١١٤٠٩١

دانشگاه رازی

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست شناسی

گرایش تکوینی

تمایز سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بندناف انسانی به سلول‌های کبدی در محیط آزمایشگاهی

اساتید راهنما:

دکتر علی امینی

دکتر فردین فتحی

دکتر مهری آزاد بخت

نگارش:

آزاده رئوفی

۱۳۸۸/۳/۳۱

اسفند ماه ۱۳۸۷

اطلاعات مدارک علمی ایران
تهیه مدارک

۱۱۴۰۹۸

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و
نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه
متعلق به دانشگاه رازی است.

دانشگاه رازی

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست شناسی

گرایش تکوینی

توسط:

آزاده رئوفی ماسوله

تحت عنوان:

تمایز سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف انسانی به سلول‌های کبدی در محیط آزمایشگاهی

در تاریخ ۸۷/۱۲/۱۴ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسیده است.

۱-استاد راهنما ۱ دکتر علی امینی با مرتبه علمی	دانشیار	امضاء
۲-استاد راهنما ۲ دکتر فردین فتحی با مرتبه علمی	دانشیار	امضاء
۳-استاد راهنما ۳ دکتر مهری آزادبخت با مرتبه علمی	استادیار	امضاء
۴-استاد داور داخلی دکتر نامدار یوسفوند با مرتبه علمی	استادیار	امضاء
۵-استاد داور خارجی دکتر جعفر رضایی با مرتبه علمی	استادیار	امضاء

اسفند ماه ۱۳۸۷

با تشکر و سپاس از
اساتید ارجمند و عزیزم از دانشگاه رازی کرمانشاه، آقای دکتر علی امینی و خانم دکتر مهری آزادبخت، که همواره درتمامی مراحل، از راهنمایی‌های ایشان بهره بردم.
استاد گرانقدر و عزیزم از دانشگاه علوم پزشکی کردستان، آقای دکتر فردین فتحی، که در تمامی مراحل این تحقیق با زحمات بی‌دریغ خود و حمایت‌های علمی، همواره حامی و پشتیبان من بودند.
جناب آقای دکتر نامدار یوسف‌وند که به عنوان ممتحن داخلی، زحمت قرائت پایان‌نامه را بر عهده گرفتند.
جناب آقای دکتر جعفر رضایی که به عنوان استاد مدعو از دانشگاه علوم پزشکی کردستان زحمت حضور در جلسه دفاع را کشیدند.
دوست، همکار و خواهر عزیزم خانم ریحانه معتمدی که همواره در کنار من بودند.
دوستان عزیزم خانم‌ها امینی و رشیدی و آقایان: سلیمی، ایزدپناه و جعفری که مطالب فراوانی از آن‌ها آموختم.
و با سپاس فراوان از دوستان عزیز و گرامی‌ام در بخش‌های مختلف گروه زیست‌شناسی به خصوص آزمایشگاه تکوین و بیوسیستماتیک جانوری.

تقدیم به

پدر و مادر مهربانم که هر چه دارم از آنهاست

و برادر عزیزم آرش

چکیده:

سلول‌های بنیادین مزانشیمی ،دارای دو ویژگی منحصر به فرد می‌باشند: توانایی خود بازسازی برای مدت طولانی و پتانسیل بالای تمایزی. توانایی تمایز این گروه از سلول‌ها به دودمان سلول کبدی، در فرایند درمان مبتنی بر بکارگیری سلول‌های بنیادین، بسیار حائز اهمیت می‌باشد. ما در این مطالعه تمایز سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بندناف انسانی به سلول‌های شبه کبدی را در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادیم.

پس از تیمار سلول‌ها با فاکتور رشد کبدی و انکوستاتین M، بیان ژن‌های خاص سلول کبدی همچون آلبومین، سیتوکراتین ۸، سیتوکراتین ۱۸، آلفافتوپروتئین، ترانستریتین، تیروزین‌آمینوترانسفراز، گلوکز۶-فسفات، هپاتوسیت نوکلئار فاکتور ۳-بتا، از طریق روش RT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. در طول دوره، سلول‌ها توسط میکروسکوپ معکوس از نظر تغییرات مورفولوژیکی مورد بررسی قرار گرفتند. در این پژوهش، از روش‌های رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی و ایندوسیانین گرین به ترتیب برای اثبات بیان پروتئین‌های خاص سلول کبدی و بررسی عملکرد سلول‌های تمایز یافته استفاده گردید. روش رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف، جهت شناسایی ذخیره گلیکوژن در سلول‌های تمایزیافته نیز مورد استفاده قرار گرفت.

