

Protective Effects of Hemin on Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Survival and Apoptosis under In Vitro Oxidative Stress

Yeganeh Shahi¹,
Aghil Esmaeili-Bandboni^{2,3},
Marjan Ghorbani-Anarkooli⁴,
Mohammadreza Mobayen⁵,
Arash Zaminy⁶,
Mehrdad Asgari^{7,4}

¹ MSc in Anatomical Sciences, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

² Assistant Professor, Medical Biotechnology Research Center, School of Paramedical Sciences, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

³ Assistant Professor, Department of Medical Biotechnology, School of Paramedical Sciences, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

⁴ Assistant Professor of Anatomical Sciences, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

⁵ Associate Professor of Burn Surgery, Burn and Regenerative Medicine Research Center, Poursina Hospital, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

⁶ Associate Professor of Anatomical Sciences, Burn and Regenerative Medicine Research Center, Poursina Hospital, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

⁷ Associate Professor of Anatomical Sciences, Neurosciences Research Center, Poursina Hospital, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

(Received February 7, 2026; Accepted June 1, 2026)

Abstract

Background and purpose: Oxidative stress is a major limiting factor affecting the survival of mesenchymal stem cells following transplantation. Activation of the heme oxygenase-1 (HMOX1) pathway is recognized as a key cytoprotective mechanism against oxidative damage. This study aimed to investigate the protective and anti-apoptotic effects of Hemin, a potent inducer of HMOX1, on human adipose-derived mesenchymal stem cells (hADSCs) exposed to hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced oxidative stress.

Materials and methods: hADSCs were isolated from human adipose tissue and characterized according to established mesenchymal stem cell markers. Cells were pretreated with non-cytotoxic concentrations of Hemin (10, 20, and 25 µM) and subsequently exposed to 300 µM H₂O₂, corresponding to the determined IC₅₀ value, for 24, 48, and 72 hours. Cell viability was assessed using the MTT assay, while apoptotic and morphological changes were evaluated using acridine orange/propidium iodide (AO/PI) and DAPI staining. The expression level of the HMOX1 gene was quantified using real-time RT-PCR.

Results: The MTT assay revealed that the IC₅₀ of H₂O₂ in hADSCs was 300 µM, whereas Hemin concentrations above 25 µM exhibited cytotoxic effects. Pretreatment with Hemin at 10, 20, and 25 µM significantly enhanced cell survival and attenuated H₂O₂-induced cytotoxicity at all evaluated time points. DAPI staining demonstrated a marked reduction in apoptotic cells, and AO/PI staining indicated improved cellular morphology and a decreased proportion of dead cells, particularly in the groups treated with 20 and 25 µM Hemin. The most pronounced protective effects were observed at the concentration of 25 µM after 48 and 72 hours. In addition, HMOX1 gene expression was significantly upregulated in Hemin-treated groups compared with the group exposed to oxidative stress alone.

Conclusion: Hemin enhances hADSC survival and reduces oxidative stress-induced apoptosis through the upregulation of HMOX1. These findings suggest that Hemin may serve as a promising cytoprotective agent for enhancing the efficacy of stem cell-based therapies.

Keywords: Heme Oxygenase-1 (HMOX1); Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells (hADSCs); Oxidative Stress; Cytoprotection; Apoptosis.

J Mazandaran Univ Med Sci 2026; 36 (257): 3-15 (Persian).

Corresponding Author: Mehrdad Asgari - Faculty of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran
(E-mail: mehrdad_vhf@yahoo.com)

بررسی اثرات محافظتی همین بر بقا و آپوپتوز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی در شرایط تنش اکسیداتیو آزمایشگاهی

یگانه شاهی^۱عقیل اسمعیلی بندبونی^{۳،۲}مرجان قربانی انارکولی^۴محمدرضا مبین^۵آرش زمینی^۶مهرداد عسگری^{۴،۷}

چکیده

سابقه و هدف: استرس اکسیداتیو بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی را پس از پیوند محدود می‌کند. فعال‌سازی مسیر هم‌اکسیژناز-۱ (Heme Oxygenase-1 (HMOX1 یک مکانیسم کلیدی محافظتی است. این مطالعه با هدف، ارزیابی اثر محافظتی همین (Hemin) به‌عنوان القاگر HMOX1 بر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسانی (Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells; hADSCs) در مواجهه با استرس اکسیداتیو ناشی از هیدروژن پراکسید (H_2O_2)، انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی، سلول‌های hADSC جدا و شناسایی شدند. سلول‌ها با غلظت‌های غیرسمی همین (۱۰، ۲۰ و ۲۵ میکرومولار) پیش‌تیمار شده و سپس با ۳۰۰ میکرومولار (IC_{50}) H_2O_2 به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. بقای سلولی با آزمون MTT ارزیابی شد. تغییرات آپوپتوتیک با رنگ‌آمیزی DAPI و آکریدین اورنج/پروپیدوم یدید (AO/PI) بررسی گردید. بیان ژن *HMOX1* با روش Real-time RT-PCR (Real-time polymerase chain reaction) اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: IC_{50} برابر ۳۰۰ میکرومولار بود. غلظت‌های بالاتر از ۲۵ میکرومولار همین سمی بودند. پیش‌تیمار با همین (۱۰، ۲۰ و ۲۵ میکرومولار) بقای سلولی را افزایش داده و سمیت H_2O_2 را کاهش داد. DAPI کاهش آپوپتوز و AO/PI بهبود مورفولوژی و کاهش سلول‌های مرده را نشان داد (به‌ویژه در ۲۰ و ۲۵ میکرومولار). بیش‌ترین اثر محافظتی در ۲۵ میکرومولار در ۴۸ و ۷۲ ساعت دیده شد. بیان *HMOX1* در گروه‌های تیمار شده با همین به‌طور معناداری بیش‌تر از گروه استرس اکسیداتیو بود.

استنتاج: همین با القای بیان *HMOX1* می‌تواند بقای hADSCs را افزایش داده و آپوپتوز القا شده توسط استرس اکسیداتیو را کاهش دهد. این نتایج، همین را به‌عنوان یک عامل محافظت‌کننده سلولی بالقوه برای بهبود کارایی درمان‌های مبتنی بر سلول‌های بنیادی معرفی می‌کند.

