Archive of SID

یک روش بهینه برای تهیه مقادیر بالایی از هپاتوسیتهای ایزوله توسط پرفیوژن کبد رت با آنزیم کلاژناز

اصغر امینی هرندی M.Sc.☆♦، عبدالامیر علامه Ph.D.☆، تقی الطریحی Ph.D.★

☆ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه بیوشیمی

★ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح

♦ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۱۱۱-۱۴۱۵۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی

چکیده

* **هدف:** تهیه مقادیر بالایی از هپاتوسیتهای ایزوله برای استفاده در آزمایشات *In vitro*

* **مواد و روشها:** برای پرفیوژن کبد موش از یک مجموعه تجهیزات به نام سیستم پرفیوژن استفاده می‌شود که اجزای آن شامل یک پمپ پریستالتیک، حمام آب گرم، pH متر، کپسول گاز اکسیژن و دی اکسید کربن، فلومتر، تعدادی لوله‌های پلی اتیلنی و کانول است.

پرفیوژن کبد را می‌توان به دو روش تک مرحله‌ای و دو مرحله‌ای انجام داد. در روش دو مرحله‌ای ابتدا کبد با یک محلول بافری فاقد یون کلسیم و به همراه یک شلاته کننده کلسیم، پرفیوژ داده شده و در مرحله دوم پرفیوژن با محلول بافری حاوی آنزیم کلاژناز ادامه می‌یابد. بدین ترتیب با حذف اتصالات بین سلولی و بافت همبند، هپاتوسیتها پس از باز کردن کپسول کبدی به راحتی و بدون هیچ گونه آسیبی به آنها از هم جدا می‌شوند.

* **یافته‌ها:** در این روش بازده هپاتوسیتهای ایزوله سالم بسیار بالا می‌باشد (بیش از ۹۰ درصد) به طوری که در هر بار پرفیوژن کبد رت با وزن تقریبی ۲۰۰ گرم حدود ۵۰۰ میلیون سلول سالم به دست می‌آید. هپاتوسیتهای جدا شده در این روش فعالیت متابولیکی خود را حدود ۱۰ ساعت حفظ می‌کنند.

* **نتیجه‌گیری:** به دلیل ویژگیهای خاص این روش بهینه، از جمله بازده بالای هپاتوسیتهای ایزوله سالم و نیز حفظ فعالیت متابولیکی آنها در زمانهای نسبتاً طولانی، دارا بودن اکثر ویژگیهای یک سلول سالم در *In vitro* از جمله نفوذپذیری آنها، امکان طراحی سیستم در داخل کشور، سهولت کار و نیز صرفه جویی در مصرف دارو، انجام صدها آزمایش تنها به وسیله یک نمونه حیوان، رفع مشکل واکنش حیوان نسبت به برخی از داروها، صرفه جویی در زمان آزمایشهای مربوطه به پاسخ حیوان به دوز دارو، می‌توان از آن به عنوان یک جانشین مناسب جهت آزمایشاتی که روی مدلهای حیوانی، رده‌های سلولی و نیز فراکسیونهای سلولی انجام می‌شود، استفاده نمود.

گل واژگان: پرفیوژن، ایزولاسیون، هپاتوسیت، رت، کلاژناز

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

امروزه از سوسپانسیون هپاتوسیتهای ایزوله به طور گسترده در تحقیقات بیوشیمیایی، سم شناسی و نیز فارماکولوژی استفاده می‌شود. از این مدل آزمایشی می‌توان به عنوان یک جانشین ارزشمند به جای فراکسیون اندامکهای جدا شده، مدل حیوانی و نیز رده‌های سلولی استفاده نمود. در این روش بسیاری از ماهیتهای حیاتی بافت‌سالم به ویژه نفوذپذیری سلولها دست نخورده باقی مانده و لذا با اطمینان می‌توان برداشت داروها، تنظیم و نیز تشکیل و دفع متابولیتهای آنها را مطالعه نمود (۱).

در ابتدا برای جداسازی سلولهای کبدی از روشهای مکانیکی استفاده شد که در پی آن پرفیوژن کبد با شلاتورهای کلسیم و پتاسیم انجام شد که در تمامی این روشها تعداد سلولهای زنده به دست آمده بسیار ناچیز بود.

