

پرتودهی با اشعه گاما، شیوه‌ای مناسب جهت استریلیزاسیون غشای فیبرینی همراه با حفظ ویژگی‌های زیست سازگاری آن

طاهر اکبری سعید^۱، میثم احمدی^۲، احمد فاطمی^۳، علیرضا فارسی‌نژاد^۴

چکیده

سابقه و هدف

مهندسی بافت به عنوان یک روش بالقوه برای ترمیم بافت‌های آسیب‌دیده ابداع گردید. پیش شرط لازم برای مهندسی بافت در شرایط آزمایشگاهی، رشد کافی سلول‌ها بر روی داربست سلولی می‌باشد. یکی از بیومتریال‌های جدید و مهم که از سال ۲۰۰۶ معرفی شد و هم اکنون فقط به صورت اتولوگ استفاده می‌شود، غشای فیبرینی است. با این وجود، استفاده از غشای فیبرینی به صورت آلوژن به دلیل خطر انتقال بیماری‌های ویروسی و باکتریایی مختلف توسط آن بسیار محدود می‌باشد. شاید بتوان استریلیزه کردن غشای فیبرینی را کلیدی‌ترین راه‌کار برای رفع محدودیت‌های کاربردی آن در مهندسی بافت دانست.

مواد و روش‌ها

در مطالعه تجربی حاضر، غشای فیبرینی از پلاسمای تازه منجمد (FFP) تهیه شده و با سه روش استریل گردید. میزان بقای سلولی و سمیت غشاهای فیبرینی استریل شده بر سلول‌های فیروبلاستی رده 3T3 با آزمایش MTT ارزیابی و تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به دست آمده با استفاده از آزمون Paired-Sample t-test انجام شد.

یافته‌ها

غشاهای فیبرینی استریل شده و نشده، بقای سلول‌های فیروبلاستی را ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از مجاورت با غشا به طور معناداری افزایش دادند، ولی ۷۲ ساعت پس از مجاورت با غشا، از مقدار تکثیر سلولی کاسته و شواهدی از مرگ سلولی دیده شد (به ترتیب $p=0/004$ و $p=0/006$).

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج می‌توان چنین استنباط کرد که غشای فیبرینی با فراهم نمودن بستری مناسب و آزادسازی فاکتورهای رشد، سبب تقویت پتانسیل تکثیر و افزایش بقای سلول‌ها می‌گردد و استریلیزاسیون تأثیری بر این ویژگی غشای فیبرینی ندارد.

کلمات کلیدی: مهندسی بافت، فیبرینوژن، استریلیزاسیون، اشعه گاما

تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۲۰

تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۲۰

۱- کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون - دانشکده علوم پزشکی سیرجان - دانشگاه علوم پزشکی کرمان - کرمان - ایران

۲- دکترای بیوفیزیک - استادیار مرکز تحقیقات فیزیولوژی و علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی کرمان - کرمان - ایران

۳- PhD هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون - استادیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان - کرمان - ایران

۴- مؤلف مسئول: PhD هماتولوژی آزمایشگاهی و بانک خون - استادیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان - کرمان - ایران - کدپستی: ۷۶۱۹۷۹۴۴۳۵

مقدمه

مهندسی بافت، علم طراحی و تولید بافت‌های جدید برای ترمیم اندام‌های آسیب دیده و جایگزینی قسمت‌های از دست رفته می‌باشد (۱، ۲). در واقع، مهندسی بافت با کشت سلول‌های زنده بیمار بر روی داربست‌های زیستی تخریب پذیر سه بعدی و با شبیه‌سازی عملکرد فیزیولوژیکی بستر خارج سلولی (ECM)، اجزای قابل پیوند و یا ساختارهایی را ایجاد می‌نماید که منجر به بازسازی و بازگردانی عملکرد بافت می‌شود (۳-۵). افزایش کارایی و بهبود عملکرد کشت سلول و بافت‌های مهندسی شده، نیازمند ایجاد داربست‌های مناسب و کارا می‌باشد. از این‌رو، استفاده از بیومتریال‌های زیستی و ساختی به عنوان داربست‌های سلولی در فرآیندهای ترمیم بافتی، گسترش فراوانی یافته است (۶-۸).

غشای فیبرینی از جمله بیومتریال‌های زیستی است که پتانسیل بالایی برای استفاده در مهندسی بافت دارد (۹-۱۲). فیبرین از خون خود بیمار جداسازی شده و به عنوان یک داربست اتولوگ بدون خطر از نظر ایجاد واکنش‌های ایمنی و هم‌چنین انتقال عفونت مورد استفاده قرار می‌گیرد. کاربرد فیبرین در زمینه‌های مهمی هم‌چون جراحی‌های شکمی، ارتوپدی، اعصاب و دهان رایج است (۱۳). استفاده از فیبرین به عنوان یک داربست بافتی، محیطی با عملکرد سلولی مناسب را فراهم آورده که امکان مهاجرت، رشد، تکثیر و تمایز سلولی را به طور مطلوب ایجاد می‌نماید (۱۴).

مطالعه‌های انجام شده حاکی از آن است که فعالیت متابولیک، تکثیر و تمایز سلولی در داربست‌های فیبرینی به ویژه غشای فیبرینی غنی از پلاکت به طور معناداری بیشتر از سایر بیومتریال‌های زیستی است (۱۵).

زیست سازگاری بالا، قابلیت تجزیه‌پذیری زیستی، ایمنوژنیسیته کم، عدم سمیت سلولی، میل اتصالی بالا، تهیه آسان، خصوصیات فیزیکی و مکانیکی مناسب و پایداری مطلوب غشای فیبرینی را به یک بیومتریال مناسب در مهندسی بافت تبدیل کرده است. با این وجود، احتمال انتقال بیماری‌های ویروسی خطرناک نظیر HCV، HBV، HIV و غیره هم‌چنین بیماری‌های باکتریایی

مختلف توسط غشای فیبرینی، استفاده از این بیومتریال را صرفاً به فرم اتولوگ محدود کرده است (۱۶-۲۳).

