

مطالعه مقایسه‌ای منحنی رشد فیبروبلاست‌های جدا شده از پوست نواحی اندام حرکتی و گردن اسب

محمد رضا آقچه‌لو^{۱*}، سید مهدی قمصری^۲، محمد مهدی دهقان^۲، داریوش سعادت^۳

(۱) گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل، زابل - ایران

(۲) گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران

(۳) گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه زابل، زابل - ایران

(دریافت مقاله: ۱۶ شهریور ماه ۱۳۹۴، پذیرش نهایی: ۲۴ آبان ماه ۱۳۹۴)

چکیده

زمینه مطالعه: فیبروبلاست‌ها یکی از سلول‌های مهم در التیام زخم‌ها هستند. این سلول‌ها بستر مناسب را جهت مهاجرت کراتینوسیت‌ها و انقباض زخم ایجاد می‌کنند. التیام زخم در ناحیه پایین اندام حرکتی اسب با تأخیر می‌باشد که یکی از دلایل آنرا رشد و تکثیر زیاد فیبروبلاست‌ها می‌دانند که منجر به ایجاد بافت جوانه‌ای اضافی در زخم‌های این ناحیه می‌شوند. هدف: این مطالعه به منظور مقایسه منحنی رشد و تکثیر فیبروبلاست‌های جدا شده از پوست نواحی اندام حرکتی و گردن اسب صورت پذیرفت. روش کار: تعداد ۵ رأس اسب با یافته‌های طبیعی آزمایشگاهی و بالینی انتخاب شدند. دو نمونه تمام ضخامت پوست به روش استریل از ناحیه جانبی گردن و دیگری از قسمت جانبی اندام حرکتی (ناحیه متاکارپ) در هر اسب برداشت شد، سپس نمونه‌ها با PBS شسته شده و با قیچی ریز شده و در داخل فلاسک ۲۵ کشت سلولی برده شدند. بعد از چسبیدن نمونه‌ها به فلاسک، ۵CC محیط کشت اضافه شد. بعد خروج تعداد کافی سلول‌ها از بافت‌های چسبیده به کف فلاسک سلول‌ها پاساژ داده شدند و بعد از رشد و تکثیر کافی سلول‌ها مجدداً پاساژ داده شده و به میزان ۱۰ هزار سلول در هر گوده یک پلیت ۲۴ تایی برده شدند. بعد از ۴۸ ساعت تا ۸ روز، روزانه سه گوده تریپسینه شده و تعداد سلول‌های هر گوده شمارش و درصد قابلیت زیستی سلول‌ها تعیین شد و به این صورت تعداد سلول‌های زنده به دست آمد. نتایج: منحنی رشد فیبروبلاست‌های جدا شده از نواحی اندام حرکتی و گردن کشیده شده و مقایسه آماری بین سلول‌ها صورت پذیرفت که تفاوت معنی‌داری در تعداد سلول‌های زنده مشاهده نگردید، ولی تفاوت در قابلیت زیستی این سلول‌ها معنی‌دار است. میانگین زمان دوبرابر شدن جمعیت سلولی در ناحیه گردن ۳۱/۷۳ ساعت و در ناحیه اندام حرکتی ۲۶/۴ ساعت است که البته از نظر آماری این تفاوت معنی‌دار نبوده است. نتیجه گیری نهایی: به نظر می‌رسد با توجه به تفاوت در درصد قابلیت زیستی، مرگ برنامه‌ریزی شده در فیبروبلاست‌های ناحیه گردن منظم‌تر از ناحیه اندام حرکتی است.

واژه‌های کلیدی: اندام حرکتی، تک سمی، فیبروبلاست

مقدمه

بافت جوانه‌ای در زخم‌های بدن اسب آهسته‌تر تشکیل می‌شود، ولی زمان کوتاه‌تری مورد نیاز است که سطح آن منظم، صورتی و سالم شود (۲۳). این موضوع از نظر میکروسکوپی نیز مطابقت دارد و شکاف‌هایی که حاوی ذخیره فیبرین و بافت‌های مرده هستند، در زخم‌های بدن زودتر ناپدید می‌شوند (۲۳) و پاسخ ایمنی قوی‌تر وجود دارد. علاوه بر این تکثیر سلول‌های فیبروبلاست زودتر در زخم‌های بدن متوقف می‌شود که احتمالاً در پاسخ به کاهش مقادیر TGF- β (Transforming growth factor- β) می‌باشد (۲۰). همچنین نحوه قرار گرفتن سلول‌ها و ECM (Extracellular matrix) در زخم‌های بدن زودتر منظم می‌شوند. برعکس در زخم‌های اندام حرکتی مقادیر TGF به صورت دائمی وجود داشته و تشکیل بافت جوانه‌ای را تشویق می‌کند؛ زیرا TGF نه تنها التهاب و انقباض را تحریک می‌کند، بلکه می‌تواند برای مهاجرت و تکثیر فیبروبلاست‌ها و سلول‌های اندوتلیال است (۲۰). اگرچه نقض آشکار این مورد در تکثیر سریع‌تر فیبروبلاست‌های کفل اسب نسبت به فیبروبلاست‌های اندام حرکتی قابل مشاهده است (۲) که ممکن است به اثرات محیط بر عملکرد سلول‌ها برگردد. پژوهش‌ها تأکید بر انقباض

