زیست‌شناسی جانوری، سال شانزدهم، شماره دوم، زمستان ۱۴۰۲، صفحات ۱۳۲-۱۲۳

مقاله پژوهشی

بررسی زنده‌مانی گرافت تمام ضخامت پوست انسان و استفاده از آنتی‌بیوتیک جنتامایسین در این فرآیند در شرایط آزمایشگاهی

مرجان محمدعلی[۱]، علی غیاث‌الدین[۲،۳*]، شیوا ایرانی[۱]، محمد امیر امیرخانی[٤]، مصطفی ده مرده‌ئی[٥]

۱- گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- مرکز تحقیقات سلول‌های بنیادی و پزشکی بازساختی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- گروه علوم تشریحی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

٤- مرکز تحقیقات پوست و سلول‌های بنیادی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

٥- گروه جراحی پلاستیک و ترمیمی، مرکز تحقیقات سوختگی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: a.ghiaseddin@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۲۹

DOI: 10.22034/ascij.2023.1981473.1473

چکیده

امروزه استفاده از گرافت‌های پوستی برای جایگزینی موقت پوست از دست رفته یا آسیب دیده در سراسر جهان انجام می‌شود. آلودگی‌های طبیعی می‌توانند روی پوست وجود داشته باشند و این آلودگی می‌تواند تهدیدی برای گیرندگان گرافت باشد. در این مطالعه، پس از دریافت نمونه گرافت پوست تمام ضخامت انسان و کشت آن در شرایط آزمایشگاهی، از نظر زنده‌مانی سلولی و وجود آلودگی باکتریایی به مدت ۷۲ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان آلودگی میکروبی در حضور و عدم حضور آنتی‌بیوتیک جنتامایسین با غلظت ۰/۰۲ درصد توسط روش‌های استاندارد مورد بررسی قرار گرفت. زنده‌مانی بالای سلول‌ها در طول مدت ۷۲ ساعت در نمونه بافت پوستی نرمال توسط تست رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج تایید شد. مشاهدات میکروسکوپ الکترونی، تصاویر رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین و تری کروم ماسون تفاوت بین دو گروه مورد آزمایش را به وضوح نشان داد. کشت گرافت پوست در عدم حضور جنتامایسین بدلیل آلودگی با باکتری، لایه‌های درم و اپیدرم (به جز لایه شاخی) را از دست داد که در تصاویر بدست آمده قابل مشاهده است. در نهایت نتایج بدست آمده تاثیر میزان آلودگی میکروبی بالا بر پوست را که می‌تواند در اثر عوامل مختلف باشد به خوبی نشان می‌دهد.

کلمات کلیدی: گرافت پوستی انسان، زنده‌مانی، آلودگی باکتریایی، جنتامایسین.

مقدمه

پوست بزرگترین اندام بدن است که ۱٦ درصد وزن یک فرد بالغ را تشکیل می‌دهد (۸، ۱۳). عملکرد اصلی پوست انسان، حفاظت از اندام‌ها به عنوان یک سد فیزیولوژیکی است و از این رو، پوست در معرض بسیاری از مواد شیمیایی و عوامل بیولوژیکی مانند لوازم آرایشی، مواد پاک‌کننده پوست، نور ماوراء بنفش، پاتوژن‌ها، آلودگی‌های محیط زیست و میکروارگانیسم‌ها قرار دارد. افزایش سریع این عوامل می‌تواند واکنش‌های مختلف پوست مانند التهاب پوست، تحریک، آلرژی و حتی سرطان را ایجاد کند.

همچنین بسیاری از بیماری‌ها، و همچنین عوارض جانبی داروها، خود را از طریق علائم پوستی نشان می‌دهند (۱۰). پوست علاوه برتنظیم محیط فیزیولوژیکی بدن در حفاظت از بدن در برابر عوامل بیماری‌زا و باکتری‌ها نیز نقش دارد (۱۷). بنابراین حفظ ساختار و پوشش پوست در انسان ضروری است. پیوند پوست در بسیاری از روش‌های بالینی مانند برداشتن پوست، اسکار، آسیب شدید پوست ناشی از سوختگی، تصادف و تروما مورد نیاز است. استاندارد فعلی برای روش‌های جایگزینی نقص پوست، استفاده از گرافت‌های پوستی اتولوگ است. گرافت‌های پوستی با ضخامت کامل از لایه‌های اپیدرم و درم تشکیل شده اند. این گرافت‌ها یک روش ساده و قابل اعتماد برای پوشاندن عیوب پوستی و بازسازی و ترمیم نواقص پوستی در نواحی که به جهت زیبایی نیازمند پوشش پوستی هستند، می‌باشد. با این حال، در دسترس بودن بافت در ناحیه اهداکننده به عنوان یک مانع بزرگ برای جایگزینی موفقیت آمیز نقایص پوستی باقی می‌ماند (۱۸، ۹).

گسترش عفونت در درجه اول به نوع و عملکرد باکتری و مقاومت بافت در برابر عفونت بستگی دارد. در انواع خاصی از جراحی ها استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها یک اقدام حیاتی مهم در برابر عفونت زخم است.

