پژوهش در جراحی

تهیه ارگان مجزا در تحقیقات

ترجمه و تلخیص: دکتر سیدعباس میـرمالک* و گـروه متـرجمین**

چکیده:

استفاده از ارگان‌های بدن انسان، حیوانات و زنده نگه داشتن آن برای تحقیقات (و پیوند)، اقدامات قبل، دخالت‌های جراحی و شرایط نگهداری آنها مورد بحث مقاله ذیل است.

مقدمه

پیشرفت فن آوری در خون رسانی مصنوعی، امکان خون‌رسانی مجزای مؤثری در طیف وسیعی از ارگان‌ها و بافت را می‌دهد. این ارگان‌ها شامل مغز، قلب، ریه قلبی ـ ریوی، کبد و کلیه، طحال، پانکراس، تیموس، دستگاه گوارش، مجاری ادراری، ارگان تولید مثل، سیستم اسکلت‌بندی، اعصاب و رگ‌های خونی می‌باشد. انتخاب درمان جراحی یا دارویی گسترده برای حیوانات قبل از جداسازی ارگان، این تکنیک را به طور گسترده‌ای قوت بخشیده است. در ابتدا خون‌رسانی مجزای ارگان ممکن است تداعی کننده پیچیدگی و دستگاه‌های جراحی فرانک اشتاین باشد به هرحال جراحان از تکمیل این مدل‌ها که امروزه بسیار ساده‌تر از آن چیزی است که در گذشته بوده، لذت می‌برند.

تشابهات بافتی بررسی پدیده‌های مشخصی نظیر روند بیوشیمیایی یا متابولیک و سیستم‌های آنزیمی مربوط به آن‌ها، مصرف اکسیژن، وزن ارگان، محتوای آب، محتوای الکترولیتی، ابعاد بخش بافت‌ها محاسبه و تجزیه و تحلیل خون‌رسانی ارگان یا جریان لنفاتیک موجود در هر سیستم ارگانی را امکان‌پذیر می‌سازد.

خون‌رسانی با محلول‌های غیرقابل تجزیه موجب از هم‌پاشیدگی سلول‌ها برای تجزیه و تحلیل زیست‌شناختی مولکول‌ها، کشت سلول‌ها، جدا کردن سلول‌ها و شکستگی اجزاء سلولی می‌شود. خون‌رسانی مستقیم بافتی با مواد فیکساتور یا رنگ‌کننده بافتی مانند

* استادیار گروه جراحی عمومی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی، واحد تهران

** دکتر لیلا پـرورش، دکتر شقایق تهرانی، دکتر پوریا حسینی، دکتر پانته‌آ رضائیان، دکتر مـریم سعیـدیان، دکتر مـروا طهماسبی‌راد، دکتر علی غلامـرضانژاد، دکتر مهدی کلانتری، دکتر الهـام کنی، دکتر امیـرتیمور مرعشی، دکتر امید میـرمطلبی، دکترعلی ناظمیان

تاریخ وصول: 1397/07/01

نویسندهٔ پاسخگـو: دکتر سیدعباس میـرمالک

تلفن: 88787561

Email: SAM@Mirmalek.net

رنگ حیاتی، نمونه بسیار خوبی برای میکروسکوپ الکترونی یا نوری تهیه می‌کند. تغییر در ترکیب مواد تزریق شده یا شرایط اجزا امکان مطالعه داروها، سموم، هیپوکسی، ایسکمی، هیپوتانسیون یا هیپرتانسیون در عملکرد ارگان را می‌دهد.

