تاثیر پلاسمای تازه منجمد شده (FFP) و لیزات پلاکت انسانی (HPL) بر روی میزان تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان (MSCs) مشتق از بافت چربی و خون بند ناف

سینا صدری‌فر [۱و۲](M.Sc)، سعیده عرفانیان [۳](Ph.D)، رسول بهارلو [۲و۴*](Ph.D)

۱- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران

۲- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۳- گروه علوم و فناوری‌های نوین پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جهرم، جهرم، ایران

۴- مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۳۶۵۲۶۷۶۹۷ Baharlour@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۴/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۳/۳

چکیده

هدف: سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) جمعیت سلولی هستند که دارای توانایی تکثیر و تمایز بالقوه‌ای بوده، اما چالش‌هایی در مورد شرایط کشت آن‌ها وجود دارد. سرم جنین گاوی (FBS)، با وجود ترکیبات نامشخص، ایمنی‌زایی بالقوه و انتقال احتمالی پریون/زئونوز، متداول‌ترین افزودنی محیط کشت برای کشت‌های آزمایشگاهی است. به این دلیل، تلاش‌های قابل توجهی برای یافتن یک جایگزین مناسب برای FBS، مانند محیط فاقد سرم یا لیزات پلاکتی انسانی (HPL) و پلاسمای تازه منجمد (FFP) صورت گرفته است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات استفاده همزمان از FFP، HPL و FBS بر تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون بند ناف و بافت چربی بود.

مواد و روش‌ها: در مطالعه‌ی حاضر ۵ کیسه کنسانتره پلاکتی از سازمان انتقال خون ایران، پایگاه جهرم تهیه گردید. لیزات پلاکتی توسط عمل انجماد و ذوب کنسانتره پلاکتی تهیه و سلول‌های مرده از لیزات پلاکتی به وسیله‌ی سانترفیوژ جدا شدند. MSCs از بافت چربی شکم زیر ناف، ۵ بیمار تحت عمل هرنیا یا سزارین، و از خون بند ناف ۱۰ نوزاد تازه متولد شده تهیه گردید. سلول‌های گروه کنترل همراه با FBS، و سلول‌های گروه آزمایش در یکی از گروه‌های FBS، FBS+FFP، FFP+HPL و FBS+FFP+HPL کشت داده شدند. فنوتیپ سلول‌های بنیادی مزانشیمی توسط آنالیز فلوسایتومتری مورد تایید قرار گرفت و زنده ماندن با استفاده از روش MTT بررسی گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان دادند که، استفاده از FBS+FFP، FBS+HPL، FFP+HPL و FBS+FFP+HPL منجر به افزایش معنی‌داری در تکثیر MSCs نسبت به گروه حاوی FBS تنها می‌شود و هم‌چنین میزان Viability سلول‌ها نیز افزایش معناداری نسبت به گروه FBS پیدا می‌کند.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که FBS+FFP، FBS+HPL، FFP+HPL و FBS+FFP+HPL اثر مساعدی بر میزان رشد و تکثیر MSCs داشته و به‌وضوح، این اثرات بیولوژیکی به‌علت وجود فاکتورهای رشد و سایتوکاین‌های تولیدی توسط سلول‌های خونی می‌باشد. این مطالعه تایید می‌کند که FFP+HPL که به عنوان مکمل در برخی محیط‌های کشت استفاده می‌شود، ممکن است جایگزین خوبی به‌جای FBS در محیط کشت MSCs در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون بند ناف، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی، لیزات پلاکت انسانی، پلاسمای منجمد شده تازه

مقدمه

در دهه ۱۹۷۰، Friedenstein و همکاران [۱] یک جمعیت سلولی را توصیف کردند که پیش‌سازهای غیر خون‌ساز جدا شده از مغز استخوان نامیده شدند. این جمعیت سلولی دارای قابلیت خود تجدید شوندگی و چندتوانی بوده و قادر به تمایز به انواع دودمان‌های مزودرمی مانند استخوان، غضروف، چربی، استرومای مغز، تاندون، ماهیچه، درم و بافت همبند می‌باشند [۲]. پس از آن، این پیش‌سازهای غیرخون‌ساز، سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) نامیده شدند. اکنون سلول‌های

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

بنیادی مزانشیمی به عنوان سلول‌های سازگار با محیط کشت شناخته می‌شوند که شامل جمعیت هتروژنی از سلول‌های پیش‌ساز بوده که در مراحل مختلف تمایز خود به سر می‌برند [۳]. به‌عنوان تلاشی برای استانداردسازی اصطلاح سلول‌های بنیادی مزانشیمی، انجمن سلول درمانی (ISCT) حداقل معیارها را برای تعریف سلول‌های بنیادی مزانشیمی به این صورت تعریف کرد که ۱- این سلول‌ها قابلیت چسبیدن به سطوح پلاستیکی کشت سلولی و فنوتیپ فیبروبلاستی را دارند. ۲- این سلول‌ها طیفی از مارکرهای سطحی شامل CD105، CD73، CD166، CD29، CD44، CD90 و MHC-I را بیان می‌کنند و برای مارکرهای CD45، CD34، CD133 و MHC-II منفی می باشند [۴]. امروزه سلول‌های بنیادی مزانشیمی به علت توانایی زیاد برای تکثیر و هم‌چنین دسترسی آسان و سهولت در جداسازی و کشت آن‌ها، نقش بسیار مهم و گسترده‌ای در کارهای کلینیکی و تحقیقاتی سلول‌درمانی و ژن‌درمانی پیدا کرده اند [۵].

به‌منظور تأمین فاکتورهای رشد مورد نیاز برای تکثیر و تمایز سلول‌ها به محیط کشت سلولی سرم جنین گاو (FBS) اضافه می‌شود [۷،۶]. FBS به‌عنوان یک مکمل مورد تایید جهانی برای حمایت از گسترش و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان استفاده شده است. استفاده از FBS در محیط کشت می‌تواند خطر انتقال انواع عفونت‌ها و ایجاد واکنش‌های ایمنی را افزایش دهد [۸]. از طرفی برخی مطالعات عنوان می‌کنند که این ماده نمی‌تواند به طور کامل رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی را در محیط in vitro، حمایت و تمامی فاکتورهای لازم برای رشد آن‌ها را فراهم کند [۸]. از این‌رو، سال‌ها است که یافتن گزینه جایگزین انسانی FBS به‌عنوان یک موضوع تحقیقاتی مهم مورد بحث بوده است [۹]. پلاسمای تازه منجمد شده (FFP) ماده‌ای شامل عناصر دخیل در لخته شدن خون مانند فاکتورهای انعقادی V و VIII، پروتئین‌های مکمل، ویتامین‌ها، فیبرونکتین‌ها و پروتئین‌های دخیل در ایمنی است که می‌تواند جهت فراهم کردن مواد لازم برای رشد و تکثیر سلول مفید واقع شود [۱۰]. پلاکت‌ها نیز یک منبع طبیعی از فاکتورهای رشد هستند. پلاکت‌ها حاوی محتویات گرانولی متفاوتی هم‌چون گرانول α، پراکسی‌زوم‌ها و لیزوزوم‌ها هستند. هر پلاکت به طور تقریبی دارای ۸۰-۵۰ گرانول α است، که اکثر فاکتورهای رشد در این گرانول‌ها وجود دارند [۱۱]. مطالعه‌های مختلف نشان داده‌اند که پلاکت‌های لیز شده با افزایش ترشح موادی چون IL-6، IL-8 و دیگر فاکتورهای رشد می‌توانند نقش مهمی در پزشکی ترمیمی ایفا کنند و نیز موجب افزایش تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به رده‌هایی چون رده‌های استخوانی، چربی و غضروف گردند [۱۳،۱۲]. بنابراین پلاکت‌ها به‌عنوان داروخانه‌ای حامل فاکتورهای رشد به حساب می‌آیند.

