

## *Novel Cell-Based Therapies in Hepatic Disorders*

Mahtab Shahriari Felordi<sup>1</sup>,  
Shukoofeh Torabi<sup>2</sup>,  
Bahareh Shokoohian<sup>3</sup>,  
Zahra Farzaneh<sup>4</sup>,  
Mehdi Mohamadnejad<sup>5</sup>,  
Reza Malekzadeh<sup>6</sup>,  
Hossein Baharvand<sup>7</sup>,  
Massoud Vosough<sup>8</sup>

<sup>1</sup> MSc Student in Genetic Engineering, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran

<sup>2</sup> PhD Student in Applied Cell Sciences, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>3</sup> PhD Student in Medical Biotechnology, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>4</sup> PhD in Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran

<sup>5</sup> Associate Professor, Cell-Based Therapies Research Center, Digestive Disease Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>6</sup> Professor, Digestive Diseases Research Center, Digestive Diseases Research Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>7</sup> Professor, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran

<sup>8</sup> Associate Professor, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran

(Received January 1, 2019 ; Accepted March 25, 2020)

### **Abstract**

In the recent decade, liver diseases with high mortality rate have become one of the major health problems worldwide. Liver transplantation is the most effective and the standard treatment for decompensated liver disease, but, shortage of available organs and inaccuracy in modeling of the liver diseases are the most limiting issues in treatment.

Regenerative medicine and cell based therapy strategies have provided promising results through cooperating in natural liver regeneration ability or providing liver function support as a bridge before transplantation. Induction of differentiation in different types of stem cells such as embryonic, induced pluripotent stem cells, mesenchymal and hematopoietic stem cells are the most common methods that provide a functional population of hepatocytes to be used in diseases like cirrhosis, cancer and all types of fatty liver diseases, and significantly restore the normal levels of hepatic factors. In addition, mesenchymal and hematopoietic stem cells improve the symptoms of autoimmune diseases by modulation of immune responses and reduction of inflammation. Other cell treatment strategies are isolating the patient's own hepatocytes in the lab, in vitro correction of defected genes and transplanting them back to the patient that can improve the symptoms of genetic disorders. In this study, we first reviewed the basic concepts related to liver diseases, then highlighted the most recent advances in cell-based therapies and regenerative medicine for the treatment of liver disease, along with tissue engineering and bio-artificial liver devices.

**Keywords:** liver cell therapy, regenerative medicine, tissue engineering, stem cells

**J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30 (185): 184-208 (Persian).**

\* **Corresponding Author: Massoud Vosough** - Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran (E-mail: masvos@Royaninstitute.org)

## درمان های نوین بر پایه سلول درمانی در بیماری های کبدی

مهتاب شهریارى فلوردی<sup>1</sup>

شکوفه ترابى<sup>2</sup>

بهاره شکوهیان<sup>3</sup>

زهرا فرزانه<sup>4</sup>

مهدی محمدنژاد<sup>5</sup>

رضا ملک زاده<sup>6</sup>

حسین بهاروند<sup>7</sup>

مسعود وثوق<sup>8</sup>

### چکیده

در دهه اخیر، بیماری های کبدی با نرخ بالای مرگ و میر به یکی از مهم ترین مشکلات حوزه سلامت در جهان تبدیل شده اند. در حال حاضر پیوند عضو به عنوان موثرترین راه درمانی در نارسایی غیر قابل جبران کبدی مورد توجه است. اما کمبود عضو اهدا شده و همچنین ضعف در مدل های مورد مطالعه بیماری های کبدی از اصلی ترین عوامل محدود کننده می باشند. پزشکی بازساختی و روش های سلول درمانی توانسته اند از طریق بهبود بازسازی طبیعی کبد و فراهم کردن فرصت بیشتر برای بیمار تا رسیدن به شرایط دریافت عضو، نتایج نوید بخشی را ارائه دهند. از جمله این روش ها می توان به القای تمایز در انواع سلول های بنیادی نظیر سلول های بنیادی جنینی، پرتوان القایی، مزانشیمی و پیش ساز خونی به سلول های کبدی اشاره کرد که با فراهم آوردن جمعیت عملکردی از هپاتوسیت ها در بیماری هایی نظیر سیروز، سرطان و انواع کبد چرب به صورت معناداری سطح فاکتورهای کبدی را به حالت طبیعی برمی گردانند. همچنین، سلول های بنیادی مزانشیمی و سلول های پیش ساز خونی با خاصیت تعدیل سیستم ایمنی، باعث کاهش التهاب و بهبود علائم بیماری های خود ایمن می شوند. از دیگر روش های درمانی نیز برداشت و تغییر سلول های کبدی خود فرد بیمار در آزمایشگاه و بازگرداندن مجدد آن ها به بیمار است که به بهبود علائم بسیاری از بیماری های ژنتیکی کمک می کند. ما در این مطالعه، در ابتدا مروری بر مفاهیم پایه ای کبد داشته، سپس به بررسی آخرین پیشرفت های صورت گرفته در حوزه سلول درمانی و پزشکی بازساختی در درمان بیماری های کبدی پرداخته و در نهایت، تازه ترین تحقیقات صورت گرفته در حوزه مهندسی بافت و ابزارهای کمکی عملکرد کبد را بررسی خواهیم کرد.

**واژه های کلیدی:** سلول درمانی کبد، پزشکی بازساختی، مهندسی بافت، سلول بنیادی

### مقدمه

است که هدف آن جایگزینی و بازسازی سلول ها، بافت ها و یا ارگان های انسانی آسیب دیده است تا بدین وسیله عملکرد طبیعی سلول ها و بافت ها حفظ شود (2).

واژه پزشکی بازساختی برای اولین بار در سال 1992 مطرح شد (1). پزشکی بازساختی، شاخه ای مشترک بین دو علم مهندسی بافت و زیست شناسی مولکولی

E-mail: masvos@Royaninstitute.org

**مؤلف مسئول:** مسعود وثوق - تهران: پژوهشگاه رویان، دپارتمان سلول های بنیادی

1. دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی ژنتیک، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشگاه سلول های بنیادی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران
2. دانشجوی دکتری علوم سلولی کاربردی، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، جهاد دانشگاهی پژوهشگاه رویان، تهران، ایران
3. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
4. دکترای بیولوژی تکوین، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشگاه سلول های بنیادی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران
5. دانشیار، مرکز تحقیقات سلول درمانی، پژوهشگاه بیماری های گوارش، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
6. استاد، مرکز تحقیقات بیماری های گوارش، پژوهشگاه بیماری های گوارش، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
7. استاد، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشگاه سلول های بنیادی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران
8. دانشیار، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشگاه سلول های بنیادی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 1398/10/11 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1398/10/29 تاریخ تصویب: 1398/12/6

استفاده از پزشکی بازساختی، رویکرد جدیدی در درمان بیماری‌های کبدی است. به دلیل میزان بالای مرگ و میر در بیماران کبدی صعب‌العلاج و کمبود اهداکنندگان عضو برای پیوند کبد، سلول درمانی می‌تواند به عنوان راه حلی جایگزین در مواجهه با آسیب‌های حاد و غیرقابل بازگشت کبدی مطرح شود (3) به همین خاطر توانایی بازساختی (Regeneration) انواع مختلف سلول‌های بنیادی در مطالعات بسیاری مورد بررسی قرار گرفته و خوشبختانه نتایج امیدوار کننده‌ای نیز به همراه داشته‌اند (3). با این وجود، استفاده گسترده از این سلول‌ها به منظور کاربردهای بالینی نیازمند بررسی‌ها و مطالعات پیش‌تری از رفتار، ماهیت و عملکرد دقیق این سلول‌ها است. ما در این مطالعه، با استفاده از دانش سلول‌های بنیادی و مهندسی بافت و با رویکرد پزشکی بازساختی، به بررسی روش‌های درمانی جدید و مدل‌سازی بیماری‌های کبدی پرداخته‌ایم و در ادامه به راهکارهای تجاری‌سازی روش‌هایی که برپایه سلول درمانی هستند، اشاره خواهیم کرد. به‌علاوه به اختصار به شرح تجربیات ملی در این حوزه که به طور عمده توسط دانشگاه علوم پزشکی تهران و پژوهشگاه رویان انجام شده است می‌پردازیم.

#### زیست‌شناسی تکوینی کبد

کبد بزرگترین اندام داخلی بدن است و انجام بیش از 500 عملکرد بیوشیمیایی و فیزیولوژیک مختلف در بدن را بر عهده دارد. واحد عملکردی کبد لوبول‌ها هستند. سلول‌های پارانشیمی هپاتوسیتی، سلول‌های اصلی سازنده این لوبول‌ها هستند که حدود 80 درصد از سلول‌های کبدی را شامل می‌شوند. در طی دوران جنینی، کبد از اندودرم شکمی در لوله گوارشی قدامی (Foregut) منشأ می‌گیرد. در طی تکوین کبد، سلول‌های اندودرمی تحت تاثیر یک سری از سیگنال‌های القایی قرار گرفته و در نهایت کبد به واسطه تکثیر و گسترش سلول‌های هپاتوسیتی شکل می‌گیرد (4). در مهره‌داران، کبد تنها ارگان داخلی بدن است که به واسطه هپاتوسیت‌های بالغ، قابلیت رشد جبرانی را داشته و می‌تواند توده‌ای

مشابه با توده اولیه را ایجاد کند. با این وجود تنها 25 درصد از توده کبدی برای ترمیم کامل این اندام از طریق همانندسازی هپاتوسیت‌ها کافی است (4). مطالعات بسیاری با نشان‌دار کردن سلول‌های کبدی اثبات کرده‌اند که بعد از برداشت قسمتی از کبد، همه هپاتوسیت‌های باقی‌مانده مجدداً شروع به تقسیم می‌توز می‌کنند تا توده کبدی را ترمیم کنند. اما در آسیب‌های شدید، ظرفیت بازساختی کبد کافی نبوده و منجر به نارسایی کبد می‌شود (5). در این شرایط، پیوند هپاتوسیت‌های زنده دارای عملکرد (Functional) فیزیولوژیک می‌تواند قدرت ترمیم کبد را از طریق جبران کمبود هپاتوسیت‌های باقی‌مانده افزایش دهد (4). طی مطالعات اخیر مشخص گردیده است که در کبد یک فرد بالغ، حداقل 20 نوع سلول مختلف وجود دارد که از جمله آن‌ها می‌توان به سلول‌های اندوتلیالی، کلاژنیوسایت‌ها و سلول‌های ستاره‌ای (Stellate cell) اشاره کرد (6).

#### فرایندهای سلولی و مولکولی در آسیب مزمن کبدی

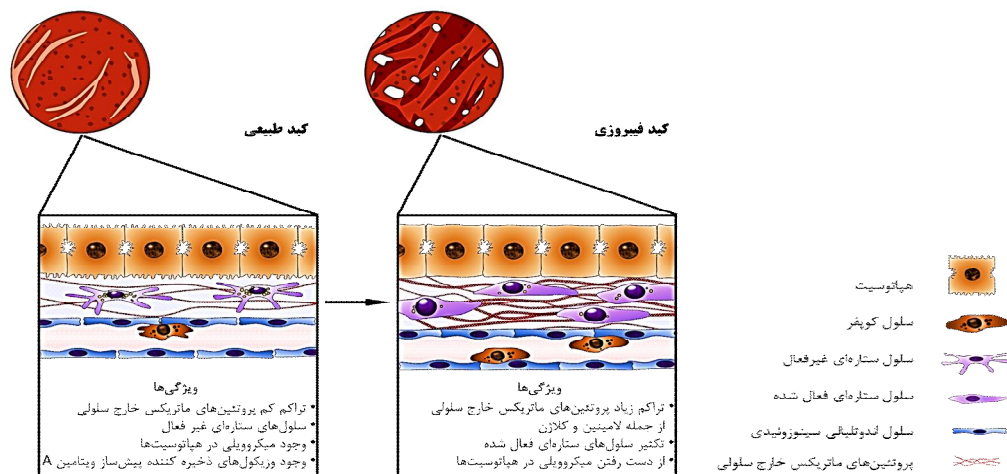
بیماری‌های مزمن کبدی یکی از عوامل عمده مرگ و میر در دنیا هستند. فیروز کبدی، پاسخ ذاتی به آسیب پایدار و التهاب مزمن کبدی است که منجر به پیچیده شدن فرآیند درمان و تسکین آسیب می‌شود. گسترش بافت فیروز منجر به بروز بیماری سیروز کبدی می‌شود که دلیل اصلی مرگ و میر در اثر بیماری‌های مزمن کبدی است. مکانیسم مولکولی فیروز شامل ایجاد تغییراتی در ماهیت و عملکرد سلول‌های ایمنی مقیم بافت، سلول‌های ستاره‌ای کبدی و سلول‌های اندوتلیال عروقی به دنبال آسیب هپاتوسیت‌ها است که منجر به ترشح فراوان ماتریکس خارج سلولی (ECM) می‌شود (7،8). کلاژن بیش‌ترین ترکیب تشکیل‌دهنده ماتریکس خارج سلولی در کبد‌های فیروزه است که با گسترش بیماری به سمت سیروز، سنتز این ترکیب به میزان 10 برابر در بافت کبدی افزایش می‌یابد (9-12). بنابراین مهار سنتز این پروتئین می‌تواند هدف درمانی کارآمدی جهت بهبود وضعیت کبد باشد (13). همان‌طور که اشاره شد یکی از

کشت در محیط خارج بدن است (17).

