

استفاده از روشهای کشت سلولی در تکثیر بافت اپیتلیوم

و پیوند اتولوگ آن

دکتر علی محمد 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 which 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 و پیوند اتولوگ آن بمنظور ترمیم نواحی بدون پوست بویژه در سوختگیهای حرارتی بیش از ۵۰٪ می باشد. در این بررسی از خرگوش استفاده شده و موفق به پوشش سطحی ۲۴ برابر در مقایسه با پوست دهنده اولیه شده ایم.

مقدمه

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

الف - اتوگرافت پوست

در مواردی که وسعت جراحی زیاد نباشد پیوند اتوگرافت بهترین روش جهت پوشش زخمهای باز خواهد بود و اگر وسعت جراحی بیشتر باشد بامتخلخل کردن پیوند پوستی (Expansion Mesh Graft) می توان تا حد اکثر ۹ برابر دهنده اصلی (Original donor Site) را پوشاند^(۱). بدلیل مسائل ظاهری و زیبایی روش

- 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 می پردازیم :

۲- خرگوش دیگری را انتخاب و دو پوست با ابعاد تقریباً مساوی از آن برداشتیم (هر کدام حدود $3/5 \times 5/5$ سانتیمتر) یکی را بعد از ۴ روز به خرگوش دیگر پیوند زدیم (پیوندگرافت) و روی دیگری اتولوگی به ابعاد $1/75 \times 1/75$ سانتیمتر کشت دادیم و بعد از ۷ روز که قطعات بطور واضحی سطح بیشتری از ساپورت را پوشانده بود اتولوگ ساپورت را بر خرگوشی که اتولوگ از آن برداشته بودیم پیوند زدیم.

۳- بر سطح درم ساپورت خرگوشی، قطعه کوچکی از پوست انسان را که به قطعات ریز تقسیم کرده بودیم قرار دادیم.

نتیجه

در تحقیق ۱ بتدریج نسج ساپورت از کناره‌ها شروع به نکرز و دفع شدن کرد (شکل ۲) و بعد 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.

در تحقیق ۲ بعد از حدود ۱۵ روز که هنوز دفع کامل ساپورت اتفاق نیفتاده بود، ناحیه حاصل از هر دورا بطور کامل برداشتیم. در مقطع بافتی حاصل از اتوگرافت، در زیر آن رژیوراسیون سلولهای اپیدرم بصورت یک لایه نازک و آتروفیه و فقط در کناره‌های زخم دیده می‌شد و در قسمت میانی زخم اثری از اپیدرم مشهود نبود. اما در بررسی میکروسکوپی از اتولوگ - ساپورت، قطعات اپیدرم که افزایش طولی و پرولیفراسیون سلولی از کناره‌های خود نشان می‌دادند حتی 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 میکروسکوپی 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

از اولین 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 مسئله نبوده و بر رسیهای بعدی جهت یافتن جانشین ایده‌آل برای پوست ضروری می‌باشد.

فوق معمولاً در صورت و دست و پا به کار نمی‌رود^(۱). همچنین در صورتی که وسعت جراحت زیاد باشد پوشش کامل آن با این روشها ممکن نیست و باید روشهای دیگر را بکاربرد.

ب - اتوگرافت پوست

در این روش به دو صورت هتروگرافت (بیشتر از خود)^(۲) و هموگرافت (Cadaver)^(۳) استفاده می‌گردد و پوشش فیزیولوژیکی است که بطور وسیعی جهت پوشاندن موقت در زخمهای باز استفاده می‌شود. بقاء اتوگرافت ۱۰-۳ هفته بوده و بهتر است هر ۵ روز باگرافت جدید تعویض گردد تا زمانی که اتوگرافت کافی جهت پوشش آن ناحیه به دست آید. لازم به ذکر است که استفاده از ایمنوساپورسورها برای بقای طولانی تر اتوگرافت-تیا موفقیتهایی همراه بوده است.^{(۴)،(۵)}

