

## *Effects of Platelet-Rich Plasma on Clinical and Inflammatory Manifestations in an Experimental Model of Ulcerative Colitis*

Maryam Ranjbar Bushehri<sup>1</sup>

Nahid Babaei<sup>2</sup>

Hadi Esmaeili Gouvarchin Ghaleh<sup>3</sup>

Gholamreza Khamisipour<sup>4</sup>

Gholamreza Farnoosh<sup>5</sup>

<sup>1</sup> PhD Student, Department of Molecular Cell Biology, Bushehr Branch, Islamic Azad University, Bushehr, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Molecular Cell Biology, Bushehr Branch, Islamic Azad University, Bushehr, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Applied Virology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>4</sup> Professor, Department of Hematology, Faculty of Allied Medicine, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

<sup>5</sup> Assistant Professor, Applied Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received September 10, 2023 ; Accepted December 24, 2023)

### **Abstract**

**Background and purpose:** Ulcerative colitis is a kind of inflammatory bowel disease that involves factors such as genetic predisposition, environmental factors, and disproportionate function of the mucosal immune system in response to intestinal microbial flora. Platelet-rich plasma (PRP) is a blood derivative that has anti-inflammatory and cell-regenerating properties. This study aimed to investigate the effects of PRP on the clinical and inflammatory manifestations in an experimental model of ulcerative colitis.

**Materials and methods:** In this experiment, male BALB/c mice were segregated into four groups, each consisting of 10 mice: the healthy group (negative control), the colitis group without treatment (positive control), the colitis group receiving PRP, and colitis group receiving sulfasalazine. All animals, except for those in the negative control group, were subjected to colitis induction via intrarectal injection of 100 µl of 4% acetic acid. The treatment regimen commenced after the onset of UC symptoms. The mice were euthanasia after 15 days of the last injection, and the disease activity index, as well as the inflammatory factors, were assessed.

**Results:** According to the results, the treatment groups showed a significant decrease in disease activity index, the severity of inflammation, the level of MPO, NO, and IL-1β, IL-6, and TNF-α cytokines expression and production, as well as inflammatory genes COX2 and iNOS expression, compared to the positive control group.

**Conclusion:** The results showed that PRP has favorable anti-inflammatory effects in ulcerative colitis and after additional evaluations, it can be used as an adjunctive treatment along with the drugs used in the treatment of ulcerative colitis patients.

**Keywords:** ulcerative colitis, inflammation, platelet-rich plasma, sulfasalazine

**J Mazandaran Univ Med Sci 2024; 33 (228): 1-12 (Persian).**

**Corresponding Author:** Nahid Babaei - Department of Molecular Cell Biology, Bushehr Branch, Islamic Azad University, Bushehr, Iran. (E-mail: nahid.babaei@iau.ac.ir)

# اثرات پلاسمای غنی از پلاکت بر تظاهرات بالینی و التهابی در مدل تجربی کولیت اولسراتیو

مریم رنجبر بوشهری<sup>۱</sup>

ناهید بابایی<sup>۲</sup>

هادی اسمعیلی گورچین قلعه<sup>۳</sup>

غلامرضا خمیسی پور<sup>۴</sup>

غلامرضا فرنوش<sup>۵</sup>

## چکیده

**سابقه و هدف:** کولیت اولسراتیو یک بیماری التهابی روده است که عواملی از قبیل استعداد ژنتیکی، فاکتورهای محیطی و عملکرد نامتناسب سیستم ایمنی مخاطی در پاسخ به فلور میکروبی روده در این بیماری دخیل هستند. پلاسمای غنی از پلاکت یکی از مشتقات حاصل از خون است که خاصیت ضد التهابی و بازسازی کننده سلولی دارد. مطالعه حاضر جهت بررسی اثر ضد التهابی پلاسمای غنی از پلاکت بر تظاهرات بالینی و التهابی در مدل تجربی کولیت اولسراتیو صورت پذیرفت.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، از موش های نر نژاد BALB/c استفاده شد که به ۴ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند که شامل، گروه سالم (کنترل منفی)، گروه کولیت بدون درمان (کنترل مثبت)، گروه کولیت دریافت کننده PRP و گروه کولیت دریافت کننده سولفاسالازین، است. کولیت با تزریق درون رکتومی ۱۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۴ درصد در تمام حیوانات به جز گروه کنترل منفی ایجاد شد. برنامه درمانی پس از القای کولیت و ظهور علائم آغاز گردید. موش‌ها ۱۵ روز پس از آخرین تزریق آسان کشتی شدند و میزان معیار فعالیت بیماری و فاکتورهای التهابی بررسی گردید.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که معیار فعالیت بیماری، شدت التهاب و هم‌چنین مقادیر MPO، NO، بیان و تولید سایتوکاین‌های IL-6، IL-1 $\beta$  و TNF- $\alpha$ ، بیان ژن‌های التهابی COX2 و iNOS در گروه‌های درمانی به نسبت گروه کولیت بدون درمان کاهش معناداری یافته است.

**استنتاج:** نتایج نشان داد که پلاسمای غنی از پلاکت دارای اثرات ضد التهابی مطلوبی در بیماری کولیت اولسراتیو بوده و بعد از ارزیابی‌های تکمیلی می‌تواند به عنوان یک درمان کمکی به همراه داروهای مورد مصرف در درمان بیماران مبتلا به کولیت اولسراتیو مورد استفاده قرار گیرد.

**واژه های کلیدی:** کولیت اولسراتیو، التهاب، پلاسمای غنی از پلاکت، سولفاسالازین

## مقدمه

است که با التهاب موضعی در مخاط رکتوم و کولون مشخص می‌شود. تعدادی از عوامل اتیولوژی، مانند

کولیت اولسراتیو (UC) یک شکل مزمن، عود کننده و پیشرونده از بیماری التهابی روده (IBD) با علت نامشخص

E-mail: nahid.babaei@iau.ac.ir

**مؤلف مسئول:** ناهید بابایی - بوشهر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد بوشهر

۱. دانشجوی دکتری تخصصی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، واحد بوشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، بوشهر، ایران

۲. استادیار، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، واحد بوشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، بوشهر، ایران

۳. استادیار، مرکز تحقیقات و پیروسی شناسی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

۴. استاد، گروه هماتولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

۵. استادیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۶/۱۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۲/۶/۲۸ تاریخ تصویب: ۱۴۰۲/۱۰/۳

