[DOI: 10.22102/19.2.21]

Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 0:59 +0330 on Sunday September 23rd 2018

کشت کراتینوسایت‌های انسانی در محیط کشت عاری از سرم

سونا زارع[۱]، طیب قدیمی[۲]، محمد علی زارعی[۳]، فردین فتحی[۴]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم زیستی و بیوتکنولوژی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.

۲. استادیار گروه جراحی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.

۳. استادیار گروه علوم زیستی و بیوتکنولوژی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.

۴. استاد گروه علوم تشریح و مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. (مولف مسئول)، تلفن: ۶۱۳۱۳۸۲-۰۸۷۱، Email: Farfath@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های کراتینوسایت انسانی ابزار مفیدی جهت انجام مطالعات سلول درمانی به منظور بهبود سوختگی‌ها و زخم‌های مزمن محسوب می‌شوند. همچنین کراتینوسایت‌ها با کارائی بالا به سلول‌های پرتوان القائی تبدیل می‌شوند. در این مطالعه جزئیات مربوط به روش‌های جداسازی، کشت و تکثیر سلول‌های کراتینوسایت از نمونه پوستی ختنه‌گاه انسان، توصیف شده است.

روش بررسی: در این مطالعه که از نوع آزمایشگاهی، و مشاهده‌ای بود. نمونه مربوط به پوست ختنه‌گاه نوزادانی که به تازگی ختنه شده بودند تحت شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل شد. از آنزیم دیسپاز جهت جداسازی اپیدرم از درم و از آنزیم تریپسین برای جداسازی سلول‌های کراتینوسیت موجود در لایه اپیدرم استفاده شد. سلول‌ها در ظروف کشت پوشش داده شده با کلاژن نوع I انسانی و محیط کشت اپی‌لایف عاری از سرم، کشت داده شدند. ارزیابی‌های مورفولوژیک و ایمونوسیتوشیمی جهت تایید ماهیت سلول‌های جداسازی شده انجام شد.

یافته‌ها: نتایج ارزیابی‌های انجام شده نشان داد که سلول‌های جداسازی شده دارای مورفولوژی تیپیک کراتینوسایت‌ها بوده و آنتی‌ژن اختصاصی کراتینوسایت‌ها CK14 را هم بیان می‌کنند. هر ۴ الی ۵ روز یکبار سلول‌ها به نسبت ۱ به ۲ پاساژ داده شدند. بعد از پاساژ ۱۰ تکثیر سلول‌ها به شدت کاهش یافته و از نظر مورفولوژیک ظاهری پهن و نازک پیدا کردند.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه نحوه جداسازی و تکثیر کراتینوسایت‌های انسانی مشتق از نمونه پوستی ختنه‌گاه انسان در آزمایشگاه بهینه‌سازی شد. از آنجاییکه بیش از بیست بار سلول‌ها با موفقیت جداسازی شدند می‌توان نتیجه گرفت ، روش معرفی شده در این مقاله که نسبت به روش‌های پیشین همراه با مقداری تعدیل و بصورت جزیی‌تری توصیف شده است در آزمایشگاه‌های دیگر نیز تکرار پذیر است.

کلید واژه‌ها: کراتینوسایت‌های انسانی، نمونه پوست ختنه‌گاه انسان، سایتوکراتین ۱۴، محیط عاری از سرم

وصول مقاله :۹۲/۳/۱۸ اصلاحیه نهایی:۹۲/۱۰/۱۴ پذیرش:۹۲/۱۰/۱۷

[DOI: 10.22102/19.2.21]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 0:59 +0330 on Sunday September 23rd 2018

مقدمه

طی سالیان متوالی سلول‌های کراتینوسایت به عنوان یکی از مناسب‌ترین مدل‌های تحقیقاتی جهت مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی شناخته شده‌اند. امروزه از کشت سلول‌های کراتینوسایت برای کمک به ترمیم آسیب‌های پوستی نظیر سوختگی‌ها، ترمیم زخم‌های مزمن، جراحی پلاستیک، مهندسی بافت، ژن درمانی و نیز تولید سلول‌های پرتوان القایی (induced Pluripotent Cells) استفاده می‌شود (۵-۱). به عنوان مثال در بیمارانی که دچار معضلات جلدی اسکار شده‌اند مشکل‌ترین مرحله ترمیم زخم تامین سلول و ماتریکس کافی برای ترمیم می‌باشد. چرا که بسته شدن سطح زخم در نتیجه تزاید سلول‌های اپی‌تلیالی یک مرحله مهم در ترمیم است و به همین دلیل به منظور بهینه‌سازی روش‌های تولید و تکثیر سلول‌های اپی‌تلیالی در آزمایشگاه‌ها، تلاش‌های بسیاری صورت گرفته است (۷ و ۶). سلول‌های استفاده شده می‌توانند منشاء اتوژنیک، آلوژنیک یا زنوژنیک داشته باشند. در تکنیک‌های مهندسی بافت پوست از سلول‌های سوماتیک که شامل سلول‌های کراتینوسیت، فیبروبلاست‌ها یا ترکیبی از این دو سلول می‌باشند استفاده می‌شود. استفاده از سلول‌های کراتینوسیت به روش اتولوگ می‌تواند موجب افزایش سرعت ترمیم آسیب‌های پوستی مثل سوختگی‌های وخیم یا زخم‌های درمان نشده گردد (۱۱-۸).

