

جداسازی و کشت اولیه هیاتوسیت های کبد رت با استفاده از آنزیم اکتینیدین میوه کیوی

زینب شیروانی فارسانی* ، کامران منصوری** ، دکتر علی بیدمشکی پور*** ، دکتر علی مصطفایی****

دریافت: ۸۵/۹/۱۰ ، پذیرش: ۸۶/۳/۲۱

چکیده:

مقدمه و هدف: برای تجزیه ماتریکس خارج سلولی، جداسازی و کشت اولیه سلول‌ها، از آنزیم‌های پروتئولیتیک، بخصوص کلاژناز برای هضم بافت استفاده می‌شود. یافتن پروتئاز جایگزین کلاژنازهای باکتریایی یا جانوری در منابع گیاهی که راحت‌تر و کم‌هزینه‌تر تخلیص گردد، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در مطالعه حاضر از آنزیم اکتینیدین که به وفور در میوه کیوی یافت می‌شود، برای جداسازی و کشت هیاتوسیت‌های کبد موش صحرایی استفاده شد.

روش کار: در این مطالعه تجربی آنزیم اکتینیدین پس از تخلیص، در غلظت‌های مختلف با روش پرفیوژن یک و دومرحله‌ای برای جداسازی هیاتوسیت‌ها از کبد موش صحرایی بکار برده شد. هیاتوسیت‌های جدا شده در پلیت‌های کلاژن‌دار در محیط کشت ویلیامز - ای کشت داده شدند. درصد زنده بودن سلول‌های جدا شده با استفاده از آزمون تریپان‌بلو و مورفولوژی سلول‌ها در مراحل کشت پس از رنگ آمیزی با روش پاپانیکولا بررسی شد.

نتایج: اکتینیدین با غلظت ۰/۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در روش پرفیوژن دومرحله‌ای توانست بطور مناسب هیاتوسیت‌ها را از کبد موش جدا نماید. درصد سلول‌های جدا شده ۹۵-۹۰ درصد تخمین زده شد. سلول‌ها پس از کشت در پلیت‌های حاوی کلاژن مورفولوژی هیاتوسیت را به وضوح نشان دادند.

نتیجه نهایی: این نتایج نشان داد که اکتینیدین پروتئاز مناسبی برای جداسازی هیاتوسیت‌ها از کبد است. بعلاوه، تخلیص اکتینیدین در مقایسه با کلاژنازها ساده‌تر و کم‌هزینه‌تر است.

اکتینیدین / کلاژناز / هیاتوسیت

مقدمه:

آزمایشگاه برای انجام مطالعات در زمینه گرفتن دارو و متابولیسم آن، القای سیتوکروم P450، واکنش‌های دارویی مؤثر در متابولیسم کبدی و هیاتوتوکسیسیته ضرورت دارد (۳،۴). بافت کبد مانند دیگر بافت‌ها شامل سلول‌ها و ماتریکس خارج سلولی متشکل از انواعی از پروتئین‌های رشته‌ای (مانند کلاژن و الاستین) و غیررشته‌ای است (۵). یکی از فراوان‌ترین پروتئین‌های فضای خارج سلولی، کلاژن است که انواع مختلفی دارد و در اندام‌های نرم مانند

کبد جایگاه مهمی در زدودن سموم طبیعی و صنایع از خون دارد و انواعی از پروتئین‌های ناقل همچون لیپوپروتئین، آلبومین و ترانسفرین را می‌سازد (۱،۲). بسیاری از فاکتورهای مولکولی و بیوشیمیایی کنترل‌کننده بیان و تنظیم ساختار و عملکرد هیاتوسیت‌ها هنوز ناشناخته باقی مانده است. به همین علت، جداسازی هیاتوسیت‌ها از کبد و کشت اولیه این سلول‌ها در

* کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه رازی کرمانشاه

** کارشناسی ارشد هماتولوژی مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

*** استادیار گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم دانشگاه رازی کرمانشاه

**** دانشیار ایمنولوژی مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه (amostafaie@kums.ac.ir)

کبد، شبکه رشته‌ای ظریفی تشکیل می‌دهد. همه انواع کلاژن ساختمان کلی مشابهی متشکل از یک مارپیچ سه تایی دارند (پروکلاژن) که از سه زنجیره آلفا به طول ۱۰۰۰ اسید آمینه با توالی تکراری Gly-X-Y ساخته شده است (X اغلب پرولین و Y اغلب هیدروکسی پرولین است) (۵،۶). مولکول کلاژن به اغلب پروتئازها غیر از کلاژنازاها مقاوم است (۵،۷). به همین علت از کلاژنازاها در جداسازی سلول‌های مختلف از بافت‌های جامد همچون کبد استفاده می‌شود.

