روش‌های کشت بافت اپی‌تلیال در پوست خرگوش Albino

دکتر سیدمحمدحسین نوری موگهی ـ استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر باقر مینایی زنگی ـ استادیار دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر مرتضی شمشیری ـ استاد انستیتو پاستور ایران
جعفری انارلوکی ـ کارشناس ارشد آناتومی گروه آناتومی

Methods of Epithelial Tissue Culture in Albino Rabbit Skin

ABSTRACT

With the intention of research of various methods of epithelial tissue culture we've studied five french Albino rabbits with an average of 8 weeks. In order to evaluate and control growth and proliferation of autologus cultured tissue samples were obtained on 1st, 5th and 8th days. After fixation of these samples and passing them through various processes, histologic sections were prepared. These sections were stained with H-E and studied by light microscope, we succeeded in developing the original donor surface by 18 times.

Key Words: Culture , Epithelial tissue, Albino rabbit.

چکیده

به منظور بررسی روشهای کشت بافت اپی‌تلیال، پنج رأس خرگوش فرانسوی از نژاد آلبینو، به سن متوسط هشت هفته را مورد مطالعه قرار دادیم. بدین نحو که جهت بررسی و کنترل رشد و تکثیر بافت اتولوگ کاشته شده، نمونه‌هایی به عنوان کشتهای یک روزه، پنج روزه و هشت روزه برداشت و پس از تثبیت در فرمالین ۱۰ درصد و طی مراحل مختلف تهیه مقاطع بافتی و رنگ‌آمیزی به روش H-E با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار دادیم و توانستیم سطح دهنده اولیه را تا ۱۸ برابر افزایش دهیم.

مقدمه

در طول قرن بیستم، انسان دستاوردهای بنیادی و پرارزشی را در زمینه کشت بافت و سلولهای جانوری در خارج از بدن موجود زنده کسب نمود. امروزه در تکنیکهای کشت سلولی، جهت بررسی هرچه بیشتر موارد بالینی،از انواع مختلف پیوندها و انتقال بافتها استفاده می‌گردد. همچنین از سلولهای پوستی کشت داده شده جهت پیوندها و حتی پوشش سطحی زخمها در بیماران مبتلا به سوختگی و زخمهای وسیع استفاده می‌شود و استفاده از این روش بیشتر در مواردی که بدن فرد نیازمند به میزان وسیعی پوشش مثل سوختگیهای وسیع، خالهای بزرگ مادرزادی، فقدان مادرزادی پوست و غیره باشد، نمود پیدا می‌کند. بنابراین امروزه می‌توان با روشهای جدید ارائه شده در زمینه کشت بافتها و سلولها، پوست را بصورت invitro تکثیر داده و از میلیونها سلول بدست آمده بصورت اتوگرافت استفاده کرد(۲،۴،۵).

برای اولین بار، در سال ۱۹۷۴، Freeman و همکارانش اقدام به کشت سلولهای اپی‌تلیالی پوست خرگوش بصورت invitro بر روی سطح ساپورت از پوست خوک، در حضور محیط کشت (Eagle's EMEM (Minimum Essential Medical که به آن ۱۰ درصد fetal calf ، ۱۰۰ U/mp سرم پنی‌سیلین ۱۰۰ mg/ml, Q استرپتومایسین اضافه شده بود و در انکوباتور با درجه حرارت ۳۷°C، رطوبت ۶۰ درصد و گاز دی‌اکسید کربن ۶ درصد، قرار دادند(۴)