لیزات پلاکتی (PL) همه فاکتورهای تشکیل‌دهنده پلاکتی را شامل می‌شود. فاکتورهای رشد مشتق از لیزات پلاکت انسانی (HPL) توانایی تاثیر بر روی رده‌های مختلف سلولی، کندروسیت‌های آرتیکولار و سلول‌های توموری را دارد. لذا در سالیان اخیر استفاده از لیزات پلاکت انسانی و فاکتورهای مشتق از پلاکت به عنوان جایگزین FBS مورد توجه قرار گرفته است [۱۴]. استفاده از فرآورده‌های خونی انسانی احتمال آلودگی سلول‌های بنیادی به عوامل پریونی و ویروسی و بیماری‌های مشترک بین انسان و دام را کاهش می‌دهد [۱۵]. هم‌چنین حضور PLs در محیط کشت، نه تنها موجب تغییر در فنوتیپ سلول‌ها نمی‌شود؛ بلکه با افزایش دادن میزان رشد سلول‌ها، باعث کاهش مدت زمان کشت آن‌ها می‌گردد. محصولات مشتق از پلاکت اثرات متفاوتی بر میزان رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت‌های مغز استخوان و چربی دارد [۱۶].

با توجه به این‌که هر کدام از مکمل‌های محیط کشت (FBS، FFP و HPL) به صورت منفرد در مطالعات گوناگونی اثرگذاری داشته‌اند، در مطالعه‌ی حال حاضر سعی بر این شد تا اثرات ترکیبی استفاده از این مکمل‌ها در محیط کشت سلولی مورد بررسی قرار گیرد. بنابراین، سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی و خون بند ناف جدا شده و در محیط‌های متفاوتی از جمله FBS، FBS+FFP، FFP+HPL و FBS+FFP+HPL کشت داده شدند و میزان تکثیر و گسترش آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نوع و نحوه انجام مطالعه. این مطالعه پس از کسب تائیدیه کمیته اخلاق از دانشگاه علوم پزشکی جهرم به شماره JUMS.REC.1392.023 به صورت تجربی مورد بررسی قرار گرفت. روش انتخاب نمونه‌ها تصادفی بود و سلول‌های مزانشیمی از بافت چربی زیر ناف ۵ بیمار تحت عمل هرنیا یا سزارین، و از خون بند ناف ۱۰ نوزاد تازه متولد شده‌ی سالم، پس از کسب رضایت‌نامه کتبی تهیه شد. برای تهیه لیزات پلاکتی، ۵ واحد کنسانتره پلاکتی تاریخ مصرف گذشته، از سازمان انتقال خون جهرم، تهیه گردید.

تهیه لیزات پلاکتی. جهت تهیه لیزات پلاکتی ابتدا نمونه‌ها در فریزر و دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس در بن‌ماری و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد ذوب گردیدند [۱۵]. عمل فریز و ذوب شدن برای ۳ بار تکرار شد. جهت استریل کردن کورد کیسه‌های پلاکتی از ماده‌ی ضدعفونی

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

کنندی ساولن ۱٪، در زیر هود استفاده شد. سپس، سر کوردها توسط قیچی استریل بریده و محتویات داخل کیسه، جهت تهیه پول (pool) پلاکتی به یک فلاسک کشت سلولی T۷۵ منتقل شد. لیزات پلاکتی در فالکون‌های ۵۰ میلی‌لیتری تقسیم شد و سانترفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه صورت گرفت تا مایع رویی جمع‌آوری گردد. پس از جمع‌آوری مایع رویی، ۲ واحد در میلی‌لیتر هپارین به آن اضافه شد.

جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از خون بند ناف انسانی. در این مطالعه، سلول‌ها از خون بند ناف ۱۰ نوزاد تازه متولد شده پس از امضای رضایت آگاهانه بر اساس دستورالعمل کوگلر و همکارانش استخراج و پاساژ داده شدند [۱۵]. به طور خلاصه، ابتدا سلول‌های تک هسته‌ای خون بند ناف با روش فایکول و سانترفیوژ شیب غلظتی، استخراج شدند. این سلول‌ها در فلاسک T۲۵ همراه ۶ میلی‌لیتر محیط کشت Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) با FBS ۱۰٪ ، پنی‌سیلین ۱٪ و استرپتومایسین ۱٪ در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت از آغاز کشت، با تعویض محیط کشت، سلول‌های معلق غیر مزانشیمی از محیط کشت حذف و سلول‌های مزانشیمی چسبنده با اتصال به کف فلاسک، در محیط باقی ماندند. برای مدت ۳۰-۲۰ روز، محیط کشت هر سه روز یک بار تعویض شد و پس از این مدت، سلول‌های مزانشیمی تکثیر شده و به مرحله‌ی تراکم (confluence) رسیده و تقریباً ۸۰-۷۰ ٪ کف فلاسک را پوشاندند. برای انجام پاساژ سلولی ابتدا محیط کشت فلاسک دو مرتبه با Phosphate-buffered saline (PBS) شست‌وشو داده شد و پس از آن سلول‌های چسبیده به کف فلاسک با استفاده از ۳ میلی‌لیتر مخلوط ۰/۲۵٪ (بیست و پنج صدم درصد) تریپسین- EDTA جدا شده و ۵ دقیقه در انکوباتور قرار گرفتند. پس از اطمینان از جدا شدن سلول‌ها از کف فلاسک با استفاده از ۳ میلی‌لیتر FBS، عمل خنثی‌سازی تریپسین توسط سانترفیوژ با سرعت ۲۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. سلول‌ها با ۳ میلی‌لیتر محیط کشت مخلوط و در نهایت تعداد 10^5 سلول در فلاسک T۷۵ کشت و پاساژ داده شدند.