اکتینیدین یک سیستمین پروتئاز است که در میوه کیوی به وفور وجود دارد. این پروتئاز از نظر خصوصیات کلی مشابه سایر سیستمین پروتئازهای گیاهی (همچون پاپائین) و سیستمین پروتئازهای حیوانی (همچون کاتپسین‌ها) است (۱۰-۸). پیش‌ساز آنزیم اکتینیدین در سلول (پری پروآنزیم) دارای ۳۰۲ اسید آمینه و وزنی معادل ۳۲۷۴۵ دالتون و شکل فعال آنزیم دارای ۲۲۰ اسید آمینه و وزنی معادل ۲۳۵۰۸ دالتون است (۱۱،۱۲). اکتینیدین یک پروتئاز مناسب در ترد کردن گوشت است و در هضم مواد پروتئینی در بیماران دارای مشکل گوارشی قابل استفاده می‌باشد. در چند مطالعه اثر کلاژنازی اکتینیدین مورد بررسی قرار گرفته است (۱۵-۱۳). بطور کلی نتایج این مطالعات حاکی از آن است که اکتینیدین قادر به هیدرولیز مولکول طبیعی کلاژن نیست ولی آتلوکلاژن (کلاژن پس از هضم جزیی توسط پپسین) را هیدرولیز می‌کند (۱۵).

برخلاف نتایج این مطالعات، مصطفایی و همکاران نشان دادند که اکتینیدین در شرایط دارای pH خنثی یا قلیایی ضعیف قادر به هضم کلاژن نوع یک است (۱۶). براین اساس و با توجه به قابلیت اکتینیدین در ترد کردن گوشت، اثر این آنزیم درغلظت‌های مختلف در مقایسه با کلاژناز برای جداسازی هیپاتوسیت‌ها از کبد رت و کشت این سلول‌ها مورد مطالعه قرار گرفت.

روش کار:

در این مطالعه تجربی آنزیم اکتینیدین میوه کیوی طبق روش استفاده شده در مطالعه مصطفایی و همکاران طی مراحل رسوب دهی با سولفات آمونیوم و کروماتوگرافی تعویض یون تخلیص شد (۱۷). موش بزرگ (رت) از نژاد ویستار (انستیتو رازی ایران)، محیط کشت ویلیامز-ای، کلاژناز (Sigma-Aldrich)، جنتامایسین

اجزای زیر بود:

- ۱- بن ماری: دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد را برای بافرها، محلول آنزیم و تمام قسمت‌های دستگاه تأمین می‌کند. بن ماری به پمپ ۱ و ظرف دوجداره وصل می‌شود.
- ۲- ظرف دوجداره: جدار بیرونی آن (ژاکت)، حاوی آب ۳۷ درجه است که توسط پمپ ۱ از بن ماری دریافت می‌شود. قسمت داخلی این ظرف، محل قرار گرفتن بافرها و یا محلول آنزیم است و از پایین به پمپ ۲ متصل است.
- ۳- پمپ ۱: از یک طرف آب ۳۷ درجه را از بن ماری به درون ژاکت ظرف دوجداره پمپ می‌کند و از طرف دیگر، آب درون ژاکت را به بن ماری بر می‌گرداند و یک چرخه آب بین بن ماری و ظرف دو جداره ایجاد می‌نماید.
- ۴- پمپ ۲: از یک طرف به جدار داخلی ظرف و از طرف دیگر توسط سوزن پروانه‌ای به کبد متصل است و بافر و یا محلول آنزیم را به درون کبد پمپ می‌کند.

