مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان- جلد ۹، شماره ۳ (پیاپی ۲۷) ، بهار ۱۳۸۷

بررسی اثر فاکتورهای هورمون رشد و مشتق از پلاکت بر روی رشد و تکثیر سلولهای اپی‌تلیال پوست رت

منوچهر صفری [۱*](Ph.D)، راهب قربانی [۲](Ph.D)، میترا امامی [۳](M.D)، بهپور یوسفی [۱](Ph.D)، لعیا قهاری [۴](Ph.D)

۱ – دانشگاه علوم پزشکی سمنان، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی

۲ – دانشگاه علوم پزشکی سمنان، دانشکده پزشکی، گروه پزشکی اجتماعی

۳ – دانشگاه علوم پزشکی سمنان، دانشکده پزشکی، گروه فارماکولوژی

۴ – دانشگاه علوم پزشکی ارتش، دانشکده پزشکی، گروه علوم تشریحی

چکیده

سابقه و هدف: به علت تماس فراوان بافت اپی‌تلیال با محیط خارج میزان آسیب آن فراوان است. امروزه برای درمان آسیب‌های این بافت از روش‌های متفاوتی استفاده می‌شود ولی در سوختگی‌های شدید و عمقی امکان درمان کامل وجود ندارد. هدف این مطالعه بررسی اثر فاکتورهای هورمون رشد و مشتق از پلاکت بر روی رشد و تکثیر سلول‌های اپی‌تلیال پوست رات است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی سلول‌های اپی‌تلیال از موش ۱ روزه، با روش استاندارد dulgos به‌دست آمد. کراتینوسیت‌های مجزا شده را به مدت ۷ روز در داخل فلاسک ۷۵ کشت داده، سپس مدت ۶ روز در معرض دوزهای متفاوت فاکتورهای PDGF و GH قرار داده شدند. در نهایت تکثیر سلولی با استفاده از تست MTT و نرم‌افزارهای استاندارد مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: سلول‌های جدا شده از پوست حیوان در محیط آزمایشگاه قابلیت تکثیر را داشتند. هر دو فاکتور تکثیر سلولی را افزایش داده اما اثرات تکثیری آن‌ها با هم متفاوت بود. فاکتور PDGF ماکزیمم تاثیر خود را در دوز ۱۰۰ نانوگرم داشته اما GH ماکزیمم تاثیر را در دوز ۱۰ نانوگرمی داشته است. اما اثر تکثیری آن در مقایسه با PDGF کم‌تر بوده است. در برخی از دوزها تعداد سلولی کاهش یافته و به نظر می‌رسد این فاکتورها می‌توانند اثرات سمی نیز بر روی سلول‌ها داشته باشند.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که فاکتورهای PDGF و GH باعث تکثیر سلول‌های اپی‌تلیال پوست در محیط کشت می‌شوند. هم‌چنین اثر PDGF بر روی تکثیر سلولی بسیار قابل توجه‌تر از GH است و GH نمی‌تواند به عنوان یک محرک قوی تکثیر سلول اپی‌تلیال عمل نماید.

واژه‌های کلیدی: کشت سلول، کراتینوسیت، PDGF، GH

مقدمه

هدف اصلی این پروژه بررسی فاکتورهایی است که بتوان با استفاده از آن‌ها تکثیر و رشد سلول‌های بنیادی اپی‌تلیال را در محیط آزمایشگاه افزایش داده و در حداقل مدت زمان لازم تعداد کافی سلول برای ترمیم به‌دست آورد. در حال حاضر حداقل مدت زمان لازم برای آماده‌سازی سلول‌ها جهت ترمیم ۳-۴ هفته می‌باشد و این زمان برای بیمارانی که بخش عمده‌ای از پوست خود را از دست داده‌اند بسیار

* نویسنده مسئول، تلفن: ۳۳۵۴۱۷۲-۰۲۳۱ نمابر: ۳۳۵۴۱۶۱ – ۰۲۳۱ Email: kh_safari@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۸۶/۱۲/۲۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۴/۵

