

مقایسه‌ی تأثیر پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) و سرم جنین گاوی (FBS) بر تکثیر و بقای سلول‌های بنیادی مشتق از چربی در داربست فیبرین

مرضیه صادقیان^۱، دکتر بتول هاشمی بنی^۲، دکتر محمد مردانی^۳، دکتر نوشین امیرپور^۳، مریم علی‌اکبری^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: امروزه در سلول درمانی و مهندسی بافت، به سلول‌های بنیادی مزانشیمی توجه خاصی می‌شود و جهت رسیدن به تعداد سلول مورد نظر با ویژگی‌های مطلوب، دستیابی به شرایط مناسب کشت ضرورت دارد. از این رو، پژوهش حاضر با هدف مقایسه‌ی تأثیر پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) یا Platelet rich plasma) و سرم جنین گاوی (FBS یا Fetal bovine serum) بر تکثیر و بقای سلول‌های بنیادی مشتق از چربی (ADSCs یا Adipose derived stem cells) در داربست طبیعی فیبرین انجام شد.

روش‌ها: نمونه‌های چربی از سه بیمار، طی جراحی لیپوساکشن به دست آمد. سلول‌های بنیادی از بافت چربی استخراج و کشت شد. سپس سلول‌های پاساژ سوم در داربست فیبرین و مدیوم حاوی PRP ۱۰ درصد (گروه مورد) یا FBS ۱۰ درصد (گروه شاهد) کشت داده شدند. میزان تکثیر و بقای سلول‌ها در روزهای چهارم و هشتم با روش MTT (۵,۲ diphenyl tetrazolium bromide assay) رنگ‌آمیزی با Trypan blue و درصد آپوتوز سلولی با روش Flow cytometry با استفاده از کیت Annexin-FITC ارزیابی گردید. اطلاعات جمع‌آوری شد و با استفاده از آزمون t مستقل مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: در روزهای چهارم و هشتم میزان بقا و تکثیر و درصد سلول‌های زنده در گروه مورد نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری بیشتر و میزان سلول‌ها در مرحله‌ی اولیه‌ی آپوتوز در گروه مورد نسبت به گروه شاهد به طور معنی‌داری کمتر بود ($P < 0/010$). میزان سلول‌ها در مرحله‌ی نهایی آپوتوز، در روز ۸ به طور معنی‌داری در گروه مورد کمتر از گروه شاهد بود ($P < 0/001$).

نتیجه‌گیری: تأثیر مثبت PRP بر روند بقا و تکثیر سلول‌های ADSCs در مقایسه با FBS قابل توجه است.

واژگان کلیدی: فیبرین، پلاسمای غنی از پلاکت، سلول‌های بنیادی مشتق از چربی، تکثیر

ارجاع: صادقیان مرضیه، هاشمی بنی بتول، مردانی محمد، امیرپور نوشین، علی‌اکبری مریم. **مقایسه‌ی تأثیر PRP و FBS بر تکثیر و بقای**

سلول‌های بنیادی مشتق از چربی در داربست فیبرین. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۳۱۷): ۲۲۹۹-۲۳۱۱

درمان‌های بافتی، چون گرافت‌ها و فلپ‌های اتولوگ و آلورژنیک (۱)، راهکار مؤثری در جهت آسیب‌های بافتی باشد.

مقدمه

مهندسی بافت و سلول درمانی، امروزه در حال پیشرفت است تا بتواند نسبت به روش‌های معمول

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- دانشیار، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استادیار، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- کارشناس، گروه علوم تشریح، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

برداشت می‌گردد (۸) که یک روش سازگار با سیستم ایمنی برای بازگشت مواد بیومولکول به شخص، به خصوص در مورد بازگرداندن سلول‌ها به بدن را فراهم می‌کند (۹).

مشخص شده است که در طی کشت در *in vitro* عوامل رشد خاص می‌توانند بر تکثیر، مهاجرت و تمایز سلول‌ها اثر بگذارند (۷). پلاکت موجود در پلاسمای غنی از پلاکت (PRP یا Platelet rich plasma) که از سانتریفیوژ خون کامل تهیه می‌شود، حاوی مقدار فراوانی عامل رشد مانند Epidermal Transforming growth factor- β ، growth factor و Vascular endothelial growth factor می‌باشد و سبب افزایش میزان کلاژن، تسریع تولید اپی‌تلیال، ایجاد عروق و ترمیم زخم‌های بافتی می‌گردد و به عنوان یک منبع قابل دسترس و اتولوگ از عوامل رشد در ترمیم بافت استفاده می‌شود (۱۱-۱۰).

به طور معمول، در روش‌های مهندسی بافت از سرم‌های حیوانی مانند سرم جنین گاوی (FBS یا Fetal Bovine Serum) در کشت سلول استفاده می‌شود. FBS در آزمایش‌های کلینیکی برای کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی با منشأ انسانی استفاده می‌شود (۱۳-۱۲)؛ اما استفاده‌ی کلینیکال از محیط‌های کشت دارای FBS از نظر کلینیکی ایمن نمی‌باشد (۱۴)؛ چرا که FBS می‌تواند سیستم ایمنی میزبان را تحریک نماید (۱۳) و حتی شوک‌های آنافیلاکتیک ناشی از FBS گزارش شده است (۱۵). FBS وارد سلول‌ها می‌شود و با شستشوی ساده‌ی سلول‌ها از سلول‌ها حذف نمی‌گردد و واکنش ایمنی ایجاد می‌کند (۱۶).

ویژگی‌های سلول‌های بنیادی از جمله توانایی تکثیر فراوان و مجدد خود، ظرفیت تمایز به انواع سلول‌ها و حیات به مدت طولانی، آن‌ها را برای استفاده در سلول درمانی و مهندسی بافت، مناسب نموده است (۲). مطالعات نشان می‌دهد سلول‌های بنیادی می‌تواند از بافت‌های بزرگسال مانند مغز استخوان و بافت چربی تهیه شود (۳). سلول‌های بنیادی مشتق از چربی (ADSCs یا Adipose derived stem cells)، به دلیل توانایی تکثیر فراوان، ظرفیت تمایز به انواع سلول‌ها مانند ادیپوسیت، استئوسیت، کندروسیت، میوسیت و نرون، در صورت فراهم کردن شرایط مناسب مانند سلول‌های بنیادی دیگر (۴) و سهل‌الوصول بودن در مقایسه با سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان، امروز در مهندسی بافت مورد توجه قرار گرفته است (۵).