در سال ۱۹۷۵ Green & Rheinwald روش جدیدی جهت کشت سلولهای اپی‌تلیالی پوست انسان ارائه نمود و آن کشت سلولهای اپی‌تلیالی بر روی لایه مغذی (Lethally Irradiated 3T3 Mouse Fibroblat) 8T3 بود. با این روش می‌توان از یک نمونه کوچک پوستی (به وسعت ۳-۲ سانتی‌متر مربع) میلیونها سلول بدست آورد و جهت پیوند و پوشاندن مناطق بدون پوشش مورد استفاده قرار داد(۵،۷). در سال ۱۹۸۱، Occonor نیز از همین روش جهت درمان سه تن از بیماران خود که دچار سوختگی شده بودند، با موفقیت استفاده کرد(۶). در سال ۱۹۸۳، Hefton نیز از روش کشت آلوژنیک کراتینوسیتها، جهت درمان بیماران خود ـ با سوختگی ۱۵ تا ۲۵ درصد ـ با موفقیت استفاده نمود(۶،۱). در طی سالهای ۱۹۸۴ و ۱۹۸۵ Gallico و همکارانش از این روش جهت درمان ده تن از بیماران خود که دچار سوختگی شده بودند با موفقیت استفاده نمودند(۵). در سال ۱۹۸۶ Compton و همکارانش مطالعات وسیعتری انجام دادند و توانستند بر روی ۲۱

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-13]

کودک با متوسط سنی ۹ سال و میزان سوختگی ۵۳ تا ۹۸ درصد و عمق سوختگی Full Thickness نتایج موفقیت‌آمیزی کسب کنند(۲).

در سال ۱۹۹۰ Ronfand و همکارانش متد جدیدتری ارائه نمودند و آن، کشت سلولهای بدست آمده از کشت اولیه بر روی چسب فیبرینی که بطور یکنواخت بر سطح ظرف پتری دیش پخش گردیده است، بود که توانستند با این روش دو تن از بیماران خود را که دچار سوختگی بیش از ۵۰ درصد سطح بدن و با عمق سوختگی Full Thickness شده بودند، بطور موفقیت‌آمیز عمل کنند(۸).

مواد و روش کار

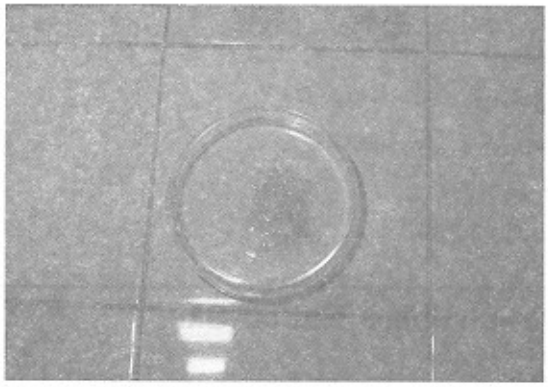
در این پژوهش از پوست خرگوش استفاده شد. به این ترتیب که از یک خرگوش، پوستی به ابعاد ۶ × ۶ سانتیمتر بعنوان سطح ساپورت برداشتیم و آن را بصورت برعکس در بوآت قرار دادیم (به این ترتیب که سطح اپیدرمال در کف بوآت و سطح درمال بافت ساپورت به طرف بالا قرار گرفت) و آن را در محیط کشت EMEM و در انکوباتور با درجه حرارت $37^{\circ}C$ ، رطوبت مناسب و گاز دی‌اکسید کربن ۵ درصد قرار دادیم و بعد از ۳ روز از خرگوش دیگر پوستی به ابعاد ۱ × ۲ سانتیمتر (بعنوان اتولوگ) برداشته و با استفاده از دو عدد اسکالپل آن را به قطعات ریز تقسیم کرده و روی سطح درمال بافت ساپورت چیدیم و در محیط کشت EMEM و در انکوباتور با درجه حرارت $37^{\circ}C$، رطوبت مناسب و گاز دی‌اکسید کربن ۵ درصد قرار دادیم. ابتدا هر روز و سپس یک روز در میان محیط کشت را تعویض نمودیم. رفته رفته مشاهده گردید که قطعات اتولوگ به سطح زیرین چسبیده و سطح بیشتری از آن را پوشانده است، تا روز هشتم که بافت کاشته شده آماده پیوند گردید. در ضمن نمونه‌هایی از بافت کاشته شده را بعنوان کشتهای یک روزه، پنج روزه و هشت روزه جهت بررسی و کنترل نحوه رشد و تکثیر قطعات کاشته شده، برداشته، بوسیله فرمالین ۱۰ درصد تثبیت کرده و پس از طی مراحل مختلف تهیه مقاطع بافتی و رنگ‌آمیزی به روش H&E با استفاده از میکروسکوپ نوری، مورد بررسی قرار دادیم.

