مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۲، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۳۹۳
صفحه: ۱۱۵۲-۱۱۴۰

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 22, No. 2, May-Jun 2014
Pages: 1140-1152

مقاله مروری

مروری بر استفاده از روش پرفیوژن کبدی در مطالعات سم شناسی

محمد کرمی *

- دانشیار گروه سم شناسی و فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۳/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۲۴

چکیده

مقدمه: با استفاده از سیستم پرفیوژن کبد جدا شده یا به عبارتی (IPRL: Isolated Perfused Rat Liver)، سلول‌ها به طور مستقیم در مجاورت غلظت‌های مختلفی از ترکیبات شیمیایی قرار می‌گیرند و پاسخ‌های بیوشیمیایی مانند تغییرات آنزیمی و پاتولوژی قابل ارزیابی است. از نظر تسریع در پاسخ‌های یاده شده، پرفیوژن کبدی در مطالعات سم شناسی به عنوان یک روش قابل قبول محسوب می‌شود.

روش بررسی: قابلیت زیست کبدی از طریق مشاهده رنگ آن (قهوه‌ای روشن)، تنظیم سرعت پرفیوژن و تنظیم دما در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و کنترل PH تعیین می‌شود. بعد از بیهوشی کامل، حفره شکمی حیوان باز شده و بافر از طریق ورید باب وارد شده و در سلول‌های کبدی جریان می‌یابد. مایعات خروجی از طریق ورید خروجی (Inferiorvena cava) جمع‌آوری شده و پاسخ‌های بیوشیمیایی مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

نتایج: تغییرات آنزیم‌های ترانسفراز(ALT ,AST) به عنوان معیار تغییرات بیوشیمیایی به منظور ارزیابی آسیب‌های کبدی ناشی از داروی‌ها مانند ایزونیازید (INH) و سموم حیوانی و گیاهی کاربرد وسیعی دارد. مواد تجمع‌یافته در کیسه صفرا نمونه‌های ارزشمند برای ارزیابی سطح گلوتاتیون (GSH) می‌باشند. ریزبینی نمونه‌های پرفیوژ شده بافت از نظر شاخص‌های پاتولوژی مانند نکروز فیبروز، سلولاریته و ... نیز مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرند.

نتیجه‌گیری: مطالعه تغییرات آنزیم‌های AST, ALT و ارزیابی سطح GSH و ریزبینی نمونه در روش پرفیوژن کبدی موجب شده تا آن در مطالعات سم شناسی ارزشمند باشد.

واژه‌های کلیدی: پرفیوژن، گلوتاتیون، آنزیم‌های ترانسفراز، کربس هنزیلت، موش صحرایی

* (نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۱۵۱-۳-۳۵۴۳۰۸۱، پست الکترونیکی:toxkarami@gmail.com

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

مقدمه

در سال‌های اخیر بسیاری از متخصصین برای انجام مطالعات سم‌شناسی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی از روش پرفیوژن ارگان‌هایی نظیر قلب، کبد، ریه، کلیه، روده و مغز استفاده کرده‌اند. Bolylioni و Muller از اولین افرادی بودند که روش پرفیوژن اعضا را برای مطالعات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی بکار بردند که بعدها توسط افرادی نظیر Embden و Brodie و Laussner توسعه داده شد. در سال‌های اخیر Pohjanvirta و همکاران از روش پرفیوژن کبد برای اندازه‌گیری میزان ملاتونین تحت تأثیر سموم علف‌کش استفاده کردند(۱).

پرفیوژن کبد می‌تواند به روش Insitu و یا به روش Invitro استفاده شود. در حالت Insitu کبد حیوان در جایگاه عمل خود قرار دارد و ارتباطش با سایر اجزا و ارگان‌های مجاور قطع می‌باشد و از این روش برای مطالعه اثرات سموم کبدی استفاده می‌کنند. در حالت Invitro خود ارگان و یا سلول‌های کبدی جداشده در محیط کشت یا سوسپانسیون برای برخی از مطالعات بیوشیمیایی مورد استفاده قرار می‌گیرد که در این حالت سلول‌های جداشده در محیط کشت پایداری کمتری دارند. بعضی از محققین عقیده دارند که بهتر است اصطلاح Exvivo Perfusion به جای Invivo Perfusion برای روش پرفیوژن ارگان‌های جداشده، در خارج از بدن بکار رود(۱).

در حال حاضر این روش در حال توسعه و تکمیل می‌باشد. سیستم پرفیوژن کبد جدا شده (IPRL:Isolated Perfused Rat Liver) سیستمی نزدیک به حالت فیزیولوژیک است که در بسیاری از مطالعات Invitro سمیت کبدی استفاده می‌شود. محیطی است که در آن سلول‌های کبدی به طور مستقیم در مجاورت غلظت‌های مختلفی از ترکیبات شیمیایی قرار می‌گیرند، به صورتی که این عمل مستقل از اثرات اجزا پلاسما و هورمون‌های موضعی است و بدین ترتیب تغییرات در سرعت جریان خون، جذب، پخش و متابولیسم و یا تغییرات هورمونی به حداقل می‌رسد.

بعد از بیهوشی و جراحی حیوان و دسترسی به وریدهای ورودی و خروجی کبد، مایع کربس حاوی ترکیبات مورد مطالعه از طریق ورید باب وارد کبد شده و اجازه می‌یابد در تمام سلول‌های کبدی جریان یابد. مایعات خروجی از طریق ورید خروجی (Inferiorvena cava) جمع‌آوری می‌شود. این ترشحات حاوی پروتئین‌ها و داروها و متابولیت‌های آنها خواهد بود که با نمونه‌برداری از حاصل پرفیوژن و تجزیه و تحلیل آنها با دستگاه‌های مربوطه می‌توان به جزییات بیشتری از کینتیک ترکیب مورد نظر دست یافت. البته در صورت نیاز می‌توان مایع پرفیوژ شده را مجدداً به ظرف اولیه بازگرداند (ایجاد چرخه) که در این صورت برای جلوگیری از ورود لخته‌ها و یا مواد جانبی از کبد به مخزن، از فیلتر Degassor استفاده می‌شود(۲،۳).

محدودیت‌های روش پرفیوژن

محدودیت اصلی که در این روش وجود دارد کوتاه بودن زمان نگهداری کبد می‌باشد به طوری که حداکثر زمانی که تاکنون توانسته‌اند کبد را زنده نگه‌دارند، ۴ ساعت بوده است(۴) و اغلب در چنین زمانی امکان تعیین اثرات درمانی و سمی بعضی از عوامل روی بافت کبد وجود ندارد. البته این اشکال با ایجاد چرخه تا حدودی رفع شده است، بنابراین تا حد امکان زمان جراحی باید کوتاه شود و این مسئله مستلزم این است که فرد آزمایش کننده کاملاً به جراحی مسلط باشد و مهارت کافی را به دست آورده باشد تا در حداقل زمان جراحی را انجام دهد. هم چنین یکی دیگر از محدودیت‌های این روش، انجام عمل پرفیوژن در یک محیط مساعد می‌باشد که در یک فاصله زمانی معین، میزان pH، دما، میزان جریان برقرار شده (Flow Rate) و سایر عوامل نمی‌تواند خارج از شرایط قابلیت زیست کبدی باشد. به طور کلی نتایج به‌دست آمده از این روش با نتایج به‌دست آمده از آزمایشات Invitro متفاوت می‌باشد و این مسئله تعمیم نتایج به دست آمده به یک موجود زنده را با محدودیت مواجه می‌کند (۴،۵).