بافت چربی زیر جلدی به عنوان منبع سلول‌های بنیادی می‌تواند به سادگی و بدون استفاده از روش تهاجمی تهیه شود و از مقدار بسیار کم آن، سلول‌های بنیادی زیادی به دست می‌آید. تعداد سلول‌های بنیادی در بافت چربی، صد برابر بیشتر از مغز استخوان است (۶). این سلول‌ها در محیط آزمایشگاه کشت داده می‌شوند و به یک داربست مشابه ماتریکس خارج سلولی، منتقل می‌گردند (۷).

فیبیرین از داربست‌های طبیعی مهمی است که به دلیل توانایی ذاتی برای القای واکنش متقابل بین سلولی و به عنوان یک داربست در توانایی بازسازی در مقایسه با داربست‌های مصنوعی، می‌تواند کاربردی مناسب در تحقیقات بافتی داشته باشد. فیبیرین یک ماتریکس پروتئینی است که از فیبیرینوژن تولید می‌شود و فیبیرینوژن به صورت اتولوگ از بیمار

شد، میزان تشکیل استخوان بیشتر گردید (۲۳). هدف این تحقیق، بررسی و مقایسه‌ی تأثیر PRP به عنوان مجموعه‌ای از عامل رشد و FBS بر تکثیر و بقای سلول‌های بنیادی مشتق از چربی در داربست فیبرین در شرایط In-vitro بود.

روش‌ها

سه نمونه از چربی سفید، از ناحیه‌ی زیر جلد شکم به صورت تصادفی از افرادی که جهت عمل لیپوساکشن به بیمارستان الزهرا (س) اصفهان مراجعه کردند، تهیه شد. این نمونه‌ها از افراد مؤنث ۲۷-۴۳ سال که به هیچ نوع بیماری مبتلا نبودند و بعد از کسب رضایت نامی کتبی از آن‌ها برداشته شد. نمونه‌های چربی تحت شرایط استریل در سرم فیزیولوژی ۰/۹ درصد، به آزمایشگاه کشت سلول گروه علوم تشریحی دانشکده‌ی پزشکی اصفهان منتقل گردید.

آماده‌سازی نمونه‌ها جهت کشت اولیه: نمونه‌ها به قطعات کوچک بریده و چندین بار با فسفات بافر سالین (PBS یا Phosphate buffered saline) شستشو گردید تا دبریدها و خون تا حد امکان از آن جدا شود. سپس نمونه‌ها با محلول کلاژناز نوع I (Sigma) جهت هضم آنزیمی مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. آنزیم کلاژناز با DMEM-LG (Dulbecco modified essential medium- low glucose) (Sigma) حاوی FBS ۱۰ درصد، خنثی شد. محلول سلولی در لوله‌ی فالكون به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۵۰۰ سانتریفیوژ گردید. رسوب سلولی با DMEM-LG حاوی FBS ۱۰ درصد و پنی‌سیلین-استرپتومایسین ۱ درصد، سوسپانسیون و به فلاسک‌های T_{۲۵} منتقل شد و در

سرم‌های حیوانی ممکن است ناقل عوامل پاتوژنی چون مایکوپلاسما، پریون‌ها و ویروس‌ها باشند. به دلیل این مشکلات، بهتر است FBS با یک سرم اتولوگ جایگزین شود (۱۷). PRP نسبت به محصولاتی با منشأ حیوانی، به صورت اتولوگ، ترکیبی از عوامل رشد می‌باشد و ماهیت اتولوگ آن واکنش ایمنی کمتری را به همراه دارد. همچنین تهیه‌ی PRP نسبت به سرم‌های حیوانی مانند FBS آسان و ارزان‌تر می‌باشد (۱۸).

در مطالعه‌ی Bensaid و همکاران مشاهده شد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی زمانی که در داربست فیبرین قرار می‌گیرند؛ قادر به چسبیدن، تکثیر و گسترش در این داربست می‌باشند (۱۹). تحقیق Christman و همکاران نشان می‌دهد که فیبرین، بقای سلول‌های بنیادی منتقل شده به محل دچار ایسکمی عضله‌ی قلب را افزایش و در نتیجه، اندازه‌ی محل دچار ایسکمی میوکارد را کاهش می‌دهد (۲۰). Lucarelli و همکاران نشان دادند که استفاده از PRP ۱۰ درصد، در محیط کشت سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان، میزان تکثیر را افزایش می‌دهد (۲۱). Akeda و همکاران در تحقیق خود مشخص کردند که PRP، تکثیر و متابولیسم ماتریکس سلول‌های بین مهره‌ای را افزایش می‌دهد (۱۸). مردانی و همکاران از PRP ۱۰ درصد در مدیوم کندروژنیک، جهت تمایز ADSCs استفاده و مشاهده نمودند که میزان بیان نشانگرهای کندروسیت افزایش یافت (۲۲). Pieri و همکاران در پژوهش خود نشان دادند در ایمپلنت‌های دندان‌ی که از سلول‌های بنیادی مزانشیمی به همراه PRP در داخل اسکافولدهای فلورو هیدروکسی آپاتیت استفاده

ترومبین است، جمع‌آوری شد. سپس $10^5 \times 5$ ADSCs حاصل از پاساژ سوم با $500 \mu\text{l}$ از Cryocipitate (فرآورده‌ی خونی که حاوی مقدار فراوانی فیبرینوژن است) مخلوط گردید. این فرآورده‌ی خونی از بانک خون تهیه و در دمای 37°C در دستگاه بن ماری ذوب شده بود. در مرحله‌ی بعد، $500 \mu\text{l}$ ترومبین به آن اضافه شد و پس از ۵ دقیقه، فیبرینوژن توسط ترومبین به فیبرین تبدیل و داربست تشکیل شد.

داربست فیبرین - سلول به ۲ گروه تقسیم گردید و به هر خانه‌ی پلیت‌های گروه شاهد، 1 cc محیط کشت حاوی DMEM-LG، FBS ۱۰ درصد و پنی‌سیلین ۱ درصد و به گروه مورد، محیط کشت حاوی DMEM-LG، PRP ۱۰ درصد و پنی‌سیلین ۱ درصد اضافه شد. سلول‌ها در داربست فیبرین در روزهای چهارم و هشتم بررسی شدند.