جداسازی سلول های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی. برای استخراج سلول‌های بنیادی از بافت چربی، در حدود ۱۰ میلی لیتر نمونه بافت چربی از زیر ناف توسط پزشک جراح، در اتاق عمل و تحت شرایط استریل برداشته شد. نمونه چربی داخل لوله ی فالکون استریل حاوی DMEM با ۱۰۰۰ واحد بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین، در زمانی حدود ۲ ساعت به آزمایشگاه منتقل گردید. تحت شرایط استریل نمونه بافت چربی در اتاق کشت و زیر هود لامینار توسط قیچی و تیغ جراحی به قطعات ریز خرد شد و تا حد ممکن بافت هم‌بند و عروق خونی از بافت چربی حذف شدند. در فرآیند خرد کردن بافت، جهت زدودن آلودگی با سلول‌های خونی و دبری‌ها، از محلول PBS استریل استفاده شد و پس از سانترفیوژ، محلول رویی دور ریخته شد. بافت چربی سفید باقی‌مانده در کف پلیت به لوله فالکون ۵۰ میلی‌لیتری منتقل شده و آنزیم کلاژناز نوع ۳ (۰/۰۷۵٪) به مقدار ۶-۵ میلی‌لیتر به قطعات چربی اضافه شد و پیپتاژ با سرنگ انجام گرفت تا بافت هموژن شده و سلول‌ها آزاد شوند. سپس لوله فالکون به مدت ۱ ساعت در شیکر انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت (در فواصل زمانی ۱۵ دقیقه با تکان دادن لوله حاوی نمونه، به تجزیه بیش‌تر بافت چربی کمک شد). بعد از مرحله تجزیه آنزیمی، لوله حاوی نمونه بیرون آورده شده و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ گردید. در شرایط استریل، روغن و بافت چربی رویی به آرامی برداشته و دور ریخته شد، و پلاک سلولی که حاوی سلول‌های چربی است، با افزودن محیط کشت DMEM با FBS ۱۰٪ و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین-استرپتومایسین ۱٪ به فلاسک T۷۵ منتقل گردید. در نهایت فلاسک حاوی سلول داخل انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و CO_2 ۵٪ قرار داده شد.

تائید هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی توسط فلوسایتومتری. به منظور تعیین هویت فنوتیپی سلول‌های مزانشیمی جدا شده از بافت چربی و بند ناف، سلول‌های تریپسینه شده توسط تریپسین در یک میلی‌لیتر PBS سوسپانسیون شدند و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌ها با ۱۰ میکرولیتر آنتی‌بادی مونوکلونال CD14، CD34، CD45 کونزوگه با FITC و CD44، CD105 و CD166 کونزوگه با PE به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در یخچال و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. به موازات آن، سلول‌ها با آنتی‌بادی ایزوتایپ کنترل نیز مجاور شدند [۲۴].

برای تعیین هویت فنوتیپی سلول‌های مزانشیمی جدا شده از خون بند ناف نیز، آنتی‌بادی‌های CD14، CD34 و CD45 کونزوگه با FITC و CD73، CD105 و CD146 کونزوگه با PE مورد استفاده قرار گرفت. در مرحله بعد سلول‌ها با ۲٪ PBS-BSA ۲٪ شست‌وشو داده و با ۵۰۰ میلی‌لیتر PBS سوسپانسیون شدند و در انتها، جهت فیکس شدن سلول‌ها، ۵۰ میکرولیتر فیکساتور پارافرمآلدئید ۱٪ به لوله‌ها اضافه و 2×10^4 سلول با دستگاه فلوسایتومتری تجزیه و تحلیل شدند. جهت تجزیه تحلیل از نرم‌افزار FlowJo نسخه ۱۰/۵ استفاده شد.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

بررسی رشد و تکثیر سلولی با استفاده از تست assay MTT. بعد از جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت‌های چربی و خون بند ناف، حدود ۵×۱۰^{۳} سلول در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای ریخته شد. ۲۴ ساعت زمان داده شد تا سلول‌ها به کف پلیت بچسبند. جهت تیمار سلول‌ها از FBS ۱۰٪ FFP،۱۰٪ و HPL ۵٪ در محیط کشت DMEM استفاده شد. بررسی رشد و تکثیر سلولی در پنج گروه مجزا شامل سلول های مزانشیمی بنیادی استخراج شده از خون بند ناف و بافت چربی در مجاورت FBS، FBS+FFP، FBS+HPL، FFP+HPL و FBS+FFP+HPL انجام شد. سلول‌های مزانشیمی کشت داده شده در محیط‌های مختلف پس از ۷ روز، توسط تست MTT ارزیابی و با لام نئوبار شمارش شدند. به طور خلاصه در روز ۷ محیط کشت روئی را دور ریخته و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی نیم میلی‌گرم در میلی‌لیتر محلول MTT اضافه و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور CO_2 در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. احیا MTT در طی زمان انکوباسیون توسط سیستم سوکسینات دهیدروژناز که یکی از آنزیم‌های چرخه تنفسی میتوکندری‌هاست، صورت پذیرفت [۱۷،۲۵،۱۸]. کریستال‌های فورمازان در آب غیرمحلول بوده و قبل از رنگ‌سنجی توسط Dimethylsulfoxide (DMSO) به حالت محلول درآمدند. در نهایت جذب نوری محلول به‌دست آمده در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت و به کمک منحنی استاندارد تعداد سلول‌ها محاسبه گردید.

آنالیز آماری. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه‌ی ۸ انجام شد. پس از وارد کردن داده‌ها به این نرم‌افزار، میانگین متغیرهای مورد نظر در نمونه های مورد آزمایش محاسبه شدند. از آزمون آماری One-way ANOVA جهت مقایسه میانگین‌ها و از آزمون تعقیبی Sidak برای تشخیص تفاوت درون گروه‌ها استفاده گردید و مقادیر $P<۰/۰۵$ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد.

