مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۶، دوره ۶۲، شماره ۳، ۱۷۶-۱۶۹

بررسی خصوصیات رشد فیبرو بلاستهای جدا شده از نواحی پایینی اندام حرکتی اسب نژاد تروبرد و اسبچه خزر در محیط کشت سلول (In vitro)

امید آذری[1] سید مهدی قمصری[1]* محمد مهدی دهقان[1] محمدرضا آقچه لو[1]

[1] گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران

(دریافت مقاله: ۱۲ شهریورماه ۱۳۸۴، پذیرش نهایی: ۱۷ خردادماه ۱۳۸۵)

چکیده

در این مطالعه خصوصیات ذاتی رشد فیبرو بلاستهای جداشده از نواحی پایینی اندام حرکتی اسب نژاد تروبرد و اسبچه خزر در محیط کشت سلول (In vitro) مورد بررسی قرارگرفت. تحت بیهوشی عمومی و با رعایت شرایط آسپتیک، در ۴ راس اسب نژاد تروبرد مخلوط و ۴ راس اسبچه خزر، زخم تمام ضخامت درسطح جانبی و ناحیه میانی متاکارپ سمت چپ ایجاد و ۳گرم بافت زیر جلدی برداشت شد. کشت و جداسازی و تکثیر فیبرو بلاست ها در محیط کشت RPMI-1640 از بافت مذکور در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد با غلظت ۵ درصد گاز CO_2 انجام شد. سپس شمارش و رنگ آمیزی حیاتی فیبرو بلاست ها به مدت ۸ روز به منظور بررسی سرعت تکثیر و میزان قابلیت زیستی این سلولها انجام گردید. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد اختلاف معنی داری در سرعت رشد و تکثیر فیبرو بلاستهای جداشده از ناحیه پایینی اندام حرکتی اسب و اسبچه خزر وجود نداشته است. همچنین میزان قابلیت زیستی این سلولها در هر دوگروه تفاوت معنی داری را نشان نداد. بنابر این می توان اظهار داشت که به دلیل قرابت ژنتیکی بسیار نزدیک بین اسب و اسبچه خزر، تفاوتی در خصوصیات ذاتی رشد فیبرو بلاستهای آنها وجود ندارد. البته به منظور دریافتن نحوه ترمیم زخم در اسبچه خزر و مقایسه آن با اسب، نیازمند به تحقیقات بیشتر در شرایط بدن (in vivo) می باشد.

واژه‌های کلیدی: اسب نژاد تروبرد، اسبچه خزر، متاکارپ، خصوصیات رشد فیبرو بلاست، محیط کشت سلول.

مقدمه

زخم‌های تروماتیک به خاطر خلق و خوی اسب‌ها و همچنین به خاطر نحوه استفاده از این حیوان، از وقوع بالایی برخوردار بوده که میزان زیادی از این زخم‌ها در اندام‌های حرکتی دیده می‌شوند(۳،۷،۲۱).

ترمیم به روش اولیه (Primary Intention) که شامل بخیه کردن لبه‌های زخم می‌باشد، بهبودی سریعتری را نسبت به روش ترمیم ثانویه (Secondary Intention) به دنبال دارد و از نظر زیبایی نیز با نتایج بهتری همراه است. در بسیاری از موارد، به کارگیری روش ترمیم اولیه به علت شکل، اندازه و محل زخم غیرممکن بوده و یا دچار عوارضی مانند گسیختگی بخیه‌ها شده که فاکتورهایی نظیر عفونت، کشش بر لبه‌های زخم و حرکت در این امر دخیل می باشند. در این موارد، التیام به شیوه ثانویه تنها راه درمان است. اما این شیوه درمانی بسیار وقت‌گیر و پرهزینه بوده و در بسیاری از موارد با عوارضی همراه بوده که گاهی این عوارض غیر قابل کنترل می‌باشند. یکی از متداول‌ترین این عوارض تشکیل بافت گرانوله اضافی و تشکیل اسکار هیپرتروفیک یا کلوئید می‌باشد(۶،۸،۱۹،۲۱،۲۶).

بافت جوانه‌ای در واقع شامل رشد و توسعه عروق خونی، تکثیر فیبرو بلاستها و تولید پروتئین، به ویژه کلاژن به عنوان ماتریکس در بستر زخم می باشد. بافت جوانه‌ای اضافی مستعد تخریش بوده و در برخی موارد یک محدودیت مکانیکی در حرکت طبیعی ایجاد می‌کند. از طرفی بافت گرانوله سبب عدم تشکیل بافت پوششی و انقباض موثر در زخم شده و التیام زخم را به تعویق می اندازد. در اثر این عارضه، تعداد قابل ملاحظه‌ای از اسب‌ها به خاطر تورم دائمی در اندام حرکتی، وجود اسکار وسیع و لنگش دائمی قادر به ادامه فعالیت نبوده که در نتیجه صاحبان حیوان یا تصمیم به معدوم کردن آن گرفته و یا فقط به منظور اهداف تولید مثلی (Breeding) آن هم در صورت امکان از آن استفاده می کنند(۸،۹،۱۹،۲۱).

عامل یا عوامل اصلی رشد و توسعه بیش از اندازه بافت گرانوله در زخمهای اندامهای حرکتی اسبها هنوز ناشناخته است، اگرچه رشد و تکثیر بیش از حد فیبرو بلاستها و تولید کلاژن توسط این سلولها و همچنین عدم تعادل در سنتز و تجزیه رشته‌های کلاژن درایجاد این عارضه نقش عمده‌ای ایفاء می‌کنند(۱۴،۱۹) در سالیان اخیر الگوی ترمیم زخم اندام حرکتی اسب در سطح وسیعی مورد ارزیابی قرار گرفته است تا عوامل مؤثر در بروز عوارضی مانند تشکیل بافت گرانوله اضافی مشخص شود و پروتکل‌های درمانی مناسب جهت تسریع در التیام این گونه زخم‌ها با حداقل عوارض ارائه گردد و از طرفی نیز سعی بر آن است تا بتوان نتایج حاصل از این تحقیقات را درعرصه پزشکی درجهت ترمیم بهتر و کاهش معضلات ترمیم زخم در انسان بسط داد. اما تاکنون روش‌های درمانی پیشنهادی همراه با عوارض بوده و چندان راهگشا برای حل این معضل نبوده است(۳،۲۱).

در این راستا، در مطالعات انجام شده بر روی نحوه ترمیم زخم اندام حرکتی در اسب‌ها و پونی‌ها عنوان شده که ترمیم این گونه زخم‌ها در پونی‌ها بهتر و با عوارض کمتر و در مدت زمان کوتاه‌تری نسبت به اسب‌ها صورت می‌گیرد. در این تحقیقات عنوان شده که سرعت تکثیر فیبرو بلاست‌ها و تشکیل بافت گرانوله

*) نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۱۱۱۷۱۶۴-۰۲۱ نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email: ghamsari@ut.ac.ir

اضافی درزخم‌های اندام حرکتی اسب‌ها با سرعت بیشتر و در سطح وسیعتری نسبت به زخم‌های مشابه در پونی‌ها صورت می‌پذیرد. تفاوت در میزان تکثیر فیبروبلاست‌ها بین اسب و پونی را بعضی از محققین به علت اختلاف در اندازه بدنی (Body Size) و عده‌ای به دلیل تفاوت در فاکتورهای ژنتیکی بین این دو نژاد دانسته‌اند(۱۰،۱۵،۲۱،۲۴). روشن شدن علت اصلی تفاوت درالگوی ترمیم زخم بین اسب وپونی می‌تواند در پیدا کردن فاکتورهای مؤثر در بروز عوارض زخم در اسب مفید بوده و با دستکاری این فاکتورها در طول دوره ترمیم، درمان مؤثری را در این زمینه انجام داد(۲۱).

