بررسی پیوند اتولوگ بافت اپی‌تلیال از طریق کشت سلول

منوچهر صفری*[1](M.Sc)، بتول نصراله زاده[2](Ph.D)، مرتضی شمشیری[3](Ph.D)

۱ – دانشگاه علوم پزشکی سمنان – دانشکده پزشکی – بخش آناتومی

۲ – دانشگاه علوم پزشکی تهران – دانشکده پزشکی – گروه آناتومی

۳ – انستیتو پاستور ایران – بخش تهیه واکسنهای ویروسی

خلاصه

سابقه و هدف: با توجه به شیوع بالای آسیب های پوستی، دست یابی به روش های جدید جهت جایگزینی پوست از دست رفته بسیار حائز اهمیت است. هدف این مطالعه، تولید پوست نرمال و پیوند آن از طریق کشت سلولهای اپی‌تلیال است.

مواد و روش‌ها: ۴ راس خرگوش نر بالغ ۴ ماهه از نژاد آلبینو استفاده شدند. ابتدا از یک خرگوش قطعه پوست کاملی به ابعاد ۶ × ۶ سانتی متر مربع برداشته و به عنوان نسج حمایتی در ظرف حاوی محیط کشت (Medium (M.E.M و Fetal Calf Serum (F.C.S) قرار داده شد. از خرگوش دوم پوستی به ابعاد ۱×۲ سانتیمتر مربع جدا و به قطعات ریز تقسیم و روی درم نسج حمایتی قرار داده شد. بعد از آماده شدن، به خرگوش دوم پیوند زده شد و بعد از ۴ هفته حیوان راکشته و ناحیه ترمیم شده جدا و از نظر بافت شناسی با دو روش رنگ آمیزی بررسی شد. تمام مراحل فوق برای یک جفت خرگوش دیگر تکرار شد.

نتایج: در مطالعه بافت شناسی ناحیه ترمیم شده اپی‌درم با بلوغ کاملاً طبیعی وجود داشت اما لایه شاخی آن نازکتر از پوست نرمال بود. ضمائم پوستی اندکی دیده شد. غده عرق مشاهده نگردید. ترمیم از کناره های زخم شروع و به مرکز گسترش یافته و برجستگی های انگشتی شکل کوتاه‌تر از نرمال بود. کلاژن‌های ناحیه درم منظم‌تر از پوست نرمال و همچنین عروق درم وسیع‌تر و گشادتر بودند

نتیجه‌گیری: با روش فوق می توان وسعت ناحیه دهنده را تا ۱۸ برابر اولیه افزایش داد و پوستی نرمال در ناحیه ترمیم شده در حداقل زمان ممکن بدست آورد. بنابراین، با روش فوق می‌توان پوست نرمال تولید و در پیوند استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: کشت، اتولوگ، گرافت، پوست

مقدمه

بافت اپی‌تلیال پوست به عنوان یک سد مهم و حیاتی برای بدن در مقابل محیط خارج می‌باشد. تخریب این سد حیاتی می‌تواند موجب از دست رفتن آب و الکترولیت‌های بدن و اختلالات متابولیک گردد. جانشین نمودن پوست از دست رفته یکی از مسائل مهم جراحی پلاستیک و ترمیمی می‌باشد. با توجه به گزارشهای موجود، به نظر می‌رسد که پیوند پوست از نظر تاریخی سابقه‌ای طولانی دارد. اولین پیوند پوست را هندی ها در ۱۰۰۰ سال قبل از میلاد گزارش داده‌اند [۸]. دانشمندان از پوست کاداور نیز به طور موفقیت آمیزی جهت ترمیم استفاده نموده‌اند اما این روش خطراتی را برای فرد گیرنده در بر دارد [۵،۶،۷،۸]. اولین روش کشت و پیوند پوست در سال ۱۹۷۴ توسط Freeman

