

جداسازی و کشت آزمایشگاهی سلول‌های کراتینوسایت پوست انسان و تهیه ورقه اپیدرمی

دکتر جبرانیل موفق^۱، دکتر محمود رضا جعفری^۲، دکتر محمد حسن آموزگار^۳، دکتر عباس طباطبایی^۴

۱- مریبی، ۲- دانشیار گروه فارماکوسیوبیوتیکس، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و مرکز تحقیقات علوم دارویی،
۳- استادیار، گروه جراحی پلاستیک و ترمیمی، ۴- دانشیار، گروه آسیب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

ژمینه و هدف: کراتینوسایت‌های انسانی در شرایط آزمایشگاهی به روشهای مختلف کشت داده شده و با استفاده از نمونه کوچکی از پوست، سطح وسیعی از ورقه اپیدرمی تولید می‌شود که به عنوان گرافت برای معالجه اپیدرم آسیب دیده، به خصوص در سوختگی، موارد مصرف دارد. هدف از این مطالعه جداسازی و کشت آزمایشگاهی سلول‌های کراتینوسایت پوست انسان و تهیه ورقه اپیدرمی بدون استفاده از لایه غذیه کننده مشکل از فیبروپلاست‌های 3T3 موش بود.

روش اجرا: نمونه کوچکی از پوست انسان با ضخامت نسبی، به قطعات کوچک تقسیم نموده و با استفاده از روش تریپسین گرم اپیدرم از درم جدا شد. سپس کراتینوسایت‌ها از اپیدرم جدا و در محیط کشت DMEM- حاوی سرم و مکمل‌های مختلف از جمله کلراتون‌کسین و فاکتور رشد اپیدرمی - با دانسیته بالا کشت داده شدند. ورقه اپیدرمی یکپارچه‌ی حاصله، با استفاده از آنزیم دیسپارز گردید II جدا و بر گاز واژلینه منتقل شد. هم چنین ورقه اپیدرمی از نظر بافت‌شناسی مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: کراتینوسایت‌ها به صورت کلی‌های متعدد رشد و گسترش یافتدند و ورقه اپیدرمی یکپارچه نازک و مشکل از چند لایه سلول ایجاد کردند. با گذشت زمان، لایه‌های سلول افزایش یافته و ورقه اپیدرمی ضخیم‌تر شد. در مواردی که رشد و گسترش کراتینوسایت‌ها ناچیز بود یا از دانسیته پایین سلول در کشت استفاده شد، فیبروپلاست‌ها نیز که در سوسپانسیون اولیه سلولی وجود داشتند، رشد کردند. در بررسی بافت‌شناسی، ورقه اپیدرمی حاصله، سلول‌های زاید در لایه بازار و سلول‌هایی با تمایز نسبی در لایه سوپرا بازار و نیز ملانوسیت‌ها دیده شد. ورقه اپیدرمی پس از جداسازی آن به وسیله دیسپارز منقبض شد و ابعاد آن کاهش یافت.

نتیجه گیری: اتوگرافت‌های اپیدرمی کشت شده موارد مصرف بالینی و پژوهشی گسترده‌ای دارند. برای تهیه ورقه اپیدرمی ضخیم‌تر و مشکل از لایه‌های سلولی بیشتر، بدتر است دو تا سه هفته پس از کشت، اقدام به جداسازی آن به وسیله دیسپارز کرد.

وازگان کلیدی: کراتینوسایت، کشت سلولی، سوختگی، فیبروپلاست

وصولی مقاله: ۱۴/۵/۲۲ پ-برش: ۸۵/۷/۷ فصلنامه بیماری‌های پوست: ۱۳۹۵ دوره ۹ (۱): ۲-۱۶

مقدمه
چنین می‌توان از این سلول‌های کشت شده از طریق

مهندسی بافت (Tissue engineering) برای بازسازی بافت مطبق و تمایز یافته انسانی استفاده کرد(۱). قلمرو

اپیدرم یکی از چند بافت محدودی است که امکان کشت سلول اصلی آن یعنی کراتینوسایت وجود دارد. هم

مؤلف مسؤول: دکتر محمود رضا جعفری - مشهد، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی مشهد صندوق پستی: ۹۱۷۷۵-۱۳۹۵

پست الکترونیک: mr_jaafari@yahoo.com

می‌شوند و ورقه یک پارچه‌ای را به وجود می‌آورند. علاوه بر این می‌توان کراتینوسایت‌ها را بدون استفاده از لایه تغذیه کننده نیز کشت داد. در این روش برای پرهیز از رشد سلول‌های مزانشیمی در محیط کشت، کراتینوسایت‌ها را با تراکم بالا در محیط کشت حاوی سرم کشت می‌دهند (۲۰ و ۲۱).

افزودن بعضی از مکمل‌های بـه محیط کشت، می‌تواند رشد سلول‌ها و گسترش کلـنی‌های کراتینوسایت را افزایش دهد. اولین پیش‌رفت در روش کشت، بعد از سال ۱۹۷۵ میلادی، افزودن فاکتور رشد اپiderمی (Epidermal Growth Factor [EGF]) به محیط کشت بود. این پلی‌پیتید، سرعت رشد و گسترش کلـنی‌های را افزایش می‌دهد. هم چنان که کلـنی‌ها بزرگ‌تر می‌شوند، سرعت رشد بالاتری را در حضور EGF در مقایسه با عدم EGF نبود آن حفظ می‌کنند. سلول‌هایی که در حضور EGF رشد می‌کنند، بازدهی تشکیل کلـنی در پاسازهای متالی و نیز عمر کشت خیلی طولانی‌تری دارند. به نظر می‌رسد که EGF با آثار ازدحام سلول‌ها در مرکز کلـنی‌ها- از طریق تحریک مهاجرت کراتینوسایت‌های در حال رشد به خارج از مرکز کلـنی‌ها- و نیز تمایز نهایی مقابله می‌کند و مقدار جمعیت‌های کلونژنیک و تقسیم شونده را با مکانیسمی متفاوت از مکانیسم اثر کلراتوکسین، افزایش می‌دهد (۲۵-۲۶ و ۲۱).

دومین پیش‌رفت، افزودن عواملی به محیط کشت بود که cAMP سلولی را افزایش می‌دهد. مؤثرترین این عوامل کلراتوکسین است که حتی در غلظت‌های خیلی زیاد سمیتی بر سلول ندارد (۱۰). به نظر می‌رسد که کلراتوکسین از طریق افزایش سطوح cAMP با تمایل کراتینوسایت‌ها با افزایش اندازه سلولی مقابله می‌کند و به همین دلیل ممکن است با شروع تمایز نهایی نیز مقابله کند. آثار دو عامل EGF و کلراتوکسین با هم، پیش از اثر هر

پژوهش‌های صورت گرفته طی ۲۰ تا ۳۰ سال گذشته در مورد زیست شناسی پوست پستانداران رشد بسیاری داشته است (۲). برای رسیدن به این پیش‌رفت، به منظور تهیه و کشت کراتینوسایت‌ها از بافت پوست اولیه انواعی از گونه‌ها روش‌های مختلفی ابداع شده است (۲-۶).

روش‌های موجود به دو گروه عمده تقسیم می‌شوند. گروه اول، روش‌هایی هستند که در آن‌ها پوست تحت هضم آنزیمی، معمولاً با استفاده از آنزیم‌های پروتولیتیک مثل دیپساز یا تریپسین قرار می‌گیرد و کراتینوسایت‌های زنده به طور انتخابی از پوست جدا می‌شوند (۶)، سپس سلول‌های به دست آمده به صورت یک جمعیت سلولی منفرد چسیده روی پلاستیک یا روی پلاستیک به اضافه سوبسترای ماتریکس خارج سلولی کشت می‌شوند (۶-۷). هم چنین می‌توان این سلول‌ها را همراه با لایه تغذیه کننده 3T3 (Feeder layer) تهیه شده از فیبرو بلاست‌های موش کشت کرد (۹-۱۴).

