خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۶ شماره ۲ تابستان ۸۸ (۸۳-۷۱)
مقاله پژوهشی

اثر عوامل رشد حاصل از ژل پلاکتی بر تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی

مریم امانی[۱]، دکتر ناصر امیری‌زاده[۲]، دکتر مسعود سلیمانی[۳]، دکتر حسین ملکان[۴]، دکتر مهریار حبیبی رودکنار[۵]، مریم بشتر[۶]

چکیده

سابقه و هدف

سلول‌های بنیادی مزانشیمی(MSCs)، جمعیت سلولی موجود در مغز استخوان هستند که توانایی تکثیر و تمایز بالقوه‌ای دارند. به منظور تکثیر و تمایز سلول‌های مزانشیمی، از FBS به عنوان یک مکمل در محیط کشت استفاده می‌شود که با خطر انتقال انواع عفونت‌ها و ایجاد واکنش‌های ایمنی همراه است. ژل پلاکتی اتولوگ، از اجزای طبیعی خون خود فرد تهیه می‌شود. پلاکت‌های فعال شده، عوامل رشدی را آزاد می‌سازند که خاصیت میتوژنیک برای سلول‌های مزانشیمی دارند. هدف از این مطالعه، بررسی تاثیر عوامل رشد پلاکتی بر روی تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی است.

مواد وروش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. سلول‌های تک هسته‌ای مغز استخوان جدا شده و در محیط کشت DMEM و ۱۰٪ FBS کشت داده شدند. سلول‌های حاصل از پاساژ اول با بررسی شاخص‌های CD45 ، CD166 ، CD90 ، CD105 ، CD44 و CD34 به روش فلوسایتومتری مورد تایید قرار گرفتند. با افزودن ترومبین و کلسیم به پلاسمای غنی از پلاکت، ژل پلاکتی تهیه شد. ژل پلاکتی به مدت ۳۰ دقیقه، ۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در گرماخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری و میزان عوامل رشد پلاکتی در این مایع با استفاده از روش الایزا اندازه‌گیری شد. سلول‌های مزانشیمی در محیط حاوی سرم ۱۰٪ و محیط حاوی عوامل رشد پلاکتی ۱۰٪ به مدت ۸ روز کشت و تکثیر داده شدند. میزان تکثیر سلول‌ها با استفاده از روش MTT بررسی شد. سلول‌های مزانشیمی بر روی داربست سه بعدی تری‌کلسیم فسفات کشت داده شدند و در نهایت میزان رشد و مورفولوژی سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی بررسی شد.

یافته‌ها

سلول‌های مزانشیمی با موفقیت جدا شده و در محیط حاوی فاکتورهای رشد پلاکتی تکثیر یافتند. از نظر مورفولوژی، سلول‌های مزانشیمی کشت داده شده مشابه سلول‌ها در محیط حاوی سرم بودند. سلول‌ها دارای شاخص‌های(۹۸/۸٪)CD166، (۹۳٪)CD105، (۹۶٪)CD90 و (۹۹/۵٪)CD44 و فاقد شاخص‌های سلول‌های خونساز نظیر(۲/۸٪)CD34 و(۳/۸٪)CD45 بودند. تفات قابل توجهی از نظر بیان شاخص‌ها بر روی سلول‌ها در دو محیط مشاهده نشد. در این مطالعه نشان داده شد که عوامل رشد پلاکتی نسبت به سرم، سبب افزایش بیشتر تعداد سلول‌ها می‌شوند. به علاوه سلول‌های مزانشیمی کشت داده شده در حضور فاکتورهای رشد پلاکتی، خاصیت استئوژنیک خود را حفظ کردند. تمایز استئوژنیک سلول‌های مزانشیمی با رنگ‌آمیزی رسوبات معدنی با Alizarin red و افزایش بیان آلکالین فسفاتاز تایید شد.

نتیجه گیری

عوامل رشد پلاکتی را می‌توان جایگزین سرم در محیط کشت سه بعدی نمود. این عوامل محیط مناسبی را برای رشد سلول‌های مزانشیمی فراهم می‌سازند. توانایی تمایز استئوژنیک سلول‌های مزانشیمی در این محیط حفظ می‌شود.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی، استئوژنزیس، داربست بافتی

تاریخ دریافت : ۸۷/۶/ ۶
تاریخ پذیرش : ۸۸/۵/۳۱

۱ـ کارشناس ارشد خون‌شناسی و بانک خون ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۲ـ مؤلف مسؤول: PhD خون شناسی و بانک خون ـ استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران ـ صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵
۳- PhD خون‌شناسی و بانک خون ـ استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
۴- متخصص ارتوپدی ـ بیمارستان آتیه
۵ـ PhD بیوتکنولوژی ـ استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۶ـ کارشناس پرستاری ـ مرکز تحقیقات پیوند خون و مغز استخوان بیمارستان شریعتی

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-21]

مقدمه

ژل پلاکتی اتولوگ اولین بار در اوایل ۱۹۹۰ به عنوان یک محصول جانبی از پلاسمای غنی از پلاکت(PRP = Platelet rich plasma) تهیه شد(۱). ژل پلاکتی را می‌توان از طریق مخلوط کردن پلاسمای غنی از پلاکت با ترومبین و کلسیم تهیه نمود(۳، ۲). عوامل رشد پلاکتی نظیر bFGF (Fibroblast growth factor)، EGF (Epidermal growth factor)، TGF-β (Transforming growth factor β) و PDGF (Platelet-derived growth factor) سبب تسریع تمایز، تکثیر و مهاجرت سلول‌های مزانشیمی می‌شوند(۴). در سال ۲۰۰۴، آرپورن ماکلانگ و همکاران به بررسی تاثیر PRP بر توانایی تمایز استئوژنیک سلول‌های مزانشیمی در رت پرداختند. نتایج نشان دادند که PRP به صورت وابسته به دوز، سبب افزایش فعالیت تکثیری سلول‌های مزانشیمی می‌شود. در حالی که سبب کاهش فعالیت آلکالین فسفاتاز و مقدار رسوب کلسیم در محیط می‌گردد(۵).

کیلیان و همکارانش در سال ۲۰۰۴ به بررسی اثرات عوامل رشد پلاکتی بر روی سلول‌های مزانشیمی و اندوتلیالی انسان در محیط کشت پرداختند. در این مطالعه، بعد از دگرانولاسیون پلاکتی با استفاده از ترومبین و کلسیم، عوامل رشد پلاکتی آزاد شده به محیط کشت سلول‌های مزانشیمی و اندوتلیالی افزوده شد. این امر سبب افزایش تکثیر و مهاجرت سلول‌های اندوتلیالی گردید و توانایی استئوژنزیز سلول‌های مزانشیمی در حضور این فاکتورها افزایش یافت(۶).

رومین و همکارانش در سال ۲۰۰۴ سلول‌های مغز استخوان و PRP را بر روی مواد بیولوژیک سرامیکی با خصلت Osteoinductive کشت دادند. افزایشی در حدود ۳۱٪ در تکثیر سلول‌های مغز استخوان مشاهده گردید. به علاوه بعد از ۱۵ روز از آغاز کشت، افزایش در فعالیت آلکالین فسفاتاز مشاهده شد(۷).

در سال ۲۰۰۵، دوکت و همکارانش به بررسی تاثیر لایست پلاکتی(PL) بر تکثیر سلول‌های مزانشیمی و جایگزین کردن سرم حیوانی با این ماده پرداختند. در این مطالعه آن‌ها از پلاسمای غنی از پلاکت، لایست پلاکتی(PL) تهیه کردند. نتایج نشانگر آن بود که PL سبب افزایش تکثیر سلول‌های مزانشیمی و افزایش اندازه CFU-F می‌شود(۸).

