گزارش کوتاه

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره نوزدهم شماره ۷۰ خرداد و تیر سال ۱۳۸۸ (۷۱-۶۷)

کشت کراتینوسایت‌های موش صحرایی در محیط کشت بدون سرم به روش کاشت اپیدرم

محمد شکرزاده [۱] مهناز محمودی راد [۲] منصوره میرزایی [۳] نریمان مصف [۴] مائده آهنگری [۵]

چکیده

سابقه و هدف : امروزه برای کمک به ترمیم آسیب‌های پوستی نظیر سوختگی‌ها، زخم‌های مزمن دیابتیک یا زخم‌های مزمن ناشی از جراحی، از کشت کراتینوسایت‌ها و پیوند آن‌ها به محل ضایعه استفاده می‌شود. در این روش باید پیوستگی لازم برای کشت سلول‌های اپیدرمال در شرایط آزمایشگاه ایجاد شود. به این منظور در این تحقیق از روش سادهٔ کاشت اپیدرم به همراه محیط کشت بدون سرم که در آن نیازی به فیبروبلاست‌های 3T3 وجود ندارد، استفاده شد.

مواد و روش ها : قطعهٔ کوچکی از پوست موش صحرایی را در تریپسین قرار داده و درم را از اپیدرم جدا نمودیم. سپس اپیدرم را به قطعات یک میلی‌متری تقسیم کرده و در یک فلاسک کاشتیم. پس از گذشت نیم ساعت، روی قطعات اپیدرم، محیط کشت بدون سرم افزوده و هر دو روز یک‌بار محیط کشت را تعویض کردیم. پس از ۲۱ روز تقریباً ۷۰ درصد سطح فلاسک توسط کراتینوسایت‌ها پوشانیده شد. این کراتینوسایت‌ها پس از دو بار پاساژ در تانک ازت ذخیره شدند.

یافته ها : کشت خالص کراتینوسایت به آسانی به روش کاشت اپیدرم و بدون استفاده از سرم‌های با منشا حیوانی و نیز لایه تغذیه کننده به دست آمد.

استنتاج : کاشت اپیدرم در محیط کشت بدون سرم یک روش ساده برای جداسازی کراتینوسایت‌های اتولوگ از قطعهٔ کوچکی پوست می‌باشد که در آینده می‌توان از این روش برای کشت کراتینوسایت‌های انسانی جهت ترمیم زخم‌ها استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: کراتینوسایت، کشت سلول، کاشت اپیدرم

مقدمه

اپیدرم طبیعی شامل کراتینوسایت‌ها است که در بالای درم به صورت چند لایه و منظم دیده می‌شوند. بر اساس میزان رشد، عملکرد و انتشار منطقه‌ای، ۳ نوع کراتینوسیت در اپیدرم انسان شناسایی شده است: نوع

مولف مسئول: دکتر مهناز محمودی راد– تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی
E-mail: mahnazrad@gmail.com

۱. استادیار گروه سم شناسی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران و دانشکده HSE دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۲. استادیار مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۳. کارشناس ارشد آناتومی، گروه سم شناسی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۴. استاد گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۵. دانشجو داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران

تاریخ دریافت : ۸۷/۱۱/۲۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۸۷/۱۲/۲۱ تاریخ تصویب : ۸۸/۲/۱۶

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 7:31 +0330 on Friday November 16th 2018
www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 7:31 +0330 on Friday November 16th 2018