از طرفی براساس تحقیقات متعددی که برروی کاریوتیپ و فنوتیپ اسبچه خزر صورت گرفته است، با قوت عنوان شده که علی رغم اندازه بدنی کوچک (درحد پونی)، این حیوان اسب بوده و اطلاق نام پونی براین حیوان اشتباه است و آن را اسبچه خزر و یا اسب کوچک خزر (Caspian Miniature Horse) می‌نامند و براساس تبارنامه اسب‌ها، اسبچه خزر را جد تمام اسب‌های خونگرم امروزی می‌دانند(۱،۲،۴،۱۱،۱۳). البته قابل ذکر می‌باشد که اسبچه خزر سرمایه ملی کشورمان ایران بوده و خوشبختانه در سال‌های اخیر تحقیقات وسیعی بر روی جنبه‌های مختلف این نژاد منحصر به فرد اسب صورت گرفته است، ولی تاکنون هیچگونه مطالعه‌ای برروی الگوی ترمیم زخم در اسبچه خزر صورت نگرفته و هنوز مشخص نیست که آیا ترمیم زخم دراین حیوان مانند اسب‌ها (به خاطر قرابت ژنتیکی) همراه با عوارض ذکر شده مانند تشکیل بافت گرانوله اضافی می‌باشد یا مانند پونی‌ها (به خاطراندازه بدنی مشابه) این زخم‌ها با حداقل عوارض بهبود می یابند؟ از این گذشته مقایسه الگوی ترمیم زخم بین اسب و اسبچه خزر می‌تواند راهگشایی در جهت پیدا کردن عامل و یا عوامل مؤثر در بروز عوارض زخم در اسب باشد.

همانطور که قبلاً ذکر گردید سرعت ومدت زمان تکثیر فیبروبلاستها و متعاقباًمیزان ترشح کلاژن توسط این سلولها نقش عمده‌ای در وسعت تشکیل بافت گرانوله اضافی دارد(۱۷،۱۸،۲۱،۲۳،۲۴) بدین منظور، در این مطالعه خصوصیات رشد فیبروبلاستهای جداشده از بافت زیر جلدی ناحیه پایینی اندام حرکتی اسب و اسبچه خزر در محیط خارج بدن (In vitro) مورد بررسی قرار گرفته و سرعت رشد فیبروبلاستهای این دو گروه و میزان توانایی زیستی (viability) این سلولها با هم مقایسه شدند.

مواد و روش کار

در این مطالعه از ۴ رأس اسب نژاد مخلوط تروبرد (اسبداری دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران) با دامنه وزنی ۴۰۰-۳۵۰ کیلوگرم، متوسط ارتفاع از جدوگاه ۱۵۵سانتیمتر (بین ۱۴۸ تا ۱۶۲سانتیمتر) ومتوسط سن ۷سال (بین ۴ تا ۱۰ سال) و ۴ رأس اسبچه خزر (مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان تهران) با دامنه وزنی ۲۰۰-۱۵۰ کیلوگرم، متوسط ارتفاع از جدوگاه ۱۱۵ سانتیمتر (بین ۱۱۲ تا ۱۲۲سانتیمتر) و متوسط سن ۵/۵سال (بین ۴ تا ۱۰ سال) استفاده گردید. سلامت همه حیوانات براساس معاینه بالینی مورد تائید قرار گرفت. دو هفته قبل از شروع مطالعه، حیوانات در اصطبل‌های انفرادی نگهداری شده و تغذیه آنها

جدول ۱ -فاصله زمانی از لحظه کاشتن بافت تا پاساژ اول فیبروبلاستها و فاصله زمانی بین پاساژ دوم تا انتقال فیبروبلاستها به پلیت ۲۴ تایی در اسب و اسبچه خزر (n=4).

حیوان	فاصله زمانی از لحظه کاشتن بافت تا پاساژاول (روز)	فاصله زمانی بین پاساژ دوم تا انتقال به پلیت ۲۴ تایی (روز)
اسب شماره۱	۱۷	۵
اسب شماره۲	۱۸	۵
اسب شماره۳	۱۸	۴
اسب شماره۴	۱۸	۴
میانگین±انحراف معیار	۱۷/۷۵±۰/۵	۴/۵±۰/۵۷
اسبچه شماره۱	۱۷	۵
اسبچه شماره۲	۱۶	۵
اسبچه شماره۳	۱۸	۳
اسبچه شماره۴	۱۸	۴
میانگین±انحراف معیار	۱۷/۲۵±۰/۹۵	۴/۲۵±۰/۹۵

شامل علوفه خشک (کاه و یونجه) و جوبوده است.

به منظور اخذ نمونه های بافتی، پس از بی هوشی عمومی با استفاده از تزریق داخل رگی (IV) داروهای دیازپام با دز ۰/۲ میلیگرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن، رامپون با دز ۱/۱ میلیگرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن و کتامین با دز ۲/۲ میلیگرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن، موهای ناحیه جانبی قلم اندام حرکتی قدامی (Metacarpus) سمت چپ تراشیده و به روش آسپتیک جهت ایجاد زخم و برداشت بافت زیر جلدی آماده شدند. سپس پوست ناحیه میانی سمت جانبی متاکارپ به صورت تمام ضخامت بریده شده و میزان ۳ گرم از بافت زیر جلدی برداشت شده و در داخل لوله پلی اتیلنی (one, Cellstar, No:188271 -Greiner bio) ۵۰ سی سی، حاوی ۱۰ سی سی محیط کشت پایه RPMI(Sigma-Aldrich, Inc, st. Louis, USA Roswell Park Memorial Institute,RPMI-1640 Medium,) قرار گرفته و در کنار یخ به آزمایشگاه کشت سلول انتقال یافت. جهت جداسازی سلولها از روش کشت بافتی (Culture Explant) استفاده شد، بدین ترتیب که در آزمایشگاه کشت سلول در زیر هود و در شرایط کاملاً استریل، ابتدا این بافتها توسط محلول PBS(Phosphate Buffered Saline) شسته شده و به تکه‌های کوچک بافتی تقسیم شده و در کف فلاسک‌های ۲۵ سانتیمتر مربع (Nunclon™ Cell Culture, No:163371) مخصوص کشت سلول کاشته شدند و سپس به این فلاسک‌ها میزان ۵سی‌سی محیط کشت RPMI حاوی ۱۰درصد FBS(Fetal Bovine Serum)، مرکز تحقیقات جهاد دانشگاهی) و آنتی بیوتیک پنی سیلین- استرپتومایسین (BioGene, Cat: AP110) به ترتیب با دز ۱۰۰ IU/ml و ۱۰۰ µg/ml اضافه شد.

بعد از ثبت مشخصات بر روی فلاسکها، آنها در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد، با غلظت ۵درصدگاز CO_2 قرار گرفته و هر ۴۸ ساعت محیط کشت تعویض می‌شد تا فیبروبلاستها از بافتها جدا شده و شروع به تکثیر نمایند. هنگامی که میزان این سلولها به حد کفایت رسید (زمانی‌که پرگنه‌های بزرگ سلولی تشکیل شد) بافتها از کف فلاسک خارج شده و پاساژ فیبروبلاستها توسط ۱ سی سی تریپسین۰/۲۵درصد(Aldrich, Inc, st. Louis, USA -

جدول ۲- تعداد فیبروبلاستهای شمارش شده در روزهای ۱ تا ۸ در گروه اسب و اسبچه خزر.