یکی دیگر از کاربردهای جدید کراتینوسایت‌ها بکارگیری آن‌ها در فرآیند تولید سلول‌های پرتوان القایی است. اخیراً محققین توانسته‌اند از طریق بیان موقت دو یا چند فاکتور رونویسی نظیر Oct4، Nanog، Sox2، c-Myc، Klf4 و Line 28 در سلول‌های سوماتیکی نظیر فیبروبلاست‌ها (۱۴-۱۲) و کراتینوسایت‌ها (۱۵) سلول‌هایی را بنام سلول‌های پرتوان القایی ایجاد کنند که کاملا مشابه سلول‌های پرتوان بنیادی جنینی هستند و قادرند به سلول‌های مختلف سازنده بدن تمایز یابند، با این تفاوت که چنانچه سلول‌های تمایز یافته حاصل از سلول‌های پرتوان القایی به همان فردی که منشا سلول‌های سوماتیک بوده پیوند زده شوند مشکل پس زدن پیوند هم در مورد آن‌ها وجود نخواهد داشت (۱۵). تولید سلول‌های پرتوان القایی نیازمند یک منبع سلولی مناسب است که گرفتن نمونه از بیمار را با محدودیت مواجه نکند و از سوی دیگر بازده بازبرنامه‌ریزی در این سلول‌ها می‌بایست بالا باشد تا با مقادیر کم سلول سوماتیکی هم بتوان سلول‌های پرتوان القایی را به دست آورد. چنین به نظر می‌رسد کراتینوسایت‌ها سلول‌هایی هستند که دارای هر دوی این شرایط هستند. اخیرا گزارش شده است که بازده برنامه‌ریزی مجدد در سلول‌های کراتینوسایت انسانی بسیار بالاتر از سلول‌های فیبروبلاستی است. در یک مقایسه صورت گرفته، بازده تولید سلول‌های پرتوان القایی از سلول‌های کراتینوسایت تا ۱۰۰ برابر بیشتر و تا دو برابر سریع‌تر از سلول‌های فیبروبلاست ارزیابی شده است. بنابراین کراتینوسایت‌ها برای کاربردهای بالینی مبتنی بر تولید و بکارگیری سلول‌های پرتوان القایی سلول‌های مناسبی بنظر می‌رسند (۱۵).

به طور کلی دو روش کلی جهت کشت کراتینوسایت‌ها وجود دارد. یکی از این روش‌ها کشت کراتینوسایت‌ها بر روی لایه سلولی تغذیه کننده و محیط کشت حاوی سرم است و دیگری کشت کراتینوسایت‌ها بدون لایه تغذیه کننده و در محیط کشت فاقد سرم است. در سال ۱۹۷۵ رینولد و گرین نشان دادند که سلول‌های اپیدرمی را می‌توان جداسازی و بر روی رده سلول‌های فیبروبلاستی موشی 3T3 که رشد آن‌ها به وسیله اشعه متوقف شده بود کشت داد (۱۶). هنگامی که کراتینوسایت‌ها بر روی لایه تغذیه کننده و در محیط حاوی سرم تکثیر می‌شوند اگرچه تعداد بیشتری کراتینوسایت حاصل می‌شود اما عواملی همچون احتمال بالای آلوده شدن آن‌ها با سلول‌های فیبروبلاستی و نیز ناشناخته بودن ترکیبات سرمی می‌توانند مداخلاتی را در فرآیند پیوند سلولی ایجاد

[DOI: 10.22102/19.2.21]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 0:59 +0330 on Sunday September 23rd 2018

کنند. در حالیکه در هنگام کشت کراتینوسایت‌ها در محیط فاقد سرم و بدون استفاده از لایه تغذیه کننده، به دلیل عدم رشد سایر سلول‌ها نظیر سلول‌های فیبروبلاستی در محیط کشت عاری از کلسیم، سلول‌های کراتینوسیت کمتر اما خالص‌تر و مستعدتری برای پیوند فراهم می‌شوند (۱۷).

از آنجاییکه همواره تاکید شده است که کشت سلول‌های کراتینوسایت کار مشکلی است (۱۸) انجام تحقیقات بیشتر جهت ساده نمودن و تکرارپذیر کردن هر چه بیشتر فرآیندهای مربوط به جداسازی، کشت و تکثیر سلول‌های کراتینوسیت ضروری بنظر می‌رسد. در مطالعه حاضر با ذکر جزئیات فرآیند جداسازی، کشت و تکثیر سلول‌های کراتینوسایت توصیف شده بطوریکه براحتی توسط سایر محققین در آزمایشگاه‌های دیگر قابل انجام باشد.

روش بررسی

نمونه‌گیری

در این مطالعه که از نوع آزمایشگاهی و مشاهده‌ای بود، نمونه‌های پوستی ختنه‌گاه انسانی (Foreskin) بعد از انجام عمل ختنه، در فواصل زمانی مختلف به روش استریل از نوزادان تازه متولد شده تهیه شد. هر نمونه به طور جداگانه به لوله ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵ میلی‌لیتر بافر HBSS که دارای ۳٪ (vol/vol) ضد قارچ و آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و استرپتومایسین بود منتقل و بلافاصله در ظرف حاوی یخ به آزمایشگاه کشت سلول انتقال یافت.

