بررسی تأثیر استفاده از پلاسمای غنی‌شده با پلاکت (Platelet Rich Plasma) بر تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی به استخوان

محسن خسروی*[۱]، ناصر سنجرموسوی[۲]، سیدمحمدرضا پریزاده[۳]، همت آقاگل‌زاده حاجی[۴]

تاریخ دریافت 1393/01/21 تاریخ پذیرش 1393/03/22

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: سلول‌های بنیادی کشت داده‌شده در موارد زیادی به‌صورت بالینی استفاده می‌شوند، اما درباره شرایط کشت آن‌ها نگرانی‌هایی وجود دارد. یکی از این شرایط، استفاده از FBS در محیط کشت می‌باشد. FBS ترکیبی خارجی با کاربرد وسیع در سیستم‌های کشت سلولی است و به دلیل داشتن اثرات زیان‌آور باید از محیط کشت حذف گردد.PRP جایگزین مناسبی برای FBS در نظر گرفته می‌شود. در این مطالعه اثرات PRP بر روی تکثیر و تمایز به استخوان سلول‌های بنیادی بررسی می‌شود.

مواد و روش کار: سلول‌های موردنظر از بافت چربی حاصل عمل لیپوساکشن استخراج و با روش فلوسایتومتری ارزیابی شدند. PRP بروش سانتریفوژ ۲ مرحله‌ای تهیه و توسط روش انجماد فعال گردید. برای بررسی تکثیر و تمایز سلول‌ها به سلول‌های استخوانی به ترتیب از آزمون‌های رزازورین و مینرالیزاسیون استفاده گردید.

یافته‌ها: ازنظر آماری، استفاده از PRP منجر به افزایش معنی‌داری در تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تمایزشان به استخوان در مقایسه با گروه کنترل منفی شد ($p<۰/۰۰۱$) و اثر گروه ۱۵ درصد PRP به‌طور معنی‌داری بیشتر از گروه ۱۰ درصد PRP شد ($p<۰/۰۵$). همچنین اثر FBS در تمایز به استخوان بیشتر از PRP می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری: این یافته‌ها نشان می‌دهد PRP روند تکثیر و تمایز به استخوان را بهبود می‌بخشد. به‌طور واضح، اثرات بیولوژیکی PRP وابسته به دوز می‌باشد و می‌تواند در کاربردهای بالینی جایگزین مناسبی برای FBS باشد. هرچند برای کاربرد PRP تحقیقات بیشتر، بخصوص در زمینه بالینی ضروری می‌باشد.

کلیدواژه‌ها: پلاسمای غنی از پلاکت، سلول‌های بنیادی بافت چربی، تمایز سلولی، تکثیر سلولی، فتال بوین سرم

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و پنجم، شماره پنجم، ص ٤٦٢-٤٥٣، مرداد ۱۳۹۳

آدرس مکاتبه: مشهد، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، تلفن: ۰۹۱۲۴۵۱۱۹۸۳

Email: khosravi.dara681@gmail.com

مقدمه

سلول‌های بنیادی مزانشیمی[۵] با داشتن پتانسیل بالای تکثیر و تمایز، یک منبع مفید برای استفاده در زمینه مهندسی بافت می‌باشند(۱). اخیراً سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی[۶] توجهات را به خود جلب کرده است(۲, ۳). به دلیل اینکه ADSC ها می‌تواند به‌طور آسان، به مقدار فراوان و با آسیب‌رسانی کم به دست آیند و دارای ویژگی‌های مشابه BMSC ها می‌باشد(۵،۴) برای کاربرد MSC ها در اهداف بالینی تلاش شده است شرایط کشت این سلول‌ها بهینه شود.

[۱] کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

[۲] استادیار، بخش جراحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاداسلامی، واحد مشهد، ایران

[۳] استاد بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران

[۴] کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علومپزشکی گلستان، ایران

[۵] Mesenchymal stem cell (MS)

[۶] adipose stem cell (ADSC)

[۷] Fetal bovine serum

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-27]

به‌طور رایج برای کشت این سلول‌ها از ترکیب FBS[7] در محیط کشت استفاده می‌شود ولی نگرانی‌هایی در مورداستفاده از FBS وجود دارد. FBS ترکیبی خارجی است که به دلیل داشتن فاکتورهای رشد بالا و مقدار اندک آنتی‌بادی به‌طور گسترده در شرایط آزمایشگاه استفاده می‌شود(۶). بااین‌حال ازآنجایی‌که FBS دارای پتانسیل انتقال بیماری‌های حیوانی همچون بیماری‌های پریونی می‌باشد به‌عنوان گزینه‌ای مناسب پیشنهاد نمی‌شود(۷, ۸).

در حال حاضر، PRP جایگزین مناسبی برای FBS در نظر گرفته می‌شود(۹). PRP می‌تواند به‌صورت اتولوگوس، با دسترسی آسان و هزینه اندک تهیه شود که پاسخ ایمنی ضعیف ایجاد می‌کند. مطالعات متعددی تأیید کرده است که PRP تکثیر انواع مختلفی از سلول‌ها بخصوص MSC ها را بهبود می‌بخشد (۱۲-۱۰). پلاکت‌ها حاوی گرانول‌های آلفا هستند که شامل چندین فاکتور رشد قوی ازجمله (platelet derived growth factor) PDGF-AB، TGF- (transforming growth factor B-1) IGF-1 (Insulin growth factor-1) و (Vascular endothelial growth factor)VEGF می‌باشند. این فاکتورها برای ترمیم زخم و ترمیم بافت‌های معدنی به‌خصوص بافت استخوان مؤثر هستند(۱۳). برای تهیه PRP، غلظت پلاکت‌ها نسبت به حجم موردنظر خون کامل افزایش پیدا می‌کند و به همین دلیل مقدار فاکتورهای رشد به‌طور خطی افزایش می‌یابد (۱۰). اگر PRP به‌صورت اتولوگوس استفاده شود، تأثیر بهتری در ترمیم بافت خواهد داشت. در این مطالعه اثرات غلظت‌های ۱۰ درصد و ۱۵ درصد PRP بافری شده بر روی تکثیر و تمایز به استخوان ADSC ها بررسی گردید. نتایج نشان می‌دهد ترکیب PRP می‌تواند تکثیر و تمایز به استخوان این سلول‌ها را بهبود بخشد(۹, ۱۴).