یافتن راه‌کاری مناسب برای استفاده از غشای فیبرینی به صورت آلوژن در مهندسی بافت و هم‌چنین رفع محدودیت‌های کاربردی آن، سبب استفاده گسترده‌تر از این بیومتریال زیست سازگار و بهره‌مندی از مزایای آن می‌گردد (۲۴، ۲۵). از این‌رو، روش‌های مختلف استریلیزاسیون همانند اتوکلاو، اشعه فرابنفش، اشعه گاما و اتیلن اکساید جهت استریل کردن غشای فیبرینی می‌توانند مؤثر واقع گردند. از آن جا که تاکنون هیچ کار پژوهشی در زمینه استریل کردن غشای فیبرینی انجام نشده، مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر روش‌های مختلف استریلیزاسیون بر ارزیابی سمیت سلولی در غشاهای فیبرینی استریل شده انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، ارزیابی سمیت سلولی غشاهای فیبرینی استریل شده بر سلول‌های فیبروبلاستی رده 3T3 در ۵ گروه تجربی و یک گروه کنترل و در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام گرفت. نتایج حاصل از تمامی آزمایش‌ها حاصل میانگین چهار بار تکرار نمونه‌ها به وسیله آزمایش MTT بود. مراحل انجام این مطالعه به قرار زیر است.

ساخت غشای فیبرینی:

پلاسمای تازه منجمد یا FFP (Fresh Frozen Plasma) از سازمان انتقال خون کرمان تهیه شد. سپس با استفاده از اتانول سرد، فیبرینوژن جداسازی شد و با استفاده از ترومبین انسانی در ون بشرهای استریل آزمایشگاهی پلیمریزه و به شکل ژل فیبرینی درآمد. این ژل فیبرینی پس از آبگیری توسط سانتریفیوژ به غشای فیبرینی به قطر ۵ سانتی متر تبدیل گردید. جهت تهیه ترومبین انسانی از بخشی از پلاسمای تازه منجمد شده استفاده شد که طی آن ۱/۵ میلی‌لیتر از کلسیم ۱۰٪ با ۱/۵ میلی‌لیتر از اتانول مطلق مخلوط و در نهایت به ۷ میلی‌لیتر از پلاسمای تازه افزوده گردید. پس از گذشت چند دقیقه و تشکیل لخته،

سرم حاوی ترومبین به عنوان منبعی از ترومبین انسانی جدا و مورد استفاده قرار گرفت.

استریلیزاسیون غشای فیبرینی:

استریلیزاسیون غشای فیبرینی با به کارگیری ۳ روش اتوکلاو، اشعه فرابنفش و اشعه گاما انجام شد. به منظور استریل کردن غشاهای فیبرینی با حرارت مرطوب تحت فشار از اتوکلاو استفاده شد. فرآیند استریلیزاسیون در اتوکلاو (پارس طب نوین، ایران) در فشار بخار ۱۵ پوند بر اینچ مربع در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد (۲۶).

به منظور استریل کردن غشاهای فیبرینی با اشعه فرابنفش از لامپ UV هود لامینار (ژال تجهیز، ایران) استفاده شد. بدین منظور، غشاها به مدت ۳۰ و ۶۰ دقیقه در زیر لامپ UV قرار گرفتند (۲۷). جهت استریلیزاسیون با اشعه گاما، غشاهای ساخته شده در معرض ۲۵ کیلوگری پروتوی گاما تولید شده توسط دستگاه گاماسل (کانادا) موجود در سازمان انتقال خون کرمان، قرار گرفتند (۲۸-۳۲).

کشت سلول‌های فیبروبلاستی رده 3T3:

در مطالعه تجربی حاضر، به منظور بررسی سمیت سلولی در غشاهای فیبرینی استریل شده، از سلول‌های فیبروبلاستی رده 3T3 استفاده شد. این رده سلولی از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. کشت سلولی در محیط کشت DMEM (آمریکا، جیبکو) حاوی ۱۰٪ FBS (آمریکا، جیبکو) و ۱٪ آنتی بیوتیک پنی‌سیلین - استرپتومایسین (آمریکا، جیبکو) در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در شرایط ۵٪ CO₂ و رطوبت ۹۵٪ صورت گرفت. پاساژ سلولی به فواصل ۲-۳ روز انجام شد. زمانی که سلول‌ها به پاساژ سوم رسیدند، حیات سلولی با استفاده از رنگ تریپان بلو ۰/۴٪ تایید گردیده و سلول‌ها توسط لام ثوبار شمارش شدند.

با بررسی‌های میکروسکوپی از شرایط مناسب سلول‌های رده 3T3 اطمینان حاصل شد و این سلول‌ها برای آزمایش سمیت سلولی به روش MTT مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی سمیت غشای فیبرینی بر سلول‌های فیبروبلاستی رده 3T3 با روش MTT:

الف- قرارگیری غشای فیبرینی در مجاورت سلول‌های فیبروبلاستی رده 3T3:

آزمایش MTT [۳- (۴ و ۵- دی‌متیل تیازول-۲-یل) ۲- و ۵- دی‌متیل تترازولیوم بروماید] به منظور تعیین میزان سمیت سلولی غشای فیبرینی و تاثیر آن بر زنده‌مانی سلول‌های رده 3T3 انجام شد. بدین منظور تعداد $10^3 \times 100$ سلول رده 3T3 به صورت یک لایه درون هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه قرار داده شد. ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت DMEM کامل به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت (overnight) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در حضور ۵٪ CO₂ و رطوبت ۹۵٪ انکوبه گردیدند. در زیر هود لومینار و در شرایط استریل، غشاهای فیبرینی (استریل شده و استریل نشده) با استفاده از پانچ به شکل دایره‌هایی با قطر ۳ میلی‌متر برش داده شدند. روز بعد، پس از اطمینان از چسبیدن کامل سلول‌ها و پر شدن کف چاهک‌ها (confluency حدود ۸۰٪-۷۰٪)، محیط سلول‌ها با احتیاط تعویض گشته و غشاهای فیبرینی برش داده شده با توجه به گروه آن‌ها (در معرض اشعه فرابنفش به مدت ۳۰ دقیقه، در معرض اشعه فرابنفش به مدت ۶۰ دقیقه، اتوکلاو شده، در معرض اشعه گاما و غشای استریل نشده) به چاهک‌های مربوطه اضافه گردیدند. برای هر یک از ۵ گروه غشاهای فیبرینی و گروه کنترل ۴ چاهک اختصاص داده شد. به چاهک‌های گروه کنترل غشای فیبرینی اضافه نشد.

