



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA
DIPARTIMENTO DI CHIRURGIA

DOTTORATO DI RICERCA IN

“SPERIMENTAZIONE TECNOLOGICA,
IMMUNOLOGICA ED IMMUNOGENETICA: SUA
APPLICAZIONE NEGLI XENOTRAPIANTI E
NEI PRELIEVI DI ORGANO PER
TRAPIANTO UMANO” XXIV CICLO

Dott.ssa ELISA LIBERA SERIA

TESI

**Rigenerazione Epatica Mediante l'Impiego di Cellule Staminali
Mesenchimali in un Modello Murino di danno Epatico
Tetracloruro-indotto**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. G.Vadal

Tutor:

Chiar.ma Prof.ssa E. Cacciola

INTRODUZIONE

La rigenerazione epatica è un fenomeno biologico che si osserva nel fegato dei mammiferi e che consiste principalmente in un processo di iperplasia compensatoria governato dalla necessità di riacquisire la massa funzionale originale quando questa, per cause chirurgiche, traumatiche, virali o farmacologiche, si riduce.(1) Può avere, pertanto, un rationale la cura di alcune patologie epatiche mediante il trapianto di epatociti piuttosto che l'impianto dell'intero organo (2-3). Gli epatociti adulti hanno però un potenziale proliferativo limitato che probabilmente non è sufficiente per ripopolare il fegato dell'ospite. Pertanto, l'attenzione si è focalizzata sull'impiego di cellule staminali per la loro peculiare multipotenzialità differenziativa e maturativa (4). Infatti studi condotti sulle cellule staminali emopoietiche (HSCs) e sulle cellule staminali midollari mesenchimali (MSCs) hanno dimostrato che queste cellule sono in grado di dare origine a numerosi e diversi tipi cellulari e che possono scegliere tra numerosi percorsi di differenziazione(4-5).

Il danno tissutale è un prerequisito fondamentale per la partecipazione delle cellule staminali circolanti ai processi di rigenerazione dei tessuti extra-ematologici (6).

Su dei modelli animali, ratti e topi, con danno epatico cronico indotto sperimentalmente, mediante la somministrazione di CCL4, si è dimostrato un recupero in seguito alla successiva infusione di cellule staminali midollari. In letteratura sono noti vari studi che dimostrano, in particolare, la capacità delle cellule MSC di svolgere un ruolo nella possibile rigenerazione epatica fibrotica di tipo cronico (8-9-10).

L'attenzione negli ultimi anni è stata rivolta proprio alla identificazione, caratterizzazione e mobilitazione delle MSC (11-12).

Queste ultime risultano particolarmente interessanti nei processi rigenerativi date le loro capacità immunomodulatorie e il loro potenziale differenziativo verso più linee cellulari (13-14).

Studi comparativi fra HSCs e MSCs hanno dimostrato un vantaggio anti-infiammatorio, mediante modulazione dell'espressività di fattori solubili e citochine plasmatiche, per queste ultime (15).

SCOPO DELLA RICERCA

Lo scopo della ricerca sarà quello di dimostrare l'efficacia delle MSC nella rigenerazione d'organo (epatica) in modelli sperimentali animali dopo induzione di danno epatico acuto e il loro ruolo nel modulare i fattori solubili e le citochine plasmatiche (16-17). I risultati di questo studio potranno essere propedeutici per la progettazione di un protocollo terapeutico da traslare nell'uomo. La applicabilità di questa procedura trapiantologia rappresenterebbe un avanzamento nell'ambito dei trapianti.

MATERIALI E METODI

Sono stati impiegati 92 ratti Wistar (Harlan Nossan) di entrambi i sessi del peso di 250-300 gr.

Gli animali sono stati mantenuti a $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sotto alternati cicli di luce-buio di 12 h ciascuno ed alimentati con mangime standard attualmente in commercio.

Gli animali sono stati suddivisi in 2 gruppi principali: Donatori e Riceventi.

Il **gruppo donatore**, composto da 20 esemplari, costituisce il pool dal quale sono prelevate le cellule staminali utilizzando come sede di prelievo le epifisi delle ossa lunghe (femore e tibia). Un prelievo di sangue carotideo servirà per ottenere i parametri di controllo normale della funzione epatica, quali AST, ALT, FAL, RBC, PLT, INR, FIB, previa induzione anestesiológica con Zoletil 100 (100mg/Kg) e mantenimento anestesiológico con Isoflurano (2-3%). Successivamente i ratti sono stati sacrificati mediante CO₂ (Tabella 1).

Il **gruppo ricevente A**, costituito da 32 ratti, riceverà una somministrazione intraperitoneale di CCL₄ (Fluka cod87030) in una dose di 2ml/Kg, previa diluizione con olio d'oliva in un rapporto di 1:1.

Il gruppo ricevente A è suddiviso in due sottogruppi di 16 ratti e ciascuno di esso in ulteriori 4 sottogruppi costituiti ognuno da 4 esemplari.

Gruppo A1: rappresenta il gruppo sperimentale che riceverà un'infusione intravenosa, attraverso l'arteria caudale, a 24h dal CCL₄, di MSC in una concentrazione di 3×10^{-6} , risospesa in 400µl di soluzione fisiologica.

Gruppo A2: rappresenta il gruppo sperimentale che riceverà un'infusione intravenosa, attraverso l'arteria caudale, a 24h dal CCL4, di sola soluzione fisiologica in quantità pari a 400µl.