استعداد ژنتیکی، فاکتورهای محیطی (تغذیه نامناسب، مصرف سیگار، استرس و مصرف برخی داروها) و عملکرد نامناسب سیستم ایمنی مخاطی در پاسخ به فلور میکروبی روده در این بیماری دخیل هستند (۱). علائم بیماری شامل درد شکمی، خونریزی از مقعد، اسهال، کم‌خونی، خستگی، بی‌اشتهایی و کاهش وزن است (۲). مسیر التهابی در کولیت اولسراتیو شامل بیان بالای فاکتورهای رونویسی پیش‌التهابی که منجر به تولید سایتوکاین‌های پیش‌التهابی مانند فاکتور نکروزدهنده تومور آلفا ( $TNF-\alpha$ )، اینترلوکین-۶ ( $IL-6$ )، اینترلوکین-۱ بتا ( $IL-1\beta$ ) و کاهش همزمان سایتوکاین‌ها و پروتئین‌های ضد التهابی می‌شود. افزایش سایتوکاین‌های پیش‌التهابی منجر به افزایش تولید میلوپراکسیداز (MPO)، نیتریک اکسید سنتاز القایی (iNOS) و سیکلواکسیژناز-۲ ( $COX-2$ ) شده و این فرآیندها منجر به افزایش بیش‌تر التهاب، استرس اکسیداتیو و کاهش سطح آنتی‌اکسیدان‌ها می‌شود. در نتیجه التهاب سلولی افزایش یافته، نفوذ سلول‌های ایمنی به ویژه نوتروفیل‌ها به محل کولون رخ داده و سلول‌های اپیتلیال آسیب دیده و موجب اختلال عملکرد سد کولونی می‌گردد (۳). درمان‌های ارائه شده برای کولیت اولسراتیو شامل داروهای ضد التهاب، سرکوب‌کنندگی ایمنی، عوامل بیولوژیک، آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای علامت‌درمانی می‌باشد. این داروها دارای عوارض جانبی قابل توجهی می‌باشند که شامل، انواع مشکلات سیستم گوارشی مانند حالت تهوع، بی‌اشتهایی، کاهش جذب فولات، کولیت، هپاتیت، پانکراتیت، مشکلات سیستم اندوکراین مانند استعداد بروز دیابت، فشار و چربی خون بالا، تأخیر رشد، پوکی استخوان و موارد متعدد دیگر، است. موثر نبودن داروهای رایج و عوارض جانبی زیاد پروتکل‌های درمانی، موجب چالش بزرگی در روند درمان بیماری شده است (۴). بهرامی و همکاران در سال ۲۰۲۲ گزارش کردند که در بین انواع مدل‌های القاکننده کولیت اولسراتیو در مدل حیوانی، استفاده از اسید استیک شباهت زیادی به بیماری‌های

التهابی روده در انسان دارد (۵). پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) یکی از مشتقات حاصل از خون است که غلظت پلاکتی بالایی دارد و دارای انواع فاکتورهای رشد و مولکول‌های پروتئینی از جمله سیتوکاین‌ها و کموکاین‌ها می‌باشد که در فرآیند تکثیر و تمایز سلولی نقش دارند و دارای خواص ضد التهابی و بازسازی‌کننده سلولی است. پلاکت‌های موجود در PRP با اضافه شدن فعال‌کننده‌هایی از قبیل ترومبین و کلرید کلسیم که در القا و تحریک روند آزادسازی فاکتورهای رشد از گرانول‌های آلفای موجود در PRP نقش دارند، شروع به ترشح فاکتورهای رشد می‌نمایند و بدین ترتیب در هموستاز و فرآیند التیام آسیب‌های مزمن می‌توانند نقش داشته باشند (۶). فاکتورهای رشد داخل PRP شامل فاکتور رشد مشتق از پلاکت، فاکتور رشد فیروبلاست، فاکتور رشد اندوتلیال عروقی، فاکتور رشد هیپاتوسیتی، فاکتور رشد اپیدرمی، فاکتور رشد شبه انسولین ۱ و ۲، ماتریکس متالوپروتیناز ۲ و ۹ و اینترلوکین ۸ می‌باشند که این مواد زیستی و فاکتورهای موجود در PRP باعث ایجاد پتانسیل درمانی در آن گردیده‌اند. طی سال‌های اخیر، فرآیند بهبود بخشیدن به وسیله PRP و خصوصیات ترمیمی آن در حوزه‌های مختلف پزشکی از جمله درماتولوژی، چشم پزشکی، دندانپزشکی، جراحی پلاستیک، درمان زخم‌های مزمن، اورولوژی و سوختگی‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (۷). گزارش‌های اخیر نشان می‌دهد که حداقل ۴۰ درصد از بیماران IBD از داروهای مکمل و جایگزین برای درمان بیماری استفاده می‌کنند و درمان‌های طبیعی سهم عمده‌ای از این داروها را تشکیل می‌دهند (۸). PRP یک روش درمانی طبیعی، کم‌هزینه و کم‌تهاجمی است که فاکتورهای رشد خون اتولوگ را برای تقویت بازسازی بافت و مقابله با اثرات التهابی بر روی ژن‌های تنظیم‌کننده تخریب و تشکیل ماتریکس ارائه می‌کند (۹). با توجه به این‌که درمان با PRP در بسیاری از زمینه‌های پزشکی از نظر تسریع بهبود طبیعی بافت موثر بوده و روشی بی‌خطر و بدون عارضه می‌باشد

خوراکی دریافت کردند (۱۱). گروه کولیت دریافت کننده PRP نیز بعد از القای بیماری، از روز پانزدهم مطالعه، هفته‌ای دو بار به مدت دو هفته تحت درمان با ۱۰۰ میکرولیتر از پلاسمای غنی از پلاکت (تزریق داخل صفاقی) قرار گرفتند (۱۲، ۱۳). در نهایت حیوانات با کتامین (۵۰ mg/kg) و زایلازین (۵ mg/kg)، آسان‌کشی شده و بافت کولون برای انجام آزمون‌ها برداشته شد.

### روش تهیه پلاسمای غنی از پلاکت

بعد از بیهوش کردن حیوان، نمونه‌های خونی از قلب و توسط سرنگ استریل جمع‌آوری و در لوله مخصوص حاوی ماده ضد انعقادی (سیترات سدیم) تخلیه گردید. PRP طی دو مرحله سانتریفیوژ تهیه و استخراج گردید (۱۲، ۱۳).

### ارزیابی میکروسکوپی و معیار فعالیت بیماری

فاکتورهای قوام مدفوع و شدت خونریزی به صورت روزانه بررسی گردید و در نهایت مجموع نمرات پارامترها به عنوان معیار شدت بیماری در هر موش در نظر گرفته شد (جدول شماره ۱) (۱۴).

