Archive of SID

Journal of North Khorasan Medical Sciences
No 44, Volume 11, Issue 4

Research Article

Evaluating the Viability of Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells in Diabetic Culture Media Model

Ahmad Ghorbani [1,*]

[1] Pharmacological Research Center of Medicinal Plants, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran
* **Corresponding author:** Ahmad Ghorbani, Pharmacological Research Center of Medicinal Plants, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. E-mail: ghorbania@mums.ac.ir

DOI: 10.29252/nkjmd-11042

How to Cite this Article:
Ghorbani A. Evaluating the Viability of Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells in Diabetic Culture Media Model. *J North Khorasan Univ Med Sci*. 2020;**11**(4):9-13. DOI: 10.29252/nkjms-11042

Received: 04 May 2019
Accepted: 01 Sep 2019
Keywords:
Stem Cells
Glucose
Diabetes
Oxidative Stress
Ischemia
© 2020 North Khorasan Medical Sciences

Abstract

Introduction: In diabetes mellitus, stem cells are exposed to inappropriate conditions such as an increase of glucose in extracellular space, oxidative stress, and deprivation from growth factors (following ischemia). This study was aimed to evaluate the effect of these conditions on stem cells.

Methods: Stem cells were isolated from subcutaneous adipose tissue of rats. The cells were maintained for 24 h in culture medium containing 25-50 mM glucose to simulate hyperglycemic condition. For the induction of the ischemic model, the cells were incubated for 12-36 h with the medium deprived of glucose- and growth factors. To induce oxidative stress, H_2O_2 was added at concentrations of 100-800 µM to the medium of the cells for 24 h. The cell viability was determined using the Thiazolyl blue Tetrazolium Bromide assay.

Results: The increase in the glucose of culture medium from 25 mM to 50 mM did not affect the viability of stem cells. The percent of viable cells was significantly decreased after 12, 24, and 36 h incubation with glucose- and growth factors-free medium ($P < 0.05$). Concentrations of 400 and 800 µM of H_2O_2 significantly decreased the percent of viable cells ($P < 0.01$). The increase in the glucose of culture medium did not further enhance H_2O_2 cytotoxicity.

Conclusions: In a short time, stem cells are more vulnerable to oxidative stress and deprivation from glucose and growth factors compared to glucotoxicity. Therefore, reactive oxygen radicals and blood flow disorders are of the main causes of stem cell damage and, as a result, reduced tissue regeneration in diabetes.

Copyright *© 2020 The Author(s); Published by Journal of North Khorasan Medical Sciences. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.*

www.SID.ir

Archive of SID

مجله علوم پزشکی خراسان شمالی
دوره ۱۱، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۸

مقاله پژوهشی

ارزیابی زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی در محیط کشت شبیه‌سازی شده دیابت

احمد قربانی [۱،*]

[۱] دانشیار پژوهش، دکتری تخصصی فیزیولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات فارماکولوژی گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

[*] **نویسنده مسئول:** احمد قربانی، دانشیار پژوهش، دکتری تخصصی فیزیولوژی پزشکی، مرکز تحقیقات فارماکولوژی گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران. ایمیل: ghorbania@mums.ac.ir

DOI: 10.29252/nkjms-110402

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۲/۱۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۱۰
واژگان کلیدی:
سلول بنیادی
گلوکز
دیابت
استرس اکسیداتیو
ایسکمی

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی محفوظ است.

چکیده

مقدمه: در دیابت سلول‌های بنیادی با شرایط نامساعد بافتی مواجهه هستند که برخی از آنها عبارتند از غلظت بالای گلوکز در خارج سلول، استرس اکسیداتیو و محرومیت از فاکتورهای رشد (متعاقب ایسکمی). هدف از این مطالعه بررسی تأثیر این شرایط بر سلول‌های بنیادی است.