سلول‌های مزانشیمی، سلول‌های بنیادی چند قوه‌ای هستند که می‌توانند به استئوبلاست‌ها، کندروسیت‌ها و سلول‌های چربی تمایز یابند(۱۱-۹). منبع اصلی این سلول‌ها مغز استخوان است. این سلول‌ها به تعداد محدودی در مکان‌های دیگری نظیر بند ناف، خون محیطی، ماهیچه، چربی و سینوویوم نیز دیده می‌شوند(۱۵-۱۲).

سلول‌های مزانشیمی جدا شده از مغز استخوان مارکرهای CD166 ، CD105 ، CD106، CD29 و CD44 را بیان می‌کنند(۲۰-۱۶). این سلول‌ها فاقد مارکرهای ویژه سلول‌های خونساز و اندوتلیالی از جمله CD14 ، CD34 و CD45 هستند(۹). به طور معمول، تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی و تمایز آن‌ها به رده‌های مختلف سلولی از جمله سلول‌های استئوبلاست در خارج بدن(*ex vivo*)، در محیط کشت حاوی سرم حیوانی انجام می‌شود که با خطر انتقال انواع پاتوژن‌های شناخته شده و ناشناخته همراه است(۲۲، ۲۱).

به همین دلیل، در هنگام کاربرد این سلول‌ها در موارد درمانی، باید تماس سلول‌ها با سرم حیوانی را به حداقل رساند. بنابراین راه‌کرد مناسب، جایگزینی سرم حیوانی با منبع حمایتی مناسب می‌باشد. مطالعه‌های گذشته نشان داده‌اند که پلاسمای غنی از پلاکت و ژل پلاکتی، حاوی عوامل رشد مختلفی می‌باشند که نقش آن‌ها در تکثیر و تمایز سلول‌های مختلف به اثبات رسیده است.

در این مطالعه به منظور حذف سرم از محیط کشت سلول‌ها، عوامل رشد پلاکتی، جایگزین سرم حیوانی شد و تاثیر آن بر روی تکثیر و تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های استئوبلاست با استفاده از آزمایش‌های مولکولی و سلولی بررسی گردید.

در این مطالعه با فرض تاثیر عوامل رشد پلاکتی بر تکثیر و تمایز سلول‌های مزانشیمی، به تهیه سلول‌های مزانشیمی و محیط مناسب پرداخته و اثر این عوامل رشد، به صورت مقایسه‌ای با شرایط کشت در محیط سرم و در داربست سه بعدی مورد بررسی قرار داده شد.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-21]

مواد و روش ها

نوع مطالعه در این تحقیق به صورت تجربی و روش انتخاب نمونه‌ها تصادفی بود. سلول‌های مزانشیمی از اهداکنندگان سالم پس از کسب رضایت تهیه شد. نمونه‌های پلاکت نیز از افرادی که فاقد هر گونه اختلالات کمی و کیفی پلاکتی بودند تهیه گردید. جهت آنالیز داده‌ها از آزمون آماری ANOVA استفاده شد. مقادیر $p<$ ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شدند.

کشت سلول‌های MSCs *مغز استخوان:*

در مطالعه حاضر، ۱۰ میلی‌لیتر نمونه مغز استخوان از ۵ نفر اهداکننده سالم(محدوده سنی بین ۲۰-۴۰ سال) تهیه گردید. به طور خلاصه، سلول‌های تک هسته‌ای با استفاده از گرادیانت غلظت جدا شدند و در فلاسک کشت ۲۵ cm^2 حاوی ۶ میلی‌لیتر محیط کشت DMEM (آمریکا ـ سیگما)، ۱۰٪ FBS (آمریکا ـ اینویتروژن) و آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و پنی‌سیلین(ایران ـ سیناژن) کشت داده شدند. ۴۸ ساعت پس از آغاز کشت، سلول‌های غیر چسبنده با تعویض محیط حذف شدند.

به مدت ۱۴ روز، هر ۳ روز یک بار محیط کشت تعویض شد. بعد از این مدت، سلول‌های مزانشیمی تکثیر یافته و ۸۰ درصد کف فلاسک را پوشاندند. در این زمان، سلول‌ها پاساژ داده شد و به فلاسک‌های جدید منتقل گردید(۲۳، ۲۱).

بررسی شاخص‌های سطحی:

سلول‌های تریپسینه شده توسط تریپسین(اینویتروژن ـ آمریکا) در ۱ میلی‌لیتر محلول PBS (بیومدیکال ـ آمریکا) سوسپانسیون شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌ها با ۱۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های CD166 و CD105 (داکو ـ دانمارک) کنژوگه با فیکواریترین(PE) و آنتی‌بادی‌های CD90 ، CD34 ، CD45 و CD44 (داکوـ دانمارک) کنژوگه با فلورسنس ایزوتیوسیانات(FITC) و برای کنترل منفی با آنتی‌بادی‌های $PE\text{-}IgG_1$ و $FITC\text{-}IgG_1$ (داکو ـ دانمارک) مخلوط شدند و به مدت ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد و تاریکی انکوبه شدند. در مرحله بعد، سلول‌ها با ۲٪ PBS-BSA (سیگما ـ آمریکا) شستشو داده شدند و در ۵۰۰ میکرولیتر PBS سوسپانسیون و با دستگاه فلوسایتومتری تجزیه و تحلیل شدند(۲۱).

تهیه ترومبین:

به منظور تهیه ترومبین، ۱۰ میلی‌لیتر نمونه خون سیتراته تهیه شد. خون به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۳۰۰۰ سانتریفوژ شد و مایع‌رویی(پلاسما) جدا گردید. کلسیم گلوکونات(مینو ـ ایران) به پلاسما افزوده و نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پس از تشکیل لخته، نمونه با دور pm ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و مایع‌رویی(ترومبین) جمع‌آوری گردید. ترومبین تهیه شده بعد از فیلتراسیون تا زمان مصرف در دمای ۸۰°C- نگهداری شد(۲۴).

تهیه ژل پلاکتی:

از ۵ فرد اهداکننده خون، ژل پلاکتی به روش زیر تهیه شد. بعد از تهیه ۳۰ میلی‌لیتر خون سیتراته، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه و با دور pm ۱۲۰۰ سانتریفوژ شدند. مایع رویی جدا شده و دوباره به مدت ۱۰ دقیقه با دور pm ۳۰۰۰ سانتریفوژ شد. به منظور تغلیظ پلاکت‌ها، نیمی از پلاسما خالی شد و رسوب پلاکتی در پلاسمای باقیمانده شناور و به این ترتیب پلاسمای غنی از پلاکت(PRP) تهیه شد. بعد از این مرحله، PRP تهیه شده از افراد مختلف با یکدیگر مخلوط شدند.

به منظور تهیه ژل پلاکتی، پلاسمای غنی از پلاکت با ترومبین و کلسیم گلوکونات مخلوط شد. نمونه‌های تهیه شده به مدت ۳۰ دقیقه، ۶، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از گذشت زمان‌های فوق، نمونه‌ها با دور rpm ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. مایع‌رویی(عوامل رشد آزاد شده از پلاکت) جدا گردید و بعد از فیلتراسیون تا زمان مصرف در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد(لازم به ذکر است که پلاکت‌های افراد مختلف با یکدیگر مخلوط گردید و این مطالعه بر روی تک تک نمونه‌ها صورت نپذیرفت)(۳، ۲).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-21]

اندازه‌گیری عوامل رشد آزاد شده از پلاکت:

میزان عوامل رشد TGF-β ، EGF ، FGF و PDGF - AB آزاد شده از پلاکت‌ها در زمان‌های مختلف با استفاده از روش الایزا و مطابق با دستورالعمل کیت(سیستم R & D)، اندازه‌گیری شدند. حداقل میزان اندازه‌گیری عوامل رشد پلاکتی توسط کیت‌های مورد استفاده برای عوامل رشد TGF-β ، EGF ، FGF ، PDGF – AB به ترتیب ۱۱۶۵ ، ۱۳، ۲ و ۲۰۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر است(۲۶، ۲۵).

