

اتصال و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست و کراتینوسیت اسب درون چسب فیبرین

محمدرضا آقچه‌لو^۱ سیدمهدی قمصری^{۲*} محمد مهدی دهقان^۲ سعید انصاری مجد^۳ محمد طاهری^۴

(۱) آموزشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل، زابل - ایران.
(۲) گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
(۳) مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی، تهران - ایران.
(۴) آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.
(دریافت مقاله: ۶ آبان ماه ۱۳۸۴، پذیرش نهایی: ۲۷ اسفند ماه ۱۳۸۵)

چکیده

بررسی امکان استفاده از فیبرینوژن استخراج شده از خون اسب در تهیه چسب فیبرین و اثرات آن بر روی سلول‌های فیبروبلاست و کراتینوسیت اسب مورد مطالعه قرار گرفته است. فیبرینوژن توسط روش رسوب گلیسین (Glycine precipitation technique) از پلاسمای اسب‌ها جدا گردید. سلول‌های فیبروبلاست توسط روش کشت قطعات بافتی (Explant culture) از پوست ناحیه گردن و سلول‌های کراتینوسیت توسط روش‌های هضم آنزیمی (enzyme digestion) از پوست ناحیه لب در هر یک از اسب‌ها جدا شدند. سپس مجموعه فیبرینوژن و سلول‌های فیبروبلاست و کراتینوسیت خودی اسب جداگانه توسط ترومبین گاوی و گلوکونات کلسیم و اسید ترانگزامیک در یک پلیت کشت سلولی ریخته شده و به صورت همگن منعقد شده و سلول‌ها به مدت شش روز مورد بررسی قرار گرفتند. سلول‌های فیبروبلاست در روز دوم از حالت مدور درآمده و کاملاً دوکی و کشیده شده بودند، این موضوع در تمام ضخامت چسب فیبرین قابل مشاهده بود. در این زمان سلول‌های کراتینوسیت به صورت مسطح شده در محل اتصال چسب فیبرین به کف پلیت مشاهده شدند. هر دو نوع سلول بعد از سه روز تکثیر یافته بودند. فیبرینوژن استحصال شده از خون اسب توسط روش رسوب گلیسین به عنوان یک داربست قادر به حمایت از رشد و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست اسب در تمام ضخامت آن بود. رشد و تکثیر سلول‌های کراتینوسیت اسب در سطح بین پلیت کشت سلولی و چسب فیبرین مشاهده می‌شود که نشان دهنده اثر مثبت فیبرین در رشد و تکثیر سلول‌های کراتینوسیت و یا دستکم عدم اثر منفی و تداخل در رشد و تکثیر می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: چسب فیبرین، کراتینوسیت، فیبروبلاست، اسب.

استفاده می‌شود. خصوصیات مثبت فیبرین عملکرد پوششی (function Sealant)، اثر خون‌بندی (Hemostasis effect) و افزایش التیام زخم است (۳).

چسب فیبرین ممکن است وقتی که در زخم‌های سوختگی مورد استفاده قرار می‌گیرد مزایای دیگری از جمله اثرات هموستاتیک و خواص ضد میکروبی داشته باشد و مشاهده شده است که میزان گرفتن پیوندهای نیمه ضخامت پوست خودی (Autologous split skin grafts) را افزایش می‌دهد. چسب فیبرین یک نمونه عالی برای مهاجرت سلولی است که می‌توان برای تکثیر سلول‌های کراتینوسیت، آندوتلیال و فیبروبلاست با ایجاد اندازه سوراخ‌های متفاوت آن را تغییر داد. همچنین چسب فیبرین نشان داده شده که یک سیستم توزیعی برای فاکتورهای رشد و سلول‌هایی که از نظر ژنتیکی اصلاح و برای افزایش بیان فاکتورهای رشد مهندسی شده‌اند، استفاده نمود (۱۰).

قیمت بالای چسب فیبرین انسانی که حدود ۳۰۰ پوند برای هر ۵ میلی لیتر است (۱۰)، استفاده از چسب فیبرین خودی را در اسب توجیه می‌کند.

بیش از دودهمه است که سلول‌های کراتینوسیت و فیبروبلاست انسانی را در محیط آزمایشگاه کشت داده و این سلول‌ها را به صورت خودی و غیر خودی بر روی سوختگی‌های وسیع و زخم‌های مزمن جهت تسریع التیام انتقال می‌دهند (۷، ۱۵، ۲۳، ۲۵).

مقدمه

زخم‌های باز در قسمت پایینی اندام حرکتی اسب غالباً توسط روش ثانویه درمان می‌شوند. علت این امر کشش زیاد پوست، آلودگی زخم و از دست رفتن بافت می‌باشد که استفاده از بخیه را برای بستن زخم‌ها غیر ممکن می‌سازد. در این نوع زخم‌ها روند التیام طولانی، کندی پدیده جمع شدگی و توقف روند آن و تشکیل کمتر بافت پوششی در مقایسه با زخم‌های سایر نقاط بدن و نهایتاً استعداد بیشتر تشکیل بافت گرانوله اضافی می‌باشد. اگرچه درمان‌های زیادی برای کمتر شدن مسائل این دسته از زخم‌ها و تسریع التیام ارائه شده ولی اثرات اثبات شده زیادی بر روی التیام زخم در اندام حرکتی اسب نداشته‌اند (۱، ۲، ۱۲، ۱۹، ۳۱).

