مقاله تحقیقاتی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران

سال هفتم ● شماره ۳ ● صفحات ۱۴۹ تا ۱۵۵ ● پاییز ۱۳۸۸

مقایسه فاکتورهای رشد سایتوکاینی در فراورده‌های سوپرناتانت پلاکتی، لایست پلاکتی و پلاسمای غنی از پلاکت فعال شده جهت کاربردهای درمانی

علی نوروزی عقیده[۱]، *دکتر مریم خیراندیش[۲]، دکتر حسن ابوالقاسمی[۳]، دکتر احمد قره باغیان[۴]

تاریخ اعلام وصول: ۸۸/۴/۱۰ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۸۸/۷/۲۵

چکیده

سابقه و هدف: پلاسمای غنی از پلاکت (PRP)، کنسانتره‌ای از پلاکت‌ها در حجم کمی از پلاسما است. نشان داده شده که اثربخشی این فراورده بر انواع مختلف سلول‌ها ناشی از آثار سینرژیک یک سری پروتئین‌های موجود در پلاکت‌ها، تحت عنوان فاکتورهای رشد پلاکتی است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تحقیقاتی (Original Article) تهیه فراورده پلاسمای غنی از پلاکت فعال شده با فعال‌سازی پلاکت توسط مخلوط ترومبین وکلریدکلسیم وتهیه فراورده‌های سوپرناتانت پلاکتی و لایست پلاکتی نیز به ترتیب باسانتریفیوژکردن با دور بالای (۹۰۰g) پلاسمای غنی از پلاکت و فرایند ذوب و انجماد پلاسمای غنی از پلاکت انجام گرفت. غلظت فاکتورهای رشد وهمچنین پروتئین موجود در این فراورده‌ها به ترتیب با روش‌های ELISA و Bradford تعیین گردید. جهت آنالیز داده‌ها از آزمون‌های آماری Student's t-test و ANOVA و نرم افزار SPSS استفاده شد و مقادیر P<۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها: بر اساس نتایج به‌دست آمده، غلظت پروتئین و همین‌طور غلظت هر چهار نوع فاکتور رشد TGF-β, PDGF, FGF و EGF در دو فراورده پلاسمای غنی از پلاکت فعال شده و لایست پلاکتی به‌طور معنی‌داری بیش از سوپرناتانت پلاکتی بود (P<۰/۰۵). همچنین مقادیر PDGF و TGF-β به‌عنوان فاکتورهای رشد اصلی پلاکتی در حد نانوگرم بوده و به نسبت FGF و EGF (در حد پیکوگرم) در هر سه فراورده سوپرناتانت پلاکتی، لایست پلاکتی و پلاسمای غنی از پلاکت فعال شده به‌طور معنی‌داری بیشتر بود (P<۰۰۵). در ضمن میزان PDGF در لایست پلاکتی و پلاسمای غنی از پلاکت فعال شده با میزان TGF-β تفاوت معنی‌دار داشت (P<۰/۰۵)، اما در سوپرناتانت پلاکتی عکس این حالت مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: با وجود مقادیر بالای پروتئینی و فاکتورهای EGF و FGF در روش ذوب و انجماد (لایست پلاکتی)، استخراج فاکتورهای رشد با روش فعال سازی پلاسمای غنی از پلاکت (پلاسمای غنی از پلاکت فعال شده)، غلظت‌های بیشتری از دو فاکتور اصلی PFGF و TGF-β را حاصل می‌نماید. می‌بایست مطالعات بیشتری صورت گیرد تا ارتباط میزان غلظت پروتئین یا فاکتورهای رشد با میزان اثربخشی آنها بر روی سلول‌ها بررسی شود.

کلمات کلیدی: پلاسمای غنی از پلاکت، فاکتورهای رشد پلاکتی، سوپرناتانت پلاکتی، لایست پلاکتی، پلاسمای غنی از پلاکت فعال شده

۱ـ مربی، ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی ارتش، دانشکده پیراپزشکی، کارشناس ارشد هماتولوژی

۲ـ استادیار، ایران، تهران، سازمان انتقال خون ایران، مرکز تحقیقات (*نویسنده مسوول)

