

## کشت کراتینوسایت‌های انسانی در محیط کشت عاری از سرم

سونا زارع<sup>۱</sup>، طیب قدیمی<sup>۲</sup>، محمد علی زارعی<sup>۳</sup>، فردین فتحی<sup>۴</sup>

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. (مؤلف مسئول)، تلفن: ۰۸۷۱-۶۱۳۱۳۸۲، 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 کارایی 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 جزئی‌تری 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

**مقدمه**

طی سالیان متوالی سلول های کراتینوسایت به عنوان یکی از مناسب ترین مدل های تحقیقاتی جهت مهندسی بافت و پزشکی ترمیمی شناخته شده اند. امروزه از کشت سلول های کراتینوسایت برای کمک به ترمیم آسیب های پوستی نظیر سوختگی ها، ترمیم زخم های مزمن، جراحی پلاستیک، مهندسی بافت، ژن درمانی و نیز تولید سلول های پرتوان القایی (induced Pluripotent Cells) استفاده می شود (۵-۱). به عنوان مثال در بیماریارانی که دچار معضلات جلدی اسکار شده اند مشکل ترین مرحله ترمیم زخم تامین سلول و ماتریکس کافی برای ترمیم می باشد. چرا که بسته شدن سطح زخم در نتیجه تزاید سلول های اپی تلیالی یک مرحله مهم در ترمیم است و به همین دلیل به منظور بهینه سازی روش های تولید و تکثیر سلول های اپی تلیالی در آزمایشگاه ها، تلاش های بسیاری صورت گرفته است (۷ و ۶). سلول های استفاده شده می تواند منشأ اتوژنیک، آلوژنیک یا زنوژنیک داشته باشند. در تکنیک های مهندسی بافت پوست از سلول های سوماتیک که شامل سلول های کراتینوسیت، فیروبلاست ها یا ترکیبی از این دو سلول می باشند استفاده می شود. استفاده از سلول های کراتینوسیت به روش اتولوگ می تواند موجب افزایش سرعت ترمیم آسیب های پوستی مثل سوختگی های وخیم یا زخم های درمان نشده گردد (۸-۱۱).

یکی دیگر از کاربردهای جدید کراتینوسایت ها بکارگیری آن ها در فرآیند تولید سلول های پرتوان القایی است. اخیراً محققین توانسته اند از طریق بیان موقت دو یا چند فاکتور رونویسی نظیر *Oct4*، *Nanog*، *Sox2*، *c-Myc*، *Klf4* و *Line 28* در سلول های سوماتیکی نظیر فیروبلاست ها (۱۴-۱۲) و کراتینوسایت ها (۱۵) سلول هایی را بنام سلول های پرتوان القایی ایجاد کنند که کاملاً مشابه سلول های پرتوان بنیادی جنینی هستند و قادرند به سلول های مختلف سازنده بدن تمایز یابند، با این تفاوت که چنانچه سلول های تمایز یافته

حاصل از سلول های پرتوان القایی به همان فردی که منشا سلول های سوماتیک بوده پیوند زده شوند مشکل پس زدن پیوند هم در مورد آن ها وجود نخواهد داشت (۱۵). تولید سلول های پرتوان القایی نیازمند یک منبع سلولی مناسب است که گرفتن نمونه از بیمار را با محدودیت مواجه نکند و از سوی دیگر بازده بازبرنامه ریزی در این سلول ها می بایست بالا باشد تا با مقادیر کم سلول سوماتیکی هم بتوان سلول های پرتوان القایی را به دست آورد. چنین به نظر می رسد کراتینوسایت ها سلول هایی هستند که دارای هر دوی این شرایط هستند. اخیراً گزارش شده است که بازده برنامه ریزی مجدد در سلول های کراتینوسایت انسانی بسیار بالاتر از سلول های فیروبلاستی است. در یک مقایسه صورت گرفته، بازده تولید سلول های پرتوان القایی از سلول های کراتینوسایت تا ۱۰۰ برابر بیشتر و تا دو برابر سریع تر از سلول های فیروبلاست ارزیابی شده است. بنابراین کراتینوسایت ها برای کاربردهای بالینی مبتنی بر تولید و بکارگیری سلول های پرتوان القایی سلول های مناسبی بنظر می رسند (۱۵).

