جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۶ شماره ۳ پاییز ۸۸ (۱۸۹-۱۸۱)

مقاله پژوهشی

مطالعه خصوصیات آزمایشگاهی چسب فیبرینی تهیه شده از پلاسمای تک واحدی

اکبر هاشمی طیر[۱]، دکتر ناصر امیری‌زاده[۲]، دکتر پیمان عشقی[۳]، دکتر حسن ابوالقاسمی[۴]، مریم امانی[۱]، علیرضا جباری[۵]، رضا رنجبران[۱]، محمد حسین محمدی[۱]، دکتر مهریار حبیبی رودکنار[۶]، اکرم علی بالازاده[۷]

چکیده

سابقه و هدف

چسب فیبرینی فرآورده بیولوژیک مشتق از پلاسما است که به طور گسترده‌ای جهت متوقف نمودن خونریزی در حین و بعد از جراحی استفاده می‌شود و نوع اتولوگ و تهیه شده در بانک خون آن، خطر انتقال عوامل عفونی را ندارد. هدف این مطالعه تهیه ترومبین و فیبرینوژن از پلاسمای تازه منجمد شده و مطالعه خصوصیات آزمایشگاهی آن‌ها به منظور تهیه چسب فیبرینی بود.

مواد و روش‌ها

فیبرینوژن با استفاده از سولفات پروتامین از کرایو استحصال و غلظت آن با روش الایزا و روش انعقادی کلاوس تعیین شد. ترومبین با دو روش دستی و دستگاهی تهیه و فعالیت آن با روش اسپکتروفتومتری تعیین گردید. زمان تشکیل لخته با ترکیب ترومبین و فیبرینوژن استحصالی اندازه‌گیری شد. قدرت کشش و قدرت چسبندگی لخته حاصل با دستگاه Tensiometry تعیین شد. بررسی زمان لیز لخته با حلال پذیری در اوره ۵ مولار انجام شد.

یافته‌ها

غلظت فیبرینوژن رسوب داده شده با سولفات پروتامین ۸ ± ۷۳ mg/ml تعیین شد. بازیافت فیبرینوژن از رسوب کرایو در دمای ۲۴°C، ۹۳٪ بود. زمان تشکیل لخته فیبرینوژن با ترومبین کمتر از ۵ ثانیه بود. قدرت کشش لخته و قدرت چسبندگی به ترتیب ۸/۹ ± ۶۰ g/cm^2 و ۹ g ± ۵۵ بود. میانگین فعالیت ترومبین دستی تولید شده NIH ۶/۲ ± ۵۹/۶ بود اضافه نمودن عامل آنتی‌فیبرینولیتیک به کنسانتره فیبرینوژن، تاثیری در زمان لخته شدن و قدرت کشسانی نداشت.

نتیجه گیری

فیبرینوژن و ترومبین تهیه شده در این تحقیق از لحاظ غلظت، فعالیت، قدرت تشکیل لخته و استحکام لخته ایجاد شده، ماهیت مناسبی برای تولید چسب فیبرینی دارند.

کلمات کلیدی: چسب فیبرینی، فیبرینوژن، ترومبین، پلاسما

تاریخ دریافت: ۸۷/۹/۶
تاریخ پذیرش: ۸۸/۴/۱۳

۱ـ کارشناس ارشد هماتولوژی ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۲ـ مؤلف مسؤول: PhD هماتولوژی ـ استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران ـ صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵
۳- فوق تخصص خون و انکولوژی اطفال ـ دانشیار دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۴- فوق تخصص خون و انکولوژی اطفال ـ استاد دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌اله و مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۵ ـ مهندس مکانیک ـ شرکت سرنگ‌سازی هلال احمر(سها)
۶ ـ PhD بیوتکنولوژی ـ استادیار مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
۷ ـ کارشناس پرستاری ـ مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

چسب فیبرینی فرآورده بیولوژیک مشتق از پلاسما است که امروزه در بسیاری از اعمال جراحی جهت کنترل خونریزی و در ترمیم بافت‌های آسیب دیده کاربرد فراوانی دارد. این فرآورده متشکل از دو جزء اصلی فیبرینوژن و ترومبین بوده و عملکردی همانند مراحل نهایی تشکیل لخته در هموستاز ثانویه دارد(۳-۱).

این فرآورده در دو فرم تجاری و تهیه شده در بانک خون(اتولوگ یا هومولوگ) در دسترس می‌باشد.فرم تجاری این فرآورده از پلاسمای انباشته شده اهداکنندگان متعدد تهیه و علی‌رغم تکنولوژی پیشرفته ویروس‌زدایی، خطر باقیمانده انتقال آلودگی‌های ویروسی کماکان وجود دارد و هزینه تولید بالاست. لذا ایده استفاده از چسب‌های فیبرینی تولید شده از پلاسمای دهنده انسانی، به صورت روزافزونی در جهان مطرح شده است(۵، ۴).

