استفاده از روشهای کشت سلولی در تکثیر بافت اپیتلیوم و پیوند اتولوگ آن

دکتر علی‌محمد میرفخرایی، دانشیار جراحی پلاستیک دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر مرتضی شمشیری، استادیار بخش ویروس شناسی ، انستیتو پاستور ایران
دکتر زهرا صفایی نراقی، استادیار پاتولوژی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران
دکتر مسعود اسماعیلی ، دستیار جراحی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران

Utilization of different methods of tissue culture in proliferation of epithelial cells and autologous graft of it.

ABSTRACT

The purpose of this study was the utilization of different methods of tissue culture in proliferation of epithelial cells and autologous graft to cover surface areas without skin specifically wich is due to thermal burns more than 50% . In this experience we performed from rabbits and success to cover almost 24 times original donor site with autograft.

خلاصه

هدف از این بررسی استفاده از روشهای مختلف کشت سلولی در تکثیر بافت اپی‌تلیوم وپیوند اتولوگ آن بمنظور ترمیم نواحی بدون پوست بویژه در سوختگیهای حرارتی بیش از ۵۰٪ می‌باشد. در این بررسی از خرگوش استفاده شده وموفق به پوشش سطحی ۲۴ برابر در مقایسه با پوست دهنده اولیه شده‌ایم .

مقدمه

سوختگیهای وسیع ، فقدان مادرزادی پوست ، خال مادرزادی بزرگ، صدمات ترومائیک ممکن است نیازمند مقدار زیادی پوست برای پیوند باشند. بزرگترین مشکل محدودیت مناطق دهنده پوست جهت پوشاندن جراحات فوق می‌باشد. از آنجائی که با روشهای معمولی در جراحی ترمیمی افزایش وسعت اتوگرافت فقط بمیزان معینی مقدور است (که البته درموارد زیادی ناکافی می‌باشد) لذا پوشش مناطق بدون پوست نیازمند جانشین مناسبی است .

- روشهای پوشش مناطق بدون پوست :

الف - اتوگرافت پوست (Skin Autograft)

ب - آلوگرافت (Skin Allograft)

ج - جایگزینی توسط پوست مصنوعی (Synthetic Skin Substitute)

د - کشت بافت اپی‌تلیوم (Tissue Cultured Epithelium)

که در زیر به شرح هر یک از روشها می‌پردازیم :

الف - اتوگرافت پوست

در مواردی که وسعت جراحت زیاد نباشد پیوند اتوگرافت بهترین روش جهت پوشش زخمهای باز خواهد بود و اگر وسعت جراحت بیشتر باشد بامتخلخل کردن پیوند پوستی (Expansion Mesh Graft) می‌توان تاحداکثر ۹ برابردهنده اصلی (Original donor Site) را پوشاند[1]. بدلیل مسائل ظاهری وزیبایی روش

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ on Tuesday, October 08, 2013

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ on Tuesday, October 08, 2013

فوق معمولاً در صورت ودست وپا به کار نمی‌رود[۲]. همچنین در صورتی که وسعت جراحت زیاد باشد پوشش کامل آن با این روشها ممکن نیست وباید روشهای دیگر را بکاربرد.

ب - آلوگرافت پوست

در این روش به دو صورت هتروگرافت (بیشتر ازخوک)[۳] وهموگرافت (Cadaver)[۴] استفاده می‌گرددو پوشش فیزیولوژیکی است که بطور وسیعی جهت پوشاندن موقت در زخمهای باز استفاده می‌شود. بقاء آلوگرافت ۱۰-۳ هفته بوده وبهتر است هر ۵ روز باگرافت جدید تعویض گردد تازمانی که اتوگرافت کافی جهت پوشش آن ناحیه به دست آید. لازم به ذکر است که استفاده از ایمنوساپرسورها برای بقای طولانی‌تر آلوگرافت‌با موفقیتهایی همراه بوده است.[۵،۶]

ج - جایگزینی توسط پوست مصنوعی

اخیراً نوعی پوست مصنوعی دو لایه ساخته شده که از یک ماتریکس اسفنجی متخلخل حاوی گلیکوزامینوگلیکان وکندروایتین ۶- سولفات بعنوان درم ویک لایه بدون تخلخل سیلاستیک (Silastic) بر روی ماتریکس تشکیل شده است. بدنبال قرار دادن آن برسطح جراحت، درم (ماتریکس اسفنجی) با فیبروبلاست وعروق از بستر زخم پرشده و سیلاستیک چسبیده به آن باقی می‌ماند. سیلاستیک می‌تواند هفته‌ها یا ماهها بعد در زمان انجام پیوند اتوگرافت برداشته شود.[۷،۸]

د - کشت بافت اپی تلیوم

هنگامی که وسعت جراحات زیاد باشد با روشهای معمول جراحی ترمیمی پوشاندن جراحات با اتوگرافت ممکن نمی‌باشد لذا روشهای جدیدی ارائه شده که می‌توان پوست را در محیط آزمایشگاه تکثیر داده ومیلیونها سلول بدست آمده را در اتوگرافت بکاربرد.[۹،۱۰] برای نیل به این هدف مابه کشت سلولهای اپیتلیال بر سطح درم خرگوشی پرداختیم.

