DOI: 10.22122/jims.v36i466.9039 Published by Vesnu Publications

مجله دانشکده پزشکی اصفهان سال سی و ششم/شماره‌ی ۴۶۶/هفته‌ی دوم فروردین ۱۳۹۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۷/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۱۸ تاریخ چاپ: ۱۳۹۷/۱/۸

# بررسی غلظت‌های مختلف پلاسمای غنی از پلاکت بر تمایز استئوبلاستی سلول‌های استرومای مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسانی

مریم چراغ‌زاده[۱]، علیرضا خیراله[۲]، هنا حنایی اهواز[۳]، حمید گله‌داری[۴]

مقاله پژوهشی

## چکیده

**مقدمه:** سلول‌های استرومایی مزانشیمی (Mesenchymal stem cells یا MSCs)، سلول‌های بنیادی با توان تمایزی بالا می‌باشند که طی دهه‌ی گذشته کاربرد آن‌ها در زمینه‌ی تمایز استخوان به صورت درون‌تن و برون‌تن مورد پژوهش واقع شده و استفاده از پلاسمای غنی از پلاکت (Platelet-rich plasma یا PRP)، می‌تواند این روند را تسریع کند. با توجه به محدودیت مطالعات انسانی در این زمینه و مشخص نبودن غلظت ایده‌آل پلاسمای غنی از پلاکت، پژوهش حاضر با هدف مقایسه‌ی غلظت‌های کاربردی این ماده بر روند تمایز استئوبلاستی سلول‌های مزانشیمی انسانی انجام شد.

**روش‌ها:** سلول‌های مزانشیمی از بافت چربی انسانی استخراج و به رده‌ی سلولی استخوان تمایز داده شدند و اثر غلظت‌های ۱۰ و ۱۵ درصد پلاسمای غنی از پلاکت بر میزان تمایز استخوانی، با اندازه‌گیری شاخص‌های بیوشیمیایی شامل فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و میزان رسوب کلسیم و بررسی میزان بیان ژن‌های RUNX2 و Osteocalcin، به روش Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) سنجیده شد.

**یافته‌ها:** سلول‌های برگرفته از بافت چربی انسانی، با دارا بودن قدرت تمایز به رده‌ی سلولی چربی و استخوان، می‌توانند در غلظت ۱۰ درصد پلاسمای غنی از پلاکت علاوه بر تمایز زودرس استخوانی، افزایش معنی‌داری در بیان ژن‌های نشانگر استخوانی، فعالیت آنزیم و رسوب کلسیم نسبت سایر گروه‌ها نشان دهند.

**نتیجه‌گیری:** پلاسمای غنی از پلاکت فعال شده به عنوان یک کاتالیزور بیولوژیک اثر آشکار و متفاوتی را بر تمایز استخوانی سلول‌های مزانشیمی انسانی در غلظت‌های مختلف نشان داد؛ به گونه‌ای که شروع روند تمایز استئوژنیک در پلاسمای غنی از پلاکت ۱۰ درصد نسبت به سایر گروه‌ها زودتر مشاهده شد. تحقیقات آتی در این زمینه، می‌تواند نویدبخش بهبود کاربرد بالینی این ماده در بازسازی استخوان باشد.

**واژگان کلیدی:** پلاسمای غنی از پلاکت، سلول‌های استرومایی مزانشیمی، تمایز سلولی، استئوبلاست

**ارجاع:** چراغ‌زاده مریم، خیراله علیرضا، حنایی اهواز هنا، گله‌داری حمید. **بررسی غلظت‌های مختلف پلاسمای غنی از پلاکت بر تمایز استئوبلاستی سلول‌های استرومای مزانشیمی مشتق از بافت چربی انسانی.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۷؛ ۳۶ (۴۶۶): ۶۳-۵۶

## مقدمه

سلول‌های استرومایی مزانشیمی (Mesenchymal stem cells یا MSCs)، سلول‌های چند توانی هستند که قابلیت تمایز به چند رده‌ی محدود از انواع سلول‌ها نظیر آدیپوسیت، استئوبلاست، کندروسیت و سلول‌های اندوتلیال را از خود نشان می‌دهند (۱). در سال ۱۹۷۰، Friedenstein وهمکاران، برای اولین بار حضور جمعیتی از سلول‌های بنیادی غیر هماتوپوئیتیک (Nonhematopoietic stem cell) را در استرومای مغز استخوان گزارش نمود و گروه همکاران وی، اولین کسانی بودند که توان تمایزی این سلول‌ها را به سلول‌های استخوانی نشان دادند (۲). این دسته از سلول‌ها، از بافت‌های مختلف نظیر خون محیطی، بافت چربی، خون بند ناف، غشاهای زلالی‌ای (Synovial membrane)، دندان‌های عقل و مایع آمنیوتیک جداسازی شدند (۳). بازسازی استخوان بعد از آسیب و شکست، از جمله آسیب‌هایی است که سلول‌های مزانشیمی در ترمیم آن نقش

۱- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی پزشکی و مرکز تحقیقات سلولی و ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور، اهواز، ایران

۳- استادیار، مرکز تحقیقات فن‌آوری بن‌یاخته، تهران، ایران

۴- استاد، گروه ژنتیک، دانشکده‌ی علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

**نویسنده‌ی مسؤول:** حمید گله‌داری

Email: galehdari187@yahoo.com

فعال دارند و سلول‌های مزانشیمی پس از فراخوانی به ناحیه‌ی آسیب، به کندروسیت و استئوبلاست متمایز می‌شوند (۵-۴) و علاوه بر نقش مستقیم در شکل‌گیری کندروسیت و استئوبلاست، از طریق تولید و ترشح سیتوکاین‌ها و عوامل رشد ، تنظیم رگ‌زایی و متعادل‌سازی ایمنی به طور غیر مستقیم نیز در این فرایند ایفای نقش می‌کنند (۶).

