فهرست

پیشگفتار ۷

بخش اول: جداسازی و کشت آزمایشگاهی سلول‌های پوستی ۹

فصل ۱: جداسازی و کشت سلول‌های کراتینوسایت پوست انسانی ۱۱

فصل ۲: ارتقای پهن شوندگی سلول‌های کراتینوسیت اپیدرم انسانی در کشت ترکیبی با سلول‌های مغذی ۲۱

فصل ۳ : جداسازی و کشت سلول‌های ملانوسیت اپیدرم ۳۵

فصل ۴: پهن شوندگی طولانی مدت کراتینوسیت‌های اولیه‌ی اپیدرم موشی با استفاده از مهارکننده‌ی سیگنالینگ β-TGF ۴۷

فصل ۵: جداسازی و کشت سلول‌های استرومایی مزانشیمی غلاف درم فولیکول مو ۵۹

فصل ۶: جداسازی و کشت فیبروبلاست‌های درم انسانی ۶۷

فصل ۷: جداسازی و کشت سلول‌های اندوتلیال میکرو-عروقی درم انسانی ۷۵

فصل ۸: جداسازی شکاف عروقی استرومایی با شکنش بافت چربی ۸۵

بخش ۲: مهندسی بافت پوست و مدل‌های پوست مهندسی شده ۹۷

فصل ۹: مهندسی پوست چند لایه معادل: اهمیت بلوغ درون زا ماتریس خارج سلولی برای ارائه استحکام و تکرارپذیری ۹۹

فصل ۱۰: مدل اپیدرم سه بعدی حاصل از کراتینوسیت‌های مشتق از فولیکول موی انسان ۱۱۳

فصل ۱۱: ساخت سیستم کشت همزمان با سلول‌های غدد عرق انسانی و سلول‌های عصبی محیطی ۱۲۵

فصل ۱۲: مهندسی جایگزین پوست چند لایه با کراتینوسیت‌ها، فیبروبلاست‌ها، سلول‌های بنیادی چربی و مشتق از چربی ۱۳۵

فصل ۱۳: ساخت فولیکول‌های موی نوترکیب برای مهندسی بافت پوست ۱۴۳

فصل ۱۴: جداسازی و کشت سلول‌های اپیدرمولیز بولوزا (EB) و مدل‌های پوستی ارگانوتیپی ۱۵۹

بخش ۳: انواع مدلهای آزمایشگاهی برای آزمایش سلولهای پوستی و مهندسی بافت پوست ۱۶۷

فصل ۱۵: اثرات ماتریکس خارج سلولی بر پروتئوم فیبروبلاست‌های اولیه پوست ۱۶۹

فصل ۱۶: پروتکل‌های لازم جهت آماده‌سازی نمونه‌های پوستی از انسان برای میکروسکوپ الکترونی عبوری ۱۷۹

فصل ۱۷: روشهای ارزیابی رگ‌زایی عروق داربست در داخل بدن ۱۸۹

فصل ۱۸: پوست بازسازی شده در مدل‌های موشی ۱۹۷

فصل ۱۹: مدل خوکی برای آزمایش بافت مهندسی شده پوستی ۲۰۷

فصل ۲۰: پیوند جایگزین‌های پوست درمو-اپیدرم اتولوگ در مدل خوکی ۲۱۵

واژه‌یاب ۲۲۳

پیشگفتار

پوست به عنوان اولین سد محافظتی بدن عمل می‌کند. بزرگترین ارگان بدن علاوه بر محافظت، در هموستاز مایعات، تشخیص حس، تنظیم دمای بدن و... نیز فعال است. با آسیب به پوست، عملکردهای مذکور دچار اختلال می‌شود و سلامت بدن را به خطر می‌اندازد. از زمانهای دور توجهات و اقدامات بسیاری جهت تسریع ترمیم و بازگشت عملکرد پوست صورت می‌گرفت.