روش بررسی

۱ - پوستی به ابعاد تقریبی ۶×۶ سانتیمتر از یک خرگوش برداشته (نسج حمایتی) وآنرا در ظرفی حاوی محیط کشت MEM (Minimum Essential Medium)که به آن ۲٪ FCS(Fetal Calf Serum) اضافه شده بود قرار دادیم. بعد از سه روز پوستی به ابعاد حدود ۲×۰/۷۵ سانتیمتر از خرگوش دیگر را که به قطعات ریز تقسیم کرده بودیم (نسج اتولوگ) برسطح درم ساپورت چیدیم. بعد از حدود ۸ روز که قطعات اتولوگ بطور واضح سطح بیشتری از ساپورت را پوشانده بودند(شکل یک) پوستی به ابعاد ۶×۶ سانتیمتر از خرگوش دوم (که اتولوگ را از آن برداشته بودیم) جداکرده واتولوگ - ساپورت را در آن ناحیه پیوند زدیم بطوری‌که اپیدرم ساپورت در مجاورت محیط خارج قرار گیرد.

۲ - خرگوش دیگری را انتخاب ودوپوست با ابعاد تقریباً مساوی از آن برداشتیم (هرکدام حدود ۳/۵×۵/۵ سانتیمتر) یکی را بعد از ۴ روز به خرگوش دیگر پیوند زدیم (پیوندگرافت) وروی دیگری اتولوگی به ابعاد ۰/۷۵×۱/۷۵ سانتیمتر کشت دادیم وبعد از ۷ روز که قطعات بطور واضحی سطح بیشتری از ساپورت را پوشانده بود اتولوگ ساپورت را برخرگوشی که اتولوگ از آن برداشته بودیم پیوند زدیم.

۳- برسطح درم ساپورت خرگوشی، قطعه کوچکی از پوست انسان راکه به قطعات ریز تقسیم‌کرده بودیم قرار دادیم.

نتیجه

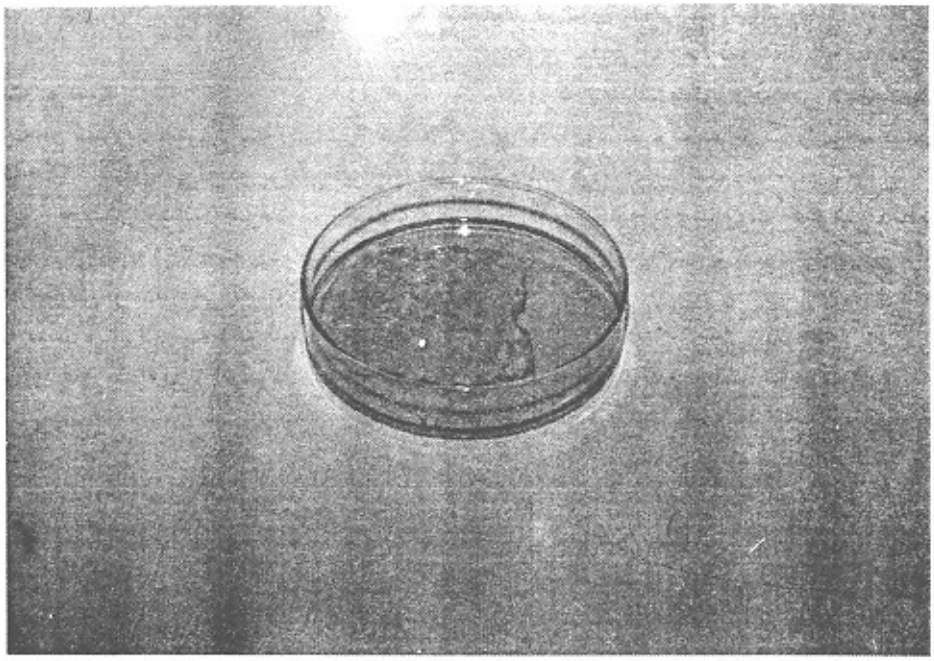
درتحقیق ۱ بتدریج نسج ساپورت از کناره‌ها شروع به نکروز و دفع شدن کرد(شکل ۲) وبعد از حدود یکماه بطور کامل دفع گردید که در زیر آن اپیتلیوم بر سطح بدن خرگوش مشهود بود که در قطع بافتی (Cross Section) از ناحیه میانی نسج حاصل، زخم بطور کامل با اپیتلیوم پوشیده شده بود که با درشت نمایی قوی اپیدرم با بلوغ طبیعی مشهود است.(شکل ۳) با این کار سطحی تقریباً ۲۴ برابر دهنده اصلی را با اتوگرافت پوشش دادیم.