تحقیق ویژه بر روی هر ارگانی بستگی به حضور عملکرد تخصصی ارگان نظیر ترشحات برون‌ریز به وسیله کبد، پانکراس یا ترشحات درون ریز (تولید هورمون) در پانکراس، تیموس و غدد فوق کلیه دارد. آماده‌سازی کلیه یا کبد امکان ارزیابی ظرفیت پاکسازی ارگان‌ها برای دارو، متابولیت یا سموم را می‌دهد. ضربان قلب، حرکات دودی دستگاه گوارش یا بافت‌های مجزا (مانند عضله، عصب و رگ) اجازه بررسی عملکرد الکتریکی یا مکانیکی شامل دپولاریزاسیون، اتوماتیستی یا ایجاد ریتم را می‌دهد، به طور کلی امکانات نامحدودند.

معایب و مزایای خون‌رسانی مجزا

جداکردن یک ارگان برای مطالعه، چندین مزیت تجربی نسبت به مطالعه زنده در اختیار ما قرار می‌دهد. ابتدا دسترسی جراحی به ارگان ساده می‌شود؛ رگ‌ها (شریان‌ها) برای خون‌رسانی و تجویز دقیق داروها لوله‌گذاری می‌شوند و جریان لنفاتیک، خون وریدی و یا ترشحات برون‌ریز به وسیله سیستم لوله‌گذاری مناسب جهت تجزیه و تحلیل به آسانی به دست می‌آیند. تمامی ارگان را می‌توان به طور مداوم برای بررسی عملکرد مکانیکی یا الکتریکی، وزن کشی و بیوپسی کرده یا مورد بازدید قرار داد.

دومین مزیت کنترل دقیق متغیرهای آزمایشگاهی با تغییرات داخلی در سطح بالا می‌باشد. در آزمایش‌های زنده، طبیعت هموستاز نظام‌مند، ایجاب می‌کند که هر ارگان با شرایط متغیر مانند تحریکات پاراسمپاتیک در مقابل سمپاتیک و در نتیجه تغییر در میزان جریان خون انطباق یابد، چنان که نیاز زنده ماندن هر ارگانیسم می‌باشد. پاسخ‌های فیزیولوژیکی غیرقابل پیش‌بینی هر حیوانی، مطالعه پدیده‌هایی را که دقت قابلیت تکثیر در آن‌ها، حیاتی است دچار اختلال می‌کند. پارامترهای خون‌رسانی ارگان مجزا (مانند ترکیبات خون‌رسانی، اکسیژن رسانی، فشار خون، جریان و دما) به سختی قابل (در سطوح فیزیولوژیک و پاتولوژیک) کنترل بوده و تابع نوسانات هوموستاتیک نمی‌باشند. سطوح داروها و یا سموم را می‌توان با حذف متابولیسم نظام‌مند که ممکن است تغییرات غیرقابل پیش‌بینی را در سطوح آن ایجاد کند و یا متابولیت ناخواسته‌ای را برای ما تولید کند به طور ثابتی نگه داشت و شرایط پایه‌ای قلب، اسکلت‌بندی، یا عضلات صاف را نیز می‌توان استاندارد نگه داشت. دپورلاریزاسیون سلولی می‌تواند به وسیله تحریکات الکتریکی جهت بررسی‌های غیرزنده فعالیت الکتریکی و یا انقباضات عضلانی برانگیخته شود.

از آن‌جا که آماده‌سازی ارگان مجزا به دور از ناپایداری‌های همودینامیک مانند تأثیرات هورمونی و عصبی صورت می‌گیرد، پاسخ ارگان تحت تأثیر پاسخ‌های نظام مند ارگانیسم دست نخورده قرار نمی‌گیرد.

مزیت سوم اقتصادی است. آماده سازی ارگان‌های مجزا به طور کلی سریع‌تر و کم هزینه تر از آماده‌سازی حیوان سالم صورت می‌گیرد. یک آماده‌سازی مجزا از اندام غالباً امکان چند مطالعه را می‌دهد که این خود موجب حفظ منابع و وقت محقق می‌شود.