با پیشرفت علوم و تکنولوژی، روش‌های درمان نیز دچار تغییر می‌شود. مهندسی بافت علمی است که با هدف ایجاد جایگزین‌های زیستی که امکان بازیابی، حفظ و بهبود عملکرد بافت صدمه دیده را داشته باشند، مورد استفاده قرار می‌گیرد. اجزای اصلی در مهندسی بافت داربست، سلول‌ها و فاکتورهای رشد هستند. داربست یک ساختار سه بعدی است که به عنوان چارچوبی برای هدایت سلول‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد و جایگزینی برای ماتریکس خارج سلولی محسوب می‌شود. سلول‌ها به درون داربست نفوذ کرده و با توجه به سیگنال‌های فیزیکی و شیمیایی که در محیط اطراف آنها قرار دارد شروع به رشد، تمایز، تکثیر و مهاجرت می‌کنند و در صورت مساعد بودن شرایط محیطی ماتریکس خارج سلولی را ترشح کرده و بافت جدید را ایجاد می‌نمایند. علم مهندسی بافت به ساخت داربست‌های مناسب برای لانه‌گزینی سلول‌ها، ایجاد و حفظ شرایط محیطی مساعد برای ادامه حیات سلولی و در نتیجه کنترل تمام فاکتورهای موثر بر ایجاد یک بافت جدید می‌پردازد. پژوهشگران مهندسی بافت، تحقیقات گسترده‌ای برای بکارگیری این دانش در ترمیم و بهبود عملکرد پوست انجام داده‌اند و این دانش روز به روز در حال گسترش است.

این کتاب با بیان پروتکل‌های عملی و بروز بکارگیری مهندسی بافت در ترمیم آسیب‌های پوستی، به یک کتاب منحصربفرد تبدیل شده است. ترجمه این کتاب با دقت و حساسیت زیادی صورت گرفته است، اما بی‌تردید با وجود تلاش‌های فراوان مترجمین، مجموعه حاضر خالی از کاستی نمی‌باشد و امکان وجود اشکالات در زمینه‌های مختلف وجود دارد.

امید است کتاب حاضر، بتواند به پژوهشگران این حوزه جهت یافتن راهکارهای جدید ترمیم و بهبود عملکرد پوست، کمکی هر چند کوچک داشته باشد. شایسته است از بزرگوارانی که ما را در تمام مراحل ترجمه، ویراستاری و چاپ این کتاب مارا یاری کرده‌اند، نهایت تشکر و قدردانی را داشته باشیم.

در انتها از خداوند متعال سپاسگزاریم که این فرصت را به ما عنایت فرموده است تا بتوانیم قدمی هرچند کوچک در راستای گسترش علوم برداریم. سپاس و ستایش خدای جل و جلاله را که آثار قدرت او بر چهره روز روشن، تابان است و انوار حکمت او در دل شب تار، درفشان. آفریدگاری که خویشتن را به ما شناساند و درهای علم را بر ما گشود و عمری و فرصتی عطا فرمود تا بدان، بنده ضعیف خویش را در طریق علم و معرفت بیازماید.

تابستان ۱۴۰۱

بخش اول

جداسازی و کشت آزمایشگاهی سلول های پوستی

فصل ۱

جداسازی و کشت سلول‌های کراتینوسایت پوست انسانی

Sergio Cortez Ghio, Gaëtan Le-Bel, Amélie Lavoie, Danielle Larouche, and Lucie Germain

چکیده

کشت آزمایشگاهی سلول‌های کراتینوسایت، به منظور تشکیل ورقه‌های منسجم بافت پوششی (اپی‌تلیال)، درمان سوختگی‌های پوستی وسیع را بهبود بخشیده است. علاوه بر این از کراتینوسایت‌های کشت داده شده، جهت بررسی مکانیسم‌های سلولی و مولکولی مختلف دخیل در انواع آسیب شناسی بیماری‌های پوستی استفاده می‌شود. روش‌ها و شرایط قابل اطمینان برای حفظ سلول‌های بنیادی در طول کشت سلول‌های بافت پوششی، از اهمیت بالایی برخوردار است. در صورتی که کراتینوسیت‌ها به طرز مناسبی کشت داده شوند؛ مورفولوژی ثابت و مکعبی از خود نشان می‌دهند و می‌توانند تعداد بالایی از پاساژ سلولی را تجربه کنند. در این فصل، مواد و روش‌های مورد نیاز برای همه‌ی جنبه‌های کشت کارآمد کراتینوسیت‌ها جهت کاربردهای بالینی، یعنی نمونه‌برداری و انتقال بافت، جداسازی، کشت معمولی، زیر-کشت و انجماد سلولی توضیح داده شده است.

