مقاله پژوهشی

جداسازی و کشت اولیه هپاتوسیت های کبد رت با استفاده از آنزیم اکتینیدین میوه کیوی

زینب شیروانی فارسانی * ، کامران منصوری ** ، دکتر علی بیدمشکی پور *** ، دکتر علی مصطفایی ****

دریافت : ۸۵/۹/۱۰ ، پذیرش : ۸۶/۳/۲۱

چکیده:

مقدمه و هدف: برای تجزیه ماتریکس‌خارج‌سلولی، جداسازی و کشت‌اولیه سلول‌ها، از آنزیم های پروتئولیتیک، بخصوص کلاژنـاز برای هضم بافت استفاده می شود. یافتن پروتئاز جایگزین کلاژنازهای باکتریایی یا جانوری در منابع گیاهی که راحتر و کم هزینه تر تخلیص گردد، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در مطالعه حاضر از آنزیم اکتینیدین که به وفور در میوه کیوی یافت می شـود، برای جداسازی و کشت هپاتوسیت‌های کبد موش صحرایی استفاده شد.

روش کار: در این مطالعه تجربی آنزیم اکتینیدین پس از تخلیص، در غلظتهای مختلف با روش پرفیوژن یک و دومرحلـه‌ای بـرای جداسازی هپاتوسیت ها از کبد موش صحرایی بکار برده شد. هپاتوسیت های جدا شده در پلیت‌های کلاژن‌دار در محـیط کـشت ویلیامز- ای کشت داده شدند. درصد زنده بودن سلول های جداشده با استفاده از آزمون تریپان‌بلو و مورفولوژی سلول ها در مراحل کشت پس از رنگ آمیزی با روش پاپانیکولا بررسی شد.

نتایج: اکتینیدین با غلظت ۰/٤ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در روش پرفیوژن دومرحله‌ای توانست بطـور مناسـب هپاتوسـیت هـا را از کبد موش جدا نماید. درصد سلول های جدا شده ۹۵-۹۰ درصد تخمین زده شد. سلول ها پـس از کـشت درپلیـت هـای حـاوی کلاژن مرفولوژی هپاتوسیت را به وضوح نشان دادند.

نتیجه نهایی: این نتایج نشان داد که اکتینیدین پروتئاز مناسبی برای جداسازی هپاتوسیت ها از کبد است. بعلاوه، تخلیص اکتینیـدین در مقایسه با کلاژنازها ساده تر و کم هزینه تر است.

کلید واژه ها : اکتینیدین / کلاژناز / هپاتوسیت

مقدمه :

کبد جایگاه مهمی در زدودن سموم طبیعی و صناعی از خـون دارد و انـواعی از پـروتئین‌هـای ناقـل همچـون لیپـوپروتئین، آلبـومین و ترانـسفرین را مـی سـازد (۱،۲). بسیاری از فاکتورهای مولکولی و بیوشیمیایی کنترل‌کننده بیـان و تنظـیم سـاختار و عملکـرد هپاتوسـیت‌هـا هنـوز ناشناخته باقی مانـده اسـت. بـه همـین علـت، جداسـازی هپاتوسـیت‌هـا از کبـد و کـشت اولیـه ایـن سـلول هـا در آزمایشگاه برای انجـام مطالعـات در زمینـه گـرفتن دارو و متابولیسم آن، القای سیتوکروم P450، واکنش‌های دارویی مؤثر درمتابولیسم کبدی و هپاتوتوکسیسیتی ضرورت دارد (۳،۴). بافت کبد مانند دیگر بافـت هـا شـامل سـلول‌هـا و ماتریکس خارج‌سلولی متشکل از انـواعی از پـروتئین‌هـای رشته‌ای (مانندکلاژن و الاستین) و غیررشته ای است (۵). یکی از فراوان‌ترین پـروتئین‌هـای فـضای خـارج سـلولی، کلاژن است که انواع مختلفی دارد و در اندام‌های نرم مانند

* کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه رازی کرمانشاه

** کارشناسی ارشد هماتولوژی مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

*** استادیار گروه زیست شناسی دانشکده علوم دانشگاه رازی کرمانشاه

**** دانشیار ایمنولوژی مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه(amostafaie@kums.ac.ir)

کبد، شبکه رشته‌ای ظریفی تشکیل می دهد. همه انواع کلاژن ساختمان کلی مشابهی متشکل از یک مارپیچ سه تایی دارند (پروکلاژن) که از سه زنجیره آلفا به طول ۱۰۰۰ اسید آمینه با توالی تکراری Gly-X-Y ساخته شده است (X اغلب پرولین و Y اغلب هیدروکسی پرولین است) (۵،۶). مولکول کلاژن به اغلب پروتئازها غیر از کلاژنازها مقاوم است (۵،۷). به همین علت از کلاژنازها در جداسازی سلول‌های مختلف از بافت های جامد همچون کبد استفاده می‌شود.