جدول شماره ۱: معیار فعالیت بیماری

نمره	قوام مدفوع	خون در مدفوع
۰	نرمال	نرمال
۱	نرم	قرمز
۲	خیلی نرم	قرمز تیره
۳	اسهال	سیاه

جهت بررسی تغییرات هستیوپاتولوژیک، بافت کولون به طور کامل جدا شده و در محلول فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد. پس از تثبیت بافت در پارافین از نمونه‌ها مقطع تهیه شده و پس از رنگ‌آمیزی بافت‌ها با هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) مقایسه مشاهدات میکروسکوپی (شدت و وسعت التهاب، تخریب کریپتی و شدت درگیری بافت) انجام گرفت (۱۴). سیستم امتیازدهی مورد استفاده برای ارزیابی هستیوپاتولوژیک شامل، درجه ۰: هیچ التهابی مشاهده نشد، درجه ۱: سلول‌های

لذا در این مطالعه، به بررسی اثرات PRP بر کولیت القا شده توسط اسید استیک در موش که شباهت زیادی به مرحله حاد کولیت در انسان دارد، پرداخته شد. این مطالعه به منظور تعیین اثر ضد التهابی پلاسمای غنی از پلاکت بر فاکتورهای بیوشیمیایی و مشاهدات میکروسکوپی و میزان تولید و بیان سایتوکاین‌ها و ژن‌های التهابی مدل تجربی کولیت اولسراتیو می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### حیوانات

در این مطالعه تجربی، از موش‌های نر نژاد BALB/c دارای میانگین سنی ۸-۶ هفته و به وزن تقریبی ۲۰ تا ۳۰ گرم استفاده شد که از انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. موش‌ها در قفس‌های مجزا در شرایط کنترل شده (دمای استاندارد، رطوبت و چرخه روز و شب) و با رژیم غذایی طبیعی و آب نگهداری شدند. تمام مراحل این تحقیق در کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله عج مورد تایید قرار گرفت (IR.BMSU.AEC.1400.006).

### القای کولیت و طراحی مطالعه

جهت ایجاد کولیت اولسراتیو از روش تزریق درون رکتومی اسید استیک استفاده شد. قبل از القای بیماری موش‌ها به مدت ۳۶ ساعت در حالت روزه داری ولی با دسترسی به آب نگهداری شدند. برای ایجاد کولیت اولسراتیو میزان ۱۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۴ درصد از طریق یک لوله پلی اتیلنی به درون رکتوم تزریق گردید (۱۰). موش‌ها در ۴ گروه که هر گروه شامل ۱۰ موش بود به صورت تصادفی تقسیم شدند که شامل، گروه سالم، گروه کولیت بدون درمان، گروه کولیت دریافت کننده PRP و گروه کولیت دریافت کننده سولفاسالازین، است. گروه کولیت دریافت کننده سولفاسالازین پس از القای بیماری، از روز پانزدهم مطالعه، هر روز ۳۰ mg/kg سولفاسالازین به صورت

التهابی گهگاه مشاهده شد، درجه ۲: ادم خفیف مخاط، خونریزی خفیف یا ضایعات خفیف و درجه ۳: زخم شدید، ضایعات شدید، ادم و نکروز بافتی، است.

#### ارزیابی فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز

جهت اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز از محلول رویی نمونه بافت کولون هموزن شده و کیت تجاری استفاده شد. به طور خلاصه، ۱۰ میکرولیتر از نمونه هموزن شده با ۸۰ میکرولیتر از ۰/۷۵ میلی مولار H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> و ۱۰۰ میکرولیتر محلول تترا متیل بنزیدین (TMB) در PH=۵ مخلوط شد. به منظور توقف واکنش، ۵۰ میکرولیتر 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> اضافه شد و جذب محصول واکنش توسط اسپکتروفتومتر در ۴۵۰ نانومتر تعیین شد (۱۵).

#### تعیین غلظت نیتریک اکساید

غلظت نیتریک اکسید (NO) به روش رنگ سنجی گریس و استفاده از منحنی استاندارد نیتريت سدیم تعیین گردید. به طور خلاصه، ۵۰ میکرولیتر از معرف گریس با ۵۰ میکرولیتر از بافت کولون هموزن شده به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شد. سپس جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر روی دستگاه میکروپلیت ریدر اندازه گیری شد (۱۵).

#### میزان تکثیر سلول های طحالی

طحال موش ها تحت شرایط استریل خارج و بعد از قطعه شدن در ۵ میلی لیتر محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد FBS، له گردید و پس از برداشت بافت های همبندی و کپسول طحال، در حضور بافر لیزکننده گلبول های قرمز، سانتریفیوژ شد. سوسپانسیون سلول حاصل از طحال را به غلظت ۱۰<sup>۵</sup> سلول در هر ۱۰۰ میکرولیتر (هر چاهک پلیت ۹۶ خانه) و ۲×۱۰<sup>۶</sup> سلول در هر میلی لیتر (هر چاهک پلیت ۲۴ خانه) رسانده و در حضور ۵۰ میکرولیتر (۱ میلی گرم/میلی لیتر) فیتوهما گلو تینین، به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور CO<sub>2</sub> در دمای ۳۷ درجه

سانتی گراد انکوبه گردید. بعد از ۷۲ ساعت مایع رویی پلیت ۲۴ خانه جهت سنجش سایتوکاین ها جمع آوری شد. به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ۲۵ میکرولیتر محلول MTT (۵ میلی گرم در میلی لیتر PBS) اضافه شد و به مدت ۴ ساعت انکوبه گردید. سپس به هر یک از چاهک ها ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد و مقادیر OD توسط دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۵۵۰ نانومتر سنجیده گردید (۱۶).

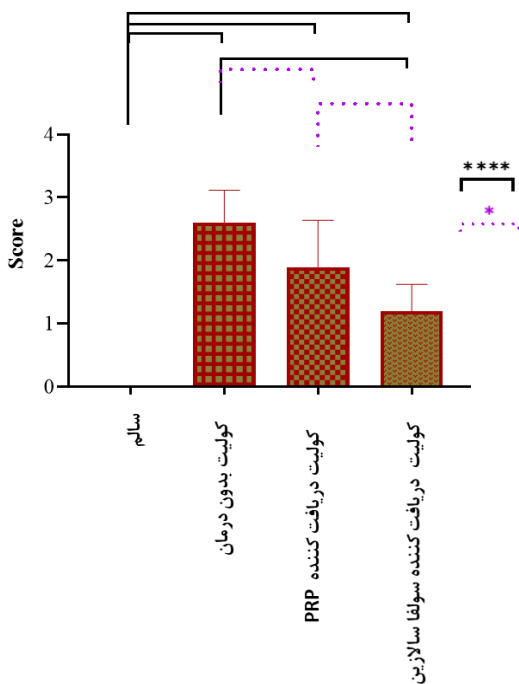
#### اندازه گیری سایتوکاین های التهابی از مایع رویی سلول های طحال

برای اندازه گیری سطح سایتوکاین های tumor necrosis factor- $\alpha$ ، interleukin 1-beta (IL-1 $\beta$ )، interleukin-6 (IL-6) و TNF- $\alpha$  در نمونه مایع رویی کشت سلول های طحال از کیت های الیزای (Karmania Pars Gene-Iran) براساس دستورالعمل شرکت سازنده مورد استفاده قرار گرفت (۱۷).