MTT [۵,۲] (۲-thiazolyl-۴,۵-dimethyl) برای بررسی بقای ADSCs در داربست فیبرین، از روش MTT در روزهای ۴ و ۸ استفاده شد و برای هر دو گروه فیبرین با PRP و فیبرین با FBS (گروه شاهد)، ۱۰ بار تکرار گردید. ابتدا، محیط کشت هر خانه‌ی پلیت‌ها تخلیه و با $400 \mu\text{l}$ مدیوم خالص و $40 \mu\text{l}$ محلول MTT (با غلظت 5 mg در 1 ml PBS) جایگزین و در دمای 37°C و ۵ درصد CO_2 ، به مدت ۴ ساعت انکوبه شد تا کریستال‌های فورامازان آزاد و رنگ ارغوانی تشکیل گردید. سپس، محلول هر خانه تخلیه و $400 \mu\text{l}$ DMSO (Dimethyl sulfoxide) (Sigma) به هر خانه اضافه شد و به مدت ۲ ساعت انکوباسیون در تاریکی انجام گرفت. $100 \mu\text{l}$ از محلول

شرایط، 5 CO_2 درصد با رطوبت نسبی و دمای 37°C کشت داده شد.

کشت تک لایه‌ای سلول‌ها: بعد از اشغال ۸۰ درصد از سطح فلاسک‌ها توسط سلول‌ها، جداسازی از سطح فلاسک با استفاده از ۰/۰۵ درصد تریپسین/EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) انجام و سلول‌ها پاساژ داده شد و کشت تک لایه‌ی سلول‌ها تا پاساژ سوم ادامه یافت.

آماده‌سازی PRP: فرآورده‌های خونی از نوع Random platelets concentrate، هر کیسه حاوی $10^{10} \times 5/5$ پلاکت، از بانک خون بیمارستان الزهرا (س) اصفهان تهیه شد و به لوله‌های فالکون 50 cc منتقل گردید. لوله‌های فالکون به مدت ۱۰ دقیقه با دور 3600 rpm سانتریفیوژ و رسوب حاصل در لوله‌های فالکون جمع‌آوری شد و به ازای 10 cc از این محلول، از ترومبین با غلظت 1000μ در 1 ml کلرید کلسیم ۱۰ درصد، اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید تا ترومبین تحت تأثیر کلرید کلسیم باعث آزاد شدن گرانول‌های آلفای پلاکت شود. سپس با دور 1500 rpm سانتریفیوژ و مایع رویی به عنوان PRP جمع‌آوری و در دمای 8°C - نگهداری شد.

کشت سلول‌ها در داربست فیبرین: ۱ کیسه از فرآورده‌های خونی از نوع FFP (Fresh frozen plasma) از بانک خون بیمارستان الزهرا اصفهان تهیه و بعد از ذوب در دمای 37°C در دستگاه بن ماری، 16 cc آن با 10 cc کلسیم گلوکونات ۱۰ درصد، در دمای 37°C در داخل لوله‌ی فالکون 50 cc ، به مدت ۹۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس با دور 2200 rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و $1/5$ - 1 cc مایع شفاف رویی که حاوی

آزمایش Trypan blue: با این روش، تعداد سلول‌های زنده در روزهای ۴ و ۸ در هر دو گروه PRP و FBS، با ۱۰ بار تکرار مشخص شد. در این روش، بعد از تجزیه‌ی داربست توسط پلاسمین (با غلظت ۰/۰۱ واحد در ml آب دیونیزه) و تهیه‌ی سوسپانسیون سلولی، به ۱۰ μl از سوسپانسیون سلولی روی یک لام معمولی، ۱۰ μl از Trypan blue ۰/۴ درصد اضافه شد. از مخلوط حاصل، ۱۰ μl بر روی لام نئوبار قرار داده شد و در زیر میکروسکوپ Invert شمارش گردید. تعداد سلول‌های شفاف به عنوان سلول‌های زنده و سلول‌های رنگ گرفته و تیره به عنوان سلول‌های مرده تلقی گردید. برای مقایسه‌ی نتایج در گروه‌های مختلف از آزمون آماری t مستقل استفاده گردید.

یافته‌ها

کشت ADSCs: در مرحله‌ی اول کشت تک لایه، ADSCs بعد از ۲ ساعت شروع به چسبیدن به کف ظرف نمودند و شکل این سلول‌ها در روزهای اولیه‌ی کشت بیشتر مدور بود و با گذشت زمان بیشتر سلول‌ها حالت دوکی یا مورفولوژی شبه فیبروبلاستی را به خود گرفتند (شکل ۱).

۵ روز به طول انجامید تا سلول‌ها تکثیر شدند و سطح فلاسک توسط سلول‌ها اشغال گردید. ۱۵ روز به طول انجامید تا کشت سلول‌ها تا پاساژ سوم در کشت تک لایه ادامه یافت (شکل ۲).

کشت سلول‌ها در داربست فیبرین: ADSCs حاصل از پاساژ سوم به داربست فیبرین منتقل شدند و در داربست فیبرین، شکل دوکی آن‌ها به حالت مدور تغییر شکل یافت (شکل ۳).

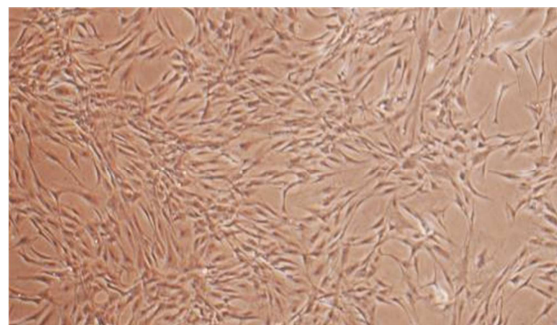
هر خانه به چاهک پلیت ۹۶ خانه منتقل و جذب نوری آن در طول موج ۵۷۰ nm، با دستگاه ELISA (Hiperion MPR) اندازه‌گیری گردید.

بررسی آپوپتوز با کیت Annexin v-FITC: این روش میزان سلول‌های زنده، سلول‌های موجود در مرحله‌ی اولیه‌ی آپوپتوز و در مرحله‌ی نهایی آپوپتوز و سلول‌های مرده را در روزهای ۴ و ۸ برای هر دو گروه PRP و FBS (گروه شاهد)، با ۱۰ بار تکرار مشخص نمود. ابتدا محیط کشت را از هر خانه‌ی پلیت‌ها تخلیه و یک بار با PBS شسته و سپس ۱ cc از پلاسمین انسانی (Sigma) (با غلظت ۰/۰۱ واحد در ml آب دیونیزه) به هر چاهک اضافه و ۳۰ دقیقه انکوبه گردید که پلاسمین سبب تجزیه‌ی داربست و آزاد شدن سلول‌ها گشت.