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

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 و ۳٪ 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 میلی‌لیتر محلول دیسپاز (۱ mg/ml) و HBSS (PS ۱ vol/vol) منتقل و لوله حاوی بافت برای یک شب

کنند. در حالیکه در هنگام کشت کراتینوسایت‌ها در محیط فاقد سرم و بدون استفاده از لایه تغذیه‌کننده، 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

محیط صورت گرفت و با استفاده از میکروسکوپ اینورت ارزیابی مورفولوژیک بر روی سلول‌ها انجام شد.

سلول‌ها ۴-۵ 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 نهایتاً در نیتروژن مایع نگهداری شدند. جهت ذوب کراتینوسایت‌ها، 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 سیتوکرآتین 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 کوئزوگه با FITC با غلظت

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

#### جداسازی کراتینوسایت‌ها 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 ۲۰-۳۰ 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 ۲۰۰ g در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند و نهایتاً ته‌نشست سلولی در DMEM (فاقد سرم) به صورت سوسپانسیون درآمد و دوباره برای ۵ دقیقه در ۲۰۰ سانتریفوژ شد. مجدداً ته‌نشست سلولی در ۱ میلی‌لیتر محیط مخصوص سلول‌های کراتینوسایت به صورت سوسپانسیون درآمد 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<sub>2</sub> و ۹۵٪ رطوبت کشت داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت محیط آن‌ها تعویض شد. در ادامه هر ۴۸ ساعت یک بار تعویض

در محيط كشت قابل مشاهده بودند (شكل ۱B)، اما با بالا رفتن تعداد پاساژها و استفاده از محيط اختصاصى سلول‌هاى كراتينوسايت، به تدريج سلول‌هاى فيبروبلاستى از محيط كشت حذف شدند (شكل‌هاى C ۱ و D ۱).

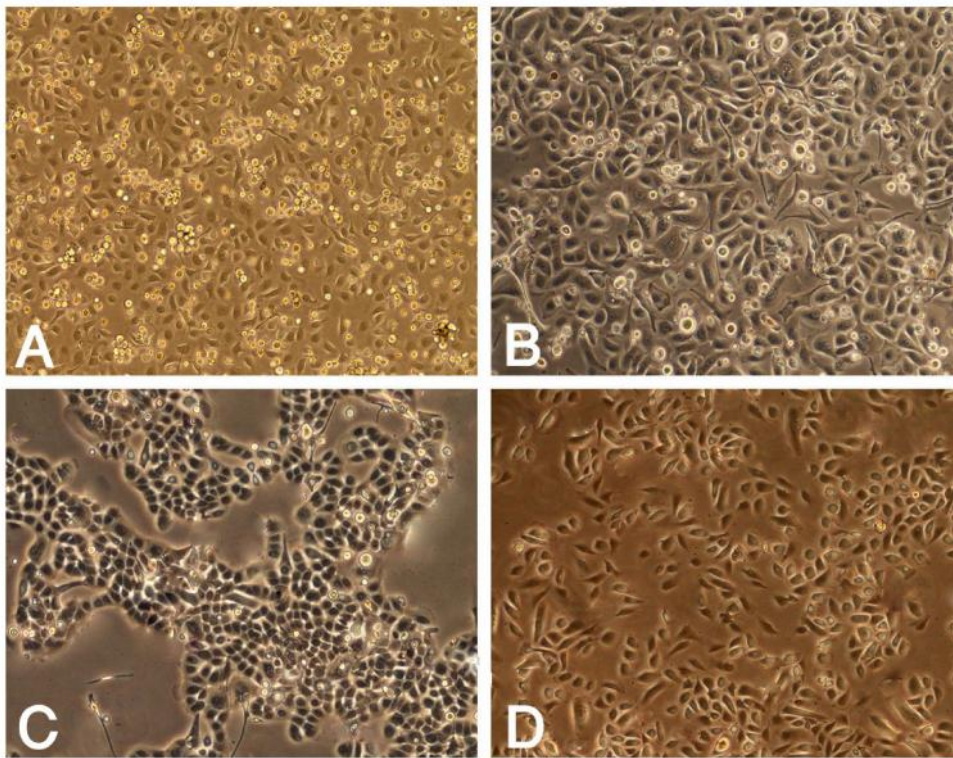
نتايج ايمونوسيتوشيمى سلول‌هاى كراتينوسايت در پاساژ دوم نشان داد كه اين سلول‌ها با آنتى‌بادى بر عليه CK14 نشان دادند و تقريبا تمام سلول‌هاى موجود در كشت، كراتينوسايت بودند (شكل ۲). نتايج ارزيابى مجدد ايمونوسيتوشيمى اين سلول‌ها در پاساژ ۹، وجود ماركر CK14 را در آن‌ها تايد كرد. بستگى به اينكه سلول‌ها از چه فردى گرفته شده باشند تا پاساژهاى ۱۰ الى ۱۳ تكثير شدند (شكل ۳A). معمولا از پاساژ ۱۰ الى ۱۳ به بعد سلول‌هاى كراتينوسايت بزرگ و پهن شده و قادر به رشد نبودند (شكل ۳B).

