مقاله تحقیقاتی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران
سال چهارم ● شماره ۳ ● صفحات ۸۷۷ تا ۸۸۱ ● پاییز ۱۳۸۵

ترمیم بافت اپی تلیال پوست خرگوش از طریق کشت سلول در محیط آزمایشگاه

*دکتر احمد ذاکری‌فر[۱]، لعیا قهاری[۲]

چکیده

سابقه و هدف: از آنجا که پوست یکی از ارگانهای حیاتی و مهم بدن بشمار می‌رود حفظ آن از جهات بسیاری حائز اهمیت است. از طرفی این بافت در تماس دائم با محیط خارج بوده و آسیب‌های محیطی بسیار سریع بر آن تاثیر خواهند گذاشت. با استفاده از تکنیکهای مختلف جراحی از جمله expansion mesh graft وسعت ناحیه دهنده را حداکثر تا ۹ برابر میتوان افزایش داد و در بسیاری از موارد این مقدار کافی نیست، مثلاً در سوختگیهای بیش از ۴۰٪ و بنابراین میبایست در این مورد فکری اساسی اندیشید. از آنجاییکه موفقیت در این پیوندها و ترمیم بافت برای بیماران سوختگی اهمیت ویژه‌ای دارد و ارگانهای نظامی و مسلح چه در زمان صلح و چه در شرایط جنگ بیشتر در معرض این مشکل قرار میگیرند، بر آن شدیم تا ترمیم بافت را از طریق کشت سلول در محیط آزمایشگاه انجام داده و از عوارض سوختگیها که در طب نظامی اولویت ویژه‌ای دارد بکاهیم.

مواد و روشها: این مطالعه از نوع تجربی می‌باشد. به منظور انجام این مطالعه از ۴ راس خرگوش آلبینو که از انستیتو پاستور خریداری گردید استفاده شد. از یکی از خرگوشها پوستی به ابعاد ۶×۶ سانتی متر مربع برداشته و به عنوان نسج حمایتی استفاده شد، سپس در ظرف حاوی محیط کشت Minimal Essential Medium (MEM) و Fetal Calf Serum(FCS) قرار داده شد. از خرگوش دوم پوستی به ابعاد ۱×۲ سانتی متر مربع جدا نموده، آنرا به قطعات ریز تقسیم کرده و سپس بر روی درم نسج حمایتی قرار داده و پس از آماده شدن به خرگوش دوم پیوند زدیم. پس از گذشت ۴ هفته حیوان کشته و ناحیه ترمیم شده جدا گردیده و تحت مطالعات بافت شناسی با دو نوع رنگ آمیزی قرار گرفت.

یافته‌ها: در مطالعه بافت شناسی، اپیدرم ناحیه ترمیم شده کاملاً طبیعی بوده اما لایه شاخی آن نازکتر از پوست نرمال بود. غده عرق مشاهده نگردید. ترمیم از کناره‌های زخم شروع گشته و به مرکز گسترش یافته بود. برجستگیهای انگشتی شکل کوتاهتر از نرمال بوده، کلاژنهای ناحیه درم منظم تر از پوست نرمال بود. همچنین عروق درم وسیعتر و گشادتر گشته بود.

نتیجه‌گیری: با این روش میتوان وسعت ناحیه دهنده را تا ۱۸ برابر اولیه افزایش داده و پوستی نرمال در ناحیه ترمیم شده و در حداقل زمان ممکن بدست آورد.

کلمات کلیدی: اتولوگ، پوست، خرگوش، گرافت، کشت

مقدمه

بافت اپی تلیال پوست به عنوان یک سد مهم و حیاتی برای بدن در مقابل محیط خارجی میباشد که تخریب این سد میتواند موجب از دست رفتن آب و الکترولیت‌های بدن و اختلالات متابولیک گردد(۱). جانشین نمودن پوست از دست رفته یکی از مسائل مهم جراحی پلاستیک و ترمیمی میباشد و پیوند پوست از نظر تاریخی سابقه‌ای طولانی دارد. اولین روش کشت و پیوند پوست در سال ۱۹۷۴ توسط Freeman (۲) پایه‌گذاری شد و توانست قسمتی از

