



ارزیابی اثرات پلاسمای غنی از پلاکت بر تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان به سلول‌های تاندونی (تنوسیت) در خرگوش

مرسده سادات حسین‌بروجردی^۱، محمد مهدی دهقان^{۱،۲}، فریدون صابری‌افشار^۱، کیوان مجیدزاده‌اردبیلی^۲، سیدحسین مرجانمهر^۳، آرتیمس یحیایی^۱، معصومه جباری‌فخر^۲

^۱ گروه آموزشی جراحی و رادیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۲ پژوهشکده تحقیقات زیست پزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۳ پژوهشکده معتمد، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

^۴ گروه آموزشی پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

doi [10.22059/jvr.2020.250664.2754](https://doi.org/10.22059/jvr.2020.250664.2754)

تاریخ دریافت: ۲۷ اردیبهشت ماه ۱۳۹۹، تاریخ پذیرش: ۲۵ تیر ماه ۱۳۹۹

چکیده

زمینه مطالعه: ترمیم تاندون می‌تواند نیازمند مجموعه‌ای از مداخله‌های درمانی نظیر ایجاد شرایط خاص فیزیکی، استفاده از روش‌های مهندسی بافت، استفاده از فاکتورهای رشد و نیز تحریک‌های مکانیکی باشد. بررسی‌های گذشته نشان داده که استفاده از پلاسمای غنی از پلاکت در ترمیم تاندون مؤثر بوده‌است.

هدف: هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر تمایزدهندگی ترشحات لخته PRP بر سلول‌های بنیادی مزانشیمال اخذ شده از مغز استخوان خرگوش می‌باشد. **روش کار:** سلول‌های بنیادی مزانشیمی از مغز استخوان ۱۰ سر خرگوش سفید نژاد نیوزیلندی اخذ شده و مورد بررسی‌های فلوسایتومتری و مورفولوژیک قرار گرفتند. سپس این سلول‌ها با استفاده از PRCR تحت درمان قرار گرفته و از نظر ظاهری و نیز مارک‌های معرف تنوسیت‌ها با استفاده از روش Real-Time PCR بررسی شدند.

نتایج: بررسی اختلاف بیان ژن‌های Scx، Tnmd، کلاژن تیپ I و تناسین C در سلول‌های تمایز یافته در مقایسه با سلول‌های بنیادی نشان داد که میزان بیان همه‌ی آن‌ها به صورت معنی‌داری پس از درمان سلول‌ها با PRCR افزایش یافته‌است.

نتیجه‌گیری نهایی: تحت درمان قرار دادن سلول‌های بنیادی با PRCR باعث بیان شدن ژن‌های مربوط به تاندون و تمایز سلول‌های بنیادی به تنوسیت‌ها می‌شود.

کلمات کلیدی: سلول بنیادی، PRCR، تمایز، Real-Time PCR، خرگوش

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: محمد مهدی دهقان، گروه آموزشی جراحی و رادیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران، پژوهشکده تحقیقات زیست پزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
پست الکترونیکی: mdehghan@ut.ac.ir

مقدمه

بسیار رایج است و بازسازی ضعیف تاندون در بسیاری از موارد منجر به ایجاد مجدد جراحات در ناحیه، پس از بازگشت آن‌ها به ورزش می‌شود. بهترین مدیریت درمان در جراحات ناشی از استفاده‌ی بیش از حد تاندون در اسب‌های ورزشی باید بتواند مانع تشکیل بافت اسکار زیاد شده، ماتریکس تاندونی نرمال

جراحات تاندونی ناشی از فشار زیاد، یکی از عواقب بسیار رایج فعالیت‌های ورزشی در اسب‌ها و نیز انسان می‌باشد که اغلب امکان بازگشت بیمار به فعالیت در سطوح قبلی را با خطر روبرو می‌کند. به عنوان مثال جراحات وارده به تاندون سطحی خم‌کننده‌ی انگشتی (SDFT) در اسب‌های ورزشی و مسابقه‌ای

سلول‌های بنیادی مزانشیمی اتولوگ به عنوان یک منبع سلولی مناسب شناخته شده‌اند. کاشت سلول‌های بنیادی در ناحیه‌ی جراحی منجر به تولید ماتریکسی شده است که بیشتر مشابه ماتریکس تاندون است تا بافت اسکار و بنابراین ظرفیت بازگشت به عملکرد اولیه را افزایش می‌دهد. همچنین کاربرد این سلول‌ها منجر به مشاهده‌ی تعداد بیشتری سلول‌های دوکی شکل که در یک راستا قرار گرفته‌اند در بررسی‌های هیستوپاتولوژیک شده است (۶،۸،۲۳). اما کاربرد این سلول‌ها برخی محدودیت‌های عملی را به همراه دارد. مهم‌ترین آن‌ها احتمال مشاهده‌ی سلول‌های غیر تاندونی نظیر سلول‌های استخوان و غضروف در ناحیه‌ی کاشت این سلول‌ها علاوه بر سلول‌های تنوسیتی می‌باشد. حضور سلول‌های استخوان و غضروف منجر به کاهش خاصیت الاستیکی و کاهش استحکام بافت تاندونی تازه تشکیل، خواهد شد (۲۱).

رهیافت‌های مهندسی بافت برای ترمیم تاندون به سمت ترمیم جراحات و پارگی‌های آن از طریق پیوند تنوسیت‌هایی که در شرایط آزمایشگاهی رشد یافته‌اند در حرکت است. تحریک MSCs با روش‌های مناسب می‌تواند تولید آزمایشگاهی سلول‌های خاص مورد نیاز را فراهم کند. نشان داده شده است که با روش‌های مختلفی می‌توان MSCs را به تنوسیت تمایز داد (۲۶، ۲۵، ۲۴، ۲۳، ۲۱، ۱۶، ۱۲، ۱).

پروسه‌ی ترمیم تاندون شامل چندین مرحله و پیچیده است. تاندون بعد از طی این مراحل وارد مرحله‌ی بازسازی می‌شود که در این مرحله توان مکانیکی خود را تا حدودی باز می‌یابد. در پروسه‌ی ترمیم تاندون بسیاری از فاکتورهای رشد دارای نقش مؤثر هستند. فاکتور رشد پلاکتی (PDGF)، فاکتور رشد اپیدرمی، $TGF-\beta_1$ ، فاکتور رشد مشابه انسولینی (IGF-I) و گیرنده‌های خاصی (مثل گیرنده‌ی $TGF-\beta_1$) به تناسب ایجاد می‌شوند (۵،۷،۲۰). با توجه به مطالعات گذشته، محققان بر این باورند که اثر تحریک‌کننده‌ی پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) در ترمیم و درمان جراحات، مربوط به فاکتورهای رشد موجود در گرانول‌های α پلاکت‌ها می‌باشد که پس از فعال شدن پلاکت از آن ترشح می‌شود (۳). بنابراین پلاکت‌ها می‌توانند به عنوان یک منبع ذخیره‌ای طبیعی برای آزاد کردن فاکتورهای رشد مورد نیاز ترمیم تاندون و یا تمایز سلول‌های بنیادی به تنوسیت‌ها به کار روند (۱۰،۱۵،۲۲).

