مقایسه روش‌های مختلف تخلیص بر تعداد محتوای جزایر لانگرهانس موش صحرایی و بررسی تاثیر پتاسیم و گلوکز بر الگوی ترشحی انسولین

دکتر ابراهیم میرزاجانی *، دکتر بیژن فرزامی **، دکتر مارک مایر ***

دکتر عبدالفتاح صراف نژاد **

خلاصه:

سابقه و هدف: نظر به اهمیت بیماری دیابت و شیوع روزافزون آن و از آنجا که این میکروارگان‌ها (جزایر لانگرهانس) در بیماری دیابت قندی وابسته به انسولین (IDDM) مورد حمله سیستم ایمنی قرار می‌گیرند، به همین منظور لازم دیده شد که جزایر لانگرهانس به روش‌های مختلف جداسازی، تخلیص و نیز مقایسه گردد. تعیین الگوی ترشحی انسولین جزایر در نتیجه تاثیر پتاسیم و گلوکز از اهداف دیگر این تحقیق می‌باشد.

مواد و روشها: پژوهش حاضر با روش تجربی (Experimenatl) بر روی موش صحرایی انجام گرفت. حیوان رابی هوش، مجرای مشترک صفراوی راکانوله و محلول هانکس به داخل آن تزریق شد. بلافاصله پانکراس جدا و وارد محلول کربس - رینگر - بیکربنات - هپس گردید. کلاژناز اضافه و در ۳۷ درجه سانتی‌گرادانکوبه شد. برای تخلیص از روش دست‌چین کردن زیر استرئومیکروسکوپ و نیز گرادیان ناپیوسته ساکارز و فیکول استفاده گردید. هم‌چنین برای بررسی ترشحات انسولین جزایر، سیستم پرفیوژن به کار رفت. انسولین مترشحه را به طریق RIA اندازه‌گیری و تعداد جزایر حاصل از هر روش ونیز محتوای انسولین جزایرهر روش نسبت به‌هرروش دیگر با t-test مورد قضاوت آماری قرار گرفت.

یافته‌ها: تعداد جزایر حاصل از روش دست‌چین کردن، ۲۰۲±۲۲/۵؛ گرادیان ساکارز، ۸۴±۱۴/۵ و گرادیان فیکول، ۲۳۰±۲۶ می‌باشد. هم‌چنین محتوای انسولین جزایر به دست آمده از روش‌های مذکور به ترتیب عبارت بودند از: ۱۰۶±۷/۶، ۴۹±۱۳ و ۲۱۰±۱۷ μIU/10 Islets ($P<0/0001$). الگوی ترشحی انسولین تحت تاثیر پتاسیم، تک‌مرحله‌ای و در نتیجه تاثیر گلوکز دو مرحله‌ای بود.

نتیجه گیری: تخلیص جزایر با استفاده از فیکول چه از نظر کمی و چه از نظر کیفی بر دو روش دیگر مزیت دارد. هم‌چنین الگوی ترشحی انسولین در نتیجه تاثیر گلوکز و پتاسیم به ترتیب دو مرحله‌ای (Biphasic) و تک‌مرحله‌ای (Monophasic) می‌باشد. آزادی انسولین احتمالاً در نتیجه دپلاریزاسیون غشا سیتوپلاسمی سلول‌های بتای جزایر است و انجام تحقیق در این زمینه توصیه می‌شود.

واژگان کلیدی: پانکراس، جزایر لانگرهانس، پرفیوژن

* دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی گیلان ، گروه بیوشیمی

** دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تهران ، گروه بیوشیمی

*** دانشگاه موناش (ملبورن ـ استرالیا) ، گروه بیوشیمی و بیولوژی ملکولی

مقدمه

در بیشتر حیوانات، سلول‌های درون‌ریز پانکراس به صورت دسته‌های کوچک و متعددی که جزایر لانگرهانس نامیده می‌شوند، می‌باشند. این دسته‌ها در انسان حدود یک میلیون و در بیشتر جوندگان حدود دو الی سه هزار است که در سرتاسر بخش اگزوکرین پخش گردیده و در مجموع ۱ درصد حجم غده بالغ را تشکیل می‌دهند. حدود $\frac{1}{3}$ از جزایر در بخش دئودنومی پانکراس و بقیه در قسمت طحالی قرار دارند (۱).

