Archive of SID

مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۶، دوره ۶۲، شماره ۶، ۳۹۷-۳۹۱

اتصال و تکثیر سلول‌های فیبروبلاست و کراتینوسیت اسب درون چسب فیبرین

محمدرضا آقچه‌لو[۱] سیدمهدی قمصری[۲]* محمدمهدی دهقان[۲] سعید انصاری‌مجد[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 استخراج‌شده از خون اسب در تهیه چسب فیبرین و اثرات آن برروی سلول‌های فیبروبلاست و کراتینوسیت اسب مورد مطالعه قرارگرفته است. فیبرینوژن توسط روش رسوب گلایسین (Glycine precipitation technique) از پلاسمای اسب‌ها جداگردید. سلول‌های فیبروبلاست توسط روش کشت قطعات بافتی (Explant culture) از پوست ناحیه گردن وسلول‌های کراتینوسیت توسط روش‌های هضم آنزیمی (enzyme digestion) از پوست ناحیه لب در هر یک از اسب‌ها جداشدند. سپس مجموعه فیبرینوژن وسلول‌های فیبروبلاست و کراتینوسیت خودی اسب جداگانه توسط ترومبین گاوی وگلوکونات کلسیم و اسید ترانگزامیک در یک پلیت کشت‌سلولی ریخته‌شده و به‌صورت همگن منعقدشده وسلول‌ها به مدت شش روز مورد بررسی قرارگرفتند. سلول‌های فیبروبلاست در روز دوم از حالت مدور درآمده و کاملاً دوکی و کشیده‌شده بودند، این موضوع در تمام ضخامت چسب فیبرین قابل مشاهده بود. در این زمان‌سلول‌های کراتینوسیت به‌صورت مسطح‌شده در محل اتصال چسب فیبرین به کف پلیت مشاهده‌شدند. هر دو نوع سلول بعد از سه روز تکثیر یافته بودند. فیبرینوژن استحصال‌شده از خون اسب توسط روش رسوب گلایسین به‌عنوان 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 کشت‌سلولی و چسب فیبرین مشاهده می‌شود که نشاندهنده 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.

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 دست‌رفتن بافت می‌باشد که استفاده از بخیه را برای بستن زخم‌ها غیرممکن 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 کمترشدن مسائل این دسته از زخم‌ها و تسریع التیام ارائه شده ولی اثرات اثبات شده زیادی برروی التیام زخم در اندام حرکتی اسب نداشته‌اند(۳۱، ۱۹، ۱۲، ۲، ۱).

زخم‌های نواحی پایینی اندام حرکتی در اسب نه تنها یک مدل ایده‌آل برای بررسی التیام مشکل در میان زخم‌های اسب است 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 به‌طور عمده برای اتصال و التیام بافت‌های آسیب دیده در طی جراحی یا بعد از تروما استفاده می‌شود. خصوصیات مثبت فیبرین عملکرد پوششی (Sealant function)، اثر خونبندی (Hemostasis effect) و افزایش التیام زخم است (۳).

چسب فیبرین ممکن است وقتی‌که در زخم‌های سوختگی مورد استفاده قرار می‌گیرد مزایای دیگری از جمله اثرات هموستاتیک و خواص ضدمیکروبی 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 سلول هایی 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 میلی‌لیتر است(۱۰)، استفاده از چسب فیبرین خودی را در اسب توجیه می‌کند.

بیش از دو دهه است که سلول‌های کراتینوسیت و فیبروبلاست انسانی را در محیط آزمایشگاه کشت داده و این سلول‌ها را به‌صورت خودی و غیرخودی برروی سوختگی‌های وسیع و زخم‌های مزمن جهت تسریع التیام انتقال می‌دهند(۲۵، ۲۳، ۱۵، ۷).

*)نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۶۴۲۷۵۱۷-۰۲۱، نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email: ghamsari@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

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

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

این مطالعه به عنوان پیش زمینه‌ای برای انتقال سلول‌ها با کمک چسب فیبرین خودی برای مصارف بالینی و حصول اطمینان از نه تنها بی‌ضرر بودن بلکه مفید بودن این چسب برای سلول‌های کشت داده شده می‌باشد.