درتحقیق ۲ بعداز حدود۱۵ روز که هنوز دفع کامل ساپورت اتفاق نیفتاده بود، ناحیه حاصل از هر دورا بطور کامل برداشتیم. در مقطع بافتی حاصل از آلوگرافت، در زیر آن رژنراسیون سلولهای اپیدرم بصورت یک لایه نازک وآتروفیه وفقط در کناره‌های زخم دیده می‌شد ودر قسمت میانی زخم اثری از اپیدرم مشهود نبود. اما در بررسی میکروسکوپی از اتولوگ - ساپورت، قطعات اپیدرم که افزایش طولی وپرولیفراسیون سلولی از کناره‌های خود نشان می‌دادندحتی در قسمت مرکزی زخم دیده شدند (شکل ۴).

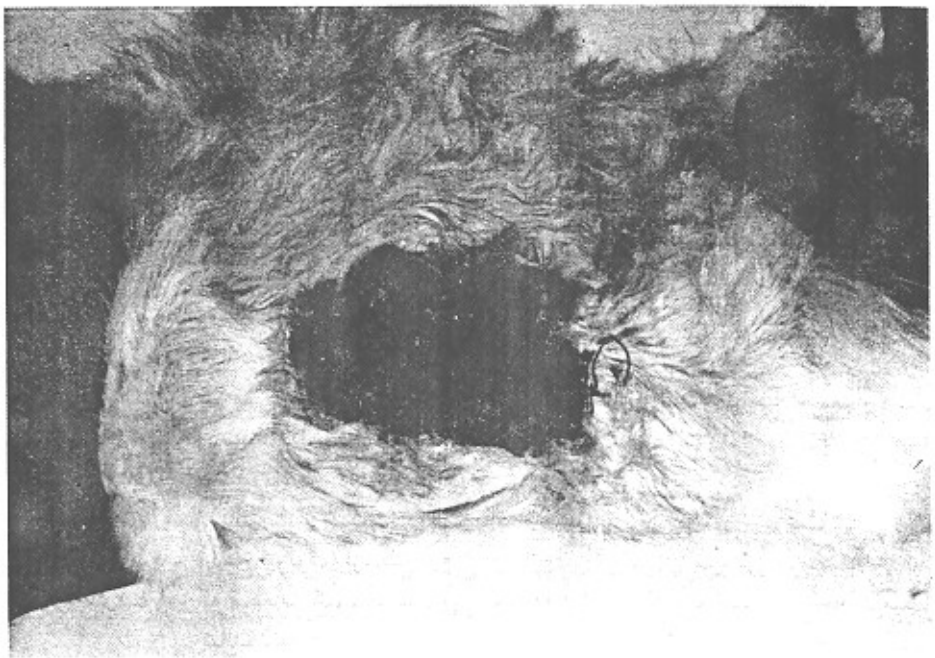
در تحقیق ۳ بتدریج قطعات انسانی در ساپورت خرگوشی نفوذ کردند بطوری که حدود ۳ روز بعد اکثر آنها بر درم ساپورت چسبیده بودند. آنگاه قطعات انسانی شروع به تکثیر سلولی نمودند که بتدریج از نظر ماکروسکوپی نیز مشهود گردید. بررسی میکروسکوپیک این قطعات انسانی در روز دهم نشانگر پرولیفراسیون شدید لایه بازال همراه با افزایش اندکس میتوتیک بود. در حال حاضر روشهای جدیدی با بهره‌گیری از تکثیر سلولهای اپیتلیال تریپسینه در محیط کشت سلولی در حال بررسی است که با استفاده از آنها می‌توان جراحات بسیار وسیعی را با اتوگرافت پوشاند(۱،۱۰،۱۱،۱۲،۱۳،۱۴،۱۵،۱۶،۱۷،۱۸،۱۹)

بحث

ازاولین گرافتهای پوستی توسط Susruta و ارزیابی بالینی بوسیله Reverdin تا به امروز، جراحان ترمیمی راهی پایدار جهت یافتن تکنیکهایی برای پوشش جراحات پیموده‌اند که تحقیق ما کوششی در این زمینه است. باید توجه داشت که گرچه روشهای جدید ارائه گردیده‌اند ولی هیچکدام راه حل کامل مسأله نبوده وبررسیهای بعدی جهت یافتن جانشین ایده‌آل برای پوست ضروری می‌باشد.