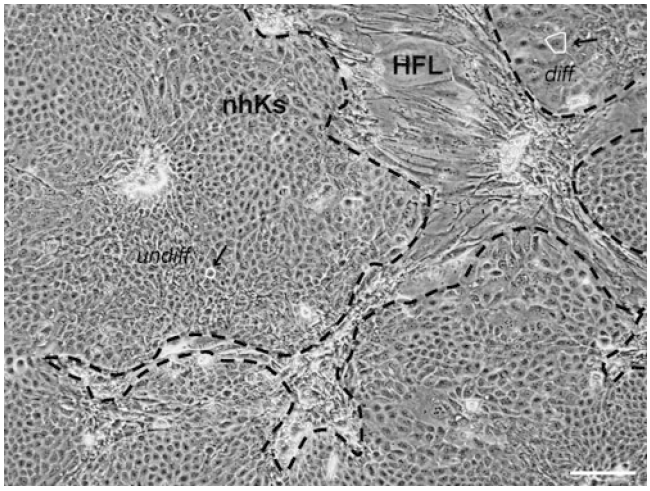
کلمات کلیدی

سلول درمانی، اتوگرفت بافت پوششی کشت داده شده، اپی درم، بافت پوششی، پزشکی بازساختی، مهندسی بافت، ترمیم زخم

■ ۱ مقدمه

سابقه‌ی کشت سلول‌های اپیدرم انسانی (کراتینوسیت‌ها) به سال ۱۹۵۷ میلادی باز می‌گردد[۱]. پس از آن، کشت گسترده‌ی آزمایشگاهی این سلول‌ها با استفاده از لایه‌های مغذی، توسط Rheinwald و Green در سال ۱۹۷۵ معرفی شد[۲]. شناسایی آنزیم دیسپاز، جهت تهیه‌ی ورقه‌های اپی درم[۳]، بعدها منجر به استفاده از ورقه‌های اپی درمی اتولوگ کشت شده برای پوشش مستقیم زخم‌های سوختگی یا محل زخم حاصل از برداشتن اتوگرفت در فرد اهدا کننده، جهت تسهیل بازسازی پوست شد[۴، ۵]. علاوه بر این، کشت کراتینوسایت‌ها برای بررسی مکانیسم‌های سلولی و مولکولی مختلف دخیل در آسیب شناسی بیماری‌های مختلف پوستی مانند سرطان پوست[۶]، اپیدرمولیز بولوسا[۷]، پسوریازیس[۸]، اسکلروز جانبی آمیوتروفیک[۹] و غیره نیز مناسب است.

پتانسیل درمانی یک گرفت اپی‌تلیالی اتولوگ با توانایی سلول‌های آن در حفظ پتانسیل تکثیر خود پس از کاشت، مرتبط است. یکی از بهترین روش‌ها برای ارزیابی کیفیت کشت کراتینوسیت‌ها مشاهده‌ی ویژگی‌های مورفولوژیکی سلول‌ها در طول زمان، توسط میکروسکوپ اختلاف فازی است[۱۰]. هنگامی که کراتینوسیت‌ها به درستی کشت داده شوند، مورفولوژی مکعبی از خود نشان داده و کلونی‌های بزرگی از سلول‌های کوچک تمایز نیافته با نسبت هسته به سیتوپلاسم بالا ایجاد می‌کنند که به آن‌ها هولوکلون گفته می‌شود. با بالا رفتن تعداد پاساژها، تمایز سلول‌ها افزایش یافته و پتانسیل تکثیر آن‌ها کاهش می‌یابد. سپس مقدار بیشتری از کراتینوسیت‌ها کلونی‌های کوچکی از سلول‌های بزرگ با نسبت هسته به سیتوپلاسم کم تشکیل می‌دهند که آن‌ها را پاراکلون (کلونی‌های رشد نکرده) می‌نامند. کراتینوسیت‌هایی که به طور کامل تمایز یافته‌اند؛ قابلیت تکثیرشان به طور گسترده‌ایی کاهش یافته و مورفولوژی کشیده و نامنظمی از خود نشان می‌دهند (شکل ۱).



