

مقایسه بین قابلیت‌های محافظتی داربست طبیعی و سنتتیک به عنوان محیط رشد مناسب سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی

مهديه سادات قیائی^{۱*}، محسن شیخ حسن^۱، رضا طباطبائی قمی^۱، ناصر کلهر^۱، محمد مهدی زاده^۲

۱. پژوهشگر، گروه سلول‌های بنیادی، جهاد دانشگاهی استان قم
۲. استادیار، بخش جراحی دهان، فک و صورت، دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل

چکیده

سابقه و هدف: مهندسی بافت یکی از علوم است که با استفاده از روش‌های پیشرفته به ترمیم بافت‌های آسیب دیده پرداخته و باعث بهبود و بازسازی آن‌ها می‌شود. موفقیت در این فرآیند نیازمند وجود عوامل بهینه و کارآمد است. از جمله عوامل مهم در این موفقیت، استفاده از داربست‌های مناسب با خواص مکانیکی و زیستی فوق‌العاده جهت فراهم آوردن یک محیط رشد بهینه و شرایط مناسب تمایزایی سلول‌های بنیادی می‌باشد. در این تحقیق به ارزیابی کارایی دو داربست پلاسمای غنی شده از پلاکت و پلی لاکتیک گلیکولیک اسید در ایجاد محیط مناسب جهت رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی پرداخته شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، پس از آماده‌سازی دو داربست PRP و PLGA و جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی از بافت چربی، این سلول‌ها به طور جداگانه بر روی این دو داربست کشت شد و پس از گذشت ۴۸ ساعت از کشت سلول‌ها بر روی داربست‌ها، ارزیابی توانایی زنده ماندن سلول‌ها توسط تست MTT به عمل آمد.

یافته‌ها: در این مطالعه، دو داربست PRP و PLGA به عنوان دو محیط مناسب جهت کشت و تکثیر سلول‌های بنیادی مزانشیمی مورد استفاده قرار گرفتند.

بحث: یافته‌های حاصل از این مطالعه با استفاده از تست MTT نشان داد که هنگامی که PRP در حالت فعال همراه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کار می‌رود از کارایی بالاتری نسبت به PLGA برخوردار می‌باشد.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد استفاده از داربست‌های مشتق شده از PRP می‌تواند به عنوان محافظی به منظور رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای توسعه استراتژی‌های کارا و جدید در مهندسی بافت و طب ترمیمی مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: مهندسی بافت، PRP، PLGA، سلول‌های بنیادی مزانشیمی

مقدمه

بیشتر آسیب‌ها در جوانی توسط خود بدن قابل ترمیم می‌باشند اما با افزایش سن قابلیت ترمیم کاهش می‌یابد. در نتیجه نیاز به روش‌هایی جهت بهبود آسیب‌های ترمیم ناپذیر در جوانی و ترمیم آسیب‌های حاصل از پیری وجود دارد که از جمله اهداف مهم درمانی و علمی به شمار می‌آید. هر روزه هزاران روش کلینیکی، جایگزینی یا ترمیم بافت‌های آسیب دیده در بدن انسان را انجام می‌دهند که یکی از روش‌های معمول جهت این هدف، پیوند بافت می‌باشد. در این روش اهداءکننده‌ها، بافت‌های خود را در اختیار فرد آسیب دیده قرار می‌دهند. بافت فرد

با اینکه بدن انسان قابلیت بسیار بالایی در ترمیم نواحی آسیب دیده خود دارد، با این حال بسیار آسیب‌پذیر می‌باشد. معمولاً

*نویسنده مسئول: مهديه سادات قیائی

پست الکترونیکی: m.ghiasi@acecr.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۷/۰۶

