بررسی یک روش ازروش های کشت سلولی بافت اپی تلیال در پوست خرگوش Albino

ایرج جعفری انارکولی * دکترمرتضی شمشیری **

خلاصه:

هدف از این بررسی استفاده از روش های کشت سلولی در تکثیر بافت اپی تلیوم و تهیه یک لایه منسجم از آن به منظور ترمیم و پیوند نواحی بدون پوست بویژه در سوختگیهای حرارتی بیش از ۵۰٪ میباشد که در این روش ما پنج رأس خرگوش از نژاد Albino باسن متوسط ۸ هفته را مورد مطالعه قرار دادیم . همچنین جهت بررسی و کنترل رشد و تکثیر بافت اتولوگ کاشته شده ، نمونه هائی به عنوان کشتهای یکروزه ، پنج‌روزه و هشت روزه برداشته و پس از تثبیت در فرمالین ۱۰٪ و طی مراحل مختلف تهیه مقاطع بافتی و رنگ آمیزی بروش H-E ، با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار دادیم . ضمنا" توانستیم سطح دهنده‌اولیه را تا ۱۸ برابر با توجه به شرایط و امکانات موجود افزایش دهیم .

واژه های کلیدی : ایران ، زنجان ، دانشگاه علوم پزشکی ، کشت بافت اپی‌تلیال ، پوست، خرگوش Albino

مقدمه:

در خلال قرن بیستم ، انسان دستاوردهای بنیادی و پرارزشی را در زمینه کشت بافت و سلولهای جانوری در خارج از بدن موجود زنده ، کسب نمود . امروزه از تکنیکهای کشت سلولی جهت بررسی هر چه بیشتر موارد بالینی انواع مختلف گرافتها و انتقال بافتها استفاده می‌گردد و همچنین از سلولهای پوستی کشت داده شده جهت پیوندها و حتی پوشش سطحی زخمها در بیماران مبتلا به سوختگی و اولسر استفاده می‌شود و پوست بعنوان یک بافت اپی‌تلیالی بصورت یک سد مهم و حیاتی در برابر عوامل خارجی ایفای نقش می‌کند.(۲) جانشینی پوست از دست رفته از مهمترین مسائل طب بالاخص جراحی ترمیمی و پلاستیک می‌باشد البته در مواردی که وسعت ناحیه نیازمند به پوست ، کوچک باشد از پوست خود شخص می‌توان بعنوان اتوگرافت استفاده‌کرد ولی در مواردیکه وسعت ناحیه نیازمندبه‌پوست زیاد باشد مثل سوختگیهای وسیع، خالهای بزرگ مادرزادی ، فقدان مادرزادی پوست و ضایعات‌تروماتیک که منجر به از دست دادن مقدار زیادی پوست می‌شود در اینصورت استفاده از روش‌های مختلف پیوند از جمله متخلخل کردن پیوند پوستی (Expansion mesh graft) در بسیاری از موارد کافی نخواهد بود. لذا امروزه متدهای جدیدی ارائه گردیده است که میتوان پوست را بصورت invitro تکثیر کرده و میلیونها سلول بدست آمده را در اتوگرافت

*کارشناس ارشد آناتومی ، عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان زنجان

** عضو هیئت علمی انستیتو پاستور ایران

بکار برد.(۳،۹،۶)

