مجله علمي دانشگاه علوم پزشكي كردستان/دوره سيزدهم/ بهار ۱۳۸۷/ ۴۳-۳۶

جدا سازي و كشت اوليه سلول‌هاي اپي‌تليال تيموس رت با استفاده از آنزيم اكتينيدين ميوه كيوي

كامران منصوري[۱]، دكتر علي مصطفايي[۲]، زينب شيرواني[۳]، دكتر علي بيد مشكي پور[۴]
۱- كارشناس ارشد هماتولوژي، مركز تحقيقات بيولوژي پزشكي دانشگاه علوم پزشكي كرمانشاه
۲- دانشيار ايمنولوژي، مركز تحقيقات بيولوژي پزشكي دانشگاه علوم پزشكي كرمانشاه (مؤلف مسؤول) amostafaie@kums.ac.ir
۳- كارشناس ارشد زيست شناسي سلولي مولكولي، گروه زيست شناسي دانشكده علوم دانشگاه رازي كرمانشاه
۴- استاديار زيست شناسي سلولي مولكولي، گروه زيست شناسي دانشكده علوم دانشگاه رازي كرمانشاه

چكيده

زمينه و هدف: براي تجزيه ماتريكس خارج سلولي جداسازي و كشت اوليه سلولها از آنزيمهاي پروتئوليتيك بخصوص كلاژناز براي هضم بافت استفاده مي‌شود. يافتن پروتئاز جايگزين كلاژناز در منابع گياهي يا جانوري كه راحت‌تر و با هزينه كمتر تخليص گردد، از اهميت ويژه‌اي برخوردار است. به همين علت در مطالعه حاضر از آنزيم اكتينيدين كه به وفور در ميوه كيوي يافت مي‌شود، جهت جداسازي سلولهاي اپي‌تليال تيموس موش صحرايي استفاده شد.

روش بررسي: آنزيم اكتينيدين تخليص شده از ميوه كيوي در دامنه غلظت ۱ تا ۱۰ ميلي‌گرم در ميلي‌ليتر و زمان ۳، ۴ يا ۵ ساعت براي جداسازي سلولهاي اپي تليال تيموس موش صحرايي استفاده شد و سلولهاي اپي تليال تيموس جداشده در پليت كلاژن دار همراه محيط كشت willams E كشت داده شدند. درصد زنده ماندن سلولهاي اپي تليال با استفاده از تست تريپان بلو و مرفولوژي سلولها در مراحل كشت پس از رنگ‌آميزي پاپا نيكولا بررسي شد.

يافته‌ها: اكتينيدين در غلظت ۴ ميلي‌گرم در ميلي‌ليتر در مدت زمان ۴-۳/۵ ساعت ماتريكس خارج سلولي تيموس موش بزرگ را هضم و سلولهاي اپي تليال تيموس را بطور مطلوب جدا نمود. درصد بقاي سلولهاي جدا شده ۹۵-۹۰ درصد تخمين زده شد.

نتيجه‌گيري: آنزيم اكتينيدين ميوه كيوي در مقايسه با كلاژناز، پروتئاز مناسبي براي جداسازي سلولهاي اپي تليال تيموس موش و احتمالاً ساير حيوانات است. لذا با توجه به سادگي و كم هزينه بودن اكتينيدين، اين آنزيم جايگزين مناسبي براي كلاژناز به هدف جداسازي سلولهاي اپي تليال تيموس و كشت اين سلولها است.

كليد واژه‌ها: اكتينيدين، سلولهاي اپي تليال تيموس، كشت اوليه، كلاژناز

وصول مقاله: ۸۶/۶/۲۹ اصلاح نهايي: ۸۶/۱۱/۱ پذيرش مقاله: ۸۶/۱۱/۱۰

مقدمه

جداسازي و كشت اوليه سلولهاي تيموس كاربردهاي فراواني در زمينه‌هاي مختلف دارد. جداسازي سلولهاي اپي‌تليال از تيموس حيوانات آزمايشگاهي و كشت آنها بيش از دو دهه است كه براي ارزيابي طبيعت اين سلولها و نقش آنها در بلوغ سلولهاي T مورد استفاده قرار گرفته است (۲و۱). جدا سازي و بررسي هورمونهاي تيموسي (۳)، شناخت و درمان سرطان با استفاده از اين هورمونها،