آماده‌سازی محیط کشت سلول‌های کراتینوسایت

جهت کشت سلول‌های کراتینوسایت از یک محیط کشت تجاری فاقد سرم به نام Epilife (گیبکو)استفاده شد. قبل از استفاده به این محیط، مکمل‌های آن اضافه شد. جهت جلوگیری از آلوده شدن محیط کشت در طی روند جداسازی، استوک اصلی آن در لوله‌های ۵۰ میلی‌لیتری تقسیم شده و در دمای ۴ درجه نگهداری شد. به هر ظرف به هنگام استفاده آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و استرپتومایسین به میزان ۱٪ اضافه شد.

آماده کردن ماتریکس جهت پوشش دادن به کف ظرف‌های کشت

قبل از جداسازی، بستر مناسب جهت کشت سلول‌های کراتینوسایت فراهم شد. جهت کشت این سلول‌ها در محیط فاقد سرم از ظروف کشت پوشش داده شده با کلاژن نوع I انسانی (گیبکو) استفاده شد. یک ساعت قبل از شروع جداسازی، هر یک از ظروف کشت ۳۵ میلی‌متری بطور جداگانه مطابق روش توصیه شده توسط کمپانی سازنده با کلاژن انسانی نوع I پوشانده شدند. ظرف حاوی کلاژن در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شد. سپس کلاژن اضافی تخلیه شده و ظروف مذکور به مدت ۲۰ دقیقه بصورت در باز در زیر هود قرار داده شدند تا خشک شوند.

استریلیزاسیون نمونه

تحت شرایط استریل و در زیر هود لامینار، نمونه پوست ختنه‌گاه انسانی به کمک قیچی و پنس استریل، در پتری دیش باکتریولوژیک ۶۰ میلی‌متری حاوی PBS و ۳٪ حجمی پنی‌سیلین، استرپتومایسین و فانگیزون بریده و باز شد. نمونه پوست به مدت ۴۰-۳۰ ثانیه در لوله یا پلیت حاوی ۵ تا ۱۰ میلی‌لیتر الکل ۷۰ ٪ غوطه‌ور شد و سپس سه مرتبه در لوله حاوی PBS و۳٪ حجمی پنی‌سیلین، استرپتومایسین و فانگیزون شستشو داده شد.

جداسازی اپیدرم از درم

نمونه پوست به پتری دیش جدید حاوی PBS و ۳٪ حجمی پنی‌سیلین، استرپتومایسین و فانگیزون منتقل و هیپودرم آن که شامل بافت چربی و رگ‌ها بود به همراه قسمتی از درم توسط قیچی و پنس برداشته شد. سپس مجموعه اپیدرم و درم بهم متصل باقیمانده بوسیله قیچی به قطعات ۱- ۰/۵ سانتی‌متر مربع برش داده شدند. قطعات مذکور به لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتری حاوی ۴ میلی لیتر محلول دیسپاز (۱ mg/ml) و HBSS (PS ۱٪ vol/vol) منتقل و لوله حاوی بافت برای یک شب

[DOI: 10.22102/19.2.21]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 0:59 +0330 on Sunday September 23rd 2018

(۱۶-۱۴ ساعت) به صورت افقی در یخچال قرار داده شد. روز بعد محتویات داخل لوله به پتری دیش جدید منتقل شده، به گونه ای که اپیدرم به سمت بالا و درم به سمت پایین باشد، سپس با استفاه از دو پنس نوک باریک، اپیدرم از درم جدا شده و به پتری دیش حاوی ۲/۵ میلی‌لیتر بافر PBS منتقل شد.

جداسازی کراتینوسیت‌ها از لایه اپیدرم

اپیدرم مربوط به هر نمونه پوستی گرفته شده از یک نوزاد به طور جداگانه با تیغ جراحی، به قطعات ۰/۵ تا ۱ میلی‌متری تبدیل شده و ۲/۵ میلی‌لیتر تریپسین ۰/۲۵٪ به پتری دیش حاوی نمونه اضافه شد. پتری دیش به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد. در طی این مدت، پتری دیش مذکور چند بار تکان داده شد تا تمام سطوح قطعات بافتی در معرض آنزیم قرار گیرند و یکنواختی تاثیر آنزیم نسبت به سطوح بافتی حفظ شود. محتویات هر پتری دیش (اپیدرم خرد شده) به طور جداگانه به لوله ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵ میلی‌لیتر DMEM دارای ۱۰٪ FBS منتقل شده و حدود ۳۰-۲۰ بار پیپتاژ شد. سپس از یک فیلتر (Mesh Filter) که دارای منافذ ۷۰ میکرومتری بود عبور داده شده و به یک لوله ۵۰ میلی‌لیتری استریل منتقل شدند. به این ترتیب سلول‌هایی که کوچکتر بودند از قطعات بافتی بزرگ جدا شدند. سلول‌ها به مدت ۵ دقیقه با دور g ۲۰۰ در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند و نهایتاً ته نشست سلولی در DMEM (فاقد سرم) به صورت سوسپانسیون درآمد و دوباره برای ۵ دقیقه در g ۲۰۰ سانتریفوژ شد. مجددا ته‌نشست سلولی در ۱ میلی‌لیتر محیط مخصوص سلول‌های کراتینوسایت به صورت سوسپانسیون درآمده و شمارش سلولی بر روی آن‌ها انجام شد. سلول‌های کراتینوسایت به پلیت‌های پوشش داده شده با کلاژن و حاوی محیط منتقل شده و در انکوباتور ۳۷ درجه با فشار ۵٪ CO_2 و ۹۵٪ رطوبت کشت داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت محیط آن‌ها تعویض شد. در ادامه هر ۴۸ ساعت یک بار تعویض محیط صورت گرفت و با استفاده از میکروسکوپ اینورت ارزیابی مورفولوژیک بر روی سلول‌ها انجام شد.

