بررسی اثر پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) بر تمایز استئوبلاست و استئوکلاست در حضور داربست سه‌بعدی پلی‌کاپرولاکتون/هیدروکسی آپاتیت: مطالعه آزمایشگاهی

هادی مختاری [۱]، آزاده منتصری [۲]، محمدعلی مجددی [۳]، سولماز ملکی دیزج [٤]

تاریخ دریافت ۱۳۹۹/۰٤/۰۱ تاریخ پذیرش ۱۳۹۹/۰۸/۰٦

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: وجود فاکتورهای رشد تأثیر بسزایی در بهبود روندترمیم دارد و نیز درصد نسبتاً بالایی از دندان‌هایی که تحت درمان اندودنتیک قرار گرفته‌اند در آینده نیازمند درمان‌های رتروگرید خواهند بود، هدف از این مطالعه بررسی اثر پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) بر تمایز استئوبلاست و استئوکلاست در حضور داربست سه‌بعدی است.

مواد و روش کار: در این مطالعه آزمایشگاهی، ابتدا سلول‌های بنیادی مزانشیمال از ژله وارتون بند ناف جنین انسانی جداسازی شده و در دو گروه بررسی تمایز به استئوبلاست و تمایز به استئوکلاست قرار داده شدند. هر گروه به دو زیرگروه کشت در حضور PRP و بدون حضور PRP تقسیم شدند. تمام نمونه‌ها بر روی اسکافولد پلیمری از جنس پلی‌کاپرولاکتون/هیدروکسی‌آپاتیت (PCL/HA) کشت داده شدند. به‌منظور بررسی تمایز به استئوبلاست از محیط کشت عقاب اصلاح‌شده دالبکو (DMEM) حاوی ۱۰-۷ مولار دگزامتازون، ۱۰ میلی‌مولار از ماده گلیسروفسفات و ۵۰ میلی‌مولار آسکوربیک اسید استفاده شد. در گروه تمایز به استئوکلاست نیز از لیگاند فعال‌کننده گیرنده فاکتور هسته‌ای کاپای B (RANKL) و فاکتور تحریک‌کننده تشکیل کلونی (CSF) استفاده شد. در دو زیرگروه حاوی PRP علاوه بر ترکیبات تمایز دهنده ۱۰ درصد PRP نیز اضافه گردید. پس از ۱۰ روز تمایز به استئوبلاست و استئوکلاست با بررسی بیان ژن‌های اختصاصی توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بی‌درنگ (RT-PCR) صورت گرفت. در گروه‌های تحت تمایز به استئوبلاست از بررسی ژن‌های استئوکلسین و اُستریکس و در گروه‌های تحت تمایز به استئوکلاست از بررسی ژن اسید فسفاتاز مقاوم در برابر تارتات (TRAP) استفاده شد. آنالیز آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار گراف‌پد و روش‌های آنالیز واریانس یک طرفه و دو طرفه و آزمون تعقیبی توکی انجام گرفت.

یافته‌ها: در بررسی بروز ژن TRAP در مقایسه گروه کنترل با گروه تیمار با PRP یافته‌های مشابهی بدست آمد (p=NaN). در خصوص مقایسه گروه حاوی مارکر استئوکلاستوژنز به تنهایی و گروه حاوی این ماده به همراه PRP لازم به ذکر است که اختلاف معنی‌دار بود (p=0.0324). در بررسی بروز ژن اُستریکس در مقایسه گروه کنترل با گروه تحت تیمار با PRP اختلاف معنی‌داری وجود داشت (p=0.0050). میان گروه حاوی مارکر استئوبلاستوژنز به تنهایی و گروه دارنده مارکر فوق به همراه PRP نیز اختلاف معنی‌دار بود (p=0.00001). در بررسی بروز ژن استئوکلسین، مقایسه گروه کنترل با گروه تحت تیمار با PRP نشانگر اختلاف معنی‌داری بود (p=0.0110) ولی نتایج مقایسه دو گروه حاوی مارکر القا استئوبلاستوژنز با و بدون تیمار با PRP نشانگر اختلاف معنی‌داری نبود (p=0.5191). در مقایسه انجام شده میان گروه‌های کنترل و تحت تیمار با PRP در سه ژن مذکور تفاوت میان گروه ژن TRAP و ژن اُستریکس و استئوکلسین معنی‌دار بود (به ترتیب p=0.006 و p=0.0001).

بحث و نتیجه‌گیری: بررسی کلی یافته‌ها نشان داد که PRP باعث افزایش تمایز به استئوبلاست شده ولی بر استئوکلاست تأثیر چشم‌گیری ندارد.

کلیدواژه‌ها: استئوبلاست، داربست، استئوکلاست، پلاسمای غنی از پلاکت

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و یکم، شماره دهم، ص ۷۳٤-۷۲۵، دی ۱۳۹۹

آدرس مکاتبه: تبریز- دانشگاه علوم پزشکی تبریز- مرکز تحقیقات بیماریهای لثه و دندان، تلفن: ۰۴۱۳۳۳۵۳۱۶۱

Email: maleki.s.89@gmail.com

[۱] استادیار گروه اندودونتیکس دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم‌پزشکی تبریز، تبریز، ایران

[۲] استادیار گروه علوم تشریح و بافت‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم‌پزشکی تبریز، تبریز، ایران

[۳] اندودنتیست خصوصی، تبریز، ایران

[٤] استادیار مرکز تحقیقات بیماری‌های لثه و دندان دانشگاه علوم‌پزشکی تبریز، تبریز، ایران (نویسنده مسئول)

مقدمه

با توجه به گزارشات موجود، درصد نسبتاً بالایی از دندان ها در آینده نیازمند درمان رتروگرید (جراحی) خواهند بود (۱) و همچنین درصد موفقیت درمان های مجدد غیر جراحی در اندودنتیک افزایش خواهد داشت(۲).