روش‌کار: سلول‌های بنیادی از بافت چربی زیرجلدی موش‌های صحرایی جدا گردید. برای شبیه سازی حالت هیپرگلیسمی، سلول‌ها ۲۴ ساعت در محیط کشت حاوی ۵۰-۲۵ mM گلوکز نگهداری شدند. برای ایجاد مدل ایسکمی، سلول‌ها برای ۱۲ الی ۳۶ ساعت در محیط فاقد گلوکز و فاکتورهای رشد تیمار شدند. به منظور القای استرس اکسیداتیو، H_2O_2 با غلظت ۸۰۰-۱۰۰ µM برای ۲۴ ساعت به محیط سلول‌ها اضافه شد. زنده‌مانی سلول‌ها با آزمون تیازولیل بلو تترازولیوم تعیین گردید.

یافته‌ها: افزایش گلوکز محیط از ۲۵ mM به ۵۰ mM اثری بر زنده‌مانی سلول‌های بنیادی نداشت. درصد سلول‌های زنده پس از ۱۲، ۲۴ و ۳۶ ساعت مجاورت با محیط فاقد گلوکز و فاکتورهای رشد کاهش یافت ($P < ۰/۰۵$) غلظت‌های ۴۰۰ µM و ۸۰۰ µM از H_2O_2 درصد سلول‌های زنده را کاهش داد ($P < ۰/۰۵$). افزایش غلظت گلوکز محیط کشت سمیت سلولی ناشی از H_2O_2 را افزایش نداد.

نتیجه گیری: سلول‌های بنیادی در کوتاه مدت به استرس اکسیداتیو و محرومیت از گلوکز و فاکتورهای رشد حساس‌تر از سمیت ناشی از گلوکز زیاد هستند. بنابراین، رادیکال‌های آزاد اکسیژن و اختلالات خونرسانی از علل اصلی آسیب سلول‌های بنیادی و لذا کاهش‌ترمیم بافتی در دیابت است.

مقدمه

امروزه تحقیقات روی سلول‌های بنیادی برای درمان دیابت و عوارض ناشی از آن نظیر آسیب کلیوی، اختلالات عصبی و سکته‌های قلبی و مغزی بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است [۱]. هیپرگلیسمی طولانی مدت از علل اصلی زمینه ساز این عوارض محسوب می‌شود. در دیابت، مجاورت سلول‌ها با گلوکز زیاد سبب تغییرات شدید داخل سلولی نظیر تجمع سوربیتول، افزایش ترکیبات گلیکوزیله نهایی (Advanced Glycation End-product)، بیان فاکتورهای التهابی و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن می‌گردد [۲]. مجموعه‌ی این تغییرات موجب اختلالات عروقی میکروسکوپی و ماکروسکپی می‌شود که نتیجه ی آنها ایسکمی بافتی و مرگ سلولی است [۲, ۳].

یکی از محدودیت‌های استفاده از سلول‌های بنیادی برای درمان عوارض دیابت این است که پس از پیوند این سلول‌ها، تعداد زیادی از آنها به علت قرار گرفتن در شرایط نامساعد بافتی (مانند هیپرگلیسمی، هیپوکسی و استرس اکسیداتیو) دچار مرگ برنامه ریزی شده می‌گردند و یا توانایی تمایز خود را از دست می‌دهند [۴, ۵]. به عنوان مثال دیابت توانایی رگ‌زایی سلول‌های بنیادی قلبی را کاهش داده و ترمیم قلب توسط این سلول‌ها را تضعیف می‌کند [۶]. همچنین گزارش شده است که در اثر دیابت سلول‌های بنیادی مزانشیمی در محل شکستگی استخوان دچار مرگ برنامه ریزی شده می‌گردند و توانایی تکثیر آنها کاهش می‌یابد [۷]. علاوه بر این، در بافت‌هایی که دچار ایسکمی شده‌اند (مانند قلب) ممکن است تا ۹۹٪ از سلول‌های بنیادی پیوند شده طی چند روز نخست از بین بروند [۸]. این مرگ سلول‌های بنیادی فارغ از واکنش سیستم ایمنی است و اغلب در اثر فرآیندهای القاء کننده ی آپوپتوز نظیر استرس اکسیداتیو روی می‌دهد [۸-۱۰].