اسب‌ها غالباً از زخم‌های ضربه‌ای آسیب می‌بینند. التیام این زخم‌ها اغلب در مقایسه با سایر گونه‌ها با تأخیر و پیچیده است و تعداد زیادی از آنها به علت لنگش و ادم اندام‌ها و اسکارهای وسیع قادر به ادامه فعالیت‌های ورزشی خود نیستند و حذف می‌شوند (۴). التیام ثانویه زمانبر و همراه پیچیدگی‌هایی مثل عفونت زخم و تشکیل بافت جوانه‌ای اضافی (Exuberant granulation tissue, EGT) و اسکارهای پرتروفیک (Hypertrophic Scar) است. این مشکلات خصوصاً زخم‌های اندام حرکتی را تحت تأثیر قرار می‌دهند، در حالی که زخم‌های وسیع بدن نسبتاً خوب درمان می‌شوند (۱۱) به طوری که طبقه‌بندی براساس محل زخم نیز در اسب مطرح است (۳). برخی از مشکلات حاضر در زخم‌های نواحی پایینی اندام‌های حرکتی اسب می‌تواند به علت خصوصیات آناتومیک و فیزیولوژیکی این ناحیه باشد. این موارد شامل کمی خون‌رسانی، حضور برجستگی‌های استخوانی، عدم حضور عضلات عمقی حمایت‌کننده، مفاصلی با حرکات زیاد و میزان بالای آلودگی (که نسبت به سایر نقاط بدن بیشتر است)، می‌باشد (۱۴).



پس از شستشوی نمونه‌ها با PBS (Phosphate-buffered salin) در زیر هود کشت سلولی، نمونه‌ها توسط قیچی به قطعات بسیار ریز تقسیم شده و بداخل فلاسک کشت سلولی انتقال داده شده و بعد از چسبیدن نمونه‌ها به کف فلاسک، ۵cc محیط کشت ذکر شده همراه با ۱۰٪ FBS (Fetal bovine serum) (جهاد دانشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران) به آنها اضافه شد، فلاسک‌های کشت سلولی در انکوباتور 37°C و ۵٪ CO_2 نگهداری شدند و یک روز در میان محیط کشت آنها تعویض گردید. زمانی که سلول‌های فیبروبلاست به اندازه کافی از بافت‌ها خارج شدند، قطعات بافتی از فلاسک خارج شده و سپس سلول‌ها توسط تریپسین (Germany, ۴۷۹۹-sigma, T, ۲۵۰:۱ Tripsin) ۰/۲۵٪ و EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) ۱mol تریپسینه شده و به فلاسک کشت سلولی دیگری انتقال داده شدند، فلاسک‌های کشت سلولی در انکوباتور 37°C و ۵٪ CO_2 به مدت ۵ روز نگهداری شدند و یک روز در میان محیط کشت آنها که حاوی ۱۰٪ FBS بود، تعویض گردید، بعد از این که سلول‌ها به تعداد کافی تکثیر شدند، مجدد تریپسینه شده و سوسپانسیون سلولی به ازای هر سی سی محیط کشت، ۱۰ هزار سلول تهیه شده و به داخل پلیت ۲۴ تایی به میزان ۱cc به هر گوده منتقل شدند. بعد از ۴۸ ساعت که سلول‌ها در پلیت‌های ۲۴ تایی قرار داشتند روزانه سه گوده و به مدت ۸ روز سلول‌های گوده‌ها تریپسینه شده و با استفاده از لام نئوبار شمارش شدند و درصد زنده بودن (قابلیت زیستی) آنها نیز با رنگ آمیزی متیلن بلو مشخص شد. تعداد سلول‌های زنده با حاصل ضرب تعداد سلول‌های شمارش شده در درصد قابلیت زیستی هر گوده مشخص شد (۱).
روش آماری استفاده شده در بررسی یافته‌ها: به جهت آنکه داده‌های مربوط به فیبروبلاست‌های زنده گردن و اندام حرکتی و درصد قابلیت زیستی آنها در مقاطع مختلف زمانی اندازه‌گیری شده بود. از روش آماری Repeated Measures ANOVA جهت مقایسه بین گروه‌ها استفاده شد. همچنین داده‌های مربوطه به گردن و اندام حرکتی در هر اسب به صورتی جفتی (Paired) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. سطح معنی‌داری $p\text{-Vaule}=0/05$ در نظر گرفته شد. از نرم افزار آماری (IBM® PASW) و SPSS® Statistics (۱۸/۰ - ۲۰۰۹) جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد.

در هر یک از نمونه‌ها، منحنی رشد فیبروبلاست‌ها رسم گردید و زمان دو برابر شدن جمعیت (Population doubling time, PDT) در فاز رشد تصاعدی (Logarithmic growth phase) محاسبه شد (۱۵). سپس میانگین، خطای معیار و حدود اطمینان ۹۵٪ برای PDT در فیبروبلاست‌های گردن و فیبروبلاست‌های اندام حرکتی تعیین شد.

نتایج

تعداد کل فیبروبلاست‌های زنده: میانگین تعداد فیبروبلاست‌های زنده

سریع‌تر و مشخص‌تر زخم‌های بدن نسبت به زخم‌های اندام حرکتی دارند (۲۳). در صورتی که مقادیر حداکثر TGF یک محرک مهم در انقباض زخم است که در زخم‌های اندام حرکتی کمتر از زخم‌های بدن نیست (۲۰). فیبروبلاست‌ها مهمترین سلول‌های موجود در درم هستند که پیش‌سازهای کلاژن، الاستین و پروتئوگلیکان را می‌سازند، در حقیقت ماده زمینه بافت درم را می‌سازند (۱۲) و در التیام زخم‌ها نقش بسیار مهم دارند. بعد از آن که ماده زمینه ذخیره شد، سنتز پروتئین متوقف و فیبروبلاست‌ها به سمت مرگ برنامه‌ریزی شده (Apoptosis) می‌روند و با خصوصیات عضلات صاف را کسب نموده و به میوفیبروبلاست (Myofibroblast) تبدیل شده که شروع به انقباض زخم می‌کنند (۱۹). در مقایسه با زخم‌های اندام حرکتی، زخم‌های بدن میوفیبروبلاست‌های منظم‌تر را نشان می‌دهند که می‌توانند باعث مؤثرتر شدن انقباض زخم و در نتیجه زیبایی بهتر شوند (۱۸).