در حالی که از روش‌های تزریق مستقیم سلول‌های مزانشیمی و یا قرار دادن این سلول‌ها در اسکافولدها برای تسریع درمان شکستگی‌های استخوانی استفاده می‌شود، استفاده از کاتالیزورهایی که این روند را تسریع می‌کنند نیز در حال پیشرفت می‌باشد. این کاتالیزورها، باید تمایز و تکثیر سلول‌های مزانشیمی را بهبود ببخشند و در عین ارزان بودن و دسترسی سریع و سازگاری با شرایط بیولوژیکی بدن، تأثیری بر ساختار سلولی و بیولوژیکی سلول‌های مزانشیمی نداشته باشند. یکی از پرکاربردترین این کاتالیزورها، پلاسمای غنی از پلاکت (Platelet- rich plasma یا PRP) می‌باشد که چندین نوع عامل رشد دارد و برای اولین بار در سال ۲۰۰۷ مشخص شد که این ماده دارای عوامل رشد لازم برای استخوان‌سازی است (۷).

پلاسمای غنی از پلاکت برای اولین بار در سال ۱۹۱۴ توسط Dimond کشف گردید و تا چهار دهه تصور بر این بود که فقط در سیستم هماتوپوئتیک مؤثر است (۷). تا این که در سال ۱۹۷۴، Ross و همکاران حین کار با سلول عضلانی، متوجه شدند اضافه کردن پلاکت و کلسیم خاصیت میتوژنی و رشد سلول‌ها را افزایش می‌دهد (۸). برخی گزارش‌های جدید حاکی از حضور حدود ۶۰۰ عامل رشد در PRP است که مسؤول تمایز، بازسازی زخم و بافت هستند (۹). برخی محققین معتقدند که پلاکت‌ها به علت ترشح پپتیدهای آنتی‌میکروبیال، خاصیت آنتی‌بیوتیکی و ضد التهابی نیز دارند (۱۱-۱۰).

این عوامل رشد، زمانی آزاد می‌شود که پلاکت‌ها توسط برخی عوامل نظیر کلاژن، ترومبین، سروتونین، کلسیم و منیزیم، ترومبوکسان و یا عوامل مکانیکی مانند چرخه‌های فریز کردن، فعال شوند.به تازگی، به طور هم‌زمان با افزایش کاربرد سلول‌های مزانشیمی در پزشکی بازساختی، درمان با PRP نیز در حال گسترش می‌باشد و از این ماده در بازسازی استخوانی و جراحی‌های ارتوپدی استفاده می‌شود (۱۳-۱۲).

با وجود کاربرد این ماده در بالین، همچنان پژوهش‌های In vitro بر روی این ماده طی سال‌های اخیر بسیار مورد توجه پژوهشگران بوده است؛ چرا که داده‌های به دست آمده از مطالعات انسانی محدود می‌باشند و زمان بیشتری نیاز است تا با دلایل محکم بتوان نقش دقیق بالینی PRP را مشخص کرد. در حالی که تأثیر پلاسمای غنی از پلاکت بر سلول های مزانشیمی مغز استخوان و چربی، به طور گسترده مورد بررسی واقع شده است، اما نقطه‌ی ضعف تمام این پژوهش‌ها، نبود توافق در کاربرد غلظت‌های مختلف این ماده است. بر طبق آن چه گفته شد، هدف از انجام این پژوهش، ارزیابی غلظت‌های کاربردی PRP بر تمایز استئوژنیک بود تا از این طریق، غلظت بهینه جهت تسریع و تسهیل تحریک تمایز استئوژنیک جهت پژوهش‌های آتی، پیشنهاد گردد.

## روش‌ها

***مواد:*** در این مطالعه، از آنزیم کلاژناز، انسولین، دگزامتازون، ایندومتاسین، بتا گلیسرول فسفات، اسکوربیک اسید بی‌فسفات و آمفوتریسین (Sigma, USA)، آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین (Atocell, Hungary)، Fetal bovine serum (FBS) (Gibco, USA)، محیط کشت Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) و آنزیم Trypsin/Ethylenediaminetetraacetic acid (trypsin/EDTA) (بیوایده، ایران) استفاده شد.

***جداسازی و فعال‌سازی پلاسمای غنی از پلاکت:*** نمونه‌ی خون هپارینه با رضایت از افراد گرفته شد و در شرایط استریل به مدت ۱۰ دقیقه با شتاب ۱۳۴۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و لایه‌ی میانی که حاوی پلاکت بود، به همراه پلاسما به لوله‌ی جدید منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه با شتاب ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب پلاکت‌ها به منظور فعال‌سازی به همراه کلرید کلسیم ۲۰ درصد به مدت دو ساعت در فریزر ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید.

