Journal of
Guilan University of Medical Sciences

Winter 2023. Vol 31. Num 4

Research Paper

Effect of Human Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium on Oxidative Stress Induced by Carbon Tetrachloride in the Liver Tissue of Rats

Seyyedeh Zahra Miri[1], ***Jafar Rahmani Kahnamoei**[2], **Seyyed Esmaeil Safavi Khalkhali**[3]

1. Graduate of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary, Tabriz Branch Medical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
2. Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary, Tabriz Branch Medical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
3. Department of Basic Science, Faculty of Veterinary, Tabriz Branch Medical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

Use your device to scan and read the article online

Citation Miri SZ, Rahmani Kahnamoei J, Safavi Khalkhali S E. [Effect of Human Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium on Oxidative Stress Induced by Carbon Tetrachloride in the Liver Tissue of Rats (Persian)]. Journal of Guilan University of Medical Sciences. 2023; 31(4):350-361. https://doi.org/10.32598/JGUMS.31.3.1748.5

https://doi.org/10.32598/JGUMS.31.3.1748.5

CC BY NC

Received: 25 Jan 2022
Accepted: 23 Aug 2022
Available Online: 01 Jan 2023

Keywords:
Mesenchymal stem cell, Conditioned medium, Liver, Oxidative stress, Rats

ABSTRACT

Background Carbon tetrachloride (CCl4) is used as a chemical intermediate in industries. It can be converted into toxic reactive products of trichloromethyl radical under the influence of cytochrome P450 enzymes, and cause tissue damage, including liver damage, through oxidative stress. Liver transplantation is an effective treatment for liver failure but is limited due to the shortage of organ donors.

Objective This study aims to evaluate the effect of human mesenchymal stem cell-conditioned medium (hMSC-CM) on the oxidative stress induced by CCl4 in rats.

Methods Twenty-one adult male Wistar rats matched for weight were randomly allocated into three groups of 7: control, treatment A (receiving CCl4), and treatment B (receiving CCl4+hMSC-CM). A single dose of normal saline was injected into the rats in the control group. Treatment group A and B received intraperitoneal injection of CCl4 along with olive oil with a ratio of 1:1. Twenty-four hours after CCl4 injection, the rats in group B were treated by injection of hMSC-CM for three consecutive days. Forty-eight hours after the injection of hMSC-CM, blood samples were collected from all rats. Oxidative stress markers including total antioxidant capacity (TAC) and malondialdehyde (MDA) were measured and the data were analyzed using one-way analysis of variance in SPSS software, version 25.

Results There was no statistically significant difference in TAC and MDA levels between different groups ($P>0.05$). The highest levels of TAC was observed in treatment group B, and the highest level of MDA was observed in treatment group A.

Conclusion The hMSC-CM has no significant effect on the oxidative stress in the liver. It is possible to achieve significant results by increasing the duration of treatment.

**** Corresponding Author:***
Jafar Rahmani Kahnamoe
Address: Department of Clinical Science, Faculty of Veterinary, Tabriz Branch Medical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
Tel: +98 (413) 31966263
E-Mail: jrahmani28@gmail.com

Extended Abstract

Introduction

As the body's largest internal organ, the liver plays an essential role in many physiological processes. It is sensitive and vulnerable to various types of toxins and microbes [1]. Many drugs cause the production of free radicals. If the amount of these radicals be more than the antioxidant capacity, they can cause damage to biomolecules such as lipids of liver cell membrane [2]. Liver transplantation is a treatment method for liver failure [3]. However, liver transplantation has limitations such as the shortage of suitable donors [4-7]. Another method for treatment of liver failure is the use of stem cells [8]. However, the direct use of mesenchymal stem cells has some problems such as the stimulation of the immune system [9]. Therefore, it seems necessary to find alternative methods. In this study, we use product that include factors secreted from stem cells without the presence of stem cells themselves so that we can avoid limitations such as conditioned medium. We aim to investigate the healing effect of a conditioned medium obtained from umbilical cord stem cells on liver damage.

Methods

The study was conducted in two stages. The first stage included the preparation of human mesenchymal stem cell-conditioned medium (hMSC-CM) in the Biotechnology Research Center of Tabriz Branch, Islamic Azad University. In the second stage, we assessed the effect of conditioned medium on the total antioxidant capacity (TAC) and malondialdehyde (MDA). In this study, 21 adult male Wistar rats were used, which were obtained from the Laboratory Animal Breeding Center of Islamic Azad University, Tabriz branch. Rats were randomly divided into three groups of 7 including control group, treatment group A received carbon tetrachloride (CCI4), and treatment group B received CCI4 and hMSC-CM under normal maintenance conditions. The control group received normal saline in a single dose of 2 cc/kg intraperitoneally. Treatment groups A and B received intraperitoneal CCI4 at a dose of 2 ml/kg body weight and olive oil with a ratio of 1:1 [11, 12]. Twenty-four hours after CCI4 injection for three consecutive days, the rats in group B were treated by injection of hMSC-CM [13]. Twenty-four hours after the second injection of hMSC-CM, blood samples were collected from all rats, and oxidative stress indicators (TAM and MDA) were evaluated by diagnostic kits; TAM was evaluated by the Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) method and MDA by the ThioBarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) method. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test was used to compare the means between different groups. Data analysis was carried out in SPSS version 25 software (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

Results

As shown in Table 1 and Figure 1, there were no significant differences between groups in TAC (P=0.175) and MDA level (P=0.478). As a result, hMSC-CM had no significant effect on treating liver damage caused by CCI4 injection. The lowest amount of TAC belonged to the group treated with CCI4 (0.46 mmol/L), while the highest TAC was observed in the group treated with CCI4 and hMSC-CM (0.65 mmol/L). The lowest amount of MDA was seen in the control group (2.20 µmol/L), while the highest amount was in the group treated with CCI4 (2.61 µmol/L).

Discussion

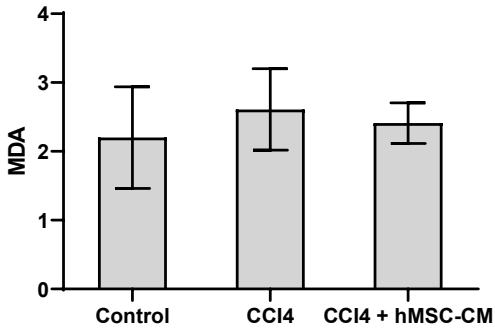
Since the antioxidant effects of hMSC-CM have been confirmed in previous studies [14], this paper aimed to investigate its effects on CCI4-induced oxidative stress. In Ogali et al.'s study, the toxicity induced by CCI4 caused a significant reduction in TAC of animals [15]. Since the CCI4-induced oxidative stress is created through the production of reactive oxygen species (ROS), a part of the TAC of the tissue is used to deal with the oxides caused by ROS. Therefore, reduced TAC in CCI4-treated animals is reasonable [16, 17].