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

طولانی می‌باشد. در این مدت احتمال از دست دادن آب و الکترولیت‌ها هم‌چنین ریسک عفونت بسیار بالا است [۱]. امروزه با توجه به آسیب‌های محیطی فراوان جانشین نمودن پوست از دست رفته یکی از مسائل مهم در جراحی پلاستیک و ترمیمی می‌باشد. پیوند پوست از نظر تاریخی، سابقه‌ای طولانی دارد. اولین روش کشت و پیوند پوست در سال ۱۹۷۴ توسط Freeman پایه‌گذاری شد. او توانست قسمتی از پوست خرگوش را بر روی ساپورت خوک کشت داده و تا ۵۰ برابر، ناحیه دهنده را افزایش دهد [۲]. به‌تدریج محققین موفق شدند با استفاده از تریپسین، اپی‌درم را از درم جدا نموده، سلول‌های اپی‌درم را در محیط کشت با مواد غذایی کافی رشد و تکثیر داده و بعد از ۳ تا ۴ هفته، سلول‌های آماده پیوند تهیه نمایند و آن‌را پیوند بزنند [۳]. آزمایشات اتوگرافت‌های حاصل از سلول‌های اپی‌تلیال کشت داده شده در سال ۱۹۸۱ توسط Oconnor و همکارانش به اوج خود رسید. آن‌ها ۳ -۲ سانتی‌متر از پوست ناحیه سالم را برداشته و بعد از کشت در محیط مغذی، وسعتی به ابعاد ۱۰۰۰ برابر اپی‌تلیوم اولیه در مدت زمان ۳ هفته به‌دست آوردند و این روش را برای بیماران با سوختگی‌های ۴۰ تا ۹۵ درصد به‌کار بردند [۲و۴]. Compton تحقیقی انجام داد که براساس آن ۴ بیمار را با کشت اتوگرافت تحت درمان قرار داد. او بعد از ۱۰ روز مشاهده نمود که کلاژن‌های نوع ۴ و ۷ در ناحیه اپی‌تلیوم رشد کرده است و تمامی بیماران از لحاظ کلینیکی، پوستی نرم را گزارش کردند. در بخش جراحی بیمارستان ماساچوست تحقیقی بر روی ۲۱ بیمار صورت گرفت و تمامی بیماران به مدت ۵ سال تحت پیگیری قرار گرفتند. در تمامی موارد قسمت‌های مختلف پوست و ضمائم آن کاملاً شبیه به بافت طبیعی بوده است [۵ و۶]. با استفاده از تکنیک‌های مختلف جراحی مانند Expansion mesh graft می‌توان وسعت ناحیه‌دهنده را حداکثر تا ۹ برابر افزود و بدیهی است که در بسیاری از موارد این مقدار بسیار ناکافی است [۷] . روش‌های جدیدی نیز ارائه گردیده که پوست را در محیط خارج in vitro تکثیر داده و وسعت ناحیه‌دهنده را تا ۱۰۰۰ برابر می‌توان افزایش داد [۸ و۹]. مطالعات نشان داده که ترمیم با کشت کراتینوسیت‌های اتوگرافت در زخم‌ها و سوختگی‌ها بسیار سریع‌تر از اتوگرافت بهبودی دارد و از طرف دیگر ناحیه دنور بسیار کم‌تری را نیاز دارد بنابراین از ارزش و کارائی بیش‌تری برخوردار است [۱۰]. امروزه در محیط آزمایشگاه با ایجاد شرایط خاص می‌توان تقریباً بیش‌تر انواع سلول‌های اپی‌تلیال از جمله مجاری هوایی, عدسی, سیستم گوارشی, کبد, پروستات را تکثیر و کشت داد [۱۱و۱۲]. با توجه به پتانسیل بسیار بالای سلول‌های بنیادی موجود در پوست، دانشمندان از مدت‌ها قبل به فکر استفاده از این سلول‌ها برای ترمیم ضایعات وسیع پوستی افتاده‌اند. در حال حاضر قادر به شناسایی و کشت آن‌ها در محیط آزمایشگاه گردیده‌اند [۱۳]. حتی با استفاده از موادی مانند FGE توانستند این سلول‌های با پتانسیل بالا را به دیگر سلول‌ها ازجمله نورون تبدیل نمایند [۱۴]. این گروه از سلول‌ها در محیط کشت، مارکر Nestin را بیان می‌کنند که یک نشان‌گر سلول‌های بنیادی است و در شرایط خاص، مارکر βIII Tubolin را بیان می‌کنند که پیش‌ساز نورون است. بنابراین توانائی بالائی دارند [۱۵]. این سلول‌ها در پوست ناحیه اسکالپ به مقدار بسیار زیادی دیده شده است و در پاسخ به FGF2 و EGF، مارکرهای فیبرونکتین و نستین را بیان می‌کنند [۱۶]. البته سلول‌های بنیادی اپی‌تلیال نواحی متفاوت، تفاوت‌هایی با یک‌دیگر دارند مثلاً اپی‌تلیال پستان، رشد و تکثیر کمی دارد در صورتی‌که سلول‌های روده، رشد و تکثیر بسیار بالایی دارد [۱۷]. Lachlan در تحقیق خود از چسب فیبرینی همراه با اسپری سلولی بر روی زخم استفاده نمود. وی نشان داد چسب فیبرینی فقط به سلول‌ها کمک می‌نماید تا در موقعیت خود بهتر مستقر گردند و در ترمیم، نقشی ندارند [۱۸].

