

## مکان رنگهای صفر ا دوست دریاخته‌های کبدی\*

دکتر رضا نفیسی

گروه شیمی پزشکی - دانشکده پزشکی - دانشگاه تهران

«مقدمه»

میکروسکپ الکترونیک تحولی عظیم در دانش یاخته‌شناسی پدید آورد و چهره پنهان سیتوپلاسم یاخته‌ای که در آغاز قرن ما دستگاه یکنواختی بشمار می‌آید، در سالهای اخیر با تشکیلات درهم پیچیده خود آشکار شد و بیرکت استفاده از اولتراساترفیوژ مجزا ساختن عناصر مختلف یاخته‌ای از یکدیگر امکان پذیر گردید و پژوهندگان توانستند ترکیب شیمیایی و فعالیت آنزیمی هر یک از این عناصر را مطالعه کنند و ارتباط حیاتی و فیزیولوژیک آنان را با یکدیگر کم یا بیش مشخص سازند .

اکنون میدانیم که سراسرسیتوپلاسم یاخته‌ای را تشکیلات تشریحی که به «تورینه درون پلاسمایی»<sup>۱</sup> موسومند فرا گرفته‌اند [۳۸، ۳۹]. تورینه‌های مذکور که از دولا به تشکیل یافته‌اند از سویی به غشاء یاخته‌ای پیوند دارند و پس از آنکه سراسرسیتوپلاسم را پیمودند، دولا به آنها از یکدیگر مجزا میشوند و هسته یاخته را در خود میگیرند و بعبارت دیگر بمشأه هسته مبدل میشوند [۵۰] و جمعی از پژوهندگان بر آنند [۵۱، ۴۲] که تورینه درون پلاسمایی از غشاء هسته بوجود می‌آید و از همینجاست که در همه یاخته‌های هسته‌دار مشاهده میشود. در حالیکه در کویچه‌های سرخ بالغ دیده نشده است .

مدارك متعدد نشان میدهد که تورینه‌های درون پلاسمایی، مجاری درون یاخته‌ای هستند که از این مجاری مواد شیمیایی بدرون یاخته‌را می‌بند و آنزیم‌ها و ذرات پروتئینی که در یاخته ساخته

\* - این تحقیقات در بخش شیمی پاتولوژیک دانشکاه لیدز انجام گرفت و بسزاست که در اینجا مراتب سپاسگزاری و امتنان خود را از استاد بخش مذکور Prof. G. H. Lathe که در جریان اجرای این طرح و طرح‌های دیگر همیشه مشوق و راهنمای نگارنده بوده‌اند اظهار دارم .

1 - Endoplasmic reticulum

شده‌اند بخارج رانده میشوند [۴۱،۳۵،۱۸].

بسطح تورینه درون پلاسمایی که مجاور سیتوپلاسم حقیقی یاخته است عناصری بقطر ۵۰-۱۵۰ آنکستروم و موسوم به ریبوزوم<sup>۱</sup> اتصال دارند؛ این عناصر بخصوص از اسیدریبونوکلیئیک (RNA) ساخته شده‌اند و مرکز پروتئین سازی یاخته میباشند. ریبوزومها در سراسر سطح تورینه درون پلاسمایی مشاهده میشوند و در قسمتی از یاخته تورینه های مذکور فاقد این عناصرند و باصطلاح سطح تورینه در این ناحیه صاف میباشد. این قسمت از تورینه درون پلاسمایی که فاقد ریبوزومهاست شاید همان دستگاه گلژی<sup>۲</sup> باشد که مصنفان در کتب کلاسیک بشرح آن پرداخته‌اند [۳۳،۱۷].

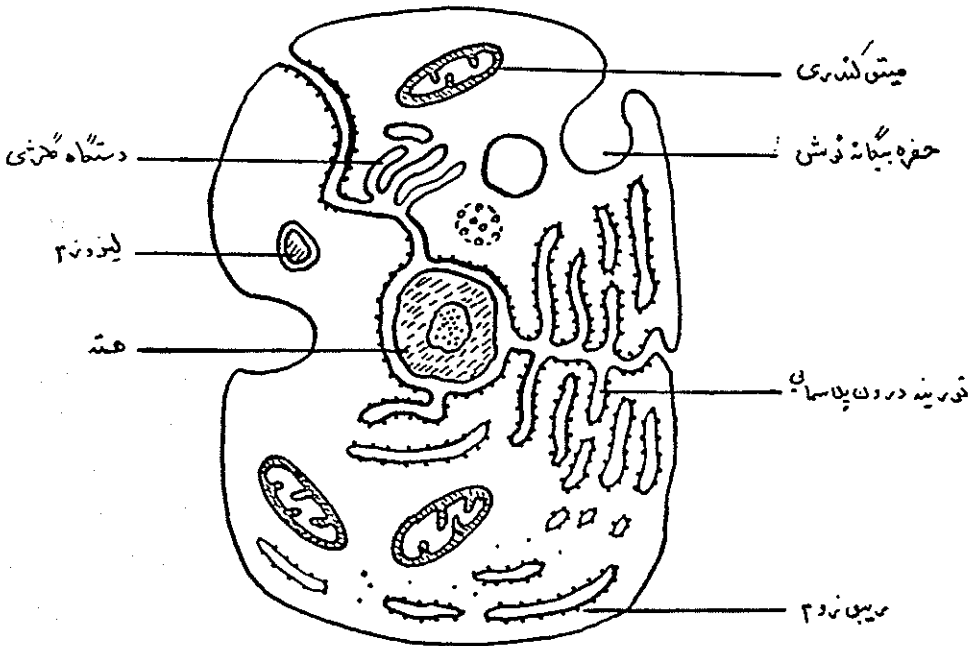
در فضای بین تورینه‌های درون پلاسمایی، سیتوپلاسم حقیقی یاخته مکان دارد و در آن عناصر متعددی شناورند که از جمله میتو کندری‌ها<sup>۳</sup> و لیزوزومها<sup>۴</sup> را باید نام برد.