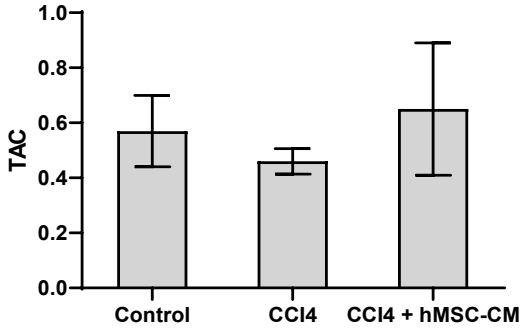
Table 1. TAC and MDA levels (Mean±SD) in different study groups

Variables	Mean±SD			P*
	CCI4+hMSC-CM	CCI4	Control	
TAC	0.26±0.65	0.05±0.46	0.14±0.57	0.175
MDA	0.32± 2.41	0.64±2.61	0.80±2.20	0.478

*One-way ANOVA.

Journal of
Guilan University of Medical Sciences





Journal of
Guilan University of Medical Sciences

Figure 1. Comparing TAC and MDA levels in the study groups
Data were presented as mean (95% CI).

MDA is one of the most common oxidative stress markers [18]. The results of our study, consistent with the studies by Mohammadalipour et al. [19] and Okda et al. [20], showed an increased level of MDA in the group treated with CCl4. Considering the effect of CCl4 on ROS production, a high level of MDA was expected. Considering the role of antioxidant enzymes in dealing with ROS as well as the results obtained in the present study, it can be said that the use of hMSC-CM may treat oxidative stress by increasing the activity of antioxidant enzymes [21]. Amelioration of oxidative stress can reduce CCl4-induced liver lesions. According to the study by Bahmani et al. [22], treatment with hMSC-CM may lead to improvement of antioxidant indices, but according to the present study, the duration of hMSC-CM injection and the interval between injections are influential factors of the significance of the result and recovery. It can be concluded that injection of hMSC-CM within 24 hours after causing liver damage does not have significant effects on TAC and MDA level. Different results may be obtained by increasing the duration of treatment or increasing the number of stem cells from which the medium was prepared.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study was conducted according (to) the principles of the ethical care and use of (laboratory) animals, and obtained ethical approval (Code: IAU.TABRIZ.REC.1400.115).

Funding

This research did not receive any grant from funding agencies in the public, commercial, or non-profit sectors.

Authors' contributions

Conceptualization and design: Jafar Rahmani Kahnamoei; Acquisition, analysis, or interpretation of data: Jafar Rahmani Kahnamoei and Seyyedeh Zahra; Drafting of the manuscript: Seyyedeh Zahra Miri; Critical revision of the manuscript for important intellectual content: Jafar Rahmani Kahnamoei; Supervision: Jafar Rahmani Kahnamoei and Seyyed Esmaeil Safavi Khalkhali.

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Pathology Laboratory of Tabriz Branch, Islamic Azad University for their coopration.

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

مقاله پژوهشی

ارزیابی تأثیر کاندیشن مدیوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف بر استرس اکسیداتیو ناشی از آسیب کبدی تجربی در موش‌های صحرایی

سیده زهرا میری[۱]، *جعفر رحمانی کهنموئی[۲]، سید اسماعیل صفوی خلخالی[۳]

۱. دانش آموخته دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، علوم‌پزشکی واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.
۲. گروه علوم بالینی، دانشکده دامپزشکی، علوم‌پزشکی واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.
۳. گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، علوم‌پزشکی واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

Use your device to scan and read the article online

Citation Miri SZ, Rahmani Kahnamoei J, Safavi Khalkhali S E. [Effect of Human Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium on Oxidative Stress Induced by Carbon Tetrachloride in the Liver Tissue of Rats (Persian)]. Journal of Guilan University of Medical Sciences. 2023; 31(4):350-361. https://doi.org/10.32598/JGUMS.31.3.1748.5

https://doi.org/10.32598/JGUMS.31.3.1748.5

تاریخ دریافت: ۰۵ بهمن ۱۴۰۰
تاریخ پذیرش: ۰۱ شهریور ۱۴۰۱
تاریخ انتشار: ۱۱ دی ۱۴۰۱

چکیده

زمینه تتراکلراید کربن به‌عنوان ماده شیمیایی بینابینی در صنایع کاربرد دارد. این ماده تحت‌تأثیر آنزیم‌های سیتوکروم پی ۴۵۰ به محصولات سمی واکنشگر تری کلرومتیل تبدیل شده و به‌عنوان سم محیطی باعث آسیب بافتی، ازجمله آسیب کبدی ازطریق استرس اکسیداتیو می‌شود. پیوند کبد، درمان مؤثر برای نارسایی و آسیب‌های کبدی است، اما با کمبود اندام‌های اهداکننده دردسترس محدود است.

هدف در این مطالعه، اثر تزریق محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی مزانشیمی بند ناف بر بهبود استرس اکسیداتیو ناشی از تزریق تتراکلراید کربن در کبد ارزیابی شد.

روش‌ها ۲۱ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار بالغ هم‌وزن، به‌صورت تصادفی ساده به ۳ گروه ۷ تایی شامل گروه کنترل، گروه آزمایش A (دریافت تتراکلراید کربن) و گروه آزمایش B (دریافت تتراکلراید کربن و سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی) تقسیم شدند. به گروه کنترل به‌صورت تک دُز سالین نرمال تزریق شد. گروه آزمایش A و گروه آزمایش B به‌روش داخل صفاقی، تتراکلرید کربن را با نسبت ۱:۱ به همراه روغن زیتون دریافت کردند. پس از گذشت ۲۴ ساعت از تزریق تتراکلراید کربن، در ۳ روز متوالی موش‌های گروه B با تزریق کاندیشن مدیوم آزمایش شدند. ۴۸ ساعت پس از تزریق اول کاندیشن مدیوم از همه موش‌ها خون‌گیری انجام شد. شاخص‌های استرس اکسیداتیو شامل ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی و مالون‌دی‌آلدئید ارزیابی و با استفاده از تحلیل واریانس یک‌طرفه و نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ بررسی شدند.

یافته‌ها براساس نتایج حاصل از مطالعه، بین میزان ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در گروه‌های مختلف مطالعه‌شده اختلاف آماری معناداری وجود نداشت ($P>0/05$). بااین‌حال، بیشترین میزان ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در گروه B (آزمایش‌شده با تتراکلراید کربن و سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی) و بین میزان مالون‌دی‌آلدئید در گروه‌های مختلف، بیشترین میزان در گروه A (آزمایش‌شده با تتراکلراید کربن) ملاحظه شد.

