مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ٦، شماره ١، بهار ١٣٩٤، ٢٩-٢٣

بررسی قابلیت بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی بر روی داربست‌های طبیعی به‌عنوان محیط رشد مناسب

مهدیه قیاثی .M.Sc[1]، رضا طباطبائی قمی .M.Sc[2]، ناصر کلهر .M.Sc[3]، محمد مهدی زاده .MD[4]، محسن شیخ حسن .M.Sc[5*]

۱- کارشناس ارشد سلولی مولکولی، آزمایشگاه سلول‌های بنیادی، جهاد دانشگاهی استان قم، قم، ایران
۲- کارشناس ارشد بیولوژی، آزمایشگاه سلول‌های بنیادی، جهاد دانشگاهی استان قم، قم، ایران
۳- کارشناس ارشد ژنتیک، آزمایشگاه سلول‌های بنیادی، جهاد دانشگاهی استان قم، قم، ایران
۴- دانشگاه علوم پزشکی بابل، دانشکده دندانپزشکی، بخش جراحی دهان، فک و صورت، بابل، ایران
۵- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، آزمایشگاه سلول‌های بنیادی، جهاد دانشگاهی استان قم، قم، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: m.sheykhhasan@acecr.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۳/۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۵/۲۱

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه ارزیابی کارایی دو داربست پلاسمای غنی شده از پلاکت (PRP) و فیبرین گلو در ایجاد محیط مناسب جهت رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، آماده سازی دو داربست PRP و فیبرین گلو انجام پذیرفت و سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی جداسازی شد. مزانشیمی بودن سلول‌ها با مارکرهای سطحی مزانشیمی به‌روش فلوسایتومتری بررسی شد. سپس، سلول‌های بنیادی تکثیر شده و در مرحله پاساژ سه به‌طور جداگانه بر روی این دو داربست کشت شد و پس از گذشت ۴۸ ساعت از کشت سلول‌ها بر روی داربست‌ها، ارزیابی توانایی زنده ماندن سلول‌ها توسط تست MTT به‌عمل آمد.

نتایج: آنالیز فلوسایتومتری نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی، نشانگرهای سطحی CD44، CD90 و CD105 را بیان می‌کنند. همچنین، نتایج این مطالعه نشان داد که PRP فعال نسبت به فیبرین گلو می‌تواند محیط مناسب‌تری را به‌منظور توانایی بقا و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی ایجاد نماید.

نتیجه گیری: به‌نظر می‌رسد استفاده از داربست‌های مشتق شده از PRP می‌تواند به‌عنوان محافظی به‌منظور رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای توسعه استراتژی‌های کارا و جدید در مهندسی بافت و طب ترمیمی مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: مهندسی بافت، PRP، فیبرین گلو، سلول‌های بنیادی مزانشیمی

