




Original Article

The therapeutic effect of conditioned medium of human amniotic membrane stem cells on heart failure in rats

Nahid Aboutaleb^{1,2}, Mahdieh Mehrab Mohseni³, Mohammad Reza Khalilzadeh³, Neda Mousavi Niri⁴, Maryam Naseroleslami^{3*}

¹Physiology Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

²Department of Physiology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

⁴Department of Biotechnology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

ARTICLE INFO**Article History:**

Received: 26 Oct 2022

Accepted: 16 Nov 2022

ePublished: 12 Mar 2023

Keywords:

- Conditioned medium
- Heart failure
- Apoptosis
- Caspase 3
- Caspase 9
- Mesenchymal stem cells
- Amniotic membrane

Abstract

Background. The conditioned medium of stem cells plays an important role in the treatment of various diseases such as heart damage, but its molecular mechanisms are unknown. Therefore, this study aimed to investigate one of the mechanisms of the effect of this substance in the treatment of male rats with heart failure.

Methods. A total of 20 male rats were divided into four groups, control, heart failure, heart failure receiving culture medium, and medium condition groups. Heart failure was induced in all groups except the control group with isoproterenol, then, culture medium and conditioned medium were injected into the related animals 28 days after HF induction. Afterward, the expressions of caspase 3 and 9 factors were examined.

Results. Changes in the expressions of caspase 3, caspase 9, and GAPDH genes in the four groups were evaluated real-time PCR. Furthermore, the average expressions of caspase 3 and 9 in four groups were compared using ELISA. All data revealed that the induction of heart failure increased the expression of apoptotic factors compared to the control group, and that the treatment with a conditioned medium caused a significant decrease in apoptotic factors compared to the heart failure group ($P \leq 0.05$).

Conclusion. It was concluded that the conditioned medium of human amniotic membrane mesenchymal stem cells was able to improve heart failure by targeting the apoptosis pathway.

Practical Implications. The findings of this study highlighted the importance of this compound as a suitable candidate for treating heart failure in the future.

How to cite this article: Aboutaleb N, Mehrab Mohseni M, Khalilzadeh M R, Mousavi Niri N, Naseroleslami M. The therapeutic effect of conditioned medium of human amniotic membrane stem cells on heart failure in rats. *Med J Tabriz Uni Med Sciences*. 2023; 45(1):22-34. doi: 10.34172/mj.2023.010. Persian.

*Corresponding author; Email: naseroleslami@gmail.com

© 2023 The Authors. This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution CC BY 4.0 License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Extended Abstract

Background

The conditioned medium of stem cells plays an important role in the treatment of various diseases, including the regulation of heart function and management of heart damage. However, the molecular mechanisms by which this protection is achieved are largely unknown. Therefore, This study, aimed to investigate one of the mechanisms contributing to the conditioned medium effect of human amniotic membrane mesenchymal stem cells in the treatment of male rats with heart failure.

Methods

A total of 20 wistar male rats with a weight of 250-300 gram were divided into four groups including control, heart failure, heart failure receiving culture medium, and heart failure receiving conditioned medium groups. Heart failure was induced by subcutaneous injection of isoproterenol at a dose of 170 mg/kg/d dissolved in 0.5 mL of normal saline for four consecutive days. To ensure the heart failure in the rats, echocardiography was performed 24 hours after the last injection. The animals were anesthetized by intraperitoneal injection of Xylazine 10 mg/kg and Ketamine 50 mg/kg. Then, the fourth left intercostal space was cut and the heart was exposed; the pericardium was opened slowly and, in one group, 100 microliters of conditioning medium was injected into four points of the myocardium of the animal's heart and for the CM heart failure group, 100 microliters of DMEM medium was injected into the myocardium. Then, the chest was sutured. Tramadol was injected to reduce pain, and cefazolin was used as an antibiotic. Real time PCR of caspase 3 and 9 genes was performed four weeks after the last injection. RNA was extracted from the heart tissue of all studied samples and, then, related cDNAs were synthesized. Also, 40 cycles were considered for each Real-Time PCR cycle. GAPDH gene was used as control. Four weeks after the last injection, moreover, the heart tissues from the tested groups were homogenized to determine the expression levels of caspase 3 and 9 proteins using ELISA test. In order to analyze the data in the present study, descriptive investigations were

performed using central indicators like mean, standard deviation, etc. The analysis of variance and Tukey's post hoc test were also used to examine the statistical relationship among pairs of groups. All analyzes were performed using SPSS software version 22, and $P \leq 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Echocardiography results showed that the control group had a significant difference with the HF, culture medium, and conditioned medium groups and the HF group also had a significant difference with the control and conditioned medium groups ($P \leq 0.05$). Investigations related to the EF variable showed that in the control group EF increased significantly compared with the HF, culture medium, and conditioned medium groups; and the EF in HF group decreased significantly compared with the control and conditioned medium groups ($P \leq 0.05$). Furthermore, investigations related to the FS variable demonstrated that the control group had a significantly higher average than the other three groups; and the average of FS in HF group was significantly lower than the control group and the group receiving conditioned medium ($P \leq 0.05$). Changes in the expressions of caspase 3, caspase 9, and GAPDH genes in four groups were evaluated by the real-time PCR method. According to the results, the average of caspase 3 in the control group was significantly lower than that in the HF and culture medium injection groups, and the average of caspase 9 in the HF group was significantly lower than that of the conditioned medium injection group. It was also observed that HF group had a significant difference with control group and medium condition injection ($P \leq 0.05$). At the significance level of $P \leq 0.05$, it was detected that the average of caspase 9 in the control group was significantly lower than that of the HF, culture medium injection, and conditioned medium injection groups; and the average of the HF group was also significantly higher than that of the conditioned medium injection group. The average expressions of caspase 3 in HF


group were compared with other groups using ELISA, and it was discovered that the average of the control group was significantly lower than that of the HF, culture medium injection, and conditioned medium groups; and the average of caspase 3 in the HF group was significantly higher than that of conditioned medium group ($P \leq 0.05$). Moreover, the average expressions of caspase 9 in the control group was significantly lower than that of HF, culture medium, and conditioned medium groups; it was also detected that caspase 9 in the HF group was

significantly higher than that of the conditioned medium injection group ($P \leq 0.05$).

Conclusion

It was concluded that the conditioned medium of human amniotic membrane mesenchymal stem cells had a great potential to improve heart failure by targeting the apoptosis pathway.

اثر درمانی کاندیشن مدیوم سلول‌های بنیادی غشای آمینوتیک انسانی بر نارسایی قلبی موش‌های صحرایی

ناهد ابوطالب^{۱،۲*}، مهدیه مهرباب محسنی^۳، محمدرضا خلیل زاده^۳، ندا موسوی نیری^۴، مریم نصرالاسلامی^{۳*} 

^۱مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران.

