

پرفیوژن و جداسازی هپاتوسیت از کبد رات

مهدی رسولی⁺ (Ph.D.) * حمیدرضا عسگری^{**} (Ph.D.)

چکیده

سابقه و هدف: پرفیوژن کبد برای مطالعه متابولیسم ویژه در این ارگان و نیز تهیه هپاتوسیت به کار می‌رود. برای تهیه هپاتوسیت از کبد رات به طور کلی سه روش مکانیکی، شیمیایی و آنزیمی وجود دارد. هر سه روش دارای مزایا و معایب خاص می‌باشند. به نظر می‌رسد تلفیقی از هر سه روش منجر به آسیب کمتر غشاء سلول و بازده بیش‌تر عمل می‌شود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه کبد در محل خود (in situ) کانوله می‌شود و بر اساس روش شیمیایی - آنزیمی در سه مرحله پرفیوژن می‌گردد. در اولین مرحله کبد توسط مسیر تک مسیری باز توسط محلول کربس - رینگر فاقد کلسیم و منیزیم و حاوی شلاتور کلسیم (EDTA)^۱ به مدت ده دقیقه پرفیوژن گردید. در دومین مرحله کبد توسط محلول کربس - رینگر فاقد کلسیم، منیزیم و شلاتور کلسیم برای شستشوی عروق کبد از شلاتور به مدت یک دقیقه دیگر پرفیوژن می‌گردد. در سومین مرحله کبد توسط کربس - رینگر آنزیم کلاژناز (۲۰۰ IU/mL) به مدت نه دقیقه توسط سیستم دو مسیری بسته پرفیوژن گردید. سلول‌های هپاتوسیت در غلظت $9 \times 10^6 - 7$ در محیط کربس - رینگر (بافر بیکربنات) در فلاسک‌های شیشه‌ای مخصوص تحت جو (۵ : ۹۵، O₂:CO₂) انکوبه شدند. برای بررسی زنده بودن سلول‌های هپاتوسیت از تست‌های منع ورود رنگ (تریان بلو) و از تست تراوش آنزیم سیتوزولی لاکتات دهیدروژناز (LDH) استفاده گردید.

یافته‌ها: سنجش فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) به عنوان نشانگر مهم بخش سیتوزولی در سلول هپاتوسیت و محیط انکوباسیون در آغاز و پایان انکوباسیون نشان داد که در ابتدای انکوباسیون حدود ۹۲ درصد و در پایان انکوباسیون حدود ۸۸ درصد آنزیم در سلول احتباس شده و به ترتیب فقط ۸ درصد و ۱۲ درصد آنزیم از سلول‌ها به خارج تراوش شده است. بررسی میکروسکوپی سلول‌های هپاتوسیت نیز نشان دادند که سلول‌ها دارای غشاء صاف، بدون چروکیدگی و پارگی و بدون واکنش می‌باشند. هنگام رنگ‌آمیزی سلول‌ها با رنگ حیاتی تریان بلو فقط در ۵ درصد سلول‌ها رنگ وارد سلول‌ها گردید.

استنتاج: یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهند که تلفیق روش‌های مکانیکی، شیمیایی و آنزیمی موجب بهبود کیفیت جداسازی سلول‌های هپاتوسیت از کبد رات می‌گردد. به طوری که پرفیوژن کبد توسط شلاتور کلسیم به مدت ۱۰ دقیقه و سپس توسط آنزیم کلاژناز به مدت ۹ دقیقه موجب تولید حدود ۱۰ سلول با زنده بودن (Viability) بیش از ۹۰ درصد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: پرفیوژن، هپاتوسیت، کبد، رات، شلاتور کلسیم و کلاژناز

1. Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid

E-mail: Mehdi.rasouli@yahoo.com

⁺ مؤلف مسئول: دکتر مهدی رسولی - ساری، کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، دانشکده پزشکی

* دانشیار گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی ساری، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی مازندران

** گروه آناتومی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران، مربی گروه آناتومی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران

تاریخ دریافت: ۸۴/۲/۱۰ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۴۸۴/۴ تاریخ تصویب: ۸۶/۹/۷

مقدمه

اثر یک ماده شیمیایی و یا دارو را می‌توان در موجود زنده (in vivo) و یا خارج از بدن موجود زنده (in vitro) مطالعه نمود. اگرچه تأثیر دارو در بدن اثر واقعی، عملی و نهایی است ولی این پاسخ نتیجه اثر بر ارگان‌ها و سیستم‌های مختلف است و ارزیابی آن بسیار پیچیده می‌باشد. از این رو مطالعات خارج از بدن موجود زنده، ویژه و ساده‌تر هستند و برای تحقیقات اولیه بسیار مناسب می‌باشند. این مطالعات شامل تحقیق بر روی اندام پرفیوز شده، برش‌های بافت و سلول‌های جدا شده از بافت می‌باشند. هم‌اکنون با پیشرفت روش‌های مدرن جداسازی سلول از بافت، روش‌های قبلی توسط متدهای انکوباسیون یا کشت سلولی جایگزین شده‌اند. مطالعه بر روی سلول جدا شده امکان بررسی و مطالعه اثر اختصاصی دارو بر روی سلول ویژه یک بافت را فراهم می‌نماید (۱).