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-16]

مطالعه و درمان بيماريهاي مرتبط با سيستم ايمني (۶-۴)، بررسي و مطالعه ايمني سلولي (۷)، بررسي ساختار و عمل سايتوكاين هاي مختلف، بررسي و مطالعه مسيرهاي انتقال سيگنال در لنفوسيتهاي T (۸)، بررسي و مطالعه ويژگي‌هاي كلي و مكانيسم هاي تحمل ايمونولوژيك (۹)، بررسي و مطالعه نقش فيزيولوژيك آپوپتوزيس در لنفوسيتهايT، بررسي و مطالعه نقصهاي ايمني مادرزادي و اكتسابي و درمان آنها از مواردي است كه اهميت جدا سازي و كشت سلولهاي تيموس را روشن مي‌سازد (۱۰). بافت تيموس مانند ديگر بافتها، شامل سلولها و ماتريكس خارج سلولي متشكل از انواعي از پروتئينهاي رشته‌اي (مانند كلاژن و الاستين) و غير رشته‌اي است. يكي از فراوانترين پروتئينهاي فضاي خارج سلولي كلاژن است كه متشكل از يك مارپيچ سه تايي (سه زنجيره آلفا) است (۱۲و۱۱). مولكول كلاژن به اغلب پروتئازها غير از كلاژنازها مقاوم است (۱۳). به همين دليل از كلاژنازها در جداسازي سلولهاي مختلف از بافتهاي جامد همچون تيموس استفاده مي‌شود.

اكتينيدين يك سيستئين پروتئاز است كه در ميوه كيوي به وفور وجود دارد. اين پروتئاز از نظر خصوصيات كلي مشابه ساير سيستئين پروتئازهاي گياهي (همچون پاپائين) و سيستئين پروتئازهاي حيواني (همچون كاتپسين) است (۱۴). پيش آنزيم اكتينيدين در سلول (پري پروآنزيم) داراي ۳۰۲ اسيدآمينه و وزني معادل ۲۳/۵ كيلو دالتون است (۱۵). اكتينيدين يك پروتئاز مناسب در تردكردن گوشت است و در هضم مواد پروتئيني در بيماران داراي مشكلات گوارشي قابل استفاده مي‌باشد. در چند مطالعه اثر كلاژنازي اكتينيدين مورد بررسي قرار گرفته است (۱۶,۱۷).

توجه به كاربردهاي فراوان جداسازي و كشت سلولها اهميت توليد و استفاده از يك آنزيم مناسب را گوشزد مي‌كند. يكي از پر مصرفترين آنزيم‌ها در اين زمينه آنزيم كلاژناز است كه از منابع مختلف بافتي يا ميكروبي تهيه مي‌شود. با توجه به مقدار كم كلاژناز در منابع فوق، مشكلات تخليص اين آنزيم، پايداري ضعيف آن در مراحل تخليص و پرهزينه بودن تهيه آن از شركتهاي خارجي (۲۰-۱۸) ضرورت يافتن جايگزين مناسب آن از نظر علمي و اقتصادي اهميت دارد. بر همين اساس در مطالعه حاضر سعي شده كه از آنزيم ديگري به نام اكتينيدين به عنوان جايگزين كلاژناز با هدف جداسازي سلولهاي اپي تليال تيموس استفاده شود. از نكات مثبت اين آنزيم، فراواني آن در ميوه كيوي و امكان تخليص آن به روشي نسبتاً ساده است كه قبلاً در اين مركز امكان پذير شده است (۲۱).

روش بررسي

مواد: آنزيم اكتينيدين ميوه كيوي (تخليص شده در مركز تحقيقات بيولوژي پزشكي كرمانشاه)، موش بزرگ با نژاد ويستار (مؤسسه سرم سازي رازي)، محيط كشت D-MEM (Gibco)، محيط كشت E Williams'، ال-گلوتامين

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-16]

۲ mM/ml (Sigma-Alderich)، جنتامايسين ۵۰ µg/ml (شركت البرز دارو)، آمفوتريسين بي ۲/۵µg/ml (Bristol-Myers Sqible)، سرم جنين گاو (Gibco)، كلاژن نوع I (Roche)، آنزيم كلاژناز، دگزامتازون، محلول ۰/۴% تريپان بلو (Gibco)، محلول هماتوكسيلين هريس، رنگ ائوزين، Orange G، بافر فسفات نمكي (PBS) همگي از شركت مرك (Merck).