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۰۲/۰۶

اهداءکننده خارج شده و به فرد پذیرنده پیوند زده می‌شود. این روش دارای مشکلاتی است که استفاده از آن را محدود ساخته که از جمله آن‌ها می‌توان به هزینه بالای این روش، مشکلات ایمنی از جمله ایجاد آلودگی‌های میکروبی، رد پیوند توسط سیستم ایمنی بدن گیرنده پیوند و تعداد محدود اهداءکننده اشاره نمود. در نتیجه، نیاز به جایگزین مناسبی برای این روش وجود دارد. به این منظور، از روش‌های مهندسی بافت استفاده می‌شود که در آن به طراحی ساختارهایی مشابه بافت‌های آسیب دیده پرداخته می‌شود که پیشرفت‌های اخیر در این زمینه بر مشکلات روش‌های پیوند بافت غلبه خواهد کرد و این روش نیازمند به‌کارگیری ابزارهای مهمی نظیر داربست^۱ سلولی، سلول‌ها و مولکول‌های فعال زیستی می‌باشد. تا به حال، با استفاده از مهندسی بافت، آزمایشات بر روی ترمیم بسیاری از بافت‌ها از جمله غضروف انجام شده است. به منظور افزایش کارایی و بهبود عملکرد کشت سلول و بافت‌های مهندسی شده، نیاز به ایجاد داربست‌های مناسب و کارا می‌باشد. داربست‌ها ساختارهایی متکی بر مواد موجود در ماتریکس خارج سلولی می‌باشند که تیمارهای مختلفی روی آن‌ها صورت پذیرفته است. داربست‌های سلولی دارای خصوصیت‌هایی هستند که از جمله آن‌ها می‌توان به عدم سمیت، قابلیت سازگاری زیستی، قابلیت تجزیه زیستی، عدم ایمنی‌زایی، تهیه آسان، خصوصیات فیزیکی و مکانیکی مناسب و پایداری مطلوب اشاره نمود. امکان تجزیه پذیری زیستی داربست جهت جایگزین شدن سلول‌ها پس از رشد با داربست ضروری می‌باشد. پلیمرهایی که به عنوان ماده اولیه جهت تهیه داربست سلولی کاربرد دارند به دو گروه پلیمرهای طبیعی و مصنوعی طبقه بندی می‌شوند. داربست‌ها دارای کاربردهای فراوانی هستند که از جمله می‌توان به استفاده از آن‌ها در دارورسانی^۲، ژن‌رسانی^۳، سلول‌رسانی^۴ اشاره نمود. اما امروزه اصلی‌ترین هدف استفاده از آن‌ها بازسازی مجدد^۵ بافت‌های آسیب دیده بدن می‌باشد. بنابراین هر داربست در عمل باید توانایی وارد کردن آثار بیولوژیکی و مکانیکی خاص را به منظور بهبود و تغییر رفتار سلولی دارا باشد. بدین منظور هر داربست براساس خواص بافت هدفش طراحی می‌شود. انتخاب نوع و جنس داربست مهم‌ترین بخش کار است به طوری که در نهایت جایگزین بافت آسیب دیده می‌شود. داربست نه تنها اجازه اتصال سلول‌ها را به خود می‌دهد، بلکه باعث مهاجرت سلول‌ها،