فیبروبلاست‌های پوست نواحی مختلف بدن با هم تفاوت دارند، مثلاً سرعت رشد سلول‌های فیبروبلاست جدا شده از اندام‌های حرکتی اسب به صورت معنی‌داری کمتر از سرعت رشد سلول‌های فیبروبلاست بدن اسب (ناحیه کپل) بوده است (۲) و فیبروبلاست‌هایی که در نواحی التیام یافته بدن قرار دارند خواص انقباضی بیشتری از فیبروبلاست‌های پوست سالم از خود نشان می‌دهند (۸).

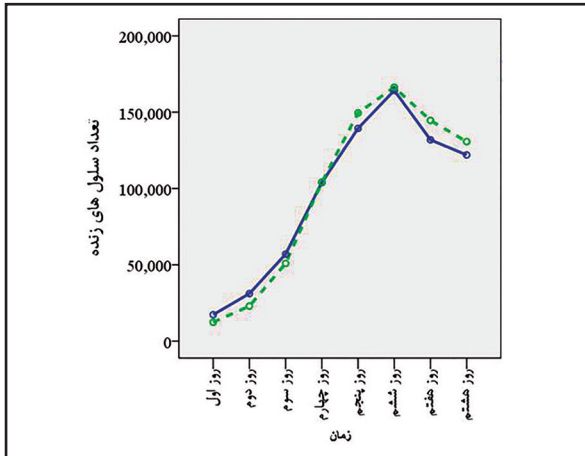
با توجه به رفتارهای متفاوت فیبروبلاست‌ها از جمله ایجاد بافت جوانه‌ای اضافی و انقباض ناقص زخم‌ها که در التیام زخم‌های اندام حرکتی وجود دارد، این مطالعه به منظور مقایسه منحنی رشد و تکثیر فیبروبلاست‌های جدا شده از پوست این نواحی انجام شد تا مشخص شود در شرایط مساوی محیطی در آزمایشگاه میزان رشد و تکثیر این سلول‌ها به چه صورت است.

مواد و روش کار

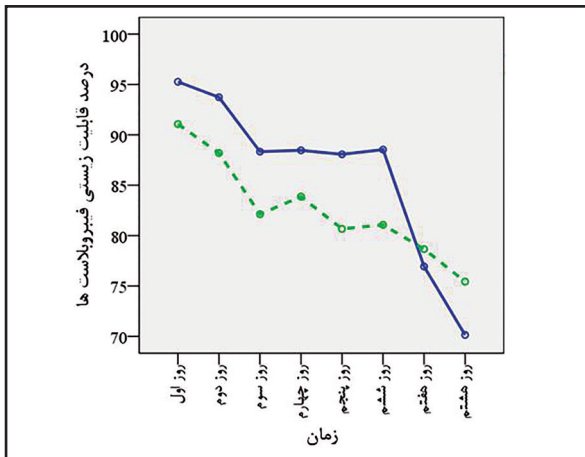
این مطالعه با استفاده از پنج راس مادبان دو خون سالم و بالغ با یافته‌های بالینی طبیعی در طی آزمایشات بالینی و بیوشیمیایی و خون‌شناسی انجام گردید.

نمونه‌هایی از پوست ناحیه گردن و اندام حرکتی در ناحیه جانبی متاکارپ اسب‌ها با استفاده از پانچ نمونه‌گیری ۹mm، به صورت تمام ضخامت توسط بی حسی موضعی با لیدوکائین هیدروکلراید ۲٪ و به صورت کاملاً استریل گرفته شد تا به صورت کشت قطعات بافتی (Explant culture) فیبروبلاست‌ها جدا شوند. نمونه‌های بافتی به داخل ۱۰cc محیط کشت سلولی (Rose well park memorial Institute) RPMI-۱۶۴۰ (Aldrich, R, ۱۶۴۰-sigma-۸۰۰۵-۱۰L, Germany) همراه پنی سیلین (۱۰۰IU/mL) استرپتومایسین (۱۰۰mg/mL) و بی کربنات سدیم (۲gm/lit) منتقل شده و در کنار یخ به محیط آزمایشگاه انتقال داده شدند،





نمودار ۱. میانگین تعداد فیبروبلاست‌های زنده گردن و اندام حرکتی در طول مدت شمارش. گردن — اندام حرکتی - - -



نمودار ۲. درصد قابلیت زیستی فیبروبلاست‌های گردن و اندام حرکتی در طول مدت شمارش. گردن — اندام حرکتی - - -

جدول ۱. میانگین و حدود اطمینان تعداد فیبروبلاست‌های زنده در گردن و اندام حرکتی در طول مدت شمارش.