مواد و روش‌ها

محیط کشت (Minimum essential)(11700-077-Gibco αMEM (medium alpha)، آنزیم تریپسین و ترکیب FBS از شرکت گیبکو خریداری شد. ترکیبات دگزامتازون، بتا فسفوگلیسرات و آنزیم کلاژناز-۱ از شرکت سیگما خریداری شد. کیت آزمون مینرالیزاسیون (ECM810) و کیت رزازورین از شرکت Milipore خریداری شد. آنتی‌بادی‌ها از شرکت Invitrogen خریداری شد. سلول‌های این مطالعه، بر طبق مطالعات گذشته از بافت چربی انسانی استخراج شدند. روند کلی این مطالعه در شکل ۱ به‌طورکلی نشان داده شده است. در این مطالعه، چهار گروه طراحی گردید که شامل: ۱) گروه کنترل منفی ۲) گروه کنترل مثبت (۱۰FBS درصد) ۳) گروه ۱۰PRP درصد و ۴) گروه ۱۵PRP درصد می‌باشد (۱۱).

جداسازی و کشت سلول:

ADSC ها بر طبق مطالعات گذشته از بافت چربی انسانی استخراج شدند. بافت‌های چربی طی عمل لیپوساکشن از ۶ بیمار سالم در بیمارستان رضوی شهرستان مشهد تهیه می‌شدند. به‌طور خلاصه، ابتدا در شرایط استریل، بافت چربی را ۳ بار با PBS شستشو می‌شود. برای جدا شدن سلول‌ها، بافت موردنظر توسط ۰/۰۷۵ درصد آنزیم کلاژناز -۱ به مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد هضم قرار می‌گیرد. بعدازاین مرحله، فعالیت آنزیمی به‌سرعت خنثی می‌شود. پلاک سلولی بعد از سانتریفوژ به دست می‌آید و گلبول‌های قرمز خون موجود با محلول بافر لایزیز تریس حذف می‌شوند. درنهایت سلول‌های به‌دست‌آمده در محیط کشت حاوی ۱۰FBS درصد کشت می‌یابند. هر ۱۰۰۰۰۰ سلول به‌دست‌آمده به یک فلاسک ۷۵ اضافه می‌شود. محیط کشت هر سه روز یک‌بار تعویض می‌شود. وقتی رشد سلول‌ها در کف فلاسک کشت به ۷۰ درصد می‌رسد، با ۰/۰۵ درصد آنزیم تریپسین-EDTA پاساژ داده می‌شود و سلول‌های پاساژ سوم برای بررسی میزان تکثیر، تمایز به استخوان و فلوسایتومتری استفاده می‌شوند (۲،۵،۱۰،۱۲،۱۵-۱۷).

تهیه PRP فعال‌شده:

نمونه خون کامل از بانک انتقال خون شهرستان مشهد تهیه شد. بعد از دو مرحله سانتریفوژ، رسوب پلاکتی همراه اندکی پلاسما به دست آمد. در مطالعه حاضر برای فعال کردن پلاکت‌ها از روش انجماد متوالی استفاده شد. در این روش از شش مرحله انجماد و ذوب متوالی استفاده شد. سپس نمونه با دور سانتریفوژ ۳۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. بعد از سانتریفوژ، دو فاز در نمونه تهیه می‌شود، لایه رسوبی سفید در پایین و PRP موردنظر شامل فاکتورهای رشد آزادشده در بالای نمونه. PRP فعال‌شده در دمای منهای ۷۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره می‌شود. نیمه‌عمر این فاکتورها در دمای محیط حدود دو هفته می‌باشد. قبل از استفاده از این ترکیب، آن را با محلول سدیم بی‌کربنات ۸/۴ درصد به pH فیزیولوژیک (۷/۴) رسانده می‌شود (۱۰).

بررسی شاخص‌های سطحی بروش فلوسایتومتری:

برای تعیین ویژگی فنوتیپ ADSC ها، بعد از پاساژ سوم، سطح بیان شاخص‌های سطح سلولی CD۲۹ و CD۹۰ این سلول‌ها ارزیابی شد. برای این منظور، سلول‌ها از کف فلاسک جدا شده و مورد شمارش قرار می‌گیرند. سلول‌ها با ۱۰ میکرو لیتر آنتی‌بادی‌های موشی بر ضد CD۲۹ انسانی حاوی رنگ ایزوتیوسیانید فلئورسین (FITC) و CD۹۰ انسانی حاوی رنگ

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-27]

فیکواریتین (PE) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌شوند و با پارافرمالدئید ۱ درصد فیکس می‌شوند. درنهایت توسط دستگاه فلوسایتومتری و نرم‌افزار WinMDI نسخه ۲/۹، مورد ارزیابی قرار می‌گیرند.