Gli animali sono stati sottoposti a induzione anestesiológica con Zoletil 100(100mg/Kg) ed anestesia con Isoflurano(2-3%).

Il **gruppo ricevente B**, costituito da 32 ratti, rappresenta il gruppo Olio, veicolo con cui è somministrato il CCL4. Gli animali ricevono un'a somministrazione intraperitoneale di olio, in una dose di 2ml/Kg.

Gli animali sono stati sottoposti a induzione anestesiológica con Zoletil 100(100mg/Kg) ed anestesia.

Anche il gruppo B è suddiviso in due sottogruppi di 16 ratti e ciascuno di esso in ulteriori 4 sottogruppi costituiti ognuno da 4 esemplari.

Gruppo B1: rappresenta il gruppo sperimentale che riceverà un'infusione intravenosa, attraverso l'arteria caudale, a 24h dall'Olio, di MSC in una concentrazione di 3×10^{-6} , risospesa in 400µl di soluzione fisiologica.

Gruppo B2: rappresenta il gruppo sperimentale che riceverà un'infusione intravenosa, attraverso l'arteria caudale, a 24h dall'Olio, di sola soluzione fisiologica in quantità pari a 400µl.

Il **gruppo C**, costituito da 8 ratti, riceve un'iniezione intraperitoneale di CCL4 con le stesse modalità dei gruppi A e B, e viene sacrificato a 24h dalla somministrazione del CCL4, rappresentando il "time point" a 24 h dall'induzione del danno acuto con il

CCL4.

I 4 esemplari di ciascun sottogruppo dei Gruppi A1, A2, B1 e B2 rappresentano, invece, i “time point” in 2, 3, 4 e 7 giornata dall’iniezione del CCL4 o dell’Olio e successiva infusione delle MSC o della sola soluzione fisiologica.

A ciascun “time point” sono stati prelevati campioni di sangue venoso e raccolti in provette tipo vacutainer contenenti EDTA e Sodio Citrato per valutare l’evoluzione del danno epatico indotto.

La funzionalità epatica è stata valutata mediante la misurazione di alcuni parametri quali PLT, INR, Fibrinogeno, Fosfatasi Alcalina (ALP), GOT e GPT, con tecnica UV-IFCC.

Sono state effettuate anche indagini istologiche sui fegati prelevati dagli animali ad ogni “time point” preso in esame. Tutte le biopsie sono state fissate in formalina al 10% ed incluse in paraffina secondo le procedure standard.

Il prelievo di sangue e di fegato sarà effettuato sotto anestesia seguito dalla soppressione mediante CO₂.

Sono state esaminate sezioni di fegato dello spessore di 5mm e colorate con H&E ed osservate al microscopio Olympus B X60. L’estensione del danno parenchimale è stata quantificata attraverso i seguenti criteri: presenza, estensione e localizzazione della necrosi epatocellulare, presenza di infiltrato neutrofilo, presenza di epatociti balloniformi e di steatosi micro e macrovescicolare.

Tutti i risultati dei parametri chimico-clinici ed istologici presi in esame sono stati analizzati mediante deviazione standard e Student’s T-test.

PROCEDURE SPERIMENTALI

Prelievo delle MSC dalle epifisi delle ossa lunghe (femore e tibia) del ratto e loro isolamento. Le ossa del ratto prelevate al momento del sacrificio sono state processate, in una condizione di sterilità, seguendo degli step specifici.

- 1) Immersione del frammento osseo in una soluzione contenente antibiotici ed antifungini, per evitare ogni possibile inquinamento al momento dell'isolamento delle cellule midollari (HSCs e MSCs). Composizione della soluzione d'immersione: in 50ml di PBS sterile 30mg Fungizone; 24mg di Gentamicina; 1ml di Penn/Strep.
- 2) Il prelievo della popolazione cellulare staminale midollare è stato effettuato dopo la rottura delle ossa alle due estremità, superiore ed inferiore, mediante un flashing dell'osso con una siringa da 5ml (ago 25-g), utilizzando terreno di coltura DMEM (Gibco) e penn/strep 2%.
- 3) Dalla popolazione midollare prelevata, sono state isolate le cellule nucleate mediante una separazione su gradiente di densità (Ficoll/Paque, Invitrogen) e quindi risospese in terreno di coltura completo e tenute in incubatore a 37°C al 95% d'aria e al 5% di CO₂, in fiasche da 25cm².
- 4) La crescita e l'espansione in coltura delle MSC è stata favorita dall'utilizzo del MesenCult Proliferation Kit(Stem Cell, catalog 05511), contenente terreno di coltura (MesenCult Basal Medium) e Mesenchymal Stem cell Stimulatory Supplements. A questo sono stati addizionati : 2mmL-glutamine(Gibco) , 100u/ml

Penicillin(Sigma),100µg/ml di streptomycin; 0,5mg/ml di gentamicina, con un cambio di terreno ogni 48h/72h.

5) caratterizzazione citofluorimetrica (FACS Diva, Beckton Dickinson) della popolazione midollare eterogenea al momento del prelievo dalle ossa e osservazione della variazione della percentuale di MSC in coltura. Al momento del prelievo midollare la percentuale delle MSC è stata circa 0,001% con progressivo incremento al progredire delle colture cellulari primarie. Sono stati messi a confronto il sangue periferico, il midollo appena estratto e le cellule della coltura primaria dopo 10 giorni.