روش آنزیمی کلاژناز روشی انتخابی برای به دست آوردن مقادیر زیادی از جزایر فعال از پانکراس گونه‌های مختلف حیوانات می‌باشد که خود به دو روش تقسیم می‌شود:

الف - هضم قطعات کوچک پانکراس که پایه روش Lacy و Kastianovsky است (۲).

ب - هضم پانکراس کامل رت که بر پایه روش Noel و سایر همکاران قرار دارد (۱).

در نتیجه روش‌های مذکور برای جداسازی جزایر مخلوطی از جزایر لانگرهانس ، باقیمانده‌های سلولی و فیبروبلاست‌ها و بخش‌های اگزوکرین را خواهیم داشت. روش‌های تخلیص مختلفی برای جداسازی جزایر وجود دارد که شامل روش‌های بر پایه اندازه که از فیلتراسیون برای جداسازی استفاده می‌شود (۳) و روش‌های بر پایه دانسیته که از فیکول (۴) ساکارز و غیره با استفاده از گرادیان غلظت جزایر لانگرهانس از بخش اگزوکرین و باقیمانده‌های سلولی جدا می‌گردند (۱). نظر به اهمیت بیماری دیابت و نظر به این که در بیماران دیابت قندی ، جزایر لانگرهانس مورد حمله ایمنی قرار می‌گیرند، انتخاب بهینه روش جداسازی و تخلیص جزایر اهمیت زیادی دارد . از این رو یکی از اهداف این مقاله تعیین روشی برای به دست آوردن جزایر در مقادیر زیاد و استفاده از آنها برای مطالعات آزمایشگاهی(in vitro) ، مرفولوژیک و متابولیک می‌باشد. هم‌چنین طراحی سیستم پرفیوژن با تغییراتی برای تعیین تغییرات ترشحی انسولین (۵،۶،۷) و نیز تایید عملکرد طبیعی سلول‌ها در فرآیند جداسازی با استفاده از محرک‌های ترشحی انسولین، گلوکز و پتاسیم است. مطالعه دو مرحله‌ای بودن ترشح انسولین با استفاده از محرک‌های مذکور نیز تنها بدین وسیله امکان پذیر می‌باشد.

مواد و روشها

تحقیق به روش تجربی (Experimental) بر روی موش صحرایی و بشرح مراحل زیر انجام گرفت.

جداسازی جزایر لانگرهانس - برای انجام آزمایش دو رت نر به وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم را با اتر یا کلروفرم یا نمبوتال (تزریق زیرجلدی) بی‌هوش، مجرای مشترک صفراوی را با آنژیوکاتتر (Angiocatheter) کانوله کرده و مقدار ۱۵ml محلول هانکس به داخل آن تزریق می‌شود تا پانکراس کاملاً منبسط گردد. بلافاصله پانکراس را با قیچی جدا نموده و داخل بشر حاوی محلول سرد KRB-HEPES که دارای گلوکز ۲/۸ mM بوده و داخل حمام یخ قرار دارد، گذاشته می‌شود. پانکراس را به صورت قطعات ۱ میلی‌متری بریده و آن را وارد لوله سانتریفوژ مدرج مخروطی (۵۰ml) پلاستیکی نموده و دوبار سانتریفوژ می‌گردد (t= ۱ min و ۵۰۰g). پس از سانتریفوژ هم حجم بافت متراکم شده در لوله سانتریفوژ

محلول (۲/۸ mM) KRB-HEPES- Glu اضافه و پس از آن آنزیم کلاژناز اثر داده می‌شود. به ازای هر میلی‌لیتر مجموع بافت - بافر، ۵۰۰ واحد آنزیم اضافه می‌گردد. آن را به شدت در حمام آب ۳۷ درجه سانتی‌گراد چرخانده تا بافت کاملاً هضم گردد. از بین رفتن قطعات و رشته‌های بافتی و چسبیدن بافت به دیواره لوله سانتریفوژ از علایم پایانی نقطه هضم می‌باشد. نقطه پایانی هضم نیز به وسیله استرئومیکروسکوپ و میکروسکوپ فاز کنتراست تایید شد.