بـرای اولیـن بـار در سـال ۱۹۷۴ Freeman و همکارانش اقدام به کشت سلولهای اپی‌تلیالی پـوست بصورت Invitro نمودند. در این حالت از کشت ، وی قطعات کـوچکی از پـوست خـرگوش را بـر روی یک سطح پشتیبان از پوست خوک قرار داد تا رشد یافته و یک لایه سلولهای اپی‌تلیالی ایجاد گردد و از آن به طور موفق جهت پوشش مناطق بدون پوست استفاده نمود . در سـال ۱۹۷۵ Green and Rheinwald مـتد جدیدی جهت کشت سلولهای اپی‌تلیالی پوست ارائـه نمودند و آن کشت سلولهای اپی‌تلیالی بـر روی لایـه مغزی 3T3 (Letbally Irradiated 3T3 mouse Fibroblast) بود. بدین ترتیب که آنها کراتینوسیتهای انسانی جدا شده از اپیدرم فرد بالغ را روی لایه مـغزی 3T3 در حضور محیط کشتی متشکل از سـه قسـمت مـحیط کشت DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) و یک قسمت محیط کشت F12 Ham's که به آن ۱۰٪ سرم جنین گوساله ، انسولین، هـیدروکورتیزون، کـلراتـوکسین،تـرانسفرین، تـری یدوتیرونین، آدنین و فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) به مقدار لازم اضافه نمودند و در انکوباتور با درجه حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد، رطوبت مناسب و گـاز CO2 ۵٪ قرار دادند. در این محیط کراتینوسیتها از سلولهای منفرد بصورت تشکیل کلونیهای ماکروسکوپیک که محتوی هزاران سلول می‌باشد، رشد می‌کنند و محیط کشت هر دو تا سه روز عوض می‌شود و وقتی سلولها تمام سطح بستر را مـی‌پوشانند کشتهای اولیـه سپس تـریپسینه گـردیده و در فـلاسکهای کشت ۷۵ سـانتیمتر مـربع درحضور همان لایه دوباره کشت داده می‌شدند و وقتی سلولهای حاصل ، تمام سطح بستر را پوشاندند اتصال این سلولها با آنزیم Dispase II از کف ظرف برداشته می‌شد و برروی بستر زخم قرار می‌گرفت.(۳،۱،۱۰)

در سال ۱۹۸۱ O'connor نیز از همین روش جهت درمان سه تن از بیماران خود که دچار سوختگی شـده بـودند و در سـال ۱۹۸۳ Hefton نیز از روش کشت آلوژنـیک کـراتینوسیتها جهت بـیماران خـودش بـا سوختگی ۱۵ تا ۲۵ ٪ و در طی سالهای ۱۹۸۴ و۱۹۸۵ Gallico و همکارانش نیز از این روش جهت درمان ده تن از بیماران خود که دچار سـوختگی شـده بـودند بـا موفقیت استفاده نمودند. در سال ۱۹۸۶ Compton و همکاران مطالعات وسیعتری انجام دادند و توانستند بر روی ۲۱ کـودک بـا مـتوسط سـنی ۹ سال و مـیزان سـوختگی ۵۳ تـا ۹۸٪ و عـمق سـوختگی Full Thickness ، نـتایج مـوفقیت آمـیزی بـدست بـیاورند.(۸،۴،۵) در سـال ۱۹۹۰ Ronfard و هـمکارانش مـتد جـدیدی ارائـه نـمودند و آن کشت سلولهای بدست آمـده از کشت اولیـه بـر روی چسب فیبرین که بطور یکنواخت بر روی ظروف پتری پخش گردیده بود، می‌باشد که توانستند با این روش دو تن از بیماران خود را که دچار سوختگی بیش از ۵۰٪ سـطح بـدن و بـا عـمق سـوختگی Full Thickness شـده بودند، نتایج مـوفقیت‌آمیزی کسب کـنند و ایـن روش نسبت به روش‌های قبلی آسانتر می‌باشد زیرا اولاً نیازی به آنزیم Dispase II جهت جداکردن اتصال سلولها از کف ظرف نیست و همچنین دو یا سه جراح می توانند در عرض یکساعت با استفاده از فورسپس ، اپی‌تلیومی را بوسعت ۳۰۰۰ سانتی متر مربع به بستر زخـم بـه آسانی منتقل کنند.(۱۰،۸)

مواد و روش‌ها:

در این تجربه ما از پوست خرگوش استفاده کردیم. به این ترتیب که ازیک خرگوش ، پـوستی بـه ابـعاد ۶×۶ سـانتی‌متر،بعنوان سـطح سـاپورت بـرداشـتیم وآنـرا درمـحیط کشت EMEM[1] و در انکـوباتور بـا درجـه