تلفن: ۰۹۱۲۳۳۷۳۱۸۸ - ۰۲۱۸۲۰۵۲۲۰۸ آدرس الکترونیک: m.kheirandish@ibto.ir

۳ـ استاد، ایران، تهران،سازمان انتقال خون ایران، مرکز تحقیقات

۴ـ استادیار، ایران، تهران، سازمان انتقال خون ایران، مرکز تحقیقات

www.SID.ir

مقدمه

پلاکت‌ها علاوه بر نقش شناخته شده‌شان در فرایند انعقاد خون، حاوی فاکتورهای رشد مختلف بوده و با رهاسازی آنها موجب القأ و تسریع فرایندهای حیاتی چون ترمیم بافتی می‌شوند (۱). از این رو درحال حاضر فاکتورهای رشد مختلف از جمله PDGF (Platelet-derived Growth Factor)، FGF (Transforming Growth Factor-β) TGF-β (Fibroblast Growth Factor) و EGF (Epithelial Growth Factor) در قالب فراورده‌هایی مانند: پلاسمای غنی از پلاکت (Platelet-Rich Plasma) ((PRP) اتولوگ، ژل پلاکتی (Platelet Gel) و یا چسب فیبرینی (Fibrin Glue) جهت بهبود نتایج حاصله در اعمال جراحی گوناگون همچون جراحی پلاستیک، قلب و ارتوپدی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۵-۲). PDGF پروتئین دایمریک با وزن مولکولی ۳۰KD بوده و طیف وسیعی از سلول‌ها از جمله سلول‌های بنیادی، فیبروبلاست‌ها، کندروسیت‌ها و سلول‌های عضله صاف را تحریک به انجام میتوز می‌نماید (۷، ۶). TGF-β پروتئین دایمریک با وزن مولکولی ۲۵KD است و در سطح بسیاری از سلول‌ها از جمله سلول‌های بنیادی مزانشیمی، فیبروبلاست‌ها و استئوبلاست‌ها دارای گیرنده می‌باشد (۹، ۸). بنا بر مطالعات انجام شده FGF دارای نقش اساسی در تکامل سیستم‌های عروقی، عصبی و اسکلتی داشته و ترمیم بافتی را تحریک می‌نماید (۱۰). EGF برای اولین بار در سال ۱۹۶۲ توسط Cohen کشف گردید و نشان داده شد که این فاکتور با تاثیر بر گیرنده سایر فاکتورها، تاثیرات غیر مستقیم بر رویدادهای سلولی دارد (۱۱). علاقه شدید به استفاده از کنسانتره‌های پلاکتی از مطالعه Marx و همکارانش در سال ۱۹۹۸ منشا گرفت. وی تاثیر قابل توجه ژل پلاکتی را بر بهبود محل پیوند استخوان فک گزارش نمود (۱۲). از آن به بعد کنسانتره‌های پلاکتی به‌طور موفقیت آمیزی در موارد بالینی مختلف جهت ترمیم بافت‌های سخت و نرم به‌کار گرفته شدند (۱۶-۱۳). با این حال بین غلظت‌های مورد نیاز ترومبین جهت فعال سازی بهینه پلاکت‌ها و میزان مورد نیاز آن در موارد بالینی و همین‌طور تهیه مناسب‌ترین فراورده پلاکتی، توافق کامل حاصل نگردیده است (۱۷، ۱۲). لذا هدف ما تهیه سه نوع فراورده مختلف پلاکتی تحت عناوین سوپرناتانت پلاکتی (PS: Platelet Supernatant)، لایست پلاکتی (PL: Platelet Lysate)، پلاسمای غنی از پلاکت فعال شده (AP: Activated Platelet-Rich Plasma) و سپس تعیین غلظت‌های پروتئینی و همین‌طور غلظت فاکتورهای رشد مختلف در آنها بود تا با انجام مقایسه این مقادیر در بین این سه فراورده ارزشمند، مناسب‌ترین فراورده پلاکتی حاوی بیشترین غلظت پروتئین و فاکتورهای رشد برای جایگزین کردن آن با فاکتورهای رشد سنتتیک، معرفی نماییم. چرا که فراهم نمودن فاکتورهای رشد سنتتیک همواره دشوار بوده و هزینه‌های سنگینی را به‌دنبال دارد. این در حالی است که پلاسمای غنی از پلاکت به‌عنوان منبع غنی از این فاکتورها دارای مزایای بسیاری نسبت به فاکتورهای سنتتیک است که برخی از آنها عبارتند از: تولید و دسترسی آسان، مقرون به صرفه بودن و از همه مهمتر ایمن بودن (Safety) آن. به‌خصوص اگر به‌صورت اتولوگ یا خودی استفاده شود فاقد اثرات جانبی مانند تحریک سیستم ایمنی و انتقال بیماری است. اما با وجود استفاده‌های گوناگون از پلاسمای غنی از پلاکت و کسب نتایج مطلوب، انجام مطالعه‌ای که در آن فراورده‌های مختلف پلاکتی، به‌طور همزمان و مقایسه‌ای مورد ارزیابی دقیق قرار گیرند، اطلاعات کاربردی مفیدی را در اختیار قرار خواهد داد.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر از نوع تحقیقاتی (Original Article) می‌باشد.

تهیه فراورده پلاسمای غنی از پلاکت

جهت تهیه این فراورده، مطابق با مطالعات قبلی، ابتدا تعداد ۵ فرد اهدا کننده سالم با شمارش پلاکت خون بالا انتخاب و در ۵ نوبت کاری از آنها فراورده پلاسمای غنی از پلاکت تهیه گردید (۱۹، ۱۸). تعداد پلاکت هر یک از نمونه‌ها با دستگاه Sysmex K۱۰۰۰ در بخش هماتولوژی سازمان انتقال خون ایران تعیین و سپس از نتایج به‌دست آمده میانگین گرفته شد. تهیه پلاسمای غنی از پلاکت با روش پلاکت فِرزیس و با دستگاه Hemonetics, MSC plus USA درمرکز آفرزیس سازمان انتقال خون ایران انجام گرفت تا بیشترین میزان پلا کت فراهم گردد.