چسب فیبرینی تهیه شده در بانک خون، از رسوب کرایو به طور مستقیم به عنوان منبع فیبرینوژن و یا با روش‌های رسوبی از پلاسما یا رسوب کرایو فیبرینوژن تهیه می‌شود. در روش رسوبی، فیبرینوژن با استفاده از عوامل شیمیایی هم چون اتانول، پلی‌اتیلن گلیکول، یا آمونیم سولفات رسوب داده می‌شود. رسوب به دست آمده از عوامل شیمیایی، دارای معایبی نیز می‌باشد. به عنوان مثال در رسوب با الکل، مقدار زیادی از الکل درفیبرینوژن تغلیظ شده به جا می‌ماند که منجر به لخته شدن ضعیف فیبرینوژن و کاهش فعالیت فاکتور XIII می‌شود(۷، ۶). در روش رسوب با آمونیوم سولفات نیز تنها ۵۵٪ فیبرینوژن و به مقدار زیاد آلبومین رسوب می‌کند(۸). روش رسوب با پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) نیز وقت‌گیر بوده و ممکن است ساختار و عملکرد فیبرینوژن تغییر کند(۹).

فیبرینوژن هم چنین توسط پروتامین نیز رسوب داده می‌شود. روند رسوب با پروتامین سریع بوده و باعث رسوب تقریباً ۱۰۰٪ فیبرینوژن موجود در پلاسما می‌گردد(۱۲-۱۰).

هنوز در برخی از کشورهای در حال توسعه، تهیه چسب فیبرینی به صورت ترکیبی از کنسانتره فیبرینوژن با ترومبین گاوی است. استفاده از ترومبین گاوی می‌تواند باعث واکنش‌های نامطلوب بافتی و تولید مهار کننده بر علیه فاکتور V انسانی و بروز عوارض خونریزی دهنده در گیرنده گردد. لذا در سال‌های اخیر کوشش‌های فراوانی جهت تهیه ترومبین از پلاسمای انسانی صورت گرفته است. تخلیص ترومبین توسط جذب با اتانل، بر اساس مطالعه‌های صورت گرفته و در نظر گرفتن هزینه، دارای کارایی بالا و سهل‌الاجرا است(۱۳).

مواد و روش ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. پلاسما به وسیله آفرزیس در ضد انعقاد سیترات سدیم ۴٪ و با استفاده از دستگاه Hemonetics (PCS2) ، بعد از کسب رضایت از اهداکنندگانی که به سازمان انتقال خون مراجعه کرده بودند(n =۲۰)، در کیسه‌های سه تایی جمع‌آوری و در دمای ۸۰°C- نگهداری شد. سپس با ذوب نمودن کیسه پلاسما در دمای ۴ °C، کرایو تهیه شد. جهت تهیه فیبرینوژن، کرایو با نسبت مساوی با سولفات پروتامین مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ گردید. مایع رویی کاملاً خالی شد و رسوب در سیترات سدیم ۰/۲ مولار حل گردید. غلظت فیبرینوژن موجود در پلاسما، کرایو و کنسانتره فیبرینوژن با استفاده از آزمایش الایزا (Assay Max Human Fibrinogen (FBG) ELISA Kit,) مورد ارزیابی قرار گرفت. هم چنین غلظت فیبرینوژن با روش انعقادی کلاوس(Clauss) ارزیابی شد. در این آزمایش، نمونه‌ها در حضور ترومبین در دستگاه اتوآنالایزر انعقادی (کمپاکت SDA ـ فرانسه) لخته شدند و بر اساس زمان لخته و منحنی استاندارد، غلظت فیبرینوژن محاسبه شد. با اضافه نمودن سولفات پروتامین به کرایوپرسیپیتات و انکوبه کردن مخلوط در دماهای مختلف ۳۷ °C ، ۲۴ °C ، ۲۰°C-، ۴ °C تاثیر دما بر رسوب فیبرینوژن مورد بررسی قرار گرفت.

در بررسی اثر غلظت‌های مختلف فیبرینوژن بر سرعت تشکیل لخته، ابتدا با مخلوط نمودن ۵ نمونه کنسانتره فیبرینوژن و ۵ نمونه ترومبین، ترومبین با غلظت متوسط ۶۰ NIH (یک واحد NIH برابر ۱/۱ تا ۱/۲ واحد بین‌المللی ترومبین است) و کنسانتره فیبرینوژن با غلظت متوسط

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

۶۵ mg/ml به دست آمد. سپس نسبت‌های مختلفی از کنسانتره فیبرینوژن به محلول ترومبین شامل نسبت‌های ۳:۱، ۲:۱ و ۱:۱تهیه (n=۵) و بلافاصله زمان تشکیل لخته اندازه گیری شد.

جهت تهیه ترومبین، در ابتدا معرف ترومبین که مخلوطی از کلرید کلسیم ۲۵ میلی‌مولار واتانول مرک می‌باشد، تهیه شد. پلاسما با معرف ترومبین در داخل لوله شیشه‌ای که حاوی ۱ گرم پودر شیشه وکائولن است، ریخته شد و لوله مخلوط گردید و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. دوباره لوله مخلوط شد تا پلاسمای لخته شده کاملاً یکنواخت گردد و ۵ دقیقه دیگر به همان حالت افقی قرار گرفت. لوله مجدداً مخلوط شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۳۰۰۰ سانتریفوژ گردید. از مایع رویی می‌توان به عنوان محلول ترومبین استفاده نمود. میزان فعالیت ترومبین دستی و دستگاهی تهیه شده از نمونه‌های پلاسمای ۲۰ نفر(به صورت دوتایی) با استفاده از سوبسترای اختصاصی(CBS 61.50 STACHROM) آن و روش اسپکتروفتومتری در مقایسه با نمونه استاندارد اندازه‌گیری شد و هم چنین زمان انعقاد آن‌ها با فیبرینوژن ثبت گردید. جهت بررسی پایداری ترومبین، ترومبین حاصل از دو روش لوله‌ای(n=۵) و دستگاهی(n=۵) در دماهای ۲۴ °C ، ۴ °C و ۲۰- °C نگهداری و به فواصل مختلف در هنگام ترکیب با کنسانتره فیبرینوژن، زمان تشکیل لخته ثبت گردید.

