

Comparison between the Effect of Advanced-Platelet Rich Fbrin and Leukocyte- Platelet Rich Fibrin on the Number of Fibroblasts Adhered to Collagen Membrane

Arash Fendereski¹ 
Mohammad Ketabi² 
Ehsan Rafiei³ 

1. Postgraduate Student, Department of Periodontics, School of Dentistry, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

2. **Corresponding Author:** Professor, Department of Periodontics, School of Dentistry, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Email: ketabimohammad@yahoo.com

3. Assistant Professor, Department of Periodontics, School of Dentistry, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

Abstract

Introduction: Growth factors and cytokines in the platelet play a major role in the progression of inflammation and healing processes, therefore A-PRF and L-PRF as platelet drive ingredients are widely used in periodontal treatments. The purpose of this study is to compare the effect of A-PRF and L-PRF on the number of gingival fibroblasts adhered to collagen membrane.

Materials & Methods: In this In-vitro study conducted in winter of 2021 at the Iranian biological resource center, the membrane was cut into five pieces (5x5 mm) and placed at the bottom of a 5 well plate. 1 milliiter of (A-PRF) was added to two wells in each group. And a similar amount of L-PRF was added to two wells in the other two groups. The last well was left A-PRF or L-PRF free. Gingival fibroblasts were seeded in all the wells. Cell adhesion was evaluated by means of a Field Emission Scanning Electron Microscope after 24 hours of incubation. The Data were analyzed by, one way and two-way ANOVA and Scheffe test (p value < 0.001).

Results: based on ANOVA there was a statistically significant difference In the A-PRF + group and L-PRF+ group (12.50 and 13.57) compared to the control group (4.67) (p value < 0.001).and Scheffe analysis showed no statistically significant difference between A-PRF+ or L-PRF+ groups (p value = 0.307).

Conclusion: A-PRF and L-PRF are both effective in the adhesion of fibroblasts cells to collagen membranes, although there is no difference between A-PRF and L-PRF in the adhesion of fibroblast cells to collagen membranes.

Key words: Membranes; Platelet rich fibrin; Fibroblasts.

Received: 05.01.2023

Revised: 04.04.2023

Accepted: 02.05.2023

How to cite: Fendereski A, Ketabi M, Rafiei E. Comparison between the Effect of Advanced-Platelet Rich Fbrin and Leukocyte- Platelet Rich Fibrin on the Number of Fibroblasts Adhered to Collagen Membrane. J Isfahan Dent Sch 2023; 19(1): 9-19.

مقایسه‌ی اثر پلاسماهای غنی از فیبرین پیشرفته با لکوسیت‌دار در میزان چسبندگی فیبروبلاستی روی غشای کلاژنی

۱. دستیار تخصصی، گروه پرپودانتیکس، دانشکده‌ی دندان پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران.
 ۲. نویسنده مسؤول: استاد، گروه پرپودانتیکس، دانشکده‌ی دندان پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران.
 Email: ketabimohammad@yahoo.com
 ۳. استادیار، گروه پرپودانتیکس، دانشکده‌ی دندان پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران.

آرش فندرسکی^۱محمد کتابی^۲احسان رفیعی^۳

چکیده

مقدمه: حضور فاکتورهای رشدی و سایتوکین‌ها در پلاکت‌ها، نقش کلیدی در التهاب و ترمیم زخم‌ها دارند. از این رو Advanced-platelet rich fibrin و Leukocyte-platelet rich fibrin به عنوان محصولات پلاکتی در درمان‌های پرپودنتال مورد استفاده قرار می‌گیرند. این مطالعه با هدف مقایسه‌ی اثر L-PRF و A-PRF بر روی میزان چسبندگی فیبروبلاست‌های لته‌ای بر روی غشای کلاژنی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی-آزمایشگاهی (in vitro) که در زمستان ۱۳۹۹ در مرکز ذخایر ژنتیکی ایران انجام شد، غشاء به پنج قطعه ۵×۵ میلی‌متری تبدیل و در ته چاهک یک محیط کشت ۵ چاهکی قرار داده شد. یک میلی‌لیتر A-PRF به دو چاهک و به دو چاهک دیگر نیز حجم وزنی مشابه A-PRF، از ماده‌ی L-PRF اضافه گردید. به طور کلی در مطالعه، ۵ گروه اصلی (۴ گروه آزمون و یک گروه شاهد) در نظر گرفته شد و در هر گروه، ۶ نمونه و در مجموع ۳۰ نمونه جهت تصویربرداری انتخاب گردید. به هر کدام از گروه‌ها، تعداد ۱۰^۴ سلول فیبروبلاست اضافه شد. چسبندگی سلولی توسط میکروسکوپ الکترونی پس از ۲۴ ساعت از فیکساسیون بررسی شد. میزان چسبندگی با استفاده از آزمون‌های آماری ANOVA و Scheffe با سطح معنی‌داری (p value < ۰/۰۰۱) آنالیز گردید.

یافته‌ها: آزمون ANOVA اختلاف معنی‌داری بین میانگین تعداد فیبروبلاست‌های لته‌ای چسبیده به غشا کلاژنی در حضور A-PRF، L-PRF (به ترتیب با میانگین ۱۲/۵۰ و ۱۳/۷۵) و گروه شاهد (با میانگین ۴/۶۷) نشان داد (p value < ۰/۰۰۱). بر اساس نتایج آزمون Scheffe، میانگین تعداد فیبروبلاست‌های لته‌ای چسبیده به غشاء کلاژنی در حضور A-PRF و L-PRF اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری نداشت (p value > ۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: افزودن لخته‌ی فیبرینی منجر به افزایش چسبندگی سلول‌های فیبروبلاست می‌شود هرچند از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری بین A-PRF و L-PRF در چسبندگی سلول‌های فیبروبلاست وجود نداشت.