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۲۳۱-۳۲۰۸۱، فاکس: ۰۲۳۱-۳۱۵۵۱

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

پایه‌گذاری شد. او موفق شد قسمتی از پوست خرگوش را بر روی ساپورت خوک کشت داده و تا ۵۰ برابر ناحیه دهنده افزایش دهد [۷]. به تدریج محققین موفق شدند با استفاده از تریپسین، اپی‌درم را از درم جدا نموده و سلول‌های اپی‌درم را در محیط کشت با مواد غذائی کافی رشد و تکثیر داده و بعد از ۳ تا ۴ هفته سلول‌های آماده گرافت تهیه نمایند و آن را پیوند بزنند [۵]. پیوند انجام شده در آزمایشهای دیگر نیز پیوندی دائمی بود و دفع نگردید [۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷]. تدریجاً با تحقیقات بیشتر دانشمندان عناصر محیط کشت را تغییر دادند؛ مثلاً جهت کشت کراتینوسیت‌های پره‌پوس مشخص شد که می‌توان از محیط بدون سرم و یا حتی بدون لایه تغذیه‌ای 3T3 استفاده نمود [۶]. آزمایشهای اتوگرافت‌های حاصل از سلول‌های اپی‌تلیال کشت داده شده در سال ۱۹۸۱ توسط O'connor و همکارانش به اوج خود رسید. آنها برای کشت، ۳-۲ سانتی‌متر از پوست ناحیه سالم را برداشته و بعد از کشت در محیط مغذی وسعتی به ابعاد ۱۰۰۰ برابر اپیتلیوم اولیه ظرف مدت کوتاه ۳ هفته‌ای بدست آوردند. آنها این روش را برای بیماران با سوختگی های ۹۵ - ۴۰ درصد بکار بردند [۱۳،۷]. Limova و همکارش [۸] از روش کشت آلوژن برای بیماران با سوختگی های ۲۵ - ۱۵ درصد استفاده نمود. در پی‌گیری بیماران به موردی که پس بزند برنخورد. تحقیقات این محقق نشان داد که سلول‌های کراتینوسیت قبل از کشت حاوی آنتی ژن HLA-DR می‌باشند و می‌توانند موجب تحریک تکثیر سلولی لنفوسیت T گردند اما بعد از ۷ روز در داخل محیط کشت بودن، سلول‌های کراتینوسیت نمی‌توانند موجب تحریک طولانی تکثیر سلولی لنفوسیت T گردند. بنابراین ، می‌توان نتیجه گرفت که کراتینوسیت‌ها در محیط کشت توانایی آنتی‌ژن HLA-DR و تحریک لنفوسیت T را از دست می‌دهند.

Limora[۸] ۴ بیمار را با کشت اتوگرافت تحت درمان قرار داد. بعد از ۱۰ روز مشاهده نمود که کلاژن‌های نوع ۴ و ۷ در ناحیه درم و اپی‌تلیال رشد کرده است و تمامی بیماران از لحاظ کلینیکی پوست نرمی را گزارش داده‌اند.

تحقیقی نیز در بخش جراحی بیمارستان ماساچوست بر روی ۲۱ بیمار انجام پذیرفت. تمامی بیماران را به مدت ۵ سال تحت پیگیری قرار دادند حتی یک مورد پس زدن پوست مشاهده نگردید. در تمامی موارد قسمت‌های مختلف پوست و ضمائم آن کاملاً شبیه نرمال گشته بود [۳]. با توجه به این موارد موفقیت آمیز که برای بیماران سوختگی از اهمیت فراوانی نیز برخوردار است ما نیز بر آن شدیم تا یکی از روش‌های کشت سلول و ترمیم اپی‌تلیال را انجام دهیم تا شاید از این طریق بتوان کمکی به بیماران سوختگی نمود.