با میکروسکپ معمولی میتو کندری‌ها بشکل رشته‌هایی که بطور متوسط تیم میکرون قطر و دومیکرون طول دارند مشاهده میشوند، میتو کندری های دیگری با ابعاد کوچکتر نیز دیده شده‌اند [۴]. این عناصر در درون یاخته‌ها متحرك هستند و میتوانند در سیتوپلاسم یاخته‌ای از سویی بسوی دیگر عزیمت کنند [۱۵] و ساختمان میتو کندری‌ها بویژه با میکروسکپ الکترونیك مطالعه شده است. غشاء این عناصر را پرده دولایی تشکیل می‌دهد که لایه درونی انشعاباتی از خود خارج میسازد و فضای درونی میتو کندری‌ها را بحجره‌های کوچک تقسیم میکند [۳۱].

از جمله عناصر دیگر درون سیتوپلاسم یاخته‌ای لیزوزومها هستند که مطالعات دقیقی درباره آنزیم‌های موجود در آنان انجام گرفته است [۱۰] اما تا کنون از نظر میکروسکپی مشخص نشده‌اند و باندیشه جمعی از پژوهندگان این عناصر همان حفره‌های درون پروتوپلاسم هستند که رنگهای بازیک از جمله آبی تولوئیدین و قرمزخنثی را بخود میگیرند [۴] و در یاخته‌های کبدی میتوان آنان را بکمک اولترا میکروسکپ در اطراف مجاری بین یاخته‌ای و صفراوی مشاهده کرد [۲۹].

هرچند شیوه تجزیه شیمیایی عناصر مختلف یاخته‌ای يك قرن سابقه دارد و در آن اوان «میشر» بتجزیه هسته یاخته‌ها پرداخت [۲۷] و همچنین بسال ۱۹۱۳ و اربورگ نتایج حاصل از تجزیه عناصر درون پلاسمایی را منتشر کرد [۴۹] با اینهمه این روش تنها پس از بکار بردن

- 1- Ribosome
- 2- Golgi apparatus
- 3- Mitochondria
- 4- Lysosome



### تصویر شماره ۱ ساختار یاخته‌ای

اولتراسانتریفوژ رونق گرفت و بسال ۱۹۳۴ مجزاساختن میتو کندری‌ها امکان‌پذیر گردید [۳] و پس از چند سال کلود با بکار بردن قدرتی معادل صد هزار g ۱ بمدت یکساعت در دستگاه اولترا - سانتریفوژ بمجزا ساختن عناصر ریزتری که با میکروسکپ معمولی مشاهده نمیشوند موفق گردید و عناصر مذکور را میکروزوم ۲ نامید [۷۰۶]. بعدها ثابت شد که میکروزوم‌ها شامل ذرات خرد شده تورینه درون پلاسمایی و همچنین ذرات ریبوزوم هستند [۳۲، ۴۰].

بر مبنای روش کلاسیک کلود که مصنفان دیگر تغییراتی در آن داده‌اند [۴۵، ۱] نخست یاخته‌ها را در دستگاه همگن‌ساز ۳ خرد میکنند سپس ماده همگن ۴ را در اولترا سانتریفوژ قرار میدهند و بر حسب نیروی g بترتیب دسته‌های زیر را از یکدیگر جدا می‌سازند.

۱ - هسته‌ها .

$$1 - g = 1118 \times 10 \times R \times (\text{rpm})^2$$

R عبارت از فاصله محور چرخش تاماده مورد آزمایش و (rpm) تعداد دوران در دقیقه است

- 2 - Microsome
- 4 - Homogenizer
- 5 - Homogenate

۲ - میتوکندری ها .

۳ - میکروزوم ها (ذرات تورینه درون پلاسمایی و ریبوزوم ها) .

۴ - لیزوزوم ها که برحسب نیروی g ممکن است در گروه میتوکندری ها یا میکروزوم ها قرار گیرند .

۵ - مایع باقیمانده که به شیره یاخته‌ای ۱ موسوم است و شامل سیتوپلاسم حقیقی یاخته می‌باشد .

ترکیب شیمیایی و آنزیم‌های موجود در هر گروه بقرار زیر است :

**الف - هسته‌ها** - اسید دزکسی ریبونوکلئیک ( DNA ) منحصرأ در این دسته قرار دارد و همانطور که میدانیم ژن ها یا واحد های بیولوژیک توارث از این ماده ساخته شده‌اند علاوه بر این هسته محتوی اسید ریبونوکلئیک ( RNA ) است ، شیوه‌های رنگ آمیزی اختصاصی نشان داده‌اند که ماده اخیر در هسته جایگزین شده است . از دیگر ترکیبات هسته ، هیستون‌ها و مواد چربی بوئره فسفولیپید را می‌توان نام برد .