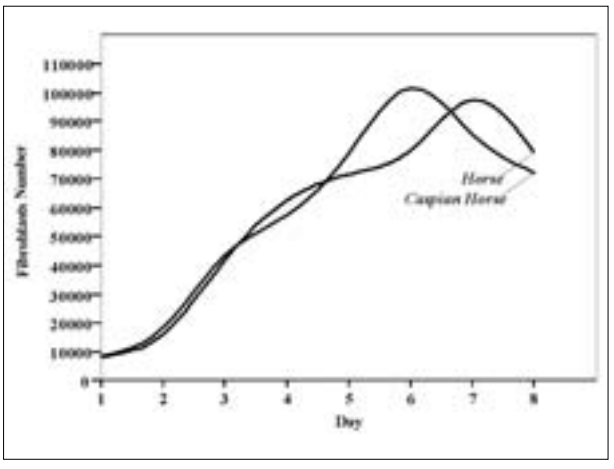
حیوان	روز اول	روز دوم	روز سوم	روز چهارم	روز پنجم	روز ششم	روز هفتم	روز هشتم
اسب شماره۱	۷۱۰۰	۱۷۲۰۰	۲۴۹۰۰	۴۳۴۰۰	۴۹۶۰۰	۵۵۴۰۰	۷۰۲۰۰	۴۵۰۰۰
اسب شماره۲	۱۰۶۰۰	۱۷۱۰۰	۴۳۲۰۰	۸۰۶۰۰	۸۷۶۰۰	۱۰۰۹۰۰	۱۱۸۲۰۰	۱۱۰۰۰۰
اسب شماره۳	۸۷۰۰	۱۴۶۰۰	۵۷۵۰۰	۸۰۰۰۰	۹۷۱۰۰	۹۸۷۰۰	۱۰۳۹۰۰	۷۲۰۰۰
اسب شماره۴	۶۷۰۰	۱۶۰۰۰	۴۲۰۰۰	۴۶۵۰۰	۵۲۰۰۰	۶۵۰۰۰	۹۷۱۰۰	۸۹۸۰۰
میانگین±انحراف معیار	۸۲۷۵±۱۱۷۴	۱۶۲۲۵±۱۲۱۲	۴۱۹۰۰±۱۳۳۴۲	۶۲۶۲۵±۲۰۴۵۰	۷۱۵۷۵±۲۴۳۲۰	۸۰۰۰۰±۲۳۲۱۳	۹۷۳۵۰±۲۰۱۲۳	۷۹۲۰۰±۲۷۵۸۳
اسبچه شماره۱	۸۴۰۰	۲۱۳۰۰	۳۴۸۰۰	۵۶۸۰۰	۵۸۰۰۰	۶۲۵۰۰	۵۰۴۰۰	۳۸۴۰۰
اسبچه شماره۲	۱۱۴۰۰	۲۳۲۰۰	۳۴۱۰۰	۴۰۸۰۰	۶۲۲۰۰	۶۴۸۰۰	۶۰۴۰۰	۵۰۶۰۰
اسبچه شماره۳	۶۷۰۰	۱۶۵۰۰	۵۳۵۰۰	۶۰۰۰۰	۱۰۰۵۰۰	۱۵۴۰۰۰	۹۷۱۰۰	۹۰۰۰۰
اسبچه شماره۴	۶۸۰۰	۱۲۹۰۰	۵۲۰۰۰	۷۲۰۰۰	۹۵۶۰۰	۱۲۵۵۰۰	۱۳۳۳۵۰	۱۰۹۷۰۰
میانگین±انحراف معیار	۸۳۲۵±۲۱۹۲	۱۸۴۷۵±۴۶۶۵	۴۳۶۰۰±۱۰۵۸۷	۵۷۴۰۰±۱۲۸۵۶	۷۹۰۷۵±۲۲۰۶۸	۱۰۱۷۰۰±۴۵۴۶۰	۸۵۳۱۲±۳۷۷۹۷	۷۲۱۷۵±۳۳۳۲۷

جدول ۳- درصد قابلیت زیستی فیبروبلاستهای اسب و اسبچه خزر در طول ۸ روز.

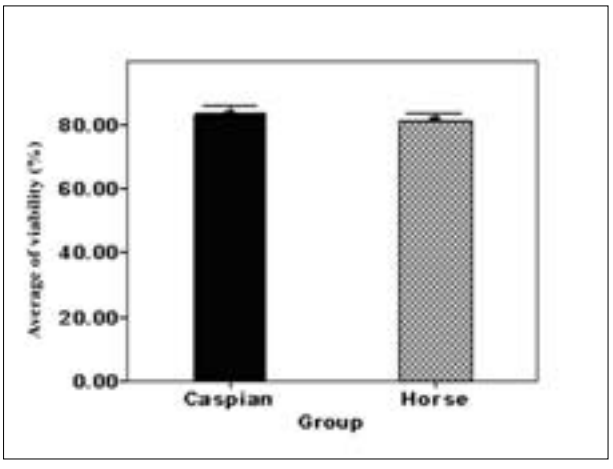
قابلیت زیستی فیبروبلاست٪	روز اول	روز دوم	روز سوم	روز چهارم	روز پنجم	روز ششم	روز هفتم	روز هشتم
اسب شماره۱	۸۹/۳۰	۹۲/۸۰	۸۴/۶	۷۸/۶	۸۵	۷۵	۷۷	۷۵
اسب شماره۲	۸۵	۸۳/۶۰	۸۲	۷۵/۳	۷۵/۶۰	۷۷/۳۰	۷۷	۷۳
اسب شماره۳	۹۲/۶۰	۸۹	۸۶	۸۰	۷۹	۸۰	۷۰/۵۰	۷۰
اسب شماره۴	۹۰	۹۲/۵۰	۹۳	۸۷/۶	۸۰/۵۰	۸۲/۳۰	۷۵	۶۵/۵۰
میانگین±انحراف معیار	۸۹/۲۲±۳/۱۵	۸۹/۴۷±۴/۲۷	۸۶/۴۰±۴/۷۰	۸۰/۳۷±۵/۲۰	۸۰/۰۲±۵/۲۴	۷۸/۶۵±۳/۱۷	۷۴/۸۷±۴/۷۶	۷۰/۸۷±۴/۰۸
اسبچه شماره۱	۹۰/۶۶	۹۲/۶۶	۸۸/۳۰	۸۲	۸۲/۵۰	۸۱	۷۰/۶۰	۷۰
اسبچه شماره۲	۹۴	۸۸/۵۰	۹۰	۸۹/۵۰	۹۰	۸۸	۸۱	۷۲/۲۲
اسبچه شماره۳	۹۵/۵۰	۹۱	۷۸/۶۰	۷۸	۷۷/۵۰	۷۸	۸۲	۷۵/۲۵
اسبچه شماره۴	۹۱/۶۶	۹۱	۸۸	۸۳/۳۰	۷۷/۳۰	۸۰/۳۰	۷۹/۵۰	۶۸/۸۰
میانگین±انحراف معیار	۹۲/۹۵±۲/۱۹	۹۰/۸۰±۱/۷۱	۸۶/۲۲±۵/۱۶	۸۳/۲۰±۴/۷۶	۸۱/۸۲±۵/۹۵	۸۱/۸۲±۴/۳۱	۷۸/۲۷±۴/۶۱	۷۱/۵۶±۱/۹۹