واژه‌های کلیدی: همین (Hemin)، هم‌اکسیژناز-۱ (Heme oxygenase-1; HMOX1)، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسانی (Human adipose-derived mesenchymal stem cells; hADSCs)، استرس اکسیداتیو، محافظت سلولی، آپوپتوز

E-mail: mehrdad_vhf@yahoo.com

مؤلف مسئول: مهرداد عسگری - گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

۱. کارشناسی ارشد علوم تشریحی، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

۲. استادیار، مرکز تحقیقات ب زبست فناوری پزشکی، دانشکده علوم پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

۳. استادیار، گروه زیست فناوری پزشکی، دانشکده علوم پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

۴. استادیار علوم تشریحی، گروه علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

۵. دانشیار جراحی سوختگی، مرکز تحقیقات پزشکی سوختگی و ترمیمی، بیمارستان پورسینا، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

۶. دانشیار علوم تشریحی، مرکز تحقیقات پزشکی سوختگی و ترمیمی، بیمارستان پورسینا، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

۷. استادیار علوم تشریحی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب، بیمارستان پورسینا، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

✉ تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۱/۱۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۴/۱۱/۲۱ تاریخ تصویب: ۱۴۰۵/۳/۱۱

مقدمه

به دلیل ضرورت یافتن درمان‌های نوین و جایگزین برای طیف وسیعی از بیماری‌ها، پژوهشگران و متخصصان پزشکی تمرکز خود را بر پزشکی بازساختی و درمان‌های سلولی معطوف کرده‌اند. در این میان، سلول‌های بنیادی به دلیل توان بالقوه خود در ترمیم و بازسازی بافت‌ها، مورد توجه گسترده پژوهش‌های پایه و بالینی قرار گرفته‌اند (۱).

از آن‌جا که بافت چربی به راحتی در دسترس است، مقدار فراوانی از آن در بدن وجود دارد و معمولاً در طی اعمال جراحی زیبایی مانند لیپوساکشن برداشت می‌شود، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسانی (Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells; hADSCs) به عنوان یکی از مناسب‌ترین و در دسترس‌ترین منابع سلولی برای کاربردهای مهندسی بافت و درمان‌های بازساختی شناخته می‌شوند (۲).

علیرغم پتانسیل بالای این سلول‌ها در درمان‌های ترمیمی، کاهش بقای سلولی پس از پیوند یا کشت در شرایط آزمایشگاهی یکی از چالش‌های اساسی در کاربرد بالینی آن‌ها محسوب می‌شود. شرایط نامساعدی نظیر کم اکسیژنی، فقر سرم، التهاب و به‌ویژه استرس اکسیداتیو، همچنین درمان‌هایی مانند شیمی درمانی و پرتو درمانی، می‌توانند منجر به کاهش بقا و کارایی سلول‌های بنیادی شوند (۳). در نتیجه، افزایش مقاومت سلول‌های بنیادی در برابر تنش‌های اکسیداتیو و محیطی، یک پیش‌نیاز اساسی برای بهبود اثربخشی درمان‌های سلولی به شمار می‌رود. برای غلبه بر این محدودیت‌ها، استراتژی‌های مختلف پیش‌تیماری توسعه یافته‌اند که شامل اصلاح ژنتیکی سلول‌های بنیادی، تیمار با هورمون‌های رشد و مواد محافظ سلولی، و کشت سلول‌ها در داربست‌های زیستی خاص است (۴). پیش‌شرطی سازی فارماکولوژیک با هدف فعال‌سازی مسیرهای محافظتی درون سلولی، یکی از روش‌های ساده و قابل انتقال به بالین محسوب می‌شود.

همین (Hemin) شکل اکسید شده هم و یک ترکیب پورفیرینی حاوی آهن است که موجب افزایش بیان آنزیم هم‌اکسیژناز-۱ (Heme Oxygenase-1; HO-1) می‌شود. آنزیم HO نقش کلیدی در کاتابولیسم هم داشته و مسئول تولید بیلی‌وردین، آهن آزاد و مونوکسید کربن است. از میان ایزوآنزیم‌های HO، نوع القایی آن یعنی HO-1 در پاسخ به آسیب‌های بافتی افزایش می‌یابد و دارای اثرات محافظتی سلولی مهمی است (۵).

همین دارویی است که عمدتاً برای درمان حملات حاد پورفیری استفاده می‌شود و در تحقیقات پیش‌بالینی توجه زیادی را به خود جلب کرده است. مطالعات متعدد غیر بالینی نشان داده‌اند که همین در شرایط التهابی مختلف مانند بیماری التهابی روده، نارسایی کلیه، سپسیس، آرتریت، پانکراتیت، انفارکتوس میوکارد و التهاب مجاری تنفسی اثر ضدالتهابی قوی دارد (۵). علاوه بر این، اثرات محافظتی همین در مدل‌های پیش‌بالینی استرس اکسیداتیو نیز گزارش شده است، اما تاکنون اثر محافظتی آن بر hADSCs به‌طور مشخص مورد بررسی قرار نگرفته بود.

مطالعات متعدد نشان داده‌اند که HO-1 با مهار استرس اکسیداتیو، التهاب و آپوپتوز، نقش محافظتی قابل توجهی در شرایط پاتولوژیک مختلف از جمله کم اکسیژنی و آسیب‌های بافتی ایفا می‌کند (۶، ۷). با این حال، شواهد محدودی در خصوص نقش القای HO-1 توسط همین در محافظت از hADSC در شرایط استرس اکسیداتیو آزمایشگاهی وجود دارد. بنابراین، بررسی اثرات محافظتی همین به‌عنوان القاگر HO-1 بر hADSC در مواجهه با استرس اکسیداتیو می‌تواند خلأ موجود در این حوزه را تا حدی برطرف کند.

در این پژوهش، هدف مطالعه حاضر بررسی اثرات محافظتی همین در برابر استرس اکسیداتیو القا شده توسط پراکسی هیدروژن (H_2O_2) در hADSCs و تبیین مکانیسم‌های زمینه‌ای آن از طریق تعدیل بیان ژن *HMOX1* است. نتایج این مطالعه می‌تواند زمینه‌ساز توسعه راهبردهای

نوین پیش‌شرطی‌سازی این سلول‌ها به‌منظور افزایش بقا و کارایی آن‌ها در شرایط نامساعد محیطی باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی - آزمایشگاهی، محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)، حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum; FBS) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین (Penicillin 100 U/mL و Streptomycin 100 µg/mL) مورد استفاده در کشت سلولی از شرکت ایده زیست نو ترکیب (تهران، ایران) تهیه گردید. محیط‌های تمایزی آدیپوژنیک و استئوژنیک از شرکت بن‌یاخته (تهران، ایران) خریداری شدند. همچنین استخراج RNA کل با استفاده از کیت تجاری RNX-Plus (سیناژن، تهران، ایران) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. همچنین، کلیه مراحل این پژوهش با تأیید کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی گیلان انجام شده است (IR.GUMS.REC.1401.365).

جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسانی

سلول‌های hADSC پس از اخذ رضایت آگاهانه و طی عمل لیپوساکشن جمع‌آوری شدند. بافت چربی پس از شستشو با PBS به قطعات کوچک تقسیم شد. سپس به ازای هر گرم بافت، ۱/۵ mg کلاژناز-۱ اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۴۵-۶۰ دقیقه در ۳۷°C انکوبه شدند. پس از هضم، سوسپانسیون سلولی به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۸۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. رسوب سلولی در محیط DMEM کامل (۱۰ درصد FBS و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک) به صورت سوسپانسیون (Suspension) آماده‌سازی شد و به فلاسک‌های کشت منتقل گردید. سلول‌ها در شرایط ۳۷°C، ۵ درصد CO₂ و ۹۵ درصد رطوبت کشت داده شدند. محیط کشت هر ۳ روز

تعویض شد و سلول‌های پاساژ ۴ برای آزمایش‌ها استفاده شدند.

تمایز چربی‌زایی و استخوان‌زایی سلول‌های hADSCs به‌منظور بررسی توان تمایزی hADSCs، سلول‌های پاساژ ۴ با تراکم ۱۰^۵ سلول در هر چاهک در پلیت‌های ۲۴ خانه کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت در معرض محیط‌های تمایزی قرار گرفتند. محیط آدیپوژنیک شامل دگزانتازون (1µM)، β-glycerophosphate (10 mM) و اسید آسکوربیک (50 µg/mL) و محیط استئوژنیک شامل دگزانتازون (6×10⁻⁸ M)، انسولین (10µg/mL)، ایندومتاسین (60µM) و ۳ isobutyl-1- (0.5mM) methylxanthine بود. محیط‌های تمایزی هر ۳ روز یک‌بار تعویض شدند و سلول‌های گروه کنترل در محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS نگهداری شدند. پس از ۲۱ روز، تمایز آدیپوژنیک و استئوژنیک به ترتیب با رنگ‌آمیزی Oil Red O و Alizarin Red S ارزیابی و با میکروسکوپ نوری بررسی گردید.

مشخصه‌ی ایمنی hADSC ها با فلوسیتومتری

سلول‌ها در پاساژ ۴ برداشت و ۱۰/۰۰۰ سلول شمارش شدند. سلول‌ها با ۰/۵ درصد آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin; BSA) بلوکه شده و سپس با ۴ درصد پارافرمالدهید فیکس شدند. نفوذپذیری با ۰/۵ درصد Triton X-100 انجام شد. سلول‌ها با آنتی‌بادی‌های FITC/PE به مدت ۱/۵ ساعت انکوبه شدند. مارکرهای CD73، CD90 و CD105 مثبت، و CD34 و CD45 منفی بررسی شدند.

بررسی اثر همین بر زنده‌مانی hADSCs

برای ارزیابی تأثیر همین بر بقای سلول‌ها، از آزمون (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5--3 diphenyltetrazolium bromide (MTT) استفاده شد. hADSCs با تراکم ۱×۱۰^۴ سلول در هر چاهک در

پلیت ۹۶ خانه کشت داده شده و سپس با غلظت‌های مختلف همین (۱۰، ۲۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکرومولار) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. پس از آن، محلول MTT با غلظت ۱ میلی گرم/میلی لیتر به سلول‌ها افزوده شد و پلیت‌ها به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. پس از تشکیل کریستال‌های فورمازان، محلول MTT حذف و کریستال‌ها با ایزوپروپانول اسیدی ۱۰۰ درصد حل شدند. جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه Synergy™ (BioTek®, USA) اندازه‌گیری شد. نتایج به صورت درصد بقای سلولی نسبت به گروه کنترل بیان گردید. تمامی آزمایش‌ها حداقل در سه تکرار مستقل انجام شد.

آپوپتوز القا شده با H_2O_2 در hADSC

به منظور ایجاد مدل استرس اکسیداتیو، hADSCs با غلظت‌های مختلف H_2O_2 شامل ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰، ۷۰۰، ۸۰۰، ۹۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومولار به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس با استفاده از آزمون MTT منحنی دوز پاسخ ترسیم و غلظت نیمه بیشینه مهار رشد (IC_{50}) برای H_2O_2 تعیین شد. این غلظت در آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی اثرات محافظتی سلولی همین در برابر استرس

اکسیداتیو القا شده توسط H_2O_2

آزمون زنده‌مانی سلولی

اثر محافظتی همین با استفاده از آزمون MTT در شش گروه آزمایشی بررسی شد. سلول‌ها در پلیت ۹۶ خانه در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد پنی سیلین/استرپتومایسین کشت داده شدند. محلول‌های استوک همین و H_2O_2 به محیط کشت اضافه شدند به گونه‌ای که غلظت نهایی مورد نظر در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر هر چاهک حاصل گردید.

گروه‌های آزمایشی، گروه کنترل منفی، محیط کشت بدون Hemin و H_2O_2 ، گروه حلال، محیط کشت حاوی ۰٫۲ درصد DMSO، کنترل مثبت، H_2O_2 300 μM ، Hemin 20 μM ، Hemin 10 μM + H_2O_2 300 μM ، Hemin 25 μM + H_2O_2 300 μM و H_2O_2 300 μM بود. آزمایش‌ها در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و در سه تکرار مستقل انجام شدند.

رنگ آمیزی آکریلین اورنج/پروپیدیم یوید (Acridine Orange/Propidium Iodide; AO/PI)

برای ارزیابی آپوپتوز از رنگ آمیزی AO/PI استفاده شد. AO سلول‌های زنده را به رنگ سبز و PI سلول‌های دارای غشای آسیب دیده را به رنگ قرمز نشان می‌دهد. پس از تیمار در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، سلول‌ها فیکس شده و با محلول AO/PI (PI: 0.5 $\mu g/mL$ ، AO: 5 $\mu g/mL$) رنگ آمیزی شدند و با میکروسکوپ فلورسانس بررسی گردیدند. درصد سلول‌های آپوپتوتیک از نسبت تعداد سلول‌های آپوپتوتیک به کل سلول‌های شمارش شده محاسبه شد.

بررسی بیان ژن با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با رونویسی معکوس کمی (Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction; qRT-PCR)

استخراج RNA

استخراج RNA کل با استفاده از کیت RNX-Plus (سیناژن، تهران، ایران) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. کیفیت و خلوص RNA با استفاده از دستگاه NanoDrop ارزیابی گردید (۸).