سلول‌ها ۵-۴ روز بعد از کشت اولیه، هنگامی که تراکم سلول‌ها به ۹۰-۸۰٪ رسید پاساژ داده شدند. بدین صورت که سلول‌ها پس از شستشو با PBS، به مدت ۱۰ دقیقه در معرض Trypsin LE Select تهیه شده از شرکت گیبکو قرار گرفتند. پس از خنثی‌سازی، ته‌نشست سلولی در محیط کشت تازه بصورت سوسپانسیون درآمده و به پتری دیش‌های جدید منتقل شدند.

سلول‌های کراتینوسایت جهت نگهداری طولانی مدت، هنگامیکه در هر پاساژ در فاز نمایی بودند منجمد شدند. به این صورت که ته‌نشست سلولی در محیط انجماد شامل ۹۰٪ FBS و ۱۰٪ DMSO به صورت سوسپانسیون درآمد و طبق روال معمول انجماد سلولی مراحل انجماد بر روی آن‌ها انجام شده و نهایتا در نیتروژن مایع نگهداری شدند. جهت ذوب کراتینوسیت‌ها، محتویات کرایوتیوب در ۳۷ درجه، در ۱ میلی‌لیتر محیط جدید ذوب شده، به ملایمت بصورت سوسپانسیون درآمده و به ظرف کشت منتقل شدند.

ارزیابی ایمونوسیتوشیمی

به منظور بررسی ماهیت سلولی، سلول‌های جداسازی شده تحت بررسی ایمونوسیتوشیمی قرار گرفتند. سلول‌ها به ازای هر ۵۰۰۰ سلول در یک چاهک به ظرف ۴ چاهکی منتقل و کشت داده شدند. روز بعد سلول‌ها با PBS شستشو و به مدت ۲۰ دقیقه در معرض پارافرمالدئید ۴٪، در دمای اتاق قرار گرفتند تا ثابت شوند. سلول‌ها سه مرتبه (هر بار ۷ دقیقه) با PBS شستشو داده شدند. محلول مسدود کننده برای ۴۵ دقیقه (در دمای اتاق) به سلول‌ها اضافه شد. آنتی‌بادی اولیه بر علیه سیتوکراتین ۱۴ با غلظت ۱:۱۰۰ به سلول‌ها اضافه و ظرف حاوی سلول به مدت یک شب در ۴ درجه قرار داده شدند. پس از سه بار شستشوی ۷ دقیقه‌ای، سلول‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در معرض آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با FITC با غلظت

[DOI: 10.22102/19.2.21]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 0:59 +0330 on Sunday September 23rd 2018

۱:۱۰۰، در تاریکی و دمای اتاق قرار گرفتند. عمل شستشو ۳ بار تکرار شد. در نهایت سلول‌ها با میکروسکوپ اینورت فلورسنت مورد بررسی قرار گرفتند. از یک چاهک که تمام مراحل در آن انجام شد به جز اینکه در آن از آنتی‌بادی اولیه استفاده نشده بود به عنوان کنترل منفی استفاده شد. برای اطمینان، این آزمایش ۲ بار تکرار شد.