در این مطالعه، این فرضیه که کاربرد PRCR (که ترکیبی از فاکتورهای رشد مترشحه از لخته‌ی PRP است) می‌تواند تمایز

تولید نموده و احتمال جراحات مجدد را در ناحیه کاهش دهد (۱۶،۲۶).

تحت شرایط فیزیولوژیکی طبیعی، یک تاندون کاملاً رشد یافته و بالغ، بافتی است کم‌عروق با دانسیته‌ی سلولی کم که فعالیت میتوزی بسیار کمی را بروز می‌دهد. این موضوع می‌تواند توجیه مناسبی برای ترمیم کُند تاندون باشد و اینکه چرا حاصل همین ترمیم نیز در اغلب موارد ماتریکس خارج سلولی می‌باشد که از نظر مکانیکی کارایی کافی را ندارد. لیگامنت‌ها و تاندون‌ها در برابر نیروهای کششی فوق‌العاده مقاوم هستند. این‌ها بافت‌های ویسکوالاستیکی هستند و در فشارهای کمتر از حدود ۴ درصد کاملاً الاستیک عمل می‌کنند، این بدان معناست که با برطرف شدن فشار به طول اولیه خود بازمی‌گردند. فشارهای بیشتر از ۴ درصد درجاتی از مشکلات میکروسکوپی یا ماکروسکوپی را ایجاد خواهد کرد (۱۲،۱۳).

استفاده از زیست‌مواد و فناوری مهندسی بافت افق‌های نوینی را در درمان جراحات بافتی گشوده است. هدف روند رو به رشد مهندسی بافت، رژنراسیون بافت‌های آسیب دیده است که این کار را با ترکیب سلول‌ها با چهارچوب‌هایی از مواد زیستی (اسکافولد) انجام می‌دهند که در نهایت منجر به تشکیل و رشد بافت جدید می‌شود. با وجود این، در مورد نوع سلول مورد استفاده و زیست‌مواد به کار رفته به طوری که بتواند موجب بازیابی عملکرد طبیعی و ترمیم بافت آسیب‌دیده به نحوی مطلوب و مؤثر شود، پرسش‌های بی‌شماری وجود دارد که پاسخ به آن‌ها نیازمند انجام مطالعات تجربی بیشتری است (۴،۶،۱۱).

طی سال‌های گذشته در دامپزشکی علاقه‌ی فزاینده‌ای برای فهم بیولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) به وجود آمده است. این علاقه ناشی از توانایی کاربرد این سلول‌ها خصوصاً در ترمیم زخم، مهندسی بافت و سایر زمینه‌های درمانی شامل جراحی ترمیمی می‌باشد. MSCs را می‌توان مستقیماً از اسپیره‌های مغزاستخوان، بافت چربی، بند ناف و بعضی بافت‌های دیگر استخراج نمود. با آنکه اخذ سلول‌های بنیادی از مغزاستخوان پیچیدگی‌های خاص خود را دارد و میزان محدودی سلول می‌توان از آن اخذ نمود ولی به عنوان بهترین منبع سلولی در این زمینه برگزیده شده است. این سلول‌ها در شرایط کشت مناسب و یا در بدن توانایی تمایز به بافت‌های متعددی از جمله استخوان، غضروف، عضله، بافت چربی و نیز تولید فاکتورهای رشد و سیتوکین‌های مشوق گسترش و تمایز سلولی را دارند (۴،۱۱،۱۲،۱۳).

سلول‌های بنیادی به تنوسیت را تحریک کند و نیز باعث تولید مقادیر بالای کلاژن شود.

مواد و روش کار

در این مطالعه تعداد ۱۰ سر خرگوش نر سفید نیوزلندی با وزن میانگین ۳ کیلوگرم انتخاب شد. حیوانات به مدت یک هفته قبل از شروع مطالعه در مرکز نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران نگهداری شدند تا استرس حمل و نقل از بین رفته و به محیط جدید عادت کنند. در طی این مدت و در طول کل زمان مطالعه، حیوانات در قفس‌های انفرادی نگهداری و با غذای پلت شده‌ی مخصوص خرگوش تغذیه شدند و دسترسی آزادانه به آب آشامیدنی داشتند. قبل از شروع مطالعه حیوانات تحت معاینه بالینی قرار گرفته و سلامت آن‌ها تأیید شد.

استخراج و کشت سلول‌های بنیادی: تحت بیپهوشی

عمومی با (۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن کتامین (Alfasan، هلند) و ۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن زایلازین (Interchemie، هلند)، به صورت داخل عضلانی حدود ۵ میلی‌لیتر از مغز استخوان هر خرگوش با استفاده از سوزن جمشیدی از کرسیت ایلوم تحت شرایط آسپتیک، در سرنگ حاوی ۷۰۰ واحد بر میلی لیتر هپارین (البرز دارو، ایران) مغز استخوان گرفته شد. نمونه اخذ شده در سرنگ وارد فالكون ۱۵ میلی لیتری استریل شد و هم حجم آن (نسبت یک به یک) محیط کشت DMEM دارای گلوکز بالا (۴/۵ گرم بر لیتر) (Gibco، انگلستان) اضافه شد. این محتویات به آرامی و در مجاورت دیواره فالكون، به نحوی که دو فاز مجزا (بالایی مغز استخوان و پایینی فایکول) ایجاد شود، وارد ۳ میلی لیتر محلول فایکول شد، سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دور ۴۰۰g سانتریفیوژ شد. سلول‌های تک‌هسته‌ای جدا شده و در دو مرحله بوسیله DMEM شستشو داده شدند. سپس رسوب حاصله همراه ۵ میلی لیتر محیط کشت که حاوی ۸۰ درصد محیط کشت DMEM، ۲۰ درصد سرم جنین گاو (FBS) (Gibco، انگلستان) و ۱ درصد آنتی بیوتیک (پنی سیلین ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر استریپتومایسین) بود، وارد فلاسک ۲۵ سانتی‌متر مربعی فیلتاردار شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با رطوبت ۹۸ درصد همراه ۵ درصد دی‌اکسید کربن در انکوباتور نگهداری شد. فلاسک‌های حاوی سلول و محیط کشت پس از انتقال به داخل انکوباتور روزانه زیر میکروسکوپ نوری معکوس بررسی شدند و محیط کشت هر ۳ روز یکبار تعویض شد. پس از گذشت یک هفته ۱۰ درصد به محیط

کشت DMEM افزوده شد و به تبع آن ۱۰ درصد از مقدار FBS کم شد و بعد از ۵ تا ۷ روز، سلول‌ها تشکیل کلونی دادند. زمانی که سلول‌ها ۹۰-۸۰ درصد کف فلاسک را پوشاندند، پاساژ اول سلول‌ها انجام شد و سپس پاساژ سلول‌ها به صورت سریالی ادامه یافت. از سلول‌های پاساژ سوم پس از شمارش سلول‌ها توسط لام نئوبار و اطمینان از زنده بودن سلول‌ها با رنگ آمیزی تریپان بلو، تعداد پنج میلیون سلول، مورد استفاده قرار گرفت.