Trypsin 1:250, T-4799, Sigma) به همراه EDTA میلی مولار انجام شد. مرحله پاساژ دادن به این ترتیب بود که ابتدا کف فلاسک توسط محلول PBS شسته شده و سپس تریپسین به مدت حداکثر ۳ دقیقه به کف فلاسک اضافه شده که در نتیجه اتصال فیبروبلاستها از کف فلاسک و از همدیگر جدا شده وسلولها به صورت شناور دیده می شدند. سپس بلافاصله برای خنثی سازی تریپسین به آن میزان ۵ سی سی محیط کشت RPMIحاوی ۱۰درصد FBS اضافه شده و بر روی این مجموعه عمل سانتریفیوژ با سرعت ۱۵۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۱۰ دقیقه انجام شده که در نتیجه سلولها در کف فالکن ته نشین می شدند. بعد از عمل سانتریفیوژ، مایع رویی خارج شده و سلولها در کف فلاسکها ریخته شدند و مطابق قبل به آنها محیط کشت RPMI حاوی ۱۰درصد FBS و آنتی بیوتیک اضافه گردید. بعد از اینکه فیبروبلاست‌ها رشد و تکثیر نمودند و حدود ۹۰درصد کف فلاسک را اشغال نمودند، مرحله پاساژ بعدی انجام گرفت. در طول این مطالعه، ۲ بار عمل پاساژ دادن بر روی سلولها انجام شد. بعد از مرحله پاساژ، زمانی‌که مجدداً حدود ۹۰درصد ازکف فلاسک توسط فیبروبلاستها پر گردید، سلولها تریپسینه شده و بعد از شمارش سلولهای زنده موجود در هر فلاسک، تعداد ۱۰۰۰۰ سلول در داخل هر گوده (Well) از پلیت ۲۴ تایی (662160 :Greiner bio-one, Cellstar, No) ریخته شده و در داخل انکوباتور با شرایط مذکور قرار گرفتند و بعد از ۴۸ ساعت شمارش سلولها آغاز شده و روزانه ۳ گوده شمارش شد و میانگین تعداد سلولهای شمارش شده در ۳ گوده محاسبه و به عنوان تعداد سلول در همان روز ثبت شد. به منظور شمارش فیبروبلاستها ابتدا سلولها تریپسینه شده و تمام سلولها با دقت و به طور کامل جمع آوری شده و سپس عمل سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه انجام و سلولهای ته‌نشین شده شمارش می‌شدند. به منظور شمارش فیبروبلاستها و تعیین درصد قابلیت زیستی آنها از رنگ‌آمیزی تریپان بلو استفاده گردید. بدین ترتیب که به سلول های کف اپندرف مقدار ۸۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI و ۱۰ میکرولیتر رنگ تریپان بلو اضافه شده و به آرامی با هم مخلوط شدند. در این روش رنگ‌آمیزی سلولهای مرده رنگ آبی تیره به خود گرفته که به راحتی از سلولهای زنده که حالت شفاف و بدون رنگ داشتند، قابل تمایز بودند (۱۲،۱۶،۱۷،۲۳).

شمارش فیبروبلاستها توسط لام نئوبار و میکروسکوپ نوری Invert (70 Olympus IX) انجام شد.



نمودار۱- منحنی رشد فیبروبلاستهای قسمت پایینی اندام حرکتی در روزهای ۱ تا ۸ در اسب واسبچه خزر.



نمودار۲- میانگین ± انحراف معیار درصد قابلیت زیستی فیبروبلاستهای قسمت پایینی اندام حرکتی در اسب و اسبچه خزر.

میزان سرعت رشد و تکثیر فیبروبلاستهای اسب و اسبچه خزر و درصد قابلیت زیستی آنها در مدت ۸ روز ثبت و منحنی رشد آنها رسم گردید و با هم مقایسه شد. بعد از ثبت اطلاعات، جهت آنالیز داده‌ها از برنامه رایانه‌ای SPSS,12 استفاده شده و نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد بیان گردید. ضمناً جهت بررسی تفاوت میانگین‌ها بین دو گروه از آزمون آماری Unpaired Student t test با سطح معنی داری $p\leq ۰/۰۵$ استفاده شد.

نتایج

نتایج حاصل شده قبل از آغاز شمارش فیبروبلاست ها: از ۸ مورد بافت زیر جلدی جداشده (۴ اسب و ۴ اسبچه خزر)، در ۷ مورد (۳ اسب و ۴ اسبچه خزر) در همان بار اول فیبروبلاستها از بافت جدا شده و شروع به تکثیر نمودند و فقط در یک مورد اسب در دفعه اول فیبروبلاستها از بافت جدا نشد که نمونه‌گیری دوباره انجام شد و همچنین فیبروبلاستها در هر دو گروه بعد از یک هفته از بافت جدا شده و به صورت سلولهای انفرادی در محیط کشت سلول، در اطراف بافت مشاهده شدند (تصویر۱).

همان‌طور که در جدول۱ آورده شده است، میزان تکثیر و رشد فیبروبلاستها در کف فلاسک کشت سلول از لحظه کاشتن بافت تا زمان پاساژ اول در اسبچه‌های خزر مقدار کمی سریع تر از اسب‌ها بوده است، به طوری که زمان تشکیل پرگنه‌های بزرگ سلولی در اسبچه‌های خزر به طور متوسط ۰/۹۵± ۱۷/۲۵ روز و در گروه اسب‌ها به طور متوسط ۰/۵± ۱۷/۷۵ روز بوده و همچنین فاصله زمانی بین پاساژ دوم تا زمان انتقال فیبروبلاستها به پلیتهای ۲۴ تایی (زمانیکه تقریباً ۹۰ درصد کف فلاسک توسط فیبروبلاستها پر شود) نیز در گروه اسبچه‌های خزر کمتر از گروه اسب‌ها بوده است به طوری که معدل این فاصله زمانی در گروه اسبچه های خزر ۰/۹۵± ۴/۲۵ روز و در گروه اسب‌ها ۰/۵۷± ۴/۵ روز بوده است، اگرچه این اختلافات از لحاظ آماری معنی دار نبوده است.

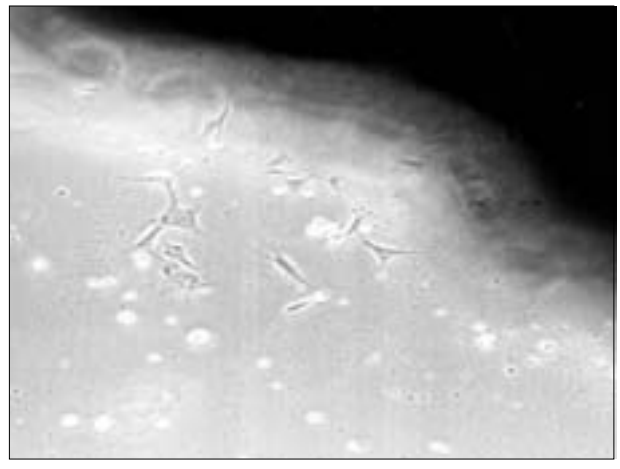
نتایج حاصل از شمارش فیبروبلاست ها: همان‌طور که در جدول ۲ آورده شده است، هیچ تفاوت معنی داری در سرعت رشد فیبروبلاستهای جدا شده از بافت زیر جلدی متاکارپ اسب و اسبچه خزر در روزهای ۱ تا ۸ دیده نشده و متوسط کل فیبروبلاستهای شمارش شده بین دو گروه اسب و اسبچه خزر نیز هیچ اختلاف معنی داری را نشان نداده است و همچنین سرعت رشد فیبروبلاستها در اسبچه‌های خزر تا روز ۶ و در مورد اسب‌ها تا روز ۷ رو به افزایش بوده و سپس کاهش یافته است.