درمان بیماری‌های کبدی با به‌کارگیری سلول‌درمانی درمان استاندارد در بیماران مبتلا به آسیب‌های کبدی که منجر به نارسایی شدید می‌شود، پیوند کبد است. امروزه پیوند عضو با مشکلات بسیار زیادی همچون کمبود تعداد اهداکنندگان، ازدیاد افراد در صف انتظار پیوند و مشکلات رد پیوند مواجه است، این مشکلات محققان را برآن داشته است که به دنبال یافتن راهکارهای درمانی جایگزینی برای این افراد باشند. سلول‌درمانی و پیوند هپاتوسیت یکی از جدیدترین این راهکارها است. تولید هپاتوسیت‌ها از منابع مختلف سلول‌های بنیادی نظیر سلول‌های استرومایی مزانشیمی، سلول‌های پیش‌ساز خونی، سلول‌های تک هسته‌ای و سلول‌های بنیادی پرتوان است که در مدل‌های حیوانی بسیاری (جدول شماره 1) مورد بررسی قرار گرفته است و از نتایج به دست آمده از این مدل‌ها در طراحی کارآزمایی‌های بالینی در بیماران مبتلا به نارسایی کبدی و سیروز استفاده شده است (جدول شماره 2). در ادامه به خلاصه‌ای از انواع سلول‌های مورد استفاده در مطالعات کبدی، مزایا، معایب (جدول شماره 3) و چشم‌اندازهای پیش‌رو در استفاده از آن‌ها اشاره می‌شود (تصویر شماره 2).

مکانیسم‌های مهم در آسیب کبدی، فعال شدن سلول‌های ستاره‌ای کبدی است (14). به دنبال تخریب هپاتوسیت‌ها، سلول‌های ستاره‌ای فعال شده، تکثیر می‌شوند و تغییر ماهیت داده به سلول‌های میوفیبروبلاستی تبدیل می‌شوند که این سلول‌ها میزان قابل توجهی از اجزای ماتریکس خارج سلولی، مانند کلاژن و لامینین را ترشح می‌کنند (تصویر شماره 1). تراکم و تجمع این ساختارهای رشته‌ای، گره‌های کبدی بازسازی‌کننده را احاطه می‌کند. به دنبال آسیب مزمن کبدی و در پی آزاد شدن فاکتورهای التهابی مختلف، گلبول‌های سفید در گردش، به محل آسیب مهاجرت کرده و با آزادسازی سایتوکاین‌ها و کموکاین‌های التهابی منجر به افزایش فعالیت سلول‌های ستاره‌ای کبد می‌شوند (15).

نتایج مطالعه‌ای که در سال 2011 منتشر شده است، نشان می‌دهد که سلول‌های ستاره‌ای می‌توانند گزینه مناسبی جهت تحقیق در مورد مکانیسم ایجاد فیروز باشند و به کمک آن‌ها می‌توان به درمان‌های جدید ضد فیروزی که باعث برگشت علائم فیروز در بیماری‌های مزمن کبدی می‌شود، دست یافت (16). با این وجود، استفاده از این سلول‌ها در مطالعات بالینی محدودیت‌هایی دارد که از جمله مهم‌ترین آن‌ها، بروز تغییرات اساسی در ژنوتیپ، فنوتیپ و کاریوتایپ این سلول‌ها حین



**تصویر شماره 1:** مکانیسم گسترش بافت فیروز به دنبال بروز آسیب کبدی، در کبد نرمال سلول‌های ستاره‌ای وظیفه ذخیره ویتامین A را بر عهده دارند. طی بروز آسیب کبدی، تحت تاثیر سیگنال‌های ارسالی از سوی سلول‌های کویفر و هپاتوسیت‌های آسیب دیده، سلول‌های ستاره‌ای فعال شده، تکثیر می‌شوند و به میوفیبروبلاست‌های ترشح‌کننده ماتریکس خارج سلولی تغییر فنوتیپ می‌دهند.

جدول شماره 1: مدل های حیوانی سلول درمانی در بیماری های کبدی

منبع	نوع سلول	مدل حیوانی	نتایج
(95)	سلول های تک هسته ای مشتق شده از مغز استخوان رت	رت، مدل فیروز BDL	کاهش میزان کلان نوع IV، <sup>1</sup> لامینین، <sup>2</sup> α-SMA، CK-19
(96)	سلول های تک هسته ای مشتق شده از مغز استخوان موش	موش، مدل فیروز CCL4	القای ترشح IL-10 از سلول های Treg، کاهش ترشح IL-6 و MCP-1، کاهش تعداد سلول های CD11b + F4 / 80 + در کبد فیروتیک
(97)	سلول های پیش ساز اندوتلیالی مشتق از مغز استخوان رت	رت، مدل فیروز CCL4	افزایش زنده ماندن، کاهش میزان تولید بافت فیروز، افزایش تکثیر هپاتوسیت ها
(98)	سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان موش	موش، مدل فیروز CCL4	افزایش بیان ژن IL-10، کاهش بیان ژن های IL-12b، JFN-γ، TNF-α، IL-6، TGF-β1، فعال شدن ماکروفاژها M2، القای تولید MMP13، مهار ماکروفاژها M1
(99)	سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان انسان	رت، مدل فیروز CCL4	کاهش بیان ژن های IL-1، IL-2، IL-6، IL-8، Wnt3a، Wnt10b، TNF-α، PPAR، Wnt3a، Cyclin D1، WISP1، catenin، مهار فعال سازی سلول های ستاره کبدی
(100)	سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان رت	رت، مدل فیروز BDL	کاهش تکثیر سلول T، کاهش ترشح سیتو کین های التهابی، تکثیر سلول های NK در داخل کبد
(101)	سلول های شبه هپاتوسیت مشتق شده از سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی خوک	موش، مدل فیروز CCL4	کاهش میزان ترشح کلان، <sup>1</sup> کاهش آیزم های کبدی، <sup>2</sup> افزایش سطح سرمی آلبومین، <sup>3</sup> کاهش بیان IL-10 و TGF-β
(102)	سلول های شبه هپاتوسیت مشتق شده از سلول های پروان موشی	موش مدل NASH	مقاومت سلول های شبه هپاتوسیت مشتق از iPSC در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از پراکسید هیدروژن و افزایش اسیدهای چرب، <sup>1</sup> افزایش ترشح IL-10، <sup>2</sup> افزایش عملکرد کبد، <sup>3</sup> ترمیم شده

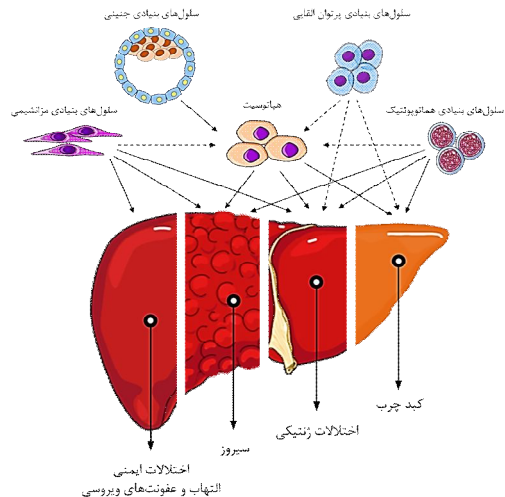
جدول شماره 2: کار آزمایه های بالینی صورت گرفته در حوزه سلول درمانی کبد

شماره کار آزمایه بالینی	بیماری	سلول مورد استفاده	فاز مطالعه	مدت پیگیری (ماه)	نتایج منتشر شده
NCT02297867	سیروز کبدی	تزریق داخل وریدی سلول های مزانشیمی اتولوگ مشتق از بافت چربی	I فاز	6-1	نتیجه ای در دسترس نیست
NCT02705742	سیروز کبدی	تزریق داخل وریدی سلول های مزانشیمی اتولوگ مشتق از بافت چربی	I/II فاز	12	نتیجه ای در دسترس نیست
NCT04088058	سیروز کبدی	تزریق داخل وریدی سلول های مزانشیمی اتولوگ مشتق از بافت چربی	II فاز	1-12	نتیجه ای در دسترس نیست
NCT03629015	نارسایی حاد کبدی	تزریق داخل وریدی سلول های مزانشیمی آلوژن مشتق از بافت چربی در دو دوز (0.5 × 10 <sup>6</sup> cells/kg) و (2 × 10 <sup>6</sup> cells/kg)	I فاز	12	نتیجه ای در دسترس نیست
NCT00913289	سیروز کبدی	تزریق سلول های استرومایی اتولوگ مشتق از بافت چربی	I فاز	6	نتیجه ای در دسترس نیست
NCT01062750	سیروز کبدی	تزریق سلول های استرومایی اتولوگ مشتق از بافت چربی از طریق کاتتریزاسیون شریانی داخل رحمی	-	1	عدم بروز عارضه جانبی جدی، بهبود سطح سرمی آلبومین در سه بیمار
NCT03254758	سیروز کبدی	تزریق داخل وریدی سلول های مزانشیمی آلوژن مشتق از بافت چربی	I/II فاز	6	نتیجه ای در دسترس نیست
NCT01854125	سیروز کبدی	تزریق سلول های مزانشیمی اتولوگ مشتق از مغز استخوان از طریق کاتتریزاسیون شریانی کبدی	III فاز	3	بهبود عملکرد کبدی بیماران در فاز 2 و 3
NCT00993941	سیروز کبدی	تزریق سلول های مزانشیمی اتولوگ مشتق از مغز استخوان از طریق کاتتریزاسیون ورید پورتال یا دارو درمانی (خوراکی یا داخل وریدی)	II فاز	12	نتیجه ای در دسترس نیست
NCT03838250	سیروز کبدی ناشی از لکل	تزریق سلول های مزانشیمی اتولوگ مشتق از مغز استخوان از طریق سرخرگ کبدی	I فاز	12	نتیجه ای در دسترس نیست
NCT03468699	سیروز کبدی صفراوی	تزریق سلول های مزانشیمی اتولوگ مشتق از مغز استخوان از طریق سرخرگ کبدی	II فاز	6	نتیجه ای در دسترس نیست
NCT00713934	سیروز کبدی	تزریق سلول های بنیادی تک هسته ای و سلول های CD133+ اتولوگ مشتق از مغز استخوان ناشی از طریق ورید پورت	I/II فاز	6	نتیجه ای در دسترس نیست
NCT01120925	سیروز کبدی	تزریق سلول های بنیادی تک هسته ای و سلول های CD133+ اتولوگ مشتق از مغز استخوان از طریق ورید پورت	I/II فاز	6	نتیجه ای در دسترس نیست
NCT01333228	سیروز کبدی	تزریق سلول های پیش ساز اندوتلیالی مشتق از مغز استخوان از طریق شریان کبدی	I/II فاز	12	درمان ایمن و عملی، تاثیرات قابل توجه ولی گذرا در عملکرد کبد
NCT03109236	سیروز کبدی	تزریق سلول های پیش ساز اندوتلیالی مشتق از مغز استخوان از طریق ورید پورت	III فاز	12 و 30	نتیجه ای در دسترس نیست

جدول شماره 3: انواع سلول های بنیادی مورد استفاده در درمان بیماری های کبدی، مزایا و معایب

منبع	معایب	مزایا	مدل	بیماری	نوع سلول
(19, 18)	پیوند ضعیف تکثیر دشوار انجماد دشوار	استفاده معمول در کار آزمایه های بالینی اصلی ترین سلول عملکردی کبد	انسان	بیماری های متابولیک کبدی نارسایی کبد کودکان	هپاتوسیت
(20)	تومورزایی	تولید جمعیت بی نهایت قابل تکثیر سلول امکان استفاده از سلول اتولوگ	حیوان	بیماری های متابولیک کبدی نارسایی کبد	سلول های بنیادی پروان القایی
(22, 21)	ریسک ترومبوز پیوند ضعیف	جداسازی راحت فریز و نگهداری راحت	حیوان	نارسایی کبد	سلول های پیش ساز کبدی
(26-23)	پیوند ضعیف بهبودی گذرا و موقت	ایمن بودن قدرت تکثیر بالا در شرایط <i>in-vitro</i> فریز و نگهداری راحت	انسان	بیماری های متابولیک کبدی نارسایی کبد	سلول های پیش ساز خونی
(29-27)	بهبودی گذرا و موقت بدتر شدن وضعیت بیمار در برخی از موارد	قدرت تکثیر بالا در شرایط <i>in-vitro</i> فریز و نگهداری راحت قابلیت مهارکنندگی سیستم ایمنی	انسان	بیماری های متابولیک کبدی نارسایی کبد سیروز کبدی بیماری های کبدی ناشی از نقص ایمنی	سلول های بنیادی مزانشیمی

برعهده دارند، اما در شرایطی که به این سلول‌ها آسیب جدی وارد شده باشد، این خاصیت خود ترمیمی را از دست می‌دهند. در این زمان، در جوندگان دیده شده است که سلول‌های بنیادی کبد این وظیفه مهم را برعهده می‌گیرند. سلول‌های بنیادی کبدی در جداره کانال‌های کوچک صفراوی (Small biliary channel) یا کانال هرینگ (Hering) و در ناحیه مجاور انشعابات درخت صفراوی حضور دارند. این سلول‌ها شاخه‌های اختصاصی مانند EpCAM در سطح و کراتین 7 و 19 را در سیتوپلاسم خود بیان می‌کنند. در زمان آسیب کبدی، سطح بیان این شاخه‌ها افزایش می‌یابد. همچنین این سلول‌ها قابلیت تمایز دو گانه (Bipotent) دارند و در زمان آسیب به کبد در پاسخ به محرک‌های ترشحی از سلول‌های غیر پارانشیمی فعال شده و به هر دو نوع سلول هپاتوسیت و کلانژیوسیت تبدیل می‌شوند (35-33). دسته‌ای از محققین معتقدند که حضور و فعالیت این سلول‌ها نشان‌دهنده شدت و وسعت بیماری کبدی است و نقشی در ترمیم کبد ندارند (36). اما در مقابل عده‌ای نظر عکس این را داشته و معتقدند که این سلول‌ها می‌توانند نقش مهمی در ترمیم کبد آسیب دیده داشته باشند (36). شواهد نشان می‌دهند که با افزایش تعداد سلول‌های ستاره‌ای کبد، تعداد سلول‌های پیش‌ساز هم افزایش می‌یابد. همچنین در هنگام آسیب کبدی، سلول‌های ستاره‌ای، باعث کنترل و هدایت تمایز سلول‌های پیش‌ساز به سمت تشکیل سلول‌های اپیتلیالی صفراوی (Biliary epithelial cell) به جای تمایز به هپاتوسیت‌ها می‌شوند (37). احتمال می‌رود که تیمار سلول‌های پیش‌ساز با مهارکننده رگرایی Angiotensin II type 1 receptor blocker (ARB) منجر به تمایز بیش‌تر آن‌ها به سمت سلول هپاتوسیتی و تولید انبوه این نوع سلول شود (37). با این حال، اگرچه توانایی تمایزی این سلول‌ها در شرایط *in vitro* مشخص شده است، هنوز هویت، موقعیت، رفتار و عملکرد فیزیولوژیک این سلول‌ها در شرایط *in vivo* اثبات نشده است (38).