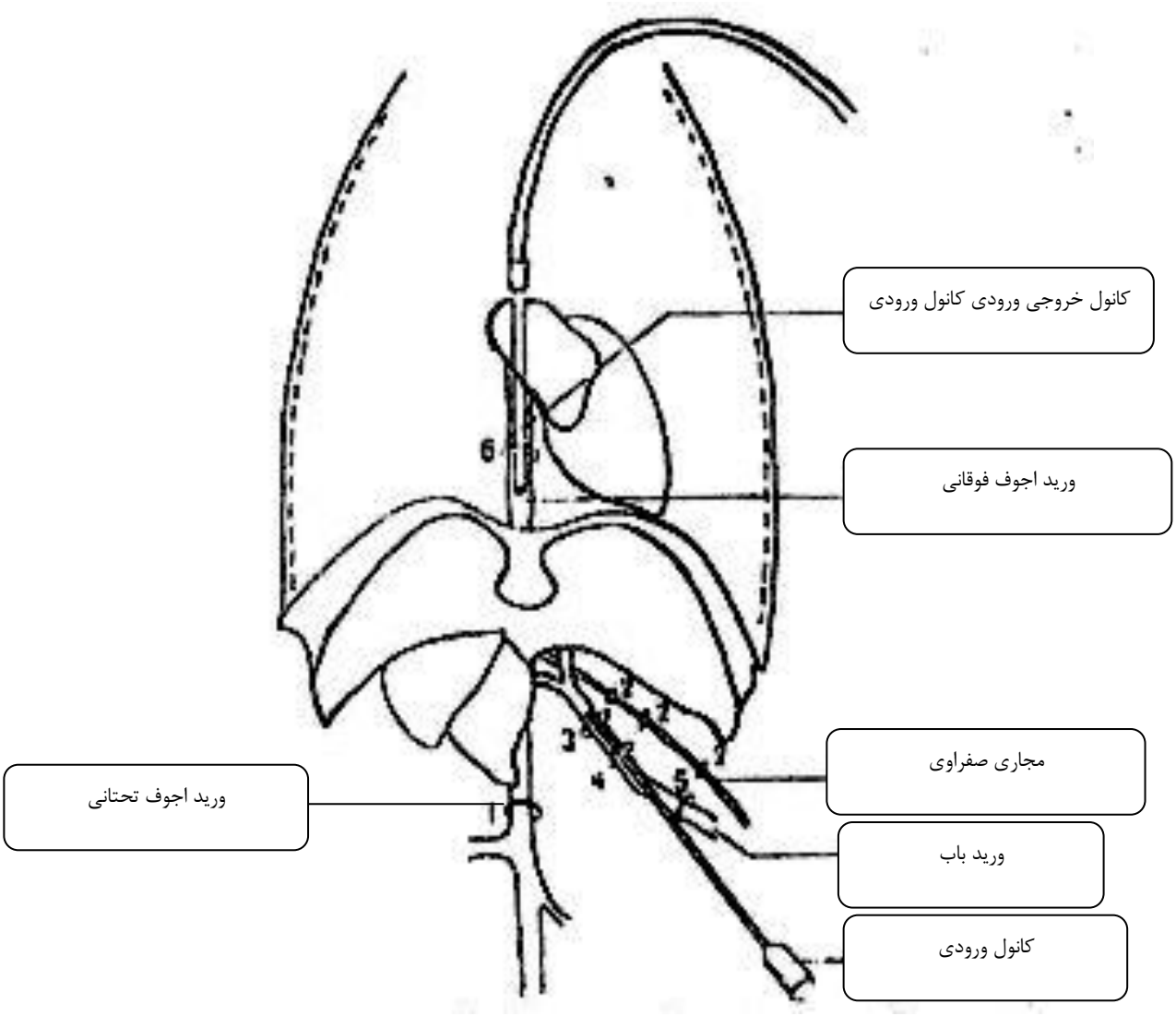
عوامل اصلی روش پرفیوژن کبد

۱- روش جراحی: اولین مرحله در جراحی، بیهوش کردن حیوان مورد نظر می‌باشد. انتخاب ماده بیهوشی با توجه به گونه حیوان و نوع مطالعه صورت می‌گیرد. به عنوان مثال در

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

مطالعاتی که بر روی متابولیسم داروها انجام می‌گیرد، بهتر است از ماده بیهوشی استفاده شود که حداقل تداخل را با آنزیم‌های کبدی از جمله سیتوکروم P450 داشته باشد.

عمومی‌ترین ماده بیهوشی‌دهنده موش صحرایی در روش پرفیوژن کبد پنتوباربیتال (PentoBarbital) با دوز ۵۰mg/kg است که از طریق داخل صفاقی (IP) به حیوان تزریق می‌شود ولی در برخی مطالعات از ترکیب گزیلازین (Xylazine) ۲/۵mg، کتامین (Ketamin) ۱۲/۵mg و دیازپام (Diazepam) ۰/۵۰mg در حجم ۳۵۰ میکرولیتر استفاده می‌کنند و گاهی هم از مواد بیهوش‌کننده استنشاقی مانند هالوتان (Halothane) ۰/۰۳٪، دی‌اکسیدکربن ۸۰٪ و یا دی‌اتیل‌اتر ۶۰٪ استفاده می‌شود. بنابراین، بعد از بیهوشی کامل توسط دی‌اتیل‌اتر، حفره شکمی حیوان به صورت T در سطح شکم و جناحین باز می‌شود. سپس، بلافاصله ورید اجوف تحتانی از بالای کبد با کمک پنس قفلی مسدود شده، سپس با استفاده از سوزن جراحی و نخ بخیه کانول ورودی به ورید پورت و خروجی به ورید اجوف تحتانی متصل می‌شود. بعد از برقراری جریان پرفیوژن، نمونه‌ها جمع‌آوری می‌شود. در طول مدت پرفیوژن سطح بافت کبد به طور مرتب با نرمال سالین گرم، مرطوب می‌شود. این عمل امکان تبادلات گازی را بهبود می‌بخشد(۶،۷) (شکل ۲، ۱).