Howard و Pesch اولین محققینی بودند که برای نخستین بار از آنزیم کلاژناز برای تهیه سلولهای کبدی استفاده نمودند (۲)، بعدها تکنیک پرفیوژن کبد به کمک آنزیم کلاژناز توسط Berry و Friend طراحی شد (۳) که با استفاده از این روش بازده جداسازی سلولهای بافتی افزایش یافت و بدین ترتیب توانستند قسمت عمده بافت کبد را به سوسپانسیونی از سلولهای سالم تبدیل کنند. تاکنون تعدیلات متعددی در نحوهٔ انجام پرفیوژن کبد انجام پذیرفته که در هرکدام به نوبه خود روش پرفیوژن، زمان انجام آن و نیز بازده سلولهای سالم، بهبود بخشیده شده است.

در حال حاضر از سوسپانسیون هپاتوسیتهای ایزوله به طور روز افزون در تحقیقات بیوشیمیایی از جمله مطالعات روی مواد شیمیایی سرطان زا، متابولیسم داروهای مرتبط با سیتوکروم P-450 و فرآیندهای وابسته و همچنین مطالعات مربوط به گلوکونئوژنز، گلیکولیز، سنتزپروتئین، اسیدهای چرب، لیپید، اوره و نیز تولید اجسام کتونی، متابولیسم پروتئین، اکسیداسیون اتانول، نقل و انتقالات غشایی، آسیب به DNA و همچنین به هورمونها استفاده می‌شود (۱).

مواد و روشها

* حیوان آزمایشگاهی

برای تهیه هپاتوسیت از رت بالغ نر، نژاد ویستار با وزن ۳۰±۲۰۰ گرم استفاده می‌شود. وزن کبد این موشها بسته به وزن حیوان بین ۱۰-۸ گرم متغیر است. نژاد، جنس و وزن موش را بنا به نوع هپاتوسیتهای ایزوله مورد آزمایش می‌توان تغییر داد.

* محلولها و مخلوط گاز تنفسی

گاز تنفسی

به دلیل اینکه هپاتوسیتها از نظر متابولیکی شدیداً فعال بوده و کاهش اکسیژن باعث آسیب جدی به آنها می‌شود، لذا محلولها بایستی در طول مدت پرفیوژن با مقادیر مناسب از گاز کربوژن ($5CO_2$ درصد و $95O_2$ درصد) گاز دهی شوند. بدین منظور گاز O_2 و CO_2 بوسیله یک فلومتر با نسبت معین مخلوط شده و از طریق یک محفظه تعبیه شده در دستگاه پرفیوژن به نام اکسیژناتور به محلول پرفیوژن اضافه می‌شود.

محلولها

در این روش از سه نوع بافر مختلف به منظور حذف اتصالات و ماتریکس بین سلولی و نیز شستشو و انکوباسیون سلول استفاده می‌شود.

بافر شماره ۱ (بافر پرفیوژن فاقد کلسیم همراه با یک شلاته کننده کلسیم): ۶/۹ گرم NaCl، ۰/۴۴۵ گرم KCl، ۰/۵۷ گرم Na_2HPo_4، ۰/۲۷ گرم NaH_2Po_4، ۹ گرم گلوکز، ۰/۳ گرم $MgSO_4, 7H_2O$، ۱/۶۹ گرم $NaHCO_3$ و ۰/۰۸ گرم (۰/۲ میلی‌مول) EGTA را پس از حل کردن در یک بالن یک لیتری به حجم می‌رسانیم. بهتر است به محلول بافری فوق ۲٪ آلبومین گاوی نیز اضافه شود (۴).

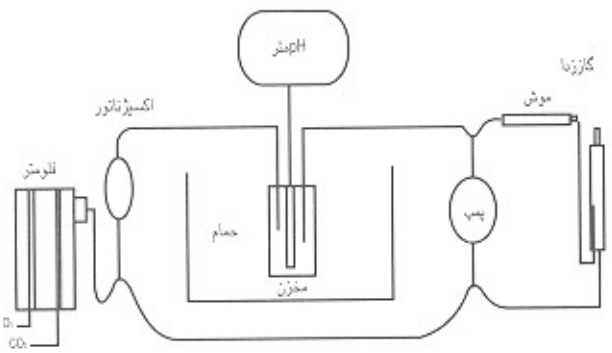
بافر شماره ۲ (بافر هضم کننده): محلول بافری شماره ۱ بدون EGTA و نیز حاوی ۴ میلی‌مول کلسیم ($CaCl_2, 2H_2O$) و ۰/۱۲ درصد آنزیم کلاژناز.