شناسایی عوامل مؤثر بر مرگ سلول‌های بنیادی در بافت‌های دیابتی می‌تواند به یافتن راه حل‌های پیشگیرانه کمک کند. با در نظر گرفتن آسیب شناسی دیابت، می‌توان پیش‌بینی کرد که سلول‌های بنیادی با مجموعه‌ای از شرایط نامساعد بافتی مواجهه هستند که برخی از آنها عبارتند از غلظت بالای گلوکز در محیط خارج سلولی، استرس اکسیداتیو، افزایش فاکتورهای التهابی و محرومیت از فاکتورهای رشد

Copyright *© 2020 The Author(s); Published by Journal of North Khorasan Medical Sciences. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.*

www.SID.ir

Archive of SID

(متعاقب ایسکمی). هدف از این مطالعه بررسی تأثیر هر یک از شرایط مذکور به صورت جداگانه یا همزمان با هم بر میزان مرگ سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از بافت چربی موش صحرایی می‌باشد.

روش‌کار

حیوانات مورد آزمایش: موش‌های صحرایی نر از نژاد Wister با محدوده وزنی ۲۰۰ الی ۲۵۰ گرم از مرکز تحقیقات حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی مشهد تهیه شدند. حیوانات با رژیم غذایی استاندارد (تهیه شده از شرکت جوانه خراسان) و آب لوله کشی تغذیه و در محیط مناسب از نظر نور (۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) و درجه حرارت (۲ ± ۲۲ °C) نگهداری گردیدند. در سراسر مطالعه نکات اخلاقی مربوط به نگهداری و کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید (با کد اخلاق IR.MUMS.fm.REC.1395.618)

جداسازی سلول‌های بنیادی: حیوانات با استفاده از کتامین (mg/kg ۶۰) و زایلازین (mg/kg ۶) بی‌هوش شدند و مقداری از بافت چربی زیر جلدی ناحیه اینگوینال برداشته شد. در شرایط استریل، بافت‌ها به قطعات کوچک برش داده شد و چندین بار با محلول فسفات-بافر سالین شستشو انجام گردید. سپس قطعات بافتی به مدت ۹۰ دقیقه با آنزیم کلاژناز نوع ۱ در دمای ۳۷ °C تیمار شدند. بافت‌های هضم شده به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و لایه فوقانی که حاوی سلول‌های چربی بود دور ریخته شد. رسوب سلولی که حاوی سلول‌های بنیادی بود در فلاسک های حاوی محیط کشت استاندارد DMEM (دارای ۲۵ mM گلوکز و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی) کشت داده شدند [۱۱]. در پیش مطالعه انجام شده روی سلول‌های استخراج شده با این روش مشخص گردید که این سلول‌ها پس از پاساژ سوم از نظر مارکرهای CD90 و CD29 مثبت و از نظر مارکرهای CD45 و CD34 منفی بودند و همچنین قابلیت تمایز به رده‌های آدیپوسیت و اوستئوسیت را داشتند که تاییدی بر ماهیت بنیادی بودن آنها است.

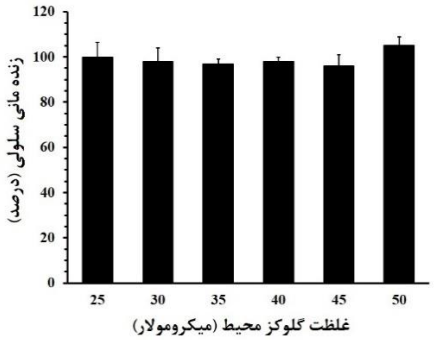
القای استرس سلولی مشابه دیابت: سلول‌های بنیادی پس از پاساژ سوم از فلاسک های کشت جداسازی و به پلیت های ۹۶ چاهک منتقل شدند (۵۰۰۰ سلول در هر چاهک). پس از اتصال سلول‌ها به بستر چاهک‌ها (۲۴ ساعت)، شرایط کشت آنها با روش‌های زیر تغییر داده شد: (۱) برای ایجاد مدل هیپرگلیسمی، محیط کشت استاندارد از چاهک‌ها تخلیه گردید و به جای آن محیط کشت با همان ویژگی اما حاوی گلوکز ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵ یا ۵۰ mM جایگزین گردید. سلول‌ها برای ۲۴ ساعت با این غلظت‌های گلوکز تیمار شدند. (۲) برای ایجاد مدل ایسکمی، محیط کشت استاندارد با محیط کشتDMEM فاقد گلوکز و فاقد فاکتورهای رشد (فاقد سرم) جایگزین گردید. سلول‌ها برای مدت ۱۲، ۲۴ یا ۳۶ ساعت در این شرایط تیمار شدند (۳). به منظور القای استرس اکسیداتیو، به محیط کشت استاندارد مقادیر ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ یا ۸۰۰ µM از H_2O_2 اضافه شد. سپس سلول‌ها برای مدت ۲۴ ساعت با H_2O_2تیمار شدند. (۴) برای ایجاد شرایط همزمان استرس اکسیداتیو و گلوکز زیاد، به محیط کشت سلول‌ها علاوه بر افزودن مقادیر ۳۰ الی ۵۰ mM گلوکز، مقادیر ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ یا ۸۰۰ µM از H_2O_2 نیز اضافه گردید. سلول‌ها برای مدت ۲۴ ساعت با H_2O_2 و گلوکز زیاد تیمار شدند. در هر ۴ آزمایش مذکور، سلول‌های کنترل در محیط کشت استاندارد یعنی DMEM دارای ۲۵ mM گلوکز و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی کشت داده شدند.

