

تأثیر پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) بر سلول‌های گلیال رده B92

مهتاب پورکمالزاده^۱، سید میثم ابطحی فروشانی^{۲*}، علی‌رضا محمودیان^۳

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد ایمنی‌شناسی، گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
 ۲. دانشیار ایمنی‌شناسی، گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
 ۳. استادیار ویروس‌شناسی، گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۹/۱۲
 تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۱۶

زمینه و هدف در مطالعات گذشته، به ارتباط برخی از سلول‌های سرطانی و پلاکت‌ها اشاره شده است. هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی تأثیرات پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) بر سلول‌های سرطانی گلیال رده B92 بوده است. **مواد و روش‌ها** در این مطالعه تجربی، تعداد 1×10^6 سلول از رده B92، با درصدهای متفاوت پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) شامل: ۰، ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد، در محیط کشت به مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند. تغییرات ریخت‌شناسی سلول‌های تیمار شده با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس ارزیابی شد. تأثیرات PRP بر میزان تکثیر سلول‌ها با استفاده از آزمون احیای نمک تترازولیوم (دی متیل تیزول-دی فنیل تترازولیوم بروماید، MTT) سنجیده شد. به منظور ارزیابی سطح بیان ژن سایتوکاین‌های TNF α ، IL-10 و ژن BCL-2 از تکنیک qRT-PCR استفاده شد.

یافته‌ها نتایج آزمون احیای MTT نشان داد که PRP به صورت کاملاً وابسته به دوز رشد سلول‌های گلیال B92 را القا می‌کند. همچنین PRP به صورت وابسته به دوز، موجبات افزایش بیان ژن BCL-2 را فراهم داشت. میزان بیان ژن سایتوکاین TNF- α به دنبال تیمار سلول‌های گلیال B92 با PRP به صورت غیروابسته به دوز کاهش یافته بود. همچنین، تیمار سلول‌های گلیال B92 با PRP به صورت غیروابسته به دوز (بدون تفاوت معنی‌دار بین درصدهای مختلف PRP) موجب افزایش سطح بیان ژن سایتوکاین ضدالتهابی IL-10 شد. **نتیجه‌گیری** در ریزمحیط سرطان، پلاکت‌ها موجبات پیش‌برد رشد و تکثیر سلول‌های گلیال B92 و فرار آن‌ها از پاسخ‌های ایمنی را فراهم می‌کنند.

کلیدواژه‌ها:

پلاسمای غنی از پلاکت (PRP)، سلول‌های گلیال رده B92، IL-10، TNF- α و BCL-2

2

۱. مقدمه

پلاکت‌های اتولوگ، را در دهه ۱۹۸۰ گروهی به رهبری Knighton ارائه دادند (۲). پژوهش‌های بسیاری در مورد استفاده وسیع از PRP در کمک به درمان بیماری‌ها و صدمات تاندون‌ها و مفاصل گزارش شده است (۳). بیشترین موارد مصرف آن در ترمیم پارگی‌های رباط‌های زانو، ترمیم تاندون‌ها، ترمیم رباط گرداننده شانه و نیز تزریق داخل

پلاسمای غنی شده از پلاکت^۱، تجمع اتولوگی از پلاکت‌های غیرفعال در حجم کمی از پلاسمای می‌باشد که برای تسریع التیام بافت نرم و استخوان‌ها استفاده می‌شود (۱). اولین گزارش از موفقیت درمان زخم‌ها با فاکتورهای مشتق از

1. Platelet Rich Plasma, PRP

* نویسنده مسئول: سید میثم ابطحی فروشانی

نشانی: دانشیار ایمنی‌شناسی، گروه میکروبی‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تلفن: ۰۹۱۳۳۰۰۴۷۰

رایانامه: sm.abtahi@urmia.ac.ir

شناسه ORCID: 0000-0003-2579-6618

شناسه ORCID نویسنده اول: 0000-0002-0300-570X

مجله علمی - پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، دوره ۲۸، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۴۰۰، ص ۱۷۳-۱۸۱

آدرس سایت: <http://jsums.medsab.ac.ir> رایانامه: journal@medsab.ac.ir

شاپای چاپی: ۱۶۰۶-۷۴۸۷

جراحی تومور می‌باشد (۱۵-۱۶). البته ذکر این نکته به نظر منطقی می‌باشد که وجود فاکتورهای رشد با وجود فواید فراوان در ترمیم جراحات ناشی از سرطان ممکن است که به تسریع رشد و نمو باقی‌مانده سلول‌های سرطانی بیانجامد. با این حال با مرور منابع خارجی و داخلی، متأسفانه اطلاعات چندانی در مورد تأثیر احتمالی پلاکت‌ها بر رشدونمو سلول‌های سرطانی وجود ندارد؛ لذا پژوهش کنونی با هدف بررسی تأثیر حفاظتی پلاسمای غنی از پلاکت بر عملکرد سلول‌های سرطانی گلیال رده B92 طراحی شده است.

۲. مواد و روش‌ها

کلیه مراحل تحقیق توسط معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه با کد IR-UU-AEC-3/PD/1382 پذیرفته شده است.

گروه‌های مورد مطالعه شامل سلول‌های B92 بدون تیمار و سلول‌های B92 تحت تیمار با پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد بود. در این مطالعه تجربی رده سلولی B92 از بانک سلولی ایران (شماره C132) تهیه شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM^۴، 10 درصد سرم جنین گاوی^۴ کشت داده شدند. این مواد از شرکت بایووست آمریکا^۵ خریداری شدند. تغییرات ریخت‌شناسی سلول‌های تیمار شده با PRP با استفاده از میکروسکوپ معکوس (OLYMPUS, Japan) در مقایسه با نمونه‌های کنترل، ارزیابی شدند.

به منظور تهیه PRP لوله‌های سیترات حاوی خون برای مرحله اول به مدت ۲۰ دقیقه در 160G، سانتریفیوژ (HINOTEK, Germany) شدند. پس از سانتریفیوژ مرحله اول، سه لایه ایجاد شد. در شرایط استریل زیر هود، توسط سرسمپلر دو لایه رویی برداشته شد و به یک لوله فالتکون استریل دیگر منتقل گردید. برای مرحله دوم، لوله فالتکون‌ها در 400G، به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. لایه بالایی دور ریخته شد و لایه زیری PRP موردنظر بود. سپس به‌منظور فعال‌سازی پلاکت‌ها به‌ازای هر سی‌سی PRP مقدار ۱۴۲ میکرولیتر از 10% CaCl₂ (Merck, Germany) استریل اضافه شد.