نتیجه‌گیری مطالعه حاضر نشان می‌دهد سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی در زمان مطالعه‌شده نتایج معناداری نداشته است. شاید با افزایش زمان آزمایش بتوان به نتایج متفاوتی دست یافت.

کلیدواژه‌ها:
سلول‌های بنیادی مزانشیمی، کاندیشن مدیوم، کبد، استرس اکسیداتیو، موش صحرایی

* **نویسنده مسئول:**
جعفر رحمانی کهنموئی
نشانی: تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم‌پزشکی تبریز، دانشکده دامپزشکی، گروه علوم بالینی.
تلفن: ۳۱۹۶۶۲۶۳ (۴۱۳) ۹۸+
رایانامه: jrahmani28@gmail.com

مقدمه

کبد به‌عنوان بزرگ‌ترین اندام داخلی بدن نقش مهمی در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی داشته و به انواع مختلفی از سموم و میکروب‌ها حساس و در مقابل آن‌ها آسیب‌پذیر است [۱]. همچنین محل متابولیسم بیشتر داروها و سموم در کبد است. بسیاری از سموم یا داروها توسط سیتوکروم پی[1] ۴۵۰ متابولیزه شده و باعث تولید رادیکال‌های آزاد می‌شوند. اگر مقدار این رادیکال‌ها بیشتر از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی باشد، موجب آسیب به بیومولکول‌هایی مانند لیپیدهای غشای سلول‌های کبدی می‌شوند. رادیکال‌های آزاد می‌توانند با اتصال به پروتئین‌ها و حتی دی‌اِن‌اِی[2]، آسیب گسترده‌تری به سلول وارد کنند [۲].

در یک مطالعه که بر روی بیماران مبتلابه آسیب‌های کبدی در اسپانیا انجام شد، عوامل مختلفی در ایجاد آن نقش داشتند. با ارتقای تکنیک‌های جراحی و درمان‌های ایمونولوژیک، پیوند کبد به‌عنوان یک روش درمانی اثبات‌شده در نارسایی‌های حاد و مزمن کبدی استفاده می‌شود [۳-۶]. بااین‌حال، پیوند کبد با محدودیت‌هایی مانند کمبود اهداکننده مناسب، هزینه بالا و عوارض بعد از جراحی همراه است [۷-۱۰]. باوجوداین، یافتن روش‌های جایگزین ضروری به‌نظر می‌رسد.

سلول‌های بنیادی، سلول‌هایی با قابلیت تکثیر و بازسازی جمعیت‌های سلولی دیگر هستند [۱۱]. این سلول‌ها را می‌توان از منابع متفاوت جنینی و بالغ همانند خون بندناف استخراج کرد. استفاده مستقیم از سلول‌های بنیادی مزانشیمی در داخل بدن درراستای درمان با محدودیت‌هایی همراه است که ازجمله آن‌ها می‌توان به تحریک سیستم ایمنی و وقوع پاسخ ایمنی اشاره کرد [۱۲].

مطالعات مختلف بر روی فاکتورهای ترشح‌شده از سلول‌های بنیادی نشان داد این فاکتورها ممکن است به تنهایی و بدون حضور خود سلول‌های بنیادی در شرایط مختلف آسیب بافت یا اندام، سبب ترمیم بافت شوند. فاکتورهای ترشح‌شده با عنوان میکرووزیکول، سکروتوم یا اگزوزوم معرفی می‌شوند [۱۳]. ازهمین‌رو، پژوهش‌های انجام‌شده در این عرصه عمدتاً سعی در استفاده از محصولاتی دارند که شامل فاکتورهای سلول‌های بنیادی و فاقد خود سلول‌ها باشند تا شامل محدودیت‌های فوق نشوند. ازجمله این محصولات می‌توان به محیط کشت شرایطی‌شده اشاره کرد.

فاکتورهای ترشح‌شده از سلول‌های بنیادی می‌توانند در محیطی که سلول‌های بنیادی کشت شدند، شناسایی شوند که به این محیط، محیط کاندیشنال (محیط کشت شرطی‌شده)، کاندیشن مدیوم[3] می‌گویند. محیط کاندیشنال اثر آنتی‌اکسیدانی و حاوی فاکتورهای رشد متفاوت و سیتوکین‌ها دارد که به‌وسیله انواع سلول‌های بنیادی ترشح می‌شوند [۱۳-۱۵]. تولید، فریز، بسته‌بندی و قابلیت انتقال از مزایای این محیط است. به همین دلیل، از محیط کاندیشنال برای تولید دارو استفاده می‌شود و همچنین نیاز به حفاظت ویژه مانند آنچه درباره سلول‌های بنیادی باید رعایت کرد را ندارد [۱۴]. از مزایای دیگر آن، استفاده بدون جداسازی سلول‌های بنیادی از بیمار است.

در این پژوهش، هدف بررسی اثر محیط کاندیشنال بر آسیب ناشی از تتراکلرید کربن[4] است. تتراکلرید کربن یک سم قوی است و در مدل‌های حیوانی آسیب کبدی ناشی از تتراکلرید کربن به‌طور گسترده‌ای برای ارزیابی پتانسیل دارو یا غذا برای محافظت در برابر سمیت کبدی استفاده می‌شود. تتراکلرید کربن با تولید رادیکال‌های آزاد، با مولکول‌های مختلف مانند اسید آمینه، نوکلئوتیدها، اسیدهای چرب، پروتئین‌ها، اسید نوکلئیک و لیپید واکنش نشان می‌دهد و باعث تخریب شدید فرایند سلولی می‌شود.

سیستم سیتوکروم پی ۴۵۰ باعث متابولیسم تتراکلرید کربن به رادیکال تری‌کلرو متیل[5] واکنش‌پذیر می‌شود که می‌تواند با اکسیژن واکنش نشان دهد و رادیکال تری‌کلرومتیل پراکسیل[6] را تشکیل دهد و سپس به لیپیدها یا پروتئین‌ها حمله کند. این واکنش می‌تواند پراکسیداسیون لیپید را آغاز کند و باعث آسیب به بافت کبد شود. رادیکال‌های آزاد باعث تجمع و افزایش مالون‌دی‌آلدئید[7] شده که یکی از محصولات نهایی پراکسیداسیون لیپیدهاست و این امر درنهایت، سبب غیرفعال شدن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سوپر اکسید دیسموتاز[8]، کاتالاز[9] و گلوتاتیون پراکسیداز[10] می‌شود و همچنین باعث کاهش ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی[11] می‌شود [۱۶]. ازاین‌رو، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر بهبود بخشی محیط کشت حاصل از سلول‌های بنیادی بندناف بر آسیب کبدی ناشی از تزریق تتراکلرید کربن انجام شده است.