تعداد فیبروبلاست‌ها		زمان	
حد پایین	حدود اطمینان ۹۵٪ برای میانگین	میانگین	خطای معیار
حد بالا	۱۰۴۸۶۰/۷	۹۵۸۶۸/۰	۴۵۳۸/۶۶
حد پایین	۹۱۹۲۵/۶	۹۷۶۹۷/۹	۲۹۱۳/۲۹
		گردن	اندام حرکتی

زخم‌های باز در قسمت‌های پایینی اندام‌های حرکتی اسب مستعد تشکیل بافت جوانه‌ای اضافی، روند طولانی التیام و عقب افتادن ترمیم زخم و میزان آهسته‌تر و توقف زودتر انقباض زخم و میزان کمتر تشکیل بافت پوششی در مقایسه با زخم‌های سایر نقاط بدن می‌باشند (۲۴، ۱۰). در ناحیه تهیگاه اسب میزان تشکیل بافت پوششی 0.7mm در روز است در حالی که در نواحی پایینی اندام‌های حرکتی این میزان به 0.9mm در روز می‌رسد، همچنین انقباض زخم در ناحیه تهیگاه اسب 1mm – 0.8 در روز است که در مقایسه با نواحی پایینی اندام حرکتی در اسب که 0.7mm در روز می‌باشد، به صورت قابل توجهی سریع‌تر رخ می‌دهد (۹). اکنون این

گردن و اندام حرکتی در طول مدت شمارش آنها (۸ روز) در نمودار ۱ آمده است. این الگو منطبق با منحنی رشد سایر سلول‌ها می‌باشد که دارای مراحل تأخیری، رشد تصاعدی، سکون و کاهش می‌باشند.

آزمون آماری نشان داد که در طول مدت آزمایش تعداد فیبروبلاست‌های زنده جدا شده از گردن با تعداد فیبروبلاست‌های زنده جدا شده از اندام حرکتی از نظر آماری تفاوت معنی‌داری ندارد ($p\text{-Value}=0.653$)، همچنین مشخص شد که میانگین تعداد سلول‌های زنده در روزهای مختلف در هر دوی سلول‌ها، در طول آزمایش دارای تفاوت آماری معنی‌داری می‌باشد ($p\text{-Value}<0.001$) که با توجه به رشد و تکثیر سلول‌ها طبیعی است.

درصد قابلیت زیستی فیبروبلاست‌ها (Viability): درصد قابلیت

زیستی فیبروبلاست‌های گردن و اندام حرکتی در طول مدت شمارش سلول‌ها (۸ روز) با رنگ آمیزی متیلن بلو مشخص شد و این داده‌ها در دو گروه فیبروبلاست‌های گردن و اندام حرکتی مقایسه شد. آزمون آماری نشان داد که درصد قابلیت زیستی فیبروبلاست‌ها گردن با درصد قابلیت زیستی فیبروبلاست‌ها اندام حرکتی تفاوت آماری معنی‌داری دارد ($p\text{-Value}<0.001$)، که نتیجه‌ای قابل توجه می‌باشد. آزمون آماری نشان داد میزان قابلیت زیستی سلول‌های فیبروبلاست در زمان‌های مختلف در طول آزمایش از نظر آماری تفاوت معنی‌داری دارد ($p\text{-Value}<0.001$) که موارد ذکر شده به صورت طبیعی در طی رشد و تکثیر سلول‌ها ایجاد می‌شود.

میانگین زمان دو برابر شدن جمعیت فیبروبلاست‌ها: میانگین زمان

دو برابر شدن جمعیت فیبروبلاست‌ها (PDT) در فاز رشد لگاریتمی برای همه فیبروبلاست‌ها در این مطالعه $29/1$ ساعت بود. میانگین PDT برای فیبروبلاست‌های جدا شده از ناحیه گردن $31/33$ ساعت و برای فیبروبلاست‌های جدا شده از ناحیه اندام حرکتی $26/4$ ساعت بوده است. آزمون آماری (t test) نشان داد که زمان دو برابر شدن جمعیت (PDT) فیبروبلاست‌های گردن با فیبروبلاست‌ها اندام حرکتی از نظر آماری تفاوت معنی‌داری ندارد ($p\text{-Value}=0.199$).

بحث

زخم‌های نواحی پایینی اندام‌های حرکتی در اسب نه تنها یک مدل ایده آل زخم‌های مزمن در میان زخم‌های نواحی مختلف اسب است بلکه نمونه زخم‌های مزمن غیر قابل درمان در پستانداران می‌باشد (۵)، همچنین زخم‌های نواحی پایینی اندام‌های حرکتی اسب شبیه زخم‌های مزمن در پای انسان می‌باشد (۶). انسان و اسب تنها گونه‌هایی هستند که در آنها بافت جوانه‌ای اضافی در طی التیام زخم‌های باز رخ می‌دهد. تفاوت پاتولوژی در این دو گونه این است که در بافت جوانه‌ای اضافه در اسب افزایش مشخص میوفیبروبلاست‌ها، عروق کوچک و سلول‌های التهابی حاد در مقایسه با کلونید در انسان وجود دارد (۲۱).



جدول ۲. میانگین و حدود اطمینان تعداد فیبروبلاست‌های زنده در روزهای مختلف در مجموع دو گروه (گردن و اندام حرکتی).