همانطور که در جدول۳ آورده شده، میزان درصد قابلیت زیستی فیبروبلاستها در هر دو گروه به تدریج کاهش یافته و هیچگونه اختلاف معنی‌داری در این خصوص بین دو گروه اسب و اسبچه خزر دیده نشده است. همچنین متوسط درصد کل قابلیت زیستی فیبروبلاست‌های اسب (۶/۷۲±۸۱/۲۳٪) و اسبچه خزر (۶/۸۱±۸۳/۳۳٪) در طول ۸ روز نیز تفاوت معنی‌داری را نشان نداده است (نمودار۱).

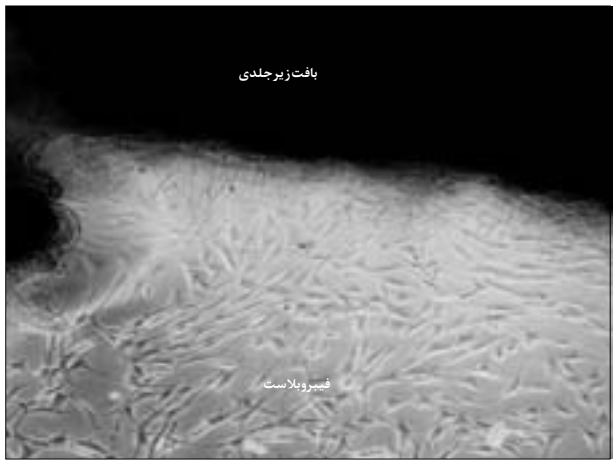
در کل با توجه به شمارش فیبروبلاستهای جدا شده از ناحیه پایینی اندام حرکتی اسب و اسبچه خزر از روز ۱ تا ۸، این سلولها الگوی رشد و تکثیر تقریباً مشابهی را در فازهای مختلف رشد سلولی نشان دادند و تفاوت معنی‌داری در این خصوص بین فیبروبلاستهای اسب و اسبچه خزر مشاهده نشد (نمودار۲).

بحث

ترمیم به شیوه ثانویه در زخم‌های اندامهای حرکتی اسبها به مقدار زیادی به پدیده انقباض زخم و تشکیل بافت پوششی بستگی دارد (۸،۱۵،۱۹،۲۱،۲۲،۲۵). تشکیل بافت گرانوله اضافی که ناشی از تکثیر فیبروبلاست‌ها و ترشح کلاژن و تشکیل جوانه‌های عروقی می‌باشد، یک عارضه مهم در این گونه زخم‌ها به شمار می‌رود که مانع از وقوع پدیده انقباض و تشکیل بافت پوششی در زخم شده و در نتیجه در پروسه التیام زخم اختلال ایجاد می‌کند (۸،۱۵،۱۹،۲۰،۲۱،۲۶). در مطالعات متعددی که بر روی نحوه ترمیم زخم اندام حرکتی در اسب و پونی صورت گرفته، عنوان شده که میزان تشکیل بافت گرانوله اضافی در زخم‌های اندام حرکتی پونی نسبت به اسب‌ها کمتر بوده و در نتیجه ترمیم زخم در پونی با سرعت بیشتری نسبت به اسب‌ها اتفاق می‌افتد (۷،۹،۱۵،۱۸،۲۱). عده‌ای از



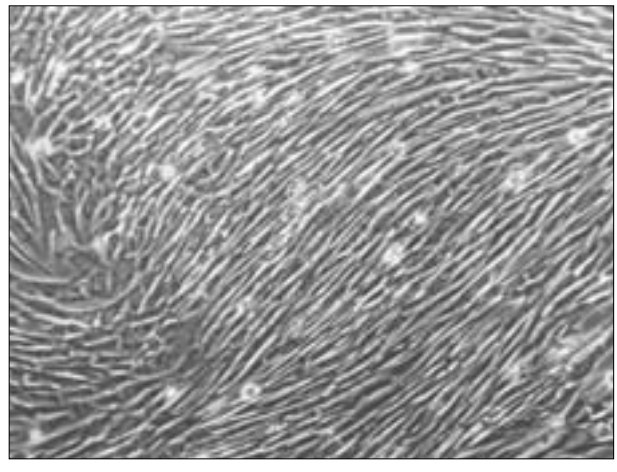
تصویر ۱- نمای میکروسکوپیک، چند عدد فیبروبلاست جدا شده از بافت زیرجلدی متاکارپ اسب شماره ۳ ، در روز هفتم بعد از کشت بافت (بزرگنمائی ۱۰×۱۰)



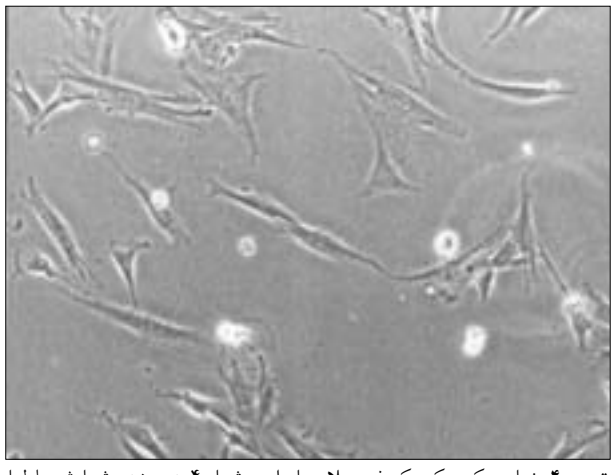
تصویر ۲- نمای میکروسکوپیک، فیبروبلاست های جدا شده و در حال تقسیم از بافت زیرجلدی متاکارپ اسبچه خزر شماره ۴ ، در روز دوازدهم بعد از کشت بافت (بزرگنمائی ۱۰×۱۰)

محققین علت اختلاف موجود در نحوه ترمیم بین اسب و پونی را مربوط به فاکتور اندازه بدنی دانسته و عنوان داشته‌اند در اسب‌ها و پونی‌هایی با وزن کمتر از ۳۶۵ کیلوگرم و ارتفاع از جدوگاه کمتر از ۱۴۰ سانتیمتر، ترمیم زخم بهتری را نسبت به حیوانات سنگین‌تر و بزرگتر نشان می‌دهند. این عده معتقدند که در نژادهای سنگین‌تر و بزرگتر، نیروی کششی (نیروی مرکز گریز) بیشتر بر روی لبه‌های زخم، مانع از اعمال نیروی انقباض (نیروی مرکز گرا) موثر توسط میوفیبروبلاستها شده و در نتیجه پدیده انقباض زخم به خوبی صورت نگرفته و زخم مدت زمان بیشتری تحت تأثیر تحریکات محیطی بوده و این عامل سبب تحریک رشد و تکثیر فیبروبلاست‌ها و تشکیل بافت گرانوله اضافی می‌گردد(۵،۹،۱۵،۱۸). اما در تحقیقاتی که Wilmink و همکاران درسال ۱۹۹۹ انجام دادند، عنوان کردند که هیچ اختلافی درمیزان نیروی مرکز گریز اعمال شده بر روی لبه‌های زخم بین اسب و پونی وجود نداشته است(۲۵). آنها اظهار می‌دارند که اختلاف در میزان تشکیل بافت گرانوله اضافی بین اسب و پونی مربوط به تفاوت در فاکتورهای ژنتیکی بین این دو نژاد می باشد، همچنین بیان می‌کنند که در پونی‌ها بعد از پرشدن بستر زخم توسط فیبروبلاستها، فیبروپلازی متوقف شده و در نتیجه بافت گرانوله اضافی تشکیل نمی‌گردد، ولی در اسب‌ها تکثیر فیبروبلاست‌ها همچنان ادامه می یابد و بافت گرانوله اضافی تشکیل شده و تحریکات محیطی نیز به نوبه خود سبب وخیم‌تر شدن اوضاع می‌گردند(۲۱،۲۲،۲۴).