#### بررسی میزان بیان ژن ها و سایتوکاین های التهابی

از نمونه های بافت کولون طبق پروتکل کیت ستونی شرکت پارس طوس، RNA کل استخراج شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ بررسی شد. برای حذف آلودگی ژنومی احتمالی تیمار DNase I با استفاده از کیت شرکت سینا ژن انجام گرفت. یک میکروگرم از RNA برای سنتز cDNA با استفاده از کیت پارس طوس مورد استفاده قرار گرفت. برای تکثیر از تکنیک Real time PCR با محلول سایبر گرین شرکت پارس طوس انجام گرفت. توالی نوکلئوتیدی پرایمر پیشرو و توالی نوکلئوتیدی پرایمر معکوس برای تکثیر ژن های IL-1 $\beta$ ، IL-6، COX2، TNF- $\alpha$  و iNOS در موش ها با استفاده از نرم افزار طراحی پرایمر Oligo7 طراحی شد و اختصاصی بودن محل جفت شدن پرایمرها از طریق سایت NCBI مورد بررسی قرار گرفت. ژن GAPDH به عنوان ژن خانه دار

نشان داد که بیشترین و کمترین امتیاز آسیب به ترتیب در گروه کولیت بدون درمان و گروه کولیت دریافت کننده سولفاسالازین مشاهده می‌گردد. اگرچه بین گروه کولیت دریافت کننده سولفاسالازین و گروه کولیت دریافت کننده PRP اختلاف آماری معنی داری مشاهده نگردید ( $P > 0.05$ ).



نمودار شماره ۱: معیار فعالیت بیماری در گروه‌های مختلف (\* نشان دهنده معنی داری در سطح  $P < 0.05$ ، \*\*\* نشان دهنده معنی داری در سطح  $P < 0.001$  می باشد).

(House keeping) استفاده شد. برنامه PCR شامل ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه و ۴۰ سیکل PCR بود (جدول شماره ۲). توالی پرایمرها در جدول شماره ۳ آمده است.

### آنالیز آماری

برای تأیید توزیع نرمال داده‌ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف و برای مقایسه گروه‌های مطالعه از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون تعقیبی LSD استفاده شد. جداول و آنالیز آماری با نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ و نمودارها توسط نرم افزار GraphPad Prism نسخه ۸ انجام شد.  $P < 0.05$  به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

معیار فعالیت بیماری و ارزیابی میکروسکوپی بافت کولون همان طور که در نمودار شماره ۱، مشاهده می‌شود معیار فعالیت بیماری در گروه‌های درمانی نسبت به گروه کولیت بدون درمان کم تر می‌باشد و گروه کولیت دریافت کننده سولفاسالازین نیز به صورت کاملاً چشم گیر معیار فعالیت بیماری کم تری نسبت به گروه کولیت دریافت کننده PRP از خود نشان داد. هم چنین طبق نمودار شماره ۲ نتایج حاصل از بررسی‌های بافت شناسی

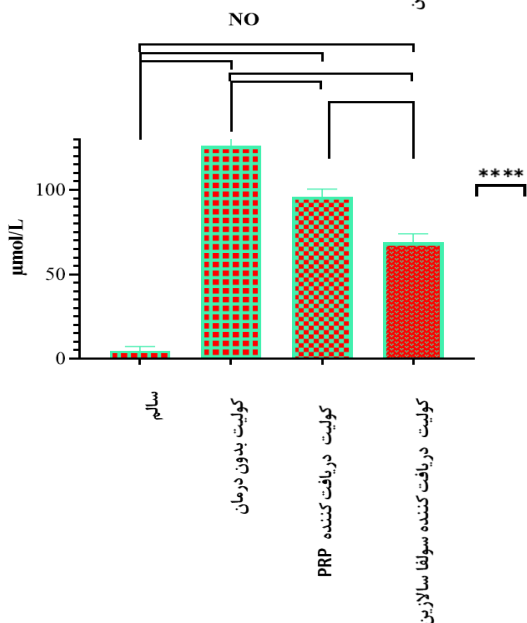
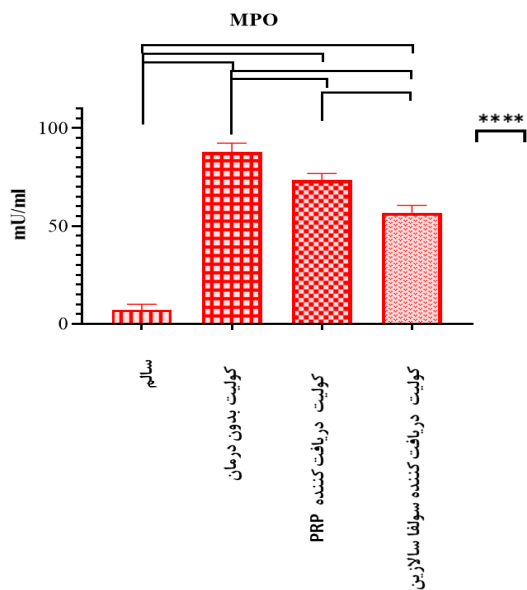
### جدول شماره ۲: پروتکل دمایی برای انجام تکثیر ژن ها

ژن	دمای دناتوراسیون اولیه دمای ۹۵ درجه سانتی گراد	دمای دناتوراسیون (به مدت ۳۰ ثانیه)	دمای اتصال (به مدت ۲۰ ثانیه) ۴۰ چرخه	دمای تکثیر (به مدت ۲۰ ثانیه)
COX2	۹۵ درجه سانتی گراد	۹۵ درجه سانتی گراد	۶۱ درجه سانتی گراد	۷۲ درجه سانتی گراد
iNOS	۹۵ درجه سانتی گراد	۹۵ درجه سانتی گراد	۶۱ درجه سانتی گراد	۷۲ درجه سانتی گراد
IL-1 $\beta$	یک چرخه	۹۵ درجه سانتی گراد	۶۲/۵ درجه سانتی گراد	۷۲ درجه سانتی گراد
IL-6	۹۵ درجه سانتی گراد	۹۵ درجه سانتی گراد	۶۰/۵ درجه سانتی گراد	۷۲ درجه سانتی گراد
TNF- $\alpha$	۹۵ درجه سانتی گراد	۹۵ درجه سانتی گراد	۶۰ درجه سانتی گراد	۷۲ درجه سانتی گراد
GAPDH	۹۵ درجه سانتی گراد	۹۵ درجه سانتی گراد	۶۱/۵ درجه سانتی گراد	۷۲ درجه سانتی گراد