به‌منظور بررسی تأثیرات PRP بر مورفولوژی سلول‌های گلیال B92، سلول‌ها تا مرحله آخر فاز لگاریتمی کشت شدند و سپس سوسپانسیونی با دانسیته بالا از سلول‌های

مفصلی در بیماران دچار آرتروز، بیماران دچار آرتروز شانه و زانو و استئوآرتریت جراحی‌های زیبای و کاشت مو است (۴). تنها در کشور آمریکا سالانه بیش از ۸۶۰۰۰ تزریق انجام می‌شود که مصرف آن به‌طور عمده در ورزشکاران است (۵). درمان با PRP نه‌تنها ساختار مفصل آسیب‌دیده بلکه جنبه‌های ضدالتهابی و تعدیل سیستم ایمنی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۶).

در انسان، سلول‌های گلیال، تشکیل‌دهنده ۹۰ درصد سلول‌های مغزی می‌باشند. از جمله فعالیت‌های این سلول‌ها می‌توان به میلین‌سازی، حفاظت و حمایت از نورون‌ها، تنظیم پتاسیم خارج سلولی، انتقال نوروترانسمیترها، انتقال عصبی، القای عملکرد سد خونی-مغزی در سلول‌های اندوتلیال و شکل‌دهی آسیب گلیالی اشاره کرد (۷-۸).

سلول‌های B92، سلول‌های چسبنده‌ای هستند که پس از جداسازی از دستگاه عصبی، به‌واسطه اتیل نیتروز آمین^۱، توموری شده‌اند. این سلول‌ها از نظر مورفولوژی، شباهت زیادی به سلول‌های گلیال دارند (۹). مورفولوژی این سلول‌ها به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای زمانی که در محیط کشت فاقد سرم، کشت داده می‌شوند تغییر پیدا می‌کند و به‌صورت سلول‌های کشیده درمی‌آیند (۱۰).

پیشرفت سرطان، نتیجه ارتباط متقابل ریزمحیط ناشی از ارتباط دوطرفه سلول‌های توموری با سلول‌های اطراف خود می‌باشد (۱۱). در بسیاری از سرطان‌ها گزارش شده است که چنین ارتباطی منجر به تبدیل وضعیت سلول‌های اپیتلیال به مزانشیمال^۲ (EMT) می‌شود و بدین ترتیب فرایند بدخیمی و تهاجم به بافت‌های اطرافی، کلید خواهد خورد (۱۲). در همین راستا به‌نحو کاملاً جالب توجهی اخیراً نشان داده است که باندهای فیبرین پلاکتی در ارتباط مستقیم با سلول‌های سرطان پستان قرار گرفته‌اند. در این شرایط به نظر می‌رسد که پلاکت‌ها از طریق تولید فاکتورهای رشد در پیشبرد رشد سلول‌های سرطان پستان از طریق ایجاد EMT دخالت می‌کنند (۱۳).

ماهیت ترمیم‌کننده فاکتورهای رشد ناشی از پلاکت‌ها استفاده از آن‌ها را در شرایط مختلفی که نیاز به ترمیم بافت است، محتمل می‌کند (۱۴). از جمله این موارد، استفاده از PRP در ترمیم آسیب‌های بعد از رادیوتراپی ناحیه سرطانی یا کمک به بازسازی ناحیه جراحی شده بعد از برداشت

4. Fetal Bovine Serum
5. Biowest, Unitated States

1. Ethyl nitrosamine
2. Epithelial-mesenchymal transition, EMT
3. Dulbecco, s Modified Eagle Medium

تکرار از هر چاهک و هر بار به مقدار ۱۰۰ میکرومولار به پلیت ۹۶ خانه ته تخت (NEST Biotech, USA) منتقل گردید و سپس جذب نوری ایجاد شده در طول موج ۴۹۲ نانومتر به وسیله الیزا نگار (BIOTEK, USA) قرائت گردید.

به منظور ارزیابی سطح بیان ژن سایتوکاین‌های TNF- α ، IL-10 و BCL-2 ژن BCL-2 آزمون qRT-PCR بررسی شد. برای انجام qRT-PCR از کیت BIOFACT, USA (شماره شناسایی: DQ385) استفاده و مراحل طبق پروتوکول شرکت انجام شد. در نهایت qRT-PCR توسط دستگاه (MYGO-mini, USA) انجام شد. qRT-PCR در سه تکرار مستقل انجام شد. ژن HPRT یکی از ژن‌های معروف و پرکاربرد برای استانداردسازی بیان ژن‌ها است (۱۹-۲۰). بنابراین در این مطالعه، از ژن HPRT به عنوان ژن مرجع برای نرمال‌سازی داده‌ها استفاده شد.

چسبنده B92 تهیه و بعد از شمارش سلول‌ها به شیوه تریپان بلو، تعداد 1×10^6 سلول به هر خانه از پلیت‌های ۲۴ خانه منتقل گردید. تیمار سلول‌ها انجام و در گرم‌خانه با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با 5% CO₂ و همچنین 95 درصد رطوبت به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. تغییرات مورفولوژی سلول‌های تیمار شده با PRP با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس در مقایسه با نمونه کنترل، ارزیابی شد. کلیه آزمایش‌ها سه بار مجزا و هر بار با سه تکرار انجام شدند.

پس از تیمار سلول‌ها در پلیت‌های ۲۴ خانه کشت سلول (NEST Biotech, USA) به مدت ۲۴ ساعت با PRP برای هر تیمار جداگانه MTT^۱ با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به نسبت ۱ به ۱۰ اضافه و سلول‌ها برای ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از اضافه شدن دی‌متیل سولفوکساید، DMSO^۲ (Sigma, USA) و چندین بار پیپتاژ از کف چاهک‌ها جدا شد و به تعداد ۳

جدول ۱. توالی پرایمرهای HPRT, IL-10, BCL-2, TNF- α .

