مجله تحقیقات دامپزشکی
دوره ۷۶، شماره۴، ۱۴۰۰، ۴۵۸-۴۵۰
مقاله پژوهشی

ارزیابی بیان ژن‌های مربوط به کلاژن‌های تیپ ۱ و ۳ در زخم باز التیام یافته اندام حرکتی اسب با استفاده از سلول‌های بنیادی خودی مشتق از بافت چربی و مقایسه آن با سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان

محمدمهدی ملکشاهی‌نژاد[۱]، سیدمهدی قمصری[۲]، محمدمهدی دهقان[۲]، غلامرضا نیکبخت‌بروجنی[۳]، سیدصدرا ایزدی[۱]

[۱] دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۲] گروه جراحی و رادیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
[۳] گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۲۸ مهر ماه ۱۴۰۰، **تاریخ پذیرش:** ۲۹ آذر ۱۴۰۰

10.22059/jvr.2021.228666.2599 20.1001.1.20082525.1400.76.4.8.2

چکیده

زمینهٔ مطالعه: زخم‌های باز اندام حرکتی یکی از شایع‌ترین مشکلات در اسب‌ها می‌باشد که به دلایلی نظیر کمبود بافت نرم، رشد سریع بافت گرانوله اضافه، آلودگی زیاد و پاسخ ضعیف به درمان‌های رایج، ترمیم آن‌ها معضل بزرگی برای دامپزشکان است. استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی جهت ترمیم زخم‌ها از روش‌هایی است که به تازگی توجه محققین را به خود جلب کرده است. در این میان سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی به عللی نظیر سهولت تهیه، تعداد بسیار زیاد سلول‌های بنیادی حاصله در استحصال اولیه و قابلیت تمایز به رده‌های مختلف سلولی کاربرد فراوان یافته‌اند.

هدف: مطالعه حاضر به منظور ارزیابی بیان ژن‌های کلاژن‌های تیپ ۱ و ۳ در روند التیام زخم باز اندام حرکتی اسب با استفاده از سلول‌های بنیادی خودی مشتق از بافت چربی و مقایسه آن با سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان صورت گرفت.

روش‌کار: پس از ایجاد زخم‌های باز تجربی در اندام‌های حرکتی چهار اسب و درمان آن‌ها با استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی خودی، از روش Real-Time PCR برای ارزیابی و مقایسه میزان بیان ژن‌های کلاژن تیپ ۱ و ۳ در روند التیام زخم استفاده شد.

نتایج: اختلاف معنی‌دار در تغییر بیان ژن‌های کلاژن تیپ ۱ و ۳ در بین گروه‌های درمانی مشاهده گردید. با وجود آن که بیشترین میزان بیان ژن‌های انواع کلاژن مربوط به سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان بود اما بین این سلول‌ها و سلول‌های مشتق از بافت چربی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری نهایی: بر این اساس با توجه به مزایای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی و عملکرد قابل قبول، این سلول‌ها می‌توانند به عنوان روشی نوین در تسریع فرایند التیام زخم‌های اندام حرکتی مد نظر قرار گیرند.

کلمات کلیدی: ترمیم زخم، اسب، سلول‌های بنیادی مزانشیمی، مغز استخوان، بافت چربی

کپی‌رایت © تحقیقات دامپزشکی: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است.

نویسنده مسئول: سیدمهدی قمصری، گروه جراحی و رادیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
پست الکترونیکی: ghamsari@ut.ac.ir

مقدمه

زخم‌های باز نواحی پایینی اندام‌های حرکتی یکی از شایع‌ترین مشکلات در اسب‌ها می‌باشد. کمبود بافت نرم و بالطبع انقباض محدودتر زخم، ایجاد و رشد سریع بافت گرانوله اضافه و کلوئید، آلودگی زیاد، دوره بهبود طولانی و پاسخ ضعیف به درمان‌های معمول از ویژگی‌های این زخم‌ها است. ترمیم ثانویه زخم‌های این ناحیه در اسب‌ها به‌طور مشخص بسیار کندتر از سایر زخم‌ها از قبیل زخم‌های قسمت‌های بالایی اندام حرکتی است. همه این عوامل موجب شده است که ترمیم در این ناحیه گاهی به شکل یک معضل عمده (همراه با پیچیدگی‌های درمانی) برای دامپزشکان محسوب شود. لذا استفاده از روش‌هایی که روند

تشکیل بافت پوششی را در این شرایط تسهیل نماید می‌تواند مفید باشد. روش‌های متعددی برای درمان این نوع از زخم‌ها و پیشگیری از ایجاد بافت گرانوله مورد مطالعه قرار گرفته‌اند اما اثربخشی اکثر آن‌ها اثبات نشده است (۹،۱۴،۱۶). یکی از روش‌هایی که به تازگی توجه محققین را به خود جلب کرده است، استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌باشد (۳،۶).