^۲گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

^۳گروه علوم سلولی مولکولی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۴گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

زمینه. کاندیشن مدیوم سلول‌های بنیادی نقش مهمی در درمان بیماری‌های مختلف مانند آسیب قلبی ایفا می‌کند، اما مکانیسم‌های مولکولی آن ناشناخته است. بنابراین در این مطالعه یکی از مکانیسم‌های تاثیر این ماده در درمان موش‌های صحرایی نر مبتلا به نارسایی قلبی بررسی شد.

روش کار. ابتدا ۲۰ موش صحرایی نر به ۴ گروه کنترل، نارسایی قلبی، نارسایی قلبی دریافت کننده محیط کشت و کاندیشن مدیوم تقسیم شدند. نارسایی قلبی در همه گروه‌ها بجز گروه کنترل با ایزوپروتونول القا شد و در نهایت پس از ۲۸ روز، محیط کشت و کاندیشن مدیوم به حیوانات تزریق شد. سپس بیان عوامل کاسپاز ۳ و ۹ بررسی شد.

یافته‌ها. تغییرات بیان ژن‌های کاسپاز ۳، کاسپاز ۹ و GAPDH در چهار گروه مذکور با روش Real-time PCR بررسی شد. علاوه بر این، مقایسه میانگین بیان کاسپاز ۳ و ۹ در این ۴ گروه توسط ELISA نتایج Real-time PCR را تایید کرد. همه داده‌ها نشان داد که القای نارسایی قلبی بیان عوامل آپوپتوتیک را نسبت به گروه کنترل افزایش داده و تیمار با محیط شرطی باعث کاهش معنی‌داری در فاکتورهای آپوپتوز نسبت به گروه نارسایی قلبی شد ($P \leq 0.05$).

نتیجه‌گیری. این مطالعه نشان داد که کاندیشن مدیوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی غشای آمینوتیک انسانی با هدف قرار دادن مسیر آپوپتوز قادر به بهبود نارسایی قلبی است.

پیامدهای عملی. یافته‌های این مطالعه اهمیت این ترکیب را به عنوان کاندیدای مناسب برای درمان نارسایی قلبی در آینده نشان می‌دهد.

اطلاعات مقاله

سابقه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۱/۸/۴

پذیرش: ۱۴۰۱/۸/۲۵

انتشار برخط: ۱۴۰۱/۱۲/۲۱

کلیدواژه‌ها:

- کاندیشن مدیوم
- نارسایی قلبی
- آپوپتوز
- کاسپاز ۳
- کاسپاز ۹
- سلول‌های بنیادی مزانشیمی
- غشای آمینوتیک

مقدمه

زندگی است که هیچ کدام اثر درمانی موفقیت آمیزی نداشته و فقط باعث کاهش عوارض این بیماری و پایین آوردن سرعت پیشرفت آن می‌شوند که حتی در این زمینه هم تاثیر رضایت بخشی ندارند. بنابراین دستیابی به روش‌های درمانی نوین بسیار مهم به نظر می‌رسد.^{۱،۴} قدم بعدی در درمان، پیوند قلب است که این روش نیز مشکلات فراوانی مانند زمان طولانی برای پیدا کردن قلب اهدایی مناسب، تعداد بسیار محدود پیوند دهنده مناسب و همچنین مداخلات سیستم ایمنی و پس زدن پیوند دارد که برای رفع این مشکل ترکیبات دارویی تضعیف کننده سیستم ایمنی مورد استفاده قرار می‌گیرد که خطر ابتلا به سرطان و انواع بیماری‌های ویروسی و باکتریایی را بالا می‌برد.^{۵-۶}

نارسایی قلبی (Heart failure, HF) از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر در کشورهای توسعه یافته و در حال توسعه بوده و از چالش‌های بزرگ بهداشت جهانی به حساب می‌آید.^۱ این اختلال از بیماری‌هایی است که پیش‌آگهی آن بسیار دشوار است و معمولاً بیمار پس از پیشرفت بیماری از ابتلای به آن مطلع می‌شود.^۳ از مهم‌ترین مکانیسم‌های سلولی و ملکولی نارسایی قلبی می‌توان به آپوپتوز و نکروز سلول‌های قلبی، هیپرتروفی سلول‌های قلبی، فیبروز بینابینی، کاهش قدرت انقباضی، التهاب، استرس‌های اکسیداتیو و آسیب به رگ‌زایی اشاره کرد. شیوه‌های کلاسیک درمان این بیماری شامل درمان دارویی، جراحی و تغییر شیوه

* نویسنده مسؤول: ایمیل naseroleslami@gmail.com

تعیین حجم نمونه‌های آماری

برای تعیین حجم نمونه با استفاده از روش ارایه شده توسط علی‌محمدی و سپندی حجم نمونه به صورت زیر محاسبه شده است.

$$n = \frac{DF}{k} + 1$$

در معادله ارایه شده n ، حجم جامعه آماری در هر گروه نمونه، DF ، عددی مابین ۱۰ الی ۲۰ برای آنالیز واریانس برای آزمایش‌های مربوط روی نمونه‌های حیوانی و k نیز تعداد گروه‌ها است. بر اساس این فرمول تعداد نمونه‌ها در این پژوهش حداقل برابر با ۴ و حداکثر ۶ خواهد بود. بنابراین در این پژوهش از ۵ نمونه برای هر گروه استفاده گردید.

گروه‌بندی حیوانات

در این پژوهش بیست موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن ۲۵۰ الی ۳۰۰ گرم به صورت تصادفی به چهار گروه کنترل، نارسایی قلبی، نارسایی قلبی دریافت‌کننده محیط کشت و گروه نارسایی قلبی دریافت‌کننده کاندیشن مدیوم (هر گروه حاوی ۵ راس موش صحرایی) تقسیم شدند.

ایجاد نارسایی قلبی در موش‌های صحرایی

برای ایجاد مدل نارسایی قلبی مقدار ۱۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر دوز ایزوپروتونول (سیگما، سینت لوییس، میسوری، ایالات متحده آمریکا) در نرمال سالین حل شده و به مدت چهار روز متوالی به صورت زیر جلدی به حیوانات تزریق شد.^{۱۴}

جراحی و تزریق

برای حصول اطمینان از نارسا شدن قلب موش‌های صحرایی یاد شده، ۲۴ ساعت بعد از آخرین تزریق ایزوپروتونول، اکوکاردیوگرافی با دستگاه Vivid 7 در بیمارستان قلب شهید رجایی بخش آزمایشگاه حیوانات انجام شد. سپس برای جراحی ابتدا حیوان‌ها وزن شدند. در مرحله بعد حیوانات با تزریق داخل صفاقی زایلازین ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (Xylazine) و کتامین ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (Ketamine) بی‌هوش شدند^{۱۴} و بعد از تراشیدن مو در ناحیه جراحی، اینتوبه شده و به ونتیلاتور متصل گردیدند. سپس چهارمین فضای بین دنده‌ای چپ برش داده شده و قلب در معرض دید قرار گرفت، پریکارد به آرامی باز شده و در یک گروه ۱۰۰ میکرولیتر از کاندیشن مدیوم به ۴ نقطه از میوکارد قلب حیوان تزریق شد.