اخیراً مهندسی بافت به‌عنوان علمی نوین در طراحی و ساخت ارگان‌ها و بافت‌های مختلف مطرح شده است که شامل چهار فاکتور سلول، داربست، فاکتورهای رشدی و بیوراکتورها می‌باشد (۳).

بقای طولانی مدت‌تر سلول های تمایز یافته در محیط سه بعدی مزیت اصلی آن در مهندسی بافت است که می‌تواند کلید کاربرد این داربست‌ها در مطالعات حیوانی بر روی داروها، ژن‌تراپی، بیولوژی سرطان و درمان‌های رژنراتیو باشد (۴).

استفاده از پلاسمای غنی از پلاکت (PRP[1]) یک نوآوری جدید در تکنیک‌های رژنراتیو است. فاکتورهای رشدی مشتق از پلاکت‌ها، ترمیم بافت همبند و رژنراسیون استخوان را آغاز کرده و باعث افزایش تشکیل عروق خونی جدید و شبیه سازی روندترمیم زخم می‌شوند (۵، ۶).

پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) به غلظت افزایش یافته‌ای از پلاکت‌ها اطلاق می‌شود که در حجم اندکی از پلاسما تغلیظ شده باشند. این ماده از سانتریفیوژ خون تازه به‌دست می‌آید. پلاکت ها حاوی گرانول های α هستند که محتوای آن ها در چند دقیقه اولیه فعال‌سازی آزاد شده و شامل فاکتورهای رشدی مانند فاکتور رشدی مشتق از پلاکت (PDGF)، فاکتور رشدی ترانسفورمینگ (TGF)، فاکتور رشدی مشابه انسولین (IGF)، پروستاگلاندین (PGE2) E2 و فاکتور رشدی اندوتلیال عروق (VEGF) می باشند (۷، ۸). وایتمن در سال ۱۹۹۷ اولین کسی بود که از PRP در جراحی‌های دهان استفاده کرد (۹). مارکس استفاده از PRP را در رژنراسیون استخوان آلوئول مطرح کرده (۸) و مشاهده کرد که بلوغ استخوان و دانسیته رادیوگرافیک آن در کاربرد همزمان گرفت اتولوگ و PRP بهتر از استفاده صرف از گرفت اتولوگ است. ریسک انتقال عفونت و ایجاد پاسخ ایمنی در کار با PRP پایین بوده و این ماده با آزادسازی یک سیگنال پپتیدی باعث جذب ماکروفاژها می‌شود. فعالیت آنتی‌میکروبیال PRP نیز ویژگی دیگری است که در مورد گونه‌های عامل عفونت‌های دهانی مشاهده شده است (۱۰-۱۴).

سلول‌های بنیادی بند ناف، در زمان تولد بدون صدمه به جاندار و به مقدار فراوان قابل دسترسی بوده و پتانسیل کلینیکی عالی جهت استفاده به‌عنوان بافت اتولوگ دارد این سلول‌ها قادر به تمایز به تمام انواع سلول‌ها می‌باشند (۱۵).

با توجه به اهمیت شبیه‌سازی کامل شرایط دهانی در محیط کشت سه‌بعدی، هدف از این مطالعه بررسی تأثیر PRP بر تمایز سلول‌های بنیادی بند ناف انسانی به استئوبلاست و استئوکلاست می‌باشد.

مواد و روش‌کار

در این مطالعه آزمایشگاهی (in vitro) از سید کردن سلول‌ها بر اسکافولد پلیمری از جنس پلی کاپرولامتون/هیدروکسی آپاتیت استفاده شد. اسکافولدهای مورد استفاده در این مطالعه به راحتی اجازه نفوذ سلول های بنیادی به درون خود را فراهم می کنند. اسکافولدها با استفاده از بیوپسی پانچ استریل به قطعات مدور با قطر ۶ میلی‌متر بریده شده و با استفاده از اشعه UV استریل شدن آن‌ها صورت گرفت.

سلول‌های بنیادی بدست آمده از ژله وارتون بند ناف بر روی داربست پلیمری مورد بررسی در این مطالعه با تعداد ۱ میلیون عدد قرار داده شدند. سلول های مورد استفاده در این مطالعه به ۶ گروه تقسیم شدند: گروه کنترل (صرفاً دریافت کننده محیط کشت به همراه ترکیبات تمایز دهنده به استئوبلاست)، گروه القا تمایز به استئوبلاست، القای تمایز به استئوکلاست، گروه تیمار با PRP و گروه‌های القای تمایز به استئوبلاست و استئوکلاست که دریافت کننده PRP نیز بودند. به منظور القای تمایز سلول های بنیادی به استئوبلاست، از محیط کشت DMEM[2] (Biosera, Hameenlinna, Finland) حاوی ۱۰-۷ مولار دگزامتازون (Sigma-Aldrich, Missouri, US)، ۱۰ میلی‌مولار از ماده گلیسروفسفات β(Sigma-Aldrich, Missouri, US) و ۵۰ میلی مولار آسکوربیک اسید (Sigma-Aldrich, Missouri, US) استفاده گردید. در گروه تمایز به استئوکلاست، سلول‌های بنیادی مشتق از ژله وارتون پس از انتقال به اسکافولدها با استفاده از ۱۰۰ نانوگرم در هر میلی‌لیتر RANKL[3] (Peprotech, London, UK) و ۲۰ نانوگرم در هر میلی‌لیتر CSF[4] (Peprotech, London, UK) تحت تمایز به استئوکلاست قرار گرفتند. این سلول‌ها نیز خود به دو گروه کنترل و تیمار با PRP تقسیم شدند. گروه تحت تیمار با PRP در محیط کشت علاوه بر ترکیبات تمایز دهنده، ۱۰ درصد PRP نیز دریافت نمودند. سلول‌ها به مدت ۱۴ روز نگهداری شده و در پایان مطالعه آماده سازی آن‌ها جهت انجام