پس از تیمار سلول‌ها با فاکتورهای القایی، تغییر شکل سلول‌ها از حالت فیبروبلاستی و دوقطبی به فرم اپیتلیال و چند وجهی مشاهده گردید. بیان تعدادی از ژن‌های خاص سلول کبدی در طول دوره القایی شناسایی شد. رنگ‌آمیزی ایمونوسیتوشیمی برای آلبومین و سیتوکراتین ۱۸، نشان داد که این پروتئین‌ها در سلول‌های شبه کبدی بیان می‌گردد. سلول‌ها به رنگ‌آمیزی ایندوسیانین گرین پاسخ مثبت داده و نیز نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف، حاکی از ذخیره گلیکوژن در سلول‌های تمایز یافته بود. با توجه به داده‌های کسب شده، می‌توان نتیجه گرفت که سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بندناف انسانی، دارای توانایی تمایز به سلول‌های شبه کبدی در شرایط آزمایشگاهی می‌باشند. امید است در آینده نزدیک، از این منبع از سلول‌های بنیادین جهت درمان بسیاری از بیماری‌های کبدی استفاده گردد.

کلید واژه: سلول‌های کبدی، تمایز کبدی، ورید بندناف، سلول‌های بنیادین مزانشیمی

فهرست مطالب

فصل اول- مقدمه

عنوان	صفحه
۱-۱- کبد	۲
۱-۱-۱- استروما	۲
۱-۱-۲- لوبول کبدی	۳
۱-۱-۳- هپاتوسیتها	۵
۱-۲- تغذیه خونی	۶
۱-۳- فاکتور رشد کبدی	۸
۱-۳-۱- مولکول گیرنده برای فاکتور رشد کبدی	۸
۱-۳-۲- فاکتور رشد کبدی و ترمیم کبد	۹
۱-۴- انکوستاتین M	۱۰
۱-۴-۱- مولکول گیرنده برای انکوستاتین M	۱۰
۱-۴-۲- مسیرهای سیگنالی القا شده توسط OSM	۱۱
۱-۴-۲-۱- مسیر سیگنالی JAK-STAT	۱۱
۱-۴-۲-۲- مسیر سیگنالی MAPK	۱۲
۱-۵- مکانیسم‌های مولکولی تکوین کبد	۱۳
۱-۵-۱- فاکتور رشد فیبروبلاستی، مسئول سیگنال‌دهی وقایع ابتدایی در تکوین کبد	۱۳
۱-۶- مسیر سیگنالی HEDGHOG در تکوین کبدی	۱۵
۱-۷- مراحل تکوین مجاری صفراوی	۱۶
۱-۸- تنظیم رونویسی ژن‌های خاص سلول کبدی	۱۶
۱-۹- ترمیم کبدی	۱۷
۱-۹-۱- شبکه سیتوکینی وآغاز ترمیم کبدی	۱۹
۱-۹-۲- شبکه فاکتورهای رشد و پیشرفت در سیکل سلولی	۲۲
۱-۹-۳- مسیرهای متابولیکی و ترمیم کبدی	۲۴
۱-۱۰- مسیر سیگنالی HEDGHOG و ترمیم کبدی	۲۴
۱-۱۱- سلول‌های بنیادین	۲۵
۱-۱۱-۱- محیط اطراف (آشیان) سلول بنیادین	۲۷
۱-۱۱-۲- سلول‌های بنیادین جنینی	۲۷
۱-۱۱-۲-۱- اساس مولکولی ظرفیت پرتوانی سلول‌های بنیادین	۳۰
۱-۱۱-۳- سلول‌های بنیادین بالغ	۳۰
۱-۱۱-۴- سلول‌های بنیادین پرتوان جداسازی شده از مایع آمنیوتیک	۳۱
۱-۱۱-۵- سلول‌های خون‌ساز و پیش‌ساز بنیادین در خون بندناف	۳۲
۱-۱۱-۶- سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بندناف	۳۲

فصل دوم- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد و محلول های آزمایش ۳۵
۲-۱-۱- محیط کشت پایه ۳۵
۲-۱-۲- سرم FBS ۳۵
۲-۱-۳- محیط کشت مورد استفاده برای نگهداری سلول‌ها ۳۵
۲-۱-۴- محلولTrypsin-EDTA 1x ۳۶
۲-۱-۵- نحوه تهیه بافر PBS ۳۶
۲-۱-۶- نحوه تهیه بافر ۳۶
(Tris borate EDTA Buffer)5x TBE
۲-۱-۷- نحوه تهیه محلول اتیدیوم برماید ۳۶
۲-۱-۸- RNase free DEPC water ۳۶
۲-۱-۹- نحوه تهیه محلول مسدود کننده ۳۷
۲-۱-۱۰- نحوه تهیه محلول شستشو ۳۷
۲-۱-۱۱- نحوه تهیه محلول تثبیت ۳۷
۲-۲- مراحل تحقیق ۳۸
۲-۲-۱- کشت اولیه سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف انسانی ۳۸
۲-۲-۱-۱- پاساژ سلول‌ها(subculture) ۳۸
۲-۲-۱-۲- شمارش سلولی ۳۹
۲-۲-۲- القای تمایز کبدی در سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف انسان ۴۱
۲-۲-۲-۱-پوشاندن کف ظروف مورد استفاده برای دوره القا با فیبرونکتین ۴۱
۲-۲-۲-۲- القای تمایز کبدی ۴۱
۲-۲-۲-۲-۱- مرحله آغازین ۴۲
۲-۲-۲-۲-۲- مرحله بلوغ ۴۲
۲-۲-۳- مشاهده تغییرات مورفولوژیکی سلول‌های تحت تیمار ۴۲
۲-۲-۴- بررسی اثر تمایزی فاکتورهای القایی بر روی سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف انسانی با استفاده از روش RT-PCR. ۴۲
۲-۲-۴-۱- استخراج RNAی کل از سلول ۴۳
۲-۲-۴-۲- بررسی کمی و کیفی RNAی استخراج شده ۴۴
۲-۲-۴-۲-۱- UV اسپکتروفتومتری ۴۴
۲-۲-۴-۲-۲- ژل الکتروفورز ۴۴
۲-۲-۴-۳- واکنش رونویسی معکوس ۴۴
۲-۲-۴-۴- واکنش PCR ۴۵
۲-۲-۴-۴-۱- طراحی پرایمر ۴۵
۲-۲-۴-۴-۲- آماده‌سازی پرایمرهای PCR ۴۷