مواد و روش‌ها

حیوانات. از ۱۲ رأس موش یک روزه بزرگ آزمایشگاهی از نژاد اسپراگواولی استفاده شد. نوزادان ۲۴ ساعت بعد از زایمان از مادران جدا شدند. بعد از جدا کردن سر، حیوانات را بلافاصله داخل الکل ۷۰ درصد قرار داده و سپس از ناحیه پشتی آن‌ها پوستی به ابعاد ۲ سانتی‌متر مربع

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

برداشته و در داخل محلول HBSS سرد قرار داده شد و به زیر هود منتقل گردید.

محیط کشت. امروزه برای کشت سلول‌های اپی‌تلیال از محیط نمونه گالیکو استفاده می‌شود. این محیط کشت حاوی Co_2 ۵٪، ترانسفرین nm ۲۰، هیدروکورتیزون ng/ml ۰/۵، انسولین ng/ml ۵، EGF DMEM ۱۰ng/ml، FBS ۱۰٪ است که به‌عنوان محیط‌کشت نمونه در هر دو گروه شاهد و مورد مورد استفاده قرار گرفت.

جدا سازی و کشت سلول‌های اپی‌تلیال. برای این منظور از روش dulgos [۶] استفاده گردید. نمونه‌ها از رات یک روزه نژاد اسپراگو داولی تهیه شد. بلا فاصله داخل محلول (1X) HBSS (Gibco-BRL) Hanks Balance Salt olution قرار داده شد. سپس با استفاده از اسکالپل آن‌ها را به قطعات کوچکی تقسیم نموده، قطعات داخل فالکون ۱۵ که حاوی محیط کشت و تریپسین ۰/۱ درصد بدون کلسیم و منیزیم است قرار داده شد. مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه نگهداری شدند. بعد از جدا شدن سلول‌ها، کمی سرم (FBS) Fetal Bovine Serum (Gibco-BRL) به فالکون‌ها اضافه نموده تا اثر تریپسین خنثی گردد. سپس با استفاده از پیپت پاستوری باریک محیط را کاملاً پی‌پتاژ نموده. بعد از انجام پی‌پتاژ تمام محیط داخل فالکون که حاوی سلول و مواد دیگر است را با استفاده از سانتریفیوژ (اپندورف ۱۶۴۰) با دور RPM ۱۲۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده، سپس سوپرناتانت را خارج نموده و cc ۲ محیط کامل که شامل محیط‌کشت گالیکو است به آن اضافه گردید. مجدداً با استفاده از پی‌پت پاستور محیط را کاملاً پی‌پتاژ نموده تا سلول‌های چسبیده به کف فالکون به صورت یکنواخت پراکنده گردند و در عین حال توده سلولی مشاهده نگردد. در این مرحله با استفاده از رنگ تریپان بلو و لام نئوبار، سلول‌های زنده شمارش شدند، در محیط فوق می‌بایست حداقل ۱×۱۰۶ سلول وجود داشته باشد. محلول فوق به دو فلاسک ml ۵۰ منتقل شد. قبل از انتقال سلول‌ها به فلاسک‌ها کف هر دو فلاسک با کلاژن نوع I پوشش داده شد تا سلول‌ها به‌راحتی توانایی چسبیدن به کف فلاسک‌ها را داشته باشند. سلول‌ها به مدت ۷ روز در داخل انکوباتور با دمای ۳۷ سانتی‌گراد Co_2 ۵٪ و هم‌چنین رطوبت مناسب نگهداری شدند. محیط کشت یک روز در میان تعویض گردید. بعد از مدت یک هفته که سلول‌ها تمام کف فلاسک‌ها را پر نمودند با استفاده از ترکیب Trypsin-EDTA (sigma) مجدداً سلول‌ها را از کف فلاسک‌ها جدا نموده و با استفاده از سانتریفیوژ سلول‌ها را از محیط روئی جدا کرده. در این مرحله نیز با استفاده از رنگ تریپان بلو و لام نئوبار مجدداً شمارش سلولی انجام شد. برای انجام ادامه آزمایش سلول‌ها را به (تعداد ۵۰۰۰۰ سلول برای هر چاهک) به میکروپلیت ۹۶ خانه انتقال داده, قبل از انتقال سلول‌ها کف چاهک‌ها، با کلاژن نوع I کت شدند. ردیف اول میکروپلیت را به‌عنوان بلانک حاوی، (محیط و سرم)، ردیف دوم را به عنوان کنترل، حاوی (محیط, سرم, سلول) و ردیف‌های بعدی به‌عنوان گروه‌های آزمایش، شامل (محیط, سرم, سلول, فاکتور) بودند. به گروه‌های آزمایش در مرحله اول دوزهای -۱µg- ng ۱۰-۵۰ - ۱۰۰-۱۵۰-۲۰۰-۳۰۰ ng -۴۰۰ از PDGF اضافه شد, سلول‌ها مدت ۶ روز با این دوزها تحت درمان بودند، سپس تست MTT (-3-4 dimethylthyazol-2-5 tetrazolium bromide) که تست مشخص‌کننده تعداد سلول‌های زنده داخل چاهک‌ها است، برای تمامی دوزها انجام شد. بعد از انجام تست با استفاده از دستگاه Elisa Reader نتایج ثبت گردید. برای تست هورمون رشد تمام مراحل انجام کار همانند روش فوق بود.