روش تهیه PRP- Clot Releasate (PRCR): برای تهیه

PRCR تحت بیپهوشی عمومی (۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم کتامین و ۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم زایلازین، داخل عضلانی) و با استفاده از سرنگ ۱۰ میلی لیتری حاوی ۱ میلی لیتر سیترات سدیم (۰/۱ مول) حدود ۹-۷ میلی لیتر خون از شریان گوشه هر خرگوش اخذ گردید. سپس خون به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۴۰۰g سانتریفیوژ شده و لایه‌ی بالایی که PRP نامیده می‌شود، جدا شد. برای فعال‌سازی پلاکت‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۲/۲ مول کلرید کلسیم به هر میلی لیتر از PRP حاصل اضافه شده و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. ژل حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰g سانتریفیوژ شده و محلول حاصل (PRCR) که حاوی فاکتورهای رشد مترشح از پلاکت‌ها می‌باشد به روش آسپیراسیون جدا گردید. PRCR به مدت یک هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ۶ ماه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری است (۲۶).

کشت BM-MSCs به همراه PRCR: سلول‌های پاساژ

سوم BM-MSCs به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت DMEM حاوی ۲۰ درصد FBS قرار گرفتند، سپس این محیط با محیطی حاوی ۱۰ درصد FBS به اضافه‌ی ۱۰ درصد PRCR تعویض شده و کشت به مدت ۱۰ روز ادامه یافت (محیط کشت هر ۳ روز یکبار تعویض شد) (۲۶).

تأیید بنیادی بودن سلول‌های BM-MSCs استخراج و

کشت شده: روش فلوسایتومتری به‌عنوان یک روش مکمل و در عین حال مطمئن برای تأیید و شناسایی شاخص‌های سطحی سلولی مختص سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان خرگوش انجام شد. برای این منظور از سلول‌های پاساژ سوم جهت آنالیز فلوسایتومتری استفاده شد. مراحل آماده‌سازی سلول‌ها به شرح زیر انجام شد:

۱. شست‌وشو و جداسازی سلول‌های BM-MSCs از کف

فلاسک با استفاده از آنزیم تریپسین

آن ایزوپروپانول (۲۰- درجه سانتی گراد) اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد قرار داده شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت نمونه‌ها از فریزر خارج شدند و در شرایط ۱۵/۱۲۰۰۰g ۴ دقیقه درجه سانتیفریوژ شدند. در انتها رسوب سفید رنگ حاوی RNA ایجاد شد. ایزوپروپانول از داخل میکروتیوب‌ها خارج شد تا فقط رسوب بماند.

در مرحله‌ی بعد (مرحله شستشوی اتانول) اتانول ۷۰ درصد به رسوب اضافه شده و به مدت ۸ دقیقه در ۷۵۰۰g و ۴ درجه سانتیفریوژ شد. اتانول از داخل میکروتیوب‌ها خارج شده و این مرحله یک بار دیگر تکرار شد. پس از حذف اتانول از روی رسوب، میکروتیوب‌ها زیر هود قرار داده شدند تا رسوب کاملاً خشک شود.

سپس ۳۵ میکرولیتر آب DEPC به رسوب‌ها اضافه شد و به مدت سه دقیقه در بن‌ماری ۵۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت تا رسوب به طور کامل حل شود. ۲ میکرولیتر از محلول حاصل جهت کنترل کمی RNA برای نانودراپ فرستاده شد و مابقی مورد استفاده قرار گرفت.

در مرحله‌ی بعد ۱۵ میکرولیتر از محلول حاصل با ۱ میکرولیتر آب، ۲ میکرولیتر بافر و ۲ میکرولیتر DNase مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در دستگاه ترموسایکلر PCR قرار گرفت. سپس به این محلول ۲ میکرولیتر EDTA اضافه شده و مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه با دمای ۶۵ درجه در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت. محلول حاصل تا زمان ساخت cDNA در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

غلظت RNA استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ قرائت شد و نسبت‌های ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ در محدوده نرمال قرار داشت.

مراحل ساخت cDNA: ابتدا ۵ میکرولیتر از RNA هر نمونه به داخل میکروتیوب‌های مخصوص PCR ریخته شده و ۱ میکرولیتر از Random Hexamer Primer (سیناژن، ایران) به هر نمونه اضافه شد. سپس میکروتیوب‌ها داخل دستگاه PCR قرار داده شده و در دو مرحله تحت گرمایش قرار گرفتند: مرحله اول به مدت ۵ دقیقه و با دمای ۶۵ درجه سانتی گراد و مرحله دوم به مدت ۱ دقیقه و با دمای ۵ درجه سانتی گراد.

در گام بعدی ترکیب جدول ۲ به میزان ۱۴ میکرولیتر برای هر نمونه ساخته شد و به هر کدام از نمونه‌ها اضافه شد به طوری که حجم نمونه‌ها به ۲۰ میکرولیتر رسید.

۲. شمارش سلول‌ها (۱۰^۶ سلول در حجم ۱ میلی لیتر)

۳. سانتیفریوژ در دور ۴۰۰g به مدت ۵ دقیقه

۴. حذف مایع فوقانی و افزودن ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۱ درصد سرم آلبومین گاوی به مدت ۱-۰/۵ ساعت برای خنثی کردن گیرنده‌های غیراختصاصی

۵. حذف محلول فوقانی (سرم آلبومین گاوی)

۶. افزودن ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت و آنتی‌بادی کنژوگه و انکوبه کردن سلول‌ها برای یک ساعت در دمای اتاق به دور از نور

۷. سه بار شستشو با PBS (سانتریفیوژ با دور ۴۰۰g به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد)

۸. حذف مایع PBS فوقانی و افزودن ۱۰۰ میکرولیتر PBS تازه

تمام مراحل برای پانل آنتی بادی‌های ایزوتیپ کنترل با همان غلظت آنتی بادی‌های اصلی انجام شد.

پس از انجام مراحل فوق، نمونه‌ها در لوله‌های مخصوص فلوسایتومتری ریخته شد و سپس توسط دستگاه فلوسایتومتری FACSCanto II (BD Bioscience, USA) قرائت و توسط نرم‌افزار flowjo نسخه ۷.۶.۱ آنالیز شد.