### جدول شماره ۳: توالی پرایمرهای استفاده شده برای تکثیر ژن ها و طول محصول تکثیر شده

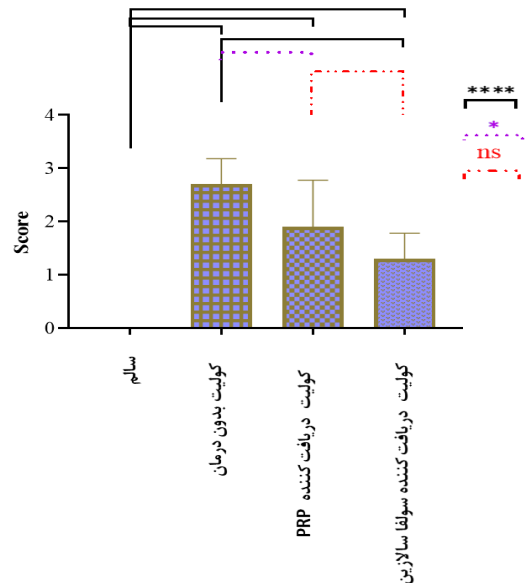
شماره دسترسی ژن در NCBI	ژن	توالی پرایمر پیشرو	توالی پرایمر معکوس	طول محصول تکثیر شده (جفت نوکلئوتید)
NM_011198.4	COX2	CTTCGGGAGCACAACAGAGT	AAGTGGTAACCGCTCAGGTG	۱۵۵
NM_010927.4	iNOS	CACCTTGGAGTTCACCCAGT	ACCACTCGTACTTGGGATGC	۱۷۰
NM_008361.4	IL-1 $\beta$	GCCACCTTTTGACAGTGATGAG	AAGGTCACGGGAAAGACAC	۲۱۹
NM_001314054.1	IL-6	CAACGATGATGCCTTGCAGA	TGTGACTCCAGCTTATCTTGG	۲۵۱
NM_001278601.1	TNF- $\alpha$	AGGCACCTCCCCAAAAGATG	CCACTTGGTGGTTGTGAGTG	۲۱۳
NM_001289726.1	GAPDH	GGTCCCAGCTTAGGTTTCAT	CATTCTCGGCCTGACTGTG	۲۴۸

درمانی کاهش میزان تکثیر معنی داری را نسبت به گروه کولیت بدون درمان از خود نشان داده‌اند ( $P < 0.0001$ ).



نمودار شماره ۳: مقادیر MPO و NO تولید شده در بافت کولون در گروه‌های مختلف مورد مطالعه (\*\*\*\* نشان‌دهنده معناداری در سطح  $P < 0.0001$  می‌باشد).

بین گروه دریافت کننده PRP و گروه کولیت بدون درمان اختلاف آماری معنی داری مشاهده گردید ( $P < 0.0001$ ). هم‌چنین گروه دریافت کننده سولفا سالازین در مقایسه با سایر گروه‌های مطالعه کم‌ترین میزان تکثیر سلولی را از خود نشان داد ( $P < 0.0001$ ).

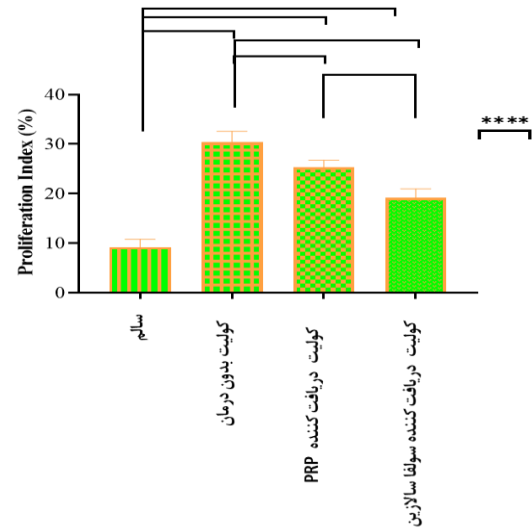
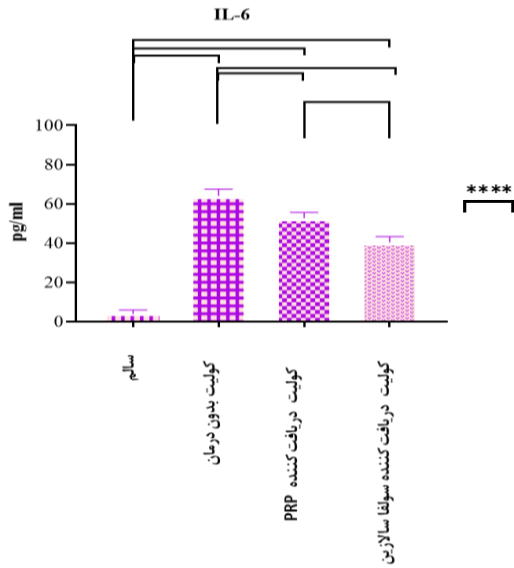


نمودار شماره ۴: اسکور بندی میکروسکوپی ضایعات در گروه‌های مورد مطالعه (\* نشان‌دهنده معناداری در سطح  $P < 0.05$ ، \*\*\*\* ns نشان‌دهنده معنی داری در سطح  $P < 0.0001$ ، ns نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی دار می‌باشد).

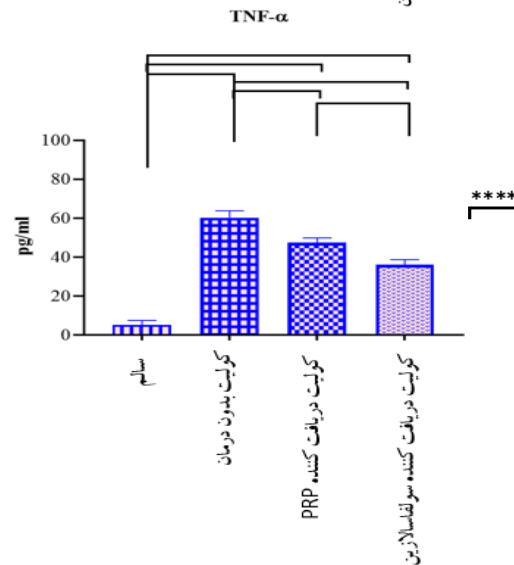
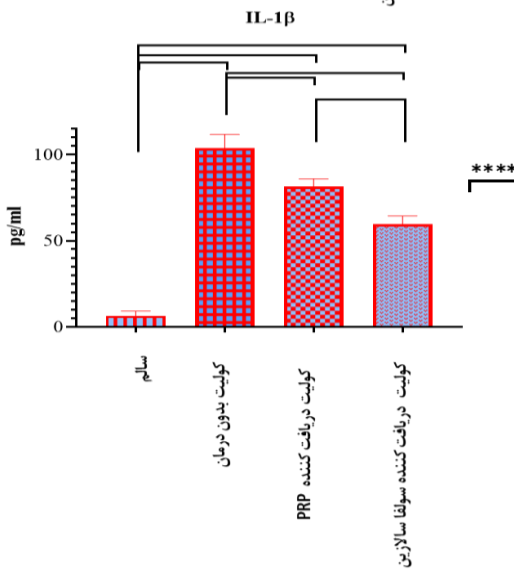
میزان تولید میلوپراکسیداز و نیتریک اکساید در بافت کولون طبق نمودار شماره ۳، بیش‌ترین میزان میلوپراکسیداز و نیتریک اکساید در گروه کولیت بدون درمان مشاهده می‌گردد. طبق بررسی انجام شده میزان میلوپراکسیداز و نیتریک اکساید تولید شده در بافت کولون تمامی موش‌های درمان شده نسبت به گروه کولیت بدون درمان کاهش معناداری یافته است ( $P < 0.0001$ ). هم‌چنین نتایج نشان داد که بین گروه کولیت دریافت کننده PRP و گروه کولیت بدون درمان اختلاف معنی داری وجود دارد ( $P < 0.0001$ ). همان‌طور که انتظار می‌رفت میزان تولید میلوپراکسیداز و نیتریک اکساید در گروه دریافت کننده سولفا سالازین در مقایسه با گروه دریافت کننده PRP کاهش بیش‌تری را نشان می‌دهد ( $P < 0.0001$ ).