مواد و روش کار

در این مطالعه از تعداد ۴ راس مادیان دوخون سالم و بالغ با وزن متوسط ۱۱۹±۳۲۵ کیلوگرم استفاده شد. برای کشت سلول‌های فیبروبلاست نمونه پوستی با مساحت تقریبی یک سانتیمتر مربع به‌صورت تمام ضخامت توسط بی حسی موضعی لیدوکائین هیدروکلراید ۲ درصد و به‌صورت کاملاً استریل از پوست ناحیه گردن اسب‌ها گرفته شد. سپس نمونه بافتی به داخل ۱۰ سی‌سی محیط کشت سلولی RPMI-1640 (R-8005-10L, Germany) (Rosewell Park Memorial Institute-1640, Sigma-Aldrich, همراه پنی‌سیلین (۱۰۰IU/ml) و استرپتومایسین (۱۰۰µg/ml) و بی‌کربنات سدیم (۲gm/lit) و در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌ها پس از شستشوی با PBS(Phosphate-buffered Salin) ، با قیچی به قطعات بسیار ریز تقسیم شده و با روش کشت قطعات بافت (Explant culture) جهت جداسازی سلول‌های فیبروبلاست به فلاسک کشت سلولی ۲۵ سانتیمتر مربع (Nunc, 163371, Denmark) انتقال داده شدند و ۳ سی‌سی محیط کشت ذکرشده 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 سلول‌های فیبروبلاست به‌اندازه کافی از بافت‌ها خارج شدند قطعات بافتی از فلاسک خارج شده و بعد از حدود دو هفته ۷۰ درصد متراکم شدند و سلول‌ها توسط تریپسین (Tripsin 1:250, Sigma, T-4799, Germany) ۰/۲۵ درصد و EDTA (Tetraacetic Acid) Ethylene Diamine) یک میلی‌مولار تریپسینه شده و به تعداد ۲۰۰×۱۰^{۳} به فلاسک کشت سلولی ۲۵ سانتیمتر مربع دیگری منتقل شدند و نهایتاً پاساژ سوم سلول‌ها جهت انتقال درون چسب فیبرین استفاده شد(۵).

از هر مادیان ۲۰۰ سی‌سی خون محیطی به‌صورت کاملاً استریل از ورید وداج همراه با ماده ضدانعقاد سیترات سدیم ۳/۸ درصد و با نسبت ۹:۱ اخذ شد. در آزمایشگاه، خون اخذشده ۱۰ دقیقه با ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و حدود ۱۲۰ سی‌سی پلاسمای آن جدا شد. از پلاسما با روش رسوب گلایسین (Glycine precipitation technique) فیبرینوژن استخراج گردید.

سولفات منیزیم و باریم بدون آب در غلظت ۲۰ میلی‌مولار در لیتر و ۹۰ گرم در لیتر به پلاسمای جدا شده اضافه شد، بعد از به‌هم‌زدن 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 اندازه‌گیری مایع جدا شده حاصل از سانتریفوژ، گلایسین به آرامی اضافه شده تا به غلظت نهایی ۲/۲ مولار برسد. مجدداً این محلول برای ۳۰ دقیقه به‌هم زده شده و سپس برای ۲۰ دقیقه با ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. این بار مایع رویی دور ریخته‌شده و رسوب بدست آمده در ۱۲۰ سی‌سی سیترات سدیم ۰/۰۵۵ مولار در pH۷/۴ محلول شد و رسوب‌دادن توسط گلایسین مجدداً تکرارگردید. نهایتاً رسوب در PBS محلول شد(۱۴). سنجش پروتئین (فیبرینوژن) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Eppendorf Biophotometer, Germany) انجام شد، سپس فیبرینوژن اخذشده توسط فیلتر ۰/۲ میکرون استریل گردید و در فریزر ۲۰- نگهداری شد. علاوه‌بر فیبرینوژن، ترومبین گاوی (Thrombin, Sigma, T-4648, Germany) و گلوکونات کلسیم در سرم نمکی محلول شده، برای انعقاد فیبرینوژن مورد استفاده قرار گرفت. علاوه‌بر مواد بالا یک ماده ممانعت‌کننده از لیزشدن فیبرین (Fibrinolytic inhibitor) یعنی اسید ترانگزامیک (Tranexamic acid) به میزان ۰/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به سرم نمکی اضافه گردید.