تصویر شماره 2: سلول درمانی و پیوند هپاتوسیت در بیماری‌های کبدی مختلف. یکی از راهکارهای

رمانی نوین در بحث درمان بیماری‌های کبدی استفاده از سلول‌های هپاتوسیت تولید شده از منابع مختلف نظیر سلول‌های هپاتوسیت اهدایی از افراد سالم و یا سلول‌های هپاتوسیت تمایز یافته از سلول‌های بنیادی نظیر سلول‌های مزانشیمی، خون‌ساز، القایی و جنینی است.

هپاتوسیت‌های کبد (Primary Hepatocytes): هپاتوسیت‌ها اصلی‌ترین سلول‌های سازنده پارانشیم طبیعی کبد هستند که به دنبال بروز آسیب کبدی با استفاده از قابلیت تکثیر خود باعث ترمیم بافت از دست رفته می‌شوند. بنابراین می‌توان از هپاتوسیت‌هایی که از کبد‌های اهدایی جداسازی می‌شوند در درمان بیماران مبتلا به آسیب‌های حاد کبدی و بیماری‌های وراثتی متابولیک استفاده کرد (30, 31). این سلول‌ها قادرند در زمان‌های حیاتی، متابولیسم پایه کبدی را حفظ کرده و فرد را از مرگ نجات دهند. مشکل اصلی در استفاده از سلول‌های هپاتوسیت در دسترس نبودن مقادیر کافی از آن‌ها به علت محدود بودن فرد سالم اهداکننده سلول است. از طرف دیگر هپاتوسیت‌ها در کشت طولانی مدت، تمایززدایی شده و کارایی خود را از دست می‌دهند (32).

سلول‌های بنیادی کبد (Liver stem cells): هپاتوسیت‌ها در شرایط عادی وظیفه ترمیم بافت کبد را

### سلول‌های هیبریدی *Hybrid hepatocytes* (زیرمجموعه‌ای از سلول‌های پیش ساز کبدی)

همان‌طور که اشاره شد، در جوندگان، بعد از هر آسیب شدید کبدی، سلول‌های پیش ساز موظف به ترمیم بافت کبدی هستند، اما در این میان فعالیت بیش از حد و بدون کنترل آن‌ها منجر به افزایش احتمال ابتلا به سرطان کبد می‌شود (39). محققان به دنبال یافتن سلول‌های جدیدی در کبد با خاصیت ترمیمی و عدم بروز بدخیمی، جمعیتی از هپاتوسیت‌های محیطی را در موش یافتند که در حالت طبیعی در ناحیه پورتال کبدی حضور دارند و دارای مقادیر پایین بیان SOX9 و مقادیر طبیعی بیان HNF4α هستند. این سلول‌ها به دلیل بیان هم‌زمان ژن‌های اختصاصی هپاتوسیت و ناحیه پورتال با نام هپاتوسیت‌های هیبرید شناخته می‌شوند. با توجه به بیان ژن‌های مرتبط با چسبندگی سلول و تشکیل توبول‌ها، به نظر می‌رسد که سلول‌های هیبریدی و سلول‌های مجاری صفراوی از یک منشأ جنینی مشترک واقع در پلاک داکتال مشتق شده باشند. سلول‌های هیبریدی دارای خاصیت ترمیمی بالایی بوده و تومور ایجاد نمی‌کنند. در هنگام آسیب کبدی، این سلول‌ها شروع به تکثیر کرده و با تبدیل شدن به سلول‌های بالغ هپاتوسیت و کلانژیوسیت منجر به بهبود نواحی آسیب دیده می‌شوند. با توجه به ویژگی‌های ذکر شده سلول‌های هیبریدی می‌توانند به‌عنوان کاندید مناسبی برای سلول درمانی بیماری‌های کبدی مطرح شوند. البته استفاده از آن‌ها در مرحله بالینی در آینده، بستگی به ابداع روش‌هایی جهت آسان‌سازی جداسازی آن‌ها و تولید محیط کشت مناسب آن‌ها جهت ادامه تکثیر و گسترش بیش تر آن‌ها دارد (39).

### سلول‌های استرومایی مزانشیمی *Mesenchymal stromal (MSC) cells*

این سلول‌ها اولین بار در سال 1968 از مغز استخوان جداسازی شدند ولی بعدها حضور آن‌ها در اکثر

بافت‌های بدن دیده شد. سلول‌های مزانشیمی به دلیل تکثیر بالا و قابلیت القای ترمیم، نقش مهمی در حوزه پزشکی بازساختی ایفا می‌کنند. سلول‌های استرومایی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان، متداول‌ترین سلول مورد استفاده جهت درمان آسیب‌های کبدی هستند. سلول‌های استرومایی مزانشیمی در میان انواع دیگر سلول‌های بنیادی به دلیل کشت و در دسترس بودن، عدم تشکیل تومور، نداشتن محدودیت اخلاقی در استفاده از آن‌ها، ایمونوژنسیستی خفیف (Low immunogenicity)، خاصیت ضدالتهابی و همچنین قابلیت ترشح سیتوکاین‌ها و فاکتورهای رشد مختلف، مورد توجه هستند (40، 41). البته در ارتباط با عدم تحریک سیستم ایمنی، هنوز ابهاماتی وجود دارد که منشأ اصلی این ابهامات تفاوت‌های موجود بین سیستم ایمنی انسان و موش است. به همین خاطر پاسخ‌هایی که در مدل موشی گرفته شده است به‌طور کامل در انسان صدق نمی‌کند و هنوز این سلول‌ها در درمان برخی از بیماری‌های خودایمنی ناتوان هستند (42).

مطالعات بسیاری با استفاده از سلول‌های استرومایی مزانشیمی در درمان آسیب‌های کبدی انجام شده است. که از جمله آن‌ها می‌توان به استفاده از این سلول‌ها در درمان سیروز کبدی (43-45) ناشی از عفونت‌های مزمن با ویروس‌های HBV (46، 47) و HCV (48-50) اشاره داشت. یکی از رویکردهایی که در این زمینه مورد توجه است، درمان‌های ترکیبی می‌باشد که به کمک آن‌ها می‌توان عوارض جانبی ناشی از پیوند این سلول‌ها را به حداقل رساند (51). از جمله این موارد می‌توان به ترکیب این سلول‌ها با داروهایی نظیر پیوگلیتازون (Pioglitazone) اشاره کرد. تزریق همزمان سلول‌های مزانشیمی مشتق از مغز استخوان به همراه داروی پیوگلیتازون در بیماران مبتلا به سیروز کبدی حاکی از بی‌خطر بودن روش ترکیبی، کاهش عوارض جانبی و کارآمدی این روش در درمان بیماران است (51).

سلول‌های بنیادی پیش‌ساز سلول‌های خونی  
(HSC) Hematopoietic stem cells:

این سلول‌ها که در مغز استخوان قرار دارند و شاخص‌های CD133+ و CD34+ را بیان می‌کنند در درمان آسیب‌های کبدی کاربرد زیادی دارند (52). سلول‌های بنیادی CD34+/CD38- مشتق شده از مغز استخوان جمعیتی قدرتمند از سلول‌های بنیادی خون‌ساز هستند که با میانجی‌گری سایتوکاین‌ها، کموکاین‌ها و آنزیم‌های پروتولیتیک، به کبد آسیب دیده مهاجرت می‌کنند (52). فاکتور القای کلونی گرانولوسیت (GCSF) می‌تواند باعث القای مهاجرت سلول‌های بنیادی خون‌ساز مشتق شده از مغز استخوان به کبد آسیب‌دیده و ترمیم بافت گردد. عده‌ای معتقد هستند که بهبود حاصل شده در کبد به علت خاصیت تمایزپذیری سلول‌های بنیادی خون‌ساز است، در مقابل برخی از محققان آن را به علت ادغام (Cell Fusion) این سلول‌ها با هیپاتوسیت اولیه در بدن میزبان می‌دانند. دیده شده است که پیوند سلول‌های CD34+ در بیماران مبتلا به مراحل پیشرفته سیروز، از بروز آسیب جلوگیری کرده و علائم بیوشیمیایی و کلینیکی آن‌ها را بهبود می‌بخشد (53).

در مطالعه‌ای که در سال 2019 منتشر شده است، نقش این سلول‌ها را در بهبود علائم در هیپاتیت نوع C نشان دادند. در این مطالعه بیان شده است که تزریق هم‌زمان سلول‌های خون‌ساز CD34+ با درمان‌های دیگر همچون تزریق مستقیم آنتی ویروس فعال، نه تنها برای درمان بدخیمی‌ها بهترین گزینه خواهد بود بلکه از پیشرفت بیماری به سمت سیروز و سایر بدخیمی‌های مهلک نیز جلوگیری می‌کند (53). همچنین طی مطالعه‌ای که به بررسی عوارض جانبی پیوند سلول‌های CD34+ پرداخته است، مشخص شده که با وجود مشاهده عوارضی مثل سندرم هیپاتورنال و نفروپاتی، باز هم تعداد قابل توجهی از بیماران بهبود یافته‌اند (54). علاوه بر سلول‌های CD34+، مطالعات دیگر نشان می‌دهند که سلول‌های CD133+ مشتق شده از مغز استخوان نیز نقش

مهمی در افزایش تعداد سلول‌های کبدی و القاء رگرایی و در پی آن افزایش بازسازی بافت کبد دارند (55). اما نکته قابل توجه این است که استفاده از سلول‌های بنیادی خون‌ساز منجر به تغییر قابل توجهی در پارامترهای عملکردی کبد مانند میزان آنزیم‌های کبدی و سطح سرمی پارامترهای انعقادی نمی‌شود (56). طبق نتایج مقاله‌ای که در سال 2019 منتشر شده است سلول‌های HSCs را علاوه بر مغز استخوان می‌توان از خون بند ناف نیز استخراج کرد (57). استفاده از این سلول‌ها می‌تواند به عنوان رویکرد جدیدی جهت ترمیم بافت‌های آسیب دیده و بهبود عملکرد کبدی مطرح شود (61-58). البته هنوز پاسخی برای برخی از سؤالات، همچون زمان مناسب دریافت سلول، تعداد، مسیر و نحوه تزریق سلول به بدن یافت نشده است که نیاز است در تحقیقات بعدی به آن‌ها پاسخ داده شود.