هسته جایگاه نوعی واکنش‌های «فسفریلاسیون اکسیداتیو» است که روش آنها از بسیاری جهات همانند واکنش‌های فسفریلاسیون اکسیداتیو میتوکندری هاست [۳۰] و در جریان این واکنش‌ها ذرات آدنوزین - منوفسفات ( AMP ) به آدنوزین تری فسفات ( ATP ) مبدل میشوند ، بجز از آدنوزین تری فسفات ، نوکلئوتید های آزاد دیگری که بمثابة کو آنزیم در واکنش های حیاتی شرکت دارند در هسته ساخته میشوند [۴۷.۳۰] واهم آنها عبارتند از :

اوریدین تری فسفات ( UTP )

اوریدین دی فسفوکلوکز ( UDPG )

نیکوتین آمید - آدنین دی نوکلئوتید ( NAD )

**ب - میتوکندری ها** - این عناصر جایگاه اساسی واکنش های فسفریلاسیون اکسیداتیو هستند [۴۶] . بعلاوه بیشتر آنزیم‌های دوره کربس و آنزیم‌های مؤثر در کانابولیم اسیدهای چرب و اسیدهای آمینه و کولین در این گروه قرار دارند [۲۴] . ۲۵-۳۰٪ وزن میتوکندری‌ها از مواد لیپیدی تشکیل یافته که بیشتر آن بحالت فسفولیپید بوئره لسیتین است [۱۹] .

**ج - میکروزوم ها** - چنانکه گذشت این دسته از ذرات تورینه درون پلاسمایی خرد شده و دانه‌های ریبوزوم تشکیل یافته است . همه آنزیم‌ها و پروتئین‌ها و فسفولیپید و هموگروه‌موژن این دسته در ذرات تورینه درون پلاسمایی و اسید ریبونوکلئیک در ذرات ریبوزوم قرار دارند [۳۴] .

از جمله آنزیم های موجود در تورینه درون پلاسما می کلوکز شش فسفاتاز ، کسترل سنتتاز ، کسترل استراز ، نوعی سیتو کروم اکسیداز ، ویتامین «آ» ، استراز و سرانجام کلو کورونیل ترانسفراز را باید نام برد .

کلو کورونیل ترانسفراز [۲، ۱۳، ۸، ۴] بویژه با مطالعاتی که شرح آن در اینجا خواهد آمد ارتباط دارد ، این آنزیم با شرکت «اوریدین دی فسفو کلو کورونیک اسید» (UDPGA) بیلیروبین را در کبد به بیلیروبین - کلو کورونید مبدل میسازد .

۵ - شیرۀ یاخته ای - این دسته شامل سیتوپلاسم حقیقی یاخته می باشد و از ترکیبات موجود در آن نوعی اسید ربونوکلئیک محلول<sup>۱</sup> است [۳۶، ۳۷] که اسیدهای آمینه را بجایگاه پروتئین سازی یاخته ، ربوزوم ها حمل میکند . ۳۵ - ۴۰٪ ازت یاخته ای در این دسته یافت میشود . از آنزیم های این دسته ایزوسیتربک دهیدرژناز ، لاکتیک دهیدرژناز ، پیروفسفاتاز فسفاتاز قلیائی ، ترانس آمیناز ، کلوکز شش فسفات دهیدرژناز و آنزیم های کلیکولیتیک که کلیکوژن را به اسید پیروویک مبدل میسازند [۲۶] باید نام برد .

۶ - لیزوزوم ها - چنانکه گذشت این دسته زمانی با میکروزوم ها و زمانی دیگر با میتو کندری ها مخلوط میگردد [۱۰] . فسفاتاز اسید ، بتا کلو کورونیداز ، ربونوکلئاز دز کسی - ربونوکلئاز و کاتپسین از آنزیم های موجود در این دسته اند . نکته قابل توجه آنست که آنزیم های مذکور همه مخرب ساختمان یاخته ای هستند و در دوران حیات یاخته فعالیت ندارند و جمعی از پژوهندگان بر آنند که پاره شدن لیزوزوم ها و آزاد شدن آنزیم های مخرب نشانه تغییرات مرضی و سر آغاز مرگ یاخته ایست [۱۱] .

از آنچه باختصار گذشت میتوان از ساختمان یاخته ای تصویری بدست آورد و مطلب در خور توجه حرکت درون یاخته ای ذرات شیمیایی در جریان واکنش های آنابولیسیم است . چنانکه کلوکز در سیتوپلاسم حقیقی یاخته که جایگاه واکنش های کلیکولیتیک است به اسید پیروویک مبدل میشود سپس اسید پیروویک در میتو کندری ها در واکنش های دوره کربس بکار گرفته میشود و میسوزد . همچنین کلوکز شش فسفات در تورینه درون پلاسما می ذره فسفات خود را از دست میدهد و کلوکز آزاد میشود .