ب: ارزیابی درصد زنده‌مانی سلول‌های فیبروبلاستی رده 3T3:

در پایان درصد زنده‌مانی سلول‌های فیبروبلاستی رده 3T3 در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از انتقال غشای فیبرینی با به کارگیری آزمایش MTT مورد سنجش قرار گرفت. بدین منظور، ۱۲ ساعت پس از مجاورت با غشاها، غشاهای فیبرینی و محیط کشت به آرامی از چاهک‌ها خارج شده و مقدار ۲۰ میکرولیتر از محلول

در جداول و نمودارهای رسم شده، حاصل میانگین چهار بار تکرار نمونه‌ها به وسیله آزمایش MTT می‌باشند. درصد بقا و سمیت سلولی (میانگین $\pm$ انحراف معیار) در گروه‌های آزمایش نسبت به گروه کنترل بر حسب زمان‌های پیگیری ترسیم شد (نمودار ۱). درصد بقای (حیات) سلولی از تقسیم میانگین میزان جذب نوری هر یک از گروه‌های آزمایش به میانگین جذب نوری گروه کنترل در همان زمان ضربدر ۱۰۰ به دست آمده و با کم کردن این عدد از ۱۰۰، میزان درصد سمیت سلولی به دست آمد (۳۳). مقایسه درصد بقای سلولی در غشای استریل نشده (طبیعی) با غشاهای استریل شده تفاوت معناداری را نشان نداد. بررسی‌های انجام شده نشان داد که غشاهای فیبرینی استریل شده و هم‌چنین غشای فیبرینی استریل نشده، بقای سلول‌های فیروپلاستی را ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از مجاورت با غشا به طور معناداری افزایش داده‌اند (به ترتیب $p=0/004$ و $p=0/006$).

به عبارتی، غشای فیبرینی بستری مناسب جهت رشد و تکثیر سلول‌های فیروپلاستی فراهم آورده است. ولی ۷۲ ساعت پس از مجاورت با غشا، از مقدار تکثیر سلولی کاسته شده و شواهدی از مرگ سلولی دیده شده است (نمودار ۱).

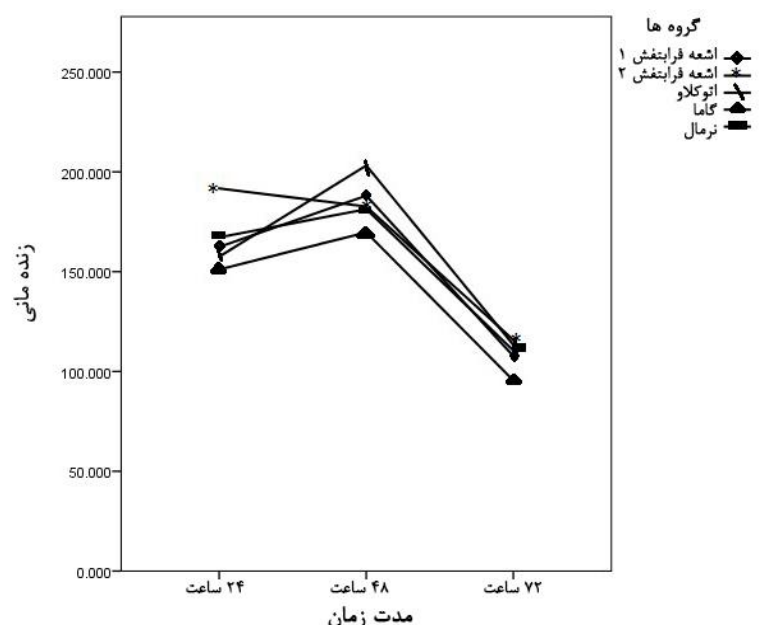
MTT با غلظت ۵ mg/mL در محیط تاریک به هر یک از چاهک‌ها اضافه شد. پلیت با فویل آلومینیومی پوشیده شده و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از انکوباسیون، محیط‌ها تخلیه شده و به منظور حل کردن کریستال‌های فورمازان، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) به چاهک‌ها اضافه شده و پس از ۱۵ دقیقه، جذب نوری سلول‌ها با استفاده از دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۴۹۰ نانومتر و با فیلتر مرجع در ۶۲۰ نانومتر خوانده شد.

آنالیزهای آماری:

آنالیز آماری داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار IBM SPSS Statistic ۲۳ و با به کارگیری آزمون Paired-Sample t-test انجام شد. سطح معناداری با ارزش $p < 0/01$ مشخص گردید.

یافته‌ها

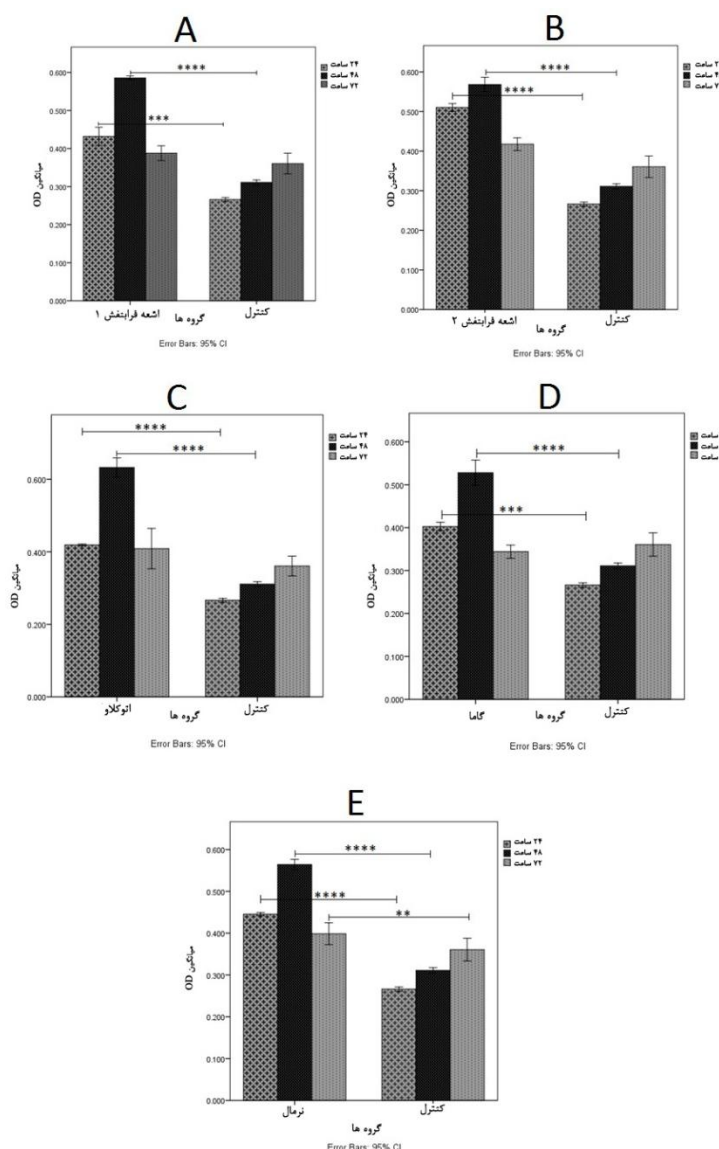
نتایج حاصل از ارزیابی سمیت سلولی غشاهای فیبرینی استریل شده بر سلول‌های فیروپلاستی رده 3T3 در ۵ گروه تجربی و یک گروه کنترل و در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت جمع‌آوری گردید. تمامی نتایج موجود