1.(Eagles Minimum Essential Medium)

حرارت ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد و دی‌اکسید کربن ۵٪ و رطوبت مناسب (سطح درمال در بالا و سطح اپیدرمال در تماس با کف ظرف) قرار دادیم و بعد از سه روز از خرگوش دیگر ؛ پوستی به ابعاد ۱×۲ سانتی‌متر(بعنوان اتولوگ) برداشته و با استفاده از دو عدد اسکالپل آنرا به قطعات ریز تقسیم کرده و روی سطح ساپورت چیدیم ، در محیط کشت EMEM و درانکوباتور با درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد، دی اکسید کربن ۵٪ و رطوبت مناسب قرار دادیم ابتدا هر روز و سپس یکروز در میان محیط کشت را تعویض نمودیم رفته رفته مشاهده گردید که قطعات اتولوگ به سطح زیرین چسبیده و سطح بیشتری از آنرا پوشانده است و تا روز هشتم که آماده پیوند گردید، در ضمن نمونه‌هائی از بافت کاشته شده را بعنوان کشتهای یکروزه پنج روزه و هشت روزه جهت بررسی و کنترل نحوه رشد و تکثیر قطعات کاشته شده برداشته و بوسیله فرمالین ۱۰٪ پس از طی مراحل مختلف تهیه مقاطع بافتی و رنگ آمیزی بروش H-E در زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار دادیم.

نتایج:

نتایج شامل دو قسمت است:

۱- نتایج ماکروسکوپی : از روز اول که قطعات اتولوگ کاشته شد تا روز هشتم که آماده پیوند گردید مشاهده شد که قطعات اتولوگ بتدریج به سطح ساپورت چسبیده و سطح بیشتری از آنرا می‌پوشاند به این ترتیب توانستیم سطحی بوسعت ۱۸ برابر سطح دهنده اولیه بدست بیاوریم . (شکل ۱)

۲- نتایج میکروسکوپی : که شامل بررسی کشتهای یکروزه ، پنج‌روزه و هشت روزه می‌باشد.

در بررسی میکروسکوپی کشتهای یکروزه ، مشاهده گردید که بین بخش اپیدرمال و درمال پوست یک فاصله‌ای ایجاد شده است همچنین سلولهای سطحی بخش اپیدرمال کاملاً دژنره شده و بصورت کراتینه در آمده‌اند و فقط سلولهای پایه‌ای آن جهت رشد و تکثیر و تشکیل لایه اپی‌تلیالی جدید باقی مانده‌اند و در بخش درمال نیز فولیکولهای مو، غدد چربی و عرق نظم پوست طبیعی را دارا هستند بنابراین در کشت یکروزه در سلولهای پایه‌ای اپیدرم ، سلولهای بخش خارجی فولیکولهای مو ، غدد چربی و عرق هیچگونه رشد و تکثیر و متعاقب آن مهاجرتی جهت تشکیل لایه‌ای اپی‌تلیالی جدید صورت نگرفت .(شکل ۲)

در بررسی میکروسکوپی کشتهای پنج روزه ، مشاهده شد که اولاً فاصله بین بخش اپیدرمال و درمال پوست کاشته شده کاسته شده و ثانیاً دیده می‌شود که سلولهای پایه‌ای بخش اپیدرمال ، سلولهای بخش خارجی فولیکولهای مو ، غدد چربی و عرق رشد و تکثیر نموده ، در ضمن جهت تشکیل لایه اپی‌تلیال جدید مهاجرت حاصل نموده‌اند .

در بررسی میکروسکوپی کشت هشت روزه ، مشاهده شد که سلولهای پایه‌ای بخش اپیدرمال ، سلولهای بخش خارجی ، فولیکولهای مو، غدد چربی و عرق کاملاً رشد و تکثیر و مهاجرت کرده و تشکیل یک لایه اپی‌تلیال جدید نموده‌اند که این لایه اپی‌تلیالی در بعضی جاها شامل یکردیف سلول و در بعضی جاها بیش از یک ردیف سلول می‌باشد. بنابراین قطعات اتولوگ کاشته شده در روز هشتم کاملاً آماده پیوند می‌گردد.(شکل ۴).