بهترین زمان هضم آنزیمی حدود ۲۰ دقیقه می‌باشد. پس از هضم بلافاصله با ۲۰-۱۵ میلی‌لیتر محلول سرد (۲/۸ mM) KRB-HEPEAS-Glu که حاوی (۰/۵ درصد) BSA می‌باشد، سه مرتبه آن را شسته و به ترتیب سانتریفوژ می‌گردد (۱۵۰ g/۳۰ sec ، ۸۰g /۳۰sec و ۸۰g/۳۰sec). این عمل از یک طرف از هضم بیش از اندازه (Overdigestion) آنزیمی جلوگیری کرده و از طرف دیگر، جزایر تا حدودی از بقیه بافت جدا می‌شوند و برای مطالعات بعدی آماده می‌باشند (۲،۱).

روش‌های مختلف تخلیص جزایر لانگرهانس عبارتند از:

الف - تخلیص جزایر با استفاده از گرادیان ناپیوسته ساکارز (۲): پس از این که برای آخرین بار بافت هضم شده در محلول سرد KRB-H-Glu-BSA سانتریفوژ گردید، رسوب بافتی را در حدود (۱ml-۰/۵) از محلول مذکور قرار داده و به وسیله سمپلرنوک آبی کاملاً به صورت هموژن درآورده و تا حد ممکن رشته‌ها و تکه‌های بافتی درشت را جدا کرده و بدین ترتیب سوسپانسیون بافتی شکل می‌گیرد که برای مرحله بعد آماده می‌باشد. سوسپانسیون بافتی بر روی شیب غلظتی ساکارز قرار می‌گیرد. بدین ترتیب که در لوله‌های مدرج پلاستیکی ۵۰ میلی‌لیتری در پیچ دار به ترتیب از پایین به بالا غلظت‌های ۱/۸M ، ۱/۷M ، ۱/۶M و ۱/۴M از محلول ساکارز قرار داده و سوسپانسیون بافتی را به آرامی بر روی آن قرار گرفته، سانتریفوژ می‌شود (۴°C، ۱۵، rpm ۲۶۰۰). در پایان لوله را به آرامی خارج کرده طوری که لایه های مختلف آن مخلوط نشود. جزایر لانگرهانس را که بر روی لایه‌های ۱/۶M و کمتر از ۱/۷ قرار دارند، با پیپت پاستور جدا می‌گردند.

ب - تخلیص جزایر با استفاده از گرادیان ناپیوسته فیکول- ۴۰۰ (ficoll-400): فیکول پلی‌مری است از ساکارز با وزن ملکولی ۴۰۰/۰۰۰ دالتون. پس از هضم محدود بافتی به وسیله کلاژناز و شستشو، بر روی آن ۱۰ ml محلول سرد KRB-H-Glu-BSA ریخته و سانتریفوژ می‌شود (۵۰۰ g, ۱ min) مایع رویی به طور کامل خارج گردیده و ۳ میلی‌لیتر فیکول ۲۷ درصد به آن اضافه و به شدت ورتکس می‌شود. سوسپانسیون بافتی کاملاً شیری رنگ به وجود آورده که با پیپت پاستور رشته‌ها و قطعات بافتی هضم نگردیده، جدا می‌شوند. سوسپانسیون بافت - فیکول را به لوله سانتریفوژ ۵۰ میلی‌لیتری مدرج درپوش دار پلاستیکی منتقل نموده که حاوی ۳/۵ میلی‌لیتر از محلول فیکول ۲۷ درصد می‌باشد. دوباره به شدت ورتکس کرده، رشته‌ها و بافت هم‌بند با پیپت پاستور برداشته می‌شوند. به ترتیب بر روی سوسپانسیون مذکور به آرامی رقت‌های مختلف ۲۳ درصد، ۲۰/۵ درصد و ۱۱ درصد از فیکول را قرار داده سانتریفوژ می‌گردد (۸۰۰g,۱۰min). پس از پایان، جزایر را از

بین گرادیان‌های ۲۰/۵ درصد و ۱۱ درصد جدا و در محلول KRB-H-Glu-BSA قرار داده و سانتریفوژ می‌شود (۵۰۰g, ۱min). این عمل باعث حذف فیکول گردید و جزایر لانگرهانس به صورت خالص به‌دست آمد (۴).