بررسی میزان تکثیر سلول‌های طحالی

طبق نمودار شماره ۴، نتایج تست MTT نشان داد که بیش‌ترین میزان تکثیر سلولی طحالی مربوط به گروه کولیت بدون درمان بوده است. هم‌چنین گروه‌های



نمودار شماره ۴: میزان تکثیر سلول‌های طحالی در گروه‌های مختلف مورد مطالعه (\*\*\*\* نشان دهنده معنی‌داری در سطح  $P < 0/0001$  می‌باشد).



نمودار شماره ۵: میزان تولید سایتوکاین‌های IL-6، IL-1β، TNF-α در گروه‌های مورد مطالعه (\*\*\*\* نشان‌دهنده معناداری در سطح  $P < 0/0001$  می‌باشد).

تغییرات سایتوکاین‌های التهابی در مایع رویی سلول‌های طحال همان‌طور که انتظار می‌رفت، سطوح  $TNF-\alpha$ ،  $IL-1\beta$  و  $IL-6$  به‌طور قابل توجهی در مایع رویی طحال موش‌های گروه کولیت بدون درمان بالا بود (نمودار شماره ۵). نتایج بعد از تجزیه آماری نشان داد که میزان تولید سایتوکاین‌های  $IL-1\beta$ ،  $IL-6$  و  $TNF-\alpha$  در گروه‌های درمانی نسبت به گروه کولیت بدون درمان کاهش معنی‌داری یافت ( $P < 0/0001$ ). گروه دریافت‌کننده سولفاسالازین در مقایسه با سایر گروه‌های درمانی کم‌ترین مقدار سایتوکاین‌های التهابی را دارا بود. هم‌چنین بین گروه دریافت‌کننده PRP و سولفاسالازین تفاوت آماری معنی‌داری مشاهده گردید ( $P < 0/0001$ ).

تغییرات میزان بیان ژن‌ها و سایتوکاین‌های التهابی

میزان بیان ژن‌ها و سایتوکاین‌های  $IL-1\beta$ ،  $IL-6$ ،  $TNF-\alpha$ ،  $iNOS$  و  $COX2$  در گروه‌های مورد مطالعه به کمک تکنیک RT-PCR تعیین شد. طبق نمودار شماره ۶، نتایج نشان داد میزان بیان این ژن‌ها و سایتوکاین‌ها در گروه‌های درمانی در مقایسه با گروه کولیت بدون درمان کاهش معنی‌داری یافته بود. کم‌ترین میزان کاهش بیان در گروه دریافت‌کننده سولفاسالازین مشاهده شد.

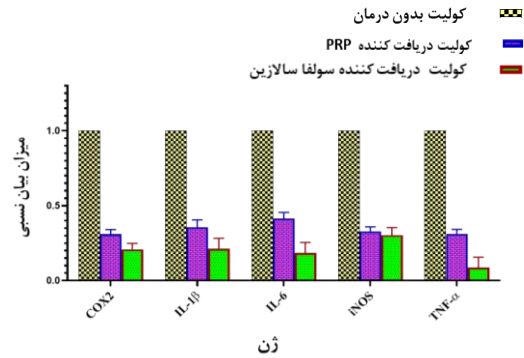


موجب تحریک معنادار فرآیندهای بیولوژیکی مورد نیاز برای بازسازی سلول‌های اپی‌تلیال قرنیه چشم انسان از قبیل افزایش تکثیر و تمایز سلول‌های اپی‌تلیالی می‌شود (۱۸).

Jalali Jivan و همکاران در سال ۲۰۱۵ گزارشی کردند که تزریق داخل مفصلی PRP می‌تواند نتایج امیدبخشی برای درمان استئوآرتریت زانو خصوصا در انواع خفیف آن به همراه داشته باشد (۱۹).

Huber و همکاران در سال ۲۰۱۶ گزارشی کردند که تزریق PRP در بیماران مبتلا به بهجت در حدود ۶ بار به فاصله زمانی ۲ هفته و سپس ۳ بار در هر ماه موجب افزایش جمعیت سلولی و پروفایل سایتوکانی ضد التهابی می‌گردد (۲۰).

da Silva و همکاران در سال ۲۰۱۷ نقش پلاسمای غنی از پلاکت را برای درمان بیماری کرون بررسی کردند. در این مطالعه ۵ بیمار با تشخیص قطعی بیماری کرون تحت درمان با PRP قرار گرفتند. میزان فاکتورهای رشد، PRP، فراوانی پلاکت‌ها و سلول‌های T تنظیمی به‌طور منظم مانیتور گردید. نتایج آندوسکوپی نشان داد که ترمیم بافت در گروه تحت درمان با PRP به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه بیمار تحت درمان با داروهای روتین بیش‌تر بود و برعکس میزان سلول‌های التهابی کاهش چشمگیری در گروه درمانی با PRP نسبت به گروه دیگر یافته بود (۲۱). بابایی و همکاران در سال ۲۰۱۷ از پلاسمای غنی از پلاکت در درمان زخم پای دیابتی مزمن استفاده کردند نتایج آن‌ها کاهش زخم پس از چهار هفته درمان را نشان داد (۲۲). Khorvash و همکاران در سال ۲۰۱۷ اثرات ژل پلاسمای غنی از پلاکت را با روش‌های درمانی زخم بر روی زخم دیابتی مقایسه کردند نتایج آن‌ها نشان داد که استفاده از ژل پلاسمای غنی از پلاکت در درمان پای دیابتی موثر است و این ترکیب می‌تواند در کنترل بهتر زخم و عفونت در کوتاه مدت موثر واقع شود (۲۳). Yousefi-Ahmadipour و همکاران در سال ۲۰۱۸ گزارشی کردند که PRP به‌طور قابل توجهی از کاهش وزن و کوتاه شدن طول کولون