کلید واژه‌ها: غشاء؛ فیبرین غنی از پلاکت؛ فیبروبلاست‌ها.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۲/۱۲

تاریخ اصلاح: ۱۴۰۲/۱/۱۵

تاریخ ارسال: ۱۴۰۱/۱۰/۱۵

استناد به مقاله: فندرسکی آرش، کتابی محمد، رفیعی احسان. مقایسه‌ی اثر پلاسماهای غنی از فیبرین پیشرفته با لکوسیت‌دار در میزان چسبندگی فیبروبلاستی روی غشای کلاژنی. مجله دانشکده دندانپزشکی اصفهان. ۱۴۰۲؛ ۱۹(۱): ۹-۱۹.

مقدمه

بازسازی هدایت شده‌ی استخوانی، یک روش قابل قبول برای بهبود ساختار استخوان آلوژنار جهت بازسازی یا ترمیم ضایعات ایجاد شده می‌باشد (۱). استفاده از غشاها منجر به جلوگیری از ورود سلول‌های اپی‌تلیالی و بافت هم‌بند به درون زخم شده و به سلول‌های با رشد آهسته‌تر از جمله استئوبلاست، سمنتوبلاست و سلول‌های لیگامان پرئودنتال فرصت استقرار در زخم و بازسازی چسبندگی پرئودنتال جدید را می‌دهد. غشاها ممکن است در ساختار و ترکیب، باهم تفاوت داشته باشند، اما همگی به عنوان سدهای مکانیکی عمل کرده و از مهاجرت سلول‌های اپی‌تلیالی و بافت هم‌بند لته به ناحیه جلوگیری کرده و به رژنراسیون سلول‌های مورد نظر کمک می‌کنند (۲-۴).

به طور ایده‌آل، غشاها باید اتصال و مهاجرت سلول‌های پیش‌ساز بافتی را ارتقا بخشند. فیبروبلاست‌ها و استئوبلاست‌ها، نقش مهمی در ترمیم زخم بازی می‌کنند. این سلول‌ها به سرعت در محل آسیب دیده حاضر شده و تکثیر می‌شوند و می‌توانند فرایند ترمیم را تسریع کنند. همچنین مسؤول ساخت فاکتورهای رشدی مختلفی هستند که در نهایت منجر به رسوب ماتریکس خارج سلولی و تمایز سلول‌های اپی‌تلیالی می‌شوند (۵، ۶).

از طرفی شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد حضور فاکتورهای رشدی و سایتوکین‌ها در پلاکت‌ها نقش کلیدی در التهاب و ترمیم زخم‌ها دارند (۷). پلاکت‌ها همچنین با ترشح فیرین و فیبرونکتین به عنوان ماتریکسی برای بافت هم‌بند عمل کرده و با کمک این مولکول‌های چسبنده مهاجرت سلول‌ها را کارآمدتر می‌کنند (۸) که این امر منجر به ایجاد نظریه استفاده از پلاکت‌ها به عنوان ابزاری درمانی برای بهبود ترمیم بافت، به خصوص بهبود زخم‌های پرئودنتال شده است (۹).

شایان ذکر است مکانیسم اثر تمام فاکتورهای رشدی به خوبی شناخته شده و اکثراً مشابه می‌باشد. فاکتورهای رشدی درون PRP یا فاکتورهای رشدی نو ترکیب بر روی

رستپورهای غشایی خاص به صورت دوتایی یا دو ناحیه‌ی فعال مجاور اثر می‌کنند. این فاکتورهای رشدی به صورت دایمر و دوتایی هستند که بر روی دو ناحیه‌ی فعال بر روی غشای خارجی سلول متصل می‌شوند. این اتصال، رستپورهای درون غشایی را فعال کرده و سبب یک باند فسفات با انرژی بالا به مولکول‌های پیغام‌رسان درون سیتوپلاسم سلول‌ها می‌شود (۱۰، ۱۱).

این مولکول‌های پیغام‌رسان تازه فعال شده به سمت هسته‌ی سلول جریان پیدا کرده و در آنجا سبب بروز یک ژن طبیعی خاص و فعال شدن آن می‌شود که کارهایی نظیر نسخه‌برداری کنترل شده‌ی سلول جوانه زدن مویرگی، تولید استئوئید و سنتز کلاژن می‌شود. بنابراین، فاکتورهای رشدی تمام فرایند بیوسنتز و پلاکت‌ها تمام مراحل ترمیم زخم را تنظیم و کنترل می‌کنند (۱۲، ۱۳).

Whitman و همکاران جز پیشگامان استفاده از محصولات پلاکتی بودند (۱۴). (Platelet rich plasma) PRP جز اولین محصولات پلاکتی مورد استفاده بود. مشکل اصلی استفاده از PRP آن است که فاکتورهای رشدی را برای مدت زمان کوتاهی آزاد می‌کند و خصوصیات مکانیکی ضعیفی دارد و از طرفی در برخی مطالعات نیز اثر افزوده‌ای در رژنراسیون بافتی ایجاد نکرده است. برای غلبه بر مشکلات PRP در سال ۲۰۰۱، (Platelet rich fibrin) PRF توسط Choukroun و همکاران معرفی شد که یک بیومتریال ساخته شده از ماتریکس فیبرینی است (۱۵). تهیه‌ی PRF بر اساس نظریه‌ی Choukroun بر این پایه استوار است که خون تهیه شده را بدون آنتی کوآگولانت سانتریفیوژ نماییم.

فیبروبلاست‌ها، سلول‌های غالب بافت هم‌بندی هستند که ۶۵ درصد کل جمعیت سلولی را تشکیل می‌دهند و به شکل یک سلول دوکی یا ستاره‌ای شکل با یک هسته‌ی بیضوی و حاوی یک یا چند هستک بوده و در سیتوپلاسم آن‌ها شبکه‌ی اندوپلاسمی گرانولر تکامل یافته، دستگاه گلژی و میتوکندری‌های بزرگ و متعدد قرار دارد که اندامک‌های

(۴ گروه آزمون و یک گروه شاهد) در نظر گرفته شد و در هر گروه، ۶ نمونه و در مجموع ۳۰ نمونه جهت تصویربرداری انتخاب گردید.