۱ـ استادیار، دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران، دانشکده پزشکی، گروه آسیب شناسی، مرکز آموزشی ـ درمانی ۵۰۱ (* نویسنده مسئول)
تلفن: ۸۸۰۲۸۳۵۱ -۰۲۱ (داخلی ۶۲۸) آدرس الکترونیک: Drzakerifar@yahoo.com
۲ـ مربی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران، دانشکده پزشکی، گروه بافت شناسی

www.SID.ir

پوست خرگوش را بر روی ساپورت خوک کشت داده و تا ۵۰ برابر ناحیه دهنده را افزایش دهد (۲). بتدریج محققین موفق شدند با استفاده از تریپسین اپی درم را از درم جدا نموده و سلولهای اپی درم را در محیط کشت با مواد غذایی کافی رشد و تکثیر داده و بعد از ۳ تا ۴ هفته سلولهای آماده گرافت تهیه نمایند و آنرا پیوند بزنند(۳). آزمایشات اتوگرافت‌های حاصل از سلولهای اپی تلیال کشت داده شده در سال ۱۹۸۱ توسط Oconnor (۴) و همکارانش به اوج خود رسید. آنها ۳ -۲ سانتی متر از پوست ناحیه سالم را برداشته و بعد از کشت در محیط مغذی، وسعتی به ابعاد ۱۰۰۰ برابر اپی تلیوم اولیه در مدت زمان ۳ هفته بدست آوردند و این روش را برای بیماران با سوختگی‌های ۴۰-۹۵ درصد بکار بردند(۲ و ۴). Woodly (۵) تحقیقی انجام داد که براساس آن ۴ بیمار با کشت اتوگرافت تحت درمان قرار گرفت. او بعد از ۱۰ روز مشاهده نمود که کلاژنهای نوع ۴ و ۷ در ناحیه اپی تلیوم رشد کرده است و تمامی بیماران از لحاظ کلینیکی پوستی نرم را گزارش دادند. 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 نرمال بوده است (۶). از آنجاییکه موفقیت در این پیوندهاو ترمیم بافت برای بیماران سوختگی اهمیت ویژه‌ای دارد و ارگانهای نظامی و مسلح چه در زمان صلح و چه در شرایط جنگ بیشتر در معرض این مشکل قرار میگیرند، بر آن شدیم تا ترمیم بافت را از طریق کشت سلول در محیط آزمایشگاه انجام داده و از عوارض سوختگیها که در طب نظامی اولویت ویژه‌ای دارد بکاهیم.

مواد و روشها

در این تحقیق تجربی از ۴ راس خرگوش نر، نژاد آلبینو (Albino)، با سن متوسط ۴ ماه و وزن متوسط ۱/۵ کیلوگرم استفاده شد که از انستیتو پاستور خریداری گردید.

خرگوشها در قفس‌های مجزا و مخصوص به مدت یک هفته نگهداری شده و در این مدت آب و غذا بطور آزاد در اختیار آنها بوده است و پس از سپری شدن زمان مورد نظر و تطابق با محیط جدید، مورد آزمایش قرار گرفتند.

ابتدا پس از بیهوش نمودن خرگوش با داروی نسدونال (با دوز ۰/۱ میلی لیتر در هر کیلوگرم)، موهای ناحیه خارجی شکم ضدعفونی و تراشیده گردید و پوست به ابعاد ۶×۶ سانتی متر مربع با ضخامت کامل (Full thickness) برداشته شد.

بافت در محلول Solution (P. B. S) Phosphate Buffer قرار گرفت و در زیر هود با محیط MEM بدون سرم ۳ بار شستشو گردید و سپس در محیط کشت MEM که به آن ۱۰ ٪ Fetal Calf Serum، پنی‌سیلین G ۲۰۰ u/ml، استرپتومایسین ۲۰۰ mg/ml و تریپتوز فسفات ۱۰٪ اضافه شده بود، قرار گرفت.

طرز قرار گرفتن بافت (ساپورت) در ظرف شیشه‌ای بگونه‌ای بود که اپی درم در کف ظرف و درم به سمت بالا قرار گرفت. سپس ساپورت در انکوباتور با درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد و دی اکسید کربن ۵٪ و رطوبت مناسب قرار گرفت.

بعد از ۳ روز از خرگوش دیگر (بصورت اتولوگ) پوستی به ابعاد ۱×۲ سانتی متر مربع در محیط استریل برداشته شد و در زیر هود با اسکالپل به قطعات ریز تقسیم و بصورت تصادفی بر روی درم ساپورت پخش گردید.