بافر شماره ۳ (بافر شستشو): ۶/۹ گرم NaCl، ۳/۶ گرم KCl، ۰/۳ گرم $MgSO_4, 7H_2O$، ۰/۱۳ گرم KH_2PO_4، ۹ گرم گلوکز و ۰/۳ گرم $CaCl_2, 2H_2O$ را پس از حل کردن، در یک بالن حجمی یک لیتری به حجم می‌رسانیم. کلیه محلولهای بافری را پس از تهیه فیلتر کرده و توسط گاز کربوژن pH آنها را به ۷/۴ می‌رسانیم.

* دستگاه پرفیوژن

این دستگاه از یک حمام آب گرم به منظور تامین دمای محلولهای پرفیوژن، فلومتر برای اختلاط گازهای O_2 و CO_2 (تولید گاز کربوژن)، اکسیژناتور برای اکسیژن دهی محلولهای پرفیوژن، حبابگر برای حذف حبابهای ناشی از گازدهی محلولهای پرفیوژن، مخزن ذخیره، pH متر برای کنترل pH و سیلندرهای گاز O_2 و CO_2 تشکیل شده است.

در این دستگاه مایع پرفیوژن به وسیله یک پمپ پریستالتیک به گردش در می‌آید، خروجی پمپ به دو قسمت تقسیم شده؛ قسمت اعظم آن وارد اکسیژناتور شده، با گاز کربوژن مخلوط گشته و مجدداً به مخزن ذخیره باز می‌گردد؛ قسمت کمتری نیز که توسط یک شیر قابل تنظیم است، وارد محفظه حباب‌گیری شده و پس از حبابگیری از طریق کانول ورودی که در محل ورید باب تعبیه شده وارد و از طرف دیگر از طریق کانول خروجی که در محل بزرگ سیاهرگ زیرین قرار داده شده خارج و به داخل مسیر گردشی باز گردانده می‌شود (شکل ۱).

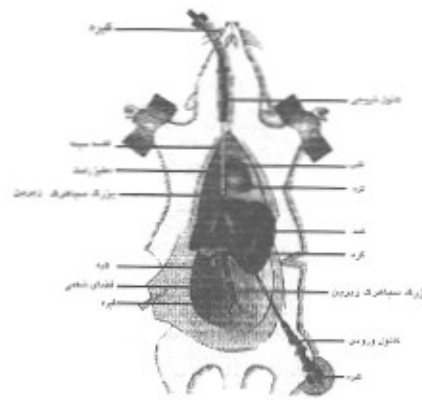


شکل ۱: نمای شماتیک دستگاه پرفیوژن

www.SID.ir

❋ جراحی

در این روش از رت نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شده است. ابتدا رت را با تزریق داخل صفاتی ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پنتوباربیتال بیهوش کرده، سپس موش را به پشت بر روی میز جراحی خوابانده، پاهای حیوان را به وسیله گیره محکم کرده و پس از ضدعفونی منطقه شکمی با الکل، به وسیله یک قیچی جراحی با یک برش طولی در قسمت میانی تا زیر پرده صفاق و نیز دو برش عرضی در در قسمت انتهایی برش اصلی شکم حیوان را باز کرده، روده‌بندی را کنار زده و لبهای کبد را به آرامی جا به جا کرده تا ورید باب و بزرگ سیاهرگ زیرین (IVC)[1] در معرض قرار گیرند، در این مرحله حدود ۰/۲ میلی‌لیتر هپارین به داخل IVC تزریق کرده و با نخ جراحی یک گره شل بر روی IVC در قسمت بالای محل انشعاب آن به کلیه و یک گره نیز روی ورید باب تیم سانتیمتر قبل از ورود آن به کبد زده می‌شود. از نیم سانتیمتر پایین‌تر از محل گره دوم یک کانول را وارد ورید باب کرده و پس از خارج کردن تروکار، کانول را توسط یک گیره در محل ثابت کرده، گره از قبل زده شده را در محل محکم می‌کنیم، پس از پر شدن کانول از خون وریدی مایع پرفیوژن را به داخل کانول هدایت نموده و بلافاصله IVC را در محلی پایین‌تر از انشعاب آن به کلیه قطع کرده و اجازه می‌دهیم تا تمامی خون حیوان و نیز نسبی از محلول پرفیوژن از محل پارگی خارج شود. در مرحله بعد با بریدن دنده‌ها قفسه سینه را باز کرده و کانول خروجی را از محل دهلیز راست به داخل IVC وارده کرده و پس از خارج کردن تروکار گره زده در محل را محکم کرده و بدین ترتیب کانول در محل خود ثابت می‌شود، با محکم کردن گره اول در محل IVC تمامی محلول پرفیوژن از کانول خروجی خارج می‌شود (۵) (شکل ۲).