1. Cytochrome P450
2. DNA

3. Conditioned Medium (CM)
4. Carbon TetraChloride (CCl4)
5. Trichloromethyl (CCl3)
6. Trichloromethyl Peroxyl Radical (CCl3OO)
7. Malon Dialdehyde (MDA)
8. Superoxide Dismutase (SOD)
9. Catalse (CAT)
10. Glutathione Peroxidase (GPX)
11. Total Antioxidant Capacity (TAC)

روش‌ها

روش‌شناسی تحقیق

مطالعه موردنظر در ۲ بخش انجام شد. بخش اول مربوط به تولید و تهیه محیط کشت شرایطی‌شده که در این مطالعه از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد واحد تبریز تهیه شد. بخش دوم مربوط به تأثیر این محیط بر ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی پلاسما و مالون‌دی‌آلدئید است [۱۷] که با استفاده از تحلیل واریانس یک‌طرفه و نرم‌افزار SPSS نسخه بررسی شد.

روش کار مراحل کشت سلولی

مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد تبریز این مرحله را انجام داد. در ادامه مطالعات زهری و همکاران به‌طور خلاصه بیان می‌شود. برای تهیه بندناف موردنیاز آماده‌سازی کاندیشن مدیوم ابتدا مراحل زیر طی می‌شود:

۱. بندناف جنین به‌دنیاآمده با روش سزارین تحت شرایط استریل و داخل سرم فیزیولوژی از بیمارستان تهیه می‌شود.

۲. بندناف داخل الکل ۷۰ درصد شست‌وشو داده می‌شود.

۳. بندناف زیر هود به تکه‌های کوچک $5mm^2$ خرد شده و توسط بافر PBS[12] و سپس داخل HBSS[13] شست‌وشو داده می‌شود [۱۸، ۱۹]. قسمت اعظم بندناف را بافت هم‌بند موکوسی به نام ژله وارتون تشکیل می‌دهد.

مراحل کشت سلول

محیط کشت مورداستفاده در این مطالعه محیط کشت سرم جنین گاوی[14]، DMEM با گلوکز کم[15] و پن استرپ[16] (۰/۲۵ درصد) و FBS/DMEM است که به‌صورت محلول بوده و از شرکت Gibco تهیه شده است. این محیط حاوی ال-گلوتامین[17] و فاقد بی‌کربنات سدیم است [۱۹، ۲۰].

سرم جنین‌گاوی

سرم جنین‌گاوی به منظور تأمین فاکتورهای رشد، هورمون‌ها و میتوژن‌های موردنیاز سلول‌ها استفاده می‌شود. بدون وجود این فاکتورهای رشد، سلول‌ها قادر به رشد و تکثیر نخواهند بود. میزان استاندارد سرم جنین گاوی استفاده‌شده برای تحریک رشد سلول‌ها ۱۰ درصد حجمی/حجمی (v/v٪) در محیط کشت است. قبل از اضافه شدن سرم به محیط کشت، کمپلمان سرم باید غیرفعال شود. بدین منظور استوک سرم خریداری شده قبل از استفاده ۳۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۵۶ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده می‌شود. غیرفعال کردن کمپلمان می‌تواند خطر آلودگی‌های ویروسی را کاهش دهد، زیرا بعضی از ویروس‌ها در اثر افزایش دما غیرفعال می‌شوند[۲۱].

رشد و تکثیر سلول‌های مزانشیمی از قطعات بافتی ژله وارتون بند ناف انسانی

قطعات ژله وارتون بعد از جداسازی از بندناف به فلاسک T25 حاوی محیط کشت کامل منتقل می‌شوند و هر روز با میکروسکوپ مطالعه می‌شوند. بعد از گذشت ۳ روز، محیط سلول‌ها تعویض شده و به آن‌ها ۳ میلی‌لیتر محیط کشت کامل افزوده می‌شود. بعد از حدود ۱ هفته، در بافت‌ها حرکت و لغزشی مشاهده نشده و این ثابت شدن بافت‌ها در کف فلاسک، از رشد و تکثیر سلول‌ها در کنار بافت حکایت می‌کند. در روز ششم، در اطراف بافت ژله وارتون اولین سلول‌های تکثیرشده مشاهده می‌شوند.

تعویض محیط سلول‌های مزانشیمی ژله وارتون بندناف انسانی

ابتدا محیط فعلی موجود در فلاسک را با استفاده از پیپت پاستور استریل خارج و به کمک سرنگ، ۴ میلی‌لیتر از DMEM و ۱ میلی‌لیتر از سرم جنین‌گاوی را برداشته و به کمک فیلتر به داخل فلاسک منتقل شد. سپس ۱ درصد حجم کل آنتی‌بیوتیک پن استرپ به فلاسک افزوده و فلاسک در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد با رطوبت ۹۶ درصد و CO_2 ۵ درصد قرار می‌گیرد [۲۲].

پاساژ سلول‌های مزانشیمی ژله وارتون بندناف انسانی

زمانی که تراکم سلولی در فلاسک T25 به بیشتر از حدود ۷۰ درصد فضای کف فلاسک رسید، پاساژ سلولی انجام می‌شود. ابتدا محیط فعلی دور ریخته‌شده و با ۲/۵ میلی‌لیتر سرم جنین‌گاوی ۳۰ ثانیه شست‌وشو داده می‌شود. جداسازی سلول‌ها از کف فلاسک با استفاده از ۲ میلی‌لیتر آنزیم تریپسین و ۳ دقیقه انکوباسیون انجام می‌شود. پس از جداسازی کامل سلول‌ها، تریپسین با استفاده از محیط DMEM حاوی 10 درصد سرم جنین‌گاوی به حجم ۴ میلی‌لیتر رسانده شد تا خنثی شود.

محلول حاوی سلول با استفاده از پیپت پاستور به یک فالکون ۱۵ میلی‌لیتری استریل منتقل و ۵ دقیقه در دور ۱۵۰۰ سانتریفیوژ می‌شود. پس از خارج کردن محیط رویی، رسوب سلولی توسط محیط DMEM به‌طور کامل سوسپانسیون شده و به‌طور مساوی به ۲ فلاسک T25 انتقال داده می‌شود. فلاسک‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با رطوبت ۹۶ درصد و CO_2 ۵ درصد نگهداری می‌شوند. فلاسک‌های حاوی سلول ژله وارتون روزانه بررسی شده و هر ۳ روز ۱ بار محیط آن‌ها تعویض می‌شود [۲۲].

