مطالعه تجربی تاثیر سوپرناتانت پلاکتی خودی (Platelet Supernatant) در التیام زخم سوختگی قرنیه در خرگوش

مسلمی، ح.ر.[۱*]، هاشمی منصور، د.[۲].

دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۱۲ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۲۰

خلاصه

زخم قرنیه یکی از بیمارهای شایع چشم است که در اثر ضربه، مواد شیمیایی و یا برخی عوامل میکروبی اتفاق می‌افتد. در این مطالعه تاثیر سوپرناتانت پلاکتی بر ترمیم زخم سوختگی قرینه ۳۰ قطعه خرگوش سفید نیوزلندی نر بالغ بررسی شد. بعد از بیهوشی، فیلترهای کاغذی ۶ میلی‌متری آغشته به سود یک نرمال، به مدت ۶۰ ثانیه در مرکز چشم قرار گرفت. سپس در گروه یک، از سوپرناتانت پلاکتی خودی، در گروه دوم از قطره‌های چشمی آتروپین و سیپروفلوکساسین (هر ۱۲ ساعت یک‌قطره و به‌مدت ۱۰ روز) و در گروه سوم، از نرمال سالین استفاده شد. در روزهای پنجم و دهم از هر گروه تعداد ۵ خرگوش آسان‌کشی شده و از محل زخم نمونه گیری شد. پس از تهیه مقاطع میکروسکوپی و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین‌ـائوزین، میزان هیپرپلازی بافت پوششی، تغییرات واکوئولی در اپیتلیوم و میزان التهاب بررسی شد. نتایج هیستوپاتولوژی نشان داد که بین گروه سوپرناتانت‌پلاکتی با دو گروه دیگر اختلاف معنی‌دار بود. در حالیکه بین دو گروه درمان شده با آتروپین/سیپروفلوکساسین و کنترل اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. مشخص گردید، سوپرناتانت پلاکتی به دلیل دارا بودن فاکتورهای رشد مورد نیاز جهت تکثیر، تمایز و رشد سلول‌های اپیتلیال لیمبوس باعث بهبود زخم قلیایی قرنیه در مدل حیوانی خرگوش می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: سوپرناتانت پلاکتی، زخم قرنیه، خرگوش

---

۱ . استادیار گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران.
۲. دانش آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، گرمسار، ایران.
*نویسنده مسئول: h.moslemi@semnan.ac.ir

مقدمه

قرنیه، پنجره شفاف چشم است که به تمرکز نور برای تشکیل تصویری از دنیای بیرون کمک می‌کند. قرنیه‌ی سالم یکی از مهمترین عوامل بینایی چشم محسوب می‌شود که بصورت یک سد فیزیکی، از چشم در برابر محیط خارج محافظت می‌نماید. در نتیجه آسیب به آن می‌تواند منجر به کدورت قرنیه، اختلال در بینایی و حتی کوری گردد (Pang و همکاران، ۲۰۱۰). هرگونه آسیب در این لایه، شفافیت و توانایی محافظت آن را از بین می‌برد. قرنیه کم سلول و بدون رگ است و عوامل باکتریایی، ویروسی، انگلی و قارچی متعددی می‌توانند سبب عفونتهای شدیدی در قرنیه شوند (Sridhar، ۲۰۱۸). سوختگی‌های قلیایی قرنیه، جدیدترین و خطرناکترین شکل سوختگیهای شیمیایی هستند که بطور معمول پیش‌آگهی خوبی ندارند. زخم‌های سوختگی چشم در ابتدا به لایه اپی‌تلیال سطحی آسیب می‌رساند، اما می‌تواند به ساختارهای عمیق‌تر چشم و پلک‌ها نیز آسیب برساند. یکی از ویژگی‌های سوختگی حاد، ایجاد نقص در اپی‌تلیال است. این نقص می‌تواند پس از یک سوختگی جزئی به‌طور کامل بهبود یابد. با این حال، اگر سوختگی به سلول‌های بنیادی بخشی از لیمبوس آسیب برساند، اپی‌تلیوم طبیعی مرکزی آن ناحیه ممکن است بهبود نیابد. سپس قرنیه توسط یک نوع اپی‌تلیوم متفاوت که از نظر عملکردی از ملتحمه محیطی مشتق شده، پوشیده می‌شود و ممکن است هفته‌ها یا ماه‌ها طول بکشد و قرنیه ممکن است تیره و واسکولاریزه شود. در غیاب پوشش اپی‌تلیال، خطر بیشتر آن است که بافت‌های عمیق‌تر قرنیه (استروما) در معرض قرار گرفته و به تدریج نازک‌تر شده و در نهایت سوراخ شود (Lorenzana-Blanco و همکاران، ۲۰۲۲).