زخم‌های نواحی پایینی اندام حرکتی در اسب نه تنها یک مدل ایده‌آل برای بررسی التیام مشکل در میان زخم‌های اسب بلکه نماینده زخم‌های مزمن بدون درمان در پستانداران نیز می‌باشد (۶). همچنین زخم‌های پایینی ناحیه اندام حرکتی اسب شبیه زخم‌های مزمن در پای انسان است (۸).

استفاده از چسب فیبرین برای افزایش التیام زخم اولین بار در سال ۱۹۱۰ با تحقیقات Bergel و همکاران به مراکز بالینی راه یافت، و آنها نشان دادند که چسب فیبرین التیام زخم را تسریع می‌کند (۳). اکنون چسب فیبرین به طور عمده برای اتصال و التیام بافت‌های آسیب دیده در طی جراحی یا بعد از تروما



استفاده از سلول جهت التیام زخم در دامپزشکی اولین بار در سگ می باشد که از روش CEA (Cultured Epidermal Autograft) در درمان سوختگی استفاده شد که نتایج رضایت بخشی نیز داشته است (۴).

کشت سلول های کراتینوسیت سم اسب اولین بار توسط Ekfalck و همکاران در سال ۱۹۹۰ انجام شد. این کار به علت مطالعه روند پاتوفیزیولوژی لنگش (Laminitis) صورت پذیرفت. در ادامه Wunn و همکاران در سال ۱۹۹۹ نشان دادند که بیان پروتئین های کراتین و ویمنتین (Keratin proteins and vimentin) در سلول های کراتینوسیت سم اسب صورت می پذیرد. در هر دو مطالعه بالا پاساژ سلول ها و کشت طولانی مدت آنها صورت نپذیرفت. بعد از آن محققین موفق به کشت سلول های کراتینوسیت لب اسب با نگهداشتن حد بالایی از تکثیر در پاساژ دوم شدند (۱۱). پاساژ دوم این سلول ها جهت انتقال به چسب فیبرین در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. جداسازی سلول های فیبروبلاست از پوست اسب انجام شده و ذکر شده است که سلول های فیبروبلاست جدا شده از پوست نواحی بالایی بدن توانایی تکثیر زیادتری نسبت به سلول های فیبروبلاست جدا شده از پوست اندام حرکتی را دارند (۵).

این مطالعه به عنوان پیش زمینه ای برای انتقال سلول ها با کمک چسب فیبرین خودی برای مصارف بالینی و حصول اطمینان از نه تنها بی ضرر بودن بلکه مفید بودن این چسب برای سلول های کشت داده شده می باشد.

مواد و روش کار

در این مطالعه از تعداد ۴ راس مادیان دوخون سالم و بالغ با وزن متوسط 325 ± 119 کیلوگرم استفاده شد. برای کشت سلول های فیبروبلاست نمونه پوستی با مساحت تقریبی یک سانتیمتر مربع به صورت تمام ضخامت توسط بی حسی موضعی لیدوکائین هیدروکلراید ۲ درصد و به صورت کاملاً استریل از پوست ناحیه گردن اسب ها گرفته شد. سپس نمونه بافتی به داخل ۱۰ سی سی محیط کشت سلولی RPMI-1640 (RPMI-1640, Germany) R-8005-10L همراه پنی سیلین (۱۰۰ IU/ml) و استرپتومایسین (۱۰۰ µg/ml) و بی کرینات سدیم (۲ gm/lit) و در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه ها پس از شستشوی با PBS (Phosphate-buffered Saline)، با قیچی به قطعات بسیار ریز تقسیم شده و با روش کشت قطعات بافت (Explant culture) جهت جداسازی سلول های فیبروبلاست به فلاسک کشت سلولی ۲۵ سانتیمتر مربع (Nunc, 163371, Denmark) انتقال داده شدند و ۳ سی سی محیط کشت ذکر شده همراه ۱۰ درصد FBS (Fetal Bovine Serum) (جهاد دانشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران) به آنها اضافه شد و یک روز در میان محیط کشت تعویض شده و زمانی که سلول های فیبروبلاست به اندازه کافی از بافت ها خارج شدند قطعات بافتی از فلاسک خارج شده و بعد از حدود دو هفته ۷۰ درصد متراکم شدند و سلول ها توسط تریپسین (4799, Germany) (Trypsin 1:250, Sigma, T) ۰/۲۵ درصد و EDTA (Tetraacetic Acid)

از هر مادیان ۲۰۰ سی سی خون محیطی به صورت کاملاً استریل از ورید وداج همراه با ماده ضد انعقاد سیترات سدیم ۳/۸ درصد و با نسبت ۹:۱ اخذ شد. در آزمایشگاه، خون اخذ شده ۱۰ دقیقه با ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و حدود ۱۲۰ سی سی پلاسما آن جدا شد. از پلاسما با روش رسوب گلیسین (Glycine precipitation technique) فیبرینوژن استخراج گردید.