آزمون تکثیر سلولی:

آزمون رزازورین برای اندازه‌گیری سرعت تکثیر سلولی ADSC ها بعد از پاساژ سوم استفاده می‌شود. اساس این آزمون به توانایی آنزیم اکسیدوردوکتاز سلول‌های فعال می‌باشد که ترکیب غیر فلورسانس رزازورین را به ترکیبات فلورسانس رزوروفین و هیدرورزوروفین احیا می‌کند. سیگنال‌های فلورسانس در طول‌موج ۵۹۰ و ۵۳۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شوند که متناسب با تعداد سلول‌های زنده می‌باشد. برای این آزمون، سلول‌ها به پلیت‌های ۹۶ تایی به تعداد 5×10^5 سلول در هر خانه در حجم ۲۰۰ میکرو لیتر اضافه می‌شوند. سپس به هر خانه ۲۰ میکرو لیتر رنگ رزازورین اضافه می‌شود و بعد از ۵ ساعت اندازه‌گیری می‌شود. بر طبق مطالعات گذشته، برای بررسی و مقایسه روند رشد هر گروه، آزمون رزازورین در طی چهار روز به‌صورت سه گانه برای هر گروه انجام می‌شود تا درنهایت منحنی رشد همه گروه‌ها رسم شود و جذب هر گروه به‌طور آماری در روز سوم (به دلیل نشان دادن فاز رشد نمایی) مقایسه شد(۲۱-۱۸، ۱۱).

آزمون مینرالیزاسیون سلولی[1]:

این آزمون بر طبق مطالعات گذشته، در روزهای ۴، ۷، ۱۴ و ۲۱ با رنگ‌آمیزی آلیزارین رد[2] انجام می‌شود. این آزمون برای ارزیابی کمی میزان استئوژنز ADSC ها صورت می‌گیرد. اساس این آزمون بر طبق مراحل کیت آزمون استئوژنز می‌باشد. بعد از پاساژ سوم، سلول‌ها به پلیت‌های ۲۴ تایی اضافه می‌شوند (به هر خانه پلیت ۲۴ تایی، 2×10^4 سلول اضافه می‌شود) و درچهار گروه حاوی محیط کشت استئوژنیک تقسیم می‌شوند. برای بررسی میزان کمی مینرالیزاسیون، ابتدا محیط کشت از ظرف برداشته شده و بعد از شستشو سلول‌ها با PBS، توسط پارافرمالدئید ۴ درصد به مدت ۱۵ دقیقه مورد فیکس قرار می‌گیرند. پس از شستشو با آب مقطر، ۱ میلی لیتر رنگ آلیزارین رد به هر خانه اضافه شده و به مدت ۲۰ دقیقه در درمای محیط انکوبه می‌شود. بعد از شستشوی رنگ، ۴۰۰ میکرو لیتر اسید استیک ۱۰ درصد به هر خانه به مدت ۳۰ دقیقه اضافه می‌شود تا سلول‌ها لیز شوند و رنگ جذب شده بعد از جدا سازی در طول‌موج ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود (۲۲، ۱۱).

تجزیه آماری:

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Spss۱۱/۵ مورد تحلیل قرار گرفتند. روش آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) بر روی داده‌ها اعمال شد و از آزمون تعقیبی[3] برای مقایسه‌های دوبه‌دو استفاده گردید. به‌منظور تجزیه‌وتحلیل داده‌ها، ابتدا جهت آزمون نرمال بودن متغیرها از آزمون کولموگروف–اسمیرنوف استفاده گردید تا بر اساس نرمال یا غیر نرمال بودن آن‌ها از آزمون‌های پارامتری و یا غیر پارامتری مناسب برای هر گروه استفاده شود. اگر فرض همگنی واریانس‌ها رد شود، از آزمون نا پارامتری کروسکال والیس[4] استفاده می‌گردد. نتایج به‌صورت Mean ± SEM ارائه گردید و همچنین سطح معنی‌داری، کمتر از ۰/۰۵ ($p<0.05$) در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

اثر غلظت‌های PRP بر روی تکثیر سلولی:

نتایج روند تکثیر چهار گروه موردمطالعه به‌صورت منحنی رشد در شکل ۲ دیده می‌شود و جذب هر گروه در روز سوم به‌صورت آماری مقایسه شدند (شکل ۳). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد PRP ۱۵ درصد بیشترین تأثیر را در افزایش رشد ADSC ها دارد. یک افزایش معنی‌دار در تکثیر سلولی در گروه‌های حاوی PRP و FBS در مقایسه با گروه کنترل منفی اثبات شد (P>۰/۰۰۱). همچنین اثبات شد گروه‌های حاوی PRP تأثیر بهتری نسبت به FBS در افزایش تکثیر سلول‌ها دارند (P>۰/۰۰۱) و اینکه رشد گروه حاوی PRP ۱۵ درصد به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه حاوی PRP10 درصد بود (P>۰/۰۵).

اثر غلظت‌های PRP بر روی مینرالیزاسیون سلولی:

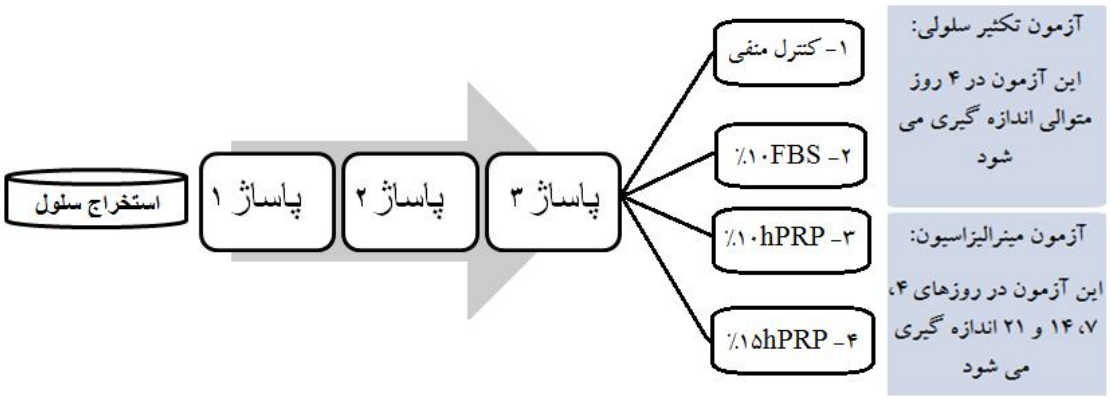
اثرات همه گروه‌ها روی مینرالیزاسیون ADSC ها در شکل ۴ دیده می‌شود. تعیین کمی مینرالیزاسیون گروه‌های موردمطالعه در روزهای ۴، ۷، ۱۴ و ۲۱ در شکل ۵ دیده می‌شود. در روزهای ۱۴، به‌طور آماری افزایش معنی‌داری در مینرالیزاسیون گروه‌های PRP در مقایسه با گروه کنترل منفی دیده می‌شود (p<۰/۰۰۱). همچنین بررسی میزان مینرالیزاسیون در روز ۲۱، نتایج به‌دست‌آمده در روز ۱۴ را اثبات می‌کند (p<۰/۰۰۱). در روزهای ۱۴ و ۲۱، میزان مینرالیزاسیون گروه PRP ۱۵ درصد به‌طور معنی‌داری بالاتر از PRP ۱۰ درصد می‌باشد (p<۰/۰۵). هرچند در تمام مدت کشت در محیط استئوژنز، اثرات PRP برای مینرالیزاسیون سلول‌ها به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه کنترل مثبت می‌باشد (P>۰/۰۰۱).

[1] Mineralization
[2] Alizarin red
[3] Post Hoc Tukey
[4] Kruskalwallis

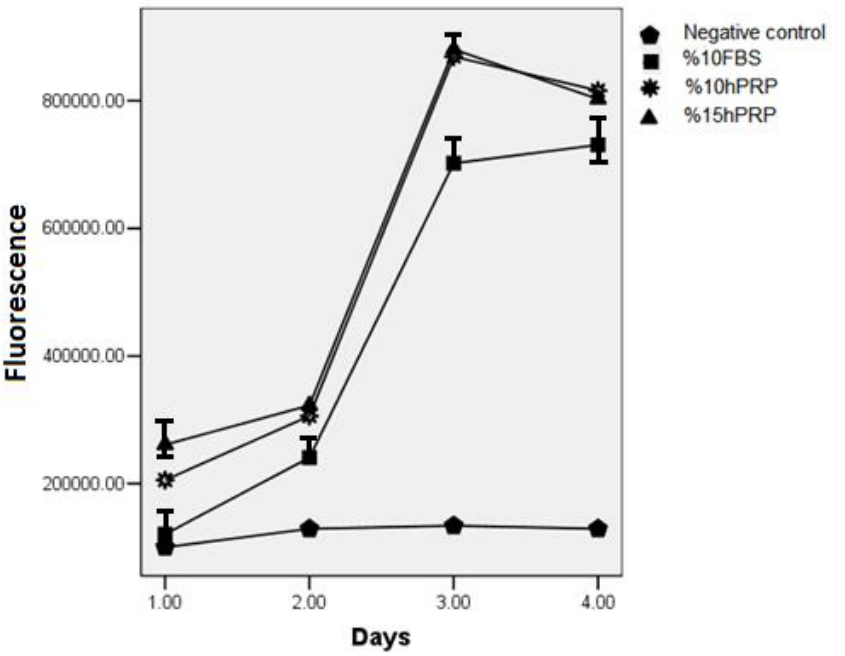
[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-27]

نتایج آنالیز فلوسایتومتری:

در مطالعه حاضر، به دلیل تعیین ویژگی‌های ADSC ها، میزان بیان شاخص‌های سطح سلولی توسط دستگاه فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. بعد از پاساژ سوم، میزان بیان شاخص‌های CD۲۹ و CD۹۰ در سطح این سلول‌ها به‌طور چشمگیری مثبت می‌باشد (شکل ۶).

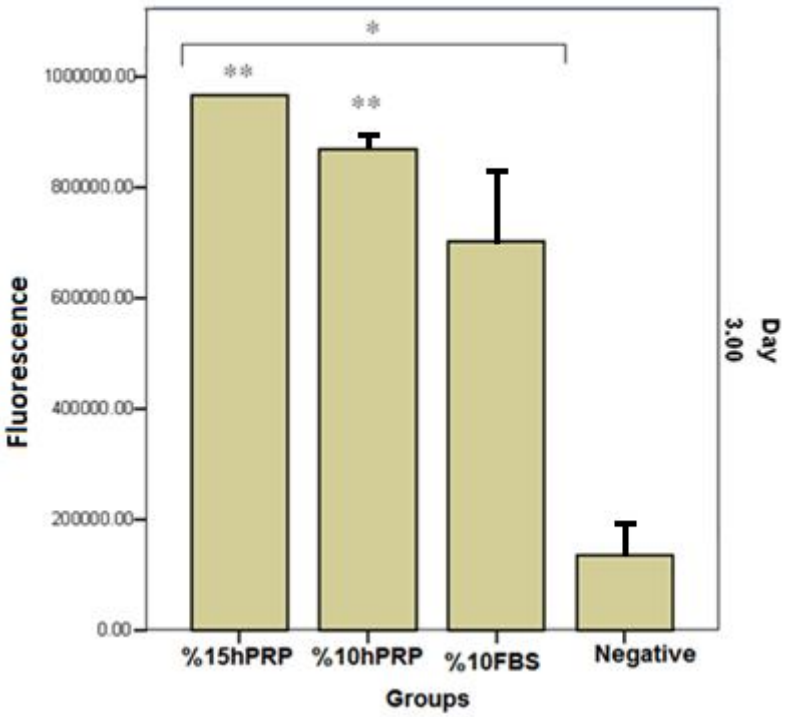


شکل (۱): نمودار کلی مطالعه حاضر. آزمون تکثیر سلولی: گروه مثبت حاوی FBS ۱۰ درصد + αMEM + ۱ درصد آنتی‌بیوتیک. گروه کنترل منفی حاوی αMEM + ۱ درصد آنتی‌بیوتیک. آزمون مینرالیزاسیون: گروه کنترل مثبت حاوی FBS ۱۰ درصد + αMEM + ۱۰۰ نانو مولار دگزامتازون + ۰/۵ میلی مولار بتا فسفو گلیسرات + ۵ میکرو مولار آسکوربیک اسید + ۱ درصد آنتی‌بیوتیک. گروه کنترل منفی حاوی FBS ۱۰ درصد + αMEM + ۱ درصد آنتی‌بیوتیک