نام پرایمر	رفت	برگشت
HPRT	5'-TTGGTGGRGATGAYCTCTCAAC-3'	5'-TTCAAATCCAACAAAGTCTGGC-3'
BCL-2	5'-GGAGGATTGTGGCCTTCTTT-3'	5'-GTTTCAGGTACTCAGTCATCCAC-3'
TNF- α	5'-CTCTCAAGGGACAAGGT-3'	5'-CTTGATGGCAGAGGAGG-3'
IL-10	5'-AAGGTTACTTGGGTTGC-3'	5'-GCTCCTTGATTCTGGGC-3'

رشد سلولی بود. سلول‌ها با تعداد بالا و به صورت چسبیده به کف فلاسک تکثیر یافتند. به دنبال واکنش‌های متعدد تغییری در مورفولوژی سلول‌ها مشاهده نشد (شکل ۱/الف). تیمار سلول‌ها با PRP باعث افزایش قدرت رشد و بقای آن‌ها شد. همچنین از لحاظ ریخت‌شناسی کمی سلول‌ها گرد شدند (شکل ۱/ب،ج). البته به صورت وابسته به درصد از لحاظ مورفولوژیک سلول‌ها کشیده شدند و الگوی تکثیر و رشد سلولی به صورت وابسته به دوز بود؛ به گونه‌ای که در ۲۰ درصد PRP، حداکثر رشد و کشیدگی وجود داشت (شکل ۱/د). بررسی تغییرات مورفولوژی بر سلول‌های B92 تیمار شده با PRP نشان‌دهنده تغییرات ریخت‌شناسی مشخصی در سلول‌های تیمار شده نسبت به کنترل بود.

۱.۲. آنالیز آماری

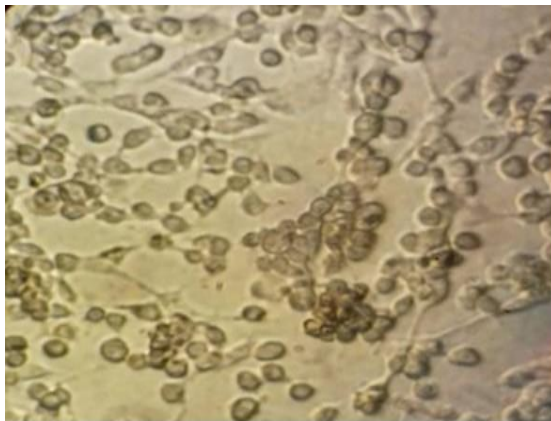
پس از اطمینان از نرمال بودن توزیع داده‌ها، برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون واریانس یک‌طرفه^۵ و تست توکی^۶ در محیط نرم‌افزاری SPSS (ویراست ۲۰) استفاده شد. سطح (P<0.05) به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

۳. یافته‌ها

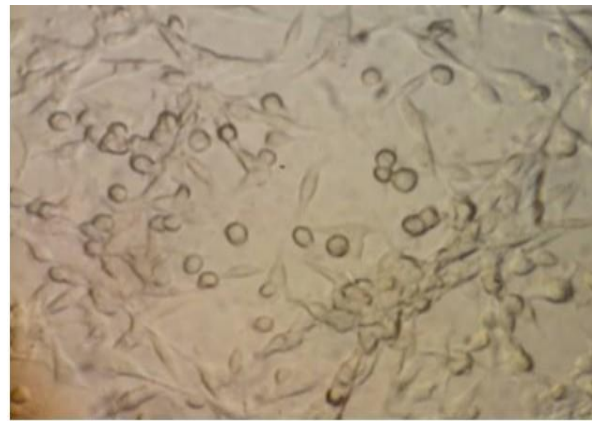
مشاهدات میکروسکوپ نوری معکوس، نشان‌دهنده ظاهری کشیده و دوکی شکل در رده سلولی B92 در شرایط بهینه

4. Tumor necrosis factor α
5. One-way analysis of variance (ANOVA)
6. Tukey post hoc test

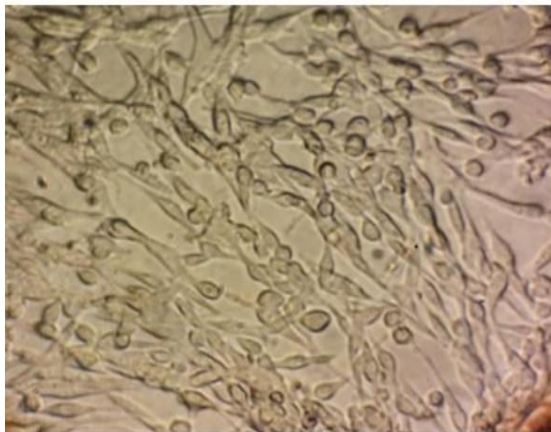
1. Methyl Thiazolyl Tetrazolium
2. Dimethyl sulfoxide
3. Interheukin-10