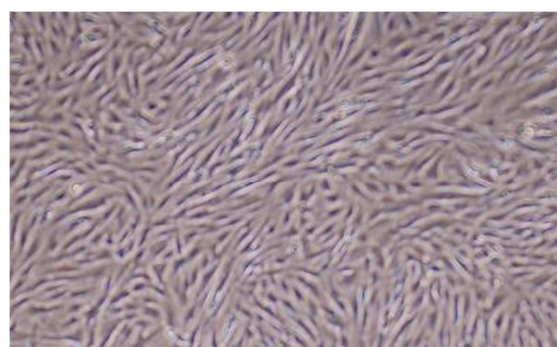
سوسپانسیون سلولی به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۵۰۰ سانتریفیوژ شد. به رسوب سلولی، ۵۰۰ μl بافر کیت و ۵ μl Annexin V-FITC و Propidium iodide اضافه شد و ۵ دقیقه در تاریکی انکوبه و سپس با دستگاه فلوسایتومتری BD امواج Annexin V-FITC در طول موج ۴۸۸-۵۳۰ nm اندازه‌گیری شد که سلول‌ها در مرحله‌ی اولیه‌ی آپوپتوز به دلیل اتصال Annexin V-FITC به فسفاتیدیل سرین در لایه‌ی خارجی غشا، این امواج را از خود ساطع می‌کنند؛ اما سلول‌ها در مرحله‌ی نهایی به دلیل از دست رفتن قدرت نفوذ پذیری غشا و هسته‌ی سلول، هر دو امواج Annexin V-FITC و PI (Power integrity) و سلول‌های مرده به دلیل از دست دادن ساختار غشای سلول، موج PI را از خود ساطع می‌کنند. همچنین برای شاهد، از یک لوله‌ی سوسپانسیون سلولی با بافر کیت استفاده شد.

هر دو گروه PRP و FBS، تکرار گردید. بعد از انجام روش MTT، تشکیل کریستال‌های فورامازان در سلول‌های موجود در فیبرین، نمایانگر حفظ بقای سلول‌ها در هر دو گروه بود که رنگ بنفش تیره‌تری در گروه PRP نسبت به گروه FBS مشاهده شد (شکل ۴). میزان جذب نوری در داربست فیبرین با PRP در روز ۴، $0.270 \pm 1/195$ و در روز ۸، $0.410 \pm 1/083$ و در داربست فیبرین با FBS در روز ۴، $0.390 \pm 0/871$ و در روز ۸، $0.698 \pm 0/180$ بود. مقایسه‌ی این دو میانگین، نشان می‌دهد که میزان بقا و تکثیر سلول‌ها به طور معنی‌داری در گروه PRP نسبت به گروه FBS در روزهای ۴ و ۸ بیشتر بوده است ($P \leq 0/010$) (شکل ۵).

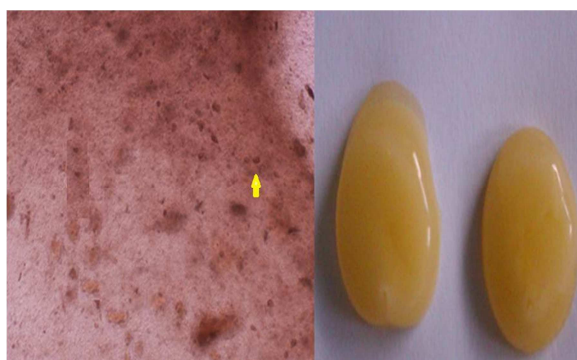
نتایج کیت Annexin v-FITC: میزان سلول‌های زنده، مرده و در مرحله‌ی اولیه و نهایی آپوپتوز با استفاده از کیت Annexin v-FITC برای هر گروه مشخص گردید. میانگین درصد سلول‌ها در گروه FBS در روز ۴ به ترتیب شامل زنده $5/550 \pm 76/730$ ، نکروز $0/270 \pm 0/826$ ، اولیه‌ی آپوپتوز $5/820 \pm 16/800$ ، نهایی آپوپتوز $0/570 \pm 5/750$ و در روز ۸ شامل زنده $2/900 \pm 80/370$ ، نکروز $1/490 \pm 1/261$ ، ۱۳ اولیه‌ی آپوپتوز $1/000 \pm 13/640$ ، نهایی آپوپتوز $4/220 \pm 4/880$ بود. همچنین در گروه PRP در روز ۴، به ترتیب برابر با $1/670 \pm 93/970$ ، $0/670 \pm 0/406$ ، $1/460 \pm 2/153$ ، $0/830 \pm 3/300$ و در روز ۸، $2/850 \pm 92/331$ ، $0/460 \pm 0/546$ ، $4/226 \pm 3/410$ ، $0/620 \pm 1/778$ بود. مقایسه‌ی میانگین سلول‌های زنده در هر دو گروه نشان



شکل ۱. سلول‌های بنیادی مشتق از چربی با اشکال ستاره‌ای و دوکی در مرحله‌ی اولیه‌ی کشت، استفاده از میکروسکوپ Invert (۴۰×).



شکل ۲. تکثیر و افزایش سلول‌های بنیادی مشتق از چربی در پاساژ سوم که سطح فلاسک را اشغال کرده‌اند، استفاده از میکروسکوپ Invert (۴۰×).



شکل ۳. تصویر ماکروسکوپی حاصل از داربست فیبرین (چپ). سلول‌های مشتق از چربی پس از پاساژ سوم بر روی داربست فیبرین ظاهری مدور دارند (راست) (۴۰۰×).

نتایج MTT: روش MTT در روزهای ۴ و ۸ در



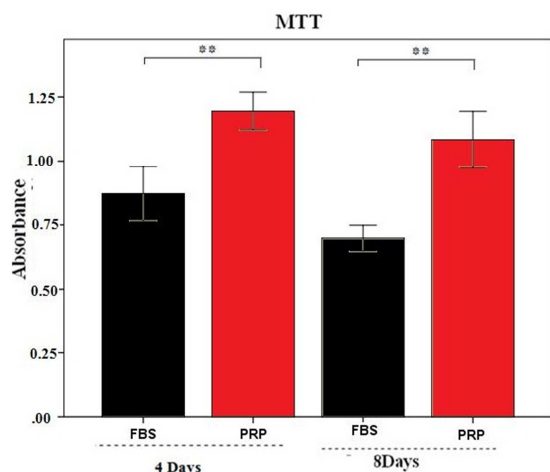
a

b

شکل ۴. نتایج حاصل از MTT (۵,۲ diphenyl tetrazolium bromide assay) (۳(۴,۵-dimethyl thiazol-۲-yl) و تولید رنگ

بنفش حاصل از فعالیت متابولیک سلول‌ها در گروه فیبرین با PRP (Platelet rich plasma) (a) و گروه فیبرین با FBS (Fetal bovine serum) (b). رنگ بنفش تیره‌تر در گروه فیبرین با PRP نسبت به گروه فیبرین با FBS نشان دهنده بقای بیشتر در گروه فیبرین با PRP است.