شکل ۱: آماده سازی کبد برای سیستم پرفیوژن

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

شکل ۲: موش جراحی شده در سیستم پرفیوژن کبدی

۲- قابلیت زیست کبدی (Viability): مسلم است در طی پرفیوژن، بافت کبد باید زنده باشد. برای حفظ توانایی زیست کبد باید عوامل رنگ ظاهری کبد، میزان دما، pH و فعالیت آنزیم‌های ترانسفراز در حد معینی تثبیت شود. رنگ ظاهری کبد باید قهوه‌ای روشن باشد. رنگ قرمز وجود لخته و عدم پرفیوژن کامل در همه سطح بافت را ثابت می‌کند و رنگ سفید، ناشی از جدا شدن سلول‌های کبدی است که در این حالت صحت عمل پرفیوژن مورد تردید است. pH حدود ۷/۲ الی ۷/۴ تنظیم می‌شود که همان pH محیط سیستماتیک موش می‌باشد. به خاطر تولید متابولیت‌های اسیدی، pH تنزل پیدا می‌کند که در این صورت با استفاده از جریان اکسیژن خالص یا بی کربنات سدیم این تغییرات pH جبران و تعدیل می‌یابد. درجه حرارت مطابق با درجه حرارت طبیعی بدن، یعنی ۳۷ درجه سانتی‌گراد تنظیم می‌شود. افزایش و یا کاهش درجه حرارت فعالیت آنزیم‌های ترنسفراز را تغییر می‌دهد. در درجه حرارت محدوده ۳۸ الی ۳۹ سانتی گراد، فعالیت آنزیمی قطع می‌شود. سرعت جریان (Flow rate) باید در حد ۲ml/min/g برقرار باشد(۴). افزایش سرعت جریان باعث افزایش فزاینده جریان اکسیژن می‌شود که به نوبه خود به رادیکال‌های آزاد تبدیل می‌شود. بالعکس کاهش فلوریت موجبات کاهش میزان اکسیژن مصرفی می‌شود که موجب نقصان در تنفس سلولی می‌گردد(۴). فعالیت آنزیم‌های ترانس آمیناز تعیین کننده فیبروز و نکروز کبدی است. به طوری که اگر میزان AST از حد طبیعی ۲۵ واحد بین‌اللمللی در لیتر (IU/L) بالاتر رود، مرگ سلولی فرا می رسد(۸،۹) (جدول ۱).

جدول۱ : عوامل قابلیت زیست کبدی (Liver Viability) در روش پرفیوژن

پارامترهای قابلیت زیستی کبد	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	Flow(ml/min)	pH
محدوده اندازه‌گیری	۱۰-۲۹	۸-۲۴	۱۰	۷/۲-۷/۴

AST(Aspartate transaminase), ALT(Alanine transaminase)

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

۳- مایع پرفیوژن: اکثر ترکیبات مایع پرفیوژن بر روی میزان بروز پیشرفت خیز (ادم) تأثیرگذار هستند، لذا فقط خون تام برای مطالعات پرفیوژن بسیار مناسب می‌باشد. استفاده از خون تام در حیواناتی مثل خرگوش عملی است زیرا از طریق قلب یک خرگوش ۳ کیلوگرمی می‌توان ۱۰۰ میلی‌لیتر خون به دست آورد که برای جلوگیری ایجاد لخته‌های خونی، هپارینه شده و برای تفکیک سلول‌های مرده، صاف می‌شود. اما این روش برای پرفیوژن کبد حیوانات کوچکی مثل موش صحرایی عملی نمی‌باشد. به دلیل اینکه خون چندین موش صحرایی باید جمع‌آوری گردد تا بتوان کبد یک موش صحرایی را برای مدت کوتاهی پرفیوژ کرد(۱۰). بدین دلیل محققین اغلب یک محیط مصنوعی را جایگزین خون می‌نمایند. ترکیبی که به طور کلی در اغلب مطالعات استفاده می‌شود، شامل موارد زیر است:

کلرید سدیم (NaCl)، کلرید کلسیم (CaCl2)، فسفات دی‌هیدروژن پتاسیم (KH2Po4)، سولفات منیزیم (MgSo4) و بی‌کربنات سدیم(NaHCo3).

PH نهایی محلول باید ۷/۴ باشد که به منظور اجتناب از تغییرات PH با ایجاد محیط‌های اسیدی یا قلیایی از محلول پرفیوژن از طریق گازهای خالص اکسیژن و دی‌اکسیدکربن تنظیم نموده و یا از باز NaOH و یا اسید HCL استفاده می‌کنند(۱۱).

محیط استاندارد پرفیوژن محلول کربس هنزیلت و یا محلول استاندارد بی‌کربنات کربس- رینگر است. این محلول‌ها علاوه بر مواد فوق، حاوی گلوکز و آلبومن سرم گاوی (BSA) نیز می‌باشند. خاصیت بافری محلول‌های فوق را می‌توان با اضافه کردن بافرهای آلی مانند HEPES: W-2-Hydroxy Ethyl Piperazin-N-2-Ethano Sulfonic Acid به میزان ۲۰-۱۰ میلی‌مول افزایش داد. این محیط مصنوعی چندین مزیت بر خون تام دارد، اول این که در مطالعات پرفیوژن یک طرفه معمولاً حجم زیادی مایع پرفیوژن مورد احتیاج می‌باشد که اگر خون تام استفاده شود از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نیست و دوم اینکه تغییرات یونی و pH محیط در مایع پرفیوژن به آسانی کنترل می‌شود و مزیت عمده دیگر این است که داروهای مورد آزمایش به راحتی و در غیاب اریتروسیت‌ها و دیگر ترکیبات مزاحم می‌توانند استخراج و تجزیه و تحلیل شوند (در بعضی از موارد برای جلوگیری از لخته شدن در حین عملیات جراحی می‌توان EDTA، به میزان ۲ میلی‌مول به عنوان شلاتور (Chelator) کلسیم استفاده کرد).

به نظر می‌رسد در پرفیوژن طولانی مدت، لازم است که از یک ماده برای افزایش اسمولالیته محیط و در نتیجه کاهش ادم استفاده کرد و یا اینکه در مایع پرفیوژن تغییرات لازم را ایجاد کرد به طوری که اسمولالیته بالایی داشته باشد. در حالت اول از دکستران و ژلاتین استفاده می‌شود ولی اغلب از آلبومین سرم گاوی (BSA) استفاده می‌کنند. اضافه کردن گلوکز به محیط باعث تأخیر در ایجاد ادم می‌شود. ضمن این که گلوکز برای ایجاد انرژی و سنتز چربی و اسیدهای نوکلییک و پروتئین ضروری است. گلوکز برای تولید اکی‌والانتهای احیاءکننده (NADPH) و نگهداری فرم احیایی آنتی‌اکسیدانت گلوتاتیون نیز بکار می‌رود. در حالت دوم از مایع پرفیوژن با اسمولالیته بالا؛ مانند بافر ونگ Wong buffer؛ با اسمولالیته ۳۲۰osm/kg استفاده می‌کنند که متعاقباً قابلیت زیست (Viability) سلولی را کاهش می‌دهد(۱۲).