آماده‌سازی ارگان مجزا روش مطلوبی برای غربال‌گری فرضیه‌های جدید پیش از شروع آزمایشات گسترده‌تر بعدی می‌باشد و سرانجام از آن‌جا که ارگان‌ها به سرعت از حیوان انتخاب شده جدا می‌شود و حیوان سریعاً قربانی می‌شود، آماده‌سازی ارگان مجزا ممکن است شکل انسانی‌تری از آزمایش برروی حیوانات باشد.

جدا کردن یک ارگان سالم و دست نخورده، مزایایی را که در کشت بافتی یا هموژنیت سلولی قابل دسترس نیست، در اختیار ما قرار می‌دهد. تقسیم بندی آناتومیک و فیزیولوژیک ارگان به بخش‌های (عروقی، گوارشی، خارج سلولی، داخل سلولی، **Secretory**، **Excretory** و بینایی) امکان پذیر است. این‌گونه تقسیم‌بندی به طور فیزیولوژیکی در آماده سازی عملکرد ارگان حیاتی است. رابطه طبیعی میان دو سلول امکان مطالعه اثرات پاراکرین و انوکرین را می‌دهد هم‌چنین نشت آنزیم‌های داخل سلولی به محیط تجربی به حداقل می‌رسد. بزرگ‌ترین عیب خون‌رسانی مجزا طبیعت ناپایدار و در نتیجه محدودیت قابلیت زیست در نمونه‌ها می‌باشد.

سبب‌شناسی و نحوه پیشگیری از مرگ ارگان سؤالات بنیادی هستند که متأسفانه در این بخش به آن‌ها پاسخ داده نخواهد شد. دانشمندان به طور کامل نیازهای فیزیولوژیک برای بقای سیستم خون رسانی مصنوعی را درک نکرده‌اند. حتی در روشی هنرمندانه

کاربرد بالینی وخامت اوضاع با تمدید اکسیژن‌رسانی، اجتناب‌ناپذیر است و پیوند اعضاء پس از برداشتن و خون‌رسانی برای نگهداری قابلیت اعتماد محدودی دارد.

علل این ناپایداری مورد بحث است. اکسیژن‌رسانی چه بدون خون و چه با خون تغییر یافته به وسیله پمپ مصنوعی، لوله و اکسیژن‌رسانی، بدون بهره‌گیری از هموستاز سیستمیک نرمال، مهیا شده و مورد استفاده قرار گرفته است. اجزای سلول خونی و پروتئین‌ها آسیب پذیرند. پلاکت‌های تخریب و توده شده ایجاد لخته‌های کوچک می‌کنند. سلول گلبول قرمز همولیز می‌شود، گلبول سفید پاره و آنزیم‌ها پخش می‌شوند. پروتئین سرم ماهیت خود را از دست می‌دهد و به لوله‌ها می‌چسبد و در نتیجه کاهش پروتئین و ورم بوجود می‌آید که اگر شدید باشد، موجب گسستگی غشایی پلاسمایی می‌شود.

میکروآمبولی تولید شده از این مواد همراه محلول خون‌رسانی کریستالوئیدی و حباب‌های کوچک در محلول‌های تزریق شده ممکن است در وخامت اوضاع نقش داشته باشند. فعالیت غیرمشخص واسطه‌های التهابی فیزیولوژیک و سیستم ایمنی در مدل‌های خونی ممکن است موجب آسیب ارگان شود. فعالیت لیزوزم‌های سلولی و تجمع غیرطبیعی گاز ممکن است در تخریب شرکت داشته باشند. نکته جالب توجه کاهش این اثرات از سطوح مصنوعی به سمت آزمایش در بدن موجود زنده می‌باشد که شانس تشکیل اندوتلیوم کاذب را می‌دهد (مانند پیوندهای پروستیتک و تقویت بطن چپ با پوشنده‌های مخصوص که امکان بروز این پدیده را بوجود می‌آورد).