جهت بررسی آنالیز کیفی فیبرینوژن و ترومبین، نمونه‌ها بر روی ژل پلی‌اکریلامید ۱۰٪ الکتروفورز شدند و ژل حاصل پس از رنگ‌آمیزی با آبی کوماسی، مورد ارزیابی قرار گرفت .

جهت بررسی قدرت چسبندگی، در ابتدا قطعات شیشه‌ای با ابعاد ۱/۵ × ۱/۵سانتی‌متر که یک سطح آن سندبلاست شده بود، تهیه شد. سپس سطح سندبلاست شده توسط کلاژن با غلظت ۱۵ میکروگرم در میلی‌لیتر پوشش داده شد. چسب فیبرینی(ترکیب فیبرینوژن و ترومبین) بر روی دو سطح سندبلاست شده ریخته شد وسریعاً این دو سطح بر روی هم قرار گرفته و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه شدند. ضخامت چسب فیبرینی حاصل بین دو قطعه شیشه ۰/۱ سانتی‌متر بود. سپس با کمک دستگاه Tensiometry (زوییک ـ آلمان) قدرت چسبندگی اندازه گیری شد.

جهت بررسی قدرت کشسانی(Tensile Strenght)، حدود ۳ میلی‌لیتر کنسانتره فیبرینوژن با غلظت‌های مختلف ۵۷ ، ۶۲، ۶۹، ۷۵ و ۸۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به طور جداگانه با ۱ میلی‌لیتر ترومبین با غلظت متوسط ۶۰NIH و ۵۰ میکرولیتر کلسیم کلراید مخلوط شد. برای اندازه‌گیری قدرت کشش از دستگاه Tensiometery (زوییک ـ آلمان) استفاده شد.

در این مطالعه هم چنین با استفاده از آزمایش حلال‌پذیری در اوره ۵ مولار، لیز لخته بررسی شد.

یافته ها

به طور میانگین، میزان غلظت فیبرینوژن درپلاسمای اولیه ۰/۴ mg/ml ± ۲/۳ و در کرایو جمع‌آوری شده ۴/۷ mg/ml ± ۲۱/۵ اندازه‌گیری شد. بنابراین میانگین مقدار فیبرینوژن تام در ۱۱ ml کرایو، ۵۲ mg ± ۲۳۶/۵ می‌باشد.

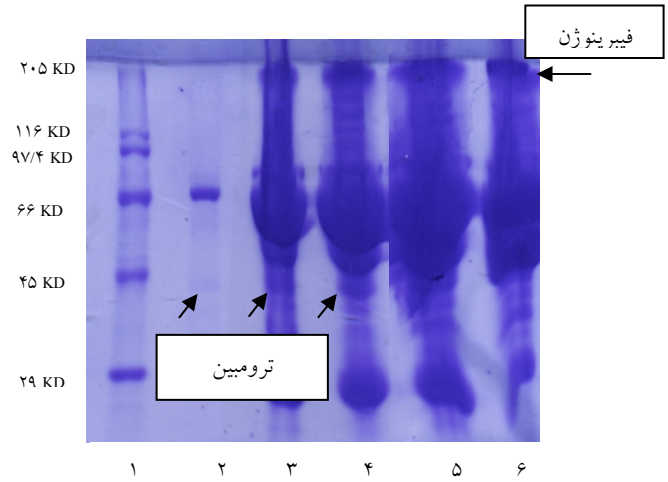
میانگین غلظت فیبرینوژن استحصالی در کنسانتره، با روش کلاوس، ۷/۸ mg/ml ± ۷۱ و با روش الایزا به طور متوسط ۸ mg/ml ± ۷۳ با محدوده ۸۷-۵۶ تعیین مقدار شد. به لحاظ این که از هر کیسه پلاسما، تقریباً ۳ ml کنسانتره فیبرینوژن استحصال می‌گردد، بنابراین مقدار فیبرینوژن تام در کنسانتره فیبرینوژن تقریباً ۲۱۹ mg در ۳ میلی‌لیتر می‌باشد. زمان تشکیل لخته نیز به طور میانگین ۰/۳ ± ۴/۷ ثانیه بود. درصد فیبرینوژن بازیافت شده از کرایو از روی نسبت فیبرینوژن موجود در کنسانتره به فیبرینوژن موجود در کرایو به دست می‌آید که این میزان در روش رسوبی با سولفات پروتامین در حدود ۹۳٪ بود. وجود باند واضحی از فیبرینوژن در ناحیه بالای ۲۰۰ کیلو دالتون در آزمایش SDS-PAGE حاکی از این قضیه بود(شکل ۱).

در بررسی اثر دما، غلظت فیبرینوژن اندازه‌گیری شده بر روی ۵ نمونه استحصالی در دماهای مختلف بیانگر میزان رسوب بالاتری از فیبرینوژن در دمای ۲۴ °C (۶۹ mg/ml)

می‌باشد($p < ۰/۰۵$). دماهای پایین‌تر و بالاتر از دمای اتاق باعث افزایش محصول فیبرینوژن در کنسانتره نشد(نمودار ۱).