یکی از کاربردهای عمده پرفیوژن، مطالعات پاتولوژی روی کبد می‌باشد. از آن جایی که که خود مایع سیستم پرفیوژن به طور نسبی سبب ایجاد واکنش التهابی (Amas Reaction) می‌شود. این ضایعه پاتولوژیک در مواردی که عوامل آزارسان به کبد آسیب وارد می‌کنند، توسعه می‌یابد. بدین‌ترتیب امکان مطالعه هیستو پاتولوژی کبد در مورد اثرات سمی یا پیشگیری از سمیت موادی که ارگان هدف‌شان کبد می‌باشد مانند سمیت کبدی پاراکوات (Papraquat) و نیتروفورانتویین (Nitrofurantoine) از طریق سیستم پرفیوژن میسر می‌شود.

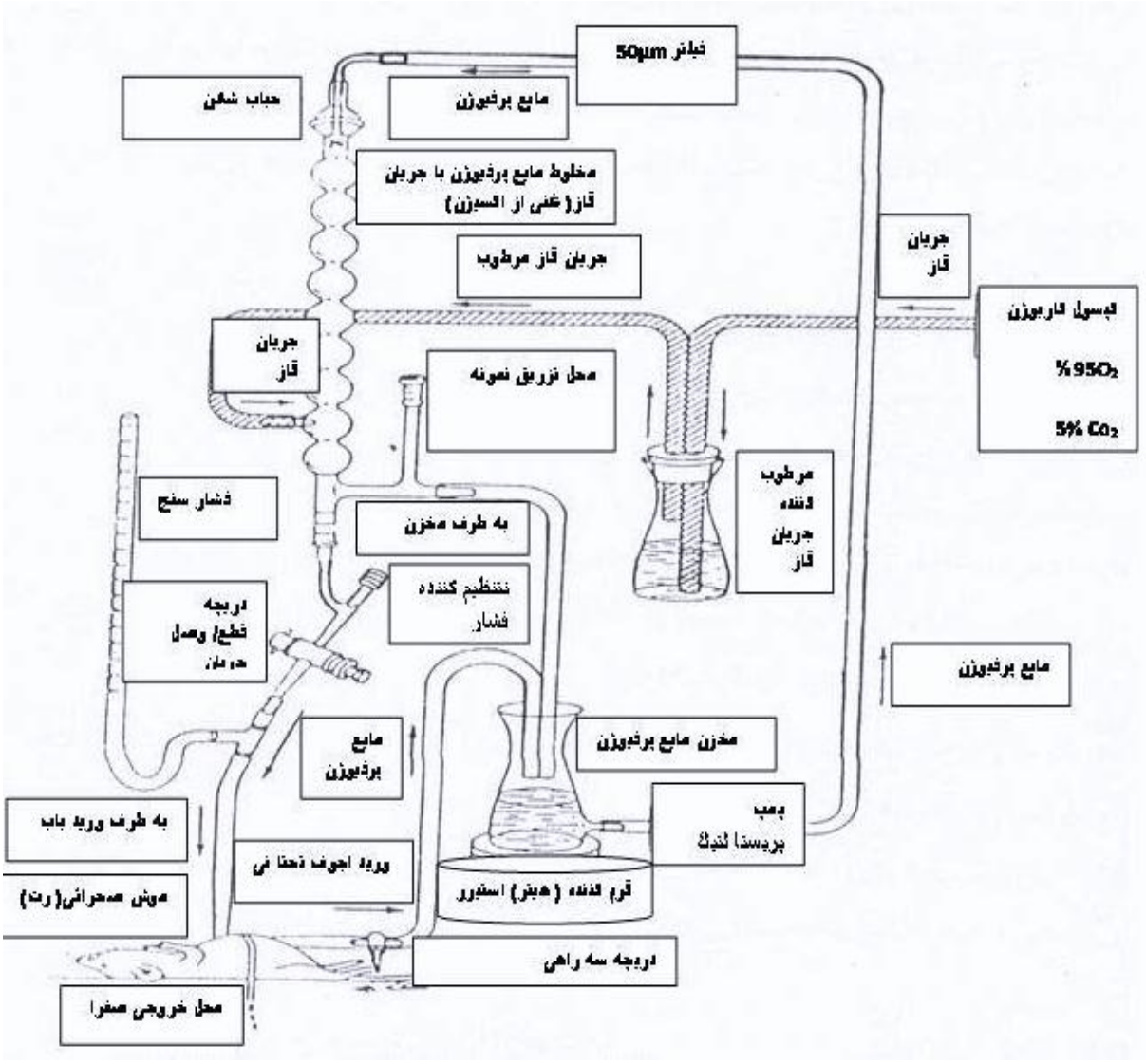
علاوه بر این مایع پرفیوژن به عنوان یک مایع شبه بیولوژیک در مطالعه متابولیسمی عوامل خارجی (Xenobiotics) که

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

بسیاری از این عوامل لیپوفیل هستند و در ارگان هدف کبد تجمع پیدا نموده و در نهایت متابولیزه می‌گردد نیز مفید است(۱۳،۱۴).