بررسی اثر عوامل رشد آزاد شده از پلاکت بر تکثیر سلول‌های مزانشیمی:

سلول‌های مزانشیمی به میزان مساوی(۵۰۰ سلول) در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شدند. سه چاهک، محیط حاوی سرم ۱۰٪ و چاهک‌های دیگر به صورت سه تایی، عوامل رشد پلاکتی ۱۰٪ مربوط به زمان‌های مختلف را دریافت کردند. به مدت ۸ روز، محیط کشت یک روز در میان تعویض شد. برای ارزیابی میزان تکثیر سلول‌ها از روش MTT استفاده شد.

تمایز به استخوان:

به منظور تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های استئوبلاست، ۵×۱۰^{۴} سلول در محیط DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم حیوانی در چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای که با کلاژن و ویترونکتین(کمیکون ـ آمریکا) پوشیده شده بودند، کشت داده شد.

پس از مرحله پوشاندن سطح، محیط سلول‌ها با محیط تمایز به استخوان جایگزین شد. محیط تمایز به استخوان شامل DMEM حاوی دگزامتازون ۱ میلی مولار، اسید اسکوربیک دو فسفات ۰/۱ مولار(کمیکون ـ آمریکا) و گلیسرول دو فسفات ۱ مولار و سرم بود که به یک سری از نمونه‌ها سرم ۱۰ درصد و به یک سری، عوامل رشد پلاکتی ۱۰ درصد افزوده شد.

بعد از ۱۴ روز، تمایز سلول‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی آلیزارین رد و آلکالین فسفاتاز مورد ارزیابی قرار گرفت. در ضمن بیان ژن استئوکلسین(OC) با روش RT-PCR بررسی شد(۲۷، ۲۱).

رنگ‌آمیزی آلیزارین رد:

به منظور تثبیت سلول‌های استئوبلاست، اتانول(آلمان، Merck) سرد ۷۰٪ به سلول‌ها افزوده گردید و سلول‌ها در دمای اتاق انکوبه شدند. بعد از آن سلول‌ها با محلول Alizarin (آمریکا، سیگما) رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با میکروسکوپ نوری ارزیابی شدند(۲۸).

رنگ‌آمیزی آلکالین فسفاتاز:

به منظور تثبیت سلول‌ها، محلول تثبیت کننده(آمریکا، سیگما) به سلول‌ها افزوده گردید و سلول‌ها در دمای اتاق انکوبه شدند. بعد از این مدت محلول رنگ‌آمیزی(آمریکا، سیگما) به سلول‌ها افزوده شد و سلول‌ها در دمای ۲۶–۱۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. بعد از این مدت سلول‌ها با هماتوکسیلین (آمریکا، سیگما) رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با میکروسکوپ نوری ارزیابی شدند(۲۹).

آنالیز RT-PCR :

سلول‌ها از نظر بیان ژن استئوکلسین(OC) مورد بررسی قرار گرفتند. بدین منظور RNA کل سلول‌های تمایز یافته و تمایز نیافته با استفاده از دستورالعمل کیت RNX-Plus (ایران ، سیناژن) جداسازی شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس از روی RNA استخراج شده، cDNA در واکنش رونویسی معکوس با استفاده از آغازگرهای هگزامر راندوم و آنزیم ترانس کریپتاز معکوس مطابق با دستورالعمل کیت ساخت cDNA (آمریکا، اینویتروژن) تهیه گردید. در ادامه واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی(Forward OCNF 5'- TGC AGA GTC CAG CAA AGG T- 3' و Reverse OCNF 5' – TCC TGC TTG GAC ACA AAG G – 3') و در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای آنیلینگ(۵۷ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۴۵ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه برای تکثیر نهایی و در ۳۴ سیکل انجام گردید. در پایان محصول PCR درون چاهک‌های ژل ۲

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-21]

درصد آگاروز(آمریکا، سیگما) ریخته شد و پس از الکتروفورز با رنگ اتیدیوم بروماید(آلمان، بهرینگ) رنگ‌آمیزی و سپس ارزیابی شد(۳۱، ۳۰).

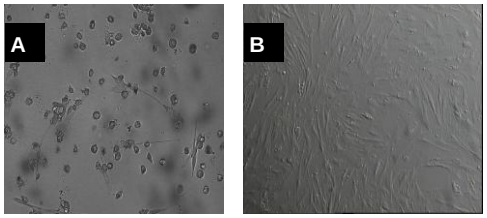
کشت و تمایز سلول‌های مزانشیمی در داربست سه بعدی:

داربست‌های سلولی سه بعدی کلسیم فسفات (بیوساینس ـ آمریکا) در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای قرار داده شدند. ۱×۱۰^{۴} سلول به هر خانه افزوده و بعد از یک ساعت محیط تمایز به آن‌ها اضافه شد. به مدت ۱۴ تا ۱۷ روز، محیط تمایز هر ۳ روز یک بار تعویض گردید. بعد از این مدت نمونه‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی و بررسی فعالیت آلکالن فسفاتاز مورد ارزیابی قرارگرفتند(۳۲).

یافته ها

کشت سلول:

۴۸ ساعت بعد از کشت سلول‌های تک هسته‌ای، سلول‌های غیر چسبان حذف شدند. سلول‌های دوکی شکل مزانشیمی پس از گذشت سه روز در محیط کشت به صورت سلول‌های چسبنده ظاهر شدند. تعدادی سلول هماتوپوئتیک به طور آزاد یا چسبیده به سلول‌های مزانشیمی هنوز در محیط دیده می‌شد که در روزهای بعدی با تعویض محیط ، این سلول‌ها حذف شدند و تنها سلول‌های مزانشیمی در محیط باقی ماندند. کشت اولیه در حدود ۱۰ تا ۱۴ روز طول کشید که در نهایت در روز

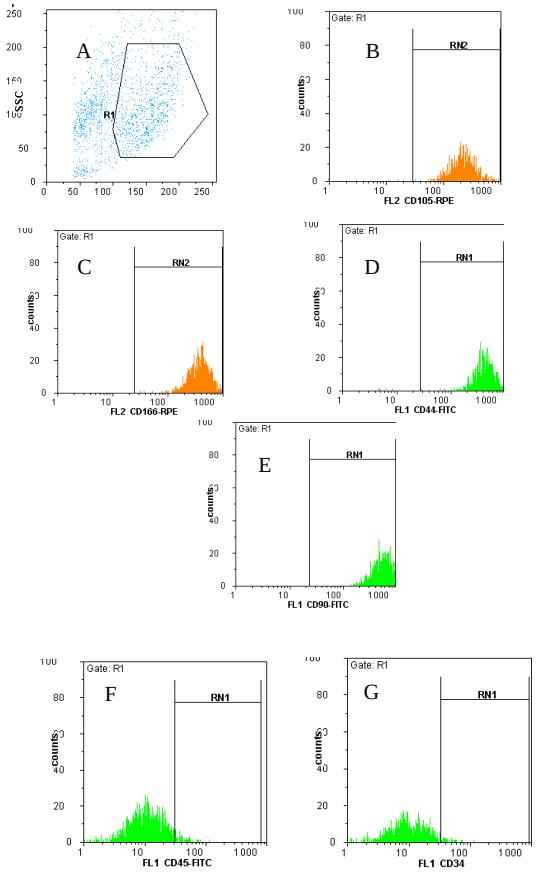


شکل ۱: نمایی از سلول‌های مزانشیمی در روزهای مختلف کشت (A) : سلول‌های شبیه فیبربلاست(سلول‌های دوکی شکل) و سلول‌های هماتوپوئتیک در روز سوم در محیط کشت دیده می‌شوند. (B) در روز چهاردهم سلول‌های مزانشیمی رشد کرده و بیش از ۸۰٪ کف فلاسک را پوشاندند. سلول‌های هماتوپوئتیک به طور کامل از محیط حذف شده‌اند(بزرگ نمائی ۴۰x).