درصد سلول‌های زنده در گروه PRP نسبت به گروه شاهد در روزهای ۴ و ۸ به طور معنی‌داری بیشتر بوده است ($P \leq 0/001$) (شکل ۸).



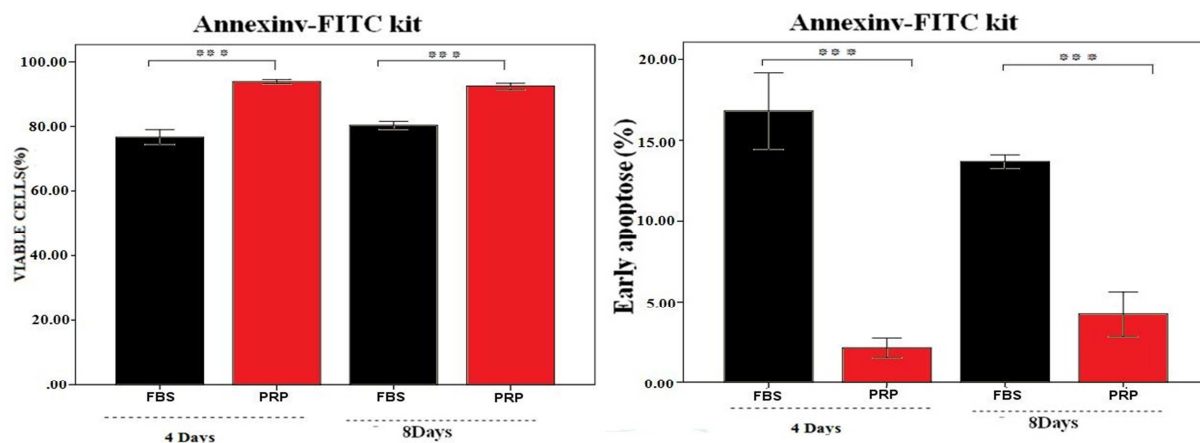
شکل ۵. نمودار مقایسه‌ی میزان جذب نوری در ۲ گروه PRP (Platelet rich plasma) و FBS

(Fetal bovine serum) در روزهای ۴ و ۸ با روش MTT (۵,۲ diphenyl tetrazolium bromide assay) (۳(۴,۵-dimethyl thiazol-۲-yl) بیان می‌کند که میزان بقای سلول‌ها در گروه PRP نسبت به FBS بیشتر است ($P \leq 0/001$).

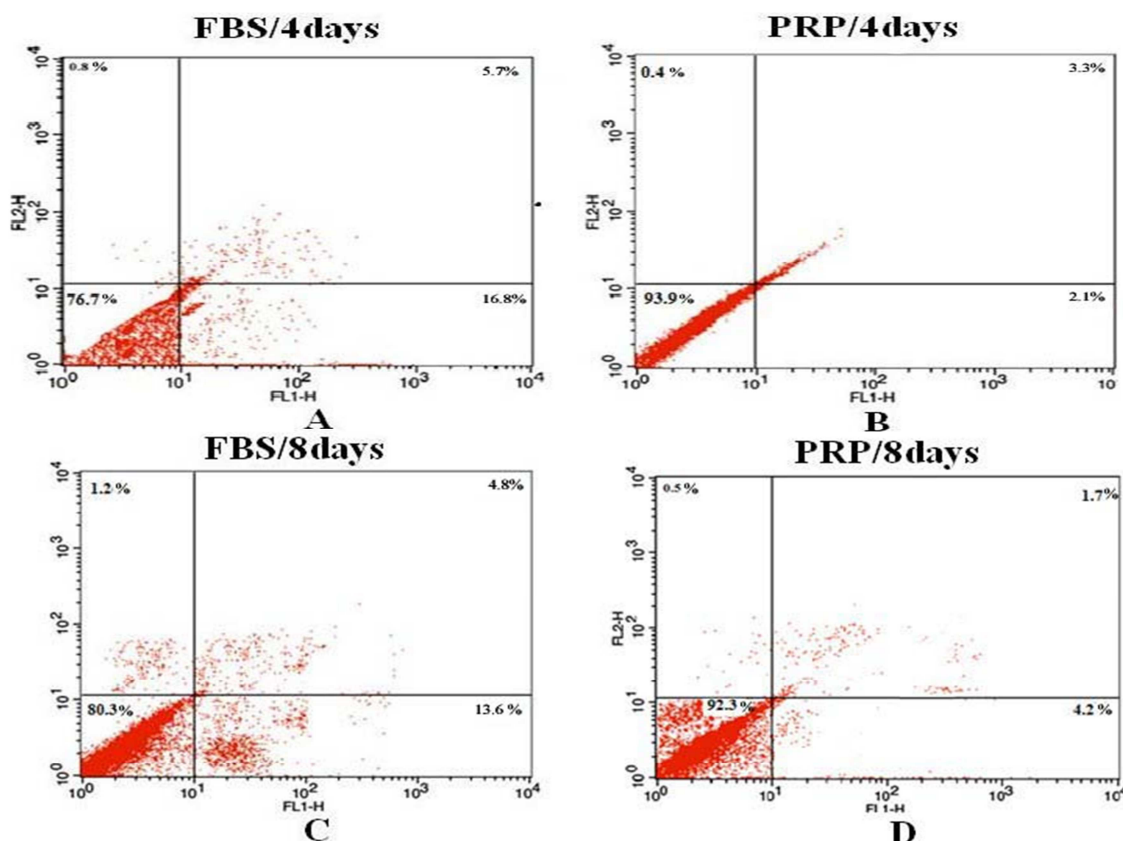
می‌دهد که میانگین سلول‌های زنده در روزهای ۴ و ۸ به طور معنی‌داری در گروه PRP بیشتر از گروه FBS بوده است ($P \leq 0/010$).

میزان سلول‌ها در مرحله‌ی اولیه‌ی آپوتوز در گروه PRP در روزهای ۴ و ۸ به طور معنی‌داری کمتر از گروه FBS بود ($P \leq 0/001$), اما در میزان سلول‌های نهایی آپوتوز در روز ۴، تفاوت معنی‌داری بین دو گروه وجود نداشت. این میزان در روز ۸ به طور معنی‌داری در گروه PRP کمتر از گروه شاهد بود ($P \leq 0/001$). میزان سلول‌های نکروز در روزهای ۴ و ۸ در هر دو گروه تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل‌های ۶ و ۷).