ج - دست‌چین کردن جزایر لانگرهانس (Hand-picking)- جداسازی جزایر و انجام آخرین مرحله شستشو، آنها را در ۲-۱ میلی‌لیتر محلول سرد KRB-H-Glu-BSA که داخل حمام یخ قرار دارد، نگه‌داری نموده، سپس برای تخلیص و تفکیک هر چه بیشتر جزایر از استرئومیکروسکوپ و پتری دیش با زمینه سیاه استفاده شد. برخورد نور در زمینه سیاه باعث انعکاس نور توسط جزایر گردیده و به رنگ سفید متمایل به خاکستری از سایر بخش اگزوکرین قابل تشخیص می‌باشند. مرتب بر روی جزایر از بافر مذکور ریخته تا خشک نشوند، سپس با پیپت پاستور جزایر که به صورت منفک بودند، جدا می‌گردیدند (۲).

اندازه گیری محتوای انسولین جزایر لانگرهانس به دست آمده از روش‌های تخلیص مذکور- همانند آن چه در بخش استاتیک ذکر شد، جزایر لانگرهانس حاصل از سه روش دست‌چین کردن، گرادیان ساکارز و فیکول را به صورت دسته‌های ده‌تایی جدا کرده ، پس از شستشو و سانتریفوژ، رسوب سلولی به مدت یک شب (overnight) در ۱ میلی‌لیتر از محلول اسید- اتانول در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس لوله حاوی جزایر را به شدت در حمام یخ تکان داده دوباره سانتریفوژ نموده (۵۰۰ g,۱ min) و حدود ۵۰۰ μl از محلول رویی برای اندازه‌گیری انسولین فریز شد (۱،۸).

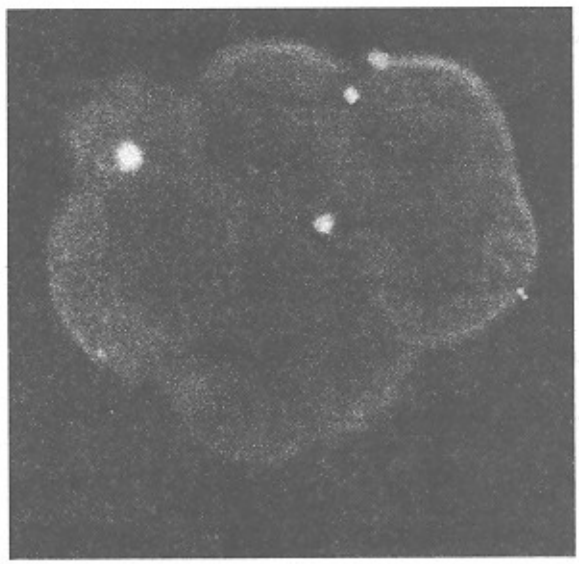
بررسی دینامیک اثر گلوکز و پتاسیم بر تغییرات ترشحی انسولین جزایر لانگرهانس با استفاده از سیستم پرفیوژن - اجزای تشکیل دهنده سیستم پرفیوژن شامل : پمپ پریستالتیک، چرخاننده مغناطیسی که بر روی آن ارلنی قرار گرفته که می‌تواند بافرهای مختلف با ترکیبات مورد نظر داخل آن قرار گیرد. به درون بافر گازهای اکسیژن و دی‌اکسید کربن (۵ درصد) دمیده شد و مرتب pH کنترل گردید تا بین ۷/۴-۷/۲ باشد، محفظه پرفیوژن که از نوع Swinex-25 بود (پلاستیکی از شرکت میلی‌پور). این محفظه در حقیقت نگه دارنده صافی (Holder) می‌باشد که برای استریل کردن مایعات به کار می‌رود. داخل آن فیلتر μ ۵ قرار داده شد و جزایر لانگرهانس (۲۵۰-۲۰۰) بر روی آن قرار می‌گرفت. پس از قرار دادن جزایر بر روی صافی، نگه دارنده صافی را از بافر مذکور پر کرده به پمپ پریستالیک متصل گردید. (flow rate 2.5ml/min) نگه‌دارنده صافی از طرف دیگر به دستگاه جمع‌کننده خودکار (fraction collector) متصل بود که نمونه‌ها را جمع‌آوری می‌کند. این بخش از سیستم پرفیوژن در خارج از انکوباتور قرار دارد. نمونه‌ها بلافاصله پس از جمع‌آوری به مقادیر ۵۰۰ μl فریز شده تا در زمان مناسب انسولین آنها اندازه‌گیری گردد (۵،۶،۷).