کبد نقش مهمی در متابولیسم بدن دارد از این رو سیستم کبد پرفیوز شده (۳،۲) و هپاتوسیت جدا شده از کبد (۶ تا ۴) برای مطالعه متابولیسم بسیار حائز اهمیت می‌باشند. روش‌ها و کاربردهای تهیه هپاتوسیت از کبد رات توسط بری و همکارانش مرور شده است (۷). برای تهیه هپاتوسیت از کبد رات به‌طور کلی سه روش مکانیکی، شیمیایی و آنزیمی وجود دارد (۸). در روش‌های مکانیکی بافت کبد توسط قیچی و تکه تکه نمودن، پیست کردن، تکان دادن به همراه گوی‌های ریز شیشه‌ای، هموژناسیون توسط پیستون پلاستیکی نرم و قابل انعطاف و یا عبور از یک غربال سلول‌های بافت از یکدیگر جدا می‌شوند. اگرچه بافت کبد نرم است و امکان به کارگیری چنین روش‌هایی را میسر می‌سازد ولی به علت آسیب مکانیکی برگشت ناپذیر سلول‌ها بازده حصول سلول‌های زنده کم است (۸). از این رو روش‌های مکانیکی به جز در مراحل انتهایی کاربرد کمی

دارند. در روش‌های شیمیایی بافت کبد توسط محلول پرفیوزات فاقد کلسیم و حاوی یک شلاتور کلسیم پرفیوزن می‌گردد (۹). این عمل سبب حذف کلسیم از بافت و تخریب دسموزوم و کاهش نیروهای چسبندگی بین سلولی می‌گردد (۱۰). مزیت این روش آن است که پروتئین‌ها و گیرنده‌های غشاء سلولی آسیب نمی‌بینند و این سلول‌ها همانند سلول‌های اولیه بافت به هورمون‌های مختلف پاسخ می‌دهند (۵،۶). تاکنون از شلاتورهای مختلف کلسیم مانند سیترات (۱۱)، EDTA (۱۲) و EGTA (۱۳) استفاده شده است. در روش‌های آنزیمی سلول‌های بافت کبد توسط پرفیوزن با محلول حاوی آنزیم‌های پروتئولیزی از یکدیگر جدا می‌شوند (۱۴ تا ۱۶). در روش‌های اولیه از آنزیم تریپسین ولی هم‌اکنون از آنزیم کلاژناز استفاده می‌گردد (۱۶). مطالعه بر روی محصولات کلاژناز شرکت سیگما نشان می‌دهد که نمونه‌های کلاژناز خالص نیستند و حداقل حاوی بیست آنزیم می‌باشند (۱۵)، علاوه بر این، عمل این آنزیم‌ها غیر ویژه است و بسیاری از پروتئین‌ها و گیرنده‌های سطح سلول را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۶).

با توجه به اهمیت «کبد پرفیوز شده» و «هپاتوسیت جدا شده» به عنوان دو سیستم و مدل برای مطالعه متابولیسم داروها، در این مطالعه به کارگیری تلفیقی از هر سه روش مکانیکی، شیمیایی و آنزیمی سلول‌های هپاتوسیت از کبد جدا شده‌اند و میزان بازده سلول و زنده ماندن آنها بررسی شده است. چگونگی پرفیوزن کبد و تهیه هپاتوسیت به ویژه برای محققین ایرانی که دسترسی کمتری به آنزیم کلاژناز دارند و معمولاً نمونه‌های آنزیم حین انتقال به ایران به علت نگهداری خارج از یخچال بیش تر فعالیت خود را از دست می‌دهند بسیار مفید می‌باشد.

1. Ethylene Glycol Tetra Acetic Acid

مواد و روش ها

مواد و وسایل:

سدیم کلرید، پتاسیم کلرید، دی سدیم هیدروژن فسفات، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، منیزیم سولفات، منیزیم کلرید، گلوکز، سدیم بیکربنات، کلسیم کلرید، اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) و کلاژناز از Merck تهیه شدند. محلول های هانگ و کریس-رینگر در آزمایشگاه تهیه شدند و برای انکوباسیون ۱-۳ ساعت قابل استفاده هستند ولی در کشت سلولی محلولها باید در زیر هود تهیه و توسط صافی ویژه (سیگما) سترون شوند (۱۷). کبد توسط دستگاه پرفیوزن دارای سیستم باز تک مسیری و بسته دو مسیری و مجهز به pH-سنج، ورودی گازهای اکسیژن و دی اکسید کربن، الکتروود دما، ترموکوپل و پمپ پرستالتیک پرفیوز گردید. سلول های هیپاتوسیت توسط میکروسکوپ مجهز به دوربین عکاسی و فاز معکوس (Olympus-AH2, Japan) عکسبرداری شدند.

