

The Effect of Platelet-Rich Plasma (PRP) On the Differentiation of Dental Pulp-Derived Stem Cells into Pancreatic Insulin-Producing Cells

Reza Eshaghi-Gorji¹
Seyed Ehsan Enderami^{2,3}
Reyhaneh Nassiri Mansour⁴
Hadi Hassannia^{5,2}
Mohammadfoad Abazari⁶

¹ Student in Student in Laboratory Sciences, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Assistant Professor, Immunogenetics Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Department of Medical Biotechnology, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Ph.D. Candidate of Tissue Engineering, Student Research Committee, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Department of Laboratory Science, Amol Faculty of Paramedicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Amol, Iran

⁶ Ph.D. Candidate of Neurosciences, Division of Medical Sciences, Island Medical Program, University of British Columbia, Victoria, BC, Canada

(Received July 4, 2023 ; Accepted November 19, 2023)

Abstract

Background and purpose: Dental pulp stem cells (DPSCs) with the ability to differentiate into different types of adult cells have provided a new vision in the treatment of various diseases. However, different challenges remain with differentiation methods to produce insulin-producing cells (IPCs). In the present study, the differentiation of dental pulp stem cells into IPCs using platelet-rich plasma (PRP) has been addressed.

Materials and methods: In this experimental study for generation of IPCs, DPSCs were cultured in the first step, and then to confirm the characteristics of stem cells, the morphology of stem cells was confirmed by microscopic observation, and then the expression of CD90 and CD105 markers assessed by flow cytometry. After confirming the pluripotency of the stem cells, a 18days differentiation protocol into IPCs began. Following that, pancreatic endocrine genes such as insulin, pdx1, glut2 and glucagon were analyzed using Real-Time PCR. Insulin and C-peptide release was assessed using ELISA. To investigate the effect of platelet-rich plasma on cell viability, the MTT test was performed.

Results: Results showed that the use of the above-mentioned differentiation protocol, in the differentiation group containing PRP, the cells resembled Langerhans islet clusters. The expression of pancreatic endocrine genes in the differentiation group containing PRP was significantly higher than the other groups. Additionally, in two differentiation groups with and without PRP, the cells responded differently to glucose concentrations compared to insulin and C-peptide release. Furthermore, the rate of cell proliferation in the differentiation group containing PRP was higher than the other groups.

Conclusion: Based on the availability of dental pulp stem cells and PRP, the absence of invasive methods for obtaining these resources, as well as the low immunogenicity due to the use of the patient's tissues, seems to be appropriate method for producing insulin-secreting cells.

Keywords: dental pulp stem cells, platelet rich plasma, insulin producing cells, differentiation

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 33 (Supple 2): 1-12 (Persian).

Corresponding Author: Seyed Ehsan Enderami - Immunogenetics Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: ehsan.enderami@gmail.com, e.enderami@mazums.ac.ir)

تاثیر پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) بر روی تمایز سلول های بنیادی مشتق از پالپ دندان به سمت سلول های انسولین ساز پانکراس

رضا اسحاقی گرجی^۱
سید احسان اندرامی^{۳و۲}
ریحانه نصیری منصور^۴
هادی حسن نیا^{۵و۲}
محمدفواد ابادری^۶

چکیده

سابقه و هدف: سلول های بنیادی پالپ دندان (DPSC) با قابلیت تمایز به انواع مختلفی از سلول های فرد بالغ، چشم انداز جدیدی را در درمان انواع بیماری ها فراهم کرده است. با این حال بازدهی روش تمایز، برای تولید سلول های تولیدکننده انسولین (IPC) با چالش های مختلفی مواجه می باشد. در مطالعه حاضر، به تمایز سلول های بنیادی پالپ دندان به سمت سلول های تولیدکننده انسولین با استفاده از پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) پرداخته شده است.

مواد و روش ها: در این مطالعه از نوع تجربی برای تولید سلول های IPC، در مرحله اول سلول های بنیادی پالپ دندان کشت داده شده اند و سپس برای تایید خصوصیات سلول های بنیادی، مورفولوژی سلول های بنیادی با مشاهده میکروسکوپی، بیان شاخص های CD90 و CD105 با فلوسایتومتری و پتانسیل تمایز سلول بنیادی به سمت چربی مورد ارزیابی قرار گرفت. بعد از تایید خصوصیت چند توانی سلول بنیادی، پروتکل ۱۸ روزه تمایز به سمت سلول های تولیدکننده انسولین شروع شد. سپس ژن های مربوط به اندوکراین پانکراسی شامل glucagon و glut2 ، pdx1 و insulin با استفاده از روش Real-Time PCR، سنجش انسولین و سی-پپتید ترشح شده با استفاده از الایزا و بررسی اثر PRP بر روی حیات سلول ها با استفاده از تست زنده مانی سلولی (MTT) نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج نشان داد که با استفاده از پروتکل تمایزی نامبرده شده، در گروه تمایزی حاوی PRP، سلول ها با مورفولوژی شبیه به خوشه های جزایر لانگرهانس حاصل شده اند. بیان ژن های مربوط به اندوکراین پانکراسی در گروه تمایزی دارای PRP به صورت معناداری بالاتر از گروه های دیگر بوده است. هم چنین این سلول ها در دو گروه تمایزی دارای PRP و فاقد PRP بازدهی متفاوتی در مواجهه با غلظت های متفاوت گلوکز نسبت به ترشح انسولین و سی-پپتید داشته اند. علاوه بر این نرخ تکثیر سلولی در گروه دارای PRP، بالاتر از سایر گروه ها بوده است.

استنتاج: استفاده از DPSC و PRP بدلیل در دسترس بودن و عدم نیاز به روش های تهاجمی برای به دست آوردن این منابع و هم چنین ایمنی زایی پایین به دلیل استفاده از بافت های خود فرد به نظر می رسد یک روش هدفمند برای تولید سلول های ترشح کننده انسولین می باشد.