گروه دوم روش‌هایی هستند که با استفاده از آن‌ها، پوست کامل را به قطعات ریز، برش و این قطعات بافت اپiderمی را کشت می‌دهند (Explant culture). گفتگی است که کراتینوسایت‌ها، از این قطعات کوچک باقی به سمت بیرون رشد می‌کنند (۱۵-۱۸).

raigحترین روش، استفاده از لایه تغذیه کننده با استفاده از فیبرو بلاست‌های 3T3 موش اشعه داده و تا حد مرگ غیرفعال با ۶۰ Gy (۶۰۰۰ rad) نوسـط اشعـه X یا منبع ^{60}Co یا مجاور شده با میتوماسین- سی است (۹-۱۸). هم چنین می‌توان از فیبرو بلاست‌های مرحله پس از میتوز در می‌انسان نیز به عنوان لایه تغذیه کننده استفاده کرد (۱۹). در این روش، کراتینوسایت‌های تهیه شده از لایه بازاـل را توأم با لایه تغذیه کننده یا روی لایه تغذیه کننده قبل‌آماده شده کشت می‌دهند. کراتینوسایت‌ها به صورت کلـنی‌های سلولی مجزا رشد می‌کنند و سرانجام به یکدیگر متصل

تراکم سلولی بالا و نیز بافت‌شناسی ورقه اپیدرمی تهیه شده بررسی قرار گرفته است.

روش اجرا

۱- محیط کشت کامل: به محیط (Dulbecco's Modified Eagles Medium, DMEM High Glucose, SIGMA) سرمه گاوی جنینی (10 V/V) (Biochrom KG)، مواد زیر اضافه شده است: سرمه گاوی جنینی ($10\text{ M}^{-1} \times 10^{-1}\text{ M}$)، آدنین (Fetal Bovin Serum-FBS) (rEGF)، فاکتور رشد اپیدرمی نوترکیب (HIMEDIA) ($1 \times 10^{-1}\text{ M}$)، کلراتوکسین (Sigma) (10 ng/lit) (BIOMOL) هیدروکورتیزون ($8/3 \times 10^{-7}\text{ M}$)، انسولین (Pharmacia and UP John N.V./S.A.) رگولاتر انسانی ($8/7 \times 10^{-7}\text{ M}$) (شرکت داروسازی اکسیر، ایران)، ترانسفرین ($6/4 \times 10^{-4}\text{ M}$) (Sigma)، پنی سیلین جی ($100\text{ }\mu\text{/ml}$) (داروسازی جابرین حیان، ایران)، استرپتومایسین ($100\text{ }\mu\text{/ml}$) (داروسازی جابرین حیان، ایران)، آمفوتربیسین - ب (Merck) ($2/5\text{ }\mu\text{/ml}$)، و Squibb)، سدیم بی کربنات ($3/7\text{ گرم}$) (Bristol-Myers) آب مقطر خالص استریل (UPW) (سرم سازی شامن، ایران) ($45-47$ و 33).

برای تهیه محیط کشت کامل مورد مصرف، حدود 90% آب مورد نیاز برای تهیه یک لیتر محیط، در یک بالن ژوژه 1000 میلی لیتری وارد شد و به تدریج محتوای یک بسته DMEM، در حال هم زدن به آن اضافه تا کاملاً حل شد. سپس مقدار $3/7\text{ گرم}$ سدیم بی کربنات نیز به آن اضافه و حل شد. pH محلول حاصله با استفاده از اسید کلریدریک 1 N یا سود 1 N به میزان $0/2-0/3$ واحد کمتر از حد مطلوب ($7/2-7/4$) تنظیم شد و در پی آن مکمل‌ها و آنتی بیوتیک‌های ذکر شده به محیط اضافه گردید و با آب مقطر به حجم، رسید. بلافاصله پس از آن محیط کامل با استفاده

کدام به تهابی است (۲۶ و ۲۴ و ۲۲). هیدروکورتیزون برای چسبندگی و حفظ رشد - مرفلولوژی کلني و تمایز کراتینوسایت‌ها وقتی که ساب کالچر می‌شوند - ضروری است (۹) و امکان دارد از زوال لایه تغذیه کننده 3T3 نیز جلوگیری کند (۲۷).

ترکیب هیدروکورتیزون، کلراتوکسین و EGF فرآکسیون کلونوژنیک، سرعت رشد جمعیت سلولی و طول عمر کشت را افزایش می‌دهد (۲۵ و ۱۱)، به طوری که حتی با یک بیوپسی کوچک پوست، می‌توان به سرعت تعداد زیادی کراتینوسایت‌های انسانی کشت شده به دست آورد. انسولین، ترانسفرین و T_3 ، نیاز به سرمه را از 20% به 10% کاهش می‌دهند به طوری که حتی با سرمه دارای کیفیت ضعیف یا متوسط، سرعت رشد به تر می‌شود (۲۸ و ۱۳ و ۱۰). پس از رشد و گسترش کلني‌ها و پرشدن سطح فلاسک کشت، می‌توان با استفاده از دیسپارز گرید II، ورقه اپیدرمی را به صورت یک ورقه سلولی یک پارچه، از کف فلاسک کشت جدا کرد. ورقه سلولی جدا شده بسته به زمان جداسازی آن مشکل از 3 تا 4 لایه سلولی یا بیشتر است. با استفاده از تکنیک مناسب کشت کراتینوسایت‌ها، می‌توان از یک نمونه کوچک پوست که از قسمت‌های سالم پوست بیمار برداشته شده باشد - طی 3 تا 4 هفته - سطح وسیعی از ورقه اپیدرمی تولید کرد (۱۰).

کراتینوسایت‌ها و ورقه‌های اپیدرمی کشت شده می‌تواند در زمینه‌های گستردۀ بالینی و پژوهشی از جمله مهندسی بافت، جراحی پلاستیک، اتیام زخم (زخم‌های عروقی پا، سوختگی)، درمان ویتیلیگو، زن درمانی، زیست‌شناسی سلول، فارماکولوژی، توکسیکولوژی و نیز تشخیص‌های بالینی روتین مورد استفاده قرار گیرد (۲۹-۴۴) و 18 و 16 .

در مطالعه حاضر، رشد کشت کراتینوسایت‌های پوست انسان، بدون استفاده از لایه تغذیه کننده و با استفاده از

شدن اپیدرم در لبه‌های آزاد، قطعات نمونه از لوله آزمایش حاوی تریپسین خارج شد و به پتری دیش حاوی محیط کشت کامل دارای سرم، انتقال یافت و به خوبی با محیط کشت مخلوط و با استفاده از دو پنس نوک باریک، اپیدرم از درم جدا شد. اپیدرم‌های جدا شده به لوله آزمایش حاوی محیط کشت کامل دارای سرم، منتقل و به آهستگی در داخل لوله پی‌پت شد و به این ترتیب کراتینوسایت‌ها از اپیدرم جدا شدند. محتوی لوله از گاز نایلونی استریل با منافذی به اندازه $100\text{ }\mu\text{m}$ میکرومتر عبور داده شد تا سلول‌های اپیدرم از قطعات بافتی جدا شود. پس از آن سلول‌های اپیدرمی جدا شده، دوبار و هر بار به مدت ۱۰ دقیقه با محیط کشت کامل حاوی سرم، با سانتریفیوژ کردن در 100 g ، شست و شو داده شد. سوسپانسیون سلولی با حجم دقیق، با استفاده از رسوپ سلولی حاصل از سانتریفیوژ تهیه و $20\text{ }\mu\text{l}$ میکرولیتر از آن با $20\text{ }\mu\text{l}$ میکرولیتر تریپان بلو مخلوط و رنگ آمیزی شد. تعداد کل سلول‌ها و نیز تعداد سلول‌های زنده توسط میکروسکوپ نوری با استفاده از لام هموسایوتومتر، مورد شمارش قرار گرفت.

۴- شرایط کشت اولیه کراتینوسایت: کراتینوسایت با استفاده از تراکسیم سلولی $1-3 \times 10^5\text{ cells/cm}^2$ در فلاسک‌های کشت سلولی 25 cm^2 سانتی‌متر مربعی در محیط کشت کامل کشت شد. فلاسک‌ها در انکوباتور 37°C درجه سانتی گراد با فشار 10% دی‌اکسید کربن و 100% رطوبت انکوبه شدند.

پس از چسبیدن سلول‌ها به کف فلاسک ($3-2$ روز بعد از کشت) سلول‌های کشت شده، با محیط کامل حاوی سرم شست و شو داده شد تا سلول‌های مرده نچسبیده و نیز سلول‌های تمایز یافته حذف شود. محیط کشت داخل فلاسک‌ها هر $3-2$ روز تعویض شد (12 و 13).

۵- بورسی روند رشد سلول‌ها و تشکیل و گسترش کلی‌ها با استفاده از میکروسکوپ معکوس: پس از

از صافی غشایی $0/22\text{ ml}$ صاف و استریل و در یخچال نگهداری شد (۱۳).