سلول درمانی را می‌توان ابزاری در جهت بهبود پیش‌آگهی بیماری‌های مختلف ناشی از نارسایی ارگان‌های مختلف بدن محسوب کرد. مطالعات آزمایشگاهی و کلینیکی متعدد در خصوص پتانسیل سلول‌های بنیادی نشان داده‌اند که این سلول‌ها در بازسازی و ترمیم ارگان‌های مختلف بدن مانند قلب، ماهیچه، غضروف و تاندون می‌توانند استفاده شوند. این سلول‌ها بوسیله افزایش سرعت بازسازی بافت روند ترمیم را سرعت می‌بخشند. تقریباً همه بافت‌های بدن دارای سلول‌های بنیادی هستند که دارای ظرفیت ترمیم دوباره بافت، بعد از آسیب، بیماری و پیری هستند. سلول‌های بنیادی مزانشیمی می‌توانند از منابع مختلف از جمله مغز استخوان، بافت چربی و بند ناف جدا گردد. اگرچه استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی سودمندتر می‌باشد اما امکان وقوع تغییرات ژنتیکی، احتمال ایجاد تومورها و تکنیک جداسازی مشکل‌تر آن و بخصوص در طب انسانی مقررات و قوانین اخلاقی وضع شده در این زمینه، کاربرد آن را محدودتر نموده است. از میان این منابع، مغز استخوان و بافت چربی منابع اصلی در آزمایشات بالینی هستند. از طرف دیگر سلول‌های بنیادی بالغ و یا غیرجنینی به سادگی در دسترس بوده و ضمن نداشتن مشکلات و قوانین اخلاقی و ژنتیکی، چنانچه به شکل خودی مورد استفاده قرار گیرند مسائل تحریک سیستم ایمنی موجود را هم به دنبال نخواهند داشت (۴،۱۵،۱۷). امروزه بکارگیری سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان کاربردی فراوان دارد ولی استحصال دردناک آن و تعداد بسیار اندک سلول‌های بنیادی اولیه بدست آمده از معایب عمده این روش به حساب می‌آید (۶). در این میان سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی که به علل مختلف از جمله سهولت تهیه آن، تعداد بسیار زیاد سلول‌های بنیادی بدست آمده در استحصال اولیه و قابلیت تبدیل آن‌ها به رده‌های مختلف سلولی (مثل سلول چربی، کندروسیت، استئوبلاست، سلول‌های اندوتلیال، سلول‌های کبدی و ماهیچه‌ای قلب، سلول‌های عصبی-اکتودرمی و بافت اندودرمی) آن را در نظر محققین ممتاز کرده است (۱،۲،۷،۸،۱۱،۱۲).

یکی از فاکتورهای مؤثر در ترمیم زخم که نقش کلیدی در مراحل مختلف بهبود آن ایفا می‌کند کلاژن است. کلاژن پروتئین اصلی ماتریکس خارج سلولی (ECM) و فراوان‌ترین پروتئین موجود در پستانداران است که شامل ۲۵ درصد از کل پروتئین و ۷۰ تا ۸۰ درصد از پوست (وزن خشک) را تشکیل می‌دهد. کلاژن‌های تیپ ۱، ۲ و ۳ از اصلی‌ترین انواع کلاژن هستند که در بافت همبند و ۹۰ درصد از بافت‌های بدن وجود دارند. در این میان کلاژن‌های تیپ ۱ و ۳ مؤثرترین نقش را در ترمیم زخم دارند. کلاژن تیپ ۳ عمده‌ترین کلاژنی است که در مرحله اول ترمیم ساختاری توسط سلول‌های فیبروبلاست تولید و ترشح می‌شود تا بدین وسیله شبکه اولیه برای قرار گرفتن سلول‌ها و همچنین تشکیل بافت بوسیله آن صورت گیرد. همچنین کلاژن نوع ۱ فراوان‌ترین جزء ساختاری ماتریکس پوستی است و نقش مکمل بر کلاژن تیپ ۳ در ترمیم زخم دارد (۹،۱۴). لازم به ذکر است در روند التیام زخم نهایتاً از میزان کلاژن تیپ ۳ کاسته شده و بر کلاژن تیپ ۱ افزوده می‌شود و حضور بیشتر کلاژن تیپ ۱ نشان دهنده ترمیم بهتر زخم می‌باشد.

در مطالعه حاضر جهت ارزیابی درجه بهبود و کیفیت التیام، میزان بیان ژن‌های مربوط به کلاژن‌های تیپ ۱ و ۳ در زخم باز درمان شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی و همچنین سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان با اندازه‌گیری mRNA به روش Real Time-PCR مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش‌کار

حیوانات: در مطالعه حاضر از تعداد ۴ راس اسب سالم با وزن تقریبی بین ۳۵۰-۲۵۰ کیلوگرم و از یک جنس و یک نژاد استفاده شد. پیش از شروع مطالعه با انجام معاینات بالینی و آزمایشگاهی (شامل شمارش تام خون و آزمایشات مربوط به کارکرد کبد، کلیه و انگل شناسی) از سلامت حیوانات اطمینان حاصل گردید. حیوانات مورد نظر در طول مدت مطالعه در اصطبل‌های انفرادی نگهداری و با مقدار کافی یونجه خشک و کنسانتره به اندازه‌ای که وزن بدن آن‌ها در طول مدت مطالعه تغییر نیابد، تغذیه گردیدند.