آماده سازی دستگاه پرفیوژن :

- ۱- آب مقطر استریل درون محفظه بن ماری ریخته و دمای آن روی ۳۷ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد.
- ۲- پس از رسیدن دمای آب به ۳۷ درجه سانتی‌گراد، پمپ ۱ روشن شد تا آب ۳۷ درجه وارد ژاکت ظرف دو جداره شود و چرخه آب آغاز گردد.
- ۳- ۱۰-۵ دقیقه پس از روشن کردن پمپ ۱، ۳۰ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد درون بخش داخلی ظرف ریخته شد.
- ۴- پمپ ۲ روشن شد و الکل خروجی جمع‌آوری شد.
- ۵- مراحل ۳ و ۴ با ۳۰ میلی لیتر آب مقطر استریل تکرار شد.
- ۶- پس از خشک شدن اجزای دستگاه، بافر KHB بدون کلسیم و سولفات (بافر ۲) درون بخش داخلی ظرف ریخته شد.

جداسازی و کشت اولیه هپاتوسیت های کبدی

۱- یک پنبه آغشته به کلروفرم درون یک محفظه بسته قرار گرفت. رت در این محفظه قرار داده شد تا بیهوش شود. ۲۰ میکرولیتر هپارین به درون سیاهرگ رانی حیوان تزریق شد.

۲- زیر هود بیولوژی و با وسایل استریل، شکم حیوان تا زیر گردن باز شد و ورید اجوف تحتانی در بالای کبد توسط یک پنس گیره دار بسته شد.

۳- روده‌ها به سمت چپ بدن حیوان و کبد به سمت بالا کنار زده شد تا سیاهرگ پورتال به وضوح دیده شود.

۴- یک سوزن پروانه ای (MEHECO) G23 که از قبل به دستگاه پرفیوژن متصل شده، به درون سیاهرگ پورتال فرو برده شد و سوزن در محل مربوطه با یک پنس گیره‌دار محکم گردید.

۵- دستگاه روشن شد و بافر ۲ با سرعت تزریق ۱۰ میلی لیتر در هر دقیقه تنظیم شد. ۲-۱ دقیقه پس از شروع تزریق، یکی از شاخه‌های رگ پورتال قطع شد

۶- تزریق بافر تا سفید شدن کبد (۱۵-۱۰ دقیقه) ادامه یافت. سپس محلول اکتینیدین تخلیص شده یا کلاژناز جایگزین بافر ۲ شد. غلظت آنزیم در آزمون های جداگانه شامل ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، ۱ میلی گرم در میلی لیتر و سرعت تزریق آن معادل ۷ میلی لیتر در دقیقه برای مدت ۱۵ دقیقه بود.

۷- کبد به طور کامل از بدن حیوان جدا شد و درون ظرف حاوی ۲۰ میلی لیتر محلول آنزیم (اکتینیدین یا کلاژناز با غلظت های ذکر شده در مرحله ۶) قرار گرفت.

۸- ظرف حاوی کبد، درون انکوباتور شیکردار به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه با سرعت بالا در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد تکان داده شد.

۹- مخلوط سلولی حاصله از دو لایه گاز استریل عبور داده شد. تعلیق سلولی بدست آمده در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب سلولی درون بافر ۲ به تعلیق در آمد. سلول ها دو بار با بافر ۲ شسته شده و بعد از آخرین سانتریفیوژ، در ۵ میلی لیتر محیط کشت ویلیامز-ای حاوی ۱۰٪ FCS به تعلیق درآمدند.

۱۰- سلولهای جدا شده به یک پلیت (قطر ۶۰ میلی متر، NUNC) کلاژن دار منتقل گردید. پلیت در محیط ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵٪ CO₂ و ۹۵٪ O₂ انکوبه شد.

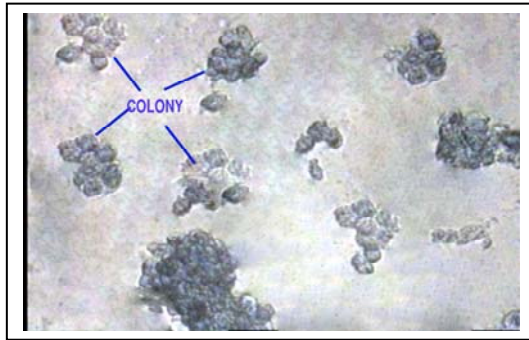
۱۱- ۲۴ ساعت بعد از کشت سلول های هپاتوسیت، محیط کشت تعویض شد. مورفولوژی سلول ها در تمام مراحل کشت با میکروسکوپ معکوس بررسی شد.