در دهه‌های اخیر استفاده از سلول‌های بنیادی به عنوان روش درمانی مناسب مطرح شد. به دلیل مشاهده نتایج مثبت این روش، امیدهای فراوانی در زمینه درمان بیماری‌ها برانگیخته شد. محققین سعی می‌کردند بر پایه سه مکانیسم، از این سلول‌ها برای درمان نارسایی قلبی بهره گیرند. مکانیسم اول تمایز کاندیشن مدیوم به کاردیومیوسیت‌ها و ترمیم میوکارد^۹، مکانیسم دوم تمایز به سلول‌های عضلات صاف عروق و تمایز به سلول‌های اندوتلیال عروق بود که سبب آژیوتنز می‌شد^{۱۱} و مکانیسم سوم اثرات ترشح فاکتورهای پاراکرینی این سلول‌ها بود.^{۱۳،۱۲} اگرچه استفاده از روش سلول درمانی موفقیت‌هایی در *in vivo* و *in vitro* در درمان بیماری‌ها مانند نارسایی قلبی نشان داد،^{۱۳-۱۴} اما به دلیل رخداد مشکلاتی، استفاده از این روش همواره با چالش‌ها و نگرانی‌هایی همراه بوده و همچنین تاکنون سوالات پاسخ نیافته فراوانی در زمینه استفاده از انواع سلول‌های بنیادی برای کارایی بالاتر و مشکلات پایین‌تر وجود دارد.

مهم‌ترین مشکلات مشاهده شده در این روش، تومورزایی به خصوص در استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی، ملاحظات اخلاقی، تمایز ناخواسته کاندیشن مدیوم به سلول دیگر، مداخلات سیستم ایمنی، مرگ سلول‌های بنیادی، دسترسی سخت و گاهی روش‌های دردناک برای به دست آوردن کاندیشن مدیوم هستند.^{۱۲-۱۳} یکی از مکانیسم‌های ایجاد اثرات مثبتی استفاده از سلول‌های بنیادی، ناشی از اثرات پاراکرینی ترکیبات ترشح شده از سلول‌های بنیادی است که منجر به تحریک رگ‌زایی و بهبود عملکرد بافت یا ارگان مورد نظر می‌شود. در این پژوهش با توجه به شواهد فوق و با تکیه بر اثرات پاراکرینی ترکیبات موجود در سوپرناتانت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از پرده آمنیوتیک انسانی، بیان فاکتورهای آپوپتوزی کاسپاز ۳ و ۹ در بافت قلب موش‌های صحرایی نر مدل نارسایی قلبی بررسی شد تا میزان اثربخشی این ترکیبات ارزیابی شوند.

روش کار

آزمایش‌ها در مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایران پس از دریافت کد اخلاق IR.IUMS.FMD.REC.1399.811 انجام شد.

تهیه کاندیشن مدیوم

کاندیشن مدیوم به صورت پودر لیوفلیزه از سلول‌های بنیادی غشای آمنیوتیک که در پاساژ سوم تا پنجم بود از مرکز انتقال خون تهران تهیه گردید.

ایالات متحده آمریکا) در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد و غلظت‌های پروتئین برحسب نانوگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد.

آنالیز داده‌های آماری

داده‌ها در پژوهش حاضر در دو بخش توصیفی و استنباطی آنالیز شدند که در بخش استنباطی با استفاده از شاخص‌های مرکزی مانند میانگین، انحراف استاندارد و ... بررسی‌های توصیفی انجام شد. در بخش استنباطی نیز موثر بودن مداخلات صورت گرفته با استفاده از آنالیز واریانس بررسی شد و همچنین برای بررسی ارتباط آماری میان زوج گروه‌ها نیز از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد و نتایج در قالب جداول و شکل‌های آماری آرایه گردید. همه آنالیزها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ انجام شد و $P \leq 0.05$ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج فاکتورهای قلبی

نتایج اکوکاردیوگرافی نشان داد که گروه کنترل با گروه‌های HF، محیط کشت و سلوله بنیادی دارای اختلاف معنی‌دار داشته و گروه HF نیز با گروه‌های کنترل و کاندیشن مدیوم اختلاف معنی‌داری داشت ($P \leq 0.05$). نتایج آنالیزهای آماری اکوکاردیوگرافی در جدول ۱ نمایش داده شده است. بررسی‌های مربوط به متغیر EF نشان داد که EF در گروه کنترل نسبت به بگروه‌های HF، محیط کشت و کاندیشن مدیوم افزایش معنی‌دار یافته و در گروه HF نیز نسبت به گروه کاندیشن مدیوم افزایش معنی‌داری یافت ($P \leq 0.05$) (شکل ۱ الف). همچنین بررسی‌های مربوط به متغیر FS نشان داد که گروه کنترل به صورت معنی‌داری میانگین بالاتری نسبت به سایر سه گروه دیگر داشت، اما در مقایسه میان گروه HF با سایر گروه‌ها میانگین میان این گروه HF نسبت به گروه کنترل و تزریق کاندیشن مدیوم بطور معنی‌دار کمتر بود ($P \leq 0.05$) (شکل ۱ ب).

نتایج بررسی بیان ژن‌ها

تغییر در بیان ژن‌های کاسپاز ۳، کاسپاز ۹ و GAPDH در گروه‌های یاد شده با روش Real time PCR ارزیابی شد. در شکل ۲ الف می‌توان مشاهده کرد که میانگین کاسپاز ۳ در گروه کنترل به صورت معنی‌داری از گروه‌های HF و نیز تزریق محیط کشت کمتر بوده و همچنین میانگین گروه HF نیز به صورت معنی‌داری از گروه تزریق کاندیشن مدیوم بیشتر است. براساس نتایج به دست آمده از آزمون تعقیبی توکی مشاهده شد که میان گروه HF با گروه کنترل و تزریق کاندیشن مدیوم اختلاف معنی‌داری وجود دارد

در گروه دیگر نارسایی قلبی فقط ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM در میوکارد تزریق شد. پس از تزریق، قفسه سینه دوخته شده و بعد از دوختن عضلات، حیوانات زیر اکسیژن خالص قرار گرفتند تا به هوش بیایند. پس از به هوش آمدن، برای کاهش درد، ترامادول با دوز ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم تزریق گردید و از سفازولین به عنوان آنتی‌بیوتیک استفاده شد. سپس حیوانات در قفس قرار گرفته و به حیوان خانه منتقل شدند. حیوانات در شرایط استاندارد و در دمای محیط در مرکز نگهداری حیوانات با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری شدند و در تمام موارد مسایل اخلاقی بر اساس استانداردهای کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی ایران رعایت گردید.

