

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

اصغر امینی هرندی <sup>✉</sup> M.Sc. <sup>\*</sup>، عبدالامیر علامه <sup>✉</sup> Ph.D. <sup>\*</sup>، تقی الطریحی <sup>\*</sup> Ph.D.

<sup>\*</sup> دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه بیوشیمی

<sup>\*</sup> دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه علوم تشریح

<sup>✉</sup> آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۱۱۱-۱۴۱۵۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه بیوشیمی

## چکیده

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

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

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

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

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

**کل واژگان:** پرفیوژن، ایزولاسیون، هپاتوسیت، رت، کلاژناز

## مقدمه

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

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

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

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

## مواد و روشها

### حیوان آزمایشگاهی

برای تهیه هپاتوسیت از رت بالغ نر، نژاد ویستار با وزن  $250 \pm 30$  گرم استفاده می‌شود. وزن کبد این موشها بسته به وزن حیوان بین ۱۰-۸ گرم متغیر است. نژاد، جنس و وزن موش را بنا به نوع هپاتوسیت‌های ایزوله مورد آزمایش می‌توان تغییر داد.

### محلولها و مخلوط گاز تنفسی

#### گاز تنفسی

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

۱۴۸

دستگاه پرفیوژن به نام اکسیژناتور به محلول پرفیوژن اضافه می‌شود.

### محلولها

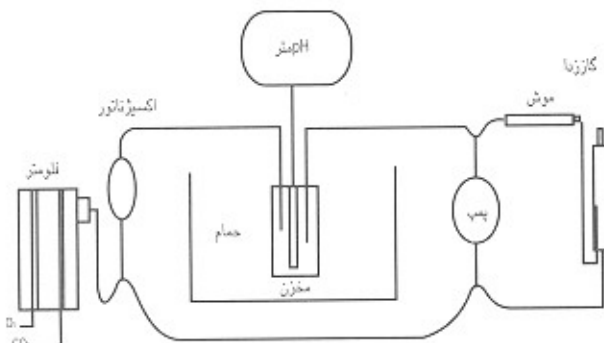
در این روش از سه نوع بافر مختلف به منظور حذف اتصالات و ماتریکس بین سلولی و نیز شستشو و انکوباسیون سلول استفاده می‌شود. بافر شماره ۱ (بافر پرفیوژن فاقد کلسیم همراه با یک شلاته کننده کلسیم):  $NaCl$  گرم  $6/9$ ،  $KCl$  گرم  $5/7$ ،  $Na_2HPO_4$  گرم  $2/7$ ،  $NaH_2PO_4$  گرم  $9$ ، گلوکز، گرم  $3/0$ ،  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  گرم  $1/69$  و  $NaHCO_3$  گرم  $0/8$  (بافر شماره ۲ (بافر هضم کننده): محلول بافری شماره ۱ بدون EGTA و نیز حاوی ۴ میلی‌مول کلسیم  $(CaCl_2 \cdot 2H_2O)$  و  $0/12$  درصد آنزیم کلاژناز.

بافر شماره ۳ (بافر شستشو):  $NaCl$  گرم  $6/9$ ،  $KCl$  گرم  $3/6$ ،  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  گرم  $1/13$ ،  $KH_2PO_4$  گرم  $9$ ، گلوکز، گرم  $3/0$ ،  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  را پس از حل کردن، در یک بالن حجمی یک لیتری به حجم می‌رسانیم. کلیه محلولهای بافری را پس از تهیه فیلتر کرده و توسط گاز کربوژن pH آنها را به  $7/4$  می‌رسانیم.

### \* دستگاه پرفیوژن

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

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



شکل ۱: نمای شماتیک دستگاه پرفیوژن

مرحله دوم کبد را با بافر شماره ۲ که حاوی آنزیم کلاژناز و نیز یون کلسیم است، شستشو انجام می‌شود. در این مرحله ماتریکس خارج سلولی نیز هضم شده و لذا سلولهای کبد به راحتی از یکدیگر جدا می‌کنیم.