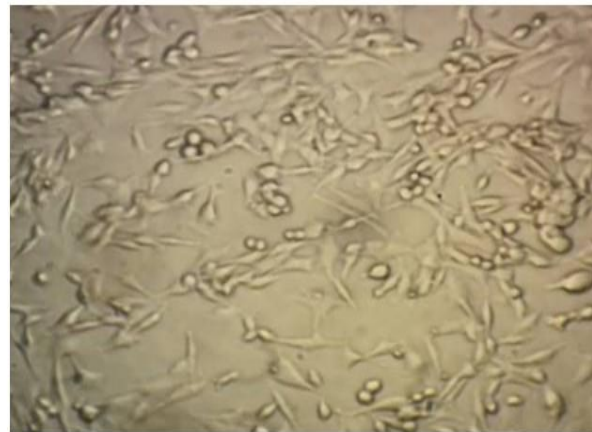
۱/ب) سلول گلیال B92 و 5% PRP



۱/الف) سلول گلیال B92



۱/د) سلول گلیال B92 و 20% PRP

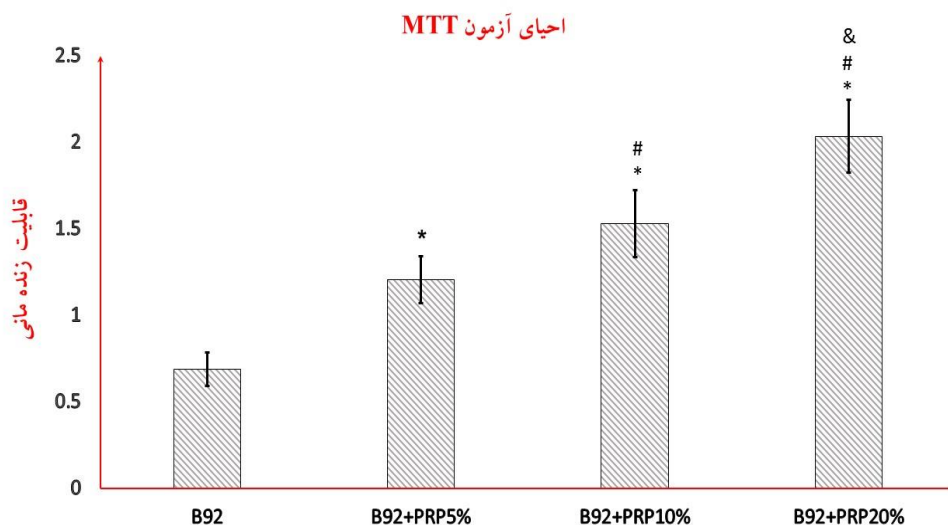


۱/ج) سلول گلیال B92 و 10% PRP

شکل ۱. مورفولوژی سلول‌های گلیال رده B92 در زیرمیکروسکوپ نوری معکوس ۲۴ ساعت بعد از تیمار با پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) ۰، ۵، ۱۰، ۲۰ درصد (عکس‌ها با بزرگ‌نمایی ۴۰× تهیه شده است).

سلول‌ها شد (نمودار ۱). این الگوی حفاظتی و قدرت زنده‌مانی از لحاظ آماری، معنی‌دار بود و در ۲۰ درصد PRP، بالاترین اثر حفاظتی بر قدرت حیاتی و متابولیک سلول‌های گلیال B92 مشاهده گردید (نمودار ۱).

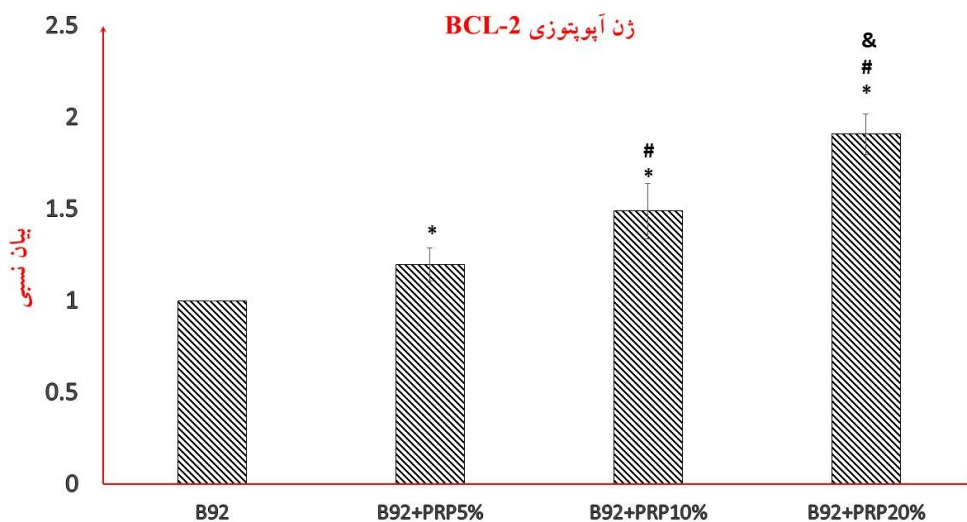
نتایج حاصل از آزمایش MTT، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین گروه کنترل و سلول‌های تحت تیمار با PRP بود (نمودار ۱). تیمار سلول‌های گلیال B92 با PRP به صورت پله‌کانی و کاملاً وابسته به درصد PRP، باعث افزایش قدرت حفاظتی بر قدرت حیاتی و متابولیک این



نمودار ۱. ارزیابی قابلیت زنده ماندن سلول‌های سرطانی گلیال رده B92 تیمار شده با پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) ۰، ۵، ۱۰، ۲۰ درصد، سطح $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی دار در تمامی محاسبات در نظر گرفته شده است. (* نشان دهنده اختلاف معنی دار نسبت به گروه سلول‌های سرطانی گلیال B92، # نشان دهنده اختلاف معنی دار نسبت به گروه سلول‌های سرطانی گلیال B92 در حضور ۵ درصد PRP و & نشان دهنده اختلاف معنی دار نسبت به گروه سلول‌های گلیال سرطانی رده B92 در حضور ۱۰ درصد PRP است).

به درصد PRP باعث افزایش بیان ژن BCL-2 نسبت به سلول‌های B92 بدون تیمار شده است (نمودار ۲).

مقایسه میزان بیان ژن BCL-2 نشان داد که مجاورت سلول‌های گلیال B92 با PRP به تنهایی، به صورت وابسته