جداسازي و كشت سلول هاي اپي تليال تيموس

براي آتروفي تيموس و به حداقل رسيدن جمعيت تيموسيتهاي موجود در آن، يك ميكروگرم دگزامتازون به ازاي هر گرم وزن موش بصورت داخل عضلاني تزريق شد. ۷۲ ساعت بعد، حيوان در شرايط استريل جراحي شد و تيموس از بدن خارج و درون يك پليت قرار داده شد. تيموس جدا شده چندين بار با سرم فيزيولوژي شسته و ۳ ميلي‌ليتر از محلول اكتينيدين يا كلاژناز به آن اضافه گرديد (آنزيم‌ها در محيط كشت william's E با غلظت مختلف ۱، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ ميلي‌گرم در هر ميلي ليتر تهيه شدند). سپس تيموس با تيغ جراحي تكه تكه شد و به مدت ۱، ۲ يا ۳ ساعت تحت تأثيرآنزيم‌ها در دماي ۳۷ درجه سانتي‌گراد با ۵% Co_2 و ۹۵% O_2 قرار گرفت. بعد از آن تيموس دوباره با تيغ جراحي خرد گرديد و ۲ ساعت ديگر نيز همراه آنزيم در شرايط فوق انكوبه شد. سپس به مخلوط سلولي داخل پليت، ۴-۳ ميلي‌ليتر محيط william's E اضافه و با پيپت به خوبي به هم زده شد تا تعليق يكنواختي حاصل گردد. اين تعليق به لوله منتقل شده و با ۳۰۰۰ دور در دقيقه به مدت ۳ دقيقه سانتريفيوژ گرديد. به منظور حذف كامل آنزيمها و قسمتهاي هضم نشده عمل سانتريفيوژ سه بار ديگر تكرار شد. بعد از آخرين سانتريفيوژ، مايع رويي دور ريخته شد و به رسوب سلولي محيط william's E حاوي ۲۰% FCS اضافه شد و با پيپت به خوبي به هم زده شد تا تعليق يكنواخت گردد. اين تعليق سلولي به پليت كلاژن دار منتقل و در دماي ۳۷ درجه سانتي‌گراد با ۵% Co_2 و ۹۵% O_2 انكوبه شد. براي رسيدن به جمعيت غني از سلولهاي اپي تليال تيموس (سلولهاي چسبيده به كف پليت) تعويض محيط ۴۸ ساعت بعد انجام شد. بلافاصله پس از جداسازي سلولها از تيموس و نيز ۴۸ ساعت بعد از آن، درصد بقاي سلولها با محلول ۰/۴% تريپان بلو اندازه‌گيري گرديد. همچنين براي بررسي مورفولوژي سلول‌هاي جدا شده از رنگ‌آميزي پاپانيكولا (الكل ۹۶% ۲۰-۱۵ دقيقه، الكل ۸۰% ۴-۳ ثانيه، الكل ۷۰% ۴-۳ ثانيه، الكل ۵۰% ۴-۳ ثانيه، شستشو با آب جاري، رنگ هماتوكسيلين ۵ دقيقه، شستشو با آب جاري، محلول اسيد- الكل ۲ ثانيه، شستشو با آب جاري، الكل ۵۰% ۴-۳ ثانيه، الكل ۷۰% ۴-۳ ثانيه، الكل ۸۰% ۴-۳ ثانيه، شستشو با آب جاري، رنگ OG ۵ دقيقه، شستشو با آب جاري، الكل ۹۶% ۴-۳ بار (هر بار يك ثانيه)، رنگ ائوزين ۵ دقيقه، شستشو با آب جاري، الكل ۹۶% ۴-۳ بار (هر بار يك ثانيه)، الكل مطلق ۴-۳ (هر بار يك ثانيه)، خشك شدن لام ها،

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-16]

گزيلول (۲۰-۱۵ دقيقه) استفاده گرديد (۲۲).