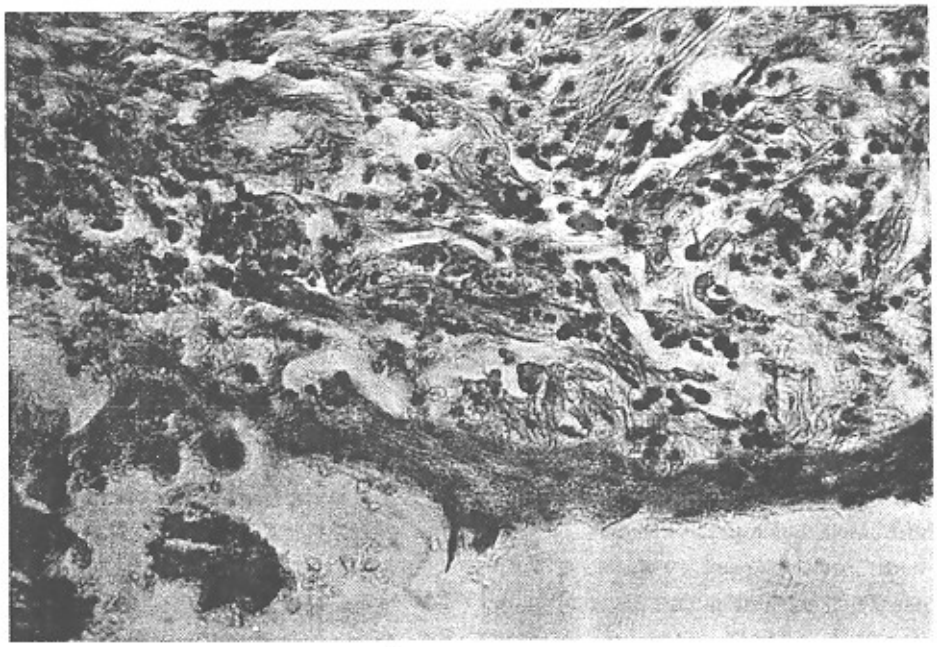


عکس یک : بعد از هشت روز از قرار دادن قطعات اتولوگ بر سطح درم ساپورت که رشد قطعات اتولوگ واضح می‌باشد.

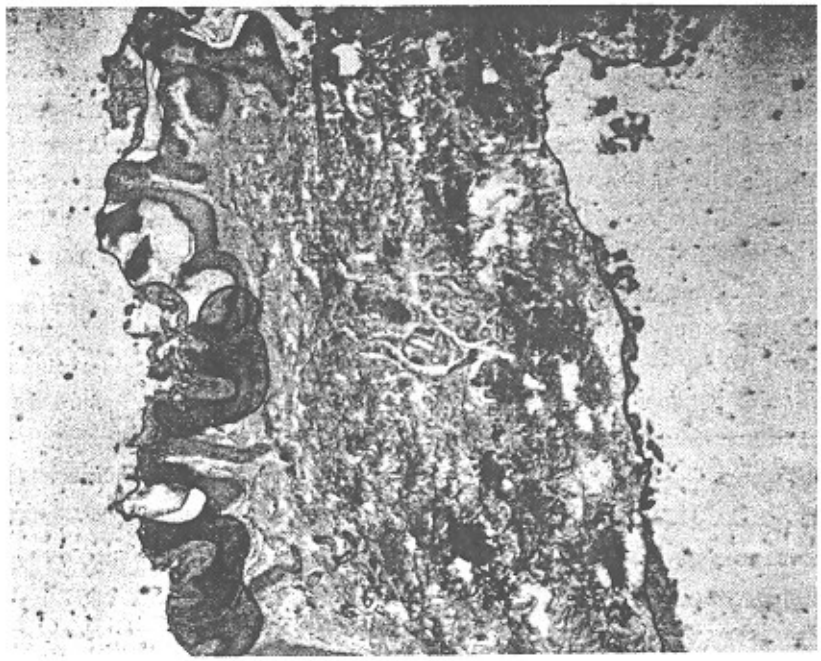


عکس دو : نسج حمایتی از کناره‌ها شروع به دفع شدن نموده است.