جنتامایسین یک آنتی‌بیوتیک آمینوگلیکوزاید پرمصرف است که دارای فعالیت ضد باکتریایی علیه باکتری‌های گرم منفی هوازی شامل اعضای خانواده انتروباکتریاسه و سودوموناداسه و ارگانیسم گرم‌مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* است. پاتوژن‌های بیمارستانی اغلب در کشت نمونه‌هایی از بخش‌های مراقبت‌های ویژه جراحی و بیماران سوختگی به این گروه تعلق دارند (٤).

جنتامایسین به دلیل مؤثر بودن در برابر طیف وسیع تری از باکتری‌ها و در برابر برخی از سویه‌های مایکوپلاسما، مورد پذیرش فزاینده ای قرار گرفته است. علاوه بر این، جنتامایسین نسبت به پنی سیلین/استرپتومایسین در محیط کشت بافت به ویژه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، دمایی که برای رشد سلول‌های پستانداران استفاده می‌شود، پایداری بیشتری دارد (۷).

بدین منظور در این مطالعه، گرافت پوست نرمال انسانی جهت بررسی ساختار و زنده مانی به مدت ۷۲ ساعت در دو شرایط حضور و عدم حضور آنتی‌بیوتیک جنتامایسین کشت داده شد. همچنین در این مطالعه سعی شد به طور کامل تصویری از ساختار بافت پوست سالم و بافتی که آلوده به باکتری است نشان داده شود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه بافتی: نمونه‌های گرافت پوستی تمام ضخامت از بیماران در طی عمل جراحی در بیمارستان سوانح سوختگی شهید مطهری و با رعایت اصول اخلاقی (کد اخلاق: IRI.IAU.SRB.REC.1400. 172) جمع‌آوری شد که در آن پوست اضافی سالم به عنوان بخشی از عمل برداشته شد.

کشت بافت پوست نرمال: نمونه‌های پوستی درون بافر نرمال سالین (PBS) حاوی آنتی‌بیوتیک پنی-سیلین/استرپتومایسین (۱ درصد) و بر روی یخ تا رسیدن به آزمایشگاه حمل گردید. سپس گرافت پوستی پس از شستشو با PBS، توسط قیچی و اسکالپل به قطعاتی به ابعاد ۱ × ۱ سانتی‌متر و با ضخامت ۰/٤ میلی‌متر برش خورد و درون پلیت کشت سلول حاوی محیط کشت ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، در حضور آنتی‌بیوتیک جنتامایسین با غلظت ۰/۰۲ درصد و عدم حضور، به درون انکوباتور (CO_2 ۵ درصد و رطوبت ۹۰ درصد

و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد) جهت بررسی و انجام آزمایشات منتقل شد.

بررسی میزان زنده‌مانی: جهت تعیین میزان حیات سلولی، بعد از ۷۲ ساعت از زمان کشت گرافت پوست در محیط کشت حاوی FBS ۱۰ درصد و در دو گروه حضور و عدم حضور آنتی‌بیوتیک جنتامایسین با غلظت ۰/۰۲ درصد از رنگ فلورسنت آکریدین اورنج استفاده گردید. رنگ آکریدین اورنج (AO) به راحتی از غشای سلول‌های زنده عبور کرده و در نهایت به DNA متصل می‌شود. اگر رنگ آکریدین اورنج به دئوکسی ریبونوکلئیک اسید دورشته‌ای (DNA) متصل شود در بازنشر نوری رنگ سبز تولید می‌کند. همچنین اگر به RNA متصل شود رنگ ضعیفی در محدوده رنگ قرمز تولید می‌کند. ابتدا نمونه‌ها در پارافرمالدئید ٤ درصد فیکس شدند. مرحله آبگیری از بافت دومین مرحله از مراحل آماده‌سازی بافت جهت رنگ‌آمیزی محسوب می‌شود. در این مرحله آب موجود در بافت و همچنین ماده فیکساتیو از آن خارج می‌شود. بدین منظور از الکل با درجات صعودی (۷۰، ۸۰، ۹۰، ۹٦ درصد و الکل مطلق) استفاده گردید. در مرحله بعد قالب‌گیری از نمونه‌ها انجام گرفت. برش‌گیری بوسیله دستگاهی به نام میکروتوم انجام گرفت. پارافین موجود در اطراف بافت‌ها مانع از نفوذ رنگ به داخل برش‌های بافتی می‌شود. لذا به منظور زدودن پارافین، نمونه‌های فیکس شده بر روی لام در ظرف حاوی گزیلول به مدت ده دقیقه قرار گرفتند. سپس با استفاده از الکل اتیلیک با درجات نزولی الکل مطلق، ۹۰، ۸۰ و۷۰ درصد عمل آبدهی صورت گرفت. پس از این مرحله نمونه‌های بافت پوستی به مدت ۱۰ دقیقه در معرض رنگ آکریدین اورنج در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و پس از شستشو با PBS نمونه‌های بافت پوستی توسط میکروسکوپ فلورسنت بررسی گردید.