سلول‌های تک‌هسته‌ای (MNCs) Mononuclear cells:

سلول‌های تک‌هسته‌ای شامل انواع مختلف سلول‌های بنیادی موجود در مغز استخوان هستند که شامل سلول‌های بنیادی هماتوپوئیتیک مانند رده‌های میلوئیدی، لنفوئیدی و اریترئوئیدی به همراه سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌شوند (62، 63). مطالعات بسیاری به بررسی تاثیر تزریق این سلول‌ها در بیماری‌های کبدی مختلف پرداخته‌اند. نتایج بیانگر این موضوع است که تزریق سلول‌های تک‌هسته‌ای به سیاهرگ کبدی بیماران مبتلا به سیروز کبدی، بعد از 24 ساعت موجب بهبود میزان آلبومین سرم می‌شود (64). همچنین این سلول‌ها را می‌توان از طریق سرخرگ آوران کبد هم تزریق کرد که در این حالت نیز موجب افزایش آلبومین سرم، کاهش بیلی‌روبین و کاهش شاخص انعقادی (ثابت جهانی استاندارد) INR می‌شوند (65). در مطالعه‌ای تاثیر تزریق سلول‌های تک‌هسته‌ای مشتق شده از مغز استخوان در درمان بیماری کبد الکلی مورد بررسی قرار گرفته است و مشخص شده است که استفاده از سلول‌های مشتق شده



از مغز استخوان می تواند جایگزین مناسبی برای درمان های استاندارد باشد (66). در ادامه جهت بررسی اثر تزریق سلول های تک هسته ای در بیماران مبتلا به سیروز کبدی، مطالعه ای به بررسی تزریق این سلول ها از طریق سیاهرگ باب کبدی در سه گروه بیماران: 1- دریافت کننده سلول های CD133+، 2- دریافت کننده سلول های تک هسته ای و 3- دریافت کننده دارونما پرداخته است. نتایج این مطالعه نشان دهنده بهبود وضعیت بیماران در گروه اول بعد از گذشت سه ماه از تزریق بوده است اما متأسفانه این بهبودی در پیگیری های بعدی و همچنین در گروه دریافت کننده سلول تک هسته ای و دارونما مشاهده نشده است (63). همچنین در مطالعه دیگری، اثر تزریق سلول های تک هسته ای در بیماران مبتلا به سیروز کبدی بعد از اصلاح تغذیه ای مورد بررسی قرار گرفته است و نتایج بیانگر بهبود موقت نمره MELD (Model for End-Stage Liver Disease)، سطح آلبومین سرم، نمره INR و همچنین میزان بیلی روبین طی 6 ماه پیگیری بیماران بوده است (67). متأسفانه هنوز مکانیسم دقیق عملکرد این سلول ها طی فرایند بهبود کبدی مشخص نشده است و در نهایت می توان اینطور نتیجه گرفت که استفاده از این رده سلولی در درمان بیماران مبتلا به آسیب های کبدی مزمن نیازمند بررسی ها و مطالعات بیش تری است. از جمله محدودیت هایی که در استفاده از این نوع سلول ها داریم تعیین تعداد سلول های موثر مورد نیاز است. دو عامل سن بیماران و نوع بیماری کبدی در تعیین تعداد سلول ها مؤثر است (68).

#### سلول های بنیادی پرتوان (Pluripotent Stem Cells):

سلول های بنیادی پرتوان شامل سلول های بنیادی پرتوان جنینی (Embryonic Stem Cells) و سلول های بنیادی پرتوان القایی (Induced Pluripotent Stem Cells) می شوند. سلول های بنیادی جنینی اولین بار در سال 1981 از توده سلولی داخلی (Inner cell mass) بلاستوسیت

موش جدا شدند (70,69) و سپس در سال 1998 از بلاستوسیت انسان استخراج شدند. از نظر قدرت تمایزی این سلول ها قابلیت تمایز به هر سه رده سلولی اکتودرم، اندودرم و مزودرم را دارند (71,69). در سال 2006 برای اولین بار، انتقال 4 فاکتور رونویسی مهم Sox2، Oct4، Klf4 و c-Myc به سلول های سوماتیک منجر به تولید رده جدیدی از سلول های بنیادی پرتوان با نام سلول های بنیادی پرتوان القایی شد. این سلول ها از نظر ویژگی های ظاهری و قدرت تمایزی مشابه سلول های ESCs هستند. در همین راستا می توان از خاصیت فوق العاده آن ها در مدل سازی برخی از بیماری ها و کشف انواع دارو ها استفاده کرد (72-75). خواص تمایزی سلول ها ارتباط مستقیمی با نوع و خصوصیات سلول مبدأ دارد (77,76). یکی از مزیت های سلول بنیادی پرتوان القایی، امکان تولید آن ها از سلول های بیمارانی با نواقص ژنتیکی کبدی است (79,78) که این امکان را فراهم می آورد تا از این سلول ها در مطالعات پایه و بالینی مختلف جهت شناخت مکانیسم بیماری و در نهایت طراحی راهکار های درمانی هدفمند با استفاده از کوچک مولکول ها (Small molecules) استفاده کرد (81,80). پروتکل های مختلفی برای تولید هپاتوسیت از سلول های بنیادی پرتوان وجود دارد. معمولاً سلول های بنیادی پرتوان را به صورت مرحله به مرحله و با اضافه کردن فاکتور هایی که در تکوین کبد موثر هستند به هپاتوسیت تمایز می دهند. در مرحله اول این سلول ها در معرض فاکتور های activin A+Wnt مدت 3 روز قرار می گیرند تا به اندودرم تمایز یابند (82). سپس به مدت 5 روز با FGFs و BMPs تیمار می شوند که در این مرحله سلول های هپاتوبلاست یا اندودرم متعهد کبدی به دست می آیند. در مرحله آخر، سلول ها با HGF و dexamethasone و oncostatinM به مدت 10-15 روز تیمار می شوند تا هپاتوسیت بالغ ایجاد شود. سپس برای بررسی بلوغ عملکردی سلول ها، آن ها را به حیوانات مدل پیوند می زنند (83). پیوند هپاتوسیت های مشتق شده از سلول های بنیادی پرتوان، در موش های مدل

سلول‌های بنیادی بر روی این بستر منجر به تولید سلول‌های هپاتوسیتی یکسان از لحاظ بیان ژن و ویژگی فنوتیپی می‌شود. از دیگر مزایای این نوع بستر می‌توان به کاربری راحت، کم هزینه بودن آن و حذف مشتقات حیوانی اشاره کرد که امکان گسترش استفاده از آن در کاربردهای درمانی را فراهم می‌کند (89). نکته قابل توجه این است که اگر این سلول‌ها به صورت تک لایه کشت داده شوند، تراکم مورد نیاز برای استفاده در صنعت و درمان را نخواهد داشت. به همین دلیل، کشت سه بعدی این سلول‌ها در بسترهای مختلف در حال بررسی است (90، 91). علی‌رغم فواید بسیار سلول‌های بنیادی پر توان در تولید هپاتوسیت، به سه دلیل تراتوژن بودن، امکان ایجاد بدخیمی و تحریک سیستم ایمنی در صورت پیوند به فرد دیگر، استفاده از این سلول‌ها در مطالعات بالینی محدود شده است (92، 93). در مقاله‌ای که در سال 2019 منتشر شده است، یکی از علل پاسخ‌های سیستم ایمنی به سلول‌های بنیادی پر توان القایی، وجود تعدادی از سلول‌ها با ناهنجاری‌های ژنتیکی و بیان غیرنرمال برخی ژن‌های تومورزا گزارش شده است. این ناهنجاری‌های ژنتیکی منجر به بیان مولکول‌های جدیدی در سطح این سلول‌ها می‌شود که همین امر منجر به برانگیختن پاسخ‌های ایمنی در بدن میزبان می‌گردد (93). در نهایت می‌توان این طور نتیجه گرفت که هنوز موانع و محدودیت‌های زیادی در ارتباط با استفاده از سلول‌های پر توان القایی وجود دارد که باید قبل از استفاده از این فناوری برای درمان‌های بالینی برطرف شود. به عنوان مثال، اطلاعات مربوط به رده‌های سلولی iPSC و پروتکل‌های برنامه ریزی مجدد (Reprogramming) و تمایز به سلول‌های کبدی باید بهینه‌سازی و استاندارد شده باشد تا کارآیی را افزایش داده و احتمال بروز تومور و واکنش‌های ایمنی را کاهش دهد (78). در سال 2019 روشی ساده و مطمئن برای کنترل کیفیت هپاتوسیت‌های تولید شده با منشأ سلول‌های بنیادی معرفی شده است. در این روش با بررسی الگوی

دارای نقص فوماریل استولاکتات (Fumaril Acetolactate) یا مدل‌هایی که دارای نارسایی مزمن کبدی بودند باعث بهبود آسیب‌های کبدی شده است (84). استفاده از این سلول‌ها به منظور تبدیل آن‌ها به سلول‌های شبه کبدی (Hepatocyte-like cells) یک دیدگاه جدید در بحث مهندسی بافت به شمار می‌آید. محققان زیادی با ساخت بافت کبدی حاصل از سلول‌های iPSC و پیوند آن، توانستند درمانی جایگزین برای بیماری هموفیلی نوع B پیدا کنند (85).

هپاتوسیت‌های حاصل از سلول‌های بنیادی پر توان از نظر بلوغ و کارایی کاملاً شبیه هپاتوسیت‌های بالغ بدن نیستند. به عبارت دیگر، سلول‌های تمایز یافته از نظر خصوصیات ظاهری شبیه هپاتوسیت‌های بدن هستند اما از نظر عملکردی کاملاً بالغ نبوده و با هپاتوسیت بالغ تفاوت‌هایی دارند. به همین دلیل به آن‌ها سلول‌های شبه هپاتوسیت گفته می‌شود (86). همچنین یافتن منبع مناسب این سلول‌ها نیز نیاز به مطالعات بیش تری دارد (87). یکی از راه حل‌های پیشنهادی جهت بهبود عملکرد هپاتوسیت‌های تولید شده از سلول‌های پر توان القایی، استفاده از رویکردهای مهندسی برای ارسال مناسب و موثر فاکتورهای القایی در روند تمایز است. استفاده از نانوپارتیکل‌ها باعث انتقال پیوسته فاکتورهای رشد و بهبود القای تمایز سلول‌های بنیادی پر توان به هپاتوسیت‌ها می‌شود (88). علاوه بر این استفاده از بستر مناسب نیز باعث بهبود بازدهی تمایز و بلوغ هپاتوسیت‌های تولید شده می‌شود. مرسوم‌ترین بستر مورد استفاده جهت کشت این سلول‌ها، بستر ماتریزلی است که از ماتریکس خارج سلولی سلول‌های سرطان موشی به دست می‌آید. پیچیدگی کار با این نوع داربست و گران قیمت بودن از جمله معضلات اصلی استفاده از آن می‌باشد. در سال 2014 تولید هپاتوسیت از سلول‌های بنیادی پر توان بر روی پوشش جدید RoGel انجام شد. RoGel، یک بستر جدید است که از محیط رویی فیبروبلاست انسانی تولید می‌شود. شواهد بیانگر این موضوع است که کشت

بیان 62 ژن که در سلول های هپاتوسیت نرمال بیان دارند و مقایسه میزان بیان این ژن ها در هپاتوسیت های تولید شده با منشأ سلول های بنیادی، توانستند کیفیت سلول ها را مورد ارزیابی قرار دهند (94).

دگر تمایزی (Transdifferentiation): دگر تمایزی، به معنای تبدیل یک سلول سوماتیک بالغ با عملکرد فعال به سلول سوماتیکی دیگر بدون نیاز به گذار از مرحله تبدیل به سلول بنیادی است (103). تولید هپاتوسیت با این روش در مقایسه با سایر روش ها در ابتدا مورد توجه قرار گرفت. چراکه با توجه به حذف مرحله تبدیل به سلول بنیادی پرتوان، ریسک تومورزایی بسیار پائین آمده و همچنین در زمان و هزینه مصرفی نیز صرفه جویی می شد. در طی فرآیند دگر تمایزی، سلول ها مارکرهای اپی ژنتیکی خود را از دست داده و عملکرد و مورفولوژی آن ها تغییر می کند، نقش اصلی در این پروسه برعهده فاکتورهای رونویسی مختلف است (104-108). مکانیسم دگر تمایزی، منجر به تولید سلول هایی می شود که از نظر الگوی بیان ژن و عملکرد بسیار شبیه به هپاتوسیت بالغ هستند (79).

در مطالعه ای که در سال 2018 در این باره انجام شد، محققان دریافتند که سلول های کلانژنوسیت که به سلول های هپاتوسیت تبدیل می شوند، سلول هایی با خاصیت دوگانه هستند و با مطالعه این سلول ها بر روی مدل های موشی و انسانی، به این نتیجه رسیدند که تبدیل کلانژنوسیت ها به هپاتوسیت ها، به صورت مستقیم و بدون دخالت سلول های اجدادی صورت می گیرد و به همین دلیل این سلول ها که خاصیت دوگانه دارند، می توانند منابع مناسبی برای درمان های آینده باشند. همچنین مطالعات *In-vivo* نشان گر این هستند که تبدیل هپاتوسیت ها به کلانژنوسیت ها می تواند از طریق مسیرهای وابسته به مسیر پیام رسانی  $TGF-\beta$  باشد (109). در مطالعه دیگری که در سال 2017 منتشر شد، برای اولین بار استفاده از سلول بنیادی اسپرماتوگونی انسانی را برای تولید هپاتوسیت ها در شرایط *in vivo* به روش

القای مستقیم به کار بردند. از آن جایی که این پیوند باید در مکان مناسبی انجام شود، در این مقاله از محیط کپسول کلیوی استفاده کردند و با توجه به عدم ایجاد تومور و آسیب در بافت های مختلف موش، استفاده از این روش جزء راهکارهای بی خطر معرفی شد (110). در ادامه محققان توانسته اند موجب القای دگر تمایزی در سلول های هپاتوسیتی شوند و آن ها را به سلول های صفراوی کارآمد سوق دهند (111). روش دگر تمایزی با توجه به مطالعات گسترده ای که صورت گرفته است، هنوز هم با مشکلات زیادی روبه رو است و برای رسیدن این سلول ها به فاز بالینی باید مطالعات بیش تری صورت گیرد. از جمله این مشکلات، عدم بیان برخی از ژن ها و یا بیان تغییر یافته طی فرآیند دگر تمایزی است (112، 113). به طور مثال شایع ترین روش انتقال فاکتورهای رونویسی، از طریق وکتورهای برپایه ویروس است. در این روش امکان تومورزایی به دلیل ورود توالی ژنی به داخل ژنوم سلول که منجر به بروز جهش های نقطه ای می شود وجود دارد. از روش های دیگر می توان به استفاده از پروتئین های نو ترکیب برای بازبرنامه ریزی سلول ها و یا سیستم های بر پایه ترانس پوزون ها (114) و همچنین پلازمیدها اشاره کرد (115-117). اما با این حال، کارآمدی این روش ها به اندازه روش استفاده از ویروس نیست که آن هم به دلیل خطرات احتمالی پیشنهاد نمی شود.