سولفات منیزیم و باریم بدون آب در غلظت ۲۰ میلی مولار در لیتر و ۹۰ گرم در لیتر به پلاسما جدا شده اضافه شد، بعد از به هم زدن محلول برای یک ساعت، مایع رویی ۱۰ دقیقه با ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و جدا شد. این روند یک بار دیگر تکرار شد. بعد از اندازه گیری مایع جدا شده حاصل از سانتریفوژ، گلیسین به آرامی اضافه شده تا به غلظت نهایی ۲/۲ مولار برسد. مجدداً این محلول برای ۳۰ دقیقه به هم زده شده و سپس برای ۲۰ دقیقه با ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. این بار مایع رویی دور ریخته شده و رسوب بدست آمده در ۱۲۰ سی سی سیترات سدیم ۰/۰۵۵ مولار در pH ۷/۴ محلول شد و رسوب دادن توسط گلیسین مجدداً تکرار گردید. نهایتاً رسوب در PBS محلول شد (۱۴). سنجش پروتئین (فیبرینوژن) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Eppendorf Biophotometer, Germany) انجام شد، سپس فیبرینوژن اخذ شده توسط فیلتر ۰/۲ میکرون استریل گردید و در فریزر ۲۰- نگهداری شد. علاوه بر فیبرینوژن، ترومبین گاوی (Germany) (Thrombin, Sigma, T-4648) و گلوکونات کلسیم در سرم نمکی محلول شده، برای انعقاد فیبرینوژن مورد استفاده قرار گرفت. علاوه بر مواد بالا یک ماده ممانعت کننده از لیز شدن فیبرین (Fibrinolytic inhibitor) یعنی اسید ترانگزامیک (Tranexamic acid) به میزان ۰/۶ میلی گرم بر میلی لیتر به سرم نمکی اضافه گردید.

بعد از یک هفته از گرفتن نمونه پوست گردن، برای کشت سلول های کراتینوسیت نمونه ای با مساحت یک سانتیمتر مربع از پوست ناحیه لب پایینی توسط بی حسی موضعی بالیدوکائین هیدروکلراید ۲ درصد و به صورت کاملاً استریل از ناحیه لب مادیان ها اخذ شده و به درون ۱۰ سی سی محیط کشت ویلیامز E (Mediame E+Glutamax I, Gibco, 32551-020, USA) (Williams) برده شده و در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از شستشوی نمونه با PBS، اپیدرم پوست با استفاده از آنزیم دیسپاز (Dispase, Gibco, 17105-041, Germany) به میزان ۱۰ میلی گرم در هر میلی لیتر و برای ۲۴ ساعت در ۴ درجه سانتیگراد جدا گردید. بعد از عمل تریپسینه کردن (Tripsinisation) سلول های لایه بازال از هم جدا شده در یک فلاسک حاوی محیط کشت ویلیامز E کشت داده شدند (۱۱). پس از رشد سلول های کراتینوسیت و پر کردن حدود ۸۰-۷۰ درصد فلاسک (Confluent)



فیرو بلاست هر اسب، ۵/۰ سی سی سوسپانسیون سلول های کراتینوسیت به تعداد ۲۵۰ هزار سلول در محیط ویلیامز E و ۵/۰ سی سی سوسپانسیون سلول های فیرو بلاست به تعداد ۲۵۰ هزار سلول در محیط RPMI-1640 را با نیم سی سی فیبرینوزن (۲۰ میلی گرم در میلی لیتر) درد و پلیت کشت سلولی با قطر ۳۰ میلی متر (Nunc, 240045, Denmark) به طور جداگانه مخلوط نموده سپس نیم سی سی سرم نمکی حاوی ترومبین، گلوکونات کلسیم و اسید ترانگزامیک را به طور جداگانه به هر یک از سوسپانسیون ها اضافه شد. این مجموعه ها در کمتر از ۱۰ ثانیه منعقد شدند (تصویر ۱). سپس به پلیت حاوی سلول های کراتینوسیت یک سی سی محیط کشت ویلیامز E حاوی ۱۰ درصد FBS و به پلیت حاوی سلول های فیرو بلاست یک سی سی محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد FBS اضافه گردید و پلیت ها در انکوباتور (Sanyo electronic, Mco-17AL, Japan) ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵ درصد CO_2 قرار داده شدند و تا ۶ روز توسط میکروسکوپ معکوس از نظر مرفولوژی و تکثیر سلول ها و همچنین قوام چسب فیبرین مورد بررسی قرار گرفتند. برای هر اسب دو کنترل چسب فیبرین بدون سلول یکی حاوی محیط کشت ویلیامز E بدون سلول های کراتینوسیت و دیگری حاوی محیط کشت RPMI-1640 بدون سلول های فیرو بلاست تهیه گردید تا از نظر ماندگاری انعقاد چسب فیبرین مورد مطالعه قرار گیرند.