مواد و روش‌ها

حیوانات. در این تحقیق از ۴ راس خرگوش نر نژاد آلبینو با سن متوسط ۴ ماه استفاده گردید. خرگوش‌ها به صورت مجزا در قفس‌های مخصوص و تمیز نگهداری شدند و آب و غذا آزادانه در اختیار آنها بود. یک هفته جهت سازش با محیط بدین صورت نگهداری گردیدند و سپس آزمایشها روی آنها انجام شد.

مواد و روش کار. ابتدا جهت تهیه نسج حمایتی، پس از تراشیدن موهای ناحیه خارجی شکم خرگوش موضع را ضد عفونی نموده و با استفاده از داروی نسدونال خرگوش بیهوش شد. سپس پوستی به ابعاد ۶×۶ سانتی متر مربع با تمام ضخامت برداشته شد و بافت را در محلول بافر فسفات قرار دادیم. پس از ۳ بار شستشو با محیط MEM بدون سرم در زیر هود، آن را به محیط کشت MEM که به آن سرم ۱۰٪ Fetal Calf، ۲۰۰ u/ml پنی سیلین G، ۲۰۰ mg/ml استرپتومایسین و ۱۰٪ تریپتوز فسفات اضافه کرده بودیم انتقال دادیم. طرز قرارگرفتن ساپورت در بوات شیشه ای طوری بود که اپی درم در کف ظرف و درم به سمت بالا قرار گرفت. سپس ساپورت را در انکوباتور با درجه حرارت ۳۷ درجه و CO2 ۵ درصد و رطوبت مناسب قرار دادیم. بعد از ۳ روز از خرگوش دیگر (اتولوگ) پوستی به ابعاد ۱×۲ سانتی‌متر مربع در محیط استریل برداشته آنرا در زیر هود

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

با دو اسکالپل به قطعات ریز تقسیم کردیم و بر روی درم حمایتی به صورت تصادفی پخش نمودیم. محیط کشت را ابتدا هر روز و سپس یک روز درمیان تعویض نمودیم. بعد از حدود ۳-۲ روز قطعات اتولوگ بر درم حمایتی چسبیده و شروع به تکثیر سلولی نمودند به طوری که بعد از ۷ روز قطعات اتولوگ، سطح بیشتری از درم را پوشانیده بود. در این موقع (روز هفتم) پوستی به ابعاد ۶×۶ سانتی متر از خرگوش دوم که اتولوگ متعلق به آن بود (از سمت مقابل ناحیه ۱×۲) را به صورت ضخیم جداکرده و پوست اتولوگ - حمایتی را در آن ناحیه قرار داده به طوری که نسج حمایتی در معرض خارج قرار داشته باشد. بااستفاده از نخ بخیه ابریشمی شماره ۳۰ ناحیه را بخیه و سطح را با استفاده از درمان استاندارد پانسمان نمودیم. در پایان هفته چهارم ناحیه پیوند شده را به طور کامل جدا و به قطعات ریز تقسیم نمودیم و در فرمالین ۱۰٪ جهت تهیه مقاطع بافت شناسی قرار دادیم. جهت بررسی نمونه‌ها از دو رنگ آمیزی هماتوکسیلین ائوزین و تری‌کروم‌ماسون استفاده نمودیم تمام مراحل فوق برای یک جفت خرگوش دیگر تکرار شد.

