پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره هجدهم شماره ۶۴ خرداد و تیر سال ۱۳۸۷ (۸۰-۷۱)

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 می رسد 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 situe) کانوله می‌شود و بر اساس روش شیمیایی- آنزیمی در سه مرحله پرفیوز می‌گردد. در اولین مرحله کبد توسط مسیر تک مسیری باز توسط محلول کربس- رینگر فاقد کلسیم و منیزیم و حاوی شلاتور کلسیم (EDTA)[1] به مدت ده دقیقه پرفیوز 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 پرفیوز می‌گردد. در سومین مرحله کبد توسط کربس- رینگر آنزیم کلاژناز (۲۰۰ IU/mL) به مدت نه دقیقه توسط سیستم دو مسیری بسته پرفیوز گردید. سلول‌های هپاتوسیت در غلظت $7-9\times10^{6}$ cell/mL در محیط کربس- رینگر (بافر بیکربنات) در فلاسک‌های شیشه‌ای مخصوص تحت جو (۵ : ۹۵ ,O_2:CO_2) انکوبه شدند. برای بررسی زنده بودن سلول‌های هپاتوسیت از تست‌های منع ورود رنگ (تریپان 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 واکوئل می‌باشند. هنگام رنگ‌آمیزی سلول‌ها با رنگ حیاتی تریپان 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 طوری‌که پرفیوژن کبد توسط شلاتور کلسیم به مدت ۱۰ دقیقه و سپس توسط آنزیم کلاژناز به مدت ۹ دقیقه موجب تولید حدود ۱۰mL 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

+ مولف مسئول : **دکتر مهدی رسولی- ساری، کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، دانشکده پزشکی** **E-mail: Mehdi.rasouli@yahoo.com**
* 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

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:45 +0430 on Wednesday July 18th 2018
www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:45 +0430 on Wednesday July 18th 2018

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 این‌رو 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. هم اکنون 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 این‌رو سیستم کبد پرفیوز شده(۳،۲) و هپاتوسیت جدا شده از کبد(۴تا۶) 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 به‌طورکلی سه روش مکانیکی، شیمیایی و آنزیمی وجود دارد(۸). در روش‌های مکانیکی بافت کبد توسط قیچی و تکه تکه نمودن، پیپت 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 این‌رو روش‌های مکانیکی به جز درمراحل انتهایی کاربرد کمی دارند. در روش‌های شیمیایی بافت کبد توسط محلول پرفیوزات فاقد کلسیم و حاوی یک شلاتور کلسیم پرفیوژن 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[1] (۱۳) استفاده شده است. در روش‌های آنزیمی سلول‌های بافت کبد توسط پرفیوژن با محلول حاوی آنزیم‌های پروتئولیزی از یکدیگر جدا می‌شوند(۱۴تا۱۶). در روش‌های اولیه از آنزیم تریپسین ولی هم اکنون 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 براین، عمل این آنزیم‌ها غیر ویژه است و بسیاری از پروتئین‌ها و گیرنده‌های سطح سلول را نیز تحت تاثیر 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 با 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 پرفیوژن 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 بیش‌تر فعالیت خود را از دست می‌دهند بسیار مفید می‌باشد.

1. Ethylene Glycol Tetra Acetic Acid

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:45 +0430 on Wednesday July 18th 2018

مواد و روش ها

مواد و وسایل:

سدیم کلرید، پتاسیم کلرید، دی سدیم هیدروژن فسفات، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، منیزیم سولفات، منیزیم کلرید، گلوگز، سدیم بیکربنات، کلسیم کلرید، اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) و کلاژناز از Merck تهیه شدند. محلول‌های هانگ و کربس- رینگر در آزمایشگاه تهیه شدند و برای انکوباسیون ۳- ۱ 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 پرفیوژن دارای سیستم باز تک مسیری و بسته دو مسیری و مجهز به pH- سنج، ورودی گازهای اکسیژن و دی اکسید کربن, الکترود دما، ترموکوپل و پمپ پریستالتیک پرفیوز گردید. سلول‌های هپاتوسیت توسط میکروسکوپ مجهز به دوربین عکاسی و فاز معکوس (Olympus-AH2, Japan) عکسبرداری شدند.