نتایج

از هر اسب با استفاده از روش رسوب گلابسین ۲۲ سی سی فیبرینوزن اخذ شد که میزان متوسط سنجش پروتئین (فیبرینوزن) $20 \pm 2/5$ میلی گرم در میلی لیتر بوده است.

با استفاده از میکروسکوپ معکوس روز اول بعد از کشت سلول های فیرو بلاست از حالت مدور که به علت ترپسینه شدن ایجاد شده بود، درآمده و کاملاً دوکی شکل و کشیده شدند، این موضوع در تمام ضخامت چسب فیبرین قابل مشاهده بود که البته به علت ماهیت این سلول ها در درون بافت ها است که به صورت سه بعدی رشد می کنند (تصویر ۲).

در روز دوم سلول های فیرو بلاست حالت کشیده تر پیدا کرده بودند و در روز سوم این سلول ها تکثیر یافته و چسب فیبرین را تا حد زیادی تجزیه نمودند و چسب فیبرین قوام خود را از دست داد که این موضوع منجر به جدا شدن سلول ها از داربست خود شده و سلول ها به صورت مدور درآمدند، به طوری که در روز ششم چسب فیبرین به صورت کامل تجزیه شده و تعداد کمی سلول فیرو بلاست به پلیت چسبیده بودند. چسب فیبرین بدون سلول (کنترل) حاوی محیط کشت RPMI-1640 تا شش روز قوام خود را حفظ نمود.

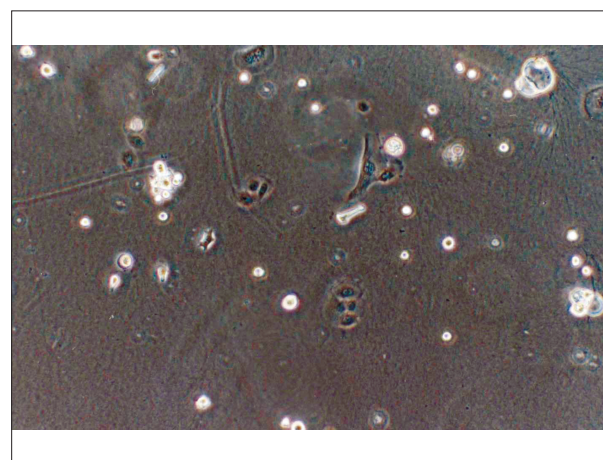
در پلیت های حاوی سلول های کراتینوسیت بعد از یک روز سلول های کراتینوسیت را به صورت مسطح شده در محل اتصال چسب فیبرین به کف پلیت مشاهده شدند این امر به این علت می باشد که سلول های کراتینوسیت بر روی سطوح رشد می کنند (تصویر ۳)، ولی سلول های کراتینوسیت که در



تصویر ۱- فیبرینوزن اسب حاوی سلول بعد از انعقاد توسط ترومبین گاوی.



تصویر ۲- سلول های فیرو بلاست گردن اسب روز اول بعد از کشت.



تصویر ۳- سلول های کراتینوسیت لب اسب روز اول بعد از کشت.

عمل ترپسینه کردن صورت پذیرفت و نهایتاً سلول ها در پاساژ دوم به درون چسب فیبرین منتقل شدند.

جهت انعقاد چسب فیبرین حاوی سلول های کراتینوسیت و



میان چسب فیبرین قرار داشتند به حالت مدور باقی ماندند.

سلول های کراتینوسیت که به پلیت چسبیده بودند در روز دوم تکثیر یافته و کلنی های آنها بزرگتر شده بود و در روز سوم این تزاید سلول ها محسوس تر شده و حتی کلنی های ده تایی از سلول های کراتینوسیت قابل مشاهده بود. در روز ششم سلول های کراتینوسیت به صورت کاملاً متراکم مشاهده شدند. قوام چسب فیبرین در این سلول ها نیز از روز چهارم به بعد کاهش محسوسی پیدا کرده بود ولی به علت اینکه تعداد سلول هایی که در ابتدا در تماس با پلیت بودند کم بود، چسب فیبرین تا روز ششم به صورت کامل تجزیه نشد. چسب فیبرین بدون سلول (کنترل) حاوی محیط کشت ویلیامز E تا شش روز قوام خود را حفظ نمود.

بحث

استفاده از صفحات سلول های اپیدرم کشت داده شده خودی CEA (Cultured epidermal cell autograft) یک روش شناخته شده برای پوشش زخم های وسیع در انسان است. در این روش سلول های کراتینوسیت خودی در محیط آزمایشگاه کشت داده شده و زمانی که سلول های کراتینوسیت در محیط آزمایشگاه مانند پوست چند لایه شدند توسط روش های آنزیمی جدا شده و بر روی زخم ها کاشته شوند. از معایب این روش فاصله زمانی زیاد برای آماده سازی سلول ها، شکنندگی و مشکل بودن جابجایی (Handling) پیوندها و میزان غیر قابل پیش بینی گرفتن پیوند و هزینه بالای آن می باشد (۲۲، ۲۰، ۷).