[1] Platelet Rich Plasma

[2] Dulbecco's Modified Eagle's Medium

[3] Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand

[4] Colony-Stimulating Factor

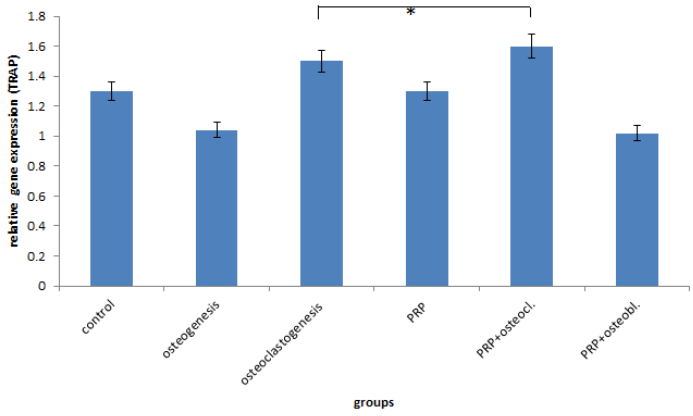
بررسی ژن‌ها انجام گرفت. جهت تعیین تمایز سلول‌های بنیادی مشتق از ژله وارتون به استئوبلاست و استئوکلاست، بیان ژن های اختصاصی این سلول‌ها بررسی شد. در استئوبلاست‌ها، ژن‌های استئوکلسین و اُستریکس[5] با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بی‌درنگ (RT-PCR[6]) مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی تمایز سلول‌های بنیادی به استئوکلاست، بیان ژن TRAP[7] مورد مطالعه قرار گرفت.

آنالیز آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار گراف‌پد[8] و روش‌های آنالیز واریانس یک طرفه و دوطرفه و آزمون تعقیبی توکی انجام گرفت.

یافته‌ها

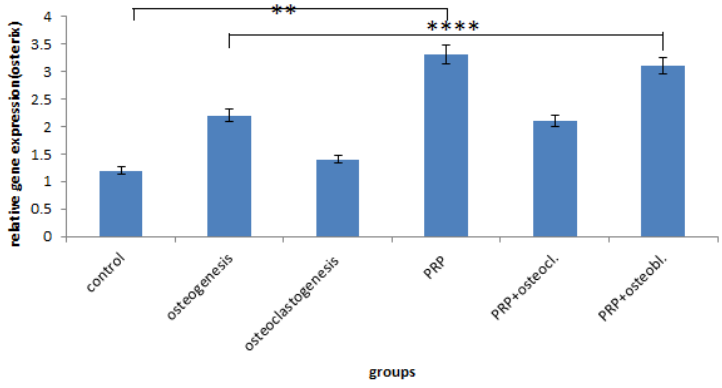
بروز سه ژن TRAP، اُستریکس و استئوکلسین در ۶ گروه ذکر شده توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بی‌درنگ (RT-PCR) مورد آنالیز قرار گرفتند.

همان گونه که در نمودار ۱ قابل مشاهده است در بررسی بروز ژن TRAP در مقایسه گروه کنترل با گروه تیمار با PRP یافته‌های مشابهی بدست آمد (p=NaN). در خصوص مقایسه گروه حاوی مارکر استئوکلاستوژنز به‌تنهایی و گروه‌های این ماده به همراه PRP لازم به ذکر است که اختلاف معنی‌دار بود (p=0.0324).



نمودار (۱): مقایسه بروز ژن TRAP

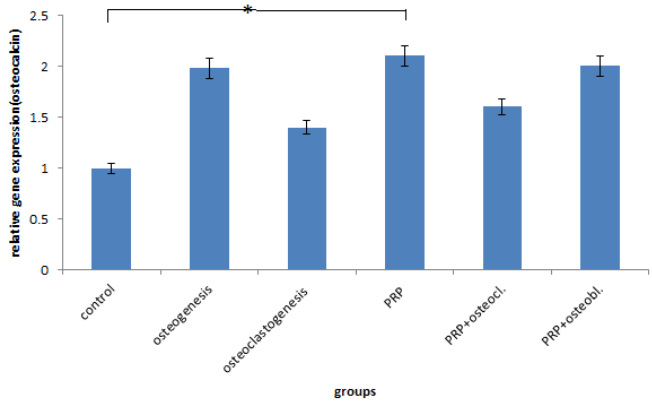
در بررسی بروز ژن اُستریکس نیز همان‌طور که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود در مقایسه گروه کنترل با گروه تحت تیمار با PRP اختلاف معنی‌داری وجود داشت (p=0.0050). در مقایسه انجام شده میان گروه حاوی مارکر استئوبلاستوژنز به تنهایی و گروه دارنده مارکر فوق به همراه PRP نشان داده شد که اختلاف معنی‌دار است (p=0.0000).