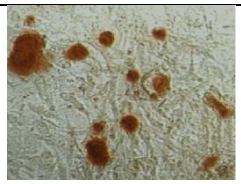
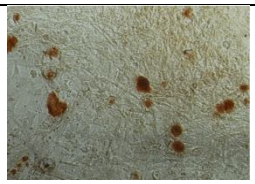
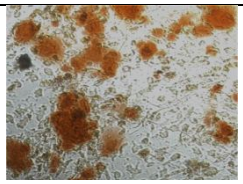
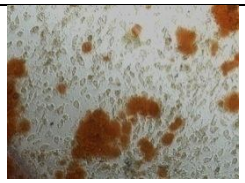
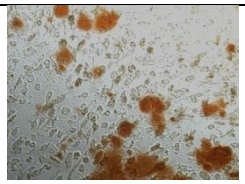
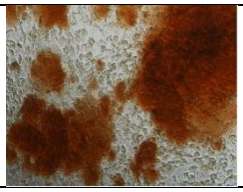


شکل (۲): بررسی روند تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی در ۴ روز به‌صورت متوالی توسط آزمون رزازورین (هر آزمایش ۳ بار تکرار شد و نتایج به‌صورت Mean ± SD نشان داده شده است). (روند رشد سلول‌ها در روز سوم به‌صورت نمایی می‌باشد).

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-27]

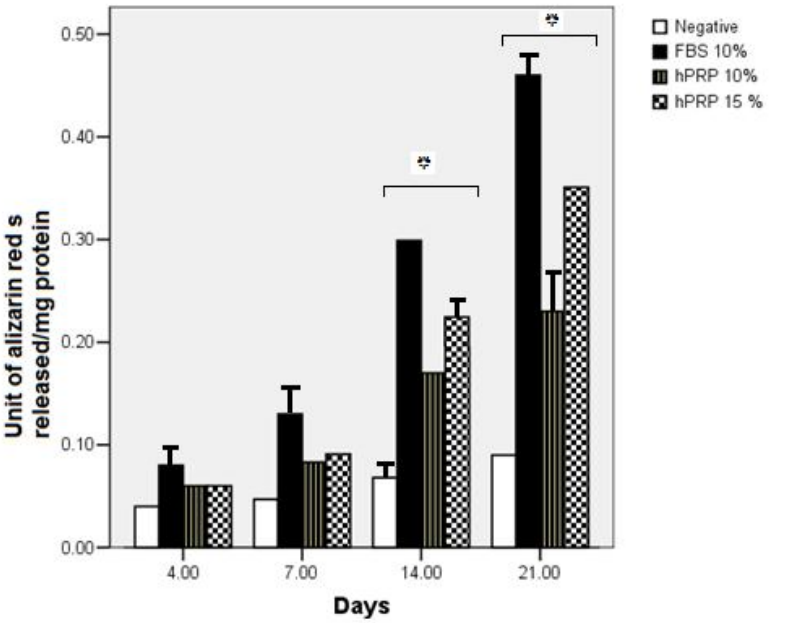


شکل (۳): اثرات گروه‌های موردمطالعه بر روند تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی در روز سوم (هر آزمایش ۳ بار تکرار شد و نتایج به‌صورت Mean ± SD نشان داده شده است). (*: p<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل منفی. **: p<۰/۰۰۱در مقایسه با گروه کنترل مثبت).

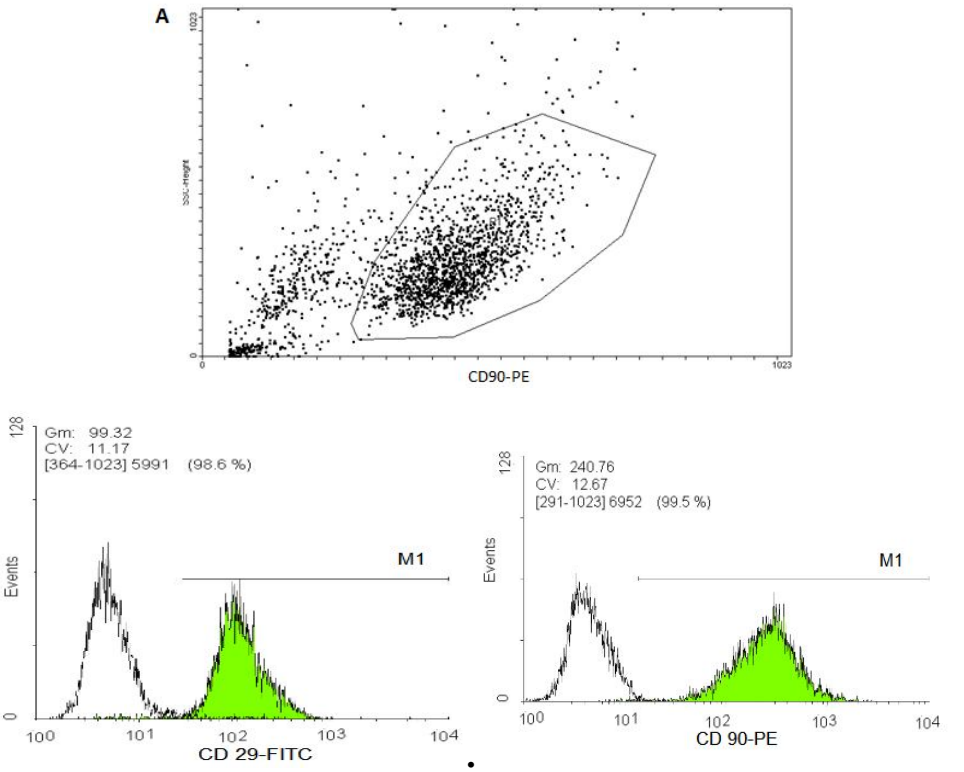
	گروه 4: 15PRP درصد	گروه 3: 10RPR درصد	گروه 2: 10FBS درصد	گروه 1: کنترل منفی
روز 14				
روز 21				