اتصال کبد به دستگاه پرفیوزن:

در این روش کبد در محل خود (in situ) کانوله و پرفیوز می گردد (۳،۲). رات نر توسط دی اتیل اتر بیهوش گشته و حفره شکمی به صورت I باز می گردد. ورید اجوف تحتانی در بالای کلیه یک لیگاتور، ورید باب دو لیگاتور یکی در فاصله سه میلی متری کبد بین ناف کبد و ورید دودنال (به طوری که مجاری صفراوی را در بر نگیرد) و لیگاتور دیگر در انتهای ورید مزاتریک زده و کانوله می شوند (۱۴). سپس لیگاتورها را محکم نموده و جریان پرفیوزات با سرعت ۱۰ mL/min.liver وارد ورید باب می گردد. دیافراگم را باز و اطراف ورید اجوف تحتانی بالای دیافراگم نیز یک لیگاتور زده و دهلیز راست باز و توسط آنژیوکت-۱۸ کانوله می گردد و لیگاتور آن محکم می گردد. هم

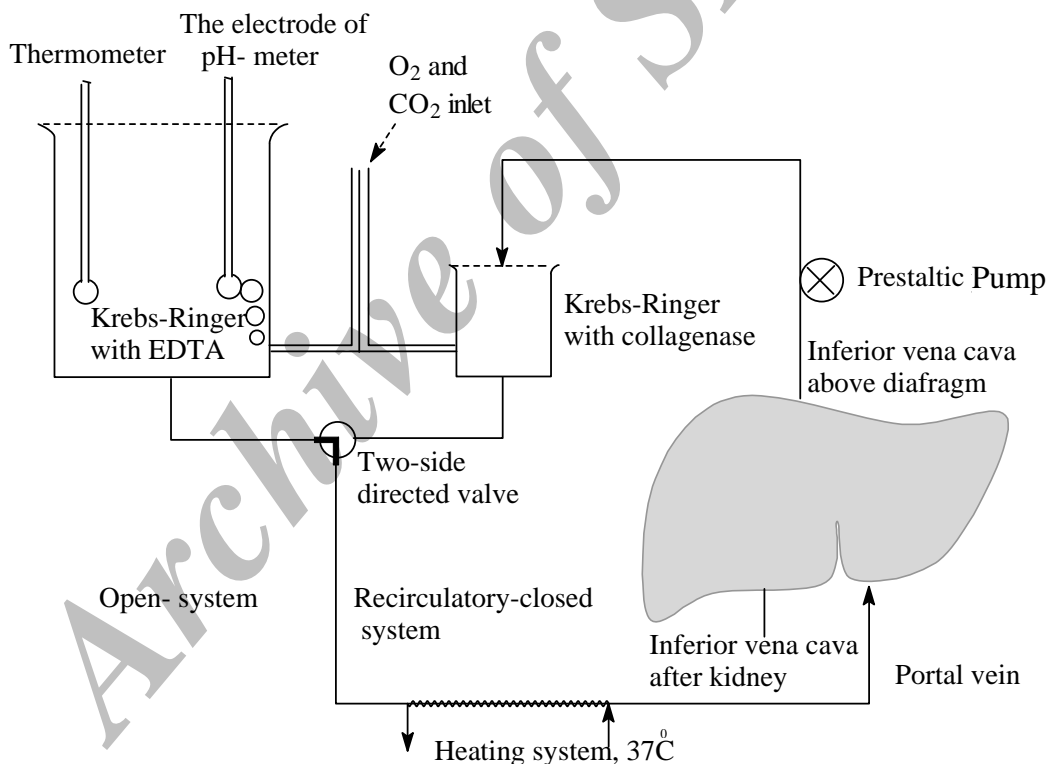
اکنون مسیر فوق باز می گردد، زمان بین شروع پرفیوزن و باز کردن یکی از وریدهای اجوف پایین یا بالای دیافراگم حداکثر یک دقیقه می باشد. پس از باز شدن مسیر جریان پرفیوزات به ۳۰ mL/min.liver افزایش می یابد (۲). با مالش دادن لوب های کبد به خروج خون و جریان پرفیوزات کمک می شود (۱۱). در یک پرفیوزن موفق طی سی ثانیه کبد کاملاً سفید می گردد که بیانگر خروج خون و عبور پرفیوزات از تمام لوب های کبد می باشد. به طور خلاصه وریدهای پورتال و اجوف تحتانی پایین و بالای دیافراگم کانوله می شوند و پرفیوزات از طریق ورید باب وارد و از یکی از وریدهای اجوف پایین یا بالای دیافراگم خارج می شود، در این شرایط همواره باید یکی از وریدهای اجوف بسته باشد. توجه نمائید که کانوله کردن وریدهای اجوف فقط جنبه دورنگری دارد زیرا غالباً ورید پورتال با موفقیت کانوله نمی شود در این صورت می توان ورید باب را بست و پرفیوزات را از یکی از وریدهای اجوف از بالای کلیه و یا از بالای دیافراگم وارد کبد نمود روش اخیر را جریان معکوس (retrograde perfusion) می نامند، بعضی از محققین این روش را موفقیت آمیزتر می دانند (۱۹،۱۸).