نمودار (۲): مقایسه بروز ژن اُستریکس

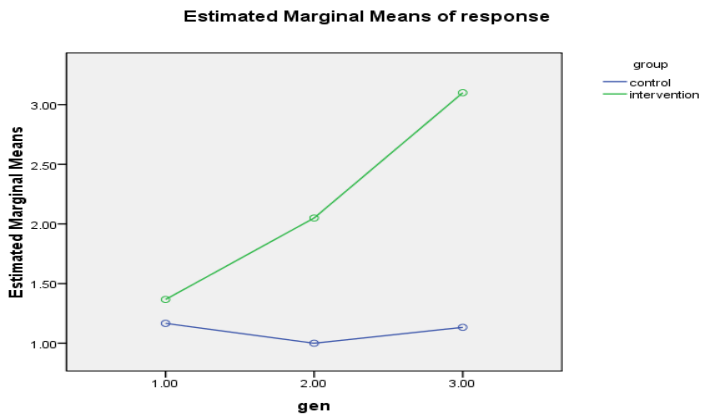
[5] Osterix
[6] Real Time Ploymerase Chain Reaction
[7] Tartrate-Resistant Acid Phosphatase
[8] Graph Pad

در بررسی بروز ژن استئوکلسین همانگونه که از نمودار ۳ می‌توان دریافت، مقایسه گروه کنترل با گروه تحت تیمار با PRP نشانگر اختلاف معنی داری بود (p=0.0110) ولی نتایج مقایسه دو گروه حاوی مارکر القا استئوبلاستوژنز با و بدون تیمار با PRP نشانگر اختلاف معنی‌داری نبود (p=0.5191).



نمودار (۳): مقایسه بروز ژن استئوکلسین

در مقایسه انجام شده میان تأثیر PRP بر بروز سه ژن ذکر شده آنالیز داده‌ها توسط آزمون تعقیبی توکی همان‌طور که در نمودار ۴ مشاهده می‌شود، نشان داد که تفاوت میان گروه ژن TRAP و ژن اُستریکس و استئوکلسین معنی‌دار بود (به ترتیب p=0.006 و p=0.000). در این نمودار، مداخله به‌معنای استفاده از PRP بوده و اعداد ۱ تا ۳ به ترتیب مربوط به ژن‌های TRAP، اُستریکس و استئوکلسین می‌باشند.



نمودار (۴): مقایسه میان بروز سه ژن TRAP، اُستریکس و استئوکلسین

بحث و نتیجه‌گیری

مزیت عمده محیط سه‌بعدی بر دو بعدی کاهش فاصله میان سیستم های کشت سلولی و فیزیولوژی سلولی است (۱۶). در شرایط دو بعدی اجزای ماتریکس خارج سلولی، ارتباطات سلول به سلول و سلول با ماتریکس که در تمایز، تکثیر و عملکرد سلولی در شرایط درون‌تنی و در موجود زنده[1] بسیار مهم‌اند، از دست خواهند رفت (۱۷). از جمله تفاوت‌های سلول ها در محیط سه بعدی و دو بعدی می‌توان به تفاوت در حساسیت نسبت به داروها، آپوپتوزیس، میزان بقا، بروز ژن‌ها، بروز پروتئین‌ها و تمایز اشاره کرد (۴). همچنین نشان داده شده زمانی که سلول‌ها بر روی غشای پایه‌ای مانند ژل رشد می‌کنند، تعامل نزدیکی در مسیرهای سیگنالینگ ایجاد خواهد شد (۱۸).

در مطالعه حاضر سلول های بنیادی مشتق شده از ژلهٔ وارتون بند ناف انسان بر روی داربست سه بعدی در حضور و عدم حضور

[1] In Vivo

PRP کشت داده شده و تمایز آن‌ها به استئوبلاست با سنجش بروز ژن‌های استئوکلسین و اُستریکس صورت گرفت که نتایج حاکی از این بود که حضور PRP باعث افزایش تمایز سلول‌های مزانشیمال بنیادی جنینی بر روی داربست سه بعدی PCL/HA[۲] به استئوبلاست می‌شود. این یافته‌ها هم‌راستا با مطالعه انجام شده توسط کِستِن در سال ۲۰۰۶ بود که نشان داده شد PRP باعث افزایش پرولیفراسیون می‌شود ولی خواص استئوژنیک آن بر اسکافولد کلسیم_ فسفات ضعیف است (۱۹). در مطالعه‌ای دیگر وانگ و رابیز نشان دادند که استاتین‌ها باعث القا و تسریع ساخت استخوان لوکالیزه شده و منجر به بروز زود هنگام فاکتورهای رشدی دخیل در آنژیوژنز، تمایز سلول های استخوانی و استئوژنز می‌شوند (۲۰). در مطالعات دیگری نیز نشان داده شد که غلظت بالای پلاکت می‌تواند فاکتوری تعیین کننده در رژنراسیون استخوانی باشد (۲۱، ۲۲). در مطالعه بابا در سال ۲۰۱۲ با بررسی تمایز استئوبلاست از سلول‌های بنیادی بند ناف جنینی در شرایط درون‌تنی و بر روی اسکافولد هیدروکسی آپاتیت نتایج نشانگر افزایش تمایز بودند (۲۳). یک مطالعه دیگر نشان داد که PRP می‌تواند در طولانی مدت باعث ارتقای استخوان‌سازی شود (۲۴).