همچنین پدیده‌ای که کم‌تر درک شده است این است که جداکردن یک ارگان از بدن می‌تواند کمبودهای حیاتی مهم اما نامشخص در متابولیت‌ها، کنترل کننده‌های عصبی، هورمون‌ها و زیرسازها ایجاد کند که موجب اختلال کار سلول شود. فرض بر این است که این کمبوده ممکن است هموستاز طبیعی سلول را مختل کنند احتمالاً از طریق اختلال روندهای بازنویسی و ترجمه که به طور ناگهانی در سلول مرده به وجود می‌آید. مرگ آپوپتوتیک که اصطلاحاً خودکشی سلولی به آن می‌گویند، مشخصاً از نکروز در سطوح مورفولوژیکی و مولکولی مجزا است. نکروز زمانی که سلول‌ها با صدمات شدید ناگهانی (مانند اسکیمی و تروما) یا تغییر در شکل میتوکندری و از دست دادن سریع توانایی نگهدای هموستاز مواجهه می‌شود بوجود می‌آید که به پاسخ‌های التهابی بارز منجر می‌شود، آپوپتوتیس نیز به عنوان مرگ برنامه ریزی شده سلولی که در پاسخ به سیگنال‌های ظریف محیطی اتفاق می‌افتد شناخته می‌شود که برای مرگ مورفوژنتیک در طول توسعه جنینی و حذف سلول‌های T فعال یا حذف هورمون عامل رشد، تحریک دمایی (سرما و گرما)، سموم، گلوکوکورتیکوئید یا اشعه یونیزه با دوز کم برنامه ریزی شده است. بیرون ریزی محتویات داخل سلولی اتفاق نمی‌افتد زیرا شکستن سلول‌ها در غشاء گونه‌ای صورت می‌گیرد و ذرات آپوپتوتیک و فاگوستیوز شده و بنابراین التهاب در حداقل است. این روند نیازمند بیان ژنی جدید (C-myc و P53 و Fas برای حداقل نامگذاری) می‌باشد و می‌تواند به وسیله بیان دیگر مهارکننده‌های بین سلولی (bcl-2, bcl-x) محافظت شود آپوپتوسیس بخشی فراتر از موضوع این مقاله دارد، اما برای هدف ما باید بر تفسیر مطالعات انجام شده با استفاده از ارگان جدید از محیط طبیعی آن، مطرح شود.

این محدودیت‌های غیرقابل اجتناب، ناگزیر موجب تخریب در عملکرد ارگان، ایجاد کننده خون‌رسانی مجزای گسترده و مزمن می‌شود. سرانجام از آن‌جا که نتایج تجربی از سیستم مجزا بدست آمده است، ممکن است به طور کامل برای پاسخ ارگان زنده قابل اجرا نباشد. از نظر تاریخی تصور می‌شد که خون‌رسانی مجزا، مطالعه یک ارگان در حال مرگ می‌باشد، اما امروزه نتایج به عنوان نتایجی قابل اطمینان و مرتبط در سطح گسترده‌ای پذیرفته شده‌اند به شرطی که ارگان در یک پنجره زمانی منطقی مورد بررسی قرار گیرد و پزشکان بتوانند پایداری سیستم را حفظ نمایند.

طراحی سیستم، اجرا و نگهداری

همان گونه که به وسیله جراحی بالینی نشان داده شده است، بهترین شکل آموختن اجرای تحقیق بر روی ارگان مجزا، انجام آن است. ارگان‌های مجزا در محیط‌های دانشگاهی در سطح گسترده ای به کار گرفته می‌شود و همکاران دانشگاهی که از مدل‌های مشابهی استفاده می‌کنند غالباً به یک فرد مبتدی می‌آموزند یا با او همکاری می‌کنند. حتی اگر مدل دقیق دارای تفاوت باشد، بسیاری از روش‌ها می‌توانند تعمیم یابند.