اکتینیدین یک سیستئین پروتئاز است که در میوه کیوی به وفور وجوددارد. این پروتئاز از نظر خصوصیات کلی مشابه سایر سیستئین پروتئازهای گیاهی (همچون پاپائین) وسیستئین پروتئازهای حیوانی (همچون کاتپسین‌ها) است (۱۰-۸). پیش ساز آنزیم اکتینیدین در سلول(پری پروآنزیم) دارای ۳۰۲ اسید آمینه و وزنی معادل ۳۲۷۴۵ دالتون و شکل فعال آنزیم دارای ۲۲۰ اسید آمینه و وزنی معادل ۲۳۵۰۸ دالتون است (۱۱،۱۲). اکتینیدین یک پروتئاز مناسب در ترد کردن گوشت است و در هضم مواد پروتئینی در بیماران دارای مشکل گوارشی قابل استفاده می باشد. در چند مطالعه اثر کلاژنازی اکتینیدین مورد بررسی قرار گرفته است (۱۵-۱۳). بطور کلی نتایج این مطالعات حاکی از آن است که اکتینیدین قادر به هیدرولیز مولکول طبیعی کلاژن نیست ولی آتلوکلاژن (کلاژن پس از هضم جزیی توسط پپسین) را هیدرولیز می کند (۱۵).

برخلاف نتایج این مطالعات، مصطفایی و همکاران نشان دادند که اکتینیدین در شرایط دارای pH خنثی یا قلیایی ضعیف قادر به هضم کلاژن نوع یک است (۱۶). براین اساس و با توجه به قابلیت اکتینیدین در ترد کردن گوشت، اثر این آنزیم درغلظت های مختلف در مقایسه با کلاژناز برای جداسازی هپاتوسیت ها از کبد رت و کشت این سلول ها مورد مطالعه قرار گرفت.

روش کار:

در این مطالعه تجربی آنزیم اکتینیدین میوه کیوی طبق روش استفاده شده در مطالعه مصطفایی و همکاران طی مراحل رسوب دهی با سولفات آمونیوم و کروماتوگرافی تعویض یون تخلیص شد (۱۷). موش بزرگ (رت) از نژاد ویستار (انستیتو رازی ایران)، محیط کشت ویلیامز- ای، کلاژناز (Sigma-Aldrich)، جنتامایسین (۵۰ µg/ml) ، کلاژن نوع یک (Roche)، آمفوتریسین B (۲۵۰ µg/L)، سرم جنین گاو FCS، هپارین(۲۵ U/ml)، محلول ۰/۴ درصد تریپان بلو(Gibco)، ال-گلوتامین (۲ mM)، بافربیکربنات هنسلیت - کربس (KHB) تحت عنوان بافر شمار ۱ (حاوی ۰/۳۵۱۶ گرم KCl ، ۱/۶۸ گرم $NaHCO_3$، ۰/۱۹۱۶ گرم $MgCl_2$، ۰/۱۳۵۷ گرم NaH_2PO_4، ۰/۱۳۶ گرم Na_2SO_4، ۳۷۶/ ۵ گرم NaCl، ۰/۱۱۰۸ گرم $CaCl_2$، ۰/۹۵۱۲ گرم گلوکز)، بافرKHB بدون یون های کلسیم و سولفات (بافر ۲)، دستگاه پرفیوژن که در آزمایشگاه ساخته شد و شامل اجزای زیر بود:

۱- بن ماری: دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد را برای بافرها، محلول آنزیم و تمام قسمت های دستگاه تأمین می کند. بن ماری به پمپ ۱ و ظرف دوجداره وصل می‌شود.

۲- ظرف دوجداره: جدار بیرونی آن (ژاکت)، حاوی آب ۳۷ درجه است که توسط پمپ ۱ از بن ماری دریافت می شود. قسمت داخلی این ظرف، محل قرار گرفتن بافرها و یا محلول آنزیم است و از پایین به پمپ ۲ متصل است.