نتایج

نتایج شامل دو قسمت است :

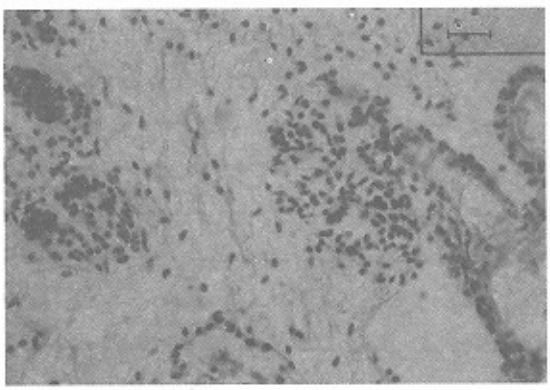
۱ـ نتایج ماکروسکوپی : از روز اول که قطعات اتولوگ کاشته می‌شوند، تا روز هشتم که بافت آماده پیوند می‌گردد، قطعات اتولوگ به سطح ساپورت چسبیده و سطح بیشتری از آن را می‌پوشانند و به این ترتیب ما توانستیم با توجه به امکانات و شرایط موجود، سطحی به وسعت ۱۸ برابر سطح دهنده اولیه بدست آوریم(تصویر ۱).

تصویر ۱ـ بعد از هشت روز که سطح بیشتری از بافت پشتیبانی با اتولوگ پوشیده شده است



۲ـ نتایج میکروسکوپی : که شامل بررسی کشتهای یک روزه، پنج روزه و هشت روزه و مقایسه آنها با یکدیگر می‌باشد. در بررسی میکروسکوپی کشتهای یک روزه، مشاهده می‌گردد که بین بخش اپیدرمال و درمال پوست، فاصله‌ای ایجاد شده و 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 پوست نیز سلولهای بخش خارجی فولیکولهای مو، غدد چربی و عروق آن نظم و هماهنگی پوست طبیعی را دارا هستند. بنابراین در کشتهای یک روزه ، سلولهای پایه‌ای اپیدرم، سلولهای بخش خارجی فولیکولهای مو، غدد چربی و عرق هیچگونه رشد و تکثیر و متعاقب آن مهاجرتی جهت تشکیل لایه اپی‌تلیالی جدید صورت نمی‌گیرد (تصویر ۲).

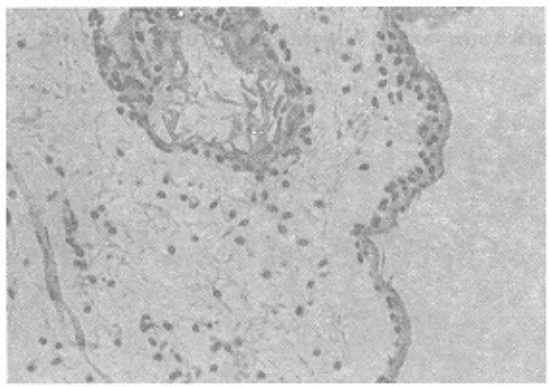
تصویر ۲ـ کشت یکروزه، رنگ‌آمیزی H & E x 400



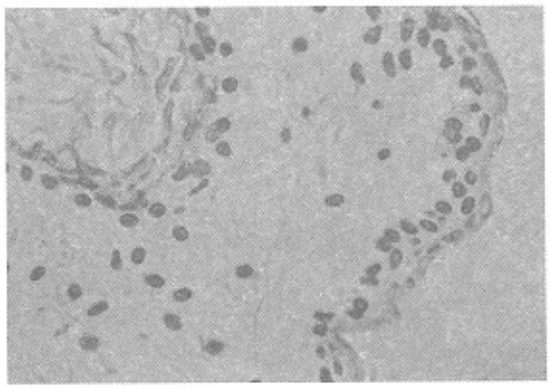
[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-13]