سلول‌هاى كراتينوسايت در هر پاساژ براى استفاده‌هاى بعدى منجمد شدند. ارزيابى رشد سلول‌ها پس از ذوب نشان داد كه تقريبا ۵۰٪ آن‌ها بعد از فرآيند ذوب، زنده و سالم بوده و پس از ۴ الى ۵ روز قادرند به تراكم سلولى ۹۰-۸۰٪ برسند (شكل ۳C). نتايج يكسانى از تكرر مطالعه به تعداد سه بار بدست آمد.

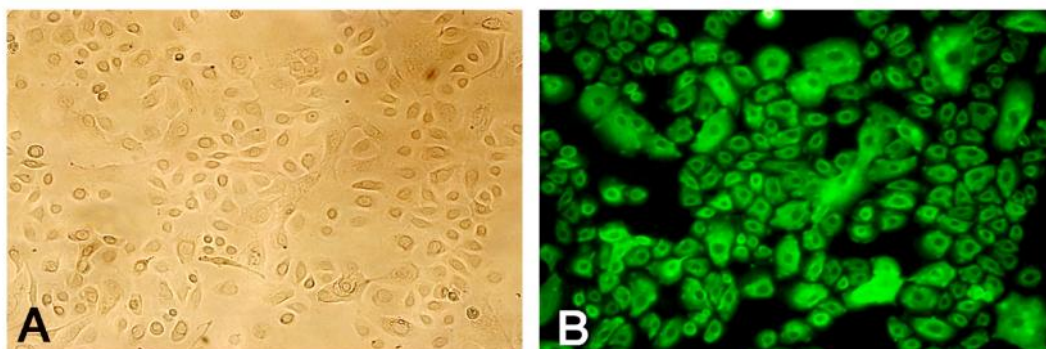
۱:۱۰۰، در تاريخى و دماى اتاق قرار گرفتند. عمل شستشو ۳ بار تكرر شد. در نهايت سلول‌ها با ميكروسكوپ اينورت فلورسنت مورد بررسى قرار گرفتند. از يك چاهك كه تمام مراحل در آن انجام شد به جز اينكه در آن از آنتى‌بادى اوليه استفاده نشده بود به عنوان كنترل منفى استفاده شد. براى اطمينان، اين آزمون ۲ بار تكرر شد.

### يافته‌ها

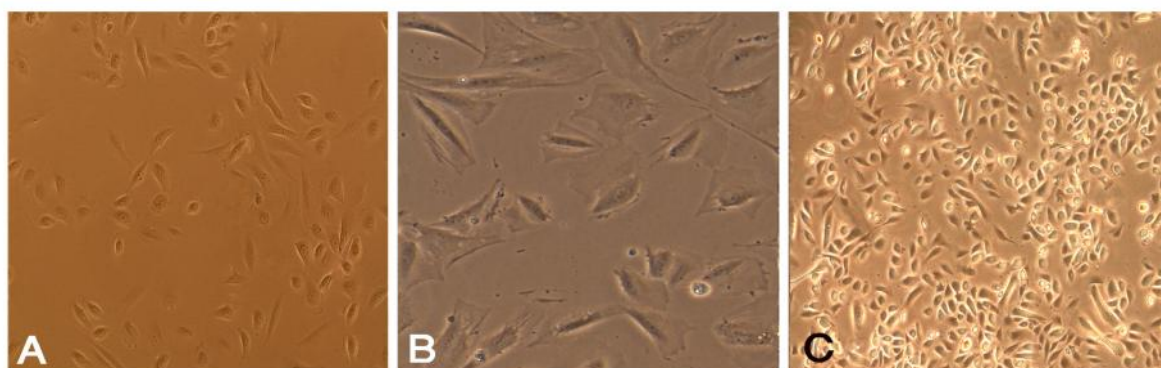
قبل از شروع فرآيند جداسازى استفاده از الكل ۷۰٪ به مدت ۳۰ الى ۴۰ ثانيه باعث حذف آلودگى‌هاى مربوط به پاساژ اول در سلول‌ها شد. پس از تهيه سوسپانسيون سلولى و رنگ‌آمizى با تريبان‌بلو و شمارش سلولى، به ازاي هر سانتي‌متر مربع از نمونه پوست ختنه‌گاه، تقريبا  $10^6 \times 2/5$  سلول كراتينوسايت به دست آمد. سلول‌ها جهت كشت به ظروف كشت ۳۵ ميلي‌مترى منتقل شدند. ۲۴ ساعت پس از كشت، اكثر سلول‌ها به كف پليت چسبيدند (شكل ۱A). مشاهده شد كه سلول‌هاى كراتينوسايت به ظروف كشت پوشش داده شده با كلاژن نوع I انساني بخوبى چسبيده و در طى ۴ الى ۵ روز قادرند به تراكم ۸۰ الى ۹۰٪ برسند. در پاساژهاى اوليه علاوه بر كراتينوسايت‌هاى شاخى شده و يا در حال شاخى شدن تعداد كمى سلول‌هاى شبه فيبروبلاستى هم