۲-۲-۳-۴-۳- واکنش PCR ۴۷
۲-۲-۴-۴-۴- یافتن دمای بهینه annealing برای پرایمرها ۴۸
۲-۲-۴-۴-۵- انجام ژل الکتروفورز برای محصولات PCR ۴۸
۲-۲-۵- بررسی اثر تمایزی فاکتورهای القایی بر روی سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف انسانی با استفاده از روش ایمونوسیتوشیمی(ICC) ۴۸
۲-۲-۶- بررسی اثر تمایزی فاکتورهای القایی بر روی سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف انسانی با استفاده از جذب رنگ ایندوسیانین گرین(ICG) ۴۹
۲-۲-۷- بررسی اثر تمایزی فاکتورهای القایی بر روی سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف انسانی با استفاده از رنگ‌آمیزی پریودیک‌اسیدشیف(PAS) ۵۰

فصل سوم- نتایج

۳-۱- القای تمایز کبدی در سلول‌های بنیادین مزانشیمی ورید بند ناف انسان ۵۲
۳-۲- ارزیابی مورفولوژیک سلول‌های تمایزیافته ۵۲
۳-۱- بررسی بیان ژن‌های خاص سلول کبدی از طریق تکنیک RT-PCR ۵۴
۳-۳-۱- بررسی کمی و کیفی RNAهای استخراج شده ۵۴
۳-۳-۲- بهینه‌سازی دمای annealing ۵۴
۳-۳-۳- بررسی بیان ژن‌های خاص سلول کبدی ۵۵
۳-۴- بررسی بیان مارکرهای ALB و CK18 از طریق تکنیک ایمونوسیتوشیمی ۶۳
۳-۵- بررسی عملکرد سلول‌های تمایز یافته از طریق تکنیک رنگ‌آمیزی با ایندوسیانین گرین ۶۶
۳-۶- بررسی ذخیره گلیکوژن از طریق رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف ۶۸

فصل چهارم- بحث و نتیجه‌گیری

۴-۱- بحث ۷۰
۴-۲- تشخیص تمایز سلول‌های UVMSC به سلول‌های کبدی ۷۴
۴-۲-۱- بررسی مورفولوژیکی ۷۴
۴-۲-۲- بررسی بیان ژن‌های خاص سلول کبدی ۷۵
۴-۲-۲-۱- آلبومین ۷۵
۴-۲-۲-۲- سیتوکراتین ۱۸ و سیتوکراتین ۸ ۷۶
۴-۲-۲-۳- آلفا فتو پروتئین ۷۶
۴-۲-۲-۴- تیروزین‌آمینوترانسفراز ۷۷

۴-۲-۲-۵- ترانستریتین ۷۹
۴-۲-۲-۶- هپاتوسیت نوکلئار فاکتور ۳-بتا(HNF3β) ۷۹
۴-۲-۲-۷- گلوکز ۶- فسفاتاز ۸۰
۴-۲-۲-۸- MET ۸۱
۴-۲-۳- بررسی بیان پروتئین‌های خاص سلول کبدی ۸۱
۴-۲-۴- بررسی جذب سلولی ایندوسیانین گرین ۸۲
۴-۲-۵- بررسی سنتز گلیکوژن ۸۲
منابع ۸۴