شکل (۴): رنگ‌آمیزی آلیزارین رد سلول‌های بنیادی مزانشیمی گروه‌های موردمطالعه تحت شرایط تمایزی به سمت استخوان در روزهای ۱۴ و ۲۱

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-27]



شکل (۵): روند بررسی مینرالیزاسیون سلول‌های کشت داده شده هر گروه در محیط تمایزی استئوژنیک در طی روزهای ۴، ۷، ۱۴ و ۲۱(هر آزمایش ۳ بار تکرار شد و نتایج به‌صورت Mean ± SD نشان داده شده است). (*:p<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل منفی در روزهای ۱۴ و ۲۱)



شکل (۶): آنالیز فلوسایتومتری ADSC بعد از پاساژ سوم. آنالیز فلوسایتومتری در این مطالعه نشان داد سلول‌های استخراج‌شده در این مطالعه مارکرهای سطح سلول‌های MSC ها را به‌طور چشمگیری بیان می‌کنند.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-27]

بحث

این مطالعه نشانمی دهد FBS می‌تواند توسط PRP در سیستم‌های محیط کشت سلولی جایگزین شود. در مطالعه ما، از محیط‌های کشت حاوی PRP ۱۰ درصد و ۱۵ درصد برای تکثیر و تمایز به استخوان ADSC ها استفاده گردید. برای کاربرد بالینی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، سه ویژگی باید در نظر گرفته شود: نخست این سلول‌ها باید به‌صورت آسان قادر به استخراج، کشت و گسترش در شرایط آزمایشگاهی باشند چراکه برای کاربردهای بالینی به تعداد بالای سلول نیاز می‌باشد. دوم اینکه این سلول‌ها نباید در هنگام پیوند در فرد گیرنده ایجاد پاسخ ایمنی نمایند. درنهایت برای گسترش این سلول‌ها در آزمایشگاه نباید از ترکیبات خارجی و زیان‌آور در شرایط کشت استفاده شود (۱۵).

امروزه به‌طور رایج از FBS برای تکثیر و تمایز به استخوان MSC ها استفاده می‌شود و نتایج قابل قبولی دیده می‌شود؛ اما برای کاربردهای پزشکی باید از ترکیبات کاملاً ایمن و بی‌خطر استفاده شود. بنابراین باید جایگزین مناسبی برای FBS در شرایط کشت سلولی استفاده شود(۷). هرچند اثرات درمانی PRP هنوز در دست بررسی و تحقیقات می‌باشد، مطالعات متعددی نشان داده است PRP منجر به بهبود روند تشکیل استخوان می‌شود. PRP حاوی فاکتورهای رشد متعدد به‌خصوص PDGF-AB و TGF-β می‌باشد که اثرات مهمی در ترمیم بافت استخوان دارند.PRP می‌تواند به‌آسانی از منابع اتولوگوس مانند خون کامل محیطی به مقدار زیاد و بدون بروز آسیب تهیه شود(۱۳).

در این مطالعه، بر طبق مطالعات گذشته PRP در pH فیزیولوژیک تنظیم شد، نه‌فقط به این دلیل که pH اسیدی (۶/۹-۷/۱) منجر به واکنش‌های ناخواسته می‌شود، بلکه فاکتورهای رشد در pH های مختلف دارای عملکرد متفاوتی هستند. همچنین مطالعه دیگری نشان می‌دهد PRP دارای pH قلیایی ترکیباتی آزاد می‌کند که دارای اثر تحریک‌کننده تکثیر سلولی می‌باشد.

برای فعال‌سازی PRP دو روش وجود دارد. در اولین روش از ترکیب کلسیم و ترومبین استفاده می‌شود. در مطالعات دیگر از روش انجماد و ذوب متوالی استفاده می‌شود. حذف ترومبین در فعال‌سازی به این دلیل اهمیت دارد که ترومبین های استفاده شده به‌صورت تجاری دارای منشأ حیوانی هستند و بنابراین منجر به واکنش‌های ناخواسته به‌ویژه واکنش‌های ایمنی می‌گردند. به همین دلایل در این مطالعه از روش انجماد استفاده گردید (۱۰).

امروزه مطالعات زیادی روی استفاده از فاکتورهای رشد PRP به‌عنوان جایگزین مناسب FBS در سیستم‌های کشت سلول‌های متنوع ازجمله MSC ها، سلول‌های استرومائی، فیبروبلاست‌ها و استئوبلاست‌ها متمرکز شده است. هرچند نتایج متناقضی درباره‌ی اثرات PRP از این مطالعات به‌دست‌آمده است. در مطالعه‌ای که توسط Plachokova و همکارانش در سال ۲۰۰۷ به‌صورت درون تنی صورت گرفت، نشان داده شد PRP هیچ‌گونه اثر مفیدی در القای تمایز سلول‌های بنیادی به استخوان در موش صحرایی ندارد(۲۳). همچنین Choi و همکاران در سال ۲۰۰۷ به‌صورت درون تنی نشان دادند PRP اثر مفیدی در ترمیم استخوان آرواره ندارد(۲۴).

