Research on Medicine Original Article

The Quarterly journal of School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences 2021 ;Vol.44; No.4

Investigation of *in vitro* Functionality of Liver Microtissues Produced by Co-Culture of Mesenchymal Stem Cells, Endothelial, and Hepatic Cell Line

Sara Darakhshan[1], Ali Bidmeshki Pour[2], Reza Kowsari-Esfahan[3], Massoud Vosough[1], Leila Montazeri[3], Mohammad Hossein Ghanian [3], Mohammad Amin Hajari[3], Mohammad Ajoudanian [4,5], Abbas Piryaei [4,6*]

1 Department of Stem Cells and Developmental Biology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran

2 Department of Biology, Faculty of Science, Razi University, Kermanshah, Iran

3 Department of Cell Engineering, Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran

4 Department of Tissue Engineering and Applied Cell Sciences, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

5 Vista Cell Farmed Co., Tehran, Iran

6 Department of Biology and Anatomical Sciences, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: 2019/11/28 Accept:2019/12/29)

Abstract

Background: *There is an urgent need for reliable in vitro liver models to assess the mechanisms of human diseases, and impact of newly developed drugs or toxins. It was previously shown that co-culture of hepatocytes with non-parenchymal cells and presence of extracellular matrix (ECM) improve the in vitro functionality of hepatocytes. The aim of the present study was to develop a reproducible method for scalable generation of liver microtissues.*

Materials and Methods: *In the current experimental study, liver microtissues with 500 um diameter were generated through co-culturing of Huh-7, human mesenchymal stem cells, and human umbilical vein endothelial cells in a composite hydrogel of liver-ECM and alginate. Cell viability, capability for glycogen storage, and cytochrome P450 enzyme activity were evaluated on day 28. Hepatic-specific genes (ALB and SULT1A1) on days 1 and 14, and albumin and urea secretion on days 1 ,7 ,14 ,21, and 28 were assessed. Furthermore, the microtissue sensitivity to acute toxicity of Metformin, Diclofenac, and ethanol were investigated. Two-dimensional cultured Huh-7 was considered as control group.*

Results: *Most cells in the microtissues were alive up to day 28 and along with accumulation of glycogen, had cytochrome inducibility 7-fold more than the basic activity. In comparison to controls, ALB and SULT1A1 genes upregulated ($p<0.05$) on day 14. Also, albumin and urea secretion increased ($p<0.05$) in all sampling time in microtissues. Furthermore, microtissues had more sensitivity ($p<0.05$) to some concentrations of the drugs and ethanol, compared to the controls.*

Conclusion: *It seems that the liver microtissues may be considered as an appropriate and functional in vitro model for liver.*

Keywords: *In vitro liver model; Drug toxicity; Extracellular matrix; Tissue engineering; Mesenchymal stem cells*

**Correspondin Author:Abbas Piryaei*

Email: piryae@sbmu.ac.ir

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-08]

پژوهش در پزشکی
فصلنامه علمی پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
مقاله پژوهشی
دور ٤٤، شماره ٤، صفحات ٥٣٢ تا ٥٣٩

بررسی عملکرد برون تنی ریزبافت‌های کبدی تولید شده با روش هم‌کشتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی، اندوتلیالی و رده کبدی

سارا درخشان[۱]، علی بیدمشکی پور[۲]، رضا کوثری اصفهان[۳]، مسعود وثوق[۱]، لیلا منتظری[۳]، محمد حسین قانیان[۳]،
محمد امین هاجری[۳]، محمد آجودانیان[٤،٥]،عباس پیریایی[٤،٦*]

۱- گروه سلول های بنیادی و زیست شناسی تکوینی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده زیست شناسی و فناوری سلولهای بنیادی جهاددانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران
۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
۳- گروه مهندسی سلول، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده زیست شناسی و فناوری سلولهای بنیادی جهاددانشگاهی، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران
۴- گروه مهندسی بافت و علوم سلولی کاربردی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۵- شرکت ویستاسل فارمد، تهران، ایران
۶- گروه بیولوژی و علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۹/۰۷ تاریخ پذیرش مقاله:۱۳۹۸/۱۰/۰۸

چکیده:

سابقه و هدف: امروزه نیاز روزافزونی به مدل‌های آزمایشگاهی کبد برای بررسی مکانیسم بیماری‌های انسان، اثربخشی داروهای جدید و سم‌شناسی وجود دارد. مطالعه‌های پیشین نشان داده‌اند که هم کشتی هپاتوسیت‌ها با سلول‌های غیرپارانشیمی و حضور ماتریکس برون‌سلولی، به‌ویژه در شرایط کشت سه‌بعدی، می‌تواند سبب بهبود عملکرد هپاتوسیت‌ها شود. بنابراین هدف این مطالعه، ایجاد یک روش تکرارپذیر و مقرون‌به‌صرفه برای تولید انبوه ریزبافت‌های کبدی در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ریزبافت‌های کبدی (با قطر ۵۰۰ میکرومتر) با هم‌کشتی سلول‌های بنیادی مزانشیمی انسان، سلول‌های اندوتلیالی ورید بندناف انسان و سلول‌های رده کبدی *Huh-7*، در یک بستر هیدروژلی حاصل از ماتریکس برون‌سلولی کبد و آلژینات، تولید شدند. سپس زنده مانی سلول‌ها، قابلیت ذخیره گلیکوژن و فعالیت آنزیم سیتوکروم *P450* آن‌ها در روز ۲۸ ارزیابی شد. بیان ژن‌های اختصاصی کبدی (*ALB, SULT1A1*) در روز های ۱ و ۱۴ و میزان ترشح آلبومین و اوره در روزهای ۱، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ بررسی شد. علاوه‌برآن، حساسیت ریزبافت‌ها به سمّیت حاد دارویی ناشی از متفورمین و دیکلوفناک و همچنین اتانول ارزیابی شد. کشت دوبعدی سلول‌های *Huh-7* نیز به عنوان گروه کنترل لحاظ شد.

یافته‌ها: اکثر سلول‌های ریزبافت‌ها تا روز ۲۸ زنده بوده و ضمن ذخیره‌سازی گلیکوژن، قابلیت القاءپذیری سیتوکروم را تا هفت برابر فعالیت پایه داشتند. بیان ژن‌های *ALB* و *SULT1A1* در ریزبافت‌ها، در روز ۱۴ نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری *($p<0.05$)* یافته بود. ترشح آلبومین و اوره نیز در همه زمان‌های نمونه‌برداری، در ریزبافت‌های کبدی به طور معناداری *($p<0.05$)* بالاتر از گروه کنترل بود. علاوه‌برآن، ریزبافت‌های کبدی نسبت به گروه کنترل، به سمّیت دارویی و الکل (در برخی غلظت‌ها) حساسیت بیشتری *($p<0.05$)* را نشان می‌دادند.

نتیجه‌گیری: به‌نظر می‌رسد ریزبافت‌های کبدی حاصله می‌توانند به‌عنوان مدل آزمایشگاهی مناسب و دارای عملکرد برای کبد درنظر گرفته شود.

واژگان کلیدی: مدل برون تنی کبد، سمّیت دارویی، ماتریکس برون سلولی، مهندسی بافت، سلول بنیادی مزانشیمی

مقدمه:

باتوجه به اهمیت کبد در متابولیسم داروها و سموم وارد شده به بدن، نیاز مبرمی به ایجاد مدل‌های آزمایشگاهی مناسب برای این اندام وجود دارد. در واقع دستیابی به چنین مدل مناسبی می‌تواند در مسیر تولید و توسعه داروهای جدید و معرفی آن‌ها به بازار مصرف، بسیار مفید باشد(۱, ۲). زیرا مدل‌های موجود کنونی (شامل کشت‌های دوبُعدی سلولی و حیوان‌های آزمایشگاهی) که برای بررسی سمّیت ترکیب‌های

نویسنده مسئول: عبّاس پیریایی

پست الکترونیک: *piryae@sbmu.ac.ir*

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-08]

دارویی استفاده می‌شوند با نقایص و مشکلاتی همراه است(۳). ازجمله آنکه نتایج حاصل از بررسی داروها روی حیوان‌های آزمایشگاهی را نمی‌توان به انسان تعمیم داد(۴)، لذا لازم است که مطالعه‌های مربوطه در سیستم‌هایی برپایه نمونه‌های انسانی ارزیابی شود(۵).