حجم نمونه در این مطالعه با مقایسه‌ی میانگین تعداد فیبروبلاست‌های لته‌ای چسبیده به غشاء کلاژنی در حضور و عدم حضور L-PRF و A-PRF، با انجام آزمون دوطرفه، در سطح معنی‌داری ۵ درصد ($\alpha = 0.05$)، با توان آزمون ۸۰ درصد ($\beta = 0.2$) و برای تشخیص تفاوت حداقل به میزان ۷۰ درصد بیشتر از انحراف معیار ($\delta = 1.7\sigma$) محاسبه گردید.

سلول‌ها هنگام تحویل در یک فلاسک کشت حاوی محیط کشت ایگل تغییر یافته توسط دالبکو (Dulbecco's modified Eagle medium DMEM, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) قرار گرفتند. سلول‌ها در انکوباتور (Memmert, Germany) در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با شرایط مرطوب و در معرض ۵ درصد دی‌اکسید کربن کشت داده شدند. در این مطالعه غشاء کلاژنی (همانند ساز بافت کیش، جزیره کیش، ایران) از نظر چسبندگی سلول‌های فیبروبلاست لته‌ای حین استفاده از APRF یا LPRF مورد بررسی قرار گرفت. از این غشاء پنج قطعه ۵×۵ میلی‌متری تهیه شد.

بعد از آماده شدن نمونه‌ها و تعداد کافی سلول، یک محیط کشت ۵ چاهکی در نظر گرفته شد. تجهیزات مورد نیاز برای آماده‌سازی A-PRF و LPRF شامل یک سانتریفیوژ (Hettich EBA 200, Berlin, Germany) و کیت جمع‌آوری خون است. برای تهیه‌ی APRF نمونه‌ی خون بیمار بدون ماده‌ی ضد انعقاد در لوله‌ی ۱۰ میلی‌لیتری قرار داده شده و بلافاصله با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۴ دقیقه سانتریفیوژ می‌گردد (۱۸). همچنین برای تهیه‌ی LPRF نمونه‌ی خون بیمار بدون ماده‌ی ضد انعقاد در لوله‌ی ۱۰ میلی‌لیتری قرار داده شد و بلافاصله با سرعت ۲۷۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۲ دقیقه سانتریفیوژ می‌شود. بالاترین لایه متشکل از پلاسمای حاوی مقادیر کم پلاکت

دخیل در فرایند پروتئین‌سازی هستند. از جمله ویژگی‌های فیبروبلاست‌های PDL، تعویض سریع و ظرفیت ریمادلینگ بالاست که توانایی ساخت بافت و ترمیم آن را از طریق تولید انواع فیبرهای بافت همبند و ساختن ماتریکس ایجاد می‌کند. همچنین به نظر می‌رسد که سلول‌های فیبروبلاست، مهم‌ترین سلول‌های PDL برای القای سلول‌های بنیادی چند پتانسیلی هستند (۱۶، ۱۷).

با توجه به این که استفاده از انواع غشاها در درمان‌های پرودنتال رایج است و هرچه میزان چسبندگی فیبروبلاست‌ها به غشاهای مربوطه بیشتر باشد، احتمال جابجایی غشا و به دنبال آن اختلال در روند بازسازی بافتی کاهش می‌یابد، انجام مطالعه‌ی حاضر ضرورت دارد و از آنجایی که به نظر می‌رسد استفاده از L-PRF و A-PRF باعث افزایش چسبندگی فیبروبلاست‌ها شود که می‌تواند در بهبود نتایج درمانی نقش داشته باشد، لذا هدف از این مطالعه، مقایسه‌ی اثر L-PRF و A-PRF بر روی میزان چسبندگی فیبروبلاست‌های لته‌ای بر روی غشاهای کلاژنی می‌باشد.

طبق فرضیه‌ی صفر پژوهش، پلاسمای غنی از فیبرین پیشرفته و پلاسمای غنی از فیبرین حاوی لکوسیت در میزان چسبندگی سلول‌های فیبروبلاست تأثیری ندارد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه‌ی تجربی-آزمایشگاهی (in vitro)، سلول‌های فیبروبلاست لته‌ای (NCBI Code C165) از مرکز ذخایر ژنتیکی ایران تهیه شدند. نمونه‌های خونی از یک مراجعه‌کننده به مرکز گرفته شد. معیار ورود به این مطالعه، سلامت سیستمیک فرد و عدم مصرف داروی آسپرین در دو هفته‌ی قبل از شروع مطالعه توسط وی و شمارش نرمال پلاکت و فاکتورهای خونی بود. هرگونه مصرف دخانیات، الکل، بارداری بودن فرد و یا ابتلای به مشکل زمینه‌ای به عنوان معیار خروج در نظر گرفته شد. این مطالعه در زمستان ۱۳۹۹ و در مرکز ذخایر ژنتیکی ایران انجام گردید. به طور کلی در مطالعه، ۵ گروه اصلی

بوده، لخته‌ی A-PRF یا L-PRF در وسط قرار می‌گیرد و گلبول‌های قرمز در پایین لوله آزمایش. با بیرون ریختن لایه‌ی رویی و خارج کردن باقیمانده‌ی محصول از لوله‌ی سانتریفوژ و جدا کردن لایه‌ی ته‌نشین، لخته‌ی فیبرین باقی می‌ماند (۱۹). پس از جداسازی لایه A-PRF یا L-PRF تا زمان استفاده بر روی دستگاه هیتر قرار داده شده تا در دمای یکسان ۳۶ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شود.