نقل و انتقال فاکتورهای بیوشیمیایی، انتشار مواد غذایی، مواد زاید و نیز مواد تولیدی سلول‌ها می‌شود. مواد زیستی مورد استفاده جهت ساخت داربست می‌توانند پلیمرهای طبیعی هم-چون پلاسمای غنی از پلاکت و یا پلیمرهای سنتتیک هم‌چون PLGA باشند. PRP یک ابزار بیولوژیکی نوظهور در جراحی و طب ترمیمی می‌باشد. PRP توانایی تحریک رشد و تمایز سلول‌های بنیادی را در شرایط آزمایشگاهی دارد و به عنوان یک داربست در پژوهش‌های مهندسی بافت می‌توان از آن استفاده نمود. به طور کلی PRP را می‌توان به عنوان پلاسمای همراه با مقدار زیادی از پلاکت‌ها به نسبت گلبول سفید خون تعریف نمود. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد ژل PRP به تنهایی یا به همراه سلول‌های بنیادی مزانشیمی اتولوگ توانایی ترمیم و بهبود بخشیدن زخم را دارا می‌باشند (۱۱). PRP به طور موفقیت‌آمیزی در سال ۱۹۷۰ توسط Matras برای اهدافی هم-چون پیوند پوست در موش مورد استفاده قرار گرفت. در حال حاضر، PRP داربست اتولوگی است که اغلب در جراحی‌های ارتوپدی مورد استفاده قرار می‌گیرد. مزیت اصلی PRP این است که یک ماده اتولوگ بوده و فعالیت آن بدون سمیت و ایجاد پاسخ ایمنی می‌باشد. استفاده از داربست‌های مشتق شده از PRP به دلیل وجود فاکتورهای رشد چندین مزیت دارد. در این فاکتورهای رشد به‌دست‌آمده از پلاکت‌ها نه تنها تمایل اختصاصی به بافت وجود دارد بلکه قابلیت برهم کنش با فاکتورهای رشد دیگر را نیز دارند که این عمل منجر به فعال شدن بیان ژن و تولید پروتئین می‌شود. PRP غنی از پروتئین‌هایی هم‌چون فیبرونکتین و فیبرین و پروتئین‌های اتصال می‌باشد که به عنوان یک مولکول اتصال عمل نموده و می‌توانند مهاجرت سلولی را تحریک نمایند. در طی دو دهه گذشته پلیمر زیستی PLGA به عنوان یکی از جالب‌ترین کاندیدهای پلیمری جهت ساخت داربست‌های مورد نیاز در پژوهش‌های مهندسی بافتی استفاده شده است (۱). PLGA یک پلیمر زیست تخریب پذیر و زیست سازگار بوده و خصوصیات بهینه مکانیکی داشته و پلیمری است که توسط سازمان غذا و داروی آمریکا^۶ تأیید شده است (۶). با این حال این پلیمر زیستی خواص آبدوستی و قابلیت جذب آب پایینی داشته و تخریب پذیری در آن به کندی صورت می‌پذیرد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی^۷ گروهی از سلول‌های بنیادی بالغ هستند که به علت قابلیت ویژه آن‌ها

⁵ -Regeneration

⁶ -FDA

⁷ -MSC

¹ -Scaffold

² - Drug Delivery

³ - Gene Delivery

⁴ - Cell Delivery

پلاکت‌ها و فاکتورهای رشد بود. در این تحقیق PRP به دو گروه تقسیم شد که شامل PRP فعال شده با کلرید کلسیم و PRP غیرفعال می‌باشد. برای تولید PRP فعال، محلول ۱۰٪ کلرید کلسیم قبل از استفاده از PRP به آن اضافه شد.

جداسازی و پاساژ سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی:

در این مطالعه، برای جداسازی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، بافت چربی به دست آمده از جراحی لیپوساکشن در سرم فیزیولوژی حاوی آنتی‌بیوتیک و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد از بیمارستان به آزمایشگاه منتقل و پس از چندین بار شستشو با PBS و سرم فیزیولوژی به قطعات کوچک تبدیل شد. سپس سلول‌های بنیادی مزانشیمی به وسیله هضم با آنزیم کلاژناز I از بافت چربی استخراج گردید. به این صورت که ابتدا به ازای هر یک گرم چربی ۱٫۵ میلی‌گرم آنزیم کلاژناز I به آن اضافه و به مدت ۴۵ تا ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس تحت سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۸۰۰ دور در دقیقه قرار گرفته و در نهایت رسوب سلولی در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰۰ واحد/میلی لیتر آنتی‌بیوتیک پنی سیلین/استرپتومایسین ۱٪ و FBS ۱۰٪ به فلاسک مخصوص کشت سلول منتقل و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵٪ CO₂ و رطوبت ۹۵٪ قرار داده شدند. پس از گذشت یک روز، سلول‌هایی که به کف فلاسک نچسبیده بودند، با تعویض محیط از فلاسک حذف شدند. محیط کشت سلول‌ها هر ۳ روز یک بار تعویض گردید. سلول‌ها پس از ترپسینه شدن به مرحله پاساژ دو انتقال یافت و جهت استفاده آماده گردید.