منابع سلولی انسانی رایج که برای چنین مطالعه‌هایی استفاده می‌شوند، شامل کشت ابتدایی هپاتوسیت‌ها، سلول‌های شبه‌هپاتوسیتی و رده‌های سلولی کبدی هستند(۶). کشت ابتدایی هپاتوسیت‌های انسانی (به صورت تک لایه یا ساندویچ)، به عنوان منبع استاندارد سلول‌های کبدی برای مطالعه‌های دارویی به شمار می‌رود(۷). اما متاسفانه دسترسی به این سلول‌ها بسیار محدود است. ضمن آنکه این سلول‌ها در آزمایشگاه قابلیت تکثیر نداشته و به سرعت عملکردهای اختصاصی خود را از دست می‌دهند(۸). سلول‌های شبه‌هپاتوسیتی مشتق از سلول‌های بنیادی، می‌توانند به عنوان یک منبع نامحدود هپاتوسیت انسانی مطرح شوند. با این وجود، روند تولید این سلول‌ها بسیار هزینه‌بر و چالش‌انگیز است و سلول‌های به دست آمده نیز نابالغ بوده و ویژگی‌های هپاتوسیت‌های جنینی را بروز می‌دهند(۸). رده‌های سلولی کبدی با داشتن ویژگی‌هایی همچون شرایط نگه‌داری آسان، کشت مناسب و پایدار و در دسترس و ارزان بودن، می‌توانند به‌عنوان گزینه‌ای مناسب در تحقیق‌های دارویی باشند. اما این سلول‌ها عملکرد پایین و متابولیسم کاهش‌یافته‌ای نسبت به کشت ابتدایی هپاتوسیت‌ها دارند(۷). برای بهبود عملکرد این سلول‌ها باید ریزمحیط دربرگیرنده آن‌ها را تا حد ممکن به شرایط درون‌تنی نزدیک کرد؛ زیرا سلول‌ها در بدن در محیطی به مراتب پیچیده‌تر از شرایط کشت ساده آزمایشگاهی قرار گرفته‌اند. یکی از راهکارهای مورد استفاده، تغییر حالت کشت از دوبعدی به سه‌بعدی است. انواع کشت‌های سه بعدی شامل توده‌های سلولی (اسفرویید)، شبه‌اندام (ارگانویید) یا ریزبافت است. این ساختارها که اجتماع‌های سه‌بعدی سلولی هستند، با روش های گوناگون و همراه با داربست یا بدون داربست ایجاد می‌شوند(۸-۱۱). تاکنون نتایج رضایت بخشی از کشت هپاتوسیت‌ها به این حالت‌ها، حاصل شده است. پیش‌تر نشان داده شد، هنگامی که هپاتوسیت‌های ابتدایی به صورت اسفرویید کشت داده می‌شوند، به مدت ۲۸ روز فعال باقی مانده و بیان آنزیم‌های متابولیسمی و ترشح آلبومین در آن‌ها حفظ می‌شود(۱۱). همچنین نتایج سایر مطالعه‌ها نشان داده که کشت رده‌های سلولی کبدی مانند HepG2/C3A، و Huh-7 به صورت سه‌بعدی سبب بهبود عملکرد این سلول‌ها درمقایسه با حالت دوبعدی می‌شود(۸، ۱۰، ۱۲، ۱۳). از سوی دیگر ثابت شده که حضور سلول‌های حمایت‌کننده غیرپارانشیمی در کنار هپاتوسیت‌ها، سبب شباهت بیشتر مدل‌ها به بافت کبد و بهبود عملکرد هپاتوسیت‌ها می‌شود (۱۱، ۱۴، ۱۵). محققین نشان دادند هنگامی‌که هپاتوسیت‌ها با سلول‌های کوپفر و اندوتلیالی به شکل اسفرویید هم‌کشت می‌شوند، برای یک دوره ۳۵ روزه فعال مانده و به سموم کبدی به خوبی پاسخ می‌دهند(۱۶). علاوه بر حضور سلول‌های غیرپارانشیمی، وجود یک ماتریکس یا داربست نیز می‌تواند به شبیه شدن هرچه بیشتر ریزمحیطِ دربرگیرنده سلول‌ها به شرایط طبیعی کمک کند. همچنین سبب بهبود بقا، تکثیر، تمایز و قطبیت سلولی شود(۱۷). نتایج حاصل از یک تحقیق نشان داد که کلاژن نوع I و فیبرونکتین به شکل داربست سه‌بعدی (هر کدام با تاثیر متفاوتی) سبب افزایش ترشح آلبومین و بیان ژن‌های دخیل در عملکرد سلول‌های رده کبدی Huh-7.5 می‌شوند(۱۸).

در مطالعه پیشین گروه ما، از هم‌کشتی سلول‌های رده کبدی Huh-7 با سلول‌های اندوتلیال ورید بند ناف انسان (HUVEC) و سلول‌های بنیادی مزانشیمی (MSC) انسان، در هیدروژل حاصل از ماتریکس برون‌سلولی کبدی، شبه اندام‌های کبدی ساخته شدند. نتایج این تحقیق نشان داد که این مدل آزمایشگاهی کبدی نسبت به کشت دو بعدی سلول‌های Huh-7 عملکرد بهتری دارد(۲۰). از آنجا که فرآیند تولید شبه‌اندام‌های مذکور (که اندازه‌ای حدود ۱۵۰۰ میکرومتر داشتند) به صورت دستی و محدود انجام می‌شد، بنابراین هدف این مطالعه توسعه یک روش آسان، تکرارپذیر و کم‌هزینه (نسبت به مطالعه‌های مشابه) برای تولید انبوه ریزبافت‌های کبدی بود، تا بتوان آن‌ها را به طور موثرتری در آزمایش‌های برون‌تن استفاده کرد. این مطالعه درگروه بیولوژی و علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و پژوهشگاه رویان طراحی و انجام شد.

مواد و روش‌ها:

نوع مطالعه:

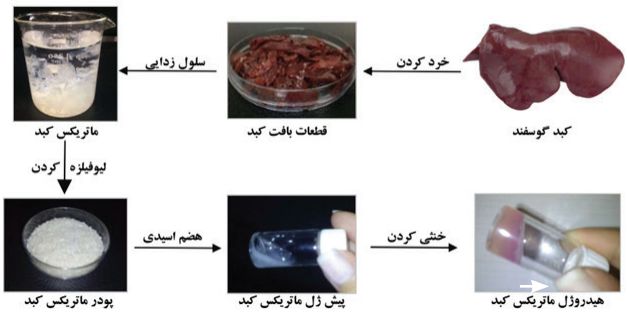
این مطالعه از نوع تجربی بوده و با انجام تست‌های آزمایشگاهی مرتبط، طراحی و اجرا شد. جمعیت مورد مطالعه شامل کشت دوبعدی سلول‌های Huh-7 و همچنین ریزبافت‌های حاصله بود که در سه تکرار زیستی بررسی می‌شدند. متغیر مستقل اصلی تحقیق نیز ریزبافت‌های کبدی تولید شده بود که با کشت دوبعدی سلول‌های Huh-7 مقایسه شد. فرضیه اصلی تحقیق آن بود که ریزبافت‌های حاصله، نسبت به کشت دوبعدی سلول‌های Huh-7، مدل آزمایشگاهی مناسب‌تری برای بافت کبد هستند. برای استفاده از سلول‌های انسانی، مصوبه کمیته اخلاق جهاد دانشگاهی (IR.ACECR.ROYAN.REC.1396.250) اخذ شده و بر اساس آن عمل شد.