روش استحصال سلول‌های بنیادی مشتق شده از بافت چربی: پس از بدست‌آوردن بافت چربی از طرفین قاعده دم اسب‌ها (که با برداشت جراحی و به کمک آرام بخشی و

بی‌حسی موضعی انجام شد)، بافت بدست‌آمده ابتدا با حجم مساوی از بافر فسفاته PBS (phosphate buffered saline) شسته شد. هضم آنزیمی بافت بدست‌آمده با محلول ۰/۰۷۵ درصد کلاژناز تیپ ۱ در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. محلول بدست‌آمده به منظور حذف تکه‌های بافت پیوندی فیلتر شد. پس از جداسازی لایه سلولی بافت چربی بالغ، سلول‌های معلق با قدرت rcf ۲۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و لایه سلولی نازک بدست‌آمده جدا و شسته شد. گلبول‌های قرمز محیط با بافر لیزکننده با pH برابر ۷/۳ حذف شدند. سلول‌های استرومال بدست‌آمده با محلول PBS دو مرتبه شسته و در محیط DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) حاوی گلوکز (۱۵ درصد)، سرم جنین گاو (۴۵۰۰ میلی‌گرم/لیتر) (fetal bovine serum) و پنی سیلین و استرپتومایسین (۱۰۰ واحدبین‌المللی/میلی‌لیتر) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور حاوی ۵ درصد دی‌اکسیدکربن کشت داده شدند. پس از ۳-۲ روز سلول‌های بنیادی تک لایه شبیه فیبروبلاست و تک‌هسته‌ای مشاهده شدند.

روش استحصال سلول‌های بنیادی مشتق از مغز استخوان: پس از ایجاد آرام‌بخشی با تزریق وریدی زایلازین (۰/۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) در هر یک از اسب‌ها، موهای ناحیه جناغ به مساحت ۲۰×۵ سانتی‌متر کاملاً تراشیده و با الکل ضدعفونی شد. سپس با استفاده از دستگاه اولتراسونوگرافی فضای بین قطعات استخوان جناغ را مشخص کرده و با نشانگرهای ثابت علامت‌گذاری شد. پس از ضدعفونی و آماده‌سازی ناحیه به روش معمول جراحی، با استفاده از لیدوکائین حاوی آدرنالین، بی‌حسی در خط میانی سطح شکمی جناغ و در حد فاصل بین دو انتهای قدامی و خلفی قطعات استخوان جناغ (قطعات ۴ و ۵) به‌صورت زیرجلدی ایجاد شد. با هدایت سر سوزن به سمت سطوح شکمی قطعات استخوان جناغ بی‌حسی در سطح پریوست استخوان نیز ایجاد شد. متعاقباً تحت شرایط آسپتیک با تیغ اسکالپل شماره ۱۱ یک برش سرنیزه‌ای در پوست ناحیه ایجاد و با استفاده از سوزن جمشیدی (شماره ۱۱ به طول ۱۰ سانتی‌متر) و با استفاده از سرنگ ۲۰ میلی‌لیتر حاوی هپارین (۷۰۰ واحد هپارین به ازای هر ۱ میلی‌لیتر مغز استخوان) حدود ۱۰ میلی‌لیتر مغز استخوان آسپیره شد. نمونه‌های اخذ شده در فالکون‌های استریل و در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس جداسازی و کشت سلول‌های بنیادی در آزمایشگاه طی مراحل زیر انجام گردید:

از مغز استخوان بدست‌آمده، پس از بارگذاری روی لینفودکس و سانتریفیوژ، محلول حاوی سلول‌های تک هسته‌ای جدا شد. با استفاده از محیط DMEM مجدداً سانتریفیوژ صورت گرفته و پس از تخلیه مایع رویی، پلت سلولی تشکیل شده در کف لوله مجدداً در DMEM و ۱۵ درصد سرم جنین گاوی و آنتی‌بیوتیک در داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسیدکربن کشت داده شد. پس از چند روز نگهداری و شستشو با محلول PBS پاساژ داده شدند. محیط کشت پاساژ اول هر ۴-۳ روز یک بار تعویض گردیده تا سطح ظرف کشت پر شود. در این زمان پاساژ بعدی انجام گرفته و در نهایت زمانی که سلول‌ها به پاساژ سوم رسیدند، جهت ترمیم زخم آماده و بکار گرفته شدند.

