

## پرفیوژن و جداسازی هپاتوسیت از کبد رات

حمیدرضا عسگری (Ph.D.)<sup>\*\*</sup>مهری رسولی (Ph.D.)<sup>†\*</sup>

### 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 می‌باشد. 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 پرفیوژ می‌گردد. در اولین مرحله کبد توسط مسیر تک مسیری باز توسط محلول کربس-رینگر فاقد کلسیم و منیزیم و حاوی شلاتور کلسیم (EDTA)<sup>۱</sup> به مدت ده دقیقه پرفیوژ 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 پرفیوژ می‌گردد. در سومین مرحله کبد توسط کربس-رینگر آنزیم کلائزناز (IU/mL ۲۰۰) به مدت نه دقیقه توسط سیستم دو مسیری بسته پرفیوژ گردید. سلول‌های هپاتوسیت در غلظت  $7 \times 10^9$  cell/mL در محیط کربس-رینگر (بافر یکریبات) در فلاسک‌های شیشه‌ای مخصوص تحت جو (۵%  $O_2$ :  $CO_2$ ) انکوبه شدند. برای بررسی زنده بودن سلول‌های هپاتوسیت از تست‌های من و رود 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 می‌باشد. هنگام رنگ آمیزی 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 طوری که پرفیوژن کبد توسط شلاتور کلسیم به مدت ۱۰ دقیقه و سپس توسط آنزیم کلائزناز به مدت ۹ دقیقه موجب تولید حدود ۱۰ mL سلول با زنده بودن (Viability) بیش از ۹۰ درصد می‌گردد.

**واژه‌های کلیدی:** پرفیوژن، هپاتوسیت، کبد، رات، شلاتور کلسیم و کلائزناز

1. Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid

+ مولف مسئول: دکتر مهدی رسولی-ساری، کیلومنتر ۱۸ جاده خزرآباد، دانشکده پزشکی

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

\*\* گروه آناتومی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران، مرکز گروه آناتومی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران

۱ تاریخ دریافت: ۱۰/۰۲/۸۴ تاریخ تصویب: ۰۷/۰۹/۸۶

## مقدمه

دارند. در روش‌های شیمیایی بافت کبد توسط محلول پرفیوژات فاقد کلسیم و حاوی یک شلاتور کلسیم پرفیوژن می‌گردد<sup>(۹)</sup>. این عمل سبب حذف کلسیم از بافت و تخریب دسموزوم و کاهش نیروهای چسبندگی بین سلولی می‌گردد<sup>(۱۰)</sup>. 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<sup>(۵,۶)</sup>. تاکنون از شلاتورهای مختلف کلسیم مانند سیترات<sup>(۱۱)</sup>، EDTA<sup>(۱۲)</sup> و EGTA<sup>(۱۳)</sup> استفاده شده است. در روش‌های آنزیمی سلول‌های بافت کبد توسط پرفیوژن با محلول حاوی آنزیم‌های پروتولیزی از یکدیگر جدا می‌شوند<sup>(۱۴,۱۵)</sup>. در روش‌های اولیه از آنزیم تریپسین ولی هم اکنون از آنزیم کلاژنаз استفاده می‌گردد<sup>(۱۶)</sup>. مطالعه بر روی محصولات کلاژناز شرکت سیگما نشان می‌دهد که نمونه‌های کلاژناز خالص نیستند و حداقل حاوی بیست آنزیم می‌باشند<sup>(۱۵)</sup>، علاوه بر این، عمل این آنزیم‌ها غیر ویژه است و بسیاری از پروتئین‌ها و گیرنده‌های سطح سلول را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد<sup>(۱۶)</sup>.

با توجه به اهمیت «کبد پرفیوژ 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.

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 پرفیوژ 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<sup>(۱)</sup>.