شکل ۲: نمایش شماتیک موش در حال جراحی

❋ پرفیوژن کبد

پرفیوژن را می‌توان به دو روش تک مرحله‌ای و دو مرحله‌ای انجام داد، ولی بهترین نتیجه با روش دوم به دست آمد (۶، ۷). در این روش در مرحله اول کبد را با بافر شماره ۱ که فاقد یون کلسیم و حاوی یک شلاته کننده کلسیم مانند EGTA است، شستشو می‌دهیم. در این مرحله اتصالات دسموزومی سلول به طور برگشت‌ناپذیر جدا می‌شوند، در مرحله دوم کبد را با بافر شماره ۲ که حاوی آنزیم کلاژناز و نیز یون کلسیم است، شستشو انجام می‌شود. در این مرحله ماتریکس خارج سلولی نیز هضم شده و لذا سلولهای کبد به راحتی از یکدیگر جدا می‌کنیم.

روش عمل بدین صورت است که در مرحله اول مقدار ۵۰۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو را به داخل مخزن ذخیره ریخته، پمپ پریستالتیک را روشن کرده تا ضمن گردش مایع پرفیوژن، با گاز کربوژن مخلوط شود، این عمل تا رسیدن به دمای ۳۷° سانتیگراد و pH=۷/۴ ادامه می‌یابد. پس از انجام عمل جراحی و آماده شدن موش، با باز کردن شیر لوله ورودی، حباب احتمالی موجود در داخل لوله و کانول ورودی را خارج کرده، سپس آن را به کانول ورودی متصل می‌شود. پس از قطع IVC، جریان پرفیوژن را به تدریج افزایش داده تا سرعت جریان به ۴-۳ میلی‌لیتر به ازای هر گرم وزن کبد حیوان برسد. در این مرحله محلول پرفیوژکننده از محل بریدگی ایجاد شده در IVC خارج می‌شود. پس از برقراری جریان پرفیوژن کبد کم رنگ‌تر شده و در نهایت به صورت پریده در می‌آید. بزرگ شدن اندازه کبد یا وجود لکه‌های قرمز رنگ روی آن نشان دهنده ناقص بودن پرفیوژن بوده و بایستی پرفیوژن را قطع و مجدداً آن را تکرار نمود.

در مرحله دوم پرفیوژن را با بافر شماره ۲ ادامه داده و در صورت موفقیت‌آمیز بودن آن آنزیم کلاژناز را به بافر اضافه می‌کنیم. در این مرحله به دلیل گران بودن کلاژناز محلول بافری مجدداً به مسیر پرفیوژن بازگشت داده می‌شود. بدین منظور کانول خروجی توسط یک لوله به محل ورود پمپ پریستالتیک متصل می‌شود. عمل پرفیوژن آنزیمی ۳۰-۱۵ دقیقه طول می‌کشد. با پیشرفت هضم آنزیمی مقدار مایع تراوش شده از کبد افزایش می‌یابد که می‌توان آن را به وسیله یک سرنگ به ظرف ذخیره انتقال داد یا در صورت تمایل با گرفتن یک انشعاب از ورودی پمپ آن را به داخل مسیر گردش باز گرداند. در انتهای عمل پرفیوژن پس از جدا کردن کبد حیوان، آن را به یک ظرف کشت ۲۰ سانتیمتری حاوی بافر شستشوی سرد انتقال داده و با پاره کردن کپسول کبد، با حرکات دورانی آن در بافر شستشو یا با کمک یک پرس کوچک هپاتوسیتها را جدا می‌کنیم. با این روش یک سوسپانسیون غلیظ سلولی به دست می‌آید.