ج - جایگزینی توسط پوست مصنوعی

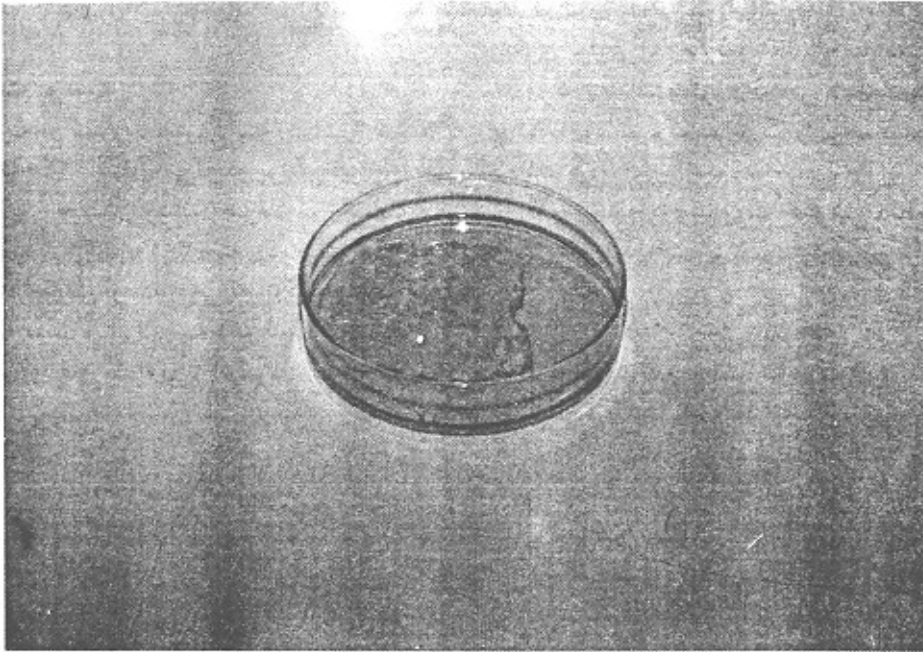
اخیراً نوعی پوست مصنوعی دو لایه ساخته شده که از یک ماتریکس اسفنجی متخلخل حاوی گلیکوزامینوگلیکان و کندروایتین ۶- سولفات بعنوان درم و یک لایه بدون تخلخل سیلاستیک (Silastic) بر روی ماتریکس تشکیل شده است. بدنبال قرار دادن آن بر سطح جراحت، درم (ماتریکس اسفنجی) با فیبروبلاست و عروق از بستر زخم پر شده و سیلاستیک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

د - کشت بافت اپی تلیوم

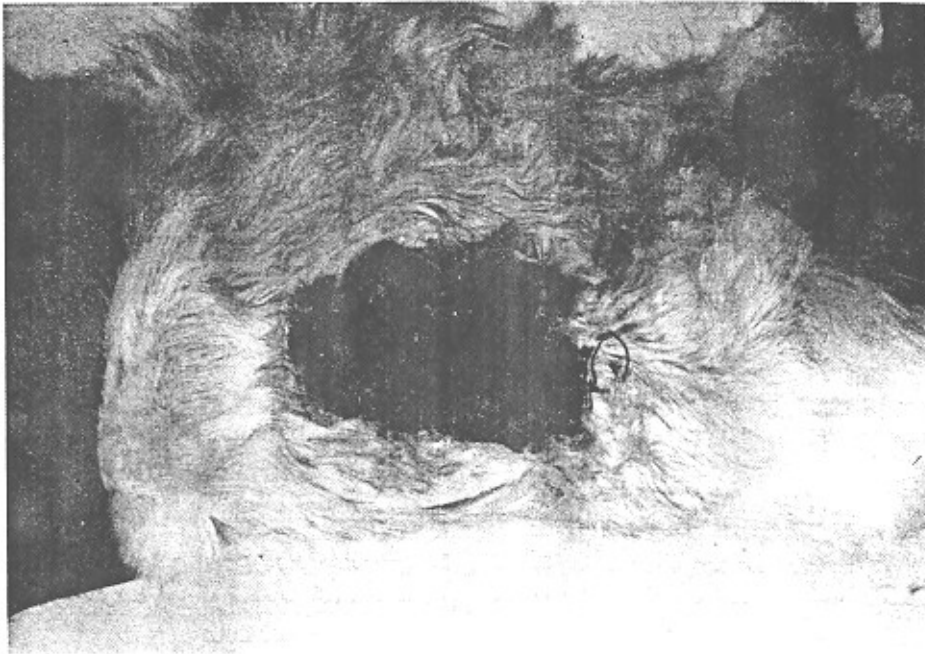
هنگامی که وسعت جراحات زیاد باشد با روشهای معمول جراحی ترمیمی پوشاندن جراحات با اتوگرافت ممکن نمی‌باشد لذا روشهای جدیدی ارائه شده که می‌توان پوست را در محیط آزمایشگاه تکثیر داده و میلیونها سلول بدست آمده را در اتوگرافت بکاربرد.^{(۸)،(۹)} برای نیل به این هدف مابہ کشت سلولهای اپیتلیال بر سطح درم خرگوشی پرداختیم.