درمان بیماری های کبدی با استفاده از وزیکول های خارج سلولی

وزیکول های خارج سلولی، نانو وزیکول های با منشأ داخل سلولی هستند که به وسیله انواع مختلف سلول ها ترشح می شوند. به واسطه وجود انواع مختلف RNAs، پروتئین، لیپید و متابولیت هایی که در این ساختارها وجود دارد، می توان به منشأ آن ها پی برد. بعد از آزاد شدن وزیکول های خارج سلولی به بیرون از سلول، به سمت سلول هدف خود حرکت کرده، به آن

شده است که استفاده از وزیکول‌های خارج سلولی مشتق از سلول‌های مزانشیمی تمایز یافته از سلول بنیادی جنینی می‌تواند منجر به بهبود وضعیت کبدی در موش‌های مدل سیروز شود (126). در واقع این ساختارها حاوی تمام عناصر مهم برای کاهش فیروز هستند که می‌توان به مهار فعالیت ماکروفاژها، ترشح سایتوکاین‌های ضد فیروزی، تغییرات ماتریکس خارج سلولی و کاهش اسکارهای حاصل از فیروز و غیرفعال‌سازی سلول‌های ستاره‌ای کبدی اشاره کرد. در درمان بیماری کبد الکلی نیز می‌توان از وزیکول‌های خارج سلولی حاصل از سلول‌های بنیادی با منشأ کبدی استفاده کرد (129). نکته جالب توجه دیگر این که در بسیاری از موارد از وزیکول‌های خارج سلولی که از بافت‌های دیگر منشأ گرفته‌اند نیز می‌توان برای درمان بیماری‌های کبدی استفاده کرد که هر کدام از طریق مکانیسم‌های مختلفی در درمان بیماری‌های گوناگون نقش خود را ایفا می‌کنند (130). با این حال، استفاده از وزیکول‌های خارج سلولی در سطح گسترده، نیاز به مطالعات بیش‌تری را دارد.

#### کاربرد مهندسی بافت در ترمیم بافت کبد

مهندسی بافت علم میان رشته‌ای است که با به‌کارگیری اصول مهندسی و علوم زیستی، شرایط بهینه در جهت مهاجرت، رشد، تکثیر و جایگزینی سلول‌ها را فراهم می‌کند (131). از مهندسی بافت برای مدل‌سازی بسیاری از بافت‌ها استفاده می‌شود که یکی از آن‌ها، زیست مهندسی بافت کبد (Liver bioengineering) است (132). به‌طور کلی کاربردهای مهندسی بافت به سه بخش تقسیم می‌شوند: 1- ساخت داربست‌های مناسب جهت کشت سلول، 2- انتقال فاکتورهای رشد، 3- سلول‌های سازگار در بافت. پیشرفت‌های صورت گرفته در بحث مهندسی بافت کبدی توانسته است به عنوان یک استراتژی امیدوارکننده برای غلبه بر محدودیت‌های فعلی رویکردهای مبتنی بر سلول باشد. قابلیت پایین

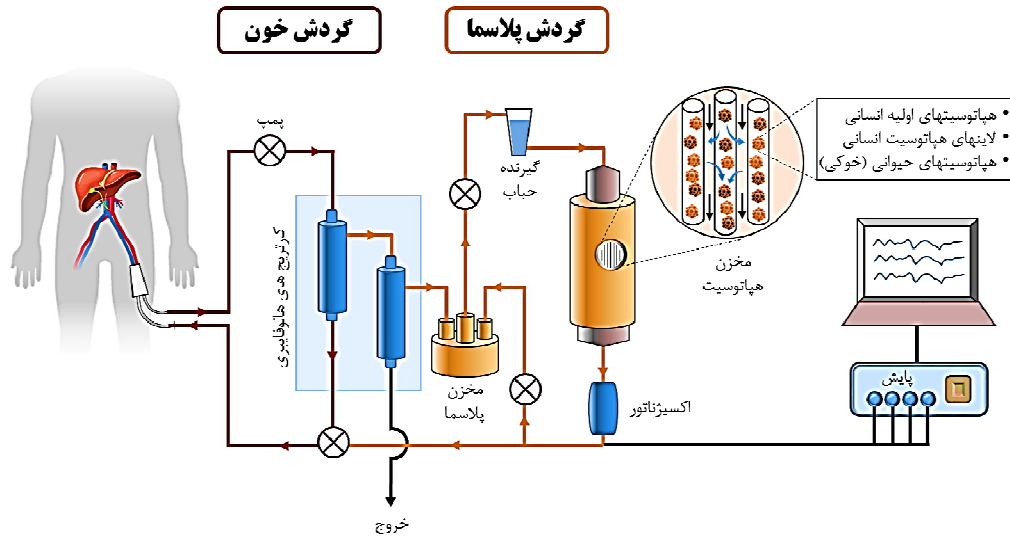
متصل شده و محتویات خود را به داخل سلول هدف منتقل می‌کنند. وزیکول‌های خارج سلولی حاوی پروتئین‌ها و بیومولکول‌های مختلفی هستند که موجب تغییر در فعالیت‌های رونویسی و ترجمه در سلول‌های مقصد آن‌ها می‌شوند (118، 119). وزیکول‌های خارج سلولی به دلیل دارا بودن ویژگی‌های مفیدی همچون انتقال از راه گردش خون، توانایی جابه‌جایی انواع دوز دارویی و همچنین سایز کوچکشان (حدود 100 نانومتر) (120) که توانایی عبور از سد‌های سلولی را برای آن‌ها فراهم می‌کند، گزینه مناسبی جهت استفاده به عنوان یک راهکار درمانی مؤثر برای بیماری‌های مختلف مطرح هستند. این خواص وزیکول‌های خارج سلولی موجب مطرح شدن جنبه جدیدی از درمان‌های نوین با عنوان (سلول‌درمانی بدون سلول) شده است (121-123). استفاده از این ساختارها در فاز بالینی، کاربردی و بی‌خطر است (124، 125). مطالعات نشان می‌دهد که وزیکول‌های خارج سلولی حاصل از بافت سالم کبدی، می‌توانند مولکول‌های آنتی‌فیروز مانند پروتئین‌ها و نوکلئیک اسید را ترشح کنند که باعث تنظیم بیان ژن و عملکرد سلولی در سلول هدف شوند (126). اگرچه مکانیسم عمل دقیق این ساختارها هنوز مشخص نیست اما به نظر می‌رسد می‌توانند به وسیله تنظیم فعالیت سلول‌های ایمنی از جمله سلول T کمکی نوع 17 و حفظ تعادل بین میزان سلول‌های T کمکی با T تنظیم‌گر باعث کاهش فیروز کبد شوند (127). همچنین قابل ذکر است که نتایج مشابهی در موش‌های مبتلا به فیروز کبدی با استفاده از وزیکول‌های خارج سلولی حاصل از سلول‌های مزانشیمی حاصل شده است (126). وزیکول‌های خارج سلولی مشتق‌شده از سلول‌های مزانشیمی به عنوان یک محصول مؤثر درمانی برای مدل‌های فیروز کبدی مطرح شده‌اند. این وزیکول‌های خارج سلولی به‌علت دارا بودن خاصیت تنظیم‌کنندگی سیستم ایمنی یک راهکار درمانی توانمند برای درمان بسیاری از بیماری‌ها و اختلالات ایمنی هستند (128). در مطالعه‌ای نشان داده

فیبرینوژن و تولید اوره نسبت به گروه کنترل افزایش یافته است. همچنین با پیوند این بافت به موش مشاهده شده است که بافت توانایی تولید آلبومین انسانی در بدن میزبان را هم دارد (139). از جمله تکنیک های دیگر معرفی شده در این حوزه، تکنیک چاپ چهاربعدی می باشد. این تکنیک نسل بعدی تکنیک چاپ سه بعدی است که کاربردهای گسترده تری دارد. در این فرآیند از مواد مختلفی استفاده می شود که می توانند رنگ و شکل بافت را تغییر دهند، جریان الکتریکی تولید کنند، از نظر زیستی فعال باشند و در پاسخ به انواع محرک های خارجی عملکرد مناسبی را ایجاد کنند. این تکنیک یک ساختار سه بعدی اما دینامیک است (140). در نهایت با وجود کاربردی بودن استفاده از مهندسی بافت، باید قبل از استفاده از آن در سطح بالینی بررسی و آزمایشات فراوانی انجام شود. با این حال آینده روشنی برای این حوزه پیش بینی می شود.

*ابزاری که به طور مصنوعی عملکردی شبیه به بافت کبد دارند*

همواره تعداد بیماران نیازمند به پیوند عضو بیش از تعداد افراد اهداکننده بوده است و از طرف دیگر، استفاده از سلول های بنیادی به صورت فراگیر با مشکلاتی همراه است. مطالعات گسترده ای به منظور بررسی کارایی دستگاه های شبیه ساز عملکرد کبد & BAL (Bioartificial liver) در بیماران ALSDs (Artificial liver support devices) نیازمند به پیوند در حال انجام است. نتایج بیانگر این است که این ابزارها تا حدودی موجب بهبود برخی از عملکردهای کبدی نظیر سم زدایی و فعالیت های تنظیمی کبد می شوند. استفاده از فناوری های نوین، اگرچه موجب بهبود فعالیت این ابزارها شده است اما هنوز این ابزارها قادر به حفظ جان بیماران از مرگ نیستند (141). سیستم BAL دستگاهی در خارج از بدن است که جهت راه اندازی دستگاه، سلول های کبدی زنده و فعال را وارد دستگاه می کنیم (تصویر شماره 3) (141).

پیوند و بقای سلول ها بعد از انتقال به بافت کبدی مهم ترین چالش هایی است که هنوز راهکار مناسبی برای فائق آمدن به آن ها یافت نشده است. تا کنون روش های متنوعی برای تولید میکروبافت های کبدی از قبیل کپسوله سازی سلولی، چاپ زیستی در ابعاد سه بعدی، سیستم های میکروفلوئیدیک و روش های سلول زدائی و تزریق مجدد سلول به منظور بهبود روش های مبتنی بر سلول درمانی استفاده شده اند (133). یکی از مهم ترین کاربردهای مهندسی بافت فراهم آوردن بستر مناسب برای کشت سلول ها در شرایط *In-vitro* است، ویژگی اساسی که در ساخت این داربست ها باید مدنظر قرار داد رعایت شباهت ساختاری و مکانیکی آن ها با ماتریکس خارج سلولی است، تا بتوانند به درستی برهمکنش های بین سلولی و بین سلول و ماتریکس را انجام دهند (134). امروزه انواع مختلف داربست های سلولی با توجه به شرایط سلول در حوزه مهندسی بافت معرفی شده است (135، 136). یکی از جدیدترین تکنیک هایی که در حوزه مهندسی بافت معرفی شده است و در تولید بافت کبدی نیز مؤثر است، تکنولوژی چاپ زیستی در ابعاد سه بعدی Three-dimensional (3D) bioprinting technology است. در مطالعات پیشین عموماً از تکنیک دوبعدی استفاده می شد که تاحدودی نیز موفقیت آمیز بود اما از آنجایی که شواهد بیانگر این مسأله بود که در محیط دوبعدی، برهمکنش بین سلولی انجام نمی شود، محیط های سه بعدی جهت رفع این مشکل پیشنهاد شدند (137). همچنین می توان به بیوراکتورها به عنوان تکنیک بعدی اشاره کرد (138). در مقاله ای که در سال 2019 منتشر شد با کشت سلول های استرومایی مغز استخوان انسانی، سلول های اندوتلیالی بندناف انسانی و سلول های لاین Huh7 سرطان کبد در یک داربست ECM سه بعدی مصنوعی توانستند بافت کبدی به نام LEMS-Patch را تولید کنند که میزان بیان ژن های کبدی و عملکرد بافتی مانند ترشح آلبومین و



تصویر شماره 3: ساختار و اجزا تشکیل دهنده سیستم BAL؛ BAL ها اساساً بیوراکتورهایی هستند که به واسطه‌ی سلول‌های کبدی تعیبه شده درون آن‌ها عملکرد یک کبد طبیعی را انجام می‌دهند. آن‌ها پلاسمای خون اکسیژن شده را که از سایر ترکیبات خون جدا شده است را پردازش می‌کنند.

آن‌ها شاهد باشیم. با این وجود استفاده بالینی از این سیستم‌ها هنوز با مشکلاتی مانند انتخاب نوع سلول مناسب و یا تخمین کارکرد و نیمه عمر استفاده از دستگاه همراه است (146).