بحث:

از جمله نتایج بدست آمده این می‌باشد که سلولهای اپی‌تلیالی از جمله پوست می‌تواند در خارج از محیط طبیعی بدن در شرایط آزمایشگاهی و در محیطهای کشت رشد کرده و یک لایه منسجم ایجاد نمایند . تقریباً تمام افرادی که روی کشت سلولهای اپی‌تلیالی مثل پوست کار کرده‌اند به این نکته اذعان دارند . از جمله

Freeman که روی کشت سلولهای اپی‌تلیالی پوست خرگوش روی سطح پشتیبان خوک کار کرده به این نتیجه رسیده است که قطعات اتولوگ بتدریج بـه دوم سـطح پشتیبان چسبیده و سلولهای اپی‌تلیالی شروع به رشد و تکثیر می‌نمایند و تشکیل یک لایه اپـی‌تلیالی جـدید مـی‌دهند.(۷) Oconnor و Gallico کـه روی کشت سلولهای کراتینوسیت پوست انسان روی لایـه مـغزی 3T3 بصورت تشکیل کلونی کار کرده‌اند به همین نتیجه رسیده‌انـد Green و Rheinwald نیزکه روی کشت کراتینوسیتهای انسانی فرد بـالغ بـصورت کـلونی روی لایه مغزی 3T3 کار کرده‌اند نیز به نتیجه مشابه رسیده‌اند نتیجه حاصل شده بعدی استفاده از لایه های اپی‌تلیالی کشت داده شده اپی‌تلیوم بعنوان پیوند جهت پـوشش زخمها و سوختگیهای وسیع که نیاز به پوشش دارند ، می‌باشد ، دیگران نیز که در این زمینه کار کرده‌اند نـظر مشـابه دارنـد، مـثل Freeman و یـا Compton و همکارانش که بر روی ۲۱ کودک با سن متوسط ۹ سال و سوختگیهای تمام ضخامت به میزان ۵۳ تا ۹۸٪ سطح بدن با موفقیت کار کردند Gallico و Hefton نیز بـا استفاده از همین روش بافت اپی‌تلیالی تشکیل شـده ، جهت پوشش ده و دو بیمار خود بـا مـوفقیت انـجام دادنـد. (۵،۷،۸،۹،۱۰) مـورد بـعدی وسـعت نـاحیه پوششی با توجه به وسعت نـاحیه دهـنده و هـمچنین زمان لازم برای تشکیل لایه‌های اپی‌تلیالی و استفاده از آنها بعنوان پیوند جهت پوشش نواحی بـدون پـوشش می‌باشد . ما در تحقیق خود توانستیم با توجه به شرایط و امکانات موجود ، ظرف مدت ۱۱ روز سطح اپی‌تلیال خرگوش دهنده را تا ۱۸ برابر افزایش دهیم. Freeman و همکارانش اعتقاد دارند که در حالت مناسب بـا ایـن روش سطح اپی‌تلیال خرگوش دهنده ظرف ۷ تا ۲۱ روز می‌تواند تا ۵۰ برابر افزایش یابد. در پاره‌ای موارد بدلیل تفاوت شرایط و روش کار نتایج حـاصله بـانتایج ایـن تجربه متفاوت است.(۷)بطوریکه Ronfard توانست ظرف مدت ۲۱ روز از هر بیمارش بترتیب ۵۳۴۲Cm2 ، ۷۵۰Cm2 ، از اپی‌تلیوم کشت داده شده بدست بیاورد و بیش از ۵۰٪ سطح بـدن بـیماران خـود راکـه دچـار سـوختگی شـده بـودند بـا مـوفقیت بـپوشاند.(۹) Compton نیز ظـرف هـمین مـدت تـوانست هـزاران سلول اپی‌تلیالی کشت داده شده بدست آورد و از آنـها برای پوشش نواحی بدون پوست بیماران خود استفاده کند.(۳،۴)