از طرفی در تحقیقاتی که Wilmink و همکاران درسال ۲۰۰۱ و Miller و همکاران درسال ۲۰۰۰ بر روی سرعت رشد فیبروبلاست‌های جدا شده از قسمت پایینی اندام حرکتی اسب و پونی در محیط in vitro به منظور مشخص شدن اینکه آیا تفاوتی در خصوصیات ذاتی رشد فیبروبلاستها در بین اسب و پونی وجود دارد یا خیر!؟ انجام دادند، عنوان شد که سرعت رشد فیبروبلاستها در پونی‌ها سریعتر از اسب‌ها بوده است که این یافته با آنچه که در شرایط بدن (vivo in) در خصوص تشکیل بافت گرانوله دیده می شود، متناقض است. دلیل این تناقض را ناشی از اثر فاکتورهای موضعی زخم نظیر فاکتورهای رشد و سیتوکین‌ها بر روی رشد و تکثیر فیبروبلاستها دانسته‌اند، در حالی که در محیط



تصویر ۳- نمای میکروسکوپیک، پرگنه بزرگ سلولی در اسبچه شماره ۴، در روز هفدهم بعد از کاشت بافت (بزرگنمائی ۱۰×۱۰)



تصویر ۴- نمای میکروسکوپیک، فیبروبلاستهای اسب شماره ۴، در روز دوم شمارش سلولها (بزرگنمائی ۲۰×۱۰)

کشت هیچ‌یک از این فاکتورها وجود ندارد(۱۷،۲۳) البته Miller و همکاران درسال ۲۰۰۰ عنوان می دارند که ممکن است تکثیر کمتر فیبرو بلاست‌ها منتهی به کاهش تعداد میوفیبرو بلاست و کاهش انقباض زخم گردد. فعالیت بیشتر فیبرو بلاست‌ها و میوفیبرو بلاست‌ها ممکن است تشکیل بافت گرانوله را مهار کند و ترمیم زخم را تحریک کند(۱۷).

مطالعه حاضر از این جهت جالب توجه و حائز اهمیت می‌باشد که خصوصیات رشد فیبرو بلاستهای جدا شده از ناحیه پایینی اندام حرکتی اسبچه خزر که یک نژاد منحصر بفرد می باشد، مورد بررسی قرار گرفته است. اسبچه خزر اگرچه از لحاظ اندازه بدنی شبیه به پونی (ارتفاع از جدوگاه ۱۲۰-۹۰ سانتیمتر) می باشد، اما در کاوش‌های باستان شناسی و تحقیقات بعمل آمده بر روی کاریوتیپ و فنوتیپ این حیوان، با قوت عنوان شده که حیوان مذکور اسب بوده و قرابت بسیار نزدیکی با اسب های خونگرم امروزی داشته و آن را جد تمام اسب های خونگرم امروزی می دانند. این محققین اسبچه خزر را در گروه تیپ ۴ اسب‌ها که اسب عرب و سایر اسب‌های خونگرم جزء این گروه هستند، قرار می‌دهند، در حالی‌که پونی‌ها در تیپ ۲ قرار می‌گیرند. بر این اساس، محققین اطلاق نام پونی (Caspian Pony) را بر این حیوان اشتباه دانسته و آن را اسب کوچک خزر (Caspian Miniature Horse) می‌نامند(۱،۲،۴،۱۱،۱۳).

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که برخلاف نتایج حاصل از مطالعه Wilmink و همکاران درسال ۲۰۰۱ و Miller و همکاران درسال ۲۰۰۰، تفاوتی در الگوی رشد فیبرو بلاستهای اسب و اسبچه خزر دیده نشد که عدم اختلاف در این مورد می تواند به دلیل مشابهت ژنتیکی بین اسب و اسبچه خزر باشد، که متعاقباً به تفصیل در مورد جزئیات نتایج حاصل از این مطالعه بحث می‌گردد. البته قابل ذکر است که در مطالعات قبلی این مقایسه بین اسب و پونی صورت گرفته بود و تاکنون هیچگونه تحقیقی برروی روند التیام زخم در اسبچه خزر صورت نگرفته است و تمام تحقیقات گذشته بر روی مقایسه التیام زخم بین اسب و پونی معطوف بوده است.

همانطور که در بخش نتایج مطالعه حاضر ذکر گردید، از ۸ مورد بافت زیر جلدی جدا شده (۴ اسب و ۴ اسبچه خزر)، در ۷ مورد (۳ اسب و ۴ اسبچه خزر) در همان بار اول فیبرو بلاستها از بافت جدا شده و شروع به تکثیر نمودند و فقط در یک مورد اسب در دفعه اول فیبرو بلاست از بافت جدا نشد که نمونه‌گیری دوباره از بافت انجام شد. در تحقیقاتی که Miller و همکاران در سال ۲۰۰۰ برروی سرعت رشد فیبرو بلاست‌های اندام حرکتی و تنه اسب و پونی در محیط آزمایشگاهی انجام دادند، عنوان کردند که از ۲۲ رأس اسب، در ۷ مورد و از ۱۷ رأس پونی، در ۱۲ مورد فیبرو بلاست از بافت زیر جلدی اندام حرکتی و تنه جدا شده و شروع به تکثیر نمودند. البته قابل ذکر است که در این تحقیق، از ۲۲ رأس اسب، ۱۱ رأس دارای بیماری سیستمیک و ۱۱ رأس دارای بیماری موضعی غیر پوستی بوده اند که در ۱۶ مورد بلافاصله بعد از نمونه‌گیری حیوانات معدوم شده و از ۱۷ رأس پونی، ۱۰ رأس سالم و ۷ رأس دارای بیماری سیستمیک یا موضعی غیر پوستی بوده‌اند که در ۷ مورد بلافاصله بعد از نمونه‌گیری حیوانات معدوم شدند. آنها علت کاهش در میزان جدا شدن فیبرو بلاست‌ها از بافت و کاهش سرعت رشد آنها را علی رغم سالم بودن پوست، به دلیل تحت تأثیر قرار گرفتن متابولیسم سلولهای بافت زیر جلدی پوست در شرایط بیماری و همچنین اثر توکسیک داروهای بیهوشی با دز بالا بر روی سلولها در زمان نمونه‌گیری، قبل از معدوم کردن حیوانات، عنوان کردند. از طرفی آنها ذکر کردند که در تمام پونی های سالم، فیبرو بلاست از بافت جدا شده و به خوبی تکثیر یافتند و البته در بعضی موارد، آلودگی میکروبی در محیط کشت علی‌رغم رعایت شرایط آسپتیک دیده شد. این محققین بیان کردند که اشتباهات تکنیکی در زمان برداشت بافت زیر جلدی و آماده‌سازی آن برای کشت سلول، می‌تواند سبب کندی رشد سلول گردد. در نهایت این محققان اظهار می‌دارند که به دلیل یکسان نبودن شرایط بدنی اسب‌ها و پونی‌ها از لحاظ سلامت جسمی، همچنین به دلیل تفاوت در نحوه نمونه‌گیری (در حیوانات سالم نمونه‌گیری تحت آرام بخشی و بی حسی موضعی و در حیواناتی که معدوم می‌شدند، تحت بیهوشی عمومی با دز بالای داروی بیهوشی انجام شد) بحث در مورد نتایج حاصل از این مطالعه را مشکل دانستند(۱۷). به نظر می‌رسد که دلیل یک مورد عدم رشد فیبرو بلاست در مطالعه حاضر با توجه به سالم بودن تمام حیوانات و یکسان بودن شرایط جهت نمونه‌گیری، به خاطر خصوصیات ژنتیکی اسب مورد نظر باشد که فیبرو بلاست‌های آن به طور ذاتی در محیط کشت به سختی از بافت جدا شده و شروع به تکثیر می‌نمایند. البته احتمال اشتباهات تکنیکی در مراحل مختلف از زمان نمونه‌گیری تا زمان کشت بافت و تعویض محیط کشت را نمی‌توان کاملاً رد کرد.