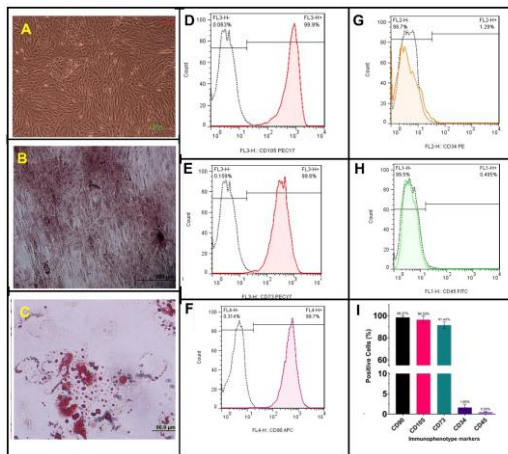
پرایمرها

پرایمرهای اختصاصی ژن *HMOX1* و *GAPDH* (به عنوان ژن مرجع) با استفاده از نرم افزار Primer-BLAST طراحی و توسط شرکت CinnaGen (تهران، ایران) سنتز شدند. توالی پرایمرها در جدول شماره ۱، آمده است.

جدول شماره ۱: توالی پرایمرها

Primer name	Sequence 5' - 3'	Tm (°C)
GAPDH	CGTGAAGGACTCATGACCA	59.39
Forward primer		
GAPDH	AGGCAGGGATGATGTTCTGG	59.45
Reverse primer		
HMOX1	CAACAAAGTGCAAGATTCTGCC	59.34
Forward primer		
HMOX1	AGTGTAAAGACCCATCGGAG	59.79
Reverse primer		

آدیوسیت‌ها و استئوبلاست‌ها در محیط‌های آدیپوژنیک و استئوژنیک تأیید شد، به طوری که قطرات چربی و کلونی‌های استخوانی به ترتیب با رنگ آمیزی آلیزارین و اوایل رد مشاهده شدند (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: ویژگی‌های سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی انسان (hADSCs): A: در پاساژ چهارم سلول‌های hADSCs ظاهر سلول‌ها مشابه فیبروبلاست‌ها به شکل دو کی، کشیده و پهن مشاهده گردید. B: تمایز استئوژنیک hADSCs که با رنگ آمیزی Alizarin Red نشان داده شده است، C: تمایز آدیپوژنیک hADSCs که با رنگ آمیزی Oil Red O مشخص شده است. D-F: تحلیل فلوسایتومتری بیان مارکرهای سطحی بر روی hADSCs، I: درصد میانگین مارکرهای سطحی، با انحراف معیار $\pm$ میانگین از سه آزمایش مستقل (n = 3) نشان داده شده است.

اثر سمیت سلولی همین بر hADSCs

با استفاده از آزمون MTT، اثر همین بر سمیت سلولی hADSCs بررسی شد. پیش تیمار hADSCs با ۱۰۰ میکرومول همین به مدت ۲۴ ساعت، بقای سلولی را به طور قابل توجهی نسبت به گروه کنترل کاهش داد ($P < 0.004$). هم چنین پیش تیمار با ۵۰ و ۱۰۰ میکرومول همین به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت، کاهش قابل توجهی در بقای سلولی ایجاد کرد ($P < 0.0001$). در مقابل، پیش تیمار با ۱۰، ۲۰ و ۲۵ میکرومول همین در همان بازه‌های زمانی تأثیر معنی داری بر بقای سلول‌ها نداشت. بنابراین، آزمایش‌های بعدی با دوزهای غیرسمی همین (۱۰، ۲۰ و ۲۵ میکرومول) انجام شد (تصویر شماره ۲).

سنتز cDNA و Real-time PCR

سنتز رشته اول cDNA با استفاده از کیت SinaClon First Strand cDNA Synthesis انجام شد. واکنش Real-time PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل، ۲ میکرولیتر cDNA، ۳ میکرولیتر پرایمر، ۵ میکرولیتر آب دو بار تقطیر (DDW) و ۱۰ میکرولیتر محلول RealQ (AMPLIQON, Cat. No.: A325402) Plus 2x Master Mix Green انجام شد. فرآیند تقویت با دستگاه ABI 7300 Real-Time PCR مطابق دستورالعمل کارخانه انجام گرفت. بیان نسبی ژن *HMOX1* نسبت به ژن *GAPDH* نرمال‌سازی شد و داده‌ها با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ تحلیل شدند (۹).

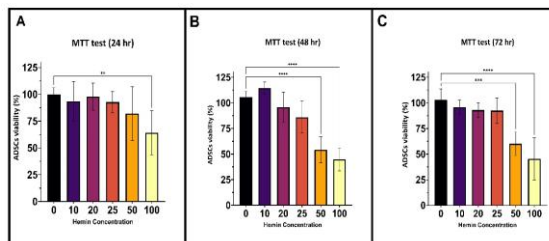
داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شدند. داده‌های دارای توزیع نرمال با استفاده از تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون Tukey پس از تحلیل (post hoc) مقایسه و بررسی شدند. برای داده‌های غیرپارامتری، از آزمون U من-ویتی استفاده شد. مقادیر P کم‌تر از ۰/۰۵ نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شدند.

یافته‌ها

نتایج حاصل از تعیین هویت hADSCs

پس از سه روز hADSCs در کشت مشاهده شدند و مورفولوژی دوکی و شبه فیبروبلاست آن‌ها با میکروسکوپ نوری معکوس تأیید شد. فلوسیتومتری پاساژ چهارم بیان بالای مارکرهای مزانشیمی (CD105، CD90 و CD73) و عدم بیان مارکرهای خونساز (CD34 و CD45) را نشان داد و خلوص سلول‌ها را تأیید کرد. پتانسیل چند توانی hADSCs نیز با تمایز آن‌ها به

بر اساس نتایج آزمون MTT، ۳۰۰ میکرومولار H_2O_2 باعث کاهش معنی دار بقای hADSCs در ۲۴ و ۴۸ ساعت ($P < 0.0001$) و ۷۲ ساعت ($P = 0.01$) نسبت به گروه کنترل و دارونما شد. همچنین، تیمار ترکیبی H_2O_2 + Hemin (۱۰، ۲۰ و ۲۵ میکرومولار هِمین همراه با ۳۰۰ میکرومولار H_2O_2) در ۲۴ ساعت بقای سلولی را به طور معنی داری نسبت به گروه کنترل و دارونما کاهش داد (همه $P < 0.05$)، اما نسبت به گروه سمی H_2O_2 موجب افزایش معنی دار بقای سلولی شد ($P < 0.0001$). هم تیماری سلول‌ها با ۱۰ و ۲۰ میکرومولار هِمین همراه با H_2O_2 در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت هم‌چنان کاهش معنی دار بقای سلولی را نسبت به گروه کنترل و دارونما نشان داد ($P < 0.05$) و در همان بازه زمانی اثر محافظتی قابل توجهی مشاهده نشد. در مقابل، پیش تیمار با ۲۵ میکرومولار هِمین در ۴۸ ساعت ($P < 0.0001$) و ۷۲ ساعت ($P = 0.01$)، به طور معنی داری اثرات سمی H_2O_2 را کاهش داده و بقای سلولی را افزایش داد، به گونه‌ای که میزان زنده‌مانی سلول‌ها در این گروه به سطح نزدیک به گروه کنترل و دارونما رسید و اختلاف معنی داری با آن‌ها مشاهده نشد. این یافته‌ها نشان دهنده اثر محافظتی هِمین در دوز ۲۵ میکرومولار در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت بود (تصویر شماره ۴).