همین امر در مورد حرکت بیلیروبین درون یاخته کبدی توجه لیت<sup>۲</sup> را بخود جلب کرد و بسزاست که در اینجا قطعه ای از نوشته او را نقل کنیم :

1 - Soluble or Transfer RNA

2 - Lathe

« تجربیات ما و دیگر پژوهندگان ( ۱۹۵۷ ) نشان داد که میکروزوم هاجایگاه، تبدیل بیلروبین به بیلیروبین گلو کورونید هستند . این مشاهدات سؤالهای بسیار، جالب توجهی را در مورد حرکت بیلیروبین دریاخته کبدی مطرح میکند. این ماده، در سطح یاخته کبدی بحالت مجموعه بیلیروبین - آلبومین است و در میکروزوم ها، ترکیب میشود و سپس بمجاری صفراوی بین یاخته ای منتقل میگردد . در جریان، این تغییرات دیگر مکانهای یاخته ای نیز شرکت دارند زیرا UDPG در هسته ساخته، میشود و در سیتوپلاسم یاخته ای به UDPGA تبدیل میگردد و سپس ماده اخیر در، سطح یادرون میکروزوم ها بمصرف گرایش بیلیروبین به بیلیروبین - گلو کورونید، میرسد [۲۵] .

لیت و همکارانش در سالهای اخیر همه کوشش خود را در راه هویدا ساختن چگونگی حرکت بیلیروبین در یاخته کبدی بکار برده اند و در راه کمک بانجام همین منظور بود که نگارنده این مقاله درصدد برآمد که مکان رنگهای صفرا دوست را در یاخته کبدی معلوم کند . مقصود از رنگهای صفرا دوست مواد رنگینی هستند که پس از ورود بجریان خون بسرعت بوسیله یاخته کبدی جذب و همراه با صفرا دفع میشوند و بروده ها میریزند .

یکی از رنگهای صفرا دوست B.S.P. ۱ است که نخستین بار بسال ۱۹۲۵ بوسیله روزنتال ۲ برای تعیین ارزش کار کبد مصرف شد [۴۴]

و اکنون بتحقیق پیوسته است که یاخته های کوپفر در ترشح آن دخالتی ندارند و این ماده از جریان خون بوسیله یاخته های پارانشیم کبد جذب میشود [۴۳] و قسمت اعظم آن در یاخته های کبدی با گلو تاتیون ترکیب میشود و سپس بحالت ترکیب از راه مجاری صفراوی دفع میگردد [۲۲، ۸] ماده رنگین صفرا دوست دیگری که مورد مطالعه قرار گرفت « ایندوسیانین سبز » I.C.G. ۳ است که نخستین بار در مایوکلینیک در ارزیابی کار فیزیولوژیک قلب مصرف شد [۱۶] و شریک و همکارانش نشان دادند که این ماده منحصرأ از راه مجاری صفراوی دفع میشود و میتوان آنرا همانند B.S.P. برای ارزیابی کار کبد بکار برد [۵]. با این همه این دو ماده رنگین يك تفاوت اساسی دارند و در حالیکه B.S.P. بحالت ترکیب با گلو تاتیون از راه مجاری صفراوی دفع میشود I.C.G. بدون تغییر و بحالت آزاد از یاخته کبدی میگردد و بروده ها میریزد .

1 - Bisodium Phenoltetrabromophthalein Sulfonate

2 - Rosenthal

3 - Indocyanine green

سومین ماده رنگینی که ما در تجربیات خود بکار بردیم فنل فتالین است که شیوه ترشح آن از بسیاری جهات همانند بیلیروبین میباشد و در یاخته کبدی با اسید کلیکوکرونیک ترکیب میشود و بحالت فنل فتالین - کلو کورونید بمجاری صفراوی میریزد [۲۳]. به علاوه فنل فتالین همچون بیلیروبین در آب غیر محلول است و تنها بحالت فنل فتالین - کلو کورونید در آب حل میشود.

### جدول شماره ۱ حالت رنگهای صفر ۱ دوست درخون و صفرا

ماده رنگین	پلازما	صفرا
B.S.P.	BSP - Albumin	BSP - Glutathione
I.C.G.	ICG - Albumin	ICG
PP (فنل فتالین)	PP - Albumin	PP - Glucuronide
B (بیلیروبین)	B - Albumin	B - Glucuronide

هر سه ماده رنگینی که نام بردیم در جریان خون به آلبومین های پلازما پیوند دارند و جدول شماره ۱ حالت هر یک از آنها و همچنین بیلیروبین را درخون و صفرا نشان میدهد.

### « روش های آزمایشگاهی »

موش های نر از تیره شفیلد<sup>۱</sup> بوزن ۲۵۰ - ۳۰۰ گرم تحت تزریق درون صفاتی محلول بیبیس کننده نمبوتال<sup>۲</sup> (۰/۰۷ + سانتیمتر مکعب برای هر صد گرم وزن موش) قرار گرفتند و سپس جدا گانه به موش یکی از رنگهای B.S.P. یا I.C.G. یا فنل فتالین<sup>۳</sup>  $10^{-3} \times 4$  ملگول گرم برای هر صد گرم وزن موش (بدرون رگ رانی تزریق شد). محلول تزریقی B.S.P. در آب مقطر تهیه شد و محلول تزریقی ایندوسیاین بر روش زیر مهیا گردید.