روش آماری. پس از انجام تمام آزمایشات با استفاده از نرم افزارهای Excel وSPSS و روش‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و TUKEY test استفاده شد. تمام نتایج در متن و جداول به صورت میانگین گزارش شده و با شرط $P<0/50$ اختلاف معنی‌دار منظور گردیدند.

نتایج

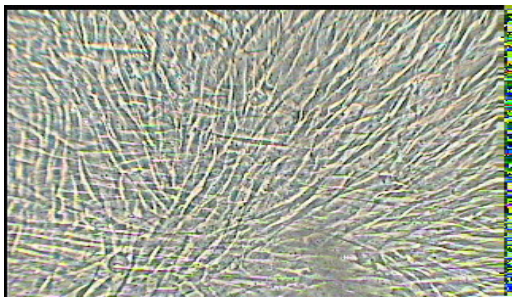
مورفولوژی سلوها. بعد از جدا کردن سلول‌ها از پوست در داخل محیط کشت انواع متفاوت سلول‌ها را می‌توان مشاهده

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

کرد. بعضی از سلول‌ها تقریباً دو برابر دیگر سلول‌ها بوده‌اند که ممکن است جزو سلول‌های بنیادی باشند. با توجه به مورفولوژی آن‌ها هم‌چون غشاء سیتوپلاسمی ضخیم، اندازه بزرگ سلول، هسته‌ای فعال، گرانول‌های داخل سیتوپلاسمی فراوان و حتی در بعضی موارد مشاهده تقسیم آن‌ها به‌صورت نابرابر می‌توان گفت سلول‌های بنیادی می‌باشند (شکل ۱).

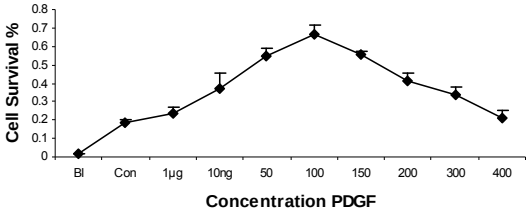
شکل ۱. سلول‌های اپی‌تلیال بعد از تریپسینه (بزرگنمائی ۲۰). سلول‌ها در اندازه‌های متفاوت سلول‌های بسیار بزرگ تقریبا بیش از دو برابر سلول‌های کوچک دیده می‌شود. در داخل سلول‌ها، خصوصاً سلول‌های بزرگ گرانول‌های فراوان، هسته‌ای روشن و فعال، دیواره سیتوپلاسمی ضیخم دیده می‌شود. فلش بلند (c) نشان دهنده سلول‌های بزرگ وفلش‌های کوتاه (→) نشان دهنده سلول‌های کوچک می‌باشد.

در تصاویر روز ۵ بعد از کشت و در هنگامی‌که سلول‌ها کاملاً کف فلاسک را پوشانده‌اند دو گروه سلول قابل مشاهده بود، گروه اول شبیه فیبروبلاست بوده‌اند. که ظاهری دوکی شکل با هسته‌ای در مرکز و گرانول‌هایی در اطراف آن بوده است. گروه دیگر سلول‌هایی که از لحاظ اندازه بزرگ‌تر اما ظاهری گرد و با زائده‌هایی بسیار کوتاه بوده‌اند، در سیتوپلاسم این سلول‌ها گرانول‌هایی وجود داشته است (شکل ۲).



شکل۲. سلول‌های اپی‌تلیال کشت داده شده ۵ روزه (بزرگنمائی ۲۰). این شکل وجود دو نوع سلول دوکی و کروی را نشان می‌دهد. سلول‌ها بسیار فراوان و کاملاً کف فلاسک را پر کرده‌اند. ارتباطات سلولی فراوان، عدم وجود دو لایه سلولی و کامل شدن کف پلیت از مشخصه تصویر فوق است.