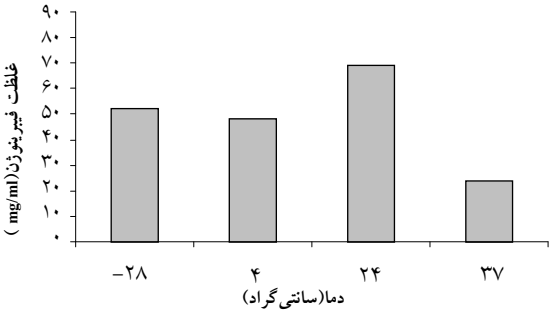
در بررسی اثر غلظت‌های مختلف فیبرینوژن و ترومبین بر روی سرعت تشکیل لخته، با کاهش نسبت ترومبین به فیبرینوژن(T:F)، زمان تشکیل لخته کاهش یافته و کوتاه‌ترین زمان تشکیل لخته در نسبت T:F = ۱:۳ مشاهده می‌گردد(نمودار ۲).

در بررسی میزان فعالیت ترومبین، غلظت ترومبین دستی و دستگاهی اندازه‌گیری شده با روش اسپکتروفتومتری به ترتیب NIH ۶/۲ ± ۵۹/۶ با دامنه ۶۹-۴۷ و ۶/۴ ± ۶۳ با



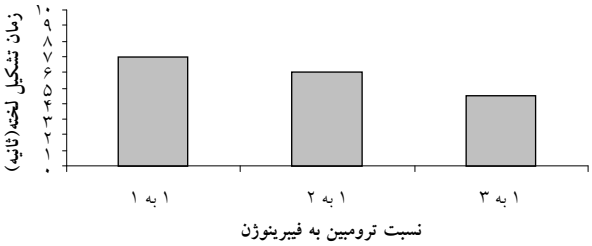
شکل ۱ : الکتروفورز نمونه‌های کنسانتره فیبرینوژن، کرایو، ترومبین دستی و دستگاهی، ترومبین کنترل و مارکر پروتئینی بر روی ژل پلی‌اکریلامید.

۱ : مارکر با وزن ملکولی - ۲ :کنترل ترومبین - ۳: ترومبین دستگاهی - ۴: ترومبین دستی - ۵: نمونه کرایو - ۶: کنسانتره فیبرینوژن

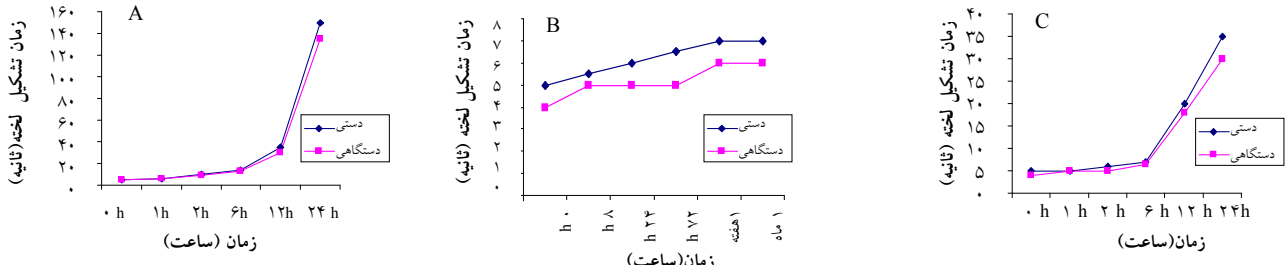


نمودار ۱: غلظت فیبرینوژن در کنسانتره حاصل از رسوب با سولفات پروتامین در دماهای مختلف

دامنه ۷۱-۵۲ تعیین مقدار شد و زمان تشکیل لخته آن‌ها با فیبرینوژن نیز به ترتیب در حدود ۰/۸ ± ۴/۸ و ۰/۷ ± ۴/۲ ثانیه بود. اختلاف معنی‌داری بین زمان تشکیل لخته و غلظت ترومبین حاصل از دو روش لوله‌ای و دستگاهی وجود نداشت. در آزمایش SDS-PAGE ، باند واضحی در ناحیه ۳۷ کیلو دالتون که مرتبط با ترومبین بود مشاهده گردید(شکل ۱). فعالیت ترومبین حاصل از دو روش دستی و دستگاهی تا مدت ۶ ساعت در دمای ۴ °C ، تا مدت ۲ ساعت در دمای اتاق و تا ۳ ماه و یا بیشتر در دمای ۲۰- °C پایدار بود(نمودار ۳).



نمودار ۲: اثر نسبت‌های مختلف فیبرینوژن به ترومبین در زمان لخته کوتاه‌ترین زمان تشکیل لخته در نسبت T:F = ۱: ۳ دیده شد.



نمودار ۳ :بررسی پایداری ترومبین در دماهای مختلف

A ۳ : بررسی پایداری ترومبین در دمای ۲۴ °C **B ۳ : بررسی پایداری ترومبین در دمای ۲۰- °C** **C ۳ : بررسی پایداری ترومبین در دمای ۴ °C**

منظور از پایداری ترومبین، تشکیل لخته فیبرینی در مدت زمان کمتر از ۱۰ ثانیه می‌باشد. اختلاف معنی‌داری بین پایداری ترومبین لوله‌ای و دستگاهی در دماهای ذکر شده وجود نداشت.