۸ میلی گرم	ایندو سیانین سبز
۷ سانتیمتر مکعب	آب مقطر
۱ «	پلازما
۱ «	کلرورسدیم ۰/۱۰

برای تهیه محلول تزریقی فنل فتالین به بیست میلی گرم از این ماده، قطره قطره محلول

- 1 - Sheffield Rat
- 2 - Nembutal
- 3 - Spinco model L., Rotor No:41

دو برابر نرمال سود محرق افزودیم تا ماده رنگین بطور کامل حل شود سپس با افزایش محلول دو برابر نرمال جوهر نمک pH محلول را به ۷٫۸ رساندیم و بلافاصله بتزریق مقدار لازم این محلول اقدام نمودیم - پنج دقیقه بعد از تزریق ماده رنگین ، کبد حیوان را خارج کردیم و آنرا در محلول سرد سرم فیزیولوژیک قرار دادیم و در همان محلول کبد را با قیچی بقطعات کوچک تقسیم نمودیم و قطعات کبد را سه مرتبه با محلول سرد سرم فیزیولوژیک بخوبی شستشو دادیم و سپس قطعات را در لابلای کاغذ صافی تا حد مقدور خشک نمودیم و آنان را توزین نموده و در دستگاه همکن ساز در محلول ۲۵ ر. ملکول گرم درلیتر سو کروز قرار دادیم و با سرعت سه هزار دور در دقیقه بمدت دو دقیقه همکن یاخته‌ای را ساختیم و با افزایش محلول سو کروز نسبت ماده همکن را بنحوی تنظیم نمودیم که هر ده سانتیمتر مکعب آن محتوی یک گرم نسج کبد باشد . و در همه حال کلیه عملیات مذکور را در اطاق سرد (۴ درجه سانتیگراد) بپایان رساندیم .

سپس همکن یاخته‌ای را در دستگاه اولتراسانتریفوزا<sup>۱</sup> قرار دادیم و عناصر مختلف یاخته‌ای (هسته‌ها و میتو کندری‌ها ، میکروزوم‌ها ، شیره یاخته‌ای) را از یکدیگر جدا کردیم و در مورد I.C.G. ماده رنگین را بالکل استخراج نمودیم و با مقایسه آن با محلول الکلی که غلظت I.C.G. آن معلوم بود مقدار ماده رنگین را در هر یک از دسته‌های یاخته‌ای مشخص ساختیم . اندازه گیری BSP را بروش تلسون [۲۸] و اندازه گیری فنل فتالین و فنل فتالین - کلو کورونید را بروش مندرج در مجله بیوشیمی [۲۳] انجام دادیم و در همه موارد برای سنجش ماده رنگین دستگاه اسپکتروفوتومتر<sup>۱</sup> را بکار بردیم .

شیوه دیالیز را برضد فشار خلاء انجام دادیم و برای این منظور لوله‌های دیالیز کارخانه هود<sup>۲</sup> را بکار بردیم . روش الکتروفورز استات سلولز را برای مشخص ساختن دستجات پروتئین - های یاخته‌ای انتخاب نمودیم و از محلول تامپون و رونات (pH = 8.6) استفاده کردیم ، زمان الکتروفورز یک ساعت و شدت جریان یک میلی آمپر برای هر ۲۵ سانتیمتر عرض کاغذ استات سلولز بود . برای مجزا ساختن ریبوزوم‌ها و ذرات تورینه درون پلاسمایی در میکروزوم‌ها روش هالتن [۲۰] و برای محلول ساختن میکروزوم‌ها روش ایسل باکر [۲۱] را بکار بردیم .

برای مجزا ساختن لیزوزوم‌ها از سایر عناصر یاخته از شیوه مندرج در مجله بیوشیمی [۹] استفاده نمودیم . پروتئین های مختلف یاخته‌ای را در درجات متغیر اشباع سولفات آمونیوم از یکدیگر جدا کردیم و در این راه از فرمول

$$X = \frac{V(C_1 - C_2)}{100 - C_2}$$

استفاده نمودیم که در آن X

1 - Unicam Spectrophotometer SP 600

2 - Visking dialysis tubing, Hudes Merchandising Co .

تعداد سانتیمتر مکعب محلول سولفات آمونیوم اشباع شده است که باید بمحلول محتوی پروتئین افزوده شود و  $V$  حجم محلول و  $C_1$  درجه اشباع موجود و  $C_2$  درجه اشباعی است که خواستار آن هستیم .

### «نتیجه»

نخستین تجربیات ما نشان داد که رنگهای سفراوی دریاخته کبیدی ، در میکروزمها یا در شیره یاخته‌ای جمع میشوند و مقدارشان در هسته‌ها و میتو کندری‌ها ناچیز و شاید ناشی از آلودگی دستجات اخیر یا میکروزمها باشد. جدول شماره ۲ تقسیم I.C.G. و B.S.P. را در دسته‌های مختلف یاخته‌ای بر حسب چند درصد نشان می‌دهد :

### جدول شماره ۲ - تقسیم مواد رنگین در دسته‌های یاخته‌ای

ماده رنگین	شیره یاخته‌ای	میکروزمها	میتو کندری‌ها و هسته‌ها
BSP	٪.۸۵	٪.۹۹۵	٪.۵۰۵
ICG	٪.۱۲۷	٪.۷۳۶	٪.۱۳۷

پس از آنکه اطمینان یافتیم که رنگ‌های سفرا دوست ، در شیره یاخته‌ای یا میکروزمها متراکم می‌شوند تنها با اندازه گیری مواد رنگین در این دودسته اکتفا کردیم و جدول شماره ۳ نتیجه چندین آزمایش را نشان می‌دهد .