تعيين درصد بقاي سلولهاي جدا شده

براي تعيين درصد بقاي سلولهاي اپي تليال جداشده، ۲۵۰ ميكروليتر از تعليق سلولي با ۳ ميليليتر بافر فسفات نمكي (PBS) مخلوط و در ۱۵۰۰ دور به مدت ۳ دقيقه سانتريفوژ شد. شستشو با PBS ۲ بار ديگر صورت گرفت. پس از آخرين سانتريفوژ، رسوب سلولي در ۳ ميليليتر PBS به تعليق درآمد. يك قطره از تعليق سلولي با يك قطره تريپان بلو ۰/۴% مخلوط گرديد. قطره اي از مخلوط حاصله روي لام شمارش قرار داده شد. تعداد كل سلولها و سلولهاي رنگ شده با تريپان بلو شمارش و درصد بقاي سلولها تعيين گرديد.

يافته ها

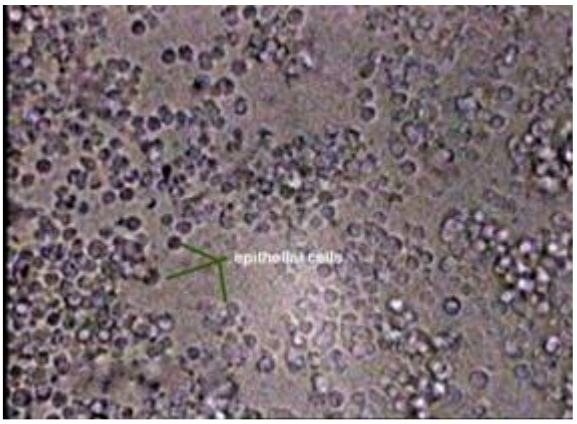
جدا سازي و كشت سلولهاي اپي تليال تيموس موش صحرايي با استفاده از آنزيم اكتينيدين

براي جداسازي سلولهاي اپي تليال تيموس، ابتدا بدون تزريق دگزامتازون عمل گرديد. اما چون تعداد بسيار زيادي از لنفوسيتها نيز همراه سلولهاي اپي تليال جدا شدند، دگزامتازون را در غلظتها و زمانهاي مختلف امتحان كرديم كه غلظت ۱ ميكروگرم به ازاي هر گرم وزن حيوان و ۷۲ ساعت قبل از جداسازي سلول ها، براي به حداقل رساندن لنفوسيت ها در محيط مناسب بود.

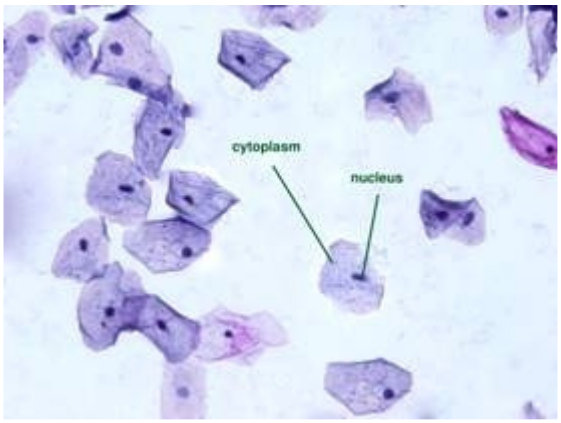
جدا سازي و كشت سلولهاي اپي تليال توسط اكتينيدين در غلظتهاي مختلف (از ۱ تا ۱۰ ميليگرم در ميليليتر) انجام گرفت كه غلظت ۴ ميليگرم در ميليليتر بهترين غلظت براي جداسازي سلولهاي اپي تليال با درصد بقاي ۹۵-۹۰ درصد بود. بنابراين اكتينيدين با غلظت ۴ ميليگرم در ميليليتر و مدت زمان ۴-۳/۵ ساعت استفاده گرديد كه اين غلظت و مدت زمان در مقايسه با كلاژناز با غلظت ۲ ميليگرم و مدت زمان ۴-۳/۵ ساعت براي جداسازي سلولهاي اپي تليال با درصد بقاي بالا مناسب بود.