***استخراج و کشت سلول های استرومایی مزانشیمی از بافت چربی:*** نمونه‌های بافت چربی انسانی از متقاضیان جراحی‌های زیبایی ابدومینوپلاستی مراجعه کننده به بیمارستان طالقانی اهواز (n = ۶) با کسب رضایت کتبی، به صورت استریل و در محلول بافری Phosphate buffered saline (PBS) حاوی آنتی‌بیوتیک و ضد قارچ، جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. تمام مراحل کار در شرایط استریل و طبق شیوه‌نامه‌ی چاپ شده در مقاله‌ی پیشین انجام شد (۱۴). سلول‌های جدا شده در محیط کشت DMEM و FBS ۱۰ درصد، پنی‌سیلین و استرپتومایسین و آمفوتریسین ۱ درصد و شرایط ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و دی‌اکسید کربن ($CO_2$) ۵ درصد و میزان رطوبت ۹۵ درصد انکوبه گردید. تعویض محیط هر سه روز یک بار انجام شد و سلول‌ها در تراکم ۸۰ درصد با استفاده از آنزیم trypsin/EDTA ۰/۰۱ درصد پاساژ داده شدند.

همچنین، میزان بیان نشانگرهای مزانشیمی و هماتوپوئتیک شامل CD45، CD34، CD90 و CD105 با تکنیک فلوسایتومتری سنجیده

شد. به طور خلاصه، پاساژ سوم سلول‌های مزانشیمی انسانی پس از جمع‌آوری توسط آنتی‌بادی Fluorescein isothiocyanate-conjugated (FITC-conjugated) و Phycoerythrin-conjugated برای نشانگرهای CD مورد نظر رنگ‌آمیزی شدند. همچنین، گروه شاهد منفی نیز با استفاده از Mouse anti-human Immunoglobulin G مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت، نتایج با نرم‌افزار WinMDI واکاوی گردید.

***تمایز به رده‌های سلولی آدیپوسیت و استئوبلاست:*** پاساژ سوم سلول‌های مزانشیمی انسانی جهت تمایز در پلیت‌های شش خانه و با تراکم $10^3 \times 5$ سانتی‌مترمربع قرار گرفتند و سلول‌ها به طور جداگانه با محیط تمایزی چربی شامل 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) ۰/۵ میلی‌مولار، دگزامتازون $10^{-7}$ میلی‌مولار، انسولین ۶۶ نانومولار، ایندومتاسین ۰/۲ میلی‌مولار و محیط تمایزی استخوان حاوی دگزامتازون $10^{-7}$ میلی‌مولار، Beta glycerol phosphate ۱۰ میلی‌مولار و همچنین Ascorbic Acid bi-phosphate ۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر تیمار شدند. محیط تمایزی هر دو روز یک بار تعویض گردید.

***رنگ‌آمیزی اختصاصی چربی و استخوان:*** در روز ۲۱ از شروع تمایز، محیط کشت خارج شد و سلول‌ها پس از شستشو با PBS توسط فرمالین ۱۰ درصد تثبیت شد و پس از حذف فرمالین، در معرض رنگ اختصاصی چربی شامل Oil red ۰/۳ درصد به مدت ۱۵ دقیقه در ایزوپروپانول و سپس، جهت مشاهده‌ی قطرات چربی، مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند. رنگ اختصاصی جهت تأیید تمایز استئوبلاست شامل Alizarin red ۱/۵ درصد بود که سلول‌ها پس از تثبیت با فرمالین به مدت ۴۰ دقیقه در معرض آن قرار گرفتند و پس از چندین بار شستشو با آب، جهت زدودن بقایای رنگ، با میکروسکوپ بررسی شدند.

***اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و رسوب کلسیم:*** در روزهای ۷ و ۱۴ از دوره‌ی تمایزی استخوان، استخراج پروتئین با به کارگیری بافر Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) انجام شد و میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز بر طبق شیوه‌نامه‌ی کیت پارس آزمون (ایران) و خواندن میزان جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر با استفاده از دستگاه Enzyme-linked immunosorbent assay reader (ELISA reader) (Biotech, USA) به دست آمد. همچنین، رسوب کلسیم با استفاده از Hydrochloric acid 0.6 N (HCL 0.6N) جمع‌آوری شد و طبق دستور کیت مخصوص (پارس آزمون، ایران)، میزان جذب نوری در طول موج ۶۳۰ نانومتر به دست آمد و با استفاده از منحنی استاندارد، میزان کلسیم موجود در هر نمونه محاسبه گردید. میزان تام پروتئین نیز در هر مورد با استفاده از روش Lowry محاسبه و در نهایت، داده‌های به دست آمده از آزمون رنگ‌سنجی بر اساس میزان تام پروتئین طبیعی شدند.

***انکوباسیون سلول های مزانشیمی انسانی با پلاسمای غنی از پلاکت:*** سلول‌های مزانشیمی انسانی با تراکم $10^3 \times 5$ سانتی‌مترمربع در پلیت‌های شش خانه قرار گرفت و در چهار گروه شامل دو گروه PRP ۱۰ درصد (DMEM و PRP ۱۰ درصد) و PRP ۱۵ درصد (DMEM و PRP ۱۵ درصد)، گروه شاهد (DMEM و FBS ۱۰ درصد) و گروه Gold standard medium (دگزامتازون $10^{-7}$ میلی‌مولار، Beta glycerol phosphate ۱۰ میلی‌مولار، Ascorbic Acid bi-phosphate ۵۰ میکروگرم/میلی‌لیتر، DMEM و FBS ۱۰ درصد) به طور همزمان مورد تیمار قرارگرفتند.