ترمیم زخم یک فرآیند پیچیده است که شامل انواع مختلف سلول‌ها، فاکتورهای رشد و سایر پروتئین‌هایی است که با یکدیگر تعامل دارند و منجر به ترمیم سریع و کارآمد ضایعه می‌شوند. پلاکت ها نقش اصلی را در ترمیم/بازسازی بافت ایفا می کنند که علاوه بر خاصیت هموستاتیک، ظرفیت آزادسازی یک سری فاکتورهای رشد است که در ترمیم ضایعه نقش دارند. به همین دلیل، استفاده از اجزای خون، در چند سال اخیر به سرعت در موارد بالینی مختلف گسترش یافته است. با توجه به غلظت بالای پلاکت ها، ژل پلاکتی حاوی مقدار قابل توجهی از فاکتورهای رشد ترشح شده توسط پلاکت های فعال می‌باشد. این عوامل رشد شامل فاکتور رشد مشتق از پلاکت، فاکتور رشد تومور-β، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی، فاکتور رشد اپیتلیالی، فاکتور رشد شبه انسولین و فاکتور رشد فیبروبلاستی می باشد. سوپرناتانت پلاکتی یکی از کنستانتره های پلاکتی است که از سانتریفیوژ دوباره پلاسمای غنی از پلاکت بدست می‌آید. مشخص شده است که سانتریفیوژ دوباره پلاسمای غنی از پلاکت با فعال سازی و تخریب مکانیکی پلاکت‌ها باعث رهاسازی بیشتر گرانول های α پلاکتی حاوی فاکتورهای رشد شده و سرعت ترمیم زخم را افزایش می‌دهند (Dohan Ehrenfest و همکاران، ۲۰۱۲).

لذا با توجه به اثرات مثبت فاکتورهای رشد بر فرآیند ترمیم زخم و مشکلات ایجاد شده در زخم های سوختگی چشم، در این مطالعه به بررسی اثر سوپرناتانت پلاکتی روی زخم سوختگی قرنیه در خرگوش پرداختیم.

مواد و روش کار

مدل حیوانی

در این مطالعه از ۳۰ سر خرگوش سفید نیوزلندی نر بالغ و با وزن ۰/۵ ± ۲/۵ کیلوگرم استفاده شد. به منظور پرهیز از استرس و سازگار شدن حیوانات با محیط، هیچگونه آزمایشی به مدت دو هفته روی آنها صورت نگرفت و تمامی حیوانات تحت شرایط محیطی و تغذیه ای یکسان نگهداری شدند. تغذیه خرگوشها با استفاده از پلت آماده مخصوص حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفت و آب نیز بصورت آزاد در اختیار حیوانات قرار داده شد. پروتکل این مطالعه بر اساس بیانیه ARVO و کمیته مراقبت و روش استفاده از حیوانات در تحقیقات چشم پزشکی و به صورتی انجام گرفت که حداقل آزار و تحریک و درد برای حیوان ایجاد شود.

تهیه‌ی سوپرناتانت پلاکتی

به صورت جداگانه از قلب هر خرگوش مقدار ۶ سی‌سی خون اخذ و در لوله‌های حاوی ضدانعقاد سدیم سیترات ریخته شد. جهت تهیه PRP، نمونه‌ها تحت سانتریفیوژ اولیه با دور g ۶۶۰ و به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. سپس

دو سوم از لایه بالایی محلول، با استفاده از میکروپیپت برداشته شده و تحت سانتریفیوژ ثانویه با دور g ۲۳۵۰ و به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند. در ادامه با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر کلرید کلسیم به محلول نهایی،PRP فعال گردید (Li و همکاران، ۲۰۱۲). جهت تهیه سوپرناتانت پلاکتی، پلاسمای غنی از پلاکت فعال تهیه شده در مرحله قبل، به مدت ۱۵ دقیقه و با دور g ۱۶۶۰۰ سانتریفیوژ گردید و مایع شفاف رویی توسط پیپت پاستور برداشت شده و به عنوان سوپرناتانت پلاکتی تا زمان شروع درمان، در یخچال ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