مقدمه

عواملی مانند بیماری، جراحت و یا کهولت سن و پیری می‌توانند باعث ایجاد آسیب در بافت‌ها و اندام‌های بدن گردند. این موضوع در طول تاریخ امری بدیهی بوده و انسان‌های زیادی در اثر این آسیب‌ها جان خود را از دست داده یا دچار مشکلات عدیده‌ای شده‌اند. بنابراین ترمیم یا جایگزینی بافت و اندام‌های آسیب دیده همواره از دغدغه‌های اصلی دانشمندان برای حل این مشکل بوده است. دانشمندان با جایگزین نمودن بافت‌ها و اندام‌های آسیب دیده با بافت‌ها و اندام‌های زنده و سالم انسان و موجودات مشابه با انسان شاخه جدیدی را در علم پزشکی با عنوان طب پیوندی پایه ریزی نمودند. با این‌حال به‌دلیل معایب مهم و اساسی این روش از جمله هزینه بالای این روش، مشکلات ایمنی از جمله ایجاد آلودگی‌های میکروبی، رد پیوند توسط سیستم ایمنی بدن گیرنده پیوند و تعداد محدود اهداکننده کاربرد آن محدود شده است (۱). در نتیجه، نیاز به روش‌های جایگزین مناسب برای این روش وجود دارد. مناسب‌ترین جایگزین این روش در سال‌های اخیر، روش مهندسی بافت عنوان شده است. مهندسی بافت یک زمینه علمی پویا و در حال توسعه می‌باشد که ماهیت بین رشته‌ای داشته و از علومی همانند مهندسی، زیست شناسی و پزشکی تشکیل شده است. این علم به‌منظور خلق ساختارهای بافتی زنده و دارای عمل‌کرد جهت جایگزین نمودن بافت یا اندام آسیب دیده در افراد بیمار با استفاده از استراتژی‌های مبتنی بر مواد بیوپلیمری و بیولوژیکی و سلول‌ها پایه ریزی شده است. مهندسی بافت معمولا از سه بخش داربست، سلول و فاکتورهای رشد تشکیل یافته است. در این روش فرآیندهای همچون جدا کردن سلول‌های مورد نظر از فرد بیمار، گسترش این سلول‌ها، کشت این سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی بر روی داربست مناسب و ایجاد شرایط تکوین این سلول‌ها از مهم‌ترین مراحل کار می‌باشد (۱). یکی از مهم‌ترین مسائل تاثیرگذار در این روش، استفاده از یک داربست مناسب به‌منظور هدایت رشد سلولی و تکوین آن می‌باشد. علاوه بر این، داربست مورد استفاده باعث ایجاد یک سطح مناسب به‌منظور چسبندگی و تکثیر سلول‌ها نیز می‌شود. به‌طور کلی داربست‌ها را بر اساس منشا آن‌ها به دو نوع طبیعی و سنتزی طبقه بندی می‌نمایند. هر دو نوع داربست با وجود مزایایی که دارند معایبی را هم شامل می‌شوند. تاکنون تحقیقات گسترده‌ای جهت ایجاد داربست‌های مناسب مرتبط با اهداف مهندسی بافت صورت پذیرفته است (۱). فیبرین یک ماده زیست تخریب پذیر طبیعی است که قابلیت کاربرد به‌عنوان یک داربست کارآمد در مهندسی بسیاری از بافت‌ها را دارد. داربست فیبرینی شبکه‌ای از پروتئین‌ها است که در کنار هم نگه‌داری شده و از انواع بافت‌های زنده محافظت می‌کنند . این داربست می‌تواند به‌طور طبیعی توسط بدن پس از آسیب تولید شود، با این‌حال همچنین می‌توان با استفاده از روش‌های مهندسی بافت به‌عنوان یک جایگزین بافت جهت بهبود سریع‌تر بافت آسیب دیده آن را طراحی نمود. داربست حاوی مواد زیستی است که به‌طور طبیعی متشکل از یک شبکه فیبرینی با ارتباطات عرضی می‌باشد که باعث استفاده گسترده ازآن در کاربردهای زیست پزشکی شده است . فیبرین متشکل از فیبرینوژن و ترومبین پروتئین خون می‌باشد که در انعقاد خون شرکت می‌کنند. چسب فیبرین و لخته نیز به‌عنوان یک داربست فیبرینی به‌حساب آمده و جهت کنترل خون‌ریزی حاصل از جراحی، بهبود سریع‌تر زخم، مهر و موم کردن ارگان‌های توخالی بدن و یا پوشاندن منافذ حاصل از بخیه استاندارد و دارورسانی آهسته و پیوسته به بافت مورد نظر مورد استفاده قرار می‌گیرد.

استفاده از داربست فیبرینی در ترمیم جراحات وارده به دستگاه‌های مختلف از جمله دستگاه ادراری، کبد، ریه، طحال، کلیه و قلب مفید است. در تحقیقات زیست پزشکی نیز داربست فیبرینی در تحقیقاتی همچون پر کردن حفره‌های استخوان، تعمیر سلول‌های عصبی، تمایز سلول‌های بنیادی به بافت غضروفی مورد استفاده قرار می‌گیرد. داربست فیبرینی دارای جنبه‌های مختلفی همچون زیست سازگار بودن، زیست تخریب پذیر بودن و قابلیت پردازش آسان می‌باشند. علاوه بر این، منبع اتولوگ داشته و می‌توان آن را به اندازه و شکل‌های مختلف دست‌کاری کرد. نقش ذاتی آن در بهبود زخم‌ها در برنامه‌های کاربردی جراحی مفید است. بسیاری از عوامل را می‌توان به داربست فیبرینی متصل و آن‌را می‌توان به شیوه کنترل شده سلول آزادسازی نمود. سختی آن‌را می‌توان با تغییر غلظت با توجه به نیازهای سلول‌های اطراف و محصور شده تنظیم نمود. خواص مکانیکی اضافی را می‌توان با ترکیب فیبرین با داربست مناسب دیگر به‌دست آورد. هر مطالعه زیست پزشکی مشخصه خاص خود را برای انواع مختلف بافت‌ها داشته و مطالعات اخیر با داربست فیبرینی امیدواری‌ها را در جهت بهبودی سریع‌تر،

عوارض کمتر و راه حل‌های طولانی مدت‌تر بیشتر کرده است.