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۱- تصویرشماتیک از کبد بالغ در پستانداران ۴
شکل ۱-۲- تصویر شماتیک برای مولکول c-met ۹
شکل ۱-۳- کمپلکس‌های رسپتوری مولکول OSM در سلول‌های انسانی و موشی ۱۱
شکل ۱-۴- OSM، مسیر JAK/STAT را فعال می‌کند ۱۲
شکل ۱-۵- OSM مسیر MAPK را فعال می‌کند ۱۳
شکل ۱-۶- شبکه‌های متابولیکی (سفید)، فاکتور رشد (قرمز) و سیتوکینی (زرد) در طول ترمیم کبدی ۱۸
شکل ۱-۷- مسیر سیتوکینی فعال شده در طول ترمیم کبدی ۲۱
شکل ۱-۸- مسیر سیگنالی فاکتور رشد، در طول ترمیم کبدی ۲۳
شکل ۱-۹- دیاگرام شماتیک از پیشرفت تبدیل سلول‌های بنیادین به سلول‌های سوماتیک بالغ در پستانداران. ۲۶
شکل ۱-۱۰- تکوین سلول‌های زایای ابتدایی (PGC) ۲۸
شکل ۲-۱-نحوه شمارش سلول‌ها از طریق لام نئوبار ۴۰
شکل ۳-۱- ظهور فنوتیپ شبه کبدی در اثر اضافه کردن فاکتورهای القایی ۵۳
شکل ۳-۲- الکتروفورز ژل آگاروز برای نمونه RNA تخلیص شده ۵۴
شکل ۳-۳- شیب دمایی تعریف شده برای ژن TTR ۵۵
شکل ۳-۴- بررسی بیان ژن CK8 ۵۶
شکل ۳-۵- بررسی بیان ژن ALB ۵۶
شکل ۳-۶- بررسی بیان ژن CK18 ۵۷
شکل ۳-۷- بررسی بیان ژن β2m ۵۷
شکل ۳-۸- بررسی بیان ژن HNF3β ۵۸
شکل ۳-۹- بررسی بیان ژن TTR ۵۸
شکل ۳-۱۰- بررسی بیان ژن TAT ۵۹
شکل۳-۱۱- بررسی بیان ژن AFP ۶۰
شکل ۳-۱۲- بررسی بیان ژن G6P ۶۱
شکل ۳-۱۳- بررسی بیان ژن c-met ۶۱
شکل ۳-۱۴- بررسی بیان ژن‌های خاص سلول کبدی در سلول‌های تحت تیمار با فاکتورهای القایی ۶۲
شکل ۳-۱۵- بررسی بیان مارکر CK18 از طریق تکنیک ایمونوسیتوشیمی در سلول‌های تمایز یافته و سلول‌های HepG2. ۶۴
شکل ۳-۱۶- بررسی بیان مارکر ALB از طریق تکنیک ایمونوسیتوشیمی در سلول‌های تمایز یافته و سلول‌های HepG2. ۶۵
شکل ۳-۱۷- بررسی عملکرد سلول‌های تمایز یافته از طریق تکنیک رنگ‌آمیزی ایندوسیانین گرین ۶۷

شکل ۳-۱۹- بررسی ذخیره گلیکوژن از طریق رنگ‌آمیزی پریودیک اسید شیف ۶۸

فهرست جدول‌ها

جدول ۲-۱- مشخصات پرایمرهای طراحی شده برای بررسی بیان ژن‌های خاص سلول‌های کبدی ۴۶

فصل اول

مقدمه

۱-۱- کبد

کبد دومین اندام بزرگ پس ازپوست و بزرگترین غده بدن است که وزن آن حدود ۱/۵ کیلوگرم می‌باشد. این اندام، بزرگترین اندام داخلی پستانداران است، که به صورت اگزوکرین و اندوکرین عمل می‌کند. کبد نقش مهمی در ابقأ هوموستازی در بدن بر عهده دارد(Desmet et all ,2001). مهمترین عملکردهای کبد شامل: تولید پروتئین‌های سرم (فاکتورهای انعقادی، آلبومین و ترانسفرین)، برداشت و شکست گلبول‌های قرمز، تولید یا برداشت گلوکز در زمان گرسنگی یا سیری، پردازش اسیدهای چرب و تری‌گلیسیریدها، برقراری هوموستازی کلسترول از طریق سنتز و کاتابولیسم آن، تولید و دفع صفرا، ذخیره برخی از مواد، سمزدایی از مواد زنوبیوتیک و شکست برخی اجزای سمی از جمله آمونیاک است. کبد در جایگاه مناسبی برای انجام این عملکردها واقع شده است. این ارگان در حفره شکم و در زیر دیافراگم قرار دارد. ذخیره و پردازش مواد غذایی جذب شده در دستگاه گوارش در این ارگان صورت پذیرفته و لذا به عنوان سدی بین جریان خون و سیستم گوارش عمل می‌کند. این اندام خون را از دو منبع دریافت می‌کند: ورید پورتال و شریان کبدی. بیشتر خون آن از ورید پورت می‌آید و قسمت اندکی از آن، توسط شریان کبدی تامین می‌شود. معماری مناسب کبد امکان تبادل مواد بین خون و هپاتوسیت‌ها را برقرار می‌سازد. تمام موادی که از طریق روده جذب می‌شوند، توسط ورید پورت به کبد می‌رسند، بجز لیپیدهای پیچیده که به وسیله عروق لنفاوی منتقل می‌شوند. به علاوه سیستم صفراوی کبدی، امکان انتقال صفرا به روده را فراهم می‌کند. کبد بهترین موقعیت را در سیستم گردش خون دارد تا متابولیت‌ها را جمع کرده، و پس از تغییر انباشته سازد. (Junqueira, 2003).