روش تهیه چسب فیبرین: از هر راس اسب ۲۰۰ میلی‌لیتر خون محیطی به صورت کاملاً استریل از ورید وداج همراه با ماده ضد انعقاد سیترات سدیم ۳/۸ درصد و با نسبت ۱: ۹ اخذ شد. در آزمایشگاه خون اخذ شده ۱۰ دقیقه با سرعت rpm ۳۰۰۰ سانتریفیوژ گردیده و پلاسمای آن جدا شد. از پلاسما با روش رسوب گلایسین، فیبرینوژن استخراج گردید. سولفات منیزیم و باریم بدون آب در غلظت ۲۰ میلی‌مولار/لیتر و ۹۰ گرم/لیتر به پلاسمای جدا شده اضافه شد. پس از به هم زدن محلول برای یک ساعت، مایع رویی سانتریفیوژ جدا شد. این فرایند یک بار دیگر نیز صورت پذیرفت. بعد از تعیین حجم مایع رویی، گلایسین به آرامی اضافه شد تا غلظت نهایی ۲/۲ مولار ایجاد شود. مجدداً این محلول برای ۳۰ دقیقه به‌هم زده شد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب در اندازه پلاسمای اولیه توسط سیترات سدیم ۰/۰۵۵ مولار در pH معادل ۷/۴ محلول شد، رسوب دادن توسط گلایسین مجدداً تکرار گردید. نهایتاً رسوب در PBS حل و به غلظت ۲۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر رسانده شد. از هر یک از نمونه‌های خون به‌طور متوسط ۲۲ میلی‌لیتر فیبرینوژن اخذ شد (میزان متوسط سنجش پروتئین (فیبرینوژن) توسط اسپکتروفتومتر ۲۰ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر می‌باشد). سپس فیبرینوژن اخذ شده توسط فیلتر ۰/۲ میکرومتر استریل گردید و تا زمان استفاده در فریزر در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. علاوه بر فیبرینوژن، ترومبین گاوی و گلوکونات

کلسیم در سرم نمکی محلول و برای انعقاد فیبرینوژن مورد استفاده قرار گرفت. اسید ترانگزامیک به میزان ۰/۶ میلی‌گرم/میلی‌لیتر نیز به عنوان ماده ممانعت‌کننده از لیز شدن فیبرین به سرم نمکی اضافه شد.

روش ایجاد زخم تجربی: تحت بیهوشی عمومی (با استفاده از زایلازین و کتامین) در هر یک از اسب‌ها در مجموع ۸ زخم در ابعاد ۳×۲ سانتی‌متر در ناحیه جانبی متاکارپ و متاتارس تحت شرایط آسپتیک ایجاد شد (دو زخم در هر اندام در قسمت جانبی). بدین ترتیب به‌طور کلی در تمام اسب‌ها در مجموع تعداد ۳۲ زخم در نواحی مشابه آناتومیک ایجاد شدند. ۵ روز بعد از ایجاد زخم‌ها، زمانی‌که بافت جوانه‌ای مناسب در بستر آن‌ها تشکیل شد، زخم‌ها با طرح مربع لاتین به ۴ گروه تقسیم شدند. نحوه گروه‌بندی درمانی زخم‌ها بدین صورت بود که در هر اسب چهار گروه درمانی وجود داشت که برای سهولت کار به گروه‌های الف، ب، ج و د به شرح زیر تقسیم شدند:

گروه الف) زخم‌های گروه شاهد که در آن‌ها هیچ گونه درمانی انجام نشد. در گروه شاهد فقط زخم‌ها با سرم نمکی شستشو داده شده و با استفاده از پانسمان غیرچسبنده مانند سایر گروه‌ها پانسمان انجام شد.

گروه ب) زخم‌ها توسط سوسپانسیون سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی قاعده دم به همراه چسب فیبرین درمان شدند.

گروه ج) زخم‌ها تنها با چسب فیبرین تحت درمان قرار گرفتند.

گروه د) زخم‌ها با سوسپانسیون سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان به همراه چسب فیبرین درمان شدند.

درمان‌ها کاملاً تصادفی و به شیوه مربع لاتین ۴×۴ انجام گرفت، به‌طوری که هر اندام حرکتی ۴ درمان را در ۴ اسب دریافت کرد (به‌طور مثال چنانچه در یک راس اسب اندام قدامی سمت راست درمان با سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی را دریافت می‌کرد در اسب دیگر همین درمان در اندام قدامی سمت چپ انجام شد و در اسب دیگر باز دقیقاً همین درمان در اندام خلفی سمت راست و بالاخره در اسب چهارم این درمان در اندام خلفی سمت چپ انجام شد و این ترتیب برای دیگر گروه‌های درمانی به همین شکل تکرار شد). درمان فقط یک بار و در روز پنجم بعد از ایجاد زخم صورت پذیرفت. زخم‌ها تا انتهای مطالعه هفته‌ای ۳ بار تعویض بانداژ شدند و در روز چهاردهم (هفته دوم) از اسکار زخم‌ها و با استفاده از روش جراحی نمونه‌گیری انجام شد و نمونه اخذ شده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند.