تأیید تمایز سلول‌های تمایز یافته: سلول‌های تمایز یافته از نظر ظاهری بوسیله‌ی میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفتند و نیز با روش real-time PCR از نظر بیان ژن‌های Scx, Tnmd, Col I و تناسین C بررسی شدند.

ارزیابی با روش Quantitative real-time PCR

(استخراج RNA): به همه‌ی سلول‌های مورد آزمایش ۱ میلی‌لیتر، RNX plus (سیناژن، ایران) اضافه شده و کاملاً مخلوط شد. مخلوط حاصل به مدت پنج دقیقه در دمای محیط قرار گرفت. سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم به نمونه‌ها اضافه شده و به مدت پنج دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد قرار گرفت.

در مرحله بعد نمونه‌ها در شرایط ۱۵/۱۲۰۰۰g ۴ دقیقه/۴ درجه سانتیفریوژ شدند. بعد از اتمام سانتیفریوژ در هر میکروتیوب سه فاز تشکیل شد؛ فاز روایی که حاوی RNA، فاز وسط که حاوی DNA و فاز زیرین که حاوی پروتئین و لیپید بود.

سپس فاز روایی هر نمونه به آرامی به میکروتیوب دیگری انتقال داده شد و هم‌حجم آن کلروفرم به آن اضافه شد. این مخلوط مجدداً با شرایط قبلی سانتیفریوژ شد. پس از اتمام سانتیفریوژ دو فاز تشکیل شد که فاز بالایی جدا شده و هم‌حجم

برای این کار همانند تست cDNA ابتدا واکنش Real-Time PCR مطابق جدول ۴ برای هر نمونه به طور جداگانه داخل استریپ‌های مخصوص به دور از نور و در محیط تاریک تهیه شد به طوری که حجم نهایی برای هر نمونه ۱۰ میکرولیتر بود. سپس استریپ‌ها داخل دستگاه Rotor-Gene Q قرار داده شده و براساس برنامه‌ی داده شده اجازه‌ی آنالیز داده‌ها داده شد.

آنالیز گراف‌های رسم‌شده توسط دستگاه Real-Time PCR: بعد از قرار دادن نمونه‌ها در دستگاه و آنالیز آن‌ها، دستگاه گراف‌هایی را ارائه داد که این گراف‌ها به روش زیر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند:

- تعیین مقدار نسبی بیان ژن با استفاده از روش C_T (Threshold cycle) مقایسه‌ای

- اعداد بدست‌آمده توسط نرم‌افزار Excel آنالیز شدند و از ژن GAPDH برای نرمال کردن داده‌ها استفاده شد: بدین‌صورت که ابتدا میزان C_T ژن مورد نظر در نمونه‌های مختلف از میزان C_T ژن GAPDH کاسته شد. عدد حاصله تحت عنوان ΔC_T نام‌داشت.

$C_T(\text{Target Gene}) - C_T(\text{GAPDH}) = \Delta C_T$

سپس ΔC_T نمونه کنترل از ΔC_T تمامی نمونه‌ها (نمونه‌های تیمار شده) کاسته شد، عدد حاصله تحت عنوان $\Delta \Delta C_T$ نام گرفت.

$\Delta C_T(\text{Control Sample}) - \Delta C_T(\text{Treated Sample}) = \Delta \Delta C_T$

در مرحله بعد تغییرات میزان بیان ژن مورد نظر در نمونه‌های مختلف به شکل زیر محاسبه شد:

$\text{Relative Fold Change in Gene Expression} = 2^{-\Delta \Delta C_T}$

روش تحلیل آماری داده‌ها: داده‌های بدست‌آمده از محاسبه‌ی بیان ژن‌ها در نرم‌افزار spss نسخه ۲۳ بوسیله‌ی آزمون t زوجی مورد بررسی قرار گرفت و نمودار میزان بیان ژن‌ها در گروه‌های مختلف در نرم‌افزار Excel ترسیم شد.

سپس نمونه‌ها با برنامه‌ی زیر داخل دستگاه PCR قرار داده شدند:

مرحله اول ۵ دقیقه با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، مرحله دوم ۶۰ دقیقه با دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد، مرحله سوم ۵ دقیقه با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، مرحله چهارم ۱ دقیقه با دمای ۵ درجه سانتی‌گراد در انتها نمونه‌ها از دستگاه خارج شدند و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

طراحی و آماده‌سازی پرایمرها: تمامی پرایمرها توسط سایت NCBI-BLAST بررسی و سفارش‌دهی و خریداری شدند. توالی‌های پرایمرها برای هر ژن در جدول ۳ بیان شده است. تمامی پرایمرها در غلظت ۱۰ پیکومول در میکرولیتر برای واکنش PCR آماده سازی شدند.

روش تست cDNA و انجام Real-Time PCR: برای بررسی کیفیت cDNA از ژن GAPDH که یک ژن House Keeping (کنترل داخلی) است، استفاده شد.

ابتدا cDNAهای ساخته شده از فریزر خارج شدند و بعد از ذوب شدن در دمای محیط به نسبت ۱ به ۱ با آب مقطر استریل رقیق شدند. سپس واکنش Real-Time PCR مطابق جدول ۴ برای هر نمونه به دور از نور و در محیط تاریک تهیه شد و به داخل استریپ‌های مخصوص دستگاه Real-Time PCR ریخته شد به طوری که حجم نهایی برای هر نمونه به ۱۰ میکرولیتر رسید.

سپس استریپ‌ها داخل دستگاه Rotor-Gene Q قرار داده شدند و براساس برنامه‌ای که به دستگاه داده شد آنالیز شدند.

پس از تأیید میزان C_T نمونه‌ها توسط ژن GAPDH، میزان بیان ژن‌های Tnmd, Scx, Tnc و Col I، تمامی نمونه‌ها ارزیابی شد.

جدول ۱. مشخصات آنتی‌بادی‌های استفاده شده در فلوسایتومتري.

غلظت استفاده شده	نوع آنتی‌بادی	نام آنتی‌بادی
۱ میکروگرم به ازای هریک میلیون سلول	PE-conjugated anti-mouse	CD45 (Biolegend, USA)
۱ میکروگرم به ازای هریک میلیون سلول	PE-conjugated anti-human	CD34 (Abcam, UK)
۱ میکروگرم به ازای هریک میلیون سلول	PE-conjugated anti-mouse	CD90 (eBioscience, USA)
۱ میکروگرم به ازای هریک میلیون سلول	PE-conjugated anti-human	CD29 (Abcam, UK)

جدول ۲. آماده‌سازی واکنش سنتز cDNA برای یک نمونه.

میزان (میکرولیتر)	ماده
۴	5X Reaction Buffer (Thermo Scientific, USA)
۰/۲۵	Ribonuclease Inhibitor (Vivantis, Malaysia)
۲	dNTP
۰/۵	Reverse Transcriptase
۷/۲۵	Distilled Water

جدول ۳. توالی پرایمرهای مورد استفاده در qRT-PCR.