نتایج

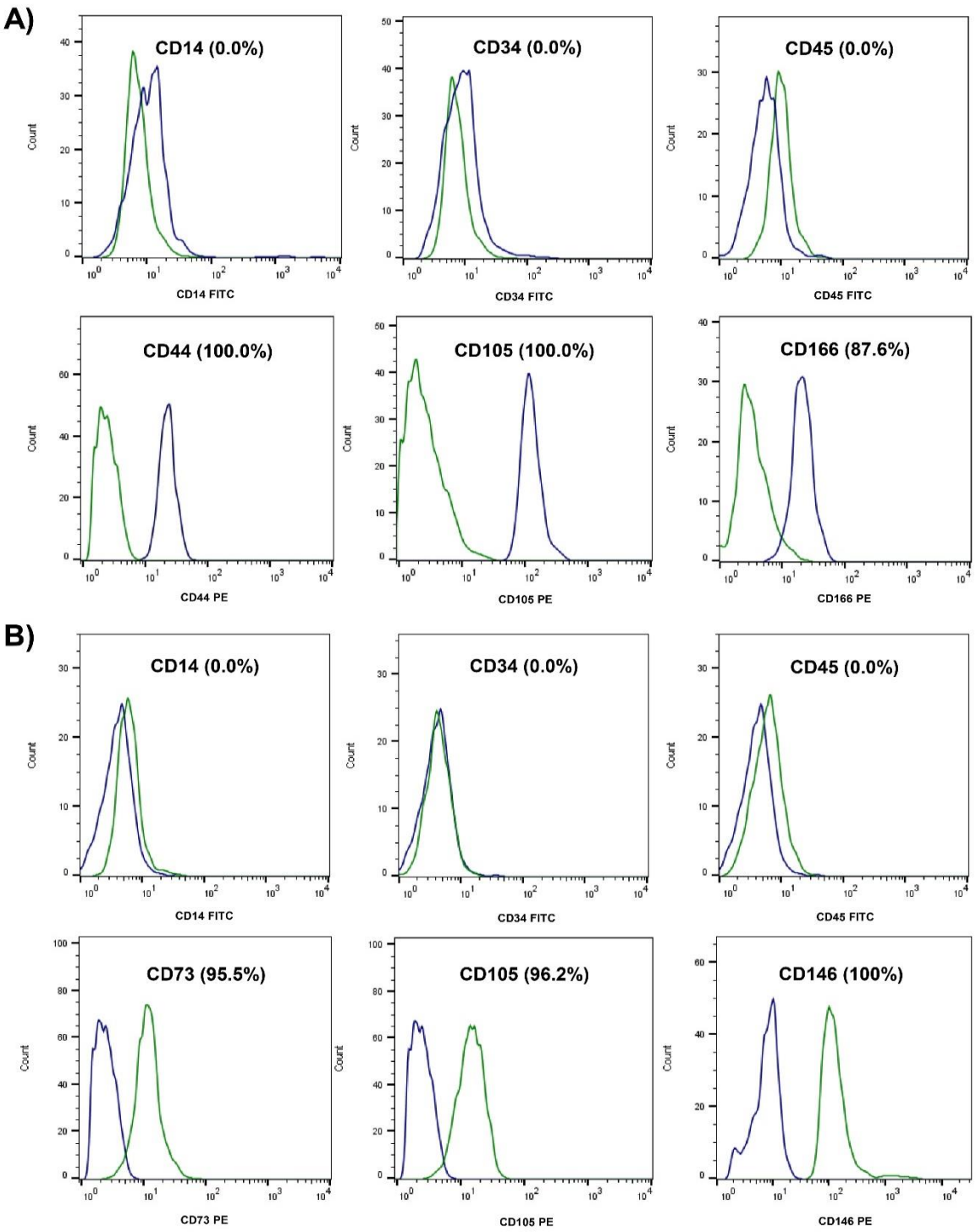
کشت سلول‌های مزانشیمی. ۲۴ ساعت پس از کشت سلول های تک‌هسته‌ای، با تعویض محیط کشت فلاسک‌ها، سلول‌های مرده و معلق حذف شدند. ۴۸ ساعت پس از کشت، سلول‌های مزانشیمی دوکی شکل، به کف فلاسک متصل شده، تشکیل کلنی داده و تکثیر شدند. سلول‌های غیرچسبان باقی‌مانده، در روزهای بعد با تعویض محیط حذف شدند. کشت اولیه در حدود ۲۰-۲۵ روز طول کشید که به طور میانگین، پس از ۲۰ روز سلول‌ها به تراکم تقریبا ۷۰-۸۰٪ می‌رسیدند.

تائید هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی. جهت تائید هویت فنوتیپی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، برروی سلول‌های پاساژ ۳، آنالیز فلوسایتومتری انجام گرفت. سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از بافت چربی شاخص‌های سطحی اختصاصی شامل CD44، CD105 و CD166 (شکل A۱) و سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از خون بند ناف شاخص های سطحی اختصاصی شامل CD73، CD105 و CD146 بالایی بیان کردند (شکل B۱). هم‌چنین این سلول‌ها جهت بیان مارکرهای سطحی سلول‌های خون‌ساز، نیز بررسی شدند که نتایج نشان داد سلول‌های بنیادی مزانشیمی از نظر بیان مارکرهای سطحی سلول‌های خون‌ساز CD14، CD34 و CD45 منفی بودند.

بررسی رشد و تکثیر سلولی در محیط‌های مختلف. سلول های مزانشیمی کشت داده شده در محیط‌های مختلف پس از ۷ روز، توسط تست MTT ارزیابی و با لام نئوبار شمارش شدند که در محیط‌های مختلف Viability سلول‌ها بالای ۸۰٪ بود. بررسی سلول‌های مزانشیمی نشان از رشد و تکثیر این سلول‌ها در حضور عوامل رشد موجود در لیزات پلاکتی، پلاسمای تازه منجمد شده و سرم حیوانی داشت. سلول‌های مزانشیمی کشت داده شده در این محیط‌ها از نظر مورفولوژی تغییر خاصی را نشان ندادند. پس از تحلیل آماری و محاسبه میانگین و انحراف معیار سلول‌های شمارش شده، مشخص شد که میانگین شمارش سلول‌های بافت چربی و خون بند ناف کشت داده شده در محیط های حاوی FBS+FFP، FFP+HPL، FBS+HPL و FBS+FFP+HPL از میانگین شمارش سلول‌های کشت داده شده در محیط حاوی FBS از لحاظ آماری بالاتر بود ($P<۰/۰۰۰۱$) (شکل ۲). هم‌چنین با بررسی بین گروه‌های مختلف، میانگین شمارش سلول‌های بافت چربی و خون بند ناف کشت داده شده در FBS+FFP+HPL، FBS+FFP و FFP+HPL از میانگین شمارش سلول‌های کشت داده شده در FBS+HPL بالاتر بوده و تفاوت معنادار به ترتیب در سلول‌های بافت چربی ($P<۰/۰۱$) و خون بند ناف ($P<۰/۰۵$) مشاهده شد (شکل A-B۲). ارزیابی تکثیر سلولی در پی تیمار سلول های بنیادی مزانشیمی استخراج شده از چربی و خون بند ناف با مکمل‌های مختلف محیط کشت، نشان داد که میزان تکثیر سلول‌های بافت چربی و خون بند ناف کشت داده شده در FBS+FFP، FFP+HPL و FBS+FFP+HPL از میزان تکثیر سلول‌های بافت چربی و خون بند ناف کشت داده شده در FBS بیش‌تر بود به ترتیب ($P<۰/۰۵$)، ($P<۰/۰۵$) و ($P<۰/۰۱$)، اما در میزان تکثیر سلول‌های کشت داده شده در FBS+HPL با سلول‌های کشت داده شده در FBS تفاوت معناداری مشاهده