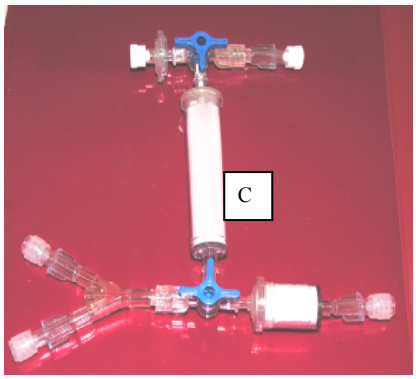
در بررسی لیز لخته، بالا بردن نسبت T:F و افزودن ترانگزامیک اسید و کلرید کلسیم به چسب فیبرینی، باعث افزایش زمان لیز لخته شد. نتایج نشان داد که در نسبت ۳ به ۱ فیبرینوژن به ترومبین(F:T= ۳:۱) در مقایسه با نسبت F:T=۱:۱ ، زمان لیز لخته به مدت ۴ روز افزایش یافت. اضافه نمودن کلرید کلسیم به F:T = ۱:۱ ، زمان لیز لخته را به مدت ۵ روز و اضافه نمودن ترانگزامیک اسید به F:T= ۱:۱ ، زمان لیز لخته را به مدت ۴/۵ روز افزایش داد.

در بررسی قدرت چسبندگی چسب فیبرینی توسط دستگاه Tensiometry (زوییک ـ آلمان)، مقدار نیروی لازم به طور میانگین ۵۵ g/cm^2 با دامنه ۵۹-۴۸ تعیین شد و این بیانگر قدرت چسبندگی چسب فیبرینی بود.

قدرت کشسانی چسب فیبرینی با دستگاه Tensiometry ، به طور میانگین ۶۰ ± ۸ g/cm^2 با دامنه ۶۴-۵۶ تعیین مقدار شد. با افزودن ترانگزامیک اسید، تاثیری در قدرت کشسانی چسب فیبرینی مشاهده نشد.

طراحی وسیله تهیه کننده ترومبین (TAD = Thrombin Activation Device) :

این وسیله شامل محفظه‌ای است که در آن کائولن و glass bead وجود داشته و ورودی‌هایی برای تزریق معرف ترومبین و پلاسما در داخل آن تعبیه شده که دارای فیلترهای ۰/۲۲ میکرون به منظور ایجاد شرایط کاملاً استریل می‌باشد. هم چنین این وسیله دارای خروجی حاوی فیلتر است، به صورتی که می‌توان ترومبین حاصل را به صورت استریل از این محفظه خارج نمود(شکل ۲). در حضور سطحی با بار منفی(کائولن و glass bead) و پلاسما، ریجنت ترومبین(کلرید کلسیم و اتانول) باعث تشکیل کمپلکس پروترومبیناز شده و با شکل‌گیری لخته، اکثر پروتئین‌های انعقادی پلاسما رسوب کرده و می‌توان از سوپ رویی به عنوان محلول ترومبین استفاده نمود.



شکل ۲: وسیله تهیه کننده ترومبین(TAD)

بحث

هدف از این مطالعه ارزیابی خصوصیات آزمایشگاهی ترکیب چسب فیبرینی(فیبرینوژن و ترومبین) تهیه شده از پلاسمای واحد انسانی بود، تا بدین وسیله بتوان به یک روش ساده و ارزان برای تهیه چسب فیبرینی اتولوگ دست یافت.

در مطالعه حاضر جهت استحصال فیبرینوژن، از روش رسوب با سولفات پروتامین قابل تزریق طبی استفاده شد. نتایج نشان داد که با روش رسوبی سولفات پروتامین، می‌توان تقریباً تا میزان ۹۳٪ فیبرینوژن موجود در کرایو را استحصال نمود. قابلیت لخته شدن فیبرینوژن حاصل به خوبی حفظ شد و در حضور ترومبین در مدت زمان حدود ۴/۷ ثانیه، لخته تشکیل شد.

در مطالعه آلستون و همکارانش، از پلاسما به عنوان منبع فیبرینوژن استفاده شد و نیاز به مصرف مقدار زیادی سولفات پروتامین بود(۱۴). در مطالعه حاضر، جهت کاهش حجم مصرفی سولفات پروتامین، از کرایو به عنوان منبع فیبرینوژن استفاده شد.

در این مطالعه، جهت بررسی غلظت فیبرینوژن از آزمایش الایزا(Assay Max Human Fibrinogen = FBG ELISA) استفاده و غلظت فیبرینوژن در حدود ۸ mg/ml ±۷۳ در کنسانتره اندازه‌گیری شد. غلظت فیبرینوژن هم چنین با روش کلاوس(با استفاده ازاتوآنالایزر انعقادی) تعیین شد و مقدار آن به طور متوسط ۷ mg/ml ± ۷۱ بود

که بیانگر فعالیت مناسب انعقادی فیبرینوژن می‌باشد. حضور باند واضحی از فیبرینوژن در نمونه کنسانتره فیبرینوژن در بررسی با SDS-PAG ، موید این قضیه بود. قدرت کشسانی لخته رابطه مستقیمی با غلظت فیبرینوژن دارد و به عنوان شاخص کیفی چسب محسوب می‌شود(۱۵). قدرت چسبندگی نیز با غلظت فیبرینوژن مرتبط می‌باشد(۱۷، ۱۶، ۱۲). معمول‌ترین روش برای استحصال فیبرینوژن از خون انسان، کرایوپرسیپیتاسیون است و غلظت فیبرینوژن حاصل از آن mg/ml ۴۰-۲۰ می‌باشد(۱۸). هم چنین می‌توان فیبرینوژن را توسط عوامل شیمیایی مانند الکل، پلی‌اتیلن گلیکول و یا آمونیوم سولفات از پلاسما یا کرایو رسوب داد(۱۹). در این موارد غلظت فیبرینوژن از mg/ml ۳۰ تا بیشتر از mg/ml ۵۰ می‌باشد(۶). در روش رسوب با الکل، مقدار زیادی از الکل در کنسانتره باقی مانده که باعث لخته شدن ضعیف فیبرینوژن و کاهش فعالیت فاکتور XIII می‌شود(۷، ۶).