واژه های کلیدی: سلول های بنیادی پالپ دندان، پلاسمای غنی از پلاکت، سلول های تولیدکننده انسولین، تمایز

مقدمه

دیابت، یکی از شایع ترین بیماری های غدد درون ریز است که به طور قابل توجهی در همه کشورها از

جمله ایران گسترش یافته است. براساس گزارش سازمان جهانی بهداشت (WHO)، دیابت در حال افزایش

مؤلف مسئول: سید احسان اندرامی - ساری: ۱۷ کیلومتر جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده فناوری های نوین پزشکی E-mail: ehsan.enderami@gmail.com

۱. دانشجوی کارشناسی علوم آزمایشگاهی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. استادیار، مرکز تحقیقات ایمونوژنتیک، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. گروه زیست فناوری پزشکی، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. دانشجوی دکتری تخصصی مهندسی بافت، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۵. گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی آمل، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، آمل، ایران
۶. دانشجوی دکتری تخصصی علوم اعصاب، شاخه علوم پزشکی، برنامه پزشکی جزیره ونکور، دانشگاه بریتیش کلمبیا، ویکتوریا، کانادا
تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۴/۲۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۲/۸/۶ تاریخ تصویب: ۱۴۰۲/۸/۲۸

است (۲،۱). دیابت و میزان غیرطبیعی قندخون می تواند عامل نابینایی، نارسایی کلیه و قطع اندام تحتانی باشد. اغلب به عنوان یک عامل مرگ و میر در بیماری های قلبی و سکنه مغزی در نظر گرفته می شود (۳). دیابت نوع یک (T1DM) به دلیل تخریب سلول های بتا تولیدکننده انسولین جزایر پانکراس به صورت خود ایمن، وابسته به انسولین است. از دست دادن سلول های بتای پانکراس و کمبود انسولین از عوامل اصلی ظهور عوارض دیابت است. دیابت نوع یک، ۵ تا ۱۰ درصد از جمعیت بیماران دیابتی را شامل می شود. رایج ترین روش برای کنترل وضعیت T1DM تزریق انسولین است. علی رغم اثربخشی آن در کاهش سطح گلوکز خون، تنها می تواند شرایط را کنترل کند و نمی توان آن را یک درمان در نظر گرفت. علاوه بر این، تزریق روزانه انسولین می تواند برای بیماران دردناک باشد و هزینه بالایی داشته باشد (۵،۴). سلول های بنیادی که توانایی تولید سلول های بتا را دارند، ابزارهای امیدوارکننده جدیدی هستند که مطالعات بسیاری بر روی آن ها متمرکز شده اند تا منابع تجدیدپذیر سلول های جایگزین جزایر را گسترش دهند (۸-۶). سلول های بنیادی به دو دسته اصلی سلول های بنیادی جنینی و سلول های بنیادی بالغ تقسیم می شوند. سلول های بنیادی مزانشیمی (MSCs) مهم ترین اعضای خانواده سلول های بنیادی بالغ هستند و به عنوان منبع سلولی بسیار مناسب برای درمان بیماری های پانکراس در بین محققان مورد توجه قرار گرفته است (۹). سلول های بنیادی مزانشیمی توانایی تمایز چندتوانی را در شرایط آزمایشگاهی دارند. سلول های بنیادی مزانشیمی به دلیل تکثیر راحت و اتولوگ بودن بهترین کاندید برای درمان های مبتنی بر سلول هستند (۱۲-۱۰). سلول های بنیادی را می توان در خارج از بدن با استفاده از عوامل رشد و رونویسی کشت داد هم چنین می توان آن ها را به سلول های تولیدکننده انسولین (IPC) تمایز داد (۱۵-۱۳). در دهه های اخیر، محققان استفاده از درمان مبتنی بر سلول را برای درمان دیابت با انواع ناقل های انتقال

دهنده ژن های مختلف و محیط های تمایزی مطالعه کرده اند (۱۸-۱۶). سلول های بنیادی پالپ دندان (DPSCs)، که سلول های بنیادی مزانشیمی هستند، کاندیدای مناسبی برای سلول درمانی هستند، زیرا به راحتی از دندان هایی که به دلایل ارتودنسی کشیده می شوند، بدون اقدامات تهاجمی برای استخراج سلول بنیادی، به دست می آیند هم چنین این سلول ها نرخ رشد بالایی دارند و توانایی تمایز چند توانی را نیز دارا می باشند که حتی پس از انجماد طولانی مدت نیز، حفظ می شوند (۱۹). یکی از عواملی که اثرات مفیدی بر پیوند اتولوگ دارد، پلاسمای غنی از پلاکت انسانی (PRP) است که از خون محیطی مشتق می شود (۲۰). فاکتورهای رشد متعدد، پلاکت ها و فیرین موجود در PRP می توانند پتانسیل تمایز سلول های بنیادی را در تمام دودمان های سلولی به ویژه به سلول های بتا تولیدکننده انسولین افزایش دهند (۲۳-۲۱). این مفهوم که PRP می تواند تمایز سلولی و بازسازی بافت را تقویت کند بر این واقعیت استوار است که پلاکت ها عوامل رشد و مولکول های چسبنده مختلف را آزاد می کنند که شامل مولکول هایی از جمله فاکتور رشد مشتق از پلاکت (PDGF)، فاکتور رشد شبه انسولین (IGF-1)، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (VEGF)، فاکتور رشد فیرو بلاست پایه (bFGF) و فاکتور رشد اپیدرمی (EGF)، فاکتور رشد هپاتوسیت (HGF)، ویترو نکتین، فیبرونکتین و سایر عواملی که توسط گرانول های پلاکتی ترشح می شوند است (۲۱،۲۲). فاکتورهای رشد و مولکول های چسبنده موجود در PRP ممکن است نقش موثری در تمایز سلول های بنیادی به IPC داشته باشند. PRP ممکن است به دلیل ماهیت اتولوگ این فاکتورهای رشد، کاربردهای مفید دیگری از جمله بهبود پروتکل های تمایز نیز داشته باشد. علاوه بر این، این ماده مقرون به صرفه و در دسترس محسوب می شود (۶،۲۴). با توجه به اهمیت موارد ذکر شده، در این مطالعه برای اولین بار پتانسیل تمایز سلول های بنیادی مزانشیمی پالپ دندان به سلول های بتا بالغ تولیدکننده انسولین در محیط

کشت بهینه شده با PRP مورد بررسی قرار می‌گیرد. این مطالعه از نوع تجربی و در مراجعه کنندگان به کلینیک آموزشی طبوبی پس از کسب کد اخلاق در پژوهش (IR.MAZUMS.REC.1400.10233) و رضایت‌نامه آگاهانه انجام شد. لازم به ذکر است که تمامی آزمایشات سه مرتبه تکرار شد.

- جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSCs) سلول‌های بنیادی مزانشیمی پالپ دندان طبق پروتکل مطالعات پیشین جدا شدند (۲۵). به‌طور خلاصه پالپ دندان انسان از مولر سوم نهفته افراد سالم در کلینیک آموزشی طبوبی، که تحت عمل کشیدن دندان معمولی قرار داشتند، استخراج شد. دندان‌های کشیده شده با سالیین بافر فسفات (Gibco, PBS) متشکل از ۱ درصد (v/v) پنی سیلین-استرپتومایسین (USA, Invitrogen) شستشو داده شدند. بافت پالپ دندان از حفره‌های دندانی خارج شد و توسط قیچی جراحی استریل به قطعات کوچک خرد شد. سپس بافت‌های پالپ با ۳ میلی گرم در میلی لیتر کلاژناز نوع I (Roche Diagnostics) و ۴ میلی گرم در میلی لیتر دیسپاز (Sigma-Aldrich) به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با هم زدن ملایم هضم شدند. برای حذف هر گونه بقایای سلولی، این مخلوط با عبور دادن سلول‌ها از داخل یک توری نایلونی با منافذ ۷۰ میکرومتری فیلتر شد. سلول‌ها در دور ۴۰۰ xg به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و در DMEM/F12 (نیئا فناوران) همراه با ۱۰ درصد سرم جنین گاو (Invitrogen; FBS)، ۲ میلی مولار ال-گلوتامین (Sigma-Aldrich) و ۱ درصد (v/v) پنی سیلین-استرپتومایسین کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵ درصد CO₂ در اتاقک مرطوب شده انکوبه شدند.

- تهیه پلاسمای غنی از پلاکت (PRP)

پلاسمای غنی از پلاکت با سانتریفیوژ دو مرحله‌ای تهیه شد (۲۶،۶). به‌طور خلاصه، ۱۰ میلی لیتر خون تام

تازه انسان در لوله فالكون حاوی ۱ میلی لیتر معرف اسید سترات دکستروز به عنوان ضد انعقاد جمع آوری شد. سپس خون سیراته در سانتریفیوژ آزمایشگاهی در دور ۲۵۰ xg به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از آن، پلاسمای همراه با بافی کوت جمع آوری شد و سانتریفیوژ دوم در دور ۱۰۰۰ xg به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. پلت پلاکت انباشته شده در انتهای لوله فالكون با استفاده از ۲ میلی لیتر پلاسمای فقیر از پلاکت جمع آوری شد تا PRP تولید شود. مایع رویی پلاسمای به عنوان پلاسمای فقیر از پلاکت استفاده شد. محلول PRP در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد ذخیره شد، تا در آینده مورد استفاده قرار گیرد.

- تعیین خصوصیات سلول‌های بنیادی با فلوسیتومتری

سلول‌های بنیادی پالپ دندان در محیطی که شامل DMEM/F12 و ۱۰ درصد FBS بود، کشت داده شدند. سلول‌ها هر ۳ تا ۴ روز یکبار پاساژ داده شدند. در پاساژ ۳، سلول‌ها با تریپسین-EDTA جدا شدند و حدود 5×10^5 سلول تک معلق در DMEM به چندین لوله تقسیم شدند و سپس در دور ۱۲۰۰ xg به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پلت سلولی مجدداً در ۱ میلی لیتر سرم انسانی معلق شد و سپس محلول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد نحفظ شد. سپس محلول با دور ۱۲۰۰ xg به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. پلت به دست آمده از سانتریفیوژ در ۳ درصد (v/v) سرم بز در PBS معلق شد و سپس آنتی‌بادی‌هایی از جمله آنتی‌بادی‌های CD105 و CD34 نشان دار با فیکواریترین (PE) و آنتی‌بادی ضد انسانی موشی CD90 نشان دار با فلورسنت ایزوتیوسیانات (FITC)، به مدت ۱ ساعت بر روی یخ انکوبه شد. در نهایت، پس از شستشو با PBS و سانتریفیوژ در دور 1200xg به مدت ۵ دقیقه، پلت مجدداً در داخل PBS به صورت معلق قرار گرفت و سلول‌ها با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری با نرم افزار FlowJo version 7.6 آنالیز شدند.

- تمایز به چربی

تمایزی II حاوی ۱ درصد آمینواسیدهای غیر ضروری (Invitrogen)، ۲۰ نانوگرم در میلی لیتر فاکتور رشد اپیدرمی (EGF, Sigma-Aldrich)، ۲۰ نانوگرم در میلی لیتر فاکتور رشد فیبروبلاست پایه (bFGF, Sigma-Aldrich)، ۲ میلی مول بر لیتر ال گلو تامین (Sigma)، ۲ درصد B27 (Invitrogen)، ۱۰ نانوگرم در میلی لیتر exendin-4 (Sigma-Aldrich) و ۲ درصد PRP به مدت ۶ روز کشت داده شدند. در مرحله ۳، سلول‌ها در محیط تمایزی III حاوی ۱۰ نانوگرم در میلی لیتر بتاسولولین (Sigma-Aldrich)، ۲ درصد B27، ۱۰ میلی مول در لیتر نیکوتین آمید (Sigma-Aldrich)، ۱۰ نانوگرم در میلی لیتر اکتیوین A (Sigma-Aldrich)، ۱۰ نانوگرم در میلی لیتر exendin-4، ۱ درصد PRP به مدت ۶ روز کشت داده شدند. لازم به ذکر است که در مراحل ۲ و ۳، هر دو روز یک بار محیط تمایزی با محیط تازه جایگزین شد.

برای تمایز به چربی، 2×10^3 سلول در پاساژ ۳ در هر چاهک در یک پلیت چهارخانه کشت داده شدند و ۰/۵ میلی لیتر محیط کشت اختصاصی DMEM با ۱ میکرومول در لیتر دگزامتازون، ۶۰ میکرومول در لیتر ایندومتاسین، ۵ میکرولیتر انسولین ۱/۷ میکرومولار و ۴۵۰ میکرولیتر ایزوبوتیل متیل گزانتین (تمامی مواد از Sigma-Aldrich) به چاهک‌ها اضافه شد. دو چاهک به عنوان گروه کنترل در معرض DMEM مکمل با ۱۰ درصد FBS قرار گرفتند و دو چاهک دیگر در معرض یک محیط تمایزی قرار گرفتند. محیط کشت هر روز تعویض می شد. پس از ۲۱ روز، سلول‌های تمایز یافته با پارافورمالدئید ۴ درصد در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه تثبیت شدند و توسط PBS شستشو داده شدند و به مدت ۵ دقیقه با رنگ (Oil red) O رنگ آمیزی شدند (۲۷).