در بررسی میکروسکوپی کشتهای پنج روزه مشاهده می‌گردد که اولاً فاصله بین اپیدرمال و درمال پوست کاشته شده، کاسته شده و ثانیاً سلولهای پایه‌ای بخش اپیدرمال و سلولهای بخش خارجی فولیکولهای مو، غدد چربی و عرق رشد و تکثیر نموده و همچنین جهت تشکیل لایه اپی‌تلیالی جدید مهاجرت نموده‌اند(تصاویر ۳ و۴). در بررسی میکروسکوپی کشت هشت روزه، مشاهده می‌گردد که سلولهای پایه‌ای بخش اپیدرمال و سلولهای بخش خارجی فولیکولهای مو، غدد چربی و عرق کاملاً رشد و تکثیر و مهاجرت نموده و یک لایه اپی‌تلیالی جدید ایجاد کرده‌اند که این لایه اپی‌تلیالی در بعضی جاها شامل یک ردیف سلول و در بعضی جاها بیش از یک ردیف می‌باشد (تصویر ۵). در نتیجه، قطعات اتولوگ کاشته شده، در روز هشتم کاملاً آماده پیوند می‌گردند. در مجموع می‌توان گفت که سلولهای اپی‌تلیالی از جمله سلولهای اپی‌تلیالی پوست را می‌توان بصورت Invitro رشد و تکثیر نمود و از آن بعنوان پیوند جهت پوشش مناطق بدون پوست، استفاده نمود و وسعت ناحیه دهنده را، با توجه به وسعت ناحیه‌ای که باید تحت پوشش قرار بگیرد، بر اساس شرایط و امکانات موجود تا چندین برابر افزایش داد.

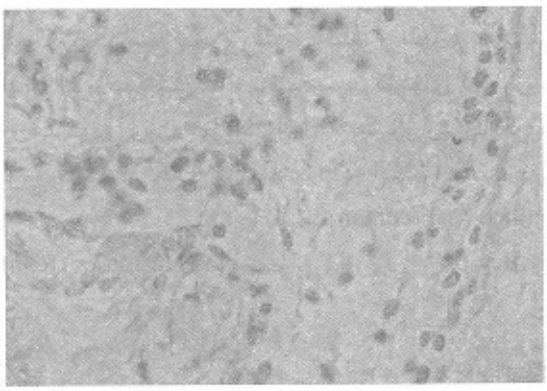
تصویر ۳ـکشت پنج روزه رنگ‌آمیزی H & E x 200



تصویر ٤ـکشت پنج روزه رنگ‌آمیزی H & E x 400



تصویر ۵ـکشت هشت روزه رنگ‌آمیزی PAS x 400



بحث

یکی از نتایج بدست آمده این می‌باشد که سلولهای اپی‌تلیالی از جمله سلولهای اپیدرمی پوست، می‌توانند در خارج از محیط طبیعی بدن در شرایط Invitro در محیطهای کشت، رشد نمایند و یک لایه منسجم ایجاد نمایند که از آن می‌توان بعنوان پیوند و پوشش جهت مناطق بدون پوست استفاده نمود. تقریباً تمام افرادی که در رابطه با کشت سلولهای اپی‌تلیالی پوست تحقیقاتی انجام داده‌اند به این نکته اذعان دارند. از جمله Freeman که در خصوص کشت سلولهای اپی‌تلیالی خرگوش بر سطح ساپورت (پوست خوک) کار کرده و توانست از لایه‌های اپی‌تلیالی بدست آمده جهت پیوند استفاده نماید(۴). O'connor و Gallico که بر روی کشت کراتینوسیتهای پوست انسان کار کرده و اعلام کردند که سلولهای حاصل یک لایه منسجم ایجاد می‌نمایند که می‌توان از آنها بعنوان پیوند استفاده کرد(۵). آقایان Green و Rheinwald هم که روی کشت کراتینوسیتهای پوست انسان کار کرده‌اند، بیان می‌کنند که جراحان می‌توانند از این روش جهت ترمیم نواحی وسیعی استفاده کنند(۳).