روش جراحی

در روز جراحی، پس از کارگذاری کاتتر وریدی در سیاهرگ جانبی گوش، القای بیهوشی با ترکیب دو داروی کتامین هیدروکلراید (ساخت شرکت آلفاسان هلند) با دوز mg/kg ۶۰ و زایلازین هیدروکلراید (ساخت شرکت آلفاسان هلند) با دوز mg/kg ۵ انجام گردید. جهت ایجاد زخم سوختگی قلیایی از روش Yang و همکاران (۲۰۱۰) استفاده شد. به این منظور بعد از بیهوشی کامل حیوانات و برای ایجاد بی حسی موضعی، در چشم راست هر کدام از خرگوش ها دو قطره تتراکائین ۰/۵ درصد (سینا دارو) ریخته شد. سپس فیلترهای کاغذی به قطر ۶ میلی‌متر را که در محلول سود یک نرمال غوطه ور بودند، به مدت ۶۰ ثانیه در مرکز چشم قرار دادیم تا جراحت مورد نظر ایجاد شود. بعد از ایجاد زخم، کاغذ مذکور را از چشم خارج کرده و چشم‌ها را به مدت ۲ دقیقه با نرمال سالین شستشو دادیم. جهت ایجاد بی‌دردی از داروی فلونکسین مگلومین ۵٪ (ساخت شرکت رویان دارو) به میزان mg/kg ۱ بصورت زیر جلدی استفاده شد.

پس از ایجاد زخم قرنیه، خرگوشها به صورت تصادفی به ۳ گروه تقسیم شدند. سپس در گروه یک، در محل زخم قرنیه از سوپرناتانت پلاکتی، در گروه دوم از نرمال سالین (گروه کنترل) و در گروه سوم از قطره‌های چشمی آتروپین و سیپروفلوکساسین استفاده شد. درمان‌ها بصورت هر ۱۲ ساعت یک قطره و به مدت ۱۰ روز انجام گرفت.

نمونه گیری و ارزیابی هیستوپاتولوژی

از هر گروه تعداد ۵ خرگوش، در روز های پنجم و دهم آسان‌کشی شده و عمل تخلیه چشم انجام گرفت. نمونه ها بلافاصله بعد از تهیّه، در محلول فرمالین ۱۰٪ که قبلاً تهیه شده و در ظروف پلاستیکی جداگانه نگهداری می شده قرار گرفت. محلول فرمالین پس از ۲۴ ساعت با میزان مشابه از محلول جدید تعویض می شد. محلول اولیه بعنوان تثبیت کننده عمل کرده و محلول دوّم نقش نگهدارنده دارد. سپس نمونه ها به آزمایشگاه پاتولوژی منتقل گردید. در ادامه تمامی مراحل از قبیل آبگیری، شفاف سازی، منسجم شدن بافت با عبور از محلول های آب مقطر، الکل، گزیلول و پارافین به طور خودکار انجام گرفت. سپس نمونه ها قالب گیری شده و با روش استاندارد از آنها مقاطعی به قطر ۵ میکرون تهیه شد. برای رنگ آمیزی برش های بافتی از روش متداول هماتوکسیلین ـ ائوزین (H&E) استفاده شد. پس از آماده شدن، اسلایدها توسط میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت. در بررسی هیستوپاتولوژی میزان التیام زخم قرنیه مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور برای دستیابی به میزان التیام در نمونه های مختلف، فاکتورهای میزان هیپرپلازی بافت پوششی (اپیتلیزاسیون)، میزان تغییرات واکوئولی در اپیتلیوم و استروما، میزان التهاب و میزان نکروز (پیکنوز هسته) در لایه های فوق مورد ارزیابی قرار گرفت. این ویژگی ها در تمامی اسلایدها مورد بررسی قرار گرفت و در هر مورد التیام ضعیف با عدد (۱)، التیام متوسط با عدد (۲)، التیام خوب با عدد (۳) و التیام عالی با عدد (۴) نشان داده شد. بر این اساس گروه هایی که اپیتلیزاسیون کامل بهمراه حداقل واکنشهای پاتولوژیک و التهابی را داشتند قطعا روند ترمیم بهتری نسبت به سایر گروه ها خواهند داشت.

نتایج

میانگین و انحراف معیار میزان التیام زخم قرنیه در گروه های مورد مطالعه در روزهای پنجم و دهم در جدول شماره ۱ آمده است. در روز پنجم، در گروه کنترل اپیتلیزاسیون به شکل ناقص و واکوئولیزه شدن در قسمت کلاژن مشاهده شد. در این روز در گروه آتروپین/سیپروفلوکساسین، اپیتلیزاسیون بصورت ناقص، واکوئولیزه شدن شدید در اپیتلیوم و استروما و پیکنوز شدید سلول‌های کراتینوسیت مشاهده گردید. همچنین در گروه سوپرناتانت پلاکتی اپیتلیزاسیون کامل همراه با واکوئولیزه شدن ملایم در ماتریکس کلاژن در استرومای بالایی مشاهده شد (نگاره‌ی ۱). بر این اساس میانگین و انحراف معیار در گروه کنترل، ۱، در گروه آتروپین/سیپروفلوکساسین، ۰/۵۷ ± ۱/۳۳، و در گروه سوپرناتانت پلاکتی، ۳ بدست آمد. در بررسی‌های آماری مشخص گردید که بین گروه سوپرناتانت پلاکتی با