توالی ۵'	نام ژن
F: ATGGCCTCCAAGGAGTAAGA R: CTGGGATGGAACTGTGAAGAG	GAPDH
F: CCCAACCAAGGATGCACTAT R: CTTGGCCTTGGAGCTCTTATAC	Col I
F: CAGAAGCCTTGGCCATGTG R: GCACTCTCTCCCCTGTGTAGGA	TnC
F: GTG GTC CCA CAA GTG AAG GT R: GTC TTC CTC GCT TGC TTG TC	Tnmd
F: CAGCGGCACACGGCGAAC R: CGTTGCCAGGTGCGAGATG	Scx

جدول ۴. تهیه واکنش Real-Time PCR برای یک نمونه.

میزان (میکرولیتر)	ماده
۵	Master mix Syber green (Cinnagen, Iran)
۱	Forward Primer هر ژن
۱	Reverse Primer هر ژن
۲	Distilled water
۱	cDNA هر نمونه

جدول ۵. مقایسه ΔCt ژن‌های مورد بررسی نسبت به ژن داخلی GAPDH در سلول‌های دو گروه.

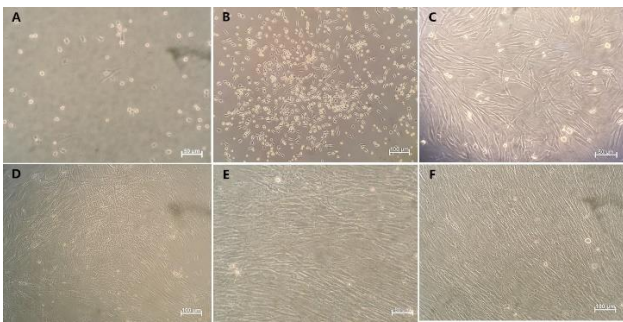
ژن مورد بررسی	ΔCt سلول‌های بنیادی (Mean±SE)	ΔCt سلول‌های تمایز یافته (Mean±SE)	سطح معنی داری
Sex	۸/۵۲±۰/۸۸	۶/۵±۱/۴۰	۰/۰۴۴
Tnmd	۹/۸۵±۱/۳۰	۶/۰۸±۱/۰۹	۰/۰۲۸
Tn-C	۹±۰/۸۲	۴/۸۶±۱/۷۳	۰/۰۳۸
Col I	۵/۱۳±۰/۳۰	۳/۱۹±۰/۵۲	۰/۰۴۱

نتایج

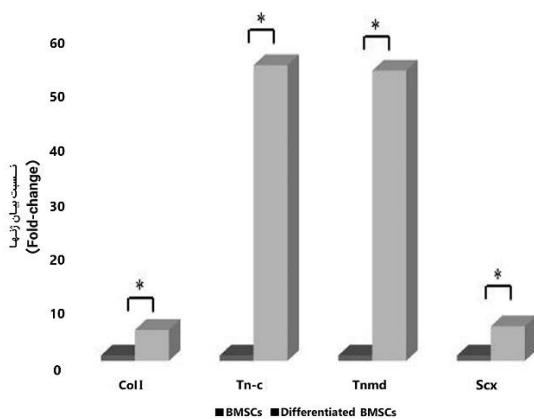
نتایج سیتومورفولوژیک: سلول‌هایی که از مغز استخوان جدا می‌شوند ابتدا کروی شکل و همراه با سلول‌ها و اجزای دیگر مغز استخوان هستند (مانند سلول‌های هماتوپویتیک، گلبول‌های قرمز، سلول‌های چربی و غیره). BM-MSCs به دلیل دارا بودن خاصیت چسبندگی به کف فلاسک چسبیده و با تعویض محیط کشت و پاساژ

دادن سلول‌ها درصد خلوص آن‌ها بالا رفته و سایر سلول‌ها حذف شدند.

در مورفولوژی سلول‌ها با گذشت زمان تغییرات محسوس مشاهده شد. سلول‌ها ابتدا زائده‌دار و پراکنده بودند و به تدریج تعداد بیشتری از آن‌ها ظاهری شبه فیبروبلاستی و دوکی شکل داشتند، به طوری که پس از سه پاساژ متوالی سلول‌ها بیشتر به صورت دوکی شکل و تعدادی نیز با ظاهر مثلی دیده می‌شدند که زوئادی را



تصویر ۱. A سلول‌های بنیادی خرگوش ۴۸ ساعت پس از کشت، B سلول‌های بنیادی ۷ روز پس از کشت، C و D سلول‌های بنیادی پس از سه پاساژ متوالی، E و F سلول‌های تمایز یافته.



نمودار ۱. نسبت بیان ژن‌ها. * اختلاف معنی‌دار.

Fackelman در سال ۱۹۷۳، بطور کامل شرایط تورم تاندون و التیام آن را شرح داده و عنوان نمود که در شرایط تجربی و بدون مصرف دارو، حداقل شش ماه زمان برای التیام تاندون آسیب دیده مورد نیاز می‌باشد (۹).

یک نکته مهم در التیام و بازسازی بافت، وجود سلول‌های مناسب در محل جراحت می‌باشد. هنگامی که جراحی در یک اندام یا ارگان رخ می‌دهد سیگنال‌هایی از سلول‌های آسیب دیده به خون رها شده که باعث جذب سلول‌های بنیادی به آن محل جهت التیام آن می‌شود. حضور این سلول‌ها بخاطر پتانسیل تکثیر آن‌ها، سیگنال‌های سلول به سلول، تولید بیومولکول‌ها و ایجاد ماتریکس خارج سلولی، مهم می‌باشد. سلول‌های بنیادی پس از رسیدن به موضع به سلول‌های آن بافت تبدیل شده و التیام آغاز می‌شود. بنابراین به نظر می‌رسد که حضور سلول‌ها در محل التیام برای ایجاد بافت طبیعی لازم باشد. این نظریه را می‌توان به التیام تاندون‌ها نیز نسبت داد (۱۷).

در سطح سلول دارا بودند. این سلول‌ها با الگوی گردابی و در جهات مختلف کنار هم قرار گرفته بودند. هسته‌ها بزرگ و بیضوی شکل و حاوی ۲-۴ هستک بودند. سلول‌های تحت درمان قرار گرفته با PRCR از نظر ظاهری با BM-MSCs پاساژ سوم تفاوت داشتند. آن‌ها کشیده‌تر و باریک‌تر شده و زوائد بسیار کمتری داشتند، در یک راستا جهت‌گیری کرده و ساختار مترامی را نشان می‌دادند. هسته‌ها کاملاً کشیده و حاوی هستک بودند.