روش استخراج RNA: استخراج RNA پس از هموژنیزه‌کردن نمونه اخذ شده از زخم‌ها به وسیله ازت مایع و پودرکردن آن‌ها صورت گرفت. بدین منظور ۱ میلی‌لیتر از محلول استخراج TriPure (Roche, Swiss) به حدود ۵۰ میکروگرم از بافت هموژنیزه شده اضافه گردید. پس از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت تکان داده شد. بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ rcf سانتریفیوژ شدند. بعد از سانتریفیوژ فاز آبی به یک تیوب جدید منتقل و جهت رسوب RNA ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به مخلوط اضافه گردید. پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق نمونه‌ها مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰rcf و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. رسوب بدست آمده با ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد شسته شد و پس از سانتریفیوژ و تبخیر اتانول، رسوب حاصله در DEPC Water حل گردید. به منظور از بین بردن آلودگی احتمالی DNA از آنزیم DNAase (سیناکلون، ایران) طبق پروتکل مربوطه استفاده گردید RNAهای استخراج شده در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

سنتز cDNA و بررسی بیان ژن با استفاده از روش Real Time – PCR: ساخت cDNA با استفاده از آغازگرهای Random Hexamer و طبق پروتکل شرکت سازنده (سیناکلون، ایران) انجام گرفت. هر واکنش شامل ۴ میکرولیتر از cDNA، ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$، ۲۰ نانو مولار dNTPs و ۲۰ پیکو مولار از هر یک از پرایمرهای مربوطه و ۲ واحد آنزیم Taq پلیمراز بود. توالی پرایمرهای استفاده شده برای هر یک از ژن‌ها در جدول ۱ آورده شده است. از آنجایی که توالی پرایمرها بر روی دو اگزون مختلف هستند و در بین آن‌ها یک اینترون وجود دارد آلودگی احتمالی به DNA در واکنش‌ها قابل تشخیص است.

جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده شده برای انجام RT-PCR.

پرایمر	توالی	اندازه محصول PCR (bp)
کلاژن تیپ ۱ آلفا ۱	5’-ACCTGCATACAGGACGGCCTC-3’ (Forward) 5’-GCCAGGCACGGAAATTCCAGC-3’ (Reverse)	۴۲۰
کلاژن تیپ ۳ آلفا ۱	5’-CACAAAGAGTCTCATGTCTGA-3’ (Forward) 5’-GGTCACCATTTCTCCCAGGA-3’ (Reverse)	۳۹۷
گلیسرید ۳- فسفات دهیدروژناز (GAPDH)	5’-GACCACAGTCCATGCCATCAC-3’ (Forward) 5’-GTCCACCACCCTGTTGCTGTA-3’ (Reverse)	۴۵۴

جدول ۲. میانگین و انحراف معیار میزان بیان نسبی ژن‌های کلاژن تیپ ۱ و ۳ در هر یک از گروه‌های درمانی.

گروه درمانی (N=۴)	کلاژن تیپ ۱ آلفا ۱		کلاژن تیپ ۳ آلفا ۱	
	میانگین	انحراف معیار	میانگین	انحراف معیار
سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی	۱/۴۲۳۰	۰/۴۹۰۴۵	۱/۲۸۸۶	۰/۳۹۵۸۲
سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان	۱/۹۰۵۹	۰/۶۷۶۰۷	۱/۷۸۱۱	۰/۶۵۰۲۶
چسب فیبرین	۰/۸۰۳۴	۰/۲۲۸۶۳	۱/۰۰۰۰	۰/۱۳۸۳۷
شاهد	۰/۷۸۲۴	۰/۳۴۲۱۰	۰/۶۳۲۴	۰/۲۴۹۷۱

برنامه حرارتی با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf, Germany) بدین شرح انجام شد: دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل شامل دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۵۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله پلی‌مریزاسیون در دمای ۶۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲/۵ دقیقه و در انتها، واکنش (extension) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه.

ارزیابی محصول PCR: ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR به درون چاهک موجود بر روی ژل آگارز ۱ درصد انتقال یافت. الکتروفورز در بافر TBE با ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۵۰ دقیقه انجام شد. سپس نتایج بر روی دستگاه ایلومینیتور (UVitec, UK) مشاهده و ثبت شدند. برای تعیین دانسیته باندها از نرم افزار Photocapture استفاده شد. برای تحلیل آماری نسبت بیان ژن کلاژن هر نمونه به بیان ژن کنترل داخلی (GPDH) محاسبه و مورد استفاده قرار گرفت.

آنالیز و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل داده‌های فاکتورهای مورد ارزیابی با استفاده از روش GLM و نرم افزار SPSS نسخه شماره ۲۱ (IBM, USA) انجام گرفت. با استفاده از آزمون POST HOC و روش LSD نیز معنی‌دار بودن بین گروه‌ها به‌صورت دو به دو مورد بررسی قرار گرفت. $P<۰/۰۵$ به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج

تحلیل داده‌ها نشان داد که در تغییر بیان ژن‌های کلاژن تیپ ۱ و ۳ در بین گروه‌ها اختلاف معنی‌داری وجود دارد. بیشترین بیان ژن کلاژن‌های تیپ ۱ و ۳ مربوط به گروه درمان شده با سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان (به ترتیب ۱/۹۰۵۹ و ۱/۷۸۱۱) بوده است. کمترین بیان ژن‌ها نیز به ترتیب با ۰/۷۸۲۴ و ۰/۶۳۲۴ مربوط به گروه کنترل بوده است. در خصوص کلاژن تیپ ۱ زخم‌هایی که با استفاده از سلول‌های بنیادی خودی مشتق از بافت چربی درمان شده بودند در مقایسه با گروه‌های درمان شده با سلول بنیادی مشتق از مغز استخوان، چسب فیبرین و گروه کنترل اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در مقایسه سلول‌های بنیادی خودی مشتق از مغز استخوان با چسب فیبرین و گروه کنترل اختلاف معنی‌دار وجود داشت (به ترتیب $P=۰/۰۰۶$ و $P=۰/۰۰۵$).