جهت آماده‌سازی غشاء کلاژنی در گروه حاوی A-PRF، یک میلی‌لیتر از A-PRF آماده شده به غشاء اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد تحت انکوباسیون قرار گرفته و در نهایت با استفاده از ۱ میلی‌لیتر Phosphate Buffer Saline شستشو داده می‌شود. سپس به همی گروه‌ها تعداد ۱۰^۴ سلول فیبروبلاست اضافه گردیده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با شرایط مرطوب و در معرض ۵ درصد دی‌اکسید کربن قرار داده شد و شستشوی نهایی انجام گردید (۲۰).

جهت آماده‌سازی غشای کلاژنی در گروه حاوی L-PRF، L-PRF جدا شده و توسط قیچی به قطعات کوچکتر تقسیم شد و نهایتاً حجم مشابهی با A-PRF (که توسط ترازوی دیجیتال سنجیده شد) از ماده L-PRF به غشاء اضافه شده و به مدت ۴ ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد تحت انکوباسیون قرار گرفته و در نهایت با استفاده از ۱ میلی‌لیتر (Phosphate Buffered Saline) PBS شستشو داده می‌شود. سپس به همی گروه‌ها، تعداد ۱۰^۴ سلول فیبروبلاست اضافه گردیده و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با شرایط مرطوب و در معرض ۵ درصد دی‌اکسید کربن قرار داده شد و شستشوی نهایی انجام گردید (۱۹).

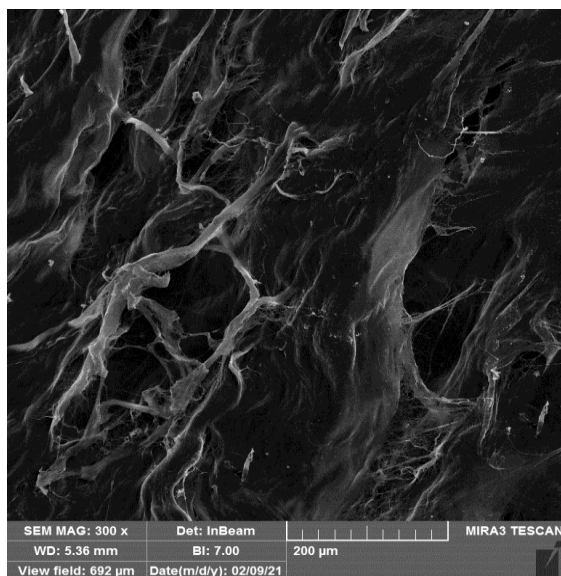
در گروه سوم یا گروه شاهد، ابتدا غشاء کلاژنی به مدت ۴ ساعت در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد تحت انکوباسیون قرار گرفته و سپس تعداد ۱۰^۴ سلول فیبروبلاست به غشای کلاژنی اضافه گردید، در نهایت با استفاده از ۱ میلی‌لیتر

PBS شستشو داده می‌شود.

بعد از گذشت ۲۴ ساعت، اتصال سلول‌های فیبروبلاست در هر پنج گروه با استفاده از میکروسکوپ نوری ارزیابی شد. سپس نمونه‌ها برای بررسی با میکروسکوپ الکترونی (Hittachi s4160, Stanford, CA, USA) آماده‌سازی شدند. ابتدا غشا به مدت ۲ ساعت درون محلول گلو تار آلدهید ۲/۵ درصد قرار گرفته و بعد از آن به مدت ۲۰ دقیقه ۵ بار با آب مقطر شسته شده و در مرحله بعدی به مدت ۲ ساعت درون محلول ۱ درصد اسمیموم تتراکساید رقیق شده در آب مقطر قرار داده شده و سپس برای ۲۰ دقیقه ۵ بار توسط آب مقطر شسته می‌شوند. در آخرین مرحله‌ی ثبوت، آگیری به ترتیب توسط الکل با غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۹۵ و ۱۰۰ درصد انجام شده و نمونه‌ها برای خشک شدن به مدت ۲۴ ساعت در هوای آزاد قرار می‌گیرند (۲۱).

غشاهای ثابت شده بر روی یک ورقه از جنس آلومینیوم درون دستگاه (Anatech USA, Sparks, NV, USA) Sputter coater به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد تا یک لایه‌ی نازک طلا به قطر ۱۵ نانومتر بر سطح غشاها قرار بگیرد. در مرحله‌ی بعد، غشاها توسط همان ورقه‌ی آلومینیومی به SEM انتقال داده می‌شوند.

در زیر میکروسکوپ الکترونی برای گروه آزمون که شامل ۴ زیرگروه می‌باشد، سطح هر غشا به شش قسمت فرضی تقسیم شد. در هر قسمت یک نقطه با بزرگ‌نمایی ۳۰۰ برابر توسط اپراتور میکروسکوپ الکترونی که اطلاعی از نحوه‌ی انجام مطالعه ندارد انتخاب شده و عکس‌برداری از آن صورت می‌گیرد (۲۲). به این ترتیب در کل، ۲۴ عکس از گروه آزمون موجود می‌باشد. ۱۲ عکس نمایانگر تعداد فیبروبلاست‌های چسبیده به غشای مذکور در حضور A-PRF بود و ۱۲ عکس دیگر سلول‌های چسبیده به سطح غشا را در حضور L-PRF نشان می‌دادند. در گروه شاهد نیز ۶ عکس تهیه شد که اتصال فیبروبلاست‌ها در گروه شاهد را جهت مقایسه نشان می‌دهد (اشکال ۱ تا ۳). شمارش تعداد سلول‌ها در هر عکس توسط دو نفر که از نحوه‌ی اجرای آزمایش اطلاع ندارند انجام گرفته و



شکل ۳: سلول‌های فیروبلاست چسبیده به غشای Collagen در گروه شاهد با بزرگنمایی ۳۰۰ برابر

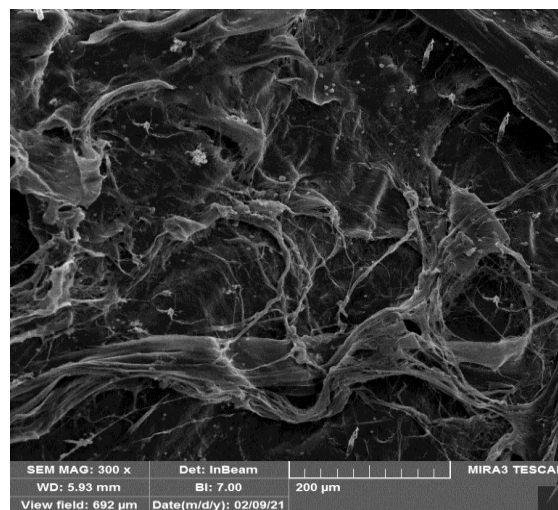
این پایان‌نامه با کد اخلاق ۱۳۹۹.۲۹۱ IR.IAU.KHUISF.REC در دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان) ثبت شد.