تعداد فیبروبلاست‌های زنده		زمان	
حدود اطمینان ۹۵٪ برای میانگین	خطای معیار	میانگین	زمان
حد بالا	حد پایین		روز اول
۱۶۸۰۳/۵	۱۲۸۸۴/۴	۹۵۶/۶۱	۱۴۸۴۴/۰
۳۱۷۴۷/۳	۲۲۳۷۵/۱	۲۲۸۷/۶۹	۲۷۰۶۷/۲
۶۳۶۶۲/۷	۴۴۲۲/۹	۴۳۴۵/۶۱	۵۳۹۴۷/۸
۱۱۹۴۱۴/۱	۸۸۶۴۷/۸	۷۵۰۹/۸۱	۱۰۴۰۳۷/۰
۱۶۴۸۸۲/۸	۱۲۴۰۳/۸	۹۹۷۱/۶۷	۱۴۴۴۵۶/۸
۱۸۵۸۶۳/۶	۱۴۴۷۷۹/۹	۱۰۰۲۸/۲۱	۱۶۵۳۲۷/۸
۱۵۸۴۲۷/۹	۱۱۸۰۹۴/۰	۹۸۴۵/۲۰	۱۳۸۲۶/۰۹
۱۴۵۰۵۲/۱	۱۰۷۶۴/۲	۹۱۳۷/۹۵	۱۲۶۳۴۶/۲

و قدرت انقباضی آنها بیشتر شده است (۲۲)، در حالی که در مطالعه حاضر منحنی رشد این سلول‌ها تفاوتی با سلول‌های فیبروبلاست جدا شده از ناحیه گردن ندارد. ممکن است عوامل محیطی مثل پروفیل‌های سایتوکین (Cytokine profiles) در این موضع نقش داشته باشد.

از نظر بافت‌شناسی التیام زخم در نواحی اندام حرکتی و روی عضله دوسر ران بررسی شده است. فعالیت میتوزی بافت جوانه‌ای ابتدا زیاد بوده ولی بعد از یک هفته کاهش می‌یابد البته با یک استثناء که در محل اندام حرکتی اسب که همچنان فعالیت میتوزی بالا بوده است (۲۳).

معمولاً تکثیر سلول‌های طبیعی مطابق الگوی سیگموئید است که به عادت یافتن به محیط کشت، شرایط محیطی و دسترسی به سوبسترای فیزیکی و مواد غذایی بستگی دارد تا تولید سلول‌های جدید حمایت شود. مراحل این تکثیر عبارتند از ۱- مرحله تأخیری (Lag phase) ۲- مرحله رشد تصاعدی (Logarithmic(log) phase) ۳- مرحله سکون (Plateau phase) ۴- مرحله کاهشی (Decline phase) می‌باشد (۱۵). فیبروبلاست‌ها بعد از کاشته شدن به ظرف کشت سلولی اتصال یافته و از حالت گرد، شکل طبیعی خود را که به شکل دوکی است، می‌گیرند. سلول‌ها در مرحله تأخیری تکثیر نمی‌شوند، بدین دلیل ۴۸ ساعت بعد از کاشته شدن سلول‌ها (روز اول شمارش) اقدام به شمارش آنها شد. طول مرحله تأخیری دستکم به دو عامل یکی مرحله (فاز) رشدی سلول‌ها در زمان پاساژ دادن و دیگری تعداد سلول‌های کاشته شده (Seeding density) بستگی دارد. کاشت سلول‌ها با تعداد سلول‌های کمتر منجر به طولانی شدن مرحله تأخیری خواهد شد (۱۵).

در مرحله رشد تصاعدی، رشد و تکثیر سلول‌ها فعال شده و تعداد سلول‌ها افزایش می‌یابد. در این فاز درصد سلول‌هایی که در چرخه سلولی (Cell cycle) قرار دارند ممکن است ۹۰ تا ۱۰۰٪ باشد. معمولاً در مرحله رشد تصاعدی جمعیت سلول‌ها در سالم‌ترین مرحله خود هستند، بنابراین بهتر است برای بررسی عملکرد سلول‌ها، از سلول‌های این مرحله استفاده گردد و در طی این مرحله زمان دوبرابر شدن جمعیت سلولی (Population doubling time) محاسبه می‌گردد. از جمله عواملی که بر روی طول

سوال مطرح است که آیا این تفاوت‌ها در محیط‌های یکسان کشت سلولی نیز بین فیبروبلاست‌های جدا شده از ناحیه اندام حرکتی با سایر مناطق بدن وجود دارد.

در یک مطالعه تفاوتی بین تکثیر سلول‌های فیبروبلاست جدا شده از ناحیه بدن و اندام حرکتی اسب در شرایط طبیعی اکسیژن و کمی اکسیژن مشاهده نشده است، در شرایط کمی اکسیژن تکثیر سلول‌های فیبروبلاست پوست اسب به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد ولی بر روی زنده ماندن سلول‌ها اثری ندارد، و این گونه نتیجه‌گیری شده است که ایجاد بافت جوانه‌ای اضافه به علت خصوصیات درونی فیبروبلاست‌های جدا شده از اندام حرکتی نمی‌باشد (۷).

قطعات ژن‌های cDNA شامل CTNNB1 (که برای بتا-کاتین (beta-catein) کد می‌شود) و PECAM1 در روند ترمیم زخم در اسب با قدرت شرکت می‌کنند و ممکن است در تنظیم تکثیر سلول‌های اندوتلیال و فیبروبلاست نقش داشته باشند (۱۶). تبدیل فیبروبلاست به میوفیبروبلاست که مرحله‌ای ضروری برای انقباض زخم در طی روند ترمیم است با افزایش بیان OB-cadherin ایجاد می‌شود. در مطالعه‌ای ذکر شده است که کمبود بیان این ژن در مراحل اولیه ترمیم زخم در پاسخ تکثیری افزایشی مشاهده شده در زخم‌های اندام حرکتی تأثیر دارد (۱۷). بیان دائمی TGF-beta1 در زخم‌های اندام حرکتی ممکن است به گسترش بافت جوانه‌ای اضافه منجر شود چون TGF-beta1 پروفیبروتیک (Profibrotic) است (۲۰).