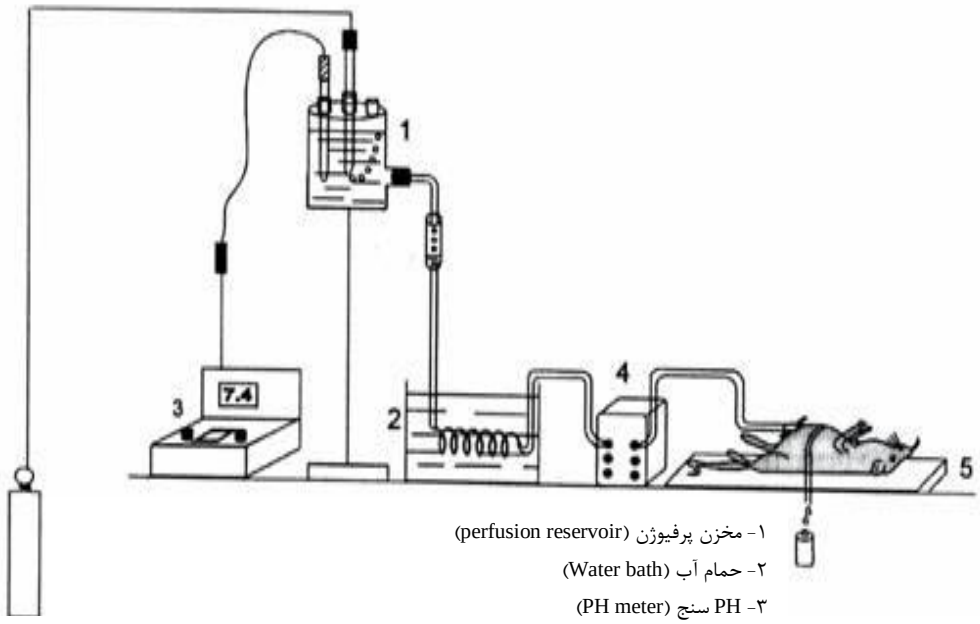
قسمت‌های اصلی سیستم پرفیوژن کبد

انواع مختلفی از سیستم پرفیوژن کبد طراحی شده که در خیلی از موارد به نوع آزمایش و مطالعه بستگی دارد و در مطالعاتی که بر روی جذب و توزیع داروها و مواد خارجی انجام می‌پذیرد از سیستم پرفیوژن یک طرفه (تک مسیری) استفاده می‌کنند که این سیستم به آنها اجازه می‌دهد که تفاوت غلظت ماده مورد نظر را در ورید باب و ورید اجوف تحتانی اندازه بگیرید ولی در مطالعاتی که بر روی جذب و متابولیسم صورت می‌گیرد از سیستم پرفیوژن دو طرفه (چرخشی) استفاده می‌کنند. سیستم پرفیوژن سه مسیری در موارد خاصی استفاده می‌شود. سیستم پرفیوژن کبد از سه قسمت اصلی تشکیل شده است: ۱- پمپ پریستالتیک (Peristaltic) که برای به جریان درآوردن مایع پرفیوژن استفاده می‌شود. ۲- محفظه (مخزن) پرفیوژن: مایع پرفیوژن در آن قرار دارد و مجهز به ترموکوپل و pH متر است ۳- محل نگهداری کبد حیوان (تخت تشریح). در پایین نمای استاندارد سیستم پرفیوژن ملاحظه می‌شود (شکل ۳،۴).



شکل ۳: فرم استاندارد سیستم پرفیوژن کبدی

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]



۱- مخزن پرفیوژن (perfusion reservoir)
۲- حمام آب (Water bath)
۳- PH سنج (PH meter)
۴- پمپ پریستالیتیک (Peristalitic pump)
۵- میز جراحی کنترل شده از لحاظ دما (Temperatue controlled surgery Table)

شکل ۴: فرم اصلاح شده سیستم پرفیوژن کبدی

نمونه‌های شبه بیولوژیک سیستم پرفیوژن: I) مایع پرفیوژ: بعد از اینکه در حفره شکمی موش صحرایی در سطح شکم و جناحین جراحی به صورت تی شکل (T) انجام شد و ساچورها یا سوزن‌های بخیه در ناحیه ورید باب و انتهایی ورید اجوف تحتانی به طور مورب قرار گرفته و آماده کانول گذاری می‌شوند. مایع از طریق کانول ورودی در داخل ورید باب وارد شده و در تمام سلول‌های کبدی پخش می‌گردد. بعد از گذشت حدود ۳۰ دقیقه از زمان پرفیوژن، مایع خروجی از طریق کانول خروجی از ورید اجوف تحتانی جمع‌آوری می‌گردد (شکل ۱). نمونه‌برداری هر ۳۰ دقیقه تکرار می‌شود. بدیهی است برای پایداری و ثبات در روند پرفیوژن یک فاصله زمانی ۴۵-۳۰ دقیقه برای خروج خون و ترشحات بافتی لازم است. یک نمونه زمانی مطلوب است که شفاف بوده و عاری از خون و لخته باشد. حجم هر نمونه‌برداری حدود ۳ میلی‌لیتر است.

برای تفکیک فازها و رسیدن به فاز شفاف و یکنواخت یک فاصله زمانی ۲۴ ساعته وقت صرف می‌شود تا در شرایط دمای یخچال مایع جمع‌آوری شده به تدریج از هم جدا شوند. این تفکیک‌پذیری همچنین در سانتریفوژ یخچال‌دار، در دورهای ۶۰۰۰ نیز انجام می‌شود. بعد از اینکه فاز غیریکنواخت یا غیرشفاف از فاز بالایی و یکنواخت پرفیوژن جدا شدند، از قسمت بالایی ویال‌ها (Supernatant) یک میلی‌لیتر برداشته و برای بررسی پاسخ‌های بیوشیمیایی (تغییرات آنزیمی) مورد استفاده قرار می‌گیرد.

منظور از مطالعات بیوشیمیایی ارزیابی تغییرات پروتیینی مانند گلوتاتیون و آنزیمی مانند ترانس آمینازهای کبدی است که در اثر آزار بافتی تغییرات می یابند(۱۵).

۱) آنزیم‌های سرمی ALT/AST: تعیین فعالیت آنزیم‌های آزاد شده در جریان آسیب کبدی، یکی از مفیدترین روش‌های مطالعه در سمیت کبدی است که در اغلب بیماری‌های کبدی دچار تغییر می‌شوند و جزو تست‌هایی هستند که برای بررسی اعمال کبدی استفاده می‌شوند. تغییرات آنزیم‌های ترانسفراز (ALT ,AST) به عنوان معیار تغییرات بیوشیمیایی به منظور

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

ارزیابی آسیب‌های کبدی ناشی از داروی ایزونیازید (INH) و سمومی مانند افلاتوکسین B1 می‌باشد(۱۶،۱۷).

بر اساس اختصاصی بودن و حساسیت در برابر انواع آسیب کبدی، آنزیم‌های را به دو گروه تقسیم می‌کنند:

الف) آنزیم‌هایی که در سمیت سلولی (آسیب‌های کبدی) حساسیت بیشتری دارند و دارای ۲ زیرگروه هستند:

آنزیم‌های که مکان اصلی آنها کبد است و در آسیب‌ها افزایش فزاینده‌ای دارند مانند آلانین آمینوترانسفراز (ALT:Alanine Amino transferase).

آنزیم‌هایی که اختصاصی نیستند ولی می‌توانند پاسخ یک آسیب خارج از بافت کبد به کبد باشند مانند آسپارتات آمینوترانسفراز (AST: Aspartate Amino transferase).

ب) افزایش فعالیت سرمی این آنزیم‌ها در آسیب کلستاتیک نسبت به آسیب نکروزی، دارای حساسیت بیشتری است مانند آلکالین فسفاتاز(ALP).

آمینوترانسفرازها، سیتوپلاسمی (ALT, AST) و یا میتوکندریایی (ایزوآنزیم میتوکندریایی AST که در صدمات میتوکندری آزاد می‌شود) هستند. AST سیتوپلاسمی در هپاتوسیت‌ها بیشترین فعالیت را دارد به طوری که میزان AST سلولی تقریباً ۷۰۰۰ برابر سطح پلاسما است.

ALT نیز بالاترین میزان فعالیت را در هپاتوسیت‌ها دارد؛ به طوری که سطح ALT سلولی تقریباً ۳۰۰۰ برابر سطح پلاسمایی است. نیمه عمر AST سیتوپلاسمی ۳ ±۱۷ ساعت می‌باشد در حالی که ALT نیمه عمر ۱۱ ± ۴۲ ساعت دارد. ایزوآنزیم AST میتوکندریایی نیمه عمر ۸۷ ساعته دارد.