شکل ۱: اولین پاساژ از کشت ترکیبی nhK–HFL، با بزرگنمایی ۱۰، تحت یک میکروسکوپ اختلاف فازی. خط چین‌های سیاه، nhk (کلونی سلول‌های کراتینوسایت مکعبی کوچکتر) و HFL (سلول‌های کراتینوسایت کشیده) را از هم جدا می‌کند. کانفلوئنسی nhK_s، ۷۵٪ برآورد شده‌است. nhK_s تمایز نیافته (undiff) در مقایسه با nhK_s تمایز یافته (diff) کوچک‌تر هستند و نسبت هسته به سیتوپلاسم بیشتری دارند. سلول‌های انفرادی هر فنوتیپ با خطوط سفید و پیکان‌های سیاه مشخص می‌شوند. مقیاس ۲۰۰ میکرومتر است.

ما در آزمایشگاه از روش‌هایی که برگرفته شده از روش‌های Rheinwald و Green هستند؛ برای تقویت عملکرد کراتینوسیت‌ها جهت تحقیقات و کاربردهای بالینی استفاده می‌کنیم[۲]. در واقع، تغییرات در پروتکل‌های اصلی با گذشت زمان انجام شده است. اکنون لایه‌های مغذی متشکل از فیبروبلاست غیر تکثیرشونده‌ی پوست انسانی، جایگزین لایه‌های نامیرای فیبروبلاست جنین موشی شده است[۱۱-۱۳] و علاوه بر آن، سم وبا که یک القا کننده‌ی چرخه‌ای AMP است؛ با ایزوپروترنول که یک مولکول مصنوعی است و نقش مشابه سم وبا را در سلول‌های اپی‌تلیال ایفا می‌کند؛ جایگزین شده است[۱۴، ۱۵]. در این فصل، روش‌ها و مواد قابل اعتماد مورد نیاز برای همه‌ی جنبه‌های کشت کراتینوسیت، یعنی نمونه‌برداری و انتقال بافت، جداسازی، کشت معمولی، زیر-کشت و انجماد سلولی توضیح داده شده است. تمام روش‌های شرح داده شده در این جا، به طور کامل مورد آزمایش قرار گرفته و جهت درمان بیماران استفاده می‌شوند[۱۶، ۱۷]. محصولات، شناساگرها و موادی که مورد استفاده قرار می‌گیرند؛ بر اساس میزان دسترسی به آن‌ها، کارایی، کیفیت و ایمنی مطابق با دستورالعمل‌های GMP انتخاب شده اند(گرید USP یا GMP در صورت موجود بودن).

■ ۲ مواد

۲-۱ DME-HAM:

سه بخش از محیط کشت DMEM را با یک قسمت از محیط کشت Ham در آب فوق خالص آپیروژنیک ترکیب کنید. سپس، سدیم بی کربنات با غلظت g/L ۳/۰۷ (۳۶/۵۴ mM) و آدنین با غلظت ۲۴/۳ mg/L (۰/۱۸ mM) که در هیدروکلریک اسید N۲ با غلظت ۳۱۲/۵ µL/L حل شده است را به محلول اصلی اضافه کنید. pH را روی ۷/۱ تنظیم کنید و پس از آن، محلول حاصل را از طریق فرآیند فیلتراسیون با استفاده از فیلتر یکبار مصرف ۰/۲۲ µm اتصال ضعیف (رجوع به زیربخش ۷,۲) استریل کنید و در دمای ۴℃، در تاریکی نگه‌داری کنید.

۲-۲ سرم

۱- سرم جنین گوساله

۲- سرم جنین کلون II

سرم‌ها را در دمای ۴℃ یا در آب سرد ذوب کنید (رجوع به یاد داشت ۱). آن را به آرامی تکان دهید تا اجزای آن معلق شود. سپس، برای غیر فعالسازی آن، به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب ۵۶℃ قرار دهید. جهت جلوگیری از چرخه‌های مکرر ذوب و انجماد، در مقادیر یکبار مصرف توزیع کنید. جهت نگه‌داری طولانی مدت در دمای ۲۰℃- یا ۸۰℃- نگه‌داری شود.