بعد از یک هفته از گرفتن نمونه پوست گردن، برای کشت سلول‌های کراتینوسیت نمونه‌ای با مساحت یک سانتیمتر مربع از پوست ناحیه لب پایینی توسط بی حسی موضعی با لیدوکائین هیدروکلراید ۲ درصد و به‌صورت کاملاً استریل از ناحیه لب مادیان‌ها اخذ شده و به درون ۱۰ سی‌سی محیط کشت ویلیامز E (Mediume 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 میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر و برای ۲۴ ساعت در ۴ درجه سانتیگراد جدا گردید. بعد از عمل تریپسینه‌کردن (Tripsinisation) سلول‌های لایه بازال از هم جدا شده در یک فلاسک حاوی محیط کشت ویلیامز E کشت داده شدند (۱۱). پس از رشد سلول‌های کراتینوسیت و پرکردن حدود ۸۰-۷۰ درصد فلاسک (Confluent)

www.SID.ir

Archive of SID

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

تصویر ۲- سلول‌های فیبروبلاست گردن اسب روز اول بعد از کشت.

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

عمل تریپسینه کردن صورت پذیرفت و نهایتاً سلول‌ها در پاساژ دوم به درون چسب فیبرین منتقل شدند.

جهت انعقاد چسب فیبرین حاوی سلول‌های کراتینوسیت و فیبروبلاست هر اسب، ۰/۵ سی‌سی سوسپانسیون سلول‌های کراتینوسیت به تعداد ۲۵۰ هزار سلول در محیط ویلیامز E و ۰/۵ سی‌سی سوسپانسیون سلول‌های فیبروبلاست به تعداد ۲۵۰ هزار سلول در محیط RPMI-1640 را با نیم سی‌سی فیبرینوژن (۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در دو پلیت کشت سلولی با قطر ۳۰ میلی‌متر (Nunc,240045,Denmark) به‌طور جداگانه مخلوط نموده سپس نیم سی‌سی سرم نمکی حاوی ترومبین، گلوکونات کلسیم و اسید ترانگزامیک را به‌طور جداگانه به هر یک از سوسپانسیون‌ها اضافه شد. این مجموعه‌ها در کمتر از ۱۰ ثانیه منعقد شدند (تصویر ۱). سپس به پلیت حاوی سلول‌های کراتینوسیت یک سی‌سی محیط کشت ویلیامز E حاوی ۱۰ درصد FBS و به پلیت حاوی سلول‌های فیبروبلاست یک سی‌سی محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد FBS اضافه گردید و پلیت‌ها 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 سلول‌ها 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 سلول‌های کراتینوسیت و دیگری حاوی محیط کشت RPMI-1640 بدون سلول‌های فیبروبلاست تهیه گردید تا از نظر ماندگاری انعقاد چسب فیبرین مورد مطالعه قرار گیرند.

نتایج

از هر اسب با استفاده از روش رسوب گلایسین ۲۲ سی‌سی فیبرینوژن اخذ شد که میزان متوسط سنجش پروتئین (فیبرینوژن) ۲/۵±۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بوده است.

با استفاده از میکروسکوپ معکوس روز اول بعد از کشت سلول‌های فیبروبلاست از حالت مدور که به علت تریپسینه 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 سلول‌ها در درون بافت‌ها است که به‌صورت سه بعدی رشد می‌کنند (تصویر ۲).