به‌منظور تهیه سه فراورده سوپرناتانت پلاکتی، لایست پلاکتی و پلاسمای غنی از پلاکت فعال شده، فراورده پلاسمای غنی از پلاکت، بلافاصله پس از تهیه به سه بخش با حجم‌های برابر تقسیم گردید.

تهیه فراورده سوپرناتانت پلاکتی

جهت تهیه این فراورده و تا حد امکان جهت ممانعت از خروج

Archive of SID
www.SID.ir

فاکتورهای مختلف از پلاکت، پلاسمای غنی از پلاکت تهیه شده در مرحله قبل، بلافاصله پس از تهیه و به مدت ۴۵ دقیقه و با دور g۹۰۰ سانتریفیوژ شد و مایع رویی شفاف توسط پیپت پاستور برداشت گردید.

تهیه فراورده لایست پلاکتی

به‌منظور تهیه فراورده لایست پلاکتی، ابتدا فراورده پلاسمای غنی از پلاکت به مدت ۲۴ ساعت در دمای C° ۸۰- نگهداری و سپس جهت جلوگیری از تقلیب (Denaturation) پروتئین‌ها در دمای C° ۸ تا ۲ به آرامی ذوب گردید. پس از ذوب کامل، سوسپانسیون حاصل به مدت ۴۵ دقیقه و دور g۹۰۰ سانتریفیوژ گردید تا ذرات وقطعات پلاکتی شناور به طور کامل ته نشین شوند. مایع رویی شفاف توسط پیپت پاستور برداشته و به عنوان لایست پلاکتی در آزمایش‌ها استفاده شد.

تهیه فراورده پلاسمای غنی از پلاکت فعال شده

جهت تهیه فراورده پلاسمای غنی از پلاکت فعال شده، بر اساس آنچه که در اغلب مقاله‌ها به آن اشاره شده بود، ابتدا ۱۰۰ واحد بین المللی (IU) ترومبین انسانی (شرکت Sigma) با یک میلی لیتر از محلول کلرور کلسیم ۱۰درصد (شرکت Sigma) ترکیب و سپس IU ۲۵۰ از ترکیب حاصل با ۱۰۰ میلی لیتر از فراورده پلاسمای غنی از پلاکت مخلوط شد (۱۸). سپس مخلوط به‌دست آمده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید تا فرایند انقباض لخته (Clot Retraction) به‌طور کامل رخ دهد. پس از اتمام زمان انکوباسیون و بررسی ماکروسکوپی نمونه، جهت اطمینان از تشکیل لخته متراکم پلاکتی، این ترکیب به مدت ۱۰ دقیقه با دور g۹۰۰ سانتریفیوژ شد و مایع رویی با دقت توسط پیپت پاستور برداشت گردید. جهت اندازه‌گیری غلظت پروتئین و همین‌طور غلظت فاکتورهای رشد، هر سه فراورده در حجم‌های معین توزیع (Aliquot) گردیده و به فریزر C° ۸۰- انتقال یافتند.

اندازه‌گیری غلظت پروتئین

در بین روش‌های موجود، جهت اندازه‌گیری غلظت پروتئینی فراورده‌های سوپرناتانت پلاکتی، لایست پلاکتی و پلاسمای غنی از پلاکت فعال شده روش استاندارد Bradford انتخاب گردید (۲۰). این روش با استفاده از واکنشگر CBBG۲۵۰ (شرکت Sigma) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. جهت تهیه محلول پروتئین استاندارد مورد نیاز این روش از آلبومین سرم گاوی (BSA: Bovine Serum Albumin) ۲۲ درصد استفاده گردید (۲۰). جهت بالا بردن دقت و کاهش میزان نمونه و واکنشگر مورد نیاز، به جای لوله آزمایش از پلیت ELISA استفاده شد و نتایج با دستگاه ELISA Reader (Lab System-Multiskan) در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت گردید. جهت بالا بردن دقت و صحت نتایج، اندازه‌گیری پروتئین در مورد هر یک از فراورده‌ها در سه نوبت کاری مختلف و به‌صورت دوبل در دو چاهک انجام گرفت و سپس از نتایج به‌دست آمده میانگین گرفته شد.

تعیین غلظت فاکتورهای رشد در فراورده‌های سوپرناتانت پلاکتی، لایست پلاکتی و پلاسمای غنی از پلاکت فعال شده با روش ELISA:

از کیت‌های تجاری ELISA (Quantikine, R&D Systems) جهت تعیین غلظت ۴ فاکتور رشد TGF-β (DHD۰۰B), TGF (DB۱۰۰B), FGF (DFB۵۰), PDGF و EGF (DEG۰۰) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده، به‌طور خلاصه به شرح ذیل استفاده گردید: پس از تهیه تمامی واکنشگرها، مقادیر معین از محلول‌های استاندارد، کنترل و نمونه در داخل چاهک‌های مربوطه ریخته و پس از طی زمان انکوباسیون, به ترتیب طی دو مرحله انکوباسیون و شستشو بین مراحل، محلول‌های کنژوگه و محلول سوبسترا افزوده شد. در مرحله انتهایی نیز پس از افزودن محلول متوقف کننده، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰-۵۴۰ نانومتر قرائت شد. به منظور بالا بردن دقت و صحت نتایج، اندازه‌گیری غلظت هریک از فاکتورها درسه نوبت کاری مختلف و به‌صورت سه گانه (Triplicate) در دو چاهک انجام گرفت. جهت آنالیز داده‌ها از آزمون‌های آماری One-Way ANOVA, Student's t-test و نرم افزار SPSS استفاده شد و مقادیر P<۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها

شمارش پلاکت

همان‌طور که در بخش قبل شرح داده شد ۵ واحد پلاسمای غنی از

Archive of SID
www.SID.ir

پلاکت از ۵ اهدا کننده سالم تهیه و پس از شمارش پلاکت هر یک از واحدها، از نتایج به‌دست آمده میانگین گرفته شد. بر این اساس تعداد پلاکت در فراورده پلاسمای غنی از پلاکت پس از انجام شمارش با دستگاه Sysmex K۱۰۰۰ به‌طورمیانگین ۰/۱۵×۱۰۹/ml ±۱/۰۶۶×۱۰۹ بود.

غلظت پروتئین و غلظت فاکتورهای رشد

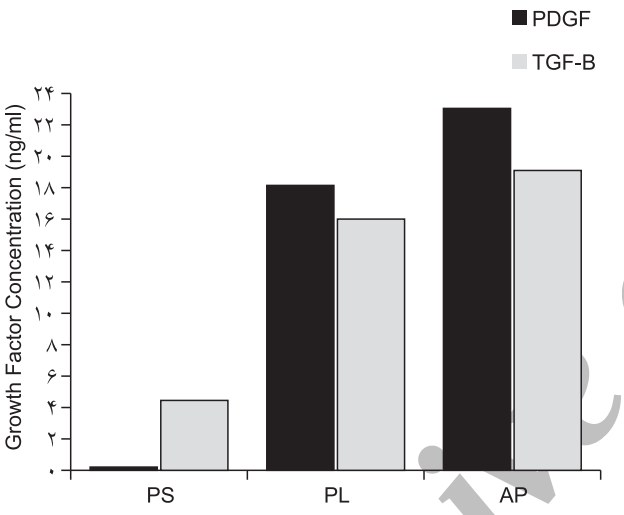
غلظت‌های پروتئینی در فراورده‌های سوپرناتانت پلاکتی، لایست پلاکتی و پلاسمای غنی از پلاکت فعال شده به ترتیب ۶ mg/ml ±۴۶۰، ۵ ±۴۹۰ و ۴ ±۴۸۰ تعیین شد. (جدول شماره ۱)

جدول ۱- مقایسه غلظت پروتئین بین سه فراورده سوپرناتانت پلاکتی (PS)، لایست پلاکتی (PL) و پلاسمای غنی از پلاکت فعال شده (AP) که با روش Bradford اندازه‌گیری شده است.

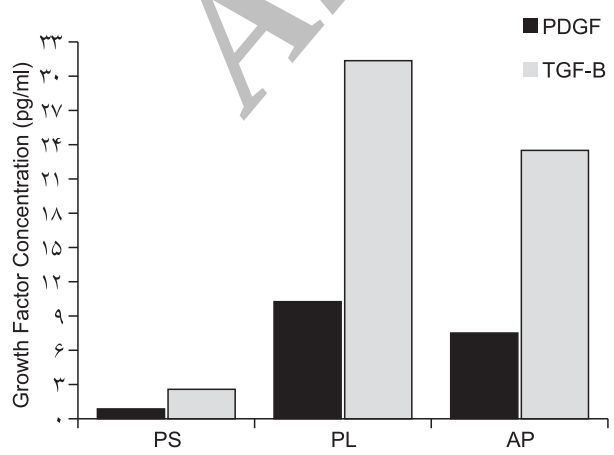
Platelet products	Protein concentration (mg/ml) mean±SD
Platelet Supernatant	۴۶۰±۶
Platelet Lysate (mg/ml)	۴۹۰±۵
Activated Platelet-Rich Plasma (mg/ml)	۴۸۰±۴

SD: Standard Deviation ,N=5 (تعداد نمونه‌های PRP تهیه شده)