کشت و نگه‌داری سلول‌ها:

رده سلولی Huh-7 از بانک سلول پژوهشگاه رویان تهیه و در محیط DMEM کشت داده شد. سلول‌های بنیادی مزانشیمی حاصل از سلول‌های بنیادی جنینی انسان (ES-MSC) نیز از بانک سلول پژوهشگاه رویان تهیه و در محیط α-MEM کشت داده شدند (این سلول‌ها از رده سلولی انسانی RH5 تمایز داده شده بودند(۱۹). سلول‌های اندوتلیال ورید بندناف انسان (HUVEC) از بندناف نوزادان تازه متولد شده، استخراج شد. برای این منظور، پس از اخذ رضایتنامه از والدین، بندناف‌ها از بانک خون بندناف رویان تهیه شد. جداسازی سلول‌های اندوتلیالی از بندناف با محلول کلاژناز یک درصد انجام و برای کشت آن ها از محیط کشت اختصاصی اندوتلیالی (EGM) استفاده شد. هر سه نوع محیط کشت یاد شده، با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، یک درصد پنی‌سیلین استرپتومایسین، و یک درصد ال-گلوتامین غنی شد. شرایط کشت شامل دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور مرطوب و غلظت ۵ درصد CO_2 بود. لازم به ذکر است که ریزبافت‌های تولیدشده نیز در محیط کشت ترکیبی شامل محیط‌های ذکرشده در بالا با نسبت ۳:۲:۱ (۳ برای DMEM، ۲ برای EGM، و ۱ برای α-MEM) کشت داده شدند(۲۰).

تهیه هیدروژل ماتریکس کبد:

برای سلول‌زدایی و تهیه ماتریکس کبد، ابتدا ۲۰۰ گرم کبد تازه گوسفند به صورت قطعه‌های دو میلی‌متری بریده شد و پس از چندین بار شست‌وشو با آب مقطر، از محلول یک درصد SDS (به مدت ۳۶ ساعت) و محلول یک درصد Triton-X100 (به مدت دو ساعت) برای حذف سلول‌ها استفاده شد. سپس ماتریکس سلول‌زدایی شده به مدت ۴۸ ساعت لیوفیلیزه شده و به صورت پودر درآمد. پودر لیوفیلیزه شده با آنزیم پپسین با غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و اسید استیک ۰/۵ مولار به مدت ۷۲ ساعت، محلول شد. سرانجام ترکیب حاصله توسط محلول ۵ نرمال سود (NaOH) خنثی شده و پیش ژل ماتریکس کبدی با غلظت ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد (شکل ۱) (۲۰).



شکل ۱- مراحل تهیه هیدروژل ماتریکس برون سلولی کبد.

بررسی کیفیت ماتریکس کبد:

از روش بافت‌شناسی استاندارد و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) و آزمون سنجش محتوای DNA برای بررسی میزان سلول‌های باقی‌مانده در بافت بهره گرفته شد. سنجش محتوای DNA با روش فنل‌کلروفرم انجام شد. به‌طور خلاصه،

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-08]

بافت کبد طبیعی و بافت سلول‌زدایی شده در معرض پروتئیناز K قرار گرفتند. پس از هضم سلولی، فنل-کلروفرم اضافه شده و سپس سانتریفیوژ انجام شد. رسوب به‌دست آمده با اتانول سرد شست‌وشو داده و خشک شد. سپس به این رسوب آب مقطر اضافه شده و میزان جذب آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر خوانده شد. از رنگ‌آمیزی تری‌کروم ماسون برای بررسی کلاژن باقی‌مانده، و از رنگ‌آمیزی آلسیان بلو برای بررسی حفظ گلیکوزآمینوگلیکان‌ها در ماتریکس کبدی حاصله استفاده شد(۱۸, ۲۰).

تهیه هیدروژل آلژینات:

یک گرم پودر آلژینات (Alginic acid sodium salt, medium viscosity, Sigma) پس از استریل شدن با پرتوی فرابنفش، در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد تا محلول ۲ درصد آلژینات به دست آید(۲۱).

آماده‌سازی هیدروژل کامپوزیت و بررسی فراساختار آن:

به منظور تهیه هیدروژل کامپوزیت برای تولید ریز بافت‌ها، هیدروژل ماتریکس کبد (با غلظت شش میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و آلژینات (دو درصد) با نسبت مساوی با یکدیگر مخلوط و هموژن شد. بنابراین هیدروژل کامپوزیت حاصله ترکیبی از سه میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ماتریکس کبد و یک درصد آلژینات بود. ساختار سه‌بعدی و تخلخل هیدروژل کامپوزیت توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) بررسی شد. برای این منظور، یک نمونه هیدروژل کامپوزیت پس از ژل شدن، با گلوتارآلدهید ۴درصد به مدت دو ساعت فیکس شد، و پس از لیوفیلیزه شدن به مدت ۴۸ ساعت، توسط ذرات طلا پوشش دهی شده و با استفاده از میکروسکوپ الکترونی مشاهده و عکسبرداری شد(۲۲،۲۳).

تولید ریزبافت‌های کبدی:

ریزبافت‌ها با استفاده از سیستم تولیدکننده قطره با کمک جریان هوا (Air-driven droplet generator system) که در آزمایشگاه ساخته و راه‌اندازی شد، ایجاد شدند (شکل ۳ الف). این سیستم براساس دو جریان کار می‌کند: یکی جریان هوا و دیگری جریان سیال. به منظور ایجاد هیدروژل حاوی سلول (سیال)، سلول‌های Huh-7، HUVEC و MSC پس از تریپسینه شدن، با نسبت مشخص ۱:۲:۳ در هیدروژل کامپوزیت به صورت سوسپانسیون درآمده، و سوسپانسیون به‌دست آمده به یک سرنگ منتقل شد. این مخلوط تحت فشار پمپ سرنگی (Harvard apparatus, PHD Ultra) قرار گرفت تا جریان سیال برقرار شود. از سوی دیگر جریان هوا توسط یک کپسول هوا و مانومتر برقرار شد، تا جریان هیدروژل حاوی سلول‌ها را در فواصل منظم قطع کرده و قطره‌های سیال (ریزبافت‌ها) را با قطر مشخص ایجاد کند. این قطره‌ها بلافاصله به درون حمام کلرید کلسیم (با غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد) وارد شده و با ژل شدن کامپوزیت، به صورت ساختارهای منسجم در می‌آمدند. ریزبافت‌ها حاصله پس از شست‌وشو، به مدت ۲۸ روز در محیط کشت ترکیبی کشت داده می‌شدند و محیط کشت هر دو روز یک‌بار تعویض می‌شد(۲۰).

بررسی اندازه و ساختار بافت‌شناختی ریزبافت:

برای بررسی یک‌نواختی اندازه ریزبافت‌ها، ۲۴ ساعت پس از تولید، تعداد ۱۰۰ عدد از آن‌ها توسط میکروسکوپ فازکنتراست عکسبرداری شده و قطر آن‌ها اندازه‌گیری شد. برای بررسی ساختار بافت‌شناختی، تعدادی از ریزبافت‌ها در روز ۲۸ نمونه‌برداری شدند. نمونه‌ها پس از ثبوت و آماده‌سازی مرسوم، در پارافین قالب‌گیری شده و برش‌هایی با ضخامت شش میکرومتر تهیه شد. سرانجام برش‌ها با روش هماتوکسیلین-ائوزین و همچنین پریودیک اسید شیف (PAS) رنگ‌آمیزی شده و با میکروسکوپ نوری مطالعه شد. علاوه‌برآن، برای بررسی زنده‌مانی سلول‌ها در ریزبافت‌ها پس از گذشت ۲۸ روز، تعدادی از آن‌ها با رنگ‌آمیزی Live/Dead طبق دستورالعمل کیت (LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit, Invitrogen)، ارزیابی شد(۲۰).

بررسی فعالیت و القاپذیری آنزیم سیتوکروم CYP1A2:

برای این منظور از آزمون نورسنجی و از کیت P450-Glo™ Assay (Promega)، طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. در ابتدا میزان فعالیت پایه این آنزیم اندازه‌گیری شد. سپس برای القای فعالیت آنزیم، ریزبافت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در معرض غلظت ۵۰۰ میکرومولار ۳-متیل کولانترن (3-Methylcholanthrene, 3-MC) قرار گرفته و دوباره فعالیت آنزیم سنجیده شد تا قابلیت القاپذیری آنزیم ارزیابی شود. میزان شدت نور ناشی از متابولیت حاصل از فعالیت آنزیم توسط دستگاه لومینومتر (HTX Multi-Mode Microplate Reader, BioTek) اندازه‌گیری شد(۲۳).