روش بررسی

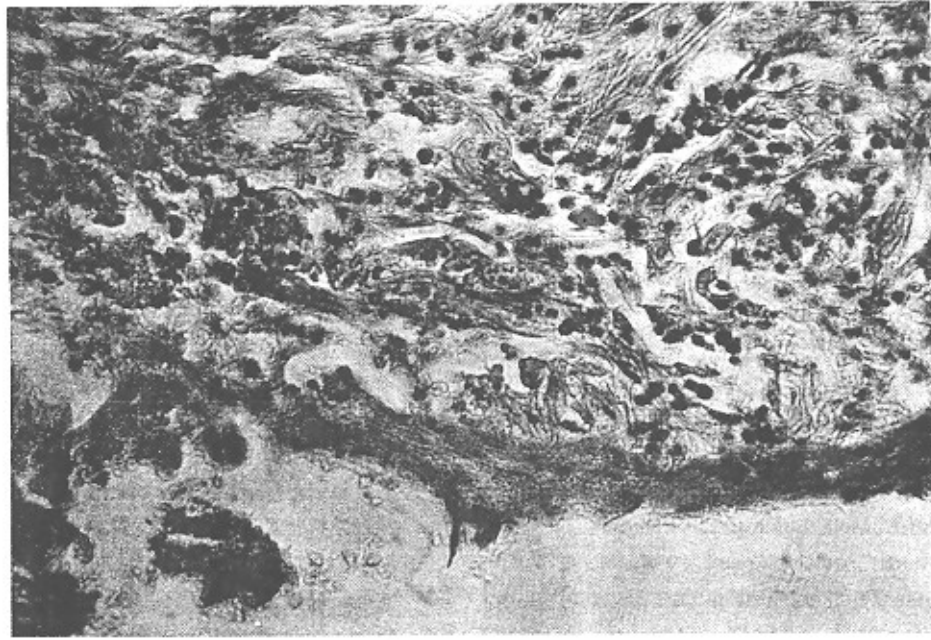
۱- پوستی به ابعاد تقریبی 6×6 سانتیمتر از یک خرگوش برداشته (نسج حمایتی) و آنرا در ظرفی حاوی محیط کشت MEM (Minimum Essential Medium) که به آن $2\% FCS$ (Fetal Calf Serum) اضافه شده بود قرار دادیم. بعد از سه روز پوستی به ابعاد حدود $2 \times 0/75$ سانتیمتر از خرگوش دیگر را که به قطعات ریز تقسیم کرده بودیم (نسج اتولوگ) بر سطح 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 6×6 سانتیمتر از خرگوش دوم (که اتولوگ را از آن برداشته بودیم) جدا کرده و اتولوگ - ساپورت را در آن ناحیه پیوند زدیم بطوری که اپیدرم ساپورت در مجاورت محیط خارج قرار گیرد.



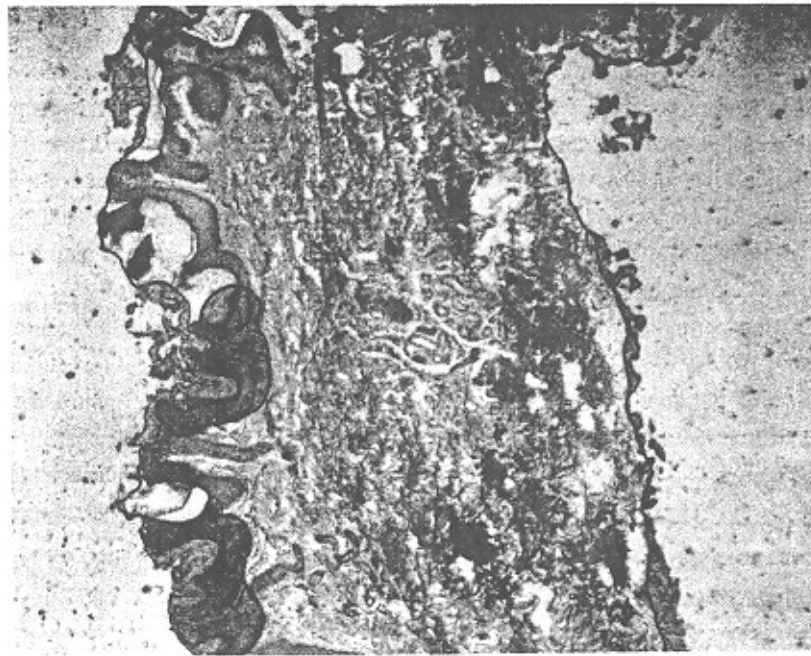
عکس یک: بعد از هشت روز از قرار دادن قطعات اتولوگ بر سطح درم ساپورت که رشد قطعات اتولوگ واضح می باشد.



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



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



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

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., Luterma A., "Principles of Surgery (Schwartz)" Five edition , Chapter 7, McGraw-Hill Inc., 1989 285-305.
3. Friedman E., "A Preliminary report on pigskin 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 bilayered skin equivalent: 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 matrix to cover full-thickness wounds on athymic mice. *surgery* , 1991, 109, 198-207
23. hansbrough, J.F., et al clinical 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 cultivation 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