مطالعات زیادی نشان داده است که PRP پتانسیل تکثیر و تمایز MSC ها را بهبود می‌بخشد (۱۰). نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه، هم‌راستا با نتایج به‌دست‌آمده از مطالعات Watatani و همکاران در سال ۲۰۰۳، Kakudo و همکاران در سال ۲۰۰۸، Vogel و همکاران در سال ۲۰۰۶، Huang و همکاران در سال ۲۰۱۰، Lee و همکاران در سال ۲۰۱۱، Mishra و همکاران در سال ۲۰۰۹ و Liu و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان می‌دهد PRP قدرت تکثیر و تمایز سلول‌های متنوع ازجمله MSC ها، سلول‌های استرومائی، فیبروبلاست‌ها و استئوبلاست‌ها را بهبود می‌بخشد. همچنین غلظت ۱۵ درصد PRP دارای اثر بیشتر بروی تکثیر سلول‌های موردنظر می‌باشد که بر طبق نتایج به‌دست‌آمده از مطالعات گذشته، اثرات PRP وابسته به دوز بوده و با افزایش غلظت، اثراتش افزایش پیدا می‌کند(۲۰-۱۸،۶-۴).Weibrich و همکاران در سال ۲۰۰۸ اثبات کردند PRP بدون محدود کردن شرایط تمایزی و تغییر ایمونوفنوتیپ این سلول‌ها منجر به افزایش تکثیر MSC ها می‌شود (۲۵).

بر طبق مطالعات گذشته، اندازه‌گیری میزان مینرالیزاسیون سلولی شاخص مناسب تشکیل استخوان می‌باشد (۲۶). در بررسی نتایج تمایز به استخوان، نتایج به‌دست‌آمده در این مطالعه، هم‌راستا با نتایج به‌دست‌آمده در مطالعات Liuو همکاران در سال ۲۰۰۸، Choi و همکاران در سال ۲۰۰۷ و Plachokova و همکاران در سال ۲۰۰۵ می‌باشد (۲۴، ۲۳، ۱۱). اثرات گروه‌های موردمطالعه در آزمون مینرالیزاسیون به این صورت می‌باشد: ۱۰ درصد FBS> ۱۵ درصد PRP > ۱۰ درصد PRP؛ اما با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در مطالعه Mishra وهمکاران در سال ۲۰۰۹،PRP می‌تواند تمایز به استخوان را بهبود بخشد و در مقایسه با FBS نتایج بهتری نشان دهد (۱۰).

Lee و همکاران در سال ۲۰۱۰ اثرات PRP تهیه‌شده از خون بند ناف (UCB-PRP)را روی تکثیر و تمایز به استخوان MSC ها مطالعه کردند. این مطالعه منطبق با نتایج مطالعه ما نشان داد UCB-PRP می‌تواند تکثیر و تمایز به استخوان این سلول‌ها را بهبود بخشد (۱۵).

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-27]

نتیجه‌گیری

نتایج ما نشان می‌دهد FBS می‌تواند به‌وسیله‌ی PRP جایگزین شود، به دلیل اینکه PRP منجر به افزایش روند تکثیر سلولی می‌شود. اثرات PRP وابسته به دوز می‌باشد و PRP ۱۵ درصد بیشترین میزان تکثیر را نشان می‌دهد. FBS اثرات بهتری نسبت به PRP در تمایز به استخوان دارد، اما به دلیل اینکه ترکیبات خارجی همچون FBS باید از محیط کشت حذف شود، PRP می‌تواند در محیط کشت سلول‌ها برای اهداف بالینی جایگزین مناسبی باشد.

References:

1. Liao W, Zhong J, Yu J, Xie J, Liu Y, Du L, et al. Therapeutic benefit of human umbilical cord derived mesenchymal stromal cells in intracerebral hemorrhage rat: implications of anti-inflammation and angiogenesis. Cell Physiol Biochem 2009;24(3-4):307–16.
2. Wilson A BP, Seifalian A. Adipose derived stem cells for clinical applications: a review. Cell proliferation 2011;44(1):86-98.
3. Yarak S, Okamoto OK. Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives. An Bras Dermatol 2010;85(5):647–56.
4. Baghban eslaminezhad m, taghiyar l, piriaei a. A comparative study between the structure of cartilage tissue produced from murine mscs differentiation and hyaline costal cartilage. J Mazandaran Univ Med Sci 2007;17(59):24-34.
5. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Molecular biology of the cell 2002;13(12):4279-95.
6. Honn KV, Singley JA, Chavin W. Fetal bovine serum: a multivariate standard. Proc Soc Exp Biol Med 1975;149(2):344–7.
7. Erickson GA, Bolin SR, Landgraf JG. Viral contamination of fetal bovine serum used for tissue culture: risks and concerns. Dev Biol Stand 1991;75:173–5.
8. Lupi O. Prions in dermatology. J Am Acad Dermatol 2002;46(5):790–3.
9. Bieback K, Hecker A, Kocaömer A, Lannert H, Schallmoser K, Strunk D, et al. Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. Stem Cells 2009;27(9):2331-41.
10. Mishra A, Tummala P, King A, Lee B, Kraus M, Tse V, et al. Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation. Tissue Engineering Part C: Methods 2009;15(3):431-5.
11. Liu Y ZY, Feng H, Ma G-e, Ni Y. Injectable tissue-engineered bone composed of human adipose-derived stromal cells and platelet-rich plasma. Biomaterials 2008;29(23):3338-45.
12. Li H, Liu D, Yu Y, Wu T. Experimental research of the promotion effect of autogeneic PRP on osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells in vitro. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi 2009;23(6):732–6.
13. Arpornmaeklong P, Kochel M, Depprich R, Kübler NR, Würzler KK. Influence of platelet-rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. An in vitro study. Int J Oral Maxillofac Surg 2004;33(1):60–70.
14. Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Reinisch A, Kashofer K, Stadelmeyer E, et al. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical□scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. Transfusion 2007;47(8):1436-46.
15. Lee J-Y, Nam H, Park Y-J, Lee S-J, Chung C-P, Han S-B, et al. The effects of platelet-rich plasma derived from human umbilical cord blood on the osteogenic differentiation of human dental stem cells. In Vitro Cell Dev Biol Anim 2011;47(2):157–64.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-27]