جهت حل مشکلات زیادی که در مورد صفحات CEA وجود دارد مسئله استفاده از سلول های کراتینوسیت که متراکم نشده اند (Preconfluent) مطرح شد یعنی انتقال سلول ها از محیط کشت به بستر زخم قبل از اینکه تشکیل صفحات را بدهند و به هم رسیدن سلول ها (Confluence) و تمایز آنها (Diffrentiation) آنها بر روی موجود زنده صورت پذیرد. مزایای اصلی این روش عبارتند از: ۱) سلول های کراتینوسیت را می توان در زمان کمتری یعنی حدود ۱۰ روز منتقل نمود. ۲) سلول ها مستقیماً روی یک سیستم انتقالی برده شوند که سپس مستقیماً به بیمار منتقل می شوند و از آسیب های بالقوه به دنبال جداسازی آنزیمی سلول ها جلوگیری می کند. دیسپاز آنزیمی است که برای آزاد سازی صفحات اپیدرم از محیط کشت استفاده می شود ممکن است پروتئین های سطحی را از سلول های کراتینوسیت برداشت کرده و باعث کاهش قدرت چسبندگی آنها شود، ۳) سلول ها در حالی که حالت تکثیری بیشتری دارند و میزان بیشتری اینتگرین (Integrin) را بیان می کنند، بنابراین چسبندگی آنها تسهیل می شود، ۴) سلول های کراتینوسیت که متراکم نشده اند در سوسپانسیون ممکن است تشکیل غشاء پایه ای که بیشتر پیوسته و گسترش یافته و محل اتصال درم و اپیدرم را همانگونه که در مدل زخم خوک نشان داده شده را محکم تر نماید (۲۰، ۷).

اولین بار Kaiser و همکاران در سال ۱۹۹۴ روش کاشت سلول های کراتینوسیت در ماتریکس فیبرینی (KFGS Fibrin Glue Suspension)

(Keratinocyte) را ارائه دادند. در این مطالعه سه بیمار با سوختگی های تمام یا قسمتی از پوست مورد درمان با روش KFGS قرار گرفتند که در دو بیمار بر روی KFGS پوست نیمه ضخامت جسد آلوژنیک که توسط گلیسرین تهیه شده بود (Glycerine-preserved Split Thickness Cadaver Skin), Allogeneic, پیوند داده شد. میزان گرفتن پیوند در دو بیمار که یکی از آنها پوست آلوژنیک دریافت نموده بودند ۹۰ تا ۱۰۰ درصد و در بیمار سوم ۳۰ تا ۷۰ درصد بود (۲۲)، در هیچ کدام از این مطالعات رشد و تکثیر سلول های کراتینوسیت و فیبروبلاست درون چسب فیبرین در محیط آزمایشگاه مورد مطالعه قرار نگرفته است و نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان می دهد در صورتی که از روش KFGS برای التیام زخم های باز استفاده می شود بایستی تعداد سلول های کراتینوسیت در هر میلی لیتر چسب فیبرین زیاد باشد تا تعداد سلول های کراتینوسیت که با بستر زخم در تماس قرار می گیرند افزایش یابد زیرا در میان چسب فیبرین سلول های کراتینوسیت از حالت مدور خارج نشده و چسبیدن و تکثیر در میان چسب فیبرین صورت نپذیرفته ولی در محل اتصال چسب فیبرین به پلیت چسبیدن و تکثیر صورت می پذیرد در حالی که سلول های فیبروبلاست قادر به چسبیدن و تکثیر در میان چسب فیبرین و به صورت سه بعدی هستند.

از چسب فیبرین در درمان زخم های مزمن با منشاء های مختلف نیز استفاده شده است. Horch و همکاران در سال ۲۰۰۱ در مطالعه ای در یازده بیمار با زخم های مزمن از روش KFGS استفاده نمودند و ذکر کردند که همه زخم هایی که تاریخچه ۴ ماهه تا ۱۴ ساله داشتند به طور کامل و یا نزدیک به کامل در طی دوره درمان مجدداً بافت پوششی (Reepithelialized) تشکیل شد. البته در برخی از زخم ها، درمان بیش از سه بار تکرار گردید (۲۱) و می توان با استفاده از روش KFGS جهت درمان زخم های مزمن، خصوصاً زخم های نواحی پایینی اندام حرکتی اسب با استفاده از چسب فیبرین خودی اقدام نمود.

تأکید شده است در صورتی که از روش KFGS استفاده می شود بایستی بستر زخم توسط روش هایی مانند کونو (Cuono technique) آماده شود تا میزان گرفتن پیوند زیاد شود (۳۳). در روش کونو ابتدا زخم توسط پوست آلوژنیک پوشیده می شود. بعد از سه تا چهار هفته اپیدرم آن تراشیده شد تا سطح سالم و پر عروق (Vascularized) مشاهده شود که سپس توسط CEA پوشانده می شود (۷، ۹).