برخلاف یافته‌های ما، مطالعه مروری دِل‌فابرو، عنوان کرد اتفاق‌نظر در مورد مزیت کاربرد غلظت‌های مختلف پلاکت در جراحی پریودنتال وجود نداشته و همچنین نقش پلاکت در کنترل تمایز استئوبلاست‌ها، عملکرد و آپوپتوز آن‌ها کاملاً شناخته شده نیست (۲۵). در بررسی انجام‌شده توسط کستن در سال ۲۰۰۸، نتایج حاکی از این بود که PRP تأثیری بر تمایز استئوژنیک سلول های مزانشیمال ندارد. در مطالعه انجام‌شده در سال ۲۰۱۳ توسط هرناندز-فرناندز نیز هیچ‌گونه شواهد هیستولوژیک و رادیولوژیک در رابطه با افزایش استخوان‌سازی در استخوان‌سازی تحت کشش[۳] با افزودن PRP در فاز اولیه مشاهده نگردید (۲۶). در مطالعات منتشرشده توسط کان در سال ۲۰۱۰ (۲۷)، اولیویرا فیلهو در سال ۲۰۱۰ (۲۸) و نیز جیوانی در سال ۲۰۱۱ (۲۹) نیز حضور PRP غیر مرتبط با رژنراسیون استخوانی تشخیص داده شد (۳۰). به نظر می‌رسد دلیل این کنتراورسی در نتایج ناشی از تفاوت در مقدار فاکتورهای رشدی در PRP باشد (۳۱).

این عقیده که PRP می‌تواند مانع رژنراسیون استخوانی شود توسط Hsu (۳۲) مورد بررسی قرار گرفت، وی نشان داد که PRP حاوی ماده ممانعت کننده از آنژیوژنز به‌نام ترومبوسپوندین-۱ (TSP-1[۴]) می‌باشد و نیز PRP در غلظت‌های بالا مانع تکثیر سلولی می‌شود. با توجه به اینکه یافته‌های مطالعه حاضر عکس این مطلب را نشان دادند، به نظر می‌رسد علت این کنتراورسی تفاوت در نوع سلول‌های بنیادی تحت بررسی و محیط کشت متفاوت باشد.

در مطالعه حاضر تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به استئوکلاست نیز با اندازه‌گیری بروز ژن TRAP مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که حضور PRP باعث افزایش تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمال بند ناف جنینی به استئوکلاست نمی‌شود. این نتایج هم‌راستا با مطالعه اُگینو و دیگران بود (۳۳) که نشان دادند علت این امر تا حدودی ناشی از تأثیر PRP بر افزایش تولید استئوپروتگرین می‌باشد. یک فرضیه دیگر می‌تواند سرکوب تکثیر ماکروفاژها باشد، بدین‌صورت که PRP می‌تواند در محیط کشت از تکثیر سلول‌های ماکروفاژ انسانی جلوگیری نماید (۳۴).

برخلاف نتایج مطالعه حاضر در برخی از مطالعات آزمایشگاهی[۵] نشان داده شد که پلاکت‌های ایزوله شده باعث افزایش (۳۵) و یا حتی القای استئوکلاستوژنز (۳۵) می‌شوند. دلیل این کنتراورسی در نتایج را می‌توان به تفاوت در نوع سلول‌ها و محیط کشت نسبت داد.

در مقایسه نهایی انجام‌شده میان تأثیر PRP بر بروز سه ژن ذکرشده آنالیز داده‌ها نشان داد که تفاوت میان گروه ژن TRAP و ژن اُستریکس و استئوکلسین معنی‌دار بود (به ترتیب p=0.006 و p=0.000).

به نظر می‌رسد مگاکاریوسیت‌ها باعث مهار تولید استئوکلاست‌های جذب‌کننده استخوان شده ولی منجر به افزایش استئوبلاست‌های سازنده استخوان و درنتیجه افزایش کلی توده استخوانی می‌شود (۳۶).

همچنین لازم به ذکر است که در مدل‌های با بروز بیش‌ازحد TGF-β در موجود زنده نشان داده شده که نقش این ماده در تمایز استئوسیت‌ها ضعیف بوده ولی به‌طور باورنکردنی هیچ‌گونه نقایص استئوبلاستی دیده نشد، بروز بیش‌ازحد TGF-β مخصوص استئوبلاست در موش باعث فعال‌سازی بیش از معمول استئوکلاست و نهایتاً از دست رفتن زیاد استخوان طی برگشت و جابه‌جایی گردید (۳۷). در مطالعات دیده‌شده که سرم آماده‌سازی شده باعث افزایش استئوبلاستوژنز می‌شود درحالی‌که پلاکت خالص باعث کاهش استئوبلاستوژنز می‌گردد (۳۸-۴۱). تفاوت اصلی در این است که در مطالعات نشانگر کاهش استئوکلاستوژنز، پلاکت‌های آماده‌شده حاوی اجزای سرم بودند، درحالی‌که در

[2] Polycaprolacton/Hydroxyapatite
[3] distraction osteogenesis
[4] Thrombospondin-1
[5] in vitro