Figura 1- Periferical blood, Bone Marrow and MSC 10days

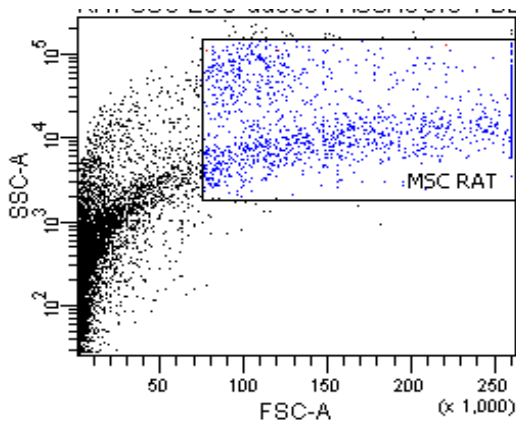
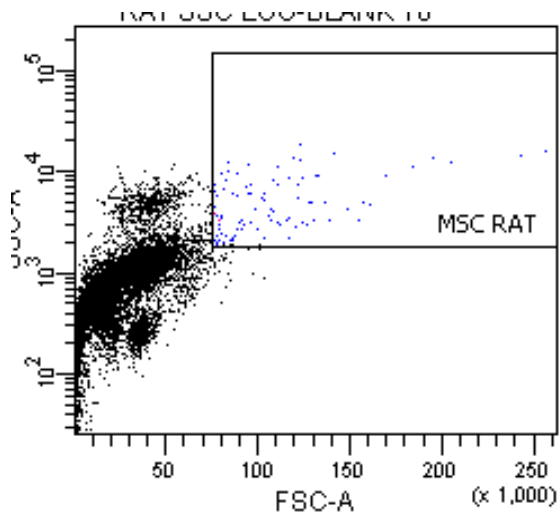
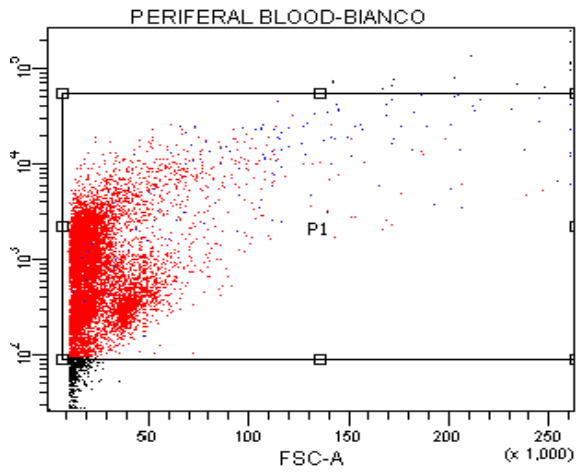
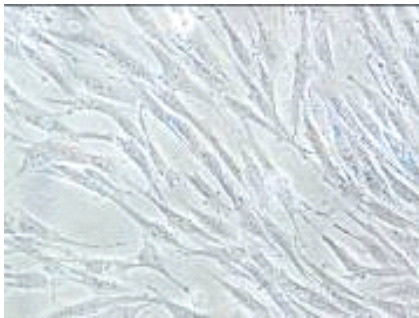
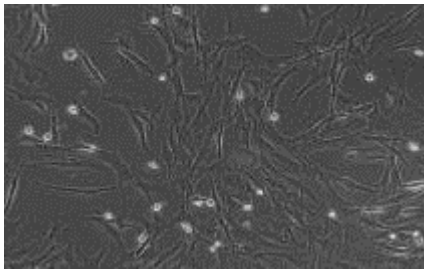
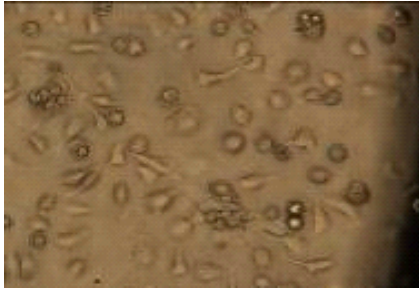


Figura 2- MSC 5 days, 10 days, 20 days.



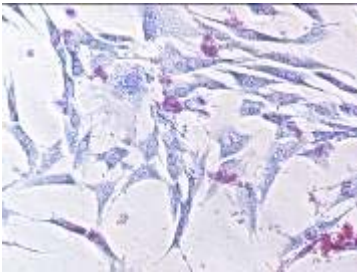
Le MSC sono state identificate mediante tecnica citofluorimetrica utilizzando i seguenti antigeni di superficie: CD45-(BD Pharmingen), CD34-(BD), CD14-(BD), CD105+ (intensità +++ e percentuale 98%) (Santa Cruz Biotechnology), CD90+(+++, 98%) (BD), CD73+(+++, 92%)(BD), CD29+(++-92%)(BD), CD11b+(DB Pharmingen) (FACS Diva Becton Dickinson). Le cellule in aderenza sono state trattate con una soluzione 2mM di EDTA in PBS senza Ca e Mg, per due minuti a T.A. Quindi lavate con terreno per 5min 1500rpm e 20°C. Il pellet cellulare è stato risospeso in PBS sterile. Per ciascuno anticorpo lo staining della sospensione della cellulare è avvenuto con 10µl di MoAb, per

30 min a T.A. al riparo dalla luce.

Successivamente, le cellule sono state trattate con PBS sterile per 5min a 1200rpm; il pellet, è stato risospeso in PBS sterile e la sospensione cellulare acquisita ed analizzata al citofluorimetro.