Real time PCR ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹

چهار هفته بعد از آخرین تزریق، RNA با خلوص و غلظت بالا طبق پروتکل شرکت سازنده (کیژن، آلمان) از بافت قلب تمام نمونه‌های مورد مطالعه استخراج شد، سپس مراحل سنتز cDNA برای دو ژن کاسپاز ۳ و ۹ طبق پروتکل شرکت سازنده (فرمنتاس، ایالات متحده آمریکا) انجام گرفت و cDNA سنتز شده جهت انجام واکنش رونویسی معکوس با استفاده از پرایمرهای پیشرو و معکوس ژن GAPDH به ترتیب ۳'-GACATGCCCGCTGGAGAAAC-۵' و ۳'-AGCCCAGGATGCCCTTTAGT-۵'، پرایمرهای پیشرو و معکوس ژن کاسپاز-۳ به ترتیب ۳'-TGGACAACAACGAAACCTC-۵' و ۳'-ACACAAGCCCATTTCAGG-۵' و پرایمرهای پیشرو و معکوس ژن کاسپاز-۹ به ترتیب ۳'-GGAGTTGACTGAGGTGGGA-۵' و ۳'-AGCAAGGAAGACTGGGA-۵' استفاده شد. تهیه cDNA تک رشته‌ای با استفاده از پرایمر Oligo dt (ام دلبیو جی-بیوتک، آلمان) و آنزیم نسخه برداری معکوس (فرمنتاس) و بر اساس پروتکل مربوطه انجام شد. هر واکنش PCR با استفاده از PCR master mix (Applied Biosystems) و SYBER Green در دستگاه ABI Step One (Applied Biosystems, Sequences Detection Systems, Foster City, CA) طبق پروتکل شرکت سازنده انجام گرفت. ۴۰ سیکل برای هر چرخه Real-Time PCR در نظر گرفته شد. از ژن GAPDH به عنوان کنترل استفاده شد.

تست الایزا

چهار هفته پس از آخرین تزریق، برای تعیین میزان بیان پروتئین‌های کاسپاز ۳ و ۹ پس از هموژنیزه کردن بافت قلب، تست الایزا طبق دستورالعمل کیت انجام شد. پلیت‌های الایزا با استفاده از ELISA Reader (الایزا ریدر، سینرجی ام‌ایکس بیوتک،

صورت معنی‌داری از گروه‌های HF، تزریق محیط کشت و نیز تزریق کاندیشن‌دهی مدیوم کمتر بوده و همچنین میانگین گروه HF نیز به صورت معنی‌داری از گروه تزریق کاندیشن‌دهی مدیوم بیشتر است ($P \leq 0/001$) (شکل ۳ الف). همچنین مقایسه میانگین بیان کاسپاز ۹ در گروه موش‌های HF با گروه‌های دیگر مطالعه نشان داد که میانگین گروه کنترل به صورت معنی‌داری کمتر از HF، تزریق محیط کشت و نیز تزریق کاندیشن‌دهی مدیوم است و نیز گروه HF نیز به صورت معنی‌داری بالاتری از گروه تزریق کاندیشن‌دهی مدیوم دارد ($P \leq 0/001$) (شکل ۳ ب).

($P \leq 0/001$). همچنین با استفاده از آزمون تعقیبی توکی در سطح معنی‌داری $P \leq 0/001$ مشاهده شد که میانگین کاسپاز ۹ در گروه کنترل به صورت معنی‌داری از گروه‌های HF، تزریق محیط کشت و نیز تزریق کاندیشن‌دهی مدیوم کمتر بوده و همچنین میانگین گروه HF نیز به صورت معنی‌داری از گروه تزریق کاندیشن‌دهی مدیوم بیشتر است (شکل ۲ ب).

نتایج الایزا

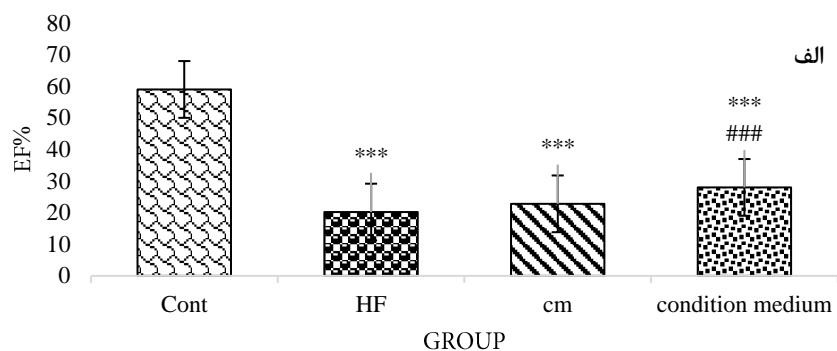
مقایسه میانگین بیان کاسپاز ۳ در گروه موش‌های HF با گروه‌های دیگر مطالعه نشان داد که میانگین گروه کنترل به