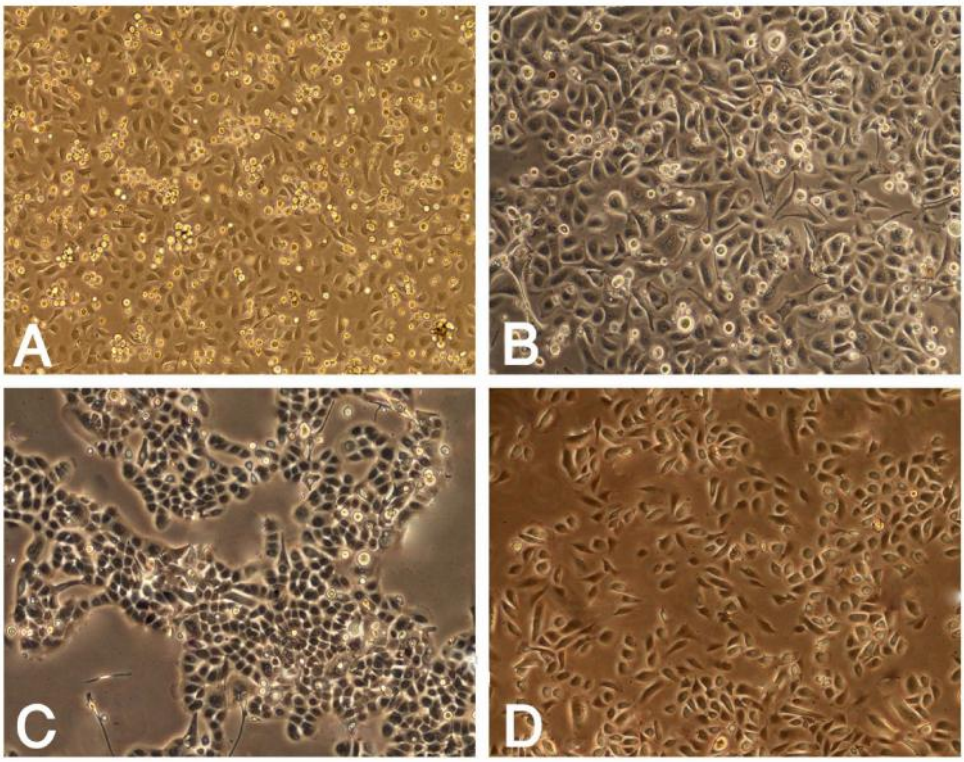
یافته‌ها

قبل از شروع فرآیند جداسازی استفاده از الکل ۷۰٪ به مدت ۳۰ الی ۴۰ ثانیه باعث حذف آلودگی‌های مربوط به پاساژ اول در سلول‌ها شد. پس از تهیه سوسپانسیون سلولی و رنگ‌آمیزی با تریپان‌بلو و شمارش سلولی، به ازای هر سانتی‌متر مربع از نمونه پوست ختنه‌گاه، تقریبا $۲/۵ \times ۱۰^{۶}$ سلول کراتینوسایت به دست آمد. سلول‌ها جهت کشت به ظروف کشت ۳۵ میلی‌متری منتقل شدند. ۲۴ ساعت پس از کشت، اکثر سلول‌ها به کف پلیت چسبیدند (شکل ۱A). مشاهده شد که سلول‌های کراتینوسایت به ظروف کشت پوشش داده شده با کلاژن نوع I انسانی بخوبی چسبیده و در طی ۴ الی ۵ روز قادرند به تراکم ۸۰ الی ۹۰٪ برسند. در پاساژهای اولیه علاوه بر کراتینوسایت‌های شاخی شده و یا در حال شاخی شدن تعداد کمی سلول‌های شبه فیبروبلاستی هم در محیط کشت قابل مشاهده بودند (شکل ۱B)، اما با بالا رفتن تعداد پاساژها و استفاده از محیط اختصاصی سلول‌های کراتینوسایت، به تدریج سلول‌های فیبروبلاستی از محیط کشت حذف شدند (شکل‌های ۱ C و ۱D).

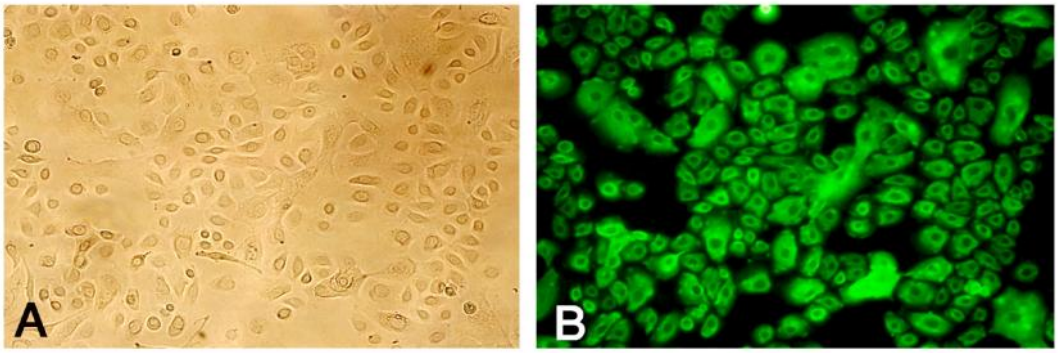
نتایج ایمونوسیتوشیمی سلول‌های کراتینوسایت در پاساژ دوم نشان داد که این سلول‌ها با آنتی‌بادی بر علیه CK14 نشان دادند و تقریبا تمام سلول‌های موجود در کشت، کراتینوسایت بودند (شکل۲). نتایج ارزیابی مجدد ایمونوسیتوشیمی این سلول‌ها در پاساژ ۹، وجود مارکر CK14 را در آن‌ها تایید کرد. بستگی به اینکه سلول‌ها از چه فردی گرفته شده باشند تا پاساژهای ۱۰ الی ۱۳ تکثیر شدند (شکل ۳A). معمولا از پاساژ ۱۰ الی ۱۳ به بعد سلول‌های کراتینوسایت بزرگ و پهن شده و قادر به رشد نبودند (شکل ۳B).

سلول‌های کراتینوسایت در هر پاساژ برای استفاده‌های بعدی منجمد شدند. ارزیابی رشد سلول‌ها پس از ذوب نشان داد که تقریبا ۵۰٪ آن‌ها بعد از فرآیند ذوب، زنده و سالم بوده و پس از ۴ الی ۵ روز قادرند به تراکم سلولی ۹۰-۸۰٪ برسند (شکل ۳C). نتایج یکسانی از تکرار مطالعه به تعداد سه بار بدست آمد.