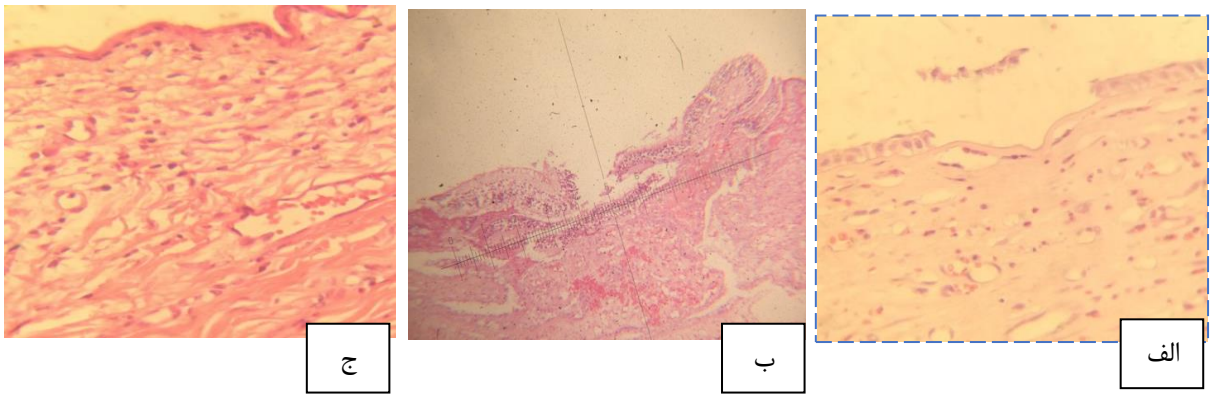
دو گروه دیگر اختلاف معنی‌دار بود ($P \leq 0.05$). در حالیکه بین گروه‌های آتروپین/سیپروفلوکساسین و کنترل اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$).

در روز دهم در گروه کنترل، روند ترمیم قرنیه ضعیف بود. حیوانات فاقد اپیتلیزاسیون کامل قرنیه بودند و واکوئولی شدن استرومای قرنیه وجود داشت. در این روز در گروه آتروپین/سیپروفلوکساسین، درجاتی از تغییرات واکوئولی هم در استروما و هم در اپیتلیوم قرنیه به همراه پیکنوز استروما و اپیتلیوم مشهود بوده و ترمیم بافت پوششی قرنیه (اپیتلیزاسیون) ناقص است. همچنین در گروه سوپرناتانت پلاکتی، اپیتلیزاسیون کامل همراه با واکوئولیزه شدن و پیکنوز ملایم در استرومای بالایی مشاهده شد (نگاره‌ی ۲). بر این اساس میانگین و انحراف معیار در گروه کنترل، ۱/۱۵ ± ۱/۶۶، در گروه آتروپین/سیپروفلوکساسین، ۲ و در گروه سوپرناتانت پلاکتی ۰/۵۷ ± ۳/۳۳ بدست آمد. در بررسی-های آماری مشخص گردید که بین گروه سوپرناتانت پلاکتی با دو گروه دیگر اختلاف معنی دار بود ($P \leq 0.05$). در حالیکه بین گروه‌های درمانی آتروپین/سیپروفلوکساسین و کنترل اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$).

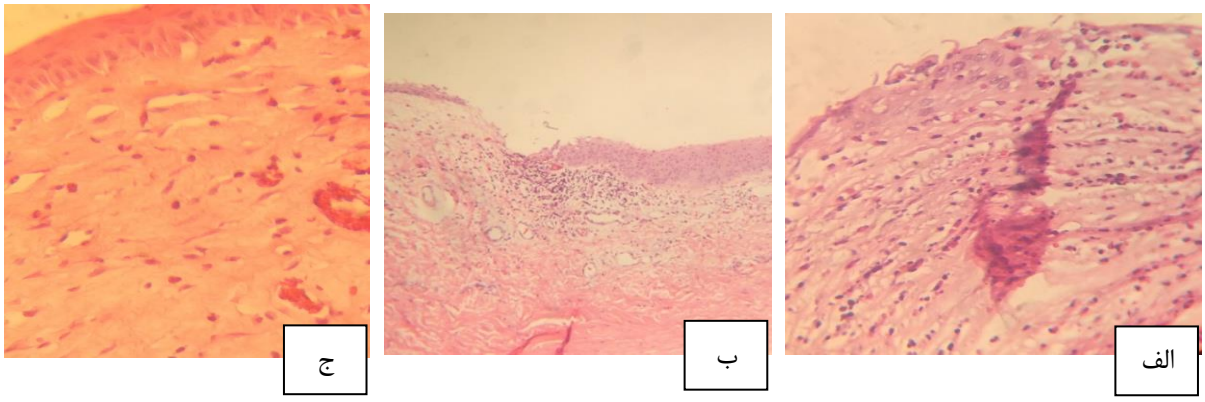
جدول شماره ۳-۱: میانگین و انحراف معیار میزان التیام در گروه های مورد مطالعه