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ on Tuesday, October 08, 2013



عکس سه : اپیدرم با بلوغ نسبتاً کامل شامل لایه بازال، سلولهای اسکواموس و لایه گرانولر همراه با درم فیبروتیک پر عروق و بدون ضمائم.



شکل چهار : وجود ساپورت در بالا که در زیر آن سلولهای بازال تکثیر یافته با درم ادماتو مشهود است.

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ on Tuesday, October 08, 2013

مراجع

1.Gallico G.G., O'connor N.E., "Cultured epithelium as a skin substitute",clinics in Plastic Surgery, 1985 Vol.12,149-157

2.Currei P.W.,Luterman A.,"Principles of Surgery (Schwartz)" Five edition , Chapter 7, McGraw-Hill Inc., 1989 285-305.

3.Friedman E.,"A Preliminary report onpigskin grafts in oral Surgery Int. J.Oral Surgery ,1974 Vol.3, 269-272.

4.Burke J.F.,Bondoc C.C., "Primary burn excision and immediate grafting,"J.Trauma,1974 Vol.14,389.

5.Burke J.F.,May J.W.,et al,"Temporaty skin transplantation and immunosuppression for extensive burns" N. Eng. J. Med.,1974 Vol.290-269.

6.Burke J.F.,Quin W.C.,et al ,"Immunosuppression and temporary skin transplantation in the treatment of massive third degree burns",Annals Surgery, 1975 Vol.182-183 .

7.Yannas I.V.,burke J.F.,"Design of an artificial skin:I. Basic design principles .",J.Biomed . Mater.Res., 1980 Vol.14,65.

8.Yannas I.V.,Burke J.F.,et al "Design of an artificial skin:II. control of chemical composition",J.Biomed. Mater.Re. ,1988. Vol.14,107, .

9.Freeman A.E.,Igel H.J.,et al,"A new method for covering large surface area wound with autografts ,"Arch Surgery,1974 Vol.108,721-729.

10.Arons J.A., et al,"The surgical applications and implications of cultured human epidermis",J.Surgery,1992 vol.11,4-9.

11.Compton C.C.,Gill J.M.,et al ,"Skin regenerated from cultured epithelial autografts on full thickness burn wounds",laboratory investigation,1989 vol.60,600-612

12.Hancock K.,Leigh I.M.,"Cultured Keratinocytes and Keratiocyte grafts",B.M.J.,1989 vol.299 1172-1180.

13.Manchahal J,Otto W.R.,et al ,"Cultured composite skin grafts, biological skin equivalents permitting massive expansion",The Lancet ,1989, 1991-193.

14.O'Connor N.E.,Mullike J.B.,et al, "Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells",The Lancet,1981 75-77.

15.Randall T.,"cultured skin cells , artificial dermis join in race against time to cover burn wound ",JAMA ,1991 vol.265,1918-1919.

16.Teeps R.G., Ponec M,et al ,"Improved grafting method for treatment of burns with autologous cultured human epithe- lium ",The Lancet, 1986, 385.

17.The surgical applications and implication of cultured human epidermis:A comprehensive review.

18.Coveraye of full thickness burns with bilayerd skin equiva-lent:a preliminary clinical trial.

19. V.ronfard,Use of human Keratinocytes cultured on fibrin glue in the treatment of burn wounds.Burns,1991,Vol 17, No.3,18 -184

20. Boyce,s .,Michel , s.et al,Reconstructed skin from cultured human keratinocytes and fibroblasts on a collagen-glycosaminoglycan biopolymer substrate. Pharmacology . 1990, 3.136-43

21.cooper,M.L. and et al,Direct comporison of a cultured composite skin substitute containing human keratinocytes to a epidermal sheet agraft containing human kerationeytes on athymic mice. Journal of investigative dermatology, 1993 101,811-19

22.cooper,M.L.,hansbrough,J.F.,Use of composite skin graft composed of cultured human keratiocytes and fibroblast and a collagen-GAG matricx to cover full-thickness wounds on athymic mice. surgery ,1991,109,198-207

23. hansbrough,J.F.,et alclinical trials of a libing dermal tissue replacement placed beneath meshed split - thickness skin graft on excised burn wounds. journal of burn care rehabilitation,1992,13.519-29

24. Johnson, E.W., et al.serial cultiration of normal human keratiocytes:a defined system for studying the regulation of growth and differentiation. In vitro cell development biology ,1992 28A,429-35

25. Leigh, J.M., et al Skin equivalents and cultured skin.:From the petridish to the patient. 1991,wound 5,4,141-8

Downloaded from http://journals.tums.ac.ir/ on Tuesday, October 08, 2013