در روز دوم سلول‌های فیبروبلاست حالت کشیده‌تر پیدا کرده بودند و در روز سوم این سلول‌ها 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 جداشدن سلول‌ها از داربست خود شده و سلول‌ها به‌صورت مدور درآمدند، به‌طوری که در روز ششم چسب فیبرین به‌صورت کامل تجزیه شده و تعداد کمی سلول فیبروبلاست به پلیت چسبیده بودند. چسب فیبرین بدون سلول (کنترل) حاوی محیط کشت RPMI-1640 تا شش روز قوام خود را حفظ نمود.

در پلیت‌های حاوی سلول‌های کراتینوسیت بعد از یک روز سلول‌های کراتینوسیت را به‌صورت مسطح شده در محل اتصال چسب فیبرین به کف پلیت مشاهده شدند این امر به این علت می‌باشد که سلول‌های کراتینوسیت برروی سطوح رشد می‌کنند (تصویر ۳)، ولی سلول‌های کراتینوسیت که در

www.SID.ir

Archive of SID

میان چسب فیبرین قرار داشتند به حالت مدور باقی ماندند.

سلول‌های کراتینوسیت که به پلیت چسبیده بودند در روز دوم تکثیر یافته و کلنی‌های آنها بزرگتر شده بود و در روز سوم این تزاید سلول‌ها محسوس‌تر شده و حتی کلنی‌های ده تایی از سلول‌های کراتینوسیت قابل مشاهده بود. در روز ششم سلول‌های کراتینوسیت به‌صورت کاملاً متراکم مشاهده شدند. قوام چسب فیبرین در این سلول‌ها نیز از روز چهارم به بعد کاهش محسوسی پیدا کرده بود ولی به‌علت اینکه تعداد سلول‌هایی که در ابتدا در تماس با پلیت بودند کم بود، چسب فیبرین تا روز ششم به‌صورت 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 سلول‌های اپیدرم کشت‌داده شده خودی CEA (Cultured epidermal cell autograft) یک روش شناخته‌شده برای پوشش زخم‌های وسیع در انسان است. در این روش سلول‌های کراتینوسیت خودی در محیط آزمایشگاه کشت داده شده و زمانی که سلول‌های کراتینوسیت در محیط آزمایشگاه مانند پوست چند لایه شدند توسط روش‌های آنزیمی جدا شده و بر روی زخم‌ها کاشته شوند. از معایب این روش فاصله زمانی زیاد برای آماده‌سازی سلول‌ها، شکنندگی و مشکل بودن جابجایی (Handling) پیوندها و میزان غیرقابل پیش‌بینی گرفتن پیوند و هزینه بالای آن می‌باشد (۲۲، ۲۰، ۷).

جهت حل مشکلات زیادی که در مورد صفحات CEA وجود دارد مسئله استفاده از سلول‌های کراتینوسیت که متراکم نشده‌اند (Preconfluent) مطرح شد یعنی انتقال سلول‌ها از محیط کشت به بستر زخم قبل از اینکه تشکیل صفحات را بدهند و به‌هم رسیدن سلول‌ها (Confluence) و تمایز آنها (Diffrentiation) آنها بر روی موجود زنده صورت پذیرد. مزایای اصلی این روش عبارتند از: ۱) سلول‌های کراتینوسیت را می‌توان در زمان کمتری یعنی حدود ۱۰ روز منتقل نمود. ۲) سلول‌ها مستقیماً روی یک سیستم انتقالی برده شوند که سپس مستقیماً به بیمار منتقل می‌شوند و از آسیب‌های بالقوه به‌دنبال جداسازی آنزیمی سلول‌ها جلوگیری می‌کند. دیسپاز آنزیمی است که برای آزادسازی صفحات اپیدرم از محیط کشت استفاده می‌شود ممکن است پروتئین‌های سطحی را از سلول‌های کراتینوسیت برداشت کرده و باعث کاهش قدرت چسبندگی آنها شود، ۳) سلول‌ها در حالی‌که حالت تکثیری بیشتری دارند و میزان بیشتری اینتگرین (Integrin) را بیان می‌کنند، بنابراین چسبندگی آنها تسهیل می‌شود، ۴) سلول‌های کراتینوسیت که متراکم نشده‌اند در سوسپانسیون ممکن است تشکیل غشاء پایه‌ای که بیشتر پیوسته و گسترش یافته و محل اتصال درم و اپیدرم را همانگونه که در مدل زخم خوک نشان داده شده را محکم‌تر نماید (۷، ۲۰).