تعیین توانایی زنده ماندن سلول توسط تست MTT

ارزیابی توانایی زنده ماندن سلول پس از گذشت ۴۸ ساعت از کشت سلول‌ها بر روی داربست‌ها انجام پذیرفت. نیم میلی‌لیتر محیط کشت DMEM و ۵۰ میکرولیتر محلول MTT (۳٪) و ۵-دی‌متیل) تیازول-۲-یل-۴-۵-دی‌متیل تترازولیم بروماید، ۵ میلی‌گرم/میلی لیتر) به داربست‌ها اضافه شد. پس از ۴ ساعت انکوباسیون، نیم میلی‌لیتر دی‌متیل سولفوکسید^{۱۰} به محلول حاصل اضافه شد. پس از گذشت ۲۰ دقیقه در نهایت میزان جذب نوری سلول/داربست در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه میکروپلیت ریدر اندازه‌گیری شد.

مورد توجه جوامع پزشکی و علمی قرار گرفته اند. این سلول‌ها جزو سلول‌های پیش ساز چندتوان هستند که قابلیت رشد و نمو و تکثیر و خودنوزایی بالایی را در محیط کشت داشته و می‌توانند به رده‌های مختلف سلولی هم‌چون سلول‌های غضروفی، استئوبلاست، آدیپوسیت، سلول‌های اندوتلیال، سلول‌های عصبی، سلول‌های میوسیت قلبی، سلول‌های هپاتوسیت و سلول‌های پانکراس تمایز یابند. به علت قابلیت‌های ویژه این سلول‌ها در زمینه مهندسی بافت و طب ترمیمی، از این سلول‌ها در ترمیم و بازسازی بیماری‌ها و آسیب‌های فیزیولوژیکی هم-چون آسیب‌های غضروف‌های مفصلی، ناهنجاری‌های عصبی و بیماری‌های حاصل از دستگاه ایمنی استفاده می‌گردد.

روش کار

مواد مورد نیاز

در این تحقیق، PLGA ۵۰/۵۰ و محیط DMEM^۸ جهت کشت سلولی از شرکت سیگما خریداری شد. سرم جنین گوساله^۹ و آنتی بیوتیک پنی‌سیلین/ استرپتومایسین از شرکت Gibco خریداری شد.

آماده سازی داربست PLGA

ابتدا ذرات PLGA ۵٪ در کلرید متیلن حل شده و سپس NaCl به آن اضافه شده و درون یک ظرف پلاستیکی با ارتفاع ۳ میلی‌متر و قطر ۶ میلی‌متر ریخته شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد فریز شد. داربست پلیمری منجمد شده به مدت ۲ روز در آب دوبار تقطیر شستشو داده شد تا ذرات نمک از آن خارج شود. سپس، نمونه با استفاده از UV استریل شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان در مرحله پاساژ دوم ترپسینه شدند و سپس تعداد سلول‌ها با لام هموسایتومتر شمارش و توانایی زنده ماندن آن‌ها با رنگ تریپان بلو ارزیابی شد. در پایان، سلول‌ها بر روی داربست PLGA با دانسیته سلولی 2×10^4 سلول/ میلی‌متر انتشار یافتند.