فیبرین و پلاسمای غنی از پلاکت (Platelet rich plasma) میزان تشکیل مجدد بافت پوششی (Reepithelialization rate) را افزایش می دهند (۲۴). تأخیری در ذخیره پروتئین های محل اتصال درم و اپیدرم (Dermoeplidermal Junction, DEJ) وقتی که صفحات اپیدرم (sheets) (Epidermal) توسط چسب فیبرین بر روی موش های بدون تیموس (mice) (Athymic) برده شدند گزارش شده است. البته کیفیت گرفتن پیوند یا چسبندگی بهبود یافته بود (۳۶).

در آینده برای بهبود روش KEGS پیوند سوسپانسیون سلول های



استفاده می شود گزارش شده است که در انسان با افت فشار خون و تشکیل آنتی بادی های غیرطبیعی علیه فاکتور ۷ همراه بوده که ممکن است اختلال انعقادی ایجاد نماید. همچنین در صورتی که چسب فیبرین یا ترومبین به تنهایی اشتباهاً به داخل سیستم عروقی تزریق شود، باعث آمبولی های خطرناک یا انعقاد داخل رگی (Intravascular coagulation) می شود (۲۸).

تشکر و قدردانی

نویسندگان صمیمانه از حسن نیت اعضای محترم شورای پژوهشی و قطب علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران در راستای تصویب، تأیید و حمایت مالی این طرح تشکر می نمایند. همچنین از مدیریت و پرسنل محترم آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی و بخش جراحی بیمارستان دام های بزرگ دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تقدیر و تشکر می شود.

References

1. Altmppen, J., Hansen, E., Bonnlander, G.L., Horch, R.E. and Jeschke, M.G. (2004) Characteristics of an autologous thrombocyte gel. *J. Surg. Res.* 117:202-207.
2. Anderson, D.M., Stanley, M.A., White, R.A.S. (2003) Canine keratinocyte culture and use of a cultured epidermal autograft in a dog. *Vet. Comp. Orthop. Traumatol.* 16:255-9.
3. Bacon Miller, C., Wilson, D.A., keegan, K.G., Kreeger, J.M., Adelstein, E.H. and Ganjam, V.K. (2000) Growth Characteristics of fibroblasts isolated from the trunk and distal aspect of the limb of horses and ponies. *Vet. Surg.* 29:1-7.
4. Carter, C.A., Jolly, D.G., Worden S.R., C.E., Hendren, D.G. and Kane, Cynthia J.M. (2003) Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Exp. Mol. Pathol.* 74:244-255.
5. Chester, D.L., Balderson, D.S., Papini, R.P.G. (2004) A review of keratinocyte delivery to the wound bed. *J. Burn Care Rehabil.* 25:266-275.
6. Cochrane, C., Rippon, M.G., Rogers, A., Walmsley, R., Knottenbelt, D. and Bowler, P. (1999) Application of an in vitro model to evaluate bioadhesion of fibroblasts and epithelial cells to two different dressing. *Biomaterials* 20:1237-1244.

فیرو بلاست و کراتینوسیت در چسب فیبرین (FKFGS (Glue Suspension) همراه با پوست آلونیک برای پوشش سوختگی های درجه ۳ که به تازگی پاکسازی شده اند بر روی لایه فاسیای عضلات در سوختگی های وسیع با ۹۵ درصد TBSA (Total Body Surface Area) مورد استفاده قرار می گیرد (۲۰).

مطالعات اخیر نشان می دهد که تجمع ماده زمینه ای خارج سلولی (Extra Cellular Matrix) ECM در زخم های اندام حرکتی اسب ممکن است به علت انسداد عروق ریز (Microvascular occlusion) و کاهش مرگ برنامه ریزی شده سلولی (Apoptosis) باشد. کاهش مرگ برنامه ریزی شده سلول ها باعث افزایش تعداد سلول های فیرو بلاست در زخم شده و تعادل بین تولید و از بین رفتن کلژن را به هم می زند که نهایتاً باعث تشکیل بافت جوانه ای اضافی می شود. بنابراین به نظر می رسد که بافت جوانه ای اضافی در اثر عدم تنظیم تکثیر سلول های فیرو بلاست (fibroplasia) (Dysregulated) تشکیل می شود. کاهش طبیعی پاسخ حاد ایمنی بایستی همراه با کاهش ساخت اجزاء ECM باشد و باعث تمایز سلول های فیرو بلاست تکثیر یافته و سازنده ECM به سلول های میوفیرو بلاست (Myofibroblasts) منقبض شونده، شود (۳۴).