در اکثر آسیب‌های حاد هپاتوسلولار، در ابتدا AST از ALT بالاتر است که به علت فعالیت بیشتر AST در هپاتوسیت‌ها می‌باشد. ولی در عرض ۲۴ تا ۴۸ ساعت، به خصوص اگر آسیب در حال پیشرفت باشد ALT به علت نیمه عمر طولانی‌تر خود از AST بالاتر می‌رود.

در آسیب مزمن هپاتوسیت‌ها، افزایش ALT شایع‌تر از AST است. با پیشرفت فیبروزها، فعالیت ALT معمولاً کاهش می‌یابد و نسبت AST به ALT به تدریج افزایش می‌یابد به طوری که در هنگام سیروز، اغلب سطح AST بالاتر از ALT می‌باشد.

ALT و ایزوآنزیم سیتوپلاسمی AST (ASTc) عمدتاً در سیتوزول هپاتوسیت یافت می‌شوند. در آسیب حاد هپاتوسلولار، این آنزیم‌ها آزاد شده و داخل سینوزویید می‌شوند و فعالیت AST وALT را در پلاسما افزایش می‌دهند. آسپارتات آمینوترانسفراز میتوکندریایی(ASTm) عمدتاً با آسیب میتوکندری‌ها مشابه آنچه که در اثر مصرف اتانل ایجاد می‌شود، آزاد می‌شود.

نمونه‌ها برای اندازه‌گیری AST و ALT در خون کامل به مدت ۱۲ تا ۲۴ ساعت پایدار هستند. اما بعد از آن زمان به علت آزاد شدن آنزیم‌ها از RBCها، به تدریج افزایش پیدا می‌کنند. AST در سرم و در درجه حرارت یخچال به مدت سه هفته و در صورت منجمد شدن، برای همیشه پایدار می‌باشد. A LT در صورت قرار گرفتن در یخچال، پایداری مشابه نشان می‌دهد اما در صورت انجماد کاهش می‌یابد. این نشان می‌دهد که در بافر معادل ۷/۴ بیشترین پایداری را دارد.

آمینوترانسفرازها انتقال عامل آمین (δ– Amino goup) را از مولکول آسپارتات و مولکول آلانین به عامل کتون گاما (δ–Keto group) مولکول گلوتارات، کاتالیز می‌کنند که منجر به تشکیل اسیداکسالواستیک و اسیدپیرویک می‌گردد.

$$\text{L- Aspartate} + \text{2 – Oxoglutarate} \xrightleftharpoons{\text{GOT}} \text{Oxalacetate} + \text{Glutamat}$$

$$\text{L- Alanine} + \text{2 – Oxoglutarate} \xrightleftharpoons{\text{GPT}} \text{Pyruvate} + \text{Glutamat}$$

اکسال استات حاصله نیز دکربوکسیله شده ایجاد پیروات می‌نماید. پیروات حاصل با ۲ و ۴ دی‌نیتروفنیل هیدرازین، هیدرازون تشکیل می‌دهد که در محیط قلیایی به کمپلکس قهوه‌ای رنگ تبدیل می‌شود. فعالیت هر دو آنزیم با اندازه‌گیری غلظت این رنگ در ۵۰۵ نانومتر با توجه به دستورالعمل کیت مربوطه (زیست شیمی) و منحنی استاندارد محاسبه می‌شود(۲۱-۱۸).

۲) تغییرات پروتئینی: این تغییرات در راس اختلالاتی هستند که در اکثر سمیت‌های کبدی اتفاق می‌افتد و ناشی از

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

تغییرات در اجزای سلولی مانند سیتوکروم، میتوکندری و سیتوزول می‌باشد. در واقع بدون نیاز به وارد شدن در اجزاء سلول، می‌توان تغییرات پروتئینی را به عنوان یک عامل بیوشیمیایی مورد تجزیه و تحلیل قرار داد و شاخص مناسبی برای راهنمایی تغییرات اختلالات جزیی و یا ماکرومولکول‌های محافظتی مانند گلوتاتیون می‌باشد.

همانطور که اطلاع دارید در ابتدا تعیین وزن خشک برای اندازه‌گیری پروتئین‌ها بکار می‌رفت و بعدها برای اندازه‌گیری پروتئین تام از روش Kjeldahl استفاده شد. متعاقب آن واکنش بیوره- لوری ابداع گردید و سپس از روش‌های نورسنجی (محدوده UV و مریی)، رفرکتومتری و روش‌های ایمنواسی استفاده گردید. در روش‌شناسی که یک روش منشعب از روشبیوره است، پروتئین‌ها با یون مس در محیط قلیایی واکنش می‌دهند و کمپلکس مس- پپتید تشکیل می‌شود در فرایند احیاء زمانی که معرف فولین –سیوکالتو افزوده می‌شود، کمپلکس، پروتئین- مس به اسید آمینه تیروزین و تریپتوفان در روند احیا متصل می‌شود که جذب این کمپلکس رنگی در طول موج ۷۵۰- ۶۵۰ نانومتر قابل اندازه‌گیری است و با استفاده از منحنی استاندارد (BSA) غلظت پروتئین نمونه محاسبه می‌گردد. روش‌شناسی برای اندازه‌گیری پروتئین‌ها در محدوده ۱۰-۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مناسب است(۲۵-۲۲).

II) ترشحات صفراوی: در حین جراحی و ثابت کردن ساچورها در ناحیه ورید باب و ورید اجوف تحتانی با دقت هر چه تمامتر مجرای صفراوی را با ساچور مناسب گرفته و کانول ظریفی را در آن قرار می‌دهیم، مایع از طریق ورید باب وارد شده و در تمام سلول‌های کبدی پخش می‌گردد و بخشی از مواد متابولیزه شده از طریق مجرایی صفراوی در کیسه صفرا تجمع می‌یابند که نمونه‌های بسیار باارزش برای تجسس و ردیابی ترکیباتی اوپیوییدی مانند مورفین است. تغییر سطح گلوتاتیون (GSH) نیز در ترشحات صفراوی قابل شناسایی است. گلوتاتیون تری‌پپتیدی حاوی گروه‌های سولفیدریلی است که با مولکول‌های الکتروفیل واکنش می‌دهد. ترکیبات الکتروفیل به واسطه اتصال با گلوتاتیون از واکنش با پروتئین و اسیدهای نوکلییک باز داشته می‌شوند و لذا گلوتاتیون نقش مهمی در سمیت‌زدایی ایفا می‌کند. مزدوج شدن مواد شیمیایی با گلوتاتیون توسط یک خانواده بزرگ از ایزو آنزیم‌ها، متشکل از پنج خانواده ژنی به نام گلوتاتیون ترانسفراز کاتالیز می‌شود. گلوتاتیون ترانسفرازهای سیتوپلاسمیک انسان با توجه به شباهت ساختمانی به کلاس‌های مو، پای و تتا (δ,ρ and θ) تقسیم می‌شوند. برای اندازه‌گیری گلوتاتیون از روش Kuo and HooK استفاده می‌شود اساس این روش مبتنی بر واکنش بین معرف ۲ و ۲ دی نیترو – ۵ و ۵ دی متیل بنزوییک اسید(DTNB) و گلوتاتیون در محیط قلیایی می‌باشد که تولید رنگ زرد ۵ تیو- ۲ – نیترو بنزوات می‌کند که جذب آن در طول موج ۴۱۲ نانومتر قابل اندازه‌گیری است(۲۶).