در کلاژن تیپ ۳ و در مقایسه گروه درمانی با سلول بنیادی خودی مشتق از بافت چربی با گروه کنترل اختلاف معنی‌دار وجود داشت ($P=۰/۰۴۱$). ولی در مقایسه آن با گروه‌های درمان شده با سلول‌های بنیادی خودی مشتق از مغز استخوان و گروه درمانی چسب فیبرین اختلاف معنی‌دار نبود.

جدول ۳. مقایسه سطح معنی‌داری اختلاف در میزان بیان ژن کلاژن تیپ ۱ و ۳ بین گروه‌های درمانی.

ژن مورد مطالعه	گروه درمانی	گروه درمانی	معنی‌داری
کلاژن تیپ ۱	سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی	سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان	۰/۱۶۸
		چسب فیبرین	۰/۰۸۴
		شاهد	۰/۰۷۵
	سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان	سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی	۰/۱۶۸
		چسب فیبرین	۰/۰۰۶*
		شاهد	۰/۰۰۵*
	چسب فیبرین	سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی	۰/۰۸۴
		سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان	۰/۰۰۶*
		شاهد	۰/۹۵۰
	شاهد	سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی	۰/۰۷۵
		سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان	۰/۰۰۵*
		چسب فیبرین	۰/۹۵۰
کلاژن تیپ ۳	سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی	سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان	۰/۱۱۲
		چسب فیبرین	۰/۳۳۵
		شاهد	۰/۰۴۱*
	سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان	سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی	۰/۱۱۲
		چسب فیبرین	۰/۰۱۹*
		شاهد	۰/۰۰۲*
	چسب فیبرین	سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی	۰/۳۳۵
		سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان	۰/۰۱۹*
		شاهد	۰/۲۲۵
	شاهد	سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از چربی	۰/۰۴۱*
		سلول بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان	۰/۰۰۲*
		چسب فیبرین	۰/۲۲۵

*بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین دو گروه می‌باشد ($P<۰/۰۵$).

در مقایسه گروه درمانی با سلول بنیادی خودی مشتق از مغز استخوان با گروه درمان شده با چسب فیبرین و گروه کنترل اختلاف معنی‌دار وجود داشت (به ترتیب $P=۰/۰۱۹$ و $P=۰/۰۰۲$).

جزئیات نتایج حاصله به ترتیب در جداول ۲ و ۳ آورده شده است.

بحث

استفاده از سلول‌های بنیادی برای التیام و بازسازی بافت‌های مختلف که از مناطق مختلفی مثل مغز استخوان، بندناف و بافت چربی استخراج شده‌اند که معمولاً با اثرات مثبت و مشابهی همراه بوده است. تاکنون مطالعات معدودی در رابطه با استفاده از سلول‌های بنیادی در بیماری‌های پوستی اسب‌ها انجام شده است. در یکی از این مطالعات که توسط Spaas و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام شد، از سلول‌های بنیادی خون محیطی اسب جهت درمان زخم‌های تروماتیک چهار اسب بالغ که به درمان با سایر روش‌ها حداقل به مدت ۳ ماه پاسخ مناسبی نداده بودند، استفاده شده است (۱۳). بر اساس نتایج حاصله، نویسندگان ارزیابی مثبتی از روند التیام زخم‌ها از نظر ظاهری و بالینی داشته‌اند. در مطالعه‌ای دیگر، توسط Broeckx و همکاران در سال ۲۰۱۵ عملکرد سلول‌های بنیادی شبه اپیتلیال (epithelial-like stem cells) اتولوگ و آلوژن در روند التیام زخم در اسب را ارزیابی کردند. بر اساس نتایج این مطالعه سلول‌های بنیادی شبه اپیتلیال در هر دو حالت اتولوگ و آلوژن تأثیر مثبت و مشابهی در تشکیل بافت گرانوله، عروق‌زایی و پاسخ ایمنی سلولی داشته‌اند (۴).

سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی به علل مختلف از جمله سهولت تهیه، تعداد بسیار زیاد سلول‌های بنیادی بدست آمده در استحصال اولیه و قابلیت تبدیل شدن به رده‌های مختلف

سلولی نظر محققین را جلب کرده است (۱،۱۰). De Ugarte و همکاران در سال ۲۰۰۳ با مقایسه سلول‌های بنیادی بدست آمده از مغز استخوان و بافت چربی ضمن برشمردن ویژگی‌های فوق‌الذکر با جزئیات کامل نشان دادند که این سلول‌ها تمام ویژگی‌های سلول‌های بنیادی بدست آمده از مغز استخوان را از نظر تبدیل به رده‌های مختلف سلولی، دارا بوده و بکارگیری آن را در مهندسی بافت و بستری برای انتقال ژن (gene delivery vehicles) توصیه نموده‌اند (۷). در مطالعه De Villiers و همکاران در سال ۲۰۰۹ نیز به نقش و جایگاه ویژه سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی در التیام زخم در انسان اشاره شده است. هرچند حجم مقالات در مورد بکارگیری این سلول‌ها در اسب زیاد نیست (۸).