میانگین سلول‌های زنده‌ی حاصل از رنگ‌آمیزی با Trypan blue در روز ۴ در گروه PRP برابر با $3/430 \pm 94/030$ درصد و در روز ۸ برابر با $1/960 \pm 97/380$ درصد و در گروه FBS در روز ۴ برابر با $4/520 \pm 87/590$ درصد و در روز ۸ برابر با $1/830 \pm 89/900$ درصد بود که مشخص نمود



شکل ۶. نمودار حاصل از نتایج کیت Annexin v-FITC بیان می‌کند که میانگین سلول‌های زنده در روزهای ۴ و ۸ به طور معنی‌داری در گروه PRP (Platelet rich plasma) بیشتر از گروه FBS (Fetal bovine serum) است ($P \leq 0.001$). میزان سلول‌ها در مرحله‌ی اولیه‌ی آپوپتوز در گروه PRP در روزهای ۴ و ۸ به طور معنی‌داری کمتر از گروه FBS است ($P \leq 0.001$).

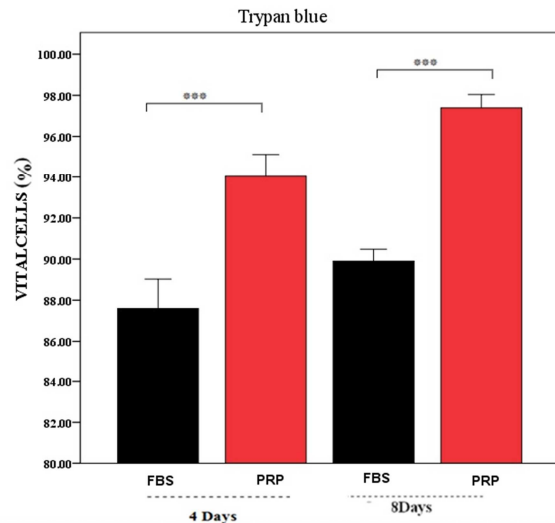


شکل ۷. نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی ADSCs (Adipose tissue-derived stem cells) با Annexin-FITC و PI را در هر دو گروه PRP (Platelet rich plasma) و FBS (Fetal bovine serum) در روزهای ۴ و ۸ که برای هر نمونه ۱۰ بار تکرار داشته است، مشخص می‌کند. مربع سمت چپ در پایین سلول‌های زنده را نشان می‌دهد (با هر دو رنگ Annexin-FITC و PI رنگ نگرفته‌اند). مربع سمت راست در پایین سلول‌ها در مرحله‌ی اولیه‌ی آپوپتوز را نشان می‌دهد (با Annexin-FITC رنگ گرفته‌اند). مربع سمت راست در بالا سلول‌ها در مرحله‌ی نهایی آپوپتوز را نشان می‌دهد (با هر دو رنگ Annexin-FITC و PI رنگ گرفته‌اند). گوشه‌ی سمت چپ در بالا سلول‌های مرده را نشان می‌دهد (با رنگ PI رنگ نگرفته‌اند). اعداد درصد میانگین سلول‌ها را نشان می‌دهد.

با منشأ انسانی که به طور کامل دستی و با قیمت بسیار اندک تهیه گردید، استفاده شد. همچنین در این مطالعه علاوه بر محیط کشت متداول (حاوی FBS)، از محیط کشت حاوی PRP استفاده گردید. FBS حاوی دامنه‌ی گسترده‌ای از عوامل رشد می‌باشد، اما برای تکثیر سلول‌های بنیادی در مدت زمان ایده‌ال کافی نیست (۲۹).

در مطالعات Zaragosi و همکاران Kabiri و همکاران برای اصلاح معایب FBS، به محیط کشت FGF۲ (Fibroblast growth factor۲) اضافه گردید (۲۹-۳۰). شفایی و همکاران در کشت تک لایه‌ای، در مقایسه‌ی FBS و سرم جفت انسانی، نشان دادند که میزان تکثیر و بقای ADSCs در مدیوم حاوی سرم جفت انسانی بیشتر از زمانی است که از FBS استفاده می‌شود (۳۱).

امروزه PRP بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در تحقیقات بیان می‌شود که PRP می‌تواند یک محرک در تکثیر سلول باشد؛ این اثر محرک قوی‌تر از FBS است (۱۸)؛ انواعی از عوامل رشدی که از پلاکت موجود در PRP آزاد می‌شوند، امکان تکثیر و تمایز انواع سلول‌ها و سنتز ماتریکس را به PRP می‌دهند که این امکان توسط یک یا مجموعه‌ای از عوامل رشد موجود در PRP با چسبیدن به گیرنده‌های سطح سلول امکان پذیر می‌شود (۳۲). گزارش‌هایی از تشکیل استخوان در *in vivo* با استفاده از PRP و BMSCs در مدل حیوانی بیان شده است (۳۲-۳۴) و PRP می‌تواند تکثیر Stromal stem cells را نسبت به زمانی که از FBS در محیط کشت استفاده می‌شود، افزایش دهد (۲۱). Akeda و همکاران از PRP به جای FBS در



شکل ۸. نمودار حاصل از Trypan blue، میانگین درصد سلول‌های زنده را در هر دو گروه نشان می‌دهد. م میانگین سلول‌های زنده در روزهای ۴ و ۸ در گروه PRP (Platelet rich plasma) بیشتر از گروه FBS (Fetal bovine serum) است ($P \leq 0/001$).

بحث

استفاده از PRP ۱۰ درصد به جای FBS ۱۰ درصد که به طور معمول در محیط کشت می‌شود، میزان تکثیر و بقای ADSCs را افزایش می‌دهد. در مطالعات Bensaid و همکاران و Lin و همکاران مشخص گردید که بقا و تکثیر سلول‌های بنیادی مغز استخوان (BMSCs) یا Bone marrow stromal cells در داربست فیبرین حفظ می‌گردد (۲۴، ۱۹) و Girandon و همکاران مشخص نمود که ADSCs قادر به تکثیر و بقا در داربست فیبرین هستند (۲۵). در تحقیق حاضر، مانند مطالعات قبلی مشخص گردید که بقا و تکثیر ADSCs در داربست فیبرین حفظ می‌شود. لازم به ذکر است که در مطالعات قبلی بیشتر از فیبرین تجاری و تهیه شده از خون حیوانات استفاده شده است (۲۸-۲۶، ۲۰)؛ اما در مطالعه‌ی حاضر از فیبرین

از FBS به عنوان یک سرم حیوانی استفاده می‌شود کمتر است و ممکن است بیانگر این امر باشد که فیبرین با PRP با ماهیت اتولوگ خود، شرایط مشابهی با *in vivo* در آزمایشگاه برای ADSCs فراهم می‌کنند؛ از این رو، این سلول‌ها استرس کمتری در مقایسه با زمان استفاده از FBS با ماهیت غیر اتولوگ را تجربه می‌کنند. همچنین بیان می‌شود که عامل رشد مشتق از پلاکت موجود در PRP میزان آپوپتوز را کاهش می‌دهد (۳۴).