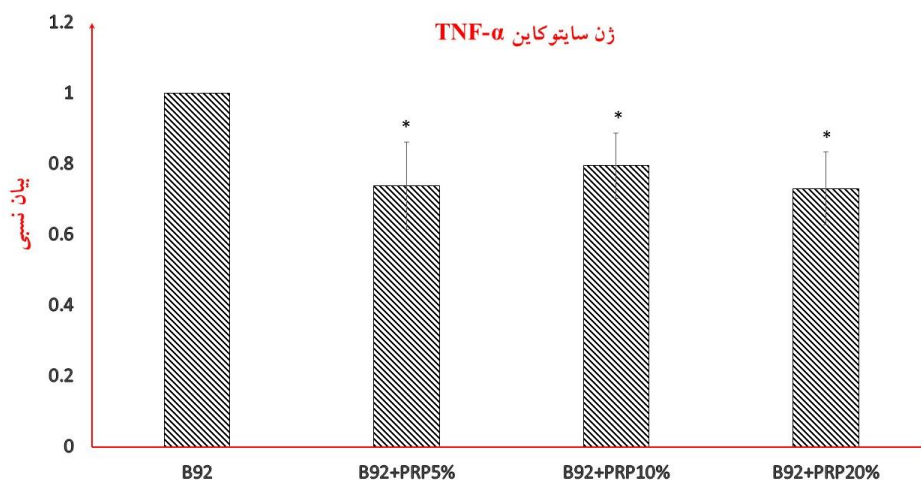


نمودار ۲. نمودار بیان ژن آپوپتوزی BCL-2، در سلول‌های سرطانی گلیال رده B92 تیمار شده با پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) ۰، ۵، ۱۰، ۲۰ درصد، سطح $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی دار در تمامی محاسبات در نظر گرفته شده است. (* نشان دهنده اختلاف معنی دار نسبت به گروه سلول‌های سرطانی گلیال B92، # نشان دهنده اختلاف معنی دار نسبت به گروه سلول‌های سرطانی گلیال B92 در حضور ۵ درصد PRP و & نشان دهنده اختلاف معنی دار نسبت به گروه سلول‌های گلیال سرطانی رده B92 در حضور ۱۰ درصد PRP است).

البته این کاهش در سطح بیان ژن سایتوکاین $TNF-\alpha$ بدون تفاوت معنی دار بین درصدهای متفاوت PRP یعنی در واقع

براساس نتایج، تیمار سلول‌های گلیال B92 با PRP منجر به کاهش سطح بیان $TNF-\alpha$ شده است (نمودار ۳).

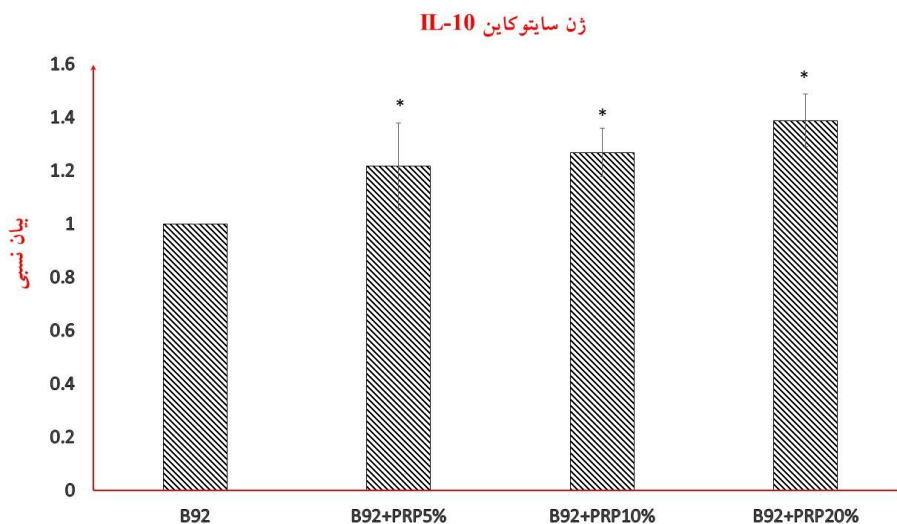
به صورت کاملاً غیروابسته به درصد PRP، مشاهده گردید (نمودار ۳).



نمودار ۳. نمودار بیان ژن سایتوکاین TNF-α، در سلول‌های سرطانی گلیال رده B92 تیمار شده با پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) ۰، ۵، ۱۰، ۲۰ درصد، سطح $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌دار در تمامی محاسبات در نظر گرفته شده است. (* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه سلول‌های سرطانی گلیال B92).

گلیال B92 با PRP به صورت غیروابسته به دوز (بدون تفاوت معنی‌دار بین درصدهای مختلف PRP) موجب افزایش سطح بیان ژن سایتوکاین ضدالتهابی IL-10 شد (نمودار ۴).

به منظور سنجش اثر ضدالتهابی PRP بر سلول‌های گلیال B92، بیان ژن سایتوکاین ضدالتهابی IL-10 سنجیده شد. در همین راستا نتایج این تحقیق نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح بیان این ژن در گروه‌های تیمار شده نسبت به گروه کنترل بود (نمودار ۴).



نمودار ۴. نمودار بیان ژن سایتوکاین IL-10، در سلول‌های سرطانی گلیال رده B92 تیمار شده با پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) ۰، ۵، ۱۰، ۲۰ درصد، سطح $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی‌دار در تمامی محاسبات در نظر گرفته شده است. (* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه سلول‌های سرطانی گلیال B92).

پلاکت‌ها روی سلول‌های سرطان گلیال B92 از مجاورت سلول‌های گلیال B92 با PRP استفاده کردیم. PRP غنی از

۴. بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر به منظور شبیه‌سازی اندرکنش درون‌تنی

درصد PRP رشد سلول‌های گلیال B92 را القا می‌کند؛ به طوری که با ۲۰ درصد PRP در محیط کشت، بالاترین میزان قابلیت زنده‌مانی و قدرت تکثیری مشاهده شد.

پروتئین BCL-2 از جمله پروتئین‌های ضد آپوپتوزی است که در غشای خارجی میتوکندری‌ها مستقر می‌باشد (۲۶). کاهش بیان ژن در بسیاری از سرطان‌ها از جمله گلیومای انسانی مقاوم به دارو به خوبی نشان داده شده است (۲۷). نتایج تحقیق ما نیز نشان داد که PRP به صورت وابسته به دوز موجبات افزایش بیان ژن BCL-2 را فراهم می‌دارد. در همین راستا در گذشته نیز نشان داده شده است که فاکتورهای رشد موجود در PRP، پس از اتصال به گیرنده‌های خود، موجب افزایش بیان پروتئین ضد آپوپتوزی BCL-2 و در نهایت، افزایش بقا و تکثیر سلول‌های فولیکول پیوندی می‌شوند (۲۸-۲۹). در مجموع، ارزیابی دو آزمون بالا نشان داد که احتمالاً در شرایط درون‌تنی، پلاکت‌ها از طریق ممانعت از آپوپتوز، موجب افزایش قدرت تکثیر و رشد سلول‌های گلیال B92 را فراهم می‌دارند.