فرایند ذوب و انجماد(Freezing and Thawing) پلاسمای غنی از پلاکت درقالب فراورده لایست پلاکتی و همچنین دگرانولاسیون پلاکت‌های فعال شده در اثر مجاورت با مخلوط ترومبین و کلرور کلسیم در قالب فراورده پلاسمای غنی از پلاکت فعال شده، منجر به رهاسازی انواع پروتئین‌ها از جمله فاکتورهای FGF,TGF-β,PDGF و EGF گردید و غلظت پروتئین و غلظت هر چهار نوع فاکتور رشد در این دو فراورده، به‌طور معنی‌داری بیش از فراورده سوپرناتانت پلاکتی بود (P<۰۰۵)غلظت هر یک از فاکتورهای FGF,TGF-β,PDGF و EGF و همچنین غلظت پروتئین در فراورده لایست پلاکتی به ترتیب ng/ml ۱/۹±۱۸/۱، ng/ml ۳/۰±۱۶/۰، pg/ml ۱/۳±۱۰/۲، pg/ml ۴/۰±۳۱/۰ و mg/ml ۵ ±۴۹۰، در فراورده پلاسمای غنی از پلاکت فعال شده ng/ml ۲/۱±۲۳/۰، ng/ml ۳/۰±۱۹/۰، pg/ml ۱/۰±۷/۴، pg/ml ۳/۰±۲۳/۳ و mg/ml ۵ ±۴۸۰ و در فراورده سوپرناتانت پلاکتی نیز ng/ml ۰/۰۳±۰/۲۴، ng/ml ۰/۴±۴/۵، pg/ml ۰/۰۶±۰/۸، pg/ml ۰/۳±۲/۶ و mg/ml ۶±۴۶۰ بود). همین‌طور مقادیر PDGF و TGF-β به‌عنوان فاکتورهای رشد اصلی پلاکتی نسبت به FGF و EGF در هر سه فراورده سوپرناتانت پلاکتی، لایست پلاکتی و پلاسمای غنی از پلاکت فعال شده به‌طور معنی‌داری بیشتر بود (P<۰۰۵). در ضمن میزان PDGF در لایست پلاکتی و پلاسمای غنی از پلاکت فعال شده (به ترتیب ۱/۹±۱/ ۱۸و ۲/۱±۲۳/۰) با میزان TGF-β (۳/۰±۱۶/۰ و۳/۰±۱۹/۰) تفاوت معنی‌دار داشت. هر چند در سوپرناتانت پلاکتی (۰/۰۳±۰/۲۴ :PDGF و



نمودار ۱- مقایسه غلظت فاکتورهای رشد PDGF و TGF-β بر حسب ng/ml بین سه فراورده سوپرناتانت پلاکتی (PS)، لایست پلاکتی (PL) و پلاسمای غنی از پلاکت فعال شده (AP) در غلظت پروتئینی ۵۰ mg/ml. همان‌طور که توضیح داده شد، غلظت این فاکتورها با روش ELISA اندازه‌گیری شده است.



نمودار ۲- مقایسه غلظت فاکتورهای رشد FGF و EGF بر حسب pg/ml بین سه فراورده سوپرناتانت پلاکتی (PS)، لایست پلاکتی (PL) و پلاسمای غنی از پلاکت فعال شده (AP) در غلظت پروتئینی ۵۰ mg/ml

Archive of SID
www.SID.ir

TGF-β:۴/۵±۰/۴) عکس این حالت مشاهده گردید و میزان TGF-β بیشتر بود (P<۰/۰۵). (نمودارهای ۱، ۲).

بحث و نتیجه‌گیری

پلاسمای غنی از پلاکت، کنسانتره‌ای از پلاکت‌های انسانی در یک حجم کم از پلاسما است و به خاطر غنی بودن از پلاکت، کنسانتره‌ای از فاکتورهای رشد به حساب می‌آید. این فاکتورهای موجود در گرانول‌های آلفای پلاکت که از قبل ذخیره شده و یا به تازگی سنتز شده‌اند، پس از رهاسازی ناشی از فعال‌سازی یا تخریب مکانیکی پلاکت، آثار خود را بر روی سلول‌های هدف دارای گیرنده، اعمال می‌کنند (۲۱، ۱۲). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که طیف وسیعی از انواع سلول‌ها دارای گیرنده برای این فاکتورها می‌باشند. از این رو امروزه پلاسمای غنی از پلاکت در قالب فراورده‌های متنوع از جمله پلاسمای غنی از پلاکت فعال شده، ژل پلاکتی یا چسب فیبرینی به‌عنوان یک منبع غنی از فاکتورهای رشد انسانی جایگاه ویژه‌ای در بحث سلول درمانی (Cell Therapy) و مهندسی بافت (Tissue Engineering) پیدا کرده است (۲۲، ۱۸).

در این تحقیق فراورده پلاسمای غنی از پلاکت با روش پلاکت فرزیس تهیه گردید تا ضمن به‌دست آمدن شمارش پلاکتی بالا، کمترین آلودگی فرآورده توسط گلبول‌های سفید حاصل گردد، زیرا طبق مطالعات انجام شده، حضور گلبول‌های سفید تاثیر زیادی بر میزان فاکتورهای رشد پلاسمای غنی از پلاکت دارد. شمارش پلاکت در فراورده پلاسمای غنی از پلاکت به طور متوسط (Mean±SD) ml ۱۰۹/۰/۱۵×۱۰۹± ۱/۰۶۶×۱۰۹ بود که از این نظر با مقاله‌های مشابه، نظیر مطالعات انجام شده توسط Martineau، Schallmoser و Ogino مطابقت داشت (۲۵-۲۳، ۱۸).