پرفیوژن جزایر با گلوکز - پس از قراردادن جزایر لانگرهانس در محفظه پرفیوژن و نیز قرار دادن بافر پایه در ارلن که شامل KRB-H-BSA می‌باشد، ابتدا گلوکز با غلظت پایه ۲/۸ mM را عبور داده و سپس بافر پایه را با بافر محرک که شامل بافر مذکور همراه با گلوکز ۱۶/۷ mM بود ، تعویض گردید. دوباره بافر پایه با غلظت گلوکز ۲/۸mM نیز عبور داده می‌شود.

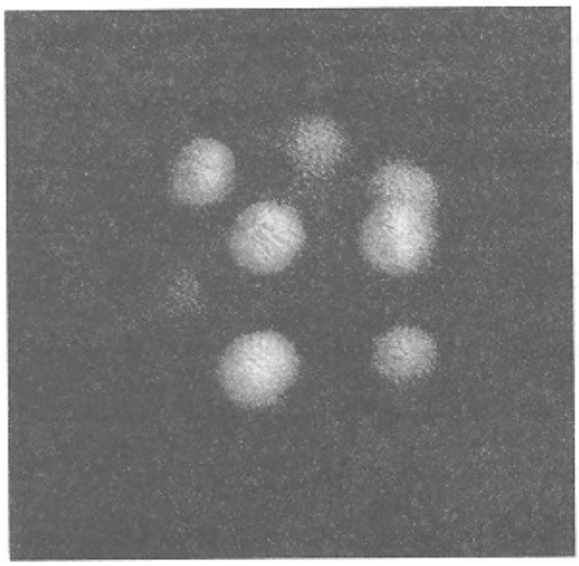
پرفیوژن جزایر با پتاسیم (K+) - همانند آن چه در بالا

ذکر شد ابتدا بافر پایه KRB-H-BSA که‌حاوی‌گلوکز mM ۲/۸ و K+ =۵/۹۴mM بود از جزایر عبور داده شد و ترشحات حاصل از جزایر به وسیله دستگاه جمع کننده خودکار جمع آوری گردید. سپس بلافاصله ارلن حاوی بافر پایه را با بافر محرک جایگزین ساخته ، این بافر دارای K+=۴۰ mM بود.

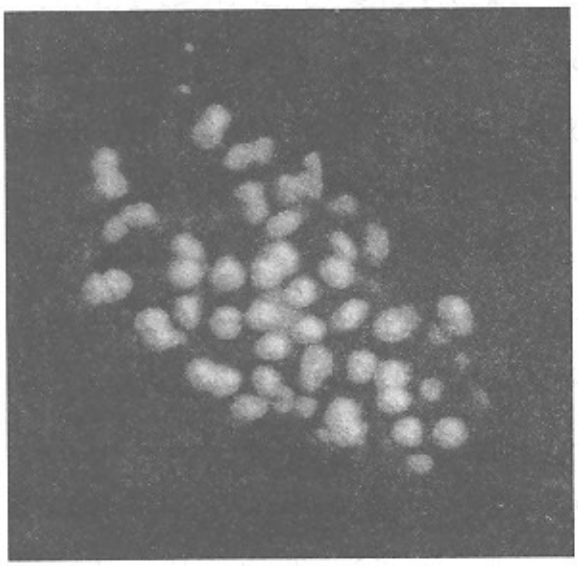
اندازه گیری تعداد جزایر و محتوای انسولین آن - جداسازی جزایر بر پایه روش آنزیمی کلاژناز انجام گردید. جزایر حاصل در زیر استرئومیکروسکوپ و میکروسکوپ فاز کنتراست در بهترین زمان هضم به شکل مدور یا بیضوی بوده که با استفاده از رنگ آمیزی اختصاصی آنتی - انسولین به طریق ایمونوفلورسنت و رنگ آمیزی هسته‌ای با پروپیدیوم آیوداید و مطالعه با میکروسکوپ کانفوکال قبلاً به وسیله همین گروه تایید گردیده است (اشکال ۱،۲،۳).