بررسی بیان ژن‌های اختصاصی کبد:

RNAی سلولی با کیت RNeasy Mini Kit (QIAGEN) و طبق پروتکل مربوطه استخراج شد. دو میکروگرم RNA با کیت PrimeScriptTM RT reagent Kit (TAKARA)، رونویسی معکوس شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به صورت کمی با استفاده از SYBR® Premix Ex Taq™ II (TAKARA) و با دستگاه StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems) انجام شد. واکنش PCR برای دو ژن آلبومین (ALB) با توالی پرایمر F: cgctattagttcgttacacca و R: tttacaacatttgctgccca؛ و سولفورونیل ترانسفراز (SULT1A1) با تولی پرایمر F: gcaacgcaaaggatgtggca و R: tccgtaggacacttctccga انجام شد. میزان بیان ژن‌های هدف نسبت به ژن گلیسرآلدهید ۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) نرمال شد. کشت دوبعدی سلول‌های Huh-7 و بافت کبد انسانی بالغ به عنوان گروه‌های کنترل درنظر گرفته شدند(۲۰).

سنجش میزان ترشح آلبومین و تولید اوره:

برای بررسی میزان ترشح آلبومین و تولید اوره، محیط کشت ریزبافت‌ها در روزهای ۱، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ (به دنبال ۲۴ ساعت انکوباسیون) جمع‌آوری و تا زمان انجام آزمون در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. برای سنجش آلبومین از کیت الایزای انسانی (Bethyl Laboratories, Inc. E80-129) و برای سنجش میزان اوره تولیدشده، از کیت رنگ سنجی پارس آزمون طبق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. کشت دوبعدی سلول‌های Huh-7 به عنوان گروه کنترل انتخاب شد(۲۳).

بررسی‌های دارویی و سم‌شناسی:

برای بررسی امکان کاربرد ریزبافت‌ها برای آزمون‌های دارویی، آزمون سمیّت حاد و سمیّت وابسته به دوز و زمان اتانول انجام شد. برای بررسی سمیّت دارویی حاد، ابتدا ریزبافت‌ها به مدت ۴۸ ساعت با غلظت‌های متفاوت دو داروی دیکلوفناک و متفورمین (به عنوان داروهای مسموم کننده کبد) تیمار شدند. برای بررسی سمیّت وابسته به دوز و زمان نیز ابتدا ریزبافت‌ها برای دوره‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با غلظت‌های متفاوت اتانول تیمار شدند. پس از سپری شدن زمان تیمار دارویی و اتانول، از آزمون MTS برای بررسی میزان زنده‌مانی سلولی استفاده شد(۹, ۱۰).

محاسبات آماری:

برای تحلیل داده‌های کمی، ابتدا توزیع نرمال آن‌ها بررسی شد. داده‌هایی که توزیع نرمال داشتند با آزمون‌های پارامتریک One way ANOVA (برای مقایسه چند گروه) یا Student t-test (برای مقایسه دوگروه) بررسی شدند. داده‌هایی که توزیع نرمال نداشتند نیز با آزمون‌های ناپارامتریک Kruskal–Wallis (برای مقایسه چند گروه) یا Mann–Whitney (برای مقایسه دوگروه) آنالیز شدند. تمامی آزمایش‌ها حدقل با سه تکرار زیستی انجام شد، و نتایج به‌دست‌آمده به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شد. تفاوت‌های بین گروه‌ها در سطح $p \leq 0/05$ معنادار درنظر گرفته شد.

یافته‌ها:

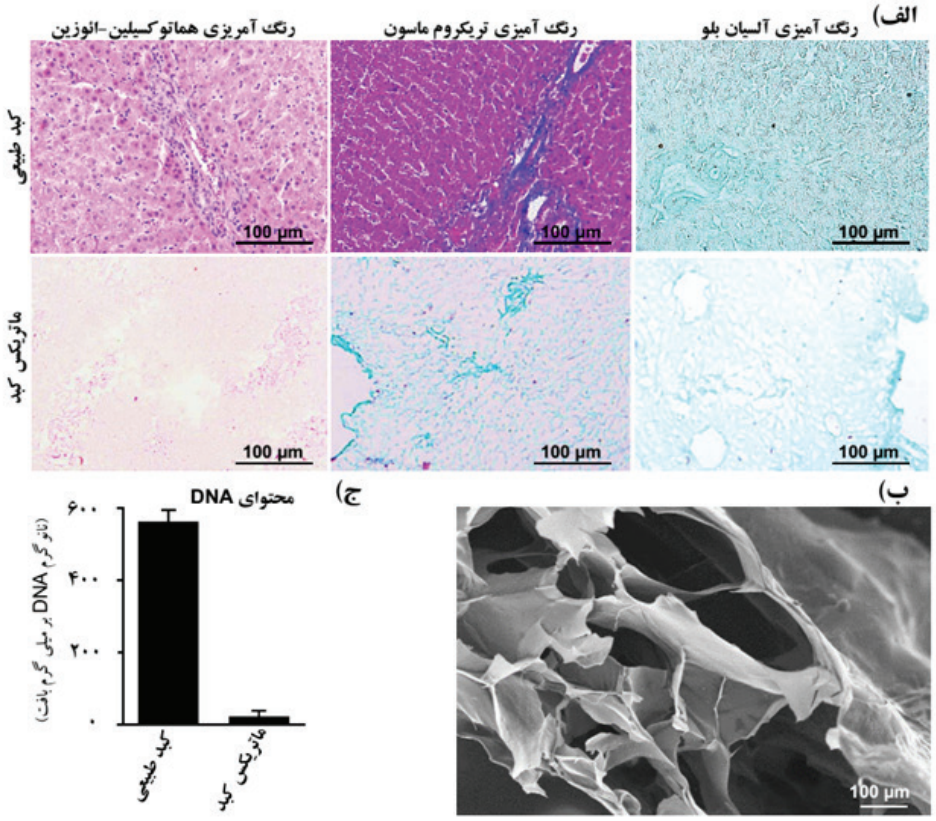
کیفیت ماتریکس کبد و فراساختار هیدروژل کامپوزیت:

نتایج به دست آمده از رنگ‌آمیزی H&E نشان داد که پس از پروسه سلول‌زدایی، تنها ماتریکس ائوزینوفیل کبد باقی مانده و همه سلول‌ها و بخصوص هسته‌ها به‌طور کامل حذف شده‌اند (شکل ۲ الف). آزمایش سنجش محتوای DNA نیز نشان داد که مقدار بسیار اندکی DNA در ماتریکس باقی مانده است (شکل ۲ ج). از سوی دیگر، بررسی برش‌های بافتی ماتریکس حاصله با رنگ آمیزی‌های تریکروم ماسون و آلسیان بلو حاکی از آن بود که ترکیب‌های کلاژنی و همچنین محتوای گلیکوزآمینوگلیکان‌های ماتریکس حاصله (پس از سلول‌زدایی) به خوبی حفظ شده است (شکل ۲ الف). این نتایج نشان داد که روش سلول‌زدایی استفاده شده در این مطالعه برای تولید ماتریکس کبد مناسب بوده است.

بررسی فراساختار هیدروژل کامپوزیت با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد که این هیدروژل دارای تخلخل مناسب برای حضور سلول‌ها است. ضمن آنکه انتظار می‌رود این منافذ به هم متصل امکان نفوذ محیط کشت و تبادلات

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-08]

متابولیت‌ها و گازهای تنفسی را برای سلول ها فراهم کند(شکل ۲ ب).



شکل ۲- بررسی کیفیت ماتریکس برون سلولی کبد و هیدروژل کامپوزیت. الف) بررسی ماتریکس برون سلولی کبد با رنگ‌آمیزی‌های هماتوکسیلین و ائوزین، تریکروم ماسون و آلسیان‌بلو برای بررسی کیفیت ماتریکس حاصله از نظر حضور سلول‌ها، ترکیب‌های کلاژن و گلیکوزآمینوگلیکان‌ها. ب) تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از ساختار هیدروژل کامپوزیت که تخلخل‌های آن را نشان می‌دهد. ج) نمودار سنجش محتوای DNA باقی‌مانده در ماتریکس برون سلولی کبد که نشان‌دهنده فرآیند سلول زدایی مناسب بافت کبد است (داده‌های کمّی حاصل از سه تکرار زیستی بوده و به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شده است).