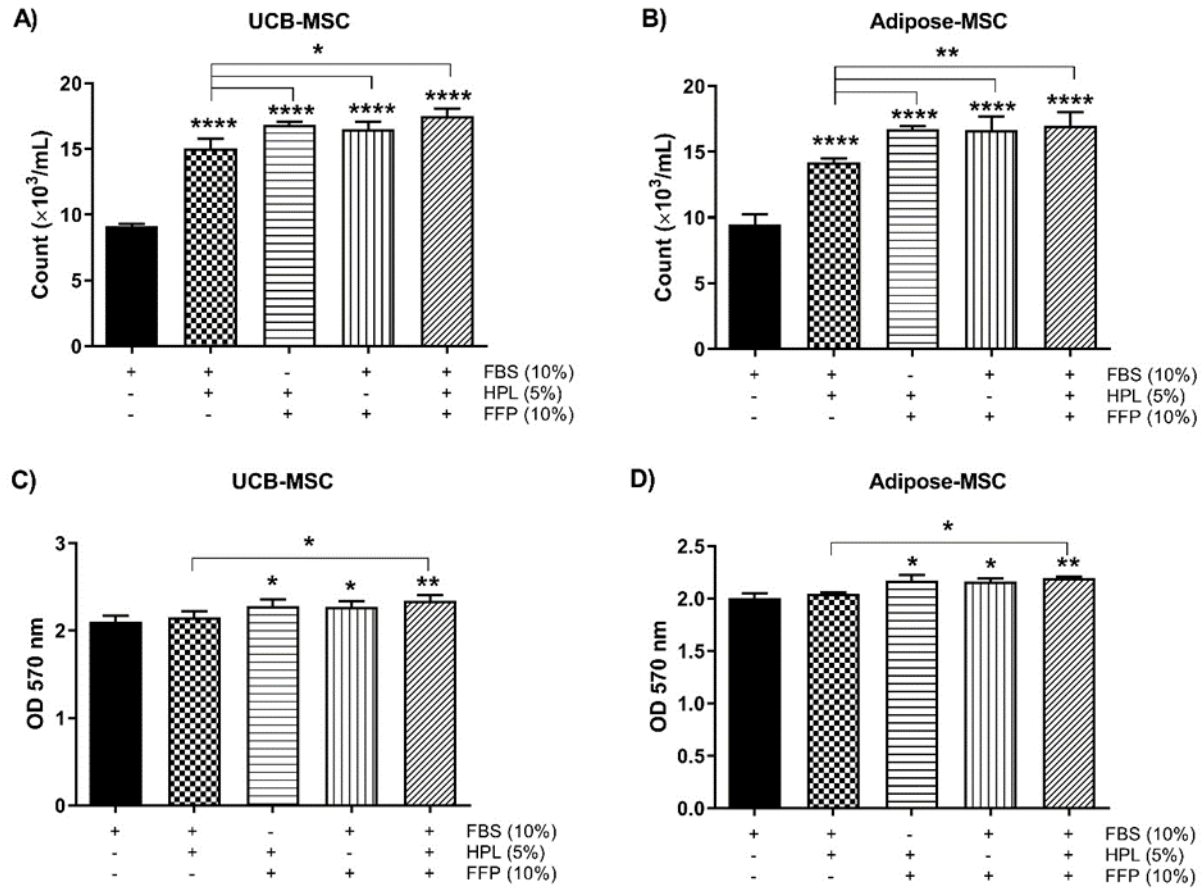
[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

نشد (شکل C-D۲). هم‌چنین با آنالیز بین گروهی مشخص شد که میزان تکثیر سلول‌های بافت چربی و خون بند ناف کشت داده شده در محیط FBS+FFP+HPL با میزان تکثیر سلول‌های بافت چربی و خون بند ناف کشت داده شده در FBS+HPL تفاوت معناداری ($P<۰/۰۵$) داشته و تکثیر سلول‌ها در این محیط بیش‌تر بود.



شکل ۱. آنالیز فلوسایتومتری بیان آنتی‌ژن‌های CD14، CD34 و CD45 جهت مارکرهای منفی و CD105، CD44 و CD166 جهت مارکرهای مثبت در سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی (A). آنالیز فلوسایتومتری بیان آنتی‌ژن‌های CD14، CD34 و CD45 جهت مارکرهای منفی و CD73، CD105 و CD146 جهت مارکرهای مثبت در سطح سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون بند ناف (B).

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]



شکل۲. نتایج شمارش سلولی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از خون بند ناف (A) و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی (B) و نتایج تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از خون بند ناف (C) و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت چربی (D) در شرایط کشت مختلف و مقایسه‌ی آنها با کشت حاوی FBS تنها. (*:P<0.05 و **:P<0.01، ***P<0.001 و ****P<0.0001). سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از خون بند ناف انسان (UCB-MSC) و سلول های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی (Adipose-MSC)

بحث و نتیجه‌گیری

سلول‌های بنیادی مزانشیمی جمعیتی هتروژن از سلول‌های بنیادی بالغ هستند. تا کنون مطالعات بسیاری، تاثیرات لیزات پلاکتی را بر تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی جدا شده از بافت چربی یا مغز استخوان مورد بررسی قرار داده‌اند. برای مثال Katharina Schallmoser در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۷ انجام دادند متوجه شدند که جایگزینی FBS با HPL از آلودگی پریون گاوی، ویروسی و بیماری‌های زئونوز جلوگیری می‌کند [۱۵]. هم‌چنین Chevallier و همکاران نشان دادند سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت شده در HPL، بیان ژن استئوبلاستیک مانند آلکالین فسفاتاز (ALP)، سیالوپروتئین استخوان (BSP)، استئوپونتین (Op) و پروتئین مورفوژنتیک استخوان ۲ (BMP-2) را القا می‌کنند [۱۹]. اکثر مطالعات به بررسی تاثیر لیزات پلاکتی یا پلاسمای تازه منجمد شده پرداخته‌اند و در مطالعه حاضر برای اولین بار تاثیر لیزات پلاکتی همراه با پلاسمای تازه منجمد شده مورد بررسی قرار گرفت شده است. در این مطالعه، علاوه بر استفاده از لیزات پلاکتی به تنهایی، از FBS و پلاسمای تازه منجمد شده هم در تکثیر و تمایز به‌کار گرفته شد تا در صورت کسب نتایج قابل قبول، به عنوان جایگزینی برای FBS از آن استفاده گردد. لیزات پلاکتی و پلاسمای تازه منجمد شده هر کدام به تنهایی یا در ترکیب با یک‌دیگر به‌عنوان مکمل به برخی از محیط‌های کشت افزوده شدند. ذکر این نکته ضروری به نظر می‌رسد که در مطالعات مشابه که تاثیر لیزات پلاکتی بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مورد بررسی قرار گرفته‌اند، از حدود ۳۰ تا ۵۰ واحد کنسانتره پلاکتی استفاده شده است. در مقابل مطالعات دیگر از تعداد واحد کنسانتره‌ی کم‌تری برای بررسی اثر لیزات پلاکتی بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی استفاده کرده‌اند [۲۰]. در این مطالعه، از ۵ واحد کنسانتره پلاکتی استفاده شد و علی‌رغم تعداد محدود کنسانتره‌ی پلاکتی، با توجه به نتایج، کارایی لیزات پلاکتی تائید گردید. در مطالعه‌ی حاضر، از غلظت ۱۰٪ سرم حیوانی و ۵٪ لیزات پلاکتی استفاده شد که به‌طور استاندارد برای کشت سلول به کار می‌رود [۲۱]. در

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

مطالعه‌ای که توسط Avanzini و همکاران انجام شد، حاکی از دوکی شکل بودن ظاهر سلول‌های مزانشیمی بود [۲۲] و در مطالعه‌ی حال حاضر نیز سلول‌های مزانشیمی کشت داده شده در هر کدام از محیط‌های حاوی لیزات پلاکتی، پلاسمای تازه منجمد شده و FBS از لحاظ مورفولوژی، دوکی شکل و شبیه سلول‌های فیبروبلاست بودند. هم‌چنین، با توجه به تکثیر این سلول‌ها در حضور مکمل‌های محیط رشد می‌توان عنوان کرد پتانسیل تمایزی این سلول‌ها در حضور لیزات پلاکتی و پلاسمای تازه منجمد شده به خوبی حفظ می‌شود. بررسی ایمونوفنوتایپی سلول‌های مزانشیمی جدا شده از بافت چربی با استفاده از روش فلوسیتومتری نشان داد که این سلول‌ها دارای مارکرهای CD105، CD44 و CD166 و نیز سلول‌های مزانشیمی مشتق از خون بند ناف دارای CD73، CD105 و CD146 بودند و در مقابل هر دو سلول مارکرهای CD14، CD34 و CD45 را نشان ندادند که نشان از جداسازی اختصاصی سلول‌های مزانشیمی از سایر سلول‌های بافت چربی و خون بند ناف دارد. این مارکرها در مطالعات بسیاری هم‌چون مطالعهFeng-Juan Lv و همکاران به عنوان مارکرهای تائید شده سلول‌های بنیادی مزانشیمی در نظر گرفته شده‌اند [۲۴،۲۳].