نتایج فلوسایتومتری BM-MSCs: اطلاعات بدست آمده از فلوسایتومتری توسط نرم افزار Flowjo تجزیه و تحلیل شد و به صورت هیستوگرام نمایش داده شدند. در هیستوگرام محور Y نشان دهنده تعداد سلول‌های شمارش شده و محور X شدت بیان شاخص سلولی را به صورت لگاریتمی نشان می‌دهد. نتایج فلوسایتومتری سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان نشان داد که این سلول‌ها شاخص‌های سطحی سلولی CD29 (۹۲ درصد) و CD90 (۸۹ درصد) را بیان کردند. CD45 (نشانه سلول‌های هماتوپوئیتیک) و CD34 (نشانه سلول‌های اندوتلیال) ۱۰۰ درصد منفی بودند (۱۹).

نتایج Quantitative real-time PCR: نتایج حاصل از منحنی‌های بدست آمده از ارزیابی Real-Time PCR همانطور که قبلاً توضیح داده شد مورد بررسی قرار گرفته و مقادیر بدست آمده مورد آنالیز آماری قرار گرفتند. بررسی اختلاف بیان ژن‌های Scx، Tnmd، کلاژن تیپ I و تناسین C در سلول‌های تمایز یافته در مقایسه با سلول‌های بنیادی نشان داد که میزان بیان همه‌ی آن‌ها به صورت معنی‌داری پس از درمان سلول‌ها با PRCR افزایش یافته است. جدول ۵ ΔCt ژن‌های مورد بررسی را نسبت به ژن داخلی GAPDH در سلول‌های هر دو گروه مورد مقایسه قرار می‌دهد. در نمودار ۱ نیز نسبت بیان ژن نهایی بدست آمده مورد مقایسه قرار گرفته است.

بحث

پروسه‌ی ترمیم و بازسازی جراحات لیگامنت‌ها و تاندون‌ها در بدن بسیار ضعیف بوده و به کندی انجام می‌شود. این بدان معناست که تاندون-عضو تعیین کننده سیستم اسکلتی عضلانی در صورت آسیب دیدن از نظر بیولوژیک و بیومکانیکی به حالت اولیه‌ی خود باز نمی‌گردد. بنابراین استفاده از یک راهکار درمانی که بتواند باعث تسریع ترمیم، افزایش بازگشت به فعالیت‌های نرمال و کاهش ایجاد مجدد جراحت در ناحیه شود بسیار مفید خواهد بود.

می‌شود و در تکثیر آن‌ها و ساختار ماتریکس نقش تنظیم‌کنندگی دارد. بنابراین می‌توان از این مارکرها جهت تست روش‌های تمایز دادن سلول‌های بنیادی به تنوسیت‌ها استفاده کرد. در مطالعه‌ی آن‌ها سلول‌های تمایز یافته بوسیله‌ی *q Real time-PCR* از نظر بیان ژن‌های *Scx*، *Tnmd* و *Col I* مورد ارزیابی قرار گرفتند و بیان آن‌ها به صورت معنی‌داری از سلول‌های تمایز نیافته بیشتر بود. در این بررسی اسکافولدهای حاوی این سلول‌ها سپس در یک نقیصه‌ی کالکانفال در رت مورد استفاده قرار گرفت و پس از سه هفته بافت ترمیم یافته نیز در گروه حاوی سلول‌های تمایز یافته مقادیر بالاتری از ژن‌های مذکور را بیان داشت (۱۳). نتایج مطالعه‌ی حاضر با این بررسی همسو بوده و مقادیر اندازه‌گیری شده برای *Scx*، *Tnmd* و *Col I* در سلول‌های تمایز یافته افزایش پیدا کرد.

در مطالعه‌ای که توسط *de Mos* و همکاران در سال ۲۰۰۸ انجام شد استفاده از *PRCR* باعث تحریک تزاید سلول‌های تنوسیت انسان و افزایش تولید کلاژن توسط سلول‌ها شد (۸). *Wang* و *Zhang* در سال ۲۰۱۰ به استفاده از *PRP* در درمان تاندون‌های آسیب دیده اشاره کردند و توضیح دادند که *PRCR* باعث تمایز سلول‌ها به تنوسیت می‌شود. آن‌ها دریافتند که ژن‌های مربوط به تنوسیت‌ها (کلاژن تیپ I و III و تناسین C) در مقادیر بالایی در سلول‌های تمایز یافته بیان شده‌اند در حالی که ژن‌های مرتبط با سلول‌های غیرتنوسیتی (*PPAR γ* ، *SOX-9* و *Runx2*) یا اصلاً بیان نشده و یا مقادیر بسیار ناچیزی داشتند (۲۶). در مطالعه‌ی حاضر نیز از اثر *PRCR* برای تمایز سلول‌های بنیادی مشتق شده از مغزاستخوان به تنوسیت‌ها استفاده شده و افزایش بیان ژن‌های *Scx*، *Tnmd*، *Col I* و تناسین C و همچنین تغییرات مشهود ظاهری سلول‌ها نشانگر تمایز سلول‌های بنیادی به سمت تنوسیتی شدن بود.

اثر تحریک‌کننده‌ی *PRP* در ترمیم و درمان جراحات، مربوط به فاکتورهای رشد موجود در گرانول‌های α پلاکت‌ها می‌باشد که پس از فعال شدن پلاکت از آن ترشح می‌شود. کاربرد *PRCR* (که ترکیبی از فاکتورهای رشد مترشحه از لخته‌ی *PRP* است) تمایز سلول‌های بنیادی به تنوسیت را تحریک کرده و باعث افزایش تکثیر تنوسیت‌ها و تولید مقادیر بالای کلاژن می‌شود. این موضوع قابل توجه است که سلول‌ها در مجاورت *PRCR* به سلول‌های غیر تنوسیتی (شامل استنوسیت، ادیپوسیت و کندروسیت) تبدیل نمی‌شوند. تبدیل شدن به سلول‌های غیرتنوسیتی مذکور منجر به تولید بافت‌های چربی، استخوانی

تعداد زیادی از اسکافولدها و سلول‌ها از انواع مختلف در مهندسی بافت برای ترمیم تاندون‌های آسیب دیده استفاده شده‌اند. فیبروبلاست‌ها و سلول‌های بنیادی مزانشیمی بیشترین کاربرد را در این زمینه داشته‌اند.

در مطالعات گذشته رعایت فاصله که استفاده از *PRP* باعث بهبود پروسه ترمیم بافتی از جمله لیگامنت‌ها و تاندون‌ها می‌شود (۱۴). علاوه بر این مطالعه و بررسی کشت‌های سلولی نشان داده است که تحت درمان قراردادن سلول‌ها با *PRCR* باعث تمایز به تنوسیت و تزاید آن‌ها و تولید کلاژن می‌شود (۲،۸).

در مطالعه‌ی حاضر استفاده از *PRCR* باعث تمایز سلول‌های بنیادی به تنوسیت‌ها شد و این موضوع با توجه به تغییرات ایجاد شده در سایز و شکل سلول‌ها به سمت فنوتیپ‌های تنوسیتی و بیان ژن‌های مرتبط با تنوسیت‌ها اثبات شد.