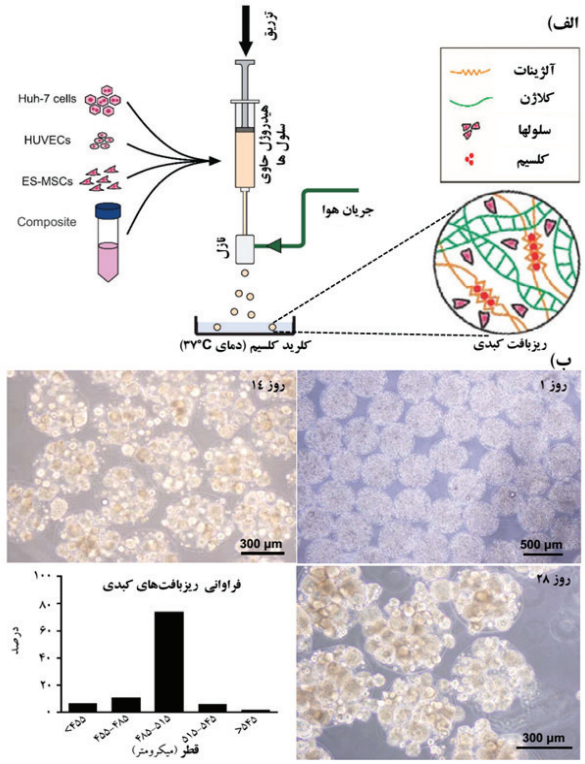
مشخصات ریزبافت‌های کبدی:

ایجاد ریزبافت‌ها با استفاده از سیستم تولیدکننده‌ی قطره، این امکان را فراهم می‌نمود تا تعداد انبوهی ریزبافت در زمانی اندک و با اندازه دلخواه تولید شود. بنابراین تنظیمات سیستم به گونه‌ای انجام شد تا ریزبافت‌ها با قطر ۵۰۰ میکرومتر ایجاد شوند (شکل ۳ الف). بررسی ریخت شناختی ریزبافت‌های تولیدشده در روزهای ۱، ۱۴ و ۲۸ حاکی از آن بود که سلول‌ها در ابتدا به صورت منفرد و پراکنده درون هیدروژل توزیع می‌شوند؛ اما با گذشت زمان، در اثر تکثیر سلولی و همچنین مهاجرت آن‌ها، توده‌های منسجم سلولی درون هر ریزبافت شکل می‌گیرد. ضمن آنکه اندازه ریزبافت‌ها در مدت زمان کشت ۲۸ روزه تقریبا ثابت بود. نتایج بررسی اندازه ریزبافت‌ها حاکی از آن بود که بیش از ۷۵ درصد آن‌ها قطری بین ۴۸۵ تا ۵۱۵ میکرومتر داشته و تعداد ریزبافت‌هایی که قطری کمتر یا بیشتر از این بازه داشتند، اندک بود. نمودار توزیع اندازه ریزبافت‌ها این همگنی را به خوبی نشان می‌دهد(شکل ۳ ب).

نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی Live/Dead در روز ۲۸ نشان داد که اکثر سلول های موجود در ریزبافت-ها زنده هستند و میزان بسیار اندکی سلول مرده در ساختار آن‌ها وجود دارد (شکل ۴ الف). بررسی ساختار بافت شناختی نیز حاکی از آن بود که درون هر ریزبافت چندین اجتماع سلولی تشکیل شده است (شکل ۴ ب). از طرفی رنگ‌آمیزی PAS نشان داد که هپاتوسیت‌های درون ریزبافت‌ها قابلیت سنتز و ذخیره‌سازی گلیکوژن را دارند (شکل ۴ ج). نتایج حاصل از بررسی عملکرد و القاءپذیری آنزیم CYP1A2 نیز حاکی از آن بود که نه تنها این آنزیم در ریزبافت‌ها فعال است، بلکه فعالیت آن تحت تیمار با القاکننده‌ی 3MC به طور معناداری (حدود هفت برابر) افزایش می‌یابد(شکل ۴ د).

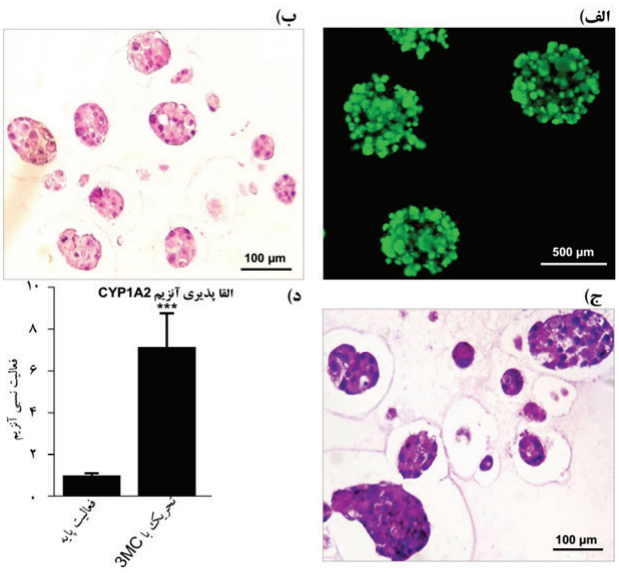
مقایسه ریزبافت‌های کبدی با کشت دوبعدی سلول Huh-7:

بررسی بیان ژن‌های ALB و SULT1A1 در روزهای یک و ۱۴ و مقایسه آن‌ها با کشت دوبعدی Huh-7 نشان داد که بیان هر دو ژن در ریز بافت‌ها در روز ۱۴ نسبت به کشت دوبعدی به‌طور معناداری افزایش می‌یابد ($p \leq ۰/۰۵$) (نمودار یک الف). علاوه‌برآن، نتایج حاصل از بررسی میزان ترشح آلبومین و تولید اوره حاکی از آن بود که ریزبافت‌ها با گذشت زمان مقادیر بیشتری آلبومین و اوره را تولید و ترشح می‌کنند. ضمن آنکه میزان این افزایش در مقایسه با کشت دوبعدی Huh-7 به طور معناداری تفاوت داشت (نمودار ۱ ب).

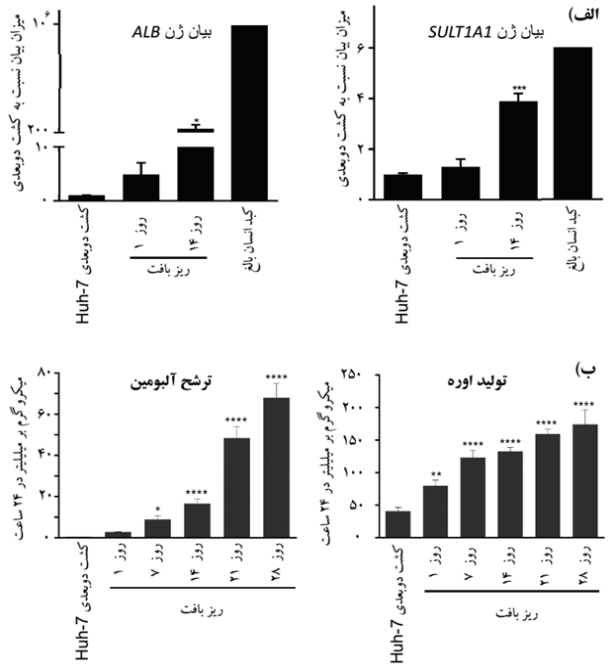


شکل ۳- تهیه ریزبافت‌های کبدی و بررسی‌های آن. الف) شکل شماتیکی که روش تولید ریزبافت‌های کبدی را نشان می دهد. ب) تصویر میکروسکوپ فازکنتراست ریزبافت‌ها در روزهای ۱، ۱۴ و ۲۸ پس از تولید و نمودار توزیع اندازه ریزبافت‌ها در زمان تولید، که همگنی بالای آن‌ها را نشان می دهد (داده‌های کمّی حاصل از شمارش ۱۰۰ ریزبافت است).