12. Phosphate-Buffered Saline (PBS)
13. Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)
14. Fetal Bovine Serum (FBS)
15. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), DMEM Low Glucose
16. Pen-Strip
17. L-Glutamine

تهیه محیط کشت شرایطی‌شده سلول‌های بنیادی ژله وارتون

طبق مطالعات انجام‌شده به‌منظور جمع‌آوری محیط کاندیشنال سلول‌های بنیادی ژله وارتون، زمانی که سلول‌های بنیادی ژله وارتون کشت داده شد، به پاساژ دوم رسیدند، سلول‌ها را پاساژ داده و به داخل یک فلاسک کشت منتقل می‌شود. پس از چسبیدن سلول‌ها به کف فلاسک کشت، محیط رویی کشت دور ریخته می‌شود و سلول‌های چسبیده به کف فلاسک را بار دیگر و هر بار با ۱ میلی‌لیتر سرم جنین‌گاوی شست‌وشو داده می‌شود. سپس حدود ۱/۵ تا ۲ میلی‌لیتر محیط DMEM تازه فاقد سرم، روی سلول‌ها ریخته و مجدداً فلاسک‌ها به انکوباتور منتقل می‌شود.

پس از گذشت ۷۲ ساعت محیط رویی سلول‌ها جمع‌آوری و در لوله فالکون ریخته شده و ۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ می‌شود، بعد محیط کاندیشنال برای جلوگیری از حضور هرگونه سلول مرده یا قطعات سلولی با فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر شده، محیط در لوله فالکون الیکوت شده و جهت نگهداری به فریزر ۸۰- منتقل می‌شود [۱۹، ۲۰، ۲۳].

شمارش تعداد سلول‌ها

بعد از اضافه کردن تریپسین و جدا کردن سلول‌ها، آن‌ها را به فالکون منتقل کرده و سانتریفیوژ انجام می‌شود، سپس محیط بالایی را حذف و ۱ میلی‌لیتر محیط کامل روی سلول‌ها ریخته می‌شود و به آرامی پیپتاژ انجام می‌شود. در مرحله بعد، مقدار ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی روی لام هموسایتومتری و لامل سنگی مخصوص لام روی سلول‌ها قرار داده می‌شود. در این حالت حجم محیط قرار گرفته بین لام و لامل سنگی ۰/۱ میکرولیتر است.

بنابراین بعد از شمارش سلول‌های موجود در هریک از ۱۶ خانه بزرگ از لام، تعداد نهایی در عدد ۱۰ هزار ضرب می‌شود. درنتیجه، تعداد کل سلول‌های موجود در ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی به دست می‌آید. برای تفاوت گذاشتن بین سلول‌های مرده و زنده، نمونه معمولاً در یک رنگ خاص مانند تریپان بلو حل می‌شود. (این روش رنگ‌آمیزی به نام رنگ‌آمیزی حذف با رنگ[18] شناخته شده که با استفاده از ۱ رنگ ۲ ظرفیتی که از غشای سلول‌های مرده می‌گذرد و آن‌ها را آبی می‌کند، شناخته می‌شود)، درحالی‌که سلول‌های زنده این رنگ را جذب نمی‌کنند و درنتیجه، سلول‌های زنده از مرده تفکیک می‌شوند. هنگامی که این نمونه در زیر میکروسکوپ مشاهده می‌شود، سلول‌های مرده مانند نقطه‌های تاریک نمایان می‌شوند [۱۹].

18. Dye exclusion staining

مراحل ایجاد آسیب و تزریق محیط کشت

در این مطالعه از ۲۱ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار بالغ که از مرکز پرورش حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز تهیه شده بودند، استفاده شد. موش‌ها در قفس‌های تمیز و تحت شرایط نرمال در دمای ۲۲ تا ۲۳ درجه و سیکل روشنایی طبیعی ۱۲ ساعته و دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند. موش‌ها به‌صورت تصادفی به ۳ گروه ۷ تایی گروه کنترل، گروه آزمایش A (دریافت تتراکلرید کربن) و گروه آزمایش B (دریافت تتراکلرید کربن و سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی[19]) تقسیم شدند.

گروه کنترل به‌صورت تک دُز ۲ سی‌سی بر کیلوگرم، به‌صورت داخل صفاقی[20]، سالین نرمال دریافت کردند. گروه آزمایش A و گروه تیمار B به‌روش داخل صفاقی تتراکلرید کربن با دُز ۲ میلی‌لیتر بر کیلوگرم با نسبت ۱:۱ با روغن زیتون دریافت کردند [۲۴، ۲۵]. پس از گذشت ۲۴ ساعت از تزریق تتراکلرید کربن، در ۳ روز متوالی موش‌های گروه B با تزریق کاندیشن مدیوم آزمایش شدند [۲۰]. تمام مراحل انجام این تحقیق با رعایت اصول اخلاقی حاکم بر حیوانات آزمایشگاهی در تحقیقات انجام شده است.

بعد از ۴۸ ساعت از تزریق اول کاندیشن مدیوم و ۲۴ ساعت از تزریق دوم کاندیشن مدیوم از همه موش‌ها خون‌گیری انجام شد و شاخص‌های استرس اکسیداتیو شامل ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی پلاسما با استفاده از روش FRAP[21] و مالون‌دی‌آلدئید با روش TBARS[22] توسط کیت‌های تشخیصی ارزیابی شد.

تحلیل آماری

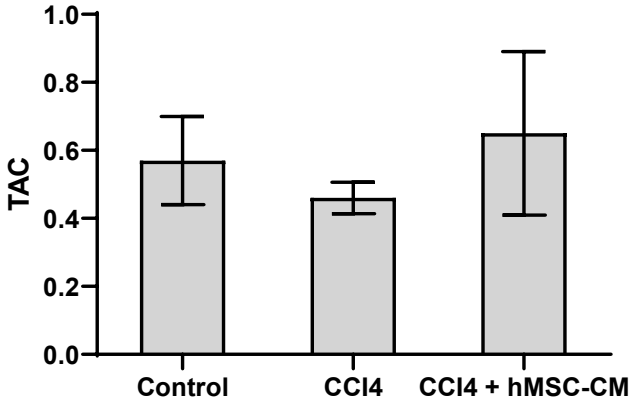
در مطالعه حاضر، مقادیر متغیرهای کمّی به‌صورت «انحراف معیار±میانگین» نشان داده شد. جهت مقایسه میانگین متغیرهای بررسی‌شده بین گروه‌ها از تحلیل واریانس یک‌طرفه استفاده شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ تجزیه‌وتحلیل شد و سطح معناداری ۰/۰۵ درنظر گرفته شد. همچنین برای رسم نمودارها از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۸/۰/۱ استفاده شد.