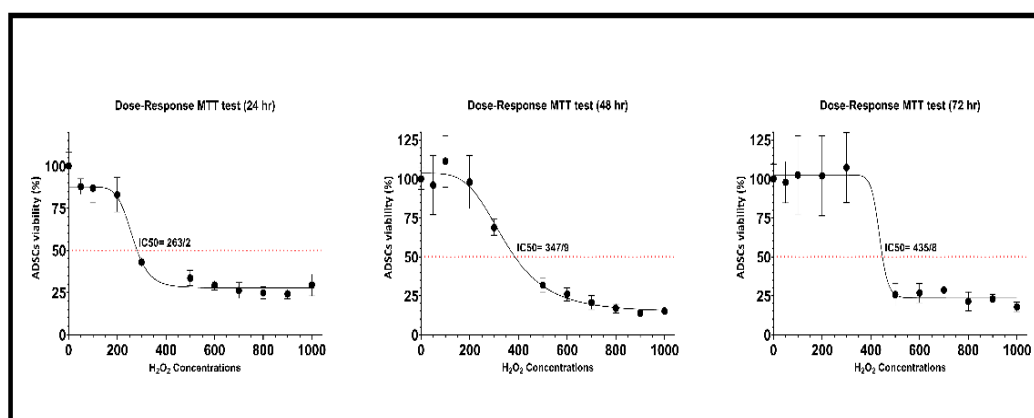


تصویر شماره ۲: اثر هِمین بر زنده‌مانی سلول‌های hADSCs با استفاده از آزمون MTT، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف هِمین به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. داده‌ها به صورت انحراف معیار $\pm$ میانگین ارائه شده و با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) مورد مقایسه قرار گرفتند، $P < 0.001$ ، *** $P < 0.001$ ، * $P < 0.05$

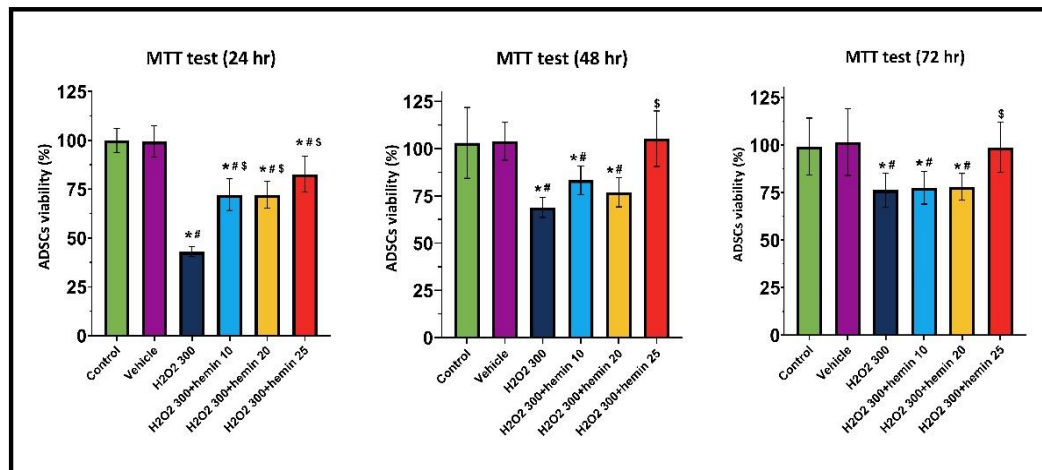
اثر سمیت سلولی H_2O_2 بر hADSCs

نتایج آزمون MTT نشان داد که H_2O_2 اثرات سمیت سلولی بر hADSCs دارد. مقدار IC_{50} H_2O_2 بر hADSCs در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب $25/94 \pm$ ، $347/9 \pm 35/67$ و $435/8 \pm 25/65$ میکرومول بود. بر این اساس، غلظت ۳۰۰ میکرومول H_2O_2 به عنوان غلظت سمی برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شد (تصویر شماره ۳).

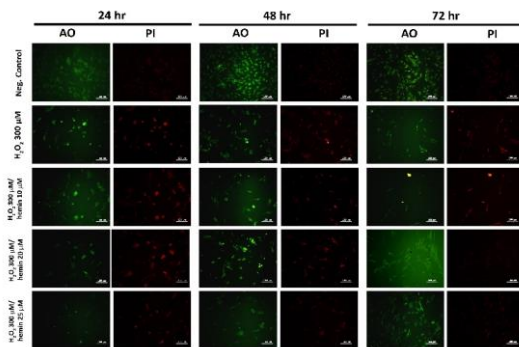
اثر محافظتی هِمین در برابر استرس اکسیداتیو ناشی از H_2O_2 آزمون بقای سلولی



تصویر شماره ۳: مقدار IC_{50} در سلول‌های hADSCs پس از تیمار با دوزهای مختلف H_2O_2 به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، داده‌ها به صورت انحراف معیار $\pm$ میانگین از سه آزمایش مستقل ($n=3$) ارائه شده‌اند.



تصویر شماره ۴: ارزیابی اثر محافظتی همین در مواجهه با H₂ O₂ در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از آزمون MTT، داده‌ها به صورت انحراف معیار ± میانگین ارائه شده‌اند. نمادها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری (P < ۰/۰۵) در مقایسه با گروه کنترل (*)، گروه حلال (#) و گروه ۳۰۰ میکرومولار H₂ O₂ (\$) می‌باشند.



تصویر شماره ۵: بررسی میزان آپوپتوز در سلول‌های hADSCs با استفاده از رنگ‌آمیزی AO/PI، سلول‌ها با دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۲۵ میکرومولار همین پس از مواجهه با دوز سمی H₂ O₂ به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. در این رنگ‌آمیزی، سلول‌های زنده به رنگ سبز و سلول‌های مرده به رنگ قرمز نمایش داده شدند.