بایستی دقت داشت به دلیل حساس و شکننده بودن سلولهای کبدی از وارد آوردن هر گونه استرس به سلولها خودداری شود. در انتهای پرفیوژن با خارج شدن هپاتوسیتها، بافت عروقی و همبند به صورت یک توده سفید رنگ باقی می‌ماند که با صاف کردن سوسپانسیون حاصل به وسیله یک صافی با روزنه‌های ۲۵۰ میکرومتری و یا یک گاز دو لایه سلولهای به هم چسبیده، بافت همبند و ذرات موجود در سوسپانسیون جدا می‌شوند. پس از صاف کردن، سوسپانسیون سلولی را به مدت نیم ساعت در دمای ۳۷° سانتیگراد با حرکت ۱۰titl/min انکوبه می‌کنیم. در این مرحله سلولهایی که آسیب کلی دیده‌اند، پاره شده یا لخته می‌شوند و سلولهایی که آسیب وارده به آنها کمتر است

1. Inferior Vena Cava

www.SID.ir

Archive of SID

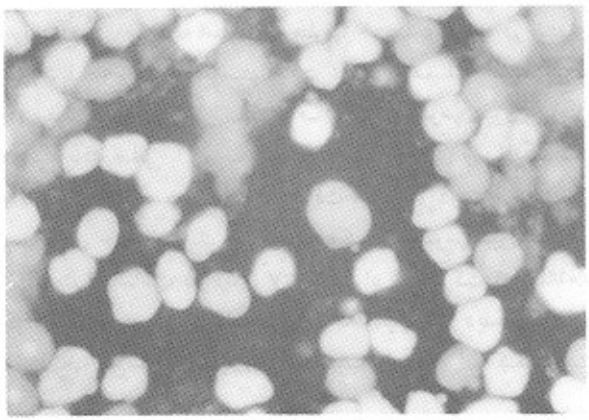
زمان لازم برای ترمیم خود را باز می‌یابند. پس از گرمخانه گذاری، سوسپانسیون سلولی را تا ۴° سانتیگراد سرد کرده (همراه با حرکت دادن سوسپانسیون) و مجدداً به وسیله یک گاز دو لایه صاف می‌کنیم. در مرحله بعد سلولها را دو قسمت کرده و در دور حدود ۲۰g به مدت ۳-۲ دقیقه در دمای صفر درجه سانتریفوژ نموده و پس از خارج کردن فاز بالایی به هر کدام از تیوبها ۳۰ میلی‌لیتر محلول شستشوی صفر درجه اضافه کرده و سانتریفوژ را تکرار می‌کنیم (این عمل سه بار تکرار می‌شود). در آخرین مرحله سانتریفوژ سلولهای راسب شده را بسته به نوع انکوباسیون در بافر یا محیط کشت مناسب غوطه ور نموده و در نهایت سلولها به وسیله میکروسکوپ بررسی شده و میزان زیست پذیری آن به وسیله رنگ‌آمیزی با تریپان بلو تعیین می‌شود.

یافته‌ها

بر خلاف روشهای مکانیکی و نیز تاثیر آنزیم روی قطعات بافت برای جداسازی سلولها، بازده سلولهای سالم به دست آمده در پرفیوژن دو مرحله‌ای کبد بسیار بالا بوده به طوری که بیش از ۹۰ درصد سلولهای کبدی به صورت سالم جدا شده و در هر بار پرفیوژن بسته به وزن کبد حیوان ۵۰۰-۴۰۰ میلیون هپاتوسیت به دست می‌آید. که می‌توان از آنها برای حدود ۱۵۰ آزمایش استفاده نمود. از سوسپانسیون هپاتوسیتها می‌توان برای آزمایشهای کوتاه مدت و نیز بلند مدت استفاده نمود. هپاتوسیتهای ایزوله به دست آمده در این تکنیک تا ۱۰ ساعت فعالیت متابولیکی خود را حفظ می‌کنند.

به دلیل اینکه در سوسپانسیون سلولی بسیاری از ماهیتهای حیاتی بافت سالم حفظ می‌شود، بنابراین این مدل آزمایشی را می‌توان جایگزین مدلهای حیوانی، رده‌های سلولی و نیز اجزای سلولی نمود. در آزمایشها روی سوسپانسیون سلولی اشکالاتی مانند حیوان، محدودیت در مصرف دارو، سمیت داروها و نیز اثر سوء دارو در مختل کردن عمل دیگر اندامها مطرح نبوده و همچنین می‌توان در مدت زمان کوتاه تعداد زیادی آزمایش را به ویژه برای تهیه منحنی‌های پاسخ به دوز برای داروها و هورمونها انجام داد.

سلولهای هپاتوسیت جدا شده با اکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شدند (شکل ۳).