۶- جمع آوری بیوپسی‌های پوست: بیوپسی‌های پوست با ضخامت متوسط ($0/1$ تا $0/2$ میلی‌متر) در ابعاد مختلف از اتاق عمل مرکزی بیمارستان قائم (عج) مشهد، از پوست‌های اضافی و خارج از نیاز - ناشی از جراحی پلاستیک بیماران - به طریق استریل تهیه شد. هر بیوپسی به مدت 30 دقیقه در محلول بتادین (پد 10%) غوطه ور شد تا از آلودگی احتمالی میکروبی پاک شود. سپس نمونه‌ها با نرمال سالین استریل به خوبی شست و شو داده شد و در داخل ظرف شیشه‌ای حاوی محیط کشت DMEM دارای $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ FBS $7/7$ ، پنی سیلین جی $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ استرپتومایسین $2/5\text{ }\mu\text{g/ml}$ و آمفوتیریسین - ب آزمایشگاه کشت سلولی انتقال یافت (۱۳).

۷- فرایند جداسازی کراتینوسایت با استفاده از آنزیم تریپسین: جدا سازی کراتینوسایت‌ها با انجام تغییرهایی در روش‌های به کار رفته در رفنس‌های 9 ، 10 ، 12 ، 13 ، 14 صورت گرفت. تحت شرایط استریل و در زیر هود لامینارفلو (Class II)، نمونه‌های بیوپسی پوست به کمک قیچی جراحی در داخل پتری دیش‌های حاوی PBSA دارای جنتامایسین با غلظت $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ به قطعات تا 1 سانتی‌متر مربع، برباده شد و قطعات به وسیله محلول PBSA ذکر شده سه بار مورد شست و شو قرار گرفت. پس از آن قطعات پوست در لوله آزمایش حاوی محلول تریپسین با غلظت مورد مصرف - حل شده در PBSA دارای جنتامایسین با غلظت $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ که قبل از به دمای 37°C درجه سانتی گراد رسانده شده بود - غوطه ور و به مدت مورد نیاز در انکوباتور CO_2 با دمای 37°C درجه سانتی گراد قرار داده شد. طی مدت انکوباسیون عالیم جدا شدن اپیدرم از درم کنترل و با مشاهده اولین عالیم جدا

پارافین قالب گیری و برش‌هایی به ضخامت ۳ تا ۴ میکرون تهیه شد و پس از رنگ آمیزی با همان توکسیلین - اتوزین به کمک میکروسکوپ نوری تحت بررسی قرار گرفت (۴۹ و ۲۰).

کشت اولیه و نیز طی روزهای بعد که تکثیر سلول‌ها ادامه می‌یافتد و کلنی‌ها گسترش می‌یافته‌ند، فرایند رشد مورد کنترل قرار گرفت و در روزهای مختلف پس از کشت و نیز بعد از پر شدن کف فلاسک از سلول‌های تکثیر یافته و تشکیل ورقه سلولی یک پارچه، به وسیله میکروسکوپ معکوس تصاویر میکروسکوپی تهیه شد.

۶- فرایند پاساز سلول‌ها: پس از آن که حدود ۶۰-۷۰ درصد کف فلاسک از سلول‌های در حال تکثیر پر شد، ابتدا محیط موجود در فلاسک تخلیه و دوبار با محلول ۰/۱ PBSA شست و شو شد. پس از آن محلول ۰/۱ EDTA در PBSA، تا حد پوشاندن کامل سلول‌ها به فلاسک اضافه شد و فلاسک به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور CO_2 قرار گرفت. طی این مدت (به علت اتصال یون‌های کلسیم بین سلولی) فضای بین سلول‌ها افزایش یافت و جدا شدن سلول‌ها آغاز شد. سپس محلول EDTA تخلیه و محلول تریپسین ۰/۰۵ EDTA به فلاسک کشت افزوده شد و مجدداً به مدت ۱۰-۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوباتور CO_2 قرار گرفت. پس از مدت فوق، سلول‌ها جدا شدند. برای جداسازی کامل سلول‌ها از کف فلاسک و نیز از یکدیگر، مایع حاوی سلول‌ها به آهستگی پی‌ت شد و پس از خنثی کردن فعالیت تریپسین وسیله محیط کامل حاوی سرم، مراحل بعدی کار مطابق بندهای ۴ و ۵ ادامه یافت (۱۳ و ۱۲).

۷- بررسی بافت شناسی ورقه اپیدرمی با استفاده از میکروسکوپ نوری: ورقه اپیدرمی کشت شده با استفاده از آنزیم دیسپاز گرید II (۱/۲ units/ml) در محلول ۳۷ DMEM بدون سرم و یک ساعت انکوباسیون در درجه سانتی گراد، با فشار ۱۰٪ دی اکسید کربن و ۱۰۰٪ رطوبت، به صورت یک پارچه جدا و سپس ورقه اپیدرمی به وسیله فرمالین ۱٪ فیکس شد. ورقه فیکس شده در

یافته‌ها

تهیه کراتینوسایت‌های اپیدرمی

برای جداسازی اپیدرم از درم، نمونه‌های پوست بریده شده به قطعاتی با ابعاد $0/5 \times 0/5 \times 0/5$ تا $1 \times 1 \times 1$ سانتی‌متر مربع در محلول تریپسین ۰/۰۵٪ تا ۱٪ غوطه‌ور و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوباتور CO_2 قرار داده شد. محلول تریپسین ۰/۰۵٪ طی ۲۴ ساعت توانست موجب جدا شدن اپیدرم از درم شود. با افزایش غلظت تریپسین مدت زمان انکوباسیون کوتاه‌تر شد. با تریپسین ۰/۰۵٪، انکوباسیون به مدت ۴۵ تا ۷۵ دقیقه - بسته به ضخامت پوست - صورت گرفت. پس از عمل جداسازی اپیدرم از درم، سوپیانسیون سلولی تهیه و با رنگ آمیزی تریپان بلو و شمارش سلولی، مشخص شد که به ازای هر سانتی‌متر مربع از نمونه پوست، تقریباً $3-4 \times 10^6$ سلول به دست آمده است که با غلظت مطلوب تریپسین و مدت انکوباسیون کافی، بیش از ۹۰٪ سلول‌ها زنده بودند.

ویژگی‌های رشد کراتینوسایت‌ها در کشت اولیه

پس از کشت سلول‌ها با دانسیته $1-3 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ به مدت ۱ تا ۳ روز، فلاسک‌ها در انکوباتور دست نخورده نگه داری شدند. نتیجه این که طی ۲۴ ساعت پس از کشت، حدود ۴۰ تا ۶۰ درصد سلول‌های اپیدرمی به کف فلاسک کشت، چسبیده و اکثر سلول‌های چسبیده، مطابق با منشاء خود از لایه بازال اپیدرم، کوچک و گرد بودند (تصویر شماره ۱).

سلول‌های نچسبیده با شست و شو به کمک PBSA از فلاسک تخلیه و به فلاسک‌های جدید منتقل شد، ولی پس

معکوس سطح ورقه یک پارچه اپiderمی، تقریباً تمیز و یک دست مشاهده شد.