	گروه کنترل	گروه آتروپین/سیپروفلوکساسین	گروه سوپرناتانت پلاکتی
روز پنجم	[a] ۱	[a] ۱/۳۳ ± ۰/۵۷	[b] ۳
روز دهم	[a] ۱/۶۶ ± ۱/۱۵	[a] ۲	[b] ۳/۳۳ ± ۰/۵۷

در هر ردیف حروف غیرهمسان، نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار می باشد ($P \leq 0.05$).



نگاره‌ی ۱- نمای ریزبینی محل جراحت و مقایسه‌ی گروه‌های مورد مطالعه در روز پنجم: الف) در گروه کنترل اپیتلیزاسیون به شکل ناقص و واکئولیزه شدن در قسمت کلاژن مشاهده می‌شود. ب) در گروه آتروپین/سیپروفلوکساسین، اپیتلیزاسیون بصورت ناقص، واکئولیزه شدن شدید در اپیتلیوم و استروما و پیکنوز شدید سلول‌های کراتینوسیت مشاهده می‌گردد. ج) در گروه سوپرناتانت پلاکتی، اپیتلیزاسیون کامل دیده همراه با واکوئولیزه شدن ملایم در ماتریکس کلاژن در استرومای بالایی مشاهده می‌شود.



نگاره‌ی ۲- نمای ریزبینی محل جراحت و مقایسه‌ی گروه‌های مورد مطالعه در روز دهم: الف) در گروه کنترل، اپیتلیزاسیون به شکل ناقص دیده می شود. در قسمت فوقانی استروما پیکنوز شدید و واکئولیزه شدن شدید در اپیتلیوم و کلاژن ماتریکس مشاهده می‌شود. ب) در گروه آتروپین/سیپروفلوکساسین، اپیتلیزاسیون ناقص، واکئولیزه شدن شدید در کلاژن قسمت فوقانی و پیکنوز سلول های کراتینوسیت مشاهده می-گردد. ج) در گروه سوپرناتانت پلاکتی، اپیتلیزاسیون کامل همراه با واکوئولیزه شدن و پیکنوز ملایم در استرومای بالایی مشاهده می شود.

بحث و نتیجه گیری

زخم قلیایی یکی از شایعترین صدمات قرنیه ای می باشد. بروز علایم بسته به عوامل، شدت و مدت زمان تماس بسیار متنوع است و می تواند از یک قرمزی خفیف چشم تا از دست دادن کامل بینایی متغیر باشد. هرگونه زخم پایدار یا کدورت اپیتلیوم قرنیه می تواند به کاهش دید چشم منجر شود. اصل اساسی در ترمیم نقص سطح چشم، رشد و تمایز سلولهای جدید لیمبوس و تبدیل شدن آنها به سلولهای ملتحمه و قرنیه می باشد. بهبود زخم قرنیه به واسطه پروتئین های زیادی که شرایط مهاجرت، تکثیر و تمایز سلول های لیمبوس را فراهم می کنند، انجام می پذیرد. این پروتئین ها شامل؛ فـاکتور رشد اپیتلیالی، فاکتور رشد فیبروبلاستی و فاکتور رشد پلاکتی می باشند که به صورت محلول در اشک بر سطح چشم پخش می شوند (Lorenzana-Blanco و همکاران، ۲۰۲۲).

درمان زخم قرنیه، از دغدغه های همیشگی علم چشم پزشکی است. دلیل این امر نیز به خاطر اهمیت بالای قرنیه در ایجاد و حفظ دید طبیعی می باشد. زخم قلیایی قرنیه واکنش التهابی شدیدتری را نسبت به آسیبهای ناشی از تروما ایجاد می کند. این التهاب شدید می تواند با مهار رشد اپیتلیوم طبیعی منجر به ایجاد فیبروز یا اسکار در سطح قرنیه گردد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد، سوپرناتانت پلاکتی باعث تسریع بهبود زخم قلیایی قرنیه در مدل خرگوش در مقایسه با گروه درمانی آتروپین/سیپروفلوکساسین و گروه کنترل می شود. تسریع در روند التیام می تواند به خاطر دارا بودن فاکتورهای رشد مورد نیاز جهت تکثیر، تمایز و رشد سلول های اپیتلیال لیمبوس و سایتوکاین های ضد التهابی موجود در سوپرناتانت پلاکتی باشد (Ríos و همکاران، ۲۰۱۵).