۳- پمپ ۱: از یک طرف آب ۳۷ درجه را از بن ماری به درون ژاکت ظرف دوجداره پمپ می‌کند و از طرف دیگر، آب درون ژاکت را به بن ماری بر می‌گرداند و یک چرخه آب بین بن ماری و ظرف دو جداره ایجاد می نماید.

۴- پمپ ۲: از یک طرف به جدار داخلی ظرف و از طرف دیگر توسط سوزن پروانه ای به کبد متصل است و بافر و یا محلول آنزیم را به درون کبد پمپ می کند.

آماده سازی دستگاه پرفیوژن :

۱- آب مقطر استریل درون محفظه بن ماری ریخته و دمای آن روی ۳۷ درجه سانتی گراد تنظیم شد.

۲- پس از رسیدن دمای آب به ۳۷ درجه سانتیگراد، پمپ ۱ روشن شد تا آب ۳۷ درجه وارد ژاکت ظرف دو جداره شود و چرخه آب آغاز گردد.

۳- ۱۰-۵ دقیقه پس از روشن کردن پمپ ۱، ۳۰ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد درون بخش داخلی ظرف ریخته شد.

۴- پمپ ۲ روشن شد و الکل خروجی جمع آوری شد.

۵- مراحل۳و۴ با۳۰ میلی لیتر آب مقطر استریل تکرار شد.

۶- پس از خشک شدن اجزای دستگاه، بافر KHB بدون کلسیم و سولفات (بافر ۲) درون بخش داخلی ظرف ریخته شد.

جداسازی و کشت اولیه هپاتوسیت های کبدی

۱- یک پنبه آغشته به کلروفرم درون یـک محفظـه بـسته قرار گرفت. رت در این محفظه قـرار داده شـد تـا بیهـوش شود. ۲۰ میکرولیتر هپارین به درون سیاهرگ رانی حیوان تزریق شد.

۲- زیر هود بیولوژی و با وسایل استریل، شـکم حیـوان تـا زیر گردن باز شـد و وریـد اجـوف تحتـانی در بـالای کبـد توسط یک پنس گیره دار بسته شد.

۳- روده‌ها به سمت چپ بدن حیوان و کبد به سـمت بـالا کنار زده شد تا سیاهرگ پورتال به وضوح دیده شود.

۴- یک سوزن پروانه ای G23 (MEHECO) که از قبل بـه دستگاه پرفیوزن متصل شده، بـه درون سـیاهرگ پورتـال فرو برده شد و سوزن در محل مربوطه با یک پنس گیره‌دار محکم گردید.

۵- دستگاه روشن شد و بافر۲ باسـرعت تزریـق ۱۰ میلـی لیتر در هر دقیقه تنظیم شد. ۲ -۱ دقیقـه پـس از شـروع تزریق، یکی از شاخه‌های رگ پورتال قطع شد

۶- تزریق بافرتا سفیدشـدن کبـد (۱۵-۱۰ دقیقـه) ادامـه یافت. سپس محلول اکتینیدین تخلـیص شـده یـا کلاژنـاز جایگزین بافر ۲ شد. غلظت آنزیم در آزمون های جداگانـه شامل ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ یا ۱ میلی گـرم در میلـی لیتـر وسرعت تزریق آن معادل ۷ میلی لیتر دردقیقه برای مدت ۱۵ دقیقه بود.

۷- کبد به طـور کامـل از بـدن حیـوان جـدا شـد و درون ظرف حاوی ۲۰ میلی لیتر محلول آنزیم (اکتینیدین یـــا کلاژنـاز بـا غلظـت هـای ذکـر شـده در مرحلـه ۶) قـرار گرفت.

۸- ظرف حاوی کبد، درون انکوبـاتور شـیکردار بـه مـدت ۳۰-۲۰ دقیقه با سرعت بالا در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد تکان داده شد.

۹- مخلوط سلولی حاصله از دو لایه گاز استریل عبور داده شد. تعلیق سلولی بدست آمده در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب سلولی درون بـافر ۲ به تعلیق در آمد. سلول ها دو بار با بـافر ۲ شـسته شـده و بعد از آخرین سانتریفیوژ، در ۵ میلی لیتـر محـیط کـشت ویلیامز-ای حاوی ۱۰٪ FCS به تعلیق درآمدند.

۱۰- سلولهای جدا شده به یک پلیت (قطر ۶۰ میلی متر ، NUNC) کلاژن دار منتقل گردیـد. پلیـت در محـیط ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵٪ CO_2 و ۹۵٪ O_2 انکوبه شد.