جهت تهیه فرآورده لایست پلاکتی از بین سه روش اتصال (Adhesion)، فعال‌سازی (Activation) و لیز نمودن (Lysing)، به دلیل سهولت انجام، هزینه کم، کمترین دستکاری و احتمال کمتر آلودگی باکتریال از روش سوم یعنی لیز پلاکت‌ها توسط فرایند انجماد و ذوب استفاده شد (۲۷، ۲۶).

براساس مطالعات مختلف، به‌خصوص مطالعه Martineau و Lacoste که در آن غلظت فاکتورهای پلاکتی در زمان‌های مختلف انکوباسیون پلاسمای غنی از پلاکت با مخلوط ترومبین و کلسیم اندازه‌گیری شد، ما نیز این مخلوط را به نسبت ۱۰ به ۱ و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه کردیم تا بیشترین غلظت فاکتورهای رشد پلاکتی حاصل گردد (۱۸).

در مطالعه ما همانند نتایج به‌دست آمده از مطالعات انجام شده توسط Martineau، Kilian و Ogino، فاکتورهای PDGF و TGF-B از غلظت بالاتری نسبت به سایر فاکتورهای رشد برخوردار بودند (۲۴، ۱۸، ۱۱).

از طرفی بر خلاف مطالعه Martineau، میزان TGF-βدر سوپرناتانت پلاکتی بیشتر از PDGF-AB بود. همچنین مشاهده شد که مقادیر FGF و EGF در لایست پلاکتی بیش از پلاسمای غنی از پلاکت فعال شده است که به احتمال زیاد این مسئله نشانگر آن است که به‌دنبال فعال‌سازی پلاکت، این دو فاکتور رشد به طور کامل از گرانول‌های آلفای پلاکتی تخلیه نشده، درحالی‌که در روند تهیه لایست پلاکتی با تخریب مکانیکی پلاکت، این دو فاکتور به میزان بیشتری از گرانول‌ها آزاد می‌گردند (۱۸).

مطالعات آزمایشگاهی (Invitro) نشان می‌دهند که غلظت فاکتورهای رشد مختلف بسته به روش تهیه پلاسمای غنی از پلاکت، شمارش پلاکت‌ها، حضور سلول‌های دیگر از جمله لکوسیت‌ها و مکانیسم رهاسازی محتویات پلاکتی، متغیر می‌باشد (۲۸، ۲۳).

مقایسه غلظت‌های پروتئین بین این سه فرآورده، همانند نتایج مربوط به غلظت‌های فاکتورهای رشد مؤید آن است که مطابق با نتایج مطالعه Kilian به دنبال فعال‌سازی پلاسمای غنی از پلاکت، غلظت پروتئینی پلاسمای غنی از پلاکت فعال شده (۴۸۰ mg/ml) نسبت به سوپرناتانت پلاکتی (۴۶۰mg/ml) افزایش یافته و در مورد لایست پلاکتی (۴۹۰mg/ml) نیز مطابق با نتایجی که از مطالعات Doucet و Kaps به‌دست آمده، به خاطر تخریب کامل ساختمان پلاکت و حداکثر آزادسازی سایر پروتئین‌های پلاکتی علاوه بر آزادسازی بیشتر پروتئین‌های درون گرانول‌های پلاکتی، محتوای پروتئینی بیش از پلاسمای غنی از پلاکت فعال شده و سوپرناتانت پلاکتی است (۲۶، ۲۵، ۱۱).

براساس مطالبی که در مطالعهٔ Marx در سال۲۰۰۴ به آن اشاره شده، فاکتورهای رشد موجود در گرانول‌های آلفای پلاکتی به شکل غیرفعال و نامحلول حضور دارند و به محض فعال شدن پلاکت، گرانول‌های آلفا با غشأ پلاکت ترکیب شده و در این حین زنجیره‌های

Archive of SID
www.SID.ir

جانبی کربوهیدراتی به ساختمان این فاکتورها افزوده می‌شود تا به شکل فعال زیستی (Bioactive) و عملکردی (Functional) خود درآیند و بتوانند به شکل محلول در پلاسما، اثرات خود را بر سلول‌ها اعمال نمایند. از این رو درصورت آسیب مکانیکی پلاکت‌ها و رهاسازی مکانیکی فاکتورهای آن که به‌طور عمده به شکل غیرفعال و ناکامل هستند، این فاکتورها نخواهند توانست اثراتی همانند فاکتورهای کامل رها شده توسط پلاکت طبیعی از خود بروز دهند (۲۹).