همانطور که در بخش نتایج این مطالعه آورده شده است، فیبرو بلاستها در اسب‌ها و اسبچه‌های خزر در هفته اول از بافت زیر جلدی کاشته شده در کف فلاسک جدا شدند و در اسب‌ها بعد از ۱۷/۷۵ روز و در اسبچه‌های خزر بعد از ۱۷/۲۵ روز پرگنه‌های بزرگ سلولی دیده شد که سلولها به صورت متراکم (Confluence) در اطراف بافت دیده شدند(تصویر ۳). در مطالعه‌ای که Galassi و همکاران درسال ۲۰۰۰ برروی کشت فیبرو بلاست‌های بافت زیر جلدی انسان انجام دادند، عنوان کردند که در طول هفته اول فیبرو بلاست از بافت جدا شده و در عرض ۲ هفته از زمان کاشت بافت، پرگنه های بزرگ سلولی تشکیل شد(۱۲). وجود تفاوت در مدت زمان رشد فیبرو بلاستها بین مطالعه Galassi و مطالعه حاضر می تواند به دلیل تفاوت در خصوصیات ذاتی فیبرو بلاست‌های اسب و انسان و همچنین اختلاف در تکنیک کشت سلول باشد.

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که جدا شدن فیبرو بلاستها از بافت زیر جلدی متاکارپ و چسبیدن آنها به کف فلاسک در اسبچه خزر تا حدی زودتر و بهتر از اسبها صورت گرفته است. البته Wilmink و همکاران در سال ۲۰۰۱ نیز ذکر کردند که فیبرو بلاست‌های اندام حرکتی پونی‌ها کمی زودتر از اسب‌ها از بافت جدا شده و زودتر به کف فلاسک چسبیده و شروع به تکثیر نمودند(۲۳).

همچنین نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که هیچ تفاوت معنی داری در سرعت تکثیر فیبرو بلاست‌های اسب و اسبچه خزر در محیط in vitro وجود ندارد که با آنچه که در الگوی رفتاری فیبرو بلاستهای اسب و پونی دیده شده متفاوت می باشد که دلیل این تفاوت می تواند به خاطر قرابت ژنتیکی بسیار نزدیک در اسب و اسبچه خزر باشد.

درصد توانایی زیستی فیبروبلاستهای اسب و اسبچه خزر نیز هیچگونه تفاوت معنی‌داری را نشان نداده‌اند، البته در مطالعه‌ای که بر روی توانایی زیستی فیبروبلاستهای اسب و پونی در محیط in vitro صورت گرفته نیز عنوان شده است که اختلاف معنی‌داری در میزان درصد این فاکتوربین دو گروه دیده نشد(۲۳). درصد توانایی زیستی فیبروبلاستهای اسب و اسبچه خزر به تدریج با گذشت زمان کاهش می یابد که علت این کاهش به خاطر کاهش مواد غذایی مورد نیاز سلول در محیط کشت و همچنین پیر و فرتوت شدن این سلولها می‌باشد(۱۶).

منحنی طبیعی رشد سلول در محیط کشت به شکل یک منحنی سیگموئید بوده که این منحنی شامل ۴ فاز می‌باشد که به ترتیب شامل: ۱- فاز تأخیری (Lag phase) ۲- فاز رشد تصاعدی (Logarithmic phase) ۳- فاز سکون (Plateau phase) ۴- فاز کاهشی (Decline phase) است.

فاز تأخیری از لحظه کاشت سلولها در محیط کشت آغاز می‌شود. در این فاز سلولها هیچگونه تقسیم میتوزی را نشان نمی‌دهند، در واقع در این فاز سلولها سعی می‌کنند که با محیط کشت جدید سازگار شوند. در فاز رشد تصاعدی، تقسیم سلولها آغاز شده و تعداد سلولها سریعاً افزایش می یابد. در این فاز حدود ۹۰ تا ۱۰۰ درصد سلولها در مرحله تقسیم بسر برده و اکثر سلولها سالم و سرحال می‌باشند و میزان مرگ و میر در آنها پائین است. در فاز سکون، میزان تکثیر سلولها کاهش یافته و تراکم سلولها در محیط زیاد می‌باشد و سلولها با هم تلاقی (Confluence) پیدا می‌کنند. در این فاز میزان کمی از تقسیم سلولی دیده می‌شود. در واقع میزان تقسیم و مرگ سلولی در حد متعادلی می‌باشد، در نتیجه تعداد سلول افزایش نمی یابد. در این فاز حدود ۱۰ درصد سلولها در مرحله تقسیم دیده می‌شوند. میزان آسیب پذیری سلول در این فاز زیاد می‌باشد. گاهی طول مدت این فاز بسیار کوتاه بوده و سریعاق تعداد سلول کاهش یافته و وارد فاز کاهشی می‌شوند. در فاز کاهشی تعداد سلولها به خاطر عدم تقسیم سلولی، میزان بالای مرگ و میر به علت کاهش مواد غذایی و تراکم زیاد سلولها و آسیب پذیری شدید به سرعت کاهش می یابد(۱۶).

همانطور که در نمودار ۱ آورده شده است، در مطالعه حاضر، فیبروبلاست‌های جدا شده از اندام حرکتی اسب واسبچه خزر الگوی رفتاری مشابهی نشان می‌دهند. در هر دو گروه سلولها از لحظه کاشته شدن (۴۸ ساعت قبل از آغاز شمارش) تا روز اول شمارش در فاز تأخیری بوده که افزایش در تعداد سلول در این ۳ روز دیده نشد. در واقع علت کاهش تعداد سلولها، به خاطر از بین رفتن سلولهایی است که در هنگام پاساژ دادن و انتقال آنها به داخل پلیت ۲۴ تایی آسیب دیده اند. فاز تصاعدی در روز دوم شمارش سلول شروع شده و تا روز ۶ در مورد گروه اسب‌ها و تا روز ۷ در گروه اسبچه‌های خزر ادامه یافت که تعداد سلولها به طور معنی داری افزایش یافته است. قابل ذکر است که در این مطالعه، مدت زمان فاز سکون کوتاه بوده و تعداد سلولها به سرعت کاهش یافته و وارد فاز بعدی که همان فاز کاهشی می‌باشد، می‌شوند که از این به بعد با گذشت زمان تعداد سلولها به سرعت کاهش می یابند.

از یافته‌های بدست آمده از این مطالعه می‌توان چنین استنباط کرد که علی‌رغم اندازه بدنی کوچک (در حد پونی) اسبچه‌های خزر به دلیل قرابت ژنتیکی بسیار نزدیک با اسب، دارای فیبروبلاستهایی با خصوصیات ذاتی رشد مشابه هستند و احتمالاً میزان تشکیل بافت گرانوله و الگوی ترمیمی مشابهی دارا خواهند بود و فاکتور اندازه بدنی نقش چندانی در بروز عوارض زخم ندارد، البته پرواضح است که برای تأیید این فرضیه باید در شرایط in vivo الگوی ترمیم زخم را در اسبچه خزر بررسی و با اسب مقایسه نمود تا بتوان فاکتورهای موثر در بروز عوارض زخم اندام حرکتی اسب را مشخص کرده و با دستکاری این فاکتورها درمان قابل قبولی را ارئه داد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی استان تهران، بخش جراحی دام بزرگ بیمارستان شماره ۱ و آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران که در مراحل مختلف انجام این تحقیق با ما همکاری نموده‌اند و همچنین از معاونت محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی و دانشگاه تهران به خاطر تصویب و حمایت مالی از این طرح، تشکر و قدردانی می گردد.