مورفولوژی بافت توسط تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونی نگاره: به منظور بررسی مورفولوژی سلول‌های بافت پوستی، از میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) استفاده گردید. ابتدا سلول‌های بافت پوست در هر دو گروه (حضور و عدم حضور جنتامایسین) با استفاده از ماده گلوتارالدهید ٤ درصد به مدت ۲ ساعت فیکس شدند و جهت دهیدراته کردن سلول‌های بافت در سری غلظت اتانول از ٦۰ تا ۱۰۰ درصد قرار داده شدند. سپس بافت بوسیله‌ی پوشش دهنده ی اسپاتر با طلا پوشش داده و در نهایت برای تصویربرداری با SEM آماده گردید.

رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین: هماتوکسیلین هسته سلول‌ها را به رنگ آبی مایل به ارغوانی رنگ‌آمیزی می‌کند و ائوزین ماتریکس برون‌یاخته‌ای و سیتوپلاسم را به رنگ صورتی در می‌آورد. جهت رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین ائوزین پس از ۷۲ ساعت از کشت نمونه‌های بافت پوستی، رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین انجام گردید. ابتدا نمونه‌های گرافت پوستی توسط فرمالدئید ٤ درصد فیکس شدند و پس از قالب گیری با پارافین، برش گیری توسط دستگاه میکروتوم بر روی لام انجام گرفت. در مرحله بعد، پارافین زدایی توسط گزیلول انجام شد. با استفاده از الکل اتیلیک با درجات نزولی الکل مطلق،۹۰، ۸۰ و ۷۰ درصد عمل آبدهی صورت گرفت. سپس به منظور رنگ‌آمیزی، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در رنگ هماتوکسیلین قرار گرفتند و پس از شستشو با آب مقطر، نمونه‌ها در ظرف حاوی ائوزین به مدت ۱۰- ۵ دقیقه قرار داده شدند و به مدت ۳-۲ دقیقه با آب مقطر شستشو داده شدند. به منظور آبگیری نمونه‌ها در ظرف محتوی الکل اتیلیک و در هر کدام به مدت ۳ دقیقه با درجات صعودی (۷۰، ۸۰، ۹۰ درصد و الکل مطلق) قرار گرفتند. در نهایت پس از خشک شدن

لام‌ها، نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرافتند.

رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون: جهت رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون پس از کشت نمونه‌های بافت پوستی در هر دو گروه در پلیت کشت سلول، ۷۲ ساعت پس از کشت مراحل زیر به ترتیب انجام گردید. در ابتدا تثبیت بافت با استفاده از محلول پارافرمالدئید ٤ درصد انجام گرفت و پس از برش‌گیری از بافت پارافین‌گیری شده با ضخامت ۵ میکرومتر، نمونه رنگ‌آمیزی گردید. لام‌های حاوی نمونه تثبیت شده به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هماتوکسیلین آهن قرار داده شدند. سپس لام‌ها با آب مقطر شستشو داده شدند. در مرحله بعد، به مدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه در محلول بیبریچ اسکارلت- اسید فوشین قرار گرفتند. جهت افتراق از محلول اسید فسفومولیبدیک فسفو تنگستیک استفاده شد. سپس نمونه‌ها به محلول آنیلین بلو منتقل و سپس شستشو گردید. در مرحله بعد دهیدراسیون نمونه با استفاده از الکل ۹۵ و ۱۰۰ درصد انجام گرفت. این مرحله باعث از بین رفتن بیبریچ اسکارلت- اسید فوشین می‌شود. در آخر نمونه‌ها توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند.

آنالیز آماری: داده‌های بدست آمده برای بررسی اهمیت آماری با استفاده از برنامه آنالیز t-test مورد تحلیل آماری قرار گرفت. آزمایشات به صورت سه تکرار انجام شد. نتایج توسط نرم‌افزار SPSS (ورژن ۲۳)، و در سطح معنی‌داری $p <$ ۰/۰۵ تحلیل شد.

نتایج

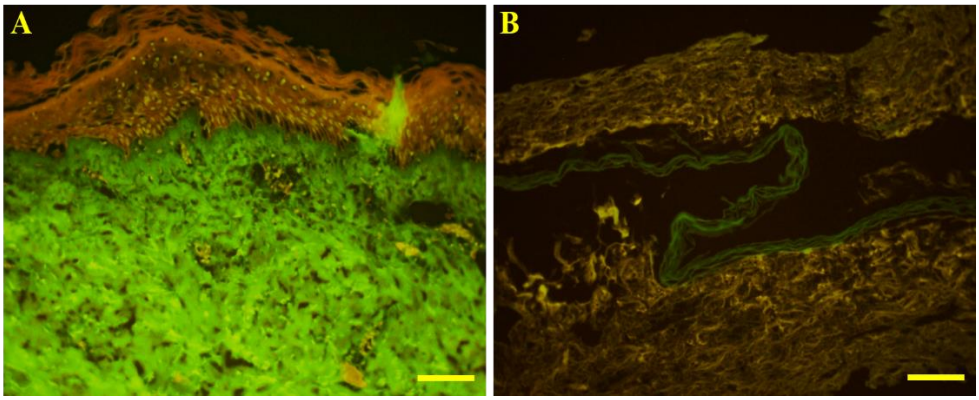
بررسی میزان زنده مانی: جهت بررسی میزان زنده-مانی سلول‌های بافت پوست کشت شده در پتری دیش، از رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج استفاده گردید. همانطور که در شکل ۱ مشاهده میشود، جمعیت زنده سلولهای بافت پوست در دو لایه اپیدرم و درم در نمونه‌های بافت نرمال نسبت به نمونه ای آلوده شده با باکتری در طی ۷۲ ساعت بالاتر بود. رنگ سبز سلول‌ها در نمونه‌های نرمال تاییدی بر این موضوع می‌باشد. علاوه بر این در نمونه‌های آلوده، بافت اپیدرم و درم در اثر فعالیت باکتری کاملا از بین رفته است و لایه شاخی بافت پوست در تصویر قابل مشاهده است.