یافته‌ها

تعداد فیروبلاست‌های لتهای چسبیده به غشاء کلاژنی در حضور گروه‌های A-PRF در محدوده‌ی ۹ تا ۱۵ با میانگین ۱۲/۵۰ و انحراف معیار ۱/۷۸ بوده است. تعداد فیروبلاست‌های لتهای چسبیده به غشاء کلاژنی در حضور گروه‌های L-PRF در ۱۰ تا ۱۷ با میانگین ۱۳/۷۵ و انحراف معیار ۲/۱۸ بود. همچنین بدون حضور A-PRF و L-PRF (گروه شاهد)، تعداد فیروبلاست‌های لتهای چسبیده به غشاء کلاژنی در محدوده‌ی ۲ تا ۷ با میانگین ۴/۶۷ و انحراف معیار ۱/۷۵ بوده است (جدول ۱).

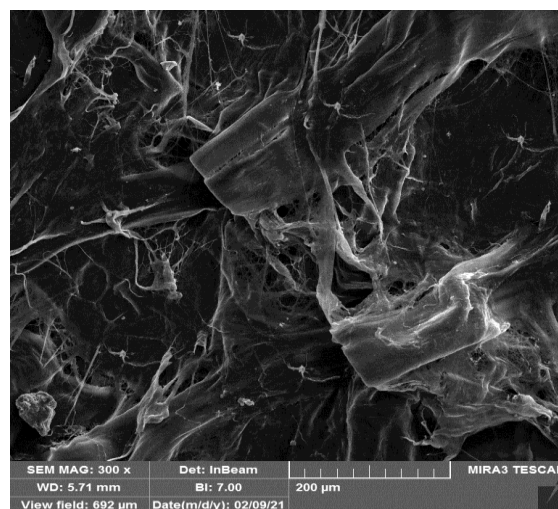
بر اساس نتایج آزمون آماری ANOVA و همانطور که در جدول ۱ قابل مشاهده است، اختلاف معنی‌داری بین میانگین تعداد فیروبلاست‌های لتهای چسبیده به غشاء کلاژنی در حضور A-PRF، L-PRF و بدون حضور این دو نشان داد ($p \text{ value} < 0/001$).

در صورت عدم توافق دو مشاهده‌گر، عدد کمتر در جداول خالی ثبت گردیده تا از زیاد برآورد کردن تعداد سلول‌ها جلوگیری شود.



شکل ۱: سلول‌های فیروبلاست چسبیده به غشای Collagen در یکی از گروه‌های A-PRF با بزرگنمایی ۳۰۰ برابر

در این مطالعه از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ (version 24, IBM Corporation, Armonk, NY) و آزمون‌های آماری Analysis of variant (ANOVA) به همراه Scheffe با سطح معنی‌داری ($p \text{ value} < 0/001$) استفاده گردید.



شکل ۲: سلول‌های فیروبلاست چسبیده به غشای Collagen در یکی از گروه‌های L-PRF با بزرگنمایی ۳۰۰ برابر

جدول ۱: نتایج آنالیز ANOVA در مقایسه‌ی میانگین تعداد فیبروبلاست‌های لته‌ای چسبیده به غشاء کلاژنی در حضور A-PRF و L-PRF و بدون حضور آن‌ها

گروه	تعداد	میانگین $\pm$ انحراف معیار	آماره	P
A-PRF	۱۲	$12/50 \pm 1/78$	۴۶/۴۲۶	۰/۰۰۱
L-PRF	۱۲	$13/75 \pm 2/18$		
شاهد	۶	$4/67 \pm 1/75$		

بر اساس نتایج آزمون Scheffe که داده‌های آن در جدول ۲ آمده است، میانگین تعداد فیبروبلاست‌های لته‌ای چسبیده به غشاء کلاژنی در حضور A-PRF و حضور L-PRF اختلاف معنی‌داری نداشت ($p \text{ value} = 0/307$). میانگین فیبروبلاست‌های لته‌ای چسبیده به غشاء کلاژنی در حضور A-PRF، L-PRF بطور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد (عدم حضور PRF یا L-PRF) مشاهده شد ($p \text{ value} < 0/001$).

همچنین در مقایسه‌ی دو به دو میان گروه‌ها و بر اساس نتایج آزمون Scheffe، میانگین تعداد فیبروبلاست‌های لته‌ای چسبیده به غشاء کلاژنی در گروه شاهد، بطور معنی‌داری کمتر از گروه‌های A-PRF1، A-PRF2، L-PRF1 و L-PRF2 بود ($p \text{ value} < 0/001$) (جدول ۲).

بحث

برخلاف فرضیه‌ی صفر پژوهش، پلاسمای غنی از فیبرین

پیشرفته و پلاسمای غنی از فیبرین حاوی لکوسیت بر میزان چسبندگی سلول‌های فیبروبلاست روی غشای کلاژنی مؤثر بود.