Caratterizzazione delle MSC mediante unità formanti colonie (CFU). L'attività proliferativa di queste cellule è stata saggiata testando la capacità CFU. Per questo test un numero di 100 cellule è stato piastrato in pozzetti da 60mm² ed incubato per 7 giorni, senza alcun cambio di terreno. Successivamente le cellule sono state fissate con metanolo per 5min a T.A., previa rimozione del terreno, e quindi colorate con Giemsa Staining Solution.

Figura 4-CFU, MSC



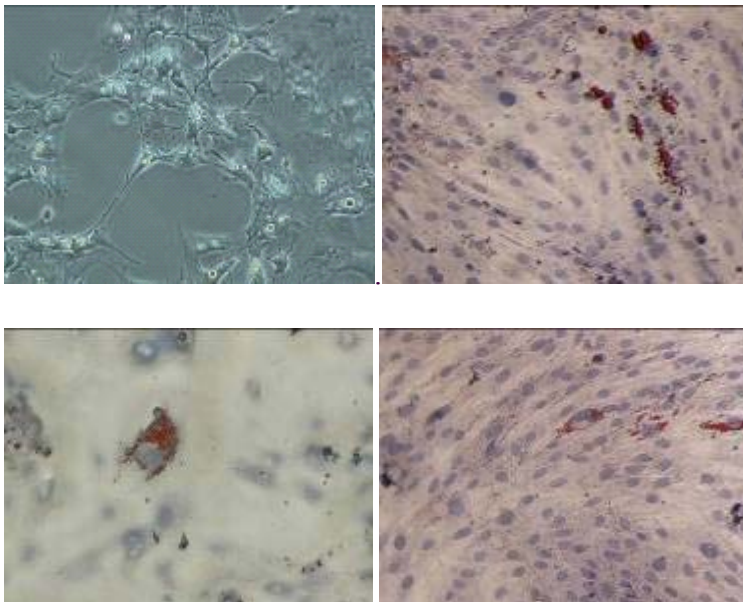
Quando la coltura primaria ha raggiunto il 100% di confluenza, le cellule sono state splittate mediante una soluzione 2mM di EDTA in PBS senza Ca e Mg, per due min a T.A. e rispese in fiasche da 75cm².

L'ulteriore differenziazione in vitro nelle tre linee cellulari, adipociti, condriociti ed

osteociti, mediante Rat Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit(R&D Systems, catalog # SC020), rientrerà nei criteri minimi di caratterizzazione delle MSC.

Differenziazione Adipocitica le cellule in coltura, sono state trattate con terreno specifico α MEM (Lonza, catalog BE-12169F) supplementato con Siero fetale bovino 10% (FBS, Invitrogen, catalog 10082), [penicillin(100 U/ml), Streptomycin(100 μ g/ml), L-Glutamina(2 mM)100X, Invitrogen, catalog 103 78). Le cellule sono state mantenute in coltura per 14 giorni con un totale di 4 cambi di terreno. Raggiunta la confluenza del 100%, verrà addizionato al terreno di coltura fino ad ora impiegato l'Adipogenic Supplement (10 μ l/ml; contenente hydrocortisone, isobutylmethylxanthine e indomethacin in 95% di etanolo, Part 390415). La presenza di vacuoli lipidici dopo 7 giorni è patognomica della differenziazione adipocitica. La coltura è stata mantenuta per 14 giorni con 3-4 cambi di terreno α MEM. Al 15° giorno le cellule sono state fissate con formalina al 10% per 30min a T.A. ed effettuato uno staining con Oil Red (Sigma) e controstainig con Ematossilina.

Figura 5- MSC/ Adipociti



Differenziazione Osteocitica : le cellule in coltura, sono state trattate con terreno specifico α MEM (Lonza, catalog BE12-168F) supplementato con Siero fetale bovino 10% (FBS, Invitrogen, catalog 100 82), [pennicilin(100 U/ml), Streptomycin(100 μ g/ml), L-Glutamina(2 mM)100X, Invitrogen, catalog 10378). Le cellule sono state mantenute in coltura per 14 giorni con un totale di 4 cambi di terreno. Raggiunta la confluenza del 50-70%, verrà addizionato al terreno di coltura α MEM l'Osteogenic Supplement (50 μ l/ml; contenente dexamethasone, ascorbate-phosphate, β -glycerolphosphate e recombinant BMP-2, Part 390441). La coltura è stata mantenuta per 14 giorni con 3-4 cambi di terreno α MEM. Al 15° giorno le cellule sono state fissate con formalina al 10% per 30min a T.A. ed effettuato uno staining con Von Kossa .