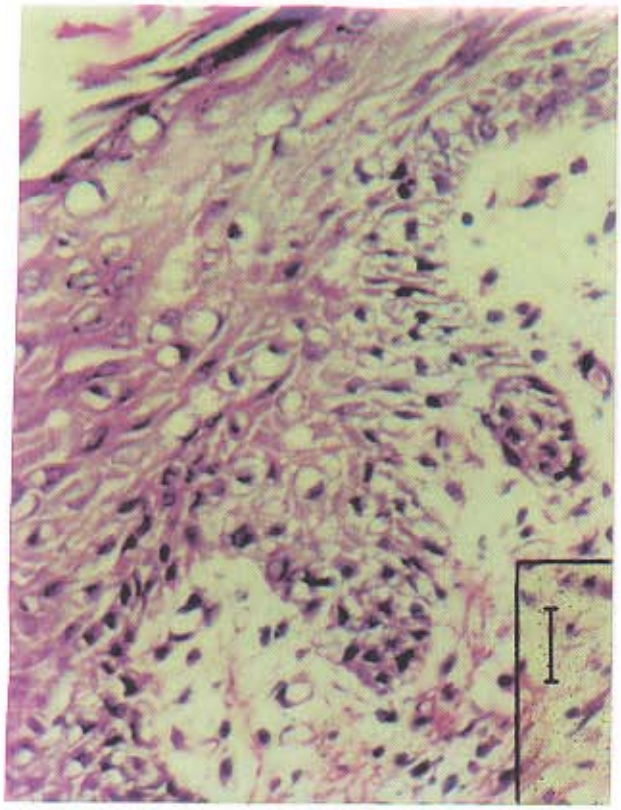
نتایج

ماکروسکوپی. نسج حمایتی از اوایل هفته دوم شروع به تغییر رنگ، تیره شدن و دفع از کناره‌های زخم گردید. در هنگام دفع نسج حمایتی از کناره‌ها در زیر آن یک پوست نازک صورتی رنگ دیده می‌شد. بعد از ۴ هفته فقط قسمت مرکزی پیوند نسج حمایتی به پوست زیرین چسبندگی داشته و مابقی دفع گردیده بود.

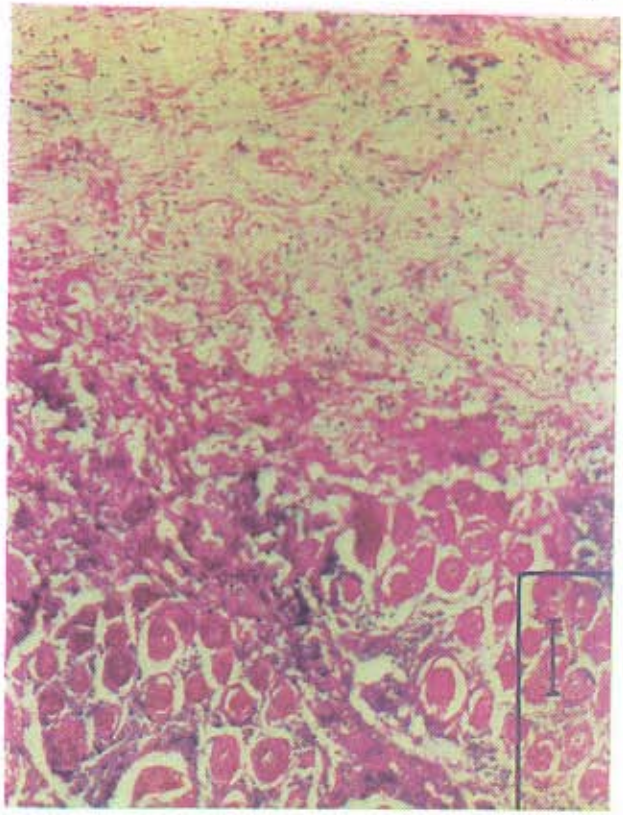
میکروسکوپی.

۱ - در ناحیه ترمیم شده، اپی‌درم بلوغ طبیعی خود را طی نموده و تمامی لایه های اپی درم تشکیل شد اما تراکم سلولی لایه خاردار نسبت به نرمال کمتر بوده است(شکل ۱).