نمودار شماره ۶: میزان بیان سایتوکاین‌های IL-6 و IL-1β، TNF-α و ژن‌های التهابی COX2 و iNOS در گروه‌های مورد مطالعه

## بحث

در مطالعه حاضر، از پلاسمای غنی از پلاکت برای بررسی علائم بالینی و بیوشیمیایی مدل تجربی کولیت اولسراتیو استفاده گردید. تحقیقات مختلف نشان داده‌اند که در بیماری‌های التهابی روده سایتوکاین‌های IL-1β، IL-6 و TNF-α نقش‌های مهمی را در فراخوانی سلول‌های التهابی و آسیب بافتی ایفا می‌کنند. در مطالعه حاضر، میزان تولید و بیان این سایتوکاین‌ها در گروه‌های مختلف بررسی گردید و نتایج نشان داد که میزان تولید سایتوکاین‌های IL-1β، IL-6 و TNF-α در گروه‌های درمانی نسبت به گروه کولیت بدون درمان کاهش معنی‌داری یافت. با توجه به این‌که افزایش سایتوکاین‌های پیش‌التهابی منجر به افزایش تولید ژن‌های COX2 و iNOS می‌گردد، بنابراین میزان بیان این ژن‌ها نیز در گروه‌های مختلف مطالعه بررسی گردید و نتایج نشان داد که میزان بیان این ژن‌ها در گروه‌های درمانی کاهش معنی‌داری یافت. این مطالعه اولین تحقیق در نوع خود جهت بررسی اثرات ضد التهابی PRP بر بیان سایتوکاین‌ها و ژن‌های التهابی مدل تجربی کولیت اولسراتیو می‌باشد. Freire و همکاران در سال ۲۰۱۲ اثرات سه مشتق خونی از جمله سرم اتولوگ (AS)، پلاسمای غنی از پلاکت (PRP) و پلاسمای غنی از فاکتورهای رشد (PRGF) را بر رده سلولی اپی‌تلیال قرنیه چشم انسان (HCE) بررسی کردند و نتایج آن‌ها نشان داد که PRGF نسبت به سایر مشتقات خونی و PRP

از طریق تعدیل وضعیت التهابی بهبود ببخشد (۲۶). Shively و همکاران در سال ۲۰۲۱ گزارش کردند که PRP یک درمان ایمن و مفید در بیماران مبتلا به آرتريت روماتوئید می باشد که عمدتاً مفصل دست را تحت تأثیر قرار می دهد و می تواند به عنوان درمان کمکی یا جایگزین در این بیماران مورد استفاده قرار گیرد (۲۷). Meznerics و همکاران در سال ۲۰۲۲ گزارش کردند که PRP یک روش ایمن و موثر برای بهبود زخم های مزمن است (۲۸). Hermann و همکاران در سال ۲۰۲۲ اثرات پلاسمای غنی از پلاکت را در فیستول های رکتواژینال در بیماران مبتلا به کولیت اولسراتیو بررسی کردند و نتایج آن ها نشان داد که استفاده از PRP در فیستول های مقعدی کوچک و کم موثر بوده و دارای میزان بهبودی قابل قبولی می باشد (۲۹). نتایج نشان داد که پلاسمای غنی از پلاکت دارای اثرات ضد التهابی مطلوبی در ترمیم و بازسازی بافت روده در بیماری کولیت اولسراتیو بوده و به نظر می رسد بعد از انجام ارزیابی های تکمیلی بتواند به عنوان یک درمان کمکی به همراه داروهای مورد مصرف در درمان بیماران مبتلا به کولیت اولسراتیو مورد استفاده قرار گیرد.

## سپاسگزاری

مطالعه حاضر حاصل پایانامه مقطع دکتری خانم مریم رنجبر بوشهری می باشد. نویسندگان مقاله سپاس و قدردانی خود را از تمام افرادی که در پیشبرد این پژوهش، یاری رسانند اعلام می دارند.

## References

1. Aslam N, Wei Lo S, Sikafi R, Barnes T, Segal J, Smith PJ. A review of the therapeutic management of ulcerative colitis. *Therap Adv Gastroenterol* 2022; 15: 17562848221138160.
2. Feuerstein JD, Cheifetz AS. Ulcerative colitis: Epidemiology, diagnosis, and management. *Mayo Clin Proc* 2014; 89(11): 1553-1563.
3. Saxena A, Kaur K, Hegde S, Kalekhan FM, Baliga MS, Fayad R. Dietary agents and phytochemicals in the prevention and treatment of experimental ulcerative colitis. *J Tradit Complement Med* 2014; 4(4): 203-217.
4. Ferretti F, Cannatelli R, Monico MC, Maconi G, Ardizzone S. An update on current

در کولیت القا شده با TNBS در موش های صحرایی ممانعت می کند. بنابراین PRP به عنوان یک گزینه درمانی امید بخش برای بیماری های التهابی بوده و قادر به نشان دادن اثرات ضد التهابی بر روی کولیت است (۲۴).

Lee و همکاران در سال ۲۰۱۹ پلاسمای غنی از پلاکت را به میزان ۱۰۰ میکرولیتر هفته ای دو بار به مدت دو هفته به موش های دارای آسیب پوستی ناشی از اشعه به صورت زیرجلدی تزریق کردند و نتایج آن ها نشان داد که پلاسمای غنی از پلاکت موجب بهبود زخم های پوستی و بازسازی اپی تلیال می گردد (۱۲).

de la Portilla و همکاران در سال ۲۰۲۰ اثرات پلاسمای غنی از پلاکت را در درمان فیستول مقعدی در بیماران کرون بررسی کردند و نتایج آن ها نشان داد که PRP در بیماران مبتلا به کرون سرعت بهبودی قابل قبولی دارد به ویژه اگر همزمان با درمان های بیولوژیکی استفاده گردد (۲۵).