در اکثر مطالعات جهت تکثیر و تمایز سلول‌های مزانشیمی از سرم حیوانی به عنوان مکمل محیط کشت استفاده می‌شود. با این‌حال استفاده از FBS به‌عنوان منبع فاکتورهای رشد، خطر انتقال پاتوژن‌های شناخته شده و ناشناخته و بیماری‌های حیوانی هم‌چون بیماری‌های پریونی، عوامل بیماری‌زای ویروسی و نیز زنوایمونیزاسیون علیه آنتی‌ژن‌های گاوی را بالا می‌برد [۱۹]. تکثیر در شرایط آزمایشگاهی، خطر بروز جهش و ترانسفورماسیون را بالا می‌برد. در مطالعه‌ای که توسط Jonsdottir-Buch و همکاران انجام شد، با بررسی کاریوتایپ کروموزومی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی که در مجاورت لیزات پلاکتی و سرم حیوانی تکثیر شده بودند، پس از چندین پاساژ متوالی، در یکی از جمعیت‌های سلولی کشت داده شده در محیط کشت حاوی سرم حیوانی، تریزومی کروموزم ۲۱ مشاهده شد. در حالی که در سلول‌هایی که در مجاورت لیزات پلاکتی تکثیر یافته بودند، هیچ‌گونه ناهنجاری کروموزومی نشان ندادند [۲۵]. بنابراین، استفاده‌ی بالینی از سلول‌های بنیادی مزانشیمی که در حضور سرم حیوانی کشت داده شده‌اند، چندان بی‌خطر هم نمی‌باشد. لذا به‌نظر می‌رسد، حذف یا حداقل کاهش استفاده از FBS و جایگزینی آن با عوامل رشد دیگر می‌تواند این خطر را کم‌تر کند. در مطالعه‌ی حاضر به‌منظور جایگزینی برای سرم حیوانی به‌عنوان مکمل محیط کشت از لیزات پلاکتی ۵٪ و نیز پلاسمای تازه فریز شده ۱۰٪ استفاده گردید. مواد آزاد شده از پلاکت‌های لیز شده و نیز FFP که حاوی فاکتورهای رشد متعددی می‌باشند، از رشد سلول‌ها حمایت کرده و در حضور آن‌ها سلول‌های مزانشیمی به خوبی به رشد خود ادامه می‌دهند. به نظر می‌رسد لیزات پلاکتی و FFP با آزادسازی فاکتورهای رشد و ترکیباتی نظیر PDGF، BFGF، IGF-I و TGF-β اثرات مثبت روی رشد و تکثیر سلولی و حفظ عملکرد سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌گذارند [۲۶]. مطالعه‌های متعدد نشان داده‌اند که استفاده از پلاکت‌های لیز شده، پلاسمای غنی از پلاکت، پلاسمای تازه فریز شده و عوامل رشد آزاد شده از این مکمل‌ها، سبب رشد و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌شوند [۲۸،۲۷]. در مطالعه‌ای که توسط Samuel و همکاران انجام پذیرفت، نشان داده شد که محیط حاوی عصاره پلاکتی (PLT-rich concentrate) تاثیر مناسبی در رشد و تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی انسانی در کشت سلولی دارد [۲۹]. مطالعه‌ی دیگری که توسط Stessuk و همکارانش در برزیل بر روی پلاسمای غنی از پلاکت انجام شد، نشان داد که این مکمل دارای منبع غنی از سایتوکاین‌ها و فاکتورهای رشد است که تاثیرات مثبتی در رشد و تکثیر سلول‌های فیبروبلاستی و کراتینوسیتی در In vitro دارد [۳۰]. مطالعه انجام شده توسط Shanbhag در سال ۲۰۲۰ بر روی سلول‌های بنیادی مزانشیمی کشت داده شده در محیط حاوی HPL، حاکی از افزایش پتانسیل تمایز و استخوان‌زایی بود [۳۱]. مطالعه‌ی Katia Mareschi و همکارانش در سال ۲۰۲۰، نشان داد که لیزات پلاکتی غیرفعال از تکثیر و ویژگی‌های تعدیل‌کننده ایمنی سلول‌های استرومایی مزانشیمی در شرایط کشت مناسب پشتیبانی می‌کند و می‌تواند جایگزین مناسبی برای FBS باشد [۳۲]. مطالعه‌ای که Kinzebach و همکاران در سال ۲۰۱۳ بر روی تاثیر لیزات پلاکتی، سرم انسانی و ترشحات پلاکت‌های فعال شده توسط ترومبین بر تکثیر سلول‌های مزانشیمی انجام دادند نتایج حاکی از تاثیر مشابه این سه ماده در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافت چربی بود [۳۳]. مطالعه‌ی دیگری که توسط Hemeda و همکارانش انجام شد، نشان داد که غلظت های ۵ و ۱۰٪ از HPL دارای اثرات تکثیری بیش‌تری بر روی سلول‌های مزانشیمی خون بند ناف است [۳۴]. در مجموع این نتایج تاییدی بر این نکته است که عوامل رشد پلاکتی را می‌توان جایگزین سرم در محیط کشت نمود. این عوامل محیط مناسبی را برای رشد سلول‌های مزانشیمی فراهم می‌سازند. نتایج بیانگر این نکته هستند که کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی بدون استفاده از سرم حیوانی امکان‌پذیر بوده، و مطالعه حاضر هم در تائید مطالعات فوق نشان داد که استفاده از HPL موجب رشد و تکثیر بهتر سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌شود. هم‌چنین

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

استفاده‌ی ترکیبی از FFP+HPL اثر مساعد بیش‌تری بر تکثیر سلول‌های مزانشیمی نسبت به HPL دارد. ازمحدودیت‌های مطالعه می‌توان به فاکتورهای موثر بر لیزات پلاکتی از جمله سن اهداکننده، شمارش سلولی اهداکننده و روش آزادسازی فاکتورهای رشد اشاره کرد که برای جلوگیری از تداخلات مربوط به تفاوت بین کیسه‌های پلاکتی، آن‌ها با هم مخلوط شدند. در مطالعه‌ی حاضر، بر خلاف مطالعات دیگر سطح فاکتورهای رشد موجود در لیزات پلاکتی به دلیل محدودیت منابع اندازه‌گیری نشد ولی به دلیل رشد و تکثیر قابل توجه سلول‌ها، احتمالاً میزان فاکتورهای رشد باید از سطح قابل قبولی برخوردار باشند. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده علاوه بر لیزات پلاکتی، از پلاسمای خون بند ناف هم به صورت ترکیبی با FFP استفاده شود و به‌علاوه غلظت فاکتورهای رشد موجود هم اندازه‌گیری گردد.