۱-۱-۱-استروما

کپسول نازکی از بافت همبندبا نام کپسول گلیسون[1] ، کبد را پوشانده است که در ناف[2] -جائیکه ورید پورت و شریان کبدی وارد کبد شده و مجاری کبدی راست و چپ و عروق

[1] - Glisson s capsule
[2] - Hilum

لنفاوی از آن خارج می‌شوند- ضخیم‌تر می‌شود. این عروق و مجاری توسط بافت همبند، در تمام طول مسیر خود تا فضای پورت بین لوبول‌های کبدی احاطه شده‌اند. در این محل، یک شبکه ظریف رتیکولر شکل گرفته و هپاتوسیت‌ها و سلول‌های اندوتلیال سینوزوئیدی لوبول‌های کبد را حمایت می‌کنند(Junqueira, 2003).

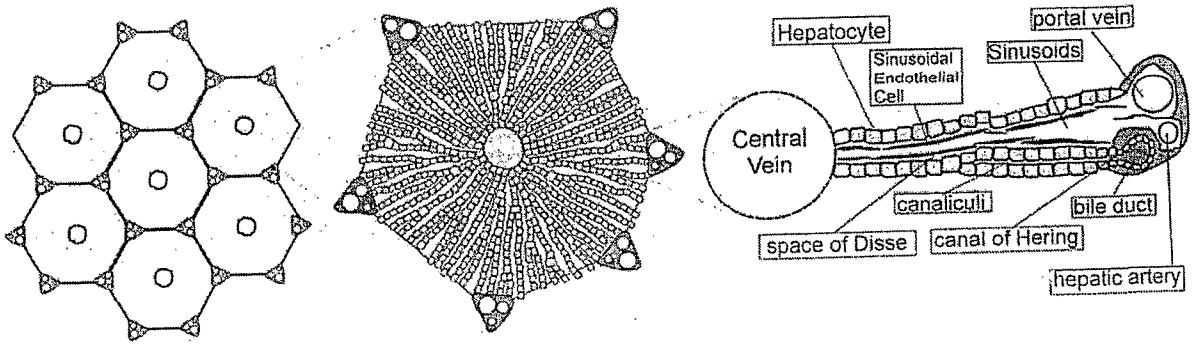
۱-۱-۲- لوبول کبدی

جزء ساختمانی اساسی کبد، سلول کبدی یا هپاتوسیت[3] است. این سلول‌های اپیتلیال، در صفحات متصل بهم، تجمع یافته‌اند. در برش‌های میکروسکوپ نوری، واحدهای ساختمانی بنام لوبول‌های کبد دیده می‌شوند. کبد از این واحدهای تکرار شونده تشکیل شده است(شکل ۱-۱). لوبول‌ها، ساختارهای شش وجهی بوده، و از صفحات بهم رسیده هپاتوسیت‌ها تشکیل شده‌اند. در بعضی حیوانات، لوبول‌ها بوسیله یک لایه از بافت همبند از یکدیگر جدا شده‌اند. این حالت در انسان اتفاق نمی‌افتد و تعیین حدود لوبول‌ها را مشکل می‌سازد. لوبول‌ها در بیشتر طول خود، در تماس نزدیک با یکدیگر هستند. در بعضی مناطق محیطی، لوبول‌ها بوسیله بافت همبند که حاوی عروق خونی، لنفاتیک، اعصاب و مجاری صفراوی است، مشخص شده‌اند. این مناطق، فضاهای پورت[4]، در گوشه لوبول‌ها قرار گرفته‌اند. در مرکز هر لوبول یک ورید مرکزی و در حاشیه‌های آن شش تریاد وجود دارد. هر تریاد پورتال شامل بخشی از سیستم مجاری صفراوی، ونول پورتال، شریانچه کبدی، و عروق لنفاوی می‌باشد. ونول محتوی خون تخلیه شده از وریدهای مزانتریک فوقانی و تحتانی و طحالی است. شریانچه حاوی خون تنه سلیاک آئورت شکمی است. مجرای صفراوی که اپیتلیوم مکعبی آن را پوشانده است، صفرای حاصل از هپاتوسیت‌ها را حمل و در نهایت، به مجرای کبدی تخلیه می‌کند(Junqueira, 2003).

هپاتوسیت‌ها به صورت شعاعی در لوبول کبدی قرار گرفته‌اند و مثل آجرهای دیوار چیده شده‌اند. این صفحات سلولی از محیط لوبول به مرکز آن هدایت شده و به طور آزاد آناستوموز پیدا می‌کنند و ساختمانی اسفنجی و حلزونی را شکل می‌دهند. فضای بین این صفحات، حاوی مویرگها یا سینوزوئیدهای کبدی[5] است. سینوزوئیدها عروق گشاد نامنظمی هستند که منحصراً از یک لایه ناپیوسته سلول‌های اندوتلیال منفذدار، تشکیل شده‌اند(Junqueira, 2003).