### جدول شماره ۳ نسبت مواد رنگین در میکروزمها و شیره یاخته‌ای

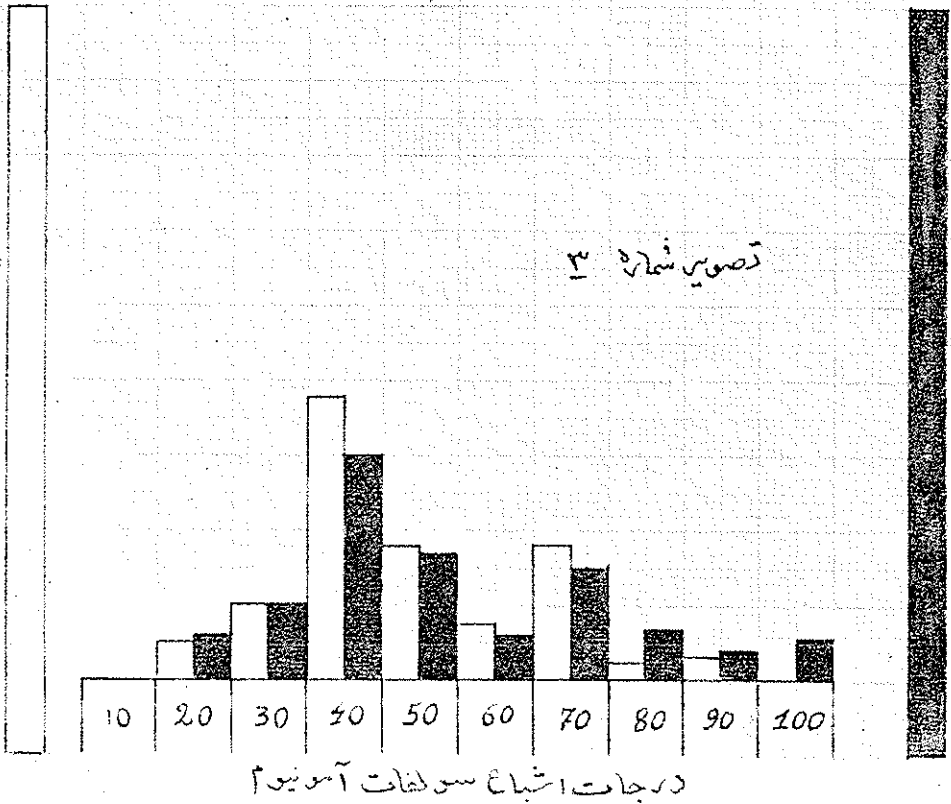
ماده رنگین	٪.BSP		٪.ICG		فصل فتلین٪.	
	شیره یاخته‌ای	میکروزمها	شیره یاخته‌ای	میکروزمها	شیره یاخته‌ای	میکروزمها
۱	۸۶	۱۴	۱۵	۸۵	۲۵	۷۵
۲	۸۵	۱۵	۵	۹۵	۱۷٫۵	۸۲٫۵
۳	۸۲٫۵	۱۷٫۵	۵	۹۵		
۴	۸۵	۱۵	۱۲	۸۸		

همانطور که مشاهده میشود B.S.P. در شیره یاخته‌ای متراکم میشود و شیوه دیالیز نشان داد که ۹۸٪ آن با پروتئین‌های شیره یاخته‌ای پیوند دارد و تنها ۲٪ از ماده رنگین بحالت آزاد است . برای شناسایی نوع پروتئینی که به B.S.P. پیوند دارد برای اشباع با سولفات آمونیوم پروتئین‌های شیره یاخته‌ای را از یکدیگر جدا کردیم . همچنان که تصویر شماره ۲ نشان می‌دهد

پروتئین برای ۸۳۷ میلی‌گرم آزاد

B.S.P برابر با ۰.۱۶۴ میلی‌گرم

تصویر شماره ۳



همه پروتئین‌های شیره یاخته‌ای با B.S.P. پیوند دارند .  
 مقدار B. S. P که در ناحیه اشباع ۱۰۰٪ دیده میشود ماده رنگینی است که بحالت آزاد در شیره یاخته‌ای وجود دارد و روش دیالیز نیز وجود آنرا تأیید کرده است .  
 I. C. G در میکرووزم‌ها متمرکز میشود اما بروش دیالیز نمیتوان پیوند آنرا با پروتئین‌ها بشیوت رسانید زیرا این ماده رنگین در آب بحالت محلول حقیقی درنمی‌آید و ایجاد میسل میکند و از غشاء دیالیز نمیکند . از اینرو ما نخست عناصر میکرووزم را محلول کردیم و سپس با استفاده از الکتروفورز استات سلولاز نشان دادیم که ماده رنگین بیکه از پروتئین‌های این دسته پیوند دارد . پس از مجزا ساختن عناصر ریبوزم و ذرات توربنه درون پلاسمایی تقریباً همه ماده رنگین را در قسمت اخیر یافتیم و عناصر ریبوزم فاقد I. C. G بودند .

لیزوزم‌ها را برای تعیین مقدار I.C. G و B.S. P از سایر عناصر یاخته‌ای مجزاساختیم و در هر دو مورد مقدار مواد رنگین در این دسته ناچیز بود .  
 فنل فتالئین همانند I.C. G در میکروزم‌ها متراکم می‌شود اما در یک مورد آزمایشی که بجای این ماده نوع ترکیب شده آن ، فنل فتالئین - گلو کورونید ب حیوان تزریق شد ۰۶۳۷٪ آن در شیر یاخته‌ای و تنها ۰۳۶۳٪ آن در میکروزم‌ها موجود بود .