پرفیوزن کبد، جداسازی سلول های هیپاتوسیت:

کبد در سه مرحله بر اساس روش شیمیایی - آنزیمی پرفیوز می گردد. در اولین مرحله کبد توسط مسیر تک مسیری باز توسط محلول کریس-رینگر فاقد کلسیم و منیزیم و حاوی شلاتور کلسیم (EDTA) به مدت ده دقیقه پرفیوز می گردد (۲۰،۲۱). در این مرحله کلسیم بافت شلات و از بافت کبد حذف می شود، این عمل موجب سست و تخریب دسموزین می گردد. در دومین مرحله، از آنجائی که EDTA باقیمانده در عروق کبد آنزیم

قابل انعطاف با کلیترانس دو میلی متر فقط با چند ضربه ملایم پراکنده می شود. سوسپانسیون حاصل از مش ۱۰۰ عبور و کپسول گیلسون که شامل شبکه عروق و بافت همبند کبد است توسط مش غربال می گردد (۲۲). سلول های هیپاتوسیت چندین بار توسط محلول کربس-رینگر تازه شسته می شود و چند دقیقه در ۵۰۰g سانتریفوژ و دکانته می گردد. با این روش بازده حصول سلول وابسته به سن حیوان و اندازه کبد حدود ۱۰ mL خواهد بود.

کلاژناز را در مرحله بعدی مهار می کند، کبد توسط محلول کربس-رینگر فاقد کلسیم، منیزیم و شلاتور کلسیم به مدت یک دقیقه دیگر پرفیوز می گردد (۱۶). در مرحله سوم کبد توسط کربس-رینگر حاوی کلسیم (۴/۵ mM) و کلاژناز (۲۰۰ IU/mL) بمدت ده دقیقه توسط سیستم دو مسیری بسته پرفیوز می گردد. در پایان کبد از محل خود جدا و در پتری دیش حاوی محلول آخری چندین بار تکان داده شده، شسته و در لوله هموژنیزه کننده صاف با یک پیستون لاستیکی نرم و



شکل شماره ۱: پرفیوژن کبد. ورید باب و ورید اجوف تحتانی بالا یا پایین دیافراگم در محل خود لیگاتور زده و کانونه می گردند. در پرفیوژن جریان مستقیم محلول پرفیوزات از ورید باب وارد و از یکی از وریدهای اجوف تحتانی خارج می شود. ولی در پرفیوژن جریان معکوس محلول پرفیوزات از یکی از وریدهای اجوف تحتانی وارد و از ورید باب خارج می گردد. توجه نمایید که در پرفیوژن جریان معکوس یکی از وریدهای اجوف تحتانی باید باز (کانونه) و دیگری بسته شده باشد، در غیر اینصورت محلول پرفیوزات از داخل کبد عبور نمی کند و از ورید دیگر اجوف خارج می شود. محفظه حاوی محلول کربس-رینگر در سمت چپ حاوی EDTA است و برای پرفیوژن یکطرفه (مسیر باز) و در طرف راست حاوی کلاژناز است و برای پرفیوژن سیستم بسته بکار می رود. قبل از شروع پرفیوژن دمای محلولها به 37°C رسیده ولی حین عمل نیز دما نزدیک 37°C تنظیم می گردد. پمپ پرستالیتیک فقط در سیستم بسته برای گردش محلول به دستگاه و کبد بکار می رود.

انکوباسیون سلول‌های هیپاتوسیت:

سلول‌های هیپاتوسیت را می‌توان در محیط‌های مختلف مانند کربس-رینگر یا محیط حداقل ضروری ایگل (EMEM)^۱ انکوبه نمود (۲۳). خصیصه مشترک محیط‌های مختلف تشابه غلظت مواد معدنی اصلی، اسمولالیته و تونیسیته آنها با پلاسماي خون می‌باشد. غالباً انکوباسیون کوتاه مدت (کمتر از چهار ساعت) نیاز به حضور اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها و عوامل رشد ندارد ولی در انکوباسیون طولانی‌تر و کشت سلولی حضور عوامل فوق ضروری است (۱۶). در این تحقیق سلول‌ها در محیط کربس-رینگر (بافر بیکرنات) در فلاسک‌های شیشه‌ای مخصوص که به سیستم مرکزی تولید تحت جو $O_2:CO_2$ (۵:۹۵) متصل بودند انکوبه شدند. انکوباسیون در لوله‌های پلاستیکی یا پلی‌استیرنی اولتراسانتریفوژ نیز میسر است (۲۴،۲۰). برای انکوباسیون سلول‌ها ۱ mL از سوسپانسیون استوک هیپاتوسیت توسط محلول کربس-رینگر به حجم کلی ۴ mL رسید. بدین ترتیب غلظت هیپاتوسیت در محیط انکوباسیون حدود $10^6 \times 9-7$ cell/mL معادل 0.5 ± 0.8 protein/mL بود.