یافته‌ها

بررسی مقایسه‌ای میزان ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی و مالون‌دی‌آلدئید در گروه‌های مطالعه‌شده

در نمونه‌گیری از تمام موش‌های هر ۳ گروه و تهیه نمونه سرمی، میزان ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی به‌روش FRAP و مالون‌دی‌آلدئید با استفاده از روش TBARS توسط کیت‌های

19. Human Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Medium (hMSC-CM)
20. IntraPeritoneal (IP)
21. Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP)
22. ThioBarbituric Acid Reactive Substances (TBARS)



تصویر ۱. مقایسه میانگین ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در گروه‌های (کنترل، A و B)
مقادیر به‌صورت میانگین همراه با فاصله اطمینان ۹۵ درصد نشان داده شده است.
براساس نتایج تحلیل واریانس یک‌طرفه، تفاوت آماری معناداری بین میانگین ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی گروه‌های مختلف وجود نداشت (P=۰/۱۷۵).

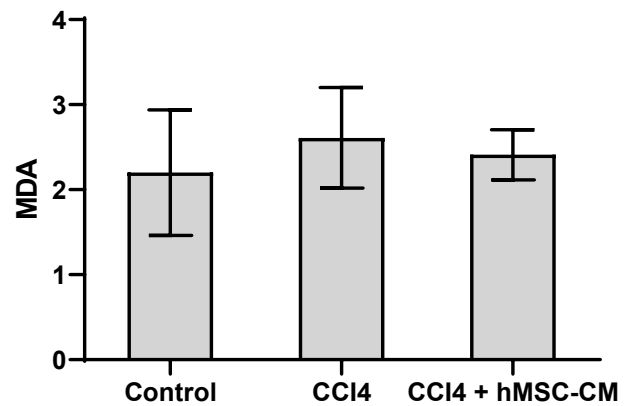
تشخیصی اندازه‌گیری شد. همان‌طور که در جدول شماره ۱ و همچنین در تصویر شماره ۱ ارائه شده است، براساس تحلیل واریانس یک‌طرفه، بین گروه‌های مطالعه‌شده ازنظر ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی تفاوت آماری معناداری وجود نداشت (P=۰/۱۷۵)؛ نتیجه مشابهی برای مالون‌دی‌آلدئید نیز یافت شد (P=۰/۴۷۸) (تصویر شماره ۲).

بر این اساس، هیچ اختلاف آماری معناداری دیده نشد و درنتیجه، محیط کاندیشن مدیوم تأثیر معناداری بر درمان آسیب کبدی ناشی تزریق تتراکلرین کربن ندارد. باوجوداین، کمترین میزان ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی متعلق به گروه آزمایش‌شده با تتراکلرید کربن (A) به میزان ۰/۴۶ میلی‌مول بر لیتر است.

همچنین بیشترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام در گروه تیمار شده با تتراکلرید کربن و سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی(B) به مقدار ۰/۶۵ میلی‌مول بر لیتر مشاهده شد. ازسوی‌دیگر، کمترین میزان مالون‌دی‌آلدئید در گروه کنترل به مقدار ۲/۲۰ میکرومول بر لیتر و بیشترین میزان آن در گروه آزمایش‌شده با تتراکلرید کربن (A) به مقدار ۲/۶۱ میکرومول بر لیتر بود.

بحث و نتیجه‌گیری

کربن تتراکلراید به‌عنوان ماده شیمیایی بینابینی در صنایع کاربرد دارد. این ماده تحت تأثیر آنزیم‌های سیتوکروم پی ۴۵۰ به محصولات سمی واکنشگر تری کلرومتیل تبدیل شده و به‌عنوان سم محیطی، باعث آسیب بافتی، ازجمله آسیب کبدی از طریق



تصویر ۲. مقایسه میانگین مالون‌دی‌آلدئید در گروه‌های (کنترل، A و B)
مقادیر به‌صورت میانگین همراه با فاصله اطمینان ۹۵ درصد نشان داده شده است.
براساس نتایج تحلیل واریانس یک‌طرفه، تفاوت آماری معناداری بین میانگین مالون‌دی‌آلدئید گروه‌های مختلف وجود نداشت (P=۰/۴۷۸).

جدول ۱. مقایسه میانگین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام و مالون‌دی‌آلدئید در گروه‌های (کنترل، A و B)

متغیر	میانگین±انحراف معیار			P†
	کنترل	تتراکلراید کربن (A)	تتراکلراید کربن و سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی (B)	
ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام	۰/۵۷±۰/۱۴	۰/۴۶±۰/۰۵	۰/۶۵±۰/۲۶	۰/۱۷۵
مالون‌دی‌آلدئید	۲/۲۰±۰/۸۰	۲/۶۱±۰/۶۴	۲/۴۱±۰/۳۲	۰/۴۷۸

† تحلیل واریانس یک‌طرفه

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان

استرس اکسیداتیو می‌شود [۲۵، ۲۶]. همچنین تزریق تتراکلرید کربن موجب استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی می‌شود و به غشای هپاتوسیت‌ها آسیب می‌رساند [۲۷].

ازآنجاکه اثرات آنتی‌اکسیدانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی در مطالعات قبلی تأیید شده است [۲۸]، مطالعه حاضر به‌منظور بررسی اثرات آن بر استرس اکسیداتیو ناشی از تتراکلرید کربن انجام شد. باتوجه‌به نتایج مطالعه اوگالی و همکاران، سمیت ناشی از تتراکلرید کربن باعث کاهش قابل توجه ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی حیوانات در مقایسه با گروه‌های عادی می‌شود [۲۹]. ازآنجاکه استرس اکسیداتیو ناشی از تتراکلرید کربن ازطریق تولید گونه‌های اکسیژن فعال[۲۳] ایجاد می‌شود، بخشی از ظرفیت تام آنتی‌اکسیدان بافت برای مقابله با اکسیدهای ناشی از گونه‌های اکسیژن فعال استفاده می‌شود؛ بنابراین کاهش ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در حیوانات آزمایش‌شده با تتراکلرید کربن منطقی است [۳۰، ۳۱].

مالون‌دی‌آلدئید یکی از رایج‌ترین نشانگرهای اکسیداتیو آسیب به بافت‌هاست [۳۲]. نتایج پژوهش این مطالعه همسو با مطالعات محمدعلی‌پور و همکاران [۳۳] و اوکدا و همکاران [۳۴]، سطح افزایش یافته مالون‌دی‌آلدئید را در گروه آزمایش‌شده با تتراکلرید کربن نشان داد. گونه‌های فعال مانند گونه‌های اکسیژن فعال با حمله به پیوندهای ۲ گانه در داخل اسیدهای چرب غیراشباع[۲۴]، رادیکال‌های لیپیدی تولید می‌کنند.