تعیین تعداد و درصد بقای هپاتوسیت‌های جدا شده: برای شمارش تعداد هپاتوسیت‌های جدا شده به وسیله آنزیم، یک قطره از سوسپانسیون سلولی روی لام نئوبار ریخته شد و لامل روی آن قرار گرفت. تعداد سلول‌ها در ۴ خانه بزرگ کناری شمارش شد. در نهایت عدد حاصل از شمارش در ضرب رقت سوسپانسیون سلولی و عدد ۱۰ ضرب شد. برای تعیین درصد بقای هپاتوسیت‌های جدا شده، ۲۵۰ میکرولیتر از تعلیق سلولی با ۳ میلی لیتر بافر فسفات نمکی (PBS) مخلوط شد و در ۳۰۰۰ دور به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ گردید. شستشو با PBS ۲-۳ بار انجام شد. پس از آخرین سانتریفیوژ، مایع رویی دور ریخته شد و به رسوب باقی مانده، ۳ میلی لیتر PBS اضافه گردید و با پیپتاژ سلول ها به تعلیق درآمدند. یک قطره از این سوسپانسیون با یک قطره از تریپان بلو ۰/۴٪ مخلوط شد. قطره ای از تعلیق حاصله روی لام قرار گرفت. تعداد کل سلول ها و سلول‌های رنگ شده با تریپان بلو شمارش گردید. سپس از فرمول زیر درصد بقای سلول ها بدست آمد:

$100 \times \text{تعداد کل سلول ها} / \text{تعداد سلولهای رنگ نگرفته} = \text{درصد بقا}$
رنگ آمیزی هپاتوسیتها با روش پاپانیکولا: ابتدا هپاتوسیتها چسبیده به کف پلیت با پیپتاژ از کف جدا شده و به صورت تعلیق درآمدند. چند قطره از این تعلیق روی لام ریخته شد و با متافول به مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه فیکس شد. برای رنگ آمیزی با روش پاپانیکولا، مراحل متعدد تثبیت و رنگ آمیزی با همانوکسیلین و ائوزین صورت گرفت سپس لام ها زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند (۱۸).

نتایج:

در این مطالعه هپاتوسیت‌های کبد توسط اکتینیدین در مقایسه با کلاژناز در غلظت های مختلف با روش های مکانیکی، پرفیوژن یک مرحله ای و پرفیوژن دومرحله‌ای جدا شدند. در روش‌های خردکردن مکانیکی و پرفیوژن یک مرحله‌ای همراه با هپاتوسیت‌های جدا شده، تعداد زیادی گلبول قرمز نیز جدا شد و تعداد هپاتوسیت‌های جدا شده کم بود. برای حل این مشکلات، دستگاه پرفیوژن در آزمایشگاه طراحی گردد. در روش پرفیوژن دومرحله ای

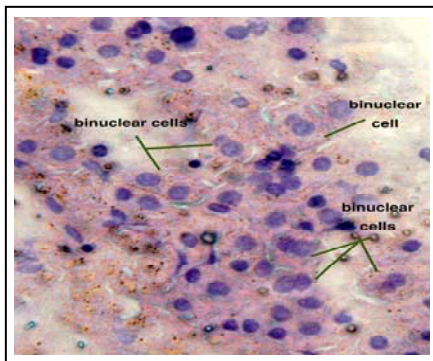


شکل ۲: مورفولوژی هپاتوسیت های جدا شده توسط

آنزیم اکتینیدین بعد از ۲۴ ساعت

(میکروسکوپ معکوس با بزرگنمایی ۱۰۰).

۴۸ ساعت پس از جداسازی، سلول ها به صورت شش ضلعی درآمدند و محکم به کف پلیت کلاژن دار چسبیدند. مشخصه بارز هپاتوسیت ها در این مرحله، داشتن یک یا دو هسته بزرگ و گرد است که پس از رنگ آمیزی سلول با روش پاپانیکولا، کاملاً مشخص بودند (شکل ۳).