- تست زنده مانی سلولی (MTT)

چسبندگی، زنده مانی و توانایی تکثیر سلول‌های بنیادی پالپ دندان در حضور یا عدم حضور PRP در محیط کشت با استفاده از روش MTT در طی ۷ روز تعیین شدند. برای انجام آن، 4×10^3 سلول در هر سانتی متر مربع کاشته شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، ۵ درصد CO₂ انکوبه شدند (۶). سپس بعد از گذشت ۲۴ ساعت دوزهای متفاوت ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میکرومولار از PRP به محیط کشت اضافه گردید. در روزهای ۱، ۳، ۵ و ۷ پس از اضافه کردن RPP، ۵۰ میکرولیتر محلول MTT (۳-۴،۵-دی متیل-تيازولیل-۲-۲-دی فنیل تترازولیوم بروماید) با غلظت نهایی ۵ میلی گرم بر میلی لیتر در DMEM بدون FBS به هر چاهک اضافه شد. پس از ۳ ساعت انکوباسیون، مایع رویی آسپیره شد و بلورهای فورمازان با افزودن دی متیل سولفو کسید (DMSO) حل شدند. جذب نوری رنگ تولید شده در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الیزا ریدر اندازه گیری شد.

- تمایز آزمایشگاهی سلول بنیادی مزانشیمی پالپ دندان به سلول تولید کننده انسولین

در این مطالعه سلول‌های بنیادی مزانشیمی پالپ دندان، بعد از تعیین خصوصیات و آنالیز در پاساژ ۳، مورد استفاده قرار گرفتند. گروه‌های تحقیق در این مطالعه عبارتند از گروه سلول‌های بنیادی پالپ دندان در محیط غیر تمایزی، گروه سلول‌های بنیادی پالپ دندان در محیط تمایزی بدون PRP، گروه سلول‌های بنیادی پالپ دندان در محیط تمایزی با PRP بود. از یک پروتکل تمایز سه مرحله‌ای برای القای سلول‌های بنیادی مزانشیمی پالپ دندان به سلول‌های تولید کننده انسولین (IPC) استفاده شد (۴). در مرحله ۱، سلول‌های بنیادی در محیط I حاوی DMEM (نیتا فناوران) به حجم ۲۵ میلی مول در لیتر به همراه ۰/۵ میلی مول در لیتر بتامرکاپیتواتانول (Invitrogen) و ۵ درصد PRP به مدت ۲ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO₂ کشت داده شدند. در مرحله ۲، سلول‌ها در محیط

گلوکز به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند. سپس غلظت‌های مختلف گلوکز به چاهک‌ها اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO₂ به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. در نهایت، ترشح انسولین و سی-پپتید در پاسخ به غلظت‌های مختلف گلوکز توسط کیت ELISA (MercoDIA، سوئد) آنالیز شد و جذب نوری آن توسط دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

- آنالیز آماری

تمامی آزمایشات در سه مرتبه تکرار انجام شد. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون t به صورت میانگین و انحراف معیار بیان شد. نتایج توسط نرم‌افزار GraphPad Prism 9 (نرم‌افزار GraphPad، Joia، La California) ترسیم شد و مقادیر $P < 0.05$ معنی‌دار تعیین شد.

یافته‌ها

خصوصیات سلول‌های بنیادی پالپ دندان تمایز نیافته همان‌طور که در (تصویر شماره ۱A) مشاهده می‌شود تجزیه و تحلیل فلوسایتومتری نشانگرهای سطح سلول در پاساژ ۳، بیان بالایی از (۱۰۰ درصد) CD90 و (۹۰ درصد) CD105 را نشان داد در حالی که بیان بسیار کمی از (۰/۸ درصد) CD34 نشان داده شده است. نتایج تست فلوسایتومتری مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی پالپ دندان در پاساژ سوم نشان می‌دهد که مارکرهای CD90 و CD 105 مثبت و مارکر CD34 منفی می‌باشد که تاییدکننده هویت سلول بنیادی مزانشیمی استخراج شده است. هم‌چنین در زیر میکروسکوپ معکوس، سلول‌های بنیادی پالپ دندان در پاساژ صفر (P0) به صورت غیر دوکی شکل و چسبیده مشاهده شد (تصویر شماره 1B) اما در پاساژ سوم (P3) سلول‌های بنیادی پالپ دندان به صورت دوکی شکل و چسبیده مشاهده شد (تصویر شماره ۱-C). در این مطالعه هم‌چنین تمایز سلول‌های بنیادی پالپ دندان به سمت سلول‌های چربی القا شد که

- استخراج RNA و *qPCR* *insulin* و *glucagon* و *glut2* و *pdx1*

برای بررسی بیان ژن‌های مربوط به اندوکراین پانکراسی شامل *glucagon*، *glut2*، *pdx1* و RNA کل از سلول‌های بنیادی پالپ دندان تمایز یافته هر دو گروه (با PRP و بدون PRP) و گروه کنترل با کیت استخراج RNA (یکتا تجهیز آزما، ایران) استخراج شد. قبل از انجام رونوشت برداری معکوس، به منظور حذف آلودگی DNA ژنومی از آنزیم DNaseI (فاقد RNase) استفاده شد. به منظور انجام رونوشت برداری معکوس بر روی RNA استخراج شده و تولید DNA مکمل (cDNA) از پرایمر رندوم هگزامر (random hexamer) و کیت سنتز cDNA استفاده شد. پروتکل به صورت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و ۵ دقیقه در ۷۰ درجه سانتی‌گراد و با توجه به دستورالعمل، Real-Time PCR با استفاده از کیت Syber-green (آرین ژن گستر، ایران) و دستگاه ABI Step One plus با حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. به توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول شماره ۱ اشاره شده است.

جدول شماره ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در تست Real Time PCR

Product size (bp)	Primer sequences	Human genes
۱۴۶	Forward: 5'-AAGCTCACGCGTGGAAAGG-3' Reverse: 5'-CGGCCGTGAGATGTACTTGT-3'	Pdx1
۱۲۴	Forward: 5'-GCAACGTTCCCTTCAAGACAC-3' Reverse: 5'-ACTGGTTAATGTGCCCTGTG-3'	Glucagon (Gcg)
۸۵	Forward: 5'-TCTACCTAGTGTGCGGGAA-3' Reverse: 5'-TCCACCTGCCACCTG-3'	Insulin
۱۲۷	Forward: 5'-TCACTGCTGTCTGTATTCC-3' Reverse: 5'-TGCTCACATAACTCATCCAAG-3'	Glut2
۱۲۶	Forward: 5'-GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA-3' Reverse: 5'-GTTGCTGTAGCAAAATCTGTTGT-3'	GAPDH

- سنجش آزادسازی انسولین و سی-پپتید

در گروه کنترل و گروه تمایز یافته (با و بدون PRP)، آزادسازی انسولین و سی-پپتید به غلظت‌های مختلف گلوکز (۵/۵، ۱۵ و ۲۵ میلی‌مولار) اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه، مایع رویی هر چاهک دور ریخته شد و سپس با PBS شسته شد و سلول‌ها در بافر تازه آماده شده کربس-رینگر بی‌کربنات (KRB) بدون

بعد از ۲۱ روز تمایز به چربی، با مشاهده واکوئل و رنگ آمیزی Oil red O تایید شد (تصویر شماره ۱D). این نتایج قابلیت چند توانی سلول‌های بنیادی پالپ دندان برای تشکیل دودمان مزودرمی را تایید کرد.