آماده سازی PRP

ابتدا خون محیطی را به داخل یک لوله آزمایش حاوی ۳٫۸٪ سدیم سیترات با نسبت ۱ به ۹ ریخته و به دنبال آن به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. محصول به دست آمده به ۳ لایه تقسیم شد که لایه پایینی حاوی سلول‌های خونی غنی از اریتروسیت‌ها بود، لایه میانی حاوی لوکوسیت‌ها و سایتوکین‌های التهابی و لایه بالایی حاوی پلاسما،

¹⁰- DMSO

⁸- Dulbecco's Modified Eagles Medium

⁹-FBS

بحث

در حجم کمی پلازما به صورت محلول درآمده‌اند تشکیل شده و به عنوان حاملی که توسط پلاکت‌های خود فاکتورهای رشد را ترشح می‌نماید عمل می‌کند. این واقعیت که گرانول‌های آلفای موجود در PRP توسط پلاکت‌های دارای بسیاری از فاکتورهای رشد ترشح می‌شود به خوبی مشخص شده است. از جمله این فاکتورها می‌توان به فاکتورهای AA، AB و BB، فاکتورهای رشد انتقالی B1 و B2، فاکتورهای رشد اپیدرمی، فاکتورهای رگ‌زایی، فاکتورهای رشد انسولین-1 و فاکتورهای پلاکتی-4 اشاره نمود. این فاکتورهای رشد هنگامی که از پلاکت‌ها آزاد می‌شوند بازسازی و ترمیم بافت‌های مختلف را تحت تأثیر قرار می‌دهند که این مسئله به علت وجود برخی از محرک‌ها از جمله حضور ترومبین که سبب دگرانوله شدن پلاکت‌ها می‌شود رخ می‌دهد. این نتایج استفاده از PRP را به عنوان یک داربست مناسب و قدرتمند تأیید می‌نماید. بر اساس نتایج حاصل از برخی مطالعات بر روی عملکردهای بیولوژیکی و فیزیولوژیکی هیدروژل‌ها، پیشنهاد شد که استفاده از PRP به جای هیدروژل‌ها برای انتقال سلول‌ها به داربست‌های ۳ بعدی می‌تواند بهبود بیشتری را در روش‌های کشت متداول ایجاد نماید. پیشنهاد می‌شود که استفاده از PRP جهت انتقال سلول‌ها می‌تواند به صورت هم‌زمان فاکتورهای زیست فعال بسیاری را به داربست‌ها انتقال دهد و امکان مساعدت در کیموتاکسیس و میتوژنی سلول‌های بنیادی و استئوبلاست‌ها، رگ‌زایی، تشکیل ماتریکس استخوانی و ساخت کلاژن را فراهم آورد.

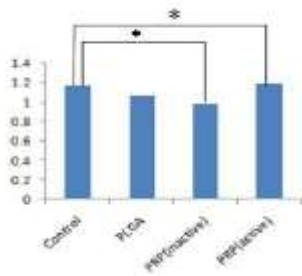
بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، استفاده از داربست‌های مشتق شده از PRP به عنوان محافظی به منظور رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی برای توسعه استراتژی‌های کارا و جدید در مهندسی بافت و طب ترمیمی پیشنهاد می‌گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که از لحاظ LSD (0.05)، $P <$ بین نمونه کنترل با PRP فعال و PRP غیرفعال اختلاف معنی‌داری وجود دارد. نتایج ارزیابی داربست‌ها در شکل ۱ آورده شده است. در قسمت اول این مطالعه، سلول‌های بنیادی مزانشیمی به ترتیب در داربست‌های PLGA و PRP بارگذاری شده است. در این آزمایش از PRP به دو صورت فعال با کلرید کلسیم ۱۰٪ و غیرفعال استفاده شد. نتایج حاصل از این مطالعه با استفاده از تست MTT نشان داد هنگامی که PRP در حالت فعال همراه با سلول‌های بنیادی مزانشیمی به کار می‌رود از جذب بالاتری نسبت به PLGA برخوردار می‌باشد. در قسمت

