Archive of SID

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان/دوره سیزدهم/ بهار ۱۳۸۷/ ۴۳-۳۶

جدا سازی و کشت اولیه سلول‌های اپی‌تلیال تیموس رت با استفاده از آنزیم اکتینیدین میوه کیوی

کامران منصوری[۱]، دکتر علی مصطفایی[۲]، زینب شیروانی[۳]، دکتر علی بید مشکی پور[۴]

۱- کارشناس ارشد هماتولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

۲- دانشیار ایمنولوژی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه (مؤلف مسؤول) amostafaie@kums.ac.ir

۳- کارشناس ارشد زیست شناسی سلولی مولکولی، گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه رازی کرمانشاه

۴- استادیار زیست شناسی سلولی مولکولی، گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه رازی کرمانشاه

چکیده

زمینه و هدف: برای تجزیه ماتریکس خارج سلولی جداسازی و کشت اولیه سلولها از آنزیمهای پروتئولیتیک بخصوص کلاژناز برای هضم بافت استفاده می‌شود. یافتن پروتئاز جایگزین کلاژناز در منابع گیاهی یا جانوری که راحت‌تر و با هزینه کمتر تخلیص گردد، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. به همین علت در مطالعه حاضر از آنزیم اکتینیدین که به وفور در میوه کیوی یافت می‌شود، جهت جداسازی سلولهای اپی‌تلیال تیموس موش صحرایی استفاده شد.

روش بررسی: آنزیم اکتیندین تخلیص شده از میوه کیوی در دامنه غلظت ۱ تا ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و زمان ۳، ۴ یا ۵ ساعت برای جداسازی سلولهای اپی تلیال تیموس موش صحرایی استفاده شد و سلولهای اپی تلیال تیموس جداشده در پلیت کلاژن دار همراه محیط کشت willams E کشت داده شدند. درصد زنده ماندن سلولهای اپی تلیال با استفاده از تست تریپان بلو و مرفولوژی سلولها در مراحل کشت پس از رنگ‌آمیزی پاپا نیکولا بررسی شد.

یافته‌ها: اکتینیدین در غلظت ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در مدت زمان ۴-۳/۵ ساعت ماتریکس خارج سلولی تیموس موش بزرگ را هضم و سلولهای اپی تلیال تیموس را بطور مطلوب جدا نمود. درصد بقای سلولهای جدا شده ۹۵-۹۰ درصد تخمین زده شد.

نتیجه‌گیری: آنزیم اکتینیدین میوه کیوی در مقایسه با کلاژناز، پروتئاز مناسبی برای جداسازی سلولهای اپی تلیال تیموس موش و احتمالاً سایر حیوانات است. لذا با توجه به سادگی و کم هزینه بودن اکتینیدین، این آنزیم جایگزین مناسبی برای کلاژناز به هدف جداسازی سلولهای اپی تلیال تیموس و کشت این سلولها است.

کلید واژه‌ها: اکتینیدین، سلولهای اپی تلیال تیموس، کشت اولیه، کلاژناز

وصول مقاله: ۸۶/۶/۲۹ اصلاح نهایی: ۸۶/۱۱/۱ پذیرش مقاله: ۸۶/۱۱/۱۰

مقدمه

جداسازی و کشت اولیه سلولهای تیموس کاربردهای فراوانی در زمینه‌های مختلف دارد. جداسازی سلولهای اپی‌تلیال از تیموس حیوانات آزمایشگاهی و کشت آنها بیش از دو دهه است که برای ارزیابی طبیعت این سلولها و نقش آنها در بلوغ سلولهای T مورد استفاده قرار گرفته است (۲و۱). جدا سازی و بررسی هورمونهای تیموسی (۳)، شناخت و درمان سرطان با استفاده از این هورمونها، مطالعه و درمان بیماریهای مرتبط با سیستم ایمنی (۶-۴)، بررسی و مطالعه ایمنی سلولی (۷)، بررسی ساختار و عمل سایتوکاین‌های مختلف، بررسی و مطالعه مسیرهای انتقال سیگنال در لنفوسیتهای T (۸)، بررسی و مطالعه ویژگی‌های کلی و