۲-۳ مواد افزودنی

۱- انسولین: غلظت ۵ mg/mL در ۵ mM از HCl تهیه شود. این کار، بازدهی محلول پایه را ۱۰۰۰ برابر می‌کند.
۲- فاکتور رشد اپیدرمی (EGF): غلظت ۲۰۰ µg/mL در ۱۰ mM HCl تهیه شود. سپس، محلول را با استفاده از محلول DME-Ham (رجوع به زیرفصل ۱,۲) که حاوی ۱۰٪ v/v سرم جنین کلون II (رجوع به زیرفصل ۲,۲، مورد ۲) است؛ با نسبت ۱ به ۲۰ رقیق کنید. این کار، بازدهی محلول پایه را ۱۰۰۰ برابر می‌کند.
۳- هیدروکورتیزون: غلظت ۵ mg/mL در اتانول ۹۵٪ درصد تهیه شود. سپس، با استفاده از DME-Ham (رجوع به زیرفصل ۱,۲) محلول را با نسبت ۱ به ۲۵ رقیق کنید. این کار، بازدهی محلول پایه را ۵۰۰ برابر می‌کند.
۴- پنی‌سیلین G / جنتامایسین: ۵۰۰۰۰ IU/ml پنی‌سیلین G و ۱۲/۵ mg/mL جنتامایسین فعال در آب فوق خالص آپیروژنیک تهیه کنید. این کار، بازدهی محلول پایه را ۵۰۰ برابر می‌کند.
۵- ایزوپروترنول هیدروکلراید: غلظت ۰/۲ mg/mL، در یک ویال یکبار مصرف تهیه کنید.
۶- فانگیزون: غلظت ۰/۲۵ mg/mL از آمفوتریسین B در آب فوق خالص آپیروژنیک تهیه کنید. این کار، بازدهی محلول پایه را ۵۰۰ برابر می‌کند.

همه‌ی افزودنی‌ها به جز ایزوپروترنول (رجوع به زیرفصل ۳,۲، مورد ۵) را از طریق فرآیند فیلتراسیون با استفاده از فیلتر یکبار مصرف ۰/۲۲ µm اتصال ضعیف (رجوع به زیرفصل ۷,۲) استریل کنید. برای جلوگیری از چرخه‌ی ذوب و انجماد مکرر، در مقادیر یکبار مصرف توزیع کنید و در دمای ۸۰ ℃- نگه‌داری شود.

۲-۴ محیط کامل

۱- محیط انتقال بافت (tDMEM): ۱۰٪ v/v از سرم جنینی گوساله (زیرفصل ۲,۲، مورد ۱) را به محیط کشت DMEM با غلظت گلوکز ۴/۵ g/L (حاوی پیروات سدیم و L-گلوتامین) اضافه کنید. سپس، پنی‌سیلین G / جنتامایسین و فانگیزون (رقیق کردن به میزان ۱ واحد در محلول؛ رجوع به زیرفصل ۳,۲، موارد ۴ و ۶) را اضافه کنید و در تاریکی در دمای ۲۰ ℃- تا ۸۰ ℃- تا مدت ۶ ماه یا در دمای ۴ ℃ تا ۱۰ روز نگه‌داری کنید.
۲- محیط کشت کامل کراتینوسیت (ckDME-Ham): ۵٪ v/v از سرم جنین کلون II (رجوع به زیرفصل ۲,۲، مورد ۲) را به DME-Ham اضافه کنید (رجوع به زیرفصل ۱,۲)، و سپس غلظت ۱/۰۶ mL/L ایزوپروترنول اضافه کنید (رجوع به زیرفصل ۳,۲، مورد ۵). پس از آن، انسولین، فاکتور رشد اپیدرمی، هیدروکورتیزون و پنی‌سیلین G / جنتامایسین را اضافه کنید (رقیق کردن به میزان ۱ واحد در محلول؛ رجوع به زیرفصل ۳,۲، موارد ۱ تا ۴) و در تاریکی در دمای ۴ ℃ تا ۱۰ روز ذخیره کنید.
۳- محیط انجماد سلولی: ۱۰٪ v/v از دی متیل سولفوکسید(DMSO) را به سرم جنین گوساله اضافه کنید (رجوع به زیرفصل ۲,۲، مورد ۱). سپس، محلول حاصل را یا در یخ یا در دمای ۴ ℃ نگه‌داری کنید و در طول روز استفاده کنید (رجوع به یاد داشت ۲).
۴- تمام اجزای منجمد را می‌توان در دمای ۴ ℃ ذوب کرد (رجوع به نکته‌ی ۱).