در مطالعه لی و همکاران مشخص گردید که پلاکتها در عروق لیمبال تجمع یافته و نوتروفیلها از عروق به سمت محل آسیب دیده مهاجرت می کنند. نتایج یافته شده درموشها ایجاد ترومبوسیتوپنی به طور معنی داری روند ترمیم را به مخاطره انداخته و ترانسفیوژن دوباره پلاکتها بر عکس عمل می نماید. نتیجه اینکه موضعی شدن پلاکتها در عروق لیمبال در قرنیه های زخم شده نقشی اساسی در نوزایی بافت پوششی دارد (Li و همکاران، ۲۰۰۶). این مطالعه در اساس با موضوع مطالعه حاضر مشابه می باشد که هر دو به نقش مهم و کاملا اساسی پلاکتها و تأثیر به سزای آن در ترمیم قرنیه اشاره دارد. رید و همکاران بیا داشتند که تجویز موضعی قطره های سرم خون اتولوگ به طور موفقیت آمیزی در درمان اختلالات سطحی تا شدید چشم کارایی دارند (Reid و همکاران، ۲۰۰۵). که تحقیق حاضر نیز از این لحاظ با نتایج بررسی ایشان همخوانی دارد. آندرا و همکاران نیز طی یک تحقیق بیان داشتند که استفاده از PRP به کاهش نهایی قطر زخم می انجامد (Andrea و همکاران، ۲۰۰۸). نیشیجیما و همکاران دریافتند که پلاکتها نقش عمده ای در فراخوانی و موضعی شدن یا جاگیری لوکوسیتها در التهاب حاد قرنیه دارند (Nishijima و همکاران، ۲۰۰۴). کوپر و همکاران نیز مشخص نمودند که خود لوکوسیتها دوباره در تجمع پلاکتها نقش دارند (Cooper و همکاران، ۲۰۰۳). همچنین نقش پلاکت‌ها در کاهش و تعدیل پاسخ التهابی و آسیب بافتی و همچنین تسریع ر روند درمان درمان مشخص شده است (Gawaz و همکاران، ۲۰۰۵؛ Kuligowski و همکاران، ۲۰۰۶).

پلاکت‌ها نقش مهمی در ترمیم زخم داشته و نقش کلیدی در هموستاز و ترمیم زخم به دنبال آسیب بافتی دارند (Borzini و همکاران ۲۰۰۵). بلافاصله بعد از تروما، پلاکت‌ها، فیبرینوژن را به عنوان فاکتور انعقادی به لخته فیبرینی تبدیل نموده و بنابراین دارای خاصیت هموستاتیک می باشند. فاکتورهای رشد پلاکتی که از پلاکت های فعال شده آزاد می‌گردند نقش مهمی در نتایج حاصله دارند. اهم

این فاکتورها شامل فاکتور رشد مشتق از پلاکت (Platelet-Derived Growth Factors- PDGF)، فاکتور رشد ترانسفورمینگ (Transforming Growth Factors-β- TGFβ)، فاکتور رشد اپی تلیال (Epithelial Growth Factor- EGF)، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (Vascular Endothelial Growth Factor- VEGF)، فاکتور رشد فیبرو بلاست (FibroblastGrowth Factor- FGF) و فاکتور رشد شبه انسولین (Insulin like Growth Factor- IGF) می باشند که باعث فراخوانی سلول های تمایز نیافته به محل التهاب و آغاز تقسیم سلولی می شوند. یکی از مکانیسم‌های احتمالی که توسط آن پلاکت‌ها به اپیتلیزاسیون مجدد کمک می‌کنند، رساندن فاکتورهای رشد به ناحیه لیمبوس است که در روند بهبود زخم های قرنیه ضروری است (Eppley و همکاران، ۲۰۰۴؛ Doucet و همکاران، ۲۰۰۵؛ Valeri و همکاران، ۲۰۰۶).