www.SID.ir

Archive of SID

مکانیسم‌های تحمل ایمونولوژیک (۹)، بررسی و مطالعه نقش فیزیولوژیک آپوپتوزیس در لنفوسیتهایT، بررسی و مطالعه نقصهای ایمنی مادرزادی و اکتسابی و درمان آنها از مواردی است که اهمیت جدا سازی و کشت سلولهای تیموس را روشن می‌سازد (۱۰). بافت تیموس مانند دیگر بافتها، شامل سلولها و ماتریکس خارج سلولی متشکل از انواعی از پروتئینهای رشته‌ای (مانند کلاژن و الاستین) و غیر رشته‌ای است. یکی از فراوانترین پروتئینهای فضای خارج سلولی کلاژن است که متشکل از یک مارپیچ سه تایی (سه زنجیره آلفا) است (۱۲و۱۱). مولکول کلاژن به اغلب پروتئازها غیر از کلاژنازها مقاوم است (۱۳). به همین دلیل از کلاژنازها در جداسازی سلولهای مختلف از بافتهای جامد همچون تیموس استفاده می‌شود.

اکتینیدین یک سیستئین پروتئاز است که در میوه کیوی به وفور وجود دارد. این پروتئاز از نظر خصوصیات کلی مشابه سایر سیستئین پروتئازهای گیاهی(همچون پاپائین) و سیستئین پروتئازهای حیوانی (همچون کاتپسین) است (۱۴). پیش آنزیم اکتینیدین در سلول (پری پروآنزیم) دارای ۳۰۲ اسیدآمینه و وزنی معادل ۲۳/۵ کیلو دالتون است (۱۵). اکتینیدین یک پروتئاز مناسب در تردکردن گوشت است و در هضم مواد پروتئینی در بیماران دارای مشکلات گوارشی قابل استفاده می‌باشد. در چند مطالعه اثر کلاژنازی اکتینیدین مورد بررسی قرار گرفته است (۱۶,۱۷).

توجه به کاربردهای فراوان جداسازی و کشت سلولها اهمیت تولید و استفاده از یک آنزیم مناسب را گوشزد می‌کند. یکی از پر مصرف‌ترین آنزیم‌ها در این زمینه آنزیم کلاژناز است که از منابع مختلف بافتی یا میکروبی تهیه می‌شود. با توجه به مقدار کم کلاژناز در منابع فوق، مشکلات تخلیص این آنزیم، پایداری ضعیف آن در مراحل تخلیص و پرهزینه بودن تهیه آن از شرکتهای خارجی (۲۰-۱۸) ضرورت یافتن جایگزین مناسب آن از نظر علمی و اقتصادی اهمیت دارد. بر همین اساس در مطالعه حاضر سعی شده که از آنزیم دیگری به نام اکتینیدین به عنوان جایگزین کلاژناز با هدف جداسازی سلولهای اپی تلیال تیموس استفاده شود. از نکات مثبت این آنزیم، فراوانی آن در میوه کیوی و امکان تخلیص آن به روشی نسبتاً ساده است که قبلاً در این مرکز امکان پذیر شده است (۲۱).

روش بررسی

مواد: آنزیم اکتینیدین میوه کیوی (تخلیص شده در مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی کرمانشاه)، موش بزرگ با نژاد ویستار (مؤسسه سرم سازی رازی)، محیط کشت D-MEM (Gibco)، محیط کشت Williams' E، ال-گلوتامین ۲ mM/ml (Sigma-Alderich)، جنتامایسین ۵۰ µg/ml (شرکت البرز دارو)، آمفوتریسین بی ۲/۵µg/ml (Bristol-Myers Sqible)، سرم جنین گاو (Gibco)، کلاژن نوع I (Roche)،آنزیم کلاژناز، دگزامتازون، محلول ۰/۴٪ تریپان بلو(Gibco)، محلول هماتوکسیلین هریس، رنگ ائوزین، Orange G، بافر فسفات نمکی(PBS) همگی از شرکت مرک (Merck).