براي كشت سلولهاي اپي تليال جداشده، محيطهاي كشت F12 و William's E به طور جداگانه به كار برده شد. سلولها در محيط كشت William'sE درصد بقاي بيشتري داشتند. لذا در مراحل بعدي از اين محيط كشت استفاده گرديد. سلولهاي جداشده به پليتهاي كلاژن دار منتقل شدند. اين سلولها در ساعتهاي اوليه پس از جداسازي، گرد، كوچك و شناور بودند (شكل ۱-الف). در روز دوم، سلولها با روش پاپانيكولا رنگآميزي و مورفولوژي آنها بررسي گرديد. سلولها به شكل چند ضلعي، داراي هسته كوچك و سيتوپلاسم فراوان بودند (حجم سيتوپلاسم چند برابر حجم هسته بود) و بصورت يك لايه سلولي در كف پليت ديده شدند. (شكل ۱- ب). اين نتايج نشان داد كه سلولهاي اپي تليال به وسيله آنزيم اكتينيدين با غلظت ۴ ميليگرم در ميليليتر و مدت زمان ۴-۳/۵ ساعت به خوبي جدا شده و سلولهاي جداشده كاملاً سالم بودند.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-16]



شكل ١: الف) مورفولوژي سلولهاي اپي تليال تيموس موش صحرايي جدا شده به وسيله آنزيم اكتينيدين، بلافاصله پس از جداسازي (ميكروسكوپ معكوس ١٠٠ ×).



شكل ١: ب) مورفولوژي سلولهاي اپي تليال تيموس موش صحرايي جدا شده به وسيله آنزيم اكتينيدين، ۴۸ ساعت پس از جداسازي (رنگآميزي با روش پاپانيكولا، ميكروسكوپ نوري ۴۰۰ ×).

بررسي تعيين درصد بقاي سلولهاي جدا شده توسط آنزيم اكتينيدين

درصد بقاي سلولهاي جدا شده (اپي تليال تيموسي) در شرايط بهينه براي هر نوع سلول توسط تست تريپان بلو و با استفاده از لام نئوبار در تمام آزمونها در دامنه ۹۵-۹۰% تخمين زده شد. نتايج نشان داد كه سلولهاي جدا شده بوسيله آنزيم اكتينيدين، سالم و زنده جدا و قابل كشت هستند و تزريق دگزامتازون با غلظت ١ ميكروگرم به ازاي هر گرم وزن حيوان و غلظت ۴ ميليگرم در ميلي‌ليتر آنزيم اكتينيدين و مدت زمان ۴-۳/۵ ساعت طي يك مرحله براي جداسازي اپي تليال تيموس موش صحرايي مناسب است.

بحث

كلاژن فراوان ترين پروتئين در بدن پستانداران است كه به صورت فيبرهاي نامحلول بافت همبندي را قوام مي‌دهد و تقريباً در همه بافتها وجود دارد. فيبرهاي كلاژن معمولاً به حمله آنزيم‌هاي پروتئازي مقاوم هستند و تنها توسط آنزيم‌هاي كلاژناز مورد حمله قرار مي‌گيرند (٢٣). آنزيمهاي كلاژناز در جداسازي انواع سلول‌ها از بافت‌هاي مختلف مانند قلب، كليه، كبد، تيموس و بند ناف به كار مي‌روند. يكي از اين نوع سلولها، سلولهاي اپي تليال تيموس است (٢٤). سلولهاي اپي تليال تيموس، سلولهاي چند ضلعي بزرگ با هسته بيضي شكل و كوچك و سيتوپلاسم فراوان هستند. اين سلولها اعمال تنظيم‌كنندگي سيستم ايمني و نوروانددوكريني را بر عهده دارند و هورمون‌هايي را ترشح مي‌كنند كه در بلوغ و تمايز لنفوسيت‌هاي T نقش دارند، لذا جداسازي و كشت آنها براي تخليص و مطالعه اين هورمون‌ها، شناخت و درمان سرطان با استفاده از هورمون‌هاي تيموسي و مطالعه و درمان بيماريهاي مرتبط با سيستم ايمني مفيد خواهد بود (٢٥).