بررسی مرگ سلولی: پس از تیمار سلول‌ها در شرایط استرس زای مذکور، درصد سلول‌های زنده با روش احیاء نمک تترازولیوم معروف به روش MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium) تعیین شد. برای انجام این تست محلول MTT با غلظت ۵ mg/mL تهیه شد و ۲۰ µL از آن به هر یک از چاهک‌های پلیت های کشت اضافه گردید. پلیت های مذکور به مدت ۴ ساعت درون انکوباتور کشت سلولی نگهداری شدند و سپس محلول رویی هر چاهک برداشته شد و با ۲۰۰ میکرو لیتر محلول دی متیل سولفوکساید جایگزین گردید. میزان جذب نوری محلول رنگی درون هر چاهک در طول موج ۵۴۵ nm ثبت شد و درصد سلول‌های زنده‌ی درون هر چاهک نسبت به سلول‌های چاهک‌های کنترل محاسبه گردید [۱۲].

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌ها به نرم افزار SPSS منتقل و با روش آنالیز واریانس یک طرفه مقایسه شدند. از آزمون توکی برای مقایسه‌های چند گانه استفاده شد و نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند. مقدار p کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

اثر افزایش گلوکز محیط بر سلول‌های بنیادی: همان گونه که در شکل ۱ نشان داده شده است، افزایش غلظت گلوکز در محیط کشت از میزان ۲۵ mM (کنترل) به میزان ۳۰، ۳۵، ۴۰، ۴۵ و۵۰ mM در طی ۲۴ ساعت اثر معنی داری بر زنده‌مانی سلول‌های بنیادی نداشت.

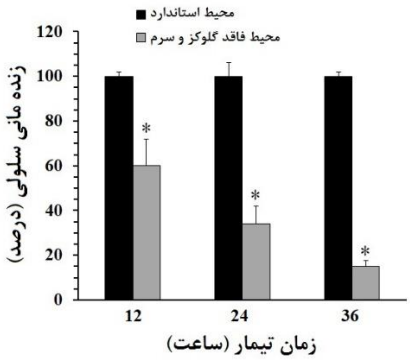


شکل ۱. اثر افزایش غلظت گلوکز محیط کشت بر زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی طی ۲۴ ساعت. مقادیر بر حسب میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است (n = ۶).

اثر محرومیت از گلوکز و فاکتورهای رشد بر سلول‌های بنیادی: درصد سلول‌های زنده پس از ۱۲، ۲۴ و ۳۶ ساعت مجاورت با محیط فاقد گلوکز و فاقد سرم جنین گاوی در مقایسه با سلول‌های کشت داده شده در محیط استاندارد به طور معنی داری کاهش یافت ($P < ۰/۰۵$) این کاهش زنده‌مانی سلول‌ها وابسته به زمان بود، به طوری که بیشترین کاهش درصد سلول‌های زنده در زمان ۳۶ ساعت اتفاق افتاد (شکل ۲).