III) مطالعات هیستوپاتولوژی و تهیه نمونه بافتی: در بیماری‌های کبدی، هپاتوسیت‌ها و بعضی از سلول‌های کوپفر دچار تغییرات می‌شوند و اغلب این آسیب‌ها در منطقه ۳ (ناحیه از لب کبد که بیشترین بیوترانسفورماسیون در آن اتفاق می‌افتد) بروز می‌نماید که ناشی از حضور غلظت‌های بالای آنزیم‌های سیتوکروم P450 و غلظت کم گلوتاتیون در ناحیه می‌باشد.

دژنرسانس یا تحلیل رفتگی وقتی به طور کامل آشکار می‌شود که همراه با واکنش‌های التهابی سینوزوییدها و هموراژی باشد. در این حالت تعداد زیادی گلبول قرمز در بافت مشاهده می‌شود و در مواردی هم که عامل آزاررسان از بین نرفته باشد، آسیب‌های وارده غیرقابل جبران و برگشت‌ناپذیر شده و سلول نکروزه می‌گردد.

از یافته‌های دیگر پاتولوژی گسترش منطقه فیبروزه و نکروزه است که به صورت توأم دیده می‌شود. اقدامات درمانی یا احیاء گلوتاتیون می‌تواند منطقه فیبروزه را محدود کند ولی افزایش دوزهای سمی و یا افزایش مدت زمان پرفیوژن موجب توسعه منطقه نکروزه می‌شود که غیرقابل برگشت است.

بعد از پرفیوژن، بافت مورد نظر از حیوان جدا و به قطعات مختلف (معمولاً ۳ میلی‌متر) تقسیم می‌گردد و بلافاصله در ۱۵ میلی‌لیتر از فرمالین ۱۰٪ در شیشه‌های مخصوص قرار می‌گیرد.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

روی هر شیشه با برچسبی مخصوص مشخص می‌شود (روی برچسب نام نسج، تاریخ نسج‌برداری و نوع حیوان نوشته می‌شود). نمونه‌ها قبل از شروع فرآیند رنگ‌آمیزی (حداکثر به مدت یک هفته) در فرمالین نگهداری می‌شود. در آزمایشگاه پاتولوژی، بعد از تهیه برش‌های کوچکتر و آماده‌سازی نمونه و رنگ‌آمیزی، ریزبینی نمونه‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرد. هدف از تهیه این نمونه آن است که شاخص‌های پاتولوژی مانند نکروز، فیبروز، سلولاریته، ادم و ... در بررسی ریزبینی تجزیه و تحلیل گردند(۲۷،۲۸).

IV) نمونه هموژینه، بافت پرفیوژن شده: بعد از پایان پرفیوژن بافتی، نمونه به اندازه حدود ۱۰۰ میلی‌گرم از نسج در معرض پرفیوژن را برداشت نموده و به یک هموژنایزر دستی یا الکتریکی منتقل می‌شود و بعد از اضافه کردن یک میلی‌لیتر نرمال سالین یا بافر با pH=۷/۴ به عنوان حامل به آن اضافه می‌شود و تا حصول یک محلول یکنواخت و پراکنده هم زدن برای ارزیابی گلوتاتیون ادامه می‌یابد(۲۹،۳۰).

نتیجه‌گیری

با توجه به نوع ارزیابی نمونه‌ها که ممکن است بیوشیمیایی (مطالعه تغییرات آنزیم‌های ALT,AST و سنجش سطح GSH که از مایع پرفیوژ شده، بافت هموژینه شده و ترشحات صفرا به دست می‌آید) و یا پاتولوژی (ریزبینی نمونه‌های حاصل از بافت پرفیوژ شده) باشد. این قابلیت‌ها در نوع ارزیابی و تنوع نمونه‌گیری در پرفیوژن کبدی، آن در مطالعات سم‌شناسی ارزشمند نموده است.

References:

1- Pohjanvirta R, Latinen JT, Vakuri O, Linden J, Kokkola T, Unkola M, et al. ***Mechanism by which 2,3,7.8 – tetra cholor–dibenzo–p-dioxin reduce circulation melatonin Level in the rat.*** Toxicol 1996; 7: 85-97.

2- Samuels AR, Theilmann L, Stollman YR, Wolkoff AW, Bhargava MM. ***Uptake metabolism and secretion of 3 – methyl – N, N- dimethyl – 4 – aminoazobenzene in isolated perfused rat liver.*** Drug Metab Dispos 1987; 15(2): 184-88.

3- Wolkoff AW, Johansen KL, Goeser T. ***The isolated perfused rat Liver, preparation and application.*** Anal Biochem 1987; 167(1): 1-14.

4- Cheung K, Hickman PE, Potter JM, Walker NI, Jericho M, Haslam R, et al. ***An optimized model for rat perfusion studies.*** J Surg Res 1987; 66(1): 81-9.

5- Triodl H, Spitzer WO, McPeek B, Mulder DS, Mc Kneally MF, Wechsler MF, et al. ***Principles and practice of research: strategies for surgical investigation***. New York: Springer-Verlag; 1991.p. 385.

6- Strubelt O, Kremer J, Tilse A, Keogh R, Pentz R, Younes M. ***Comparative studies of the toxicity of mercury, cadmium and copper toward the isolated perfused rat liver.*** J Toxicol Environ Health 1996; 47(3): 267-83.

7- Toxopeus C, Frazier JM. ***The isolated perfused rat liver and its use in the study of chemical kinetics: quality and performance parameters.*** Virginia; Air Force Technical Report 1999. No 22060-6218.p. 1998-0134.

8- Ghazi-Khansari M, Karami M, Rezayat M, Abdollahi M, Minaei B, Sabzevari O. ***The protective effects of antioxidants and propranolol on hepatotoxicity of TCDD during isolated rat liver perfusion.*** Int J Pharm 2005; 1(4): 336-41.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

9- Temellini A, Gastiglioni M, Giuliani L, Mussi A, Giulianotti PC, Pietrabissa A, et al. ***Glutathione conjugation with 1- chloro- 2,4- dinitrobenzene(CDNB): interindividual variability in human liver, lung, kidney and intestine.*** Int J Clin Pharmacol Ther 1995; 33(9): 498-503.