خاصیت انقباضی سلول‌های فیبروبلاست جدا شده از نواحی اندام حرکتی و کیل اسب و پونی در ژل کلاژن مورد بررسی قرار گرفته است. تنها تفاوت در فیبروبلاست‌های جدا شده از اندام حرکتی دیده شده است که در آن این سلول‌ها به طور معنی‌داری انقباض ژل را زودتر و با قدرت بیشتری انجام داده‌اند. با توجه به این نکته که انقباض زخم در اندام حرکتی کمتر از سایر نقاط بدن اسب است این موضوع این طور توجیه شده است که بعلت کم بودن میزان تکثیر و طولانی شدن کاشت سلول‌های فیبروبلاست جدا شده از اندام حرکتی اسب در محیط کشت سلول‌ها، این سلول‌ها بالغ‌تر شده



(۱۵). مرحله سکون فیبروبلاست‌های پوست ناحیه گردن و اندام حرکتی در روزهای پنجم تا هفتم اتفاق افتاده است. در مرحله کاهش تعداد سلول‌ها کاهش می‌یابد که به علت مرگ غیرجبرانی سلول‌ها است. در مطالعه حاضر این مرحله از روز ششم به بعد رخ داده است. از نظر آماری تفاوتی در تمام مراحل چرخه سلولی در تعداد سلول‌های فیبروبلاست جدا شده از گردن و اندام حرکتی در مطالعه حاضر وجود نداشت.

مطالعات اخیر نشان می‌دهند که زخم‌های پایین اندام‌های حرکتی افزایش ساخت کلاژن از خود نشان می‌دهند که به علت بیان طولانی مدت فاکتورهای رشد قبل از فیبروز (Profibrotic) است (۲۰). وجود تعداد زیاد فیبروبلاست‌ها به مدت طولانی و کاهش تجزیه کلاژن می‌تواند علت دیگر آن باشد (۱۸).

Lepault و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که تجمع ماده زمینه‌ای خارج سلولی (Extracellular matrix, ECM) در زخم‌های اندام‌های حرکتی اسب ممکن است باعث انسداد عروق ریز (Microvascular occlusion) و کاهش مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (Apoptosis) باشد. کاهش مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌ها باعث افزایش تعداد سلول‌های فیبروبلاست شده و تعادل بین تولید و از بین رفتن کلاژن را بهم می‌زند که نهایتاً باعث تشکیل بافت جوانه‌ای اضافی می‌شود بنابراین به نظر می‌رسد این بافت‌ها در اثر عدم تنظیم تکثیر سلول‌های فیبروبلاست (Dysregulated fibroplasia) تشکیل می‌شوند. در حقیقت کاهش طبیعی پاسخ ایمنی حاد بایستی همراه با کاهش ساخت اجزاء ماتریکس خارج سلولی باشد و باعث تمایز سلول‌های فیبروبلاست تکثیر یافته و سازنده ماتریکس خارج سلولی به سلول‌های میوفیبروبلاست منقبض شونده، شود (۱۳). برای محاسبه تعداد کل فیبروبلاست‌های زنده، تعداد کل فیبروبلاست‌های شمارش شده در درصد قابلیت زیستی ضرب می‌شود. درصدهای قابلیت زیستی بدست آمده در مطالعه با روش‌های آماری، در دو گروه فیبروبلاست‌های ناحیه گردن و اندام حرکتی با هم مقایسه شده‌اند (نمودار ۲) و تفاوت معنی‌داری بین این درصدها مشاهده شده است. در روز اول شمارش میزان قابلیت زیستی در ناحیه گردن بالاتر از اندام حرکتی است و این موضوع تا روز ششم ادامه می‌یابد ولی در روزهای هفتم و هشتم درصد قابلیت زیستی فیبروبلاست‌های ناحیه گردن از اندام حرکتی پایین تر است. در واقع قابلیت زیستی فیبروبلاست‌های اندام حرکتی در اسب نوسان کمتری از ناحیه گردن دارند و شاید بتوان گفت مرگ برنامه‌ریزی شده در سلول‌های ناحیه گردن منظم تر از سلول‌های ناحیه اندام حرکتی است، علاوه بر این تعداد کل فیبروبلاست‌های زنده ناحیه گردن و اندام حرکتی تفاوت معنی‌داری ندارند ولی در روزهای پایانی شمارش تعداد فیبروبلاست‌های ناحیه اندام حرکتی کمی بیشتر از ناحیه گردن است (نمودار ۱)، و شاید این نکته یکی از علل ایجاد بافت جوانه‌ای اضافی و تأخیر در التیام زخم‌های اندام حرکتی باشد.

جدول ۳. میانگین و حدود اطمینان درصد قابلیت زیستی فیبروبلاست‌ها در گردن و اندام حرکتی در طول مدت شمارش.

زمان	میزان زنده بودن (قابلیت زیستی) فیبروبلاست‌ها	
	میانگین	خطای معیار
گردن	حدود اطمینان ۹۵٪ برای میانگین	حد پایین
	۸۶/۳٪	۸۴/۷٪
اندام حرکتی	حد پایین	حد پایین
	۸۲/۷٪	۸۷/۱٪

جدول ۴. میانگین و حدود اطمینان درصد قابلیت زیستی فیبروبلاست‌ها در روزهای مختلف در مجموع دو گروه (گردن و اندام حرکتی).