---

[3] - Hepatocyte
[4] - Portal space
[5] - Liver sinusoids



شکل ۱-۱- تصویر شماتیک از کبد بالغ در پستانداران. چپ: ساختار لوبولی کبد بالغ، نشان دهنده واحدهای شش وجهی تکرار شونده در کبد پستاندار بالغ می‌باشد. ورید مرکزی در قسمت میانی هر لوبول قرار گرفته است. در گوشه‌های هر ساختار شش وجهی تریاد پورتال واقع شده است. راست: محور پورتال-سنترال هر لوبول کبدی مشاهده می‌شود. خون از طریق سیاهرگ پورتال و سرخرگ کبدی وارد این ارگان شده و در طول سینوزوئیدها به سمت سیاهرگ مرکزی جریان می‌یابد (Spear et al., 2006).

سلول‌های اندوتلیال از هپاتوسیت‌های زیرین، به وسیله یک لایه قاعده‌ای ناپیوسته و یک فضای ساب اندوتلیال بنام فضای دیس[6] جدا می‌شوند که محتوی مقداری الیاف رتیکولر و میکروویلی‌های هپاتوسیت‌هاست. متعاقباً خون از دیواره اندوتلیال به آسانی گذشته و تماس نزدیکی با هپاتوسیت‌ها برقرار می‌کند و اجازه تبادل آسان ماکرومولکول‌ها را از لومن سینوزوئید به سلول کبدی و بالعکس، می‌دهد. اهمیت فیزیولوژیک این مسئله نه تنها به علت ترشح مقدار زیادی ماکرومولکول به جریان خون توسط هپاتوسیت‌هاست، بلکه بسیاری از این مولکول‌های بزرگ را خود برداشت کرده و کاتابولیزه می‌نمایند. علاوه بر سلول‌های اندوتلیال، سینوزوئیدها همچنین حاوی ماکروفاژهایی بنام سلول‌های کوپفر[7] می‌باشند. این سلول‌ها در سطح مجرایی سلول‌های اندوتلیال یافت می‌شوند. اعمال اصلی آنها متابولیزه کردن گلبول‌های پیر، هضم هموگلوبین، ترشح پروتئین‌های وابسته به روندهای ایمنی و نابودی باکتری‌هایی است که در نهایت از طریق روده بزرگ وارد خون پورتال می‌شوند. سلول‌های کوپفر، ۱۵٪ جمعیت سلول‌های کبدی را تشکیل می‌دهند. در فضای دیس، سلول‌های ذخیره کننده چربی، که سلول‌های ایتو[8] نامیده می‌شوند، محتوی انکلوزیون‌های لیپیدی غنی از ویتامین A هستند. در کبد سالم، این سلول‌ها کارکردهای مختلفی دارند، مانند جذب، ذخیره‌سازی و آزادسازی رتینوئیدها، ساخت و ترشح بسیاری از پروتئین‌ها و پروتئوگلیکان‌های ماتریکس خارج سلولی، ترشح عوامل رشد و سیتوکین‌ها، و تنظیم قطر مجرای داخلی سینوزوئیدها در پاسخ به عوامل تنظیم‌گر گوناگون. سلول‌های ایتو، نقش مهمی در پاسخ کبد به آسیب دارند(Junqueira, 2003).

---

[6] - Space of disse
[7] - kupffer cells
[8] - Ito cells

فعال شدن این سلول‌ها منجر به آسیب کبدی مزمن (منجر به فیبروز) می‌گردد(Friedman et al., 2003). سلول‌های قاتل[9]، نقش مهمی در ایمنی بازی می‌کنند.

۱-۱-۳- هپاتوسیت‌ها

سلول‌های کبدی چند وجهی بوده و قطری حدود ۳۰-۲۰ میکرومتر دارند. در برش‌هایی که توسط هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی می‌شوند، سیتوپلاسم آنها به علت وجود تعداد زیادی میتوکندری و مقداری شبکه اندوپلاسمیک صاف، ائوزینوفیل خواهد بود. سطح هر سلول کبدی از طریق فضای دیس با دیواره سینوزوئیدها و سطوح دیگر هپاتوسیت‌ها، در تماس می‌باشد. هر جا که دو هپاتوسیت در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند، فضایی لوله‌ای بین آنها ایجاد می‌شود بنام کانالیکول صفراوی(Junqueira, 2003).