تست‌های بیوشیمیایی:

برای بررسی زنده بودن (viability) سلول‌های هیپاتوسیت از تست‌های منع ورود رنگ (dye exclusion test) از تریپان بلو و از تست تراوش آنزیم سیتوزولی لاکتات دهیدروژناز (LDH) استفاده گردید. فعالیت آنزیم LDH در هموزنه سلولی و نیز در محلول مورد استفاده برای پراکنده کردن سلول‌ها و در محیط انکوباسیون نیز تعیین گردید، زیرا ممکن است آسیب و تخریب غشاء سلولی و در نتیجه تراوش آنزیم در مرحله دیسپرسیون کم ولی در مرحله انکوباسیون افزایش یابد.

برای تعیین فعالیت LDH از کیت آنزیمی شرکت سیگما استفاده گردید و به علت فعالیت زیاد آنزیم در داخل سلول، ۱۰ μ L از هموزنه سلولی و ۱۰۰ μ L از محیط انکوباسیون به محیط سنجش آنزیم اضافه شد.

یافته‌ها

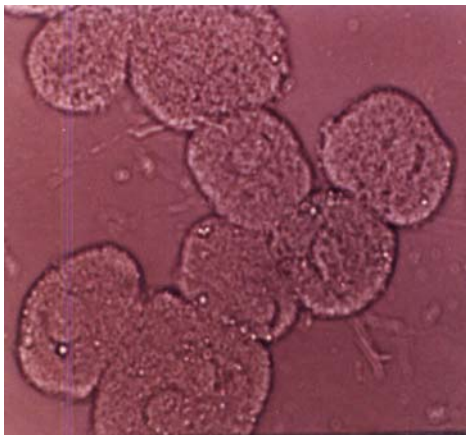
تعیین ویابیلیتی سلولی توسط سنجش درصد احتباس لاکتات دهیدروژناز.

آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) یک نشانگر مهم بخش سیتوزول سلول است (۲۵). میزان فعالیت نسبی و مطلق فعالیت LDH در سلول هیپاتوسیت و محیط انکوباسیون در آغاز و پایان انکوباسیون در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. این نتایج نشان می‌دهند که در ابتدای انکوباسیون حدود ۹۲ درصد و در پایان انکوباسیون حدود ۸۸ درصد آنزیم در سلول احتباس شده و به ترتیب ۸ درصد و ۱۲ درصد آنزیم از سلول‌ها به خارج تراوش شده است.

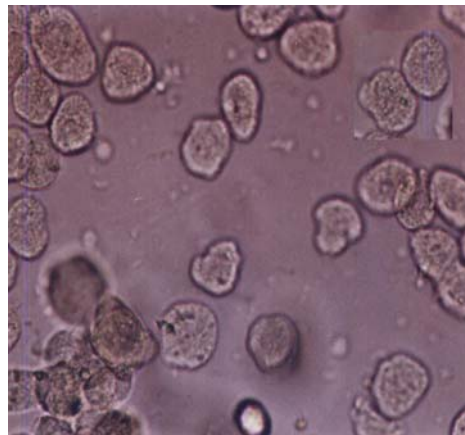
جدول شماره ۱: تعیین درصد احتباس آنزیم سیتوزولی لاکتات دهیدروژناز (LDH) در آغاز و پایان انکوباسیون. نسبت فعالیت کل LDH در حالت الف به ب و الف به ج به ترتیب برابر درصد احتباس آنزیم در آغاز و پایان انکوباسیون در نظر گرفته شده است. واحد Berger-Broida در کیت سیگما به واحد بین‌المللی تبدیل شده است.

درصد احتباس LDH	فعالیت کل LDH (IU)	حجم (mL)	فعالیت LDH (IU/L)	فعالیت LDH (IU/L)
-	9.4 ± 0.9	۸۰	118 ± 11	الف) پلیت سلولی
92 ± 2	0.9 ± 0.2	۵۰	18 ± 5	ب) مجموعه محلول دیسپرسیون و شستشو
88 ± 2	1.0 ± 0.1	$28 + 50$	13 ± 2	ج) مجموعه محلول شستشو و محیط انکوباسیون

1. Eagle Minimal Essential Medium



(ب)



(الف)

شکل شماره ۲: عکس میکروسکوپی سلول‌های هیاتوسیت پس از سه ساعت انکوباسیون در محیط کربس-رینگر با بزرگنمایی الف) ۱۰۰ و ب) ۴۰۰. هیاتوسیت‌ها براساس روش پرفیوژن سه مرحله‌ای تهیه شده و در محیط کربس-رینگر انکوبه شده‌اند.