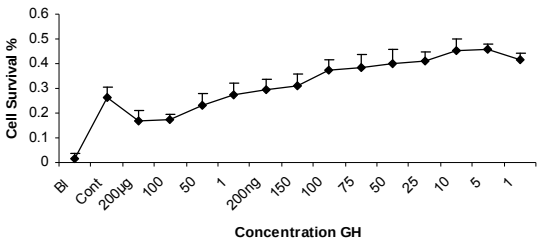
اثرات PDGF بر روی سلول‌های اپی‌تلیال. نتایج آماری حاصل از تحقیقات فوق نشان داد، که دوزهای متفاوت PDGF می‌توانند بر روی تکثیر سلول‌های اپی‌تلیالی موثر باشند. بیش‌ترین تاثیر در محدوده۱۰ تا ۲۰۰ نانوگرم بوده است و از لحاظ آماری این اختلاف معنی‌دار بوده است ($p<۰/۱۰۰$). دراین محدوده بیش‌ترین تعداد سلول‌ها در دوز ng ۱۰۰ بوده است. در دوزهای بیش‌تر از ng ۱۰۰ تعداد سلول‌ها تدریجاً سیر نزولی یافته تا جایی‌که در دوز ng ۳۰۰ تقریباً برابر با گروه کنترل بوده است و تفاوتی با دوز ng ۱۰ نخواهد داشت. بنابراین ۱۰۰ نانوگرم دوز بهینه برای این مجموعه خواهد بود (شکل ۳).



شکل ۳. بررسی اثر دوزهای متفاوت فاکتور PDGF بر روی سلول‌های اپی‌تلیال با کت کلاژن. اختلاف بین دوز های ۱۰ تا ۲۰۰ نانوگرم معنی دار بود. در دوز ۱۰۰ نانوگرم بیش‌ترین تعداد سلولی دیده می‌شود. در مابقی دوزها تعداد سلول‌ها از گروه کنترل کم‌تر نیست. دوزهای ۱ میکروگرم و ۴۰۰ نانوگرم با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری ندارند.

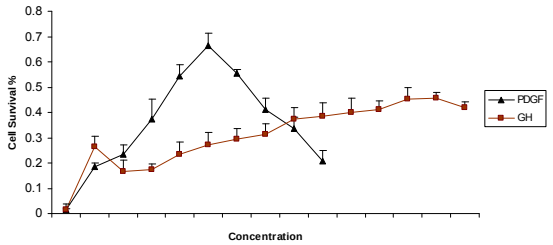
اثرات هورمون رشد بر روی سلول‌های اپی‌تلیال. در مورد هورمون رشد نتایج کمی متفاوت بود. بیش‌ترین تاثیر در دوز ۱ تا ۲۵ نانوگرم بوده است. اما تعداد سلول‌های زنده شمارش شده با استفاده از elisa کم‌تر از PDGF بوده. در دوزهای بالاتر و پایین‌تر از ۱۰ – ۵ نانوگرم تعداد سلول‌های زنده کاهش یافته است. در دوزهای بین ۲۰۰ تا ۱۰۰ میکروگرم کاهش قابل توجهی در تعداد سلول‌ها مشاهده شد به‌طوری‌که حتی تعداد سلول‌ها در این دوزها از گروه کنترل کمتر بوده است. در دوزهای کم‌تر یعنی نانوگرم هم افزایش قابل توجهی را در تعداد سلول‌ها نمی‌توان مشاهده کرد و با گروه کنترل اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ($p<۰/۰۰۱$) بنابراین، این دوزها هم تاثیرات قابل توجهی بر روی رشد و تکثیر سلول‌ها نخواهند داشت (شکل ۴).

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]



شکل ۴. بررسی اثر دوز های مختلف فاکتور GH بر روی سلولهای اپی تلیال. بیشترین تاثیر در دوز ۱۰ نانوگرم است که نسبت بـه گـروه کنتـرل معنی دار است. در دوزهای ۲۰۰ و ۱۰۰ میکروگرم تعداد سلولها کمتر از گروه کنترل است . در دوز های دیگر اختلاف معنی داری با گروه کنتـرل مشاهده نمی شود.

مقایسه اثرات PDGF و GH با یکدیگر بـر روی سـلول‌هـای اپی‌تلیال. در مقایسه دو فاکتور با یـک‌دیگـر دوز ۱۰ng ، دوز بهینه هورمون رشد است که تعداد سلول‌های گروه آزمایش بـا گروه کنترل اخـتلاف معنـی‌داری دارد (p<۰/۰۰۱). از لحـاظ تعداد سلولی، دوز بهینه یـا دوز ۱۰ng هورمـون رشـد تقریبـاً برابر با دوز ۱۵۰ نانوگرمی فاکتور PDGF است. (شکل ۵).



شکل ۵. بررسی مقایسه اثر دو فاکتور PDGF و GH بر روی سلولهای اپی تلیال . همان گونه که مشاهده می شود اثرات فـاکتور PDGF در رشـد و تکثیر سلولهای اپی تلیـال بیـشتر از GH اسـت . مـاگزیمم تـاثیر آن ۱۰۰ نانوگرم است که از ماگزیمم دوزGH بسیار بیشتر است.