***استخراج RNA Total، سنتز cDNA و Quantitative real time PCR.*** RNA تام (Total RNA) با استفاده از ترایزول (Invitrogen ,USA) طبق شیوه‌نامه‌ی شرکت سازنده استخراج گردید. سنتز complementary DNA (cDNA) طبق کیت مخصوص (Takara, Japan) و با استفاده از پرایمرهای راندوم هگزامر و الیگو dt، انجام شد. در نهایت، میزان بیان ژن‌های RUNX2, OCN، با استفاده از کیت Master mix SYBR green (Takara, Japan)، در همه‌ی گروه‌ها در مقابل گروه شاهد با روش مقایسه‌ای ($2^{-\Delta\Delta CT}$) CT و استفاده از Beta2- Microglobulin به عنوان شاهد داخلی به دست آمد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است.

**جدول ۱. توالی پرایمرهای انسانی مورد استفاده در Real time polymerase chain reaction (Real-time PCR)**

| ژن | توالی پرایمر |
|---|---|
| B2M | F: ATG CCT GCC GTG TGA AC<br>R: ATC TTC AAA CCT CCA TGA TG |
| OCN | F: GCA AAG GTG CAG CCT TTG TG<br>R: GGC TCC CAG CCA TTG ATA CAG |
| RUNX2 | F: GCC TTC AAG GTG GTA GCC C<br>R: CGT TAC CCG CCA TGA CAG TA |

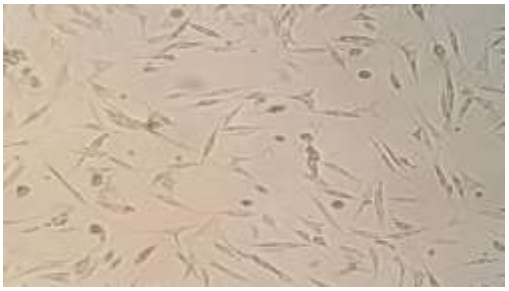
***واکاوی آماری:*** بررسی آماری این مطالعه با استفاده از آزمون ANOVA با سطح معنی‌داری $P < ۰/۰۵۰$ و میانگین ± انحراف معیار در نرم‌افزار GraphPad Prism6.07(2015) انجام شد. تمام داده‌ها بر اساس سه تکرار بیولوژیک به دست آمد.

## یافته‌ها

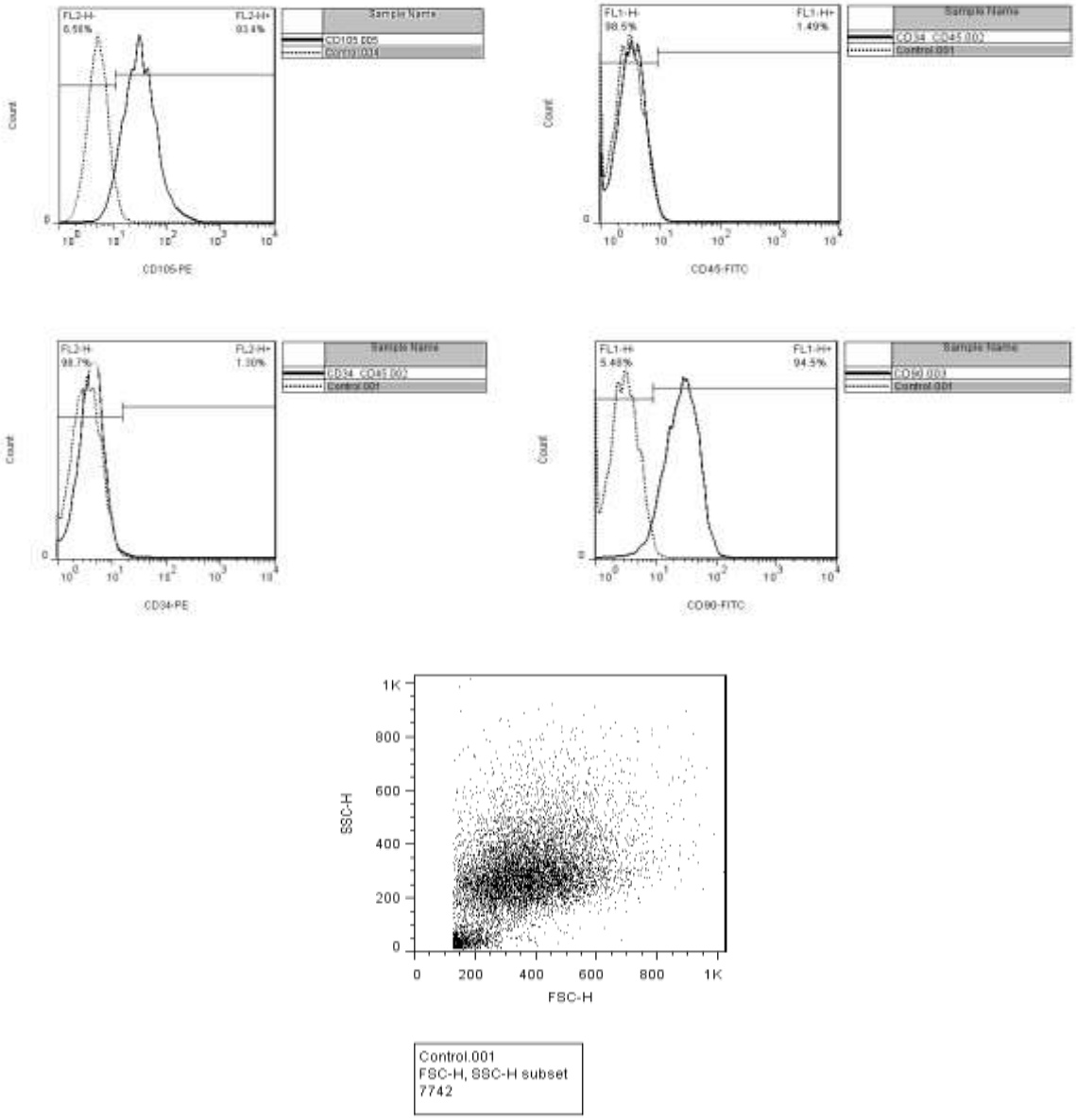
سلول‌های استرومایی مزانشیمی انسانی (Human mesenchymal stem cells)