[DOI: 10.22102/19.2.21]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 0:59 +0330 on Sunday September 23rd 2018

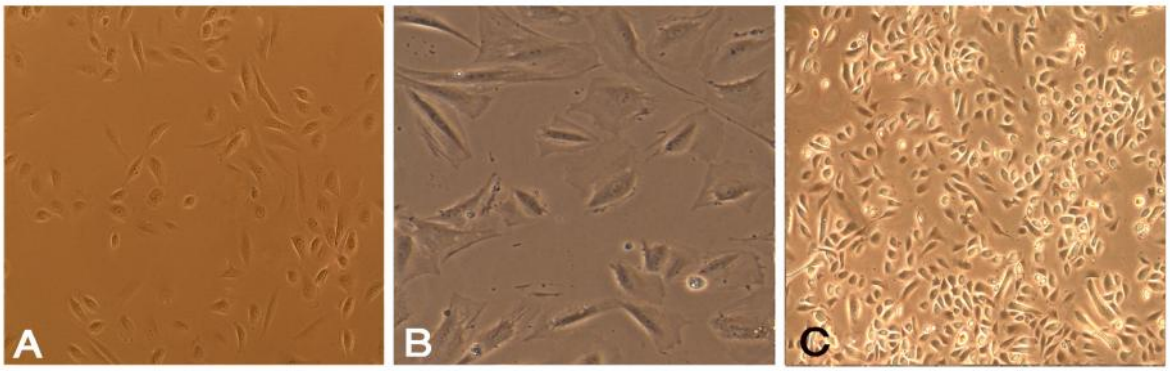


شکل ۱: جداسازی سلول‌های کراتینوسایت انسانی از نمونه پوست ختنه‌گاه انسانی. A: ۲۴ ساعت پس از هضم آنزیمی لایه اپیدرم با آنزیم تریپسین با غلظت ۰/۱۲۵٪ اکثر سلول‌ها به کف ظرف‌های پوشش داده شده با کلاژن نوع I انسانی چسبیده و به تدریج شروع به رشد و تکثیر نمودند. B: در طی ۴ الی ۵ روز سلول‌ها به تراکم ۸۰ تا ۹۰٪ رسیدند و در لابلای سلول‌های کراتینوسایت سلول‌هایی با مورفولوژی شبیه به سلول‌های فیبروبلاستی مشاهده شدند که در پاساژهای بعدی (C: پاساژ۲و D: پاساژ ۳) بتدریج حذف شدند و سلول‌های یکدست و خالص‌تری با مورفولوژی کراتینوسایت‌های انسانی مشاهده شدند (بزرگنمایی ۲۰۰).



شکل ۲: نتیجه ارزیابی ایمونوسیتوشیمی کراتینوسایت‌های انسانی جداسازی شده از نمونه پوست ختنه‌گاه انسانی. A و B به ترتیب تصاویر فاز کنتراست و فلورسنت سلول‌های کراتینوسایت انسانی را در پاساژ ۹ نشان می‌دهد. تقریبا پاسخ تمام سلول‌ها به آنتی‌بادی بر علیه سیتوکراتین ۱۴ مثبت بود (بزرگنمایی ۲۰۰).

[DOI: 10.22102/19.2.21]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 0:59 +0330 on Sunday September 23rd 2018



شکل ۳: تصاویر مربوط به کراتینوسایت‌های انسانی جداسازی شده از نمونه پوست ختنه‌گاه انسانی در پاساژ ۱۰ (A) و پاساژ ۱۳ (B) و بعد از انجماد (C) همانطوریکه ملاحظه می‌شود در پاساژ دهم هنوز کراتینوسایت‌های انسانی مورفولوژی طبیعی خود را حفظ کرده‌اند در حالیکه در بعضی از نمونه‌ها در پاساژهای بعدی (۱۳) به تدریج سلول‌ها پهن و بزرگ شده و قادر به تکثیر نبودند. همچنین بعد از ذوب سلول‌ها مورفولوژی طبیعی داشتند و در طی ۴ الی ۵ روز به تراکم بالا رسیدند (بزرگنمایی ۲۰۰).

بحث

در این تحقیق سلول‌های کراتینوسایت انسانی از نمونه پوست ختنه‌گاه با استفاده از روش هضم آنزیمی جداسازی و کشت داده شده و در محیط کشت عاری از سرم تا پاساژ ۱۳ تکثیر شدند. ماهیت سلول‌های جداسازی شده با انجام ارزیابی ایمونوسیتوشیمی تایید شد. اگرچه در ابتدای کار بر اساس مقالات موجود در این زمینه اقدام به جداسازی سلول‌های مذکور شد اما حدود یکسال طول کشید تا به گونه ای ساده و تکرارپذیر سلول‌های کراتینوسایت جدا سازی شوند.