- تغییرات مورفولوژیکی تمایز سلول‌های بنیادی پالپ دندان به سلول‌های تولیدکننده انسولین

سلول‌های بنیادی پالپ دندان تمایز نیافته طبق پروتکل ذکر شده به سلول‌های تولیدکننده انسولین تمایز یافته‌اند و در روز آخر تمایزی، گروه تمایزی دارای PRP، سلول‌ها مورفولوژی شبیه به خوشه‌های جزایر لانگرهانس پیدا کرده بودند در صورتی که در گروه تمایزی فاقد PRP، در روز آخر تمایز سلول‌ها صرفاً در کنار یکدیگر جمع شده بودند و مورفولوژی شبیه به خوشه‌های جزایر لانگرهانس مشاهده نشد (تصویر شماره ۲).

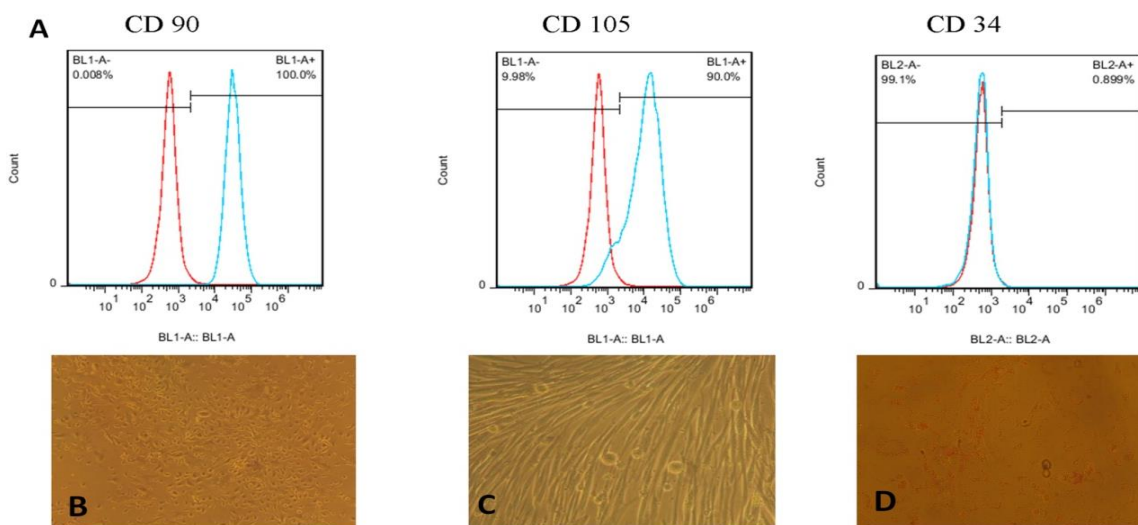
- قابلیت حیات سلول‌های بنیادی پالپ دندان در طول تمایز به سلول‌های تولیدکننده انسولین

تست MTT برای تعیین اثرات مراحل مختلف روش‌های تمایز بر روی زنده ماندن یا تکثیر سلولی در طول هفت روز اعمال شد. نتایج نشان داد که سرعت

تکثیر در همه روزها در محیط تمایزی دارای PRP نسبت به محیط تمایزی بدون PRP بیش‌تر بود. در روزهای اول و سوم، سرعت تکثیر در محیط تمایزی دارای PRP نسبت به محیط تمایزی بدون PRP بیش‌تر بوده اما این افزایش، تفاوت معنی‌داری نداشته است. در روزهای پنجم و هفتم، سرعت تکثیر در محیط تمایزی با PRP نسبت به گروه تمایزی بدون PRP بیش‌تر بوده و این افزایش، دارای تفاوت معنی‌داری بوده است (نمودار شماره ۱).

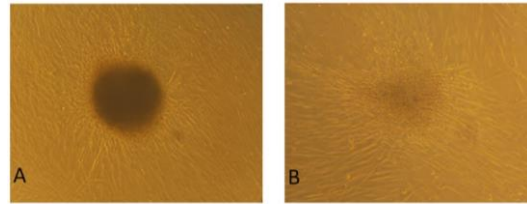
- بررسی ژن‌های مربوط به اندوکراین پانکراسی در سلول‌های تمایز یافته

بیان mRNA در تکامل پانکراس توسط ژن‌های اندوکراین پانکراسی مانند Pdx-1، Insulin، Glucagon، Glut-2 در مرحله پایانی تمایز به سلول‌های تولیدکننده انسولین، با روش کمی Real-Time PCR اندازه‌گیری شد. همان‌طور که در نمودار شماره ۲ نشان داده شده است، بیان کم ژن‌های Pdx-1، Insulin، Glucagon، Glut-2 در گروه تمایزی سلول‌های تولیدکننده انسولین مشتق شده از سلول‌های بنیادی پالپ دندان بدون PRP شناسایی شد. اما به‌طور کلی در گروه تمایزی با PRP، سلول‌های تمایز یافته بیان بالایی از ژن‌های مذکور نشان می‌دهد.

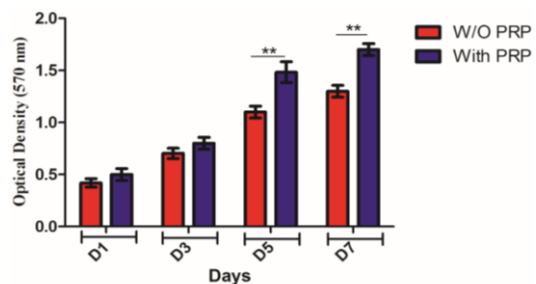


تصویر شماره ۱: تعیین هویت سلول‌های بنیادی مزانشیمی. تصویر (A): نتایج تست فلوسایتومتری مارکرهای سطحی سلول‌های بنیادی پالپ دندان در پاساژ سوم. تصویر (B): سلول‌های بنیادی پالپ دندان در پاساژ صفر (P0) به صورت چسبیده و غیر دوکی. تصویر (C): سلول‌های بنیادی پالپ دندان در پاساژ سوم (P3) به صورت چسبیده و دوکی شکل (مشخصه مورفولوژی سلول‌های بنیادی مزانشیمی). تصویر (D): تمایز سلول‌های بنیادی پالپ دندان به سمت بافت چربی با استفاده از پروتکل ۲۱ روزه

