمال، نکروز در نواحی مرکزی لوپول‌های کبدی هنوز مشاهده می‌شد و از طرفی در گروه شم که سلول دریافت نکرده بودند، پل‌های نکروتیک بین لوپولی 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 براسکیدهیدروژن، راهکاری جدید در راستای افزایش بقا و بهبود عملکرد سلول‌های بنیادی مزانشیمی در ترمیم بافت کبد در مدل نارسایی حاد کبدی را جهت بهبود کارآیی 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، گروتادروریا و همکارانش نیز تصویر کاهش یافته‌ای از میزان آسیب هپاتوسیت‌ها در موش‌های صحراوی مدل نارسایی حاد کبدی به دنبال پیوند اтолوگ 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 کارآیی 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 نکروز بافتی مشاهده نشد ولی

References :

- 1- Mitra V, Metcalf J. Metabolic functions of the liver. Anaesth Intensive Care Med 2009; 10(7): 334-5.
- 2- 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.
- 3- Kelly JH, Koussayer T, He DE, Chong MG, Shang TA, Whisennand HH, et al. An improved model of acetaminophen-induced fulminant hepatic failure in dogs. Hepatology 1992; 15(2): 329-35.
- 4- Palmes D, Spiegel HU. Animal models of liver regeneration. Biomaterials 2004; 25(9): 1601-11.
- 5- 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.
- 6- Sell S. Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. Hepatology 2001; 33(3): 738-50.
- 7- Braude S, Gimson AE, Williams R. Progress in the management of fulminant hepatic failure. Intensive Care Med 1981; 7(3): 101-3.
- 8- Zakim D, Boyer TD. Hepatology: A textbook of liver disease. 6th ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1990. p. 469-87.
- 9- 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.
- 10- Nikeghbalian S, Pournasr B, Aghdami N, Rasekh 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.
- 11- 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.
- 12- Le Blanc K, Rasmussen 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.
- 13- 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, Kurpisz 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; 41(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, Piryaei 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