مورفولوژی بافت توسط تصویربرداری با SEM: نمونه‌های بافت پوست کشت شده در هر دو گروه آزمایش توسط دستگاه میکروسکوپ الکترونی نگاره مورد بررسی قرار گرفت. تصاویر میکروسکوپ الکترونی از بافت پوستی (شکل ۲) نشان می‌دهد که ساختار و یکپارچگی بافت پوست نرمال نسبت به بافت پوست آلوده شده پس از طی ۷۲ ساعت به خوبی حفظ شده است.

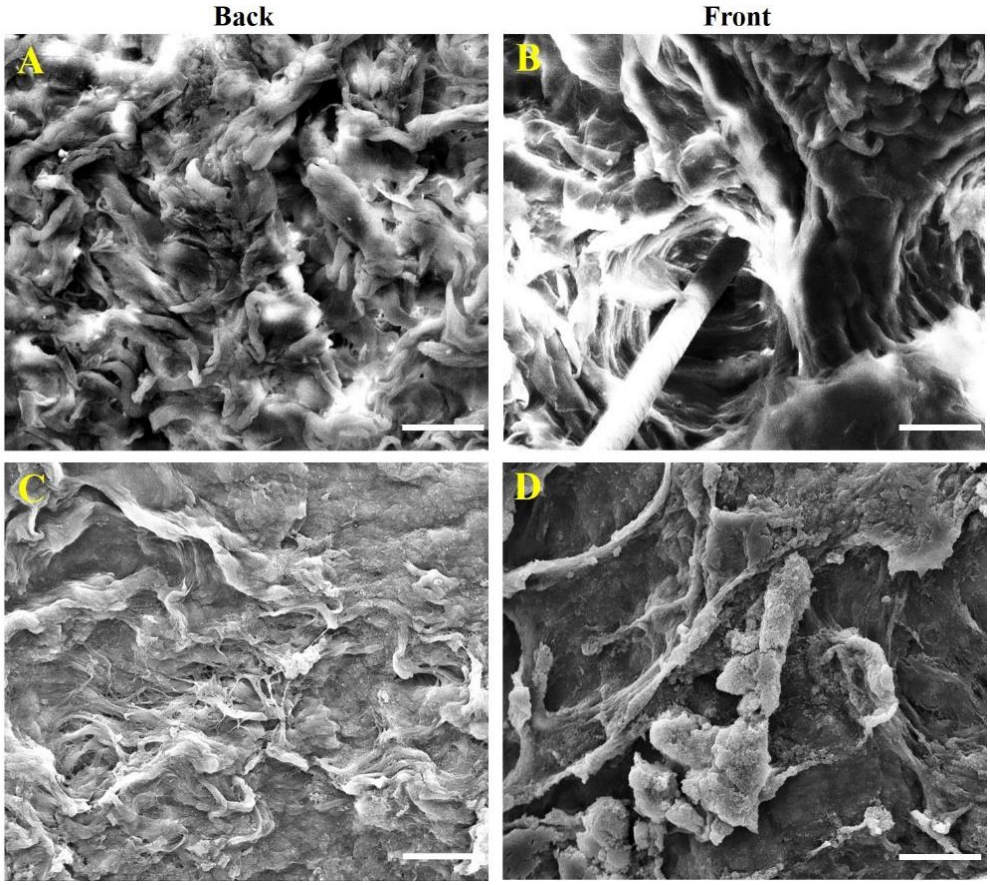
رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین: رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) جز اولین رنگ های تشخیصی است که بر روی تمام نمونه‌های پوستی ثابت شده با فرمالین انجام می‌شود که تصویری از سلول‌ها و ساختارهای مختلف پوست و همچنین رابطه آنها را ترسیم می‌کند. مطابق با نمودار A ۳، هسته سلول‌های بافت پوست نرمال در ناحیه اپیدرم و درم کاملا مشخص و به رنگ بنفش دیده می‌شود در حالیکه در نمونه‌های بافت آلوده سلول‌ها در اثر فعالیت باکتری از بین رفته‌اند (شکل B ۳). نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی H&E نمونه‌های گرافت تمام ضخامت پوست با استفاده از نرم افزار Image J مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت (نمودار ۱).

رنگ‌آمیزی تری‌کروم ماسون: نتایج رنگ‌آمیزی تری‌کروم ماسون در تمام لام‌های رنگ‌آمیزی شده به این صورت ملاحظه گردید: کلاژن به رنگ آبی و سیتوپلاسم را به رنگ قرمز روشن یا صورتی و هسته-ها نیز به رنگ بنفش تیره رو به سیاه دیده می‌شوند.