سایتوکاین $TNF-\alpha$ در فرایندهایی از قبیل آپوپتوز، بقای سلول‌ها و همچنین التهاب و واکنش‌های ایمنی نقش بازی می‌کند. با توجه به اثرات ضد توموری مناسبی که از این سایتوکاین دیده شده است، امروزه از آن در درمان برخی از تومورها از قبیل سارکوم‌های بافت نرم و ملانومای مهاجم استفاده می‌شود (۳۰). بسته به نوع گیرنده درگیر $TNFR-1$ ، در سلول‌های ایمنی عمدتاً $TNF-\alpha$ موجب تکثیر و القای فعال‌سازی آن‌ها را فراهم می‌آورد (۳۱). نتایج این تحقیق نشان داد که میزان بیان ژن سایتوکاین $TNF-\alpha$ به دنبال تیمار سلول‌های گلیال B92 با PRP کاهش یافته است. البته این کاهش در سطح بیان ژن سایتوکاین $TNF-\alpha$ بدون تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های متفاوت PRP یعنی در واقع به صورت کاملاً غیروابسته به غلظت PRP، مشاهده گردید. بنابراین این کاهش سطح $TNF-\alpha$ نیز ممکن است که یکی از عوامل افزایش‌دهنده بقا و تکثیر سلول‌های B92 توسط PRP باشد. بیان این نکته لازم است که در سلول‌های غیردخیل در سیستم ایمنی، عمدتاً گیرنده $TNFR-2$ بیان می‌گردد. این گیرنده به صورت عمده در راه‌اندازی مسیرهای خارجی آپوپتوز نقش دارد (۳۲). همچنین از آنجایی که این سایتوکاین در راه‌اندازی پاسخ‌های ایمنی نیز نقش دارد، کاهش بیان آن در نهایت،

فاکتورهای رشد؛ از قبیل EGF ، $IGF1$ ، FGF ، $TGF\beta$ ، $PDGF$ ، $VEGF$ ، می‌باشند. تمامی این فاکتورهای رشد، به نوعی، در التیام زخم، پیشرفت کموتاکسی سلول‌های ایمنی، ساخت کلاژن تیپ یک، میتوز، پرولیفراسیون سلولی، تکامل سلولی برای احیای بافتی و آنژیوژنز، نقش دارند (۱). پلاسمای غنی از پلاکت همچنین حاوی سه پروتئین فیبرین، فیبرونکتین و ویترونکتین است که می‌تواند به عنوان مولکول‌های چسبنده سلول برای القای استخوان‌سازی، ماتریکس استخوانی، بافت هم‌بند و مهاجرت اپیتلیال عمل کند (۱۹-۲۰). فاکتورهای رشد موجود در پلاسمای غنی از پلاکت، هرگز به سلول یا هسته آن وارد نمی‌شود و از طریق تحریک گیرنده‌های غشای خارجی سلول‌های بنیادی، فیبروبلاست‌ها و سلول‌های اپیدرمی عمل می‌کند؛ بنابراین پلاسمای غنی از پلاکت، توانایی برای ایجاد تومور را ندارند (۲۱-۲۳). حال آن که نتایج ما نشان داد که PRP علی‌رغم اینکه در گذشته نشان داده شده است که تومورزا نیست ولی در رشد و گسترش سلول‌های توموری گلیال B92 نقش ایفا می‌کند.

در گذشته، نشان داده شده است که PRP موجب افزایش چشم‌گیری در عملکرد واحدهای فولیکولی پیوند شده در جراحی پیوند مو از طریق تولید فاکتورهای رشد شده است. این عوامل رشد، با اتصال به گیرنده‌ها، موجب فعال‌سازی چرخه‌های $MAPK/ERK$ می‌شوند که فعال‌سازی این چرخه‌ها، به تکثیر، تمایز و بقای سلولی می‌انجامد و در نهایت باعث افزایش بقا و تکثیر این سلول‌ها می‌گردند (۲۳-۲۴). آزمون MTT به عنوان یک شیوه مناسب و ارزان برای سنجش میزان تقسیمات سلولی و ارزیابی قابلیت زنده‌مانی سلول‌ها استفاده می‌شود. سلول‌های فعال و زنده پس از برداشت ماده MTT، طی فرایند عادی تنفس سلولی و طی چرخه انتقال الکترون میتوکندری، ماده MTT را به کریستال‌های فورمازون تبدیل می‌کنند (۲۷). بنابراین نتایج این آزمون، علاوه بر تعداد سلول‌های زنده موجود در محیط به قدرت حیاتی و متابولیک سلول‌های موجود نیز وابسته خواهد بود مشابه با نتایج قبلی که حاکی از تقویت مسیرهای رشد و تمایز سلولی از قبیل مسیر $MAPK/ERK$ توسط PRP در فولیکول‌های موی پیوندی بوده است (۲۳-۲۵). نتایج این تحقیق نیز نشان داد که PRP به صورت کاملاً وابسته به

5. Platelet Derived Growth Factor
6. Vascular Endothelial Growth Factor
7. Tumor necrosis factor receptor-1
8. Tumor necrosis factor receptor-2

1. Transforming Growth Factor- β
2. Epidermal Growth Factor
3. Insulin-like Growth Factor 1
4. Fibroblast Growth Factor

پستان، استفاده از PRP به بهبود بازسازی ضایعات پس از برداشت پستان کمک می‌کند (۱۴). البته با توجه به نتایج این تحقیق باید این احتمال را در نظر گرفت که استفاده از PRP به منظور بازسازی ضایعات پس از جراحی بافت‌های سرطانی ممکن است که به تقویت رشد معدود سلول‌های سرطانی باقی‌مانده کمک کند و به این ترتیب منجر به عود مجدد سرطان شود.

در کل به نظر می‌رسد که پلاکت‌ها به واسطه فاکتورهای رشد فراوانی که دارد بر سلول‌های گلیال B92 نیز تأثیرات قوی پیش‌برنده رشد و تکثیر و مانع‌شونده از ایجاد پاسخ‌های ایمنی دارند. با این وجود، تحقیق حاضر یک تحقیق مقدماتی است و لازم است که در آینده، مطالعات بیشتری در رابطه با مسیرهای سلولی که توسط PRP در سلول منجر به این اثر حفاظتی بر سلول‌های گلیال می‌گردد، صورت پذیرد.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل پایان‌نامه کارشناس‌ارشد مهتاب پورکمال‌زاده در رشته ایمنی‌شناسی می‌باشد که با پشتیبانی مالی معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه انجام شده است.