غشایی که برای انجام درمان‌های رژنراسیون مورد استفاده قرار می‌گیرد باید دارای یک سری خصوصیات ویژه باشد. یک خصوصیت مهم غشاء، توانایی آن در بهبود چسبندگی سلولی، پرولیفراسیون و تمایز سلولی می‌باشد. غشاهای مختلفی طراحی شده‌اند تا خصوصیات مذکور را تأمین کنند (۲۳).

استفاده از مولکول‌های چسبندگی سلولی ویژه بر روی غشاهای مختلف می‌تواند باعث بروز پاسخ‌های بافتی خاص در هنگام رژنراسیون شود. انتظار می‌رود استفاده از ترکیبی از مولکول‌های فانکشنال بر روی غشاها باعث بهبود نتایج به دست آمده از درمان‌های رژنراسیون شود (۲۴).

جدول ۲: نتایج آزمون تعقیبی Scheffe در مقایسه‌ی میانگین تعداد فیبروبلاست‌های لته‌ای چسبیده به غشاء کلاژنی دو به دو میان گروه‌ها

گروه (۱)	گروه (۲)	اختلاف میانگین	خطای معیار	P
A-PRF1	APRF2	$-0/33$	۱/۰۷	۰/۹۹۹
	LPRF1	$-1/50$	۱/۳۷	۰/۷۹۸
	LPRF2	$-1/33$	۱/۳۰	۰/۸۵۸
	شاهد	$7/67$	۱/۱۹	$< 0/001$
APRF2	LPRF1	$-1/17$	۱/۱۰	۰/۹۰۷
	LPRF2	$-1/00$	۱/۰۱	۰/۹۴۵
	شاهد	$8/00$	۰/۸۷	$< 0/001$
LPRF1	LPRF2	$0/17$	۱/۳۲	۱/۰۰
	شاهد	$9/17$	۱/۲۱	$< 0/001$
LPRF2	شاهد	$9/00$	۱/۱۴	$< 0/001$

چسبندگی سلول به سوبسترای سطحی شامل یک توالی چهار مرحله‌ای است که به ترتیب شامل جذب گلیکوپروتئین‌ها به سطح سوبسترا، تماس سلولی، چسبندگی و پخش شدن بر روی سطح می‌باشند (۲۵).

به طور کلی مهاجرت و پرولیفراسیون سلولی پس از این چهار مرحله رخ می‌دهند. از آنجا که چسبندگی سلولی در سطح غشای مورد آزمایش اتفاق افتاده بود و از آنجایی که چسبندگی، مهم‌ترین و اولین مرحله برای انجام این توالی می‌باشد پس می‌توان نتیجه گرفت، مهاجرت و پرولیفراسیون سلولی نیز در سطح غشاء رخ خواهد داد.

نتایج حاصل از بررسی هر گروه در این مطالعه مشخص کرد که چسبندگی سلول‌های فیبروبلاست به غشای کلاژنی هنگامی که A-PRF یا L-PRF حضور ندارد کمتر است و این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار می‌باشد. این نتیجه همسو با مطالعه‌ی Vahabi و همکاران بود که در آن اتصال سلول‌های فیبروبلاست و استئوبلاست روی سه غشای غیرقابل جذب، کلاژن انسانی و کلاژن حیوانی مورد ارزیابی قرار گرفت که به دو گروه فعال شده با PRP و (۵٪ FBS (Fetal bovine bone تقسیم شدند. در نهایت مشخص شد که اتصال هر دو نوع سلول در گروه فعال شده با PRP بیشتر از ۵ درصد FBS بود (۲۶).

در این مطالعه نشان داده شد که چسبندگی سلول‌های فیبروبلاست به غشای کلاژنی هنگامی که L-PRF حضور دارد نسبت به زمانی که A-PRF حضور دارد بیشتر بود، هرچند این اختلاف از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد. علت برتری نسبی L-PRF را می‌توان به حضور بیشتر لکوسیت‌ها درون ماتریکس آن مرتبط دانست که این مولکول‌ها خاصیت آنتی‌میکروبیال داشته و می‌تواند پرولیفراسیون سلولی و تمایز آن‌ها را نیز تنظیم کند. همچنین آن‌ها سلول‌های پایه‌ی مسؤول برای پروسه‌ی ترمیم زخم بوده و اولین سلول‌هایی هستند که نوآئوپوزن را شروع می‌کنند.

اما نتایج مطالعه‌ی Döri و همکاران نشان دادند که پارامترهای کلینیکی در درمان هدایت شده‌ی بافتی نقایص

داخل استخوانی با PRP، غشاء کلاژنی و استخوان مینرالیزه اتوژن تفاوتی با گروهی که از همین متریال‌ها ولی بدون استفاده از PRP درمان شده بودند نداشت (۲۷)، که شاید دلیل این مغایرت با نتایج مطالعه‌ی حاضر استفاده از PRP به جای PRF باشد که فاکتورهای رشدی را برای مدت زمان کوتاهی آزاد می‌کند و خصوصیات مکانیکی ضعیفی دارد. همچنین مطالعه‌ی انجام شده از نوع *in vivo* بود نه *in vitro*.

از مجموع مطالعاتی که از غشاء قابل جذب و غیرقابل جذب استفاده کرده‌اند می‌توان اینطور برداشت کرد که چسبندگی به غشاء قابل جذب بهتر از غشاء غیرقابل جذب است. در تأیید این موضوع به مطالعه‌ی Kasaj و همکاران اشاره می‌شود که در آن از انواع غشاهای کلاژنی قابل جذب و غشاهای غیرقابل جذب پلی‌تترافلوئورواتیلن را در برابر سلول‌های فیبروبلاست لته‌ای اولیه انسان، فیبروبلاست‌های لیگامان پریدنتال و سلول‌های شبه استئوبلاستی قرار دادند (۲۸). نتایج نشان دادند که مواد موجود در غشاهای مورد استفاده می‌توانند جذب و تکثیر سلولی را در فرایند رژنراسیون بافت پریدنتال یا استخوانی بهبود ببخشند و در بین غشاهای مورد استفاده در این مطالعه دیده شد که غشاهای قابل جذب در مقایسه با غشاهای غیرقابل جذب بهتر می‌توانند پرولیفراسیون سلولی را تحریک نمایند.