PRP یک ابزار بیولوژیکی نوظهور در جراحی و طب ترمیمی می‌باشد (۲). PRP توانایی تحریک رشد و تمایز سلول‌های بنیادی را در شرایط آزمایشگاهی دارد و به‌عنوان یک داربست در پژوهش‌های مهندسی بافت می‌توان از آن استفاده نمود. به‌طور کلی PRP را می‌توان به‌عنوان پلاسمای همراه با مقدار زیادی از پلاکت‌ها به نسبت گلبول سفید خون تعریف نمود. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد ژل PRP به تنهایی یا به همراه سلول‌های بنیادی مزانشیمی اتولوگ توانایی ترمیم و بهبود بخشیدن زخم را دارا می‌باشند (۳ و۴ و۵). PRP به‌طور موفقیت آمیزی در سال ۱۹۷۰ توسط Matras برای اهدافی همچون پیوند پوست در موش مورد استفاده قرار گرفت. در حال حاضر، PRP داربست اتولوگی است که اغلب در جراحی‌های ارتوپدی مورد استفاده قرار می‌گیرد. مزیت اصلی PRP این است که یک ماده اتولوگ بوده و فعالیت آن بدون سمیت و ایجاد پاسخ ایمنی می‌باشد. استفاده از داربست‌های مشتق شده از PRP به‌دلیل وجود فاکتورهای رشد چندین مزیت دارد. در این فاکتورهای رشد به‌دست آمده از پلاکت‌ها نه تنها تمایل اختصاصی به بافت وجود دارد بلکه قابلیت برهم کنش با فاکتورهای رشد دیگر را نیز دارند که این عمل منجر به فعال شدن بیان ژن و تولید پروتئین می‌شود. PRP غنی از پروتئین‌هایی همچون فیبرونکتین و فیبرین و پروتئین‌های اتصالی می‌باشد که به‌عنوان یک مولکول اتصالی عمل نموده و می‌توانند مهاجرت سلولی را تحریک نمایند (۲). هدف از این مطالعه، بررسی توانایی دو داربست طبیعی فیبرین گلو و PRP در ایجاد محیطی مناسب جهت رشد و بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی می‌باشد.

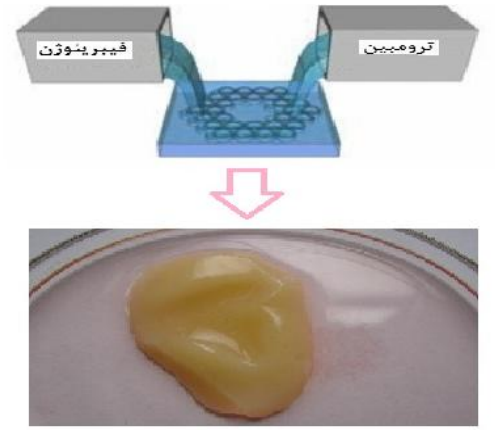
مواد و روش‌ها

به‌منظور کشت سلول، محیط DMEM از شرکت سیگما (Sigma- شماره کاتالوگ D5523) و سرم جنین گوساله (FBS- شماره کاتالوگ ۱۰۲۷۰) و آنتی بیوتیک پنی سیلین- استرپتومایسین از شرکت گیبکو (Gibco- شماره کاتالوگ P0781) خریداری شدند.