شکل ۱ـ تصویر لیزری با منبع آرگن از جزایر لانگرهانس به وسیله میکروسکوپ کانفوکال، رنگ آمیزی داخل سلولی آنتی- انسولین تحت شرایط پرمئابیلیزاسیون



شکل ۲ـ تصویر لیزری با منبع آرگن از هسته‌های یک جزیره (مدور) به وسیله میکروسکوپ کانفوکال اصول رنگ‌آمیزی مشابه شکل ۱



شکل ۳ـ تصویر لیزری با منبع آرگن از هسته‌های یک جزیره (بیضوی) به وسیله میکروسکوپ کانفوکال

یافته‌ها

تحقیق نشان داد که تعداد جزایر حاصل از روش فیکول به میزان ۴۶ واحد و یا حدود ۲۵ درصد بیشتر از روش گرادیان ساکارز به دست آمد (P< ۰/۰۵) و نسبت به روش دست‌چین کردن ۲۸ واحد و یا حدود ۱۴ درصد بیشتر تعداد جزایر را حاصل نمود (جدول ۱) . در ضمن، مشاهده گردید تعداد جزایر جدا شده در روش دست‌چین کردن بستگی به زمان داشته و هر چه زمان بیشتری صرف تخلیص گردد، جزایر بیشتری را می‌توان جدا نمود.

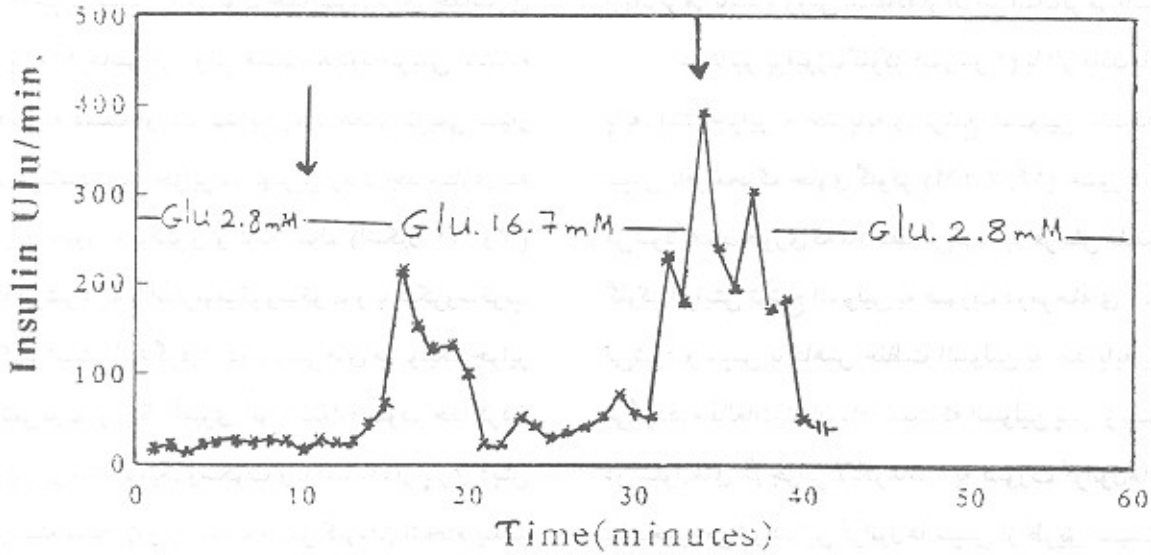
جدول ۱ـ توزیع تعداد جزایر به تفکیک روش‌های تخلیص

روش تخلیص	تعداد جزایر (×۳)
دست‌چین کردن	۲۰۲±۲۲/۵
گرادیان ساکارز	۱۸۴±۱۴/۵
گرادیان فیکول	۲۳۰±۲۶

بررسی محتوای انسولین جزایر در سه روش تخلیص بیانگر آن است که روش گرادیان فیکول بیش از ۴ برابر واحد بیشتر از روش گرادیان ساکارز را حاصل نمود (P< ۰/۰۰۰۱) و همین روش فیکول به میزان ۱۰۴ واحد و یا حدود ۹۸ درصد بیشتر از روش دست‌چین کردن ، محتوای انسولین جزایر را به دست آورد. t-test نشان داد که این اختلاف نیز به لحاظ آماری معنی‌دار است (P<۰/۰۰۱) (جدول ۲).