نتایج این مطالعه نشان داد که منبع سلول‌های بنیادی مزانشیمی در بیان ژن‌های کلاژن‌های ماتریکس خارج سلولی واجد اهمیت می‌باشد. در مطالعه حاضر با وجود آنکه بیشترین میزان بیان ژن‌های کلاژن‌های تیپ ۱ و ۳ مربوط به زخم‌های گروه سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان بود اما بین این سلول‌ها و سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی که در رتبه دوم از نظر بیان ژن کلاژن‌های تیپ ۱ و ۳ قرار داشت، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. در مقایسه با چسب فیبرین که امروزه در جهت تسریع فرآیند ترمیم زخم‌ها نیز بکار برده می‌شوند، سلول‌های بنیادی مزانشیمی با هر دو منشأ سبب بیان غلظت‌های بالاتر کلاژن شده‌اند. بنابراین بر اساس نتایج مطالعه حاضر، استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان بهترین عملکرد را در روند التیام زخم داشته است (اختلاف معنی‌دار با گروه چسب فیبرین و گروه کنترل)، هر چند سلول‌های بنیادی مشتق از بافت چربی نیز با توجه به مزایایی نظیر سهولت تهیه، تعداد بسیار زیاد سلول‌های بنیادی بدست آمده در استحصال اولیه عملکردی قابل قبول داشته و در رابطه با افزایش بیان ژن کلاژن تیپ ۳ که عمده‌ترین کلاژنی است که در مرحله اول ترمیم ساختاری توسط سلول‌های فیبروبلاست تولید و ترشح می‌شود و بدین وسیله شبکه اولیه برای قرار گرفتن سلول‌ها و همچنین تشکیل بافت را تشکیل می‌دهد، نیز اختلافی معنی‌دار با گروه کنترل داشته است.

در مطالعه Burk و همکاران در سال ۲۰۱۴ سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت‌های مختلف از نظر مارکرهای تاندونی اسب نظیر پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی تاندون مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این مطالعه مشخص گردید سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی بیشترین غلظت کلاژن تیپ ۱ آلفا ۲ و کلاژن تیپ ۳ آلفا ۱ را در مقایسه با سایر منابع سلول‌های بنیادی مزانشیمی نظیر مغز استخوان، بافت تاندون، خون و بافت بندناف و حتی بافت تمایز یافته تاندون داشته‌اند، بنابراین سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی می‌توانند در مقایسه با سایر منابع عملکرد بهتری در سازماندهی مجدد ماتریکس تاندون داشته باشند (۵). در مطالعه Nixon و همکاران در سال ۲۰۰۸ که از سلول‌های فوق در ترمیم تاندون خم‌کننده سطحی بندهای انگشت اسب استفاده کرده‌اند، با وجود آنکه از نقطه نظر اولتراسونوگرافی تفاوتی بین گروه درمان و کنترل در میزان و کیفیت بهبود وجود نداشت، اما از نقطه نظر بافت‌شناسی، سلول‌های مشتق شده از بافت چربی کارایی بالاتری در بهبود ساختار بافتی تاندون داشته‌اند. از سوی دیگر اما بیان ژن‌های کلاژن تیپ ۱ و ۳ بین دو گروه درمان و کنترل تفاوتی نداشته است (۱۲). بر اساس نتایج حاصله در مطالعه حاضر، سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از مغز استخوان در مقایسه با آن‌هایی که از بافت چربی مشتق شده‌اند، به‌صورت in vivo در بیان ژن‌های کلاژن‌های تیپ ۱ و ۳ در روند التیام زخم‌ها عملکرد بهتری داشتند. با این وجود اختلاف معنی‌داری بین این دو گروه مشاهده نشد. لازم به ذکر است در رابطه با کاربرد سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از مغز استخوان در بهبود روند التیام زخم‌ها در اسب‌ها تاکنون مطالعه‌ای صورت نپذیرفته است، اما مطالعات در سایر گونه‌ها و از جمله انسان تأثیر مثبت این سلول‌ها را در روند التیام زخم مشخص ساخته است (۳،۶).

در نهایت با توجه به مزایای سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی از جمله سهولت تهیه، تعداد بسیار زیاد سلول‌های بنیادی بدست آمده در استحصال اولیه و عملکرد قابل قبول این سلول‌ها در روند التیام زخم براساس یافته‌های حاصله در مطالعه حاضر، استفاده از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بافت چربی را می‌توان به عنوان روشی نوین در تسریع فرایند التیام زخم‌های اندام حرکتی در اسب مد نظر قرار داد، هر چند طراحی مطالعات متعدد در مقیاس وسیع‌تر و با در نظر گرفتن حالات پاتولوژیک متفاوت می‌تواند در پیشبرد کاربرد سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق شده از بافت‌های مختلف و از آن جمله بافت چربی بسیار راه‌گشا باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله برخود واجب می‌دانند که از همکاری‌های بی‌دریغ آقایان دکتر پرهام متقیان، دکتر سیدسعید