انتخاب گونه حیوانی

حفظ منابع، نیازمند برنامه‌ریزی دقیق در مراحل اولیه آزمایش است. نیاز به توجه بیشتر جهت به دست آوردن حیوانات سالم برای دستیابی به اطلاعات باارزش به خودی خود روشن است. هرچند حیوانات کوچک‌تر در بررسی پدیده‌های سلولی یا بیوشیمیایی ممکن است با صرفه تر باشد و گونه‌های انتخاب شده باید امکان انجام بررسی کافی پارامترهای مورد نظر را بدهد. بافت، متابولیت، ترشحات برون ریز با محصولات آندوکرین باید برای تجزیه و تحلیل‌های بعدی در دسترس باشند یا به قدر کافی تولید شده باشند. ابعاد ارگان باید به گونه‌ای باشد که امکان لوله‌گذاری برای رگ‌های کوچک، مجاری لنفاتیک و یا فضای مورد نظر را بدهد. پاسخ‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک در گونه‌های مختلف ممکن است تغییر کند. محقق باید تعیین کند آیا یک گونه خاص برای تحقیق بر روی یک فرضیه مناسب است یا خیر.

بیهوشی

برای اجتناب از هیپوکسی یا ایست تنفسی، استفاده از حمایت ونتیلاتور را در نظر بگیرید یا انتخاب ماده بیهوشی مناسب به طور منطقی از عوارض فوق یا اثرات تعیین کننده بر روی ارگان مورد نظر مانند خستگی غیرقابل برگشت عضله قلب هنگام استفاده از هیدروکربن‌های هالوژنه در مطالعه فیزیولوژی قلب، اجتناب ورزید. موادی با تأثیر کوتاه مدت ارجحیت دارند، از آن جا که برداشتن ارگان به سرعت انجام‌پذیر است، لذا اثرات برجامانده باید به حداقل برسد. دقت در انتخاب دوز مورد نیاز است. استفاده میزان کم‌تر از دوز لازم نه تنها غیرانسانی است بلکه باعث آزاد شدن توام با درد کاتکول آمین می‌شود که اثرات عمیق و ناخوشایندی بر روی عرق ارگان به وجود می‌آورد. اگر شل کننده های عضلانی مورد استفاده قرار می‌گیرند حل آن‌ها با بررسی کفایت داروی بیهوشی ممکن است نتایج نهایی مشابه با نتایج حاصل از مصرف کم‌تر از دوز لازم را به همراه داشته باشد. تزریق مقدار بیشتر از دوز مورد نیاز ممکن است موجب کشتن حیوان دهنده ارگان یا کاهش غیرضروری عملکرد ارگان مورد نظر شود.

روش تجویز به طور عموم موجب آسایش می شود تجویز از راه اینتراپریتیونئال در اکثر حیوانات کوچک ساده‌ترین روش است در حالی که تجویز از راه ورید عموماً در حیوانات بزرگ‌تر کاربرد دارد. تزریق از راه عضله ممکن است سلامتی محقق را در مقابل گوشتخوارهای وحشی تضمین کند و روش استنشاقی نیازمند لوله‌های بخارکننده می‌باشد، اما به هرحال یک انتخاب است.

در ارگان بلندتر حتی مراقبت دقیق‌تر ونتیلاتور، همودینامیک، هیدراتاسیون، دما و وضعیت متابولیک مورد اشاره است. در روش مشابهی برای سیستم پارابیوتیک که یک حیوان حمایت کننده در آن خون دارای اکسیژن تزریقی به ارگان مجزا در طول مدت آزمایش در خود دارد، نیز وجود دارد.

جراحی

اگرچه آماده سازی جراحی ارگان‌های مجزا نسبت به ارگان‌های ویژه، حیوان، گونه حیوانی و پروتکل آزمایشی، تغییر می‌کند، به حداقل رساندن هیپوکسی ارگان از طریق برداشتن سریع و خون رسانی مجدد و فوری برای تولید مجدد نتایج، ضروری است. خوشبختانه پروتکل‌های برداشتن سریع ارگان و به حداقل رساندن ایسکمی برای بیشتر ارگان‌ها وجود دارد (برداشتن کبد می‌تواند بدون وجود زمان لازم برای ایسکمی انجام شود.) هم‌چنین آسیب مکانیکی ارگان از طریق اجتناب از دستکاری‌های غیرضروری بافت، باید به حداقل برسد.