آماده سازی PRP: ابتدا خون محیطی را به‌داخل یک لوله آزمایش حاوی ۳/۸ درصد سدیم سیترات با نسبت ۱ به ۹ ریخته و به‌دنبال آن به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. محصول به‌دست آمده به ۳ لایه تقسیم شد که لایه پایینی حاوی سلول‌های خونی غنی از اریتروسیت‌ها بود، لایه میانی حاوی لوکوسیت‌ها و سایتوکین‌های التهابی و لایه بالایی حاوی پلاسما، پلاکت‌ها و فاکتورهای رشد بود. در این تحقیق PRP به‌دو گروه تقسیم شد که شامل PRP فعال شده با کلرید کلسیم و PRP غیرفعال می‌باشد. برای تولید PRP فعال، محلول ۱۰ درصد کلرید کلسیم قبل از استفاده از PRP به آن اضافه شد (۳ و۶).

آماده سازی فیبرین گلو

آماده سازی فیبرینوژن و ترومبین: پلاسمای تازه منجمد و فیبرینوژن از سازمان انتقال خون قم تهیه شد. پلاسمای تازه منجمد به نسبت ۵ به ۳ به کلسیم گلوکونات اضافه شده و به‌مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه با ۲۲۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. در مرحله بعد پس از سانتریفوژ، محلول رویی آن حذف و ترومبین آن جداسازی گردید. فیبرینوژن و ترومبین حاصله برای استفاده جهت کشت سلول آماده شد (شکل ۱). به‌همین منظور، ابتدا سلول‌های بنیادی مشتق از چربی با غلظت 5×10^{6} سلول در هر میلی‌لیتر در داخل ترومبین به‌صورت محلول درآمده و فیبرینوژن به آن‌ها اضافه گردید و در نهایت به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در داخل انکوباتور (۳۷ درجه سانتی‌گراد، CO_2 ۵ درصد و رطوبت ۹۹ درصد) قرار گرفت (۶).



شکل ۱: آماده سازی داربست فیبرین گلو

جداسازی و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی: در این مطالعه، برای جداسازی سلول‌های بنیادی

مزانشیمی، بافت چربی به‌دست آمده از جراحی لیپوساکشن در سرم فیزیولوژی حاوی آنتی بیوتیک و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد از بیمارستان به آزمایشگاه منتقل و پس از چندین بار شستشو با PBS و سرم فیزیولوژی به قطعات کوچک تبدیل شد. سپس سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌وسیله هضم با آنزیم کلاژناز I از بافت چربی استخراج گردید. به این‌صورت که ابتدا به‌ازای هر یک گرم چربی ۱٫۵ میلی‌گرم آنزیم کلاژنازI به آن اضافه و به‌مدت ۴۵ تا ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس تحت سانتریفوژ به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۸۰۰ دور در دقیقه قرار گرفته و در نهایت رسوب سلولی در محیط کشت DMEM حاوی آنتی بیوتیک پنی سیلین/استرپتومایسین و FBS ۱۰ درصد به فلاسک مخصوص کشت سلول منتقل و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵ درصد CO_2 و رطوبت ۹۵ درصد قرار داده شدند. پس از گذشت یک روز، سلول‌هایی که به کف فلاسک نچسبیده بودند، با تعویض محیط از فلاسک حذف شدند. محیط کشت سلول‌ها هر ۳ روز یک‌بار تعویض گردید. سلول‌ها پس از ترپسینه شدن به مرحله پاساژ سوم به‌عنوان نمونه انتقال یافت و جهت استفاده آماده گردید (۶ و۷).

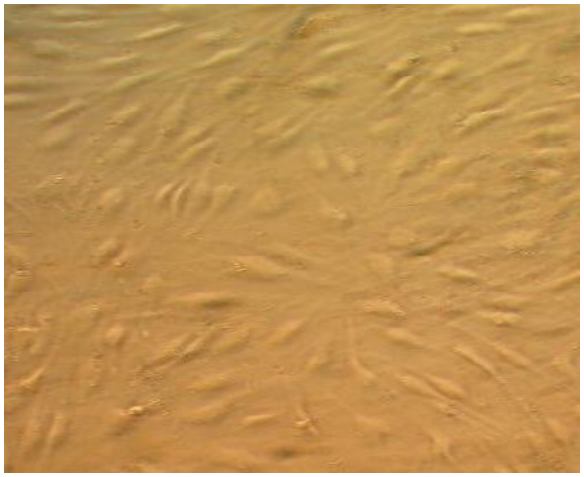
شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی توسط روش فلوسایتومتری: در مطالعه حاضر، به‌منظور شناسایی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی از روش فلوسایتومتری استفاده شد. به این‌صورت که سلول‌ها پس از تریپسینه شدن در مرحله پاساژ سوم، به‌مدت ۱۵ دقیقه با پارافرمالدئید ۴ درصد فیکس شدند. سپس سلول‌ها به‌وسیله محلول شستشوی مخصوص فلوسایتومتری (شامل PBS و سرم ۱ درصد) شستشو داده شدند و در PBS حاوی آنتی بادی به‌صورت محلول در آمدند. سپس آنتی‌بادی‌های اولیه کونژوگه شده با فیکواریترین یا ایزوتیوسیانات فلورسنت ضد CD44، CD90، CD105 و CD34 مورد استفاده قرار گرفتند. در پایان فلورسنس سلولی با استفاده از دستگاه FACS Calibur instrument (Becton Dickinson, Germany) به‌وسیله فلوسایتومتری اندازه‌گیری شد.