در مرحله بعد، رادیکال‌های لیپیدی به رادیکال‌های پروکسی لیپیدی تبدیل می‌شوند. هیدروپراکسیدهای لیپیدی و سایر رادیکال‌های لیپیدی در واکنش با دیگر اسیدهای چرب غیراشباع، هیدروپراکسیدهای لیپیدی ناپایداری هستند و به سرعت به مالون‌دی‌آلدئید و ۴-هیدروکسی-۲-نونال[۲۵] تجزیه می‌شوند [۳۲]. باتوجه‌به تأثیر تتراکلرید کربن در تولید گونه‌های اکسیژن فعال، سطح بالای مالون‌دی‌آلدئید طبیعی است. باتوجه‌به اینکه مالون‌دی‌آلدئید محصول نهایی گونه‌های اکسیژن فعال است.در مطالعه جیانگ و همکاران [۳۵] گزارش شده که درمان با اگزوزوم‌های مشتق‌شده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی[۲۶] (hMSC-EX) در آسیب مزمن ناشی از تتراکلرید کربن، سطح مالون‌دی‌آلدئید را به سطح نرمال برمی‌گرداند.

باتوجه‌به نقش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در مقابله با گونه‌های اکسیژن فعال و همچنین نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر، می‌توان نتیجه گرفت که درمان با سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی ممکن است استرس اکسیداتیو را با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بهبود بخشد [۳۶]، اما زمان و فاصله طول درمان تأثیرگذار است.

استرس اکسیداتیو نقش کلیدی در ضایعات کبدی ناشی از تتراکلرید کربن ایفا می‌کند؛ بنابراین بهبود اکسیداتیو استرس می‌تواند این ضایعات را کاهش دهد. طبق مطالعه بهمنی و همکاران [۳۷] درمان با سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی ممکن است موجب بهبود شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی شود، اما باتوجه‌به مطالعه حاضر، زمان تزریق و فاصله بین تزریقات، عاملی مؤثر بر معنادار بودن نتیجه و بهبود است.

مطالعه حاضر نشان می‌دهد تزریق سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی در زمان ۲۴ ساعت پس از ایجاد آسیب کبدی، نتایج معناداری ایجاد نمی‌کند. باوجوداین، بیشترین میزان ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی در گروه آزمایش‌شده با کاندیشن مدیوم مشاهده شد. همچنین کمترین میزان مالون‌دی‌آلدئید در گروه آزمایش‌شده با تتراکلرید کربن به دست آمد. با افزایش زمان آزمایش یا افزایش تعداد سلول‌هایی که محیط رویی از آن‌ها جمع‌آوری شده است، احتمال دارد نتایج متفاوتی حاصل شود.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

تمام اصول «راهنمای اخلاقی پژوهش بر حیوانات» در مراحل اجرای این پژوهش با کد اخلاق IR.IAU.TABRIZ.REC.1400.115 رعایت شد.

23. Reactive Oxygen Spicies (ROS)
24. PolyUnsaturated Fatty Acids (PUFAs)
25. 4-Hydroxynonenal (4-HNE)
26. human Mesenchymal Stem Cells (hMSC)

حامی مالی

این پژوهش هیچ‌گونه کمک مالی از سازمان‌های دولتی، خصوصی و غیرانتفاعی دریافت نکرده است.

مشارکت‌نویسندگان

مفهوم‌سازی، طراحی مطالعه و بازبینی نقادانه دست‌نوشته برای محتوای فکری مهم: جعفر رحمانی کهنموئی؛ کسب، تحلیل و تفسیر داده‌ها: جعفر رحمانی کهنموئی و سیده زهرا میری؛ تهیه پیش‌نویس دست‌نوشته: سیده زهرا میری؛ نظارت بر مطالعه: جعفر رحمانی کهنموئی و سید اسماعیل صفوی خلخالی.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

از کادر آزمایشگاه پاتولوژی دانشگاه آزاد واحد تبریز و کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز که در این پژوهش ما را همراهی کرده‌اند، سپاس‌گزاری می‌شود.

References

[1] Mazani M, Rezagholizadeh L, Shamsi S, Mahdavifard S, Ojarudi M, Salimnejad R, et al. Protection of CCl_4-induced hepatic and renal damage by linalool. Drug and Chemical Toxicology. 2022; 45(3):963-71. [DOI:10.1080/01480545.2020.1792487] [PMID]

[2] Guengerich FP. A history of the roles of cytochrome P450 enzymes in the toxicity of drugs. Toxicological Research. 2021; 37(1):1-23. [DOI:10.1007/s43188-020-00056-z] [PMID] [PMCID]

[3] 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. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2011; 2011:219060. [DOI:10.1155/2011/219060] [PMID] [PMCID]

[4] Tuñón MJ, Alvarez M, Culebras JM, González-Gallego J. An overview of animal models for investigating the pathogenesis and therapeutic strategies in acute hepatic failure. World Journal of Gastroenterology. 2009; 15(25):3086-98. [DOI:10.3748/wjg.15.3086] [PMID] [PMCID]

[5] Escorsell A, Mas A, de la Mata M; Spanish Group for the Study of Acute Liver Failure. Acute liver failure in Spain: Analysis of 267 cases. Liver Transplantation. 2007; 13(10):1389-95. [DOI:10.1002/lt.21119] [PMID]

[6] Shito M, Balis UJ, Tompkins RG, Yarmush ML, Toner M. A fulminant hepatic failure model in the rat: Involvement of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha. Digestive Diseases and Sciences. 2001; 46(8):1700-8. [DOI:10.1023/A:1010653504568] [PMID]

[7] Mohamadnejad M, Alimoghaddam K, Mohyeddin-Bonab M, Bagheri M, Bashtar M, Ghanaati H, et al. Phase 1 trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis. Archives of Iranian Medicine. 2007; 10(4):459-66. [PMID]

[8] 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 Journal of Gastroenterology: WJG. 2007; 13(24):3359-63. [DOI:10.3748/wjg.v13.i24.3359] [PMID] [PMCID]

[9] 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. Archives of Iranian Medicine. 2011; 14(1):12-7. [PMID]

[10] Vosough M, Moslem M, Pournasr B, Baharvand H. Cell-based therapeutics for liver disorders. British Medical Bulletin. 2011; 100:157-72. [DOI:10.1093/bmb/ldr031] [PMID]

[11] Fuchs E, Segre JA. Stem cells: A new lease on life. Cell. 2000; 100:143-55. [DOI:10.1016/S0092-8674(00)81691-8]

[12] Amiri F, Jahanian-Najafabadi A, Roudkenar MH. In vitro augmentation of mesenchymal stem cells viability in stressful microenvironments : In vitro augmentation of mesenchymal stem cells viability. Cell Stress and Chaperones. 2015; 20(2):237-51. [PMID] [PMCID]

[13] Fontanilla CV, Gu H, Liu Q, Zhu TZ, Zhou C, Johnstone BH, et al. Adipose-derived stem cell conditioned media extends survival time of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Scientific Reports. 2015; 5:16953. [DOI:10.1038/srep16953] [PMID] [PMCID]