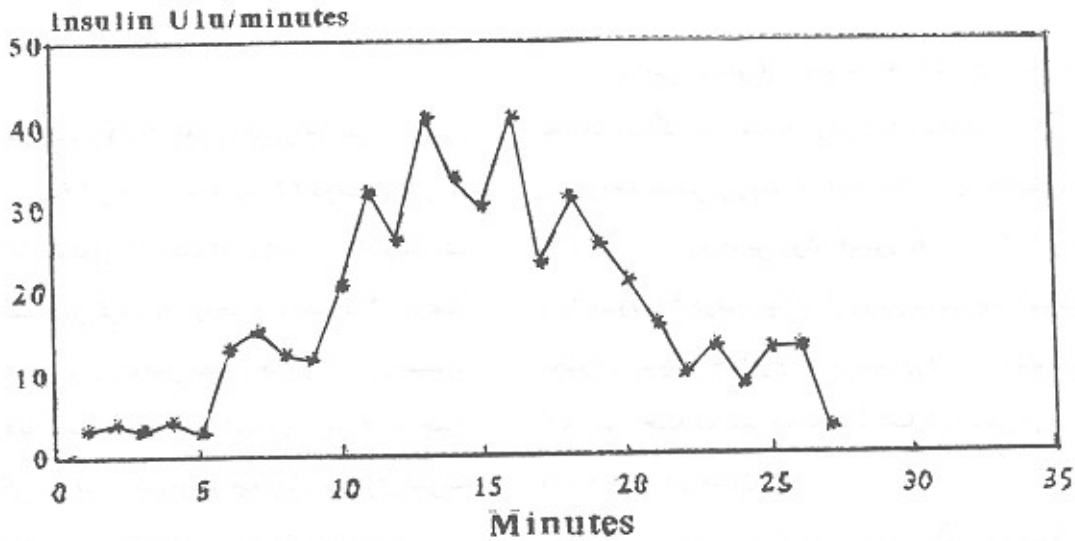
جدول ۲ـ توزیع محتوای انسولین به دست آمده به تفکیک روش‌های تخلیص

روش تخلیص	محتوای انسولین (μIu/10Islets)
دست‌چین کردن	۱۰۶±۷/۶
گرادیان ساکارز	۴۹±۱۳
گرادیان فیکول	۲۱۰±۱۷



نمودار ۱ـ الگوی دومرحله‌ای (Biphasic) ترشح انسولین متعاقب تحریک جزایر با گلوکز (۱۶/۷ mM)

در فرآیند دینامیک به مطالعه اثر گلوکز و پتاسیم پرداخته شد و نقش این دو ترکیب به عنوان محرک‌های ترشحی انسولین بررسی گردید و الگوی ترشحی انسولین نشان می‌دهدکه در نتیجه تاثیر گلوکز، الگو دو مرحله‌ای (Biphasic) (نمودار ۱) و در نتیجه تاثیر و تحریک جزایر با پتاسیم، الگو تک مرحله‌ای (Monophasic) (نمودار۲) می‌باشد.



نمودار ۲ـ الگوی تک مرحله‌ای (Monophasic) ترشح انسولین متعاقب تحریک جزایر با پتاسیم (۴۰ mM)

بحث

تحقیق نشان داد که روش جداسازی و تخلیص فیکول ، تعداد بیشتری از جزایر را تخلیص نمود و در روش دست‌چین کردن ، هرچه زمان بیشتری صرف شود، تعداد جزایر بیشتر را می‌توان جدا نمود. برای جداسازی جزایر لانگرهانس از روش هضم محدود آنزیمی استفاده گردید. به دست آوردن بهترین زمان هضم آنزیمی بسیار مهم می‌باشد، زیرا جزایر در بهترین زمان جداسازی به صورت مدور یا بیضوی و کاملاً سالم (اشکال ۱،۲ و۳) دیده می‌شوند که با استرئومیکروسکوپ و یا میکروسکوپ فازکنتر است تایید گردید. در بررسی‌های متابولیک جزایر که نمی‌توان از رنگ آمیزی آنها استفاده نمود، جدا کردن جزایر زیر استرئومیکروسکوپ و با استفاده از پتری دیش در زمینه سیاه (روش دست چین کردن) انجام پذیر می‌باشد. در مقایسه سه روش دست چین کردن ، گرادیان ساکارز و فیکول باید گفت که روش اول مشکل و وقت‌گیر اما برای جداسازی و تخلیص جزایر مطمئن می‌باشد و احتیاج به ساعت‌ها وقت دارد.

تحقیق هم‌چنین نشان داد که بهترین روش جداسازی استفاده از گرادیان فیکول برای اندازه‌گیری محتوای انسولین جزایر است. در روش ساکارز نیز احتمالاً به دلیل محیط هیپرتونیک فعالیت‌های ترشحی جزایر تحت تاثیر قرارمی‌گیرند(۲) هر چندکه ساکارز ماده‌ای سهل الوصول و ارزان‌تر می‌باشد و روش استفاده از آن نیز آسان‌تر می‌باشد.