جداسازی و کشت سلول‌های اپی‌تلیال تیموس

برای آتروفی تیموس و به حداقل رسیدن جمعیت تیموسیتهای موجود در آن، یک میکروگرم دگزامتازون به ازای هر گرم وزن موش بصورت داخل عضلانی تزریق شد. ۷۲ ساعت بعد، حیوان در شرایط استریل جراحی شد و تیموس از بدن خارج و درون یک پلیت

www.SID.ir

Archive of SID

قرار داده شد. تیموس جدا شده چندین بار با سرم فیزیولوژی شسته و ۳ میلی‌لیتر از محلول اکتینیدین یا کلاژناز به آن اضافه گردید (آنزیم‌ها در محیط کشت william's E با غلظت مختلف ۱، ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر تهیه شدند). سپس تیموس با تیغ جراحی تکه تکه شد و به مدت ۱، ۲ یا ۳ ساعت تحت تأثیرآنزیم‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ Co_2 و ۹۵٪ O_2 قرار گرفت. بعد از آن تیموس دوباره با تیغ جراحی خرد گردید و ۲ ساعت دیگر نیز همراه آنزیم در شرایط فوق انکوبه شد. سپس به مخلوط سلولی داخل پلیت، ۴-۳ میلی‌لیتر محیط william' s E اضافه و با پیپت به خوبی به هم زده شد تا تعلیق یکنواختی حاصل گردد. این تعلیق به لوله منتقل شده و با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ گردید. به منظور حذف کامل آنزیمها و قسمتهای هضم نشده عمل سانتریفیوژ سه بار دیگر تکرار شد. بعد از آخرین سانتریفیوژ، مایع رویی دور ریخته شد و به رسوب سلولی محیط william' s E حاوی ۲۰٪ FCS اضافه شد و با پیپت به خوبی به هم زده شد تا تعلیق یکنواخت گردد. این تعلیق سلولی به پلیت کلاژن دار منتقل و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ Co_2 و ۹۵٪ O_2 انکوبه شد. برای رسیدن به جمعیت غنی از سلولهای اپی تلیال تیموس (سلولهای چسبیده به کف پلیت) تعویض محیط ۴۸ ساعت بعد انجام شد. بلافاصله پس از جداسازی سلولها از تیموس و نیز ۴۸ ساعت بعد از آن، درصد بقای سلولها با محلول ۰/۴٪ تریپان بلو اندازه‌گیری گردید. همچنین برای بررسی مورفولوژی سلول‌های جدا شده از رنگ‌آمیزی پاپانیکولا (الکل ۹۶٪ ۲۰-۱۵ دقیقه، الکل ۸۰٪ ٤-۳ ثانیه، الکل ۷۰٪ ٤-۳ ثانیه، الکل ۵۰٪ ٤-۳ ثانیه، شستشو با آب جاری، رنگ هماتوکسیلین ۵ دقیقه، شستشو با آب جاری، محلول اسید- الکل ۲ ثانیه، شستشو با آب جاری، الکل ۵۰٪ ٤-۳ ثانیه، الکل ۷۰٪ ٤-۳ ثانیه، الکل ۸۰٪ ٤-۳ ثانیه، شستشو با آب جاری، رنگ OG ۵ دقیقه، شستشو با آب جاری، الکل ۹۶٪ ٤-۳ بار (هر بار یک ثانیه)، رنگ ائوزین ۵ دقیقه، شستشو با آب جاری، الکل ۹۶٪ ٤-۳ بار (هر بار یک ثانیه)، الکل مطلق ٤-۳ (هر بار یک ثانیه)، خشک شدن لام ها، گزیلول (۲۰-۱۵ دقیقه) استفاده گردید (۲۲).

تعیین درصد بقای سلولهای جدا شده

برای تعیین درصد بقای سلولهای اپی تلیال جداشده، ۲۵۰ میکرولیتر از تعلیق سلولی با ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات نمکی (PBS) مخلوط و در ۱۵۰۰ دور به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شد. شستشو با PBS ۲ بار دیگر صورت گرفت. پس از آخرین سانتریفوژ، رسوب سلولی در ۳ میلی‌لیتر PBS به تعلیق درآمد. یک قطره از تعلیق سلولی با یک قطره تریپان بلو ۰/۴٪ مخلوط گردید. قطره‌ای از مخلوط حاصله روی لام شمارش قرار داده شد. تعداد کل سلولها و سلولهای رنگ شده با تریپان بلو شمارش و درصد بقای سلولها تعیین گردید.