- ترشح انسولین و سی-پپتید در پاسخ به تحریک گلوکز در این مطالعه به منظور بررسی پاسخ سلول‌های تمایز یافته انسولین ساز نسبت به غلظت‌های مختلف گلوکز به منظور آزادسازی انسولین و سی-پپتید با استفاده از کیت (Mecodia, Winston-Salem, NC) استفاده شدند. بدین منظور از سه غلظت متفاوت ۵/۵، ۱۵ و ۲۵ میلی‌مولار گلوکز استفاده شد. ترشح انسولین در گروه تمایزی با PRP نسبت به گروه تمایزی بدون PRP و گروه کنترل در تمامی غلظت‌های گلوکز بیشتر بوده است ولی در غلظت ۱۵ و ۲۵ میلی‌مولار گلوکز، ترشح انسولین در گروه تمایزی با PRP نسبت به گروه کنترل و گروه تمایزی بدون PRP پیش‌تر و دارای تفاوت معنی‌داری بوده است (نمودار شماره ۵ A). ترشح سی-پپتید نیز در گروه تمایزی با PRP نسبت به گروه بدون PRP و گروه کنترل در تمامی غلظت‌های گلوکز بیشتر بوده است ولی در غلظت ۱۵ و ۲۵ میلی‌مولار گلوکز، ترشح سی-پپتید در گروه تمایزی با PRP نسبت به گروه بدون PRP و گروه کنترل به صورت معنی‌داری پیش‌تر بوده است (نمودار ۳ B).



تصویر شماره ۲: تغییرات مورفولوژیکی تمایز سلول‌های بنیادی پالپ دندان به سمت سلول‌های تولیدکننده انسولین پس از ۱۸ روز، شکل (A): گروه تمایزی دارای PRP با ساختار شبیه به خوشه‌های جزایر لانگرهانس شکل (B): گروه تمایزی فاقد PRP که سلول‌ها صرفاً در کنار یکدیگر جمع شده‌اند و بی‌شبهت به ساختار خوشه‌های جزایر لانگرهانس

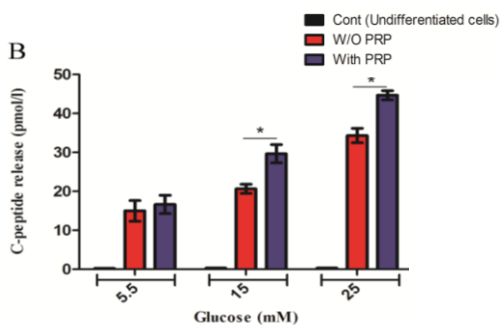
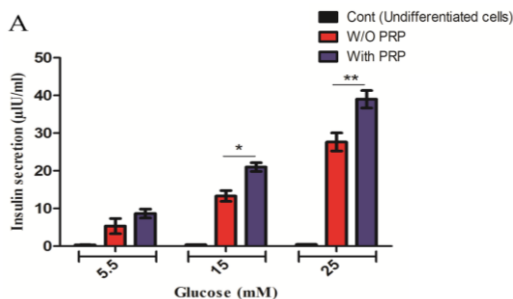


نمودار شماره ۱: زنده‌مانی و تکثیر سلول‌های بنیادی پالپ دندان در طول مدت تمایز توسط تست MTT. مقادیر در هر نمودار به صورت Mean ±SD نشان داده شده است.

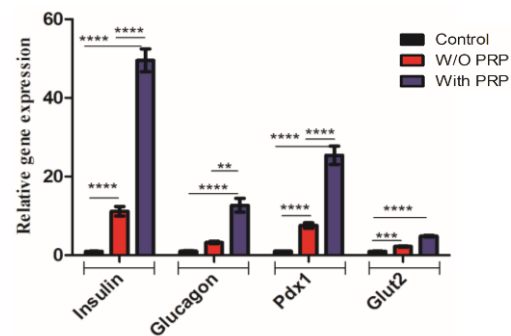
P < 0.01**

W/O PRP: گروه تمایزی فاقد PRP

With PRP: گروه تمایزی دارای PRP



نمودار شماره ۳: پاسخ سلول‌های بنیادی پالپ دندان گروه کنترل و تمایز یافته به سمت سلول‌های تولیدکننده انسولین در مواجهه با



نمودار شماره ۲: بیان نسبی ژن‌های Insulin، Glucagon، Pdx-1.

در مرحله انتهایی تمایز سلول‌های تولیدکننده انسولین مشتق شده از سلول‌های بنیادی پالپ دندان. مقدار بیان ژن‌ها.

مقادیر در هر نمودار به صورت Mean ±SD نشان داده شده است.

P < 0.01**

P < 0.001**

P < 0.0001****

W/O PRP: گروه تمایزی فاقد PRP

With PRP: گروه تمایزی دارای PRP

Contol: گروه غیر تمایزی

نشان داد گروه تمایزی با PRP، دارای پتانسیل تمایز قابل توجهی به سمت سلول‌های تولیدکننده انسولین در مقایسه با گروه تمایزی فاقد PRP است. همچنین، نتایج نشان داد که پس از یک پروتکل تمایز سه مرحله‌ای، PRP می‌تواند میزان زنده ماندن سلولی را در گروه تمایزی دارای PRP به صورت قابل توجهی نسبت به گروه تمایزی فاقد PRP و گروه کنترل افزایش دهد. مطالعه حاضر تمایز موفقیت‌آمیز سلول‌های بنیادی پالپ دندان به سمت سلول‌های تولیدکننده انسولین را نشان داد. همچنین این سلول‌ها از نظر مورفولوژیکی شبیه به سلول‌های جزایر پانکراس بوده‌اند. همچنین با استفاده از تست الایزا، نشان داده شد که انسولین و سی-پپتید را بیان می‌کنند. اندازه‌گیری سی-پپتید همراه با انسولین همراستا با دیگر مطالعات محققان پیشین است بدین دلیل که نشان دهنده و تایید تولید *de novo* انسولین از سلول‌های تمایز یافته است (۱۳۸). در مطالعه Suchanek و همکاران، سلول‌های تولیدکننده انسولین حاصل از تمایز سلول‌های بنیادی پالپ دندان نیز نسبت به گروه تمایز نیافته انسولین و سی-پپتید را ترشح کرده‌اند (۲۹). همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تفاوت ترشح سی-پپتید و انسولین در پاسخ به غلظت بالای گلوکز (۱۵ میلی‌مولار و ۲۵ میلی‌مولار) بین دو گروه تمایزی آزمون، معنی‌دار بوده است که این نتایج هم راستا با مطالعه جعفریان و همکاران بوده است، در بررسی آن‌ها نیز، ترشح انسولین در پاسخ به غلظت گلوکز ۱۵ و ۲۵ میلی‌مولار، در سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان تمایز یافته به سمت سلول‌های تولیدکننده انسولین به طور قابل توجهی بیش‌تر از گروه تمایز نیافته بود (۳۰). در مطالعه‌ای که توسط Suchanek و همکاران انجام شد از سلول‌های بنیادی پالپ دندان برای تمایز به سلول‌های تولیدکننده انسولین استفاده شد و برای تایید تمایز، بیان ژن‌های اندوکرین پانکراسی از جمله Glut-2 و Pdx-1 مورد بررسی قرار گرفت بیان این ژن‌ها در گروه تمایزی به صورت معنی‌داری نسبت به سلول‌های