کانالیکول‌ها که اولین قسمت سیستم مجاری صفراوی هستند، فضاهای لوله‌ای به قطر ۲-۱ میکرومتر هستند که تنها بوسیله غشای سلولی دو هپاتوسیت محدود شده‌اند و تعداد کمی میکروویلی در داخل آن‌ها وجود دارد. غشاهای سلولی نزدیک این کانالیکول‌ها، توسط اتصالات محکم، به یکدیگر متصل هستند. این اتصالات اطمینان می‌دهد که اجزای صفرا وارد جریان خون نشده و مستقیماً وارد روده کوچک می‌شوند (Kojima et al., 2003). اتصالات شکاف‌دار بین هپاتوسیت‌ها، در واقع محلی برای ارتباطات بین‌سلولی هستند. کانالیکول‌های صفراوی، یک شبکه پیچیده پیوندی ایجاد می‌کنند که در طول صفحات لوبول کبدی سیر کرده و در فضای پورت خاتمه می‌یابند. در نتیجه، جریان صفرا در جهتی خلاف جریان خون سیر می‌کند، یعنی از مرکز به محیط لوبول کبدی. در محیط صفرا وارد مجاری کوچک صفراوی یا کانال هرینگ[10] می‌شود(Junqueira, 2003). این مجاری از سلول‌های استوانه‌ای یا مکعبی شکل بنام کلانژیوسیت[11] پوشیده شده و غلاف مشخصی از بافت همبند دارند. این مجاری به تدریج بزرگ شده و به یکدیگر متصل می‌گردند و در نهایت مجاری کبدی را حاصل می‌نمایند. کانال هرینگ حاوی جمعیت کوچکی از سلول‌ها بنام سلول‌های بیضوی[12] است(Theise et al., 1999). سلول‌های بیضوی به عنوان سلول‌هایی بنیادین و پیش‌ساز برای هپاتوسیت‌ها و کلانژیوسیت‌ها در کبد باقی مانده و این سلول‌ها نقش مهمی در ترمیم کبدی ایفا می‌کنند(Wang et al., 2003).

سلول‌های کبدی، قطبی بوده و سطح راسی[13] یا غشای کانالیکولار آن‌ها در انتقال اجزای صفراوی سنتز شده توسط هپاتوسیت‌ها، نقش دارد. ناقلین مورد نیاز برای این تبادل در سطح راسی قرار گرفته‌اند(Trauner et al., 2003). سطح سینوزوئیدی در برابر فضای دیس واقع شده، و در تبادل دو طرفه مواد بین

---

[9] - Pit cells
[10] - Hering canales
[11] -Cholangiocyte
[12] - Oval cells
[13] - Apical

هپاتوسیت‌ها و خون نقش دارد. این سطح، حاوی تعداد زیادی میکروویلی بوده و انواع رسپتورها، کانال‌ها و پروتئین‌های درگیر در انتقال، در این سطح واقع شده‌اند(Malarkey et al., 2005). یکی از شاخص‌های سلول کبدی، ۱ یا ۲ هسته گرد (پلی‌پلوئید) به همراه ۱ یا ۲ هستک تیپیک است. هپاتوسیت‌ها محتوی مقدار زیادی شبکه آندوپلاسمی خشن و صاف هستند. در هپاتوسیت‌ها، شبکه اندوپلاسمیک خشن تجمعاتی را تشکیل می‌دهد که در سیتوپلاسم پراکنده‌اند و بنام اجسام بازوفیل خوانده می‌شوند. تعداد زیادی پروتئین مثل آلبومین و فیبرینوژن، بر روی ریبوزوم‌های این اجزا ساخته می‌شوند. این ارگانل مسئول روندهای اکسیداسیون، متیلاسیون و کنژوگاسیون بوده که جهت غیرفعال‌کردن و سم‌زدایی بسیاری از مواد الزامی می‌باشد. شبکه اندوپلاسمیک صاف سیستم حساسی است که سریعاً نسبت به مولکول‌هایی که وارد هپاتوسیت می‌شوند، واکنش نشان می‌دهد(Junqueira, 2003).

سلول‌های کبدی اکثراً محتوی گلیکوژن هستند. این پلی‌ساکارید در زیر میکروسکوپ الکترونی، بشکل گرانول‌های خشن دارای کدورت الکترونی، به نظر می‌رسد که اکثراً در تجمع‌های شبکه آندوپلاسمیک صاف تجمع می‌یابد. مقدار گلیکوژن موجود در کبد آهنگ روزانه داشته و همچنین به حالت تغذیه‌ای حیوان بستگی دارد. گلیکوژن کبد، منبعی برای گلوکز است و اگر قند خون به زیر مقدار طبیعی برسد، به حرکت در می‌آید. به این ترتیب، هپاتوسیت‌ها سطح گلوکز خون را تنظیم می‌کنند. هر سلول کبدی، حدوداً ۲۰۰۰ میتوکندری دارد. جزء شایع دیگر این سلول‌ها، قطرات چربی است که تعداد آن‌ها بسیار متغییر است(Junqueira, 2003).

۱-۲- تغذیه خونی

کبد از این لحاظ که از دو منبع خون می‌گیرد، اندامی غیر عادی است. ٪۸۰ خون از ورید پورت می‌آید که خون کم اکسیژن و پر از مواد غذایی را از احشای شکمی حمل می‌کند، و ٪۲۰ آن از شریان کبدی منشاء می‌گیرد که خون پر اکسیژن را تامین می‌کند.