چهاردهم، سلول‌ها بیش از ۸۰٪ کف فلاسک را پوشاندند(شکل ۱).

بررسی مارکرهای سطح سلولی:

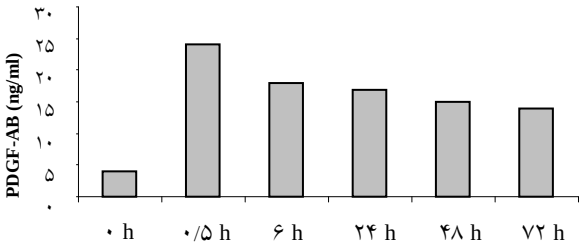
درصد بیان مارکرهای اختصاصی سلول‌های بنیادی مزانشیمی شامل CD90 ، CD166 ، CD105 و CD44 در سلول‌های جدا شده از مغز استخوان به ترتیب ۹۶/۸٪ ، ۹۸/۸٪ ، ۹۳٪ و ۹۹/۵٪ می‌باشد. در حالی که مارکرهای



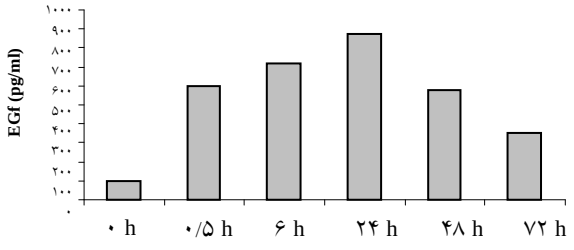
شکل ۲: ایمونوفنوتایپینگ سلول‌های مزانشیمی

نمودار (A) : گیت سلول‌های تک هسته ای را نشان می‌دهد. نمودار (B) بیان آنتی‌ژن CD166 را نشان می‌دهد. نمودار (C) : میزان بیان آنتی‌ژن CD44 . نمودار (D) : بیان آنتی‌ژن CD105. نمودار (E) : بیان آنتی‌ژن CD90. نمودار (F) : بیان آنتی‌ژن CD45. نمودار (G) : بیان آنتی‌ژن CD34. در نمودارهای فوق، محورهای افقی نمایانگر میزان رنگ کنژوگه‌های (FITC,PE) متصل به آنتی‌بادی‌های مورد نظر می‌باشد و محورهای عمودی تعداد سلول‌ها را نشان می‌دهد. خطوط RN1,RN2 بیانگر سلول‌های واجد مارکر ارزیابی است که توسط آنتی‌بادی‌های نشاندار شده با مواد فلورسنت مختلف شناسایی شده‌اند.

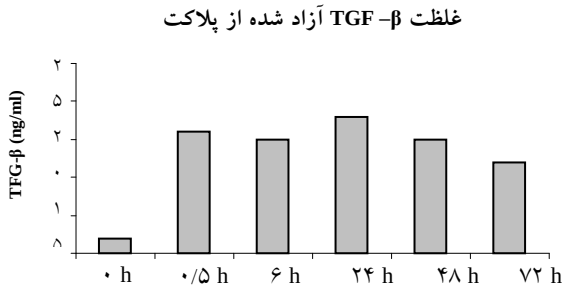
[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-21]



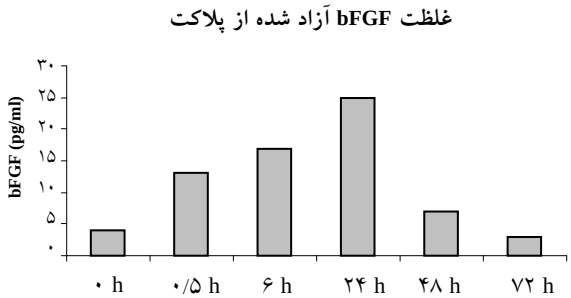
نمودار ۱: غلظت فاکتور PDGF آزاد شده از پلاکت‌ها در زمان‌های مختلف



نمودار ۲: غلظت فاکتور EGF آزاد شده از پلاکت‌ها در زمان‌های مختلف



نمودار ۳: غلظت فاکتور TGF-β آزاد شده از پلاکت‌ها در زمان‌های مختلف



نمودار ۴: غلظت فاکتور b-FGF آزاد شده از پلاکت‌ها در زمان‌های مختلف

ویژه سلول‌های هماتوپوئتیک از جمله CD45 و CD34 در این سلول‌ها بیان قابل توجهی(۳/۸٪ ، ۲/۸٪) را نشان ندادند(شکل ۲).

سنجش میزان عوامل رشد آزاد شده از پلاکت‌های فعال شده:

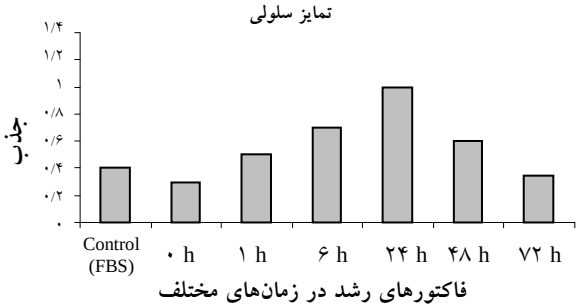
میزان عوامل رشد(TGF-β ، EGF ، bFGF ، PDGF AB) حاصل از ژل پلاکتی تهیه شده از نمونه‌های پلاکتی مخلوط و انکوبه شده در زمان‌های مختلف با روش الایزا اندازه‌گیری شد. داده‌های به دست آمده به صورت میانگین ± SD بیان شده‌اند. میزان عوامل رشد PDGF-AB و TGF-β در پلاسما و سوپرناتانت پلاکتی بالا بوده و در حدود نانوگرم در هر میلی‌لیتر است. میزان عوامل رشد EGF و FGF پایین بوده و در حدود پیکوگرم در هر میلی‌لیتر است. بالاترین میزان فاکتور PDGF مربوط به نیم ساعت اول انکوباسیون و در حدود ۵/۲ ± ۲۳/۲ نانوگرم در میلی‌لیتر می‌باشد(نمودار ۱). میزان EGF در ۲۴ ساعت به ۶۴ ± ۸۷۰ پیکوگرم در میلی‌لیتر می‌رسد که بالاترین میزان مشاهده شده است(نمودار ۲). بیشترین غلظت TFG-β مربوط به ۲۴ ساعت اول پس از انکوباسیون می‌باشد و میزان آن ۴/۹ ± ۱۸/۲ نانوگرم در میلی‌لیتر است(نمودار ۳). میزان bFGF در طی ۲۴ ساعت به ۷/۲± ۲۴/۷ پیکوگرم در میلی‌لیتر می‌رسد(نمودار ۴).