نمودار ۱: مقایسه درصد زنده‌مانی سلول‌های رده 3T3 در غشاهای فیبرینی استریل شده و استریل نشده با گروه کنترل بر حسب زمان‌های پیگیری

فیبرینی (استریل شده و استریل نشده) ۴۸ ساعت پس از مجاورت با غشا دیده شد. یافته دیگر این بود که برخلاف سایر گروه‌ها، غشای فیبرینی استریل شده با اشعه گاما ۷۲ ساعت پس از مجاورت با غشا، برای سلول‌های رده 3T3 توکسیک بوده و میزان بقای سلولی را به ۹۵/۵٪ کاهش داده است (جدول ۱).

تفاوت معناداری در بقای سلولی در زمان ۷۲ ساعت در غشاهای استریل شده مشاهده نشد ولی این تفاوت در غشای فیبرینی استریل نشده (طبیعی) معنادار بود ($p=0/006$) (نمودار ۲). بر اساس نتایج حاصله، تحریک رشد و افزایش بقای سلولی در ۴۸ ساعت اول مجاورت با غشا دیده شده و پس از آن از میزان رشد و تکثیر سلولی کاسته شده است. بیشترین میزان بقای سلولی در غشای



نمودار ۲: مقایسه سمیت سلولی غشاهای فیبرینی استریل شده با گروه کنترل در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مجاورت با غشا، A: سمیت سلولی غشای فیبرینی استریل شده با اشعه فرابنفش (به مدت ۳۰ دقیقه) در مقایسه با گروه کنترل، B: سمیت سلولی غشای فیبرینی استریل شده با اشعه فرابنفش (به مدت ۶۰ دقیقه) در مقایسه با گروه کنترل، C: سمیت سلولی غشای فیبرینی اتوکلاو شده در مقایسه با گروه کنترل، D: سمیت سلولی غشای فیبرینی استریل شده با اشعه گاما در مقایسه با گروه کنترل، E: سمیت سلولی غشای فیبرینی استریل نشده در مقایسه با گروه کنترل. در این نمودارها * نشان‌دهنده $p \leq 0/01$ ، *** نشان‌دهنده $p \leq 0/001$ و **** نشان‌دهنده $p \leq 0/0001$ است.

جدول ۱: درصد بقا و سمیت سلولی در غشاهای فیبرینی استریل شده نسبت به گروه کنترل بر حسب زمان‌های پی‌گیری

گروه‌ها	۲۴ ساعت		۴۸ ساعت		۷۲ ساعت	
	بقای سلولی (درصد)	سمیت سلولی (درصد)	بقای سلولی (درصد)	سمیت سلولی (درصد)	بقای سلولی (درصد)	سمیت سلولی (درصد)
اشعه UV (۳۰ دقیقه)	$162/4 \pm 0/009$	-	$188/1 \pm 0/010$	-	$107/7 \pm 0/015$	-
اشعه UV (۶۰ دقیقه)	$171/7 \pm 0/007$	-	$182/6 \pm 0/010$	-	$115/8 \pm 0/012$	-
اتوکلاو	$157/5 \pm 0/002$	-	$203/2 \pm 0/009$	-	$113/3 \pm 0/020$	-
اشعه گاما	$151/1 \pm 0/006$	-	$169/7 \pm 0/015$	-	$95/5 \pm 0/011$	۴/۵
غشای دست نخورده	$167/2 \pm 0/003$	-	$181/3 \pm 0/018$	-	$110/5 \pm 0/019$	-

* از آن جایی که نه تنها سمیت سلولی وجود ندارد بلکه باعث القای رشد و تمایز شده است لذا بر اساس فرمول درصد سمیت سلولی منفی محاسبه می‌شود که نشان‌دهنده تاثیر مثبت و القای رشد و تکثیر سلولی است ولی از آنجایی که نمی‌توان عدد منفی گزارش کرد، در محل مورد نظر خط فاصله قرار داده شده است که نشان‌دهنده عدم وجود سمیت سلولی می‌باشد.

بحث

یافته‌ها حاکی از آن است که غشای فیبرینی بقای سلول‌های فیروبلاستی را به میزان چشمگیری افزایش داده و فرآیندهای مختلف استریلیزاسیون تأثیری منفی بر پتانسیل تکثیری غشای فیبرینی نداشته است. از آن جایی که یکی از مهم‌ترین جنبه‌های تأثیرگذار یک غشای زیستی در عملکرد آن، خصوصیات فیزیکی آن می‌باشد، لذا به نظر می‌رسد در کل ویژگی‌های فیزیکی ماده زیستی مورد نظر در اثر اعمال روش‌های مختلف استریلیزاسیون تحت تأثیر قرار نگرفته است، این یافته‌ها با نتایج حاصل از پژوهش رونی و همکاران که در سال ۲۰۰۸ بر روی پوست انجام شد، هم‌راستا بود. در این پژوهش نیز پوست قرار گرفته در معرض اشعه گاما با دوز ۲۵ کیلوگری با پوست دست نخورده تفاوتی از نظر قابلیت‌های پیوند نداشت (۲۸). بر اساس یافته‌ها درصد بقا و تکثیر سلول‌های فیروبلاستی ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از مجاورت با غشای فیبرینی به طور معنادار و چشمگیری افزایش می‌یابد. با توجه به ساختار سه بعدی مناسب و هیدروفیل بودن غشای فیبرینی، این بیومتریال قادر است به عنوان یک ماده زمینه خارج سلولی، بستری مناسب جهت رشد سلول‌ها فراهم آورد. به علاوه، آزاد شدن بسیاری از فاکتورهای زیست فعال از فیبرین می‌تواند در رشد و تمایز

سلول‌ها نقش مهمی را ایفا نماید.