۱۱- ۲۴ سـاعت بعـد از کـشت سـلول هـای هپاتوسـیت، محیط کشت تعویض شد. مورفولوژی سـلول هـا در تمـام مراحل کشت با میکروسکوپ معکوس بررسی شد.

تعیین تعداد و درصد بقای هپاتوسیت‌های جـدا شـده : بـرای شمارش تعداد هپاتوسیت‌های جدا شده به وسـیله آنـزیم، یک قطره از سوسپانسیون سـلولی روی لام نئوبـار ریختـه شد و لامل روی آن قرار گرفت. تعداد سلول‌ها در ۴ خانـه بـزرگ کنـاری شـمارش شـد. در نهایـت عـدد حاصـل از شمارش در ضریب رقت سوسپانسیون سـلولی و عـدد ۱۰ ضرب شد. برای تعیین درصد بقای هپاتوسـیت‌هـای جـدا شده، ۲۵۰ میکرولیتر از تعلیق سـلولی بـا ۳ میلـی لیتـر بافر فسفات نمکی (PBS) مخلوط شد و در ۳۰۰۰ دور بـه مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ گردید .شستشو با PBS ۳-۲ بار انجام شد. پـس از آخـرین سـانتریفیوژ، مـایع رویـی دور ریخته شد و به رسـوب بـاقی مانـده، ۳ میلـی لیتـر PBS اضافه گردید و با پیپتاژ سلول ها به تعلیق درآمدنـد. یـک قطره از این سوسپانسیون با یک قطره از تریپان بلو ۰/۴ ٪ مخلوط شـد. قطـره ای از تعلیـق حاصـله روی لام قـرار گرفت. تعداد کل سلول هـا و سـلول‌هـای رنـگ شـده بـا تریپان بلو شمارش گردید. سپس از فرمول زیر درصد بقای سلول ها بدست آمد:

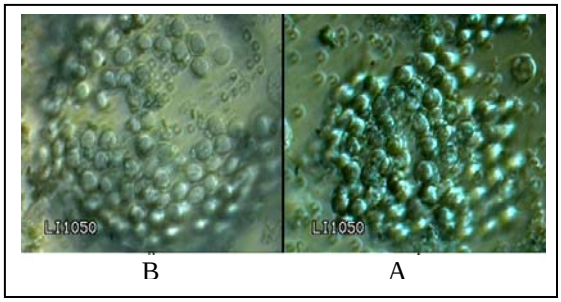
۱۰۰× تعداد کل سلول ها / تعداد سلولهای رنگ نگرفته = درصد بقاء

رنگ آمیزی هپاتوسیتها باروش پاپانیکولا : ابتدا هپاتوسیتهای چسبیده به کف پلیت بـا پیپتـاژ از کـف جـدا شـده و بـه صورت تعلیق درآمدند. چند قطـره از ایـن تعلیـق روی لام ریخته شد و با متانول به مدت۱ ساعت در دمای آزمایشگاه فیکس شد. برای رنگ آمیـزی بـا روش پاپـانیکلا، مراحـل متعدد تثبیت و رنـگ آمیـزی بـا هماتوکـسیلین و ائـوزین صورت گرفت سپس لام ها زیر میکروسـکوپ نـوری مـورد بررسی قرار گرفتند(۱۸).

نتایج :

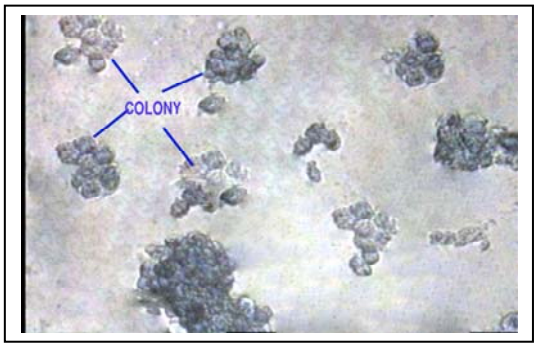
در این مطالعه هپاتوسیت‌های کبد توسط اکتینیـدین در مقایسه با کلاژناز در غلظت های مختلف بـا روش هـای مکانیکی، پرفیوژن یک مرحله ای و پرفیـوژن دومرحلـه‌ای جدا شدند. در روش‌های خردکـردن مکـانیکی و پرفیـوژن یک مرحله‌ای همراه بـا هپاتوسـیت‌هـای جداشـده، تعـداد زیادی گلبول قرمز نیز جدا شـد و تعـداد هپاتوسـیت‌هـای جدا شده کم بود. برای حل این مشکلات، دستگاه پرفیوژن در آزمایشگاه طراحی گردد. در روش پرفیوژن دومرحله ای