تعیین توانایی زنده ماندن سلول توسط تست MTT: ارزیابی توانایی زنده ماندن سلول پس از گذشت ۴۸ ساعت از کشت سلول‌ها بر روی داربست‌ها انجام پذیرفت. نیم میلی‌لیتر محیط کشت DMEM و ۵۰ میکرولیتر محلول MTT (۳، ۴ و ۵-دی متیل) تیازول-۲-یل-۲و۵-دی متیل تترازولیوم بروماید, ۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) به داربست‌ها اضافه شد. پس از ۴ ساعت انکوباسیون، نیم میلی‌لیتر دی متیل سولفوکسید (DMSO) به محلول حاصل اضافه شد. پس از گذشت ۲۰ دقیقه در نهایت میزان جذب نوری سلول/داربست در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت ریدر اندازه‌گیری شد (۶).

آنالیز آماری: در این آزمایش با استفاده از تست مقایسه میانگین‌ها برای حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD)، معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در ارزیابی ایجاد محیط مناسب جهت توانایی بقا در دو داربست مشخص گردید. آنالیز MTT برای هر نمونه ۴ بار تکرار شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه ۱۷) انجام پذیرفت و سطح معنی‌داری با ارزش $p< ۰/۰۵$ مشخص گردید.

نتایج

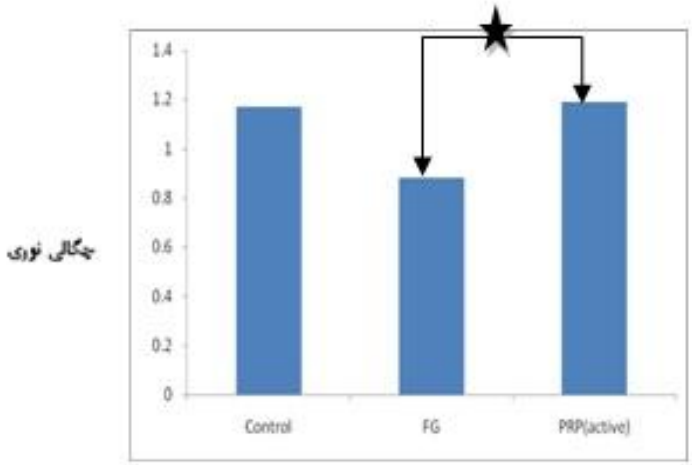
در کشت اولیه، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی با ظاهری شبیه به فیبروبلاست یا دوکی شکل با هسته‌های مشخص رشد کردند که توسط میکروسکوپ فاز متضاد مشاهده گردید (شکل۲).



شکل ۲: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی

در پاساژ سوم، سلول‌های یکنواختی با رشد و افزایش در تعداد آن‌ها به‌دست آمد. جهت بررسی و اثبات مزانشیمی بودن سلول‌ها از نشانگرهای سطحی CD44، CD90 و CD105 استفاده شد. روش فلوسایتومتری نشان داد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی

مشتق از چربی از نظر بیان نشانگرهای سطحی CD44، CD90 و CD105 با بیش از ۹۰ درصد بیان، مثبت هستند و از نظر بیان مارکر سلول‌های هماتوپوئیتیک CD34 منفی می‌باشند. در پاساژ سوم، تعداد $۵×۱۰^{۴}$ سلول/ میلی‌لیتر به‌عنوان نمونه بر روی هر کدام از داربست‌ها قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که از لحاظ آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) با احتمال $p<۰/۰۵$ دوام بقای سلولی میان دو داربست به‌صورت معنی‌داری متفاوت بود. این قابلیت در داربست فیبرین گلو به‌صورت معنی‌داری کمتر از PRP گزارش شد. همچنین دوام بقای سلولی بر روی داربست PRP ($p< ۰/۰۵$) بالاتر به‌دست آمد (نمودار ۱).