در روش رسوبی با آمونیم سولفات نیز مقادیر بالایی از آلبومین رسوب کرده که با تشکیل لخته مداخله می‌نماید(۸). روش رسوبی با پلی‌اتیلن گلیکول نیز وقت‌گیر بوده و هم چنین لازم است قبل از شروع کار، پروترومبین را باز جذب نمود (۲۰).

در این مطالعه هم چنین تاثیر دما بر روی میزان رسوب فیبرینوژن توسط سولفات پروتامین مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بالاترین میزان رسوب فیبرینوژن در دمای ۲۴ °C بود. با کاهش یا افزایش دما، میزان استحصال فیبرینوژن کاهش یافت. این نتایج با بررسی مشابهی که توسط آلستون و همکارانش انجام شد، مطابقت داشت(۱۴).

با توجه به این که پس از تشکیل لخته هم زمان روند فیبرینولیز در لخته آغاز شده و پس از مدتی لخته تجزیه می‌گردد، لذا لازم است در موارد استفاده بالینی در اعمال جراحی، از روند فیبرینولیز جلوگیری شود. از عوامل آنتی‌فیبرینولیتیک استفاده شده می‌توان به آپروتینین، ترانگزامیک اسید و اپسیلون آمینوکاپروئیک اسید اشاره نمود(۲۲، ۲۱). در این مطالعه از ترانگزامیک اسید به عنوان عامل ضد لیز استفاده شد. نتایج نشان داد که حضور عامل آنتی‌فیبرینولیتیک، زمان لیز لخته در محیط آزمایشگاه را افزیش داده و تاثیری بر قدرت کشش، چسبندگی و زمان لخته شدن ندارد.

فعالیت ترومبین تولید شده توسط TPD در حدود NIH ۶۳/۷ با دامنه ۷۱-۵۲ (n=۲۰) تعیین مقدار شد و با یافته‌های حاصل از مطالعه‌های راک وهمکارانش کاملاً مطابقت داشت(۲۳). از طرفی فعالیت ترومبین حاصل از روش لوله‌ای نیز در حدود NIH ۵۹/۶ با دامنه ۶۹-۴۷ (n=۲۰) تعیین مقدار شد که با مقادیر فعالیت ترومبین حاصل از TPD برابری می‌نمود وتفاوت معنی‌داری وجود نداشت. ترومبین تجاری استفاده شده در چسب فیبرینی، معمولاً غلظت بالاتری در حدود ۵۰۰ یا NIH ۱۰۰۰ دارند. اما نشان داده شده که ترومبین با غلظت NIH ۵۰ در مقایسه با NIH ۵۰۰ در هنگام ترکیب با کنسانتره فیبرینوژن، قدرت چسبندگی بالاتری دارد(۲۴). حضور ترومبین حاصل از دو روش دستی و دستگاهی در بررسی با SDS-PAGE نشان داده شد و باند واضحی در ناحیه ۳۷ کیلودالتون مشاهده گردید.

این مطالعه نشان داد که امکان تولید ترومبین از پلاسمای تک واحدی با استفاده از روش دستی امکان‌پذیر بوده و ترومبین تولیدی فعالیت مناسب برای تولید کافی فیبرین وتشکیل لخته را دارد. این روش ساده بوده و در مدت زمان ۳۰ دقیقه قادر به تولید ترومبین می‌باشد.

در این مطالعه هم چنین پایداری ترومبین حاصل از هر دو روش مورد بررسی قرار گرفت. ترومبین تهیه شده در هر دو روش تا مدت زمان ۶ ساعت در دمای ۴ ºC ، تا ۲ ساعت در دمای ۲۴ ºC و تا ۳ ماه و یا بیشتر در دمای ۲۰ ºC- پایدار بود و در هنگام ترکیب با کنسانتره فیبرینوژن، سرعت تشکیل لخته کمتر از ۱۰ ثانیه می‌شد. این مطالعه با مطالعه‌های مشابهی که توسط کومار و همکارانش صورت گرفت، همخوانی داشت(۲۵).

نسبت ترومبین به فیبرینوژن در چسب فیبرینی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این مطالعه کوتاه‌ترین زمان تشکیل لخته و مستحکم‌ترین قوام لخته در نسبت ۱ به ۳ مشاهده شد. این مطالعه با مطالعه استچیسون و همکارانش که از ترومبین با غلظت‌های مختلف (NIH

۲۰۰۰ ، ۱۵۰۰ ، ۱۰۰۰ ، ۵۰۰) و نسبت‌های مختلف فیبرینوژن به ترومبین استفاده کرده بودند، مطابقت داشت(۲۶).