تحقیقات مختلف نشان دادند که PRP حاوی غلظت‌های بالایی از فاکتورهای رشد بوده و این سایتوکین‌ها می‌توانند سلول‌هایی را که بر روی آن‌ها کشت می‌شوند تحریک به رشد نمایند (۳ و ۵). در این آزمایش می‌توان یکی از دلایل کارایی بیشتر داربست‌های PRP نسبت به PLGA را برهم کنش بین سایتوکین‌های موجود در در این داربست با سلول‌های بنیادی مزانشیمی دانست که منجر به رشد بیشتر این سلول‌ها گردید. هیدروفوب بودن سطح داربست PLGA که باعث محدود شدن چسبندگی و رشد سلول در سطح آن می‌شود احتمالاً یکی از دلایل کاهش دهنده کارایی این داربست به شمار می‌آید. فقدان گروه‌های عملکردی در سطح این پلیمر امکان تغییرات را محدود می‌کند (۶ و ۷). این داربست وقتی در شرایط حیاتی به اندام یا بافت آسیب دیده پیوند زده می‌شود می‌تواند به راحتی یک واکنش ایمنی مزمن را ایجاد کند. علاوه بر این، این داربست به طور معمول تحت شرایط نسبتاً سختی ساخته می‌شوند که اتصال و قرار گرفتن سلول‌ها را با مشکل روبرو می‌کند. این معایب می‌تواند کاربرد این داربست را در مهندسی بافت محدود سازد. مزایای PRP نسبت به داربست‌های دیگر حاصل از مواد طبیعی و مصنوعی در مهندسی بافت بیشتر می‌باشد که دلایل آن، نخست این که PRP اتولوگ مشکلات حاصل از ایمنی‌زایی و انتقال بیماری‌ها را ندارد (۱۰). این اسکلت به طور طبیعی امن بوده و تاکنون هیچ مدرکی دال بر تحریک افزایش غیر طبیعی رشد، سرطان زایی یا رشد تومور پس از استفاده از آن وجود ندارد (۱۴). ثانیاً، نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی نگاره نشان داد که سلول‌های مزانشیمی حاصل از مغز استخوان قابلیت توزیع مناسب را در داربست‌های PRP دارند. دلیل سوم اینکه فاکتورهای رشد اتولوگ موجود در PRP می‌توانند مهاجرت، رشد و تمایز که زمینه ساز ترمیم زخم‌ها و جوان سازی و نوسازی بافت‌های نرم است را تحریک نماید. دلیل چهارم اینکه، PRP قابل تزریق بوده و بنابراین می‌توان آن را در درمان آسیب‌های کوچک مورد استفاده قرار داد و همچنین به دلیل قابلیت انعطاف‌پذیری^{۱۱} و تثبیت چسبندگی آن به جایگاه‌های طراحی شده می‌توان از آن در محیط‌های زنده استفاده نمود. پنجم این که، پلاکت‌ها و لوکوسیت‌های موجود در PRP نقش مهمی را در دفاع ضد میکروبی میزبان بازی می‌کنند که این توانایی باعث کاهش ایجاد عفونت پس از پیوند می‌شود (۱۳ و ۱۲ و ۱۱ و ۸ و ۴ و ۲). داربست از مقادیر زیاد پلاکت‌هایی که

¹¹ plasticity



شکل ۱: نتایج ارزیابی توانایی زنده ماندن سلول‌های بنیادی مزانشیمی بر روی داربست‌های مختلف با استفاده از تست MTT

*: نشان دهنده معنی دار بودن از لحاظ آماری ($P < 0.05$)

سپاسگزاری

از ریاست محترم جهاد دانشگاهی قم جناب آقای محمد ابراهیم فقیه زاده تشکر و قدردانی می‌شود.