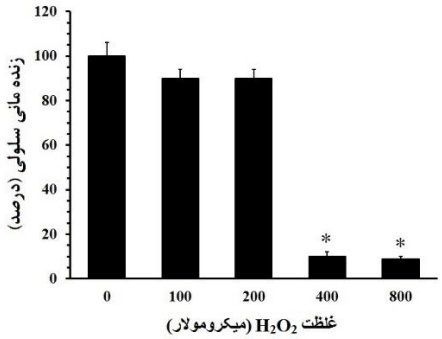
www.SID.ir

Archive of SID

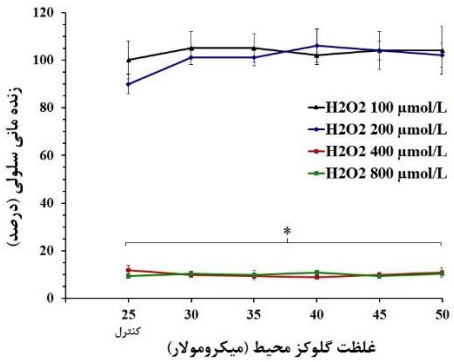


شکل ۲. اثر استرس ناشی از محرومیت گلوکز و فاکتورهای رشد بر زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی. مقادیر بر حسب میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است (n = ۶). علامت * نشان دهنده P < ۰/۰۵ نسبت به محیط کشت استاندارد در زمان مربوطه است.

اثر استرس اکسیداتیو ناشی از H_2O_2 بر سلول‌های بنیادی: شکل ۳ تأثیر H_2O_2 بر زنده‌مانی سلول‌ها را نشان می‌دهد. همان گونه که مشاهده می‌شود درصد سلول‌های زنده پس از مجاورت با غلظت‌های ۴۰۰ و ۸۰۰ µM از این ماده استرس زا به طور معنی داری کاهش می‌یابد (P > ۰/۰۱).



شکل ۳. اثر استرس اکسیداتیو القاء شده با H_2O_2 بر زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی. مقادیر بر حسب میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است (n = ۶). علامت * نشان دهنده P < ۰/۰۰۱ نسبت به غلظت صفر (کنترل) است.



شکل ۴. اثر همزمان افزایش غلظت گلوکز واسترس اکسیداتیو القاء شده با H_2O_2 بر زنده‌مانی سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی. مقادیر بر حسب میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است (n = ۶). علامت * نشان دهنده P < ۰/۰۰۱ نسبت به سلول‌های کشت شده در محیط استاندارد فاقد H_2O_2 (زنده‌مانی ۱۰۰٪) است.

اثر توام استرس اکسیداتیو و افزایش گلوکز محیط بر سلول‌های بنیادی:

همان گونه که در شکل ۴ نشان داده شده است، علارقم افزایش گلوکز محیط کشت، درصد مرگ سلول‌های بنیادی تنها در غلظت‌های ۴۰۰ و ۸۰۰ µM از H_2O_2 افزایش داشت. همچنین افزایش غلظت گلوکز از میزان ۲۵ mM (کنترل) تا میزان ۵۰ mM تاثیری بر سمیت سلولی H_2O_2 نداشت.

بحث

در بیماران دیابتی سلول‌های بنیادی مستقر در بافت و یا پیوند شده به بیمار در مواجهه با شرایط استرس زا نظیر غلظت زیاد گلوکز، آسیب اکسیداتیو و محرومیت از فاکتورهای رشد (در صورت بروز ایسکمی) قرار می‌گیرند. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر هر یک از شرایط مذکور بر میزان مرگ سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از بافت چربی موش صحرایی بود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که سلول‌های بنیادی به آسیب اکسیداتیو ناشی از H_2O_2 حساس هستند و این ماده از غلظت ۴۰۰ µM به بالا به شدت زنده‌مانی سلول‌ها را کاهش می دهد. به طور مشابه، گزارش شده است که H_2O_2 می‌تواند با الگوی وابسته به غلظت و وابسته به زمان موجب مرگ برنامه ریزی شده در سلول‌های بنیادی عصبی جنینی از مسیر سیگنالینگ PI3k-Akt گردد [۱۳]. نقش استرس اکسیداتیو در ایجاد عوارض دیابت به خوبی شناخته شده است. تجمع رادیکال‌های آزاد سبب پراکسیداسیون چربی‌های سلولی، تغییرات آنزیمی، اختلال متابولیسم گلوتاتیون و سایر آسیب‌های سلولی می‌شود که در نهایت آسیب DNA و مرگ برنامه ریزی شده سلولی را موجب می‌شود [۱۴, ۱۵].