در ابتدا محیط کشت هر روز و سپس یک روز در میان تعویض گشت. بعد ازگذشت ۲ الی ۳ روز قطعات اتولوگ بر روی درم ساپورت چسبیده و شروع به تکثیر سلولی نمودند بطوریکه بعد از ۷ روز سطح بیشتری را در بر گرفت. روز هفتم پوست جدیدی از خرگوش دوم که بافت اتولوگ متعلق به آن بود در ابعاد ۶×۶ سانتی متر مربع از سمت مقابل ناحیه برداشته شده قبلی ۲×۱ سانتی متر مربع بصورت ضخیم جدا نموده و بافت اتولوگ ـ ساپورت آماده شده در آن ناحیه قرارداده شد. طرز قرار گیری بگونه‌ای بود که نسج حمایتی در معرض خارج قرار گرفت. با استفاده از نخ بخیه ۰-۳ ابریشمی ناحیه بخیه گردید و سطح آن با استفاده از درمان استاندارد پانسمان گشت.

در پایان هفته چهارم ناحیه پیوند شده را بطور کامل جدا نموده و به قطعات ریز تقسیم کرده و در فرمالین ۱۰ ٪ جهت ثبوت و تهیه مراحل بافتی قرار دادیم.

در بررسی نمونه‌ها از دو رنگ آمیزی هماتوکسیلین ـ ائوزین (معمولی) و تری کروم ماسون (رنگ آمیزی اختصاصی رشته‌های بافت همبند) استفاده شد.

Archive of SID
www.SID.ir

یافته‌ها

نتایج ماکروسکوپی

در بافت ساپورت تغییر رنگ و تیره شدن آن از اوایل هفته دوم شروع شد و بافت از کناره‌های زخم دفع گردید. در هنگام دفع ساپورت، یک پوست نازک صورتی رنگ از کناره‌های آن رویت می‌شد. بعد از سپری شدن ۴ هفته فقط قسمت مرکزی پیوند فوق به پوست زیرین چسبندگی داشت ولی مابقی دفع شده بود.

نتایج میکروسکوپی

اپیدرم در ناحیه ترمیم شده، بلوغ طبیعی خود را طی نموده است و تمامی لایه‌ها تشکیل شده است اما تراکم سلولی لایه خاردار نسبت به نرمال کمتر بوده است. میزان شاخی شدن لایه سطحی در پوست پیوندی بسیار نازکتر از پوست طبیعی است (شکل ۱). بافت ساپورت در ناحیه مرکزبه پوست زیرین چسبیده است و بتدریج با اسیدوفیلی و نکروزه شدن، از بافت زیرین جداشده و شروع به دفع شدن می‌نماید و اپی درم از کناره‌ها تشکیل میگردد (شکل ۲).

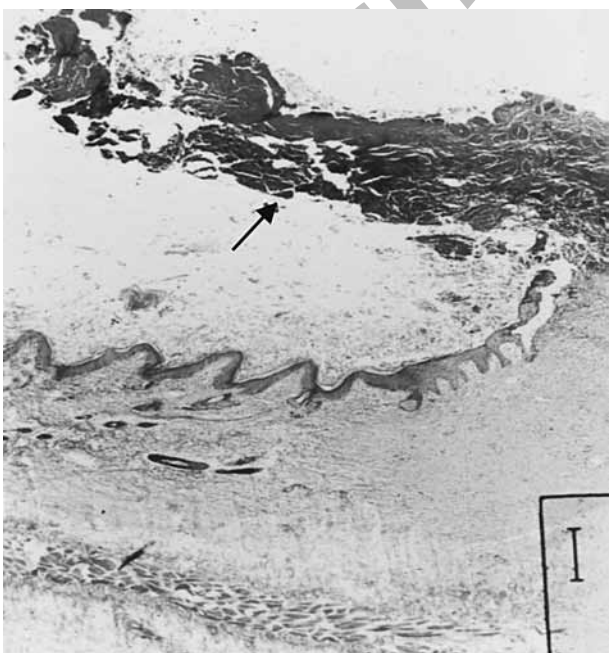
تعداد ستیغهای اپیدرمال با نزدیک شدن به ناحیه ترمیم شده، کمتر گشت(شکل ۳). میزان عروق خونی، دردرم ناحیه گرافت شده فراوان ولیکن بیشتر عروق دیواره‌های نازکی داشتند. در اطراف عروق تراکم سلولی ادوانتیس زیاد دیده میشود (شکل ۴). در رنگ آمیزی‌تری کروم ماسون، تراکم رشته‌های کلاژن در درم ناحیه گرافت شده کمتر از طبیعی بود.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر این مسئله میباشد که در مدت زمان کوتاهی میتوان از طریق کشت سلول در محیط آزمایشگاه، ناحیه اندکی از پوست را تکثیر نموده و آنرا پیوند زده و پوستی نرمال در مقیاس وسیع بدست آورد. دفع بافت ساپورتی که از اوایل هفته دوم در این تحقیق دیده شد، بعلت رشد سریع ترمیمی لایه اپی تلیال از کناره‌های زخم و جوانه زدن به داخل زخم میباشد(۵).