یافته‌ها

جدا سازی و کشت سلولهای اپی تلیال تیموس موش صحرایی با استفاده از آنزیم اکتینیدین

برای جداسازی سلولهای اپی تلیال تیموس، ابتدا بدون تزریق دگزامتازون عمل گردید. اما چون تعداد بسیار زیادی از لنفوسیتها نیز همراه سلولهای اپی تلیال جدا شدند، دگزامتازون را در غلظتها و زمانهای مختلف امتحان کردیم که غلظت ۱ میکروگرم به ازای هر گرم

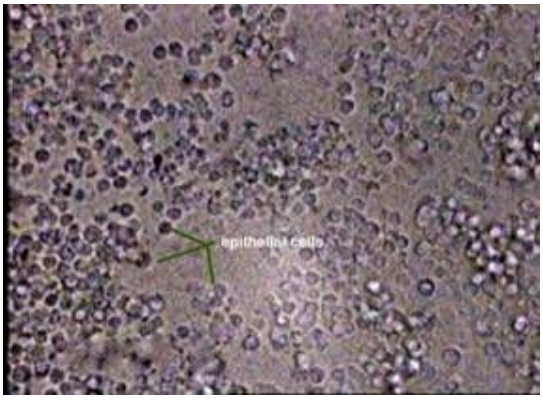
www.SID.ir

Archive of SID

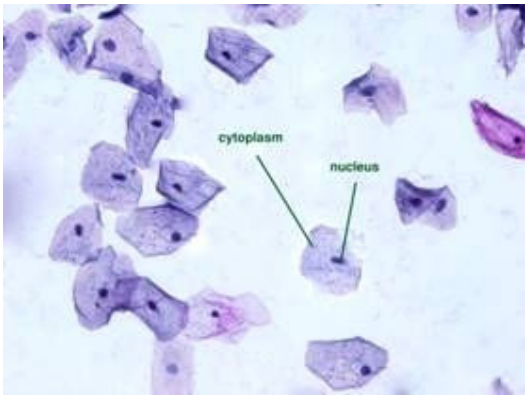
وزن حیوان و ۷۲ ساعت قبل از جداسازی سلول‌ها، برای به حداقل رساندن لنفوسیت‌ها در محیط مناسب بود.

جدا سازی و کشت سلولهای اپی تلیال توسط اکتینیدین در غلظتهای مختلف (از ۱ تا ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) انجام گرفت که غلظت ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بهترین غلظت برای جداسازی سلولهای اپی تلیال با درصد بقای ۹۵-۹۰ درصد بود. بنابراین اکتینیدین با غلظت ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و مدت زمان ۴-۳/۵ ساعت استفاده گردید که این غلظت و مدت زمان در مقایسه با کلاژناز با غلظت ۲ میلی‌گرم و مدت زمان ۴-۳/۵ ساعت برای جداسازی سلولهای اپی تلیال با درصد بقای بالا مناسب بود.

برای کشت سلولهای اپی تلیال جداشده، محیط‌های کشت F12 و William's E به طور جداگانه به کار برده شد. سلولها در محیط کشت William'sE درصد بقای بیشتری داشتند. لذا در مراحل بعدی از این محیط کشت استفاده گردید. سلولهای جداشده به پلیتهای کلاژن دار منتقل شدند. این سلولها در ساعتهای اولیه پس از جداسازی، گرد، کوچک و شناور بودند (شکل ۱- الف). در روز دوم، سلولها با روش پاپانیکولا رنگ‌آمیزی و مورفولوژی آنها بررسی گردید. سلولها به شکل چند ضلعی، دارای هسته کوچک و سیتوپلاسم فراوان بودند (حجم سیتوپلاسم چند برابر حجم هسته بود) و بصورت یک لایه سلولی در کف پلیت دیده شدند. (شکل ۱- ب). این نتایج نشان داد که سلولهای اپی تلیال به وسیله آنزیم اکتینیدین با غلظت ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و مدت زمان ۴-۳/۵ ساعت به خوبی جدا شده و سلولهای جداشده کاملاً سالم بودند.



شکل ۱: الف) مورفولوژی سلولهای اپی تلیال تیموس موش صحرایی جدا شده به وسیله آنزیم اکتینیدین، بلافاصله پس از جداسازی (میکروسکوپ معکوس ۱۰۰ ×).



شکل ۱: ب) مورفولوژی سلولهای اپی تلیال تیموس موش صحرایی جدا شده به وسیله آنزیم اکتینیدین، ۴۸ ساعت پس از جداسازی (رنگ‌آمیزی با روش پاپانیکولا، میکروسکوپ نوری ۴۰۰ ×).