آلودگی هپاتوسیت های جدا شده با گلبول قرمز بسیار کم بود، به طوری که پس از سه بار شستشو و سانتریفیوژ، گلبول های قرمز کمی که با هپاتوسیت ها استخراج شده بودند، از محیط عمل خارج شدند. در این روش قبل از تزریق آنزیم، کبد در حالی که به دستگاه پرفیوژن وصل بود از بدن موش جدا شد و آویزان نگه داشته شد و در هنگام پرفیوژن آنزیم، سوسپانسیون خروجی از کبد در ظرف استریل جمع آوری گردید. سپس این سوسپانسیون از گاز استریل عبور داده شد و سانتریفیوژگردید، اما به دلیل این که این مراحل نتیجه لازم را نداشت با مراحل ۸-۷ گفته شده در قسمت مواد و روش ها جایگزین شد. در این مطالعه، غلظت های مختلف آنزیم اکتینیدین (۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در مقایسه با کلاژناز برای جداسازی هپاتوسیت‌ها استفاده شد. نتایج تعداد سلول بدست آمده و درصد بقا نشان داد که غلظت ۰/۴ میلی گرم در میلی لیتر این آنزیم در شرایط فوق، غلظت بهینه جهت جداسازی هپاتوسیت‌های زنده و سالم از کبد رت و مشابه نتایج کلاژناز در غلظت۰/۴-۰/۲ میلی گرم در میلی لیتر است. هپاتوسیت‌های جدا شده حاصل از پرفیوژن دومرحله‌ای آنزیم اکتینیدین(با غلظت ۰/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در پلیت‌های حاوی کلاژن کشت داده شدند. این سلولها، کروی بوده و سیتوپلاسم شفاف و سالم داشتند. هپاتوسیت‌ها در ابتدا گرد، به هم چسبیده و توده ای شکل بودند و هسته و شش ضلعی بودن آنها مشخص نبود (شکل ۱).



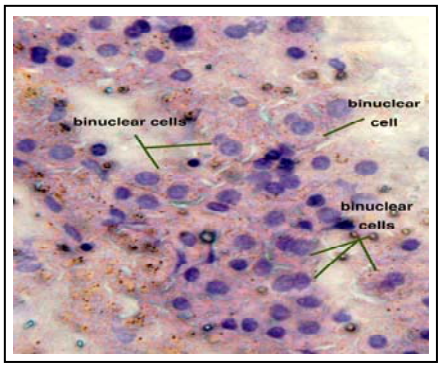
شکل ۱: مورفولوژی هپاتوسیت های جداشده توسط آنزیم اکتینیدین(A) و کلاژناز (B) بلافاصله پس از جداسازی (میکروسکوپ معکوس با بزرگنمایی ۴۰۰)

۲۴ ساعت پس از جداسازی، تعداد کمی از این سلول ها از حالت توده ای به حالت منفرد درآمده و و مورفولوژی آنها از حالت گرد به حالت شش ضلعی تغییر کرد و به طور ضعیف به کف پلیت متصل شدند (شکل ۲).



شکل ۲: مورفولوژی هپاتوسیت های جدا شده توسط آنزیم اکتینیدین بعد از ۲۴ ساعت (میکروسکوپ معکوس با بزرگنمایی ۱۰۰).

۴۸ ساعت پس از جداسازی، سلول ها به صورت شش ضلعی درآمدند و محکم به کف پلیت کلاژن دار چسبیدند. مشخصه بارز هپاتوسیت ها در این مرحله، داشتن یک یا دو هسته بزرگ و گرد است که پس از رنگ آمیزی سلول با روش پاپانیکولا، کاملا" مشخص بودند (شکل ۳).



شکل ۳: مورفولوژی هپاتوسیت های جدا شده با آنزیم اکتینیدین ۴۸ ساعت پس از جداسازی (میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۲۰۰).

این سلول ها در محیط کشت ویلیامز- ای حاوی ۱۰ ٪ FCS بدون افزودن مواد دیگر مانند هورمون ها و فاکتورهای رشد، ۵-۴ روز زنده ماندند و برای کشت طولانی تر نیازمند فاکتورهای رشد بودند.