۲-۵ محلول‌های دیگر

۱- فسفات بافر سالین (PBS): ۱۲۷ mM از NaCl، ۲/۷ mM از KCl، ۶/۵ mM از Na_2HPO_4 و ۱/۵ mM از KH_2PO_4 را در آب فوق خالص آپیروژنیک حل و pH را بین ۷/۳۵ تا ۷/۴۵ تنظیم و در دمای اتاق نگه‌داری کنید. این کار، بازدهی محلول پایه را ۱۰ برابر می‌کند.
۲- PBS-پنی‌سیلین G /جنتامایسین/فانگیزون (PBS-P/G/F): ۱۰ قسمت از PBS (رجوع به زیربخش ۵,۲، مورد ۱) را به وسیله‌ی ۱ قسمت از آب فوق خالص آپیروژنیک رقیق کنید. سپس، محلول حاصل را از طریق فرآیند فیلتراسیون با استفاده از یک فیلتر قابل دسترس و یکبار مصرف ۰/۲۲ µm اتصال ضعیف (رجوع به زیربخش ۷,۲، مورد ۱) استریل کنید و پنی‌سیلین G /جنتامایسین و فانگیزون را اضافه کنید (رقیق کردن به میزان ۱ واحد در محلول؛ رجوع به زیرنویس ۳,۲، موارد ۴ و ۶).
۳- HEPES/KCl/NaCl: ۰/۱ M از ۴-(۲-هیدروکسیل)-۱-پیپرازین اتان سولفونیک اسید (HEPES)، ۶۷ mM از KCl و ۱/۴۲ mM از NaCl را در آب فوق خالص آپیروژنیک حل و pH را روی ۷/۳ تنظیم کنید و محلول را در تاریکی و دمای ۴ ℃ نگه‌داری کنید (رجوع به یاد داشت ۳). این کار، بازدهی محلول پایه را ۱۰ برابر می‌کند.

۴- HEPES/KCl/NaCl – $CaCl_2$: ۱۰ قسمت از HEPES/KCl/NaCl را با استفاده از ۱ قسمت آب فوق خالص آپیروژنیک رقیق کنید (رجوع به زیرفصل ۵-۲، مورد ۳). پس از آن، ۱ mM از $CaCl_2$ را اضافه، pH را روی ۷/۴۵ تنظیم و محلول را در تاریکی و دمای ۴℃ نگه‌داری کنید.

۵- ترمولیزین: ۵۰۰ µg/mL از HEPES/KCl/NaCl – $CaCl_2$ (رجوع به زیرفصل ۵،۲، مورد ۴) را از طریق فرآیند فیلتراسیون با استفاده از یک فیلتر قابل دسترس و یکبار مصرف ۰/۲۲ µm اتصال ضعیف (رجوع به زیربخش ۷،۲، مورد ۱) استریل کنید و در دمای ۴℃ نگه‌داری و در طول روز استفاده کنید.

۶- تریپسین/EDTA: مقدار ۰/۰۵٪ w/v تریپسین، ۰/۰۱٪ w/v EDTA و ۲/۸ mM از D-گلوکز را به ۱ واحد PBS (زیرفصل ۵،۲، مورد۱) بیفزایید. سپس، ۱۰۰۰۰۰ IU/L پنی‌سیلین‌G، ۲۵ mg/L جنتامایسین فعال و ۰/۰۰۰۷۵٪ v/v از محلول پیش از استریل فنل قرمز-آب با غلظت ۰/۱٪ را اضافه نمایید. pH را روی ۷/۴۵ تنظیم و محلول را از طریق فرآیند فیلتراسیون با استفاده از یک فیلتر قابل دسترس و یکبار مصرف ۰/۲۲ µm میکرومتر اتصال ضعیف (رجوع به زیربخش ۷،۲، مورد ۱) استریل کنید. جهت جلوگیری از چرخه‌های مکرر ذوب و انجماد، در مقادیر یکبار مصرف توزیع کنید و در دمای ۲۰℃- تا ۸۰℃- نگه‌داری کنید.