۲- در پوست پیوند شده برجستگی های انگشتی شکل Rete ridge عمق کمتری دارند و کمتر به داخل درم زیرین خود نفوذ کرده‌اند. در این پوست لایه بازال به طور

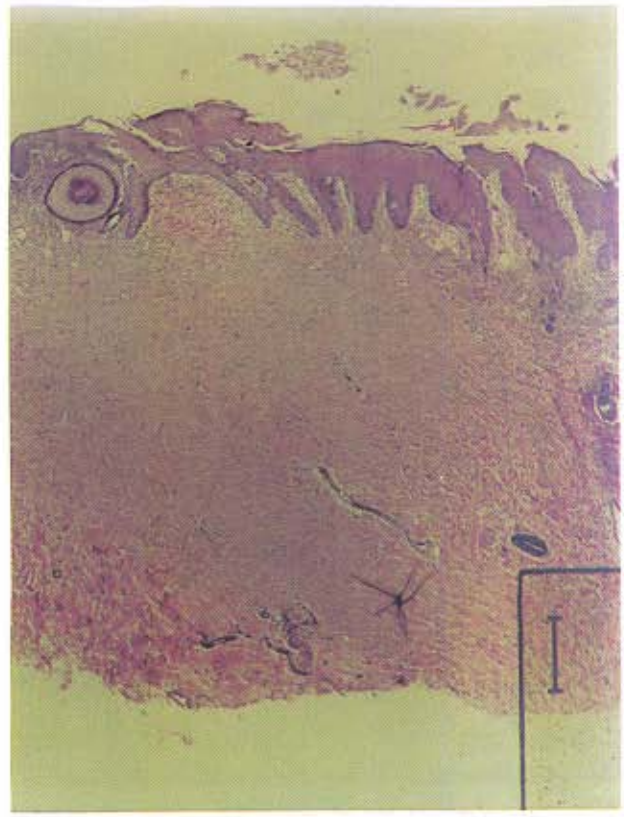


شکل ۱. اپی‌درم با بلوغ طبیعی در ناحیه ترمیم شده (هماتوکسیلین- ائوزین×۴۰).

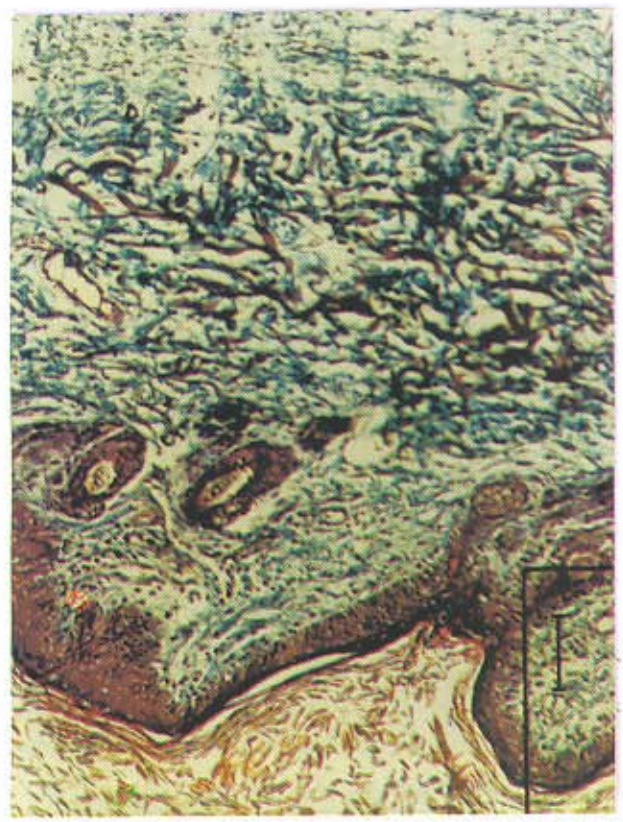


شکل ۲. پوست گرافت شده با نسج حمایتی (هماتوکسیلین - ائوزین×۴۰).

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]



شکل ۳. کناره پوست گرافت شده (هماتوکسیلین - ائوزین × ۲/۳).



شکل ۴. پوست گرافت شده (تری کروم ماسون × ۱۰).

کامل تشکیل شده و در بین لایه‌های بازال و خاری سلول‌های با سیتوپلاسم روشن (Clear Cell) دیده می‌شود (شکل ۱ و ۳).