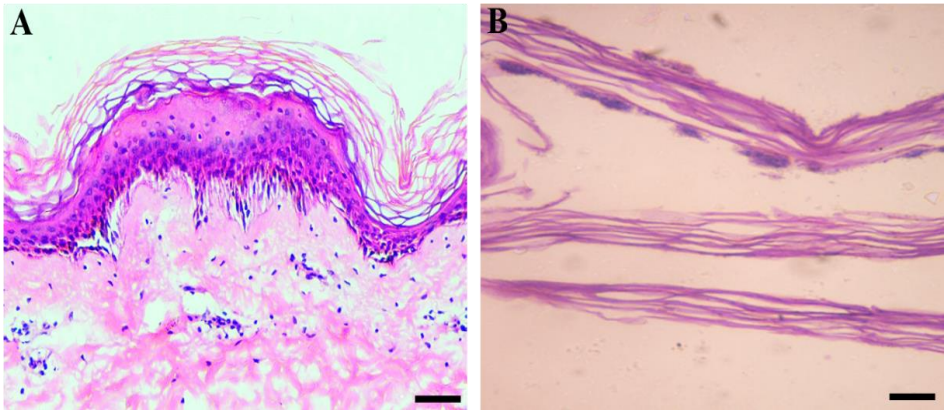
فیبروبلاست یک سلول بافت همبند در لایه درم پوست است که مسئول تولید و سنتز پروتئین کلاژن در پوست می‌باشد (۵). در این رنگ‌آمیزی میزان کلاژن بخش درم در نمونه بافت پوست نرمال برخلاف نمونه آلوده شده به باکتری به خوبی حفظ شده است. در نمونه آلوده، بخش اپیدرم و درم به کلی از بین رفته اند و تنها بخش شاخی اپیدرم باقی مانده است (شکل ٤).



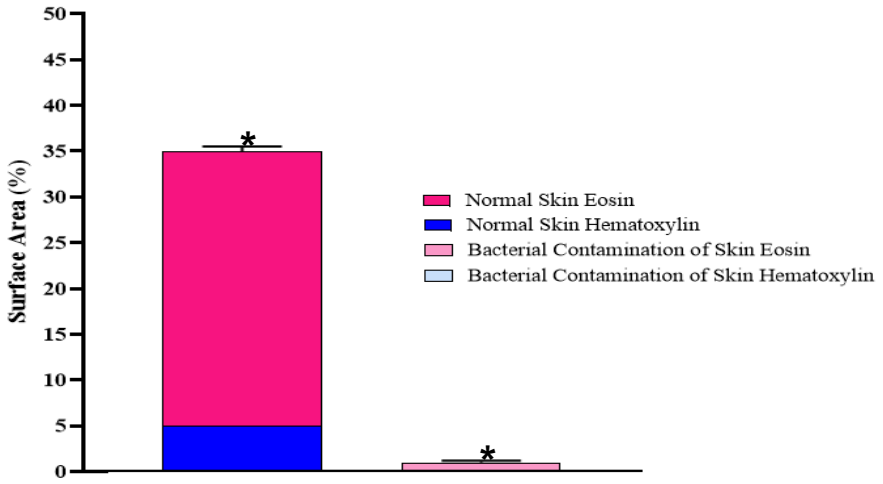
شکل ۱- تصاویر میکروسکوپی از گرافت پوستی رنگ‌آمیزی شده با آکریدین اورنج. A) بافت نرمال انسانی در حضور آنتی‌بیوتیک جنتامایسین B) بافت نرمال انسانی در عدم حضور آنتی‌بیوتیک، ۷۲ ساعت پس از کشت. (بزرگنمایی X ۲۰۰).



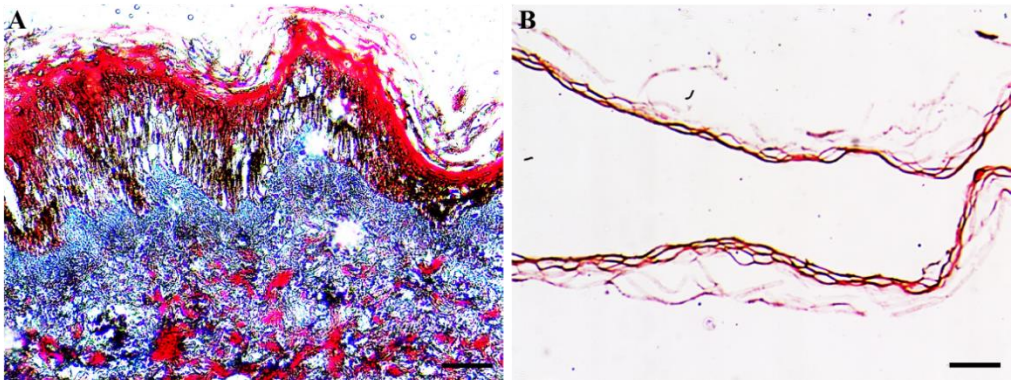
شکل ۲- تصاویر SEM تهیه شده از گرافت تمام ضخامت پوست انسانی. A) بخش زیرین (Back) و B) بخش رویی (Front) گرافت پوست نرمال انسانی در حضور آنتی‌بیوتیک و C) بخش زیرین و D) بخش رویی گرافت پوست انسان در عدم حضور آنتی‌بیوتیک، ۷۲ ساعت پس از کشت (بزرگنمایی: ۱۰۰ میکرومتر).