بررسی تعیین درصد بقای سلولهای جدا شده توسط آنزیم اکتینیدین

درصد بقای سلولهای جدا شده (اپی تلیال تیموسی) در شرایط بهینه برای هر نوع سلول توسط تست تریپان بلو و با استفاده از لام نئوبار در تمام آزمونها در دامنه ۹۵-۹۰٪ تخمین زده شد. نتایج نشان داد که سلولهای جدا شده بوسیله آنزیم اکتینیدین، سالم و زنده جدا و قابل کشت هستند و تزریق دگزامتازون با غلظت ۱

www.SID.ir

Archive of SID

میکروگرم به ازای هر گرم وزن حیوان و غلظت ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آنزیم اکتینیدین و مدت زمان ۴-۳/۵ ساعت طی یک مرحله برای جداسازی اپی تلیال تیموس موش صحرایی مناسب است.

بحث

کلاژن فراوان‌ترین پروتئین در بدن پستانداران است که به صورت فیبرهای نامحلول بافت همبندی را قوام می‌دهد و تقریباً در همه بافتها وجود دارد. فیبرهای کلاژن معمولاً به حمله آنزیم‌های پروتئازی مقاوم هستند و تنها توسط آنزیم‌های کلاژناز مورد حمله قرار می‌گیرند (۲۳). آنزیمهای کلاژناز در جداسازی انواع سلول‌ها از بافت‌های مختلف مانند قلب، کلیه، کبد، تیموس و بند ناف به کار می‌روند. یکی از این نوع سلولها، سلولهای اپی تلیال تیموس است (۲٤). سلولهای اپی تلیال تیموس، سلولهای چند ضلعی بزرگ با هسته بیضی شکل و کوچک و سیتوپلاسم فراوان هستند. این سلولها اعمال تنظیم‌کنندگی سیستم ایمنی و نوروآندوکرینی را بر عهده دارند و هورمون‌هایی را ترشح می‌کنند که در بلوغ و تمایز لنفوسیت‌های T نقش دارند، لذا جداسازی و کشت آنها برای تخلیص و مطالعه این هورمون‌ها، شناخت و درمان سرطان با استفاده از هورمون‌های تیموسی و مطالعه و درمان بیماریهای مرتبط با سیستم ایمنی مفید خواهد بود (۲۵).

محققین برای جداسازی سلولهای اپی تلیال تیموس روشها، محیط‌های کشت و مواد کمکی مختلفی را به کار برده‌اند. مثلاً در سال ۱۹۸۱ و ۱۹۸۲، از خرد و له کردن مکانیکی جهت جدا سازی این سلولها از تیموس و برای کشت سلولهای جدا شده از محیط کشت RPMI حاوی ۱۰٪ FCS استفاده کردند (۲۷ و۲۶). در سال ۱۹۸۵، برای جداسازی سلولهای اپی تلیال تیموس، محلول ۰/۳ درصد تریپسین و مدت زمان ۱۰ دقیقه و محیط کشت D-MEM حاوی ۱۰٪ FCS و پلیتهای کلاژن دار را به کار بردند (۲۸). در سال ۱۹۹۶ Kurz و همکارانش برای جداسازی سلولهای اپی تلیال تیموس از تریپسین استفاده کردند و به جای FCS از FHS استفاده کردند. درصد بقای سلولهای جداشده در این حالت ۹۵ درصد تخمین زده شد (۲۹). در سال ۲۰۰۰ Ferone و همکارانش سلولهای اپی‌تلیال تیموسی را با استفاده از آنزیم کلاژناز با غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و مدت زمان یک ساعت جدا کردند و سلولهای جدا شده را در محیط کشت D-MEM حاوی ۱۰٪ FCS کشت دادند و درصد بقای این سلولها بوسیله آزمایش تریپان بلو ۹۰٪ تخمین زده شد (۳۰). در سال ۱۹۹۱، Collc و همکارانش، سلولهای اپی تلیال را بوسیله آنزیم کلاژناز جدا کردند و در محیط کشت RPMI حاوی ۱۵٪ FCS، دگزامتازون، انسولین، فاکتور رشد اپی تلیال(EGF) و پلی ال- لیزین کشت دادند. درصد بقای این سلولها ۹۰٪ گزارش شد (۳۱). در سال ۲۰۰۴ Kikuchi و همکارانش برای جداسازی این سلولها از آنزیم DNase I و آنزیم لیبراز (مخلوطی است از آنزیمهای کلاژناز نوع I وII از باکتری کلستریدیوم هیستولیتیکوم و آنزیم پروتئاز نوع X از باکتری باسیلوس ترموپروتئولیتیکوس) و مدت زمان ۳۰ دقیقه استفاده کردند و سلولها را در محیط کشت Williams'E حاوی ۲٪ FHS، دگزامتازون، انسولین، ترانسفرین و EGF کشت دادند و درصد بقای این سلولها ۹۰-۸۵٪ تخمین زده شد (۳۲). در همین سال نیز دانشمندان دیگری به طور جداگانه در این زمینه تحقیقاتی انجام دادند. آنها نیز سلولهای اپی تلیال تیموس را با محلول آنزیمی کلاژناز/ دیسپاز (یک متالوپروتئاز