۳- در پوست پیوندی میزان شاخی شدن لایه سطحی بسیار نازک‌تر از پوست طبیعی است و با نکروزه شدن نسج حمایتی و جدا شدن آن از نسج زیرین تدریجاً اپی‌درم از کناره‌ها تشکیل می‌گردد. نسج حمایتی در ناحیه مرکزی به پوست زیرین چسبیده و اسیدوفیل شده و شروع به دفع شدن می‌نماید (شکل ۲ و ۳).

۴- هر چه به ناحیه ترمیم شده نزدیک شویم تعداد برجستگی‌های انگشتی و همچنین تمایز لایه‌های اپی‌تلیال کمتر می‌شود (شکل ۱ و ۳).

۵- در ناحیه درم گرافت شده بعد از ۴ هفته که مقاطع تهیه گردید تعداد اندکی از ضمائم پوستی مانند مو و غده چربی مشاهده گردید (شکل ۲ و ۳).

۶- در ناحیه درم گرافت شده میزان عروق خونی فراوان بوده در عین حال بیشتر عروق دیواره‌های نازکی دارند. در اطراف عروق تراکم سلولی ادوانتیس زیاد مشاهده می‌شود (شکل ۲ و ۴).

۷- در رنگ آمیزی اختصاصی تری‌کروم‌ماسون و معمولی H&E تراکم رشته‌های کلاژن در درم گرافت شده بسیار کمتر از طبیعی بوده از طرفی کلاژن‌ها بیشتر موازی با سطح می‌باشند و بعد از ۴ هفته حالت Woven پیدا نکرده‌اند و درم هنوز به دو قسمت رتیکولر و پاپیلر تقسیم نشده است. تنها قسمتی از ضمائم درم که در حال شکل گیری و کامل شدن است غده چربی و مو می‌باشد (شکل ۱ و ۴).

بحث

مهم‌ترین یافته این مطالعه این است که در مدت زمان کوتاهی می‌توان با استفاده از روش‌های مختلف کشت سلول، ناحیه اندکی از پوست را تکثیر داده و آن را پیوند زد و پوستی نرمال به دست آورد.

در این مطالعه از نظر ماکروسکوپی دفع نسج حمایتی از اوایل هفته دوم ازکناره‌های پیوند مشاهده گردید و این

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

به علت رشد سریع ترمیم لایه اپی‌تلیال از کناره‌های زخم و جوانه زدن آن به داخل زخم می‌باشد [۸]. در هنگام دفع نسج حمایتی در روی سطح زخم پوست نازک صورتی رنگ مشاهده گردید که به علت وجود بافت گرانولاسیون می‌باشد و روشن بودن این بافت به علت کمبود ملانوسیت‌های آن می‌باشد. با توجه به تحقیقات Compton [۳] بعد از ۱۶ - ۳ هفته میزان ملانوسیت‌ها تقریباً به حد نرمال می‌رسد.

در بررسی مقاطع بافتی در مدت زمان ۴ هفته بعد از گرافت، لایه اپی‌درم بلوغ خود را طی نموده و تمام لایه‌های آن تشکیل شده اما تراکم سلولی آن نسبت به پوست نرمال کمتر بود و در عین حال فعالیت میتوتیک سلول‌ها در لایه بازال و خاردار بیشتر گردیده است. البته هر چه به مرکز زخم نزدیک‌تر شویم تراکم سلولی کمتر است [۳، ۱۰]. در ظرف مدت ۴ هفته میزان لایه شاخی سطحی کمتر از نرمال می‌باشد. تعداد برجستگی‌های انگشتی کمتر و عمق فرو رفتگی آنها به داخل درم کاهش یافته اما سلول‌های با سیتوپلاسم روشن هم در لایه بازال و هم در لایه خاری دیده می‌شود و با توجه به تحقیقات قبلی، کامل شدن Rete Ridge حدود ۲۱ هفته زمان لازم دارد [۴، ۸].