بررسی میزان تکثیر سلول‌های مزانشیمی در حضور عوامل رشد پلاکتی:

بررسی میزان تکثیر سلول‌ها نشان‌دهنده افزایش تعداد سلول‌ها در حضور اکثر عوامل رشد پلاکتی است. به طوری که بیشترین میزان رشد سلول‌ها در محیط حاوی عوامل آزاد شده از پلاکت در طی ۲۴ ساعت پس از

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-21]

انکوباسیون مشاهده شد. میزان افزایش تعداد سلول‌ها در این زمان به طور معنی‌داری بیشتر از زمان‌های دیگر و نمونه کنترل بود($p< ۰/۰۵$)(نمودار ۵). لازم به ذکر است که میزان رشد سلول‌ها بر حسب OD بیان می‌گردد. در این آزمایش هر چقدر تعداد سلول‌ها بیشتر باشد، OD نیز افزایش می‌یابد. سلول‌های مزانشیمی کشت داده شده در

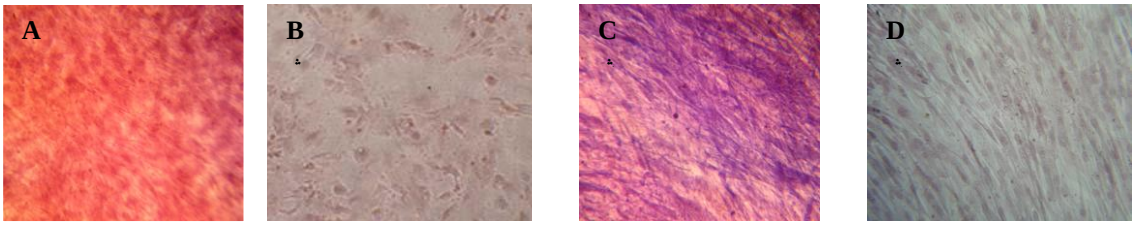


نمودار ۵: میزان رشد سلول‌های مزانشیمی در حضور عوامل رشد پلاکتی آزاد شده طی ساعات مختلف

این محیط از نظر مورفولوژی تغییر خاصی را نشان ندادند. میانگین و انحراف معیار میزان رشد سلول‌های مزانشیمی کشت داده شده در حضور عوامل رشد پلاکتی در زمان‌های مختلف در حضور سرم حیوانی، در زمان صفر، ۱، ۶، ۷۲، ۴۸، ۲۴ ساعت پس از انکوباسیون به ترتیب ۰/۱۸ ± ۰/۳۵ ، ۰/۲۳ ± ۰/۶ ، ۰/۲۱ ± ۱، ۰/۲ ± ۰/۷ ، ۰/۱۹ ± ۰/۵ ، ۰/۱۵ ± ۰/۳ ، ۰/۲ ± ۰/۴ می‌باشد.

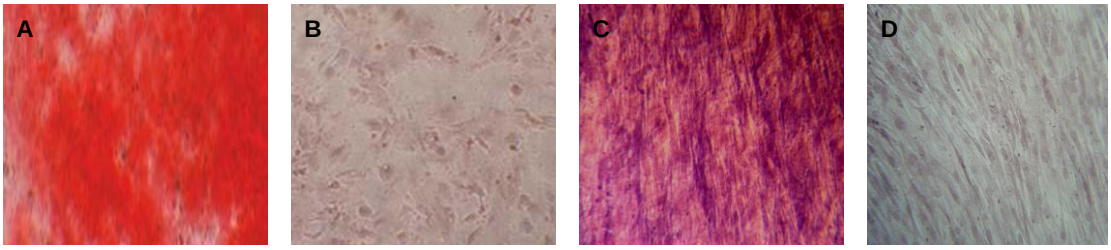
ارزیابی توانایی تمایز سلول‌های مزانشیمی به استئوبلاست:

سلول‌های مزانشیمی که به مدت دو هفته در محیط تمایز به استخوان قرار گرفته بودند، با رنگ‌آمیزی اختصاصی آلیزارین رد به رنگ قرمز در آمدند که حاکی از تجمع عناصر معدنی بر روی ماتریکس بود(شکل ۳A). به علاوه رنگ‌آمیزی آلکالن فسفاتاز نشان‌دهنده افزایش میزان فعالیت این آنزیم در سلول‌های تمایز یافته بود(شکل ۳C).



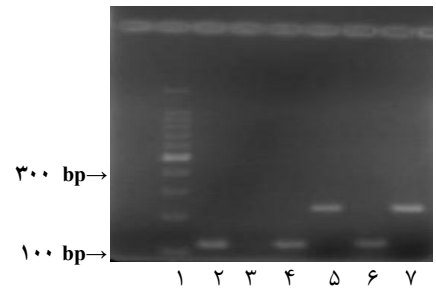
شکل ۳: تمایز سلول‌های مزانشیمی به رده سلول‌های استخوانی

سلول‌های مزانشیمی تمایز داده شده به سمت استئوبلاست با رنگ‌آمیزی آلیزارین رد (A) و آلکالین فسفاتاز (C) مثبت بودند. سلول‌های تمایز نیافته که نسبت به هر دو رنگ‌آمیزی منفی بودند(D, B)(بزرگ‌نمایی ۴۰ x).

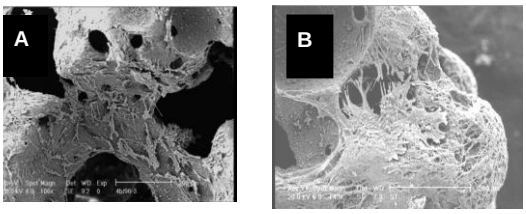


شکل ۴: تمایز سلول‌های مزانشیمی به رده سلول‌های استخوانی در حضور فاکتورهای رشد پلاکتی. سلول‌های مزانشیمی تمایز داده شده به سمت استئوبلاست با رنگ‌آمیزی آلیزارین رد (A) و آلکالین فسفاتاز (C) مثبت بودند. سلول‌های تمایز داده نشده که نسبت به هر دو رنگ‌آمیزی منفی بودند(D, B)(بزرگ‌نمایی ۴۰ x).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-21]



شکل ۵ : بیان ژن‌های استئوکلسین (OCN) و بتا اکتین(β-actin) در سلول‌های مزانشیمی.
(۱) نشانگر شاخص وزن مولکولی(DNA size Marker 100bp) است.
(۲و۳) بیان ژن بتااکتین و استئوکلسین را در سلول‌های مزانشیمی تمایزنیافته نشان می‌دهد.
(۴و۵) بیان ژن بتااکتین واستئوکلسین را در سلول‌های مزانشیمی تمایز یافته در حضور سرم نشان می‌دهد.
(۶و۷) بیان ژن بتااکتین و استئوکلسین را در سلول‌های مزانشیمی تمایز یافته در حضور فاکتورهای رشد پلاکتی نشان می‌دهد.



شکل ۶ : تصاویر داربست سلولی سه بعدی تری‌کلسیم فسفات تصاویر SEM ساختار داربست تری‌کلسیم فسفات که سلول‌ها در آن قرار گرفته اند(A, B) .

بررسی تمایز سلول‌های مزانشیمی در حضور فاکتورهای رشد پلاکتی:

نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی‌های آلیزارین رد و آلکالین فسفاتاز نشان‌دهنده حفظ پتانسیل تمایزی سلول‌های مزانشیمی به سمت سلول‌های استخوانی در حضور فاکتورهای رشد پلاکتی می‌باشد(شکل ۴).

شدت رنگ‌آمیزی‌ها نشان‌دهنده افزایش میزان تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های استئوبلاست است.

بررسی بیان ژن استئوکلسین در سلول‌های تمایز یافته:

بررسی‌های PCR نشان داد که ژن استئوکلسین که یک مارکر برای استخوان است، در سلول‌های تمایز یافته به خوبی بیان می‌شود(شکل ۵).

تمایز سلول‌های مزانشیمی در داربست سه بعدی:

همان طور که در شکل(۶، A و B) که با میکروسکوپ الکترونی از سطح داربست سلولی اسکن گردیده(SEM) مشاهده می‌گردد، سلول‌ها به خوبی در این داربست قرار گرفته‌اند. نتایج بررسی فعالیت آلکالین فسفاتاز بیانگر تمایز سلول‌ها در روی این داربست و در حضور عوامل رشد پلاکتی است. میزان فعالیت آنزیم در حدود ۸۷ U/L ± ۸۰۰ می‌باشد.