اول شامل سلول‌های پایه است که محکم به بازال لامینا چسبیده‌اند. نوع دوم سلول‌های تکثیر شونده و گذرایی هستند که نسبت به سلول‌های پایه به میزان بیشتری تکثیر می‌شوند و به یک یا چند نوع سلول تخصص یافته تمایز می‌یابند. نوع سوم کراتینوسیت‌های تمایز یافتهٔ نهایی هستند که متعاقباً می‌میرند. این نوع از کراتینوسایت، سلول‌های شاخی لایهٔ خارجی را تشکیل می‌دهند. این سلول‌ها مواد غذایی و فاکتورهای رشد را از سلول‌های استروما در درم به دست می‌آورند. کراتینوسایت‌های پایه مواد چسبنده‌ای را تولید می‌کنند که ساختمان‌های لنگری اپیدرم را تشکیل می‌دهند و همچنین مواد غذایی مختلف ومولکول‌های تنظیم‌کننده شامل سایتوکاین‌ها را ترشح می‌کنندکه اعمال اتوکرین، پاراکرین و اندوکرین را انجام داده و از غشا پایه عبور می‌کنند و وارد جریان خون می‌شوند(۱). کراتینوسایت‌های کشت داده شدهٔ اتولوگ کاربردهای زیادی درمهندسی بافت، جراحی پلاستیک، ترمیم زخم، انواع پیوند، ژن‌درمانی و... دارد(۲). در سال ۱۹۷۵، رینولد و گرین نشان دادندکه سلول‌های اپیدرمی را می‌توان جداسازی و به طور متوالی کشت داد و ورقه‌های اپیتلیال زندهٔ ایجاد شده به این روش را پیوند زد(۳). تا کنون روش‌های مختلفی برای کشت کراتینوسایت‌ها به کار رفته است. در اوایل از محیط‌های کشت ۱۹۹ یا NCTC168 به همراه سرم برای کشت کراتینوسایت‌ها استفاده می‌شد(۴،۵). در سال ۱۹۷۵ رشد و تشکیل کلنی کراتینوسایت‌ها با کاشت آن‌ها روی فیبروبلاست‌های موشی3T3 که رشد آن‌ها به وسیلهٔ اشعه متوقف شده بود و افزودن فاکتور رشد اپیدرمی(EGF) و هیدروکورتیزون به محیط کشت به جای سرم امکان‌پذیر شد(۶). درسال ۱۹۸۲ یکی ازاولین محیط‌های کشت بدون سرم بر پایهٔ محیط کشت ۱۹۹ به همراه مخلوطی از فاکتورهای رشد و نیز عصارهٔ مغز گاو تهیه گردید(۷). با عرضهٔ محیط کشت MCDB-153 کشت کراتینوسایت‌ها بدون استفاده از سرم به طور گسترده‌ای پذیرفته شد(۸).

در این تحقیق یک روش ساده و کارآمد برای کشت کراتینوسایت‌های خالص از یک نمونهٔ بسیار کوچک پوست موش ارائه شده که در آن از محیط کشتی بدون نیاز به سرم و لایهٔ تغذیه کننده استفاده شده است از مزایای این روش آن است که تنها با استفاده از قطعهٔ کوچکی از پوست بیمار می‌توان مقادیر زیادی کراتینوسایت اتولوگ به دست آورد و نیز بدون نیاز به سرم‌های حیوانی که خود می‌تواند منشا انتقال عفونت باشد، کراتینوسایت را بدون نیاز به لایهٔ تغذیه کننده (فیبروبلاست‌های موشی 3T3) و تداخل در درمان، کشت داد.

مواد و روش ها

محیط‌های‌کشت (DMEM)، Keratinocyte Growth Medium،Keratinocyte Growth supplement،تریپسین و آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده همگی از شرکت سیگما تهیه شدند.