نتایج حاصل از شمارش و تعیین درصد بقای هپاتوسیت های جدا شده از کبد موش صحرایی به وسیله آنزیم اکتینیدین :

نتیجه حاصل از شمارش هپاتوسیت‌های جدا شده با استفاده از پرفیوژن دومرحله‌ای اکتینیدین، تعداد $۲/۷۵ \times ۱۰^{۶}$ سلول در هر میلی‌لیتر بود. طبق نتیجه به دست آمده، غلظت ۰/۴ میلی گرم در میلی لیتر آنزیم اکتینیدین بیشترین هپاتوسیت سالم را از کبد استخراج نمود و به عنوان غلظت بهینه آنزیم انتخاب گردید.

درصد بقای هپاتوسیت‌های جدا شـده در غلظـت ۰/۴ میلـی‌گـرم در میلـی‌لیتـر از آنـزیم اکتینیـدین ۹۵-۹۰٪ تخمین زده شد. این نتیجه نشان داد که سلول‌ها، سـالم و زنده جدا شده‌اند و غلظت ۰/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ایـن آنـزیم و روش پرفیـوژن دومرحلـه‌ای بـرای جداسـازی هپاتوسیت‌های کبـد مناسـب اسـت. اکتینیـدین همچـون کلاژناز در غلظت‌های پایین‌تر از ۰/۴ میلـی‌گـرم در میلـی لیتر تعداد کمتری از هپاتوسیت‌ها را اسـتخراج نمـود و در غلظت‌های بالاتر از ۰/۴ میلـی‌گـرم در میلـی‌لیتـر درصـد بقای سلول‌های جدا شده کمتر بود.

بحث:

کلاژنازها از انتخابی‌ترین پروتئازها در جداسازی انـواع سلول‌ها از بافت‌های مختلـف از جملـه سـلول‌هـای سـالم پارانشیمی از بافت کبد انـسان و مـوش هـستند (۱۹،۲۰). برای اولـین بـار در سـال ۱۹۶۹ روشـی بـرای جداسـازی هپاتوسیت‌های سالم با درصد بقـای بـالا گـزارش گردیـد. این روش شـامل هیـدرولیز بافـت کبـد بوسـیله پرفیـوژن مستقیم کبد با یک محلول نمکی حاوی آنزیم‌های کلاژناز و هیالورونیداز بود (۲۱). سگلن (Seglen) نشان داد که اگر یون کلسیم در پرفیوژن اولیه به بافت کبد حـذف گـردد و سپس محلول حاوی کلاژنـاز اضـافه شـود، نتیجـه بهتـری بدست خواهد آمد (۲۲). در بسیاری از مطالعات دیگر نیـز برای جداسازی هپاتوسـیت هـا از پرفیـوژن دو مرحلـه ای کبد استفاده شد (۲۷-۲۳ ،۲۰). در مطالعه حاضر که برای اولین بار در آن از پروتئـاز جدیـدی بـه عنـوان جـایگزین کلاژناز برای جداسازی سلول هـای کبـدی اسـتفاده شـد، روش پرفیوژن دو مرحله ای به نتیجه بهتری نسبت بـــه روش هیدرولیز مکانیکی بافت بدون پرفیوژن یا پرفیـوژ ن یک مرحله ای انجامید. درصد بقای هپاتوسیت هـای جـدا شده با غلظـت بهینـه آنـزیم اکتینیـدین در ایـن مطالعـه ۹۰-۹۵٪ تخمین زده شد که قابل مقایسه با نتایج حاصـل از کلاژناز در این مطالعه و مطالعات دیگـران اسـت. بـرای مثال، پوویانی و همکارانش درصـد بقـای هپاتوسـیت‌هـای جدا شده از کبد موش صحرایی بـا اسـتفاده از کلاژنـاز را ۹۰٪ (۲۴)، وانگ و همکارانش، ۹۰-۹۸٪ و در مطالعـه ای دیگر ۹۰٪ (۲۶،۲۸) و آتماکا، ۹۵٪ (۲۷) گزارش کرده‌اند. از نظر تعداد سلول های جدا شده با آنـزیم اکتینیـدین در مطالعه حاضر در مقایسه با آنزیم کلاژنازدر ایـن مطالعـه و مطالعات دیگران نیز نتایج مشابه و قابل مقایسه ای دیده می شود (۲۸-۲۶ ،۲۰).