انقباض زخم در مناطقی که پوست آزاد دارند نسبت به مناطقی که پوست آنها کشیده شده است مثل قسمت پایینی اندام حرکتی اسب، بیشتر است. زمانی که انقباض زخم متوقف می شود سلول های میوفیرو بلاست به سلول های فیرو بلاست در حال استراحت تبدیل شده و یا توسط روند مرگ برنامه ریزی شده ناپدید می شوند. اگر تعداد سلول های میوفیرو بلاست ناکافی باشد ممکن است انقباض به خوبی صورت نپذیرد. در مقابل وقتی سلول های میوفیرو بلاست بیش از زمانی که برای بستن زخم نیاز است حضور داشته باشند ممکن است باعث تجمع ماده زمینه ای خارج سلولی و انقباض پاتولوژیک شوند که خصوصاً زمانی که مفاصل یا منافذ بدن (Body orifices) را درگیر می کند بسیار اتفاق می افتد (۳۰)، رشد سلول های فیرو بلاست جدا شده از اندام حرکتی اسب به صورت معنی داری کمتر از رشد فیرو بلاست های بدن اسب بوده است (۵) و در صورتی که از سلول های فیرو بلاست بدن اسب جهت التیام زخم های اندام حرکتی به صورت FKFGS استفاده شود ممکن است التیام زخم را تسریع بخشد.

با توجه به اینکه برای جداسازی فیبرینوژن از پلاسما اسب در این روش از موادی مثل سولفات منیزیم و باریم استفاده می شود، برای اطمینان از عدم تداخل این مواد در روند رشد و تکثیر سلول ها زنده ماندن و تکثیر سلول ها در این چسب حایز اهمیت بوده است و می توان از این فیبرینوژن در چسب فیبرین استفاده نمود و جهت التیام زخم های پایینی اندام حرکتی اسب باروش های FKFGS و KFGS به کار برد.

در صورتی که فیبرینوژن به صورت خودی تهیه نشود می تواند همراه با انتقال عفونت هایی که منشأ خونی دارند مثل ایدز و هپاتیت در انسان و عفونت های مشابه در حیوانات باشند. ترومبین گاوی که به صورت موضعی



7. Cuono, C., Langdon, R., McGuire, J. (1986) Use of cultured epidermal autografts and dermal allografts as skin replacement after burn injury. *Lancet* 1:1123-4.
8. Currie, L.J., Martin, R., Sharpe, J.R. and James, S.E. (2003) A comparison of keratinocyte cell sprays with and without fibrin glue. *Burns* 29:677-685.
9. Dahm, A.M., De Bruin, A., Limat, A., Von Tscharn, C., Wyder, M. and Suter, M.M. (2002) Cultivation and characterization of primary and sub cultured equine keratinocytes. *Equine Vet. J.* 34:114-120.
10. Dart, A.J., Cries, L., Jeffcott, L.B., Hodgson, D.R. and Rose, J.R. (2002) Effects of 25% propylene glycol hydrogel (solugel) on second intention wound healing in horses. *Vet. Surg.* 31:309-313.
11. Dart, A.J., Cries, L., Jeffcott, L.B., Hodgson, D.R. and Rose, J.R. (2002) The effect of equine recombinant growth hormone on second intention wound healing in horses. *Vet. Surg.* 31:314-319.
12. De Moraes, A.M., Annichino-Bizzacchi, J.M., Rossi, A.B.R. (1998) Use of autologous fibrin glue in dermatologic surgery: application of skin graft and second intention healing. *Rev. Paul. Med.* 116:1747-52.
13. Ehrlich, H.P. (2004) Understanding experimental biology of skin equivalent: from laboratory to clinical use in patients with burn and chronic wounds. *Am. J. Surg.* 187 (Suppl to May) 29S-33S.
14. Ekfalck, A., Rodriguez-Martinez, H., Obel, N. (1990) Cultivation of tissue from the matrix of the stratum medium of the equine and bovine hoof walls. *Am. J. Vet. Res.* 51:1952-1956.
15. Ghamsari, S.M., Dehghan, M. M., Raii Dehaghi, M., Nowrouzian, I. (2001) Clinical evaluation of two surgical treatment methods of exuberant granulation tissue of lower limb open wounds in horses. *J. Faculty of Vet. Med. University of Tehran*, 56: 69-74.
16. Ghamsari, S.M., Dehghan, M.M., Rassoli, A., Nowrouzian, I. (2001) Clinical evaluation of chitin and chitosan effects on lower limb open wound healing in horses. *J. Faculty of Vet. Med. University of Tehran*, 56: 1-7.
17. Hendrikson, D., Virgin, J. (2005) Factors that affect equine wound repair. *Vet. Clin. Equine* 21:33-44.
18. Horch, R.E. (2001) Tissue engineering and the skin: development of cultured skin substitutes from sheets and composites to suspensions and monolayers on biological carrier materials. In: *Cultured Human Keratinocytes and Tissue Engineered skin substitutes*. Edited by RE Horch, AM Munster and BM Achauer. New York: Thieme. pp.3-22.
19. Horch, R.E., Bannasch, H., Stark, G.B. (2001) Transplantation of cultured autologous keratinocytes in fibrin sealant biomatrix to resurface chronic wounds. *Transplant. Proc.* 33:642-644.
20. Kaiser, H.W., Stark, G.B., Kopp, J., Balcerkiewicz, A., Spilker, G. and Kreysel, H.W. (1994) Cultured autologous keratinocytes in fibrin glue suspension, exclusively and combined with STS-allograft (preliminary clinical and histological report of a new technique). *Burns* 20:23-29.
21. Lamme, E.N., Van Leeuwen, R.T.J., Brandsma, K., Marle, J.V. and Middlekoop, E. (2000) Higher numbers of autologous fibroblasts in an artificial dermal substitute improve tissue regeneration and modulate scar tissue formation. *J. pathol.* 190:595-603.
22. Laplante, A.F., Germain, L., Auger, F.A. (2001) Mechanisms of wound reepithelialization: hints from a tissue-engineered reconstructed skin to long-standing questions. *The FASEB J.* 15:2377-89.
23. Machens, H.G., Berger, A.C. and Mailaender, P. (2000) Bioartificial skin. *Cells Tissues Organs* 167:88-94.
24. Ronfard, V., Broly, H., Mitchell, V., Galizia, J.P., Hochart, D., Chambon, E., Pellerin, P. and Huart, J.J. (1991) Use of human keratinocytes cultured on fibrin glue in the treatment of burn wounds. *Burns* 17:181-184.
25. Ronfard, V., Rives, J., Neveux, Y., Carsin, H. and Barrandon, Y. (2000) Long-term regeneration of human epidermis on third degree burns transplanted with autologous cultured epithelium grown on a fibrin matrix. *Transplantation* 70:1588-98.
26. Spotnitz, W.D. (1995) Fibrin sealant in the United States: clinical use at the university of Virginia. *Thromb. Haemost.* 74:482-485.