کبد نقش مهمی در متابولیسم بدن دارد از این روش سیستم کبد پرفیوژ شده<sup>(۳,۲)</sup> و هپاتوسیت جدا شده از کبد<sup>(۴,۱۶)</sup> برای مطالعه متابولیسم بسیار حائز اهمیت می‌باشند. روش‌ها و کاربردهای تهیه هپاتوسیت از کبد رات توسط بری و همکارانش مرور شده است<sup>(۷)</sup>. برای تهیه هپاتوسیت از کبد رات به طور کلی سه روش مکانیکی، شیمیایی و آنزیمی وجود دارد<sup>(۸)</sup>. 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<sup>(۸)</sup>. از این روش‌های مکانیکی به جز در مراحل انتهایی کاربرد کمی

1. Ethylene Glycol Tetra Acetic Acid

## مواد و روش‌ها

### مواد و وسائل:

اکنون مسیر فوق باز می‌گردد، زمان بین شروع پروفیوژن و باز کردن یکی از وریدهای اجوف پایین یا بالای دیافراگم حداکثر یک دقیقه می‌باشد. پس از باز شدن مسیر جریان پروفیوزات به  $10\text{ mL/min.liver}$  افزایش می‌یابد<sup>(۲)</sup>. با مالش دادن لوب‌های کبد به خروج خون و جریان پروفیوزات کمک می‌شود<sup>(۱۱)</sup>. در یک پروفیوژن موفق طی سی ثانیه کبد کاملاً سفید می‌گردد که بیانگر خروج خون و عبور پروفیوزات از تمام لوب‌های کبد می‌باشد. به طور خلاصه وریدهای پورتال و اجوف تحتانی پایین و بالای دیافراگم کانوله می‌شوند و پروفیوزات 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 موقیت کانوله نمی‌شود در این صورت می‌توان ورید باب را بست و پروفیوزات 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<sup>(۱۸, ۱۹)</sup>.

**پروفیوژن کبد، جداسازی سلول‌های هپاتوسیت:**  
کبد در سه مرحله بر اساس روش شیمیایی - آنزیمی پروفیوز 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 ۵ دقیقه پروفیوز می‌گردد<sup>(۲۰, ۲۱)</sup>. در این مرحله کلسیم بافت شلات و از بافت کبد حذف می‌شود، این عمل موجب سست و تخریب دسموزین می‌گردد. در دومین مرحله، از آنجائی که EDTA باقیمانده در عروق کبد آنزیم

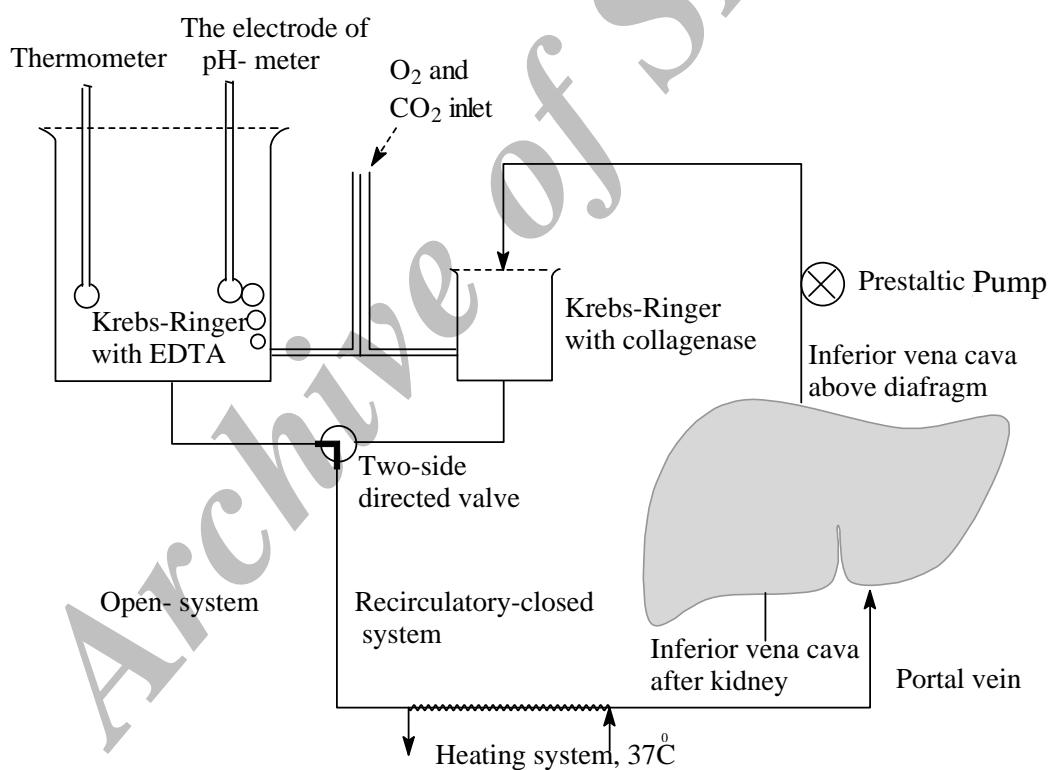
سدیم کلرید، پتاسیم کلرید، دی‌سدیم هیدروژن فسفات، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، منیزیم سولفات، منیزیم کلرید، گلوگر، سدیم بیکربنات، کلسیم کلرید، اتیلن دی آمین ترا استیک اسید (EDTA) و کلائزناز از Merck تهیه شدند. محلول‌های هانگ و کربس- رینگر در آزمایشگاه تهیه شدند و برای انکوباسیون ۳-۱ ساعت قابل استفاده هستند ولی در کشت سلولی محلولها باید در زیر هود تهیه و توسط صافی ویژه (سیگما) ستون شوند<sup>(۱۷)</sup>. کبد توسط دستگاه پروفیوژن دارای سیستم باز تک مسیری و بسته دو مسیری و مجهز به pH-سنچ، ورودی گازهای اکسیژن و دی‌اکسید کربن، الکترود دما، ترموموکوپل و پمپ پریستالیک پروفیوز گردید. سلول‌های هپاتوسیت توسط میکروسکوپ مجهز به دوربین عکاسی و فاز معکوس (Olympus-AH2, Japan) عکسبرداری شدند.