این نتایج با یافته‌های احمد و همکاران مشابهت دارد. در این مطالعه نیز نتایج نشان داد فاکتورهای رشد موجود در چسب فیبرینی سبب تحریک رشد و همانندسازی سلول‌های غضروفی در محل آسیب دیده می‌گردد. به گونه‌ای که زمان ترمیم را به طور چشمگیری کاهش می‌دهد. هم‌چنین افرادی و همکاران نیز در مطالعه‌ای که بر روی اثر ترمیمی پلاسمای غنی از پلاکت بر روی زخم‌های مزمن داشتند، دریافتند که فاکتورهای رشد موجود در این بیومتریال توانایی بالایی در القای رشد و تکثیر سلولی دارد (۳۶-۳۴).

برخلاف هیدروژل‌های سنتتیک، فیبرین نه تنها یک ماتریکس سلول‌رسان است بلکه فعالیت زیستی فیبرین آن را برای تمایز سلول‌های بنیادی و مهندسی بافت مناسب می‌سازد (۳۷). یافته‌های چن و همکاران با نتایج حاصل از این پژوهش یکسان بود. این گروه در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که تلفیق پلاکت انسانی با چسب فیبرینی، پتانسیل تمایزی و تکثیری کندروسیت‌ها را در این داربست به میزان بالایی افزایش می‌بخشد (۳۸). هم‌چنین کپسوله شدن سلول‌ها درون داربست فیبرینی از دیگر عوامل مؤثر در حمایت از تکثیر سلولی است. از طرفی، توالی اتصالی ایتگرینی آرژنین-گلیسین-آسپارتیک اسید

که یک عامل تحریک کننده اتصال و رشد سلولی است، در فیبرین وجود دارد (۳۹). در مطالعه‌ای دیگر گزارش شده که در محیط‌های برون و درون بدنی (*in vivo* و *in vitro*)، فیبرین امکان حمایت از رشد سلول‌های فیروبلاست و کراتینوسیت را فراهم آورده و سبب افزایش تحرک سلولی در محل‌های زخم می‌گردد. چسب فیبرینی نیز از قابلیت خوبی در انتقال فاکتورهای رشد آگروژنی برخوردار است، همین امر موجب بروز پیشرفت‌هایی در زمینه درمان زخم گردیده است (۱۳).

از سویی، به نظر می‌رسد که تکثیر بسیار بالای سلول‌ها در ۴۸ ساعت اول پس از مجاورت با غشا، غلظت فاکتورهای رشد آزاد شده از غشای فیبرینی و هم چنین محرک‌های رشد موجود در محیط کشت سلول‌ها را کاهش داده و همین امر مانع تکثیر پیش‌رونده و بقای طولانی مدت سلول‌ها در زمان ۷۲ ساعت می‌گردد. به علاوه، گمان می‌رود که نقش رادیکال‌های آزاد ایجاد شده در غشاهای فیبرینی که در معرض پرتوهای گاما قرار گرفتند، با کاهش عوامل محرک رشد در محیط پر رنگ‌تر شده و کاهش بقای سلولی و همچنین مرگ سلولی را به دنبال دارد (۲۹). همین امر توجه کننده سمیت سلولی ۴/۵ درصدی غشاهای فیبرینی استریل شده با اشعه گاما در زمان ۷۲ ساعت می‌باشد. پیش از این نیز، نقش فیبرین در تحریک رشد، تکثیر و بقای سلولی در گروهی از مطالعه‌ها به اثبات رسیده بود. برای مثال، مطالعه آیوکی و همکارانش نشان داد که چسب فیبرینی سبب تحریک رشد و تکثیر سلولی می‌گردد (۴۰). در مطالعه بن سعید و همکاران و لین و همکاران مشخص گردید که داربست فیبرینی سبب حفظ پتاسیل تکثیر و بقای سلول‌های بنیادی مغز استخوان می‌شود (۴۱). هم چنین گروهی از مطالعه‌ها به نقش فیبرینوزن در تکثیر سلولی اشاره داشته‌اند، به گونه‌ای که دیده شده با افزایش استفاده از فیبرینوزن در داربست چسب فیبرینی، تکثیر سلولی به طور چشمگیری افزایش می‌یابد (۴۲). هم چنین برتری‌های فیبرین در مقایسه با سایر بیومتریال‌های طبیعی برای استفاده در داربست‌های ساخته شده برای کشت سلول‌های مزانشیمی، مثال زدنی است (۴۳). یافته‌های گروهی از