زمان	درصد زنده بودن (قابلیت زیستی) فیبروبلاست‌ها	
	میانگین	خطای معیار
روز اول	حدود اطمینان ۹۵٪ برای میانگین	حد پایین
	۹۳/۲٪	۹۱/۸٪
روز دوم	حد پایین	حد پایین
	۹۷/۰٪	۸۹/۳٪
روز سوم	حد پایین	حد پایین
	۸۵/۲٪	۸۲/۷٪
روز چهارم	حد پایین	حد پایین
	۸۶/۲٪	۸۳/۷٪
روز پنجم	حد پایین	حد پایین
	۸۴/۴٪	۸۰/۸٪
روز ششم	حد پایین	حد پایین
	۸۴/۸٪	۸۷/۹٪
روز هفتم	حد پایین	حد پایین
	۷۷/۸٪	۷۳/۹٪
روز هشتم	حد پایین	حد پایین
	۷۷/۹٪	۶۷/۶٪

جدول ۵. میانگین و حدود اطمینان زمان دو برابر شدن جمعیت فیبروبلاست‌ها بر حسب ساعت (PDT) در گردن و اندام حرکتی در فاز رشد لگاریتمی.

زمان	تعداد فیبروبلاست‌ها	
	میانگین	خطای معیار
گردن	حدود اطمینان ۹۵٪ برای میانگین	حد پایین
	۳۱/۷۳	۲۳/۳
اندام حرکتی	حد پایین	حد پایین
	۲۶/۴	۲۴/۳

زمان مرحله رشد تصاعدی اثر می‌گذارد شامل تعداد سلول‌های کاشته شده و میزان رشد سلول‌ها می‌باشند. فیبروبلاست‌های جدا شده از گردن و اندام حرکتی اسب در مطالعه حاضر مرحله رشد تصاعدی تقریباً از روز دوم شمارش شروع شده و تا روز پنجم شمارش فیبروبلاست‌ها ادامه یافته است (نمودار ۱) و این زمان جهت تعیین زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی محاسبه شد که میانگین آن در ناحیه گردن ۳۱/۷۳ ساعت و در ناحیه اندام حرکتی ۲۶/۴ ساعت است که البته از نظر آماری این تفاوت معنی‌دار نبوده است.

در مرحله سکون تکثیر سلول‌ها کاهش می‌یابد و جمعیت سلول‌ها به هم می‌رسند (Confluency). در این مرحله برخی فیبروبلاست‌هایی که هنوز فعالیت میتوزی دارند، متراکم تر شده و یا ممکن است سلول‌های دختر در محیط کشت آزاد شوند. در این مرحله تکثیر سلول‌ها با مرگ آنها به حالت تعادل می‌رسد و درصد سلول‌هایی که در چرخه سلولی قرار دارند به حدود صفر تا ۱۰٪ می‌رسد و سلول‌ها در این زمان آسیب پذیرتر هستند



References

1. Azari, O., Ghamsari, S.M., Dehghan, M.M., Aghcheloo, M.R. (2007) Growth characteristics of isolated fibroblasts from the distal limb of Thoroughbred horses and Caspian miniature horses. *J Vet Res. (University of Tehran)*. 62: 169-176.
2. Bacon Miller, C., 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 aspect of the limb of horses and ponies. *Vet Surg*. 29: 1-7.
3. Baxter, G.M. (1998) Wound management. In: *Current Techniques in Equine Surgery and Lameness*. White, N.A., Moore, J.N. (eds.). (2nd ed.) W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA. p. 72-80.
4. Caron, J.P. (1999) Management of superficial wounds. In: *Equine Surgery*. Auer, J.A., Stick, J.A. (eds.). (2nd ed.). W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA. p. 129-40.
5. Carter, C.A., Jolly, D.G., Worden, S.R., C.E., Hendren, D.G., Kane Cynthia, J.M. (2003) Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Exp Mol Pathol*. 74: 244-255.
6. Cochrane, C., Rippon, M.G., Rogers, A., Walmsley, R., Knottenbelt, D., 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.
7. Deschene, K., Celeste, C., Boerboom, D., Theoret, C.L. (2012) Hypoxia regulates the expression of extracellular matrix associated proteins in equine dermal fibroblasts via HIF1. *J Dermatol Sci*. 65: 12-8.
8. Germain, L., Jean, A., Auger, F.A., Garrel, D.R. (1994) Human wound healing fibroblasts have greater contractile properties than dermal fibroblasts. *J Surg Res*. 57: 268-273.
9. Heinz, C.D., Clem, M.F. (1982) Wound healing and tissue repair. In: *Text Book of Large Animal Surgery*. Oehme, F.W. (ed.). (2nd ed.) Williams and Wilkins, Baltimore, USA. p. 141-153.
10. Hendrikson, D., Virgin, J. (2005) Factors that af-

مطالعات بیشتری برای فهم التیام در اندام حرکتی اسب مورد نیاز است. اسب‌هایی که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند از نژادهای مختلفی بوده اند که این موضوع شاید بتواند علت تفاوت در نتایج گرفته شده در این مطالعه را با سایر مطالعات توجیه نماید.

تشکر و قدردانی

از همه همکاران محترم دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و زابل، نهایت تشکر و قدردانی شود.