با در نظر گرفتن نتایج به‌دست آمده از این مطالعه و سایر مطالعات، می‌توان عنوان کرد که استفاده از FFP و HPL به‌عنوان منابع سرشار فاکتورهای رشد و سایتوکاین، در محیط کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی، به‌دلیل افزایش سرعت رشد و تکثیر سلولی و کاهش زمان مجاورت سلول‌ها با محیط کشت، می‌تواند جایگزین مناسبی برای سرم حیوانی در محیط کشت سلول باشد. یا حداقل می‌توانند در کنار FBS از مکمل‌های FFP و HPL برای رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی به‌کار برده شود. هم‌چنین تهیه‌ی لیزات پلاکتی یک روش مقرون به صرفه بوده و می‌توان مقادیر فراوان آن را بدون مواجه شدن با مشکلات اخلاقی موجود در تهیه‌ی FBS تهیه کرد.

تشکر و قدردانی

تامین مالی مطالعه حاضر از طرف دانشگاه علوم پزشکی جهرم انجام شده است که بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از آن دانشگاه اعلام می‌داریم.

مشارکت و نقش نویسندگان

ایده و طراحی این آزمایش بر عهده رسول بهارلو بود. آزمایشات و جمع‌آوری داده‌ها توسط رسول بهارلو و سعیده عرفانیان صورت گرفت. آنالیز و تفسیر نتایج توسط رسول بهارلو انجام شد. سینا صدری‌فر نسخه‌ی اولیه‌ی مقاله را نوشته است. همه نویسندگان بازخورد انتقادی ارائه کردند و به شکل‌گیری تحقیق، تحلیل و نسخه پایانی مقاله کمک کردند.

منابع

[1] Friedenstein AJ. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. Exp Hematol 1974; 2: 83-92.

[2] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999; 284: 143-147.
https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143
PMid:10102814

[3] Pevsner-Fischer M, Levin S, Zipori D. The origins of mesenchymal stromal cell heterogeneity. Stem Cell Rev Rep 2011; 7: 560-568.
https://doi.org/10.1007/s12015-011-9229-7
PMid:21437576

[4] Patel SA, Sherman L, Munoz J, Rameshwar P. Immunological properties of mesenchymal stem cells and clinical implications. Arch Immunol Ther Exp 2008; 56: 1-8.
https://doi.org/10.1007/s00005-008-0001-x
PMid:18250975

[5] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 2006; 8: 315-317.
https://doi.org/10.1080/14653240600855905
PMid:16923606

[6] McPherson RA, Pincus MR. Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods E-book: Elsevier Health Sci 2021.

[7] Elder S, Thomason J. Effect of platelet-rich plasma on chondrogenic differentiation in three-dimensional culture. Open Orthop J 2014; 8: 78.
https://doi.org/10.2174/1874325001408010078
PMid:24843389 PMCid:PMC4023405

[8] Azouna NB, Jenhani F, Regaya Z, Berraeis L, Othman TB, Ducrocq E, Domenech J. Phenotypical and functional characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow: comparison of culture using different media supplemented with human platelet lysate or fetal bovine serum. Stem Cell Res Ther 2012; 3: 1-14.
https://doi.org/10.1186/scrt97
PMid:22333342 PMCid:PMC3340550

[9] Rauch C, Feifel E, Amann EM, Spötl HP, Schennach H, Pfaller W, Gstraunthaler G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: human platelet lysates as a serum substitute in cell culture media. ALTEX 2011; 28: 305-316.
https://doi.org/10.14573/altex.2011.4.305
PMid:22130485

[10] Hartwig D, Herminghaus P, Wedel T, Liu L, Schlenke P, Dibbelt L, Geerling G. Topical treatment of ocular surface defects: comparison of the epitheliotrophic capacity of fresh frozen plasma and serum on corneal epithelial cells in an in vitro cell culture model. Transfus Med 2005; 15: 107-113.
https://doi.org/10.1111/j.0958-7578.2005.00559.x
PMid:15859976

[11] Arpornmaeklong P, Kochel M, Depprich R, Kübler N, Würzler K. Influence of platelet-rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. An in vitro study. Int J Oral Maxillofac Surg 2004; 33: 60-70.
https://doi.org/10.1054/ijom.2003.0492
PMid:14690661

[12] Schallmoser K, Strunk D. Preparation of pooled human platelet lysate (pHPL) as an efficient supplement for animal serum-free human stem cell cultures. J Vis Exp 200; 1e1523.

[13] Xia W, Li H, Wang Z, Xu R, Fu Y, Zhang X, et al. Human platelet lysate supports ex vivo expansion and enhances osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Cell Biol Int 2011; 35: 639-643.
https://doi.org/10.1042/CBI20100361
PMid:21235529

[14] Fazzina R, Iudicone P, Mariotti A, Fioravanti D, Procoli A, Cicchetti E, et al. Culture of human cell lines by a pathogen-inactivated human platelet lysate. Cytotechnology

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

mesenchymal stem cells. PloS One 2013; 8: e68984. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068984 PMid:23874839 PMCid:PMC3708923

[26] Crespo-Diaz R, Behfar A, Butler GW, Padley DJ, Sarr MG, Bartunek J, et al. Platelet lysate consisting of a natural repair proteome supports human mesenchymal stem cell proliferation and chromosomal stability. Cell Transplant 2011; 20: 797-812. https://doi.org/10.3727/096368910X543376 PMid:21092406

[27] Astori G, Amati E, Bambi F, Bernardi M, Chieregato K, Schäfer R, et al. Platelet lysate as a substitute for animal serum for the ex-vivo expansion of mesenchymal stem/stromal cells: present and future. Stem Cell Res Ther 2016; 7: 1-8. https://doi.org/10.1186/s13287-016-0352-x PMid:27411942 PMCid:PMC4944312

[28] Viau S, Lagrange A, Chabrand L, Lorant J, Charrier M, Rouger K, et al. A highly standardized and characterized human platelet lysate for efficient and reproducible expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells. Cytotherapy 2019; 21: 738-754. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2019.04.053 PMid:31133491

[29] Samuel S, Ahmad RE, Ramasamy TS, Karunanithi P, Naveen SV, Murali MR, et al. Platelet-rich concentrate in serum free medium enhances osteogenic differentiation of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells. PeerJ 2016; 4: e2347. https://doi.org/10.7717/peerj.2347 PMid:27651984 PMCid:PMC5018671

[30] Stessuk T, Puzzi MB, Chaim EA, Alves PCM, de Paula EV, Forte A, Izumizawa JM, et al. Platelet-rich plasma (PRP) and adipose-derived mesenchymal stem cells: stimulatory effects on proliferation and migration of fibroblasts and keratinocytes in vitro. Arch Dermatol Res 2016; 308: 511-520. https://doi.org/10.1007/s00403-016-1676-1 PMid:27394438