یا hMSCs)، طبق روش پیش‌گفته، از بافت آدیپوز انسانی جداسازی و کشت داده شد و مورفولوژی سلول‌ها با میکروسکوپ معکوس مورد ارزیابی واقع گردید (شکل ۱).

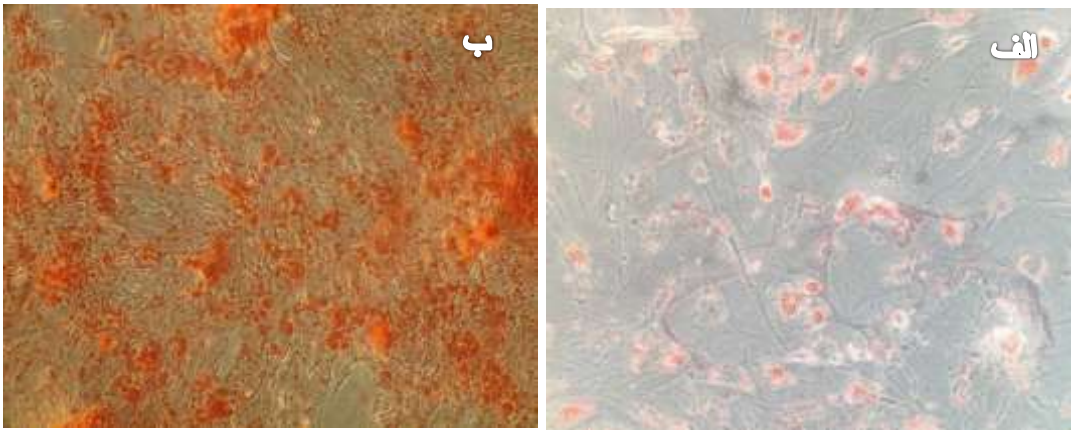
نشانگرهای مزانشیمال و هماتوپوئتیک با روش فلوسایتومتری و با استفاده از آنتی بادی اختصاصی مورد ارزیابی واقع گردید. میزان بیان نشانگر هماتوپوئتیک CD34 و CD45 بسیار کم و در حدود ۱/۵ درصد و بیان نشانگر مزانشیمال CD105 و CD90 در حدود ۹۴ درصد به دست آمد (شکل ۲).



**شکل ۱. سلول‌های استرومایی مزانشیمی جدا شده از بافت چربی انسانی در روز هفتم کشت پرایمری.بزرگ‌نمایی 10X**




**شکل ۲. میزان بیان نشانگرهای سطحی CD90، CD105، CD34 و CD45 در سلول‌های جدا شده از بافت چربی انسانی**




**شکل ۳. رنگ‌آمیزی اختصاصی الف) Oil red برای چربی، ب) Alizarin red برای استخوان. بزرگ‌نمایی × ۱۰**

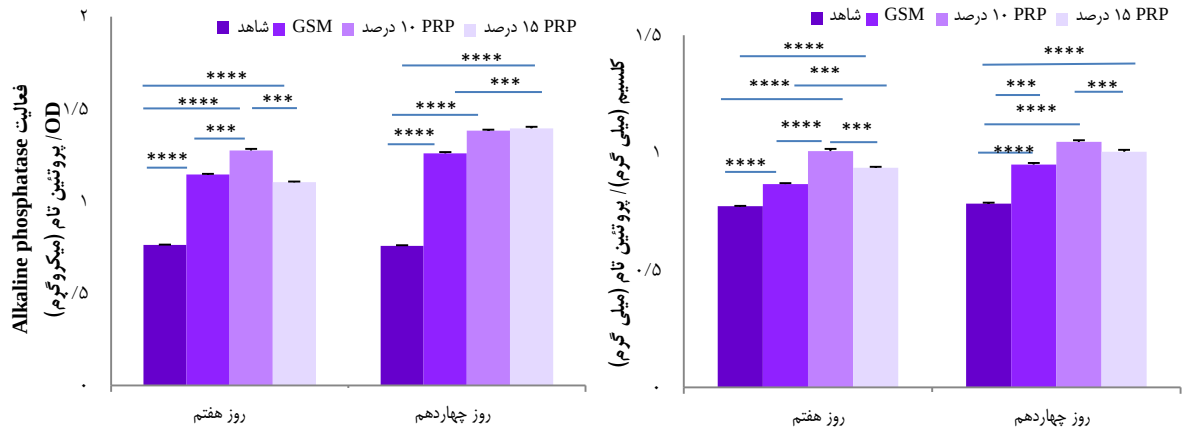
جهت تأیید توان تمایزی سلول‌های مزانشیمی جدا شده از بافت چربی، پاساژ سوم این سلول‌ها طبق شرایط ذکر شده در بخش روش‌ها، تحت تیمار تمایزی چربی و استخوان واقع شد و رنگ‌آمیزی اختصاصی انجام شد (شکل ۳).