سلول‌های زنده می‌شد. یکی از مهم‌ترین یافته‌های متابولیسم یعنی سیکل اوره توسط کربس و دانشجوی پزشکی آن هنسلیت بر روی برش‌های کبد به دست آمد (۲۷). در آن زمان متدهای مدرن جداسازی سلول زنده از بافت شناخته نشده بود. به هرحال هم اکنون این روش‌ها فقط در مراحل نهایی برای پراکنده کردن سلول‌ها به کار می‌روند. در روش‌های شیمیایی کبد توسط محلول پرفیوژن فاقد کلسیم و حاوی یک شلاتور کلسیم مانند سترات، EDTA و EGTA پرفیوژن می‌گردد (۱۳ تا ۱۱). این عمل سبب حذف کلسیم از بافت و تخریب دسموزوم و کاهش نیروهای چسبندگی بین سلولی می‌گردد (۱۰). مزیت این روش آن است که پروتئین‌ها و گیرنده‌های غشاء سلولی آسیب نمی‌بینند و این سلول‌ها همانند سلول‌های اولیه بافت به هورمون‌های مختلف پاسخ می‌دهند (۶ تا ۴). ولی عیب مهم این روش آسیب شدید فیزیکی سلول‌ها و زنده بودن (ویابیلیتی) کم سلولی است به طوری که میزان احتباس آنزیم لاکتات دهیدروژناز در روش سوزنگر (Susangar) ۲۷ درصد و در روش وانگ (Wang) ۵۰ درصد گزارش

تعیین ویابیلیتی سلولی توسط ارزیابی مورفولوژی و تعیین درصد منع درج تریپان بلو.

شکل شماره ۲ نشان می‌دهد که سلول‌های هیاتوسیت دارای غشاء صاف، بدون چروکیدگی و پارگی و عدم وجود واکوئل می‌باشند. چسبندگی سلول‌ها به یکدیگر و نیز به جدار ظرف از شاخص‌های مهم زنده بودن سلول‌ها می‌باشد. سلول‌های مرده از یکدیگر و از جدار ظرف جدا و معلق می‌شوند و می‌توان آنها را توسط محلول پرکول (percoll) شسته، سانتریفوژ و جدا نمود (۲۶). رنگ آمیزی سلول‌ها با رنگ حیاتی تریپان بلو نشان می‌دهد که فقط در حدود ۵ درصد سلول‌ها رنگ وارد سلول‌ها می‌گردد که بیانگر مرگ سلولی است.

بحث

روش‌های مختلفی برای جداسازی سلول‌های پارانیشیم از کبد گزارش شده است. در روش‌های قدیمی که بیشتر مکانیکی بودند اعمال نیروی فیزیکی سبب آسیب شدید و برگشت‌ناپذیر سلول‌ها و کاهش راندمان حصول

شده است (۱۲،۱۱). در تمام این روش‌ها پرفیوزن در دمای 37°C و $\text{pH } 7.4$ انجام می‌شود. محلول‌های مختلفی نیز برای پرفیوزن کبد، پراکنده کردن سلول‌ها و انکوباسیون سلول جدا شده به کار می‌رود. دی ساکاریدهای هیپرتونیک مانند ساکاروز 0.5 M اگرچه سبب تجزیه اتصالات محکم (gap junction) بین سلول‌ها و تسهیل جدا شدن سلول‌ها می‌گردند ولی از آنجایی که عمل آنها برگشت پذیر است و سبب پلاسمولیز نیز می‌گردند توصیه نمی‌شوند (۲۶). از این رو بیشتر محققین از محلول نمکی هانگ و یا کربس-رینگر استفاده می‌کنند (۱۶ تا ۱۳). غلظت گلوکز نیز چندان مهم نبوده و در حیطه غلظت فیزیولوژی یعنی حدود $5/0 \text{ mM}$ انتخاب می‌گردد (۱۶). به هر حال اگر در مطالعه‌ای لازم باشد به پرفیوزات یا محیط انکوباسیون هیپاتوسیت عوامل محرک گلیکوژنولیز مانند کاتکولامین‌ها اضافه شود به منظور ممانعت از تحلیل گلیکوژن کبد و افزایش ویابیلیتی سلولی لازم است غلظت گلوکز تا 20 mM افزایش یابد (۲۸).

کشف این نکته که کلاژن و لامینین در اتصال سلول‌ها به یکدیگر نقش دارند منجر به پیشرفت روش‌های تفکیک سلول‌ها با استفاده از آنزیم‌های پروتئولیزی گردید (۸). از آنجایی که آنزیم کلاژناز دارای ویژه‌گی عمل بیش تری است غالباً برای جداسازی سلول‌ها به کار می‌رود. شرکت سیگما برای پرفیوزن بافت‌های مختلف انواع مختلف کلاژناز ارائه نموده است ولی متخصصین تهیه هیپاتوسیت هیچ ارجحیتی بین آنها پیدا نکردند (۱۵). نمونه‌های آنزیم کلاژناز خود حاوی بیست آنزیم می‌باشند و پروتئین‌های دیگر حاوی ردیف -Pro را نیز هیدرولیز می‌کنند (۱۵). اگرچه غالباً گزارش شده که کلاژناز بر روی پروتئین‌های غشاء سلول از جمله گیرنده‌های هورمون‌ها اثری ندارد ولی پاسخ سلول‌های تهیه شده از روش‌های شیمیایی (شلاتورهای کلسیم) و روش‌های آنزیمی متفاوت است (۲۹، ۶ تا ۴). بنابراین به نظر می‌رسد