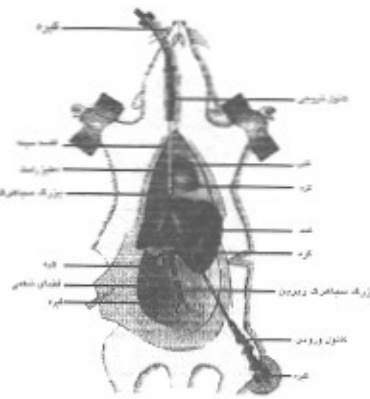
روش عمل بدین صورت است که در مرحله اول مقدار ۵۰۰ میلی‌لیتر از محلول شستشو را به داخل مخزن ذخیره ریخته، پمپ پرستالتیک را روشن کرده تا ضمن گردش مایع پرفیوژن، با گاز کربون مخلوط شود، این عمل تا رسیدن به دمای ۳۷ سانتیگراد و  $\text{pH} = 7.4$  ادامه می‌یابد. پس از انجام عمل جراحی و آماده شدن موش، با باز کردن شیر لوله ورودی، حباب احتمالی موجود در داخل لوله و کاتول ورودی را خارج کرده، سپس آن را به کاتول ورودی متصل می‌شود. پس از قطع IVC، جریان پرفیوژن رابه تدریج افزایش داده تا سرعت جریان به ۳-۴ میلی‌لیتر به ازای هر گرم وزن کبد حیوان برسد. در این مرحله محلول پرفیوژن کننده از محل بریدگی ایجاد شده در IVC خارج می‌شود، پس از برقراری جریان پرفیوژن کبد کم رنگ‌تر شده و در نهایت به صورت پریده در می‌آید. بزرگ شدن اندازه کبد یا وجود لکه‌های قرمز رنگ روی آن نشان دهنده ناقص بودن پرفیوژن بوده و بایستی پرفیوژن را قطع و مجدداً آن را تکرار نمود.

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

بایستی دقت داشت به دلیل حساس و شکننده بودن سلولهای کبدی از وارد آوردن هرگونه استرس به سلولها خودداری شود. در انتهای پرفیوژن با خارج شدن هپاتوسیتها، بافت عروقی و همبند به صورت یک توده سفید رنگ باقی می‌ماند که با صاف کردن سوسپانسیون حاصل به وسیله یک صافی با روزه‌های ۲۵۰ میکرومتری و یا یک گاز دو لایه سلولهای به هم چسبیده، بافت همبند و ذرات موجود در سوسپانسیون جدا می‌شوند. پس از صاف کردن، سوسپانسیون سلولی را به مدت نیم ساعت در دمای ۳۷ سانتیگراد با حرکت  $10 \text{ titl/min}$  اتکوبه می‌کنیم. در این مرحله سلولهایی که آسیب کلفتی دیده‌اند، پاره شده یا لخته می‌شوند و سلولهایی که آسیب وارده به آنها کمتر است

## \* جراحی

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



شکل ۲: نمایش شماتیک موش در حال جراحی

## \* پرفیوژن کبد

پرفیوژن را می‌توان به دو روش تک مرحله‌ای و دو مرحله‌ای انجام داد، ولی بهترین نتیجه با روش دوم به دست آمد (۶، ۷). در این روش در مرحله اول کبد را بافر شماره ۱ که فاقد یون کلسیم و حاوی یک شلانه کننده کلسیم مانند EGTA است، شستشو می‌دهیم. در این مرحله اتصالات دسوزومی سلول به طور برگشت‌ناپذیر جدا می‌شوند، در

1. Inferior Vena Cava

## بحث

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

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

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

## \* هیپوکسی

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

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

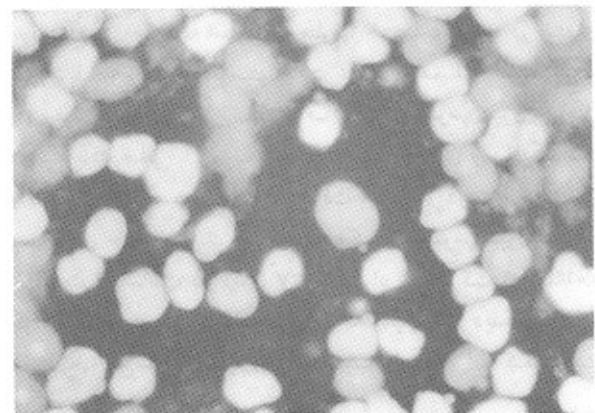
زمان لازم برای ترمیم خود را باز می‌یابند. پس از گرمخانه گذاری، سوسپانسیون سلولی را تا ۴ سانتیگراد سرد کرده (همراه با حرکت دادن سوسپانسیون) و مجدداً به وسیله یک گاز دو لایه صاف می‌کنیم. در مرحله بعد سلولها را دو قسمت کرده و در دور حدود ۲۰g به مدت ۳-۲ دقیقه در دمای صفر درجه سانتیفرز نموده و پس از خارج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

## یافته‌ها

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

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

سلولهای هیاتوسیت جدا شده با اکریدین اورنج و اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند (شکل ۳).