۲-۶ بافت‌ها و سلول‌ها

۱- کراتینوسیت‌های طبیعی انسان (nhk): مساحت ۶-۳ cm^2 پوست انسان، توسط جراحی برداشته می‌شود.

۲- لایه‌ی فیبروبلاست‌های انسانی (HFL): فیبروبلاست‌های تابش نشده‌ی غیر تکثیر شونده (رجوع به نکته‌ی ۴) که از بیوپسی‌های پوست معمولی استخراج شده است (رجوع به نکته‌ی ۴)؛ در تعداد ۱۵۰۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰۰ (رجوع به زیرفصل ۷،۲، مورد ۹)، در ۵ mL تا ۶ ml از ckDME-Ham (رجوع به ۴،۲، مورد ۲) در هر ۲۵ cm^2 از فلاسک، کشت داده‌اند. محیط کشت، باید هر ۷ روز یکبار عوض شود. سلول‌های HFL کشت داده شده، در کربن دی اکسید ۸٪، رطوبت ۱۰۰٪ و دمای ۳۷℃ انکوبه می‌شوند. سلول‌های HFL کشت داده شده، باید ظرف ۳۰ روز استفاده شود.

۲-۷ تجهیزات آزمایشگاهی

۱- برای حجم‌های کمتر از ۱۰۰ mL: فیلتر یکبار مصرف ۰/۲۲ µm اتصال ضعیف. برای حجم‌های بیش‌تر از ۱۰۰ mL: هر واحد فیلتراسیون با قطر ۴۷ mm و مجموعه فیلتر ۰/۲۲ µm نصب شده است.

۲- بیوپسی استریل یا ظرف جمع‌آوری ادرار

۳- لوله‌های ۵۰ mL

۴- پتری دیش‌های کشت سلول با ابعاد ۱۰۰ mm*۱۵

۵- انبرهای جراحی مخصوص برش‌های انحنا دار

۶- چاقوی جراحی سایز ۴ و تیغه‌ی سایز ۲۲

۷- فلاسک کشت سوسپانسیون ۵۰ mL، Celstir®

۸- پارافیلم

۹- فلاسک‌های کشت بافت با مساحت ۲۵ cm^2 یا ۷۵

۱۰- ویال‌های استریل شده، مخصوص فرآیندهای انجماد

۱۱- ظرف انجماد

■ ۳ روش‌ها

همه‌ی اقدامات، باید زیر یک هود استریل با جریان هوای خطی انجام شود.

۳-۱ نمونه‌برداری و انتقال بافت

۱- بلافاصله پس از جراحی استریل برداشتن پوست (رجوع به نکته‌ی ۵)، بیوپسی پوست را درون یک ظرف استریل حاوی tDMEM سرد (۴℃) قرار دهید.

۲- نمونه‌ها باید درون یخ نگه‌داری شده و سریعا به محل کشت سلولی منتقل شوند.

۳-۲ جداسازی

۱- نمونه‌ی پوستی (رجوع به زیرفصل ۱،۳) را شستشو دهید؛ بدین گونه که آن را به یک لوله‌ی ۵۰ mL که حاوی ۳۰ mL از PBS-P/G/F است، انتقال داده و سپس با سرعت بالا تکان دهید. با انبرهای جراحی استریل، نمونه را به لوله‌ی ۵۰ mL دیگری که حاوی ۴۵-۳۰ mL از PBS-P/G/F تازه است؛ منتقل کنید. این کار را ۸ بار دیگر تکرار کنید و در مجموع ۱۰ بار نمونه را شستشو دهید.

۲- از پنس خمیده جهت پخش آرام نمونه‌ی پوستی (لایه‌ی بالایی اپی درم)، در پتری دیش استفاده کنید.