دوم این مطالعه، داربست PRP فعال شده و هم‌چنین غیرفعال به همراه سلول‌های بنیادی مزانشیمی و بدون وجود این سلول‌ها به مدت ۸ روز کشت داده شد و هر کدام از آن‌ها به ۲ گروه شامل محیط مکمل شده با FBS ۱۰٪ و گروه دیگر فاقد FBS تقسیم بعد از این مدت، سلول‌ها تریپسین و توسط لام هموسایتومتر ۱۲ شمارش شدند و هم‌چنین کارایی بیشتر PRP فعال در مقایسه با PLGA تأیید شد. در حالی که کارایی PLGA نسبت به PRP غیرفعال بالاتر بود. نتایج نشان داد که تعداد سلول‌های همراه با PRP فعال شده و دارای محیط FBS ۱۰٪، بعد از ۸ روز به ۲ برابر افزایش یافتند که احتمالاً دلیل آن سرعت تکثیر بیشتر این سلول‌ها نسبت به بقیه می‌باشد.

منابع

1. Abd Razak S, Ahmad Sharif N, Abdul Rahman W.A.W. Biodegradable Polymers and their Bone Applications: A Review. *International Journal of Basic & Applied Sciences IJBAS-IJENS*, 2012; 12(1):31-49.
2. Lee HR, Park KM, Joung YK, Park KD, Do SH. Platelet-rich plasma loaded in situ-formed hydrogel enhances hyaline cartilage regeneration by CB1 upregulation. *J Biomed Mater Res A*, 2012; 100(11):3099-3107.
3. Lee HR, Park KM, Joung YK, Park KD, Do SH. Platelet-rich plasma loaded hydrogel scaffold enhances chondrogenic differentiation and maturation with up-regulation of CB1 and CB2. *Journal of Controlled Release*, 2012; 159(3):332-337.
4. Lei H, Xiao R, Tang XJ, Gui L. Evaluation of the Efficacy of Platelet-Rich Plasma in Delivering BMSCs Into 3D Porous Scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2009;91(2):679-91.
5. Niemeyer P, Fechner K, Milz S, Richter W, Suedkamp NP, Mehlhorn AT, Pearce S, Kasten P. Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma. *Biomaterials*, 2010; 31(13):3572-3579.
6. Ning C. 2011. Fabrication of alginate hydrogel scaffolds and cell viability in calcium-crosslinked alginate hydrogel. Master of science Thesis in the division of biomedical Engineering. University of Saskatchewan.
7. Patrick CW Jr, Zheng B, Johnston C, Reece GP. Long-Term Implantation of Preadipocyte-Seeded PLGA Scaffolds. *Tissue Eng*, 2002;8(2):283-93.
8. Rampichová M, Filová E, Varga F, Lytvynets A, Prosecká E, Koláčná L, Motlík J, Nečas A, Vajner L, Uhlík J, Amler E. Fibrin/Hyaluronic Acid Composite Hydrogels as Appropriate Scaffolds for In Vivo Artificial Cartilage Implantation. *ASAIO Journal*, 2010;56(6):563-568.
9. Scotti C, Mangiavini L, Boschetti F, Vitari F, Domeneghini C, Fraschini G, Peretti GM. Effect of in vitro culture on a chondrocyte-fibrin glue hydrogel for cartilage repair. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, 2010;18(10):1400-1406.

10. Sun Y, Feng Y, Zhang CQ, Chen SB, Cheng XG. The regenerative effect of platelet-rich plasma on healing in large osteochondral defects. *Int Orthop*, 2010; 34(4):589–597.
11. Wang P, Qu Y, Man Y. Platelet-rich plasma as a scaffold for injectable soft-tissue augmentation. *Cytotherapy*. 2010 Sep;12(5):701-702.
12. Westreich R, Kaufman M, Gannon P, Lawson W. Validating the Subcutaneous Model of Injectable Autologous Cartilage Using a Fibrin Glue Scaffold. *The Laryngoscope*, 2004; 114(12): 2154–2160.
13. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 1997;55(11):1294-1299.
14. Zumstein M, Bielecki T, Dohan Ehrenfest D.M. The Future of Platelet Concentrates in Sports Medicine: Platelet-Rich Plasma, Platelet-Rich Fibrin, and the Impact of Scaffolds and Cells on the Long-term Delivery of Growth Factors. *Operative Techniques in Sports Medicine*, 2011; 19(3):1060-1872.