طراحی سیستم خون‌رسانی

انتخاب ماده تزریقی

طـراحی یک سیستم خون‌رسانی باید نیازهای آزمایش را برآورده سازد و استفاده روزانه و نگهداری را تسهیل کند. در انتخاب یکی از چنـد روش در دستـرس نیـازهای پایه‌ای شامل اکسیـژن‌رسانی بافتی، تهیه مـواد غذایی، برداشتن مواد زائد متابولیتی، ضربه گیر ... مناسب، غلظت فیزیولوژیک یون‌های اساسی، فشار اسموتیک کلوئید کافی برای جلوگیری از ورم می‌شود.

تغذیه و اکسیژن‌رسانی عموماً به دو دسته تقسیم می‌شود 1- تزریق مواد بدون خون 2- تزریق مواد بر پایه خون. لانگن دورف (Longendorff) در مطالعه فیزیولوژی قلب در سال 1895 ابتدا مشخص کرد که در حمایت از قلب مجزای موش، مقدار کافی اکسیژن

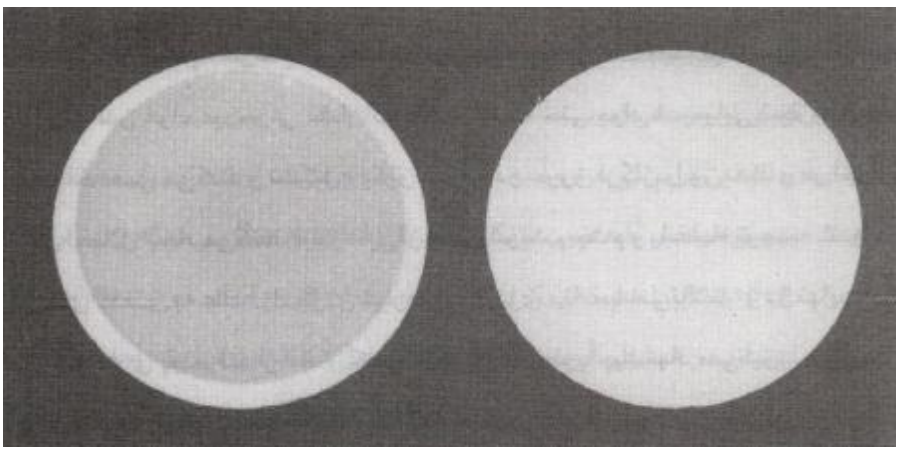
می‌تواند در محلول کریستالوئید غیرقابل حل بماند، این تزریق‌های بدون خون عموماً مقرون به صرفه و راحت تر از تزریق بر پایه خون هستند، اما با کمال تعجب کم‌تر فیزیولـوژیک نیستند. ابتدا این که ظرفیت حمل اکسیژن توسط کریستالوئید خالص محدود است. دوم محلول‌های آب‌دار از چسبندگی کمتـری برخوردارند، در نتیجه جریان بالاتری نسبت به تزریق بر پایه خون ایجاد می‌کنند و سرانجام کریستالوئید بدون مکمـل‌های نرمال سلولی و پروتئین‌های موجود در خون می‌باشد. معذالک مطالعات مهم و پذیرفته شده بسیاری با تـزریق بدون خون انجام شده‌اند. ترکیب فرمول‌هایی که به طور رایج مورد استفاده هستند و تغییرات Krebs Henseleit در جدول 1 نشان داده شده است. بسیاری از محلول‌ها باری استفاده‌های مشخصی فرمول بندی شده‌اند.