مطالعاتی که به نتیجه افزایش استئوکلاستوژنز دست پیدا کردند، این اجزا حضور نداشتند زیرا این مولکول های بیواکتیو بر فانکشن سلولی تأثیر گذارند (۴۲). در یک مطالعه نشان داده شد که حضور PRP باعث افزایش تعداد استئوبلاست و استئوکلاست در محل گرفت در یک ماه خواهد شد. درهرحال در گرفت استخوانی بدون PRP در مدت ۲ ماه یا بیشتر تعداد استئوکلاست و استئوبلاست حاضر در بافت مشابه وجود PRP بود و لذا به نظر می‌رسد طول عمر PRP کوتاه باشد (۴۳). در یک مطالعه اخیر، آقای وانگ و همکارانش نشان دادند که داربست‌های مهندسی با ترکیب مواد معدنی بیومریال و مصنوعی (متشکل از پوسته صدف (OS) و سولفات آلفا کلسیم همی هیدرات (α-CSH) به‌عنوان اسکفولد، پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) به‌عنوان تأمین‌کننده فاکتورهای رشد و سلول‌های بنیادی مزانشیمی استخوان (BMSC)) دارای پتانسیل نویدبخش برای بازسازی بافت استخوان هستند. نتایج آن‌ها نشان داد که در شرایط آزمایشگاهی، گروه داربست + BMSCs + PRP فعالیت آلکالین فسفاتاز (ALP) بالاتری را در مقایسه با گروه‌های دیگر با روش الایزا نشان داد ($P <$ ۰/۰۵). در مدل حیوانی رت، کوچک‌ترین ناحیه نقص جمجمه و بیشترین حجم استخوان جدید احیاشده در گروه داربست + + PRP BMSCs توسط اشعه ایکس و تجزیه‌وتحلیل Micro-CT مشاهده شد ($P <0.05$) و نتایج مشابهی نیز در رنگ‌آمیزی HE و Masson مشاهده شد. رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی برای پروتئین‌های نشانگر استئوژنیک ALP نشان داد که بارزترین رنگ‌آمیزی مثبت در گروه داربست + BMSC + PRP مشاهده شد ($P <$ ۰/۰۵). همچنین، بیان مارکرهای التهابی IL-6 و TNF-α کمترین میزان را در گروه شاهد (داربست بدون PRP) نشان داد ($P <0.05$) (۴۴).

از یافته‌های این مطالعه می‌توان به این نتیجه رسید که حضور PRP تأثیری بر بروز ژن TRAP ندارد. در مورد بروز ژن اُستریکس نیز لازم به ذکر است که حضور PRP با یا بدون مارکر القا استئوبلاستوژنز باعث افزایش بروز ژن مذکور می‌گردد. در بررسی بروز ژن استئوکلسین نیز یافته های مطالعه حاکی از این بودند که در عدم حضور مارکر القا استئوبلاستوژنز، PRP باعث افزایش بروز این ژن شده ولی در حضور مارکر القای استئوبلاستوژنز تأثیر آن ازنظر آماری چشم‌گیر نبود. بررسی کلی یافته‌ها نشان داد که میان تمایز به استئوبلاست و استئوکلاست تفاوت آماری معنی‌داری وجود دارد.

بررسی کلی یافته ها نشان داد که PRP باعث افزایش تمایز به استئوبلاست شده ولی بر استئوکلاست تأثیر چشم‌گیری ندارد.

محدودیت‌های مطالعه و پیشنهادات آینده

نتایج مطالعات آزمایشگاهی برای بررسی کارایی این اسکفولد کافی نیست. برای یافتن ارتباط میان نتایج آزمایشگاهی و نتایج درون تنی نیازمند استفاده از مدل حیوانی می‌باشد که از محدودیت‌های این کار محسوب می‌گردد و به‌عنوان پیشنهاد کارهای آینده باید آن را در نظر گرفت.

تشکر و قدردانی

این مطالعه بر اساس داده‌های حاصل از پایان‌نامه دوره تخصصی دانشجوی دندانپزشکی و با کد تصویب ۲۶۷/ت نگارش شده است. پشتیبانی مالی این طرح توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی تبریز صورت گرفته است که آر این معاونت قدرانی می‌گردد.

References:

1. Hargreaves KM, Berman LH. Cohen’s pathways of the pulp. 11th ed. USA: Elsevier; 2016. p. 495.
2. Elemam RF, Pretty I. Comparison of the success rate of endodontic treatment and implant treatment. ISRN Dent 2011; 2011: 640509.
3. Ravi M, Paramesh V, Kaviya S, Anuradha E, Solomon F. 3D cell culture systems: advantages and applications. J Cell Physiol. 2015; 230 (1):16-26.
4. Tang R, Application of platelet-rich plasma in traumatic bone infections. Exp Rev Anti Infect Ther 2020; 18 (1): 1-12.
5. Priya MH, Tambakad PB, Naidu J. Pulp and Periodontal Regeneration of an Avulsed Permanent Mature Incisor Using Platelet-rich Plasma after Delayed Replantation: A 12-month Clinical Case Study. J Endod 2016; 42 (1): 66-71.
6. Rosello-Camps A, Monje A, Lin GH, Khoshkam V, Chavez-Gatty M, Wang HL, et al. Platelet-rich plasma for periodontal regeneration in the treatment of intrabony defects: a meta-analysis on prospective clinical trials. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol 2015; 120 (5): 562-74.