در این مطالعه قدرت کشش چسب فیبرینی در حدود ۶۰ ± ۸ g/cm^2 اندازه‌گیری شد. با افزودن ترانگزامیک اسید، تاثیری در قدرت کشسانی ایجاد نشد. در مطالعه باسو و همکارانش، قدرت کشسانی چسب فیبرینی g/cm^2 ۶۳ ± ۱۱/۵ بود و به طور قابل توجهی نسبت به چسب حاصل از کرایوپرسیپیتانت بالاتر بود(۲۷).

قدرت چسبندگی رابطه مستقیمی با غلظت فیبرینوژن و اندازه سطح هم پوشانی شده دارد، به طوری که با افزایش غلظت فیبرینوژن و سطح هم پوشانی شده، قدرت چسبندگی افزایش می‌یابد. در مطالعه مارکس و همکارانش، قدرت چسبندگی بروی برش‌های پوستی رت به ابعاد cm^2 ۰/۵ در حدود g ۳۵ بود و با افزایش غلظت فیبرینوژن، قدرت چسبندگی افزایش یافت(۲۸). در مطالعه ما، قدرت چسبندگی بر روی تکه‌های شیشه cm^2 ۲ پوشیده از کلاژن در حدود g ۵۵ بود.

در بررسی لیز لخته چنانچه بین مونومرهای فیبرینی اتصالات کوالان توسط فاکتور XIII برقرار نباشد، لخته فیبرینی در کمتر از ۱ ساعت در اوره ۵ مولار حل می‌شود. در این مطالعه با افزایش غلظت فیبرینوژن نسبت به ترومبین، استحکام لخته افزایش یافت. هم چنین اضافه نمودن کلرید کلسیم و ترانگزامیک اسید باعث افزایش پایداری لخته به مدت ۳ الی ۴ روز شد و اضافه نمودن توام کلرید کلسیم و عوامل رشد پلاکتی به ترکیب فیبرینوژن و ترومبین(T:F = ۱:۳)، لخته را به مدت ۷ روز پایدار نمود.

نتیجه‌گیری

بررسی‌های انجام شده بروی فیبرینوژن و ترومبین تهیه شده در آزمایشگاه، بیانگر کیفیت مطلوب این فرآورده‌ها برای تهیه چسب فیبرینی از پلاسمای واحد انسانی بود.

تشکر و قدردانی

این طرح با بودجه مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران انجام پذیرفته است. بدین‌وسیله نویسندگان مقاله از شرکت سرنگ‌سازی هلال احمر برای کمک در طراحی و ساخت دستگاه تهیه ترومبین تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References :

1- Radosevich M, Goubran HA, Burnouf T. Fibrin sealant: Scientific rationale, Production methods, Properties, and current clinical use. Vox Sang 1997; 72 (3): 133-43.
2- Jackson MR, Macphee MJ, Dorphan WN, Alving BM. Fibrin sealant: Current and potential clinical applications. Blood Coagul Fibrinolysis 1996; 7(8): 737- 46.
3- Tock B, Drohan W, Hess J, Pusateri A, Holcomb J, MacPhee M. Hemophilia and advanced fibrin sealant technologies. Hemophilia 1998; 4(4); 449-55.
4- Jackson MR. Fibrin sealants in surgical practice: An overview. Am J Surg 2001; 182(2 Suppl):1S-7S.
5- McCullough J. Progress toward a pathogen-free blood supply. Clin Infect Dis 2003; 37(1): 88-95.
6- Gammon RR, Avery N, Mintz PD. Fibrin sealant: an evaluation of methods of production and the role of the blood bank. J Long Term Eff Med Implants 1998; 8(2): 103-16.
7- Sierra DH. Fibrin sealant adhesive systems: a review of their chemistry, material properties and clinical applications. J Biomat Appl 1993; 7: 309-52.
8- Park MS, Cha CI. Biochemical aspects of autologous fibrin glue derived from ammonium sulfate precipitation. Laryngoscope 1993; 103(2): 193-6.
9- Barker TH, Fuller GM, Klinger MM, Feldman DS, Hagood JS. Modification of fibrinogen with poly (ethylene glycol) and its effects on fibrin clot characteristics. J Biomed Mater Res 2001; 56(4): 529-35.
10- Ferguson JH. The action of heparin, serum albumin (crystalline), and salmine on blood-clotting mechanisms. Am J Physiol 1940; 130(4): 759-70.
11- Mylon E, Winternitz MC, Suto-Nagy GJ. The determination of fibrinogen with protamine. J Biol Chem 1942; 143(1): 21-7.
12- Portmann AF, Holden WD. Protamine (salmine) sulphate, heparin, and blood coagulation. J Clin Invest 1949; 28: 1451-8.
13- Zehnder J, Leung L. Development of antibodies to thrombin and factor V with recurrent bleedin in a patient exposed to topical bovin thrombin. Blood 1990; 76(10): 2011-6.
14- Alston SM, Solen KA, BroderickAH, Sukavaneshvar S, Mohammad SF. New method to prepare autologous fibrin glue on demand. Translational Res 2007; 149(4): 187-95.
15- Siedentop KH, Park JJ, Sanchez B. An autologous fibrin tissue adhesive with greater bonding power. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1995; 121(7): 769-72.
16- Bale MD, Mosher DF. Thrombospondin is a substrate for blood coagulation factor XIIIa. Biochemistry 1986; 25(19): 5667-73.
17- Hada M, Kaminski M, Bockenstedt P, McDonagh J. Covalent crosslinking of von Willebrand factor to fibrin. Blood 1986; 68: 95-101.
18- Dresdale A, Rose EA, Jeevanandam V, Reemtsma K, Bowman FO, Malm JR. Preparation of fibrin glue from single-donor fresh-frozen plasma. Surgery 1985; 97(6): 750-5.
19- Vila V, Regañón E, Llopis F, Aznar J. A rapid method for isolation of fibrinogen from human plasma by precipitation with polyethylene glycol 6,000. Thromb Res 1985; 39(5): 651-6.
20- Brennan M. Fibrin glue. Blood Rev 1991; 5(4): 240-4.
21- Pipan CM, Glasheen WP, Matthew TL, Gonias SL, Hwang LJ, Jane JA, *et al*. Effects of antifibrinolytic agents on the life span of fibrin sealant. J Surg Res 1992; 53: 402-7.
22- Furtmüller R, Schlag MG, Berger M, Hopf R, Huck S, Sieghart W, *et al*.Tranxamic acid, a widely used antifibrinolytic agent, causes convulusions by a gamma-aminobutyric acid (A) receptor antagonist effect. J Pharmacol Exp Ther 2002; 301(1): 168-73.
23- Rock G, Berger R, Lange J, Tokessy M, Palmer DS, Giulivi A. A novel, automated method of temperature cycling to produce cryoprecipitate. Transfusion 2001; 41(2): 232-5.
24- Yoshida H, Hirozane K, Kamiya A. Comparative study of autologous fibrin glues prepared by cryo-centrifugation, cryo-filtration, and ethanol precipitation methods. Biol Pharm Bull 1999; 22(11): 1222-5.
25- Kumar V, Champan JR. Autologous thrombin: intraoperative production from whole blood. J Extra Corpor Technol.2008 ;40(2): 94-8.
26- Stechison MT. Rapid polymerizing fibrin glue from autologous or single donor blood: preparation and indications. J Neurosurg 1992; 76(4): 626-8.
27- Basu S, Marini CP, Bauman FG, Shirazian D, Damiani P, Robertazzi R, *et al*. Comparative study of biological glues: cryoprecipitate glue, two-component fibrin sealant, and "French" glue. Ann Thorac Surg 1995; 60(5): 1255-62.
28- Marx G, Mou X. Characterizing fibrin glue perforance as modulated by heparin, aprotinin, and factor XIII. J Lab Clin Med 2002; 140(3): 152-60.