درزمان دفع بافت ساپورت در روی سطح زخم پوست نازک صورتی رنگ مشاهده گشت که بدلیل وجود بافت گرانولاسیون بوده است و کمبود ملانوسیتهای آن موجب روشن شدن بافت گردید. با توجه به تحقیقات Duluca (۷) بعد از ۳-۱۶ هفته میزان ملانوسیتها تقریبا 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 اپیدرم تشکیل شده اما تراکم سلولی آن نسبت به پوست نرمال کمتر بوده 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 کمتراست (۷ و۸).

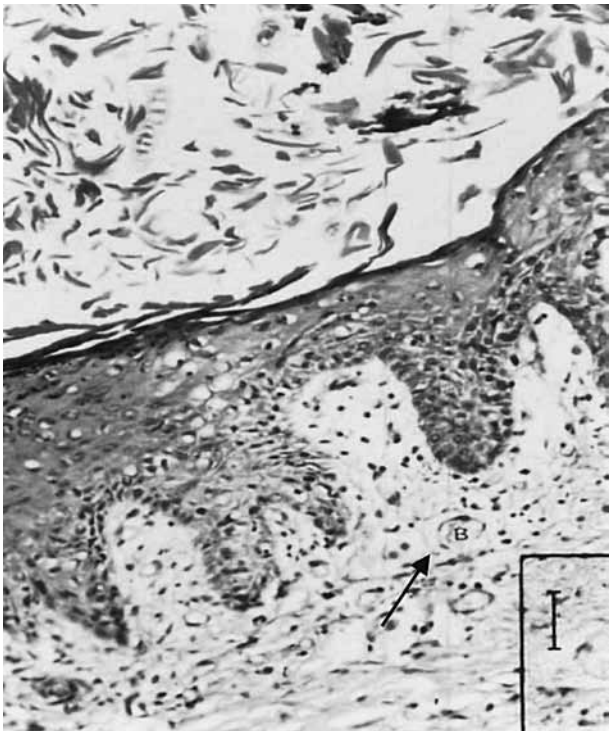
شکل ۱- علامت ← اپیدرم درحال جوانه زدن را با رنگ آمیزی هماتوکسیلین وائوزین(بزرگنمایی ۲۵) نشان میدهد.



شکل۲- علامت ← ساپورت دفع شده را با رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (بزرگنمایی ۲۵) نشان میدهد.

Archive of SID
www.SID.ir

شکل۳- علامت ← برجستگی انگشتی درحال تشکیل رادرپوست گرافت شده بارنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین(بزرگنمایی ۲۰۰) نشان میدهد.



شکل۴- علامت ← عروق جوانه‌ای را در پوست گرافت شده با رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین(بزرگنمایی ۲۰۰) نشان میدهد.

در ظرف مدت ۴ هفته میزان لایه شاخی سطحی کمتر از نرمال میباشد. تعداد برجستگیهای انگشتی کمتر و عمق فرو رفتگی آنها بداخل درم کاهش یافته اما سلولهای با سیتوپلاسم روشن هم در لایه بازال و هم در لایه خاری دیده میشود و با توجه به تحقیقات Comoton کامل شدن Rete Ridge حدود ۲۱ هفته زمان لازم دارد(۵و۹).

مطالعات Oconnor نشان داد که ترمیم اپیدرم سریع و درم کند است اما ساختمانهای بین آنها رشد حد واسطی دارند. با توجه به تحقیقات Compton (۷) ایجاد نظم خاص در اپیدرم با تمام لایه‌های تمایز شده طبیعی به حدود یک هفته زمان نیاز میباشداز طرفی Yannas (۸) مشخص نمود حدود ۴-۳ هفته زمان لازم است تا درمیس ترمیم کلی یابد. در 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 موو‌غده عرق نیاز به زمان طولانی تری دارند. در ناحیه پاپیلر درم گرافت شده میزان عروق خونی بسیار زیاد گشت و بیشتر عروق گشاد بوده و دیواره آن نازک میباشد که احتمالا بعلت تازه تشکیل بودن این عروق میباشد(۳، ۸ و۱۰). تحقیقات نشان داد که بازسازی کامل عروق و ترمیم کامل رشته‌های الاستیک به حدود ۵-۴ سال زمان نیاز است.