شکل ۳: مورفولوژی هپاتوسیت های جدا شده با آنزیم

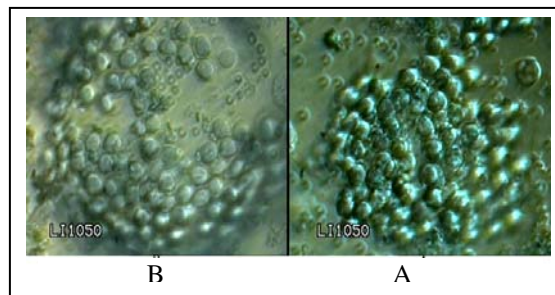
اکتینیدین ۴۸ ساعت پس از جداسازی

(میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۲۰۰).

این سلول ها در محیط کشت ویلیامز-ای حاوی ۱۰٪ FCS بدون افزودن مواد دیگر مانند هورمون ها و فاکتورهای رشد، ۴-۵ روز زنده ماندند و برای کشت طولانی تر نیازمند فاکتورهای رشد بودند.

نتایج حاصل از شمارش و تعیین درصد بقای هپاتوسیت های جدا شده از کبد موش صحرائی به وسیله آنزیم اکتینیدین: نتیجه حاصل از شمارش هپاتوسیت های جدا شده با استفاده از پرفیوژن دومرحله ای اکتینیدین، تعداد $2/75 \times 10^6$ سلول در هر میلی لیتر بود. طبق نتیجه به دست آمده، غلظت ۰/۴ میلی گرم در میلی لیتر آنزیم اکتینیدین بیشترین هپاتوسیت سالم را از کبد استخراج نمود و به عنوان غلظت بهینه آنزیم انتخاب گردید.

آلودگی هپاتوسیت های جدا شده با گلبول قرمز بسیار کم بود، به طوری که پس از سه بار شستشو و سانتریفیوژ، گلبول های قرمز کمی که با هپاتوسیت ها استخراج شده بودند، از محیط عمل خارج شدند. در این روش قبل از تزریق آنزیم، کبد در حالی که به دستگاه پرفیوژن وصل بود از بدن موش جدا شد و آویزان نگه داشته شد و در هنگام پرفیوژن آنزیم، سوسپانسیون خروجی از کبد در ظرف استریل جمع آوری گردید. سپس این سوسپانسیون از گاز استریل عبور داده شد و سانتریفیوژ گردید، اما به دلیل این که این مراحل نتیجه لازم را نداشت با مراحل ۷-۸ گفته شده در قسمت مواد و روش ها جایگزین شد. در این مطالعه، غلظت های مختلف آنزیم اکتینیدین (۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی گرم در میلی لیتر) در مقایسه با کلاژناز برای جداسازی هپاتوسیت ها استفاده شد. نتایج تعداد سلول بدست آمده و درصد بقا نشان داد که غلظت ۰/۴ میلی گرم در میلی لیتر این آنزیم در شرایط فوق، غلظت بهینه جهت جداسازی هپاتوسیت های زنده و سالم از کبد رت و مشابه نتایج کلاژناز در غلظت ۰/۴-۰/۲ میلی گرم در میلی لیتر است. هپاتوسیت های جدا شده حاصل از پرفیوژن دومرحله ای آنزیم اکتینیدین (با غلظت ۰/۴ میلی گرم در میلی لیتر) در پلیت های حاوی کلاژن کشت داده شدند. این سلولها، کروی بوده و سیتوپلاسم شفاف و سالم داشتند. هپاتوسیت ها در ابتدا گرد، به هم چسبیده و توده ای شکل بودند و هسته و شش ضلعی بودن آنها مشخص نبود (شکل ۱).



شکل ۱: مورفولوژی هپاتوسیت های جدا شده توسط آنزیم

اکتینیدین (A) و کلاژناز (B) بلافاصله پس از جداسازی

(میکروسکوپ معکوس با بزرگنمایی ۴۰۰)

۲۴ ساعت پس از جداسازی، تعداد کمی از این سلول ها از حالت توده ای به حالت منفرد درآمدند و مورفولوژی آنها از حالت گرد به حالت شش ضلعی تغییر کرد و به طور ضعیف به کف پلیت متصل شدند (شکل ۲).