شکل ۳: هپاتوسیتهای ایزوله رنگ‌آمیزی شده با اکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید

بحث

تهیه هپاتوسیتهای ایزوله به وسیله پرفیوژن کبد رت با آنزیم کلاژناز به دلیل بازده بالای آن از مدتها پیش مورد توجه و استفاده محققین بوده است و بنابراین تاکنون تعدیلات متعددی برای بهبود روش، ساده سازی و افزایش بازده آن صورت پذیرفته، ولی به دلیل نیاز به مهارت در جراحی، تجهیزات مورد استفاده نیز گران بودن روش کمتر مورد توجه محققین ایرانی بوده است.

در کار تحقیقی اخیر حداکثر تعدیلات در سیستم انجام شده تا با امکانات موجود در کشور بتوان این روش را در بیشتر آزمایشگاههای تحقیقاتی راه اندازی کرد. از جمله ویژگیهای این کار تحقیقاتی عبارتند از:

- بازده بالای سلولهای جدا شده (تقریباً تمامی سلولهای پارانشیمی در این روش از هم جدا می‌شوند).
- زیست پذیری بسیار بالای سلولهای جدا شده (تنها کمتر از ۱۰ درصد هپاتوسیتهای جدا شده با تریپان‌بلو رنگ می‌شوند).
- انجام تمامی مراحل پرفیوژن روی کبد بدون جداکردن بافت از بدن حیوان (انجام پرفیوژن به صورت *In situ*) به منظور حذف ریسک پارگی کبد در هنگام جداکردن آن از بدن حیوان و انتقال آن
- طراحی سیستم پرفیوژن و نیز دستگاه اختلاط گاز O_2 و CO_2 برای تهیه گاز کربوژن با وسایل بسیار ساده
- کنترل pH و دما در طول مدت پرفیوژن برای جلوگیری از آسیب رسیده به سلول و افزایش بازده آن
- ساده سازی جراحی و صرفه جوئی در هزینه‌های آن.

در پرفیوژن کبد ذکر نکات زیر ضروری است:

* هیپوکسی

بایستی در نظر داشت که هپاتوسیتها هم از نظر ساختمانی و هم متابولیکی بسیار آسیب‌پذیر بوده و باید دقت داشت تا از هرگونه استرس مانند واردکردن فشار مکانیکی به بافت، پاره شدن بافت و یا به هم زدن شدید سوسپانسیون سلولی، فشرده شدن بیش از حد سلولها، با فشار فیلترکردن یا کف آلوده شدن محلولها که باعث وارد آمدن آسیب جدی به سلولها می‌شود، اجتناب شود. همچنین بایستی تمامی تجهیزات تمیز و فاقد مواد پاک کننده باشند و نیز از تماس سلولها با آب یا محلولهای هیپوتونیک اجتناب نمود (۸).

اگر چه هپاتوسیتها بسته به شرایط متابولیکی آنها و نیز وضعیت حیوان قبل از جراحی می‌توانند هیپوکسی را در مدت زمان کوتاه تحمل کنند، اما زمانهای طولانی هیپوکسی در ابتدا منجر به ضایعات برگشت‌پذیر و در صورت ادامه باعث مرگ سلولها می‌شود. کیفیت سلولهای جدا شده به میزان صدمات هیپوتونیک و نیز فرصت سلول برای ترمیم آن بستگی دارد. کبد در دمای ۳۷° سانتیگراد اکسیژن موجود در محلول پرفیوژ کننده را شدیداً مصرف می‌نماید (۹)، بنابراین برای پرفیوژن کبد در این دما بایستی محلول پرفیوژ کننده مرتباً اکسیژن دهی شود. وقتی زمان پرفیوژن به دلیل نشست محلول پرفیوژن از کبد یا پایین بودن کیفیت آنزیم کلاژناز و نیز طولانی شدن مدت زمان جراحی یا