گروه‌های مختلف مطالعه شامل شاهد، Gold standard medium (GSM)، PRP ۱۰ درصد و PRP ۱۵ درصد، تحت تیمار واقع شدند و نتایج حاصل از روش‌های سنجش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و میزان کلسیم در شکل ۴ نمایش داده شده است (شکل ۴). رسوب‌گذاری کلسیم در گروه تیمار شده با PRP ۱۰ درصد نسبت به سایر گروه‌های مورد مطالعه افزایش معنی‌داری ($P < ۰/۰۵$) در روزهای هفتم و چهاردهم تمایز نشان داد و همچنین، میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز نیز در این گروه در روز هفتم تمایز نسبت به گروه‌های دیگر به طور معنی‌داری بالاتر بود؛ در حالی که در روز چهاردهم، بین این گروه و گروه PRP ۱۵ درصد، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

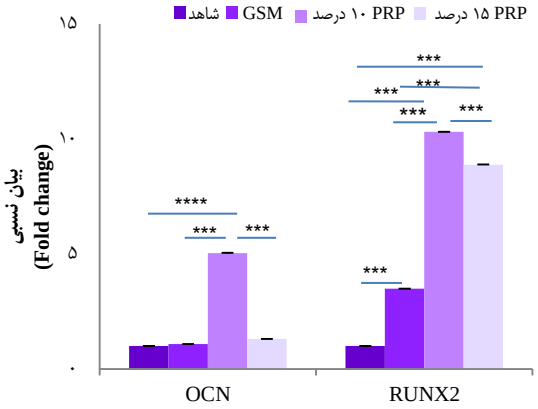
بیان ژن‌های Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) و Osteocalcin (OCN) نیز در روز هفتم تمایز به دست آمد که نتایج آن در شکل ۵ نشان داده شده است. بیان هر دو ژن که به عنوان نشانگرهای استئوژنیک مطرح هستند، در گروه PRP ۱۰ درصد نسبت به سایر گروه‌ها به طور معنی‌داری بالاتر بود.

## بحث

روش استاندارد در بهبود آسیب‌های مادرزادی و اکتسابی استخوان، پیوند اتولوگ استخوان می‌باشد، اما مشکلات و محدودیت‌های این گونه جراحی‌ها، باعث شده است راهبردهای جدیدی بر پایه‌ی مهندسی استخوان توسعه پیدا کند. یکی از روش‌های پیشرفته‌ی مواد زیستی (Biomaterial)، مهندسی بافت استخوان (Bone tissue engineering) می‌باشد که از سلول‌های استرومایی مزانشیمی بهره می‌برد (۱۵).




**شکل ۴. نمودار مربوط به فعالیت آنزیم Alkaline phosphatase (ALP) و میزان کلسیم در گروه‌های تمایزی. تغییر میزان رسوب‌گذاری کلسیم و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در غلظت‌های ۱۰ و ۱۵ درصد پلاسمای غنی از پلاکت (Platelet-rich plasma یا PRP) نسبت به گروه شاهد و گروه Gold standard medium (GSM) معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۵$).**




**شکل ۵. نمودار بیان ژن‌های Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) و Osteocalcin (OCN) در روز هفتم تمایز در گروه‌های شاهد، Gold standard medium (GSM) و غلظت‌های ۱۰ و ۱۵ درصد پلاسمای غنی از پلاکت Platelet-rich plasma یا (PRP) (P < ۰/۰۵)**

برای این که بتوان از این سلول‌ها در مهندسی استخوان بهره برد، باید جزئیات مکانیزم‌های تنظیمی استئوژنز (Osteogenesis) و راه‌های افزایش توان استئوژنیک سلول‌های مزانشیمی مشخص شود. پژوهش‌ها نشان داده است که استفاده از PRP، می‌تواند توان تمایزی سلول‌های ASCs را افزایش دهد.

نتایج فلوسایتومتری بر روی سلول‌های جدا شده از بافت چربی انسانی، بیان بالای نشانگرهای مزانشیمال و بیان جزیی نشانگرهای هماتوپوئتیک را در این پژوهش نشان داد. همچنین، هم‌راستا با سایر پژوهش‌ها مبنی بر توان چند بعدی MSCs، نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد جمعیت سلولی که از بافت چربی انسانی با روش پیش‌گفته جداسازی شدند، زمانی که با محیط اختصاصی چربی و استخوان کشت داده شدند، توان تمایزی به رده‌های چربی و استخوان نشان می‌دهند (شکل ۲).