غلظت‌های متفاوت گلوکز ۵/۵، ۱۵ و ۲۵ میلی‌مولار در ترشح انسولین (A) و سی-پپتید (B).
مقادیر در هر نمودار به صورت Mean \pm SD نشان داده شده است.
** : $P < 0.05$
** : $P < 0.01$
W/O PRP: گروه تمایزی فاقد PRP
With PRP: گروه تمایزی دارای PRP
Contol: گروه غیر تمایزی

بحث

طراحی آزمایشی این مطالعه، شامل تمایز سلول‌های بنیادی پالپ دندان به سمت سلول‌های تولیدکننده انسولین با استفاده از PRP طبق پروتکل بوده است (۶). اگرچه پروتکل‌های تمایز زیادی برای درمان T1DM و تولید سلول‌های تولیدکننده انسولین از سلول‌های بنیادی طراحی شده‌اند، یکی از مشکلات عمده در پروتکل‌های تمایز، نرخ بالای آپوپتوز در جمعیت سلولی به دنبال حذف FBS و کمبود فاکتورهای رشد در محیط تمایزی می‌باشد از سوی دیگر، این عوامل رشد پرهزینه هستند و افزودن آن‌ها به طور جداگانه به محیط‌های کشت تمایزی باعث بار مالی زیادی می‌شود. PRP را می‌توان به راحتی از خون محیطی به دست آورد و منبع طبیعی و غنی از فاکتورهای رشد و موادی است که ممکن است برای تمایز و زنده ماندن سلول مورد نیاز باشد (۲۸).

هنگامی که PRP تحریک می‌شود، مولکول‌های چسبنده و فاکتورهای رشد زیادی را آزاد می‌کند که در تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های تولیدکننده انسولین مانند EGF، bFGF، HGF، VEGF-A و فیبرونکتین نقش دارند (۲۴). بنابراین در این مطالعه PRP برای القای سلول‌های بنیادی پالپ دندان به سمت سلول‌های تولیدکننده انسولین سازمورد استفاده قرار گرفت. فاکتورهای رشد متعدد آزاد شده از PRP ممکن است نقش هم‌افزایی و مهمی در تمایز سلول‌های بنیادی پالپ دندان به سلول‌های تولیدکننده انسولین داشته باشند.

در این مطالعه پس از تایید چند توانی سلول بنیادی پالپ دندان، پروتکل تمایزی ۱۸ روزه شروع شد. نتایج

بنیادی پالپ دندان با بهینه‌سازی PRP، رویکرد جدیدی برای تمایز سلول‌های بنیادی پالپ دندان انسانی به سلول‌های تولیدکننده انسولین طراحی شد. نتایج مطالعه نشان داد که این سلول‌های تمایز یافته دارای ویژگی مشابه سلول‌های بنای جزایر پانکراس همانند مورفولوژی، سطوح بیان mRNA و پروتئین هستند و به غلظت‌های مختلف گلوکز پاسخ می‌دهند. پروتکل تمایزی گزارش شده در این مطالعه نه تنها یک روش تمایزی مؤثر با راندمان بالا است، بلکه می‌توان از سلول‌های بنیادی پالپ دندان و PRP خود بیمار برای درمان استفاده کرد. این رویای پزشکی شخصی را برای درمان بیماران دیابتی به واقعیت تبدیل می‌کند. با این حال، نتایج این مطالعه قبل از بررسی در بیماران دیابتی، باید در مدل‌های حیوانی دیابتی مورد بررسی قرار گیرد.

سپاسگزاری

این طرح با هزینه کمیته تحقیقات و فناوری دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی مازندران با کد طرح ۱۰۲۳۳ انجام گردیده است.

کشت داده شده در محیط‌های کشت استاندارد بالاتر بودند (۲۹). در مطالعه حاضر نیز به منظور تایید تمایز سلول‌های بتا، بیان ژن‌های اندوکرین پانکراسی شامل Insulin، Glut-2، Pdx-1 و Glucagon مورد بررسی قرار گرفت که همراستا با مطالعه اندرامی و همکاران (۴) و هم‌چنین ژانگ و همکاران بود (۳۱) نتایج این مطالعه نشان داد که ژن Glut-2 که به‌عنوان شاخص بلوغ سلول‌های بتا، براساس مطالعه اندرامی و همکاران و هم‌چنین خرسندی و همکاران در نظر گرفته شده بود (۳۲،۴)، در گروه تمایزی دارای PRP به صورت معنی‌داری نسبت به گروه تمایزی فاقد PRP بیان بالاتری داشت، این نتیجه همراستا با مطالعه Hojat و همکاران بوده است با این تفاوت که آن‌ها در مطالعه خود به تمایز سلول‌های بنیادی خون قاعدگی با استفاده از PRP پرداخته بودند (۲۸). پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده میزان بازدهی تولید سلول‌های انسولین ساز با محیط تمایزی بهینه شده PRP توسط دیگر محققین با انواع سلول‌های بنیادی مزانشیمی و جنینی انجام گردد و سپس نتایج مطالعات با یکدیگر مورد بررسی قرار گیرد. در این مطالعه با بهبود پروتکل تمایز سلول‌های