اولین‌بار Kaiser و همکاران در سال ۱۹۹۴ روش کاشت سلول‌های کراتینوسیت در ماتریکس فیبرینی KFGS (Fibrin Glue Suspension Keratinocyte) را ارائه دادند. در این مطالعه سه بیمار با سوختگی‌های تمام یا قسمتی از پوست مورد درمان با روش KFGS قرار گرفتند که در دو بیمار برروی KFGS پوست نیمه ضخامت جسد آلوژنیک که توسط گلیسیرین 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 هیچ‌کدام از این مطالعات رشد و تکثیر سلول‌های کراتینوسیت و فیبروبلاست درون چسب فیبرین در محیط آزمایشگاه مورد مطالعه قرار نگرفته است و نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد در صورتی که از روش KFGS برای التیام زخم‌های باز استفاده می‌شود بایستی تعداد سلول‌های کراتینوسیت در هر میلی‌لیتر چسب فیبرین زیاد باشد تا تعداد سلول‌های کراتینوسیت که با بستر زخم در تماس قرار می‌گیرند افزایش یابد زیرا در میان چسب فیبرین سلول‌های 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 می‌پذیرد در حالی که سلول‌های فیبروبلاست قادر به چسبیدن و تکثیر در میان چسب فیبرین و به صورت سه بعدی هستند.

از چسب فیبرین در درمان زخم‌های مزمن با منشاءهای مختلف نیز استفاده شده است. Horch و همکاران در سال ۲۰۰۱ در مطالعه‌ای در یازده بیمار با زخم‌های مزمن از روش KFGS استفاده نمودند و ذکر کردند که همه زخم‌هایی که تاریخچه ۴ ماهه تا ۱۴ ساله داشتند به‌طور کامل و یا نزدیک به کامل در طی دوره درمان مجدداً بافت پوششی (Reepithelialized) تشکیل شد. البته در برخی از زخم‌ها، درمان بیش از سه بار تکرار گردید (۲۱) و می‌توان با استفاده از روش KFGS جهت درمان زخم‌های مزمن، خصوصاً زخم‌های نواحی پایینی اندام حرکتی اسب با استفاده از چسب فیبرین خودی اقدام نمود.

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

فیبرین و پلاسمای غنی از پلاکت (Platelet rich plasma) میزان تشکیل مجدد بافت پوششی (Reepithelialization rate) را افزایش می‌دهند (۲۴). تأخیری در ذخیره پروتئین‌های محل اتصال درم و اپیدرم (Dermoepidermal Junction, DEJ) وقتی‌که صفحات اپیدرم (sheets Epidermal) توسط چسب فیبرین برروی موش‌های 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 سلول‌های

www.SID.ir

Archive of SID

فیبروبلاست و کراتینوسیت در چسب فیبرین FKFGS (Glue Suspension Fibroblast Keratinocyte Fibrin) همراه با پوست آلوژنیک برای پوشش سوختگی‌های درجه ۳ که به تازگی پاکسازی شده‌اند برروی لایه فاسیای عضلات در سوختگی‌های وسیع با ۹۵ درصد TBSA (Body Surface Area Total) مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۰).