در این تحقیق از موش‌های نر یک ماهه نژاد WISTAR که وزن آن‌ها ۸۰ تا ۱۲۰ گرم بود، استفاده شد. ابتدا حیوان را با تزریق کتامین به میزان ۵۰ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن، و دیازپام به میزان ۵ میلی‌گرم برای هر کیلوگرم وزن، بیهوش نموده و روی میز جراحی فیکس کرده و ناحیهٔ کشالهٔ ران و شکم را به طور کامل تراشیده شد، سپس ناحیه با الکل- بتادین کاملاً اسکراب شد، بعد از شستشو، نمونهٔ پوست ۱×۱ سانتی‌متر مربعی را تحت شرایط استریل برداشته و در پتری‌دیش حاوی محیط کشت DMEM،که پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد در هر میلی‌لیتر، استرپتومایسین ۱۰۰میکروگرم در هر میلی‌لیتر، فونژیزون ۱ میکروگرم در هر میلی‌لیتر به آن اضافه شده بود، قرار دادیم. بعد از ۱۶ ساعت نمونهٔ پوست را از محلول DMEM حاوی آنتی‌بیوتیک خارج کرده و با محلول PBS شستشو دادیم و بعد از تریپسینه کردن به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد، اپیدرم را طی چند مرحله از درم جدا نمودیم. سپس

Archive of SID

www.SID.ir

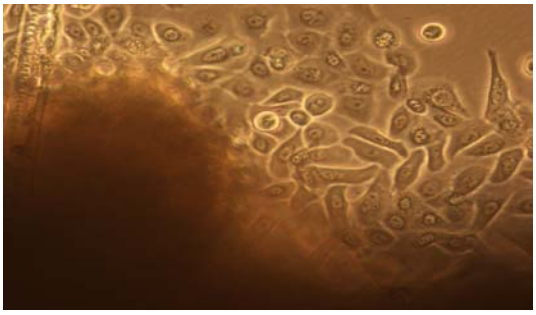
Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 7:31 +0330 on Friday November 16th 2018

اپیدرم را به قطعات کوچک‌تر از یک میلی‌متر تقسیم کرده و با روش explantation (۹) در فلاسک‌های کشت ۵۰mL کشت دادیم و پس از افزودن ۱۰mL محیط کشت Keratinocyte Growth Medium به همراه ۱ درصد مکمل Keratinocyte Growth supplement در انکوباتور ۳۷ درجهٔ سانتیگراد با ۵ درصد دی‌اُکسیدکربن انکوبه کردیم. محیط کشت سلول‌ها هر دو روز یک‌بار تعویض شد. در زمانی که به هم پیوستگی کلنی‌ها صورت گرفت، با تریپسینه کردن کوتاه مدت به مدت ۵ دقیقه توسط تریپسین ۰/۲۵ درصد، کراتینوسیت‌ها جدا شده و با تراکم ۱۰۵×۱ سلول در هر سانتی‌متر مربع در یک فلاسک جدید کشت داده شد. کشت مجدد این سلول‌ها با این روش تا پاساژ دوم ادامه یافت.بعد از بررسی سلول‌ها از نظر زمان دو برابر شدن و نیز سنجش میزان سلول‌های زنده (حداقل تعداد ۱۰۷ سلول در هر میلی‌لیتر) به روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو، سلول‌های پاساژ دوم در کرایوویال ۱/۵ میلی‌لیتری قرار داده شد و برای حفظ طولانی مدت، به تانک ازت منتقل گردید.

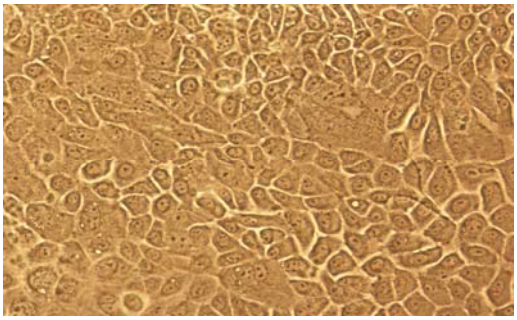
یافته ها و بحث

کراتینوسایت‌ها به طور شعاعی دراطراف اپیدرم‌های کاشته شده رشد کردند واین رشد در ۲۴ ساعت اولیه قابل مشاهده بود (تصویر شمارهٔ ۱). سپس کراتینوسایت‌ها مهاجرت کرده و کلنی‌های جدید را تشکیل داده و بعد از ۲۱ روز تقریباً ۷۰ درصد فلاسک را پوشش دادند (تصویر شمارهٔ ۲). به علت عدم استفاده ازسرم و فاکتورهای اختصاصی رشد ملانوسیت، هیچ‌گونه آلودگی با فیبروبلاست یا ملانوسیت در فلاسکها مشاهده نشد ومیزان سلول‌های زنده توسط رنگ‌آمیزی با تریپان‌بلو تعیین شد.