مورد بعدی بـررسی نـحوه رشـد ، تکـثیر و مـهاجرت سلولهای اپی‌تلیالی اتولوگ کاشته شده ، ۲۴ ساعت بعد از کاشته شدن تا روز هشتم که بافت کاشته شده آمـاده پیوند مـی‌گردد، مـی‌باشد. کـه Freeman نـیز بـهمین صورت بررسی کرده و به‌نتایج مشابه دست یافته است (۳،۷،۱۰) و Ronfard نیز مطالعه میکروسکوپی روی کراتینوسیتهای کشت داده شده قبل از پیوند انجام داده و مشاهده کرده که اپی‌تلیوم کشت داده شده دارای ۶ تا ۵ لایه سلول کراتینوسیتی است (۹) و Gallico نیز که در چند مورد به بررسی میکروسکپی لایه‌های اپـی‌تلیالی کشت داده شده که بـرای انـجام پـیوند آمـاده هسـتند، پرداخته و مشاهده کرد که دارای ضخامتی در حدود ۲ تا ۸ ردیف سلول می‌باشد کـه ایـن تـفاوت‌ها مـی‌توانـد احـتمالاً نـاشی از تـفاوت در نـمونه مـورد اسـتفاده و روش‌های کشت سلولی مورد استفاده باشد.(۶،۸،۹)

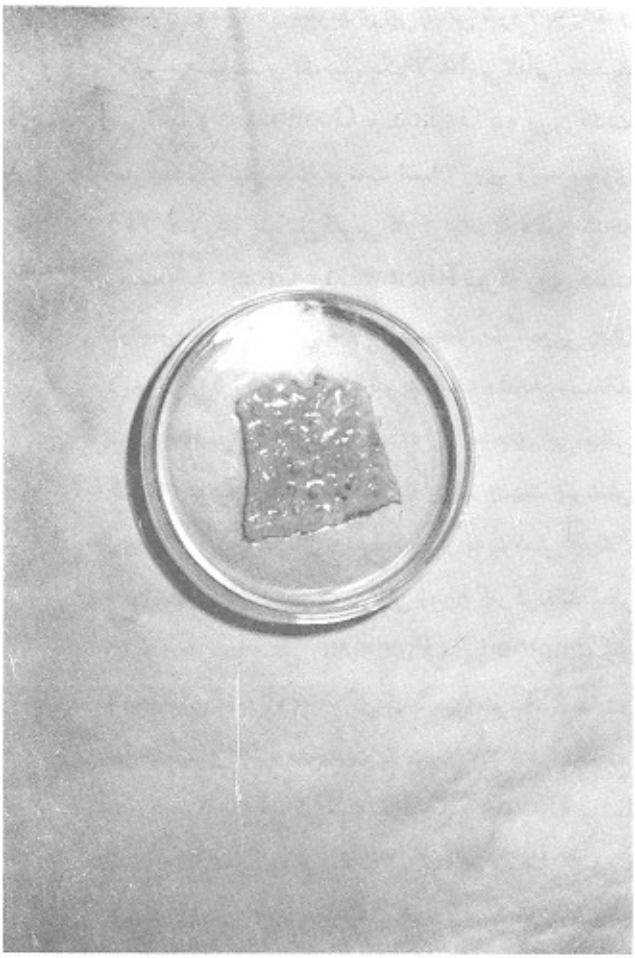
در پایان امیداوریم که انشاءا...

۱- روی کشت سلولهای کراتینوسیت پوست انسان بر روی لایه مغزی 3T3 کار شود.

۲- ضمناً جهت بررسی و کنترل رشد و تکثیر سلولهای کاشته شده سعی شود بصورت روزانه مقاطع بافتی تهیه و بررسی میکروسکوپی انجام شود.