تعارض منافع

بدین وسیله نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

منجر به کاهش پاسخ‌های ایمنی و به عبارتی فرار سلول‌های گلیال از سیستم ایمنی خواهد شد (۳۰).

IL-10 یا ICSIF^۱ (فاکتور مهارکننده سنتز سایتوکاین التهابی)، یک مهارکننده قوی پاسخ‌های التهابی و ایمنی سلولی است و از تولید سایتوکاین‌های سلول‌های T فعال جلوگیری کرده و مهارکننده قوی انفجار تنفسی رادیکال‌های آزاد اکسیژن و نیتریک اکساید در ماکروفاژهاست (۳۲-۳۳). IL-10 باعث مهار بروز سایتوکاین‌های التهابی نظیر TNF- α ، IL-6، IL-1 از ماکروفاژ است. بسیاری از سلول‌های توموری، از طریق افزایش بیان این سایتوکاین، موجبات گسترش خود و فرار از سیستم ایمنی را ایجاد می‌کنند (۳۴). در همین راستا نتایج ما نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح بیان این ژن در گروه‌های تیمار شده نسبت به گروه کنترل بود. تیمار سلول‌های گلیال B92 با PRP به صورت غیروابسته به غلظت (بدون تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف PRP) موجب افزایش سطح بیان ژن سایتوکاین ضدالتهابی IL-10 شد. در مجموع، پس از ارزیابی میزان بیان دو سایتوکاین TNF- α و IL-10 می‌توان این طور نتیجه‌گیری کرد که پلاکت‌ها در محیط توموری سلول‌های گلیوما از طریق افزایش بیان IL-10 و کاهش بیان TNF- α مانع از ایجاد پاسخ‌های مؤثر ایمنی علیه سلول‌های توموری گلیال می‌شوند.

نشان داده شده است که PRP موجب افزایش تکثیر و تولید فاکتورهای نوروتروفیک توسط سلول‌های شوان در شرایط آزمایشگاهی شده است (۳۵). همچنین گزارش شده است که در شرایط سرطان پستان پس از برداشت بافت

References

- [1]. Zhang W, Guo Y, Kuss M, Shi W, Aldrich AL, Untrauer J, et al. Platelet-Rich Plasma for the Treatment of Tissue Infection: Preparation and Clinical Evaluation. *Tissue Eng Part B Rev.* 2019;25(3):225-36.
- [2]. Alves R, Grimalt R. A review of platelet-rich plasma: history, biology, mechanism of action, and classification. *Skin appendage disorders* 2018; 4(1): 18-24.
- [3]. Liu CJ, Yu K, Bai J-B, Tian D, Liu G. Platelet-rich plasma injection for the treatment of chronic Achilles tendinopathy: A meta-analysis. *Medicine* 2019; 98(16): 123-98.
- [4]. Filardo G, Kon E, Buda R, Timoncini A, Di Martino A, Cenacchi A, et al. Platelet-rich plasma intra-articular knee injections for the treatment of degenerative cartilage lesions and osteoarthritis. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 2018; 19(4): 528-535.
- [5]. Meheux CJ, McCulloch P, Lintner D, Varner K, Harris D. Efficacy of intra-articular platelet-rich plasma injections in knee osteoarthritis: a systematic review. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 2016; 32(3): 495-505.
- [6]. Johal H, Khan M, Yung S-HP, Dhillon MS, Fu FH, Bedi A, et al. Impact of Platelet-Rich Plasma Use on Pain in Orthopaedic Surgery: A Systematic Review and Meta-analysis. *Sports Health.* 2019;11(4):355-66.
- [7]. Campbell K, Götze M. Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends in neurosciences* 2018; 25(5): 235-238.
- [8]. Fuente-Martin E, Garcia-Caceres C, Morselli E, Clegg DJ, Chowen A, Finan B. Estrogen, astrocytes and the neuroendocrine control of metabolism. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 2019; 14(4): 331-338.
- [9]. khezri S, Salehhaggho L, Abtahi Foroushani SM. The protective role of glycyrrhizin on ethanol- damaged B92 glial cells in vitro. *Armaghane danesh* 2019; 24-(3).
- [10]. Jamalidoust M, Ravanshad M, Namayandeh M, Zare M, Asaei S, Zivaevan M. Construction of AAV-rat-IL4 and evaluation of its modulating effect on A β (1-42)-induced