جدول ۱. نتایج آزمون تعقیبی توکی برای گروه‌های مختلف موش برای متغیرهای EF و FS

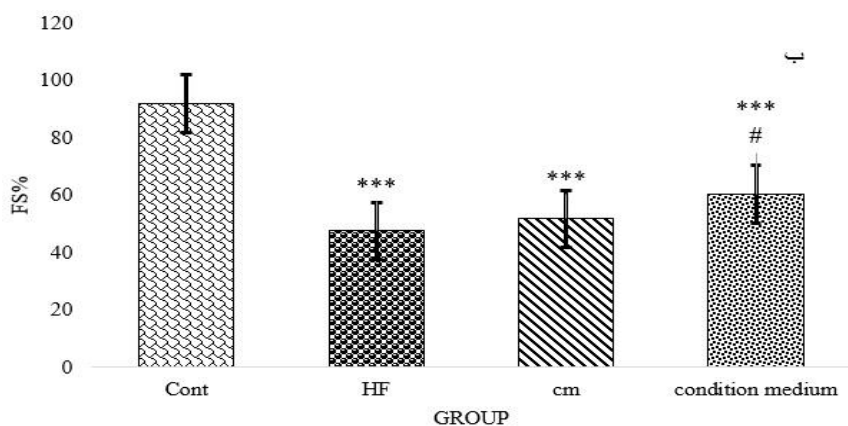
گروه (A)	گروه (B)	اختلاف میانگین متغیر EF	خطای استاندارد متغیر EF	مقدار احتمال متغیر EF	اختلاف میانگین متغیر FS	خطای استاندارد متغیر FS	مقدار احتمال متغیر FS
کنترل	HF	۴۴/۴**	۱/۵۹	>0/001	۳۸/۸**	۱/۵۳	>0/001
	تزریق محیط کشت	۴۰/۲**	۱/۵۹	>0/001	۳۶/۲**	۱/۵۳	>0/001
	تزریق کاندیشن‌دهی مدیا	۳۱/۶**	۱/۵۹	>0/001	۳۱**	۱/۵۳	>0/001
HF	کنترل	-۴۴/۴**	۱/۵۹	>0/001	۳۸-**	۱/۵۳	>0/001
	تزریق محیط کشت	-۴/۲	۱/۵۹	0/076	-۲/۶	۱/۵۳	0/356
	تزریق کاندیشن‌دهی مدیا	-۱۲/۸**	۱/۵۹	>0/001	-۷/۸*	۱/۵۳	0/017
تزریق محیط کشت	کنترل	۴۰/۲**	۱/۵۹	>0/001	-۳۶/۲**	۱/۵۳	>0/001
	HF	۴/۲	۱/۵۹	0/076	۲/۶	۱/۵۳	0/356
	تزریق کاندیشن‌دهی مدیا	-۸/۶**	۱/۵۹	>0/001	-۵/۲*	۱/۵۳	0/017
تزریق کاندیشن‌دهی مدیا	HF	-۳۱/۶**	۱/۵۹	>0/001	-۳۱**	۱/۵۳	>0/001
	تزریق محیط کشت	۱۲/۸**	۱/۵۹	>0/001	۷/۸**	۱/۵۳	0/001
	تزریق کاندیشن‌دهی مدیا	۸/۶**	۱/۵۹	>0/001	۵/۲*	۱/۵۳	0/017

*: معنی‌داری در سطح ۵ درصد

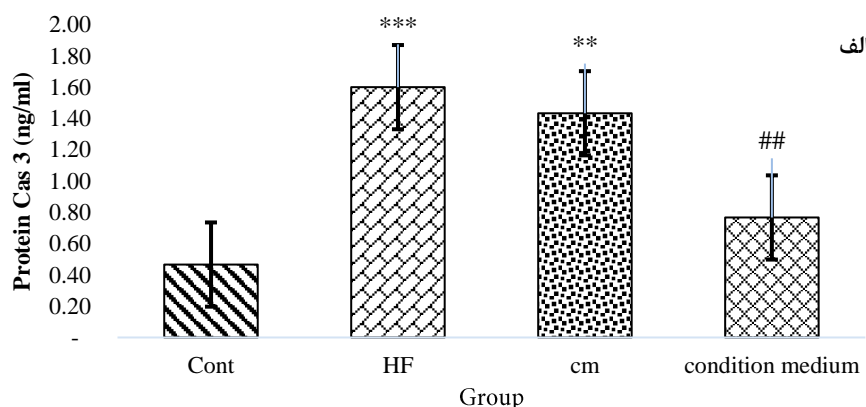
** : معنی‌داری در سطح ۱ درصد



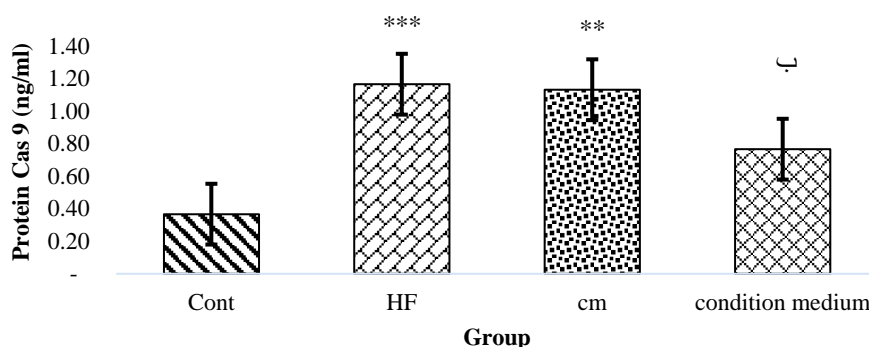
شکل ۱. مقایسه میانگین گروه‌های مختلف موش‌های صحرایی بر حسب متغیرهای EF و FS و الف. مقایسه میانگین گروه‌های مختلف موش‌های صحرایی بر حسب متغیر EF (***: مقایسه گروه کنترل با HF و گروه تزریق کاندیشن مدیوم کاندیشن مدیوم (P<0/001): ###; مقایسه گروه HF با گروه تزریق کاندیشن مدیوم (P<0/001))



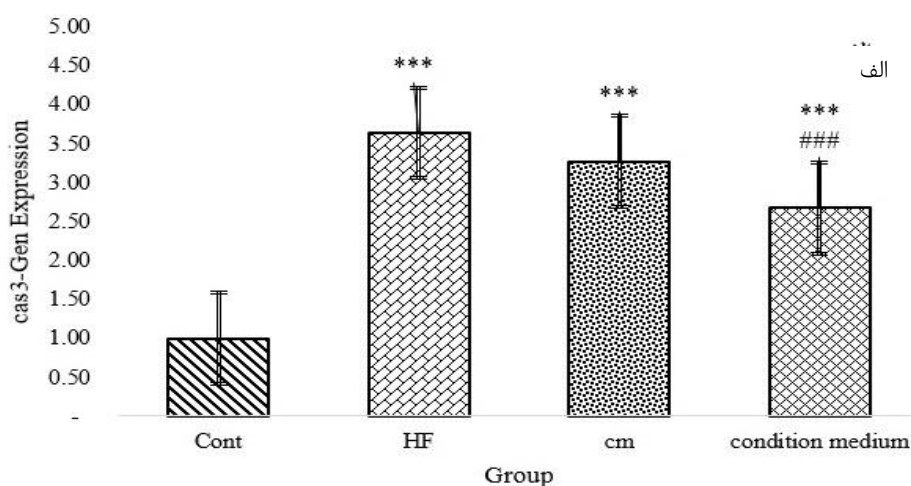
ب. مقایسه میانگین گروه‌های مختلف موش‌های صحرایی بر حسب متغیر FS (***: مقایسه گروه کنترل با HF، تزریق محیط کشت و تزریق کاندیشن مدیوم (P<0/001): #; مقایسه گروه HF با تزریق کاندیشن مدیوم (P<0/05))