می شود (۲۸-۲۶، ۲۰).

در بررسی منابع مختلف، تاکنون مطالعه‌ای در ارتباط با جداسازی سلولها با اکتینیدین یافت نشده است. لذا مطالعه حاضر ظاهراً "اولین مطالعه‌ای است که با کمک پروتئازی جدید به جداسازی هیپاتوسیتها پرداخته و به نتایج قابل توجهی دست یافته است. تا کنون چند مطالعه در مورد اثر هیدرولیزی آنزیم اکتینیدین روی کلاژن انجام گرفته که در آنها اثر هیدرولیزی آنزیم بر مولکول کلاژن دیده نشده است. برای مثال، سوچی یاما و همکارانش گزارش کردند که اکتینیدین هیچ گونه فعالیت کلاژنازی ندارد (۱۳). موری موتو و همکارانش نیز نشان دادند که اکتینیدین قادر نیست در شریط اسیدی کلاژن طبیعی را هیدرولیز کند اما این آنزیم در pH اسیدی آتلوکلاژن (کلاژن پس از هضم جزئی توسط پیسین) را می شکند (۱۵). در مقایسه با مطالعات فوق، مصطفایی و همکارانش نشان دادند که آنزیم اکتینیدین در بافر استات با pH معادل ۴ و بافر سترات با pH معادل ۵/۵ بر کلاژن نوع اول اثر قابل توجهی ندارد ولی در pH معادل ۷ (بافر فسفات) و بالاتر از آن (بافر تریس) این نوع کلاژن را کاملاً هیدرولیز می نماید (۱۶). لذا این آنزیم در pH های خنثی و قلیایی ضعیف، اثرات کلاژنازی قابل توجهی دارد. براین اساس، به نظر می رسد کارایی مطلوب اکتینیدین در جداسازی سلولهای کبدی ناشی از فعالیت کلاژنازی آن باشد.

نتیجه نهایی:

باتوجه به کم بودن مقدار کلاژنازها در منابع باکتریایی و یا جانوری و مشکلات تخلیص این آنزیم ها (۳۱-۲۹)، اکتینیدین باتوجه به وفورش در میوه کیوی و ساده تر بودن مراحل تخلیص، میتواند جایگزین مناسبی برای کلاژنازها در جداسازی سلولها از بافت های جامد باشد. به هر حال، با انجام مطالعات بیشتر در خصوص اثر اکتینیدین بر انواع دیگر کلاژن و اثر این آنزیم در جداسازی سلول از سایر بافت ها بخصوص بافت های حاوی کلاژن بیشتر، صحت چنین ادعایی روشن خواهد شد و به ارزش این پروتئاز گیاهی در کنار ارزش آن در صنایع غذایی و دارویی خواهد افزود.

سپاسگزاری:

با تشکر از همکاری و مساعدت آقای دکتر داریوش شکیبایی در تهیه حیوان آزمایشگاهی مورد نیاز، خانم مریم چلبی در تخلیص آنزیم اکتینیدین و پرسنل مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی.

درصد بقای هیپاتوسیت های جدا شده در غلظت ۰/۴ میلی گرم در میلی لیتر از آنزیم اکتینیدین ۹۵-۹۰٪ تخمین زده شد. این نتیجه نشان داد که سلولها، سالم و زنده جدا شده اند و غلظت ۰/۴ میلی گرم در میلی لیتر این آنزیم و روش پرفیوژن دومرحله ای برای جداسازی هیپاتوسیت های کبد مناسب است. اکتینیدین همچون کلاژناز در غلظت های پایین تر از ۰/۴ میلی گرم در میلی لیتر تعداد کمتری از هیپاتوسیتها را استخراج نمود و در غلظت های بالاتر از ۰/۴ میلی گرم در میلی لیتر درصد بقای سلول های جدا شده کمتر بود.