- fect equine wound repair. *Vet Clin Equine* 21: 33-44.
11. Jacobs, K.A., Leach, D.H., Fretz, P.B., Townsend, H.G.G. (1984) Comparative aspects of the healing of excisional wounds on the leg and body of horses. *Vet Surg*. 13: 83-90.
12. Leach, D.H., Caron, J.P. (1999) The integument. In: *Equine Surgery*. Auer, J.A. and Stick, J.A. (eds.). (2nd ed.). WB Saunders, Philadelphia, USA. p. 121-128.
13. Lepault, E., Celeste, C., Dore, M., Martineau, D., Theoret, C.L. (2005) Comparative study on microvascular occlusion and apoptosis in body and limb wounds in the horse. *Wound Repair Regen*. 13: 520-9.
14. Lindsay, M.A. (1988) Wound healing in horses: guidelines for classification. *J Vet Med*. 83: 387-95.
15. McAteer, J.A., Davis, J.M. (2002) Basic cell culture technique and the maintenance of cell lines. In: *Basic Cell Culture*. Davis, J.M. (ed.). (2nd ed.) The Bath Press, Avon, USA. p.135-190.
16. Miragliotta, V., Ipina, Z., Lefebvre-Lavoie, J., Lussier, J.G., Theoret, C.L. (2008) Equine CTN-NB1 and PECAM1 nucleotide structure and expression analyses in an experimental model of normal and pathological wound repair. *BMC Physiol*. 31: 1.
17. Miragliotta, V., Lefebvre-Lavoie, J., Lussier, J.G., Theoret, C.L. (2008) OB-cadherin cloning and expression in a model of wound repair in horses. *Equine Vet J*. 40: 643-8.
18. Schwartz, A.J., Wilson, D.A., Keegan, K.G.,



- Ganiam, V.K., Sun, Y., Weber, K.T., Zhang, J. (2002) Factors regulating collagen synthesis and degradation during second intention healing of wounds in the thoracic region and distal aspect of the forelimb of horses. *Am J Vet Res.* 63: 1564-70.
19. Theoret, C.L. (2005) The pathophysiology of wound repair. *Vet Clin Equine* 21: 1-13.
20. Theoret, C.L., Barber, S.M., Moyana, T.N., Gordon, J.R. (2001) Expression of transforming growth factor β 1, β 2, and basic fibroblast growth factor in full-thickness skin wounds of equine limbs and thorax. *J Vet Surg.* 30: 269-77.
21. Theoret, C.L., Olutoye, O.O., Parnell, L.K., Hicks, J. (2013) Equine exuberant granulation tissue and human keloid: A comparative histopathologic study. *Vet Surg.* 42: 783-9.
22. Wilmink, J.M., Nederbragt, H., Van Weeren, P.R., Stolk, P.W.T., Barneveld, A. (2001) Differences in wound contraction between horses and ponies: the in vitro contraction capacity of fibroblasts. *Equine Vet J.* 33: 499-505.
23. Wilmink, J.M., Stolk, P.W.T., 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.
24. 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.



A comparative study of the fibroblasts growth curve isolated from neck and distal limb of horse skin

Aghchelou, M.R.^{1*}, Ghamsari, S.M.², Dehghan, M.M.², Saadati, D.³

¹Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol- Iran

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

³Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zabol, Zabol- Iran

(Received 7 September 2015, Accepted 15 November 2015)

Abstract:

BACKGROUND: Fibroblasts are one of the important cells in wound healing. These cells create a proper bed for keratinocytes migration and wound contraction. Wound healing in distal limb of horses has complications, such as formation of exuberant granulation tissue (EGT). The main factor in this problem is overgrowing of fibroblasts. **OBJECTIVES:** The purpose of the present study was to compare fibroblast growth curve in isolated skin from horses' neck and distal limb. **METHODS:** 5 horses with normal hematological and clinical signs were selected. Two samples of full thickness of skin were taken from the neck and lateral metacarpal region of each horse aseptically. Then the samples were washed with PBS minced and placed in ventilated flask 25 cm². After attaching samples to flask, 5 ml culture medium (RPMI-1640 with 10% FBS) were added and the flask was placed in an incubator at 37°C in 5% CO₂. After leaving a sufficient number of cells from tissues adhered to the bottom of the flask, the cells were passaged to a new ventilated flask. After growth and proliferation of cells, they were passaged again and a suspension of cells in culture medium (10000 cells/ml) was made. To each cell of a 24-well plate, one ml of this suspension was added. After 48 hour, cells of 3 well were detached with trypsin daily, counted and viability determined within 8 days. **RESULTS:** There was no significant difference between viable cells number but there was significant difference in viability percent of cells in neck and distal limb. The mean of population doubling time (PDT) for fibroblasts of neck is 31.73 hours and for fibroblasts of distal limb is 26.4 hours. This difference was not significant. **CONCLUSIONS:** With regard to different viability percentage, it seems that the apoptosis in fibroblasts of neck skin is more regular than distal limb skin.

Keyword: distal limb, equine, fibroblast

Figure Legends and Table Captions

Graph 1. Mean of alive fibroblasts of neck and distal limb during the counting period.

Graph 2. Viability percent of fibroblasts of neck and distal limb during the counting period.

Table 1. Mean and confidence interval of alive fibroblasts of neck and distal limb during the counting period.

Table 2. Mean and confidence interval of total alive fibroblasts of two groups (neck and distal limb) in different days.

Table 3. Mean and confidence interval of viability percentage of fibroblasts in neck and distal limb groups during the counting period.

Table 4. Mean and confidence interval of viability percent of total fibroblasts of two groups (neck and distal limb) during different days.

Table 5. Mean and confidence interval of population doubling time (PDT) of fibroblasts in two groups (neck and distal limb) according to hour in logarithmic [log] phase.

*Corresponding author's email: mraghelou@gmail.com, Tel: 054-31232253, Fax: 054-31232251

J. Vet. Res. 70, 4:403-410, 2015