در مطالعات بسیاری از روش‌های مختلف برای تمایز سلول‌های بنیادی به تنوسیت‌ها استفاده شده است. *Wang* و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۵ ژن *BMP-12* را از طریق الکتروپوراسیون به *BM-MSCs* رزوس منتقل نموده و سپس فنوتیپ سلول‌های حاصل را با مشاهده‌ی مورفولوژیک و آزمایشات بیولوژیکی مولکولی مورد مطالعه قرار دادند. پس از انتقال ژن، سلول‌ها کشیده‌تر شده و به صورت شبکه‌ای قرار گرفتند و تعداد ارگانل‌های داخل سلولی در آن‌ها نسبت به *MSCs* مادری بیشتر بود. همچنین *RT-PCR* سلول‌های تمایز یافته نشان داد که ژن‌های *BMP12* و *Col I* در این سلول‌ها بیان شده است. نقطه‌ی مشترک این مطالعه و مطالعه حاضر افزایش مقدار *Col I* در سلول‌های تمایز یافته و نیز تغییرات ظاهری سلول‌ها بعد از تمایز به سمت تنوسیتی شدن بوده است (۲۳). در بعضی از مطالعات نیز از روش‌های فیزیکی برای تمایز سلول‌های بنیادی به تنوسیت‌ها استفاده شده است. این روش‌ها شامل کشت سلولی در محیط‌های سه‌بعدی و دینامیک و یا تحریک سلول‌ها به صورت سیکلیک و یا کشش‌های مکانیکی بوده است (۱،۱۲،۲۴،۲۵).

Lee و همکاران در سال ۲۰۱۱ اثر مجاورت *BMP-12* را بر سلول‌های بنیادی رت بررسی نمودند. آن‌ها *Scx* و *Tnmd* را به عنوان ژن‌هایی که عمدتاً در سلول‌های تاندونی بیان شده و قابل اعتمادترین مارکرها‌ی فنوتیپی در بررسی رده‌های سلولی تاندونی می‌باشند، ذکر نمودند. در حالی که *Scx* یک تنظیم‌کننده‌ی رونویسی است و اول در سلول‌های پیش‌ساز تاندون بیان می‌شود، *Tnmd* یک پروتئین غشایی است که در تنوسیت‌های بالغ‌تر بیان

با PRCR باعث بیان شدن ژن‌های مربوط به تاندون و تمایز سلول‌های بنیادی به تنوسیت‌ها می‌شود.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از نتایج پایان‌نامه دکترای تخصصی می‌باشد و نویسندگان بر خود لازم می‌دانند که از معاونت محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به خاطر تأمین بخشی از هزینه‌های مالی پایان‌نامه تشکر و قدردانی بعمل آورند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

کلسیفیه و غضروفی در اغلب ضایعات مزمن تاندونی می‌شود که در جهت ترمیم ساختار و عملکرد تاندون بسیار مضر خواهد بود. در مطالعه حاضر نیز از PRCR برای القای تمایز تنوسیتی استفاده شد تا از همه مزایای آن نظیر در دسترس بودن و هزینه کمتر بهره برده شود. استفاده از این روش می‌تواند پیچیدگی‌هایی که در سایر روش‌های تمایز وجود دارد نظیر استفاده از مقادیر زیاد فاکتورهای رشد با هزینه‌های بالا، استفاده از وکتورهای حاوی ژن یا محیط‌های کشت فیزیکی پیچیده و چند بعدی را برطرف کند.

در مجموع با توجه به یافته‌های مطالعه‌ی حاضر می‌توان این‌گونه نتیجه گرفت که تحت درمان قرار دادن سلول‌های بنیادی

References

- Altman, G.H., Horan, R.L., Martin, I., Farhadi, J., Stark, P.R.H., Volloch, V., Richmond, J.C., Novakovic, G.V., Kaplan, D.L. (2002). Cell differentiation by mechanical stress. *FASEB J*, 16(2), 270-272. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0656fje>
- Anitua, E., Andía, I., Sanchez, M., Azofra, J., del Mar Zaldueño, M., de la Fuente, M., Nurden, A.T. (2005). Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *J Orthop Res*, 23(2), 281-286. <https://doi.org/10.1016/j.orthres.2004.08.015>
- Anitua, E., Andia, I., Ardanza, B., Nurden, P., Nurden, A.T. (2004). Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost*, 91(1), 4-15. <https://doi.org/10.1160/th03-07-0440>
- Awad, H.A., Butler, D.L., Boivin, G.P., Smith, F.N.L., Malaviya, P., Huijbregtse, B., Caplan, A.I. (1999). Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue Eng*, 5(3), 267-277. <https://doi.org/10.1089/ten.1999.5.267>
- Chang, J., Most, D., Stelnicki, E., Siebert, J.W., Longaker, M.T., Hui, K., Lineaweaver, W.C. (1997). Gene expression of transforming growth factor beta-1 in rabbit zone II flexor tendon wound healing: evidence for dual mechanisms of repair. *Plast Reconstr Surg*, 100(4), 937-944. <https://doi.org/10.1097/00006534-199709001-00016>
- Chong, A.K.S., Ang, A.D., Goh, J.C.H., Hui, J.H.P., Lim, A.Y.T., Lee, E.H., Lim, B.H. (2007). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells influence early tendon-healing in a rabbit Achilles tendon model. *J Bone Joint Surg Am*, 89(1), 74-81. <https://doi.org/10.2106/jbjs.e.01396>
- Dahlgren, L.A., Mohammed, H.O., Nixon, A.J. (2005). Temporal expression of growth factors and matrix molecules in healing tendon lesions. *J Orthop Res*, 23(1), 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.orthres.2004.05.007>
- de Mos, M., van der Windt, A.E., Jahr, H., van Schie, H.T., Weinans, H., Verhaar, J.A., van Osch, G.J. (2008). Can platelet-rich plasma enhance tendon repair? A cell culture study. *Am J Sports Med*, 36(6), 1171-1178. <https://doi.org/10.1177/0363546508314430>
- Fackelman, G. (1973). The nature of tendon damage and its repair. *Equine Vet J*, 5(4), 141-149. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1973.tb03214.x>
- Hsu, C., Chang, J. (2004). Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing. *J Hand Surg Am*, 29(4), 551-563. <https://doi.org/10.1016/j.jhssa.2004.04.020>
- Kryger, G.S., Chong, A.K.S., Costa, M., Pham, H., Bates, S.J., Chang, J. (2007). A comparison of tenocytes and mesenchymal stem cells for use in flexor tendon tissue engineering. *J Hand Surg Am*, 32(5), 597-605. <https://doi.org/10.1016/j.jhssa.2007.02.018>
- Kuo, C.K., Tuan, R.S. (2008). Mechanoactive tenogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*, 14(10), 1615-1627. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2006.0415>
- Lee, J.Y., Zhou, Z., Taub, P.J., Ramcharan, M., Li, Y., Akinbiyi, T., Maharam, E.R., Leong, D.J., Laudier, D.M., Ruike, T., Torina, P.J., Zaidi, M., Majeska, R.J., Schaffler, M.B., Flatow, E.L., Sun, H.B. (2011). BMP-12 treatment of adult mesenchymal stem cells in vitro augments tendon-like tissue formation and defect repair in vivo. *PLoS ONE*, 6(3), 17-31. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017531>
- Marx, R.E. (2004). Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg*, 62(4), 489-496. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2003.12.003>
- Molloy, T., Wang, Y., Murrell, G. (2003). The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med*, 33(5), 381-394. <https://doi.org/10.2165/00007256-200333050-00004>
- Murray, S.J., Santangelo, K.S., Bertone, A.L. (2010). Evaluation of early cellular influences of bone morphogenetic proteins 12 and 2 on equine superficial digital flexor tenocytes and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Am J Vet Res*, 71, 103-114. <https://doi.org/10.2460/ajvr.71.1.103>
- Smith, R.K. (2006). Stem cell technology in equine tendon and ligament injuries. *Vet Rec*, 158(4), 140-140. <https://doi.org/10.1136/vr.158.4.140-a>
- Smith, R.K.W. (2008). Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy. *Disabil Rehabil*, 30(20-22), 1752-1758. <https://doi.org/10.1080/09638280701788241>