نتیجه‌گیری نهایی این که می‌توان PRP را به عنوان مجموعه‌ای از عوامل رشد به عنوان یک مکمل مناسب برای جایگزین کردن با سرم حیوانی مانند FBS در نظر گرفت و به کارگیری فیبرین به عنوان داربست و PRP به عنوان مکمل محیط کشت بر بقا و تکثیر (کاهش آپوپتوز) سلول‌های بنیادی مشتق از چربی ADSCs تأثیر چشمگیری داشته است. لازم به ذکر است که در زمینه‌ی روش تهیه‌ی PRP، اندازه‌گیری میزان هر یک از عوامل رشد موجود در آن و اثر آن‌ها بر روند تکثیر و تمایز Stem cells به انواع سلول‌ها، تحقیقات گسترده لازم است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد مرضیه صادقیان در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

پژوهشگران مراتب سپاسگزاری خود را از معاونت محترم تحقیقات و فناوری، جناب آقای دکتر ادیبی و همچنین مدیر محترم گروه علوم تشریح، جناب آقای دکتر اسفندیاری اعلام می‌دارند.

محیط کشت بر روی داربست آلژینات حاوی سلول‌های دیسک بین مهره‌ای خوکی استفاده نمود و نشان داد که PRP تکثیر و تولید ماتریکس خارج سلولی را نسبت به FBS افزایش می‌دهد (۱۸). در مطالعه‌ی حاضر، نوع سلول و داربست به کار رفته متفاوت است. در مطالعه‌ی Lucarelli و همکاران، تحت تأثیر محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های متفاوت FBS و PRP میزان تکثیر BMSCs در داربست ژل پلاکت مورد ارزیابی قرار گرفت. وی نشان داد که محیط کشت حاوی PRP ۱۰ درصد بدون وابستگی به حضور یا عدم حضور FBS می‌تواند منجر به افزایش تکثیر در BMSCs گردد (۲۱) که این نتیجه، مطابق با مطالعه‌ی حاضر است. اما در مطالعه‌ی حاضر، نوع سلول‌های بنیادی متفاوت است و این سلول‌ها به داربست فیبرین منتقل شده‌اند. در تحقیق Kakudo و همکاران، غلظت‌های متفاوت PRP (۱، ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد) با FBS در کشت تک لایه‌ای ADSCs و فیروبلاست‌های درم انسانی مقایسه شد. این مطالعه، درصد مناسب PRP به منظور کشت ADSCs را ۵ درصد و برای سلول‌های فیروبلاست ۱ درصد بیان می‌کند (۳۳). تحقیق حاضر مطابق با مطالعات قبلی نشان داد که PRP، میزان تکثیر و بقای سلولی را افزایش می‌دهد.

در نتایج تحقیق حاضر مشاهده شد زمانی که از داربست فیبرین و PRP که هر دو به صورت اتولوگ قابل تهیه می‌باشند و در این تحقیق، متفاوت با بیشتر مطالعات قبلی، به طور کامل دستی، با قیمت بسیار ارزان و از خون و فراورده‌های خون انسان تهیه شد و در کشت ADSCs استفاده گردید، میزان آپوپتوز اولیه‌ی سلول‌ها به طور معنی‌داری نسبت به زمانی که

References

- Galateanu B, Dimonie D, Vasile E, Nae S, Cimpean A, Costache M. Layer-shaped alginate hydrogels enhance the biological performance of human adipose-derived stem cells. *BMC Biotechnol* 2012; 12: 35.
- Grigoriadis AE, Heersche JN, Aubin JE. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J Cell Biol* 1988; 106(6): 2139-51.
- Liang L, Bickenbach JR. Somatic epidermal stem cells can produce multiple cell lineages during development. *Stem Cells* 2002; 20(1): 21-31.
- Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* 2003; 5(5): 362-9.
- Hattori H, Sato M, Masuoka K, Ishihara M, Kikuchi T, Matsui T, et al. Osteogenic potential of human adipose tissue-derived stromal cells as an alternative stem cell source. *Cells Tissues Organs* 2004; 178(1): 2-12.
- Jurgens WJ, Oedayrajsingh-Varma MJ, Helder MN, Zandiehoulabi B, Schouten TE, Kuik DJ, et al. Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell Tissue Res* 2008; 332(3): 415-26.
- Cancedda R, Castagnola P, Cancedda FD, Dozin B, Quarto R. Developmental control of chondrogenesis and osteogenesis. *Int J Dev Biol* 2000; 44(6): 707-14.
- Aper T, Schmidt A, Duchrow M, Bruch HP. Autologous blood vessels engineered from peripheral blood sample. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2007; 33(1): 33-9.
- Neidert MR, Lee ES, Oegema TR, Tranquillo RT. Enhanced fibrin remodeling in vitro with TGF-beta1, insulin and plasmin for improved tissue-equivalents. *Biomaterials* 2002; 23(17): 3717-31.
- Thur J, Rosenberg K, Nitsche DP, Pihlajamaa T, Ala-Kokko L, Heinegard D, et al. Mutations in cartilage oligomeric matrix protein causing pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia affect binding of calcium and collagen I, II, and IX. *J Biol Chem* 2001; 276(9): 6083-92.
- Wu JJ, Woods PE, Eyre DR. Identification of cross-linking sites in bovine cartilage type IX collagen reveals an antiparallel type II-type IX molecular relationship and type IX to type IX bonding. *J Biol Chem* 1992; 267(32): 23007-14.
- Koc ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000; 18(2): 307-16.
- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276(5309): 71-4.
- Solchaga LA, Penick K, Porter JD, Goldberg VM, Caplan AI, Welter JF. FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2005; 203(2): 398-409.
- Mackensen A, Drager R, Schlesier M, Mertelsmann R, Lindemann A. Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* 2000; 49(3): 152-6.
- Spees JL, Gregory CA, Singh H, Tucker HA, Peister A, Lynch PJ, et al. Internalized antigens must be removed to prepare hypoimmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Mol Ther* 2004; 9(5): 747-56.
- Shetty P, Bharucha K, Tanavde V. Human umbilical cord blood serum can replace fetal bovine serum in the culture of mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int* 2007; 31(3): 293-8.
- Akeda K, An HS, Pichika R, Attawia M, Thonar EJ, Lenz ME, et al. Platelet-rich plasma (PRP) stimulates the extracellular matrix metabolism of porcine nucleus pulposus and anulus fibrosus cells cultured in alginate beads. *Spine (Phila Pa 1976)* 2006; 31(9): 959-66.
- Bensaid W, Triffitt JT, Blanchat C, Oudina K, Sedel L, Petite H. A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials* 2003; 24(14): 2497-502.
- Christman KL, Vardanian AJ, Fang Q, Sievers RE, Fok HH, Lee RJ. Injectable fibrin scaffold improves cell transplant survival, reduces infarct expansion, and induces neovasculature formation in ischemic myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44(3): 654-60.
- Lucarelli E, Beccheroni A, Donati D, Sangiorgi L, Cenacchi A, Del Vento AM, et al. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials* 2003; 24(18): 3095-100.
- Mardani M, Kabiri A, Esfandiari E, Esmaeili A, Pourazar A, Ansar M, et al. The effect of platelet rich plasma on chondrogenic differentiation of human adipose derived stem