Original Article

Study of *in vitro* properties of fibrin sealant prepared from single donor plasma

Hashemi Teir A.[1](MS), Amirizadeh N.[1](PhD), Eshghi P.[2](MD), Abolghasemi H.[1,3](MD), Amani M.[1](MS), Jabari A.[1](BS), Ranjbaran R.[1](MS), Mohammadi M.H.[1](MS), Habibi Roudkenar M.[1](PhD), Ali Balazadeh A.[4](BS)

[1]*Iranian Blood Transfusion Organization,Research Center,Tehran,Iran*
[2]*Shahid Beheshti University of Medical Sciences,Tehran,Iran*
[3]*Baqiyatallah Hospital,Tehran,Iran*
[4]*Plasmapheresis Division,Iranian Blood Transfusion Organiztion, Research Center, Tehran, Iran*

Abstract

Background and Objectives

Fibrin sealant (FS) is a plasma derived product and has hemostatic, sealing and healing properties and is frequently used to reduce blood loss during and after surgery. Blood bank autologous fibrin sealants have no risk of transfusion transmitted diseases. The aim of this study was to obtain of thrombin and fibrinogen from FFP and study their *in vitro* properties for preparation of FS.

Materials and Methods

Fibrinogen was precipitated by use of protamin sulfate. Fibrinogen concentration was assayed with an enzyme-linked immunosorbent assay and clotting clauss method; the effect of temperature on fibrinogen precipitation was also evaluated. Thrombin was prepared by manual method and TPD and its activity was then determined using specific chromogenic substrate spectrophotometric assay. Thrombin stability at different temperature degrees was evaluated and clotting time was measured. Tensile strength and adhesion strength were evaluated with the tensiometry device. Clot lysis time was determined by a clot solubility test in 5M urea.

Results

Fibrinogen concentration precipitated with protamin sulfate was measured as being 73 ± 8 mg/ml. The recovery of fibrinogen in cryoprecipitate was 93%. Thrombin mixed with fibrinogen had clot time of less than 5 seconds. Tensile strength and adhesion strength of fibrin sealant were 60 ± 8.9 g/cm^2 and 55 ± 9 g, respectively. The average activity of the thrombin produced manually was 59.6 ± 6.2. Adding anti-fibrinolttic agent to fibrinogen concentrate has no effect on clotting time and tensile strength but it causes the stability improvement of fibrin clot.

Conclusions

Fibrinogen and thrombin prepared in this experiment have appropriate properties for production of fibrin sealants.

Key words: Fibrin sealant, Fibrinogen, Thrombin, Plasma
Sci J Iran Blood Transfus Org 2009; 6(3): 181-189

Received: 26 Nov 2008
Accepted: 4 Jul 2009

Correspondence: Amirizadeh N., PhD of Hematology and Blood Bank. Assistant Professor of Iranian Blood Transfusion Organization- Research Center.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821)88601599 ; Fax : (+9821)88601599
E-mail: *n.amirizadeh@ibto.ir*