در بررسی منابع مختلف، تاکنون مطالعه ای‌در ارتباط با جداسازی سلولها با اکتینیدین یافت‌نشده‌است. لذا مطالعه حاضر ظاهرا" اولین مطالعه‌ای است که با کمک پروتئـازی جدید به جداسازی هپاتوسیت‌ها پرداخته و به نتـایج قابـل توجهی دست یافته است. تا کنون چند مطالعه در مورد اثر هیدرولیزی آنزیم اکتینیدین روی کلاژن انجام گرفتـه کـه در آنها اثر هیدرولیزی آنزیم بر مولکول کلاژن دیده نـشده است. برای مثال، سوجی یاما و همکارانش گـزارش کردنـد که اکتینیدین هیچ گونه فعالیـت کلاژنـازی نـدارد (۱۳). موری موتو و همکارانش نیز نـشان دادنـد کـه اکتینیـدین قادر نیست در شریط اسیدی کلاژن طبیعـی را هیـدرولیز کند اما این آنزیم در pH اسیدی آتلوکلاژن (کلاژن پس از هضم جزیی توسط پپسین) را می شکند (۱۵). در مقایسه با مطالعات فوق، مصطفایی و همکارانش نـشان دادنـد کـه آنزیم اکتینیدین در بـافر اسـتات بـا pH معـادل ۴ و بـافر سیترات با pH معادل ۵/۵ بـر کـلاژن نـوع اول اثـر قابـل توجهی ندارد ولی در pH معادل ۷ (بافر فسفات) و بـالاتر از آن (بافر تریس) این نوع کلاژن را کاملا" هیدرولیز مـی نماید (۱۶). لـذا ایـن آنـزیم در pH هـای خنثـی وقلیـایی ضعیف، اثرات کلاژنازی قابل توجهی دارد. براین اساس، بـه نظر می رسـد کـارایی مطلـوب اکتینیـدین در جداسـازی سلول‌های کبدی ناشی از فعالیت کلاژنازی آن باشد.

نتیجه نهایی:

باتوجه به کم بودن مقدار کلاژنازها در منابع باکتریایی و یا جانوری و مشکلات تخلیص این آنزیم ها (۳۱-۲۹)، اکتینیدین باتوجه به وفورش در میوه کیوی و ساده تر بودن مراحل تخلیص، میتواند جایگزین مناسبی برای کلاژنازها در جداسازی سلولها از بافت های جامد باشد. به هرحال، با انجام مطالعات بیشتر در خصوص اثر اکتینیدین بـر انـواع دیگـر کلاژن و اثر این آنزیم در جدا سازی سلول از سایر بافت ها بخصوص بافت های حاوی کـلاژن بیـشتر، صـحت چنـین ادعایی روشن خواهد شد و به ارزش این پروتئاز گیاهی در کنار ارزش آن در صنایع غذایی و دارویی خواهد افزود.

سپاسگزاری :

بـا تـشکر از همکـاری و مـساعدت آقـای دکتـر داریوش شکیبایی در تهیه حیوان آزمایشگاهی مورد نیـاز ، خانم مریم چلبی در تخلیص آنـزیم اکتینیـدین و پرسـنل مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی.

منابع :