تا بحال جدا سازی و کشت سلول‌های اپیدرمی از پوست حیوان و انسان بیشتر به دو روش صورت گرفته است. یکی از آن‌ها قرار دادن مستقیم تکه‌هایی از بافت پوست در محیط کشت است که متعاقب آن سلول‌های کراتینوسایت به صورت بیرون زدن از حاشیه تکه های بافتی رشد می‌کنند و دیگری جدا کردن اپیدرم از درم و پس از آن اعمال هضم آنزیمی جهت جدا کردن سلول‌های اپیدرمی از همدیگر است تا بعد از آن بتوانند در محیط کشت رشد کنند. در روش اخیر سلول‌ها در یکی از دو نوع محیط کشت حاوی سرم یا فاقد سرم کشت داده می‌شوند. این روش توسط رینولد و گرین ارائه شد و تاکنون همواره یک روش انتخابی برای محققین جهت جداسازی سلول‌های کراتینوسایت بویژه از پوست ختنه‌گاه انسانی بوده است (۱۹و۱۶). قبل از آنکه رینولد و گرین برای اولین بار سلول‌های کراتینوسایت را جداسازی کرده و در محیط کشت تکثیر کنند Medwar و همکاران در سال ۱۹۴۱ یک لایه سلول اپیدرمی کامل را با استفاده از تریپسین از پوست جدا کرده و نشان دادند که امکان جداکردن سلول‌های کراتینوسایت انسانی و آماده کردن آن‌ها برای رشد در محیط کشت وجود دارد (۲۰). سال‌ها بعد در نتیجه پیشرفتهایی که در زمینه جداسازی و کشت اولیه سلول‌ها بوجود آمد در سال ۱۹۷۵ رینولد و گرین نشان دادند که سلول‌های اپیدرمی را می‌توان جداسازی کرده و کشت داد. آن‌ها رشد و تشکیل کلنی کراتینوسایت‌ها را با کشت آن‌ها بر روی فیبروبلاست‌های موشی که رشد آن‌ها به وسیله اشعه متوقف شده بود امکان‌پذیر کردند (۱۶). Kitano و Okada روش جداسازی مبتنی بر هضم با استفاده از آنزیم تریپسین را تعدیل کرده و بجای تریپسین از آنزیم دیسپاز برای جدا کردن درم از اپیدرم استفاده کردند (۲۱). پس از آن در سال ۱۹۸۳ Boyce و Ham یک محیط کشت عاری از سرم

[DOI: 10.22102/19.2.21]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 0:59 +0330 on Sunday September 23rd 2018

برای کشت کراتینوسایت‌ها طراحی کردند که با استفاده از آن نیاز به لایه تغذیه کننده مرتفع شد و لذا این روش در برگیرنده فواید زیادی در هنگام استفاده بالینی از کراتینوسایت‌ها بود (۲۲). از بین محیط‌های تجاری متعددی که تا بحال بدین منظور تهیه شده محیط Epilife است که در این مطالعه هم از آن استفاده شد (۱۹).

Guo و همکاران بجای استفاده از روش هضم آنزیمی قطعات بافتی پوست را مستقیما در ظرف‌های کشت قرار داده و با توجه به رشد و تکثیر زودتر کراتینوسایت‌ها نسبت به فیبروبلاست‌ها توانستند سلول‌های کراتینوسایت را جدا سازی کنند (۱۹). Aasen و همکاران با استفاده از هضم آنزیمی و استفاده از محیط کشت فاقد سرم، کراتینوسایت‌های انسانی را جدا سازی و تکثیر کردند (۱۷). آن‌ها از دیسپاز برای جدا کردن اپیدرم از درم و از یک نوع تریپسین با نام تجاری Trypsin LE Select برای جداسازی سلول‌های کراتینوسایت لایه اپیدرم از همدیگر استفاده کردند که در این تحقیق با وجود اینکه بارها از آن استفاده شد جداسازی و کشت کراتینوسایت‌ها موفقیت آمیز نبود. در این تحقیق از دیسپاز با انکوباسیون در مدت زمان‌های ۱۴ الی ۱۶ ساعت در ۴ درجه و ۲ الی ۳ ساعت در ۳۷ درجه برای جدا کردن درم از اپیدرم استفاده شد و از تریپسین نیز با غلظت‌های ۰/۱۲۵٪ جهت جداسازی سلول‌های کراتینوسایت موجود در اپیدرم از همدیگر استفاده شد. نتایج این تحقیق نشان داد که اعمال آنزیم دیسپاز در مدت زمان ۲ تا ۳ ساعت هم، باعث جدا کردن اپیدرم از درم می‌شود اما لایه جدا شده اپیدرم بجای حفظ قوام نسبی خود به تکه‌های کوچکی تبدیل می‌شوند و در مجموع کارایی تولید کراتینوسایت از آن‌ها پایین تر بود. اما باید توجه داشت که ممکن است گاهی به دلایلی، انکوباسیون سلولی در محیط ۴ درجه و برای مدت زمان ۱۶ ساعت امکان‌پذیر نباشد و لذا می‌توان از انکوباسیون کوتاه‌تر اما دمای بالاتر استفاده کرد. همچنین با استفاده از آنزیم تریپسین با غلظت ۰/۱۲۵٪ کراتینوسایت‌ها با کارایی بالا قابل جداسازی بودند. در حالیکه در مطالعات قبلی یا از Trypsin LE Select و یا تریپسین با غلظت ۰/۲۵٪ استفاده شده است (۲۳). یکی از مشکلاتی که در ابتدای این تحقیق وجود داشت آلودگی سریع سلول‌های جداسازی شده در طی ۲ تا ۴ روز اول کشت سلولی بود که با آغشته کردن نمونه‌ها به الکل ۷۰٪، قبل از شروع فرآیند جداسازی، خطر آلودگی بطور کاملا معنی‌داری مرتفع شد. در هیچکدام از مقالات مورد استفاده در این تحقیق به این مشکل و نحوه مقابله با آن اشاره‌ای نشده بود.