19. Tan, S.L., Ahmad Ts Fau – Selvaratnam, L., Selvaratnam L Fau – Kamarul, T., Kamarul, T. (2013). Isolation, characterization and the multi-lineage differentiation potential of rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Anat*, 222(4), 437-450. <https://doi.org/10.1111/joa.12032>
20. Tsubone, T., Moran, S.L., Amadio, P.C., Zhao, C., An, K.N. (2004). Expression of growth factors in canine flexor tendon after laceration in vivo. *Ann Plast Surg*, 53(4), 393-397. <https://doi.org/10.1097/01.sap.0000125501.72773.01>
21. Violini, S., Ramelli, P., Pisani, L.F., Gorni, C., Mariani, P. (2009). Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12. *BMC Cell Biol*, 10, 29-44. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-10-29>
22. Wang, J.H. (2006). Mechanobiology of tendon. *J Biomech*, 39(9), 1563-1582. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2005.05.011>
23. Wang, Q.W., Chen, Z.L., Piao, Y.J. (2005). Mesenchymal stem cells differentiate into tenocytes by bone morphogenetic protein (BMP) 12 gene transfer. *J Biosci Bioeng*, 100(4), 418-422. <https://doi.org/10.1263/jbb.100.418>
24. Yin, Z., Chen, X., Chen, J.L., Shen, W.L., Nguyen, T.M.H., Gao, L., Ouyang, H.W. (2010). The regulation of tendon stem cell differentiation by the alignment of nanofibers. *Biomaterials*, 31, 2163-2175. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.083>
25. Zhang, J., Wang, J.H.C. (2010). Mechanobiological response of tendon stem cells: Implications of tendon homeostasis and pathogenesis of tendinopathy. *J Orthop Res*, 28(5), 639-643. <https://doi.org/10.1002/jor.21046>
26. Zhang, J., Wang, J.H.C. (2010). Platelet-rich plasma releasate promotes differentiation of tendon stem cells into active tenocytes. *Am J Sports Med*, 38, 2477-2486. <https://doi.org/10.1177/0363546510376750>



Evaluation of the Effects of PRCR on Differentiation of Autologous Mesenchymal Stem Cells into Tenocytes in Rabbit

MersedehSadat Hossein Boroujerdi¹, Mohammad Mehdi Dehghan^{1, 2}, Fereydoun Saberi Afshar¹, Keyvan Majidzadeh-A³, Seyed Hossein Mardjanmehr⁴, Artimes Yahyaei¹, Masoumeh Jabarifakhr²

¹ Department of Surgery and Radiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

² Institute of Biomedical Research, University of Tehran, Tehran, Iran

³ Motamed Institute, Jahade Daneshgahi, Tehran, Iran

⁴ Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

doi [10.22059/jvr.2020.250664.2754](https://doi.org/10.22059/jvr.2020.250664.2754)

Received: 16 May 2020, Accepted: 15 July 2020

Abstract

BACKGROUND: Tendon repair requires a sequence of medical procedures such as physical modalities, tissue engineering, growth factors, and mechanical stimulation. Previous studies have shown that using of PRP is effective in tendon healing.

OBJECTIVES: The purpose of this study was to investigate the differentiation effect of PRCR on mesenchymal stem cells extracted from rabbits' bone marrow.

METHODS: Mesenchymal stem cells were extracted from bone marrow (BM-MSCs) of 10 New Zealand white rabbits. The cells were then examined both flow cytometrically and morphologically. Afterwards, the cells received treatment using PRCR. Finally, the markers indicating tenocytes were analyzed through the method of Real-Time PCR.

RESULTS: Investigating the differences between differentiated cells and undifferentiated stem cells (BM-MSCs) regarding the expression of four genes including Scx, Tnmd, Col I, and Tenascin C revealed that the level of expression in all the four genes was significantly enhanced after receiving PRCR- mediated treatment.

CONCLUSIONS: BM-MSCs treated with PRCR express high levels of tendon-related genes and undergo differentiation into tenocyte-like cells.

Keywords: BM-MSCS, PRCR, Differentiation, Real-Time PCR, Rabbit

Copyright © 2020. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution- 4.0 International License which permits Share, copy and redistribution of the material in any medium or format or adapt, remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

Corresponding author's email: mdehghan@ut.ac.ir Tel/Fax: 021-61117039/021-66438328

How to cite this article:

Hossein Boroujerdi, M., Dehghan, M., Saberi Afshar, F., Majidzadeh-A, K., Mardjanmehr, S., Yahyaei, A., Jabarifakhr, M. (2021). Evaluation of the Effects of PRCR on Differentiation of Autologous Mesenchymal Stem Cells into Tenocytes in Rabbit. *J Vet Res*, 75(4), 498-508. <https://doi.org/10.22059/jvr.2020.250664.2754>

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Specifications of Antibodies Used in Flowcytometry.

Table 2. cDNA Synthesis Reaction for Each Specimen.

Table 3. Sequences of the Primers Used in qRT-PCR.

Table 4. Real-Time PCR Reaction for Each Specimen.

Table 5. Genes' Δ Ct in Comparison with GAPDH.

Figure 1. Rabbit Stem Cells After 48 hours, B Stem Cells After 7 days, C&D, Stem Cells After Three Passages, E&F Differentiated Cells.

Graph 1. Relative Gene Expression. *means significant difference.