References

- Care D. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 2016; 39(1): S13-S22.
- Rathmann W, Giani G. Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the Year 2000 and Projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27(10): 2568-2569.
- Chapman J. Chronic calcineurin inhibitor nephrotoxicity—lest we forget. *Am J Transplant* 2011; 11(4): 693-697.
- Enderami SE, Soleimani M, Mortazavi Y, Nadri S, Salimi A. Generation of insulin-producing cells from human adipose-derived mesenchymal stem cells on PVA scaffold by optimized differentiation protocol. *J Cell Physiol* 2018; 233(5): 4327-4337.
- Chen S, Du K, Zou C. Current progress in stem cell therapy for type 1 diabetes mellitus. *Stem Cell Res Ther* 2020; 11(1): 1-13.
- Enderami SE, Mortazavi Y, Soleimani M, Nadri S, Biglari A, Mansour RN. Generation of insulin-producing cells from human-induced pluripotent stem cells using a stepwise differentiation protocol optimized with platelet-rich plasma. *J Cell Physiol* 2017; 232(10): 2878-2886.
- Piran M, Enderami SE, Piran M, Sedeh HS, Seyedjafari E, Ardeshirylajimi A. Insulin producing cells generation by overexpression

- of miR-375 in adipose-derived mesenchymal stem cells from diabetic patients. *Biologicals* 2017; 46: 23-28.
8. Mansour RN, Soleimanifar F, Abazari MF, Torabinejad S, Ardeshirylajimi A, Ghoraiean P, et al. Collagen coated electrospun polyethersulfon nanofibers improved insulin producing cells differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2018; 46(sup3): 734-739.
 9. Dave S. Mesenchymal stem cells derived in vitro transdifferentiated insulin-producing cells: a new approach to treat type 1 diabetes. *Adv Biomed Res* 2014; 3: 266.
 10. Hashemian SJ, Kouhnavard M, Nasli-Esfahani E. Mesenchymal stem cells: rising concerns over their application in treatment of type one diabetes mellitus. *J Diabetes Res* 2015; 2015: 675103.
 11. Mirzaei A, Saburi E, Enderami SE, Barati Bagherabad M, Enderami SE, Chokami M, et al. Synergistic effects of polyaniline and pulsed electromagnetic field to stem cells osteogenic differentiation on polyvinylidene fluoride scaffold. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2019; 47(1): 3058-3066.
 12. Enderami SE, Shafiei SS, Shamsara M, Enderami SE, Rostamian Tabari A. Evaluation of osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell on highly porous polycaprolactone scaffold reinforced with layered double hydroxides nanoclay. *Front Bioeng Biotechnol* 2022; 10: 805969.
 13. Hashemi J, Pasalar P, Soleimani M, Arefian E, Khorramirouz R, Akbarzadeh A, et al. Decellularized pancreas matrix scaffolds for tissue engineering using ductal or arterial catheterization. *Cells Tissues Organs* 2018; 205(2): 72-84.
 14. Nadri S, Barati G, Mostafavi H, Esmailzadeh A, Enderami SE. Differentiation of conjunctiva mesenchymal stem cells into secreting islet beta cells on plasma treated electrospun nanofibrous scaffold. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2018; 46(sup1): 178-187.
 15. Ojaghi M, Soleimanifar F, Kazemi A, Ghollasi M, Soleimani M, Nasoohi N, et al. Electrospun poly-l-lactic acid/polyvinyl alcohol nanofibers improved insulin-producing cell differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2019; 120(6): 9917-9926.
 16. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells: when, where, and how. *Stem Cells Int* 2015; 2015: 628767.
 17. Li Y, Zhang R, Qiao H, Zhang H, Wang Y, Yuan H, et al. Generation of insulin-producing cells from PDX-1 gene-modified human mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2007; 211(1): 36-44.
 18. Okere B, Lucaccioni L, Dominici M, Iughetti L. Cell therapies for pancreatic beta-cell replenishment. *Ital J Pediatr* 2016; 42(1): 1-9.
 19. Omi M, Hata M, Nakamura N, Miyabe M, Kobayashi Y, Kamiya H, et al. Transplantation of dental pulp stem cells suppressed inflammation in sciatic nerves by promoting macrophage polarization towards anti-inflammation phenotypes and ameliorated diabetic polyneuropathy. *J Diabetes Investig* 2016; 7(4): 485-496.
 20. Zhang S, Li P, Yuan Z, Tan J. Effects of platelet-rich plasma on the activity of human menstrual blood-derived stromal cells in vitro. *Stem Cell Res Ther* 2018; 9(1): 1-11.
 21. Masoudi EA, Ribas J, Kaushik G, Leijten J, Khademhosseini A. Platelet-rich blood derivatives for stem cell-based tissue engineering and regeneration. *Curr Stem Cell*

- Rep 2016; 2(1): 33-42.
22. Sánchez-González DJ, Méndez-Bolaina E, Trejo-Bahena NI. Platelet-rich plasma peptides: key for regeneration. *Int J Pept* 2012; 2012: 532519.
23. Xu F-T, Li H-M, Yin Q-S, Liang Z-J, Huang M-H, Chi G-Y, et al. Effect of activated autologous platelet-rich plasma on proliferation and osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells in vitro. *Am J Transl Res* 2015; 7(2): 257-270.
24. Burnouf T, Strunk D, Koh MB, Schallmoser K. Human platelet lysate: replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials* 2016; 76: 371-387.
25. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97(25): 13625-13630.
26. Tang XB, Dong PL, Wang J, Zhou HY, Zhang HX, Wang SZ. Effect of autologous platelet-rich plasma on the chondrogenic differentiation of rabbit adipose-derived stem cells in vitro. *Exp Ther Med* 2015; 10(2): 477-483.
27. Bayati V, Hashemitabar M, Gazor R, Nejatbakhsh R, Bijannejad D. Expression of surface markers and myogenic potential of rat bone marrow-and adipose-derived stem cells: a comparative study. *Anat Cell Biol* 2013; 46(2): 113-121.
28. Hojjat A, Mansour RN, Enderami SE, Hassannia H, Mahdavi M, Mellati A, et al. The differentiation and generation of glucose-sensitive beta like-cells from menstrual blood-derived stem cells using an optimized differentiation medium with platelet-rich plasma (PRP). *Acta Histochem* 2023; 125(3): 152025.
29. Suchanek J, Nasry S, Soukup T. The Differentiation Potential of Human Natal Dental Pulp Stem Cells into Insulin-Producing Cells. *Folia Biol (00155500)*. 2017; 63(4): 132-138.
30. Jafarian A, Taghikhani M, Abroun S, Pourpak Z, Allahverdi A, Soleimani M. Generation of high-yield insulin producing cells from human bone marrow mesenchymal stem cells. *Mol Biol Rep* 2014; 41: 4783-4794.
31. Zhang D, Jiang W, Liu M, Sui X, Yin X, Chen S, et al. Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell Res* 2009; 19(4): 429-438.
32. Khorsandi L, Khodadadi A, Nejad-Dehbashi F, Saremy S. Three-dimensional differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into insulin-producing cells. *Cell Tissue Res* 2015; 361(3): 745-753.