طباطبایی، دکتر ایرج اشرافی و دکتر حسین امینیان‌فر جهت همکاری و پیشبرد این امر، کمال تشکر را داشته باشند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Attia, N., Mashal, M. (2021). Mesenchymal stem cells: the past present and future. Adv Exp Med Biol, 1312, 107-129. 46-49. https://doi.org/10.1007/5584_2020_595
2. Bertozzi, N., Simonacci, F., Grieco, M.P., Grignaffini, E., Raposio, E. (2017). The biological and clinical basis for the use of adipose-derived stem cells in the field of wound healing. Ann Med Surg (Lond), 20, 41-48. 46-49. https://doi.org/10.1016/j.amsu.2017.06.058
3. Borena, B.M., Martens, A., Broeckx, S.Y., Meyer, E., Chiers, K., Duchateau, L., Spaas, J.H. (2015). Regenerative skin wound healing in mammals: State-of-the-art on growth factor and stem cell based treatments. Cellular Physiology and Biochemistry, 36(1), 1-23. 46-49. https://doi.org/10.1159/000374049
4. Broeckx, S.Y., Borena, B.M., Van Hecke, L., Chiers, K., Maes, S., Guest, D.J., Meyer, E., Duchateau, L., Martens, A., Spaas, J. H. (2015). Comparison of autologous versus allogeneic epithelial-like stem cell treatment in an in vivo equine skin wound model. Cytotherapy, 17(10), 1434-1446. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.06.004
5. Burk, J., Gittel, C., Heller, S., Pfeiffer, B., Paebst, F., Ahrberg, A.B., Brehm, W. (2014). Gene expression of tendon markers in mesenchymal stromal cells derived from different sources. BMC Res Notes, 7, 826. https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-826
6. Cequier, A., Sanz, C., Rodellar, C., Barrachina, L. (2021). The usefulness of mesenchymal stem cells beyond the musculoskeletal system in horses. Animals, 11(4), https://doi.org/10.3390/ani11040931
7. De Ugarte, D.A., Morizono, K., Elbarbary, A., Alfonso, Z., Zuk, P.A., Zhu, M., Dragoo, J.L., Ashjian, P., Thomas, B., Benhaim, P., Chen, I., Fraser, J., Hedrick, M.H. (2003). Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. Cells Tissues Organs, 174(3), 101-109. https://doi.org/10.1159/000071150
8. de Villiers, J.A., Houreld, N., Abrahamse, H. (2009). Adipose derived stem cells and smooth muscle cells: implications for regenerative medicine. Stem Cell Rev Rep, 5(3), 256-265. https://doi.org/10.1007/s12015-009-9084-y
9. Harmon, C.C.G., Hawkins, J.F., Li, J., Connell, S., Miller, M., Saenger, M., Freeman, L.J. (2017). Effects of topical application of silver sulfadiazine cream, triple antimicrobial ointment, or hyperosmolar nanoemulsion on wound healing, bacterial load, and exuberant granulation tissue formation in bandaged full-thickness equine skin wounds. American J Vet Res, 78(5), 638-646. https://doi.org/10.2460/ajvr.78.5.638
10. Holm, J.S., Toyserkani, N.M., Sorensen, J.A. (2018). Adipose-derived stem cells for treatment of chronic ulcers: current status. Stem Cell Res Ther, 9(1), 142. https://doi.org/10.1186/s13287-018-0887-0
11. Li, P., Guo, X. (2018). A review: therapeutic potential of adipose-derived stem cells in cutaneous wound healing and regeneration. Stem Cell Res Ther, 9(1), 302. https://doi.org/10.1186/s13287-018-1044-5
12. Nixon, A.J., Dahlgren, L.A., Haupt, J.L., Yeager, A.E., Ward, D.L. (2008). Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. Am J Vet Res, 69(7), 928-937. https://doi.org/10.2460/ajvr.69.7.928
13. Spaas, J.H., Broeckx, S., Van de Walle, G.R., Polettini, M. (2013). The effects of equine peripheral blood stem cells on cutaneous wound healing: a clinical evaluation in four horses. Clin Exp Dermatol, 38(3), 280-284. https://doi.org/10.1111/ced.12068
14. Theoret, Ch., Schumacher, J. (2016). Equine Wound Management. (3rd ed). Wiley Blackwell Ltd. Pondicherry, India.
15. Uder, C., Brückner, S., Winkler, S., Tautenhahn, H.M., Christ, B. (2018). Mammalian MSC from selected species: Features and applications. Cytometry Part A, 93(1), 32-49. https://doi.org/10.1002/cyto.a.23239
16. Wilmink, J.M., Ladefoged, S., Jongbloets, A., Vernooij, J.C.M. (2020). The evaluation of the effect of probiotics on the healing of equine distal limb wounds. PLOS ONE, 15(7), e0236761. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236761
17. Yamanaka, S. (2020). Pluripotent stem cell-based cell therapy-promise and challenges. Cell Stem Cell, 27(4), 523-531. https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.09.014