اتصال کبد به دستگاه پرفیوژن:

در این روش کبد در محل خود (in situe) کانوله و پرفیوز می‌گردد(۳،۲). رات نر توسط دی اتیل اتر بیهوش گشته و حفره شکمی به صورت I باز می‌گردد. ورید اجوف تحتانی در بالای کلیه یک لیگاتور، ورید باب دو لیگاتور یکی در فاصله سه میلی‌متری کبد بین ناف کبد و ورید دودنال (به طوری‌که مجاری صفراوی را در بر نگیرد) و لیگاتور دیگر در انتهای ورید مزانتریک زده و کانوله می‌شوند(۱۴). سپس لیگاتورها را محکم نموده و جریان پرفیوزات با سرعت ۱۰ mL/min.liver وارد ورید باب می‌گردد. دیافراگم را باز و اطراف ورید اجوف تحتانی بالای دیافراگم نیز یک لیگاتور زده و دهلیز راست باز و توسط آنژیوکت- ۱۸ کانوله می‌گردد و لیگاتور آن محکم می‌گردد. هم اکنون مسیر فوق باز می‌گردد، زمان بین شروع پرفیوژن و باز کردن یکی از وریدهای اجوف پایین یا بالای دیافراگم حداکثر یک دقیقه می‌باشد. پس از باز شدن مسیر جریان پرفیوزات به ۳۰ mL/min.liver افزایش می‌یابد(۲). با مالش دادن لوب های کبد به خروج خون و جریان پرفیوزات کمک می‌شود(۱۱). در یک پرفیوژن موفق طی سی ثانیه کبد کاملاً سفید می‌گردد که بیانگر خروج خون و عبور پرفیوزات از تمام لوب های کبد می‌باشد. به طور خلاصه وریدهای پورتال و اجوف تحتانی پایین و بالای دیافراگم کانوله می‌شوند و پرفیوزات از طریق ورید باب وارد و از یکی از وریدهای اجوف پایین یا بالای دیافراگم خارج می‌شود، 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 نمی‌شود در این‌صورت می‌توان 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) می‌نامند، بعضی از محققین این روش را موفقیت آمیزتر می‌دانند(۱۸،۱۹).

پرفیوژن کبد، جداسازی سلول‌های هپاتوسیت:

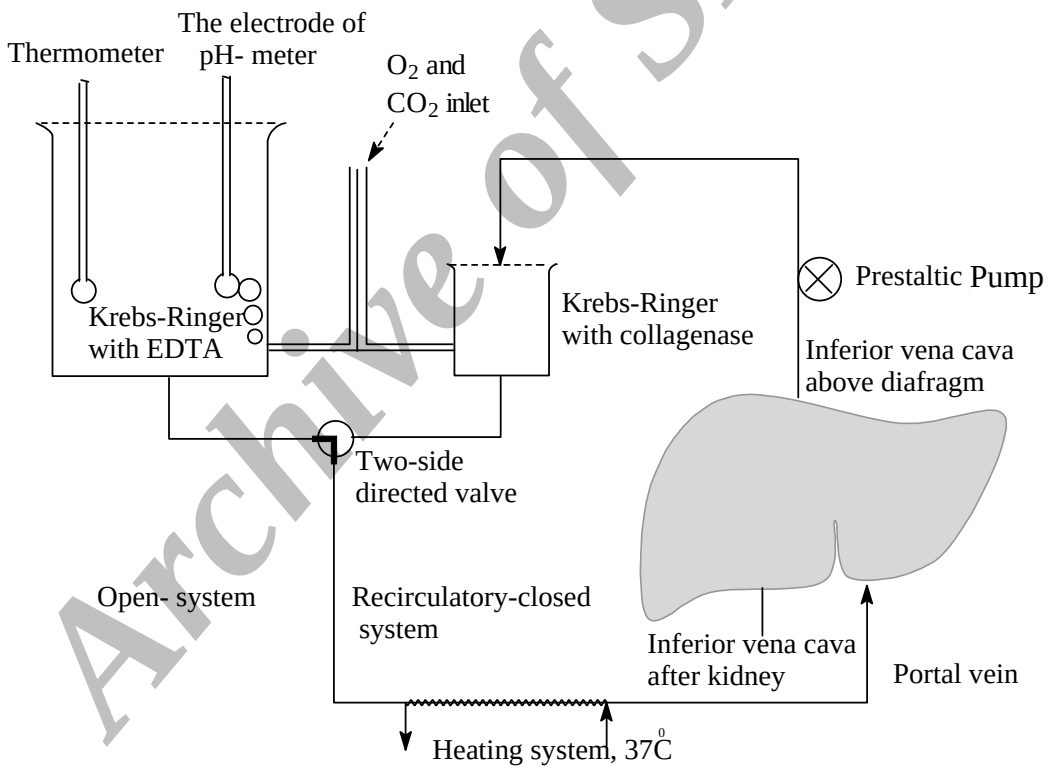
کبد در سه مرحله بر اساس روش شیمیایی- آنزیمی پرفیوز می‌گردد. در اولین مرحله کبد توسط مسیر تک مسیری باز توسط محلول کربس- رینگر فاقد کلسیم و منیزیم و حاوی شلاتور کلسیم (EDTA) به مدت ده دقیقه پرفیوز می‌گردد(۲۰،۲۱). در این مرحله کلسیم بافت شلات و از بافت کبد حذف می‌شود، این عمل موجب سست و تخریب دسموزین می‌گردد.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

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:45 +0430 on Wednesday July 18th 2018

کلاژناز را در مرحله بعدی مهار می‌کند، کبد توسط محلول کربس- رینگر فاقد کلسیم، منیزیم و شلاتور کلسیم به مدت یک دقیقه دیگر پرفیوز می‌گردد(۱۶). در مرحله سوم کبد توسط کربس- رینگر حاوی کلسیم (۱-۴/۵ mM) و کلاژناز (۲۰۰ IU/mL) بمدت ده دقیقه توسط سیستم دو مسیری بسته پرفیوز می‌گردد. در پایان کبد از محل خود جدا و در پتریدیش حاوی محلول آخری چندین بار تکان داده شده، شسته و در لوله هموژنیزه کننده صاف با یک پیستون لاستیکی نرم و قابل انعطاف با کلیرانس دو میلی‌متر فقط با چند ضربه ملایم پراکنده می‌شود. سوسپانسیون حاصل از مش ۱۰۰ عبور و کپسول گیلسون که شامل شبکه عروق و بافت همبند کبد است توسط مش غربال می‌گردد(۲۲). سلول‌های هپاتوسیت چندین بار توسط محلول کربس- رینگر تازه شسته می‌شود و چند دقیقه در ۵۰۰g سانتریفوژ و دکانته می‌گردد. با این روش بازده حصول سلول وابسته به سن حیوان و اندازه کبد حدود ۱۰ mL خواهد بود.



شکل شماره ۱: پرفیوژن کبد. ورید باب و ورید اجوف تحتانی بالا یا پایین دیافراگم در محل خود لیگاتور زده و کانوله 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 نمائید که در پرفیوژن جریان معکوس یکی از وریدهای اجوف تحتانی باید باز (کانوله) 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 ۳۷ °C رسیده ولی حین عمل نیز دما نزدیک ۳۷ °C تنظیم می گردد. پمپ پریستالتیک فقط در سیستم بسته برای گردش محلول به دستگاه و کبد بکار می رود.