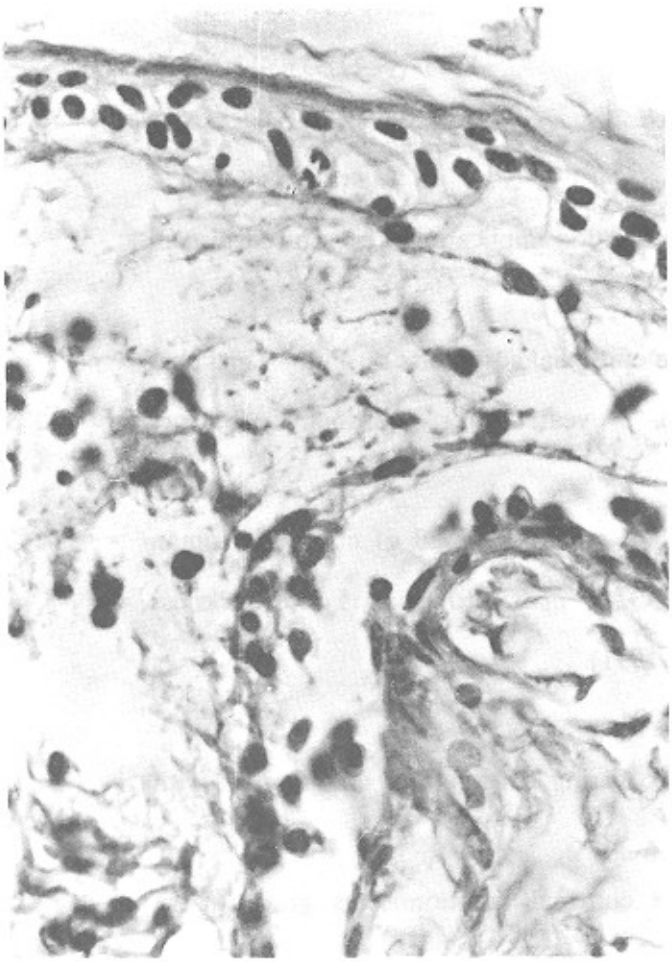
۳- همچنین کار تـیمی مـتشکل از مـتخصصین کشت سلولی، جراحی ترمیمی و پلاستیک، بافت شـناسی ، بـیهوشی و غـیره انـجام شـود . انشـاءا... هـم اسـتفاده بهینه از وقت شود و هم کار بهتر و بـی‌عیب و نـقصی

ارائـه گـردد تـا کسـانیکه از ایـن مسئله رنـج مـی‌برند بالاخص‌افراد دچـار سـوختگی بـه مـیزان وسـیع و بـا عمق زیاد راه‌حلی اصولی ارائه شود.