### اتصال کبد به دستگاه پروفیوژن:

در این روش کبد در محل خود (in situ) کانوله و پروفیوز می‌گردد<sup>(۳, ۲)</sup>. رات نر توسط دی‌اکسید یهوش 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 طوری که مجاری صفراوی را در بر نگیرد) و لیگاتور دیگر در انتهای ورید مزانتریک زده و کانوله می‌شوند<sup>(۱۴)</sup>. سپس لیگاتورها را محکم نموده و جریان پروفیوزات با سرعت  $10\text{ mL/min.liver}$  وارد ورید باب می‌گردد. دیافراگم را باز و اطراف ورید اجوف تحتانی بالای دیافراگم نیز یک لیگاتور زده و دهیلیز راست باز و توسط آنژیوکت- ۱۸ کانوله می‌گردد و لیگاتور آن محکم می‌گردد. هم

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 هپاتوسيت چندین بار توسط محلول کربس- رینگر تازه شسته می‌شود و چند دقیقه در ۵۰۰ g سانتریفوژ و دکانته می‌گردد. با این روش بازده حصول سلول وابسته به سن حیوان و اندازه کبد حدود ۱۰ mL خواهد بود.

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 توسط سیستم دو مسیری بسته پرفیوز می‌گردد. در پایان کبد از محل خود جدا و در پتريیدیش حاوی محلول آخربی چندین بار تکان داده شده، شسته و در لوله هموژئیزه کننده صاف با یک پیستون لاستیکی نرم و



شکل شماره ۱: پرفیوزن کبد. ورید باب و ورید اجوف تحتانی بالا یا پایین دیافراگم در محل خود لیگاتور زده و کانوله می‌گردند. در پرفیوزن جریان مستقیم محلول پرفیوزات از ورید باب وارد و از یکی از وریدهای اجوف تحتانی خارج می‌شود. ولی در پرفیوزن جریان معکوس محلول پرفیوزات از یکی از وریدهای اجوف تحتانی وارد و از یکی از ورید باب خارج می‌گردد. توجه نمائید که در پرفیوزن جریان معکوس یکی از وریدهای اجوف تحتانی باید باز (کانوله) و دیگری بسته شده باشد، در غیر اینصورت محلول پرفیوزات از داخل کبد عبور نمی‌کند و از ورید دیگر اجوف خارج می‌شود. محفظه حاوی محلول کربس- رینگر در سمت چپ حاوی EDTA است و برای پرفیوزن یکطرفة (مسیر باز) و در طرف راست حاوی کلاژناز است و برای پرفیوزن سیستم بسته بکار می‌رود. قبل از شروع پرفیوزن دمای محلولها به  $37^{\circ}\text{C}$  رسیده ولی حین عمل نیز دما نزدیک  $37^{\circ}\text{C}$  تنظیم می‌گردد. پمپ پریستالتیک فقط در سیستم بسته برای گردش محلول به دستگاه و کبد بکار می‌رود.

برای تعیین فعالیت LDH از کیت آنزیمی شرکت سیگما استفاده گردید و به علت فعالیت زیاد آنزیم در داخل سلول،  $10 \mu\text{L}$  از هموژنه سلولی و  $100 \mu\text{L}$  از محیط انکوباسیون به محیط سنجش آنزیم اضافه شد.