### « بحث »

یک نکته در مورد رنگهای صفرا دوستی که در یاخته کبدی نخست تر کیب و سپس دفع میشوند ( B.S. P ، بیلیروبین ، فنل فتالئین ) مسلم است . این مواد باید از جایگاه آنزیمی که عامل ترکیب آنان است عبور کنند - بیلیروبین و فنل فتالئین هر دو با اسید گلیکوکورونیک ترکیب میشوند و عامل ترکیب آنان ( آنزیم گلو کورونیل ترانسفراز ) در تورینه درون پلاسمایی جای دارد . منطقی است که گفته شود این مواد از جریان خون نخست بفضای دیس<sup>۱</sup> و سپس از راه مجاری تورینه درون پلاسمایی یاخته کبدی وارد میشوند و در آنجا به بیلیروبین - گلو کورونید و فنل فتالئین - گلو کورونید مبدل میگردند .

B.S. P در کبد با گلوکوتایون ترکیب میشود و آنزیمی که این دورا با یکدیگر ترکیب میکند در سیتوپلاسم یاخته‌ای جای دارد . ما نیز در تجربیات خود B.S. P را در سیتوپلاسم یاخته‌ای یافته‌ایم . در این مورد میتوان ورود B.S. P را بدرون یاخته کبدی بدو راه توجیه کرد ، یکی آنکه این ماده همانند بیلیروبین و فنل فتالئین نخست از راه مجاری تورینه درون پلاسمایی یاخته کبدی راه مییابد و سپس از آنجا بسیتوپلاسم حقیقی یاخته وارد و در آنجا با گلوکوتایون ترکیب میشود . توجیه دوم آنست که B.S. P پس از ورود بفضای دیس بیرکت فعالیت بیگانه‌نوشی<sup>۲</sup> یاخته مستقیم بدرون سیتوپلاسم حقیقی یاخته راه مییابد ، بدون آنکه از مجاری تورینه درون پلاسمایی عبور کند .

پذیرش قطعی هر یک از این دو فرضیه دشوار است . با اینهمه اگر توجه داشته باشیم که ما در تجربیات خود ، تنها پنج دقیقه پس از تزریق B.S. P قسمت اعظم آنرا در سیتوپلاسم یاخته‌ای یافته‌ایم ، توجه ما بفرضیه دوم بیشتر معطوف میشود و اگر تصور کنیم که دوراه برای ورود رنگهای صفرا دوست بدرون یاخته کبدی وجود دارد ، یکی راه مجاری تورینه درون پلاسمایی و دیگری راهی که مستقیم بسیتوپلاسم حقیقی یاخته منتهی میشود ، باید بنحوی تفاوت

1. Disse's Spaces
2. Pinocytosis

این دو راه را توجیه کنیم. تجربیات ما راه این توجیه را گشوده است، ترکیبات صفرادرستی که در آب نامحلولند از جمله بیلیروبین و فنل فتالئین و I.O.G (که در آب بحالت میسل درمیآید و ازغشاء دیالیز نمیگذرد) از راه مجاری تورینه درون پلاسمایی یاخته کبد راه میابند، در حالیکه B.S.P که در آب محلول است مستقیماً بدرون سیتوپلاسم حقیقی یاخته وارد میشود، تجربه دیگر ما نیز مؤید این فرضیه است، در يك مورد که بجای فنل فتالئین (غیر محلول در آب) فنل فتالئین - گلو کورونید (محلول در آب) ب حیوان تزریق شد ماده اخیر در سیتوپلاسم یاخته‌ای وجود داشت.

پیدااست که بیلیروبین و همچنین فنل فتالئین پس از آنکه در تورینه درون پلاسمایی بحالت گلو کورونید درآمدند باید از مرحله دیگری عبور کنند تا بمجاری صفرای بین یاخته‌ای راه یابند، مؤید این مطلب وجود سندرم دوبن - جونسون [۱۲] است و همچنانکه میدانیم در این سندرم، بیلیروبین بدرون یاخته کبدی راه مییابد و در آنجا به بیلیروبین گلو کورونید مبدل میشود. اما انتقال بیلیروبین - گلو کورونید از تورینه درون پلاسمایی بمجاری صفرای بین یاخته‌ای انجام نمیگیرد، از اینرو ماده مذکور بخون باز میگردد و نشانه‌های یرقان انسدادی را ظاهر میسازد، بدون آنکه انسداد مجاری صفرای درکار باشد.

نوبکوف و همکارانش عقیده دارند، دانه‌های درون سیتوپلاسم که شاید همان لیزوزم‌ها هستند عمل انتقال بیلیروبین را در مرحله دوم انجام میدهند و دلیلی که بر صحت فرضیه خود ارائه میدهند تصویر میکروسکپ الکترونی یاخته‌های کبدی حیوانی است که قبل از هلاکت، بطور مداوم بیلیروبین بدرون رگهایش تزریق میشده است. در این تصویر تعداد زیادی دانه‌های مذکور در اطراف مجاری بین یاخته‌ای صفرای دیده میشوند [۲۹]، نوبکوف عقیده دارد که در سندرم دوبن - جونسون مواد نامعلومی در این دانه‌ها رسوب کرده‌اند و بدین جهت از عهده جذب بیلیروبین - گلو کورونید و حمل آن بمجاری صفرای برنمیآیند [۱۴].