- cells in transwell culture. *Iran J Basic Med Sci* 2013; 16(11): 1163-9.
23. Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, Iezzi G, Piattelli A, Giardino R, et al. Mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma enhance bone formation in sinus grafting: a histomorphometric study in minipigs. *J Clin Periodontol* 2008; 35(6): 539-46.
 24. Lin N, Lin J, Bo L, Weidong P, Chen S, Xu R. Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells in an alginate scaffold. *Cell Prolif* 2010; 43(5): 427-34.
 25. Girandon L, Kregar-Velikonja N, Bozиков K, Barlic A. In vitro models for adipose tissue engineering with adipose-derived stem cells using different scaffolds of natural origin. *Folia Biol (Praha)* 2011; 57(2): 47-56.
 26. Humphrey RG, Smith SD, Pang L, Sadovsky Y, Nelson DM. Fibrin enhances differentiation, but not apoptosis, and limits hypoxic injury of cultured term human trophoblasts. *Placenta* 2005; 26(6): 491-7.
 27. Ho ST, Cool SM, Hui JH, Hutmacher DW. The influence of fibrin based hydrogels on the chondrogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 2010; 31(1): 38-47.
 28. Almqvist KF, Wang L, Wang J, Baeten D, Cornelissen M, Verdonk R, et al. Culture of chondrocytes in alginate surrounded by fibrin gel: characteristics of the cells over a period of eight weeks. *Ann Rheum Dis* 2001; 60(8): 781-90.
 29. Zaragosi LE, Ailhaud G, Dani C. Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells. *Stem Cells* 2006; 24(11): 2412-9.
 30. Kabiri A, Esfandiari E, Hashemibeni B, Kazemi M, Mardani M, Esmaeili A. Effects of FGF-2 on human adipose tissue derived adult stem cells morphology and chondrogenesis enhancement in Transwell culture. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 424(2): 234-8.
 31. Shafaei H, Esmaeili A, Mardani M, Razavi S, Hashemibeni B, Nasr-Esfahani MH, et al. Effects of human placental serum on proliferation and morphology of human adipose tissue-derived stem cells. *Bone Marrow Transplant* 2011; 46(11): 1464-71.
 32. Lynch SE, Colvin RB, Antoniades HN. Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. *J Clin Invest* 1989; 84(2): 640-6.
 33. Kakudo N, Minakata T, Mitsui T, Kushida S, Notodihardjo FZ, Kusumoto K. Proliferation-promoting effect of platelet-rich plasma on human adipose-derived stem cells and human dermal fibroblasts. *Plast Reconstr Surg* 2008; 122(5): 1352-60.
 34. Gruber HE, Norton HJ, Hanley EN, Jr. Anti-apoptotic effects of IGF-1 and PDGF on human intervertebral disc cells in vitro. *Spine (Phila Pa 1976)* 2000; 25(17): 2153-7.

Comparing the Effect of Platelet Rich Plasma (PRP) and Fetal Bovine Serum (FBS) on Proliferation and Survival of Adipose-Derived Stem Cells in Fibrin Scaffolds

Marzieh Sadeghian¹, Batool Hashemibeni PhD², Mohammad Mardani PhD²,
Noushin Amirpoor PhD³, Maryam Aliakbari⁴

Original Article

Abstract

Background: Today, stem cells are the best candidate for cell therapy and tissue engineering. To achieve intended number of cells with optimal characteristics, it is necessary to have appropriate condition of culture. Therefore, in this study, we compared the effects of platelet rich plasma (PRP) and fetal bovine serum (FBS) on proliferation and survival of adipose-derived stem cells (ADSCs) in a natural fibrin scaffold.

Methods: Adipose tissue specimens were obtained from 3 patients undergoing liposuction surgery. adipose-derived stem cells were isolated from adipose tissue and cultured and encapsulated in fibrin scaffolds in third passage with culture media containing PRP-10% (experimental group) or FBS-10% (control group). Then, the rate of viability and survival were evaluated using MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay and Trypan blue staining. Percentage of apoptotic cells was evaluated via flow cytometry using AnnexinV-FITC kit on fourth and eighth days. Data were collected and statistical analyzed using t-test.

Findings: The rates of viability, survival and percentage of living cells in the experimental group were significantly higher than control group on fourth and eight days ($P < 0.010$ for all). Percentages of early apoptotic cells in the experimental group were significantly lower than control group on fourth and eight days ($P < 0.001$ for both). On the eighth day, percentage of late apoptotic cells in experimental group was significantly lower than control group.

Conclusion: This study showed that the positive effect of platelet rich plasma on the survival and proliferation of adipose-derived stem cells in compared with fetal bovine serum was significant.

Keywords: Fibrin, Platelet rich plasma, Adipose-derived stem cells, Proliferation

Citation: Sadeghian M, Hashemibeni B, Mardani M, Amirpoor N, Aliakbari M. **Comparing the Effect of Platelet Rich Plasma (PRP) and Fetal Bovine Serum (FBS) on Proliferation and Survival of Adipose-Derived Stem Cells in Fibrin Scaffolds.** J Isfahan Med Sch 2015; 32(317): 2299-2311

1- MSc Student, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Associate Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences Isfahan, Iran

4- Department of Anatomical Sciences, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Batool Hashemibeni PhD, Email: hashemibeni@med.mui.ac.ir