References

۱. ساعی، ه.، صادقی، خ.، میریان، ج. (۱۳۷۷): ارزیابی بیومتریک اسبچه خزر. پایان نامه جهت دریافت دکترای دامپزشکی، شماره ثبت: ۲، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان.

۲. دورداری، ش.، میریان، ج.، دست افشان، م. (۱۳۷۹): اسبچه خزر. سازمان میراث فرهنگی ایران - پژوهشکده مردم شناسی، صفحه: ۷۷- ۳۲.

۳. قمصری، س.م.، دهقان، م.م.، راعی-دهقی، م.، نوروزیان، ا. (۱۳۸۰): ارزیابی بالینی اثرات دو روش درمان جراحی بافت گرانوله اضافی در زخم های اندام حرکتی اسب. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۶، شماره ۱، ۷۴-۶۹.

4. Afshar, A., Huck, R.A.(1978) The Caspian miniature horse and its relationship to the ancient Lydian horse. The Ark. 5:152-154.
5. Barber, S.M., Caron, J.(1987) The effect of bandaging on second intention wound healing in the horse. Vet. Surg. 16:82.
6. Berry, D.B., Sullins, K.E.(2003) Effects of topical application of antimicrobials and bandaging on healing and granulation tissue formation in wounds of the limb in horses. AJVR, 64:88-92.
7. Bertone, A.L.(1989) Management of exuberant granulation tissue. The veterinary Clinics of North America. 5: 551-562.
8. Bertone, A.L.(1989) Second- Intention healing. Veterinary Clinics of North America: Equine practice. 5: 539-550.

9. Bertone, A.L., Sullins, K.E., Stashak, T.S., Norrdin, R.W.(1985) Effects of wound location and the use of topical collagen gel on exuberant granulation tissue formation and wound healing in the horse and pony. Am. Vet. Res. 49:1438-1444.
10. Cochrane, C.A., Pain, R., Knottonbelt, D.C.(2002) In vitro contraction in the horses: differences between body and limb wound. Wounds - A Compendium of Clinical Research and Practice. 15: 175-181.
11. Firouz, L.(1978) The Caspian miniature horse in Iran; in the international Caspian studbook. Country wild livestock Ltd. Halt Whistle, England. 2: 11-16.
12. Glassi, G., Brun, P., Radice, M., Cortivo, R., Zanon, G.F., Genovese, P., Albatangelo, G.(2000) In vitro reconstructed dermis implanted in human wounds: degradation studies of the HA- based supporting scaffold. Biomaterials 21: 2183-2191.
13. Hatami-monazah, M., Afshar, A.(1979) A view of genealogy of the Caspian miniature horse of Iran as revealed by chromosome studies. The Ark. 6:260-261.
14. Hendrickson, D., Virgin, J.(2005) Factors that effect equine wound repair. Vet. Clin. Equine. 21: 33-34.
15. Knottonbelt, D.C.(2002) Factors that delay healing. Journal of Equine Veterinary Science. 22:451-455.
16. Mc Ateer, J.A., Davis, J.M.(2002) Basic culture technique and the maintenance of cell lines; in basic cell culture. Second Edition, J.M. Davis, By the Bath Press, Avon. pp. 163-165.
17. Miller, B.M., Wilson, D.A., Keegan, K.G., Kreeger, J.M., Adelstein, E.H., Ganjam, V.K.(2000) Growth characteristics of fibroblasts isolated from the trunk and distal aspects of the limb of horses and ponies. Veterinary Surgery. 29: 1-7.
18. Schwartz, A.J., Wilson, D.A., Keegan, K.G., Ganjam, V.K., Weber, K.T., Zhang, J.(2002) Factors regulating collagen synthesis and degradation during second- intention healing of wound in the thoracic region and the distal aspect of the fore limb of horses. American Journal of Veterinary Research. 63: 1564-1570.
19. Silver, I.A.(1989) Basic physiology of wound healing in the horse. Equine Vet. J. 14: 7-15.
20. Theort, C.L., Barber, S.M., Moyona, T.N., Gordon, G.R.(2001) Expression of TGFβ1,β3 and basic fibroblast factor in full thickness skin wound of equine limb and thorax. Veterinary Surgery, 30:269-277.
21. Wilmink, J.M., Van Weeren, P.R. (2005) Second-intention wound repair in the Horse and pony and management of exuberant granulation tissue. Vet. Clin. North Am. Equine practice. 21: 15-35.
22. Wilmink, J.M., Van Weeren, P.R.(2004) Differences in wound contraction between horses and ponies; Application of Research results to the clinical approach of equine wounds. Clin Tech Equine Pract. 3: 123-133.
23. Wilmink, J.M., Nederbragt, H., Van Weeren, P.R., Stolk, P.W., Barneveld, A.(2001) Differences in wound contraction between horses and ponies; the in vitro contraction capacity of fibroblasts. Equine Vet. J. 33: 499-505.
24. Wilmink, J.M., Nederbragt, H., Van Weeren, P.R., Stolk, P.W., Barneveld, A.(1999) Differences in Second- intention wound healing between horses and ponies: histological aspects. Equine Vet. J. 31: 61-7.
25. Wilmink, J.M., Stolk, P.W., Van Weeren, P.R., Barneveld, A.(1999) Differences in Second-intention wound healing between horses and ponies: macroscopical aspects. Equine Vet. J. 31, 53-60.
26. Wilson, D.A., Adelstein, E.H., Keegan, K.G., Barret, B.A., Kutz, R.R.(1996) In vitro and In vivo effects of activated macrophage supernatant on distal wounds of ponies. AJVR. 57: 1220-1224.

J.Vet.Res. 62,3:169-176,2007

GROWTH CHARACTERISTICS OF ISOLATED FIBROBLASTS FROM THE DISTAL LIMB OF THOROUGHBRED HORSES AND CASPIAN MINIATURE HORSES

Azari, O.[1], Ghamsari, S. M.[1*], Dehghan, M.M.[1], Aghcheloo, M.R.[1]

[1]*Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran*

(Received 3 September 2005 , Accepted 7 June 2006)

Abstract:

In this study, in vitro growth characteristics of fibroblasts of metacarpal region of horses and Caspian miniature horses were evaluated. Under general anesthesia and aseptic condition, A full thickness skin incision was created on the lateral aspect of mid-third of left metacarpal region of 4 mixed thoroughbred horses and 4 caspian miniature horses and 3 grams of subcutaneous tissue was harvested and placed in culture medium (RPMI-1640) in an incubator at 37°C (5%CO2). After growth of fibroblasts, count of cells was performed for 8 days and growth rates and percentage viability of fibroblasts were recorded. There were no significant differences in the growth rates and viability rate of fibroblasts between horses and caspian horses. It was therefore concluded that due to Genetic similarity between horses and caspian horses, growth characteristics of fibroblasts in these two groups are the same, but Further In vivo research is needed to identify the wound healing pattern in Caspian horses in compare with horses.

Key words: thoroughbred horse, caspian miniature horse, growth characteristics of fibroblast, metacarpus, cell culture medium.

***Corresponding author's email:ghamsari@ut.ac.ir,Tel: 021-61117164 , Fax:021-66933222**