www.SID.ir

Archive of SID

بیهوشی‌های بسیار عمیق افزایش یابد، چنانچه اکسیژن دهی کافی صورت نگیرد منجر به آسیبهای جبران‌ناپذیر به هپاتوسیتها می‌شود. اثرهای هیپوکسی به سلولها ابتدا به صورت حبابهایی بر سطح سلول ظاهر می‌شود (۱۰). این حبابها نسبت به مولکولهای کوچک بسیار نفوذپذیر بوده (۱۱) و زمانهای طولانی این نفوذپذیری منجر به به هم خوردن تعادل یونی و متابولیک این حبابچه‌ها شده و در صورت پاره شدن آنها مرگ سلول را به دنبال خواهند داشت. با انکوباسیون سلولها قبل از سانتریفوژ سلول ترمیم شده و این مشکل نیز برطرف می‌شود. سانتریفوژ سلولها باید در صفر درجه سانتیگراد انجام گیرد چون سلولهای رسوب کرده در اثر سانتریفوژ خیلی زود دچار کمبود اکسیژن می‌شوند، بنابراین به دلیل به حداقل رسیدن فعالیت سلول در این درجه حرارت آسیب وارده ناچیز است (۱۲، ۱۳).

افزایش سوبسترای گلیکولیک مانند گلوکز، فروکتوز به محلول پرفیوژن مانع از صدمات ناشی از کمبود اکسیژن می‌شود. افزودن گلوکز باعث افزایش میزان هپاتوسیتهای سالم و نیز حفظ سطح ذخیره گلیکوژن شده و بدین ترتیب ذخیره گلیکوژن هپاتوسیتهای ایزوله در مراحل بعدی مورد استفاده سلول قرار می‌گیرد (۱۴).

* عمل جراحی

عمل جراحی به تمرین و کسب تجربه نیاز دارد، بنابراین ممکن است مشکلاتی را برای افراد مبتدی ایجاد نماید. لذا رعایت چند مورد در جراحی ضروری است؛ میزان بیهوشی نباید آنقدر کم باشد که موش در مراحل مختلف جراحی به هوش آید و نه آن قدر زیاد که منجر به اختلال در گردش خون حیوان یا حتی مرگ آن شود. به جای اتر بهتر است از تزریق داخل صفاتی پنتاباربیتال استفاده شود. تزریق بایستی با دقت صورت گیرد زیرا در صورت وارد شدن استرس به حیوان موجب تنگ شدن عروق شده و جراحی دچار اشکال می‌شود. برای جلوگیری از لخته شدن خون حیوان در طول جراحی، باید پس از باز نمودن شکم بلافاصله ۰/۲ میلی‌لیتر هپارین به داخل IVC تزریق شود. تزریق باید با احتیاط انجام شود. زیرا تزریق در عروق کوچک دشوار بوده و در عروق بزرگ نیز ممکن است موجب خونریزی شود. واردکردن کانول به داخل ورید باب مشکل‌ترین قسمت جراحی است و چنانچه ورید باب دچار خونریزی شود به سرعت رگ مربوطه منقبض شده و باید جراحی را تکرار نمود.

عمل کانول گذاری نیز بایستی سریع انجام پذیرد؛ در صورت طولانی شدن زمان، رگ بسته شده و امکان کانول گذاری کمتر می‌شود. در هنگام کانول گذاری بهتر است کانول را در امتداد ورید باب وارد کرد. بدین منظور قسمت پایین ورید باب را با پنس قدری کشیده تا رگ به صورت مستقیم در آید.

* کلسیم

با افزایش کلسیم در مرحله دوم پرفیوژن سرعت جدا شدن سلولهای کبدی چندین بار افزایش می‌یابد. مناسبترین غلظت کلسیم ۵ میلی‌مولار است (۱۵). احتمالاً در این مرحله یون کلسیم باعث فعال شدن دیگر آنزیمهایی که به صورت ناخالصی همراه آنزیم کلاژناز هستند، نیز می‌شود. افزایش کلسیم به همراه آنزیم کلاژناز باید در مرحله دوم پرفیوژن انجام گیرد، زیرا بافر مورد استفاده در مرحله اول به منظور شکستن اتصالات دسموزومی کاملاً عاری از کلسیم بوده و مقادیر ناچیز کلسیم می‌تواند باعث اختلال در به دست آوردن نتیجه مطلوب شود. بدین ترتیب بهتر است در این مرحله از شلاتورهای کلسیم و ترجیحاً EGTA استفاده شود. لذا در هر بار استفاده مجدد از دستگاه پرفیوژن توصیه می‌شود برای جلوگیری از آلودگیهای کلسیمی به جا مانده از مرحله دوم پرفیوژن تمامی مسیرها و قطعات به خوبی شستشو شوند.