افزایش مزمن قند خون در بیماران دیابتی از دلایل ایجاد آسیب اکسیداتیو و زمینه ساز عوارض دیابت است. از جمله اختلالات داخل سلولی ناشی از هیپرگلیسمی می‌توان به افزایش ترکیبات گلیکوزیله نهایی، تجمع سوربیتول، بیان فاکتورهای التهابی، تحریک مسیر هگزوزآمین و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن اشاره کرد. نتیجه‌ی این اثرات تغییر در بیان ژن‌ها، آسیب DNA و مرگ سلولی است [۲, ۱۶].

در این مطالعه، بررسی اثر افزایش غلظت گلوکز محیط کشت بر سلول‌ها نشان داد که برخلاف انتظار ما افزایش گلوکز به میزان دو برابر (از ۲۵ تا ۵۰ mM) موجب مرگ سلول‌های بنیادی نشد. همچنین این میزان از افزایش گلوکز تاثیری بر سمیت ناشی از H_2O_2 (در ۴ غلظت تست شده) نداشت. البته یکی از محدودیت‌های این پژوهش این بود که طول مدت مجاورت با محیط دارای گلوکز زیاد تنها ۲۴ ساعت بود، در حالی که در دیابت معمولاً آسیب ناشی از هیپرگلیسمی در طولانی مدت روی می‌دهد. بنابراین بهتر است تأثیر افزایش گلوکز بر سلول‌های بنیادی در مطالعات آتی مورد بررسی قرار گیرد.

بر اساس نتایج این مطالعه، محرومیت سلول‌ها از گلوکز و فاکتورهای رشد به طور وابسته به زمان زنده‌مانی سلول‌ها را کاهش داد، به گونه‌ای که پس از ۳۶ ساعت حدود ۸۵ درصد از سلول‌ها از بین رفتند. کشت سلول‌ها در محیط فاقد گلوکز و سرم یک مدل برون تنی برای شبیه سازی شرایط ایسکمی است [۱۷, ۱۸]. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که اختلالات خونرسانی در نتیجه‌ی تصلب شرایین از عوامل اصلی آسیب به سلول‌های بنیادی است و این می‌تواند یکی از دلایل کاهش قابلیت ترمیم بافتی در دیابت باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه‌گیری

بر اساس این نتایج به طور خلاصه می‌توان گفت که در کوتاه مدت سلول‌های بنیادی مزانشیمی نسبت به آسیب ناشی از استرس اکسیداتیو و آسیب ناشی از محرومیت گلوکز و فاکتورهای رشد، حساس‌تر از آسیب ناشی از گلوکز زیاد هستند. بنابراین، به نظر می‌رسد که استرس اکسیداتیو و اختلالات خونرسانی از علل اصلی از دست رفتن سلول‌های بنیادی و لذا کاهش قدرت‌ترمیم بافتی در دیابت است.

سپاس‌گزاری

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد به خاطر تأمین هزینه این مطالعه تشکر و قدردانی می‌گردد (کد طرح: ۹۵۰۷۷۶ و کد اخلاق IR.MUMS.fm.REC.1395.618).