علاوه بر این پلاکت‌ها حاوی پروتئیناز می باشند که در آزادسازی آنزیم های پروتئولیتیک توسط سایر سلول ها نقش دارند. این آنزیم ها در تجزیه غشای پایه و ماتریکس خارج سلولی موثر هستند. پلاکت ها هم چنین در مهار آزادسازی سیتوکاین ها توسط ماکروفاژها نقش دارند. مدل های مختلف آزمایشگاهی نشان دادند که سلول های درگیر در ترمیم بافتی به نوعی به فاکتورهای رشد پلاکتی حساس می باشند، بدین صورت که TGB-B باعث کموتاکسی نوتروفیل ها و مونوسیت ها، PDGF باعث مهاجرت و تکثیر فیبروبلاست ها به محل زخم وVEGF نفوذپذیری عروقی را افزایش می دهد. IGF در التیام زخم و در تکثیر و تمایز استئوبلاست ها و EGF در تکثیر سلول های اپیتلیال نقش دارد. پلاسمای غنی از پلاکت، کنسانتره ای از پلاکت در یک حجم کم از پلاسما است و به خاطر غنی بودن از پلاکت، کنسانتره ای از فاکتورهای رشد به حساب می آید. این فاکتورهای موجود در گرانول های آلفای پلاکت که از قبل ذخیره شده و یا به تازگی سنتز شده اند، پس از رهاسازی ناشی از فعال سازی یا تخریب مکانیکی پلاکت، آثار خود را بر روی سلول های هدف دارای گیرنده، اعمال می کنند. مطالعات مختلف نشان داده اند که طیف وسیعی از انواع سلول ها دارای گیرنده برای این فاکتورها می باشند. از اینرو امروزه پلاسمای غنی از پلاکت در قالب فراورده های متنوعی نظیر سوپرناتانت پلاکتی به عنوان یک منبع غنی از فاکتورهای رشد جایگاه ویژه ای در بحث سلول درمانی و مهندسی بافت پیدا کرده است (Pavlovic و همکاران، ۲۰۱۶).

نوروزی و همکاران بیان داشتند فاکتورهای رشد موجود در گرانول های آلفای پلاکتی به شکل غیرفعال و نامحلول حضور دارند و به محض فعال شدن پلاکت، گرانول های آلفا با غشأ پلاکت ترکیب شده و در این حین زنجیره های جانبی کربوهیدراتی به ساختمان این فاکتورها افزوده می شود تا به شکل فعال زیستی و عملکردی خود درآیند و بتوانند به شکل محلول در پلاسما، اثرات خود را بر سلول ها اعمال نمایند (Noroozi Aghideh و همکاران، ۲۰۰۹).

بنابراین نتایج این تحقیق نشان می دهد که سوپرناتانت پلاکتی می‌تواند باعث تسریع بهبود زخم قلیایی قرنیه در مدل حیوانی خرگوش گردد. تسریع در روند التیام می تواند به دلیل دارا بودن فاکتورهای رشد مورد نیاز جهت تکثیر، تمایز و رشد سلول های اپیتلیال لیمبوس موجود در سوپرناتانت پلاکتی باشد.

Journal of Veterinary Medicine & Laboratory 14(2022-23)121-129

Experimental study of the effect of Autologous Platelet Supernatant on the healing of corneal born ulcer in rabbit

Moslemi, H.[1*], Hashemi Mansour, D.[2].

Received:02.05.2022 Accepted: 09.02.2023

Abstract:
A corneal ulcer is one of the most common eye diseases, which can be caused by trauma and chemical or some microbial agents. This study was carried out to investigate the effects of autologous platelet supernatant (PS) on corneal burn ulcer healing in 30 adult male New Zealand white rabbits. After general anesthesia, alkali wounds were created on the right corneas of rabbits by applying a 6 mm round filter paper, soaked in 1 M NaOH for 60 s. All rabbits were divided into three groups (n=10). In group A, platelet supernatant and in group B, atropine plus ciprofloxacin (AC) eye drops were used (one drop/12 h for 10 days). In group C, rabbits received normal saline, as the control group. Rabbit corneas were collected for histological examination on days 5 and 10. Histopathological factors such as epithelialization, vacuolar changes in epithelium and inflammation were evaluated. According to histopathological findings, a significant difference was observed between the PS group and with two another groups, while no significant difference was found between the AC group and the control group. The results from this study demonstrate that platelet supernatant can significantly promote the healing process of corneal alkali burn in rabbits.

Keywords: Platelet Supernatant, Corneal ulcer, Rabbit

---

1. Assistant Prof., Veterinary Surgery, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Semnan University, Semnan, Iran.

2- DMV Graduated, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Garmsar branch, Garmsar, Iran.
*Corresponding author: **h.moslemi@semnan.ac.ir**

منابع

Andrae, J., Gallini, R., Betsholtz, C. 2008. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. Genes and Development. **22(10)**, 1276-1312.