27. Spotnitz, W.D., Mintz, P.D., Avery, N., Bithell, T.C., Kaul, S. and Nolan, S.P. (1987) Fibrin glue from stored human plasma an inexpensive and efficient method for local blood bank preparation. *The Am. Surg.* 53:460-62.
28. Theoret, C.L. (2005) The pathophysiology of wound repair. *Vet. Clin. Equine* 21:1-13.
29. Theoret, C.L., Barber, S.M. and Gordon, J.R. (2002) Temporal localization of immunoreactive transforming growth factor $\beta 1$ in normal equine skin and in full-thickness dermal wound. *Vet. Surg.* 31:274-280.
30. Theoret, C.L., Barber, S.M., Moyana, T.N. and Gordon, J.R. (2002) Preliminary observations on expression of transforming growth factor $\beta 1$ and $\beta 3$ in equine full-thickness skin wounds healing normally or with exuberant granulation tissue. *Vet. Surg.* 31:266-273.
31. Travia, G., Palmisano, P.A., Cervelli, V., Esposito, G. and Casciani, C.U. (2003) The use of fibroblast and keratinocyte cultures in burn treatment. *Annals of Burns and Fire Disasters* 16:19-24.
32. Wilink, J.M., Van Weeren, P.R. (2005) Second-intention repair in the horse and pony and management of exuberant granulation tissue. *Vet. Clin. Equine* 21:15-32.
33. Wunn, D., Wardrop, J., Meyers, K., Kramer, J. and Ragle, C. (1999) Culture and characterization of equine terminal arch endothelial cells and hoof keratinocytes. *Am.J.Vet.Res.* 60:128-132.
34. Xu, W., Li, H., Brodniewicz, T., Auger, F.A. and Germain, L. (1996) Cultured epidermal sheet grafting with Hemaseel HMN fibrin sealant on nude mice. *Burns* 22:191-196.



ADHESION AND PROLIFERATION OF HORSE FIBROBLAST AND KERATINOCYTE CELLS IN FIBRIN GLUE

Aghchelou, M.R.¹, Ghamsari, S.M.^{2*}, Dehghan, M.M.², Ansari Majd, S.³, Taheri, M.⁴

¹Veterinary School, University of Zabol, Zabol - Iran.

²Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran.

³Research Genetic Engineering Center and Biological Technology, Tehran - Iran.

⁴Central Research Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran.

(Received 28 October 2005 , Accepted 17 March 2007)

Abstract:

Evaluation of autogenous fibrinogen extracted from horse blood in fibrin glue and its effects on horse's fibroblast and keratinocyte cells were performed. Fibrinogen has been obtained by glycine precipitation technique from horse's blood. Fibroblast cells were separated by explant culture method from neck skin and keratinocytes were separated by enzyme digestion from lib samples. Autologous fibrinogen, horse's fibroblast and keratinocyte cells separately mixed with bovine thrombin, calcium gluconate and tranexamic acid. This mixture was uniformly spread on cell culture plate and evaluated for six days. After one day of culture the thickness of fibrin glue were observed by invert microscope, fibroblast cells in elongated shape were observed in the fibrin glue in all thickness and keratinocyte cells were flattened and adherent on surface of plate. Both of them proliferated after 3 days. Fibrinogen that was obtained from horse blood by glycine precipitation technique can support horse fibroblasts as a scaffold and support horse keratinocyte proliferation in vitro.

Key words: fibrin glue, keratinocyte, fibroblast, horse.

*Corresponding author's email: ghamsari@ut.ac.ir, Tel: 021- 61117517, Fax: 021-66933222