مورد بعدی، وسعت ناحیه پوششی با توجه به وسعت ناحیه دهنده و همچنین زمان لازم برای تشکیل لایه‌های اپی‌تلیال و استفاده از آنها بعنوان پیوند، جهت پوشش نواحی بدون پوشش می‌باشد. ما در تحقیق خود توانستیم با توجه به شرایط و امکانات موجود در ظرف مدت ۱۱ روز سطح اپی‌تلیال خرگوش دهنده را تا ۱۸ برابر افزایش دهیم.

Freeman و همکاران عقیده دارند که در حالت مناسب، با این روش، سطح اپی‌تلیال خرگوش دهنده ظرف ۷ تا ۲۱ روز می‌تواند تا ۵۰ برابر افزایش یابد(۴). البته دیگران به دلیل تفاوت شرایط و روش کار نتایج متفاوتی نسبت به نتایج این تحقیق بدست آورده‌اند. مثلاً Ronfard با توجه به شرایط و روش کارش توانسته است ظرف مدت ۲۱ روز، از هر یک از بیماران به ترتیب ۵۳۴۲ و ۷۵۰ سانتیمتر مربع از اپی‌تلیوم کشت داده شده بدست آورد(۸).

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-13]

و آقایان Green و Rheinwald نیز توانسته‌اند ظرف مدت ۲۱ روز هزاران سلول اپی‌تلیال کشت داده شده بدست آورده و از آنها جهت آزمایشات مورد بحث استفاده نمایند(۳).

در مورد بررسی نحوه رشد، تکثیر و مهاجرت سلولهای اپی‌تلیالی اتولوگ کاشته شده تحت عنوان کشتهای یک روزه، پنج روزه و هشت روزه نیز، تنها Freeman به همین روش کار کرده است که نتایج حاصل از تحقیق ما کاملاً با نتایج ایشان مطابقت دارد(۴).

در مجموع، تجربه حاضر با نظرات Freeman(۹) Gallico (۵) Ronfard (۸) Hefton (۱) همخوانی دارد ولی از نظر زمان وسعت ناحیه پوششی با نظر Green و Rheinwald (۳) Comptonl (۲) همخوانی ندارد و ملاک تأیید یا رد و یا تفاوت نتایج بدست آمده، بستگی به انتخاب روش کشت سلول اپی‌تلیالی بطریقه‌ای که محققین مختلف استفاده کرده‌اند، دارد. بطور کلی تجربه حاضر تأیید نتایج Tgel و Freeman از دیدگاه هیستولوژیک می‌باشد و این موضوع راکه در روز هشتم سلولهای اپی‌تلیالی بطور وسیع تکثیر و مهاجرت نموده و یک لایه اپی‌تلیالی جدید جهت پیوند و پوشش مناطق بدون پوشش تشکیل می‌دهند(۴)، از دیدگاه هیستولوژیک ثابت می‌نماید.

منابع

1- Arons wain wright. Jordan: "The surgical applications and inplications and inplications of cultured human epidermis". Surgery 111, 74-77, 1992.

2- Compton C.C. et al. "Skin regenerated from culture epithelial autografts on full-thickness burn wounds from 6 days to 5 years after grafting". Laboratory Investigation, 60, 600-612, 1989.

3- Cooper 8 Hansbrough. "Use of a composite skin graft composed of cultured human keratinocytes and fibroblasts and a collagen - GAG matrix to cover full thickness wounds on Athymic mice". Surgery 109, 198-207, 1991.

4- Freeman A.E. Igel H.J et al. "A new methods for covering large surface area wounds with aulografts". Arch. Surgery 108, 721-729, 1974.

5- Gallico G.G. oconnor N.E. "Cultured epithelium as a keratinocytes grafts". (Surgery 12, 149-157, 1985).

6- Limova and Gerkin. "Synthetic membranes and cultured keratinocytes grafts. J Am ACAD Dermatology 23, 713-719, 1990.

7- Oconnor N.E. et al. "Grofting of burns with cultured epithelium priepared from autografts epidermal cells". The Lancer 7, 75-78, 1987.

8- Ronfard et al. "Use of human keratinocytes cultured on fibrin Glue in the treatment of burn wounds". Burn 17, 181-184, 1991.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-11-13]