۳- در صورت لزوم، از یک چاقوی جراحی با تیغه‌ی ۲۲ جهت برش نمونه‌ها به شکل نوارهایی با ابعاد ۳ mm * ۱۰۰ تا ۱۵۰ استفاده کنید. اگر پوست مودار است (یعنی بافت پوست سر)، نوارهای ۳ mm * ۳ ترجیح داده می‌شود.

۴- ۱۰ mm از ترمولیزین سرد (۴℃) را به پتری دیش حاوی نوارهای کوچک پوست اضافه کنید(رجوع به نکته‌ی ۶).

۵- پتری دیش را به وسیله‌ی پارافیلم به خوبی مهر و موم کرده و یک شب در ۴℃ انکوبه کنید.

۶- از دو پنس خمیده برای جدا کردن دقیق اپی درم از درم استفاده کنید (در صورت وجود مو، آن‌ها را با ظرافت بکشید تا کراتینوسیت‌های فولیکول مو جمع‌آوری شود). جهت تفکیک nhK_s، نوارهای اپیتلیال (اپی درم و مو) را در یک فلاسک کشت سوسپانسیونی®Celstir که حاوی ۲۰ mL تریپسین/EDTA گرم (۳۷-۲۲℃) است؛ قرار دهید.

۷- تحت همزدن به مدت ۳۰-۱۵ دقیقه در دمای ۳۷℃، مواد مرحله‌ی قبل را انکوبه کنید.

۸- مقدار ۱۰ mL از ckDME-Ham گرم (۳۷-۲۲℃) را به فلاسک کشت سلول اضافه کنید. سوسپانسیون ۲۰ mL از nhK_s را به یک لوله‌ی ۵۰ mL که حاوی ۱۰ mL از ckDME-Ham گرم است؛ منتقل کنید. فلاسک کشت غیرچسبنده را با ۱۰ mL از ckDME-Ham گرم بشویید و به لوله‌ی ۵۰ mL اضافه کنید.

۹- برای شمارش nhK_s از شمارش گر سلولی خودکار یا هموسایتومتر استفاده کنید. انتظار می‌رود که حدود ۳ تا ۴ میلیون nhK_s، در هر cm^2 از بیوپسی پوست وجود داشته باشد و اندازه‌ی سلول‌ها نیز باید بین ۶ µm تا ۱۴ باشد.

۱۰- برای برآورد میزان زنده مانی سلول‌ها از تکنیک رنگ‌آمیزی تریپان بلو و هموسایتومتر استفاده کنید. انتظار می‌رود زنده مانی سلول‌ها بیش از ٪۸۰ باشد.

۱۱- سوسپانسیون nhK_s را به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق، سانتریفیوژ (۳۰۰ g) کنید.

۱۲- مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ سوسپانسیون سلولی را برداشته و nhK_s را با غلظت مورد نظر در ckDME-Ham گرم، مجدداً معلق کنید.

۱۳- nhK_s را در دانسیته‌ی ۱۰۰۰۰۰ سلول در هر cm^2 ۲۵ یا بیشتر از آن (رجوع به نکته‌ی ۷) در یک فلاسک کشت که از قبل HFL در آن، کشت شده است؛ کشت دهید. کشت را مستقیماً در محیط کشت، انجام دهید. حجم کل متوسط نباید از ۷ mL بر cm^2 ۲۵ بیشتر شود. اگر برنامه ریزی به گونه‌ایی انجام شود که تعویض محیط کشت HFL در روزی انجام شود که کشت nhk_s صورت گرفته است (۷ روز از آخرین تعویض محیط کشت HFL گذشته باشد)؛ فقط نیمی از محیط کشت HFL را با ckDME-Ham گرم جایگزین کنید.

۳-۳ کشت

۱- کشت ترکیبی دو نوع سلول nhK-HFL (رجوع به زیرفصل ۲،۳، مرحله‌ی ۱۳ و زیرفصل ۶،۳، مرحله‌ی ۱۰) را در شرایط کربن دی اکسید ٪۸، رطوبت ٪۱۰۰ و دمای ۳۷℃ انکوبه کنید.

۲- محیط کشت را سه بار در هفته، هر ۲ تا ۳ روز عوض کنید. محیط کشت را از فلاسک کشت خارج کنید و آن را با ckDME-Ham گرم (۳۷-۲۲℃) جایگزین کنید.