مطالعه‌ها بیانگر این است که توانایی زنده ماندن سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی به طور معناداری در داربست فیبرینی نسبت به گروه کنترل بیشتر است. دلیل این امر را می‌توان به قابلیت کپسوله کردن یکنواخت سلول‌ها توسط فیبرین نسبت داد (۴۴). مطالعه گیراندون و همکاران نیز نشان داد که سلول‌های بنیادی مشتق از چربی قادر به تکثیر و بقا در داربست فیبرینی هستند (۴۵). ژل فیبرینی نیز فرصت مناسبی را برای رشد سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی ایجاد می‌نماید. در پژوهش‌های صورت گرفته در سال‌های اخیر، چسب فیبرینی به عنوان کاندیدی مناسب جهت داربست طبیعی برای تمایز سلول‌های چربی معرفی شد. به طوری که کشت سلول‌های مزانشیمی مشتق از چربی در داربست چسب فیبرینی، سبب زنده ماندن طولانی مدت و افزایش بقای سلول‌ها تا ۸۴ روز گردید (۴۰). در مطالعه‌ای دیگر جانگ و همکارانش نشان دادند که درصد زنده ماندن سلول‌های مزانشیمی موش در داربست پلی لاکتیک اسید که دارای فیبرین و هیدروکسی آپاتیت بوده است، در روز اول به شدت کاهش یافته بود. این تیم تحقیقاتی بیان داشتند که با وجود سمیت بسیار بالای این داربست تلفیقی در روز اول، به تدریج سلول‌ها در داربست تثبیت شده و کاهش در میزان سمیت سلولی این داربست از روز ۱۷ قابل مشاهده بوده است (۴۶). در مطالعه‌ای نیز نشان داده شده که هیدروژل فیبرین به دست آمده از فیبرینوزن و ترومبین خون، از چرخه غضروف‌زایی حمایت نموده و سبب بهبود بقا، تکثیر و تمایز غضروف در شرایط آزمایشگاهی می‌گردد. به علاوه، این داربست توانایی ایجاد یک محیط مناسب جهت تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به رده غضروفی را دارا می‌باشد (۴۷). نتایج حاصل از تحقیق حاضر با یافته‌های این دسته از مطالعه‌ها همسو بوده و حاکی از تقویت قدرت رشد و تکثیر سلولی و افزایش بقای سلول‌ها در داربست فیبرینی است. لازم به ذکر است که در اکثر مطالعه‌های قبلی، از فیبرین تجاری و تهیه شده از خون حیوانات استفاده شده ولی در این پژوهش از فیبرین با منشأ انسانی جداسازی شده از FFP، استفاده گردید که طی روشی آسان و با هزینه بسیار اندک تهیه

می‌شود.

رشد و تکثیر سلولی از اصلی‌ترین ویژگی‌های غشای فیبرینی است و روش‌های مختلف استریلیزاسیون (اشعه فرابنفش، اتوکلاو و اشعه گاما) قادر به تغییر آن‌ها نمی‌باشند. یافته‌های این پژوهش استفاده از روش‌های استریلیزاسیون جهت کاهش خطرات احتمالی انتقال آلودگی‌ها توسط غشای فیبرینی را در موارد استفاده به صورت آلون پیشنهاد می‌نماید.

نتیجه‌گیری

روش PCR-RFLP دارای حساسیت تشخیصی قابل مقایسه‌ای با روش‌های Real Time PCR و تعیین توالی بود. از دیگر مزایای این روش اصلاح شده می‌توان به توانایی آن در افتراق انواع هموزیگوت و هتروزیگوت بیماران، وجود کنترل داخلی برای عملکرد آنزیم و هم چنین سهولت و صرفه اقتصادی آن اشاره کرد. این روش اصلاح شده می‌تواند به عنوان یک روش مناسب و مقرون به صرفه برای اجرا در آزمایشگاه‌های تشخیص مولکولی پیشنهاد شود.

تشکر و قدردانی

با تشکر از مرکز سلول‌های بنیادی دانشگاه علوم پزشکی کرمان که ما را در انجام این تحقیق یاری کردند.

غشای فیبرینی از مهم‌ترین بیومتریال‌های زیستی است که به دلیل دارا بودن خصوصیات فیزیکی، مکانیکی و بیولوژیکی مناسب به ویژه زیست سازگاری و تخریب‌پذیری زیستی بالا، ایمونونئیسیتی کم، عدم سمیت سلولی و میل اتصالی بالا، کاربرد گسترده‌ای در مهندسی بافت دارد (۴۸، ۸). با این وجود، استفاده از غشای فیبرینی به صورت آلون به دلیل وجود خطر انتقال بیماری‌های ویروسی و باکتریایی مختلف توسط این بیومتریال بسیار محدود می‌باشد (۵۰، ۴۹). شاید بتوان استریل کردن غشای فیبرینی را کلیدی‌ترین راه کار برای رفع محدودیت‌های کاربردی آن در مهندسی بافت دانست. نکته حائز اهمیت، پایداری و حفظ ویژگی‌های این بیومتریال پس از فرآیندهای مختلف استریلیزاسیون است. بر اساس یافته‌های به دست آمده از مطالعه تجربی حاضر، استریلیزاسیون غشای فیبرینی با اشعه فرابنفش، اتوکلاو و اشعه گاما نه تنها برای سلول‌های فیبروبلاستی کشت داده شده بر این غشا سمیت نداشته، بلکه خواص بیولوژیکی این غشا را از نظر تحریک رشد و تکثیر و افزایش بقای این سلول‌ها حفظ نموده است.

در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که تقویت قدرت

References:

- 1- Panadero J, Vikingsson L, Gomez Ribelles J, Lanceros-Mendez S, Sencadas V. In vitro mechanical fatigue behavior of poly--caprolactone macroporous scaffolds for cartilage tissue engineering: Influence of pore filling by a poly vinyl alcohol gel. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2015; 103(5): 1037-43.
- 2- Soleimannejad M, Ebrahimi-Barough S, Nadri S, Riazi-Esfahani M, Soleimani M, Tavangar SM, et al. Retina tissue engineering by conjunctiva mesenchymal stem cells encapsulated in fibrin gel: Hypotheses on novel approach to retinal diseases treatment. *Med Hypotheses* 2017; 101: 75-7.
- 3- Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol* 2012; 30(10): 546-54.
- 4- Cai M, Zhang J, Guan L, Zhao M. Novel implantable composite biomaterial by fibrin glue and amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *J Mater Sci Mater Med* 2015; 26(3): 149.
- 5- Tsai IL, Hsu CC, Hung KH, Chang CW, Cheng YH. Applications of biomaterials in corneal wound healing. *J Chin Med Assoc* 2015; 78(4): 212-7.
- 6- Cui W, Zhou Y, Chang J. Electrospun nanofibrous materials for tissue engineering and drug delivery. *Sci Technol Adv Mater* 2010; 11(1): 014108.
- 7- Kim BS, Shkempi F, Lee J. In Vitro and *in vivo* Evaluation of Commercially Available Fibrin Gel as a Carrier of Alendronate for Bone Tissue Engineering. *Biomed Res Int* 2017; 2017: 6434169.
- 8- Chiti MC, Dolmans MM, Donnez J, Amorim CA. Fibrin in Reproductive Tissue Engineering: A Review on Its Application as a Biomaterial for Fertility Preservation. *Ann Biomed Eng* 2017; 45(7): 1650-63.
- 9- Gassling V, Douglas T, Warnke PH, Acil Y, Wiltfang J, Becker ST. Platelet-rich fibrin membranes as scaffolds for periosteal tissue engineering. *Clin Oral Implants Res* 2010; 21(5): 543-9.
- 10- Arabaci T, Kose O, Albayrak M, Cicek Y, Kizildag A. Advantages of Autologous Platelet-Rich Fibrin Membrane on Gingival Crevicular Fluid Growth Factor Levels and Periodontal Healing: A Randomized Split-Mouth Clinical Study. *J Periodontol* 2017; 88(8): 771-7.
- 11- Parthiban PS, Lakshmi RV, Mahendra J, Sreekumar K,