محققين براي جداسازي سلولهاي اپي تليال تيموس روشها، محيطهاي كشت و مواد كمكي مختلفي را به كار برده‌اند.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-16]

مثلاً در سال ۱۹۸۱ و ۱۹۸۲، از خرد و له کردن مکانيکي جهت جدا سازي اين سلولها از تيموس و براي کشت سلولهاي جدا شده از محيط کشت RPMI حاوي ۱۰% FCS استفاده کردند (۲۷ و۲۶). در سال ۱۹۸۵، براي جداسازي سلولهاي اپي تليال تيموس، محلول ۰/۳ درصد تريپسين و مدت زمان ۱۰ دقيقه و محيط کشت D-MEM حاوي ۱۰% FCS و پليتهاي کلاژن دار را به کار بردند (۲۸). در سال ۱۹۹۶ Kurz و همکارانش براي جداسازي سلولهاي اپي تليال تيموس از تريپسين استفاده کردند و به جاي FCS از FHS استفاده کردند. درصد بقاي سلولهاي جداشده در اين حالت ۹۵ درصد تخمين زده شد (۲۹). در سال ۲۰۰۰ Ferone و همکارانش سلولهاي اپي‌تليال تيموسي را با استفاده از آنزيم کلاژناز با غلظت ۲ ميلي گرم در ميلي ليتر و مدت زمان يك ساعت جدا کردند و سلولهاي جدا شده را در محيط کشت D-MEM حاوي ۱۰% FCS کشت دادند و درصد بقاي اين سلولها بوسيله آزمايش تريپان بلو ۹۰% تخمين زده شد (۳۰). در سال ۱۹۹۱، Collc و همکارانش، سلولهاي اپي تليال را بوسيله آنزيم کلاژناز جدا کردند و در محيط کشت RPMI حاوي ۱۵% FCS، دگزامتازون، انسولين، فاکتور رشد اپي تليال (EGF) و پلي ال- ليزين کشت دادند. درصد بقاي اين سلولها ۹۰% گزارش شد (۳۱). در سال ۲۰۰۴ Kikuchi و همکارانش براي جداسازي اين سلولها از آنزيم DNase I و آنزيم ليبراز (مخلوطي است از آنزيمهاي کلاژناز نوع I وII از باکتري کلستريديوم هيستوليتيکوم و آنزيم پروتئاز نوع X از باکتري باسيلوس ترموپروتئوليتيکوس) و مدت زمان ۳۰ دقيقه استفاده کردند و سلولها را در محيط کشت Williams'E حاوي ۲% FHS، دگزامتازون، انسولين، ترانسفرين و EGF کشت دادند و درصد بقاي اين سلولها ۹۰-۸۵% تخمين زده شد (۳۲). در همين سال نيز دانشمندان ديگري به طور جداگانه در اين زمينه تحقيقاتي انجام دادند. آنها نيز سلولهاي اپي تليال تيموس را با محلول آنزيمي کلاژناز/ ديسپاز (يك متالوپروتئاز خنثي مشتق شده از باسيلوس پلي ميکسا است که فيبرونکتين، کلاژن نوع I و کلاژن نوع IV را مي‌شکنند) و مدت زمان ۴۰-۳۰ دقيقه جدا کردند و در محيط کشت Williams'E کشت دادند و براي شناسايي اين سلولها از خصوصيات مورفولوژي به علاوه رنگ‌آميزي ايمونوسيتوشيميايي براي سيتوکراتين استفاده کردند (۳۴ و۳۳).

در اين تحقيق براي جداسازي سلولهاي اپي تليال تيموس موش صحرايي، ما آنزيم اکتينيدين را با غلظت ۴ ميلي گرم در ميلي ليتر و مدت زمان ۴-۳/۵ ساعت به کار برديم و سلول هاي جدا شده را در محيط کشت Williams'E حاوي ۲۰% FCS کشت داديم. درصد بقاي سلولهاي جدا شده ۹۵-۹۰% تخمين زده شد که اين نتايج با نتايج حاصل از کلاژناز که در اين مطالعه و مطالعات ديگر محققين بدست آمده، قابل مقايسه است. در مطالعه حاضر نسبت به مطالعات ديگران که با استفاده از آنزيمهاي پروتئاز از جمله کلاژناز انجام شده بود، آنزيم

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-16]

اكتينيدين مدت زمان طولانيتري بر بافت تيموس اثر داده شد. با اين حال نتايج نشان داد كه اين آنزيم اثر سمي يا تخريبي بر سلولهاي جدا شده ندارد. اين موضوع يكي از مزيتهاي استفاده از اكتيندين نسبت به ساير پروتئازها همچون كلاژناز يا تريپسين ميباشد.