افزایش معنی‌دار بیان ژن HMOX1 توسط همین

تصویر شماره ۶، بیان ژن HMOX1 را در گروه‌های مختلف نشان می‌دهد. تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که میانگین بیان ژن HMOX1 در برخی گروه‌ها در زمان‌های مشخص نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری دارد. اضافه شدن H₂ O₂ پس از ۲۴ ساعت باعث کاهش معنی‌دار بیان HMOX1 شد (P < ۰/۰۰۰۱)، در حالی که تیمار با ۲۵ میکرومولار همین پس از همان مدت، افزایش معنی‌داری در بیان ژن نسبت به گروه

تحلیل رنگ‌آمیزی AO/PI

داده‌های رنگ‌آمیزی AO/PI نشان داد که ۳۰۰ میکرومولار H₂ O₂ آپوپتوز را در hADSCs القا کرده و تعداد سلول‌ها با گذر زمان کاهش یافت. تصویر شماره ۵، نیز تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های آپوپتوتیک از جمله جمع‌شدگی، تراکم کروماتین، از دست رفتن شکل سلول و غیرعادی شدن غشای سلولی را در مقایسه با سلول‌های کنترل نشان داد. در سلول‌های تیمار شده با همین و H₂ O₂، بقای سلولی و مورفولوژی سلول بسته به زمان و غلظت متفاوت بود. در ۲۴ ساعت، دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۲۵ میکرومولار همین تغییر محسوسی در تعداد یا شکل سلول‌ها نسبت به گروه H₂ O₂ ایجاد نکردند.

پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت، ۱۰ میکرومولار همین قادر به بهبود بقای سلول‌ها نبود، در حالی که دوزهای ۲۰ و ۲۵ میکرومولار باعث کاهش سلول‌های مرده و افزایش تعداد سلول‌ها نسبت به گروه سمی H₂ O₂ شدند. مورفولوژی سلول‌ها در دوزهای ۲۰ و ۲۵ میکرومولار همین در ۴۸ و ۷۲ ساعت بهبود یافت و بیش‌ترین تعداد سلول‌های زنده در ۲۵ میکرومولار همین پس از ۷۲ ساعت مشاهده شد.

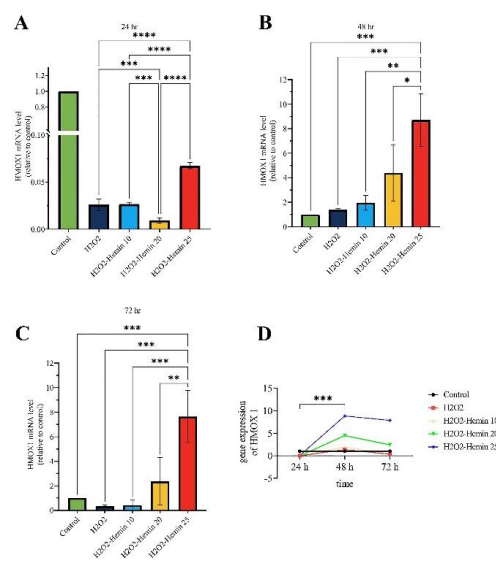
پتانسیل همین را به عنوان یک مداخله درمانی برای محافظت از hADSCs در برابر استرس اکسیداتیو برجسته می کند. علاوه بر این، شواهد نشان می دهد که اثرات محافظتی همین از طریق افزایش بیان HO-1، یک آنزیم آنتی اکسیدانی کلیدی، اعمال می شود که حفاظت سلولی در برابر استرس اکسیداتیو را تقویت می کند.

استفاده از سلول های بنیادی در پزشکی بازساختی، چشم انداز امیدوار کننده ای برای درمان بیماری های مختلف انسانی ارائه می دهد. با این حال، موانع و چالش هایی در کاربرد بالینی این رویکرد وجود دارد؛ به طور مثال، مطالعات نشان داده اند که در ساعات اولیه پس از پیوند، بخش قابل توجهی از سلول های پیوندی از بین می روند (۱۰). آپوپتوز سلولی می تواند توسط محرک های داخلی و خارجی از جمله پاسخ های التهابی، کمبود مواد مغذی، کاهش اکسیژن و گونه های فعال اکسیژن مانند H_2O_2 القا شود (۱۱). برای غلبه بر این محدودیت ها، استراتژی های مختلف پیش تیماری توسعه یافته اند که شامل اصلاح ژنتیکی سلول های بنیادی، تیمار با هورمون های رشد و مواد محافظ سلولی، و کشت سلول ها در داربست های زیستی خاص است (۴). تایج آزمون MTT نشان داد که غلظت های کم تر

از ۵۰ میکرومولار همین اثر محافظتی سلولی دارند. پیش تیمار hADSCs با ۱۰، ۲۰ و ۲۵ میکرومولار همین در برابر ۳۰۰ میکرومولار H_2O_2 موجب افزایش بقای سلول ها و تکثیر آن ها شد. یافته های Deng و همکاران نشان داد که پیش تیمار سلول های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان با همین در محدوده ۱-۲۵ میکرومولار، بقای سلول ها را افزایش داده و اثرات محافظتی قلبی در مدل انفارکتوس میوکارد ایجاد می کند، به طوری که قوی ترین اثر محافظتی در دوز ۱۰ میکرومولار مشاهده شد. این اثر شامل افزایش بقای سلول، کاهش آپوپتوز کاردیومیوسیت ها و افزایش آنژیوژنز بود (۱۲).

به منظور بررسی مکانیسم های محافظتی همین تحت شرایط استرس اکسیداتیو، سطح بیان mRNA ژن HO-1

H_2O_2 ایجاد کرد ($P < 0.001$). پس از ۴۸ ساعت، تمام گروه های تیمار شده با غلظت های مختلف همین افزایش بیان ژن HMOX1 را نسبت به کنترل نشان دادند و این افزایش در گروه ۲۵ میکرومولار همین به طور معنی داری بالاتر بود ($\text{fold change} = 8.85 \pm 1.23$, $P = 0.005$). همچنین، پس از ۷۲ ساعت، تیمار با ۲۵ میکرومولار همین باز هم افزایش معنی دار بیان ژن HMOX1 نسبت به کنترل را نشان داد ($P = 0.007$, $\text{fold change} = 7.86 \pm 1.23$).