جدا سازی ورقه یک پارچه اپiderمی از کف فلاسک کشت

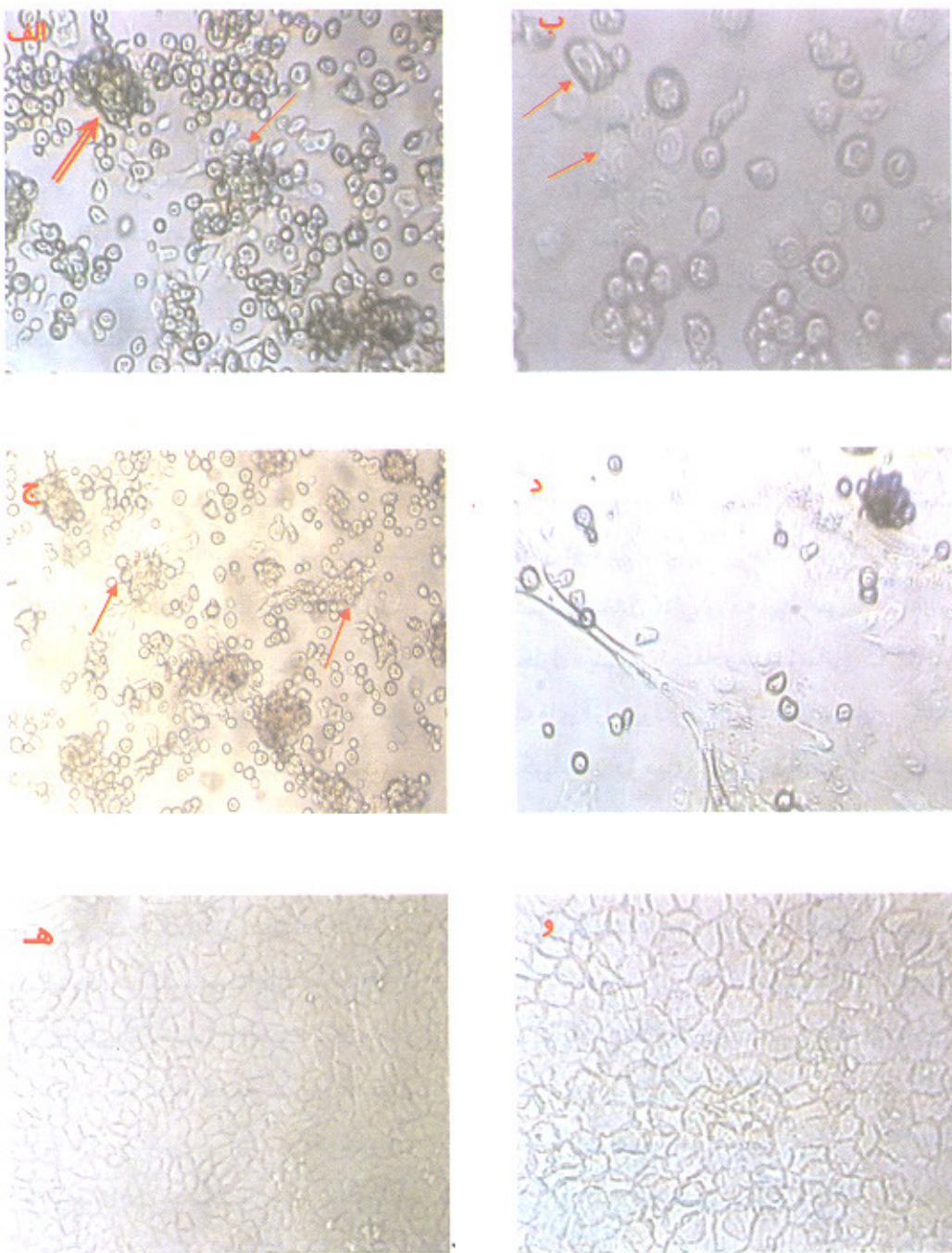
پس از پوشش کامل کف فلاسک از سلول‌های تکثیر یافته و تشکیل ورقه اپiderمی یک پارچه، برای جداسازی ورقه اپiderمی به صورت دست نخورده از آنزیم دیسپاز گرید II ($1/2 \text{ units/ml}$) استفاده شد (تصویر شماره ۱، ه). با توجه به این که سلول‌ها پس از ۲ هفته از کشت اولیه، تا حدی در دیواره جانبی فلاسک نیز رشد کرده بودند، به منظور پوشاندن کافی ورقه اپiderمی از مقدار بیشتری از محلول دیسپاز استفاده شد. زمانی که آنزیم دیسپاز از لبه‌های آزاد ورقه نفوذ کرد، پس از حدود ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای 37°C درجه سانتی گراد - فشار $10\% \text{ O}_2$ اکسید کربن و $100\% \text{ Rطوبت}$ - فرآیند جداشدن ورقه از لبه‌های آن آغاز شد و به طرف داخل پیش‌رفت کرد. عموماً طی 45 تا 90 دقیقه - بسته به سن کشت - عمل جدا شدن کامل شد. پس از آن با استفاده از سیم داغ استریل، سطح بالایی فلاسک بریده شد و ورقه اپiderمی در شرایط استریل روی گاز واژلینه انتقال یافت، به طوری که سطح بازال که باید به سطح زخم یا محل پیوند قرار گیرد، آزاد بود. اپی تلیوم جدا شده بسیار الاستیک بود، به طوری که پس از جدا شدن از کف فلاسک، جمع شد و ابعاد آن کاهش یافت (تصویر شماره ۲). در این تجربه، ورقه‌های اپiderمی جدا شده از فلاسک‌های 25 و 75 سانتی متر مربعی، به ترتیب دارای ابعاد $4-5 \times 3-4 \text{ cm}^2$ و $10-15 \times 8-3 \text{ cm}^2$ بود. ضخامت ورقه اپiderمی پس از جدا شدن، به علت انقباض افزایش می‌یافت و به راحتی دچار چین خوردگی می‌شد.

در ورقه‌های اپiderمی که به مدت طولانی پس از یک پارچه‌شدن نگه‌داری شده بودند (حدود 3 هفته بعد از کشت)

از 3 روز انکوباسیون، چسبندگی این سلول‌ها و تشکیل کلني سلولی مشاهده نشد.

سلول‌های اپiderمی افراد مختلف، سرعت رشد متفاوتی نشان دادند. هم چنین سلول‌های اپiderمی کودکان نسبت به بزرگسالان از سرعت رشد بالاتری برخوردار بودند. کشت سلول‌ها با دانسته کم تر از $1 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ به رغم تشکیل اولیه تعداد کلني و رشد و گسترش نسبی، با گذشت زمان، رشد قابل توجهی نشان نداد و کلني‌ها عملاء به صورت محدود باقی ماندند با این توضیح که در کف فلاسک ورقه یک پارچه‌ای تشکیل نشد. در این وضعیت تقریباً پس از گذشت 7 تا 10 روز از کشت اولیه، فیروblast‌های درمی انسان، در محل‌های خالی کف فلاسک ظاهر شد و با سرعت قابل توجهی تکثیر و فضاهای خالی کف فلاسک را پر کردند و مرز مشخصی نیز بین این سلول‌ها و کلني‌های کراتینوسایت به وجود آمد و قابل ذکر این که، پس از رشد و گسترش فیروblast‌ها، کلني‌های کراتینوسایت عملاء گسترشی نشان ندادند.

وقتی کراتینوسایت‌ها با تراکم مناسب ($1-3 \times 10^5 \text{ cells}$) کشت شدند. طی روزهای اولیه پس از کشت - کلني‌های سلولی متعدد کوچکی ایجاد شد که به تدریج گسترش یافت که طی 7 تا 14 روز پس از کشت، کلني‌ها به یکدیگر متصل شدند و به صورت یک پارچه، تمام کف فلاسک را پر کردند (تصویر شماره ۱ الف، ج). در بعضی موارد در سطح کلني‌ها، توده‌ای از سلول‌های به هم چسبیده و تیره رنگ نیز مشاهده شد که به سلول‌های در حال تکثیر چسبیده بودند (تصویر شماره ۱ الف، ج، د). البته در روزهای بعد و پس از گسترش کلني‌ها و یک پارچه شدن آن‌ها، بخش عمده‌ای از این توده‌ها جدا و به تدریج با تعویض محیط تخلیه شدند. هم چنین بخشی دیگر از این توده‌های سلولی طی تأثیر دیسپاز برای جداسازی ورقه اپiderمی، کنده و حذف شد و در زیر میکروسکوپ



تصویر شماره ۱ - تصاویر تهیه شده با میکروسکوپ معکوس از کراتینوسایت‌های طبیعی پوست انسان که بر سطح فلاسک کشت شده‌اند.