بحث

در مطالعه حاضر، سلول‌های بنیادی مزانشیمی با موفقیت از نمونه مغز استخوان جدا گردیدند و در محیط کشت مناسب(DMEM با غلظت کم گلوکز) حاوی سرم حیوانی و محیط حاوی عوامل رشد پلاکتی کشت و تکثیر داده شدند. سلول‌های مزانشیمی جدا شده در هر دو محیط از نظر مورفولوژی شبیه به سلول‌های فیبروبلاست بوده و ظاهر دوکی شکل داشتند. نتایج نشان داد که سلول‌های مزانشیمی جدا شده از نمونه مغز استخوان دارای مارکرهای CD44 ، CD166 ، CD90 و CD105 بودند. علاوه بر آن نتایج کشت، تکثیر و تمایز این سلول‌ها در حضور عوامل رشد پلاکتی بسیار موفقیت‌آمیز بود، سلول‌ها در حضور این عوامل به خوبی تکثیر یافتند و پتانسیل تمایزی آن‌ها نیز به خوبی حفظ شد.

سلول‌های مزانشیمی جدا شده از نظر مورفولوژی شبیه به سلول‌های فیبروبلاست بودند و ظاهر دوکی شکل داشتند. این نتایج مشابه نتایج به دست آمده در بسیاری از تحقیقات از جمله مطالعه وکسلر و همکاران در سال ۲۰۰۳ بود(۲۱). به منظور تایید سلول‌های مزانشیمی، بررسی ایمنوفنوتیپی سلول‌ها پس از پاساژ اول با استفاده از روش فلوسایتومتری انجام گرفت. نتایج نشان دادند که این سلول‌ها دارای مارکرهای CD44 ، CD166 ، CD90 و CD105 و فاقد ماکرهای CD34 و CD45 هستند. این نتایج با نتایج سایر محققین از جمله مولمن و همکاران در سال

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-21]

۲۰۰۶ کـــه مارکرهـــای CD44 ، CD166 و CD105 را از مارکرهای تایید شده سلول‌های بنیادی مزانشـیمی در نظـر گرفته بودند، مطابقت داشت(۳۳). به منظور بررسی توانایی تمایزی این سلول‌هـا، سـلول‌هـای مزانشـیمی در حضـور فاکتورهای تمایز دهنده، کشت داده شدند و به سلول‌هـای استئوبلاست تمایز یافتند. به منظور تاییـد تمـایز آن‌هـا بـه سلول‌های استئوبلاست، از رنگ‌آمیزی سیتوشیمی آلیزارین رد و آلکالین فسفاتاز استفاده شـد. نتـایج رنـگ‌آمیـزی‌هـا تاییدی بر تمایز این سلول‌ها بود. مورفولوژی سلول‌ها پس از رنگ‌آمیزی مشابه با سلول‌های تمایز یافته توسط مولمن و همکارانش در سال ۲۰۰۶ بود(۳۳).

در اکثر مطالعه‌های صورت گرفتـه بـه منظـور تکثیـر و تمـایز سـلول‌هـای مزانشـیمی در محـیط کشـت، از سـرم حیوانی استفاده شـده اسـت(۲۲، ۲۱). در ایـن مطالعـه بـه منظور جایگزینی سرم حیوانی، از عوامل رشد آزاد شده از پلاکت استفاده شد. این عوامل به خوبی از رشد سـلول‌هـا حمایت کردند و در حضور آن‌ها سلول‌های مزانشـیمی بـه رشد خود ادامه دادند. در این مطالعـه بـه منظـور ارزیـابی رشد سلول‌ها از آزمایش MTT استفاده گردید کـه در ایـن آزمایش میزان رشد سلول‌ها بر حسب OD بیان مـی‌شـود. هر چقدر میزان رشد سلول‌ها بیشتر باشد(تعداد سلول‌هـا)، OD آزمایش نیز افزایش خواهد یافت. در اکثر مطالعه‌ها به منظـور بررسـی میـزان رشـد سـلول‌هـا از آزمـایش MTT استفاده شده است(۳۴). هنگامی کـه از پلاسـمای سـیتراته غنی از پلاکت استفاده شود و پلاکـت‌هـای موجـود در آن توسط ترومبین و کلسیم فعال شوند، عوامل رشد آزاد شده از پلاکت به همراه عناصـر موجـود در پلاسـما در نهایـت سبب افزایش رشد و تکثیر سلول‌های مزانشیمی می‌شـوند. به همین دلیل به نظر مـی‌رسـد عوامـل رشـد آزاد شـده از پلاکت تاثیر بیشـتری از سـرم داشـته باشـند. مطالعـه‌هـای متعددی نشـان داده‌انـد کـه اسـتفاده از پلاسـمای غنـی از پلاکت، پلاکت‌های لیز شـده و عوامـل رشـد آزاد شـده از پلاکت، سبب حمایت از رشد و تکثیر سلول‌هـای بنیـادی مزانشـیمی مـی‌شـوند(۳۶، ۳۵، ۸، ۶). بـر خـلاف اکثـر مطالعه‌های تحقیقاتی کـه بـرای آزاد سـازی عوامـل رشـد پلاکتی از روش انجماد ـ ذوب استفاده مـی‌کننـد، در ایـن مطالعه برای آزاد سازی عوامـل رشـد پلاکتـی از تـرومبین انسانی و کلسیم استفاده شد.

در اکثر مطالعه‌ها(روتنیاک و همکاران، ۲۰۰۷ و بُرزینـی و همکـاران، ۲۰۰۵) بـرای تهیـه ژل پلاکتـی، از تـرومبین تجاری با میزان فعالیت بالا استفاده شده است(۳۷). امـا در برخـی مطالعـه‌هـا نشـان داده شـده اسـت کـه اسـتفاده از ترومبین تهیه شده از پلاسمای انسانی، علـی‌رغـم فعالیـت اندازه‌گیری شده پایین‌تر، فعالیت مناسب‌تـری داشـته و بـه طـور مـؤثرتری باعـث آزادسـازی عوامـل رشـد پلاکتـی می‌گردد. در این مطالعه نیز تـرومبین از پلاسـمای انسـانی تهیه شد که علی‌رغم پایین‌تر بودن میزان فعالیت آن نسبت بـه تـرومبین تجـاری، توانسـت بـه خـوبی باعـث رهـا سازی عوامل رشد پلاکتی گردد. پـس از تهیـه ژل پلاکتـی بـا اسـتفاده از غلظـت ثابـت تـرومبین و کلسـیم، میـزان آزادسـازی عوامـل رشـد پلاکتـی در زمـان‌هـای مختلـف انکوباسیون با استفاده از روش الایـزا بررسـی شـد. میـزان عوامل رشد پلاکتی اکثراً پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون بـه بالاترین سطح خود رسیدند. آزادسازی عوامل رشد پلاکتی می‌تواند تابعی از زمان باشد، به همین دلیل است که میزان عوامل پس از ۲۴ ساعـت انکـوباسیون افزایـش یافـت. ولی نکته‌ای که باید در نظر داشت؛ نیمه عمـر پـایین ایـن عوامل است که بعد از گذشت زمـان ممکـن اسـت سـبب کاهش میزان آن‌ها شود. در اکثر مطالعه‌های انجام شـده در این زمینه، دست‌یابی به روش مناسـب بـرای تهیـه عوامـل رشد پلاکتی، تعداد مناسب پلاکت‌ها و زمـان انکوباسـیون مناسب مورد توجه بوده است.