با رنگ آمیزی اختصاصی تری کروم ماسون در لایه درم ناحیه گرافت شده، میزان رشته‌های کلاژن کاهش یافته و رشته‌ها بصورت موازی با اپیدرم قرار گرفته اند و دو لایه درم قابل تمایز از یکدیگر نیستند. در صورتیکه رشته‌های کلاژن بافت طبیعی به صورت Woven می‌باشند. تحقیقات جدید نشان میدهد که زمان لازم برای تمایز درم به دو لایه ودرهم شدن کلاژنهای آن در حدود ۴-۳ سال می‌باشد(۷ و ۹).

با توجه به اهمیت پوست و بازسازی مناطق وسیع در سوختگیها پیشنهاد میگردد که تحقیقات گسترده‌تری برای یافتن روشهای جدید تر در مدت زمان کمتر بدست آورد.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1- Fawcet & Bloom, A Text Book of Histology, W. P. Saunders Company, Philadelphia, 2004.

2- Igel H, Freeman A. A new method for covering large surface area wound with autografts. Arch surgery 1974; 106:724-729.

3- Petersen M. Characterizatio of cellular elements in healed cultured keratinocyte autgrafts used to cover burn wound. Arch Dermatology 1990; 126: 175-179.

4- Oconnor N. Grafting of burner with cultured epithelium prepared autologus epidermal cell. Lancet 1981; June: 75-76.

5- Limove M, Grekin R. Synthetic membranes and cultured keratinocyte grafts. Am Acad Dermatol 1990; 23(4): 713-718.

6- Paparo lesson. Text atlas of histology, 4 Th edi, churchil Livingstone, 2005.

7- Compton C, Grill J. Skin regenerated from cultured epithelial autografts on full thickness burn wound from 6 days to 5 years after grafting. Lab Invest 1989; 60(5): 600-612.

8- Suzuki S, Matsuda K. Clinical evaluation of a new bilayer artificial skin collagen sponge and silicon layer. Br J Plastic Surg1990; 43(1): 47-53.

9- Green H. Editorial regeneration of the skin after grafting of epidermal culture. J. Lab Invest 1989; 60(5): 583-584.

10- Teepe R. Improved grafting method for treatment of burns with autologus cultured human epithelium. Lancet 1989; 15: 385.

11- Ghazizadeh S, Taichman LB. Multiple classes of stem cells in cutaneous epithelium: a lineage analysis of adult mouse skin. Embo J 2001; 20(6): 1215-1222.

12- Cepko CL, Ryder E, Austin C, Golden J, Fields-Berry S, Lin J. Lineage analysis using retroviral vectors. Methods 1998; 14(4):393-406.

13- Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. Cell 2000; 100: 143-155.

14- Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. Cell 1997; 88:287-298.

15- Slack JMW. Stem cells in epithelial tissues. Science 2000; 287:1431-1433.

Archive of SID

www.SID.ir

Reapair and Remodeling of Epithelial Tissue with Cell Culture in Vitro

*Zakerifar A; MD[1], Ghahari L; MSc[2]

Abstract

Background: Epithelial is an important tissue in our body. The human epithelium forms a barrier between the external and internal environment.

Materials and methods: This study was a Lab-Experimental. We were used 4 male albino rabbits in this study. At first, 6×6 cm^2 full thickness skin separated of rabbit and cultured in DMEM and FCS 10%. Then 2×1 cm^2 skin separated of other rabbit and cut into small pieces and transplanted on the first skin's derm. After 2 weeks, small pieces covered the entire feeder layer and then new skin grafted on the donor rabbits and supported for 2 weeks. Then after, histological studies were done.

Results: Histological studies were shown epidermal layer were normal but the number of layers were lower than normal skin. Other findings were thin cornified layer, low skin appendages, absent of sweat gland, regular of collagen fiber in dermal layer and small rete ridge.

Conclusions: With this method of cell culture, skin can expand 18 times and a normal skin was obtained.

Keyword: Cell culture, Keratinocyte, Rabbit, Skin

Archive of SID

1- (*Corresponding author) Assistant Professor, Army University of Medical Sciences, Faculty of Medicine, Department of Pathology, 501 Medical Center. Tel: 021- 88028351-4, E-mail: Drzakerifar@yahoo.com

2- Instructor, Army University of Medical Sciences, Faculty of Medicine, Department of Histology

www.SID.ir