

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 ساده کاشت اپیدرم به همراه محیط کشت بدون سرم که در آن نیازی به فیبروبلاست‌های 3T3 وجود ندارد، استفاده شد.

مواد و روش‌ها: قطعه 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.

یافته‌ها: کشت خالص کراتینوسایت به آسانی به روش کاشت اپیدرم و بدون استفاده از سرم‌های با منشأ 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 قطعه 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

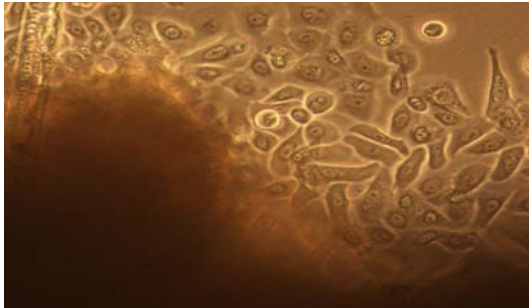
اول شامل سلول‌های پایه است که محکم به بازال لامینا چسبیده‌اند. نوع دوم سلول‌های تکثیر شونده و گذرایی هستند که نسبت به سلول‌های پایه به میزان بیشتری تکثیر می‌شوند و به یک یا چند نوع سلول تخصص یافته تمایز می‌یابند. نوع سوم کراتینوسیت‌های تمایز یافته نهایی هستند که متعاقباً می‌میرند. این نوع از کراتینوسایت، سلول‌های شاخی لایه 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 و مولکول‌های تنظیم کننده شامل سایتوکاین‌ها را ترشح می‌کنند که اعمال اتوکرین، پاراکرین و اندوکرین را انجام داده و از غشا پایه عبور می‌کنند و وارد جریان خون می‌شوند (۱). کراتینوسایت‌های کشت داده شده اتولوگ کاربردهای زیادی در مهندسی بافت، جراحی پلاستیک، ترمیم زخم، انواع پیوند، ژن درمانی و... دارد (۲). در سال ۱۹۷۵، رینولد و گرین نشان دادند که سلول‌های اپیدرمی را می‌توان جداسازی و به طور متوالی کشت داد و ورقه‌های اپیتلیال زنده 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 موشی 3T3 که رشد آن‌ها به وسیله اشعه متوقف شده بود و افزودن فاکتور رشد اپیدرمی (EGF) و هیدروکورتیزون به محیط کشت به جای سرم امکان پذیر شد (۶). در سال ۱۹۸۲ یکی از اولین محیط‌های کشت بدون سرم بر پایه محیط کشت ۱۹۹ به همراه مخلوطی از فاکتورهای رشد و نیز عصاره مغز گاو تهیه گردید (۷). با عرضه 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 نمونه بسیار کوچک پوست موش ارائه شده که در آن از محیط کشتی بدون نیاز به سرم و لایه تغذیه کننده استفاده شده است از مزایای این روش آن است که تنها با استفاده از قطعه 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 لایه تغذیه کننده (فیروبلست‌های موشی 3T3) و تداخل در درمان، کشت داد.

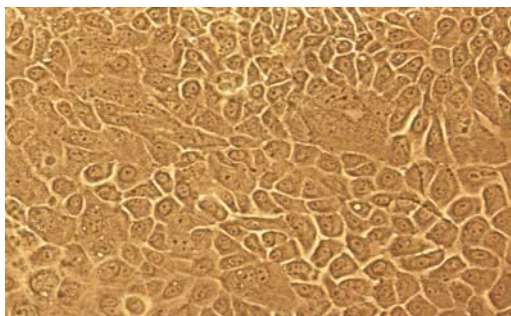
مواد و روش‌ها

محیط‌های کشت (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 میلی گرم برای هر کیلوگرم وزن، و دیازپام به میزان ۵ میلی گرم برای هر کیلوگرم وزن، بیهوش نموده و روی میز جراحی فیکس کرده و ناحیه کشاله ران و شکم را به طور کامل تراشیده شد، سپس ناحیه با الکل-بتادین کاملاً اسکراب شد، بعد از شستشو، نمونه پوست ۱×۱ سانتی متر مربعی را تحت شرایط استریل برداشته و در پتری دیش حاوی محیط کشت DMEM، که پنی سیلین ۱۰۰ واحد در هر میلی لیتر، استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم در هر میلی لیتر، فونزیزون ۱ میکروگرم در هر میلی لیتر به آن اضافه شده بود، قرار دادیم. بعد از ۱۶ ساعت نمونه 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 درجه سانتی گراد، اپیدرم را طی چند مرحله از درم جدا نمودیم. سپس



تصویر شماره ۱: کراتینوسایت‌های رشد یافته در اطراف اپیدرم کشت داده شده بعد از گذشت هشت روز با درشت‌نمایی $\times 200$



تصویر شماره ۲: کراتینوسایت‌های رشد یافته در اطراف اپیدرم کشت داده شده بعد از بیست و یک روز با درشت‌نمایی $\times 200$

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 فیروپلاست‌ها به شکست می‌انجامد. برای سرکوب کردن رشد فیروپلاست‌ها رینولد و گرین (۶) از فیروپلاست‌های 3T3 موش که توسط اشعه رشد آن‌ها متوقف شده بود، به عنوان لایه تغذیه کننده به صورت کشت هم‌زمان با کراتینوسایت‌ها استفاده کردند. بویس و هم (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).

اپیدرم را به قطعات کوچک‌تر از یک میلی‌متر تقسیم کرده و با روش explantation (۹) در فلاسک‌های کشت ۵۰ mL کشت دادیم و پس از افزودن ۱۰ mL محیط کشت Keratinocyte Growth Medium به همراه ۱ درصد مکمل Keratinocyte Growth supplement در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد با ۵ درصد دی‌اکسید کربن انکوبه کردیم. محیط کشت سلول‌ها هر دو روز یک‌بار تعویض شد. در زمانی که به هم پیوستگی کلنی‌ها صورت گرفت، با تریپسین کردن کوتاه مدت به مدت ۵ دقیقه توسط تریپسین ۰/۲۵ درصد، کراتینوسیت‌ها جدا شده و با تراکم 1×10^5 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 کرایوبیال ۱/۵ میلی‌لیتری قرار داده شد و برای حفظ طولانی مدت، به تانک ازت منتقل گردید.

یافته‌ها و بحث

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

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

کاهش داده و خواص بیولوژیکی آن‌ها را تغییر می‌دهد(۸). مشکل دیگری که در روش‌های پیشنهادی قبلی، نظیر استفاده 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 لایه 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.

به منظور جلوگیری از رد ایمونولوژیکی پیوند و خطر انتقال یک بیماری عفونی، بهتر است کراتینوسایت‌ها از نمونه بیوپسی خود بیمار تهیه شوند. با استفاده از روش کاشت پوست برای تهیه کراتینوسایت‌ها می‌توان برای کاهش عوارض در ناحیه دهنده، همچون خون‌ریزی، درد، عفونت یا اسکار، تنها از قسمت 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 در این 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

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 culture. *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.

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.

Archive of SID