مطالعات و تحقيقات انجام شده براي جداسازي و كشت سلولهاي اپي تليال تيموس حاكي از آن است كه مطالعه حاضر ظاهراً اولين مطالعهاي است كه براي جداسازي سلولهاي اپي تليال تيموس از آنزيم اكتينيدين ميوه كيوي استفاده نموده و مطالعه مشابهي تاكنون در اين زمينه گزارش نشده است.

نتيجه‌گيري

بنابراين با توجه به مشكل بودن تخليص كلاژناز كه در مقدمه ذكر شد و نتايج حاصل از اين تحقيق، اكتينيدين، آنزيم مناسبي براي جداسازي سلولهاي اپي تليال موش و احتمالاً ساير حيوانات است و راندمان مطلوبي در اين خصوص داشته و فعاليت آن قابل مقايسه با كلاژناز است. بنابراين آنزيم اكتيندين ميتواند جايگزين مناسبي در اين زمينه براي كلاژناز باشد.

تشكر و قدرداني

با تشكر از خانم اعظم احمدي به خاطر كمك در مراحل اجرايي، آقاي دكتر قرباني به خاطر راهنمايي در تشخيص سلولها، آقاي شهرام پروانه به خاطر كمك در تهيه مواد و وسايل مورد نياز و ساير همكاران مركز تحقيقات بيولوژي پزشكي دانشگاه علوم پزشكي كرمانشاه به خاطر همكاري بيدريغ آنها.

References

1. Sun TT, Bonitz P, and Burns WH. Cell culture of mammalian thymic epithelial cells: growth, structural, and antigenic properties. J Cell Immunol 1984; 83: 1-13.
2. Ropke C. Thymic epithelial cell culture. J Microsc Res Tech 1997; 38: 276-286.
3. Hashimura H, Toyokawa T, Hato F, Oshitani N, Kimura S, and Kinoshita Y. Separation of biologically active polypeptides from rat thymus-epithelial-cell-culture-supernatant by high-performance liquid chromatography. J Cell Mol Biol 1987; 33: 375-86.
4. Garaci E, Pica F, Rasi G, and Favalli C. Thymosin alpha1 in the treatment of cancer: from basic research to clinical application. Int J Immunopharmacol 2000; 22: 1067-1076.
5. Bodey B, Bodey JB, Siegel SE, and Kaiser HE. Review of thymic hormones in cancer diagnosis and treatment. Int J Immunopharmacol 2000; 22: 261-273.
6. Kater L, Osterom R, McClure J, and Goldstein AL. Presence of thymosin-like factors in human thymic epi- thelium conditioned medium. Int J Immunopharmacol 1979; 1: 273-284.
7. Pelegri C, Rodriguez-Palmero M, Morante MP, Comas J, Castell M, and Franch A. Comparison of four lymphocyte isolation methods applied to rodent T cell subpopulations and B cells. J Immunol Methods 1995; 187: 265-271.
8. Berhanu D, Mortari F, De Rosa SC, and Roederer M. Optimized lymphocyte isolation methods for analysis of chemokine receptor expression. J Immunol Methods 2003; 279: 199-207.
9. Juhlin R, and Alm GV. Morphologic and antigenic maturation of lymphocytes in the mouse thymus in vitro. Scand J Immunol 1976; 5: 497-503.
10. Figdor CG, Vyth-Dreese FA, Bont WS, Spits H, de Vries JE. Isolation of human thymocytes differing in maturation state and function by centrifugal elutriation. J Thymus 1982; 4: 243-256.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-16]