در حالی که برخی پژوهش‌ها، پلاسمای غنی از پلاکت را به همراه محیط استاندارد تمایز استخوان جهت القای تمایز به کار می‌برند (۱۷-۱۶). مزیت پژوهش حاضر در کابرد پلاسمای غنی از پلاکت بدون اضافه کردن هر گونه محرک تمایز استئوژنیک مانند بتا گلیسرول فسفات، دگزامتازون و یا اسکوربیک اسید می‌باشد. در این پژوهش، نشان داده شد که حتی در غیاب محیط تمایزی استخوان، PRP به تنهایی باعث تمایز استئوبلاست شد. همچنین، مشخص گردید که فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و رسوب‌گذاری کلسیم در گروه‌های PRP نسبت به گروه GSM، بالاتر است؛ به طوری که در روز هفتم از زمان شروع تمایز، میزان Calcium deposition در دو گروه PRP ۱۰ و ۱۵ درصد، به طور معنی‌داری بالاتر از گروه استاندارد بود و گروه با غلظت ۱۰ درصد نیز نسبت به غلظت ۱۵ درصد افزایش معنی‌داری در میزان کلسیم نشان داد. میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در گروه PRP با غلظت ۱۰ درصد در روز هفتم نسبت به GSM بالاتر بود؛ در حالی که گروه PRP با غلظت ۱۵ درصد در این روز نسبت به گروه GSM فعالیت آنزیمی کمتری نشان داد. در روز چهاردهم، همچنان میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در گروه PRP ۱۰ درصد نسبت به گروه GSM بالاتر بود، اما اختلاف معنی‌داری با گروه PRP ۱۵ درصد نشان نداد. شاید دلیل این امر، آن باشد که فعالیت آنزیم Alkaline phosphatase (ALP) در گروه PRP ۱۵ درصد نسبت به دو گروه دیگر، دیرتر افزایش یافته است.

در طی روند تمایز برخی ژن‌ها مانند استئوکلسین و RUNX2 بیان می‌شوند و از این ژن‌ها به عنوان نشانگرهای ژنی تمایز استئوژنیک نام برده می‌شود. در این پژوهش، بیان این ژن‌ها در روز هفتم تمایز (روزهای میانی) سنجیده شد و همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، گروه GSM و گروه غلظتی ۱۵ درصد در روز هفتم افزایش بیان معنی‌داری در ژن استئوکلسین نداشتند؛ در صورتی که گروه PRP ۱۰ درصد در همان زمان افزایش بیان نشان داد.

افزایش بیان ژن RUNX2 در روز هفتم، در گروه‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱۰ و ۱۵ درصد PRP نسبت به گروه تیمار شده با محیط استاندارد تمایز استخوان، معنی‌دار بود و همچنین، گروه غلظتی ۱۰ درصد به طور معنی‌داری افزایش بیان بیشتری نسبت به گروه غلظتی ۱۵ درصد نشان داد.

در حالی که برخی پژوهش‌ها از وابسته به دوز بودن اثر PRP بر تمایز استخوان نام برده‌اند(۱۶)، نتایج پژوهش حاضر این گونه نبوده است و به طور کلی، با توجه به بالاتر بودن میزان رسوب‌گذاری کلسیم و فعالیت آنزیم ALP، غلظت ۱۰ درصد اثر بهتری بر تمایز استخوان نسبت به ۱۵ درصد دارد و داده‌های بیان ژن نیز تأیید کننده‌ی این روند می‌باشد که احتمال می‌رود شروع تمایز در گروه غلظتی ۱۰ درصد نسبت به سایر گروه‌ها زودتر رخ می‌دهد. در نتیجه، PRP فعال شده اثر آشکاری بر تحریک تمایز استخوانی سلول‌های hMSCs در برون‌تن دارد و می‌تواند کاربرد بالقوه‌ی این سلول‌ها را در بازسازی استخوان تسهیل نماید.

پیش از این نشان داده شده بود که پلاسمای غنی از پلاکت با دارا بودن انواعی از عوامل رشد، می‌تواند روند تمایز استئوژنیک را بهبود ببخشد و نتایج حاصل از این پژوهش نیز نشان داد که این کاتالیروز بیولوژیک، نه تنها باعث تمایز استخوانی سلول‌های مزانشیمی انسانی می‌شود، بلکه در غلظت‌های مختلف رفتار متفاوتی از خود نشان می‌دهد و می‌تواند مسیر تمایز به سمت استخوان را

دستخوش تغییر نماید و با توجه به این موضوع کـه PRP یـک روش درمان نویدبخش برای آینده اسـت، پیشـنهاد مـی‌شـود مکانیسـم‌هـای مولکـولی و چگـونگی تـأثیر پلاسـمای غنـی از پلاکـت بـر تمـایز سلول‌های مزانشیمال در این غلظت بهینه شده، بررسی شود.

## تشکر و قدردانی

از دانشگاه‌های شهید چمران و علوم پزشکی جندی شاپور اهواز به دلیل حمایت‌های علمی- آزمایشگاهی و مالی در اجرای این مطالعه سپاسگزاری می‌گردد.