در کل به نظر می‌رسد که بستر گیرنده‌ی کلاژنی باعث رشد و تمایز بسیاری از سلول‌ها در محیط کشت به میزان بیشتری نسبت به محیط‌های با بستر پلاستیکی و شیشه‌ای دارد (۲۹، ۳۰). گزارش شده که بسیاری از سلول‌ها از جمله فیبروبلاست‌ها نمی‌توانند مستقیم به بستر کلاژنی یا سطح پلاستیکی پلیت‌ها متصل شوند. در عوض گلیکوپروتئین‌های خارج سلولی منجر به اتصال سلول‌ها به بستر گیرنده می‌شوند. یکی از این پروتئین‌های چسبندگی فیرونکتین می‌باشد که به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است (۳۱، ۳۲).

برخلاف نتایج مطالعه‌ی Pitzurra و همکاران که به بررسی تأثیر Lprf و Aprf بر روی فیبروبلاست‌های

پریودنتال و ترمیم زخم تجربی پرداختند، مشاهده کردند که هر دو منجر به افزایش مهاجرت سلولی نسبت به FGF در فاز ابتدایی می شود اما در فاز توقف میزان مهاجرت القا شده توسط Aprf بالاتر بود و همچنین بسته شدن زخم تجربی توسط Aprf تسریع شد که می تواند به علت بالاتر بودن میزان فاکتورهای رشدی و کموکاین های آن باشد (۳۳).

Abbas و همکاران در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۹ جهت بررسی تأثیر استفاده از انواع مختلف PRF به عنوان غشا و ماده گرفت به تنهایی در آگمنتاسیون ضایعات فنستریشن و دهی سنس اطراف ایمپلنت ها حین پروسه جراحی پرداختند به این نتیجه رسیدند که بطور کلی استفاده از PRF در ضایعات کوچک و متوسط منجر به برطرف شدن کامل ضایعه می گردد اما در ضایعات بزرگ ممکن است نیاز به استفاده از پودر استخوان جهت برطرف شدن کامل ضایعه باشد (۳۴). همسو با مطالعه ای ما، پژوهشگران در این مطالعه مشاهده کردند تفاوت آماری معنی داری بین استفاده از APRF و LPRF در درمان ضایعات وجود ندارد. همچنین نتیجه ی مطالعه ی Esfahrood و همکاران همسو با مطالعه ی ما بود. در این مطالعه به مقایسه ی اثر Lprf و Aprf بر روی مهاجرت و زیست پذیری سلول های فیبروبلاست لتهای پرداختند و مشاهده کردند در طی ۲۴ ساعت اول Lprf منجر به افزایش مهاجرت و همچنین افزایش viability سلول های فیبروبلاست در مقایسه با Aprf شد. اما با گذشت ۴۸ ساعت، تفاوتی بین این دو گروه قابل مشاهده نبود (۱۹).

استفاده از یک نوع سلول و یک بازه ی زمانی خاص

برای بررسی چسبندگی، جزء محدودیت های این مطالعه به حساب می آید. پیشنهاد می شود مطالعات دیگری با همین طراحی در بازه ی زمانی دیگری و با استفاده از سلول های دیگر (به طور مثال سلول های اپی تلیالی، سلول های استئوبلاست، سلول های بافت همبند، سلول های فیبروبلاست لیگامان پریودنتال، سمئتوبلاست ها و سایر سلول های موجود در بافت) که در پدیده ی رژنراسیون دخیل هستند، انجام گیرد.

نتیجه گیری

بر اساس مطالعه ی انجام گرفته می توان نتیجه گرفت که حضور A-PRF و یا L-PRF منجر به افزایش چسبندگی سلول های فیبروبلاست بر روی غشای کلاژنی می شود. همچنین در این مطالعه مشاهده شد که چسبندگی سلول های فیبروبلاست بر روی غشای کلاژنی در حضور L-PRF بیشتر از A-PRF بوده اما این اختلاف از نظر آماری معنی دار نمی باشد.

سپاسگزار

از اساتید گرانقدرم، جناب آقایان دکتر محمد کتابی و دکتر احسان رفیعی که در تمامی مراحل انجام این تحقیق، با نظرات گرانبهای شان، مرا یاری رساندند کمال تشکر را دارم و با سپاس از لطف و محبت بی کران تمامی اساتید بخش پریودانتیکس دانشکده ی دندان پزشکی آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان).

این پایان نامه با کد ۱۶۲۳۶۹۱۶۲ در دانشکده ی دندان پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان) ثبت گردید.

References

1. Wang HL, Miyauchi M, Takata T. Initial attachment of osteoblasts to various guided bone regeneration membranes: an in vitro study. J Periodontal Res 2002; 37(5): 340-4.
2. Hammerle CHF. Membranes and bone substitutes in guided bone regeneration. In: Lang NP, Karring T, Lindhe J, editor. Proceedings of the 3rd European Workshop on Periodontology. 1st ed. Berlin, Germany: Quintessenz Verlags-GmbH; 1999. p. 468-99.
3. Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. J Periodontol 1976; 47(5): 256-60.
4. Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. J Clin Periodontol 1982; 9(3): 257-65.