نمودار ۱: مقایسه دوام بقای سلولی میان دو داربست طبیعی PRP و فیبرین گلو

بحث

مطالعه حاضر به بررسی قابلیت بقای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی بر روی دو داربست طبیعی فیبرین گلو و *PRP* می‌پردازد. در این مطالعه، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی از بیماران تحت عمل لیپوساکشن جداسازی شد. جهت تایید جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی از روش فلوسایتومتری استفاده گردید. نتایج حاصل از فلوسایتومتری نشان داد که این سلول‌ها از نظر بیان نشانگرهای سطحی ویژه سلول‌های مزانشیمی مثبت بوده و توانایی بیان نشانگر سلول‌های هماتوپوئیتیک را ندارند که این نتایج مطابق با نتایج گزارش شده توسط *Zuk* و همکاران (۸) بود. طبق نتایج به‌دست آمده از این مطالعه، انتخاب داربست مناسب می‌تواند بر روی قابلیت بقای سلول‌های بنیادی مشتق از چربی تاثیرگذار باشد. مهندسی بافت و طب ترمیمی به روابط بین سه عنصر اساسی منبع سلولی، فاکتورهای رشد و داربست سلولی مناسب بستگی دارد. انتخاب داربست مناسب در مهندسی بافت می‌تواند باعث تقویت و حفظ عمل‌کردهای مختلف سلولی گردد. از جمله داربست‌های مورد استفاده در مهندسی بافت با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی، داربست *PRP* می‌باشد. پلاسمای غنی از پلاکت *(PRP)* حجمی از پلاسمای خود فرد (اتولوگ یا مشتق از خود) که غلظت پلاکت آن بالاتر از حد پایه در خون کامل است. نتایج حاصل از پژوهش‌های مختلف نشان دادند که *PRP* حاوی غلظت‌های بالایی از فاکتورهای رشد و سایتوکین‌ها بوده و این فاکتورهای زیستی می‌توانند رشد و تکثیر سلول‌های مزانشیمی، استئوبلاستی و فیبروبلاستی را تحریک نمایند (۳، ۴، ۹ و ۱۰ و۱۱). در این تحقیق یکی از دلایل کارایی بهتر داربست *PRP* نسبت به فیبرین گلو را می‌توان برهم‌کنش بین فاکتورهای رشد موجود در پلاکت‌های این داربست با سلول‌های بنیادی مزانشیمی دانست که منجر به رشد بیشتر این سلول‌ها می‌گردد. تصور می‌شود که مزایای *PRP* به ویژگی‌های درون آن و تعامل فاکتورهای رشد تغلیظ شده، ارتباط داشته باشد. داربست ژلی *PRP* مزایای بیشتری را در مقایسه با داربست‌های دیگر حاصل از زیست مواد طبیعی و مصنوعی در مهندسی بافت بیشتر دارد که از جمله دلایل آن، نخست این که *PRP* اتولوگ مشکلات حاصل از ایمنی زایی و انتقال بیماری‌ها را ندارد. این اسکلت