شکل ۳- تصاویر بافت پوست رنگ‌آمیزی شده با هماتوکسیلین-ائوزین در دو گروه A) بافت نرمال انسانی در حضور آنتی‌بیوتیک B) بافت نرمال انسانی در عدم حضور آنتی‌بیوتیک، ۷۲ ساعت پس از کشت. (بزرگنمایی X ۲۰۰)



نمودار ۱- تجزیه و تحلیل آماری نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین/ائوزین در دو گروه نمونه گرافت پوستی در حضور و عدم حضور آنتی‌بیوتیک جنتامایسین ($p < ۰/۰۵$*)



شکل ٤- تصاویر بافت پوست رنگ‌آمیزی شده با تری کروم ماسون در دو گروه A) بافت نرمال انسانی در حضور آنتی‌بیوتیک B) بافت نرمال انسانی در عدم حضور آنتی‌بیوتیک، ۷۲ ساعت پس از کشت. (بزرگنمایی ۲۰۰ میکرومتر).

بحث

پوست بزرگترین عضو بدن می‌باشد و عملکرد آن محافظت از بدن در برابر عفونت است و در واقع مانعی برای ورود آلودگی به اندام‌های داخلی بدن است. برخی مواقع پوست ما با میکروب و آلودگی

های متفاوت روبرو شده و اگر رسیدگی‌های لازم انجام نشود این آلودگی‌ها باعث ایجاد عفونت پوست می‌شود. پوست یک بافت پیچیده است که میزبان انواع مختلف سلول‌های تخصصی است و در انجام بسیاری از اعمال از جمله سد فیزیکی و عملکردهای ایمنی و حسی نقش دارد. بنابراین، مدل‌سازی پوست در شرایط آزمایشگاهی (*In vitro*) چالش‌های فنی را برای مهندسی بافت ارائه می‌دهد (۱). نکته قابل ذکر این است که نگهداری سلول و بافت در کشت جهت جلوگیری از آلودگی‌های باکتریایی بسیار مهم است.

در روش‌های استاندارد مبتنی بر سلول، معمولاً از کشت‌های دو بعدی سلول‌های اولیه و یا رده‌های سلولی استفاده می‌شود. به عنوان مثال کشت کراتینوسیت‌ها یا کشت همزمان کراتینوسیت‌ها همراه با سلول‌های ایمنی و فیبروبلاست در پتری دیش می‌توان اشاره کرد، این مدل‌ها به راحتی قابل استفاده هستند (۳). مطالعات انسانی که برای توسعه تشخیص و درمان‌های جدید حیاتی هستند، توسط مسائل اخلاقی محدود می‌شوند. از طرفی مطالعات پیش‌بالینی روی حیوانات اغلب پیش‌بینی‌کننده‌های ضعیفی از پاسخ‌های انسانی هستند. به عبارتی مطالعات پیش بالینی روی حیوانات تنها موفقیت محدودی در پیش بینی فیزیولوژی، آسیب‌شناسی و پاسخ‌های درمانی انسان داشته است. کشت‌های سنتی سلول‌های انسانی نیز، به دلیل نداشتن ریزمحیط مناسب برای انواع سلول‌ها، در نمایش پاسخ‌های درون تنی نیز محدود هستند. یکپارچگی ساختاری دلیل اصلی استفاده از کشت بافت به عنوان یک روش آزمایشگاهی به جای کشت سلولی است (۲).

اگرچه داده‌های بدست آمده، به ویژه در اولین مراحل کشت، ارزشمند و اساسی هستند، اما قابلیت اطمینان کم آنها در مقایسه با مدل‌های *In vivo* اغلب منجر به شکست در مراحل پیش بالینی و بالینی بعدی می‌شود. با این حال، آنها موفق به بازسازی کمپلکس سه بعدی میانکنش‌های سلول- سلول و سلول- ماتریس همانند پوست واقعی نشدند. بنابراین ابتدا باید ساختار بافت پوست را بتوان در شرایط آزمایشگاهی حفظ کرد تا در مراحل بعدی تست‌های دارویی و آزمایشات دیگر را بتوان انجام داد. بدین منظور، جهت بررسی زنده‌مانی، گرافت پوست نرمال انسانی در شرایط آزمایشگاهی کشت داده شد و نتایج حاصله مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

معادل‌های طراحی شده از پوست انسان برای تست سمیت دارو به عنوان یک ابزار ارزشمند برای مطالعه پایه مولکولی پاسخ‌های سلولی در فیزیولوژی و آسیب‌شناسی پوست در نظر گرفته می‌شود. عملکردهای مهم پوست، آن را به عنوان یک عضو اصلی برای سلامت و فیزیولوژی بدن تبدیل می‌کند (۱۲). آزمایش این مواد بر روی پوست از اهمیت حیاتی برای ارزیابی دوز و اثربخشی درمانی، شناسایی واکنش های احتمالی پوست برخوردار است (۱۹، ۱٤). اما یکی از نگرانی‌های اصلی در مورد استفاده از پوست (آلوژنیک)، خطر انتقال بیماری توسط عوامل بیماری‌زای بالقوه است، زیرا گیرندگان پیوند پوست اغلب از نظر ایمنی در معرض خطر هستند و در نتیجه بیشتر مستعد ابتلا به عفونت‌ها هستند (۱٦).