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 فیروپلاستی مشاهده شدند که در پاساژهای بعدی (C: پاساژ ۲ و 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. تقریباً پاسخ تمام سلول‌ها به آنتی‌بادی بر علیه سیتوکراتین ۱۴ مثبت بود (بزرگنمایی ۲۰۰).



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 گونه‌ای 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 تکه‌های 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 (۱۹ و ۱۶). 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 جدا کردن 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

ساعت امکان پذیر نباشد و لذا می توان از انکوباسیون کوتاه تر اما دمای بالاتر استفاده کرد. همچنین با استفاده از آنزیم تریپسین با غلظت ۰/۱۲۵٪ کراتینوسایت ها 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 سلول های جداسازی شده در طی ۲ تا ۴ روز اول کشت سلولی بود که با آغشته کردن نمونه ها به الکل ۷۰٪، قبل از شروع فرآیند جداسازی، خطر آلودگی بطور کاملاً معنی داری مرتفع شد. در هیچکدام از مقالات مورد استفاده در این تحقیق به این مشکل و نحوه مقابله با آن اشاره ای نشده بود.

### نتیجه گیری

نظر به اینکه در این مطالعه بیشتر از بیست بار سلول ها از نمونه های مختلف جداسازی شدند، احتمالاً این روش در سایر آزمایشگاه های 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 سلول های کراتینوسایت منتشر شده اند به دلیل اینکه به جزئیات روش های انجام کار کمتر اشاره شده است. میزان تکرارپذیری روش ها 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 می شود.

برای کشت کراتینوسایت ها 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 کراتینوسایت ها بود (۲۲). از بین محیط های 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 مستقیماً در ظرف های کشت قرار داده و با توجه به رشد و تکثیر زودتر کراتینوسایت ها نسبت به فیروبلاست ها توانستند سلول های کراتینوسایت را جدا سازی کنند (۱۹). Aasen و همکاران با استفاده از هضم آنزیمی و استفاده از محیط کشت فاقد سرم، کراتینوسایت های انسانی را جدا سازی و تکثیر کردند (۱۷). آن ها از دیسپاز برای جدا کردن اپیدرم از درم و از یک نوع تریپسین با نام تجاری Trypsin LE Select برای جداسازی سلول های کراتینوسایت لایه اپیدرم از همدیگر استفاده کردند که در این تحقیق با وجود اینکه بارها از آن استفاده شد جداسازی و کشت کراتینوسایت ها موفقیت آمیز نبود. در این تحقیق از دیسپاز با انکوباسیون در مدت زمان های 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 غلظت های ۰/۱۲۵٪ جهت جداسازی سلول های 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 می شود اما لایه جدا شده اپیدرم بجای حفظ قوام نسبی خود به تکه های کوچکی تبدیل می شوند و در مجموع کارایی تولید کراتینوسایت از آن ها پایین تر بود. اما باید توجه داشت که ممکن است گاهی به دلایلی، انکوباسیون سلولی در محیط ۴ درجه و برای مدت زمان ۱۶

## 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, and et 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.

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 epidermal keratinocytes 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.