مطالعات اخیر نشان می‌دهد که تجمع ماده زمینه‌ای خارج سلولی ECM (Extra Cellular Matrix) در زخم‌های اندام حرکتی اسب ممکن است به‌علت انسداد عروق ریز (Microvascular occlusion) و کاهش مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (Apoptosis) باشد. کاهش مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌ها باعث افزایش تعداد سلول‌های فیبروبلاست در زخم شده و تعادل بین تولید و از بین‌رفتن کلاژن را به‌هم می‌زند که نهایتاً باعث تشکیل بافت جوانه‌ای اضافی می‌شود. بنابراین به‌نظر می‌رسد که بافت جوانه‌ای اضافی در اثر عدم تنظیم تکثیر سلول‌های فیبروبلاست (fibroplasia Dysregulated) تشکیل می‌شود. کاهش طبیعی پاسخ حاد ایمنی بایستی همراه با کاهش ساخت اجزاء ECM باشد و باعث تمایز سلول‌های فیبروبلاست تکثیریافته و سازنده ECM به سلول‌های میوفیبروبلاست (Myofibroblasts) منقبض‌شونده، 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 می‌شود سلول‌های میوفیبروبلاست به سلول‌های فیبروبلاست در حال استراحت تبدیل شده و یا توسط روند مرگ برنامه‌ریزی شده ناپدید می‌شوند. اگر تعداد سلول‌های میوفیبروبلاست ناکافی باشد ممکن است انقباض به‌خوبی صورت نپذیرد. در مقابل وقتی سلول‌های میوفیبروبلاست بیش از زمانی که برای بستن زخم نیاز است حضور داشته باشند ممکن است باعث تجمع ماده زمینه‌ای خارج سلولی و انقباض پاتولوژیک شوند که خصوصاً زمانی که مفاصل یا منافذ بدن (Body orifices) را درگیر می‌کند بسیار اتفاق می‌افتد (۳۰)، رشد سلول‌های فیبروبلاست جداشده از اندام حرکتی اسب به‌صورت معنی‌داری کمتر از رشد فیبروبلاست‌های بدن اسب بوده است (۵) و در صورتی‌که از سلول‌های فیبروبلاست بدن اسب جهت التیام زخم‌های اندام حرکتی به‌صورت FKFGS استفاده شود ممکن است التیام زخم را تسریع بخشد.

با توجه به اینکه برای جداسازی فیبرینوژن از پلاسمای اسب در این روش از موادی مثل سولفات منیزیم و باریم استفاده می‌شود، برای اطمینان از عدم تداخل این مواد در روند رشد و تکثیر سلول‌ها زنده‌ماندن و تکثیر سلول‌ها در این چسب حایز اهمیت بوده است و می‌توان از این فیبرینوژن در چسب فیبرین استفاده نمود و جهت التیام زخم‌های پایینی اندام حرکتی اسب با روش‌های FKFGS و KFGS به‌کار برد.

در صورتی‌که فیبرینوژن به‌صورت خودی تهیه نشود می‌تواند همراه با انتقال عفونت‌هایی که منشاء خونی دارند مثل ایدز و هپاتیت در انسان و عفونت‌های مشابه در حیوانات باشند. ترومبین گاوی که به‌صورت موضعی استفاده می‌شود گزارش شده است که در انسان با افت فشار خون و تشکیل آنتی‌بادی‌های غیرطبیعی علیه فاکتور V همراه بوده که ممکن است اختلال انعقادی ایجاد نماید. همچنین در صورتی‌که چسب فیبرین یا ترومبین به تنهایی اشتباهاً به داخل سیستم عروقی تزریق شود، باعث آمبولی‌های خطرناک یا انعقاد داخل رگی (Intravascular coagulation) می‌شود (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 می‌نمایند. همچنین از مدیریت و پرسنل محترم آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی و بخش جراحی بیمارستان دام‌های بزرگ دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تقدیر و تشکر می‌شود.

References

1. Altmeppen, 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.

www.SID.ir

Archive of SID

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 Tscharner, 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.

www.SID.ir

Archive of SID

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 β1 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 ?1and ?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. Wilmink, 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.

www.SID.ir

Archive of SID

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]

[1]*Veterinary School,University of Zabol,Zabol - Iran.*

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

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

[4]*Central 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 it's effects on horse's fibroblast and keratinocyte cells were preformed. 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 glycin 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**

www.SID.ir