Yousefi-Ahmadipour و همکاران در سال ۲۰۲۰ اثرات درمانی ترکیب لیزات پلاکت و سولفاسالازین را در کولیت القا شده با TNBS در رت بررسی کردند، نتایج آن ها نشان داد که آسیب بافتی کولیت با تجویز همزمان لیزات پلاکت (PL) و سولفاسالازین کاهش یافت و هم چنین موجب کاهش سایتوکاین های پیش التهابی  $TNF-\alpha$ ،  $IL-1\beta$  و  $IL-6$  و افزایش سایتوکاین های ضد التهابی  $IL-1\beta$  و  $TGF-\beta$  گردید. علاوه بر این درمان ترکیبی باعث کاهش آپوپتوز و مهار مسیر سیگنال دهی  $NF-\kappa B$  گردید، بنابراین درمان ترکیبی می تواند IBD را

- pharmacotherapeutic options for the treatment of ulcerative colitis. *J Clin Med* 2022; 11(9): 2302.
5. Bahrami G, Malekshahi H, Miraghaee S, Madani H, Babaei A. Improving animal model of induced colitis by acetic acid in terms of fibrosis and inflammation incidence in the colon. *J Investig Surg* 2022; 35(1): 214-222.
  6. Pixley JN, Cook MK, Singh R, Larrondo J, McMichael AJ. A comprehensive review of platelet-rich plasma for the treatment of dermatologic disorders. *J Dermatol Treat* 2023; 34(1):2142035.
  7. Alves R, Grimalt R. A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification. *Skin Appendage Disord* 2018; 4(1): 18-24.
  8. Hilsden RJ, Verhoef MJ, Best A, Pocobelli G. Complementary and alternative medicine use by Canadian patients with inflammatory bowel disease: Results from a national survey. *Am J Gastroenterol* 2003; 98(7): 1563-1568.
  9. Everts P, Onishi K, Jayaram P, Lana JF, Mautner K. Platelet-Rich Plasma: New Performance Understandings and Therapeutic Considerations in 2020. *Int J Mol Sci* 2020; 21(20): 7794.
  10. Gheibi S, Hashemi SR, Karimipour M, Motlagh BM, Esmaeili, H. Synergistic effects of hydro extract of jujube fruit in combination with Mesalazine (orally) and Asacol (intra-colonic) administration in ameliorating animal model of ulcerative colitis. *J Coloproctol* 2018; 38: 275-282.
  11. Shin MR, Kim KJ, Kim SH, Kim SJ, Seo BI, An HJ, et al. Comparative evaluation between sulfasalazine alone and in combination with herbal medicine on DSS-induced ulcerative colitis mice. *BioMed Res Int* 2017; 2017: 6742652.
  12. Lee J, Jang H, Park S, Myung H, Kim K, Kim H, et al. Platelet-rich plasma activates AKT signaling to promote wound healing in a mouse model of radiation-induced skin injury. *J Transl Med* 2019; 17: 295.
  13. Bayat M, Zabihi S, Karbalaee N, Haghani M. Time-dependent effects of platelet-rich plasma on the memory and hippocampal synaptic plasticity impairment in vascular dementia induced by chronic cerebral hypoperfusion. *Brain Res Bull* 2020; 164: 299-306.
  14. Ranjbar Bushehri M, Babaei N, Esmaeili Gouvarchin Ghaleh H, Khamisipour G, Farnoosh G. Anti-inflammatory activity of peiminine in acetic acid-induced ulcerative colitis model. *Inflammopharmacology* 2023; 19:1-9.
  15. Mashhour S, Abtahi Froushani SM, Tehrani AA. Non-adherent bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate clinical manifestations and inflammation in an experimental model of ulcerative colitis in rats. *Iran J Med Sci* 2020; 45(5): 341-351 (Persian).
  16. Froushani SM, Galeh HE. New insight into the immunomodulatory mechanisms of Tretinoin in NMRI mice. *Iran J Basic Med Sci* 2014; 17(9): 632-637 (Persian).
  17. Hosseini A, Ghaleh HE, Aghamollaei H, Ramandi MF, Alishiri G, Shahriary A, et al. Evaluation of Th1 and Th2 mediated cellular and humoral immunity in patients with COVID-19 following the use of melatonin as an adjunctive treatment. *Eur J Pharmacol* 2021; 904: 174193.
  18. Freire V, Andollo N, Etxebarria J, Duran JA, Morales MC. In vitro effects of three blood derivatives on human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53(9): 5571-5578.

19. Jalali Jivan S, Asadi T, Shariati-Sarabi Z, Tavakol afshari J, Ghasemi A, Hamidi alamdari D. Platelet-Rich plasma: A new therapeutic approach for osteoarthritis. *Med J Mashhad Univ Med Sci* 2015; 58(2): 74-79 (Persian).
20. Huber SC, Montalvão SA, Sachetto Z, De Paula EV, Annichino-Bizzacchi JM. Autologous platelet rich plasma (PRP) provoke immunomodulatory response by an increase of regulatory T cells (CD4+ CD25+ FOXP3+) with a decrease of activated NK cells (CD16+ CD56+ CD69+) in a longitudinal study of patients with behçEt's disease. *Blood* 2016; 128(22): 3849.
21. da Silva FA, Rodrigues BL, Huber SC, Luiz J, Júnior RC, Lana JF, et al. The use of platelet rich plasma in the treatment of refractory Crohn's disease. *Int J Clin Exp Med* 2017; 10(5): 7533-7542.
22. Babaei V, Afradi H, Gohardani HZ, Nasserif, Azarafza M, Teimourian S. Management of chronic diabetic foot ulcers using platelet-rich plasma. *J Wound Care* 2017; 26(11): 784-787.
23. Khorvash F, Pourahmad M, Khoshchingol N, Avijgan M, Mohammadi M, Saheb nazari K. Comparing the effects of the platelet-rich plasma gel with wound therapeutic methods on the treatment of diabetic foot. *J Isfahan Med Sch* 2017; 35(450): 1389-1395 (Persian).
24. Yousefi-Ahmadipour A, Pour Mohammadi-Nejad F, Ebrahimi S. Platelet rich plasma as a tool for inflammatory bowel disease treatment. 1<sup>th</sup> International Iranian Tissue Engineering and Regenerative Medicine Congress 2018 Jul 18-20; Tehran, Iran.
25. de la Portilla F, Jimenez-Salido A, Araujo-Miguez A, Maestre-Sanchez MV, Reyes-Diaz ML, Ramallo-Solis I, et al. Autologous platelet-rich plasma in the treatment of perianal fistula in crohns disease. *J Gastrointest Surg* 2020; 24(12): 2814-2821.
26. Yousefi-Ahmadipour A, Ebrahimi-Barough S, Niknia S, Allahverdi A, Mirzahosseini-pourranjbar A, Tashakori M, et al. Therapeutic effects of combination of platelet lysate and sulfasalazine administration in TNBS-induced colitis in rat. *Biomed Pharmacother* 2020; 125: 109949.
27. Shively D, Amin N. Platelet-Rich Plasma for Rheumatoid Arthritis: A Case Series. *Cureus* 2021; 13(11): e19629.
28. Meznerics F.A, Fehérvári P, Dembrovszky F, Kovács K.D, Kemény L.V, Csupor D, et al. Platelet-Rich Plasma in Chronic Wound Management: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *J Clin Med* 2022; 11(24): 7532.
29. Hermann J, Cwalinski J, Banasiewicz T. Application of platelet-rich plasma in rectovaginal fistulas in the patients with ulcerative colitis. *Langenbecks Arch Surg* 2022; 407(1): 429-433.