در مطالعـه‌هـا نتـایج نشـان داد کـه b-FGF و EGF بـا غلظـت کمـی در پـلاسما و مـایع فوقـانی ژل پلاکتـی حضور دارند(غلظی در حدود پیکوگرم در میلی‌لیتر). میزان آزاد سـازی bFGF در ایـن مطالعـه در ابتـدای دوره انکوباسیون کم بود کـه در نهایـت پـس از ۲۴ سـاعت بـه حداکثر میزان خود رسید. مـارتینو در مطالعـه‌هـای خـود نشان داد هنگامی که از غلظـت بـالای تـرومبین و کلسـیم برای دگرانولاسیون پلاکتی استفاده شود، آزاد سازی bFGF سریعاً آغاز می‌شود، ولی هنگامی که از غلظت‌هـای کمتـر تـرومبیـن و کلسـیم استفـاده می‌شود، آزاد سازیbFGF به

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-21]

تاخیر می‌افتد(۳۸). تاخیر در آزادسازی bFGF در این مطالعه نیز احتمالاً به دلیل پایین بودن میزان فعالیت ترومبین بود. در این مطالعه نیز همانند مطالعه مارتینو و یا مطالعه ویبریچ، میزان عوامل رشد TGF و PDGF در پلاسما و مایع فوقانی ژل پلاکتی بالا بود(در حدود نانوگرم در میلی‌لیتر)(۳۹، ۳۸). والری و همکارانش در سال ۲۰۰۶ نیز مشابه با این مطالعه، از عوامل رشد پلاکتی برای تکثیر سلول‌های فیبروبلاستی استفاده کردند که البته در مطالعه صورت گرفته توسط آن‌ها، سرم حیوانی به طور کامل از محیط حذف نشد(۴۰). از عوامل رشد آزاد شده از پلاکت علاوه بر این که می‌توان برای تکثیر سلول‌های مزانشیمی استفاده کرد، می‌توان سلول‌های مزانشیمی را نیز در حضور آن‌ها تمایز داد. در مطالعه حاضر، مشخص شد که عوامل رشد پلاکتی نه تنها سبب تکثیر سلول‌های مزانشیمی می‌شوند، بلکه در حضور این عوامل توانایی تمایز سلول‌های مزانشیمی حفظ می‌شود و این سلول‌ها به خوبی به سلول‌های استئوبلاست تمایز می‌یابند. نتایج این مطالعه با نتایج مطالعه‌های ژونوگو در سال ۲۰۰۷ و رومین مطابقت داشت(۴۱، ۷). در مطالعه‌ای که توسط گروبر و همکاران در سال ۲۰۰۴ صورت گرفت، نشان داده شد که در حضور عوامل رشد پلاکتی، میزان تکثیر سلول‌های مزانشیمی افزایش یافته ولی این عوامل سبب کاهش میزان تمایز سلول‌های مزانشیمی به سلول‌های استئوبلاستی شدند(۴۲).

با مطالعه نقش عوامل رشد پلاکتی، مشخص گردید که افزایش میزان PDGF-AB در کاهش میزان تمایز سلول‌ها مؤثر است. با توجه به این که میزان PDGF-AB پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت نسبت به ساعات اولیه کاهش می‌یابد و سطح فاکتورهای دیگر افزایش می‌یابد، می‌تواند دلیلی برای افزایش تمایز سلول‌ها در این مطالعه باشد. در این مطالعه سلول‌های مزانشیمی به خوبی بر روی داربست سه بعدی کلسیم ـ فسفات کشت و تمایز داده شدند که این نتایج، با نتایج کاستن و همکاران در سال ۲۰۰۶ مطابقت داشت(۴۳)، ولی با نتایج مطالعه‌های تامورا در سال ۲۰۰۷ مطابقت نداشتند، زیرا نتایج تحقیق گزارش شده حاکی از این بود که عوامل رشد پلاکتی سبب افزایش تمایز و استئوژنزیز سلول‌های مزانشیمی در داربست‌های کلسیم ـ فسفات نمی‌شوند(۴۴). البته لازم به ذکر است که این تحقیق بر خلاف مطالعه حاضر که در محیط کشت انجام شد، در محیط *In vivo* بررسی شده و از PRP به تنهایی استفاده شده است. آن‌ها در مطالعه خود با استفاده از روش‌های هیستولوژی، اثری از تشکیل استخوان‌های جدید در خرگوش‌های آزمایش شده مشاهده نکردند. به علاوه نتایج این مطالعه با یافته‌های مطالعه کاواسومی و همکارانش در سال ۲۰۰۸ مطابقت داشت. آن‌ها در تحقیقات خود نشان دادند که ژل پلاکتی سبب افزایش تکثیر و تمایز سلول‌های مزانشیمی موش می‌گردد(۴۵).

یکی از محدودیت‌های اصلی طرح حاضر، تهیه مغز استخوان از اهداکنندان سالم بود. علاوه بر آن به منظور کاهش تغییرات پلاکتی، در این طرح نمونه خون چند نفر با یکدیگر مخلوط گردید که تهیه این نمونه‌ها نیز یکی از مشکلات این طرح به شمار می‌رفت.

نتیجه‌گیری

در مجموع این نتایج تاییدی بر این نکته است که عوال رشد پلاکتی را می‌توان جایگزین سرم در محیط کشت نمود. این عوامل محیط مناسبی را برای رشد سلول‌های مزانشیمی فراهم می‌سازند. به علاوه توانایی استئوژنیک سلول‌های مزانشیمی در این محیط نیز به خوبی حفظ می‌شود. نتایج بیانگر این نکته هستند که کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی بدون استفاده از سرم حیوانی امکان‌پذیر بوده و از این روش می‌توان سلول‌های لازم برای پیوند را تکثیر نمود.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-21]

References :

1- Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP? Implant Dentistry 2001; 4: 225-8.
2- Green DM, Klink B. Platelet gel as an intraoperatively procured platelet-based alternative to fibrin glue. Plast reconstruct Surg 1998; 101(4): 1161-2.
3- Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. Thromb Haemost 2001; 91(1): 4-15.
4- Risau w, Drexler H, Mironov V. platelet derived growth factor is angiogenic in vivo. Growth factors 1992; 7: 261-6.
5- Arpornmaeklong P, Kochel M. Depprich R, Kubler NR, Wurzler KK. Influence of platelet rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. Int J Oral Maxillofac Surg 2004; 33: 60-70.
6- Kilian O, Flesch I, Wenisch S, Taborski B, Jork A, Schnettler R, *et al*. Effect of platelet growth factors on human Mesenchymal stem cells and human endothelial cells in vitro. Eur J Med Res 2004; 9: 337-44.
7- Romin M, Declerin J, Heymanin D, Deschamps C, Passuti N. Usefulness of combining platelets with bone marrow cells on ceramic bone substitutes materials. J of bone and joint surgery 2004; 86: 47-8.
8- Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Begot L, Holy X. Platelet lysates promotes mesenchymal stem cell expansion: A safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. J cell physiol 2005; 205(2): 228-36.
9- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science1999; 284: 143-7.
10- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Shwartz RE, Keene CD, Catherine M, *et al*. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature 2002; 418: 41-9.
11- Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 69: 10711-6.
12- in 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Kruisselbrink AB, van Bezooijen RL, *et al.* Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. Haematologica 2003; 88(8): 845-52.
13- Friedenstein AJ, Piatezky-shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow. J Embryol Exp Morphol 1996; 16: 381-90.
14- Hu y, Lia L, Wang Q, Ma G, Jiang X, Zhao RC. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. J Lab Clin Med 2003; 141: 342-9.
15- Romaniv YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources as postnatal human mesenchymal stem cell: candidate MSC-like cells from umbilical cord. Stem Cells 2003; 21: 105-10.
16- Gronthos S, Zannettino AC, Hay DJ, Stephen E, paul J, selley J. Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stems derived from human bone marrow. J Cell Sci 2003; 116: 1827-35.
17- Dennis JE, Carbillt JP, Caplan AI, Charbord P. The STRO-1+marrow cell population is multipotential. Cells Tissues Organs 2002; 170: 73-82.
18- Cognet PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. J Cell Physiol 1999; 181: 67-73.
19- Boiret N, Rapatel C, Veyrat-Masson R, Boisgard S, Berger MG. Characterization of non expanded mesenchymal progenitor cells from normal adult human bone marrow. Exp Hematol 2005; 33: 219-25.
20- Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, Gaupp D, Hughes C, Kopen GC, *et al*. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. J Cell Biochem 2003; 89: 1235-49.
21- Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows JM.. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal stem cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. J Haematol 2003; 121(2): 368-74.
22- George J, kuboki Y, miyata T. Differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts on honeycomb collagen scaffolds. Biotechnol Bioeng. 2006; 95(3): 404-11
23- Kraus KH, Head CK. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. Veterinary surgery 2006; 35: 232-42.
24- Crovetti G, Martinelli G, Issi M, Barone M, Guizzardi M, Campanati B. Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. Transfusion and Apheresis Science 2004; 30: 145-51.
25- Leitner GC, gruber R, Neumuller J. Platelet content and growth factor release in platelet rich plasma: a comparison of four different systems. Vox sanguinis 2006; 91: 135-9.
26- Zimmermann R, Arnold D, Strasser E. sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. Vox Sang 2003; 85: 283-9.
27- Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SH. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. Human reproduction 2004; 19: 1450-56.
28- Sottile V, Halleux C, Bassilana F, Keller H, Seuwen K. Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells. Bone 2002; 30: 699-704.
29- Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. BMC Cell biology 2006; 7: 14.
30- Friedman MS, Long MW, Hankenson KD. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6. J Cell Biochem 2006; 98: 538-54.
31- Lin Y, Liu L, Li Z, Qiao J, Wu L, Tang W, *et al.* Pluripotency potential of human adipose-derived stem cells marked with exgogenous green fluorescent protein. Mol Cell Biochem 2006; 291(1-2):1-10.
32- BD Biosciences. Available from: URL: http://www.bdbiosciences.com.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-21]