بحث:

کلاژنازها از انتخابی ترین پروتئازها در جداسازی انواع سلولها از بافت های مختلف از جمله سلول های سالم پارانئیمی از بافت کبد انسان و موش هستند (۲۰، ۱۹). برای اولین بار در سال ۱۹۶۹ روشی برای جداسازی هیپاتوسیت های سالم با درصد بقای بالا گزارش گردید. این روش شامل هیدرولیز بافت کبد بوسیله پرفیوژن مستقیم کبد با یک محلول نمکی حاوی آنزیم های کلاژناز و هیالورونیداز بود (۲۱). سگلن (Seglen) نشان داد که اگر یون کلسیم در پرفیوژن اولیه به بافت کبد حذف گردد و سپس محلول حاوی کلاژناز اضافه شود، نتیجه بهتری بدست خواهد آمد (۲۲). در بسیاری از مطالعات دیگر نیز برای جداسازی هیپاتوسیت ها از پرفیوژن دو مرحله ای کبد استفاده شد (۲۷-۲۳، ۲۰). در مطالعه حاضر که برای اولین بار در آن از پروتئاز جدیدی به عنوان جایگزین کلاژناز برای جداسازی سلول های کبدی استفاده شد، روش پرفیوژن دو مرحله ای به نتیجه بهتری نسبت به روش هیدرولیز مکانیکی بافت بدون پرفیوژن یا پرفیوژن یک مرحله ای انجامید. درصد بقای هیپاتوسیت های جدا شده با غلظت بهینه آنزیم اکتینیدین در این مطالعه ۹۰-۹۵٪ تخمین زده شد که قابل مقایسه با نتایج حاصل از کلاژناز در این مطالعه و مطالعات دیگران است. برای مثال، پوویانی و همکارانش درصد بقای هیپاتوسیت های جدا شده از کبد موش صحرایی با استفاده از کلاژناز را ۹۰٪ (۲۴)، وانگ و همکارانش، ۹۰-۹۸٪ و در مطالعه ای دیگر ۹۰٪ (۲۶، ۲۸) و آتماکا، ۹۵٪ (۲۷) گزارش کرده اند. از نظر تعداد سلول های جدا شده با آنزیم اکتینیدین در مطالعه حاضر در مقایسه با آنزیم کلاژناز در این مطالعه و مطالعات دیگران نیز نتایج مشابه و قابل مقایسه ای دیده

منابع:

- Komai T, Shigehara E, Tokui T, Koga T, Ishigami M, Kuroiwa C, et al. Carrier-mediated uptake of pravastatin by rat hepatocytes in primary culture. *J Biochem Pharmacol.* 1992; 43(4): 667-670.
- Parkinson A. An overview of current cytochrome P450 technology for assessing the safety and efficacy of new materials. *J Toxicol Pathol.* 1996; 24: 45-57.
- LeCluyse EL. Human hepatocyte culture systems for the in vitro evaluation of cytochrome P450 expression and regulation. *Eur J Pharm Sci.* 2001;13(4): 343-368.
- LeCluyse EL, Madan A, Hamilton G, Carroll K, Dehaan R, Parkinson A. Expression and regulation of cytochrome P450 enzymes in primary cultures of human hepatocytes. *J Biochem Mol Toxicol.* 2000; 14: 177-188.
- Culav EM, Clark CH, Merrilees MJ. Connective tissues: Matrix composition and its relevance to physical therapy. *J Physic Ther* 1999; 79(3): 308-319.
- Kleinman HK, Klebe RJ, Martin GR. Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. *J Cell Biol* 1981;88:473-485.
- Goldberg GI, Wilhelm SM, Kronberger A, Bauer EA, Grant GA, Eisen AZ. Human fibroblast collagenase. *J Biol Chem* 1986; 261 (14): 6600-6605.
- Boland MJ, Hardman MJ. Kinetic studies on the thiol protease from *Actinidia chinensis*. *FEBES Lett.* 1972; 27(2): 282-284.
- Reid DJ, Hussain S, Bailey TSF, Sonkaria S, Sreedharan SK, Thomas EW, et al. Isomerization of the uncomplexed actinidin molecule: kinetic accessibility of additional steps in enzyme catalysis provided by solvent perturbation. *J Biochem.* 2004; 378: 699-703.
- Paul W, Amiss J, Try R, Praekelt U, Scott R, Smith H. Correct processing of the Kiwifruit protease actinidin in transgenic tobacco requires the presence of the C-terminal propeptide. *J Plant Physiol.* 1995; 108: 261-268.
- Podivinsky E, Forsterl RLS, Gardner RC. Nucleotide sequence of actinidin, a kiwifruit protease. *J Nucl Acid Res* 1989; 17(20): 8363.
- Carne A, Moore CH. The amino acid sequence of the tryptic peptides from actinidin, a proteolytic enzyme from the fruit of *Actinidia chinensis*. *J Biochem.* 1978; 173: 73-83.
- Sugiyama S, Ohtsuki K, Sato K, Kawabata M. Enzymatic properties, substrate specificities and pH-activity profiles of two kiwifruit proteases. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1997; 43(5): 581-9.
- Ohyama H, Enomoto T, Mitsunaga S. Variety of kiwifruit protease and their collagenolytic activity. *Nippon Eiyo Syokuyo Gakkaishi (in Japanese).* 1997; 50: 57-62.
- Morimoto K, Kuni S, Hamano K, Tonomura B. Preparation and structural analysis of actinidain-processed atelocollagen of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*). *J Biosci Biotechnol Biochem.* 2004; 68: 861-867.
- مصطفایی علی، چلبی مریم، فردوسی محمد اسماعیل. تخلیص اکتینیدین میوه کیوی و بررسی فعالیت پروتئولیتیکی آن. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، سال ۱۳۸۳.
- مصطفایی علی، چلبی مریم. اکتینیدین میوه کیوی: خالص سازی و بررسی مقدار آن در وارپته های داخلی. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، دوره دهم، شماره ۳، ۱۳۸۵: ۲۲۳-۲۳۰.
- Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. *Histology: a text and atlas.* 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2003, pp. 561-568.
- Maekubo H, Ozaki S, Mitmaker B, Kalant N. Preparation of human hepatocytes for primary culture. *J In vitro* 1982;18:483-491.
- McGowan J, Bucher A, Nancy LR. The isolation of adult rat liver parenchymal cells. *J Tissue Culture Methods* 1985;9(2):49-52.
- Berry MN, Friend DS. High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J Cell Biol* 1969; 43: 506-520.
- Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.* 1976; 13: 29-34.
- Chen HL, Wu HL, Fon CC, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Long-term culture of hepatocytes from human adults. *J Biomed Sci.* 1998; 5: 435-440.
- Puviani AC, Ottolenghi C, Tassinari B, Pazzi P, Morsiani E. An update on high-yield hepatocyte isolation methods and on the potential clinical use of isolated liver cells. *Comp Biochem Physiol.* 1998; 121: 99-109.
- Li J, Li LJ, Chao HC, Yang Q, Liu XL, Sheng JF, et al. Isolation and short term cultivation of swine hepatocytes for bioartificial liver support system. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2005; 4(2): 249-253.
- Wang YJ, Liu HL, Guo HT, Wen HW, Liu J. Primary hepatocyte culture in collagen gel mixture and collagen sandwich. *J Gastroenterol.* 2004; 10(5): 699-702.
- Atmaca M. Improvement of the original isolation procedure for hormone studies in short-time culture. *J Dicle Tip Dergisi.* 2005; 32(2): 63-68.

28. Wang YJ, Li MD, Wang YM, Ding J, Nie OH. Simplified isolation and spheroidal aggregate culture of rat hepatocytes. *World J Gastroenterol.* 1998; 4(1): 74-76 .
29. Wittstock M, Flemmig TF, Schmidt H, Mutters R, Karch H. Serodiagnosis of *Porphyromonas gingivalis* infection by immunoblot analysis with recombinant collagenase. *J Clin Microbiol* 1996; 34(10): 2411-1413.
30. Yoshihara K, Matsushita O, Minami J, Okabe A. Cloning and nucleotide sequence analysis of the colH gene from *Clostridium histolyticum* encoding a collagenase and a gelatinase. *J Bacteriol.* 1994; 176(21): 6489-6496.
31. Murphy G, Reynolds JJ, Bretz U, Baggiolini M. Partial purification of collagenase and gelatinase from human polymorphonuclear leucocytes: Analyses of their actions on soluble and insoluble collagens. *J Biochem.* 1982; 203: 209-221.

Archive of SID