نتیجه‌گیری

نظر به اینکه در این مطالعه بیشتر از بیست بار سلول‌ها از نمونه‌های مختلف جداسازی شدند، احتمالا این روش در سایر آزمایشگاه‌های کشت سلول نیز تکرار پذیر خواهد بود. این مسئله از آن جهت حائز اهمیت است که بنظر می رسد در مقالاتی که تاکنون در زمینه جداسازی سلول‌های کراتینوسایت منتشر شده‌اند به دلیل اینکه به جزئیات روش‌های انجام کار کمتر اشاره شده است. میزان تکرارپذیری روش‌ها توسط سایر محققین نیز کمتر بوده است.

تقدیر و تشکر

بودجه این تحقیق که حاصل بخشی از یک پایان نامه کارشناسی ارشد است از محل اعتبارات پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کردستان و شبکه پزشکی مولکولی کشور تأمین شده است که بدینوسیله قدردانی می‌شود.

[DOI: 10.22102/19.2.21]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 0:59 +0330 on Sunday September 23rd 2018

Reference

1. Guozhong L, Liangliang C, Peng Z, Zaiqiu G, Yugang Z. Mixed suspension of cultured autologous and allogenic keratinocytes in fibrin glue for the treatment of full-thickness burns. Wounds 2011; 23:32–37.
2. Cervelli V, De Angelis B, Spallone D, Lucarini L, Arpino A, Balzani A. Use of a novel autologous cell-harvesting device to promote epithelialization and enhance appropriate pigmentation in scar reconstruction. Experimental Dermatology 2009;35:776–780.
3. Therrien J P, Pfutzner W, Vogel CJ. An approach to achieve long-term expression in skin gene therapy. Toxicologic Pathology 2008;36:104-111.
4. Aasen T, Belmonte JCI. Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin or plucked hair for the generation of induced pluripotent stem cells. Nature Protocol 2010; 5:371-382.
5. Consiglio A, Gonzalez F, Vassena R, Bilić J, Pekarik V, Tiscornia G, andet al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. Nature Biotechnology 2008; 26: 1276–1284.
6. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. Nature 2008; 15:314-21.
7. Ronfard V, Rives JM, Neveux Y, Carsin H, Barrandon Y. Long-term regeneration of human epidermis on third degree burns transplanted with autologous cultured epithelium grown on a fibrin matrix. Transplantation 2000; 70:1588-98
8. Knight MAF, Evans GRD. Tissue engineering process and challenges. Plast Reconstr Surg 2003;114: 26-37.
9. Bayram Y, Deveci M, Imirzalioglu N, Soysal Y, Sengezer M. The cell based dressing with living allogenic keratinocytes in the treatment of foot ulcers: a case study. Br J Plast Surg 2005; 58:988-96.
10. Dalla Paola L, Cogo A, Deanesi W, Stocchiero C, Collet VC. Wound manage using hyaluronic acid derivatives and cultured autologous fibroblasts and keratinocytes in a lower limb wound in a patient with diabetes: a case report. Ostomy/wound Management 2002; 48:46-49.
11. Wong T, McGrath JA, Navsaria H. The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. Br J Dermatol 2007; 156:1149-55.
12. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 2006; 126:663–676.
13. Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. Nat Protoc 2007;2: 3081–3089.
14. Park IH, Lerou PH, Zhao R, Huo H, Daley GD. Generation of human-induced pluripotent stem cells. Nature Protocol 2008; 3: 1180-1186.
15. Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez Fand et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocyte. Nature Biotechnology 2008; 26: 1276-1284.
16. 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.
17. Aasen T, Belmonte JCI. Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin or plucked hair for the generation of induced pluripotent stem cells. Nature Protocols 2010; 5: 371.

[DOI: 10.22102/19.2.21]
Downloaded from sjku.muk.ac.ir at 0:59 +0330 on Sunday September 23rd 2018

18. Tenchini ML, Ranzati C, Malcovatie M. Culture techniques for human keratinocytes. Burns 1992; 18: S11–S16.
19. Guo A, Jahoda CAB. An improved method of human keratinocyte culture from skin explants: cell expansion is linked to markers of activated progenitor cells. Experimental Dermatology 2009; 18: 720–726.
20. Medawar PB. Sheets of pure epidermal epithelium from human skin. Nature 1941; 148: 783.
21. Kitano Y, Okada N. Separation of the epidermis sheet by dispase. Br J Dermatol 1983; 108: 555–560.
22. Boyce ST, Ham RG. Calcium-regulated differentiation of normal human epidermalkeratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. J Invest Dermatol 1983; 81: 33–40.
23. Zellmer S, Gaunitz F, Salvetter J, Surovoy A, Reissig D, Gebhardt R. Long-term expression of foreign genes in normal human epidermal keratinocytes after transfection with lipid/DNA complexes. Histochem Cell Biol 2001; 115: 41–47.