حضور یون کلسیم در مرحله دوم پرفیوژن علاوه بر افزایش سرعت جداسازی هپاتوسیتها باعث حفظ سطح یون کلسیمی سلولی نیز می‌شود. یون کلسیم برای تمامیت اتصالات محکم باز و نیز دسموزوم ضروری بوده و لذا حذف یون کلسیم برای شکستن این اتصالات مهمتر از هضم بافت همبند به وسیله کلاژناز است. از طرفی وجود یون کلسیم برای فعالیت آنزیم کلاژناز ضروری بوده و حذف آن باعث از دست دادن فعالیت این آنزیم می‌شود. ولی از آنجاکه با حذف یون کلسیم در مرحله اول پرفیوژن اتصالات بین سلولی به طور برگشت‌ناپذیر شکسته می‌شود، بنابراین در مرحله دوم با افزودن حداقل کلسیم مورد نیاز برای فعالیت آنزیم کلاژناز از تخلیه کامل کلسیم سلول که برای فعالیت آن لازم است نیز جلوگیری می‌شود (۱۶، ۱۷، ۱۸).

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از همکاری جناب آقای دکتر رسائی ریاست محترم دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس جهت مساعدت در تهیه قسمتهایی از سیستم پرفیوژن تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Moldeus P, Hogberg J, Orrenius S: Isolation and use of liver cells. Met Enzymol 1978; 5260-5271
2. Howard RB, Pesch LA: Respiratory activity of intact, isolated parenchymal cells from rat liver. J Biol Chem 1968; 10; 243(11): 3105-3109
3. Berry MN, Friend DS: High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. J Cel lBiol 1969; 43(3): 506-520
4. Hogberg J, Kristoferson A: A correlation between glutathione levels and cellular damage in isolated hepatocytes. Eur J Biochem 1977; 15; 74(1): 77-82
5. Berry MN, Edwards AM, Barrit GJ: Isolated hepatocyes preparation, properties and applications. Burdon RH, Knippenderg H(eds), volume 21, New

www.SID.ir

Archive of SID

York, Elsevier 1991, pp 26
6. Seglen PO: Preparation of rat liver cells. I. Effect of Ca 2+ on enzymatic dispersion of isolated, perfused liver. Exp Cell Res 1972; 74(2): 450-454
7. Seglen PO: Preparation of rat liver cells. 3. Enzymatic requirements for tissue dispersion. Exp Cell Res 1973; 82(2): 391-398
8. Seglen PO: Isolation of hepatocyes by collagenase perfusion. Methods in toxicology, Volume 14, Academic Press, 1995, pp 251-243
9. Seglen PO: The effect of perfusate pH on respiration and glycolysis in the isolated rat liver perfused with an erythrocyte- and protein-free medium. Biochem Biophys Act 1972; 16: 264(3): 398-410
10. Solheim AE, Seglen PO: Cellular and lysosomal uptake of methylamine in isolated rat hepatocytes. Biochem J 1983; 15; 210(3): 929, 36
11. Gordon PB, Tolleshaug H, Seglen PO: Autophagic sequestration of [14C]sucrose introduced into isolated rat hepatocytes by electrical and non-electrical methods. Exp Cell Res 1985; 160(2), 449-458
12. Seglen PO: Effects of anaerobiosis, glucose, insulin and glucagon on glycogen metabolism in isolated parenchymal rat liver cells. FEBS-Lett 1973; 36(3): 309-312
13. Seglen PO: Inhibitor of protein degradation formed during incubation of isolated rat hepatocytes in a cellculture medium. Its identification as ammonia. Exp Cell Res 1977; 107(1): 207-217
14. Bellemann P, Gebhardt R, Mecke D: An improved method for the isolation of hepatocytes from liver slices. Selective removal of Trypan blue-dyeable cells. Anal- Biochem 1977; 81(2): 408-415
15. Seglen PO: Preparation of rat liver cells. II. Effects of ions and chelators on tissue dispersion. Exp Cell Res 1973; 76(1): 25-30
16. Barnabei O, Leghissa G, Tomasi V: Hormonal control of the potassium level in isolated rat liver cells. Biochem Biophys Act 1974; 5: 362(2): 316-325
17. Baur H, Kasperek S, Pfaff E: Criteria of viability of isolated liver cells. Hoppe Seylers Z Physiol Chem 1975; 356(6): 827-838
18. Edmondson JW, Bang NU: Deleterious effects of calcium deprivation on freshly isolated hepatocytes. Am J Physiol 1981; 241(1): C3-8

www.SID.ir