در تاثیر پرفیوژن گلوکز (نمودار ۱) با اثر دادن بافر پایه، ابتدا جزایر به حد پایه‌ای ترشح انسولین رسیده ، سپس بافر محرک حاوی گلوکز (۱۶/۷ mM) عبور داده می‌شود. همان طوری که ملاحظه می‌گردد با افزایش غلظت گلوکز افزایش ترشح انسولین به صورت دومرحله‌ای دیده می‌شود و سپس با کاهش غلظت انسولین به حد پایه بر می‌گردد. مطالعات نشان داده است که انسولین پس از سنتز در سلول‌های β جزایر لانگرهانس به صورت گرانول‌های بتا ذخیره می‌شوند. این گرانول‌ها سپس از طریق سیستم میکروتوبولی به خارج از سلول ترشح می‌گردند (پدیده اگزوسیتوز)، احتمالاً مرحله اول ترشح انسولین که بلافاصله پس از تاثیر گلوکز با غلظت بالا به وجود می‌آید به این دلیل است که گرانول‌های بتا قبلاً به سیستم میکروتوبولی ملحق شده و مرحله دوم به دلیل گرانول‌هایی

است که به تازگی سنتز گردیده و سپس به سیستم میکروتوبولی ملحق می‌گردد (۶). تنها مطالعه دینامیک فوق می‌تواند دو مرحله‌ای بودن ترشح انسولین را نشان دهد، در حالی که بررسی استاتیک (بررسی ترشح انسولین به صورت انکوباسیون ساده) قادر به نشان دادن دو مرحله‌ای بودن ترشح‌انسولین نمی‌باشد و فقط تک مرحله‌ای است.

علاوه بر این، گلوکز به عنوان قوی‌ترین محرک ترشح انسولین می‌باشد که در سیستم آزمایشگاهی (in vitro) نیز این مساله مشاهده گردید و تاییدی بر این مطلب می‌باشد که سیستم مذکور زنده و پویا بوده و در مقابل محرک‌ها واکنش نشان داده و می‌تواند در مطالعات متابولیک مورد استفاده قرار گیرد.

در تاثیر پرفیوژن پتاسیم (نمودار ۲) نکته‌ایی که باید متذکرشد این است که وقتی بافر محرک با پتاسیم بالا (۴۰ mm) به کار می‌رود، برای حفظ تونیسته سلولی باید از غلظت سدیم کاست. نقش پتاسیم به عنوان محرک ترشح انسولین مورد تایید بسیاری از محققینی می‌باشد. بعضی از مطالعات نقش کانال‌های پتاسیمی را در این رابطه موثر می‌دانند و با استفاده از برخی از مهارکننده‌های کانال‌های پتاسیمی این موضوع را تایید کرده‌اند (۸).

پیشنهاد می‌شود که مکانیسم آزادی انسولین مورد پژوهش همکاران محترم قرار گیرد.

References:

1. Wollheim CB. Meda P. Halban PA. Isolation of pancreatic islets and primary culture of the intact microorgans or of dispersed islets cells. Method Enzymol. 1990; 192: 188-267.
2. Lacy PE. Kostianovsky M. Louis ST. Method for the isolation of intact islets of langerhans from the rat pancreas. Diabetes. 1968; 16: 35-39.
3. Offord RE. Halban PA. Isolation of pacnreatic islets of langerhans by filtration on nylon Mesh. Bioch Biophys Res Commun. 1978; 82: 57-68.
4. Lindal A. Steffes M. Sorenson R. Immunoassayable insulin content of subcellulor fractions of rat islets. Endocrinology. 1969; 85: 218.
5. Lacy PE. Finke EH. Conant S. Naber S. Long - term perfusion of isolated rat islets in vitro. Diabetes. 1976; 25: 484-493.
6. Lacy PE. Walker MM. Fink CJ. Perfusion of isolated rat islets in vitro. Diabetes. 1972; 21: 987-998.
7. Hill RS. Boyd AE. Perfusion of a clonal cell line of simian virus 40- transformed beta cells. Diabetes. 1985; 34: 115-120.
8. Weir GC. Halban PA. Meda P. Wollheim CB. Orci L. Renold AE. Perfusion of isolated rat iislets. Metabolism. 1984; 33: 5 .