از سویی دیگر مشاهدهٔ محتوای بیشتر پروتئین و همچنین فاکتورهای رشد در لایست پلاکتی نسبت به سوپرناتانت پلاکتی این تصور را در ذهن ایجاد می‌نماید که تاثیرات لایست پلاکتی بیشتر از سوپرناتانت پلاکتی خواهد بود، اما می‌بایستی به این نکته توجه داشت که مقادیر زیاد فاکتورهای غیرعملکردی در لایست پلاکتی، می‌تواند گیرنده‌های فاکتورهای رشد را در سطح سلول هدف اشباع نموده وبه صورت رقابتی مانع از آن شود که مقادیر کم فاکتورهای فعال از قبل ترشح شده در لایست پلاکتی توسط پلاکت بتوانند اثراتی برابر با سوپرناتانت پلاکتی از خود نشان دهند، این در حالی‌است که مقادیر کم فاکتورهای فعال موجود در سوپرناتانت پلاکتی به دلیل عدم حضور فاکتورهای غیرعملکردی، قادر خواهند بود با اتصال به گیرنده‌های موجود در سطح سلولهای هدف، اثرات خود را اعمال کنند. لذا جهت مشخص شدن این موارد می‌بایست مطالعات بیشتری صورت گیرد. در پایان با توجه به نتایج به‌دست آمده بار دیگر به این مسئله مهم اشاره می‌کنیم که فاکتورهای رشد پلاکتی به دلایلی مانند ایمنی بالا، دسترسی آسانتر و صرف هزینه‌های تولیدی کمتر، می‌توانند جایگزین مناسب برای روش‌هایی گردند که در آنها از فاکتورهای سنتتیک استفاده می‌شود. ضمن اینکه امروزه مقادیر بسیار کمی از فاکتورهای رشد سنتتیک جهت استفاده‌های بالینی در دسترس می‌باشد. مجموع موارد ذکر شده، پلاسمای غنی از پلاکت را به‌عنوان منبع مفید و موثر از فاکتورهای رشد فیزیولوژیک معرفی می‌نماید.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از مسؤولین و همکاران گرامی در بخش‌های مختلف سازمان انتقال خون ایران، به خصوص بخش ایمونولوژی و مرکز آفرزیس، به‌دلیل همکاری صمیمانه شان کمال تشکر و قدردانی را ابراز می‌داریم.

References

1- Rozman P, Bolta Z. Use of Platelet Growth Factors in Treating Wounds and Soft-tissue Injuries. Acta Dermatoven APA 2007;16(4).
2- Koveker GB. Growth Factors in Clinical Practice. Int J Clin Pract 2000;54:590–3.
3- Froum SJ, Wallace SS, Tarnow DP, Cho SC. Effect of Platelet-rich Plasma on Bone Growth and Osteointegration in Human Maxillary Sinus Grafts: Three Bilateral Case Reports. Int J Periodont Restor Dent 2002;22:45–53.
4- Rakesh K, Chandra, Charles Handorf, Mitch West, Emma A. Kruger, Scott Jackson. Histologic Effects of Autologous Platelet Gel in Skin Flap Healing. Arch Facial Plast Surg 2007;9(4):260-63.
5- Susan J, Thomas H, Cynthia C. Autologous Platelet Gel Applications During Cardiovascular Surgery: Effect on Wound Healing JECT 2005;37:148–52.
6- Campochiaro PA, Glaser BM, et al. Platelet-derived Growth Factor is Chemotactic for Human Retinal Pigment Epithelial Cells. Arch ophthalm 1985;103:576-9.
7- Sytkowski Aj, O`Hara C, et al. Charactriztion of Biologically Active Platelet-derived Growth Factor-like Molecules Produced by Murine Erythron Cells in Vitro and Invivo. J Clin Invest 1990;85:40-6.
8- Barnord JA, Lyons RM, etal. The Cell Biology of Growth Factor B. Biochem Biophys Acta 1990;1032:79-87.
9- Mjesky MW, Linder V, et al. Production of Transforming Growth Factor B1 During Repair of Arterial Injury. J Clin Invest 1991;88:904-10.
10- Gibby KA, McDonnell K, Schmidt M, Wellstein A. A Distinct Role for Secreted Fibroblast Growth Factor-binding Proteins in Development. PNAS 2009;106(21):85-7.
11- Kilian O, Fle I, et al. Effects of Platelet Growth Factors on Human Mesenehymal Stem Cells and Human Endothoill Cells Invitro. Eur J Med Res 2004;9:337-44.
12- Max RE, Carlson ER, Eichtaed R. Platelet Rich Plasma. Growth Factor Enhancement for Bone Gifts. Oral surg oral Med oral pothole oral Radial Endod 1998;85:638.
13- Griffioen AW, Molema G. Angiogenesis: Potentials for Pharmacologic Intervention in the Treatment of Cancer, Cardiovascular Diseases, and Chronic Inflammation. Pharmacol Rev 2000;52:237–68.
14- Khan SN, Tomin E, Lane JM. Clinical Applications of Bone