بر خلاف سایر بافت‌ها، پوست با میکروارگانیسم‌های مرتبط کلونیزه می‌شود، بنابراین نمی‌توان آن را در زمان برداشت استریل در نظر گرفت (۲۰). اگرچه سطح پوست اهداکننده با ضد عفونی‌کننده‌ها انجام می‌شود، اما این روش بی‌عیب نیست (۲۰). بنابراین اطمینان از ایمن بودن پوست برای پیوند با انجام غربالگری میکروبیولوژیکی قبل و بعد از پیوند مورد اهمیت است.

به منظور زنده‌مانی و حفظ بافت پوست در شرایط آزمایشگاهی از آنتی‌بیوتیک در محیط کشت استفاده

می‌گردد. آنتی‌بیوتیک‌های موجود در محیط کشت به جلوگیری از آلودگی باکتریایی کمک می‌کنند و انجام آزمایشات را برای محققان آسان تر می‌کند. به عنوان یک آنتی‌بیوتیک با طیف وسیع مقابله با باکتری، جنتامایسین به نظر می‌رسد در کشت بافت عملکرد بهتی نسبت به پنی سیلین/استرپتومایسین داشته باشد. علاوه بر این، برخلاف پنی سیلین، جنتامایسین در pH و دماهای مختلف تا حد زیادی پایدار است (٦). در این مطالعه نیز از آنتی‌بیوتیک جنتامایسین استفاده گردید و در طی مدت ۷۲ ساعت به خوبی ساختار پوست را از آلودگی باکتریایی حفظ کرد. نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی عدم حضور باکتری را نشان داد و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین نیز به خوبی لایه‌های درم و اپیدرم را در گرافت پوست تمام ضخامت در نمونه‌های کشت شده در حضور جنتامایسین نشان دادند.

مطالعات بسیاری در رابطه با استفاده از جنتامایسین و غلظت مناسب آن بر بقا و تکثیر سلول‌ها انجام شده است. در یک مطالعه، تجزیه و تحلیل اثر جنتامایسین بر روی قابلیت‌های تکثیر و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی در شرایط آزمایشگاهی صورت گرفت. نتایج نشان داد که ۲۰ میکروگرم/میلی‌لیتر جنتامایسین غلظت مناسبی برای کشت سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسانی است و برای جلوگیری از انواع آلودگی‌های باکتریایی کافی است، اما هیچ اثر بازدارنده‌ای بر رشد و تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی ندارد (۱۱).

در مطالعه‌ای دیگر، غربالگری میکروبی از آلوگرافت پوست انسان در بانک پوست کشور برزیل انجام شد. باسیلوس، پانی باسیلوس و استافیلوکوک از پوست جداسازی شدند که نشان‌دهنده غلبه آلودگی باکتری‌های گرم مثبت بود. در این مطالعه نشان داده شد که تمام کوکسی‌ها و باسیل‌های گرم مثبت به AMI، GEN و TET حساس بودند. بنابراین نویسندگان استفاده از یک یا چند مورد از این ضد میکروبی‌ها را در یک کوکتل درمان پوست پیشنهاد می‌دهند (۱۵).

نتیجه‌گیری

به منظور حفظ ساختار پوست جهت بررسی آزمایشات غربالگری و همچنین انجام پیوند گرافت، بافت پوست به مدت ۷۲ ساعت در شرایط آزمایشگاهی در دو گروه حضور و عدم حضور آنتی‌بیوتیک جنتامایسین قرار گرفت و زنده‌مانی گرفت پوستی تمام ضخامت بررسی گردید. نتایج زنده‌مانی با استفاده از رنگ‌آمیزی آکریدین اورنج، و بررسی ساختار بافت پوست با میکروسکوپ الکترونی و رنگ‌آمیزی‌های هماتوکسیلین-ائوزین و تری کروم ماسون در دو گروه صورت گرفت و نتایج حاصله از گروه نمونه گرفت پوستی کشت شده در حضور آنتی‌بیوتیک، به خوبی حفظ ساختار پوست را نشان داد.

منابع

1. Abaci H.E., Zongyou G., Yanne D., Jacko J., Christiano A. 2017. Next generation human skin constructs as advanced tools for drug development. *Experimental Biology and Medicine*, 242: 1657-1668.

2. Al-Lamki R.S., Bradley J.R., Pober J.S. 2017. Human Organ Culture: Updating the Approach to Bridge the Gap from In Vitro to In Vivo in Inflammation, Cancer, and Stem Cell Biology. *Frontiers in Medicine (Lausanne)*, 4:148.