www.SID.ir

Archive of SID

خنثی مشتق شده از باسیلوس پلی میکسا است که فیبرونکتین، کلاژن نوع I و کلاژن نوع IV را می‌شکند) و مدت زمان ۴۰-۳۰ دقیقه جدا کردند و در محیط کشت Williams'E کشت دادند و برای شناسایی این سلولها از خصوصیات مورفولوژی به علاوه رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمیایی برای سیتوکراتین استفاده کردند (۳۴ و۳۳).

در این تحقیق برای جداسازی سلولهای اپی تلیال تیموس موش صحرایی، ما آنزیم اکتینیدین را با غلظت ۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و مدت زمان ۴-۳/۵ ساعت به کار بردیم و سلول های جدا شده را در محیط کشت Williams'E حاوی ۲۰٪ FCS کشت دادیم. درصد بقای سلولهای جدا شده ۹۵-۹۰٪ تخمین زده شد که این نتایج با نتایج حاصل از کلاژناز که در این مطالعه و مطالعات دیگر محققین بدست آمده، قابل مقایسه است. در مطالعه حاضر نسبت به مطالعات دیگران که با استفاده از آنزیمهای پروتئاز از جمله کلاژناز انجام شده بود، آنزیم اکتینیدین مدت زمان طولانی‌تری بر بافت تیموس اثر داده شد. با این حال نتایج نشان داد که این آنزیم اثر سمی یا تخریبی بر سلولهای جدا شده ندارد. این موضوع یکی از مزیتهای استفاده از اکتیندین نسبت به سایر پروتئازها همچون کلاژناز یا تریپسین می‌باشد.

مطالعات و تحقیقات انجام شده برای جداسازی و کشت سلول‌های اپی تلیال تیموس حاکی از آن است که مطالعه حاضر ظاهراً اولین مطالعه‌ای است که برای جداسازی سلولهای اپی تلیال تیموس از آنزیم اکتینیدین میوه کیوی استفاده نموده و مطالعه مشابهی تاکنون در این زمینه گزارش نشده است.

نتیجه‌گیری

بنابراین با توجه به مشکل بودن تخلیص کلاژناز که در مقدمه ذکر شد و نتایج حاصل از این تحقیق، اکتینیدین، آنزیم مناسبی برای جداسازی سلولهای اپی تلیال موش و احتمالاً سایر حیوانات است و راندمان مطلوبی در این خصوص داشته و فعالیت آن قابل مقایسه با کلاژناز است. بنابراین آنزیم اکتیندین می‌تواند جایگزین مناسبی در این زمینه برای کلاژناز باشد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از خانم اعظم احمدی به خاطر کمک در مراحل اجرایی، آقای دکتر قربانی به خاطر راهنمایی در تشخیص سلولها، آقای شهرام پروانه به خاطر کمک در تهیه مواد و وسایل مورد نیاز و سایر همکاران مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه به خاطر همکاری بی‌دریغ 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.

www.SID.ir

Archive of SID

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.
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.
۲۱- مصطفایی علی، چلبی مریم. اکتیندین میوه کیوی: خالص سازی و بررسی مقدار آن در واریته های داخلی. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، سال ۱۳۸۵، شماره۳، صفحات: ۲۲۳-۲۳۰.
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.

www.SID.ir

Archive of SID

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.
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.

www.SID.ir