تصویر شماره ۱: بیان نسبی ژن HMOX1، محور Y تغییرات نسبی با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ را نشان می دهد. سطوح HMOX1 در اثر درمان با سه غلظت همین پس از ۲۴ ساعت (a)، ۴۸ ساعت (b) و ۷۲ ساعت (c) افزایش می یابد، تأثیر مدت زمان درمان با همین بر بیان ژن HMOX1 نشان داده شده است. $P < 0.001$ ، $P < 0.01$ ، $P < 0.05$ ، ***

بحث

این مطالعه تأثیر همین بر بیان ژن HMOX1 را به عنوان یک رویکرد محافظتی برای hADSCs در برابر استرس اکسیداتیو بررسی کرده است. یافته های مطالعه حاضر نشان می دهد که تیمار با همین به طور معنی داری بقای سلول ها را افزایش داده و آپوپتوز آن ها را در مواجهه با H_2O_2 کاهش می دهد، که این موضوع

مورد ارزیابی قرار گرفت. بیش‌ترین افزایش بیان *HO-1* در دوز ۲۵ میکرومولار همین مشاهده شد که نشان می‌دهد همین می‌تواند اثرات محافظتی سلولی خود را از طریق القای بیان *HO-1* اعمال کرده و در کاهش استرس اکسیداتیو نقش داشته باشد. مطالعات متعدد حیوانی نشان داده‌اند که *HO-1* به‌عنوان آنزیم محدود کننده سرعت در مسیر تجزیه هم، نقش کلیدی در حفاظت سلولی در برابر استرس اکسیداتیو و التهاب ایفا می‌کند (۱۳). عملکرد اصلی *HO-1* شامل کاتالیز تجزیه اکسیداتیو هم به بیلوردین، مونواکسیدکربن و آهن آزاد است؛ به‌طوری که بیلوردین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی قادر به حذف رادیکال‌های پروکسیل بوده و مونواکسیدکربن نیز دارای خواص ضدآپوپتوز و ضدالتهابی می‌باشد (۱۴).

مطالعات همچنین نشان داده‌اند که اثرات محافظتی و ضد آپوپتوز همین از طریق فعال‌سازی ژن *HMOX1* اعمال می‌شود (۵). به‌عنوان مثال، پیش‌تیمار آستروسیت‌ها با همین در شرایط استرس اکسیداتیو در مغز اثر محافظتی دارد. مطالعات دیگر نشان داده‌اند که افزایش بیان *HO-1* توسط همین می‌تواند از آتروفی عضلانی ناشی از سپسیس در موش‌ها جلوگیری کند، از کلستاز حاد ناشی از استرس اکسیداتیو در رت‌ها محافظت کند و آسیب بافت‌های دیگر را کاهش دهد.

مطالعات همچنین نشان داده‌اند که ویژگی‌های سیتوپروتکتیو همین از طریق بیان *HO-1* اعمال می‌شود. برای مثال، پیش‌شرطی‌سازی آستروسیت‌ها با همین با القای ژن *HMOX1* اثر محافظتی سلولی در برابر استرس اکسیداتیو در مغز ایجاد می‌کند (۱۵). Yu و همکاران گزارش کردند که افزایش بیان *HO-1* توسط همین، آتروفی عضلانی القا شده توسط سپسیس را در موش‌ها کاهش می‌دهد (۱۶). همچنین مارتین و همکاران نشان دادند که فعال‌سازی *HO-1* به‌واسطه همین، از بروز کلستاز حاد ناشی از استرس اکسیداتیو در موش‌های صحرایی محافظت می‌کند (۱۷).

محیط‌های سیتوتوکسیک در شرایط آزمایشگاهی (*in vitro*) و درون‌تنی (*in vivo*) موجب القای آپوپتوز در سلول‌های بنیادی پس از پیوند می‌شوند، بنابراین، مهار آپوپتوز می‌تواند راهکاری مناسب برای افزایش اثربخشی سلول درمانی باشد (۱۱). در مطالعه حاضر، ویژگی‌های سلولی مشاهده شده در رنگ‌آمیزی دوگانه AO/PI اثرات محافظتی و مهارکننده آپوپتوز همین را تأیید کردند. در غلظت‌های ۲۰ و ۲۵ میکرومولار، سلول‌های فلورسنت هیچ‌گونه ناهنجاری مورفولوژیک، برجستگی غشایی (*membrane blebbing*)، تراکم کروماتین یا تغییر رنگ از سبز به قرمز را نشان ندادند که بیانگر عدم وقوع آپوپتوز زودرس است. با این حال، بیش‌ترین درصد سلول‌های زنده در تیمار با ۲۵ میکرومولار همین پس از ۷۲ ساعت مشاهده شد (تصویر شماره ۵).

مطالعات متعددی نشان داده‌اند که اثرات محافظت کننده سلولی و ضدآپوپتوزی همین از طریق فعال‌سازی ژن *HMOX1* اعمال می‌شود. اشمای و همکاران گزارش کردند که همین با افزایش بیان *HMOX1* در بافت کلیه، تحت شرایط استرس اکسیداتیو دارای اثرات نفروپروتکتیو و ضدآپوپتوزی است (۱۸). بای و همکاران نشان دادند که درمان با همین (۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، تزریق داخل صفاقی) با جلوگیری از مرگ کراتینوسیت‌ها و کاهش نفوذ نوتروفیل‌ها در پوست، از آسیب پوستی القا شده توسط UVB پیشگیری می‌کند (۱۹). عبدالحمید و همکاران دریافتند که تیمار با همین می‌تواند استرس سلولی ناشی از استروژن و پروژسترون را کاهش داده و از طریق تعدیل مسیرهای NF-κB و Nrf2/HO-1 از بروز هیپرپلازی غده پستانی جلوگیری کند (۲۰). همچنین Han و همکاران نشان دادند که همین با افزایش بیان *HO-1*، از آسیب قلبی ناشی از کم‌اکسیژنی متناوب محافظت می‌کند؛ اثری که از طریق مهار قطعه‌قطعه شدن میتوکندری و مرگ کاردیومیوسیت‌ها اعمال می‌شود (۲۱). بر این اساس، افزایش بیان *HMOX1* توسط همین می‌تواند راهبردی

امیدبخش برای افزایش مقاومت hADSCs در برابر استرس اکسیداتیو و ارتقای پتانسیل درمانی آن‌ها در کاربردهای پزشکی بازساختی باشد.

یافته‌های این مطالعه پیامدهای بالینی مهمی برای به‌کارگیری hADSCs در پزشکی بازساختی و مهندسی بافت دارد. استرس اکسیداتیو یکی از چالش‌های شایع در طی فرایند پیوند یا جای‌گیری سلول‌های بنیادی در بافت‌های آسیب دیده یا بیمار محسوب می‌شود (۲۲). توانایی محافظت از hADSCs در برابر استرس اکسیداتیو از طریق مداخلات دارویی مانند همین می‌تواند به‌طور قابل توجهی بقای سلولی، جای‌گیری پیوندی (Engraftment) و اثربخشی درمانی آن‌ها را در محیط‌های بالینی بهبود بخشد.