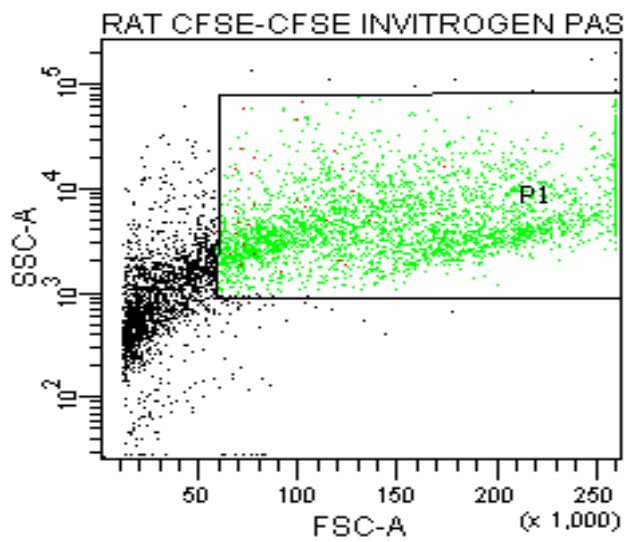
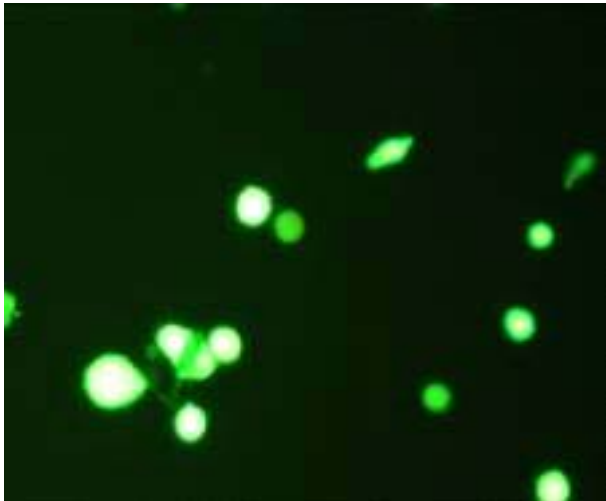
Differenziazione Condriocitica : le cellule in coltura, sono state trattate con terreno specifico D-MEM/F-12 (Lonza, catalog BE12-719F) supplementato con ITIS Supplement (Part 390418), il Chondrogenic Supplement (Part 390505) e [pennicilin(100 U/ml), Streptomycin(100 μ g/ml), L-Glutamina(2 mM)100X, Invitrogen, catalog 10378). La coltura è stata mantenuta con cambio di terreno D-MEM/F-12 ogni 2-3giorni. Al 21° ha cominciato a rendersi visibile l'aggregato cellulare tipico della differenziazione condriocitica.

Per studiare la proliferazione cellulare in vitro è stata impiegata il Cell TraceCFSE Cell Proliferation Kit(Invitrogen, catalog C34554), costituito da Cell Trace CFSE(Component A) 10 vials 50µg di polvere liofilizzata e DMSO (component B), 1 vials contenente 0,5 mL di DMSO.

La CFSE è una molecola fluorescente lipofila, in grado di diffondere liberamente attraverso la membrana cellulare. Le divisioni cellulari sono state seguite sia all'invertoscopio a fluorescenza, sia al citofluorimetro (FACS Diva). Ogni singola vials di CFSE è stata risospesa con 18µl di DMSO ottenendo una concentrazione di CFSE 5mM. Partendo, quindi, da una concentrazione iniziale di 5mM, facendo una diluizione 1:100 con PBS sterile abbiamo ottenuto una concentrazione 50 µM per poter marcare un numero di cellule pari a $1-5 \times 10^7$.

La marcatura è avvenuta risospendendo le cellule, precedentemente slittate (tripsinizzate) con una soluzione 2mM di EDTA in PBS sterile senza Ca e Mg, nella vials contenente la soluzione di CFSE 50µM. Sono state tenute al buio a 37°C per 15 min. La sospensione è stata centrifugata ed il pellet risospeso in terreno di coltura e lavato per 2 volte. Le cellule sono state tenute nuovamente al buio per 15 min a 37°C. Sono stati effettuati due lavaggi con terreno di coltura ed il pellet è stato risospeso in PBS sterile per l'analisi al citofluorimetro o in terreno di coltura (Mesencult) e trasferito in fiasche da 25cm² per l'osservazione all'invertoscopio.

Figura 6-MSC marcate con CFSE



Tube: CFSE INVITROGEN PASSAGE 2 T0

Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	5,000	####	100.0
■ P1	3,081	61.6	61.6
☒ P2	3,043	98.8	60.9
☒ P3	38	1.2	0.8
☒ Q1	0	0.0	0.0
☒ Q2	4	0.1	0.1
☒ Q3	38	1.2	0.8
■ Q4	3,039	98.6	60.8

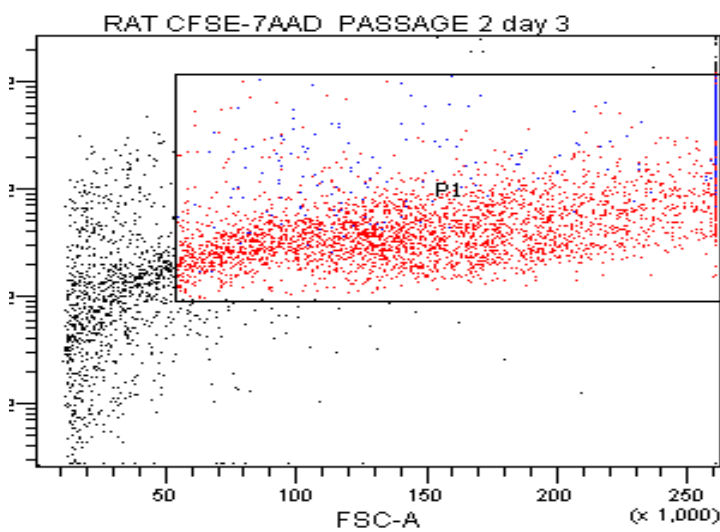
Abbiamo osservato che le cellule in coltura al quarto passaggio, rallentano la fase proliferativa. Per tale motivo, giunte a tale passaggio, le cellule venivano congelate e conservate in azoto liquido.

Soluzione di congelamento: 10% DMSO

30% FBS

60% DMEM

Abbiamo avuto riscontro di non alterata vitalità dopo il congelamento mediante analisi al citofluorimetro.