ورید پورت، متوالیاً به شاخه‌هایی تقسیم شده و وریدچه‌های کوچکی بنام وریدچه‌های پورت به فضای پورت می‌فرستد. وریدچه‌های پورت به وریدهای توزیع‌کننده تقسیم می‌شوند که اطراف محیط لوبول را دور می‌زنند. از وریدهای توزیع‌کننده، وریدچه‌های ورودی به سینوزوئیدها تخلیه می‌شوند. سینوزوئیدها به طور شعاعی و در مرکز لوبول بهم نزدیک می‌شوند و ورید مرکزی یا مرکز لوبولی را شکل می‌دهند. این رگ، دیواره نازکی دارد که فقط از سلول‌های اندوتلیال و تعداد کمی رشته‌های کلاژن تشکیل شده است. همانطور که ورید مرکزی در طول لوبول پیش می‌رود، سینوزوئیدهای بیشتری در آن ریخته و بتدریج بر قطرش افزوده می‌شود. در انتها از قاعده لوبول خارج شده و با ورید بزرگتر زیر لوبولی یکی می‌شود. وریدهای زیر لوبولی به تدریج بهم نزدیک شده، یکی می‌شوند و دو یا تعداد بیشتری وریدهای کبدی را تشکیل

می‌دهند که این‌ها نیز به نوبه خود، به ورید اجوف تحتانی می‌ریزند. دستگاه پورت حامل خون پانکراس و طحال و خون محتوی مواد غذایی جذب شده در روده‌ها است. مواد غذایی در کبد تجمع یافته و تغییر شکل داده می‌شوند. مواد سمی نیز در کبد خنثی و دفع می‌شوند.

شریان کبدی شاخه شاخه شده و شریان‌های بین لوبولی را ایجاد می‌نماید. بعضی از این شاخه‌ها، شریانچه‌ها را تشکیل داده و مستقیماً در سینوزوئیدها در فواصل مختلفی از فضاهای پورت، خاتمه می‌یابند. در نتیجه مخلوطی از خون شریانی و وریدی پورت، در سینوزوئیدها پدید می‌آید. کارکرد اصلی دستگاه شریانی عبارت است از تامین میزان کافی اکسیژن برای سلول‌های کبدی.

خون از محیط به مرکز لوبول کبدی جریان می‌یابد. در نتیجه اکسیژن و متابولیت‌ها، ابتدا به سلول-های محیطی رسیده و سپس به سلول‌های مرکزی لوبول می‌رسند. این جهت جریان خون تا حدی علت رفتار متفاوت سلول‌های محیطی لوبول را نسبت به سلول‌های مرکز لوبولی، توضیح می‌دهد. این دوگانگی رفتار هپاتوسیت‌ها، مخصوصاً در نمونه‌های پاتولوژیک مشخص است. جایی که تغییراتی در سلول‌های مرکزی یا محیطی لوبول پدید می‌آیند(Junqueira, 2003).

سازمان لوبولی کبد، دارای نمود عملکردی می‌باشد. برای مثال اگر بعضی از عملکردهای مربوط به کبد، که در بالا به آن اشاره شد،توسط تمام هپاتوسیت‌ها صورت پذیرد بقیه عملکردها به زیر مجموعه‌ای از هپاتوسیت‌ها محدود می‌شود. این ناحیه‌بندی برای عملکردها، توسط مکان هپاتوسیت‌ها داخل لوبول کبدی تعیین می‌گردد. این حالت، توزیع متابولیکی[14] نامیده می‌شود(Jungermann et al., 1989; Jungermann et al., 1996; Gebhardt et al., 1992; junqueira, 2003). هپاتوسیت‌هایی که در فواصل مختلفی از تریاد پورت قرار گرفته‌اند، تنوعی در خصوصیات ساختمانی، شیمی بافتی و بیوشیمیایی خود نشان می‌دهند. بعضی از آنزیم‌های کبدی در هپاتوسیت‌های اطراف تریاد پورتال[15] سنتز می‌شوند، در حالی که بقیه آنزیم‌ها در هپاتوسیت‌های اطراف ورید مرکزی[16] بیان می‌گردند. هپاتوسیت‌ها از دو الگو برای سنتز آنزیم‌های خود استفاده می‌کنند: الگوی توزیع تدریجی[17] والگوی وابسته به منطقه حضور آن‌ها[18]. ویژگی ذکر شده در بالا، این امکان را برقرار می‌کند که مسیرهای متابولیکی موجود در هپاتوسیت‌ها، بدون هم‌پوشانی، به نواحی خاصی از کبد محدود شوند. ناحیه‌بندی متابولیکی از ماهای آخر بارداری[19]، همزمان باغیر فعال شدن ژن‌هایی مثل AFP[20] و فعال شدن ژن‌هایی مثل PEPCK[21] آغاز می‌گردد(Spear et al., 2006).

---

14 - Metabolic zonation
15 - Periportal
16 - Pericentral
17 - Gradual zonation
18 - Zonal activity
19 - Perinatal
20 - Alpha-fetoprotein
21 - Phosphoenolpyruvate carboxykinase