به‌طور طبیعی امن بوده و تاکنون هیچ مدرکی دال بر تحریک افزایش غیر طبیعی رشد، سرطان‌زایی یا رشد تومور پس از استفاده از آن وجود ندارد. ثانیا، نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی نگاره نشان داد که سلول‌های مزانشیمی حاصل از مغز استخوان قابلیت توزیع مناسب را در داربست‌های *PRP* دارند. دلیل سوم اینکه فاکتورهای رشد اتولوگ موجود در *PRP* می‌توانند مهاجرت، رشد و تمایز که زمینه ساز ترمیم زخم‌ها و جوان سازی و نوسازی بافت‌های نرم است را تحریک نماید. دلیل چهارم اینکه، *PRP* قابل تزریق بوده و بنابراین می‌توان آن‌را در درمان آسیب‌های کوچک مورد استفاده قرار داد و همچنین به‌دلیل قابل برگشت پذیر بودن *(Placticity)* و تثبیت چسبندگی آن به جایگاه‌های طراحی شده می‌توان از آن در محیط‌های زنده استفاده نمود. پنجم اینکه، پلاکت‌ها و لوکوسیت‌های موجود در *PRP* نقش مهمی را در دفاع ضد میکروبی میزبان بازی می‌کنند که این توانایی باعث کاهش ایجاد عفونت پس از پیوند می‌شود (۲، ۴ ، ۵ و۱۲). داربست از مقادیر زیاد پلاکت‌هایی که در حجم کمی پلاسما به‌صورت محلول درآمده‌اند تشکیل شده و به‌عنوان حاملی که توسط پلاکت‌های خود فاکتورهای رشد را ترشح می‌نماید عمل می‌کند (۳ و۴). این واقعیت که گرانول‌های آلفای موجود در *PRP* توسط پلاکت‌های دارای بسیاری از فاکتورهای رشد ترشح می‌شود به‌خوبی مشخص شده است. از جمله این فاکتورها می‌توان به فاکتورهای *AA*، *AB* و *BB* ، فاکتورهای رشد انتقالی *B1* و *B2*، فاکتورهای رشد اپیدرمی، فاکتورهای رگ‌زایی، فاکتورهای رشد انسولین-۱ و فاکتورهای پلاکتی-۴ اشاره نمود (۲ و۵). این فاکتورهای رشد هنگامی‌که از پلاکت‌ها آزاد می‌شوند بازسازی و ترمیم بافت‌های مختلف را تحت تاثیر قرار می‌دهند که این مسئله به‌علت وجود برخی از محرک‌ها از جمله حضور ترومبین که سبب دگرانوله شدن پلاکت‌ها می‌شود رخ می‌دهد. این نتایج استفاده از *PRP* را به‌عنوان یک داربست مناسب و قدرتمند تایید می‌نماید. بر اساس نتایج حاصل از برخی مطالعات بر روی عمل‌کردهای بیولوژیکی و فیزیولوژیکی هیدروژل‌ها، پیشنهاد شد که استفاده از *PRP* به‌جای هیدروژل‌ها برای انتقال سلول‌ها به داربست‌های ۳ بعدی می‌تواند بهبودی بیشتری را در روش‌های کشت متداول ایجاد نماید (۱۳). پیشنهاد می‌شود که استفاده از *PRP* جهت انتقال سلول‌ها می‌تواند به‌صورت همزمان فاکتورهای زیست فعال بسیاری را به داربست‌ها انتقال دهد و امکان مساعدت در کیموتاکسیس و میتوژنی سلول‌های بنیادی و استئوبلاست‌ها، رگ‌زایی، تشکیل ماتریکس استخوانی و ساخت کلاژن را فراهم آورد (۲).

نتیجه گیری

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، استفاده از داربست‌های مشتق شده از PRP به‌عنوان محافظی به منظور رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای توسعه استراتژی‌های کارا و جدید در مهندسی بافت و طب ترمیمی پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

از آقایان جناب دکتر حمیدرضا فرهنگ و دکتر محمدرضا بیگدلو که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند تشکر به‌عمل می‌آوریم.

منابع

1. Chan BP, Leong KW. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. Eur Spine J. 2008 Dec;17 Suppl 4: 467-79.

2. Mei-Dan O, Lippi G, Sánchez M, Andia I, et al. Autologous platelet-rich plasma: a revolution in soft tissue sports injury management? Phys Sportsmed. 2010; 38(4): 127-35.

3. Krüger JP, Hondke S, Endres M, Pruss A, et al. Human platelet-rich plasma stimulates migration and chondrogenic differentiation of human subchondral progenitor cells. J Orthop Res. 2012; 30(6): 845-52.

4. Krüger JP, Ketzmar AK, Endres M, Pruss A, et al. Human platelet-rich plasma induces chondrogenic differentiation of subchondral progenitor cells in polyglycolic acid–hyaluronan scaffolds. J Biomed Mater Res Part B. 2013; 102(4): 681–692.

5. Lee HR, Park KM, Joung YK, Park KD, et al. Platelet-rich plasma loaded hydrogel scaffold enhances chondrogenic differentiation and maturation with up-regulation of CB1 and CB2. J Control Release 2012; 159(3): 332-7.