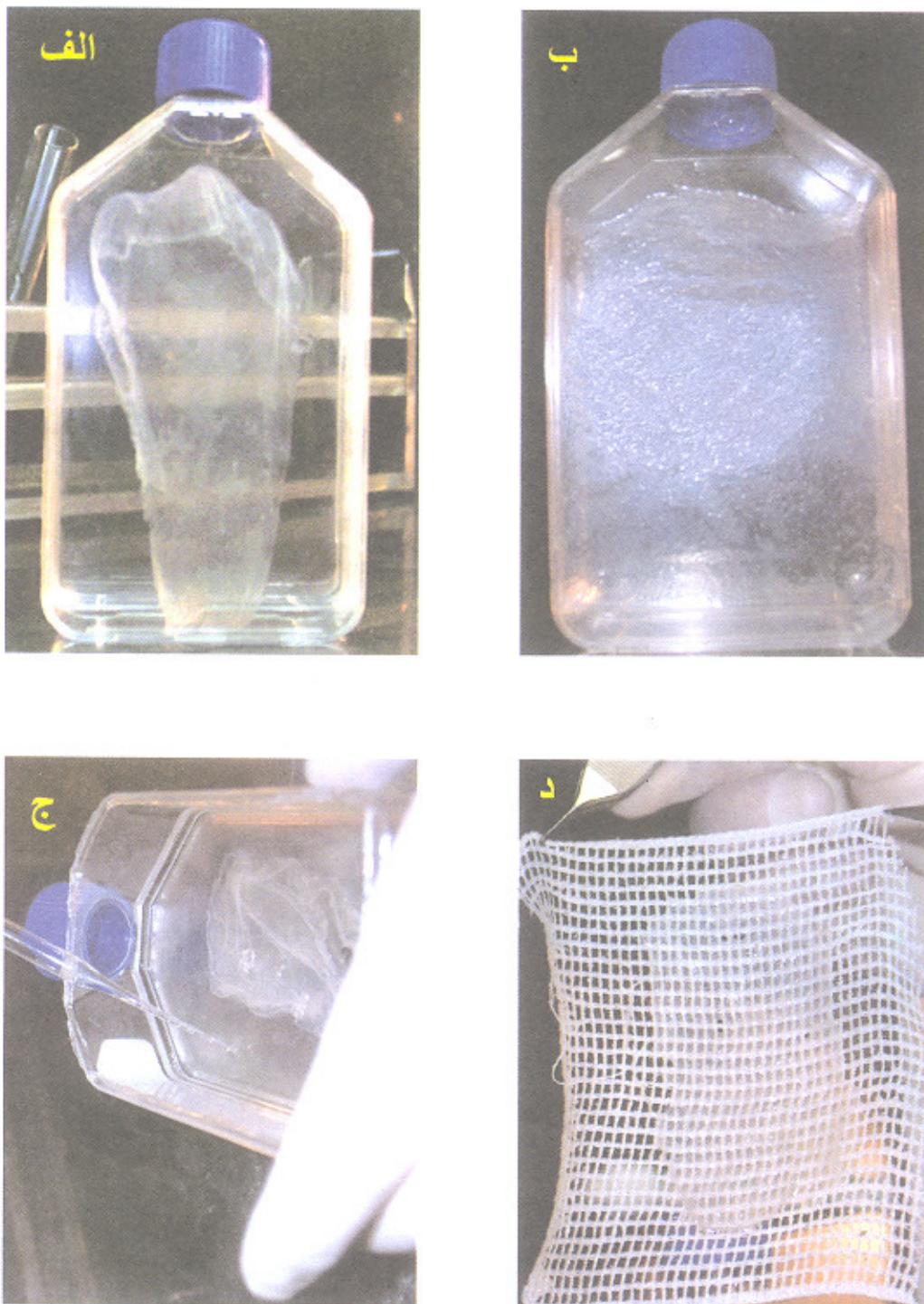
الف - یک روز پس از کشت و قبل از شست و شوی فلاسک، کشت با PBSA. سلول‌های چسبیده به کف فلاسک و در حال تکثیر (\leftarrow) و نیز سلول‌های تچسبیده گرد فاقد توانایی تکثیر و سلول‌های مرده (\rightarrow) (در شتنمایی $\times 50$)

ب - دو روز پس از کشت، سلول‌های چسبیده در حال تکثیر و کلثی‌های در حال تکثیر (\leftarrow) (در شتنمایی $\times 100$)

ج - چهار روز پس از کشت، کلثی‌های متعدد کراتینوسایت‌های در حال تکثیر (\leftarrow) (در شتنمایی $\times 50$)

د - ۵ روز پس از کشت، کلثی در حال گسترش (در شتنمایی $\times 100$)

ه و - کراتینوسایت‌های تکثیر بافته به یکدیگر متصل شده و یک ورقه اپiderمی یک پارچه مشکل از چند لایه سلول را پس از ۱۰ و ۲۰ روز ایجاد کرده‌اند (در شتنمایی $\times 50$) و (در شتنمایی $\times 100$)

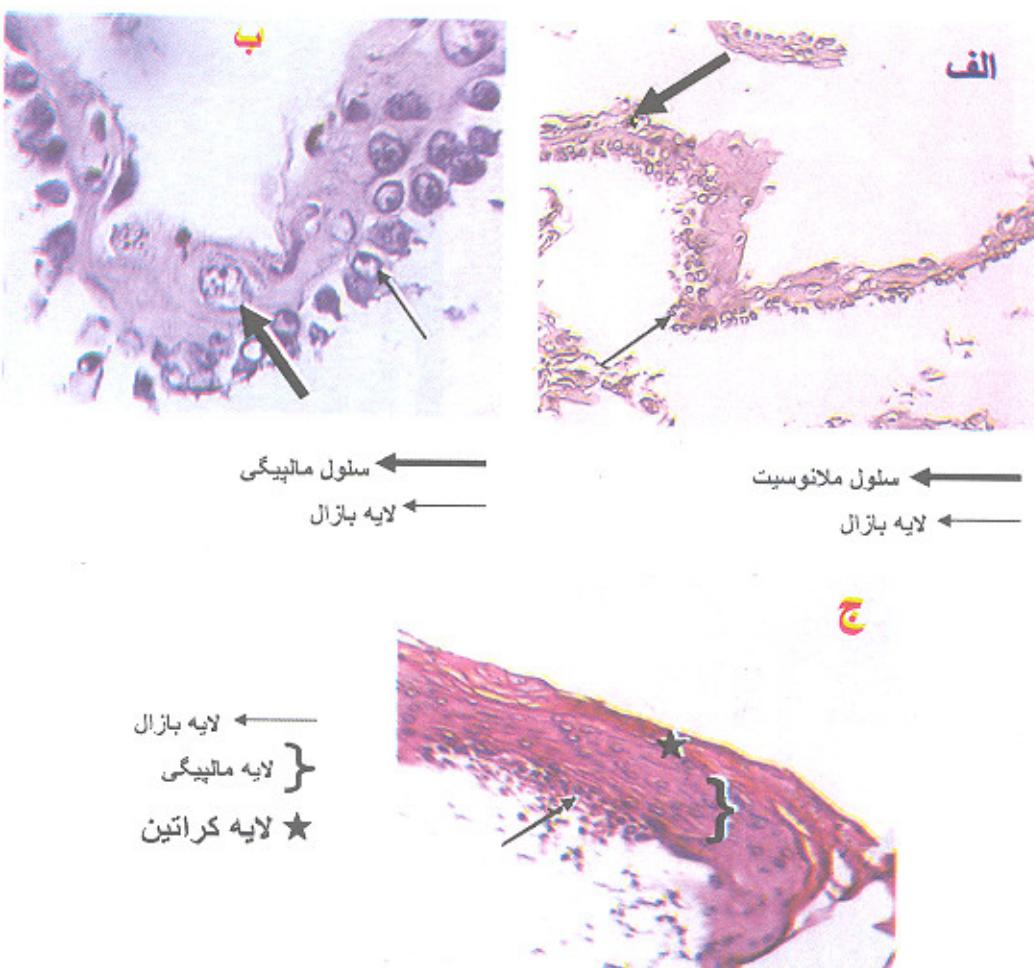


تصویر شماره ۲ - جدا سازی ورقه اپیدرمی کشت شده از کف فلاسک کشت با استفاده از آنزیم دیسپاز

الف - جدا شدن تدریجی ورقه اپیدرمی از کف فلاسک کشت، قسمت‌های داخلی تر هنوز چسبیده‌اند.

ب - ورقه اپیدرمی به طور کامل و یک پارچه از کف فلاسک جدا شده است.

ج و د - انتقال ورقه اپیدرمی منتقل شده روی گاز واژینه، ابعاد ورقه اپیدرمی به علت جمع شدگی پس از جدا شدن به کمک دیسپاز، کوچکتر شده است.



تصویر شماره ۳ - تصاویر میکروسکوپی از برش ورقه اپیدرمی، پس از رنگ آمیزی با هماتوکسیلین - انوزین
الف و ب - ورقه اپیدرمی کشته ۱۰ روزه کراتینوسایت‌های انسان، شامل ۴-۳ لایه سلولی، مشکل از سلول‌های کوچک بازآل و سلول‌های درشت چند وجهی لایه خاردار با هسته‌های درشت حاوی هستک و وزیکوله، برخی حاوی گرانولهای بنشش کراتوهالن، هستند. هم چنین چند سلول درشت ملانوسیت حاوی پیگمان ملانین در سیتوپلاسم، در لایه بازآل دیده می‌شود. (به ترتیب در شتمایی $\times 100$ و $\times 200$).
ج - ورقه اپیدرمی کشته ۲۰ روزه، دارای ۱۰-۸-۴ لایه سلولی کامل، شامل یک تا دو لایه سلول‌های کوچک بازآل و سلول‌های درشت خاردار، هم چنین ۳-۲ لایه سلول‌های کراتینیزه با هسته‌های کوچک پیکتوژنیک و سیتوپلاسم انوزینوفیلیک شدید (در شتمایی $\times 100$).