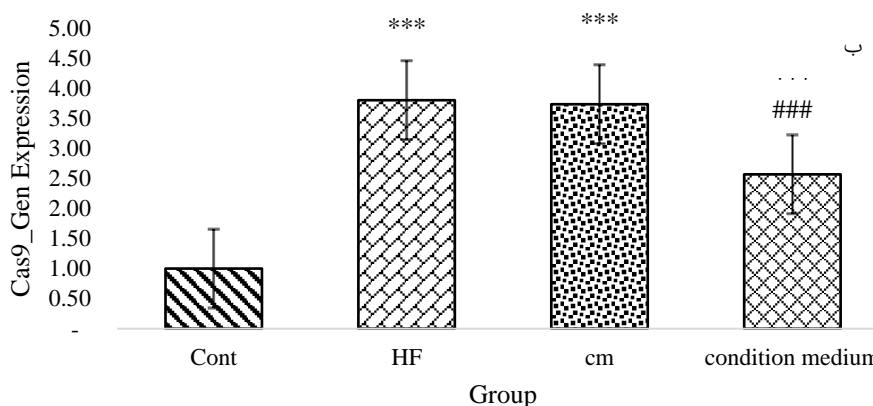
شکل ۲. بررسی بیان ژن کاسپاز ۳ و ۹ در گروه‌های مختلف موش‌های صحرایی توسط تکنیک Real time PCR و الف. نمودار مستطیلی میانگین داده‌های ارایه شده برای گروه‌های مختلف برای متغیر Cas 3 (ng/ml) (***: مقایسه گروه کنترل با HF (P<0/001): **; مقایسه گروه کنترل با گروه تزریق محیط کشت (P<0/01): #; مقایسه میان گروه HF با گروه تزریق کاندیشن مدیوم (P<0/01))



ب. نمودار مستطیلی میانگین داده‌های ارایه شده برای گروه‌های مختلف برای متغیر **Cas 9 (ng/ml)** (***) مقایسه گروه کنترل با گروه HF ($P < 0.001$): **؛ مقایسه گروه کنترل با تزریق محیط کشت ($P < 0.01$): *؛ مقایسه گروه HF با تزریق کاندیشن مدیوم ($P < 0.05$): #



شکل ۳. بررسی بیان پروتئین کاسپاز ۳ و ۹ در گروه‌های مختلف توسط تکنیک الیزا
 الف. نمودار مستطیلی میانگین داده‌های ارایه شده برای گروه‌های مختلف برای متغیر **Cas 3-Gen Expression (ng/ml)** (***) مقایسه گروه کنترل با گروه HF، تزریق محیط کشت و تزریق کاندیشن مدیوم ($P < 0.001$): ###؛ مقایسه گروه HF با گروه تزریق کاندیشن مدیوم ($P < 0.001$): ###



ب. شکل مستطیلی میانگین داده‌های ارایه شده برای گروه‌های مختلف برای متغیر **Cas 9-Gen Expression** (***) مقایسه گروه کنترل با گروه HF، تزریق محیط کشت و تزریق کاندیشن مدیوم ($P < 0.001$): ###؛ مقایسه گروه HF با گروه تزریق کاندیشن مدیوم ($P < 0.001$): ###

پروتئین فعال خاص شده یا بر بیان ژن‌هایی اثرگذار باشد. بر اساس این گزارش‌ها، کاهش سطح فیبروز بر اثر مهار تکثیر فیبروبلاست‌ها توسط کاندیشن‌مدیوم، مهار بیان پروتئین‌های کلژن ۱ و ۳ و یا تحریک میوبلاست‌های قلب رخ می‌دهد. برخی پژوهش‌ها نیز این بهبود را تنها به افزایش رگ‌زایی نسبت می‌دهند.^{۲۳-۲۶}

در مطالعه حاضر، اثر کاندیشن‌مدیوم سلول‌های بنیادی غشای آمینوتیک بر نارسایی قلبی بررسی شد و به دلیل این که مرگ کاردیومیوسیت‌ها عامل مهمی در گسترش و پیشرفت این بیماری هستند، عوامل دخیل در آپوپتوز شامل کاسپاز ۳ و ۹ ارزیابی شدند. طی مطالعه انجام شده، عملکرد قلب با بررسی فاکتورهای اکوکاردیوگرافی ارزیابی شد. مقایسه نتایج حاصل از EF و FS نشان داد پس از نارسا شدن قلب موش‌های صحرایی، تمام موش‌های صحرایی علایم نارسایی را به صورت کاهش معنی‌دار EF و FS نشان دادند. اما در این میان، گروهی که کاندیشن‌مدیوم مشتق از پرده آمینوتیک انسانی را دریافت کردند افزایش معنی‌داری نسبت به ۲ گروه نارسا شده دیگر داشتند، اگرچه همچنان با میزان طبیعی EF و FS گروه کنترل تفاوت معنی‌داری داشتند. با توجه به این که بیان کاسپاز ۳ و ۹ در این مطالعه در گروه‌های تیمار شده با کاندیشن‌مدیوم نسبت به گروه نارسایی قلبی کاهش پیدا کرده بود، به نظر می‌رسد که کاندیشن‌مدیوم سلول‌های مزانشیمی غشای آمینوتیک انسانی از طریق هدف‌گیری مسیر آپوپتوز می‌تواند در درمان قلب آسیب دیده اثرگذار باشد و از این طریق به بهبود عملکرد قلب کمک کند.

در راستای مطالعه حاضر، ونگ و همکاران با تکیه بر گزارش‌های محققین مبنی بر بالا بودن سطح عوامل رگ‌زایی مثل VEGF و IL-6 در MSC-CM، اثرات پاراکرینی به ویژه رگ‌زایی MSC-CM در ترمیم شکستگی‌های دیابتی موش‌های بزرگ صحرایی را بررسی کردند. ایشان گزارش کردند که با کاشت زیر جلدی اسفنج ژلاتینی حامل MSC-CM در موش‌های یاد شده، رگ‌زایی افزایش یافته و با افزایش جریان خون در محل مورد نظر، ترمیم شکستگی سرعت یافته است.^{۲۷} چن و همکاران نیز در مطالعه‌ای، اثرات مثبت کاندیشن‌مدیوم سلول‌های مزانشیمی در ترمیم عصب بیماران را گزارش کردند.^{۲۸} تاکاهاشی و همکاران از کاندیشن‌مدیوم سلول‌های بنیادی غشای آمینوتیک برای ترمیم زخم موش دیابتی استفاده کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که هیدروژل‌های حاوی کاندیشن‌مدیوم مزانشیمی مشتق از آمیون، با افزایش رگ‌زایی، تسریع اپی‌تلیزاسیون و سرکوب التهاب، باعث تسریع بهبود زخم در موش‌های دیابتی شدند. بنابراین استفاده

بیماری‌های قلبی و عروقی مانند نارسایی میوکارد یا سکته‌های قلبی از دلایل اصلی مرگ و میر در سراسر جهان است.^۱ ایسکمی عضله قلبی منجر به آسیب برگشت‌ناپذیر و ایجاد اسکار در بافت قلب می‌شود که عامل اصلی ایجاد نارسایی قلبی است. اگرچه در سال‌های اخیر برای درمان نارسایی قلبی از گزینه‌های درمانی متفاوتی مانند دارو درمانی، پیوند قلب، بای پس عروق کرونر و ترومبولیز استفاده شده است اما هر کدام از این موارد با وجود داشتن مزایا، معایبی هم دارند.