تجاری‌سازی سلول درمانی برای آسیب‌های کبدی شرکت پرومتر با Promethera Biosciences SA هدف حفظ سلامت بیماران و تا حد ممکن درمان آن‌ها بدون نیاز به پیوند کبد تأسیس شد. این شرکت پیشگام در گسترش دانش سلول درمانی جهت هموار ساختن دو مشکل اساسی در بیماری‌های کبدی یعنی هپاتیت‌های اتوایمیون و فیروز کبد عمل می‌کند. اولین شعبه این شرکت در کشور بلژیک تأسیس شد اما شعبات دیگری نیز در ژاپن، سوئیس و آمریکا دارد. سه محصول اصلی این کمپانی که از روش‌های مبتنی بر سلول درمانی کمک گرفته است عبارتند از: H2stem، Hepastem و Atrosimab. Hepastem: این محصول شامل سلول‌های بنیادی کبدی فرد اهدا کننده سالمی است که در محیط آزمایشگاه تکثیر یافته‌اند. این سلول‌ها پس از تزریق و لانه‌گزینی در کبد، موجب کاهش التهاب و مانع

نتایج مطالعه‌ای که به مقایسه رفتار سلولی در سیستم BAL و محیط کشت تک لایه پرداخته است نشان می‌دهد که سلول‌های کبدی در محیط BAL به علت دینامیک و سه‌بعدی بودن محیط کشت و کافی بودن سطح اکسیژن موجود، از نظر عملکردی وضعیت مناسب‌تری دارند و افزایش بیوژنز میتوکندری در آن‌ها دیده می‌شود (142). در سیستم BAL می‌توان از انواع مختلفی از سلول‌ها استفاده کرد. بهترین مدل سلولی مورد استفاده هپاتوسیت‌های اولیه انسانی هستند که به علت عدم دسترسی راحت، محدودیت‌های در استفاده از آن‌ها وجود دارد (143). به همین خاطر منابع سلولی دیگری پیشنهاد شده است که متأسفانه استفاده از آن‌ها نیز با معضلاتی از جمله گران‌قیمت بودن، نیازمند بودن به تعداد زیادی از سلول و عدم شناخت کافی از رفتار و عملکرد سلول‌ها مواجه است. همچنین مطالعات نشان می‌دهد که این سلول‌ها در مقایسه با هپاتوسیت‌های اولیه انسانی از نظر متابولیسمی کارایی مورد نظر را ندارند (144، 145). در سال‌های اخیر تحقیقات نشان می‌دهد که با در نظر گرفتن انطباق بین اجزای زیستی مورد استفاده در این ابزار، می‌توان عملکرد بهتری را از

فعال شدن سلول های ستاره ای و ترشح کلاژن می شوند. از این رو با انجام هردو عمل تعدیل سیستم ایمنی و ممانعت از تشکیل فیروز، موجب ترمیم بافت و بهبود عملکرد کبد می شوند. به همین دلیل، شرکت پرومترا معتقد است که این محصول می تواند در درمان بیماری های کبدی که در اثر اختلال در سیستم ایمنی ایجاد شده اند، مؤثر باشد. این دارو جهت درمان بیماران مبتلا به نارسایی حاد کبد که در اثر بیماری مزمن Acute on chronic liver failure (ACLF) ایجاد شده باشد در مرحله دوم کارآزمایی بالینی و برای و بیماران مبتلا به نش Non-alcoholic Steatohepatitis (NASH) در فاز اول بالینی قرار دارد.

**H2stem:** این محصول حاوی سلول های پیش ساز کبدی مشتق شده از کبد انسانی است که قابلیت تمایز در محیط *in vitro* به سلول های شبیه به هپاتوسیت ها را پیدا کرده اند و با ترشح آلبومین و آنتی تریپسین  $1\alpha$  شناسایی می شوند و می توانند در ترمیم مؤثر باشند. این دارو در فاز پیش بالینی است.

**Atrosimab:** دارویی است بر پایه آنتی بادی که در سال 2018 گسترش یافت. این دارو از طریق اتصال اختصاصی به گیرنده  $TNF-\alpha$  (TNF-R1) و مهار این مسیر می تواند در درمان بیماری های مرتبط با این مسیر مفید باشد. مسیر  $TNF-\alpha$  در گسترش بسیاری از بیماری های عفونی مانند بیماری های مزمن کبدی، دخالت دارد، این دارو نیز در فاز پیش کلینیکی است.

#### کارآزمایی های بالینی انجام گرفته در حوزه سلول درمانی کبد در ایران

دانش سلول های بنیادی از اوایل سال 2000 در ایران مورد مطالعه قرار گرفت و کاربرد آن ها در زمینه های مختلف مورد ارزیابی و آزمایش قرار گرفته است. در این زمینه محققان ایرانی توانستند سلول های بنیادی را در درمان بیماری های مختلف هم چون بیماری های کبدی، قلبی و استخوانی به کار ببرند (147،133). در فاز بالینی

مداخلات انجام شده توسط دو منبع سلولی مشتق شده از مغز استخوان که سلول های بنیادی مزانشیمی و سلول های بنیادی خون ساز هستند، انجام شده است. تا به حال در چهار مرکز پژوهشگاه رویان، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشگاه علوم پزشکی شیراز و دانشگاه علوم پزشکی مشهد، بیماران تحت سلول درمانی قرار گرفته اند (148). در زمینه بیماری های کبدی در ایران، بیش ترین تحقیقات صورت گرفته در زمینه درمان بیماری سیروز بوده است. در همین راستا مطالعات مختلفی با استفاده از انواع مختلف سلول های مشتق شده از مغز استخوان از جمله سلول های MSCs (150،149)، HSCs (151)، MNCs (67،63)، CD34+ (151) و CD133+ (63) از طریق روش های تزریق داخل سیاهرگ باب کبدی (150،63)، سرخرگ کبدی (151) و ورید محیطی (149،67) صورت گرفته است. بسیاری از نتایج این مطالعات بیانگر بی خطر بودن استفاده از سلول های بنیادی مختلف و همچنین بهبود نسبی وضعیت بیماران در مدت زمان پیگیری پس از تزریق بوده است (149). استفاده از سلول های بنیادی در درمان بیماری هایی مانند بیماری های کبدی در ایران در حال پیشرفت است. امید است که با استفاده از این سلول ها بتوان به بهبود بسیاری از بیماران کمک کرد.

سلول درمانی راهکاری جایگزین جهت بهبود وضعیت بیمارانی است که متأسفانه به علت عدم دسترسی سریع به عضو اهدایی در وضعیت جسمانی مناسبی قرار ندارند. استفاده از هپاتوسیت ها به علت عدم دسترسی راحت با معضلات بسیاری مواجه است. به همین خاطر دانشمندان به دنبال یافتن راهی جهت استفاده از انواع مختلف سلول های بنیادی نظیر iPSCs، سلول های مشتق شده از مغز استخوان و همچنین القای تمایز مستقیم از سلول سوماتیک، جهت تولید سلول های فعال و بالغ هپاتوسیتی هستند. اکثر روش های مورد استفاده با مشکلاتی متعددی از جمله احتمال تومورزایی رو به رو است. امروزه استفاده از انواع مختلف سلول های بنیادی

جهت رفع این مشکلات و تولید انبوه سلول هپاتوسیتی بالغ دست یافت (138). یکی از این روش‌ها، استفاده از بیورآکتورها و کنترل شرایط محیطی کشت سلول است که امروزه بسیار مورد توجه قرار گرفته است (140).

### سپاسگزاری

این مطالعه با همکاری مرکز تحقیقات سلول درمانی پژوهشکده بیماری‌های گوارش دانشگاه علوم پزشکی تهران و با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور و پژوهشگاه رویان در گروه کبد و گوارش پژوهشکده سلول‌های بنیادی اجرا گردید. از همه عزیزانی که در این پروژه قبول زحمت کردند کمال تشکر را داریم.

مشتق‌شده از مغزاستخوان نظیر سلول‌های CD34+، CD133+، MNC و MSCs، متداول‌ترین راهکاری است که توسط بسیاری از محققان و مراکز بالینی در حال انجام می‌باشد و خوشبختانه تا حدودی توانسته است منجر به بهبودی برخی از عملکردهای کبدی در بیماران شود. به‌طور کلی، استفاده از سلول‌های بنیادی در درمان اختلالات کبدی می‌تواند راهکاری مناسب برای بهبود موقت وضعیت بیماران باشد، اما با مشکلات متعددی از جمله عدم دسترسی راحت به سلول‌های بنیادی بافت کبدی، تمایز ناکارآمد سلول‌های بنیادی در دسترس به سمت سلول هپاتوسیتی بالغ و عملکردی و همچنین احتمال رد پیوند روبه‌رو است. امید است با بهره‌گیری از تکنولوژی‌های نوین بتوان به راه‌حلی

### References

1. Kaiser LR. The future of multihospital systems. *Top Health Care Financ* 1992; 18(4): 32-45.
2. Mason C, Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine. *Regen Med* 2008; 3(1): 1-5.
3. Vosough M, Moslem M, Pournasr B, Baharvand H. Cell-based therapeutics for liver disorders. *Br Med* 2011; 100(1): 157-172.
4. Nussler A, Konig S, Ott M, Sokal E, Christ B, Thasler W, et al. Present status and perspectives of cell-based therapies for liver diseases. *J Hepatol* 2006; 45(1): 144-159.
5. Duncan AW, Dorrell C, Grompe M. Stem cells and liver regeneration. *Gastroenterology* 2009; 137(2): 466-481.
6. MacParland SA, Liu JC, Ma XZ, Innes BT, Bartczak AM, Gage BK, et al. Single cell RNA sequencing of human liver reveals distinct intrahepatic macrophage populations. *Nature communications* 2018; 9(1): 4383.
7. Rockey DC, Bell PD, Hill JA. Fibrosis- a common pathway to organ injury and failure. *N Engl J Med* 2015; 372(12): 1138-1149.
8. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet* 2008; 371(9615): 838-851.
9. Karsdal MA, Manon-Jensen T, Genovese F, Kristensen JH, Nielsen MJ, Sand JMB, et al. Novel insights into the function and dynamics of extracellular matrix in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2015; 308(10): G807-G830.
10. Karsdal MA, Nielsen SH, Leeming D, Langholm L, Nielsen M, Manon-Jensen T, et al. The good and the bad collagens of fibrosis—their role in signaling and organ function. *Adv Drug Deliv Rev* 2017; 121: 43-56.
11. Schuppan D. Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver: collagens and glycoproteins. *Semin Liver Dis* 1990; 10(1): 1-10.
12. Schuppan D, Ruehl M, Somasundaram R, Hahn EG, editors. Matrix as a modulator of hepatic fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 2001; 21(3): 351-372.



13. Schuppan D, Ashfaq-Khan M, Yang AT, Kim YO. Liver fibrosis: direct antifibrotic agents and targeted therapies. *Matrix Biol* 2018; 68: 435-451.
14. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological reviews. Physiol Rev* 2008; 88(1): 125-172.
15. Dai LJ, Li HY, Guan LX, Ritchie G, Zhou JX. The therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on hepatic cirrhosis. *Stem Cell Res* 2009; 2(1): 16-25.
16. Lu WY, Bird TG, Boulter L, Tsuchiya A, Cole AM, Hay T, et al. Hepatic progenitor cells of biliary origin with liver repopulation capacity. *Nat Cell Biol* 2015; 17(8): 971-983.
17. Swiderska-Syn M, Syn WK, Xie G, Krüger L, Machado M, Karaca G, et al. Myofibroblastic cells function as progenitors to regenerate murine livers after partial hepatectomy. *Gut* 2014; 63(8): 1333-1344.
18. Hansel MC, Gramignoli R, Skvorak KJ, Dorko K, Marongiu F, Blake W, et al. The history and use of human hepatocytes for the treatment of liver diseases: the first 100 patients. *Curr Protoc Toxicol* 2014; 62(1): 14.12.1.23.
19. Mito M, Kusano M. Hepatocyte transplantation in man. *Cell transplant* 1993; 2(1): 65-74.
20. Takayama K, Akita N, Mimura N, Akahira R, Taniguchi Y, Ikeda M, et al. Generation of safe and therapeutically effective human induced pluripotent stem cell derived hepatocyte like cells for regenerative medicine. *Hepatology* 2017; 65(10): 1058-1069.
21. Czyz J, Wiese C, Rolletschek A, Blyszczuk P, Cross M, Wobus AM. Potential of embryonic and adult stem cells in vitro. *Biol Chem* 2003; 384(10-11): 1391-1409.
22. Susick R, Moss N, Kubota H, Lecluyse E, Hamilton G, Luntz T, et al. Hepatic progenitors and strategies for liver cell therapies. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 944: 398-419.
23. Lyra AC, Soares MBP, da Silva LFM, Braga EL, Oliveira SA, Fortes MF, et al. Infusion of autologous bone marrow mononuclear cells through hepatic artery results in a short-term improvement of liver function in patients with chronic liver disease: a pilot randomized controlled study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2010; 22(1): 33-42.
24. Moore J, Stutchfield B, Forbes S. Systematic review: the effects of autologous stem cell therapy for patients with liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2014; 39(7): 673-685.
25. Newsome PN, Fox R, King AL, Barton D, Than N-N, Moore J, et al. Granulocyte colony-stimulating factor and autologous CD133-positive stem-cell therapy in liver cirrhosis (REALISTIC): an open-label, randomised, controlled phase 2 trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2018; 3(1): 25-36.
26. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32(1): 11-16.
27. Mohamadnejad M, Alimoghaddam K, Bagheri M, Ashrafi M, Abdollahzadeh L, Akhlaghpour S, et al. Randomized placebo controlled trial of mesenchymal stem cell transplantation in decompensated cirrhosis. *Liver Int* 2013; 33(10): 1490-1496.
28. Shi M, Zhang Z, Xu R, Lin H, Fu J, Zou Z, et al. Human mesenchymal stem cell transfusion is safe and improves liver function in acute on chronic liver failure patients. *Stem Cells Transl Med* 2012; 1(10): 725-731.