7. Dohan Ehrenfest DM, Andia I, Zumstein MA, Zhang CQ, Pinto NR, Bielecki T. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine :current consensus, clinical implications and perspectives. Muscles Ligaments Tendons J 2014; 4(1): 3-9.
8. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1998; 85 (6): 638-46.
9. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. J Oral Maxillofac Surg 1997; 55 (11): 1294-9.
10. DelFabbro M, Bortolin M, Taschieri S. Is autologous platelet concentrate beneficial for post-extraction socket healing? A systematic review. Int J Oral Maxillofac Surg 2011; 40 (9): 891-900.
11. Sanchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. Int J Oral Maxillofac Implants 2003; 18(1): 93-103.
12. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. Thromb Haemost 2004; 91 (1):4-15.
13. Marx RE. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. J Oral Maxillofac Surg 2004; 62 (4): 489-96.
14. Martinez-Zapata MJ, Marti-Carvajal AJ, Sola I, Exposito JA, Bolibar I, Rodriguez L, et al. Autologous platelet-rich plasma for treating chronic wounds. Cochrane Database Syst Rev 2012; 10: CD006899.
15. Baba K, Yamazaki Y, Ishiguro M, Kumazawa K, Aoyagi K, Ikemoto S, et al. Osteogenic potential of human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells cultured with umbilical cord blood-derived fibrin: a preliminary study. Journal of Cranio-Maxillo Surg 2013; 41 (8): 775-82.
16. Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. Science 2001; 294 (5547): 1708-12.
17. Mazzoleni G, Di Lorenzo D, Steimberg N. Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research? Genes Nutr 2009; 4 (1): 13-22.
18. Lee GY, Kenny PA, Lee EH, Bissell MJ. Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. Nat Methods 2007; 4 (4): 359-65.
19. Kasten P, Vogel J, Luginbühl R, Niemeyer P, Weiss S, Schneider S, et al. Influence of platelet-rich plasma on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and ectopic bone formation in calcium phosphate ceramics. Cells Tissues Organs 2006; 183 (2): 68-79.
20. Wong RW, Rabie ABM. Histologic and ultrastructural study on statin graft in rabbit skulls. J Oral Maxillofacial Surg 2005; 63 (10): 1515-21.
21. Kawasumi M, Kitoh H, Siwicka K, Ishiguro N. Theeffect of the platelet concentration in platelet-rich plasma gel on the regeneration of bone. Bone Joint J 2008; 90 (7): 966-72.
22. Moreira DC, Sá CN, Andrade MGS, dos Santos Calmon TCB, de Almeida Reis SR, Pithon MM, et al. Angiogenesis and osteogenesis at incorporation process of onlay bone graft. J Oral Maxillo Surg 2013; 71 (12): 2048-57.
23. Baba K, Yamazaki Y, Ikemoto S, Aoyagi K, Takeda A, uchinuma E. oateogenic potential of human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells cultured with umbilical cord blood-derived autoserum. J Cranio-maxillo-facial Surg 2012; 40: 768-72
24. Pessoa RS, Oliveira SR, Menezes HH, de Magalhaes D. Effects of platelet-rich plasma on healing of

alveolar socket: split-mouth histological and histometric evaluation in Cebus apella monkeys. Indian J Dental Res 2009; 20 (4): 442.

25. Del Fabbro M, Bortolin M, Taschieri S. Is autologous platelet concentrate beneficial for post-extraction socket healing? A systematic review. Int J Oral Maxillofac Surg 2011; 40 (9): 891-900.
26. Hernandez-Fernandez A, Vélez R, Soldado F, Saenz-Ríos JC, Barber I, Aguirre-Canyadell M. Effect of administration of platelet-rich plasma in early phases of distraction osteogenesis: an experimental study in an ovine femur model. Injury 2013; 44 (7): 901-7.
27. Kon E, Filardo G, Delcogliano M, Fini M, Salamanna F, Giavaresi G, et al. Platelet autologous growth factors decrease the osteochondral regeneration capability of a collagen-hydroxyapatite scaffold in a sheep model. BMC Musculo Disord 2010; 11 (1): 220.
28. Oliveira Filho MAd, Nassif PAN, Malafaia O, Ribas Filho JM, Ribas CAPM, Camacho AC, et al. Effects of a highly concentrated platelet-rich plasma on the bone repair using non-critical defects in the calvaria of rabbits. Acta Cir Bras 2010; 25 (1): 28-33.
29. Giovanini AF, Gonzaga CC, Zielak JC, Deliberador TM, Kuczera J, Göringher I, et al. Platelet-rich plasma (PRP) impairs the craniofacial bone repair associated with its elevated TGF-β levels and modulates the co-expression between collagen III and α-smooth muscle actin. J Orthoped Res 2011; 29 (3): 457-63.
30. Kasten P, Vogel J, Beyen I, Weiss S, Niemeyer P, Leo A, et al. Effect of platelet-rich plasma on the in vitro proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on distinct calcium phosphate scaffolds: the specific surface area makes a difference. J Biomater App 2008; 23 (2):88-9.
31. Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: a pilot study. J Oral Maxillo Surg 2002; 60 (10):1176-81.
32. Hsu C-W, Yuan K, Tseng C-C. The negative effect of platelet-rich plasma on the growth of human cells is associated with secreted thrombospondin-1. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodont 2009; 107 (2): 185-92.
33. Ogino Y, Ayukawa Y, Kukita T, Atsuta I, Koyano K. Platelet-rich plasma suppresses osteoclast genesis by promoting the secretion of osteoprotegerin. J PerioRes 2009; 44 (2): 217-24.
34. Woodall Jr J, Tucci M, Mishra A, Benghuzzi H. Cellular effects of platelet rich plasma: a study on HL-60 macrophage-like cells. Biomed Sci Instrument 2006; 43: 266-71.
35. Alissa R, Esposito M, Horner K, Oliver R. The influence of platelet-rich plasma on the healing of extraction sockets: an explorative randomised clinical trial. Eur J Oral Implantol 2010; 3(2):121-34.
36. Lu HH, Vo JM, Chin HS, Lin J, Cozin M, Tsay R, et al. Controlled delivery of platelet-rich plasma-derived growth factors for bone formation. J Biomedical Material Res Part A 2008; 86 (4):1128-36.
37. Erlebacher A, FilvaroffEH, Ye J-Q, Derynck R. Osteoblastic responses to TGF-β during bone remodeling. Molecular Biology Cell 1998; 9 (7): 1903-18.
38. Arora NS, Ramanayake T, Ren Y-F, Romanos GE. Platelet-rich plasma in sinus augmentation procedures: a systematic literature review: Part II. Implant Dent 2010; 19 (2): 145-57.
39. Boyapati L, Wang H-L. The role of platelet-rich plasma in sinus augmentation: a critical review. Implant Dent 2006; 15 (2):160-70.
40. Aimetti M, Romano F, Dellavia C, De Paoli S. Sinus grafting using autogenous bone and platelet-rich