## یافته ها

تعیین ویابیلیتی سلولی توسط سنجش درصد احتباس لاكتات دهیدروژنаз.

آنژیم لاكتات دهیدروژناز (LDH) یک نشانگر مهم بخش سیتوزول سلول است<sup>(۲۵)</sup>. 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 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 تراوosh شده است.

جدول شماره ۱: تعیین درصد احتباس آنزیم سیتوزولی لاكتات 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 بین المللی تبدیل شده است.

درصد احتباس	LDH	فعالیت کل (IU)	حجم (mL)	فعالیت (IU/L)	LDH (الف) پلی سلولی
-	$94 \pm 0.9$		۸۰	$118 \pm 11$	
		$0.9 \pm 2.4$	۵۰	$18 \pm 5$	ب) مجموعه مخلوط دیسپرسیون و شستشو
$79.2 \pm 2$	$100 \pm 0.1$	$28 \pm 50$		$13 \pm 2$	ج) مجموعه مخلوط شستشو و محیط انکوباسیون

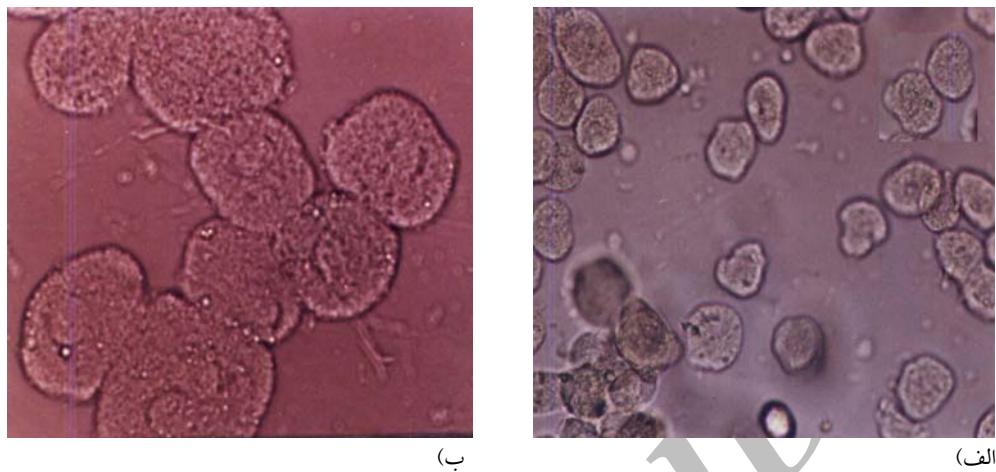
انکوباسیون سلول‌های هپاتوسیت:

سلول‌های هپاتوسیت را می‌توان در محیط‌های مختلف مانند کربس-رینگر یا محیط حداقل ضروری ایگل (EMEM)<sup>(۱)</sup> انکوبه نمود<sup>(۲۳)</sup>. خصیصه مشترک محیط‌های مختلف تشابه غلظت مواد معدنی اصلی، اسمولالیته و توئیسیته 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 طولانی تر و کشت سلولی حضور عوامل فوق ضروری است<sup>(۱۶)</sup>. در این تحقیق سلول‌ها در محیط کربس-رینگر (بافر بیکربنات) در فلاسک‌های شیشه‌ای مخصوص که به سیستم مرکزی تولید تحت جو  $\text{CO}_2: \text{O}_2 = 5: 95$  متصل بودند انکوبه شدند. انکوباسیون در لوله‌های پلاستیکی یا پلی استیرنی اولتراسانتریفوژ نیز میسر است<sup>(۲۴, ۲۰)</sup>. برای انکوباسیون سلول‌ها  $1 \text{ mL}$  از سوسپانسیون استوک هپاتوسیت توسط محلول کربس-رینگر به حجم کلی  $4 \text{ mL}$  رسید. بدین ترتیب غلظت هپاتوسیت در محیط انکوباسیون حدود  $7-9 \times 10^6$  cell/mL معادل  $80 \pm 5 \text{ protein/mL}$  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 لاكتات 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.