29. Zhang Z, Lin H, Shi M, Xu R, Fu J, Lv J, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve liver function and ascites in decompensated liver cirrhosis patients. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27: 112-120.
30. Bonora-Centelles A, Donato MT, Lahoz A, Pareja E, Mir J, Castell JV, et al. Functional characterization of hepatocytes for cell transplantation: customized cell preparation for each receptor. *Cell Transplant* 2010; 19(1): 21-28.
31. Meyburg J, Das AM, Hoerster F, Lindner M, Kriegbaum H, Engelmann G, et al. One liver for four children: first clinical series of liver cell transplantation for severe neonatal urea cycle defects. *Transplantation* 2009; 87(5): 636-641.
32. Haridass D, Narain N, Ott M. Hepatocyte transplantation: waiting for stem cells. *Curr Opin Organ Transplant* 2008; 13(6): 627-632.
33. Theise ND, Saxena R, Portmann BC, Thung SN, Yee H, Chiriboga L, et al. The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* 1999; 30(6): 1425-1433.
34. Alison MR, Islam S, Lim SJCoimt. Cell therapy for liver disease. *Curr Opin Mol Ther* 2009; 11(4): 364-374.
35. Lanthier N, Spahr LJC. Resident liver progenitor cells: Proofs of their contribution to human liver regeneration. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2019; 43(6): 646-648.
36. Lanthier N, Rubbia-Brandt L, Spahr L. Liver progenitor cells and therapeutic potential of stem cells in human chronic liver diseases. *Acta Gastroenterol Belg* 2013; 76(1): 3-9.
37. Kitade M, Kaji K, Nishimura N, Seki K, Nakanishi K, Tsuji Y, et al. Blocking development of liver fibrosis augments hepatic progenitor cell derived liver regeneration in a mouse chronic liver injury model. *Hepatology* 2019; 49(9): 1034-1045.
38. Itoh T, Miyajima A. Liver regeneration by stem/progenitor cells. *Hepatology* 2014; 59(4): 1617-1626.
39. Font-Burgada J, Shalpour S, Ramaswamy S, Hsueh B, Rossell D, Umemura A, et al. Hybrid periportal hepatocytes regenerate the injured liver without giving rise to cancer. *Cell* 2015; 162(4): 766-779.
40. Pountos I, Giannoudis PVJI. Biology of mesenchymal stem cells. *Injury* 2005; 36(3): S8-S12.
41. Lee CW, Chen YF, Wu HH, Lee OK. Historical Perspectives and Advances in Mesenchymal Stem Cell Research for the Treatment of Liver Diseases. *Gastroenterology* 2018; 154(1): 46-56.
42. Prockop DJ, Oh JY, Lee RH. Data against a common assumption: xenogeneic mouse models can be used to assay suppression of immunity by human MSCs 2017; 25(8): 1748-1756.
43. Jang YO, Kim YJ, Baik SK, Kim MY, Eom YW, Cho MY, et al. Histological improvement following administration of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells for alcoholic cirrhosis: a pilot study. *Liver Int* 2014; 34(1): 33-41.
44. Kharaziha P, Hellstrom PM, Noorinayer B, Farzaneh F, Aghajani K, Jafari F, et al. Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I-II clinical trial. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009; 21(10): 1199-1205.
45. 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. Arch Iranian Med 2007; 10(4): 459-466.
46. Peng L, Xie DY, Lin BL, Liu J, Zhu HP, Xie C, et al. Autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in liver failure patients caused by hepatitis B: short-term and long-term outcomes. Hepatology 2011; 54(3): 820-828.
  47. Zhang Z, Lin H, Shi M, Xu R, Fu J, Lv J, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve liver function and ascites in decompensated liver cirrhosis patients. J Gastroenterol Hepatol 2012; 27(Suppl 2): 112-120.
  48. Amer ME, El-Sayed SZ, El-Kheir WA, Gabr H, Gomaa AA, El-Noomani N, et al. Clinical and laboratory evaluation of patients with end-stage liver cell failure injected with bone marrow-derived hepatocyte-like cells. Eur J Gastroenterol Hepatol 2011; 23(10): 936-941.
  49. El-Ansary M, Abdel-Aziz I, Mogawer S, Abdel-Hamid S, Hammam O, Teaema S, et al. Phase II trial: undifferentiated versus differentiated autologous mesenchymal stem cells transplantation in Egyptian patients with HCV induced liver cirrhosis. Stem Cell Rev Rep 2012; 8(3): 972-981.
  50. Amin MA, Sabry D, Rashed LA, Aref WM, el-Ghobary MA, Farhan MS, et al. Short-term evaluation of autologous transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in patients with cirrhosis: Egyptian study. Clin Transplant 2013; 27(4): 607-612.
  51. Vosough M, Moossavi S, Mardpour S, Akhlaghpour S, Azimian V, Jarughi N, et al. Repeated Intraportal Injection of Mesenchymal Stem Cells in Combination with Pioglitazone in Patients with Compensated Cirrhosis: A Clinical Report of Two Cases. Arch Iranian Med 2016; 19(2): 131-136.
  52. Kollet O, Shivtiel S, Chen YQ, Suriawinata J, Thung SN, Dabeva MD, et al. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. J Clin Invest 2003; 112(2): 160-169.
  53. Cunningham HE, Shea TC, Grgic T, Lachiewicz AM. Successful treatment of hepatitis C virus infection with direct acting antivirals during hematopoietic cell transplant. Transpl Infect Dis 2019; 2(3): e13091.
  54. Garg V, Garg H, Khan A, Trehanpati N, Kumar A, Sharma BC, et al. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes CD34(+) cells and improves survival of patients with acute-on-chronic liver failure. Gastroenterology 2012; 142(3): 505-512.
  55. am Esch JS, Knoefel WT, Klein M, Ghodsizad A, Fuerst G, Poll LW, et al. Portal application of autologous CD133+ bone marrow cells to the liver: a novel concept to support hepatic regeneration. Stem Cells 2005; 23(4): 463-470.
  56. Salama H, Zekri AR, Zern M, Bahnassy A, Loutfy S, Shalaby S, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in 48 patients with end-stage chronic liver diseases. Cell Transplant 2010; 19(11): 1475-1486.
  57. Lee CC, Chang HH, Lu MY, Yang YL, Chou SW, Lin DT, et al. The incidence and risk factors of hepatic veno-occlusive disease after hematopoietic stem cell transplantation in Taiwan. Ann Hematol 2019; 98(3): 745-752.
  58. Wan Z, You S, Rong Y, Zhu B, Zhang A, Zang H, et al. CD34+ hematopoietic stem cells mobilization, paralleled with multiple cytokines elevated in patients with HBV-related acute-on-chronic liver failure. Dig Dis Sci 2013; 58(2): 448-457.

59. Körbling M, Katz RL, Khanna A, Ruifrok AC, Rondon G, Albitar M, et al. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* 2002; 346(10): 738-746.
60. Lehwald N, Duhme C, Wildner M, Kuhn S, Fürst G, Forbes SJ, et al. HGF and SDF 1 mediated mobilization of CD 133+ BMSC for hepatic regeneration following extensive liver resection. *Liver Int* 2014; 34(1): 89-101.
61. 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): 122-1234.
62. Liedtke S, Enczmann J, Waclawczyk S, Wernet P, Kögler GJCsc. Oct4 and its pseudogenes confuse stem cell research. *Cell Stem Cell* 2007; 1(4): 364-366.
63. Mohamadnejad M, Vosough M, Moossavi S, Nikfam S, Mardpour S, Akhlaghpour S, et al. Intraportal Infusion of Bone Marrow Mononuclear or CD133+ Cells in Patients With Decompensated Cirrhosis: A Double Blind Randomized Controlled Trial. *Stem Cells Transl Med* 2016; 5(1): 87-94.
64. Terai S, Ishikawa T, Omori K, Aoyama K, Marumoto Y, Urata Y, et al. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells* 2006; 24(10): 2292-2298.
65. Gordon MY, Levičar N, Pai M, Bachellier P, Dimarakis I, Al Allaf F, et al. Characterization and clinical application of human CD34+ stem/progenitor cell populations mobilized into the blood by granulocyte colony stimulating factor. *Stem Cells* 2006; 24(7): 1822-1830.
66. Spahr L, Chalandon Y, Terraz S, Kindler V, Rubbia-Brandt L, Frossard JL, et al. Autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with decompensated alcoholic liver disease: a randomized controlled trial. *PloS one* 2013; 8(1): e53719.
67. Esmaeilzadeh A, Ommati H, Kooshyar MM, Jarahi L, Rezayat KA, Saberi S, et al. Autologous Bone Marrow Stem Cell Transplantation in Liver Cirrhosis after Correcting Nutritional Anomalies, A Controlled Clinical Study. *Cell J* 2019; 12(3): 268-273.
68. Lyra AC, Soares MB, da Silva LF, Fortes MF, Silva AG, Mota AC, et al. Feasibility and safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with advanced chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13(7): 1067-1073.
69. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292(5819): 154-156.
70. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78(12): 7634-7638.
71. Ware CB, Nelson AM, Mecham B, Hesson J, Zhou W, Jonlin EC, et al. Derivation of naive human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111(12): 4484-4489.
72. Lister R, Pelizzola M, Kida YS, Hawkins RD, Nery JR, Hon G, et al. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; 471(7336): 68-73.
73. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663-676.
74. Plath K, Lowry WE. Progress in understanding reprogramming to the induced pluripotent state. *Nat Rev Genet* 2011; 12(4): 253-265.

75. Zacharias DG, Nelson TJ, Mueller PS, Hook CC. The science and ethics of induced pluripotency: what will become of embryonic stem cells? *Mayo Clin Proc* 2011; 86(7): 634-640.
76. Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 2010; 467(7313): 285-290.
77. Marchetto MC, Yeo GW, Kainohana O, Marsala M, Gage FH, Muotri AR. Transcriptional signature and memory retention of human-induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 2009; 4(9): e7076.
78. Hansel MC, Davila JC, Vosough M, Gramignoli R, Skvorak KJ, Dorko K, et al. The use of induced pluripotent stem cells for the study and treatment of liver diseases. *Curr Protoc Toxicol* 2016; 67(1): 14.13. 1-14.13.27
79. Rashid ST, Corbineau S, Hannan N, Marciniak SJ, Miranda E, Alexander G, et al. Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells. *J Clin Invest* 2010; 120(9): 3127-3136.
80. Cayo MA, Mallanna SK, Di Furio F, Jing R, Tolliver LB, Bures M, et al. A Drug Screen using Human iPSC-Derived Hepatocyte-like Cells Reveals Cardiac Glycosides as a Potential Treatment for Hypercholesterolemia. *Cell Stem Cell* 2017; 20(4): 478-489e5.
81. Jing R, Duncan CB, Duncan SA. A small-molecule screen reveals that HSP90beta promotes the conversion of induced pluripotent stem cell-derived endoderm to a hepatic fate and regulates HNF4A turnover. *Development* 2017; 144(10): 1764-1774.
82. Hay DC, Fletcher J, Payne C, Terrace JD, Gallagher RC, Snoeys J, et al. Highly efficient differentiation of hESCs to functional hepatic endoderm requires ActivinA and Wnt3a signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(34): 12301-12306.
83. Cai J, Zhao Y, Liu Y, Ye F, Song Z, Qin H, et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. *Hepatology* 2007; 45(5): 1229-1239.
84. Espejel S, Roll GR, McLaughlin KJ, Lee AY, Zhang JY, Laird DJ, et al. Induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes have the functional and proliferative capabilities needed for liver regeneration in mice. *J Clin Invest* 2010; 120(9): 3120-3126.
85. Okamoto R, Takayama K, Akita N, Nagamoto Y, Hosokawa D, Iizuka S, et al. Human iPS Cell-based Liver-like Tissue Engineering at Extrahepatic Sites in Mice as a New Cell Therapy for Hemophilia B. *Cell Transplant* 2018; 27(2): 299-309.
86. Yu Y, Liu H, Ikeda Y, Amiot BP, Rinaldo P, Duncan SA, et al. Hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells: relevance to cellular therapies. *Stem Cell Res* 2012; 9(3): 196-207.
87. Nicolas C, Wang Y, Luebke-Wheeler J, Nyberg SLJB. Stem cell therapies for treatment of liver disease. *Biomedicines* 2016; 4(1): E2.
88. Wang M, Yang X, Zhang P, Cai L, Yang X, Chen Y, et al. Sustained Delivery Growth Factors with Polyethyleneimine Modified Nanoparticles Promote Embryonic Stem Cells Differentiation and Liver Regeneration. *Advanced science* 2016; 3(8): 1500393.
89. Farzaneh Z, Pakzad M, Vosough M, Pournasr B, Baharvand H. Differentiation of human embryonic stem cells to hepatocyte-like cells on a new developed xeno-free extracellular matrix. *Histochem Cell Biol* 2014; 142(2): 217-226.