1. Komai T, Shigehara E, Tokui T, Koga T, Ishigami M, Kuroiwa C, et al. Carrier-mediated uptake of pravastatin by rat hepatocytes in primary culture. J Biochem Pharmacol. 1992; 43(4): 667–670.
2. Parkinson A. An overview of current cytochrome P450 technology for assessing the safety and efficacy of new materials. J Toxicol Pathol. 1996; 24: 45–57.
3. LeCluyse EL. Human hepatocyte culture systems for the in vitro evaluation of cytochrome P450 expression and regulation. Eur J Pharm Sci. 2001;13(4): 343–368.
4. LeCluyse EL, Madan A, Hamilton G, Carroll K, Dehaan R, Parkinson A. Expression and regulation of cytochrome P450 enzymes in primary cultures of human hepatocytes. J Biochem Mol Toxicol. 2000; 14: 177–188.
5. Culav EM, Clark CH, Merrilees MJ. Connective tissues: Matrix composition and its relevance to physical therapy. J Physic Ther 1999; 79(3): 308-319.
6. Kleinman HK, Klebe RJ, Martin GR. Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. J Cell Biol 1981;88:473-485.
7. Goldberg GI, Wilhelm SM, Kronberger A, Bauer EA, Grant GA, Eisen AZ. Human fibroblast collagenase. J Biol Chem 1986; 261 (14): 6600-6605.
8. Boland MJ, Hardman MJ. Kinetic studies on the thiol protease from *Actinidia chinensis*. FEBES Lett. 1972; 27(2): 282-284.
9. Reid DJ, Hussain S, Bailey TSF, Sonkaria S, Sreedharan SK, Thomas EW, et al. Isomerization of the uncomplexed actinidin molecule: kinetic accessibility of additional steps in enzyme catalysis provided by sol vent perturbation. J Biochem. 2004; 378: 699-703.
10. Paul W, Amiss J, Try R, Praekelt U, Scott R, Smith H. Correct processing of the Kiwifruit protease actinidin in transgenic tobacco requires the presence of the C-terminal propeptide. J Plant Physiol. 1995; 108: 261-268.
11. Podivinsky E, Forsterl RLS, Gardner RC. Nucleotide sequence of actinidin, a kiwifruit protease. J Nucl Acid Res 1989; 17(20): 8363.
12. Carne A, Moore CH. The amino acid sequence of the tryptic peptides from actinidin, a proteolytic enzyme from the fruit of *Actinidia chinensis*. J Biochem. 1978; 173: 73-83.
13. Sugiyama S, Ohtsuki K, Sato K, Kawabata M. Enzymatic properties, substrate specificities and pH-activity profiles of two kiwifruit proteases. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) 1997; 43(5): 581-9.
14. Ohyama H, Enomoto T, Mitsunaga S. Variety of kiwifruit protease and their collagenolytic activity. Nippon Eiyo Syokuyo Gakkaishi (in Japanese). 1997; 50: 57-62.
15. Morimoto K, Kuni S, Hamano K, Tonomura B. Preparation and structural analysis of actinidain-processed atelocollagen of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*). J Biosci Biotechnol Biochem. 2004; 68: 861-867.
۱۶. مصطفایی علی، چلبی مریم، فردوسی محمد اسماعیل. تخلیص اکتینیدین میوه کیوی و بررسی فعالیت پروتئولیتیکی آن. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، سال ۱۳۸۳.
۱۷. مصطفایی علی ، چلبی مریم. اکتینیدین میوه کیوی: خالص سازی و بررسی مقدار آن در واریته های داخلی. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، دوره دهم، شماره ۳، ۱۳۸۵: ۲۲۳-۲۳۰.
18. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. Histology: a text and atlas. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2003, pp. 561-568.
19. Maekubo H, Ozaki S, Mitmaker B, Kalant N. Preparation of human hepatocytes for primary culture. J In vitro 1982;18:483-491.
20. McGowan J, Bucher A, Nancy LR. The isolation of adult rat liver parenshymal cells. J Tissue Culture Methods 1985;9(2):49-52.
21. Berry MN, Friend DS. High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. J Cell Biol 1969; 43: 506–520.
22. Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. Methods Cell Biol. 1976; 13: 29–34.
23. Chen HL, Wu HL, Fon CC, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Long-term culture of hepatocytes from human adults. J Biomed Sci. 1998; 5: 435-440.
24. Puviani AC, Ottolenghi C, Tassinari B, Pazzi P, Morsiani E. An update on high-yield hepatocyte isolation methods and on the potential clinical use of isolated liver cells. Comp Biochem Physiol. 1998; 121: 99-109.
25. Li J, Li LJ, Chao HC, Yang Q, Liu XL, Sheng JF, et al. Isolation and short term cultivation of swine hepatocytes for bioartificial liver support system. Hepatobiliary Pancreat Dis Int. 2005; 4(2): 249-253.
26. Wang YJ, Liu HL, Guo HT, Wen HW, Liu J. Primary hepatocyte culture in collagen gel mixture and collagen sandwich. J Gastroenterol. 2004; 10(5): 699-702.
27. Atmaca M. Improvement of the original isolation procedure for hormone studies in short-time culture. J Dicle Tip Dergisi. 2005; 32(2): 63-68.

28. Wang YJ, Li MD, Wang YM, Ding J, Nie OH. Simplified isolation and spheroidal aggregate culture of rat hepatocytes. Wourd J Gasterol. 1998; 4(1): 74-76 .
29. Wittstock M, Flemmig TF, Schmidt H, Mutters R, Karch H. Serodiagnosis of *Porphyromonas gingivalis* infection by immunoblot analysis with recombinant collagenase. J Clin Microbiol 1996; 34(10): 2411-1413.
30. Yoshihara K, Matsushita O, Minami J, Okabe A. Cloning and nucleotide sequence analysis of the colH gene from *Clostridium histolyticum* encoding a collagenase and a gelatinase. J Bacreiol. 1994; 176(21): 6489-6496.
31. Murphy G, Reynolds JJ, Bretz U, Baggiolini M. Partial purification of collagenase and gelatinase from human polymorphonuclear leucocytes: Analyses of their actions on soluble and insoluble collagens. J Biochem. 1982; 203: 209-221.