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

طولانی شدن زمان، رگ بسته شده و امکان کانول گذاری کمتر می شود. در هنگام کانول گذاری بهتر است کانول را در امتداد ورید باب وارد کرد. بدین منظور قسمت پایین ورید باب را با پنس قدری کشیده تا رگ به صورت مستقیم در آید.

### \* کلسیم

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

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

### تقدیر و تشکر

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

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

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

### \* عمل جراحی

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

عمل کانول گذاری نیز بایستی سریع انجام پذیرد؛ در صورت

### References

1. Moldeus P, Hogberg J, Orrenius S: Isolation and use of liver cells. *Met Enzymol* 1978; 5260-5271
2. Howard RB, Pesch LA: Respiratory activity of intact, isolated parenchymal cells from rat liver. *J Biol Chem* 1968; 10; 243(11): 3105-3109
3. Berry MN, Friend DS: High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and

- fine structural study. *J Cel lBiol* 1969; 43(3): 506-520
4. Hogberg J, Kristoferson A: A correlation between glutathione levels and cellular damage in isolated hepatocytes. *Eur J Biochem* 1977; 15; 74(1): 77-82
5. Bery MN, Edwards AM, Barrit GJ: Isolated hepatocytes preparation, properties and applications. Burdon RH, Knippenderg H(eds), volume 21, New



York, Elsevier 1991, pp 26

6. Seglen PO: Preparation of rat liver cells. I. Effect of Ca<sup>2+</sup> on enzymatic dispersion of isolated, perfused liver. *Exp Cell Res* 1972; 74(2): 450-454
7. Seglen PO: Preparation of rat liver cells. 3. Enzymatic requirements for tissue dispersion. *Exp Cell Res* 1973; 82(2): 391-398
8. Seglen PO: Isolation of hepatocytes by collagenase perfusion. *Methods in toxicology*, Volume 14, Academic Press, 1995, pp 251-243
9. Seglen PO: The effect of perfusate pH on respiration and glycolysis in the isolated rat liver perfused with an erythrocyte- and protein-free medium. *Biochem Biophys Act* 1972; 16: 264(3): 398-410
10. Solheim AE, Seglen PO: Cellular and lysosomal uptake of methylamine in isolated rat hepatocytes. *Biochem J* 1983; 15: 210(3): 929, 36
11. Gordon PB, Tolleshaug H, Seglen PO: Autophagic sequestration of [<sup>14</sup>C]sucrose introduced into isolated rat hepatocytes by electrical and non-electrical methods. *Exp Cell Res* 1985; 160(2), 449-458
12. Seglen PO: Effects of anaerobiosis, glucose, insulin and glucagon on glycogen metabolism in isolated

parenchymal rat liver cells. *FEBS-Lett* 1973; 36(3): 309-312

13. Seglen PO: Inhibitor of protein degradation formed during incubation of isolated rat hepatocytes in a cellculture medium. Its identification as ammonia. *Exp Cell Res* 1977; 107(1): 207-217
14. Bellemann P, Gebhardt R, Mecke D: An improved method for the isolation of hepatocytes from liver slices. Selective removal of Trypan blue-dyeable cells. *Anal- Biochem* 1977; 81(2): 408-415
15. Seglen PO: Preparation of rat liver cells. II. Effects of ions and chelators on tissue dispersion. *Exp Cell Res* 1973; 76(1): 25-30
16. Barnabei O, Leghissa G, Tomasi V: Hormonal control of the potassium level in isolated rat liver cells. *Biochem Biophys Act* 1974; 5: 362(2): 316-325
17. Baur H, Kasperek S, Pfaff E: Criteria of viability of isolated liver cells. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1975; 356(6): 827-838
18. Edmondson JW, Bang NU: Deleterious effects of calcium deprivation on freshly isolated hepatocytes. *Am J Physiol* 1981; 241(1): C3-8