در مقایسه دوزهای هر دو هورمون این نکته قابل توجـه بـود که دوزهای بسیار بالا و پایین PDGF از لحاظ تعداد سلول‌ها تقریباً برابر با گروه نرمال بوده است و یا مقدار بـسیار انـدکی کم‌تر از آن می‌باشد. امـا در هـیچ کـدام از مراحـل آزمـایش مشاهده نشد که تعداد سلول‌ها از گروه نرمال که همـان گـروه گـالیکو بـوده کـم‌تـر باشـد. بنـابراین نمـی‌توانـد اثـرات سیتوتوکسیسیتی شدیدی برای سلول‌ها داشته باشد. مـی‌تـوان گفت که این فاکتور یا بی‌تاثیر است و یا موثر. اما بـا مـشاهده نتایج هورمون رشد تعداد سلول‌ها در دوزهای بسیار بالا کم‌تر از گروه نرمال بوده است بنابراین می‌توان گفت که این فاکتور اثـرات سیتوتوکسیـسیتی شـدیدی بـر روی رشـد و تکثیـر سلول‌های اپی‌تلیال خواهد داشت (شکل ۵).

بحث و نتیجه‌گیری

۱ – نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که دوزهای خاصی از هر دو فاکتور قابلیـت تحریـک رشـد و تکثیـر سلول‌های اپی‌تلیال را در محیط آزمایشگاه خواهند داشت اما با توجه به نتایج هورمون PDGF مـوثرتر ازهورمـون رشد بـوده اسـت. نتـایج ایـن مطالعـه منطبـق بـا برخـی گزارشات محققان دیگر مـی‌باشـد. تـرمیم اولیـه زخـم و سوختگی از اهمیت خاصی برخوردار است اما زمـانی کـه زخم عمقی و وسیع باشد ترمیم مشکل است انواع متفاوتی از داروها مانند پمادها و یا پوشش‌هایی برای بهبود ناحیـه سوخته وجود دارد استفاده از ایـن پمادهـا و پوشـش‌هـا نیازمند تعویض‌های مکرر می‌باشد و این مسئله مـی‌توانـد در ترمیم و بازسازی ناحیه آسیب‌دیده اهمیت داشته باشـد [۱۹و۴]. سلول‌های اپی‌تلیالی به علت داشتن سـلول‌هـای بنیادی در لایه بازال و خاردار توانایی تکثیر و حتی تمایز را نیز دارند. محققین با جداسازی سلول‌های اپی‌تلیال نای در حـضور فاکتورهـای رشـد ماننـد EGF, FGF, HGF cholera toxin, توانستند رشد سـریعی را در سـلول‌هـای اپی‌تلیال‌نای داشته باشند حتی بعضی از این سلول‌ها تمایز یافته و سلول‌های اپی‌تلیالی نـوع II را ایجـاد نمـوده‌انـد. بنابراین با وجود سلول‌های بنیادی فـراوان در اپـی‌تلیـال می‌توان با اضافه کردن فاکتورهای خاص تکثیـر آن‌هـا را افزایش داد و حتی آن‌ها را تمایز داده و انواع متفـاوتی از دیگر سلول‌ها با خصوصیات متفاوت بـه‌دسـت آورد. امـا می‌بایست دوز فاکتور و زمان اضافه شدن فاکتور مناسـب باشد در غیر این صورت اثرات معکـوس خواهـد داشـت. وجود این سلول‌های بنیادی و سلول‌های قابل تکثیر است که به ما اجازه می‌دهد تا بتوانیم با استفاده از ناحیه انـدکی از پوست، ناحیه وسیعی را ترمیم نمائیم. چون هدف از این

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

تحقیق فقط تکثیر سلولی بوده است برای جلوگیری از تمایز سلولی از سرم در داخل محیط کشت استفاده شد. امروزه سرم‌هایی درست شده که فاقد یک‌سری از فاکتورها است و می‌توان از آن در تمایز هم استفاده کرد. با توجه به آزمایشات انجام شده مشخص گردید که فاکتور PDGF همانند فاکتورهای فوق می‌تواند در تکثیر سلول‌های اپی‌تلیال نقش داشته باشد اما در دوزهای خاص و اگر مقدار فاکتور بیش از اندازه باشد نه تنها موجب تکثیر نخواهد شد بلکه از تکثیر هم جلوگیری خواهد نمود. در تحقیقات Chegini مشخص شد که مقدار خاصی از فاکتور PDGF درتکثیر و تمایز سلولی نقش دارد. مقدار کم‌تر و یا بیش‌تر این فاکتور نمی‌تواند موجب تکثیر گردد [۱۴]. در تحقیقات Marion مقدار۰ تا ۷۵ ng ازفاکتور PDGF می‌تواند موجب تکثیر سلول‌های اپی‌تلیال گردد. اما در تحقیقات ما این مقدار بین ۵۰ تا ۱۵۰ نانوگرم بوده است و مقادیر پایین‌تر نمی‌تواند موجب تکثیر سلولی گردد. البته در تحقیقات آقای ماریون فاکتورهای دیگری هم مانند EGF, TGF استفاده شده بود که ممکن است این فاکتورها نقش داشته باشد. آن‌ها در تحقیقات خود نشان دادند که اضافه کردن دوزng ۰-۱۰ از فاکتور TGF در محیط کشت سلول‌های اپی‌تلیال برای تکثیرآن‌ها ضروری می‌باشد و ما چون از این گروه از فاکتورها استفاده نکردیم نتایج آن‌ها با این تحقیق متفاوت به‌نظر می‌رسد [۱۶].