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:45 +0430 on Wednesday July 18th 2018

انکوباسیون سلول‌های هپاتوسیت:

سلول‌های هپاتوسیت را می‌توان در محیط‌های مختلف مانند کربس- رینگر یا محیط حداقل ضروری ایگل (EMEM)[1] انکوبه نمود(۲۳). خصیصه مشترک محیط‌های مختلف تشابه غلظت مواد معدنی اصلی، اسمولالیته و تونیسیته آنها با پلاسمای 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 بیکربنات) 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 هپاتوسیت توسط محلول کربس- رینگر به حجم کلی ۴ mL رسید. بدین ترتیب غلظت هپاتوسیت در محیط انکوباسیون حدود $۷-۹\times۱۰^{۶}$ cell/mL معادل ۸/۰±۰/۵ protein/mL بود.

تست های بیوشیمیایی:

برای بررسی زنده بودن (viability) سلول‌های هپاتوسیت 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 همو‌ژنه 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 µL از همو‌ژنه سلولی و ۱۰۰ µL از محیط انکوباسیون به محیط سنجش آنزیم اضافه شد.

یافته ها

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 هپاتوسیت 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 ۹۲درصد 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 درحالت 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 بین المللی تبدیل شده است.

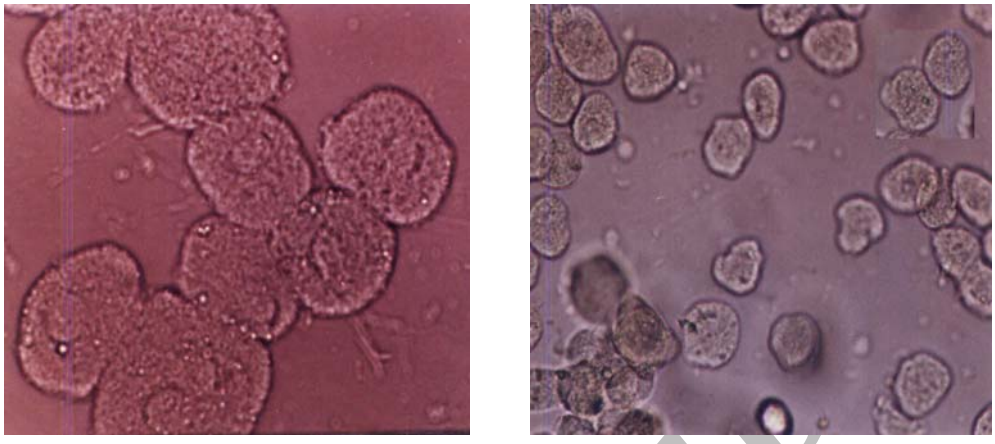
فعالیت LDH (IU/L)	فعالیت LDH (IU/L)	حجم (mL)	فعالیت کل LDH (IU)	درصد احتباس LDH
الف) پلیت سلولی	۱۱۸±۱۱	۸۰	۹/۴±۰/۹	-
ب) مجموعه محلول دیسپرسیون و شستشو	۱۸±۵	۵۰	۰/۹±۲/۴	٪۹۲±۲
ج) مجموعه محلول شستشو و محیط انکوباسیون	۱۳±۲	۲۸+۵۰	۱/۰±۰/۱	٪۸۸±۲

1. Eagle Minimal Essential Medium

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:45 +0430 on Wednesday July 18th 2018



الف) ب)