علاوه بر این، درک مکانیسم‌های مولکولی اثرات محافظتی همین بر hADSCs می‌تواند زمینه‌ساز توسعه رویکردهای هدفمند برای ارتقای درمان‌های مبتنی بر

سلول‌های بنیادی در طیف وسیعی از بیماری‌ها و آسیب‌ها باشد. به‌طور کلی، اگر چه یافته‌های مطالعه حاضر اثرات محافظت‌کننده سلولی و ضدآپوپتوزی همین را در شرایط استرس‌زا نشان داد، اما پیش از توصیه همین به‌منظور تقویت و بهبود سلول درمانی در انسان، انجام مطالعات بیش‌تر آزمایشگاهی، درون‌تنی و پیش‌بالینی برای بررسی و پایش بقای hADSCs پس از پیوند، با یا بدون تیمار همین، ضروری است.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از نتایج پایان‌نامه انجام شده با کد ۳۶۵ در گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان است. بدین‌وسیله نویسندگان مراتب قدردانی و سپاس صمیمانه خود را از همکاری ارزشمند اعضای محترم گروه علوم تشریح ابراز می‌دارند.

References

- 1- Musiał-Wysocka A, Kot M, Majka M. The pros and cons of mesenchymal stem cell-based therapies. *Cell Transplant* 2019; 28(7): 801-12. PMID: PMC671950.
- 2- Tabatabaei Qomi R, Sheykhasan M, Kalaher N, Ghiathi M. Chondrogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells using a fibrin hydrogel scaffold. *J Mazand Univ Med Sci* 2015; 25(123): 21-31. (Persian)
- 3- Seo Y, Shin T-H, Kim H-S. Current strategies to enhance adipose stem cell function: an update. *Int J Mol Sci* 2019; 20(15): 3827. PMID: PMC6696067.
- 4- Li M, Jiang Y, Hou Q, Zhao Y, Zhong L, Fu X. Potential pre-activation strategies for improving therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells: current status and future prospects. *Stem Cell Res Ther* 2022; 13(1): 146. PMID: PMC8981790.
- 5- Estarreja J, Caldeira G, Silva I, Mendes P, Mateus V. The Pharmacological Effect of Hemin in Inflammatory-Related Diseases: Protocol for a Systematic Review. *JMIR Res Protoc* 2023; 12(1): e48368. PMID: PMC10690530.
- 6- Abraham NG, Kappas A. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Rev* 2008; 60(1): 79-127. PMID: 18323402.
- 7- Donnelly LE, Barnes PJ. Expression of heme oxygenase in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 24(3): 295-303. PMID: 11245628.
- 8- Mohammadloo A, Asgari Y, Esmaeili-Bandboni A, Mazloomi MA, Ghasemi SF, Ameri S, et al. The Potential of Circulating

- miR-193b, miR-146b-3p and miR-483-3p as Noninvasive Biomarkers in Cutaneous Melanoma Patients. *Mol Biotechnol* 2024; 66(10): 2830-40. PMID: 37934389.
- 9- Sharifzadeh M, Esmaili-Bandboni A, Emami MR, Naeini F, Zarezadeh M, Javanbakht MH. The effects of all trans retinoic acid, vitamin D3 and their combination on plasma levels of miRNA-125a-5p, miRNA-34a, and miRNA-126 in an experimental model of diabetes. *Avicenna J Phytomed* 2022; 12(1): 67-78. PMID: PMC8801211.
- 10- Sart S, Ma T, Li Y. Preconditioning stem cells for in vivo delivery. *Biores Open Access* 2014; 3(4): 137-49. PMID: PMC4120806.
- 11- Shekarchi S, Roushandeh AM, Roudkenar MH, Bahadori MH. Dimethyl fumarate prevents cytotoxicity and apoptosis mediated by oxidative stress in human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Mol Biol Rep* 2021; 48(9): 6375-85. PMID: 34426902.
- 12- Deng R, Liu Y, He H, Zhang H, Zhao C, Cui Z, et al. Haemin pre-treatment augments the cardiac protection of mesenchymal stem cells by inhibiting mitochondrial fission and improving survival. *J Cell Mol Med* 2020; 24(1): 431-40. PMID: PMC6933414.
- 13- Grochot-Przeczek A, Dulak J, Jozkowicz A. Haem oxygenase-1: non-canonical roles in physiology and pathology. *Clin Sci (Lond)* 2012; 122(3): 93-103. PMID: 21992109.
- 14- Ryter SW, Morse D, Choi AM. Carbon monoxide and bilirubin: potential therapies for pulmonary/vascular injury and disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36(2): 175-82. PMID: PMC2176112.
- 15- Sheng WS, Hu S, Nettles AR, Lokensgard JR, Vercellotti GM, Rock RB. Hemin inhibits NO production by IL-1 β -stimulated human astrocytes through induction of heme oxygenase-1 and reduction of p38 MAPK activation. *J Neuroinflammation* 2010; 7: 51. PMID: 20822529.
- 16- Yu X, Han W, Wang C, Sui D, Bian J, Bo L, et al. Upregulation of Heme Oxygenase-1 by hemin alleviates sepsis-induced muscle wasting in mice. *Oxid Med Cell Longev* 2018; 2018: 8927104. PMID: PMC6250022.
- 17- Martín PL, Ceccatto P, Razori MV, Francés DE, Arriaga SM, Pisani GB, et al. Heme oxygenase-1 induction by hemin prevents oxidative stress-induced acute cholestasis in the rat. *Clin Sci (Lond)* 2019; 133(1): 117-34. PMID: 30538149.
- 18- El-Ashmawy NE, Al-Ashmawy GM, Farag AA, Ibrahim AO. Hemin versus erythropoietin: Possible role in Nrf2/HO-1 signaling pathway in rats with nephrotoxicity. *Biomed Pharmacother* 2022; 156: 113971. PMID: 36411647.
- 19- Bai F, Fan C, Lin X, Wang H-Y, Wu B, Feng C-L, et al. Hemin protects UVB-induced skin damage through inhibiting keratinocytes apoptosis and reducing neutrophil infiltration. *J Photochem Photobiol B* 2023; 238: 112604. PMID: 36525776.
- 20- Abdel-Hamid HA, Marey H, Ibrahim MFG. Hemin protects against cell stress induced by estrogen and progesterone in rat mammary glands via modulation of Nrf2/HO-1 and NF- κ B pathways. *Cell*

- Stress Chaperones 2023; 28(3): 289-301. PMID: 36930344.
- 21- Han Q, Li G, Ip MS, Zhang Y, Zhen Z, Mak JC, et al. Haemin attenuates intermittent hypoxia-induced cardiac injury via inhibiting mitochondrial fission. J Cell Mol Med 2018; 22(5): 2717-26. PMCID: PMC5908095.
- 22- Ma Z, Ding J, Wang Y, Zhang T, Chen G, Huang J. Study of platelet-rich fibrin promoting endothelial cell differentiation and angiogenesis induced by transplantation of adipose-derived stem cells. Acta Histochem 2023; 125(6): 152059. PMID: 37329849.