نتایج به دست آمده از کاشت قطعهٔ کوچکی از پوست به همراه محیط کشت بدون سرم برای کشت کراتینوسایت‌های موش صحرایی در این تحقیق نشان



تصویر شماره ۱ : کراتینوسایت‌های رشد یافته در اطراف اپیدرم کشت داده شده بعد از گذشت هشت روز با درشت‌نمایی ۲۰۰×



تصویر شماره ۲ : کراتینوسایت‌های رشد یافته در اطراف اپیدرم کشت داده شده بعد از بیست و یک روز با درشت‌نمایی ۲۰۰×

داد که این روش می‌تواند روش مطمئنی برای کشت و تکثیر کراتینوسایت‌ها به منظور استفاده از این سلول‌ها در سلول‌درمانی و دیگر تحقیقات بیولوژیکی پایه و بالینی باشد. رشد کراتینوسایت‌ها از قطعات کوچک پوست توسط چند محقق گزارش شده است(۱۰،۱۱). اما اغلب کشت کراتینوسایت‌ها با غالب شدن رشد فیبروبلاست‌ها به شکست می‌انجامد. برای سرکوب کردن رشد فیبروبلاست‌ها رینولد و گرین(۶) از فیبروبلاست‌های 3T3 موش که توسط اشعه رشد آن‌ها متوقف شده بود، به عنوان لایهٔ تغذیه کننده به صورت کشت هم‌زمان با کراتینوسایت‌ها استفاده کردند. بویس و هَم(۸) نیز برای رفع این مشکل کراتینوسایت‌ها را در یک محیط کشت بدون سرم که غلظت کلسیم آن کم بود، کشت دادند. این سلول‌های کراتینوسایت کشت داده شده به عنوان پایه‌ای برای سلول‌درمانی‌های بعدی به خصوص در ترمیم زخم‌ها، سوختگی‌های عمیق و زخم‌های وریدی پا قرار گرفت(۱۲،۱۳).

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 7:31 +0330 on Friday November 16th 2018

به‌منظورجلوگیری از رد ایمونولوژیکی پیوند وخطر انتقال یک بیماری عفونی، بهتر است کراتینوسایت‌ها از نمونهٔ بیوپسی خود بیمار تهیه شوند.با استفاده از روش کاشت پوست برای تهیهٔ کراتینوسایت‌ها می‌توان برای کاهش عوارض در ناحیهٔ دهنده، همچون خون‌ریزی، درد، عفونت یا اسکار، تنها ازقسمت کوچکی از پوست بیمار نمونه گرفت. همچنین با حذف سرم حیوانی از محیط کشت، کراتینوسایت‌ها به جای تمایز یافتن، تکثیر می‌شوند و بدین وسیله می‌توان مقدار بیشتری کراتینوسایت زنده و فعال به دست آورد. کشت کراتینوسایت بدون استفاده از سرم حیوانی احتمال انتقال عوامل پاتوژن موجود دراین فرآورده را نیز کاهش می‌دهد(۱۴،۱۵). در ضمن این روش نیاز به جداسازی کراتینوسایت از بیوپسی پوست توسط آنزیم را مرتفع می‌سازد و این یک برتری مهم روش کاشت پوست می‌باشد، زیرا هضم آنزیمی باعث تخریب فیبریل‌های تکیه‌گاهی کراتینوسایت‌ها شده و به اجزای دیگر سلول آسیب می‌رساند و همچنین میزان سلول‌های زنده را کاهش داده و خواص بیولوژیکی آن‌ها را تغییر می‌دهد(۸). مشکل دیگری که در روش‌های پیشنهادی قبلی، نظیراستفاده از فیبروبلاست‌های موشی 3T3 (۶)، برای ممانعت از غالب شدن رشد فیبروبلاست‌ها در کشت کراتینوسایت‌ها وجود دارد، نیاز به تریپسینه نمودن این نمونه‌ها در دو مرحله به منظور حذف لایهٔ تغذیه کننده و سپس برای جداسازی کراتینوسایت‌ها به منظور پیوند به بیماران یا اهداف تحقیقاتی دیگر می‌باشد. دو مرحله تریپسینه کردن نه تنها میزان سلول‌های زنده را کاهش می‌دهد، بلکه به خواص بیولوژیکی سلول‌ها نیز آسیب می‌رساند. در تحقیق حاضر نشان داده شد که بدون استفاده از لایه تغذیه کننده می‌توان سلول‌های کراتینوسایت را به طور خالص کشت داد و حتی این سلول‌ها برای کشت مجدد نیازی به لایه تغذیه کننده نداشتند زیرا به دلیل تریپسینه کردن آن‌ها تنها در یک مرحله، این سلول‌ها از توانایی تکثیر بالایی برخوردار می‌باشند.