5. Rodrigues AZ, Oliveira PT, Novaes Jr AB, Maia LP, Souza SL, Palioto DB. Evaluation of in vitro human gingival fibroblast seeding on Acellular Dermal Matrix. *Braz Dent J* 2010; 21(3): 179-89.
6. Erdag G, Sheridan RL. Fibroblasts improve performance of cultured composite skin substitutes on athymic mice. *Burns* 2004; 30(4): 322-8.
7. Lindhe J, Westfelt E, Nyman S, Socransky SS, Haffajee AD. Long-term effect of surgical/non-surgical treatment of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1984; 11(7): 448-58.
8. Christan C, Dietrich T, Hägewald S, Kage A, Bernimoulin JP. White blood cell in generalized aggressive periodontitis after non-surgical therapy. *J Clin Periodontol* 2002; 29(3): 201-6.
9. Purucker P, Mertes H, Goodson JM, Bernimoulin JP. Local versus systemic adjunctive antibiotic therapy in 28 oatients with generalized aggressive periodontitis. *J Periodontol* 2001; 72(9): 1241-5.
10. Masuki H, Okudera T, Watanebe T, Suzuki M, Nishiyama K, Okudera H. Growth factor and pro-inflammatory cytokine contents in platelet-rich plasma (PRP), plasma rich in growth factors (PRGF), advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), and concentrated growth factors (CGF). *Int J Implant Dent* 2016; 2(1): 19.
11. Panda S, Sankari M, Satpathy A, Jayakumar D, Mozzati M, Mortellaro C, et al. Adjunctive Effect of Autologus Platelet-Rich Fibrin to Barrier Membrane in the Treatment of Periodontal Intrabony Defects. *J Craniofac Surg* 2016; 27(3): 691-6.
12. Caton JG, DeFuria EL, Polson AM, Nyman S. Periodontal regeneration via selective cell repopulation. *J Periodontol* 1987; 58(8): 546-52.
13. Gentile P, Chiono V, Tonda-Turo C, Ferreira AM, Ciardelli G. Polymeric membranes for guided bone regeneration. *Biotechnol J* 2011; 6(10): 1187-97.
14. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55(11): 1294-9.
15. Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A. Une opportunité en paro-implantologie: le PRF. *Implantodontie* 2001; 42: 55-62.
16. Lindhe J, Karring T, Araújo M. Anatomy. In: Lang NP, Lindhe J, editors. *Clinical periodontology and implant dentistry*. 6th ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2015. p. 19.
17. Rios HF, Bashutski JD, Giannobile WV. Bone as a living organ. In: Lang NP, Lindhe J, editors. *Clinical periodontology and implant dentistry*. 6th ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2015.
18. Ghanaati S, Booms P, Orlowska A, Kubesch A, Lorenz J, Rutkowski J, et al. Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *J Oral Implantol* 2014; 40(6): 679-89.
19. Esfahrood ZR, Talebi Ardakani M, Shokri M, Shokri M. Effects of leukocyte–platelet-rich fibrin and advanced platelet-rich fibrin on the viability and migration of human gingival fibroblasts. *J Indian Soc Periodontol* 2020; 24(1): 15-9.
20. Schär MO, Diaz-Romero J, Kohl S, Zumstein MA, Nesic D. Platelet-rich concentrates differentially release growth factors and induce cell migration in vitro. *Clin Orthop Relat Res* 2015; 473(5): 1635-43.
21. Amid R et al. Assessment of gingival fibroblast attachment to root surfaces restored with three different dental materials: An in vitro study. *J Periodontal Implant Dent* 2016; 8(1): 24-32.
22. Babay N. Attachment of human gingival fibroblasts to periodontally involved root surface following scaling and or etching procedures: A scanning electron microscopy study. *Braz Dent J* 2001; 12(1): 17-21.
23. Takata T, Wang HL, Miyauchi M. Attachment, proliferation and differentiation of periodontal ligament cells on various guided tissue regeneration membranes. *J Periodontol Res* 2001; 36(5): 322-7.
24. Hurley LA, Stinchfield FE, Bassett AL, Lyon WH. The role of soft tissues in osteogenesis. An experimental study of canine spine fusions. *J Bone Joint Surg Am* 1959; 41(7): 1243-54.
25. Burridge K, Molony L, Kelly T. Adhesion plaques: sites of transmembrane interaction between the extracellular matrix and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci Suppl* 1987; 8: 211-29.
26. Vahabi S, Yadegary Z, Karamshahi M. Evaluating the adhesion of human gingival fibroblasts and MG-63 osteoblast-like cells to activated PRP-coated membranes. *Cell Tissue Bank* 2019; 20(3): 339-49.
27. Döri F, Huszár T, Nikolidakis D, Arweiler NB, Gera I, Sculean A. Effect of platelet-rich plasma on the healing of intra-bony defects treated with a natural bone mineral and a collagen membrane. *J Clin Periodontol* 2007; 34(3): 254-61.
28. Kasaj A, Reichert C, Götz H, Röhrig B, Smeets R, Willershausen B. In vitro evaluation of various

- bioabsorbable and nonresorbable barrier membranes for guided tissue regeneration. *Head Face Med* 2008; 4: 22.
29. Newsome DA. In vitro stimulation of cartilage in embryonic chick neural crest cells by products of retinal pigmented epithelium. *Dev Biol* 1976; 49(2): 496-507.
30. Gospodarowicz D, Greenburg G, Birdwell CR. Determination of cellular shape by the extracellular matrix and its correlation with the control of cellular growth. *Cancer Res* 1978; 38(11 Pt 2): 4155-4171.
31. Vaheri A, Mosher DF. High molecular weight, cell surface-associated glycoprotein (fibronectin) lost in malignant transformation. *Biochim Biophys Acta* 1978; 516(1): 1-25.
32. Vaheri A, Ruoslahti B, Mosher DF. Fibroblast surface protein. New York, NY: New York Academy of Sciences; 1978.
33. Pitzurra L, Jansen IDC, de Vries TJ, Hoogenkamp MA, Loos BG. Effects of L-PRF and A-PRF+ on periodontal fibroblasts in in vitro wound healing experiments. *J Periodontal Res* 2020; 55(2): 287-95.
34. Abbas AM, Alnumay SH, Bede SY. Evaluation of the effectiveness of using platelet rich fibrin (PRF) as a sole grafting material and membrane in augmentation of dehiscence and fenestration defects encountered during dental implant surgery. *J Baghdad Coll Dent* 2019; 31(2): 44-51.