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

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

شکل شماره۲ نشان می‌دهد که سلول‌های هپاتوسیت 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). رنگ‌آمیزی 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 پارانشیم 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 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 پرفیوزات فاقد کلسیم و حاوی یک شلاتور کلسیم مانند سیترات، EDTA و EGTA پرفیوژن می‌گردد(۱۱تا۱۳). 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(۴تا۶). ولی عیب مهم این روش آسیب شدید فیزیکی سلول‌ها و زنده بودن (ویابیلیتی) کم سلولی است به طوری‌که میزان احتباس آنزیم لاکتات دهیدروژناز در روش سوزنگر (Susangar) ۲۷ درصد و در روش وانگ (Wang) ۵۰ درصد گزارش

www.SID.ir
Archive of SID

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:45 +0430 on Wednesday July 18th 2018

شده است(۱۲،۱۱). در تمام این روش‌ها پرفیوژن در دمای ۳۷ °C و pH ۷/۴ انجام می‌شود. محلول‌های مختلفی نیز برای پرفیوژن کبد، پراکنده کردن سلول‌ها و انکوباسیون سلول جدا شده به کار می‌رود. دی ساکاریدهای هیپرتونیک مانند ساکاروز ۰/۵ M اگرچه سبب تجزیه اتصالات محکم (gap junction) بین سلول‌ها و تسهیل جدا شدن سلول‌ها می‌گردند ولی از آن‌جایی‌که عمل آنها برگشت‌پذیر است و سبب پلاسمولیز نیز می‌گردند توصیه نمی‌شوند (۲۶). از این‌رو بیشتر محققین از محلول نمکی هانگ و یا کربس- رینگر استفاده می‌کنند(۱۳تا۱۶). غلظت گلوکز نیز چندان مهم نبوده و در حیطه غلظت فیزیولوژی یعنی حدود ۵/۰ mM انتخاب می‌گردد(۱۶). به هرحال اگر در مطالعه‌ای لازم باشد به پرفیوزات یا محیط انکوباسیون هپاتوسیت عوامل محرک گلیکوژنولیز مانند کاتکولامین‌ها اضافه شود به منظور ممانعت از تحلیل گلیکوژن کبد و افزایش ویابیلیتی سلولی لازم است غلظت گلوکز تا ۲۰ 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 آنجایی‌که آنزیم کلاژناز دارای ویژه‌گی عمل بیش‌تری است غالباً برای جداسازی سلول‌ها به کار می‌رود. شرکت سیگما برای پرفیوژن بافت‌های مختلف انواع مختلف کلاژناز ارائه نموده است ولی متخصصین تهیه هپاتوسیت هیچ ارجحیتی بین آنها پیدا نکردند(۱۵). نمونه‌های آنزیم کلاژناز خود حاوی بیست آنزیم می‌باشند وپروتئین‌های 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(۴تا۶،۲۹). 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 طوری‌که در ابتدا کبد حدود ۱۰-۱ دقیقه با محلول فاقد کلسیم و حاوی شلاتور کلسیم پرفیوز می‌شود، سپس حدود ۱۰ دقیقه دیگر توسط محلول حاوی کلاژناز پرفیوز می‌گردد(۱۴تا۱۶). از آن‌جائی‌که 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 بازتک 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 ازسه ساعت) می‌باشد. بدین منظور سلول‌های جدا شده از بافت در محیط مناسب‌کشت می‌گردند(۱۶). هنگام کشت سلولی برخی خصایص سلول مانند تعداد رسپتورهای سطح سلول و متعاقباً پاسخ سلول به دارو تغییر می‌کند(۳۰). از این‌رو 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 این‌رو 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 این‌رو 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

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:45 +0430 on Wednesday July 18th 2018

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

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 lipogertesis. ***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. Haghighi 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 supresses 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. Orando 1987; 4: 1-21.
10. Cholhia 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.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:45 +0430 on Wednesday July 18th 2018

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. Elsevior, Amesterdam 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, Smedsrϕd 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 reglation 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 sters 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 amin oacids into protein in isolated tat 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 l988; 257-265.

23. Berry MN, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parencyhmal 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 occludetes, 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.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 16:45 +0430 on Wednesday July 18th 2018

28. Brindle NPJ, Ontko JA. α1-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

www.SID.ir