References

1. Papini S, Cecchetti D, Campani D, Fitzgerald W, Grivel JC, Chen S, et al. Isolation and clonal analysis of human epidermal keratinocyte stem cells in long-term culture. Stem Cells 2003; 21(4): 481-494.
2. Hoeller D, Huppertz B, Roos TC. An improved and rapid method to construct skin equivalents from human hair follicles and fibroblasts. Exp Dermatol 2001; 10: 264-271.
3. Green H. Cultured cells for the treatment of disease. Sci Am 1991; 265(5): 96-102.
4. Marcelo CL, Kim YG. Stratification, specialization, and proliferation of primary keratinocyte cultures. Evidence of a functioning in vitro epidermal cell system. J Cell Biol 1978; 79: 356-370.
5. Price FM, Camalier RF, Gantt R, Taylor WG, Smith GH, Sanford KK. A new culture medium for human skin epithelial cells. In Vitro 1980; 16(2): 147-158.
6. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. Cell 1975; 6: 331-343.
7. Gilchrest BA, Calhoun JK, Maciag T. Attachment and growth of human keratinocytes in a serum-free environment. J Cell Physiol 1982; 112(2): 197-206.
8. Boyce ST, Ham RG. Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culure. J Invest Dermatol 1983; 81(1 suppl): 33-40.
9. Sun TT, Green H. Differentiation of epidermal keratinocyte in cell culture: Formation of the cornified envelope. Cell 1976; 9: 511-521.

Archive of SID

www.SID.ir

10. Karasek MA. In vitro culture of human skin epithelial cells. J Invest Dermatol 1966; 47: 533-540.
11. Flaxman BA, Harper RA. Primary cell culture for biochemical studies of human keratinocytes: A method for production of very large numbers of cells without the necessity of subculturing techniques. Br J Dermatol 1975; 92: 305-309.
12. Braye F, Pascal P, Bertin-Maghit M, Colpart JJ. Advantages of using a bank of allogenic keratinocytes for the rapid coverage of extensive and deep second-degree burns. Med Biol Eng Comput 2000; 38: 248-252.
13. Wood FM, Kolybaba ML, Allen P. The use of cultured epithelial autograft in the treatment of major burn injuries: A critical review of the literature. Burns 2006; 32: 395-401.
14. Bayram Y, Deveci M, Imirzalioglu N. The cell based dressing with living allogenic keratinocytes in the treatment of foot ulcers: a case study. Br J Plast Surg 2005; 58: 988-996.
15. Richards S, Leavesley D, Topping G, Upton Z. Development of defined media for the serum-free expansion of primary keratinocytes and human embryonic stem cells. Tissue Eng Part C Methods 2008; 14(3): 221-232.

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 7:31 +0330 on Friday November 16th 2018
Archive of SID

www.SID.ir