plasma: histologic outcomes in humans. Inter J Periodont Res Dent 2008; 28 (6).

41. Schaaf H, Streckbein P, Lendeckel S, Heidinger KS, Rehmann P, Boedeker R-H, et al. Sinus lift augmentation using autogenous bone grafts and platelet-rich plasma: radiographic results. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontol 2008; 106 (5): 673-8.
42. Lee CY, Rohrer MD, Prasad HS. Immediate loading of the grafted maxillary sinus using platelet rich plasma and autogenous bone: a preliminary study with histologic and histomorphometric analysis. Implant Dent 2008; 17 (1): 59-73.
43. Ju B. comparative dosimetry of Galileos dental CBCT imaging: report of result . http://www.wisby.net/tv/334391/files/Galileos_CBCT.2012
44. Wang J, Xie L, Wang X, Zheng W, Chen H, Cai L. The effects of oyster shell/alpha-calcium sulfate hemihydrate/platelet-rich plasma/bone mesenchymal stem cells bioengineering scaffold on rat critical-sized calvarial defects. J Mater Sci Mater Med 2020; 31 (11): 1-14.

Original Article

EVALUATION OF THE EFFECT OF PLATELET-RICH PLASMA (PRP) ON OSTEOBLAST AND OSTEOCLAST DIFFERENTIATION IN THE PRESENCE OF POLYCAPROLACTONE / HYDROXYAPATITE 3D SCAFFOLD: AN IN VITRO STUDY

*Hadi Mokhtari[1], Azadeh Montaseri[2], Ali Mojadadi[3], Solmaz Maleki Dizaj[4] **

Received: 20 June, 2020; Accepted: 26 October, 2020

Abstract

Background & Aims: It has been shown that growth factors have a great role in improving wound healing processes. In addition, a relatively high proportion of endodontically treated teeth will require retrograde treatment in the future. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the effect of platelet-rich plasma (PRP) on differentiation of osteoblasts and osteoclasts in the presence of a three-dimensional scaffold.

Materials & Methods: In this in vitro study, mesenchymal stem cells were isolated from the Wharton jelly of human fetal umbilical cord and assigned into osteoblasts and osteoclasts groups for the evaluation of differentiation. Each group was subdivided into two subgroups with and without PRP. All the samples were cultured on two PCL/HA (polycaprolacton/hydroxyapatite) polymer scaffold. To evaluate differentiation into osteoblasts, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) was used that contained 7–10-mol dexamethasone, 10-mol glycerophosphate, and 50-mol ascorbic acid. In the osteoclast differentiation group, RANKL (receptor activator of nuclear factor Kappa-B ligand) and CSF (colony-stimulating factor) were used. In addition to differentiation agents, 10% PRP was added to the two subgroups containing PRP. After 10 days, differentiation into osteoblasts and osteoclasts was evaluated by assessing the expression of specific genes using real-time PCR. In the osteoblast differentiation group, expression of osteocalcin and osteotrix genes was evaluated and in the osteoclast differentiation group, expression of TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) was evaluated. Data were analyzed using one-way ANOVA, two-way ANOVA, and post hoc Tukey tests, using Graph Pad software program.

Results: Evaluation of the expression of the TRAP gene did not reveal any significant differences between the study and control groups. There was a significant difference between the group with the osteoclastogenic factor alone and the group with osteoclastogenic factor and PRP (p=0.0324). There was a significant difference in osterix expression between the control group and the PRP-treated group (p=0.0050). There was a significant difference between the group with osteoblastogenic factor alone and the group with osteoblastogenic factor and PRP (p=0.00001). There was a significant difference in the expression of osteocalcin gene between the control and PRP-treated groups (p=0.0110); however, the differences between the osteoblastogenesis groups with and without PRP treatment were not significant (P=0.5191). The differences in the expression of TRAP, osterix, and osteocalcin genes between the control and PRP-treated groups were significant (p=0.006 and p=0.0001, respectively).

Conclusion: The results of the present study showed that PRP resulted in an increase in osteoblastic differentiation, with no significant increase in osteoclastic differentiation.

Keywords: Osteoblast, Osteoclast, Platelet-Rich Plasma, Scaffold

Address: Golgasht St., Daneshgah Ave., Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
Tel: 09841 33353161
Email: maleki.s.89@gmail.com

SOURCE: STUD MED SCI 2020: 31(10): 734 ISSN: 2717-008X

[1] *Assistant Professor, Department of Endodontics, Faculty of Dentistry, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran*
[2] *Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, Medicine Faculty, Medical University of Tabriz, Tabriz, Iran*
[3] *Endodontist, Tabriz, Iran*
[4] *Assistant Professor, Dental and Periodontal Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran (Corresponding Author)*