بررسی بافت شناسی ورقه سلولی اپیدرمی کشته
داده شده به کمک میکروسکوپ نوری
 برش هیستولوژیک از یک ورقه، ۱۰ روز پس از کشته اولیه، نشان داد که ورقه دارای ۳ تا ۴ لایه سلولی است (تصویر شماره ۳ الف، ب). با گذشت مدت بیشتری از زمان کشته، لایه‌های سلولی افزایش یافت و ضخامت آنها نیز بیشتر شد (تصویر شماره ۳، ج). همان طور که در تصویر شماره ۳ مشاهده می‌شود، ورقه اپیدرمی مشکل از

- در مناطق کوچکی از ورقه یک پارچه -
 بر جستگی‌هایی به صورت تاول مشاهده شد. در این مناطق، ورقه از کف فلاسک جدا شده و در زیر آن، مایع تجمع یافته بود. هنگام جدا کردن ورقه اپیدرمی به کمک دیسپاز، بعضی از این تاول‌ها پاره شدند و حفره‌هایی در ورقه یک پارچه ایجاد کردند. ورقه‌هایی که حفره‌های زیادی داشتند، عمل انتقال آن‌ها به روی گاز واژلینه مشکل بود و موفقیت چندانی نداشت.

شدند، سلول‌های حاصله پس از کشت به اختلال رشد دچار شدند. گفته‌ی است که حتی با دانسیته زیاد کشت، کلثی‌های سلولی مناسبی که به خوبی رشد و توسعه یابند، تشکیل نشد یا پس از تشکیل نسبی کلثی، توسعه و گسترش کافی نیافت. بنابراین، در روش گرم، غلظت مناسب از تریپسین (۰/۰۲۵٪) با حداقل زمان انکوباسیون توصیه می‌شود (۱۲ و ۱۳). لازم است طی انکوباسیون نمونه‌های بافت از نظر علایم جدا شدن اپیدرم از درم مرتباً در لبه‌های آزاد قطعات پوست کنترل شود. با مشاهده علایم جدا شدن اپیدرم از درم، باید نسبت به قطع انکوباسیون و خنثی کردن تریپسین اقدام کرد. از طرفی چون احتمال زیادی وجود دارد که ضخامت نمونه پوست مورد استفاده در سرتاسر سطح خود یکسان نباشد، بهتر است قطعات ضخیم تر و نازک تر را در لوله‌های جداگانه انکوبه کرد تا از زمان مواجهه غیرضروری بافت طی انکوباسیون با تریپسین کاسته شود.

بازوجه به این که در روش کشت تحقیق حاضر، از لایه تغذیه کننده سلول‌های فیبروبلاست ۳T3 موش استفاده نشده است، ضروری بود که از دانسیته زیاد سلولی در کشت اولیه استفاده شود (۱۲ و ۲۰٪)، به همین دلیل، کراتینوسایتها با دانسیته‌های مختلف کشت داده شدند. کشت‌های با دانسیته کمتر از 1×10^5 cells/cm² به رغم رشد اولیه و تشکیل کلثی، گسترش قابل توجهی نیافتند و در عده‌های موارد، ورقه یک پارچه اپیدرمی تشکیل نشد. لذا در کشت‌های با دانسیته کمتر، ضروری است از لایه تغذیه کننده استفاده شود.

پس از کشت کراتینوسایتها با دانسیته مناسب که در این تحقیق بین $1-3 \times 10^5$ cells/cm² بود، طی ۲۴ ساعت پس از کشت اولیه حدود ۴۰-۶۰٪ درصد از سلول‌های کشت شده به کف فلاسک چسیدند. با توجه به این که سلول‌های نچسیده، پس از انتقال و کشت در فلاسک

سلول‌های بازال گرد و کوچک است و لایه‌های فوق بازال دارای سلول‌های بزرگ با اشکال نامنظم و حاوی واکوئل هستند. ملانوسیت‌هایی که در سوسپانسیون اولیه سلولی اپیدرمی وجود داشتند در فرایند کشت نیز زنده مانده بودند، لذا در ورقه اپیدرمی، سلول ملانوسیت و رنگدانه ملانین نیز مشاهده شد.

بحث

اپیدرم کشت شده، در موارد بالینی و تحقیقاتی گسترده‌ای استفاده می‌شود و برای تهیه اپیدرم روش‌های مختلف کشت، از جمله استفاده از فیبروبلاست‌های ۳T3 موش به عنوان لایه تغذیه کننده به همراه استفاده از محیط کشت حاوی سرم و مکمل‌های مختلف، به خصوص کلراتونکسین و فاکتور رشد اپیدرمی که ارتفاع دهنده‌ی تکثیر کراتینوسایتها در منحیط کشت هستند، به کار رفته است. (۹-۲۰٪).

در این مقاله، روش خاصی برای کشت کراتینوسایتها، بدون استفاده از لایه تغذیه کننده، برای تهیه ورقه‌های اپیدرمی قابل پیوند و نیز چشم انداز پیوند و استفاده موفقیت‌آمیز آن در معالجه بیماران مبتلا به سوختگی شدید و ویتیلیگو توصیف شده است.

جداسازی اپیدرم از درم به روش تریپسین گرم صورت گرفت. غلظت‌های مختلف از تریپسین و زمان‌های متفاوت انکوباسیون به کار گرفته شد. با توجه به این که، یکی از معایب صدمه‌ای است که در مواجهه طولانی در دمای ۳۷°C وارد می‌کند.

در این تجربه، با افزایش غلظت تریپسین - در زمان کوتاه‌تری از انکوباسیون - اپیدرم از درم جدا شد، ولی مشاهده شد با غلظت ۰/۰۶٪ و بیش از آن، به رغم انکوباسیون کوتاه مدت و به دست آمدن مقدار مناسبی از سلول‌ها که در رنگ آمیزی با تریپان بلوزنده تشخیص داده

این کار در آن است که آلودگی سلول‌های مزانشیمی در سوسپانسیون سلولی کراتینوسایت‌ها افزایش می‌یابد(۱۲). سوسپانسیون سلولی اساساً حاوی کراتینوسایت‌ها است ولی مقدار کمی فیبروبلاست‌های درمی، ملانوسیت‌ها، سلول‌های لانگرهانس و سلول‌های مرکل نیز دارد. این فیبروبلاست‌ها مهم‌ترین منبع آلودگی سلولی کشت‌های اپیدرمی هستند، زیرا سلول‌های مرکل و سلول‌های لانگرهانس در کشت زنده نمی‌مانند و ملانوسیت‌ها نیز به رغم زنده ماندن به جز در شرایط کشت اختصاصی تکثیر نمی‌یابند(۱۳ و ۱۴). لذا تنها فیبروبلاست‌ها می‌توانند در شرایط کشت رشد و تکثیر یابند. به این لحاظ در این تجربه، زمانی که کراتینوسایت‌ها با دانسته پایین، به خصوص کمتر از 1×10^5 cells/cm² کشت شدند، به این دلیل که طی ۷ تا ۱۰ روز توانستند با رشد و گسترش خود تمام کف فلاسک را پر کنند، به تدریج فیبروبلاست‌ها ظاهر شدند و به سرعت گسترش یافته و فضاهای خالی را پر کردند. بر اساس این پروسه، گسترش کلنجی‌های کراتینوسایت و تشکیل ورقه یک پارچه اپیدرمی امکان‌پذیر نشد، هر چند می‌توان با استفاده از محلول EDTA با غلظت ۰/۰۲٪ فیبروبلاست‌ها را جدا نمود(۱۴) ولی در صورت باقی ماندن حتی تعداد اندکی از آن، باز هم به سرعت تکثیر و گسترش می‌یابند. برای جلوگیری از این پدیده، توصیه می‌شود چنانچه خلوص سوسپانسیون سلولی دارای اهمیت است، خراشیدن سطح درم صورت نگیرد و صرفاً از سلول‌های جدا شده از اپیدرم، با دانسته مناسب استفاده شود. هم چنین می‌توان از روش تریپسین سرد (انکوباسیون قطعات برش یافته پوست با تریپسین ۱۲۵/۰٪ در دمای ۴°C + به مدت یک شب) استفاده کرد(۱۵). در این روش، احتمال آلودگی با فیبروبلاست، کمتر از ۱٪ است، در حالی که این احتمال با روش گرم ۱٪ است(۱۶). هم چنین می‌توان از لایه تغذیه کننده سلول‌های