11. Culav EM, Clark CH, Merrilees MJ. Connective tissues: matrix composition and its relevance to physical therapy. J Physic Ther 1999; 79: 308-319
12. Kleinman HK, klebe RJ, Martin GR. Role of collagenous matrices in adhesion and growth of cells. Cell Biol 1981; 88: 473-485.
13. Goldberg Gl, wilhelm SM, Kronberger A, Bauer EA, Grant GA, Eisen AZ. Human fibroblast collagenase. J Biol Chem 1989; 261(14): 6600-6605.
14. Boland MJ, Hardman MJ. kinetic studies on thiol protease from Actinidia Chinesis. Febes Lett. 1972; 27: 282-284.
15. Reid DJ, Hussain S, Bailey TS, Sonkaria S, Sreedharan SK,Thomas EW, and et al. Isomerization of uncomplexed actinidin molecule: Kinetic accessibility of additional steps in enzyme catalysis provided by solvent perturbatuion. J Biochem 2004; 378: 699-703.
16. Podivinsky E, Forsterl RLS, Gardner RC. Nucleotide sequence of actinidin, a kiwifruit protease. J Nucl Acid Res 1989; 17: 8363.
17. Ohyama H, Enomoto T, Misunage S. Variety of kiwifruit protease and their collagenolytic activity. Nippon Eiyo sykuyo Gakkaishi (in Japanese) 1997; 50: 57-62.
18. Woolley DE, Glanville RW, Roberts DR, and Evanson JM. Purification, characterization and inhibition of human skin collagenase. J Biochem 1978; 169: 265-276.
19. Wittstock M, Flemmig TF, Schmidt H, Mutters R, and Karch H. Serodiagnosis of porphyromonas gingivalis infection by immunoblot analysis with recombinant collagenase. J Clin Microbio 1996; 34: 2411-13.
20. Yoshihara K, Matsushita O, Minami J, and Okabe A. Cloning and nucleotide sequence analysis of the colH gene from clostnidium histolyticum encoding a collagenase and a gelatinase. J Bacteriol 1994; 176: 6489-6496.
٢١- مصطفايي علي، چلبي مريم. اكتيندين ميوه كيوي: خالص سازي و بررسي مقدار آن در واريته هاي داخلي. مجله علوم و فنون كشاورزي و منابع طبيعي، سال ١٣٨٥، شماره٣، صفحات: ٢٢٣-٢٣٠.
22. Bancroft JD. Theory and practice of histological techniques. 5 th ed. 1997. p. 429.
23. Billinghurst RC, Dahlberg L, Ionescu M, Reiner A, Bourne R, Rorabeck C, and et al. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. J Clin Invest 1997; 99: 1534-1545.
24. Strom SC, Jirtle RL, Jones RS. Isolation, culture and transplantation of human hepatocytes. J Nat Cancer Inst 1982; 68: 771-778.
25. Anderson G, Moore NC, Owen JJ, and Jenkinson EJ. Cellular interactions in thymocyte development. Annu Rev Immunol 1996; 14: 73-99.
26. Charles M, Harper JR, and Sharp JG. Evaluation of the morphological and functional characteristics of murine thymic non-lymphoid cells grown in vitro. J Anat 1981; 132: 607-625.
27. Savino W, Dardenne M, Papiernik M, Bach JF. Thymic hormone containing cells: characterization and localization of serum thymic factor in young mouse thymus studied by monoclonal antibodies. J Exp Med 1982; 156: 628-633.
28. Dhillon DS, and Harvey AL. Acetylcholine reseptors of skeletal muscle cells in cultures of rat thymus glands. J Physiol 1985; 362: 349-358.
29. Kurz B, von Gaudecker B, Krisch B, and Mentlein R. Rat thymic epithelial cells in vitro and in situ: characterization by immunocytochemistry and morphology. Cell Tissue Res 1996; 283: 221-229.
30. Ferone D, Hagen MP, Kwekkeboom DJ, Koetsveld PM, Mooy DM, Lichtenuer-Kaligis E and et al. Somatostatin receptor subtypes in human thymoma and inhibition of cell proliferation by octreotide in Vitro. J. Clin Endocrinol Metabolism 2000; 85: 1719-1726.
31. Collc M, Pejnovi N, Kataranovski M, Terzi T, Stojanovi N, and Duji A. Rat thymic epithelial cells in culture constitutively secrete IL-1 and IL-6. J Int Immunol 1991; 3: 1165-1174.
32. Kikuchi T, Ichimiya S, Kojima T, Crisa1 L, Koshiba S, Tonooka A and et al. Expression proles and functional implications of p53-like transcription factors in thymic epithelial cell subtypes. J Int Immunol 2004; 16: 831-841.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-16]

33. Gotter J, Brors B, Hergenhahn M, and Kyewski B. Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes colocalized in chromosomal clusters. JEM 2004; 199: 155-166.
34. Chentoufi AA, Palumbo M, and Polychronakos C. Proinsulin expression by hassall's corpuscles in the mouse thymus. J Diabets 2004; 53: 354-359.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2025-12-16]