Borzini, P., Mazzucco, L. 2005. Tissue regeneration and in loco administration of platelet derivatives: clinical outcome, heterogeneous products, and heterogeneity of the effector mechanisms. Transfusion. **45**, 1759 –1767.

Cooper, D., Chitman, K.D., Williams, M.C., Granger, D.N. 2003. Time-dependent platelet-vessel wall interactions induced by intestinal ischemia-reperfusion. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal* and *Liver Physiology*. **284(6)**, 1027-1033.

Dohan Ehrenfest, D.M., Bielecki, T., Mishra, A., Borzini, P., Inchingolo, F., Sammartino, G., Rasmusson, L., Everts, P.A. 2012. In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes. *Current Pharmaceutical Biotechnology.* **13(7)**, 1131-1137.

Doucet, C., Ernou, I., Zhang, Y, Llense, J.R., Begot, L., Holy, X., Lataillade, J.J. 2005. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. Journal of Cellular Physiology. **205**, 228–236

Eppley, B.L., Woodell, J.E., Higgins, J. 2004. Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. Plastic and Reconstructive Surgery. **114**, 1502–1508.

Gawaz, M., Langer, H., May, A.E. 2005. Platelets in inflammation and atherogenesis. Journal of Clinical Investigation. **115(12)**, 3378-3384.

Kuligowski, M.P., Kitching, A.R., Hickey, M.J., 2006. Leukocyte Recruitment to the Inflamed Glomerulus: A Critical Role for Platelet-Derived P-Selectin in the Absence of Rolling. Journal of Immunology. **176 (11)**, 6991–6999.

Li, Z., Rumbaut, R.E., Burns, A.R., Smith, C.W. 2006. Platelet Response to Corneal Abrasion Is Necessary for Acute Inflammation and Efficient Re-epithelialization. Investigative Ophthalmology & Visual Science. **47(11)**, 4794-4802.

Li, Z.J., Choi, H-I., Choi. D-K., Sohn, K-C., Im., Seo, Y-J., Lee, Y-H., Lee, J-H., Lee, Y. 2012. Autologous platelet-rich plasma: a potential therapeutic tool for promoting hair growth. Dermatologic Surgery. **38**, 1040-1046.

Lorenzana-Blanco, N., Santander-García, D., Güell, J.L., Alejandre-Alba N. 2022. Acute management of ocular chemical burns: A review. Journal of EuCornea. **11(3)**, 1-15.

Nishijima, K., Kiryum J., Tsujikawa, A., Miyamoto, K., Honjo, M., Tanihara, H., Nonaka, A., Yamashiro, K., Katsuta, H., Miyahara, S., Honda, Y., Ogura, Y. 2004. Platelets adhering to the vascular wall mediate postischemic leukocyte-endothelial cell interactions in retinal microcirculation. Investigative Ophthalmology & Visual Science. **45(3)**, 977-984.

Noroozi Aghideh, A., Kheirandish, M., Abolghasemi, H., Gharehbaghian, A. 2009. Comparison of Cytokine Growth Factors in Platelet Supernatant, Platelet Lysate and Activated Platelet-rich Plasma for Therapeutic Applications. annals of military and health sciences research. **7(3)**, 149-155.

Pang, K., Du, L., Wu, X. 2010. A rabbit anterior cornea replacement derived from acellular porcine cornea matrix, epithelial cells and keratocytes. Biomaterials. **31(28)**, 7257-7265.

Pavlovic, V., Ciric, M., Jovanovic, V., Stojanovic, P. 2016. Platelet Rich Plasma: a short overview of certain bioactive components. Open Medicine. **11(1)**, 242-247.

Reid, B., Song, B., McCaig, C.D., Zhao, M. 2005. Wound healing in rat cornea: the role of electric currents. FASEB Journal. **19(3)**, 379-86.

Ríos, D.L., López, C., Carmona, J.U. 2015. Evaluation of the anti-inflammatory effects of two platelet-rich gel supernatants in an in vitro system of cartilage inflammation. Cytokine. **76**, 505-513.

Sridhar, M.S. 2018. Anatomy of cornea and ocular surface. Indian Journal of Ophthalmology. **66(2)**, 190-194.

Valeri, C.R., Saleem, B., Ragno, G. 2006. Release of platelet-derived growth factors and proliferation of fibroblasts in the releasates from platelets stored in the liquid state at 22 degrees C after stimulation with agonists. Transfusion. **46**, 225–229.

Yang, G., Espandar, L., Mamalis, N., Prestwich, G.D. 2010. A cross-linked hyaluronan gel accelerates healing of corneal epithelial abrasion and alkali burn injuries in rabbits Veterinary Ophthalmology. **13(3)**, 144–150.