مطالعات O'connor [۱۳] نشان داد که ترمیم اپی درم سریع و درم کند است اما ساختمان‌های بین آنها رشد حد واسطی دارند. همچنین با توجه به تحقیقات [Compton۳] ایجاد نظم خاص در اپی درم با تمام لایه‌های متمایز شده طبیعی به حدود یک هفته زمان نیاز می‌باشد. از طرفی Suzuki [۱۰] مشخص نمود حدود ۴ - ۳ هفته زمان لازم است تا درم ترمیم کلی یابد.

در منطقه درم گرافت شده هیچ اثری از عضلات راست کننده مو و غده عرق مشاهده نشد اما فقط یک توده چربی کوچک در نزدیکی Rete Ridge دیده شده است و این نشان می‌دهد که اولین قسمتی که تشکیل می‌شود غده چربی است و رشد مو و غده عرق نیاز به زمان طولانی تری دارند. البته Compton [۳] عدم رشد تمام ضمائم را در مطالعه خود مشاهده نمود در صورتی که در مطالعات ما غده چربی دیده شد که احتمالاً علت آن این است که این تحقیق بر روی خرگوش بوده در صورتی که تحقیق دیگران بر روی انسان بوده است.

سیستم عروق خونی در منطقه درم ناحیه گرافت خصوصاً در ناحیه پاپیلر بسیار رشد کرده و بیشتر عروق متسع بودند و بعضی از آنها به صورت عمودی نسبت به سطح قرار گرفته و دیواره نازکی داشتند که احتمالاً به علت تازه تشکیل شدن این عروق می‌باشد [۱۰، ۱۵، ۲۰]. تحقیقات دیگران نشان داده که بازسازی کامل عروق و ترمیم کامل رشته‌های الاستیک به حدود ۵-۴ سال زمان نیاز است [۳].

در رنگ آمیزی اختصاصی تری‌کروم‌ماسون، در لایه درم ناحیه گرافت شده میزان رشته‌های کلاژن کاهش یافته، به صورت موازی با اپی‌درم قرار گرفته‌اند و دو لایه درم قابل تمایز از یکدیگر نیستند. در صورتی که رشته‌های کلاژن بافت طبیعی به صورت Woven می‌باشند. تحقیقات دیگران نشان داده تمایز درم به دو لایه و در هم شدن کلاژن‌های درم به حدود ۴ - ۳ سال زمان لازم دارد [۳، ۴]

در پایان با توجه به اهمیت پیوند پوست پیشنهاد می‌شود تحقیقات وسیع‌تری در موارد زیر صورت گیرد:

۱ - مطالعه پیوند پوست از طریق کشت آلوژن بر روی انسان در مدت زمان طولانی تر

۲ - یافتن روش‌های جدیدتری تا در مدت زمان کمتر از ۳ هفته بتوان پوست آماده گرافت بدست آورد.

قدردانی

در پایان از زحمات پرسنل بخش تهیه واکسن‌های ویروسی انستیتو پاستور ایران خصوصاً جناب آقای جعفری تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

[1] Bondoc, C. and Burke, J., Clinical experience with viable frozen human skin and frozen skin bank, J. Ann . Surg., 174

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

(1971) 341-381.

[2] Bell, E. and Ehrlich, P., Development and use of a living skin equipment, J. Plast. Reconstr. Surg., , (1981) 386-392.

[3] Compton, C. and Gill, J., Skin regenerated from cultured epithelial autografts on full thickness burn wounds from 6 days to 5 years after grafting, J. Lab. Invest., 60 (1989) 600-612.

[4] Green, H., Editorial regeneration of the skin after grafting of epidermal culture, J. Lab. Invest.,, 60 (1989) 583-584.

[5] Hancock, K., Cultured keratinocytes and keratinocyte graft, BMJ, 299 (1989) 1179-1180.