- Namasivayam A. A contemporary approach for treatment planning of horizontally resorbed alveolar ridge: Ridge split technique with simultaneous implant placement using platelet rich fibrin membrane application in mandibular anterior region. *Indian J Dent Res* 2017; 28(1): 109-13.
- 12- Can ME, Çakmak HB, Dereli Can G, Ünverdi H, Toklu Y, Hücemenoglu S. A Novel Technique for Conjunctivoplasty in a Rabbit Model: Platelet-Rich Fibrin Membrane Grafting. *J Ophthalmol* 2016; 2016: 1965720.
 - 13- Laurens N, Koolwijk P, De Maat M. Fibrin structure and wound healing. *J Thromb Haemost* 2006; 4(5): 932-9.
 - 14- Lisi A, Briganti E, Ledda M, Losi P, Grimaldi S, Marchese R, et al. A combined synthetic-fibrin scaffold supports growth and cardiomyogenic commitment of human placental derived stem cells. *PloS One* 2012; 7(4): e34284.
 - 15- Gassling V, Hedderich J, Acil Y, Purcz N, Wiltfang J, Douglas T. Comparison of platelet rich fibrin and collagen as osteoblast-seeded scaffolds for bone tissue engineering applications. *Clin Oral Implants Res* 2013; 24(3): 320-8.
 - 16- Tunalı M, Özdemir H, Arabacı T, Gürbüz B, Pıkdöken L, Firatlı E. Clinical evaluation of autologous platelet-rich fibrin in the treatment of multiple adjacent gingival recession defects: a 12-month study. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2015; 35(1): 105-14.
 - 17- Nagaveni NB, Kumari KN, Poornima P, Reddy V. Management of an endo-perio lesion in an immature tooth using autologous platelet-rich fibrin: a case report. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 2015; 33(1): 69-73.
 - 18- Joseph VR, Sam G, Amol NV. Clinical evaluation of autologous platelet rich fibrin in horizontal alveolar bony defects. *J Clin Diagn Res* 2014; 8(11): ZC43-7.
 - 19- Guinot A, Arnaud A, Azzis O, Habonimana E, Jasienski S, Fremont B. Preliminary experience with the use of an autologous PRF membrane for urethroplasty coverage in distal hypospadias surgery. *J Pediatr Urol* 2014; 10(2): 300-5.
 - 20- Thorn JJ, Sørensen H, Weis-Fogh U, Andersen M. Autologous fibrin glue with growth factors in reconstructive maxillofacial surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33(1): 95-100.
 - 21- de la Puente P, Ludena D. Cell culture in autologous fibrin scaffolds for applications in tissue engineering. *Exp Cell Res* 2014; 322(1): 1-11.
 - 22- Shah M, Deshpande N, Bharwani A, Nadig P, Doshi V, Dave D. Effectiveness of autologous platelet-rich fibrin in the treatment of intra-bony defects: A systematic review and meta-analysis. *J Indian Soc Periodontol* 2014; 18(6): 698-704.
 - 23- Safinaz MK, Norzana AG, Hairul Nizam MH, Ropilah AR, Faridah HA, Chua KH, et al. The use of autologous fibrin as a scaffold for cultivating autologous conjunctiva in the treatment of conjunctival defect. *Cell Tissue Bank* 2014; 15(4): 619-26.
 - 24- Hermans MH. Preservation methods of allografts and their (lack of) influence on clinical results in partial thickness burns. *Burns* 2011; 37(5): 873-81.
 - 25- Li Y, Meng H, Liu Y, Lee BP. Fibrin gel as an injectable biodegradable scaffold and cell carrier for tissue engineering. *ScientificWorldJournal* 2015; 2015: 685690.
 - 26- Shimizu T, Shibata K, Kora S. First Autoclave, Sterilized Platelet-Additive Solution Containing Glucose with a Physiological pH for the Preparation of Plasma-Poor Platelet Concentrates. *Vox Sang* 1992; 62(2): 87-93.
 - 27- Lai JY. Photo-cross-linking of amniotic membranes for limbal epithelial cell cultivation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2014; 45: 313-9.
 - 28- Rooney P, Eagle M, Hogg P, Lomas R, Kearney J. Sterilisation of skin allograft with gamma irradiation. *Burns* 2008; 34(5): 664-73.
 - 29- Ab Hamid SS, Zahari NK, Yusof N, Hassan A. Scanning electron microscopic assessment on surface morphology of preserved human amniotic membrane after gamma sterilisation. *Cell Tissue Bank* 2014; 15(1): 15-24.
 - 30- Horowitz B, Williams B, Margolis-Nunno H, Chin SN. Process for the sterilization of biological compositions using irradiation and quenchers of type I and type II photodynamic reactions. Google Patents; US 5981163 A.
 - 31- Hiemstra H, Tersmette M, Vos A, Over J, Berkel M, Bree H. Inactivation of human immunodeficiency virus by gamma radiation and its effect on plasma and coagulation factors. *Transfusion* 1991; 31(1): 32-9.
 - 32- Margolis-Nunno H, Ben-Hur E, Horowitz B. Process for the sterilization of biological compositions and the product produced thereby. WO1994028120 A1. Google Patents; 2000.
 - 33- Doyle A, Griffiths JB. Cell and tissue culture: laboratory procedures in biotechnology. New York: Wiley; 1998. p. 1-15.
 - 34- Ahmed TA, Giulivi A, Griffith M, Hincke M. Fibrin glues in combination with mesenchymal stem cells to develop a tissue-engineered cartilage substitute. *Tissue Eng Part A* 2011; 17(3-4): 323-35.
 - 35- Singh R, Rohilla R, Gawande J, Kumar Sehgal P. To evaluate the role of platelet-rich plasma in healing of acute diaphyseal fractures of the femur. *Chin J Traumatol* 2017; 20(1): 39-44.
 - 36- Afradi H, Saghaei Y, Kachoei ZA, Babaei V, Teimourian S. Treatment of 100 chronic thalassemic leg wounds by plasma-rich platelets. *Int J Dermatol* 2017; 56(2): 171-5.
 - 37- Ho ST, Cool SM, Hui JH, Hutmacher DW. The influence of fibrin based hydrogels on the chondrogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 2010; 31(1): 38-47.
 - 38- Chien CS, Ho HO, Liang YC, Ko PH, Sheu MT, Chen CH. Incorporation of exudates of human platelet-rich fibrin gel in biodegradable fibrin scaffolds for tissue engineering of cartilage. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2012; 100(4): 948-55.
 - 39- Huang GP, Shanmugasundaram S, Masih P, Pandya D, Amara S, Collins G, et al. An investigation of common crosslinking agents on the stability of electrospun collagen scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 2015;