۲ – فاکتورهای خارجی هر کدام نقش‌های متفاوتی دارند مثلاً EGF باعث تکثیر سلول‌های اپی‌تلیالی خواهد شد اما همین فاکتور بر روی سلول‌های بنیادی مغز با توجه به این‌که یک منشا جنینی با سلول‌های اپی‌تلیالی دارند تاثیری بر روی تکثیر آن‌ها نداشته و فقط در زنده ماندن این گونه سلول‌ها نقش ایفاء می‌نمایند. در تحقیقات ما نیز مشخص شد که فاکتور GH نقش مهمی در تکثیر سلول‌های اپی‌تلیالی ندارد شاید در زنده ماندن و یا تمایز آن‌ها نقش داشته باشد و در این بین ممکن است فاکتورهای دیگری اهمیت فوق العاده قوی داشته باشند که می‌بایست در تحقیقات دیگر به آن‌ها دست یافت. حتی ممکن است اگر این فاکتور را با فاکتور دیگری ترکیب نمود و همزمان استفاده کرد اثرات فوق‌العاده قوی در تکثیرسلولی داشته باشند اما به‌کاربردن آن‌ها به تنهائی نقش قابل قبولی را در تکثیر ندارند [۱۶و۲۱].

۳ – نشان داده شده که سلول‌های اپی‌تلیال قرنیه نسبت به دوزهای متفاوت برخی از فاکتورهای خارجی از جمله PDGF موثر می‌باشد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که این سلول‌ها دارای گیرنده‌های سطحی برای این گروه از فاکتورها هستند. با توجه به این‌که در این تحقیق هر دو فاکتور PDGF و GH باعث تکثیر سلولی می‌شوند می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌های اپی‌تلیال برای هر دو فاکتور فوق دارای گیرنده‌های سطحی می‌باشند که می‌تواند مکانیزم‌های داخل سلولی برای تحریک تقسیم را فعال نماید [۲۳].

تشکر و قدردانی

این تحقیق بر اساس طرح پژوهشی ۱۰۶ معاونت پژوهشی و با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی سمنان به انجام رسیده است. از آقایان دکتر رشیدی‌پور، دکتر ملک، دکتر سمنانی، سرکار خانم دکتر رهبر و سرکار خانم دانایی نهایت تشکر را دارم.

منابع

[1] Clare W. Epithelial cell culture. 1st edition. New york: Human Inc Press; 2002; p.123-155.

[2] Carlos D. Controlled clinical study of deep partial thickness burn treated with frozen cultured human allogenic epidermal sheets. J Burn Care Rehabil 2000; 21: 291-299.

[3] Boyce T. Comparative assessment of cultured skin substitute and native skin autograft for treatment full thickness burn. Ann Surgery 1995; 222: 743-752.

[4] Oconnor N. Grafting of burns with cultured epithelial prepared autologus epidermal cells. Lancet 1981; 11: 75-76.

[5] Compton M, and Carolyn S. Skin regeneration from cultured epithelial autografts on full thickness burn wounds from 6 days to 5 years after grafting. J Lab Invest 1989; 60: 600-612.

[6] Dulgos A. Isolation and utilization of epidermal keratinocytes for oncogen research. Methods Enzymol 1995; 254: 3-20.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

[7] Boyce T. Cultured skin substitutes reduce requirements for donor skin autograft in treatment of full – thickness burns. J Burn Care Rehabil 1999; 20: 228.

[8] Duinsaleger L. Cultured allogenic keratinocyte sheets acceletrate healing compared to op-site treatment of donor sites in burnes. J Burn Care Rehabil 1997; 18: 545-551.

[9] Marie L. Treatment of hypopigment leasion with cultere epithelial autograft. J Burn Care Rehabil 2000; 21: 50-54.