کلاژناز بر روی این گیرنده‌ها اثر و پاسخ سلول را تغییر می‌دهد. در تکنیک‌های فعلی روش‌های شیمیایی و آنزیمی با یکدیگر تلفیق شده‌اند. به طوری که در ابتدا کبد حدود $10-1$ دقیقه با محلول فاقد کلسیم و حاوی شلاتور کلسیم پرفیوز می‌شود، سپس حدود 10 دقیقه دیگر توسط محلول حاوی کلاژناز پرفیوز می‌گردد (۱۴ تا ۱۶). از آنجایی که در ایران معمولاً دسترسی به آنزیم کلاژناز محدود است و یا کلاژناز موجود به علت شرایط نگهداری و انتقال نادرست بیشتر فعالیت خود را از دست داده است زمان جداسازی شیمیایی توسط شلاتور کلسیم طولانی تر انتخاب شده است. به علاوه در این روش به علت محدود بودن کلاژناز موجود از سیستم بسته دو مسیری به جای سیستم باز تک مسیری استفاده شده است. بدین طریق با استفاده از مقدار کم کلاژناز کیفیت جداسازی سلول‌ها افزایش می‌یابد.

در برخی از مطالعات نیاز به انکوباسیون طولانی سلول‌ها (بیشتر از سه ساعت) می‌باشد. بدین منظور سلول‌های جدا شده از بافت در محیط مناسب کشت می‌گردند (۱۶). هنگام کشت سلولی برخی خصایص سلول مانند تعداد رسپتورهای سطح سلول و متعاقباً پاسخ سلول به دارو تغییر می‌کند (۳۰). از این رو نتایج حاصل از کشت سلول با نتایج انکوباسیون سلول تازه تهیه شده الزاماً یکسان نیستند (۲۹). سلول‌های نرمال در محیط کشت دارای طول عمر محدود (چند روز) می‌باشند. از این رو برای کشت سلولی هر بار باید سلول زنده را از بافت جدا نمود، این عمل مشکل و وقت گیر است. هم اکنون از سلول‌های نرمال انسان یا حیوان سلول‌های سرطانی نامیرا (immortalized) تهیه شده است (۳۱). سلول‌های نامیرا مکرراً قابل تکثیر و کشت می‌باشند، از این رو ذخیره، تکثیر و آزمایش بر روی آنها بسیار ساده است. متابولیسم سلول‌های نامیرا تقریباً مشابه سلول‌های نرمال است ولی دارای تفاوت‌هایی نیز می‌باشند (۳۱). سلول‌های مک

دارای متابولیسم بسیار مشابه سلول‌های اولیه و اصلی هستند برای مطالعه ارجح می‌باشند. نتایج این تحقیق نشان می‌دهند که، پرفیوژن کبد با محلول کریس-رینگر حاوی شلاتور کلسیم و سپس با کلاژناز به مدت ده دقیقه منجر به تولید سلول هپاتوسیت با بازده و ویابیلیتی زیاد می‌گردد.

آردل (McArdle) سلول‌های نامیرای کبد رات و HepG2 سلول‌های نامیرای کبد انسان هستند، این سلول‌ها مانند سلول‌های نرمال هپاتوسیت قادر به سنتز و ترشح لیپوپروتئین‌ها می‌باشند (۳۲). علی‌رغم پیشرفت‌های روز افزون روش‌های تهیه و کشت سلولی متد پرفیوژن بافت و انکوباسیون سلول‌های تازه تهیه شده از آن جهت که

References

1. Nelson DL, Michael MC. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth Publisher, NY 2000: 485-526.
2. Brunengraber H, Boutry M, Daikuhara Y et al. Use of the perfused liver for the study of lipogenesis. *Method Enzymol* 1975; 35: 597-606.
3. Sies H. The use of perfusion of liver and other organs for the study of microsomal electron-transport and cytochrome P-450 systems. *Method Enzymol* 1978; 52: 48-59.
4. Haghghi B, Rasouli M, Suzangar M. Inhibitory effect of epinephrine on phosphatidate phosphohyrolase activity on isolated rat hepatocytes. *Endocrinology* 1990; 28: 149-154.
5. Rasouli M, Zahraei M. Suppression of VLDL-triacylglycerol secretion by both alpha- and beta- adrenoceptor agonists in isolated rat hepatocytes. *Eur J Pharmacol* 2006; 545: 109-114.
6. Rasouli M, Zahraei M. Epinephrine suppresses secretion of VLDL-triacylglycerol and increases triacylglycerol and phospholipids contents in isolated rat hepatocytes. *MJIRI* 2000; 14: 61-68.
7. Berry MN, Grivell AR, Grivell MB, Phillips JW. Isolated hepatocytes: past, present and future. *Cell Biol Toxicol* 1997; 13: 223-233.
8. Bashor MM. Dispersion and Disruption of tissues. *Method Enzymol* 1979; 119-129.
9. Waymouth C. *Methods for obtaining cells in suspension from animal tissues*. In Pretlow TG and Pretlow TP eds. Cell separation methods and selected applications. Orlando 1987; 4: 1-21.
10. Cholia C, Jones EY. The molecular structure of cell adhesion molecules. *Annu Rev Biochem* 1997; 66: 823-862.
11. Susangar M, Dickson JA. Biochemical studies on cells isolated from adult rat liver. *Exp Cell Res* 1970; 63: 353-364.
12. Wang S, Renaud C, Infante J, et al. Isolation of rat hepatocytes with EDTA and their metabolic functions in primary culture. *In Vitro Cell Dev Biol* 1985; 21: 526-530.