16. Taha MF HVI, identification and multipotential differentiation of mouse adipose tissue-derived stem cells. Tissue cell 2010;42(4):211-6.
17. Rada T, Santos TC, Marques AP, Correlo VM, Frias AM, Castro AG, et al. Osteogenic differentiation of two distinct subpopulations of human adipose-derived stem cells: an in vitro and in vivo study. J Tissue Eng Regen Med 2012;6(1):1–11.
18. Ahmed SA, Gogal RM, Walsh JE. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. J Immunol Methods 1994;170(2):211–24.
19. Nociari MM, Shalev A, Benias P, Russo C. A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. J Immunol Methods 1998;213(2):157–67.
20. Shahan TA SP, Sorenson WG, Kuschner WG, Lewis DM. A sensitive new bioassay for tumor necrosis factor. J Immunol Methods 1994;175(2):181-7.
21. Anoopkumar-Dukie S, Carey JB, Conere T, O'Sullivan E, Van Pelt FN, Allshire A. Resazurin assay of radiation response in cultured cells. Br J Radio 2005;78(934):945-7.
22. Sila-Asna M, Bunyaratvej A, Maeda S, Kitaguchi H, Bunyaratavej N. Osteoblast differentiation and bone formation gene expression in strontium-inducing bone marrow mesenchymal stem cell. Kobe J Med Sci 2007;53(1-2):25-35.
23. Plachokova AS, Van Den Dolder J, Stoelinga PJ, Jansen JA. Early effect of platelet□rich plasma on bone healing in combination with an osteoconductive material in rat cranial defects. Clin oral implants res 2007;18(2):244-51.
24. Choi B-H, Zhu S-J, Kim B-Y, Huh J-Y, Lee S-H, Jung J-H. Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an in vitro study. Int J Oral Maxillofac Surg 2005;34(4):420–4.
25. Weibrich G, Gnoth SH, Otto M, Reichert TE, Wagner W. Growth stimulation of human osteoblast-like cells by thrombocyte concentrates in vitro. Mund Kiefer Gesichtschir 2002;6(3):168–74.
26. Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. Endocrine Rev 1993;14(4):424-42.

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-27]

Original Article

INVESTIGATING PLATELET RICH PLASMA EFFECTS ON ADIPOSE-DERIVED STROMAL CELLSPROLIFERATION AND DIFFERENTIATION TO OSTEOBLAST

Mohsen Khosravi[1], Nasser Sanjar Mossavi[2], Seyyed Mohammad Reza Parizadeh[3], Hemat Aghagolzade Haji[4]*

Received: 10 Apr, 2014; Accepted: 12 Jun, 2014

Abstract

Background & Aims: The cultured mesenchymal stem cells (MSCs) have been applied in many clinical trials and there are some concerns about the culture conditions. One of them is related to the use of fetal bovine serum (FBS). FBS is a xoengenic supplement withadverse effects which is used widely in culture system and many attempts have been done to eliminate it. Platelet rich plasma (PRP) is a candidate in the place of FBS.

Materials & Methods: Adipose-derived stromal cells (ADSCs) were isolated from liposuction tissues and cultured in αMEM with 10% FBS. Cells of the third passage were used for the in vitro experiments and characterized by flowcytometric analysis. PRP was obtained by two-step centrifugation and PRP sample were activated by freezing method. Resazurinand mineralization assays were used to determine the effects of PRP on cell proliferation and osteogenic differentiation.

Results: Treatment with PRP resulted in a statistically significant increase cell proliferation and mineralization in comparison to negative control ($P<0.001$) and that of the 15% PRP group significantly was higher than that of 10% PRP group ($P<0.05$). FBS showed the osteogenic differentiation of ADSCs better than hPRP.

Conclusions: These findings indicate that PRP improves the proliferation and osteogenic differentiation of ADSCs. Obviously, the biological effects of PRP were dose-dependent and can be a useful solution for clinical applications in the place of FBS. However, for the clinical application of PRP, more research is needed such as in vivo transplantation.

Keywords: Platelet rich plasma, Adipose-derived stromal cells, Cell differentiation, Cell proliferation, Fetal bovine serum

Address: Department of Clinical Biochemistry, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran, ***Tel***: +98 9124511983
Email: khosravi.dara681@gmail.com

SOURCE: URMIA MED J 2014: 25(5): 462 ISSN: 1027-3727

[1] *Master in Biochemistry, Department of Clinical Biochemistry, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran (Corresponding Author)*
[2] *Assistant Professor, Department of Surgery, Faculty of Medicine, Islamic Azad University, Mashhad Branch, Iran*
[3] *Professor of Clinical Biochemistry, Mashhad University Medical Sciences, Mashhad, Iran*
[4] *Master in Biochemistry, Department of Clinical Biochemistry, Gorgan University Medical Sciences, Golestan, Iran*

[Downloaded from umj.umsu.ac.ir on 2024-04-27]