[10] Arambula H, and Sieera E. Frozen human epidermal allogenic cultures promote rapid healin of facial dermabrasion wounds. Dermat Surg 1999; 25: 708-712.

[11] Bals R. Secretory cell type and cell proliferation of human bronchial epithelial cells in an organ culture system. Cell Tissue Res 1998; 293: 573-577.

[12] Alan A, and Boulton S. Cell Neurobiology Techniques .1th edition: Humana press inc. 1999; p. 211-255.

[13] Adnan Z, and Melissa H. Epithelial stem cells and their niche. Stem Cells 2005; 23: 150-165.

[14] Chegini N. Platelet derived growth factor, epidermal growth factor and EGF&PDGF Receptors in human endometrial tissue. Endocrinology 1992; 30: 2373-2385.

[15] Jean G, Ian A, Darius B, and Freda M. Isolation and characterization of multipotent skin–derived precursors from human skin. Stem Cells 2005; 23: 727-737.

[16] Marion H. Effects of growth factor (EGF, PDGF, TGF) on cultured equine epithelial cells and keratinocytes implication for wound healing. Veteri Opht 2003; 6: 211-215.

[17] Marchetti S. Endothelial cells genetically selected from differentiated mouse embryonic stem cells incorporated at sites of neovascularization in vivo. J Cell Sci 2002; 15: 2075-2080.

[18] Lachlan J, Robin M, Justin R, Elizabeth J. A comparison of keratinocyte cell sprays with and without fibrin glue. Burns 2003; 29: 677-685.

[19] Hirschi K, and Belaguli L. Transforming growth factor – beta induction of smooth muscle cell phenotype requires transcriptional and post transcriptional control of serum response factor. J Bio Chem 2002; 277: 6287-6295.

[20] Lam PK. A new system for cultureation of keratinocyte on a cellular human dermis with the use of fibrin glue and 3T3 feeder cells. J Burn Care Rehabil 2000; 21: 1-4.

[21] Schittek A. Microcrystalline collagen hemostate and wound healing. J Clini Neurosci 2004; 11: 408-411.

[22] Steevan T. Assessment with the dermal torque meter of skin pliability after treatment of burns with culture skin substitutes. J Burn Care Rehabil 2000; 21: 55-63.

[23] Grant I, Warwick K, Marshal J, and Green C. The co application of sprayed cultured autologus keratinocytes ant autologus fibrin sealant in a porcine wound model . British J Plast Surg 2002; 55: 219-227.

[24] Peter S, Majlinda L, Rebecca S, and Stefan P. An autogenic feeder cell system that efficiently supports growth of undifferentiated human embryonic stem cells. Stem Cells 2005; 23: 306-314.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]

The effects of GH and PDGF on the growth and proliferation of the epithelial cells

M. Safari (Ph.D) [*1], R. Ghorbani(Ph.D) [2], M. Emami (M.D.)[3] , B. Yousefi (Ph.D)[1] , L. Ghahari (M.Sc)[4]
1 - Dept. of Anatomy, Semnan University of Medical Science, Semnan, Iran.
2 - Dept. of Social Medicine, Semnan University of Medical Science, Semnan, Iran.
3 - Dept. of Pharmacology, Semnan University of Medical Science, Semnan Iran.
4 - Dept. of Histology, Army University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Introduction: Epithelial is an important tissue in our body. The human epithelium forms a barrier between the external and internal environment. Natural process of wound healing e.g. ischemia, necrotic tissues and infection is a concept that has been in practice for a long time. Large full thickness wounds don't heal spontaneously and are life treating. The closure of large wounds, when there is limited availability of autologous split skin grafts, has been a significant challenge to burns surgeons over the last century.

Material & Methods: Rat keratinocytes were isolated from pups 1 DIV and cultured according to the to the protocol already described by Dulgos et al. Keratinocytes Isolated and were cultured in flask 75cm for 7 days ,then different concentrations of PDGF or GH were added daily for 6 days . Finally MTT test were done for all of wells(Case and Control) . Results were analyzed by Excel & SPSS.

Results: Results of current study showed that keratinocytes culture were successfully established. There were two kinds of cells after 7 days in vitro. Both of the factors could stimulate cells reproduction. Count of cells between concentrations of 10 – 200 ng of PDGF was significant ($P<0.000$). The concentration of 10ng of GH had the maximum effect in cells number and was significant ($p<0.000$). In comparison between two factors, the concentration of 100ng of PDGF was the best concentration for cells reproduction.

Conclusion: These findings indicated that the extrinsic factors such as PDGF & GH could increase reproduction of keratinocyte cells in vitro

Keywords: cell culture, PDGF, GH, keratinocyte.

* Corresponding author: Fax: +98 231 3354161; Tel: +98 231 3354171
kh_safari@yahoo.com

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-31]