[14] Pawitan JA. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. BioMed Research International. 2014; 2014:965849. [DOI:10.1155/2014/965849] [PMID] [PMCID]

[15] Schweizer R, Tsuji W, Gorantla VS, Marra KG, Rubin JP, Plock JA. The role of adipose-derived stem cells in breast cancer progression and metastasis. Stem Cells International. 2015; 2015:120949. [DOI:10.1155/2015/120949] [PMID] [PMCID]

[16] Tsai JC, Chiu CS, Chen YC, Lee MS, Hao XY, Hsieh MT, et al. Hepatoprotective effect of Coreopsis tinctoria flowers against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2017; 17(1):139. [PMID] [PMCID]

[17] McClain CJ, Kromhout JP, Peterson FJ, Holtzman JL. Potentiation of acetaminophen hepatotoxicity by alcohol. JAMA. 1980; 244(3):251-3. [DOI:10.1001/jama.244.3.251] [PMID]

[18] Nagamura-Inoue T, He H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: their advantages and potential clinical utility. World Journal of Stem Cells. 2014; 6(2):195-202. [PMID] [PMCID]

[19] Zahri S, Maleki M, Hamidi K, Khatami SM. [Isolation and characterization of human umbilical cord wharton's jelly stem cells (Persian)]. Journal of Ardabil University of Medical Sciences. 2013; 13(47):36-43. [Link]

[20] Ravan AP, Goudarzi F, Rafieemehr H, Bahmani M, Rad F, Jafari M, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells conditioned medium attenuates CCl4 induced chronic liver fibrosis. Toxin Reviews. 2021; 40(2):238-49. [DOI:10.1080/15569543.2019.1590849]

[21] Rauch C, Feifel E, Amann EM, Spötl HP, Schennach H, Pfaller W, et al. Alternatives to the use of fetal bovine serum: human platelet lysates as a serum substitute in cell culture media. ALTEX. 2011; 28(4):305-16. [PMID]

[22] Hoveizi E, Tavakol S. Therapeutic potential of human mesenchymal stem cells derived beta cell precursors on a nanofibrous scaffold: An approach to treat diabetes mellitus. Journal of Cellular Physiology. 2019; 234(7):10196-204. [DOI:10.1002/jcp.27689] [PMID]

[23] Salehi PM, Foroutan T, Javeri A, Taha MF. Extract of mouse embryonic stem cells induces the expression of pluripotency genes in human adipose tissue-derived stem cells. Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 2017; 20(11):1200-6. [PMID]

[24] Nasiri F, Amiri F, Mohammadipour M, Molaei S, Habibi Roudkenar M, Jalili MA. [H2O2-preconditioned mesenchymal stem cell regenerative effects on acute liver failure mice (Persian)]. The Scientific Journal of Iranian Blood Transfusion Organization. 2015; 12(2):111-24. [Link]

[25] Mohseni R, Karimi J, Tavilani H, Khodadadi I, Hashemnia M. Carvacrol ameliorates the progression of liver fibrosis through targeting of Hippo and TGF-β signaling pathways in carbon tetrachloride (CCl4)-induced liver fibrosis in rats. Immunopharmacology and immunotoxicology. 2019; 41(1):163-71. [PMID]

[26] Mochizuki M, Shimizu S, Urasoko Y, Umeshita K, Kamata T, Kitazawa T, et al. Carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in pregnant and lactating rats. The Journal of Toxicological Sciences. 2009; 34(2):175-81. [PMID]

[27] Zhen MC, Wang Q, Huang XH, Cao LQ, Chen XL, Sun K, et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits oxidative damage and preventive effects on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis. The Journal of Nutritional Biochemistry. 2007; 18(12):795-805. [DOI:10.1016/j.jnutbio.2006.12.016] [PMID]

[28] Cantinieaux D, Quertainmont R, Blacher S, Rossi L, Wanet T, Noël A, et al. Conditioned medium from bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves recovery after spinal cord injury in rats: An original strategy to avoid cell transplantation. PloS One. 2013; 8(8):e69515. [DOI:10.1371/journal.pone.0069515] [PMID] [PMCID]

[29] Ogaly HA, Eltablawy NA, Abd-Elsalam RM. Antifibrogenic influence of mentha piperita L. Essential oil against CCl4-induced liver fibrosis in rats. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2018; 2018:4039753. [DOI:10.1155/2018/4039753] [PMID] [PMCID]

[30] Suresh DR, Kumaran SD, Annam V, Veena H. Age related changes in malondialdehyde: Total antioxidant capacity ratio-A novel marker of oxidative stress. International Journal of Pharma and Bio Sciences. 2010; 1(2):1-6. [Link]

[31] Ma JQ, Ding J, Zhang L, Liu CM. Ursolic acid protects the mouse liver against CCl4-induced oxidative stress and inflammation by the MAPK/NF-κB pathway. Environmental Toxicology and Pharmacology. 2014; 37(3):975-83. [PMID]

[32] Grotto D, Maria LS, Valentini J, Paniz C, Schmitt G, Garcia SC, et al. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. Quimica Nova. 2009; 32(1):169-74. [DOI:10.1590/S0100-40422009000100032]

[33] Mohammadalipour A, Karimi J, Khodadadi I, Solgi G, Hashemnia M, Sheikh N, et al Dasatinib prevents hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride (CCl_4) via anti-inflammatory and antioxidant mechanism. Immunopharmacology and Immunotoxicology. 2017; 39(1):19-27. [DOI:10.1080/08923973.2016.1263860] [PMID]

[34] Okda TM, Abd-Alhaseeb MM, Barka K, Ragab NM. Ginger potentiates the effects of silymarin on liver fibrosis induced by CCl4: The role of galectin-8. European Review for Medical and Pharmacological Sciences. 2019; 23(2):885-91. [PMID]

[35] Jiang W, Tan Y, Cai M, Zhao T, Mao F, Zhang X, et al. Human umbilical cord MSC-derived exosomes suppress the development of CCl4-induced liver injury through antioxidant effect. Stem Cells International. 2018; 2018:6079642. [PMID] [PMCID]

[36] Karimi J, Mohammadalipour A, Sheikh N, Khodadadi I, Hashemnia M, Goudarzi F, et al. Protective effects of combined Losartan and Nilotinib on carbon tetrachloride (CCl4)-induced liver fibrosis in rats. Drug and Chemical Toxicology. 2020; 43(5):468-78. [PMID]

[37] Bahmani M, Ziamajidi N, Hashemnia M, Abbasalipourkabir R, Salehzadeh A. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cell conditioned medium (hMSC-CM) improves antioxidant status in carbon tetrachloride-induced oxidative damage in rat. Iranian Journal of Science and technology, Transactions A: Science. 2020; 44(5):1327-35. [DOI:10.1007/s40995-020-00944-x]