1. Eagle Minimal Essential Medium



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

سلول‌های زنده می‌شد. یکی از مهم‌ترین یافته‌های متابولیسم یعنی سیکل اوره توسط کربس و دانشجوی پژوهشکی آن هنسیلت بر روی برش‌های کبد به دست آمد.<sup>(۲۷)</sup> در آن زمان متدهای مدرن جداسازی سلول زنده از بافت شناخته نشده بود. به هر حال هم اکنون این روش‌ها فقط در مراحل نهایی برای پراکنده کردن سلول‌ها به کار می‌روند. در روش‌های شیمیایی کبد توسط محلول پرفیوژات فاقد کلسیم و حاوی یک شلاتور کلسیم مانند سیترات، EDTA و EGTA پرفیوژن می‌گردد<sup>(۱۱-۱۳)</sup>. این عمل سبب حذف کلسیم از **باتف** و تخریب دسموزوم و کاهش تیروهای چسبندگی بین سلولی می‌گردد<sup>(۱۰)</sup>. 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<sup>(۱۴)</sup>. ولی عیب مهم این روش آسیب شدید فیزیکی سلول‌ها و زنده بودن (ویاپلیتی) 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 ویاپلیتی سلولی توسط ارزیابی مورفوژری و تعیین درصد منع درج تریپان بلو.

شکل شماره ۲ 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<sup>(۲۶)</sup>. 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

کلائزناز 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 ۱–۱۰ دقیقه با محلول فاقد کلسیم و حاوی شلاتور کلسیم پروفیوژن می‌شود، سپس حدود ۱۰ دقیقه دیگر توسط محلول حاوی کلائزناز پروفیوژن می‌گردد(۱۴،۱۶). از آنجائی که در ایران عموماً دسترسی به آنزیم کلائزناز محدود است و یا کلائزناز 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 کلائزناز موجود از سیستم بسته دو مسیری به جای سیستم بازتک مسیری استفاده شده است. بدین طریق با استفاده از مقدار کم کلائزناز 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 می‌گردد(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 سلطانی 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

شده است(۱۱،۱۲). در تمام این روش‌ها پروفیوژن در دمای ۳۷°C و pH ۷/۴ انجام می‌شود. محلول‌های مختلفی نیز برای پروفیوژن کبد، پراکنده کردن سلول‌ها و انکوباسیون سلول جدا شده به کار می‌رود. دی‌ساکاریدهای هیپرتونیک مانند ساکاروز M ۰/۵ اگرچه سبب تجزیه اتصالات محکم (gap junction) بین سلول‌ها و تسهیل جدا شدن سلول‌ها می‌گردد ولی از آنجایی که عمل آنها برگشت‌پذیر است و سبب پلاسمولیز نیز می‌گردد توصیه نمی‌شوند(۲۶). از این‌رو بیشتر محققین از محلول نمکی هانگ و یا کربس-رینگر استفاده می‌کنند(۱۳،۱۶). غلظت گلوکز نیز چندان مهم نبوده و در حیطه غلظت فیزیولوژی یعنی حدود mM ۵/۰ ۵/۰ انتخاب می‌گردد(۱۶). به هر حال اگر در مطالعه‌ای لازم باشد به پروفیوژات یا محیط انکوباسیون هپاتوسیت عوامل محرك گلیکوژنولیز مانند کاتکولامین‌ها اضافه شود به منظور ممانعت از تحلیل گلیکوژن کبد و افزایش ویاپلیتی سلولی لازم است غلظت گلوکز تا mM ۲۰ افزایش یابد(۲۸).

کشف این نکته که کلائز 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 کلائزناز دارای ویژه‌گی عمل بیشتری است غالباً برای جداسازی سلول‌ها به کار می‌رود. شرکت سیگما برای پروفیوژن بافت‌های مختلف انواع مختلف کلائزناز ارائه نموده است ولی متخصصین تهیه هپاتوسیت هیچ ارجحیتی بین آنها پیدا نکردنند(۱۵). نمونه‌های آنزیم کلائزناز خود حاوی بیست آنزیم می‌باشند و پروتئین‌های دیگر حاوی ردیف-Pro-را نیز هیدرولیز می‌کنند(۱۵). اگرچه غالباً گزارش شده که کلائزناز 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،۳۰). بنابراین به نظر می‌رسد

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 کلارازناز به مدت ده دقیقه منجر به تولید سلول هپاتوسیت با بازده و ویاپلیتی 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 متدهای 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, Daikuahara 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. Haghghi B, Rasouli M, Suzangar M. Inhibitory effect of epinephrine on phosphatidate phosphohydrolyase 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. 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.

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.  $\alpha$ 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