- 103(2): 762-71.
- 40- Aoyagi Y, Kuroda M, Asada S, Tanaka S, Konno S, Tanio M, *et al.* Fibrin glue is a candidate scaffold for long-term therapeutic protein expression in spontaneously differentiated adipocytes *in vitro*. *Exp Cell Res* 2012; 318(1): 8-15.
- 41- Bensaid W, Triffitt J, Blanchat C, Oudina K, Sedel L, Petite H. A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials* 2003; 24(14): 2497-502
- 42- Charo I, Nannizzi L, Phillips DR, Hsu MA, Scarborough RM. Inhibition of fibrinogen binding to GP IIb-IIIa by a GP IIIa peptide. *J Bio Chem* 1991; 266(3): 1415-21.
- 43- Li W-J, Tuli R, Okafor C, Derfoul A, Danielson KG, Hall DJ, *et al.* A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2005; 26(6): 599-609.
- 44- Ahmed T, Hincke MT. Mesenchymal stem cell-based tissue engineering strategies for repair of articular cartilage. *Histol Histopathol* 2014; 29(6): 669-89.
- 45- Girandon L, Kregar-Velikonja N, Bozikov K, Barlic A. In vitro models for adipose tissue engineering with adipose-derived stem cells using different scaffolds of natural origin. *Folia Biol* 2011; 57(2): 47-56.
- 46- Jung O, Hanken H, Smeets R, Hartjen P, Friedrich RE, Schwab B, *et al.* Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in fibrin-hydroxyapatite matrix in a 3-dimensional mesh scaffold. *In Vivo* 2014; 28(4): 477-82.
- 47- Ahmed TA, Griffith M, Hincke M. Characterization and inhibition of fibrin hydrogel-degrading enzymes during development of tissue engineering scaffolds. *Tissue Eng* 2007; 13(7): 1469-77.
- 48- Hong DP. Effect of platelet-rich fibrin on frequency of alveolar osteitis following mandibular third molar surgery: A double-blinded randomized clinical trial. *J Oral Maxillofac Surg* 2014; 72(8): 1463-7.
- 49- Safinaz M, Norzana A, Nizam MH, Ropilah A, Faridah H, Chua K, *et al.* The use of autologous fibrin as a scaffold for cultivating autologous conjunctiva in the treatment of conjunctival defect. *Cell Tissue Bank* 2014; 15(4): 619-26.
- 50- Chaudhary Z, Kumar YR, Mohanty S, Khetrapal A. Amalgamation of allogenic bone graft, platelet-rich fibrin gel, and PRF membrane in auto-transplantation of an impacted central incisor. *Contemp Clin Dent* 2015; 6(2): 250-3.

Original Article

Gamma irradiation, an appropriate method for sterilization of the fibrin membrane while maintaining its biocompatibility characteristics

Akbari Saied T.¹, Ahmadi M.², Fatemi A.³, Farsinejad A.R.⁴

¹Sirjan University of Medical Sciences, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

²Physiology and Neuroscience Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

³School of Paramedical Science, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

⁴Department of Hematology and Medical Laboratory, Faculty of Allied-Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran

Abstract

Background and Objectives

Tissue engineering as a potential method was developed for the repair of tissue damages. The basic prerequisite for tissue engineering is *in vitro* growth and proliferation of cells on the scaffolds. One of the important new biomaterials that was introduced in 2006 by Choukroun and colleagues is fibrin membrane and now is only used as an autologous biomaterial. However, the use of fibrin as allogeneic membrane due to the risk of transmission of viral and bacterial diseases is very limited. Perhaps the decontamination of fibrin membranes be a key solution to overcome the limitations of its application in tissue engineering.

Materials and Methods

In this experimental study, fibrin membranes prepared of FFP by three methods were decontaminated. Cell viability and toxicity of 3T3 fibroblast cell on membranes of fibrin that was decontaminated were evaluated by MTT assay. Statistical analysis of data was performed by using Paired-Sample t-test.

Results

In case of both decontaminated and contaminated fibrin membranes, the survival of fibroblast cells 24 and 48 hours after exposure to the membrane increased significantly ($P > 0.01$); however, 72 hours after exposure, the proliferation reduced and there were evidence of cells apoptosis.

Conclusions

Based on these findings it can be concluded that Fibrin membranes by providing an appropriate background and releasing growth factors enhance the proliferative potential and increased survival of the cells. This feature is not affected by the decontamination methods of fibrin membranes.

Key words: Tissue Engineering, Fibrinogen, Sterilization, Gamma Rays

Received: 10 Dec 2016

Accepted: 11 Dec 2017

Correspondence: Farsinejad A.R., PhD of Hematology & Blood Banking. Assistant Professor of Department of Hematology and Medical Laboratory, Faculty of Allied-Medicine, Kerman University of Medical Sciences. Postal Code: 7619794435, Kerman, Iran. Tel: (+9834) 32112007; Fax: (+9834) 31325375 E-mail: Farsinezhad239@yahoo.com