[6] Ian, F., Culture of animal cell, 3 th Edition, Co Pub., New York, 1995, pp.165-176

[7] Igel, H., and Freeman, A., A new method for covering large surface area wound with autografts, Arch. Surgery , 106 (1974) 724-729.

[8] Limova, M. and Grekin, R., Synthetic membranes and cultured keratinocyte grafts, American J. Dermatol., 23(1990) 713-718

[9] Munster, A. and Weiner, S., Cultured epidermis for the coverage of massive burn wounds, Ann. Surg., 212 (1990) 676-779.

[10] Matsuda, S. and Suzuki, I., Clinical evaluation of a new bilayer artificial skin collagen sponge and silicon layer, Br. J. Plast. Surg., 55 (1990) 47-53.

[11] Nanchahal, J., Cultured composite skin grafts for burns, BMJ, 301(1990) 1342-1343.

[12] Nanchahal, J., Cultured composite skin grafts biological skin premitting massive expantion, Lancet, 13 (1989) 75-76

[13] O´connor N., Grafting of burnes with cultured epithelium prepared autologus epidermal cell, Lancet, 5 (1981) 75-76.

[14] Oliver, A. and Kaawach, B., The differentiation and proliferation of newly formed epidermis on wounds treated with cultured epithelial allografts, Br. J. Dermatol., 20 (1991) 147-154.

[15] Petersen M. , characterization of cellular elements in healed cultured keratinocyte autografts used to cover burn wounds, Arch. Dermatol., 126 (1990) 175-179.

[16] Philips, T., Cultured autografts as an adjunct to the medical treatment of problematic leg ulcer, Arch. Dermatology, 127 (1991) 781-799.

[17] Poumay Y., Utilization of human cultured epidermal keratinocyte irreversibility of the inhibition of proliferation induced in stored detached cultured, Burns, 17 (1991) 205-208.

[18] Randal, T., Cultured skin cell artificial dermis join in race against time to cover burn wound, JAMA, 15 (1991) 265-266.

[19] Rhenwald, J., Epidermal growth factor and the multipication of cultured human epidermal keratinocyte, Nature, 265 (1997) 421-424.

[20]Teepe, R., Improved grafting method for treatment of burns with autologous cultured human epithelium, Lancet, 15 (1989) 385.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]

The investigation on the skin graft by epithelial cells culture

M. Safari*[1] (M.Sc), B. Nasrollah zadeh[2] (Ph.D), M. Shamshiri[3] (Ph.D)

1- Dept. of Anatomy , School of Medicine , Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

2- Dept. of Anatomy , School of Medicine , Tehran University of Medical Sciences, Tehran , Iran

3- Dept. of Virus vaccin, Pastur Institute of Iran, Tehran, Iran

Introduction. Due to high incidence of skin damages, finding new methods for skin transplantation is quite important . The aim of this study was to produce normal skin by culture of epithelial cells and to examine its autologus graft.

Materials and Methods. 4 male albino rabbits (4 months) were used. At the first from one of the rabbits a piece of skin (6 × 6 cm) separated from back region and placed in MEM and FCS solution as a supporting surface. From another rabbit, a piece of skin (2 × 1cm) separated and divided into small particles and placed on the derm of supporting surface. By two other rabbits, this process was accomplished once more. After preparation it grafted to the second rabbit. After 4 weeks the animal killed and the grafted region separated and prepared for histological study by two staining methods.

Results. The results show that in the grafted region, epiderm is normal but outer layer (cornea) is thiner than normal skin. Histological studies have been shown that skin elements were decreased, sweat glands were not found, repair was started from margin of ulcer, rete ridges were little and short, collagen of derm was regulated and vessels were dilated.

Conclusion. With this method, the donor skin can be expanded to several times and used for autologus skin graft.

Key words: Autologus; Culture; Graft; Skin

Corresponding author. Fax: 0231-31551; Tel: 0231-32080

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-08-05]