33- Meuleman N, Tondreau T, Delforge A, Dejeneffe M, Massy M, Libertalis M, *et al*. Human marrow mesenchymal stem cell culture: serum free medium allows better expansion than classical MEM medium. J Haematol 2006; 76(4): 309-16.
34- Krasna M, Domanovic D, Tomsic A, Svajger U, Jeras M. platelet gel stimulates proliferation of human dermal fibroblasts in vitro. Acta Dermatoven APA 2007; 16: 105-10.
35- Kazemnejad S, Allameh A, Gharehbaghian A, Soleimani M, Amirizadeh N, Jazayeri M. Efficient replacing of fetal bovine serum with human platelet releasate during propagation and differentiation of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells to functional hepatocyte-like cells. Vox Sang 2008; 95(2): 149-58.
36- Kocaoemer A, Kern S, Kluter H, Bieback K. Human AB serum and thrombin-activated platelet rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. Stem cells 2007; 25: 1270-8.
37- Wrotniak M, Bielecki T, Gaździk TS. Current opinion about using the platelet-rich gel in orthopaedics and trauma surgery. Ortop Traumatol Rehabil 2007; 9(3): 227-38.
38- Martineu I, Lacoste E, Gagnon G. Effects of calcium and thrombin on growth factor release from platelet concentrates: Kinetics and regulation of endothelial cell proliferation. Biomaterial 2004; 25: 4489-502.
39- Weibrich G, Kleis W, Hafner G, Hitzler WE. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlation with donor age, sex, and platelet count. J Craniomaxillifac Surg 2002; 30: 97-102.
40- Valeri R, Saleem B, Rango G. Release of platelet derived growth factors and proliferation of fibroblasts in the release from platelets stored in the liquid state at 22 C after stimulation with agonists. Transfusion 2006; 46(2): 225-9.
41- Cardiovascular perfusion forum. Availavle at : URL: hp://WWW.Perfusion.com/cgi-bin/absolutenm.
42- Gruber R, Karreth F, Kandler B, Fuerst G, Rot A, Fischer MB, *et al*. Platelet released supernatants increase migration and proliferation and decrease osteogenic differentiation of bone marrow derived mesenchymal progenitor cells under in vitro conditions. J Platelet 2004; 15(1): 29-35.
43- Kasten P, Vogel J, Luginbühl R, Niemeyer P, Weiss S, Schneider S, *et al*. Influence of platelet rich plasma on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and ectopic bone formation in calcium phosphate ceramics. Cell Tissue Organs 2006; 183(2): 68-79.
44- Tamura K, Sato S, Kishida M, Asano S, Murai M, Ito K. The use of porous beta-Tricalcium Phosphate Blocks with Platelet-Rich plasma as an only Bone graft biomaterial. J Periodontol 2007; 78(2): 315-21.
45- Kawasumi M, Kitoh H, Siwicka KA, Ishiguro N. The effect of the platelet concentration in platelet-rich plasma gel on the regeneration of bone. J of Bone and joint surgery 2008; 9(7): 966-972.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-21]

Effect of growth factors of platelet gel on proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells

Amani M.[1](MS), Amirizadeh N.[1](PhD) , Soleimani M.[2](PhD), Malekan H.[3](PhD), Habibi Roudkenar M.[1](PhD), Bashtar M.[4](BS)

[1]*Iranian Blood Transfusion Organization, Research Center, Tehran, Iran*
[2]*Tarbiat Modarres University, Faculty of Medicine, Tehran, Iran*
[3]*Atieh Hospital,Orthopedic Department, Tehran, Iran*
[4]*Bone Marrow Transplant Research Center of Shariati Hospital, Tehran, Iran*

Abstract

Background and Objectives

Mesenchymal stem cells (MSCs) are bone marrow populating cells, which posses an extensive proliferation potential. In isolation and expansion protocols for clinical scale production of MSCs, fetal bovine serum (FBS) is used as a supplement with potential risk for infections as well as immunological reactions. Autologous platelet gel is made from a natural component of the patient's own blood. Activated platelets release growth factors are mitogenic for MSCs. In vitro studies have indicated that concentration of growth factor varies according to platelet concentration, methods of preparation and mechanism of platelet growth factors release. The aim of our study was to investigate the effect of platelet growth factors on the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells.

Materials and Methods

Mononuclear cells of bone marrow were collected in 10% FBS growth medium. The expanded cells were characterized by flow cytometric analysis of specific surface antigens. Analysed markers included CD45, CD34, CD166, CD105, CD90, and CD44. The gel is formed by adding calcium and thrombin to platelet rich plasma (PRP). Treated PRP was incubated for 30 min, 6,24,48 and 72 hours in incubator. Growth factors concentrations in supernatants were determined by ELISA. Human mesenchymal stem cells were cultured in the complete medium that supplemented with 10% FBS or Platelet growth factors for 8 days. The rate of proliferation was evaluated by MTT assay. Expanded cells were seeded on calcium phosphate scaffold. Cells growth and morphology on scaffold were analyzed by SEM.

Results

Isolation and expansion of MSCs in the complete medium supplemented with platelet growth factors were successful and morphology of cells was compatible with that of FBS. Cells were highly positive for CD90, CD166, CD44 and CD105 and negative for CD34, CD45. There was no significant difference between expression of markers on cells expanded with platelet growth factors and FBS. We demonstrated that platelet growth factors provide a significantly higher proliferative effect on MSCs than those of FBS. MSCs cultured in the presence of growth factors maintain their osteogenic differentiation properties. Osteogenic differentiation was indicated by deposition of mineralized matrix stained with Alizarin red and increased expression alkaline phosphates.

Conclusions

Platelet growth factors can be used in place of FBS to provide a safer and more effective culture condition to expand MSC for clinical purposes. MSCs cultured in the presence of platelet growth factors maintain their osteogenic properties.

Key words: Mesenchymal Stem Cells, Osteogenesis, Tissue Scaffolds
SJIBTO 2009; 6(2): 71-83
Received: 27 Aug 2008
Accepted: 22 Aug 2009

Correspondence: Amirizadeh N., PhD of Hematology and Blood Bank. Assistant Professor of Iranian Blood Transfusion Organization- Research Center.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821)88601599 ; Fax : (+9821)88601599
E-mail: *n.amirizadeh@ibto.ir*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2025-12-21]