13. Berry MN, Edwards AM, Barritt GJ. *Isolated hepatocytes preparation: properties and applications*. In Burdon RH, Knippenberg V eds. *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier, Amsterdam 1991: 1-460.
14. Lindros KO. *Separation of functionally different liver cell types*. In Thurman RG eds. *Regulation of hepatic metabolism (intra- and intercellular compartmentation)* NY 1986: 137-157.
15. Pertof H, Smedsrød B. Separation and characterization of liver cells. In: cell separation: Methods and selected application 1987; 4: 1-23.
16. Bayliss MK, Skett P. *Isolation and culture of human hepatocytes*. In Careth F Jones. ed. *Human cell culture protocols*, NY 1996: 369-389.
17. Johnson MM, Das NM, Bucher FR, Fain JN. The regulation of gluconeogenesis in isolated rat liver cells by glucagons, insulin, dibutyryl cAMP and fatty acids. *J Biol Chem* 1972; 147: 3229-3235.
18. Cascale CE, Mangiapane H, Brindley DN. Oleic acid promotes the activation and translocation of phosphatidate phosphohydrolase from the cytosol to particulate fractions of isolated rat hepatocytes. *Biochem J* 1984; 219: 916-919.
19. Martin-Sanz P, Hopewell R, Brindley DN. Long chain fatty acids and their CoA esters causes the translocation of phosphatidate phosphohydrolase from the cytosol to the microsomal fraction of rat liver. *FEBS* 1984; 175: 284-288.
20. Seglen PO. Incorporation of radioactive amino acids into protein in isolated rat hepatocytes. *BBA* 1976; 442: 391-404.
21. Seglen PO. Disaggregation and separation of rat liver cells. In: Reid E ed. *Cell preparations*. Ellis Horwood, Chichester, England. 1979; 25-46.
22. Steinberg P, Seihert B, Oesch F. *Separation and biochemical characterization of rat liver parenchymal cell subpopulations*. In. Robertfroid MB and Prear V eds. *Experimental hepatocarcinogenesis*. NY 1988; 257-265.
23. Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J Cell Biol* 1969; 43: 507-519.
24. Kosugi K, Harano Y, Nakano T, et al. Mechanism of adrenergic stimulation of hepatic ketogenesis. *Metab* 1983; 32: 1081-1087.
25. Cook JA, Mitchell JB. Viability measurements in mammalian cell systems. *Anal Biochem* 1989; 179: 1-7.
26. Goodenough DA, Gilula NB. The splitting of hepatocyte GAP junctions and zonulae occludentes, with hypertonic disaccharides. *J Biol Chem* 1974; 61: 575-590.
27. Holmes FL. Hans Krebs and discovery of the ornithine cycle. *Fed Proc* 1980; 39: 216-225.

28. Brindle NPJ, Ontko JA. α 1-Adrenergic suppression of VLDL triacylglycerol secretion by isolated rat hepatocytes. *Biochem J* 1988; 250: 363-368.
29. Rasouli M, Trischuk T, Lehner R. Calmodulin antagonist W-7 inhibits de novo synthesis of cholesterol and suppresses secretion of de novo synthesized and preformed lipids from cultured hepatocytes. *Mol Cell Biol Lipid (BBA)* 2004; 1682: 92-101.
30. Tsujimoto A, Tsujimoto G, Azhar S, et al. Altered responsiveness to alpha-and beta- adrenoceptor stimulation in hepatocytes cultured in defined medium. *Biochem Pharmacol* 1986; 35: 1400-1404.
31. Leichtling BH, Su YF, Wimalasena J, Harden TK, Wolfe BB and wicks WD. Studies of cAMP metabolism in cultured hepatoma cells: presence of functional adenylate cyclase despite low cAMP content and lack of hormonal responsiveness. *J Cell Physiol* 1978; 96: 215-223.
32. Rasouli M, Lehner R. Hepatomas McArdle-RH7777 cells have the same response as normal rat hepatocytes to dibutyryl-cAMP and anticalmodulin W-7. *MJIRI* 2002; 15: 209-217.

Archive of SID