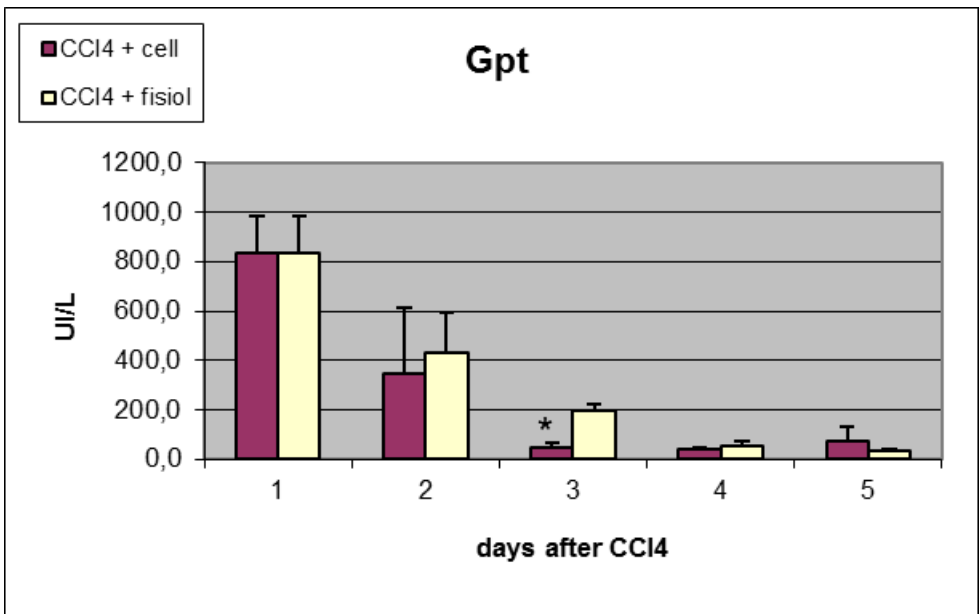
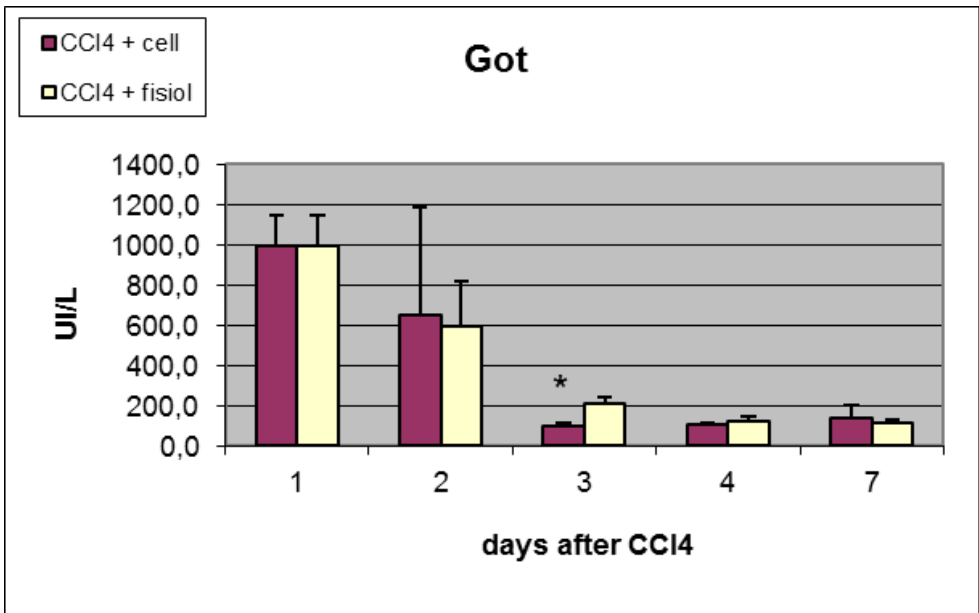
Experiment Name: MSC
 Specimen Name: RAT CFSE
 Tube Name: 7AAD PASSAGE 2 day 3
 Record Date: May 6, 2010 1:04:46 PM