- proinflammatory cytokines in primary microglia and the B92 cell line by quantitative PCR assay. *Jundishapur journal of microbiology* 2016; 9(3).
- [11]. Shen K, Luk S, Hicks DF, Elman JS, Bohr S, Iwamoto Y, et al. Resolving cancer-stroma interfacial signalling and interventions with micropatterned tumour-stromal assays. *Nature communications* 2014; 5: 5662.
- [12]. Gao Y, Bado I, Wang H, Zhang W, Rosen JM, Zhang XHF. Metastasis Organotropism: Redefining the Congenial Soil. *Dev Cell*. 2019;49(3):375-91.
- [13]. Andrade SS, Sumikawa JT, Castro ED, Batista FP, Paredes-Gamero E, Oliveira LC, et al. Interface between breast cancer cells and the tumor microenvironment using platelet-rich plasma to promote tumor angiogenesis-influence of platelets and fibrin bundles on the behavior of breast tumor cells *Oncotarget* 2017; 8(10): 16851.
- [14]. Syllaios A, Tsimpoukelis A, Vagios I, Kyros E, Davakis S. Breast reconstruction with autologous fat combined with platelet rich plasma: fighting between medical novelty and cancer biology. *Journal of BU ON, official journal of the Balkan Union of Oncology* 2019; 24(4): 1516-1520.
- [15]. Barbieri A, Bimonte S, Loquercio G, Rea D, Cascella M, et al. The effects of the use of platelet-rich plasma gel on local recurrence in an animal model of human fibrosarcoma. *Infectious agents and cancer* 2019; 14(1): 1-7.
- [16]. Lee I, Jang H, Park S, Myung H, Kim K, et al. Platelet-rich plasma activates AKT signaling to promote wound healing in a mouse model of radiation-induced skin injury. *Journal of translational medicine* 2019; 17(1): 1-10.
- [17]. Lv Y, Zhao SG, Lu G, Leung CK, Xiong ZQ, Su, et al. Identification of reference genes for qRT-PCR in granulosa cells of healthy women and polycystic ovarian syndrome patients. *Scientific reports* 2017; 7(1): 6961.
- [18]. Van De Moosdijk AA, Van Amerongen R. Identification of reliable reference genes for qRT-PCR studies of the developing mouse mammary gland. *Scientific reports* 2016; 6(11): 35595.
- [19]. Trams E, Kulinski K, Kozar-Kaminska K, Pomianowski S, Kaminski R. The Clinical Use of Platelet-Rich Plasma in Knee Disorders and Surgery-A Systematic Review and Meta-Analysis. *Life (Basel)*. 2020;10(6):94.
- [20]. Mariani E, Pulsatelli L. Platelet Concentrates in Musculoskeletal Medicine. *Int J Mol Sci*. 2020;21(4):1328.
- [21]. Wang X, Zhang Y, Choukroun J, Ghanaati S, Miron R. Behavior of gingival fibroblasts on titanium implant surfaces in combination with either injectable-PRF or PRP. *International journal of molecular sciences* 2017; 18(2): 331.
- [22]. Kakudo N, Minakata T, Mitsui T, Kushida S, Notodihardjo FZ, Kusumoto K. Proliferation-promoting effect of platelet-rich plasma on human adipose-derived stem cells and human dermal fibroblasts. *Plast Reconstr Surg* 2008; 122(5): 1352-60.
- [23]. Navarro M, Asín M, Martínez M. Management of androgenetic alopecia: a comparative clinical study between plasma rich in growth factors and topical minoxidil. *Eur J Plast Surg* 2016; 39: 173-80.
- [24]. Vieira L, Carling C, Barbieri FA, Aquino R, Santiago P. Match running performance in young soccer players: A systematic review. *Sports Medicine* 2019; 49(2): 289-318.
- [25]. Zarei L, abtahi foroshani M, Garajedagi A. The effects of *Bifidobacterium Bifidum* (BBCWF) on proliferation of K562 cell line. *J Fasa Univ Med Sci* 2017; 7 (1) :21-27.
- [26]. Aharoni-Simon M, Shumiatcher R, Yeung A, Shih AZ, Dolinsky VW, Doucette CA, et al. Bcl-2 regulates reactive oxygen species signaling and a redox-sensitive mitochondrial proton leak in mouse pancreatic β -cells. *Endocrinology* 2016; 157(6): 2270-2281.
- [27]. Meng L, Ma P, Cai R, Guan Q, Wang M, Jin B. Long noncoding RNA ZEB1-AS1 promotes the tumorigenesis of glioma cancer cells by modulating the miR-200c/141-ZEB1 axis. *Am J Transl Res*. 2018;10(11):3395-412.
- [28]. Singh B, Goldberg LJ. Autologous platelet-rich plasma for the treatment of pattern hair loss. *American journal of clinical dermatology* 2016; 17(4): 359-367.
- [29]. Chen L, Duan H, Xie F, Gao Z, Wu X, Chen F, et al. Tetrahydroxystilbene Glucoside Effectively Prevents Apoptosis Induced Hair Loss. *BioMed research international* 2018; 85(4): 283-9.
- [30]. Cruceriu D, Baldasici O, Balacescu O, Berindan-Neagoe I. The dual role of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in breast cancer: molecular insights and therapeutic approaches. *Cell Oncol (Dordr)*. 2020;43(1):1-18.
- [31]. Josephs SF, Ichim TE, Prince SM, Kesari S, Marincola FM, Escobedo AR, et al. Unleashing endogenous TNF-alpha as a cancer immunotherapeutic. *J Transl Med*. 2018;16(1):242.
- [32]. Zhang H, Madi A, Yosef N, Chihara N, Awasthi A, Pot C, et al. Transcriptional regulation of IL-10 in T helper cells 2019; 44(5): 207-214.
- [33]. Ouyang W, O'Garra A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. *Immunity*. 2019;50(4):871-91.
- [34]. Rojas JM, Avia M, Martín V, Sevilla N. IL-10: a multifunctional cytokine in viral infections. *Journal of immunology research* 2017; 42(7): 38-88.
- [35]. Zheng C, Zhu Q, Liu X, Huang X, He C, et al. Effect of platelet - rich plasma (PRP) concentration on proliferation, neurotrophic function and migration of Schwann cells in vitro. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 2016; 10(5): 428-436.

The effect of Platelet Rich Plasma (PRP) on the B92 Glial Cell

Mahtab Pourkamalzadeh¹, Seyyed Meysam Abtahi froushani^{2*}, Alireza Mahmoudian³

1. Master of Science in immunology, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
2. Associate Professor of immunology, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran
3. Assistant Professor of virology, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Abstract

Introduction: In previous studies, the crosstalk between some cancer cells and platelets have been documented. The purpose of the present study was to evaluate the effects of platelet-rich plasma (PRP) on B92 glial cancer cells.

Materials and Methods: In this experimental study, 1×10^6 B92 cells were treated with Platelet-rich plasma (PRP) for different of 0, 5, 10 and 20 percent of cutler media for 24 h. The morphological changes of the treated cells were evaluated by inverted light microscopy. The effects of PRP on the proliferation rate of cells were measured using the tetrazolium salt reduction test (dimethyl thiazole-diphenyltetrazolium bromide, MTT). QRT-PCR technique was used to evaluate the expression level of TNF α , IL-10 and BCL-2 genes.

Results: The results of the MTT reduction test showed that PRP promotes B92 glial cell growth in a dose-dependent manner. PRP in a dose-dependent manner also increased BCL-2 gene expression. The expression of the TNF- α cytokine gene was decreased in a non- percent-dependent manner after the treatment of B92 glial cells with PRP. Treatment of B92 glial cells with PRP promoted a significant increase in the expression level of the gene of anti-inflammatory IL-10 cytokine.

Conclusion: In the microenvironment of cancer, platelets promote the growth and proliferation of B92 glial cells and their escape from immune responses.

Received: 2019/12/03

Accepted: 2020/01/06

Keywords: Platelet-Rich Plasma (PRP), B92 Glial Cells, IL-10, TNF-A, BCL-2.