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-08]



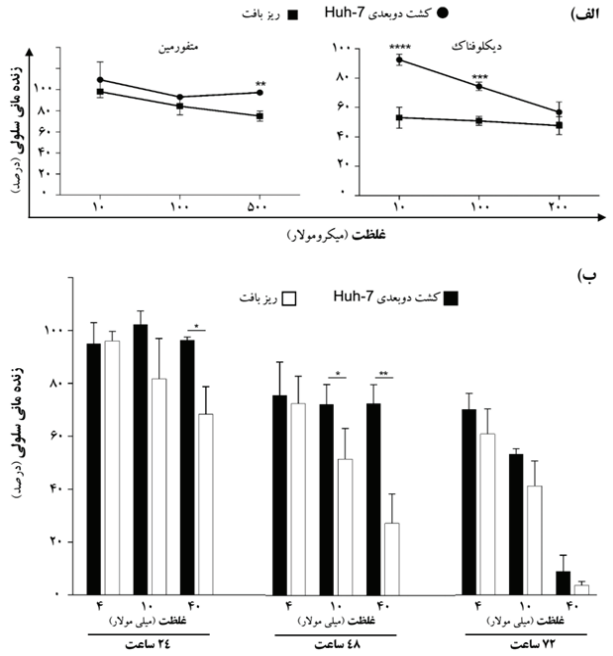
شکل ۴- بررسی ریزبافت‌های کبدی در روز ۲۸ پس از تولید. الف) تصویر رنگ‌آمیزی Live/Dead برای ارزیابی میزان زنده‌مانی سلول‌ها که نشان‌دهنده زنده بودن اکثر سلول ها (سبز) و مرگ (قرمز) تعداد بسیار اندکی از آن‌هاست. ب) برش بافتی ریزبافت با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین که ساختار دورنی آن را نشان می‌دهد. ج) برش بافتی ریزبافت با رنگ‌آمیزی PAS برای بررسی توانایی سنتز و ذخیره‌سازی گلیکوژن در ریزبافت‌ها. رنگ ارغوانی سیتوپلاسم حاکی از ذخیره گلیکوژن در سلول‌هاست. د) نمودار بررسی آنزیم سیتوکروم CYP1A2، که حاکی از فعالیت پایه و همچنین قابلیت القاپذیری آن با ماده 3MC است. نتایج کمی حاصل از سه تکرار زیستی بوده و به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده‌است. ***p ≤ ۰/۰۰۱



نمودار ۱. بررسی بیان ژن‌ها و عملکردهای اختصاصی کبدی در ریزبافت‌ها. الف) نمودارهای بیان ژن‌های آلبومین (ALB) و سولفورونیل ترانسفراز (SULT1A1) در ریزبافت‌ها، در مقایسه با کشت دوبعدی سلول‌های Huh-7 به عنوان گروه کنترل.

ب) نمودارهای میزان ترشح آلبومین و تولید اوره در ریزبافت‌ها، در مقایسه با کشت دوبعدی سلول‌های Huh-۷ به عنوان گروه کنترل. نتایج کمی حاصل از سه تکرار زیستی بوده و به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده‌اند. (*p ≤ ۰/۰۵، **p ≤ ۰/۰۰۱، ***p ≤ ۰/۰۰۱، ****p ≤ ۰/۰۰۰۱).

نتایج آزمون بررسی سمیّت حاد دارویی و آزمون سمیّت اتانول و ارزیابی میزان حساسیت سلول‌ها به این سموم در شکل پنج نشان داده شده است. بررسی سمیّت حاد دارویی نشان داد که ریزبافت‌ها در غلظت ۵۰۰ میکرومولار متفورمین و همچنین در غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ میکرومولار دیکلوفناک، نسبت به کشت دوبعدی Huh-7 حساسیت بیشتری داشته و به همین خاطر میزان زنده‌مانی سلول‌های آن‌ها به طور معناداری کاهش می‌یابد (نمودار ۲ الف). در آزمون سمّیت وابسته به دوز و زمان اتانول نیز مشخص شد هنگامی که ریزبافت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در معرض غلظت ۴۰ میلی مولار اتانول قرار می‌گیرند، نسبت به کشت دوبعدی Huh-7 حساسیت بیشتری به سمیّت آن بروز می‌دهند. همچنین تیمار ریزبافت‌ها به مدت ۴۸ ساعت با دوزهای ۱۰ و ۴۰ میلی‌مولار اتانول، موجب شد که حساسیت آن‌ها نسبت به کشت دوبعدی Huh-7 به‌طور معناداری افزایش یابد. به نحوی که در دوز ۴۰ میلی‌مولار اتانول، پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، زنده‌مانی سلول‌های ریزبافت‌ها به ترتیب به ۶۸، ۲۳، و ۴ درصد کاهش پیدا کرد. از سوی دیگر، میزان زنده‌مانی ریزبافت‌ها پس از ۷۲ ساعت قرار گرفتن در معرض غلظت‌های ۴، ۱۰ و ۴۰ میلی‌مولار اتانول به ترتیب به ۶۱، ۴۱ و ۴ درصد کاهش یافت. از این داده‌ها می‌توان نتیجه گرفت که تاثیر سمّیت کبدی اتانول وابسته به زمان تیمار و میزان غلظت آن بوده و ریزبافت در مقایسه با کشت دوبعدی Huh-7 پاسخ بهتری به این فرآیند بروز می‌دهند (نمودار ۲ ب). بنابراین با وجود ساختار سه‌بعدی ریزبافت‌ها می‌توان ازآن‌ها در مطالعه‌های سم‌شناسی به عنوان مدل آزمایشگاهی مناسب‌تر استفاده کرد.



نمودار ۲. بررسی‌های دارویی و سمیّت ریزبافت‌های کبدی. الف) بررسی پاسخ به سمیّت حاد دو داروی متفورمین و دیکلوفناک در دوزهای متفاوت به دنبال تیمار ۴۸ ساعته با آن‌ها. ب) بررسی پاسخ ریزبافت‌ها به سمیّت وابسته به دوز و زمان اتانول. در همه این بررسی‌ها (الف و ب)، کشت دوبعدی سلول‌های Huh-7 به عنوان گروه کنترل درنظر گرفته شد. میزان زنده‌مانی کمتر سلول‌های ریزبافت‌ها نشان‌دهنده حساسیت بیشتر آن‌ها به سمیت دارویی است. نتایج کمی حاصل از سه تکرار زیستی بوده و به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده‌اند. (*p ≤ ۰/۰۵، **p ≤ ۰/۰۰۱، ***p ≤ ۰/۰۰۱، ****p ≤ ۰/۰۰۰۱).

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-08]

بحث:

تاکنون مطالعه‌های متعددی در باره ایجاد مدل‌های آزمایشگاهی مناسب برای بافت‌های مختلف بدن انجام شده و نتایج حاکی از آن است که کشت سه بعدی و استفاده از داربست مطلوب سبب شباهت هرچه بیشتر این مدل‌ها به بافت طبیعی می‌شود(۱۱، ۱۹، ۱۲۰). بنابراین در مطالعه حاضر برای تولید ریزبافت‌های کبدی از یک هیدروژل کامپوزیت که ترکیبی از ماتریکس برون سلولی کبد و آلژینات بود، استفاده شد. یکی از اجزای مهم ماتریکس برون سلولی کبد گلیکوزآمینوگلیکان‌ها هستند که با ذخیره‌سازی فاکتورهای رشد و سیتوکاین‌های اختصاصی بافتی و همچنین با برقراری بعضی مسیرهای پیام‌رسانی سبب سازماندهی ساختاری و عملکرد بهتر بافت کبد می‌شوند(۲۲). از سوی دیگر، حضور کلاژن‌ها سبب حفظ ریزمحیط بافت کبد شده، و علاوه‌بر بهبود انسجام بافتی، اتصالات سلولی و تنظیم پارامترهای مکانیکی، میزان زنده‌مانی و عملکرد هپاتوسیت‌ها را افزایش می‌دهد(۱۸). Ramaiahgari و همکارانش در سال ۲۰۱۴ دریافتند که سلول‌های HepG2 زمانی‌که با ماتریژل به شکل سه‌بعدی کشت داده می-شوند، ساختارهای شبیه کانالیکول‌های صفراوی تشکیل می‌دهند و بسیاری از ویژگی‌های هپاتوسیتی از دست رفته را بازمی‌یابند(۱۰). در مطالعه Yamada و همکارانش در سال ۲۰۱۶ نیز نشان داده شد که کشت هپاتوسیت‌ها به شکل اسفرویید و در حضور گوی‌های کلاژن نوع I (که هم اندازه سلول بودند) سبب افزایش زنده‌مانی و بهبود ترشح آلبومین می‌شود (۲۳). در یک مدل کبد-روی-چیپ که توسط Bhise و همکارانش در سال ۲۰۱۶ تولید شد، اسفرویید‌های سلول‌های HepG2/C3A که با ژلاتین متاکریلویل انکپسوله شدند، به مدت ۳۰ روز عملکردشان را به خوبی حفظ کردند(۸). آلژینات (به عنوان جزء دیگر هیدروژل کامپوزیت که در این مطالعه استفاده شد) یک پلی‌ساکارید طبیعی است، که به دلیل ویژگی‌های آب‌دوستی، زیست‌سازگاری، عدم ایجاد واکنش‌های ایمنی، و مهم‌تر از همه ژل شدن سریع با یون‌های کلسیم، می‌تواند گزینه مناسبی برای انکپسوله کردن سلول‌ها باشد. پیش‌تر در سال ۲۰۰۳، Dvir-Ginzberg و همکارانش نشان دادند که هپاتوسیت‌های موشی انکپسوله شده در هیدروژل آلژینات، زنده‌مانی بهتری داشته و عملکردشان (از جمله سنتز فیبرونکتین) افزایش می‌یابد(۲۱). در واقع، آلژینات پس از ژل شدن، یک شبکه به هم متصل با منافذ فراوان ایجاد می‌کند که اجازه زنده ماندن هپاتوسیت‌ها و حفظ عملکرد را به آن‌ها می‌دهد(۲۱). این یافته‌های پیشین نشان می دهد که شکل، ساختار و نوع ترکیب ریزمحیط اطراف، تاثیر مهمی بر عملکرد و رفتارهای سلولی دارد(۲۴). در مطالعه حاضر، بررسی ساختار داربست کامپوزیت تایید کرد که ساختار سه بعدی و متخلخل آن می‌تواند زمینه تغذیه، تحرک، مهاجرت و تکثیر مناسب را برای سلول‌های ریزبافت حاصله مهیا کند. علاوه‌برآن، چنین داربستی سبب شد که ریزبافت‌ها به طور انبوه و با یک روش آسان، کنترل شده و تکرارپذیر در آزمایشگاه ایجاد شوند. مهم‌تر ازآن، نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر تایید کرد که این شیوه کشت سه بعدی به صورت ریزبافت سبب می‌شود تا عملکرد سلول‌های Huh-7 (ازجمله، میزان ترشح آلبومین و تولید اوره، به عنوان دو شاخص مهم کبدی) افزایش یابد. همان‌طور که Sainz و همکارانش در سال ۲۰۰۹ نشان دادند، سلول‌های Huh-7 به شکل اسفرویید بیان بهتری از شاخص‌های قطبیت سلولی و اتصالات محکم را نسبت به حالت کشت دوبعدی نشان می‌دهند(۱۳). علاوه بر آن Khetani و همکارانش در سال ۲۰۱۵ گزارش کردند که کشت سلول‌های HepG2/C3A به شکل اسفرویید‌های کبدی سبب بهبود ترشح آلبومین، افزایش فعالیت متابولیک و افزایش بیان آنزیم‌های فازهای یک و دو متابولیسم کبدی، نسبت به حالت کشت دوبعدی می‌شود(۹). در مطالعه حاضر بیان دو ژن مهم کبدی، آلبومین و SULT1A1 بررسی شد. آلبومین به عنوان یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های ترشحی کبد و SULT1A1 یکی از آنزیم‌های فاز دو متابولیسم است که در متابولیزه کردن طیف وسیعی از ترکیب‌های اندوژن و اگزوژن نقش دارد(۲۶). افزایش بیان این دو ژن (هم‌راستا با سایر یافته‌های این تحقیق و نتایج سایر محققان) نشان از بهبود وضعیت عملکرد سلول‌های Huh-7 در مدل ریزبافت داشت.

در اکثر مدل‌های آزمایشگاهی کبدی، تاکید بر هپاتوسیت‌ها به عنوان سلول پارانشیمی کبد است، زیرا فراوان‌ترین سلول در بافت کبد بوده و عمده وظایف کبد را به عهده دارد. اما واقعیت این است که کبد اندامی با ساختار پیچیده است که سلول‌های غیرپارانشیمی هم در آن حضور داشته و نقش مهمی در حفظ ساختار و عملکرد آن دارند. از این‌رو، یک مدل آزمایشگاهی مناسب و عملکردی، مدلی است که در کنار هپاتوسیت‌ها، حاوی سایر سلول‌های مناسب نیز باشد. Gaskell و همکارانش در سال ۲۰۱۶ نشان دادند که وجود سلول‌های اندوتلیالی سینوزوئیدی در کنار هپاتوسیت‌های موشی، سبب حفظ عملکرد CYPها و افزایش بیان شاخص‌هایی مانند آلبومین و ترانسفرین تا ۳۷ روز می‌شود(۲۷). سلول‌های ستاره‌ای نقش مهمی در هموستاز کبد دارند. نتایج مطالعه Kasuya و همکارانش در سال ۲۰۱۱ نشان داد که این سلول‌ها ارتباط بین هپاتوسیت‌ها و سلول‌های اندوتلیالی را برقرار می‌کنند(۲۵). همچنین Kostadinova و همکارانش با هم‌کشتی هپاتوسیت‌ها، سلول‌های اندوتلیالی، سلول‌های کوپفر و سلول‌های ستاره‌ای مدلی را ساختند که به مدت سه ماه عملکرد خود را حفظ کرد. این بهبود عملکرد شامل بیان آلبومین و فیبرینوژن، تولید اوره و نیز القاپذیری CYPها بود(۲۶).

بررسی اثرهای سمّی ترکیب‌های دارویی و ارزیابی میزان حساسیت سلولی به آن‌ها یکی از اصلی‌ترین کاربردهای مدل‌های کبدی است. بنابراین در مطالعه حاضر، بررسی سمیّت حاد دارویی و آزمون سمیّت وابسته به زمان و دوز اتانول نیز انجام داده شد. پیش‌تر Ramaiahgari و همکارانش در سال ۲۰۱۴ نشان دادندکه اسفرویید‌های HepG2 در مقایسه با گروه کنترل کشت دوبعدی، حساسیت بیشتری به سمیت کبدی داروها از خود نشان می‌دهند(۱۰). در مطالعه حاضر برای بررسی حساسیت ریزبافت‌ها به سمیت دارویی از آزمون زنده‌مانی سلولی استفاده شد. درحالی‌که Skardal و همکارانش در سال ۲۰۱۵، ابتدا با انکپسوله کردن سلول‌های HepG2 در هیدروژل هیالورونیک‌اسید و ژلاتین، سازه‌های کبدی را تولید کردند. سپس آن‌ها را با غلظت-های ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌مولار اتانول تیمار کرده و تاثیر سمیت را با بررسی میزان تولید آلبومین و اوره ارزیابی کردند. آن‌ها نشان دادند که میزان تولید و ترشح این شاخص‌ها به‌صورت وابسته به دوز اتانول کاهش یافته و از سویی دیگر شاخص‌های آسیب سلولی افزایش می‌یابد(۲۷).

یکی از شاخص‌های تعیین کننده عملکرد هپاتوسیت‌ها، میزان فعالیت آنزیم‌های سیتوکروم P450 و همچنین توان القاپذیری آن‌هاست. بیان و فعالیت بسیار پایین این آنزیم‌ها در رده‌های سلولی هپاتومایی سبب شده تا استفاده از آن‌ها در مطالعه‌های دارویی با مشکل جدی مواجه شود(۲۸). برای غلبه بر این مشکل باید عملکرد این آنزیم‌ها را در رده‌های سلولی بهبود بخشید. مطالعه‌های پیشین نشان داده که کشت رده‌های سلولی به صورت سه‌بعدی می‌تواند میزان فعالیت سیتوکروم‌ها را نسبت به حالت دوبعدی به میزان قابل توجهی افزایش دهد(۱۰, ۲۹). بنابراین در مطالعه حاضر نیز می‌توان بیان کرد که نتایج رضایت‌بخشی که از مطالعه‌های دارویی در ریزبافت‌ها به دست آمد، با بهبود عملکرد آنزیم‌های سیتوکرومی که قابلیت القاپذیری نیز داشتند، ارتباط دارد.