امروزه سلول‌های بنیادی در درمان بسیاری از بیماری‌ها مانند ناراحتی‌های قلبی استفاده شده است.^{۲،۵، ۱۴-۱۶} اما در مورد سلول‌های بنیادی نیز نکاتی مانند این که تعداد سلول دریافتی چه قدر باشد، به کدام ناحیه و با چه فاصله زمانی تزریق گردد تا حداکثر کارایی را داشته باشد وجود دارد. با وجود همه این موارد، بررسی‌ها نشان داده‌اند که وقتی سلول‌ها به ناحیه مورد نظر تزریق می‌شوند امکان رخداد موارد ناخواسته مانند این که تعدادی از سلول‌ها به دلیل عدم تطابق و سازگاری با محیط از بین روند، تعداد زیادی از سلول‌ها از ناحیه مورد نظر به سایر قسمت‌ها مهاجرت کنند و حتی سلول‌های تزریق شده قادر به تمایز به سلول‌های بافت هدف نباشند و گاهی با توجه به شرایط به سلول‌های ناخواسته تبدیل شوند وجود دارد که این موارد کارایی این روش را کاهش می‌دهند.^{۱۴، ۱۵}

بنابراین تا کنون درمان موثری برای بیماری‌های قلبی شناخته نشده و مکانیسم‌های متعدد دخیل در این بیماری شناسایی شده‌اند. یکی از این مکانیسم‌ها آپوپتوز سلول‌های قلبی است. از آن جایی که کاهش کاردیومیوسیت‌ها در عملکرد قلب تاثیر زیادی دارد، در این تحقیق برای اولین بار اثر کاندیشن‌مدیوم (به عنوان محصول بدون سلول) بر مرگ کاردیومیوسیت‌ها در مبتلایان به نارسایی قلبی بررسی شد.

امروز مطالعات متعدد نشان داده است که یکی از عواملی که سبب عملکرد موثر سلول‌های بنیادی شده ترشحات این سلول‌هاست که شامل فاکتورهای رشد، رگ‌زایی، ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی هستند. با توجه به مطالعات پیشین، پیوند کاندیشن‌مدیوم و استفاده از کاندیشن‌مدیوم این سلول‌ها در نارسایی قلبی سبب کاهش سطح فیبروز شده است. بنابراین این اثرات به طور عمده مربوط به ترشحات پاراکرینی این سلول‌ها است. بر اساس برخی گزارش‌ها در سکرتوم‌ها یا آگزوزوم‌های ترشح شده از این سلول‌ها گاهی RNAهای کدکننده و غیر کدکننده نیز دیده می‌شود که همه این‌ها می‌توانند منجر به بیان

در مقطع کارشناسی ارشد بوده که با حمایت مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایران اجرا شده است.

مشارکت پدیدآوران

ناهید ابوطالب در ایده‌پردازی، ندا موسوی نیری در جمع‌آوری داده‌ها، محمدرضا خلیل‌زاده در تحلیل یا تفسیر داده‌ها، مهدیه مهرباب محسنی در تهیه پیش‌نویس و نقد و بررسی آن از جهت محتوای فکری و مریم ناصرالاسلامی در طراحی اثر مشارکت داشتند.

منابع مالی

این تحقیق به با بودجه دانشگاه علوم پزشکی ایران انجام شده است.

دسترس‌پذیری داده‌ها

در صورت نیاز تمام داده‌ها قابل ارایه هستند..

ملاحظات اخلاقی

تمام آزمایش‌ها براساس استانداردهای کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی ایران در مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی ایران پس از دریافت کد اخلاق IRIUMS.FMD.REC.1399.811 انجام شد.

تعارض منافع

مؤلفان اظهار می‌کنند که منافع متقابلی از تألیف و انتشار این مقاله وجود ندارند.

موضوعی از کاندیشن مدیوم هیپوکسیک مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی آمیون می‌تواند یک درمان جدید برای زخم پای دیابتی باشد.^{۴۹} مونتر و همکاران نیز در مقاله‌ای مروری بیان کردند که کاندیشن مدیوم مشتق از سلول‌های بنیادی مزانشیمی یک درمان امیدوارکننده برای بیماری‌های پوستی است و تأکید داشتند که مطالعات بیشتری برای تایید ایمنی، اثربخشی و استانداردسازی تولید کاندیشن مدیوم نیاز است.^{۳۰} در مطالعات گوناگون از کاندیشن مدیوم سلول‌های بنیادی در درمان بیماری‌های کلیوی، پوستی، عصبی و... استفاده شده و اثرات مفید و معنی‌داری در مدل‌های حیوانی و بیماران دیده شده است. در نتایج این مطالعات بیان شده که اثرات مفید این ترکیبات بیشتر به علت تاثیر این ترکیبات در افزایش رگ‌زایی، کاهش مرگ سلولی و التهاب در بافت هدف است.^{۲۸} در انجام این تحقیق محدودیت‌های تکنیکی و غیرتکنیکی مانند مرگ و میر موش‌ها در فرایند ایجاد نارسایی قلبی، عدم ایجاد نارسایی قلبی مناسب، افزایش هزینه کیت‌ها و آنتی‌بادی‌ها وجود داشت.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی مطالعه حاضر نشان داد که کاندیشن مدیوم سلول‌های بنیادی غشای آمینوتیک انسانی قادر به کاهش آسیب قلبی در موش‌های صحرایی از طریق هدف‌گیری مسیر آپوپتوز دارد. این یافته حاکی از آن است که در آینده کاندیشن مدیوم می‌تواند به عنوان روش غیر تهاجمی که فاقد معایب تزریق سلول‌های بنیادی است برای درمان بیماری‌های قلبی استفاده شود.

قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه با عنوان بررسی اثر کاندیشن مدیوم سلول‌های بنیادی مزانشیمی غشای آمینوتیک انسانی بر میزان کاسپاز ۳ و کاسپاز ۹ در نارسایی قلبی موش‌های صحرایی نر

References

1. Levy WC, Mozaffarian D, Linker DT, Sutradhar SC, Anker SD, Cropp AB, et al. The Seattle Heart Failure Model: prediction of survival in heart failure. *Circulation*. 2006;113(11):1424-33. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.584102
2. Rosamond W, Flegal K, Friday G, Furie K, Go A, Greenlund K, et al. Heart disease and stroke statistics—2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2007;115(5):e69-e171. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.179918
3. Gheorghide M, Bonow RO. Chronic heart failure in the United States: a manifestation of coronary artery disease. *Circulation*. 1998;97(3):282-9. doi: 10.1161/01.cir.97.3.282
4. Massie BM. 15 years of heart-failure trials: what have we learned? *The Lancet*. 1998;352:SI29-S33. doi: 10.1016/s0140-6736(98)90016-2

5. Zhang F, Pasumarthi K. Embryonic stem cell transplantation. *BioDrugs*. 2008;22(6):361-74.
6. Miniati DN, Robbins RC. Heart transplantation: a thirty-year perspective. *Annual review of medicine*. 2002;53:189. doi: 10.1146/annurev.med.53.082901.104050
7. Marelli D, Desrosiers C, El-Alfy M, Kao RL, Chiu RC-J. Cell transplantation for myocardial repair: an experimental approach. *Cell transplantation*. 1992;1(6):383-90. doi: 10.1177/096368979200100602
8. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *The EMBO journal*. 1999;18(14):3964-72. doi: 10.1093/emboj/18.14.3964
9. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *cell*. 2003;114(6):763-76. doi: 10.1016/s0092-8674(03)00687-1
10. Razavi Tousi SMT, Sharifi M, Naseroleslami M, Azizi Y, Aboutaleb N. Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Amniotic Membrane Increase VEGF and Extenuate Fibrosis in Heart Failure Rats. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*. 2022;46(3):781-91. doi: 10.1007/s40995-022-01307-4
11. Halkos ME, Zhao Z-Q, Kerendi F, Wang N-P, Jiang R, Schmarkey LS, et al. Intravenous infusion of mesenchymal stem cells enhances regional perfusion and improves ventricular function in a porcine model of myocardial infarction. *Basic research in cardiology*. 2008;103(6):25-36. doi: 10.1007/s00395-008-0741-0
12. Uemura R, Xu M, Ahmad N, Ashraf M. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. *Circulation research*. 2006;98(11):1414-21. doi: 10.1161/01.RES.0000225952.61196.39
13. Rosenthal N, Santini MP, Musarò A. Growth factor enhancement of cardiac regeneration. *Cell Transplantation*. 2006;15(1_suppl):41-5. doi: 10.3727/00000006783982287
14. Naseroleslami M, Aboutaleb N, Parivar K. The effects of superparamagnetic iron oxide nanoparticles-labeled mesenchymal stem cells in the presence of a magnetic field on attenuation of injury after heart failure. *Drug Delivery and Translational Research*. 2018;8(5):1214-25. doi: 10.1007/s13346-018-0567-8
15. Naseroleslami M, Aboutaleb N, Mokhtari B. Amniotic membrane mesenchymal stem cells labeled by iron oxide nanoparticles exert cardioprotective effects against isoproterenol (ISO)-induced myocardial damage by targeting inflammatory MAPK/NF-κB pathway. *Drug Delivery and Translational Research*. 2021;11(1):242-54. doi: 10.1007/s13346-020-00788-3
16. Naseroleslami M, Aboutaleb N. Human amniotic membrane mesenchymal stem cells exert cardioprotective effects against isoproterenol (ISO)-induced myocardial injury through suppression of inflammation and modulation of inflammatory MAPK/NF-κB pathway. *Cell and Tissue Banking*. 2022;23(1):67-77. doi: 10.1007/s10561-021-09915-x
17. Xiao Y-F, Min J-Y, Morgan JP. Immunosuppression and xenotransplantation of cells for cardiac repair. *The Annals of thoracic surgery*. 2004;77(2):737-44. doi: 10.1016/j.athoracsur.2003.08.036
18. Vulliet PR, Greeley M, Halloran SM, MacDonald KA, Kittleson MD. Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *The Lancet*. 2004;363(9411):783-4. doi: 10.1016/S0140-6736(04)15695-X
19. Maitra A, Arking DE, Shivapurkar N, Ikeda M, Stastny V, Kassaei K, et al. Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nature genetics*. 2005;37(10):1099-103. doi: 10.1038/ng1631
20. Tsuji H, Miyoshi S, Ikegami Y, Hida N, Asada H, Togashi I, et al. Xenografted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells are immunologically tolerated and transdifferentiated into cardiomyocytes. *Circulation research*. 2010;106(10):1613-23. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.205260
21. Müller-Ehmsen J, Whittaker P, Kloner RA, Dow JS, Sakoda T, Long TI, et al. Survival and development of neonatal rat cardiomyocytes transplanted into adult myocardium. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2002;34(2):107-16. doi: 10.1006/jmcc.2001.1491
22. Pan Q, Fouraschen SM, de Ruiter PE, Dinjens WN, Kwekkeboom J, Tilanus HW, et al. Detection of spontaneous tumorigenic transformation during culture expansion of human mesenchymal stromal

- cells. *Experimental biology and medicine*. 2014;239(1):105-15. doi: 10.1177/1535370213506802
23. Zhang Y, Liang X, Liao S, Wang W, Wang J, Li X, et al. Potent paracrine effects of human induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells attenuate doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Scientific reports*. 2015;5(1):1-17. doi: 10.1038/srep11235
24. Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NSK, Choo A, Chen TS, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem cell research*. 2010;4(3):214-22. doi: 10.1016/j.scr.2009.12.003
25. Angoulvant D, Ivanov F, Ferrera R, Matthews PG, Nataf S, Ovize M. Mesenchymal stem cell conditioned media attenuates in vitro and ex vivo myocardial reperfusion injury. *The Journal of heart and lung transplantation*. 2011;30(1):95-102. doi: 10.1016/j.healun.2010.08.023
26. Ohnishi S, Sumiyoshi H, Kitamura S, Nagaya N. Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions. *FEBS letters*. 2007;581(21):3961-6. doi: 10.1016/j.febslet.2007.07.028
27. Wang CY, Yang HB, Hsu HS, Chen LL, Tsai CC, Tsai KS, et al. Mesenchymal stem cell-conditioned medium facilitates angiogenesis and fracture healing in diabetic rats. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2012;6(7):559-69. doi: 10.1002/term.461
28. Chen Y-T, Tsai M-J, Hsieh N, Lo M-J, Lee M-J, Cheng H, et al. The superiority of conditioned medium derived from rapidly expanded mesenchymal stem cells for neural repair. *Stem cell research & therapy*. 2019;10(1):1-15. doi: 10.1186/s13287-019-1491-7
29. Takahashi H, Ohnishi S, Yamamoto Y, Hayashi T, Murao N, Osawa M, et al. Topical application of conditioned medium from hypoxically cultured amnion-derived mesenchymal stem cells promotes wound healing in diabetic mice. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2021;147(6):1342-52. doi: 10.1097/prs.0000000000007993
30. Montero-Vilchez T, Sierra-Sánchez Á, Sanchez-Diaz M, Quiñones-Vico MI, Sanabria-de-la-Torre R, Martinez-Lopez A, et al. Mesenchymal stromal cell-conditioned medium for skin diseases: A systematic review. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2021;9:16. doi: 10.3389/fcell.2021.654210