References

1. Path G, Perakakis N, Mantzoros CS, Seufert J. Stem cells in the treatment of diabetes mellitus - Focus on mesenchymal stem cells. Metabolism. 2019;90:1-15. **doi:** 10.1016/j.metabol.2018.10.005 **pmid:** 30342065
2. Díaz-Flores M, Baiza-Gutman LA. Biochemical Mechanisms of Vascular Complications in Diabetes. The Diabetes Textbook: Springer; 2019.
3. Rask-Madsen C, King GL. Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. Cell Metab. 2013;17(1):20-33. **doi:** 10.1016/j.cmet.2012.11.012 **pmid:** 23312281
4. Yan J, Tie G, Wang S, Messina KE, DiDato S, Guo S, et al. Type 2 Diabetes Restricts Multipotency of Mesenchymal Stem Cells and Impairs Their Capacity to Augment Postischemic Neovascularization in db/db Mice. J Am Heart Assoc. 2012;1(6):e002238. **doi:** 10.1161/jaha.112.002238
5. Kume S, Kato S, Yamagishi S, Inagaki Y, Ueda S, Arima N, et al. Advanced glycation end-products attenuate human mesenchymal stem cells and prevent cognate differentiation into adipose tissue, cartilage, and bone. J Bone Miner Res. 2005;20(9):1647-58. **doi:** 10.1359/JBMR.050514 **pmid:** 16059636
6. Molgat AS, Tilokee EL, Rafatian G, Vulesevic B, Ruel M, Milne R, et al. Hyperglycemia inhibits cardiac stem cell-mediated cardiac repair and angiogenic capacity. Circulation. 2014;130(11 Suppl 1):S70-6. **doi:** 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007908 **pmid:** 25200058
7. Ko KI, Coimbra LS, Tian C, Alblowi J, Kayal RA, Einhorn TA, et al. Diabetes reduces mesenchymal stem cells in fracture healing through a TNFalpha-mediated mechanism. Diabetologia. 2015;58(3):633-42. **doi:** 10.1007/s00125-014-3470-y **pmid:** 25563724
8. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. Circulation. 2002;105(1):93-8. **doi:** 10.1161/hc0102.101442 **pmid:** 11772882
9. Zhang M, Methot D, Poppa V, Fujio Y, Walsh K, Murry CE. Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies. J Mol Cell Cardiol. 2001;33(5):907-21. **doi:** 10.1006/jmcc.2001.1367 **pmid:** 11343414
10. Geng YJ. Molecular mechanisms for cardiovascular stem cell apoptosis and growth in the hearts with atherosclerotic coronary disease and ischemic heart failure. Ann N Y Acad Sci. 2003;1010:687-97. **doi:** 10.1196/annals.1299.126 **pmid:** 15033813
11. Feizpour A, Boskabady MH, Ghorbani A. Adipose-derived stromal cell therapy affects lung inflammation and tracheal responsiveness in guinea pig model of COPD. PLoS One. 2014;9(10):e108974. **doi:** 10.1371/journal.pone.0108974 **pmid:** 25330334
12. Hadjzadeh M, Tavakol Afshari J, Ghorbani A, Shakeri MT. The effects of aqueous extract of garlic (Allium sativum L.) on laryngeal cancer cells (Hep-2) and L929 cells in vitro. J Med Plants. 2006;2(18):41-8.
13. Lin HJ, Wang X, Shaffer KM, Sasaki CY, Ma W. Characterization of H2O2-induced acute apoptosis in cultured neural stem/progenitor cells. FEBS Lett. 2004;570(1-3):102-6. **doi:** 10.1016/j.febslet.2004.06.019 **pmid:** 15251448
14. Asmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review. Saudi Pharm J. 2016;24(5):547-53. **doi:** 10.1016/j.jsps.2015.03.013 **pmid:** 27752226
15. Rehman K, Akash MSH. Mechanism of Generation of Oxidative Stress and Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus: How Are They Interlinked? J Cell Biochem. 2017;118(11):3577-85. **doi:** 10.1002/jcb.26097 **pmid:** 28460155
16. Volpe CMO, Villar-Delfino PH, Dos Anjos PMF, Nogueira-Machado JA. Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications. Cell Death Dis. 2018;9(2):119. **doi:** 10.1038/s41419-017-0135-z **pmid:** 29371661
17. Asadpour E, Ghorbani A, Sadeghnia HR. Water-soluble compounds of lettuce inhibit DNA damage and lipid peroxidation induced by glucose/serum deprivation in N2a cells. Acta Pol Pharm. 2014;71(3):409-13. **pmid:** 25265820
18. Shafaei-Bajestani N, Emami SA, Asili J, Tayarani-Najaran Z. Anti-apoptotic effect of taxodione on serum/glucose deprivation-induced PC12 cells death. Cell Mol Neurobiol. 2014;34(8):1103-9. **doi:** 10.1007/s10571-014-0085-2 **pmid:** 25187359

www.SID.ir