[31] Shanbhag S, Mohamed-Ahmed S, Lunde THF, Suliman S, Bolstad AI, Hervig T, Mustafa K. Influence of platelet storage time on human platelet lysates and platelet lysate-expanded mesenchymal stromal cells for bone tissue engineering. Stem Cell Res Ther 2020; 11: 1-18. https://doi.org/10.1186/s13287-020-01863-9 PMid:32962723 PMCid:PMC7510290

[32] Mareschi K, Castiglia S, Adamini A, Rustichelli D, Marini E, Banche Niclot AG, et al. Inactivated platelet lysate supports the proliferation and immunomodulant characteristics of mesenchymal stromal cells in GMP culture conditions. Biomedicines 2020; 8: 220. https://doi.org/10.3390/biomedicines8070220 PMid:32708843 PMCid:PMC7400095

[33] Kinzebach S, Dietz L, Klüter H, Thierse HJ, Bieback K. Functional and differential proteomic analyses to identify platelet derived factors affecting ex vivo expansion of mesenchymal stromal cells. BMC Cell Biol 2013; 14: 1-13. https://doi.org/10.1186/1471-2121-14-48 PMid:24168020 PMCid:PMC4231358

[34] Hemeda H, Giebel B, Wagner W. Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. Cytotherapy 2014; 16: 170-180. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.11.004 PMid:24438898

2016; 68: 1185-1195. https://doi.org/10.1007/s10616-015-9878-5 PMid:25944665 PMCid:PMC4960166

[15] Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Reinisch A, Kashofer K, Stadelmeyer E, et al. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. Transfusion 2007; 47: 1436-146. https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2007.01220.x PMid:17655588

[16] Dessels C, Potgieter M, Pepper MS. Making the switch: alternatives to fetal bovine serum for adipose-derived stromal cell expansion. Front Cell Dev Biol 2016; 4: 115. https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00115 PMid:27800478 PMCid:PMC5065960

[17] Baharlou R, Tajik N, Behdani M, Shokrgozar MA, Tavana V, et al. An antibody fragment against human delta-like ligand-4 for inhibition of cell proliferation and neovascularization. Immunopharmacol Immunotoxicol 2018; 40: 368-374. https://doi.org/10.1080/08923973.2018.1505907 PMid:30183441

[18] Mohammadlou M, Salehi S, Baharlou R. Development of anti DLL4 Nanobody fused to truncated form of Pseudomonas exotoxin: As a novel immunotoxin to inhibit of cell proliferation and neovascularization. Anal Biochem 2022; 653: 114776. https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.114776 PMid:35679954

[19] Chevallier N, Anagnostou F, Zilber S, Bodivit G, Maurin S, Barrault A, et al. Osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells with platelet lysate. Biomaterials 2010; 31: 270-278. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.043 PMid:19783038

[20] Amir Allahverdi, Arefeh Jafarian, Saeed Abroun, Masoud Soleimani, Mohammad Taghikhani, Fatemeh Eskandari. The effect of platelet lysate on proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. Pajoohande 2014; 19: 125-30.

[21] Rahimi Mofrad M, Yari F, Nikougoftar Zarif M, Dadashi M, Aghaie A. Comparison of the effect of platelet lysate derived from umbilical cord blood and peripheral blood on the expansion and differentiation of MSCs. Scientific Journal of Iran Blood Transfus Organ 2021; 18: 255-68.

[22] Avanzini MA, Bernardo ME, Cometa AM, Perotti C, Zaffaroni N, Novara F, et al. Generation of mesenchymal stromal cells in the presence of platelet lysate: a phenotypic and functional comparison of umbilical cord blood-and bone marrow-derived progenitors. Haematologica 2009; 94: 1649. https://doi.org/10.3324/haematol.2009.006171 PMid:19773264 PMCid:PMC2791945

[23] Lv FJ, Tuan RS, Cheung KM, Leung VY. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. Stem Cells 2014; 32: 1408-1419. https://doi.org/10.1002/stem.1681 PMid:24578244

[24] Zhang ZY, Teoh SH, Hui JH, Fisk NM, Choolani M, Chan JK. The potential of human fetal mesenchymal stem cells for off-the-shelf bone tissue engineering application. Biomaterials 2012; 33: 2656-2672. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.12.025 PMid:22217806

[25] Jonsdottir-Buch SM, Lieder R, Sigurjonsson OE. Platelet lysates produced from expired platelet concentrates support growth and osteogenic differentiation of

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

Koomesh -Volume 25, Issue 3 (May and June 2023), 385-393

The effect of fresh frozen plasma (FFP) and human platelet lysate (HPL) on the proliferation rate of human mesenchymal stem cells (MSCs) derived from adipose tissue and umbilical cord blood

Sina Sadrifar (M.Sc) [1,2], Saeideh Erfanian (Ph.D)[3], Rasoul Baharlou (Ph.D)[*2,4]
1- Dept. of Immunology, School of Medicine, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran
2- Dept. of Immunology, School of Medicine, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran
3- Dept. of Advanced Medical Sciences and Technologies, Jahrom University of Medical Sciences, Jahrom, Iran
4- Cancer Research Center, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

* Corresponding author. +98 9365267697 baharlour@gmail.com
Received: 6 Jul 2022; Accepted: 24 May 2023

Introduction: Mesenchymal stem cells (MSCs) are cells that can replicate and differentiate into cells of multiple organs. However, there are challenges regarding their cultivation conditions. Fetal bovine serum (FBS) is the most commonly used culture medium additive for in vitro cultures, despite its undefined composition, potential immunogenicity, and possible prion/zoonotic transmission. For these reasons, significant efforts have been targeted at finding substitutes, such as serum-free media or human platelet lysates (HPL) and fresh frozen plasma (FFP). This study aimed to investigate the effects of the simultaneous use of FFP, HPL, and FBS on the proliferation of MSCs derived from umbilical cord blood and adipose tissues.

Materials and Methods: In this study, five platelet concentrate bags were obtained from the Iranian Blood Transfusion Organization, the branch of Jahrom. Relatively, the Platelet lysate was prepared by repeated freezing/thawing method, and dead cells were separated from platelet lysate by centrifugation. MSCs were isolated from the adipose tissue of five patients undergoing hernia surgery or cesarean, and from the umbilical cord of 10 newborns. The cells were cultured in control (FBS) and experimental (FBS+FFP, FFP+HPL and FBS+FFP+HPL) groups. Cells of MSC phenotype were confirmed by flow cytometric analysis and viability was examined using the MTT assay.

Results: The results showed that the proliferation and viability of mesenchymal stem cells were increased significantly in the FBS+FFP, FBS+HPL, FFP+HPL, and FBS+FFP+HPL groups compared to the FBS group.

Conclusion: In this study, it was shown that FBS+FFP, FBS+HPL, FFP+HPL, and FBS+FFP+HPL had a beneficial effect on the growth and proliferation of MSCs. It seems these biological effects are due to the presence of growth factors and cytokines produced by blood cells. This study confirms that FFP+HPL as a supplement in some culture media may be considered a suitable alternative instead of FBS for the MSC culture media.

Keywords: Umbilical cord blood-mesenchymal stem cells, Adipose-mesenchymal stem cells, Human platelet lysate, Fresh frozen plasma

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]