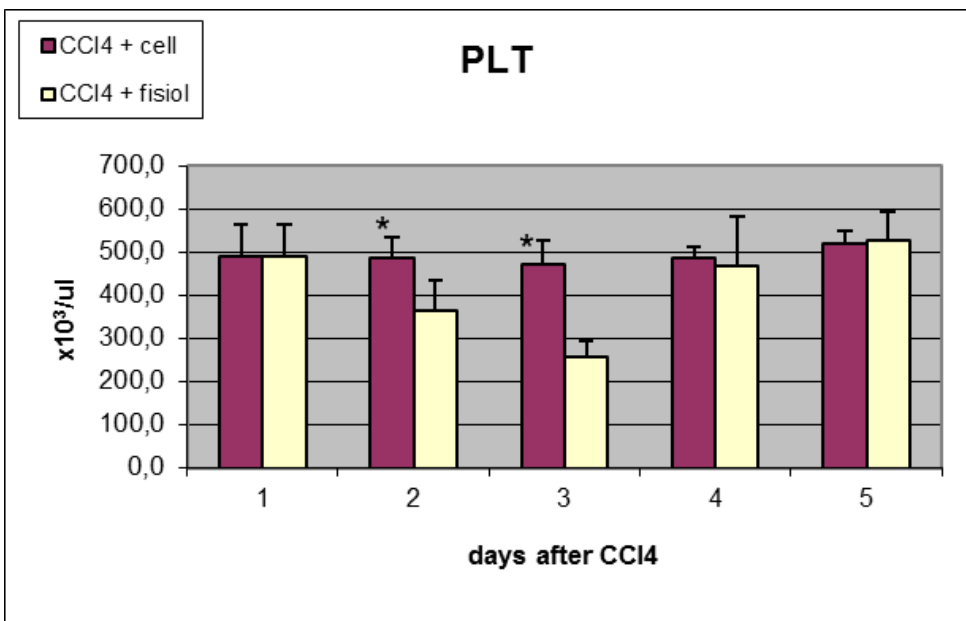
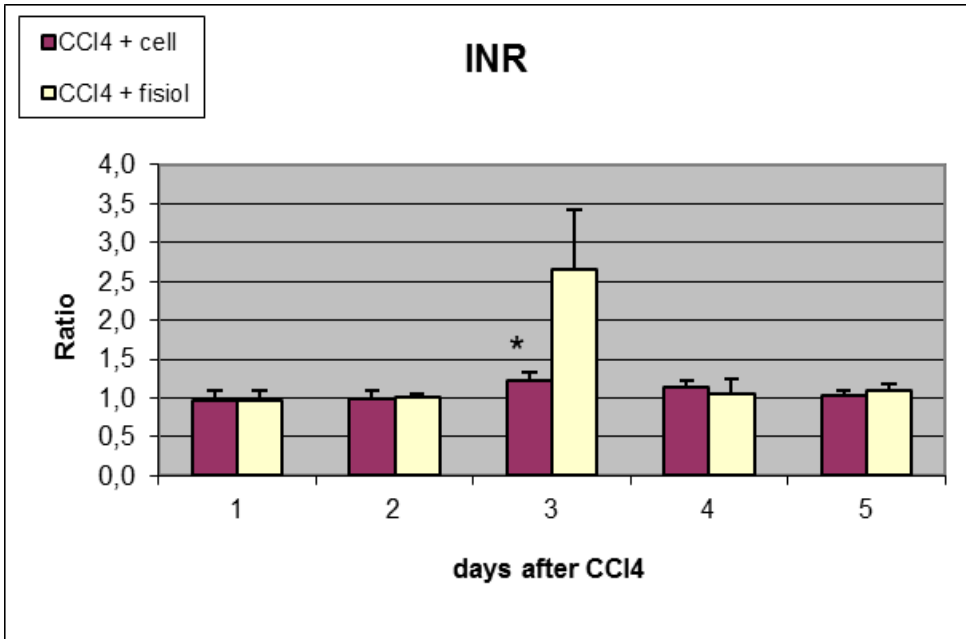
Population	#Events	%Parent	PerCP-A Mean
■ P1	3,886	77.7	91
☒ LIVE	3,641	93.7	48
■ DEAD	254	6.5	713

RISULTATI

Alcuni tipi di danno tissutale, quale quello provocato dal CCL4, determinano il rilascio in circolo di fattori solubili (citochine, fattori di crescita) in grado di richiamare le cellule staminali a livello del sito del danno. Secondo studi già condotti la necrosi epatica instaurata somministrando 2ml/Kg di CCL4 come soluzione al 50% in olio di mais, dovrebbe evidenziarsi a livello delle aree centrolobulari tra il primo ed il terzo giorno dopo l'intossicazione (17). Per tale motivo le MSC verranno inoculate nel ratto a 24 h dall'insulto con il CCL4 ed il fegato dovrebbe ritornare quasi alla normalità già dal settimo giorno.

Il nostro studio vuole comparare l'eventuale ruolo delle MSC nella rigenerazione e nella immunomodulazione sia al momento della massima espressione del danno (fra il 1° ed il 3° giorno) e la fase di rigenerazione spontanea (7° giorno). Pertanto a decorrere dal tempo zero sino al 7° giorno dalla somministrazione del CCL4 e dell'olio, per ciascun gruppo verrà effettuato un sacrificio, da considerarsi come il "time point" giornaliero per valutare l'evoluzione del danno e l'eventuale effetto protettivo-rigenerativo delle MSC. Dall'analisi dei parametri chimico-clinici di tutti gli esemplari del gruppo C, poiché sono stati sacrificati a 24 h dal CCL4, si può solo confermare l'induzione di un danno acuto. L'analisi statistica dei parametri chimico-clinici dei gruppi sperimentali A e B non ha messo in evidenza una significativa differenza fra il gruppo A ed il gruppo B relativamente al fibrinogeno ed alla fosfatasi alcalina, mentre una significativa è stata osservata per PLT, GOT, GPT e INR fra il gruppo A e B e all'interno del gruppo A (A1 e A2), particolarmente in 2° e 3° giornata dall'infusione delle MSC e dalla fisiologica, con un ritorno ai valori normali nei ratti che hanno ricevuto le cellule.





Anche dai dati istologici si può confermare la presenza di un danno acuto epatico nel gruppo C attraverso una severa percentuale di necrosi epatocelellulare, infiltrato neutrofilo e presenza di epatociti balloniformi.



Foto 1 : 24h dal CCL4

Comparando le sezioni istologiche dei fegati prelevati a ciascun “time point” risulta significativa la 3° dall’infusione delle MSC con un inferiore grado di necrosi ed infiltrato neutrofilo.

Viceversa non vi è significativa differenza nei parametri di steatosi macro e microvescicolare.