90. Lei Y, Jeong D, Xiao J, Schaffer DVJC, bioengineering m. Developing defined and scalable 3D culture systems for culturing human pluripotent stem cells at high densities. *Cell Mol Bioeng* 2014; 7(2): 172-183.
91. Takayama K, Kawabata K, Nagamoto Y, Kishimoto K, Tashiro K, Sakurai F, et al. 3D spheroid culture of hESC/hiPSC-derived hepatocyte-like cells for drug toxicity testing. *Biomaterials* 2013; 34(7): 1781-1789.
92. Gorelik J, Ali NN, Shevchuk AI, Lab M, Williamson C, Harding SE, et al. Functional characterization of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes using scanning ion conductance microscopy. *Tissue Eng* 2006; 12(4): 657-664.
93. Zhao T, Zhang Z-N, Rong Z, Xu YJN. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; 474(7350): 212-215.
94. Zabolica M, Srinivasan RC, Vosough M, Hammarstedt C, Wu T, Gramignoli R, et al. Guide to the Assessment of Mature Liver Gene Expression in Stem Cell-Derived Hepatocytes. *Stem Cells Dev* 2019; 28(14): 907-919.
95. Carvalho S, Lira D, Oliveira G, Thole A, Stumbo A, Caetano C, et al. Decreased collagen types I and IV, laminin, CK-19 and  $\alpha$ -SMA expression after bone marrow cell transplantation in rats with liver fibrosis. *Histochem Cell Biol* 2010; 134(5): 493-502.
96. Suh YG, Kim JK, Byun JS, Yi HS, Lee YS, Eun HS, et al. CD11b<sup>+</sup> Gr1<sup>+</sup> bone marrow cells ameliorate liver fibrosis by producing interleukin 10 in mice. *Hepatology* 2012; 56(5): 1902-1912.
97. Liu F, Liu ZD, Wu N, Cong X, Fei R, Chen HS, et al. Transplanted endothelial progenitor cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis in rats. *Liver Transpl* 2009; 15(9): 1092-1100.
98. Luo X Y, Meng X J, Cao D C, Wang W, Zhou K, Li L, et al. Transplantation of bone marrow mesenchymal stromal cells attenuates liver fibrosis in mice by regulating macrophage subtypes. *Stem Cell Res Ther* 2019; 10(1): 16.
99. Rong X, Liu J, Yao X, Jiang T, Wang Y, Xie F. Human bone marrow mesenchymal stem cells-derived exosomes alleviate liver fibrosis through the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Stem Cell Res Ther* 2019; 10(1): 98.
100. Duman DG, Zibandeh N, Ugurlu MU, Celikel C, Akkoc T, Banzragch M, et al. Mesenchymal stem cells suppress hepatic fibrosis accompanied by expanded intrahepatic natural killer cells in rat fibrosis model. *Mol Biol Rep* 2019; 46(3): 2997-3008.
101. Zhang S, Zhu Z, Wang Y, Liu S, Zhao C, Guan W, et al. Therapeutic potential of Bama miniature pig adipose stem cells induced hepatocytes in a mouse model with acute liver failure. *Cytotechnology* 2018; 70(4): 1131-1141.
102. Chien Y, Huang C-S, Lin H-C, Lu K-H, Tsai P-H, Lai Y-H, et al. Improvement of non-alcoholic steatohepatitis by hepatocyte-like cells generated from iPSCs with Oct4/Sox2/Klf4/Parpl. *Oncotarget* 2018; 9(26): 18594-18606.
103. Jopling C, Boue S, Izpisua Belmonte JC. Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12(2): 79-89.
104. Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 1987; 51(6): 987-1000.

105. Laiosa CV, Stadtfeld M, Xie H, de Andres-Aguayo L, Graf T. Reprogramming of committed T cell progenitors to macrophages and dendritic cells by C/EBP $\alpha$  and PU. 1 transcription factors. *Immunity* 2006; 25(5): 731-744.
106. Nerlov C, Graf T. PU. 1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Genes Dev* 1998; 12(15): 2403-2412.
107. Tachibana M, Takeda K, Nobukuni Y, Urabe K, Long JE, Meyers KA, et al. Ectopic expression of MITF, a gene for Waardenburg syndrome type 2, converts fibroblasts to cells with melanocyte characteristics. *Nat Genet* 1996; 14(1): 50-54.
108. Xie H, Ye M, Feng R, Graf T. Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* 2004; 117(5): 663-676.
109. Schaub JR, Huppert KA, Kurial SN, Hsu BY, Cast AE, Donnelly B, et al. De novo formation of the biliary system by TGF $\beta$ -mediated hepatocyte transdifferentiation. *Nature* 2018; 557(7704): 247-251.
110. Chen Z, Niu M, Sun M, Yuan Q, Yao C, Hou J, et al. Transdifferentiation of human male germline stem cells to hepatocytes in vivo via the transplantation under renal capsules. *Oncotarget* 2017; 8(9): 14576-14592.
111. Kamath B, Mack C. From hepatocyte to cholangiocyte: the remarkable potential of transdifferentiation to treat cholestatic diseases. *Hepatology* 2019; 69(4): 1828-1830.
112. Zhou Q, Melton DA. Extreme makeover: converting one cell into another. *Cell Stem Cell* 2008; 3(4): 382-388.
113. Ahrens TD, Caglayan S, Staerk J, Cieřlar-Pobuda A. Transdifferentiation—Changing Cell Identity. *Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine*: Elsevier; 2019. p. 37-56.
114. O'Malley J, Woltjen K, Kaji K. New strategies to generate induced pluripotent stem cells. *Curr Opin Biotechnol* 2009; 20(5): 516-521.
115. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008; 26(1): 101-106.
116. Pei H, Yang Y, Xi J, Bai Z, Yue W, Nan X, et al. Lineage restriction and differentiation of human embryonic stem cells into hepatic progenitors and zone 1 hepatocytes. *Tissue Eng Part C Methods* 2009; 15(1): 95-104.
117. Si Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, Li J, Battle MA, Duris C, et al. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology* 2010; 51(1): 297-305.
118. Chen L, Brenner DA, Kisseleva T. Combatting Fibrosis: Exosome Based Therapies in the Regression of Liver Fibrosis. *Hepatol Commun* 2019; 3(2): 180-192.
119. Tkach M, Théry C. Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to Go. *Cell* 2016; 164(6): 1226-1232.
120. Sato K, Meng F, Glaser S, Alpini G. Exosomes in liver pathology. *J Hepatol* 2016; 65(1): 213-221.
121. Haney MJ, Klyachko NL, Zhao Y, Gupta R, Plotnikova EG, He Z, et al. Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. *J Control Release* 2015; 207: 18-30.
122. Johnsen KB, Gudbergsson JM, Skov MN, Pilgaard L, Moos T, Duroux M. A comprehensive overview of exosomes as drug delivery vehicles—endogenous nanocarriers for targeted cancer therapy. *Biochim Biophys*

- Acta 2014;1846(1):75-87.
123. Sun D, Zhuang X, Xiang X, Liu Y, Zhang S, Liu C, et al. A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes. *Mol Ther* 2010; 18(9): 1606-1614.
  124. Mobasheri A, Kalamegam G, Musumeci G, Batt ME. Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions. *Maturitas* 2014; 78(3): 188-198.
  125. Squillaro T, Peluso G, Galderisi U. Clinical trials with mesenchymal stem cells: an update. *Cell Transplant* 2016; 25(5): 829-848.
  126. Mardpour S, Hassani SN, Mardpour S, Sayahpour F, Vosough M, Ai J, et al. Extracellular vesicles derived from human embryonic stem cell MSCs ameliorate cirrhosis in thioacetamide induced chronic liver injury. *J Cell Physiol* 2018; 233(12): 9330-9344.
  127. Li J, Qiu SJ, She WM, Wang FP, Gao H, Li L, et al. Significance of the balance between regulatory T (Treg) and T helper 17 (Th17) cells during hepatitis B virus related liver fibrosis. *PloS one*. 2012;7(6):e39307.
  128. Ren G, Chen X, Dong F, Li W, Ren X, Zhang Y, et al. Concise review: mesenchymal stem cells and translational medicine: emerging issues. *Stem Cells Transl Med* 2012; 1(1): 51-58.
  129. Levine P, McDaniel K, Francis H, Kennedy L, Alpini G, Meng F. Molecular mechanisms of stem cell therapy in alcoholic liver disease. *Dig Liver Dis* 2014; 46(5): 391-397.
  130. Masyuk AI, Masyuk TV, LaRusso NF. Exosomes in the pathogenesis, diagnostics and therapeutics of liver diseases. *J Hepatol* 2013; 59(3): 621-625.
  131. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260(5110): 920-926.
  132. Mazza G, Al-Akkad W, Rombouts K. Engineering in vitro models of hepatofibrogenesis. *Adv Drug Deliv Rev* 2017; 121: 147-157.
  133. Heydari Z, Najimi M, Mirzaei H, Shpichka A, Ruoss M, Farzaneh Z, et al. Tissue Engineering in Liver Regenerative Medicine: Insights into Novel Translational Technologies. *Cells* 2020; 9(2): 304.
  134. Chan BP, Leong KW. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J* 2008; 17(Suppl 4): 467-479.
  135. Smith MK, Mooney DJ. Biomaterials in liver tissue engineering. *E-Biomed a Journal of Regenerative Medicine* 2000; 1(5): 65-73.
  136. Zhang W, Tucker-Kellogg L, Narmada BC, Venkatraman L, Chang S, Lu Y, et al. Cell-delivery therapeutics for liver regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 2010; 62(7-8): 814-826.
  137. Zhang YS, Yue K, Aleman J, Moghaddam KM, Bakht SM, Yang J, et al. 3D Bioprinting for Tissue and Organ Fabrication. *Ann Biomed Eng* 2017; 45(1): 148163.
  138. Wang J, Sun M, Liu W, Li Y, Li M. Stem Cell-Based Therapies for Liver Diseases: An Overview and Update. *Tissue Eng Regen Med* 2019; 16(2): 107-118.
  139. Nobakht F, Saheli M, Farzaneh Z, Teheri P, Dorraj M, Baharvand H, et al. Generation of Transplantable Three-Dimensional Hepatic-Patch to Improve the Functionality of Hepatic Cells in vitro and in vivo. *Stem Cells and Development* 2020; 29(5): 301-313.
  140. Tamay DG, Usal TD, Alagoz AS, Yucel D, Hasirci N, Hasirci VJFib, et al. 3D and 4D printing of polymers for tissue engineering



- applications. *Front Bioeng Biotechnol* 2019; 7: 164
141. Mizumoto H, Shirakigawa N, Ijima H. Current Status and New Challenges of the Artificial Liver. *Engineering Challenges: A Chemical Engineering Insight*. Wiley-Blackwell; 2018. p. 27-54.
142. Adam AAA, van Wenum M, van der Mark VA, Jongejan A, Moerland PD, Houtkooper RH, et al. AMC-Bio-Artificial Liver culturing enhances mitochondrial biogenesis in human liver cell lines: The role of oxygen, medium perfusion and 3D configuration. *Mitochondrion* 2018; 39: 30-42.
143. Carpentier B, Gautier A, Legallais C. Artificial and bioartificial liver devices: present and future. *Gut* 2009; 58(12): 1690-1702.
144. De Bruyn T, Chatterjee S, Fattah S, Keemink J, Nicolai J, Augustijns P, et al. Sandwich-cultured hepatocytes: utility for in vitro exploration of hepatobiliary drug disposition and drug-induced hepatotoxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2013; 9(5): 589-616.
145. Nyberg SL, Remmel RP, Mann HJ, Peshwa MV, Hu W-S, Cerra FB. Primary hepatocytes outperform Hep G2 cells as the source of biotransformation functions in a bioartificial liver. *Ann Surg* 1994; 220(1): 59-67.
146. Chamuleau RA. Future of bioartificial liver support. *World J Gastrointest Surg* 2009; 1(1): 21-25.
147. Saberi S, Karamzadeh R, Moghadam P, Kadivari M, Behbahani BE, Heydari Z, et al. Research Performance in Stem Cell Science and Regenerative Medicine in Iran: A National Comprehensive Observation. *Archives of Iranian Medicine (AIM)* 2019; 22(6): 318-327.
148. Miremadi T, Salekdeh GH, Aghdami N, Gharanfoli M, Vasei M, Kouhkan A, et al. Stem cell research and therapy in the Islamic republic of Iran: pioneering in the Islamic world. *Stem Cells Dev* 2012; 22(1): 51-57.
149. Mohamadnejad M, Alimoghaddam K, Mohyeddin-Bonab M, Bagheri M, Bashtar M, Ghanaati H, et al. Phase I trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis. *Arch Iran Med* 2007; 10(4): 459-466.
150. Vosough M, Moossavi S, Mardpour S, Akhlaghpour S, Azimian V, Jarughi N, et al. Repeated Intraportal Injection of Mesenchymal Stem Cells in Combination with Pioglitazone in Patients with Compensated Cirrhosis: A Clinical Report of Two Cases. *Arch Iran Med* 2016; 19(2): 131-136.
151. Mohamadnejad M, Namiri M, Bagheri M, Hashemi SM, Ghanaati H, Mehrjardi NZ, et al. Phase I human trial of autologous bone marrow-hematopoietic stem cell transplantation in patients with decompensated cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2007; 13(24): 3359-3363.