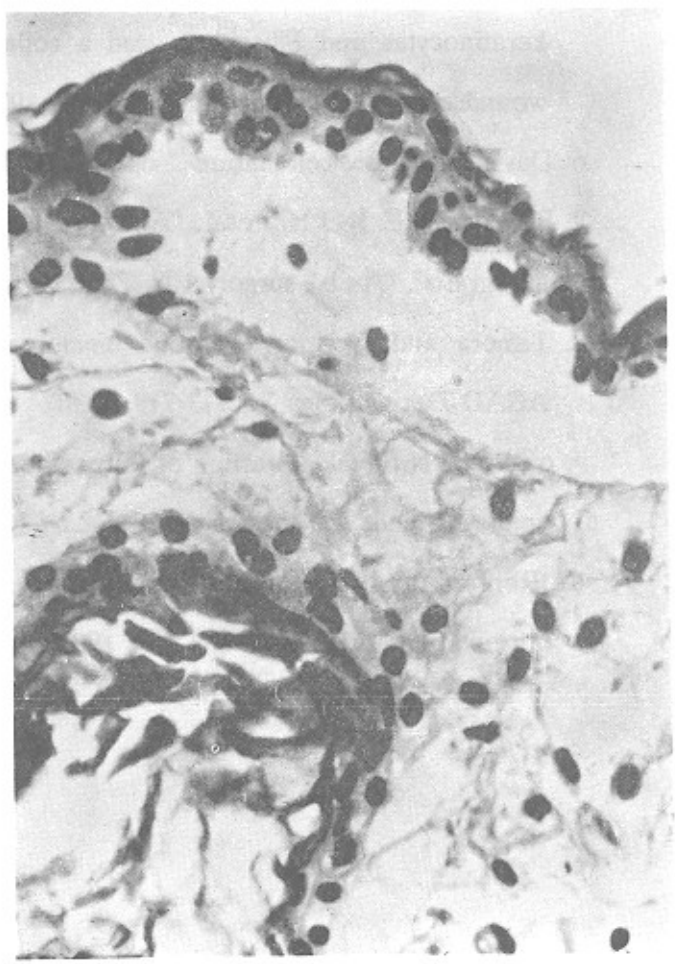


تصویر شماره ۱ - بـعداز هشت روز کـه سـطح بیشتری از ساپورت با اتولوگ پوشیده شده است

تصویر شماره ۲ - بخش اپیدمی اتـولوگ کـاشته شده بطور واضح از بخش درمی آن جدا شده و یک فاصله ای بین آنـدو مـوجود است ودژنـره شدن سـلولهای اپـیدرم مشـهود است و سـلول -هـای فـولیکولیهای مـو ، غـدد چـربی و عـرق بصورت جزایری مجتمع دیده میشوند . (کشت یکروزه) (H8E × 23)



تصویر شماره ۳ - (کشت پنج روزه) . سلولهای پایه ای تکثیر یافته‌اند و در حال مهاجرت هستند . سلولهای بخش مرکزی فولیکول مودژنره شده و سلولهای لایه خارجی تکثیر یافته اند و در حال مهاجرت هستند . (400 × H8E)



تصویر شماره ۴ - (کشت هشت روزه) تکثیر و مهاجرت سلولها و همچنین تشکیل لایه اپی تلیالی جدید ودژنره شدن سلولهای بخش مرکزی فولیکول مو بوضوح دیده میشود و تعدادی سلول میتوتیک نیزبطور واضح دیده می شوند .(400 × H8E)

کتابنامه:

۱- خوانساری . ن و شمشیری . م ." روشهای بنیادی کشت یاخته‌های جانوری" انتشارات مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی .۱۳۷۴.

۲- محسنی ج . امیر، ن " ترمیم زخم‌های وسیع با استفاده از کشت سلولهای اپی تلیال اتولوگ ، استاد راهنما، کیهانی . ع ، شماره پایان‌نامه ۴۲۲۵

3. Arons wain wright. Jordon. "The surgical application and implications of cultured human epidermis". (surgery 111.74-77, 1992).
4. Compton c.c. etal ." Skin regenerated from culture epithelial autografts on Full - Thickness burn wounds from 6 days to 5 days to 5 years after grafting".(Laboratory Investigation.60,600-612, 1989).
5. cooper and Hansbrough. "Use of a composite skin graft composed of cultured Human keratinocytes and Fibroblasts and a collagen - GAG matrix to cover Full- Thickness woundson Athymic mice". (surgery 109, 198-207, 1991).
6. Davis J.M."Basic cell culture ." oxford IRl.Press 1994.
7. Freeman A.E. Igel H..J etal . "A new methods for covering lavge surface erea wounds with autografts". (Arch . surgery 108, 721-729, 1974).
8. Limora and Gerkin." synthetic membranes and cultured kerationocytes grafts".(JAM ACAD Dermatology 23, 713-719, 1990).
9. o'connor N.E.etal. "Grafting of burns with cultured epithelium prepared from outografts epidermal cells". (The lancet 7, 75-78, 1987).
10. Ronfard eta l."Use of human keratinocytes cultured on Fibrin Glue in The treatment of burn wounds".(Brun 17, 181-184, 1991).