از جانب دیگر وجود آنزیم‌های لیزوزم‌ها درصفا نشانه دیگری است که این دانه‌ها از یاخته کبدی بدرون مجاری صفرای راه مییابند و با لاقط محتویات خود را بدرون این مجاری میریزند.

با اینهمه ما در تجربیات خود قادر نبودیم که تراکم مواد رنگین را در لیزوزم‌ها مشاهده کنیم و این تجربیات مؤید فرضیه نوبکوف نیست و بدون شك حل مسأله حرکت ذرات شیمیایی در یاخته کبدی به پژوهش‌های وسیع‌تر و پرم دامنه‌تری نیازمند است.

## References

- 1- Anderson, N. G., in «Physical Techniques in Biological Research» Oster and Pollister ed. Vol. 3, Academic Press (1956)
- 2- Arias, I. M., et al., Science 126, 563 (1957)
- 3- Bensley, R. R. et al., Anat. Record. 60, 449 (1934)
- 4- Brachet, J., in «Biochemical Cytology» Academic Press (1957)
- 5- Cherrick et al., J. Clin. Invest. 39, 592 (1960)
- 6- Claud, A., Science, 97, 451 (1943)
- 7- « « J. Exptl. Med. 84, 51 (1946)
- 8- Combes, B., J. Clin. Invest., 38, 1426 (1959)
- 9- de Duve, C., 59, 438 (1955)
- 10- « « et al., Biochem. J., 60, 604 (1955)
- 11- « « in «Subcellular Particles», Hiyashi, T. ed. Am. Physiol. Soc., Washington (1959)
- 12- Dubin, I. N., and Johnson, F. B., Medicine 33, 155 (1954)
- 13- Dutton, G. J., et al., Biochem. J., 57, 275 (1954)
- 14- Essner and Novikoff, J. Ultrastrut. Research, 3, 374 (1960)
- 15- Feredric, J., Ann. N. Y. Acad. Sci, 58, 1245 (1954)
- 16- Fox et al., Proc. Mayo. Clin., 32, 478 (1957)
- 17- Haguenu, F. Arch. anat. microscop., Paris., 44, 27 (1955)
- 18- « « , in «Biological Approaches to Cancer Chemotherapy» R. J. C. Harris ed. Academic Press (1961)
- 19- Harel, L., et al., Bull. Soc. chim. biol., 39, 819 (1957)
- 20- Hultin, T., Exptl. Cell. Research. Suppl., 3, 210 (1955)
- 21- Isselbacher, K. J., Biochem. Biophys. Research. Comm., 5, 243 (1961)
- 22- Javitt, N., Am. J. of Med, 30, 341 (1961)
- 23- Karunairatnan, M. C., et al., Biochem. J., 49, 210 (1951)
- 24- Kennedy, E. P., J. Biol. Chem., 179, 957 (1949)
- 25- Lathe, G. H., et al., Biochem. J., 70, 705 (1958)
- 26- le Page, G. A., J. Biol. Chem., 176, 1021 (1948)
- 27- Miescher, F., «Die histochemischen und physiologischen Arbeiten,» Leipzig (1897)

- 28- Natelson, S. in «Microtechniques of Clinical Chemistry» C. C. Thomas Publ. (1961)
- 29- Novikoff, A. B., in «The Cell» Brachet and Mirsky ed. Vol. 2 Academic Press (1961).
- 30- Osawa, S., et al., J. Gen. Physiol., 40, 491 (1957)
- 31- Palade, G. E., J. Appl. Phys., 24, 419 (1953)
- 32- « « , J. Biophys. Biochem. Cytol., 1, 59 (1955)
- 33- « « , J. Biophys. Biochem. Cytol. Suppl., 2, 85 (1956)
- 34- « « , et al., J. Biophys. Biochem. Cytol., 2, 171 (1956)
- 35- Palay, S. L., et al., J. Biophys. Biochem. Cytol., 5, 379 (1959)
- 36- Petermann, M. L., Texas. Reports. Biol. and Med., 12, 921 (1954)
- 37- « « « , Cancer Research., 16, 620 (1956)
- 38- Porter, K. R., J. Histochem. Cytochem., 2, 346 (1954)
- 39- « « , Federation Proc., 14, 673 (1955)
- 40- « « , Harvey Lectures., 51 175 (1957)
- 41- « « , in «The Cell» Brachet and Mirsky ed., Vol 2 (1961)
- 42- Rebhun, L. I., J. Biophys. Biochem. Cytol., 2, 93 (1956)
- 43- Reinhold, J. D., Clin. Chem., 4, 399 (1955)
- 44- Rosenthal, S. M., et al., J. A. M. A., 84, 1112 (1956)
- 45- Schneider, W. C., et al., Ann. Rev. Biochem., 25, 201 (1956).
- 46- Siekevitz, P., J. Biol. Chem., 195, 549 (1952)
- 47- Stern, H., et al., J. Gen. Physiol., 37, 177 (1953)
- 48- Strominger, J. L., et al., J. Biol. Chem., 224, 79 (1957)
- 49- Warburg, O., Pflügers Arch. ges. Physiol., 154, 599 (1913)
- 50- Watson, M. L., J. Biophys. Biochem. Cytol, 1, 257 (1955).
- 51- Weiss, J. M., J. Exptl. Med. 98, 607 (1953)