3. Bal-Öztürk A., Miccolic B., Avci-Adalie M., Mogtader F., Sharifi F., Çeçenh B., Yaşayani G., Braekenc D., Alarcin E. 2018. Current Strategies and Future Perspectives of Skin-on-a-Chip Platforms: Innovations, Technical Challenges and Commercial

Outlook. Current Pharmaceutical Design, 24(45):5437-5457.

4. Chaves B.J., Tadi P. 2022. Gentamicin. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

5. Diegelmann R.F., Evans M.C. 2004. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontiers in Bioscience*, 9:283-289.

6. Fischer A.B. 1975. Gentamicin as a bactericidal antibiotic in tissuc culture. *Microbiology and. Immunology*, 161:23-39.

7. Goetz I.E., Moklebust R., Warren C.J. 1979. Effects of some antibiotics on the growth of human diploid skin fibroblasts in cell culture. *Society for in Vitro Biology*, 15(2):114-119.

8. Groeber F., Holeiter M., Hampel M., Hinderer S., Schenke-layland K. 2011. Skin tissue engineering-*In-vivo* and *in-vitro* applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63:352-366.

9. Huh M.I., Yi S.J., Lee K.P., Kim H.K., An S.H., Kim D.B., Ryu R.H., Kim J.S., Lim J.O. 2018. Full Thickness Skin Expansion ex vivo in a Newly Developed Reactor and Evaluation of Auto-Grafting Efficiency of the Expanded Skin Using Yucatan Pig Model. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 15:629-638.

10. Joodak H., Panzer M. 2018. Skin mechanical properties and modeling: A review. *Engineering in Medicine*, 232(4):323-343.

11. Kagiwada H., Fukuchi T., Machida H., Yamashita K., Ohgushi H. 2008. Effect of Gentamicin on Growth and Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Toxicology and Pathology*, 21: 61-67.

12. Klicks J., Molitor E., Ertongur-Fauth T., Rudolf R., Hafner M. 2017. In vitro skin three-dimensional models and their applications. *Journal of Cellular Biotechnology*, 3: 21–39.

13. Kucharzewski M., Rojczyk E., Wilemska-Kucharzewska K., Wilk R., Hudecki J., J.Los M. 2019. Novel trends in application of stem cells in skin wound healing. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 843:307-315.

14. Küchler S., Strüver K., Friess W. 2013. Reconstructed skin models as emerging tools for drug absorption studies. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 9:1255-1263.

15. Meneghetti K.L., do Canto Canabarro M., Otton L.M., dos Santos Hain T., Passos Geimba M., Corção G. 2018. Bacterial contamination of human skin allografts and antimicrobial resistance: a skin bank problem. *BMC Microbiology*, 18:121.

16. Pianigiani E., Risulo M., Ierardi F., Sbano P., Andreassi L., Fimiani M. 2006. Prevalence of skin allograft discards as a result of serological and molecular microbiological screening in a regional skin bank in Italy. *Burns*, 32:348-351.

17. Rousselle P., Braye F., Dayan G. 2018. Re-epithelialization of adult skin wounds: cellular mechanisms and therapeutic strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 146:344-365.

18. Taifour Suliman M. 2009. A simple method to facilitate full-thickness skin graft harvest. *Burns*, 35:87-88.

19. Van Gele M., Geusens B., Brochez L. 2011. Three-dimensional skin models as tools for transdermal drug delivery: challenges and limitations. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 8:705-720.

20. Verbeken G., Verween G., De Vos D., Pascual B., De Corte P., Richters C. 2012. Glycerol treatment as recovery procedure for cryopreserved human skin allografts positive for bacteria and fungi. *Cell Tissue Bank*, 13:1-7.

Assessment of Human *In-vitro* Full Thickness Skin Graft Viability and the Use of Gentamicin Antibiotic on This Process

Marjan Mohamadali[1], Ali Ghiaseddin[2, 3*], Shiva Irani[1], Mohammad Amir Amirkhani[4], Mostafa Dahmardehei[5]

1- Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2- Institute for Stem Cell Research and Regenerative Medicine, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran
3- Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medical Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
4- Skin and Stem Cell Research Center, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran
5- Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Burn Research Center, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Nowadays, skin grafts use to replace lost or damaged skin around the world. Natural contaminants can exist on the skin and this contamination can be a threat to graft recipients. In this study, after obtaining human full thickness skin graft sample and culturing it *in-vitro* condition, skin samples were evaluated for cell viability and the presence of bacterial contamination during 72 hr. The amount of microbial contamination in the presence and absence of antibiotic gentamicin 0.02% was also investigated by standard methods. High cell viability during 72 hr in normal skin tissue samples was confirmed by the acridine orange staining. Electron scanning microscope observations, hematoxylin-eosin, and Masson's trichrome staining images clearly showed the difference between the two experimental groups. Skin graft samples lost the layers of dermis and epidermis (except the stratum corneum layer), in the absence of gentamicin due to contamination with bacteria which can be seen in the obtained images. Finally, the obtained results clearly showed the effect of high microbial contamination on the skin tissue structure, which can be caused by various factors.

Keywords: Human skin graft, Viability, Bacterial contamination, Gentamicin.