10- Vickers AEM. ***Experimental in vitro models to evaluate hepatotoxicity.*** In: Castell JV, Gomez-Lechon MJ, editors. In Vitro Methods in Pharmaceutical Res San Diego: Academic Press; 1997.p. 103-27.

11- Rosini S, Benetti D, Kvetina J. ***The function capacity of the isolated perfused rat liver in relation to the colloidal osmotic of the perfusion medium.*** Farmaco Pract 1976; 31(12): 612-25.

12- Bell R, Shiel AG, Dolan P, Mears DC, Woodman K. ***The evaluation of the isolated perfused liver as a model for the assessment of liver preservation.*** Aust NZJ Surg 1993; 63(1): 44-52.

13- Delmas-Beauvieux MC, Gallis JL, Rousse N, Clerc M, Canioni P. ***Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance of isolated rat liver during hypothermic ischemia and subsequent normothermic perfusion.*** J Hepatol 1992; 15(1-2): 192-201.

14- Karami M, Shahabi-Majd N, Saeidnia S,Omrani N. ***The hepatoxicity of aqueous methanol extract and fractionated –methanol extract of phytolacca Americana inmale rat using perfusion Mctheod.*** J Shahrekord Univ Med Sci 2007; 9(1): 1-9. [Persian]

15- Bermeyer HW, Bernt E. ***Practical clinical biochemistry:*** Varley H, Gowenlok AH, and Bell M. (eds.) London: William Heinemann Medical books Ltd; 1980.p. 741-42.

16- Groneberg DA, Grosse-Siestrup C, Fischer A. ***in vitro models to study hepatotoxicity.*** Toxicol Pathol 2002; 30(3): 394-99.

17- Castell JV, Gomez-Lechon MJ, Ponsoda X, Bort R. ***In vitro investigation of the molecular mechanisms of hepatotoxicity***. In: Castell JV, Gomez-Lechon MJ, editors. In Vitro Methods in Pharmaceutical Research**.** San Diego: Academic Press; 1997.p. 375-410.

18- Reitman S, Frankel S. ***A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamine pyruvic.*** Am J Clin Pathol 1957; 28(1): 53-63.

19- Kew MC. ***Serum aminotransferase concentration as evidence of hepatocellular damage.*** Lancet 2000; 355(9204): 591-92.

20- Dickson RC, Lauwers GY, Rosen CB, Cantwell R, Nelson DR, Lau JY. ***The utility of noninvasive serologic markers in the management of early allograft rejection in liver transplantation recipients.*** Transplantation 1999; 68(2): 247-53.

21- Goldestein SW, Jenkins GL, Thompson MR. ***A chemical and pharmacological study Phytolacca americana.*** J Am Pharm Assoc 1973; 26(4): 306-12.

22- Theodorus PM, Akerboom S. ***Glutathione in biological samples.*** Method in Enzymol 1981; 77: 373-83.

23- Peters T, Ejamonte GT, Doumas BT. ***Protein(total protein) in serum, urine, and cerebrospinal fluid.*** Clinical

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

Chemistry 1982; 9: 583-86.

24- Ruderman NB, Houghton CR, Hems R. ***Evaluation of the isolated perfused rat hindquarter for the study of muscle metabolism.*** Biochem J 1971; 124 (3): 639-51.

25- Suzuki T, Takahashi T, Yamasaki A, Fujiwara T, Hirakawa M, Akagi R. ***Tissue-specific gene expression of heme oxygenase-1 and non-specific delta-aminolevulinate synthase in a rat model of septic multiple organ dysfunction syndrome.*** Biochem Pharmacol 2000; 60(2): 275-83.

26- Kuo CH, Hook JB. ***Depletion of renal glutathione content and nephrotoxicity of cephaloridine in rabbits, rats and mice.*** Toxicol Appl Pharmacol 1982; 63(2): 292-302.

27- Karami M, Ghazi-Khansari M, Rezayat M, Minaei B, Abdollahi M, Sabzevari O. ***Histopathological study of TCDD by isolated rat liver perfusion system.*** Med J IRI 2001; 15(1): 55-60.

28- Karami M, Saeidnia S, Naghshvar F. ***The hepatoprotective effects of corn silk against dose-induced injury of ecstasy (MDMA) using isolated rat liver perfusion system*** . Iran J Toxicol 2013;7(20): 815-22.

29- Karami M, Naghshvar F, Saeidnia S, Omrani N. ***The hepatoxicity of methanol extract and fractionated – methanol extract of Phytolacca Americana growing in Iran By Isolated Rat Liver Perfusion System.*** Afr J Biotechnol 2010; 9(8): 1211-17.

30- Karami M, Saeidnia S, Nosrti A. ***Study of the hepatoprotective activity of methanolic extract of feijoa sellowiana fruits against MDMA using the isolated rat liver perfusion system.*** Iran J Pharm Res 2013; 12(1): 85-91.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]

REVIEW ARTICLE

A Review of Liver Perfusion Method in Toxicology Studies

Karami M(PhD)

Department of Toxicopharmacology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

Received: 14 Jun 2013 ***Accepted:*** 13 Feb 2014

Abstract

Introduction: The isolated perfused rat liver is an accepted method in toxicology studies. The isolated perfused rat liver (IPRL) is a useful experimental system for evaluating hepatic function without the influence of other organ systems, undefined plasma constituents, and neural-hormonal effects.

Methods: The untreated male rats (180-220gr body weight) were anesthetised with ether and then surgery with proper method. The abdomen was opened through a midline and one transversal incision and the bile duct was cannulated. Heparin sodium solution (0.5 ml; 500 U/ml in 0.9% NaCl) was injected via the abdominal vena cava to prevent blood clotting. The liver inferior venacava was cannulated with PE-10 tubing and secured. The portal vein was immediately cannulated with an 23gr catheter which was secured and then liver was perfused in situ by Krebs- Henseleit buffer (pH 7.4; saturated with 95% O_2 and 5% CO_2; 37°C) at a flow rate of 20 ml/min for 3hr. Temperature, perfusion pressure, flow rate and perfusion fluid pH were closely monitored during the perfusion.

Results: Transferase enzymes (ALT, AST) alterations can be widely used as a measure of biochemical alterations in order to assess liver damage due to use of drugs such as isoniazid (INH) and animal and plant toxins. Accumulated material in gallbladder are valuable samples to assess the level of Glutathione (GSH). Sections of perfused liver tissue can also be effectively analyzed for pathological aspects such as necrosis, fibrosis, cellularity.

Conclusion: The isolated perfused rat liver (IPRL) is a useful and Sutible experimental system for evaluating hepatic function. In this system, the effects of adjacent organs, on the liver is minimized

Keywords: Isolated Perfused Rat Liver - Krebs- Henseleit Glutathione Reductase, Serum Enzymes (ALT, AST)

This paper should be cited as:
Karami M. ***A review of liver perfusion method in toxicology studies***. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2014; 22(2): 1140-52.

****Corresponding author: Tel: +98 1513543081, Email: toxkarami@gmail.com***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-04-25]