جدید، از خود چسبندگی نشان ندادند می‌توان گفت تمام سلول‌های زنده موجود در سوسپانسیون اولیه سلولی تهیه شده از نمونه‌های پوست، قابلیت چسبندگی، رشد و تکثیر را در شرایط کشت ندارند و توانایی چسبیدن سلول‌ها به کف فلاسک، تابع دانسته کشت نیست (۲۰). بخشی از سلول‌های زنده که قدرت تکثیر ندارند به صورت توده‌های به هم چسبیده به سطح سلول‌های در حال تکثیر کف فلاسک متصل می‌شوند و به شکل توده‌های تیره رنگ دیده می‌شوند. به نظر می‌رسد این توده‌ها تجمعی هستند از سلول‌های تمايز نهایی یافته که در سوسپانسیون اولیه سلولی وجود داشته‌اند. قسمت عمده این توده‌های سلولی طی گسترش و رشد کلنجی‌ها، به تدریج کنده و تخلیه می‌شوند و بخشی دیگر هم طی مرحله جداسازی ورقه اپیدرمی از کف فلاسک، از سطح آن کنده می‌شوند، به طوری که هنگام جدا شدن کامل ورقه اپیدرمی از کف فلاسک، تقریباً هیچ توده‌ای از این قبیل در سطح آن باقی نمی‌ماند.

سلول‌های اپیدرمی نوزادان و کودکان نسبت به افراد مسن توانایی تکثیر بالاتری نشان دادند و سرعت رشد و گسترش سلول‌ها و تشکیل ورقه یک پارچه در کف فلاسک، به طور قابل توجهی بیشتر از افراد مسن تر بود. دلیل این امر آن است که کارآیی تشکیل کلنجی سلول‌های اپیدرمی افراد با سن کمتر از ۱۰ سال، بیش از افراد مسن تر است (۹).

با روش تریپسین (۲۵٪) گرم به کار رفته در تحقیق حاضر به ازای هر سانتی‌مترمربع از نمونه پوست، به طور میانگین $3-4 \times 10^4$ سلول به دست آمد. برای تهیه سلول‌های بیش تر، می‌توان پس از جدا کردن اپیدرم از درم، سطح درم را به کمک قاشقک به آهستگی تراشید. با این کار سلول‌های اپیدرمی که به سمتی به سطح درم چسبیده‌اند، کنده می‌شوند و به این طریق به ازای هر سانتی‌متر مربع پوست تعداد سلول بیش تری به دست می‌آید. ولی اشکال

مشکل از سلول‌های بزرگ واکنوله با اشکال نامنظم هستند که با استراتوم ژرمناتوم و استراتوم اسپینوزوم لایه اپiderم مشابه‌اند. ملانوسيت‌ها هم که در سوسپانسيون اولیه سلولی وجود داشتند، در فرایند کشت زنده مانده‌اند. گرچه استراتوم کورنثوم در کشت کراتینوسایت‌ها ایجاد نمی‌شود ولی این کراتینوسایت‌های تکثیر یافته و به طور نسبی قادرند در محیط کشت تمایز یافته، پس از پیوند به بیمار تمایز خود را کامل کنند و اپiderم طبیعی با استراتوم کورنثوم کامل تشکیل دهند (۲۰). لذا ورقه‌های اپiderمی کشت شده می‌توانند به عنوان گرفت‌هایی به کار روند که بهبودی و پوشش انواعی از زخم‌های افراد می‌کنند (۴۰ و ۴۱ و ۴۲).

برای جلوگیری از ایجاد حفره ناشی از پاره شدن تاول‌ها در ورقه اپiderمی یک پارچه، طی جداسازی با دیسپار گردید II، که معمولاً به دلیل نگهداری طولانی پس از یک پارچه، شدن سلول‌های وجود می‌آید، نشان داده شده است اگر فلاسک‌های حاوی ورقه اپiderمی در دمای $20-23^{\circ}\text{C}$ و به طور متناسب در 37°C نگهداری شوند از ایجاد تاول‌های مقدار زیادی پیش گیری می‌شود (۳۲).

ورقه اپiderمی کشت شده، در معالجه ویتیلیگو نیز استفاده شده است. با توجه به این که نسبت مناسب ملانوسيت - کراتینوسایت، در صورتی که نمونه بیوپسی پوست بیش از $25/0$ سانتی‌متر مربع باشد یا این که کراتینوسایت‌های اولیه با دانسیته $10^4 \times 4$ یا بیش‌تر، کشت داده شوند، حفظ می‌شود (۳۷) و از طرفی در روش کشت تحقیق حاضر علاوه بر مناسب بودن اندازه نمونه پوستی و دانسیته کشت بالا، ملانوسيت‌های حاوی بیگمان ملانین در بررش ورقه اپiderمی نیز مشاهده شده است، می‌توان ادعا کرد که ورقه اپiderمی کشت شده در درمان ویتیلیگو قابل استفاده است. در سایر موارد هم پس از پیوند امکان دارد رنگ طبیعی پوست را تامین کند.

فیروپلاست ۳T3 موش استفاده کرد. با این روش، کلني‌های ماکروسکوپیک کراتینوسایت‌ها تشکیل می‌شود، در حالی که تکثیر فیروپلاست‌ها متوقف می‌شود و مقدار آلدگی فیروپلاست با پاساز کراتینوسایت‌ها نیز کاهش می‌یابد (۹ و ۱۳).

با توجه به این که تلاش این تحقیق برای ساب کالچر کراتینوسایت‌های رشد یافته نتایج موفقیت آمیزی به همراه نداشت، باید گفت استفاده از دانسیته بالای کشت، بدون به کار بردن لایه تغذیه کننده، به رغم سهولت نسبی کار، مشکلاتی به همراه دارد، از جمله ساب کالچر آن مشکل و موفقیت آن کم است (۱۳). لذا برای تهیه ورقه اپiderمی در هر بار کشت اولیه، به نمونه جدید پوست نیاز است. هم چنین مشکل آلدگی با فیروپلاست‌های درم نیز وجود دارد. بنابر این توصیه می‌شود در صورتی که از یک نمونه پوست، به ورقه‌های اپiderمی زیادی نیاز باشد، حتماً از لایه تغذیه کننده استفاده شود؛ زیرا در این روش از دانسیته کشت خیلی کم‌تری بهره گرفته می‌شود و امکان ساب کالچر نیز وجود دارد.

پس از کشت سلول‌های کراتینوسایت، اکثریت سلول‌های چسبیده مطابق با منشاً خود از لایه بازال اپiderم، کوچک و گرد هستند. استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال اختصاصی لایه بازال (EL-2)، نشان داده است که بیش از ۹۵٪ جمعیت سلول‌های چسبیده، مشخصات مرفلوژیک و ایمونو‌شیمیایی سلول‌های بازال اپiderمی را دارا هستند (۲۰).

برش بافت‌شناسی یک ورقه اپiderمی جدا شده از کف فلاسک، نشان داد که طی ۱۰ روز پس از کشت، ورقه حاصله از ۳-۴ لایه سلولی تشکیل می‌شود و پس از حدود ۸ روز، مشاهده شد که ورقه اپiderمی دارای حدود ۱۰-۱۴ لایه سلولی است. سلول‌های بازال گرد و کوچک در اولین ردیفی هستند که به کف فلاسک چسبیده و لایه‌های بالاتر

علوم پزشکی مشهد به خاطر تأمین امکانات و بودجه این تحقیق و نیز اتفاق عمل مرکزی جراحی بیمارستان قائم(عج) دانشگاه علوم پزشکی مشهد برای تأمین نمونه‌های پوست، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

تشکر و قدردانی

به این وسیله از مشاوره‌های آقای دکتر جلیل توکل افشاری دانشیار محترم گروه ایمنولوژی دانشگاه علوم پزشکی مشهد و هم چنین از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات علوم دارویی و دانشکده داروسازی دانشگاه