## References

1. Garg P, Mazur MM, Buck AC, Wandtke ME, Liu J, Ebraheim NA. prospective review of mesenchymal stem cells differentiation into osteoblasts. Orthop Surg 2017; 9(1): 13-9.
2. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. Transplantation 1974; 17(4): 331-40.
3. Saeed H, Ahsan M, Saleem Z, Iqtedar M, Islam M, Danish Z, et al. Mesenchymal stem cells (MSCs) as skeletal therapeutics - an update. J Biomed Sci 2016; 23: 41.
4. Knight MN, Hankenson KD. Mesenchymal stem cells in bone regeneration. Adv Wound Care (New Rochelle) 2013; 2(6): 306-16.
5. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. Injury 2005; 36(12): 1392-404.
6. Dimond L. Blood platelets in the treatment of disease. Br Med J 1914; 2(2811): 828-9.
7. Schwartz-Arad D, Levin L, Aba M. The use of platelet rich plasma (PRP) and platelet rich fibrin (PRP) extracts in dental implantology and oral surgery. Refuat Hapeh Vehashinayim (1993) 2007; 24(1): 51-5, 84. [In Hebrew].
8. Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 1974; 71(4): 1207-10.
9. Yoshida K, Sumita Y, Marukawa E, Harashima M, Asahina I. Effect of platelet-rich plasma on bone engineering with an alloplastic substitute containing BMP2. Biomed Mater Eng 2013; 23(3): 163-72.
10. Drago L, Bortolin M, Vassena C, Taschieri S, Del Fabbro M. Antimicrobial activity of pure platelet-rich plasma against microorganisms isolated from oral cavity. BMC Microbiol 2013; 13: 47.
11. El-Sharkawy H, Kantarci A, Deady J, Hasturk H, Liu H, Alshahat M, et al. Platelet-rich plasma: growth factors and pro- and anti-inflammatory properties. J Periodontol 2007; 78(4): 661-9.
12. Fernandes G, Yang S. Application of platelet-rich plasma with stem cells in bone and periodontal tissue engineering. Bone Res 2016; 4: 16036.
13. Rodriguez IA, Growney Kalaf EA, Bowlin GL, Sell SA. Platelet-rich plasma in bone regeneration: engineering the delivery for improved clinical efficacy. Biomed Res Int 2014; 2014: 392398.
14. Pakfar A, Irani S, Hanaee-Ahvaz H. Expressions of pathologic markers in PRP based chondrogenic differentiation of human adipose derived stem cells. Tissue Cell 2017; 49(1): 122-30.
15. Majumdar MK, Thiede MA, Haynesworth SE, Bruder SP, Gerson SL. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. J Hematother Stem Cell Res 2000; 9(6): 841-8.
16. Xu FT, Li HM, Yin QS, Liang ZJ, Huang MH, Chi GY, et al. Effect of activated autologous platelet-rich plasma on proliferation and osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells in vitro. Am J Transl Res 2015; 7(2): 257-70.
17. Tavakolinejad S, Khosravi M, Mashkani B, Ebrahimzadeh BA, Sanjar MN, Parizadeh MR, et al. The effect of human platelet-rich plasma on adipose-derived stem cell proliferation and osteogenic differentiation. Iran Biomed J 2014; 18(3): 151-7.

DOI: 10.22122/jims.v36i466.9039 Published by Vesnu Publications

**Journal of Isfahan Medical School** **Vol. 36, No. 466, 2nd Week, April 2018**

Received: 22.10.2017 Accepted: 08.01.2018 Published: 28.03.2018

# The Effect of Various Platelet-Rich Plasma Concentrations on Osteoblast Differentiation in Human Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells

Maryam Cheraghzadeh[1], Alireza Kheirollah[2], Hana Hanaee-Ahvaz[3], Hamid Galehdari[4]

**Original Article**

## Abstract

**Background:** Mesenchymal stromal cells (MSCs) are stem cells with high differentiation potential that have been investigated for bone differentiation both in vivo and in vitro during the last decade. It was shown that platelet-rich plasma (PRP) can accelerate bone formation. Due to limitation of human studies in this field, and unknown appropriate concentration of platelet-rich plasma, this study compared the effect of applicable concentration of platelet-rich plasma on osteoblast differentiation in mesenchymal stromal cells.

**Methods:** Mesenchymal stromal cells were isolated from human adipose tissue and differentiated into osteoblasts. The effects of 10% and 15% of platelet-rich plasma on bone differentiation evaluate via measuring biochemical markers like alkaline phosphatase activity and calcium deposition. The expression of RUNX2 and osteocalcin genes were calculated using real-time polymerase chain reaction.

**Findings:** Compared to other groups, when treated by 10% platelet-rich plasma, human adipose-derived cells, having the potential to differentiate to adipocyte and osteoblast cell lines, showed significant increase in osteoblast differentiation rate, expression of gene markers, enzyme activity, and mineralization.

**Conclusion:** Activated platelet-rich plasma as a biological catalyst has different and significant effect on bone differentiation of human mesenchymal stromal cells (hMSCs) in different concentration; so, the onset of osteogenic differentiation in 10% platelet-rich plasma was observed earlier than other groups. Further investigations in this field can improve its clinical application in bone remodeling.

**Keywords:** Platelet-rich plasma, Mesenchymal stromal cells, Cell differentiation, Osteoblasts

**Citation:** Cheraghzadeh M, Kheirollah A, Hanaee-Ahvaz H, Galehdari H. **The Effect of Various Platelet-Rich Plasma Concentrations on Osteoblast Differentiation in Human Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells.** J Isfahan Med Sch 2018; 36(466): 56-63.

1- PhD Student, Department of Genetics, School of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2- Associate Professor, Department of Biochemistry, School of Medicine AND Cellular and Molecular Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
3- Assistant Professor, Stem Cell Technology Research Center, Tehran, Iran
4- Professor, Department of Genetics, School of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
**Corresponding Author:** Hamid Galehdari, Email: galehdari187@yahoo.com