اهمیت بالای کبد برای حفظ هموستاز بدن و نقش این اندام در متابولیسم داروها، موجب شده تا یافتن مدل‌های جدید برای مطالعه بیولوژی این اندام، بررسی اثر داروها و مدل‌سازی بیماری‌های کبدی به اهداف ویژه‌ای بدل شود. بنابراین تاکنون مدل‌های کشت دوبعدی، اسفرویدی، ریزبافت، یا ارگانوییدی متعددی ایجاد شده و سعی شده تا عملکرد هپاتوسیتی بهبود داده شود، اما اکثر این روش‌ها نیازمند وسایل، امکانات و سلول‌های خاصی هستند، گران قیمت بوده و تکرارپذیر نیستند، یا امکان تولید در مقیاس انبوه را ندارند. به دلیل همین مشکلات، این مدل‌ها هنوز نتوانسته‌اند به خوبی وارد عرصه صنعت دارویی شوند. مهم‌ترین نقطه قوت این مطالعه، دست‌یابی به یک روش آسان، تکرارپذیر، کم‌هزینه (نسبت به رویکردهای مشابه) و سازگار با تولید انبوه، برای تولید ریزبافت‌های کبدی است. باتوجه به افزایش چشمگیر عملکرد ریزبافت‌های کبدی حاصله (نسبت به کشت دوبعدی سلولی) به نظر می‌رسد می‌توان از آن‌ها در مطالعه‌های آزمایشگاهی، ازجمله بررسی سمیت دارویی استفاده کرد. با این وجود نقطه ضعف این مطالعه استفاده از رده سلولی سرطانی کبدی است. بنابراین پیشنهاد می‌شود برای دست‌یابی به مدل کبد آزمایشگاهی انسانی مناسب‌تر، این رده سلولی توسط هپاتوسیت‌های طبیعی انسان یا هپاتوسیت‌های تمایز یافته از سلول های بنیادی جایگزین شود.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-08]

تشکر و قدردانی:
هزینه‌های مربوط به انجام این تحقیق توسط پژوهشگاه رویان (به شماره گرنت ۹۶۰۰۰۱۶۰)، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی (به شماره گرنت ۱۱۵۴۶)، و موسسه نیماد (به شماره گرنت ۹۴۰۲۳۱) تامین شد. همچنین نویسندگان، مراتب سپاسگزاری خود را از خانم‌ها مونا ساحلی، زهرا فرزانه، فاطمه نوبخت و مهشاد درّاج و آقایان حسین بهاروند، آرش خجسته، کاظم شریفی، فرشاد حسینی شیرازی، مصطفی نجاراصل، پیام طاهری، پیام بایی و حسن انصاری، برای همکاری وکمک‌های علمی و عملی ایشان اعلام می‌دارند.

منـابع:

1. Watkins PB, Seeff LB. Drug-induced liver injury: summary of a single topic clinical research conference. Hepatology. 2006;43(3):618-31.
2. Navarro VJ, Senior JR. Drug-related hepatotoxicity. N Engl J Med. 2006;354(7):731-9.
3. Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL. Principles of early drug discovery. Br J Pharmacol. 2011;162(6):1239-49.
4. Graham MJ, Lake BG. Induction of drug metabolism: species differences and toxicological relevance. Toxicology. 2008;254(3):184-91.
5. Kaplowitz N. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. Nat Rev Drug Discov. 2005;4(6):489-99.
6. Lin JH. CYP induction-mediated drug interactions: in vitro assessment and clinical implications. Pharm Res. 2006;23(6):1089-116.
7. Hewitt NJ, Lechon MJ, Houston JB, Hallifax D, Brown HS, Maurel P, et al. Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies. Drug Metab Rev. 2007;39(1):159-234.
8. Bhise NS, Manoharan V, Massa S, Tamayol A, Ghaderi M, Miscuglio M, et al. A liver-on-a-chip platform with bioprinted hepatic spheroids. Biofabrication. 2016;8(1):014101.
9. Khetani SR, Berger DR, Ballinger KR, Davidson MD, Lin C, Ware BR. Microengineered liver tissues for drug testing. J Lab Autom. 2015;20(3):216-50.
10. Ramaiahgari SC, den Braver MW, Herpers B, Terpstra V, Commandeur JN, van de Water B, et al. A 3D in vitro model of differentiated HepG2 cell spheroids with improved liver-like properties for repeated dose high-throughput toxicity studies. Arch Toxicol. 2014;88(5):1083-95.
11. Bell CC, Hendriks DF, Moro SM, Ellis E, Walsh J, Renblom A, et al. Characterization of primary human hepatocyte spheroids as a model system for drug-induced liver injury, liver function and disease. Sci Rep. 2016;6:25187.
12. Chang TT, Hughes-Fulford M. Monolayer and spheroid culture of human liver hepatocellular carcinoma cell line cells demonstrate distinct global gene expression patterns and functional phenotypes. Tissue Eng Part A. 2009;15(3):559-67.
13. Sainz B, Jr., TenCate V, Uprichard SL. Three-dimensional Huh7 cell culture system for the study of Hepatitis C virus infection. Virol J. 2009;6:103.
14. Wagner I, Materne EM, Brincker S, Sussbier U, Fradrich C, Busek M, et al. A dynamic multi-organ-chip for long-term cultivation and substance testing proven by 3D human liver and skin tissue co-culture. Lab Chip. 2013;13(18):3538-47.
15. Ramachandran SD, Schirmer K, Munst B, Heinz S, Ghafoory S, Wolfl S, et al. In Vitro Generation of Functional Liver Organoid-Like Structures Using Adult Human Cells. PLoS One. 2015;10(10):e0139345.
16. Messner S, Agarkova I, Moritz W, Kelm JM. Multi-cell type human liver microtissues for hepatotoxicity testing. Arch Toxicol. 2013;87(1):209-13.
17. Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. Science. 2009;326(5957):1216-9.
18. Wang Y, Kim MH, Shirahama H, Lee JH, Ng SS, Glenn JS, et al. ECM proteins in a microporous scaffold influence hepatocyte morphology, function, and gene expression. Sci Rep. 2016;6:37427.
19. Lotfinia M, Kadivar M, Piryaei A, Pournasr B, Sardari S, Sodeifi N, et al. Effect of Secreted Molecules of Human Embryonic Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells on Acute Hepatic Failure Model. Stem Cells Dev. 2016;25(24):1898-908.
20. Saheli M, Sepantafar M, Pournasr B, Farzaneh Z, Vosough M, Piryaei A, et al. Three-dimensional liver-derived extracellular matrix hydrogel promotes liver organoids function. J Cell Biochem. 2018;119(6):4320-33.
21. Dvir-Ginzberg M, Gamlieli-Bonshtein I, Agbaria R, Cohen S. Liver tissue engineering within alginate scaffolds: effects of cell-seeding density on hepatocyte viability, morphology, and function. Tissue Eng. 2003;9(4):757-66.
22. De Colli M, Massimi M, Barbetta A, Di Rosario BL, Nardecchia S, Conti Devirgiliis L, et al. A biomimetic porous hydrogel of gelatin and glycosaminoglycans cross-linked with transglutaminase and its application in the culture of hepatocytes. Biomed Mater. 2012;7(5):055005.
23. Piryaei A, Valojerdi MR, Shahsavani M, Baharvand H. Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells on nanofibers and their transplantation into a carbon tetrachloride-induced liver fibrosis model. Stem Cell Reviews and Reports. 2011;7(1):103-18.
24. Discher DE, Janmey P, Wang YL. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. Science. 2005;310(5751):1139-43.
25. Kasuya J, Sudo R, Mitaka T, Ikeda M, Tanishita K. Hepatic stellate cell-mediated three-dimensional hepatocyte and endothelial cell triculture model. Tissue Eng Part A. 2011;17(3-4):361-70.
26. Kostadinova R, Boess F, Applegate D, Suter L, Weiser T, Singer T, et al. A long-term three dimensional liver co-culture system for improved prediction of clinically relevant drug-induced hepatotoxicity. Toxicol Appl Pharmacol. 2013;268(1):1-16.
27. Skardal A, Devarasetty M, Soker S, Hall AR. In situ patterned micro 3D liver constructs for parallel toxicology testing in a fluidic device. Biofabrication. 2015;7(3):031001.
28. Schwartz RE, Fleming HE, Khetani SR, Bhatia SN. Pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells. Biotechnol Adv. 2014;32(2):504-13.
29. Gaskell H, Sharma P, Colley HE, Murdoch C, Williams DP, Webb SD. Characterization of a functional C3A liver spheroid model. Toxicol Res (Camb). 2016;5(4):1053-65.

[Downloaded from pejouhesh.sbmu.ac.ir on 2026-11-08]