References

- 1-Chicarelli ZN, Cuono CB, Heinrich JJ, et al. Selective aggressive burn excision for high-mortality subgroups. *J Trauma* 1986; 26: 18-25.
- 2-Tanner JC, Vandeput J, Olley H. The mesh graft skin. *Plast Reconstr Surg* 1964; 34: 287-92.
- 3-Kreis RW, Vloemans AFPM, Hoekstra MJ, et al. The use of non-viable glycerol-preserved cadaver skin combined with widely expanded autografts in the treatment of extensive third degree burns. *J Trauma* 1989; 29: 51-54.
- 4-Elliot RA, Hoehn JG. Use of commercial skin for wound dressing. *Plast Reconstr Surg* 1973; 52: 401-05.
- 5-Stein AA, Soike K, Hoffmeister FS. Human embryonic monolayer as skin grafts: A preliminary report of an application in burn treatment. *Human Pathol* 1979; 10: 363-66.
- 6-Chvapill M. Considerations on manufacturing principles of a synthetic burn dressing: A review. *J Biomed Mater Res* 1982; 16: 245-63.
- 7-Boyce ST, Ham RG. Cultivation frozen storage and clonal growth of normal human epidermal keratinocytes in serum free media. *J Tissue Cult Methods* 1985; 9: 83-93.
- 8-Eisinger M, Lee JS, Hefton JM, et al. Human epidermal cell cultures: Growth and differentiation in the absences of dermal components or medium supplements. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 5340-44.
- 9-Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: The formation of keratinizing colonies from single cell. *Cell* 1975; 6: 331-44.
- 10-Green H, Keninde O, Thomas J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76: 5665-68.
- 11-Rheinwald JG. Serial cultivation of normal human epidermal keratinocytes. *Methods Cell Biol* 1980; 21 a: 229-54.
- 12-Limat A, Hunziker T, Boillat C, et al. Post-mitotic human dermal fibroblasts efficiently support the growth of human follicular keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1989; 92: 758-62.
- 13-Staiano-Coico L, Higgins PJ, Darzynkiewicz Z, et al. Human Keratinocyte culture, identification and staging of epidermal cell subpopulations. *J Clin Invest* 1986; 77: 396-404.
- 14-Freshney RI, editor. Culture of animal cells. A manual of basic technique. New York: Wiley-Liss; 2000: 345-84.

- 15-Rheinwald JG, Green H. Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocyte. *Nature* 1977; 265: 421-24.
- 16-Barrandon Y, Green H. Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: The roles of transforming growth factor C and epidermal growth factor. *Cell* 1987; 50: 1131-37.
- 17-Green H. Cyclic AMP in relation to proliferation of the epidermal cell: A new view. *Cell* 1987; 15: 801-811.
- 18-Sun TT, Green H. Differentiation of epidermal keratinocyte in cell culture: Formation of the cornified envelope. *Cell* 1976; 9: 511-21.
- 19-Barrandon Y, Green H. Cell size as a determinant of clone-forming ability of human keratinocyte. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 83:5390-94.
- 20-Green H. The keratinocyte as differentiated cell type. *Harvey Lect* 1980; 74: 101-38.
- 21-Allen-Hoffman BL, Rheinwald JG. Polycyclic aromatic hydrocarbon mutagenesis of human epidermal keratinocytes in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 7802-06.
- 22-O'Connor NE, Mulliken JB, Banks-Schlegel S, et al. Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet* 1981; 1: 75-78.
- 23-Dc Luca M, Albanese E, Bondanza S, et al. Multicentre experience in the treatment of burns with autologous and allogenic cultured epithelium, fresh or preserved in frozen state. *Burns* 1989; 15: 303-09.
- 24-Eldad A, Burt A, Clarke JA. Cultured epithelium as a skin substitute. *Burns* 1987; 13: 173-80.
- 25-Faure M, Mauduit G, Schmitt D, et al. Growth and differentiation of human epidermal cultures used as auto- and allografts in human. *Br J Dermatol* 1987; 116: 161-70.
- 26-Gallico GG, O'Connor NE, Compton CC, et al. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med* 1984; 311: 448-51.
- 27-Hefton JM, Madden MR, Finkelstein JL, et al. Grafting of burn patients with allografts of cultured epidermal cells. *Lancet* 1983; 2: 428-30.
- 28-Herzog SR, Meyer A, Woodley D, et al. Wound coverage with cultured autologous keratinocytes: Use after burn wound excision, including biopsy follow up. *J Trauma* 1988; 28: 195-98.
- 29-Kumagai N, Nishima H, Tanabe H, et al. Clinical application of autologous cultured epithelia for the treatment of burn wounds and burn scars. *Plast Reconstr Surg* 1988; 82: 99-108.
- 30-Levick PL, Blight A, Clancy JMP, et al. Generation of autografts: Current techniques and results. In: Teepe RGC, editor. *Clinical use of cultured epithelium in surgery and dermatology*. Wheathampstead, Herts, England: Medical and Scientific Conferences, Ltd.; 1987: 15-18.
- 31-Madden MR, Finkelstein JL, Staiano-Coico L, et al. Grafting of cultured allogeneic epidermis on second- and third-degree burn wounds on 26 patients. *J Trauma* 1986; 26: 955-62.
- 32-Teepe RGC, Ponec M, Kempenaar JA, et al. Clinical histological and ultrastructural aspects of cultured epithelium. In: Teepe RGC, editor. *Clinical use of cultured epithelium in surgery and dermatology*. Wheathampstead, Herts, England, Medical and Scientific Conferences, Ltd. ;1987: 36-45.

- 33-Teepe RGC, Kreis RW, Koebrugge EJ, et al. The use of cultured autologous epidermis in the treatment of extensive burn wounds. *J Trauma* 1990; 30: 269-75.
- 34-Paddle-Ledinek JE, Cruickshank DG, Masterton JP. Skin replacement by cultured keratinocyte grafts: An Australian Experience. *Burns* 1997; 23: 204-11.
- 35-Hickerson WL, Compton C, Fletchall S. Cultured epidermal autografts and allodermis combination for permanent burn wound coverage. *Burns* 1994; 20: 552-56.
- 36-Munster AM. Cultured skin for massive burns. A prospective, controlled trial. *Ann Surg* 1996; 224: 372-77.
- 37-Coleman JJ, Siwy BK. Cultured epidermal autografts: A life-saving and skin-saving technique in children. *J Pediatr Surg* 1992; 27: 1029-32.
- 38-Hefton JM, Caldwell D, Biozes DG, et al. Grafting of skin ulcers with cultured autologous epidermal cells. *J Am Acad Dermatol* 1986; 14: 399-405.
- 39-Leigh IM, Purkis PE, Navasaria HA, et al. Treatment of chronic venous ulcers with sheets of cultured allogenic keratinocytes. *Br J Dermatol* 1987; 117: 591-97.
- 40-Phillips TJ, Kehinde O, Green H, et al. Treatment of skin ulcers cultured epidermal allografts. *J Am Acad Dermatol* 1989; 21: 191-99.
- 41-DeLuca M, Albanese E, Cancedda R, et al. Treatment of leg ulcers with cryopreserved allogenic cultured epithelium. A multicenter study. *Arch Dermatol* 1992; 128: 633-38.
- 42-Limat A, Mauri D, Hunziker T. Successful treatment of chronic leg ulcers with epidermal equivalents generated from cultured autologous outer root sheath cells. *J Invest Dermatol* 1996; 107: 128-35.
- 43-Kumagai N, Matsuzaki K, Fukushi S, et al. Grafting of autologous cultured epithelium after excision of tattoos. *Ann Plast Surg* 1994; 33: 385-91.
- 44-Gallico GG, O'Connor NE, Compton CC, et al. Cultured epithelial autografts for giant congenital nevi. *Plast Reconstr Surg* 1989; 84: 1-9.
- 45-Guerra L, Capurro S, Melchi F, et al. Treatment of stable vitiligo by timed surgery and transplantation of cultured epidermal autografts. *Arch Dermatol* 2000; 136: 1380-89.
- 46-Garcia Fernandez E, Bejar JM, Alonso-Varona A, et al. Study of the human keratinocyte isolation methods and in vitro culture techniques in a single laboratory. *Eur J Plast Surg* 1998; 21: 353-57.
- 47-Parkinson EK, Yedull WA. The epidermis. In: Freshney RI, Freshney MG, editors. *Culture of epithelial cells*. New York: Wiley Liss; 2002: 65-94.
- 48-Phillips TJ, Provan A, Colbert D, et al. A randomized single blind controlled study of cultured epidermal allografts in the treatment of split-thickness skin graft donor sites. *Arch Dermatol* 1993; 129: 879-82.
- 49-Fratianne R, Papay F, Housini I, et al. Keratinocyte allografts accelerate healing of split-thickness donor site: Applications for improved treatment of burns. *J Burn Care Rehabil* 1993; 14: 148-54.