Archive of SID
www.SID.ir

Graft Substitutes. Orthop Clin North Am 2000;31:389– 98.
15- Kassolis JD, Rosen PS, Reynolds MA. Alveolar Ridge and Sinus Augmentation Utilizing Platelet-rich Plasma in Combination Withfreeze-dried Bone Allograft: Case Series. J Periodontol 2000;71:1654–61.
16- Anitua E. Plasma Rich in Growth Factors: Preliminary Results of Use in the Preparation of Future Sites for Implants. Int J Oral Maxillofac Implants 1999;14:529–35.
17- Maloney JP, Silliman CC, Ambruso DR, Wang J, Tuder RM, Voelkel NF. In Vitro Release of Vascular Endothelial Growth Factor During Platelet Aggregation. Am J Physiol 1998;275:1054–61.
18- Martineau I, Lacoste E, Gagnon G. Effects of Calcium and Thrombin on Growth Factor Release from Platelet Concentrates: Kinetics and Regulation of Endothelial Cell Proliferation. Biomaterials 2004;25:4489-502.
19- Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. Annal Biochem 1976;72:248-54.
20- Kevy S, Jacobson M. Preparation of Growth Factors Enriched Autologous Platelet Gel. In: Proceedings of the 27th annual Meeting of service Biometrical; 2001.
21- Everts P, Devilee R, Oosterbos C, Mahoney CB, Schattenkerk MF, et al. Autologous Platelet Gel and Fibrin Sealant Enhance the Efficacy of Total Knee Arthroplasty: Improved Range of Motion, Decreased Length of Stay and a Reduced Incidence of Arthrofibrosis. Journal of Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy 2007;15(7):888-94.
22- Zimmermann R, Arnold D, Strasser E, et al. Sample Preparation Technique and White Cell Content Influence the Detectable Levels of Growth Factors in Platelet Concentrates. Vox Sang 2003;85:283-9.
23- Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E. Human Platelet Lysate Can Replace Fetal Bovine Serum or Clinical-scale Expansion of Functional Mesenchymal Stromal Cells. Transfusion 2007;47:1436-46.

Archive of SID
www.SID.ir

Comparison of Cytokine Growth Factors in Platelet Supernatant, Platelet Lysate and Activated Platelet-rich Plasma for Therapeutic Applications

Noroozi Aghideh. A; MSc[1], *Kheirandish. M; PhD[2]
Abolghasemi. H; MD[3], Gharehbaghian. A; PhD[4]

Received: 1 Jul 2009 Accepted: 17 Oct 2009

Abstract

Background: Platelet-Rich Plasma (PRP) is a concentration of human platelets in a small volume of plasma. It has been shown that effects of this product on various cell types is due to synergistic effects of some proteins of platelet alpha granules as platelet growth factors. The purpose of this study is definition of the more efficient platelet product, with higher protein and growth factor concentration for using in various applications.

Materials and Methods: In this study, platelet-rich plasma was isolated by apheresis method. Activated Platelet-rich Plasma (AP) was prepared by platelet activation by thrombin and calcium chloride. Platelet Supernatant (PS) and Platelet Lysate (PL) preparation was performed by high speed centrifugation (900g), and freezing and thawing of platelet rich plasma, respectively. The growth factors and protein concentrations in these platelet products were measured by ELISA and Bradford methods, respectively.

Results: Platelet concentration of Platelet-rich Plasma was $1.066\times10^9 \pm 0.15\times10^9$ /ml (Mean ± SD). According to the results, concentrations of PDGF, TGF-β, FGF, EGF and protein were few in Platelet Supernatant (0.24±0.03 ng/ml, 4.5±0.4 ng/ml, 0.8±0.06 pg/ml, 2.6±0.3 pg/ml and 460±6 mg/ml, respectively) and significantly increased by platelet activation (23.0±2.1 ng/ml, 19±3.0 ng/ml, 7.4±1.0 pg/ml, 23.3±3.0 pg/ml and 480±4 mg/ml, respectively) or freezing and thawing of PRP (18.1±1.9 ng/ml, 16.0±3.0 ng/ml, 10.2±1.3 pg/ml, 31.0±4.0 pg/ml and 490±5 mg/ml, respectively) ($P<0.05$). We showed that concentration of PDGF and TGF-β as two major platelet growth factors is significantly higher than FGF and EGF in all of three platelet products ($P<0.05$). We also found that FGF and EGF concentrations are significantly higher in Platelet Lysate (10.2±1.3 and 31.0±4.0) than Activated Platelet-rich Plasma (7.4±1.0 and 23.3±3.0) ($P<0.05$), and TGF-β in Platelet Supernatant (4.5±0.4), in contrast to two other platelet products, is significantly higher than PDGF (0.24±0.03) ($P<0.05$).

Conclusions: Preparation of Platelet-rich Plasma by apheresis method, gives a high platelet count. Protein extraction by PRP activation yields a higher concentration of two major factors (PDGF and TGF-β), in spite of higher amounts of protein, FGF and EGF in Platelet Lysate. More studies are needed to define the relation between higher growth factor concentration or protein content and effects in various applications.

Keywords: Platelet Growth Factors, Platelet-rich Plasma, Platelet Supernatant, Platelet Lysate, Activated Platelet-rich Plasma

1- Instructor, Aja University of Medical Science, Tehran, Iran
2- (* Corresponding Author) Assistant Professor, Iranian Blood Transfusion Organization, Research Center Iran, Tehran
Tel: 021-82052208 Email: m.kheirandish@ibto.Ir
3- Professor, Iranian Blood Transfusion Organization, Research Center, Iran, Tehran
4- Assistant Professor, Iranian Blood Transfusion Organization, Research Center, Iran, Tehran

Archive of SID
www.SID.ir