6. Ghiasi M, Tabatabaei Qomi R, Nikbakht M, Sheykhhasan M. Expression of collagen type I and II, aggrecan and SOX9 genes in mesenchymal stem cells on different bioscaffolds.Tehran Univ Med J. 2015; 73(3): 158-67.

7. Ghiasi M, Tabatabaei Qomi R, Kalhor N, Fazaeli H, et al. The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. SMU Medical Journal. 2014; 1(2): 261 – 273.

8. Ghiasi M, Fazaely H, Asaii E, Sheykhhasan M. In Vitro Maturation of Human Oocytes using Conditioned Medium of Mesenchymal Stem Cells and Formation of Embryo by Use of ICSI. SMU Medical Journal. 2014; 1(1): 89 – 98.

9. Labusca L, Mashayekhi K. Adipose-derived stem cells for cartilage regeneration - moving towards clinical applicability. Stem Cell Research & Therapy. 2013; 4: 118-119.

10. Mishra A, Tummala P, King A, Lee B, et al. Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation. Tissue Eng Part C Methods. 2009 Sep; 15(3): 431-5.

11. Nguyen RT, Borg-Stein J, McInnis K. Applications of platelet-rich plasma in musculoskeletal and sports medicine: an evidence-based approach. PM&R. 2011; 3(3): 226–250.

12. Xie X, Wang Y, Zhao C, Guo S, et al. Comparative evaluation of MSCs from bone marrow and adipose tissue seeded in PRP-derived scaffold for cartilage regeneration,Biomaterials. 2012; 33(29): 7008-18.

13. Yin Z, Yang X, Jiang Y, Xing L, et al. Platelet-rich plasma combined with agarose as a bioactive scaffold to enhance cartilage repair: An in vitro study. J Biomater Appl. 2014; 28(7): 1039-50.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Spring 2015; 6(1): 23-29

Original Article

Survival Potential Investigation of the Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell in the Natural Scaffolds as a Suitable Growth Medium

Ghiasi, M, M.Sc.[1], Tabatabaei Qomi R, M.Sc.[2], Kalhor N, M.Sc.[3], Mehdizadeh M, MD.[4], Sheykhhasan M, M.Sc.[5]*

1. Cellular and molecular M.Sc., Laboratory of Stem Cell, The Academic Center for Education, Culture and Research, Qom Branch, Qom, Iran
2. Biology M.Sc., Laboratory of Stem Cell, The Academic Center for Education, Culture and Research, Qom Branch, Qom, Iran
3. Genetic M.Sc., Laboratory of Stem Cell, The Academic Center for Education, Culture and Research, Qom Branch, Qom, Iran
4. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Dental Faculty, Babol Medical Science University, Babol, Iran
5. Biotechnology M.Sc., Laboratory of Stem Cell, The Academic Center for Education, Culture and Research, Qom Branch, Qom, Iran

*corresponding author: m.sheykhhasan@acecr.ac.ir

Received: 24 May. 2014 Accepted: 12 Aug. 2014

Abstract

Aim: In this study, it was done to evaluate the efficiency of both PRP and Fibrin Glue scaffolds in producing suitable environment for the growth of mesenchymal stem cells.

Material and Methods: In this study, the preparation of PRP and Fibrin Glue Scaffold were carry out and Mesenchymal Stem Cells (MSCs) isolated from adipose tissue. The mesenchymal phenotype of these cells was determined by mesenchymal surface marker using flow cytometry. Then, MSCs were cultured, and on the third passage (P3) stage, they were seeded separately on the two scaffolds and after 48 hours of cell culture, the ability of the scaffolds seeded cells was evaluated by MTT assay for cells viability.

Results: Flow cytometry results showed that human adipose-derived mesenchymal stem cell expressed CD44, CD90 and CD105 surface markers. Also, the results of this study showed that the active PRP could be creating a more suitable environment for the survival and proliferation of mesenchymal stem cells in compare with Fibrin glue

Conclusion: It is suggested that the PRP as a protective scaffold could be used for mesenchymal stem cells growth to provide effective strategies in order to tissue engineering development and regenerative medicine.

Keywords: Tissue Engineering, PRP, Fibrin Glue, Mesenchymal Stem Cells