E’ quindi possibile affermare che l’infusione delle MSC ha accelerato già in 3° giornata il fisiologico processo di rigenerazione confermato anche dai reperti istologici con epatociti in fase mitotica.

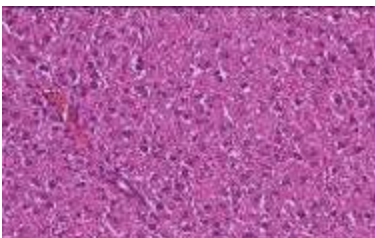


Foto 2 : 3a giornata CCL4, 48h MSC

La spiegazione di questa osservazione potrebbe risiedere in un fenomeno di migrazione delle MSC sul sito del danno o di stimolazione ad opera delle MSC sulle cellule staminali emopoietiche alla migrazione differenziazione in epatociti. In entrambi i casi le MSC giocano sicuramente un ruolo primario nel rilascio di mediatori chimici e fattori di crescita.

Questo studio sperimentale suggerisce la possibilità di instaurare un trattamento alternativo nel danno epatico da epatite acuta mediante l'impiego delle MSC capaci di favorire la rigenerazione.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Michalopoulos Gk, De Frances MC. Liver regeneration. *Science* 1997; 276: 60-66
- 2) FoxJ, Roy ChowdhuryJ. Hepatocyte transplantation. *Trasplant* 2004; 4(suppl.6):7-1.
- 3) Aurich I, Mueller LP, Aurich H, LuetzkendorfJ, Tis ljarK, Dollinger MN, SchormannW, WalldorfJ,Hengstler JG, Fleig WE, Christ B. Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cell into mouse livers. *Gut* 2007 Mar;56(3);405-15.
- 4) YagiK, KojimaM,OyagiS, IkedaE, HiroseM,Isoda K KawaseM, Kondoh M, Ohgushi H. Application of Mesenchymal stem cell to liver regeneration medicine. *YakugakuZasshi* 2008Jan;128(1):3-9.
- 5) Krause DS, Theise ND, Collector M I, Henegarín O, HwangS, GardenerR et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell.*Cell*2001;105:369-37.
- 6) You Qing Xu, Zun Chang Liu Therapeutic Potential of Adult Bone Marrow Stem Cells in Liver Disease and Delivery Approaches. *Stem cell Rev* (2008) 4;101-112.
- 7) OkumotoK, SaitoT, Haga H, Hattori E, Is hiiR, Karasawa T, Su zuki A, Misawa K, SanjoM, Jto JI;Sugahara K, Saito K, Togashi H, Kawata S. Characteristics of rat bone marrow cell differentiated into a liver cell lineage and dynamics of the transplanted cells in the injured liver. *J Gastroenterol*,2006 Jan ;41(1):62-9.
- 8) Isao Sakaida, Shuji Terai, Naoki Yamamoto, Koji Aoyama, Tsuyoshi Ishikawa, Hiroshi Nishina and Kiwamu Okita. Transplantation of bone marrow cell reduces CCL4-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology*, vol 40,No.6,2004 1304-1311
- 9) Dong-Chang Zhao, Jun-Xia Lei, Rui Chen, Wei-Hua Yu, Xiu-Ming Zhang, Shu-Ning Li, Peng Xiang. Bone Marrow-derived mesenchymal stem cell protect against experimental liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterology* 2005;11(22):3431-3440.
- 10) M.T. Abdel Aziz, H.M. Atta, S Mahfouz, H.H. Fouad, N.K. Roshdy, H.H. Ahmed, L.A. Rashed, D.Sabry, A.A. Hassouna, N.M. Hasan. Therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis *Clin Biochem.* 2007 Aug; 40(12): 893-9
- 11) M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, FC Marini, DS Krause, RJ Deans, A Keating, DJ Prockop, and AM Horwitz. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy* (2006) Vol 8, No 4, 315-317.
- 12) DENG Jun, Zou ZhongMi, ZHOU TaoLi, Ai GuoPing, WANG JunPing, DONG ShiWu, SU YongPing. The mobilization of rat's mesenchymal stem cell into peripheral blood by LiCL and its potency differentiation. *Chinese Science Bulletin*,2008.

- 13) Pittenger MF, Mackay SC, Beck RK, Jaiswal R, Douglas JD, Mosca MA, Moorman DW, Simonetti S, Craig DR, Marshall DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284; 143-7.
- 14) Kode JA, Mukherjee SM, Joglekar MV, Hardikar AA (2009). Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy* 11:377-91.
- 15) Sivasami Pulavendran, Jayarajan Vignesh, Chellan Rose. Differential anti-inflammatory and anti-fibrotic activity of transplanted mesenchymal vs. hematopoietic stem cells in tetrachloride-induced liver injury in mice. *International Immunopharmacology* 2010; in press
- 16) Marc H. Dahlke, Felix C. Popp, Ferdinand H. Bahlmann, Heiko Aselmann, Mark D. Jager, Michael Neipp, Philipp Piso, Jürgen Klempner, Hans J. Schlitt. Liver regeneration in a retosine/CCL4-induced acute liver failure model: Do bone marrow-derived cells contribute? *Scriver*
- 17) Maciej M, Markiewsky, Dimitrios Mastellos, Ruxandra Tudoran, Robert A, De Angelis, Christoph W, Strey, Silvia Franchini, Rick A. Westel, Anna Erdei and John D. Lambris. C3 and C4 Activation products of the third component of complement (C3) are critical for normal liver recovery after toxic injury. *J. Immunology* 2004; 173; 747-754.