جدول 1- محلول اصلاح شده Kerb's - Hensalet

NaCl	*118.0 mmol/L*
KCl	*4.70 mmol/L*
CaCL2	*2.52 mmol/L*
MgSO4	*1.64 mmol/L*
NaHCO3	*24.88 mmol/L*
KH2PO4	*1.18 mmol/L*
Glucose	*5.55 mmol/L*

آماده کردن دقیق مواد تزریقی غیرخونی ضروری است. تمام ترکیبات باید به دقت اندازه‌گیری و تصفیه شوند به ویژه محلول‌ها. در تصویر 1 یک فیلتر مورد استفاده برای رساندن مواد غیرخونی نشان داده شده است، حتی مواد شیمیایی تجزیه شده ایجاد ناخالصی می‌کنند و تشکیل میکروآمبولی در عروق ارگان را می دهند و در اجرای مراحل اختلال ایجاد می‌کنند. فیلترهایی از جنس ابریشم، پشم و یا غشاء توصیه شده‌اند، فیلترهای کاغذی به علت آزاد کردن فیبرهای سلولزی مناسب نمی باشند و در نهایت این که آماده سازی پیشرفته از مقدار کافی مواد تزریقی قویاً پیشنهاد می‌شود. هیچ چیز مأیوس کننده‌تر از این نیست که یک ماده آماده سازی شده از سیستم تزریق بیرون بریزد و زمان لازم برای ایسکمی ناخواسته ای را ایجاد کند، طول این مدت وابسته به سرعت محقق می‌باشد.

دسته دوم مواد تزریقی، موادی برپایه خون می‌باشد که عموماً پرهزینه‌تر، پرزحمت‌تر و در عین حال بیشتر فیزیولویکی هستند. در هر تزریق بر پایه خون استفاده از آنتی کواگولان الزامی است. هیارین بیشتر بکار گرفته می‌شود اما در صورت ممنوعیت استفاده از هیارین، موارد دیگر در دسترسند. باید نسبت به تغییراتی که در ترکیبات خونی ایجاد شده و موجب تخریب خون‌رسانی بافتی در سیستم خارج از بدن می‌شود، شناخت داشته باشید. این تغییرات عبارتند از تغییر ماهیت پروتئین، آمبولی چربی، تجمع پلاکت و گلبول قرمز تغییرات چسبندگی و پارگی گلبول قرمز، گلبول سفید و پلاکت.



تصویر 1- فیلتر مورد استفاده با روزنه پنج میکرونی (چپ) برای محلول‌های کریستالوئید در مقایسه با فیلتر استفاده نشده است. حتی وقتی محلول‌های مصرفی به نظر شفاف می‌رسند، استفاده از فیلتر ضروری است.

بدون توجه به تقسیم‌بندی ماده تزریقی غلظت ترکیبات مورد استفاده در خون‌رسانی مانند سدیم، پتاسیم، کلرید کلسیم، منیزیم و گلوکز و سایز اضافه کننده‌های مربوط به آزمایش، باید به تناوب مواد تجزیه و تحلیل قرار گیرند. ماده تزریقی بر پایه خون مستعد همولیز است که هماتوکریت را پایین می‌آورد و پتاسیم و هموگلوبین آزاد را بالا می‌برد که همه این مواد باید هنگام استفاده از سیستم خونی بررسی شوند. به خاطر داشته باشید که هموگلوبین آزاد آسیب می‌رساند اما به وسیله کبد پاکسازی می‌شود. مواد تزریقی بر پایه خون بسیار مستعد هیپرکالمی (ناشی از همولیز) و تغییر در سطح کلسیم یا PH می‌باشد.

اگر از خون حیوان دیگر استفاده شود ممکن است ناسازگاری خونی ایجاد شود.

برای اجتناب از این پدیده استفاده از خون سازگار رجحان دارد که از موارد لازم برای موفقیت است. خون ممنوع ممکن است مشکلات منطقی دربر داشته باشد، از آن جا که ارگان و ماده تزریقی به‌طور هم‌زمان باید از یک موجود گرفته شوند، ایسکمی ارگان افزایش می‌یابد.

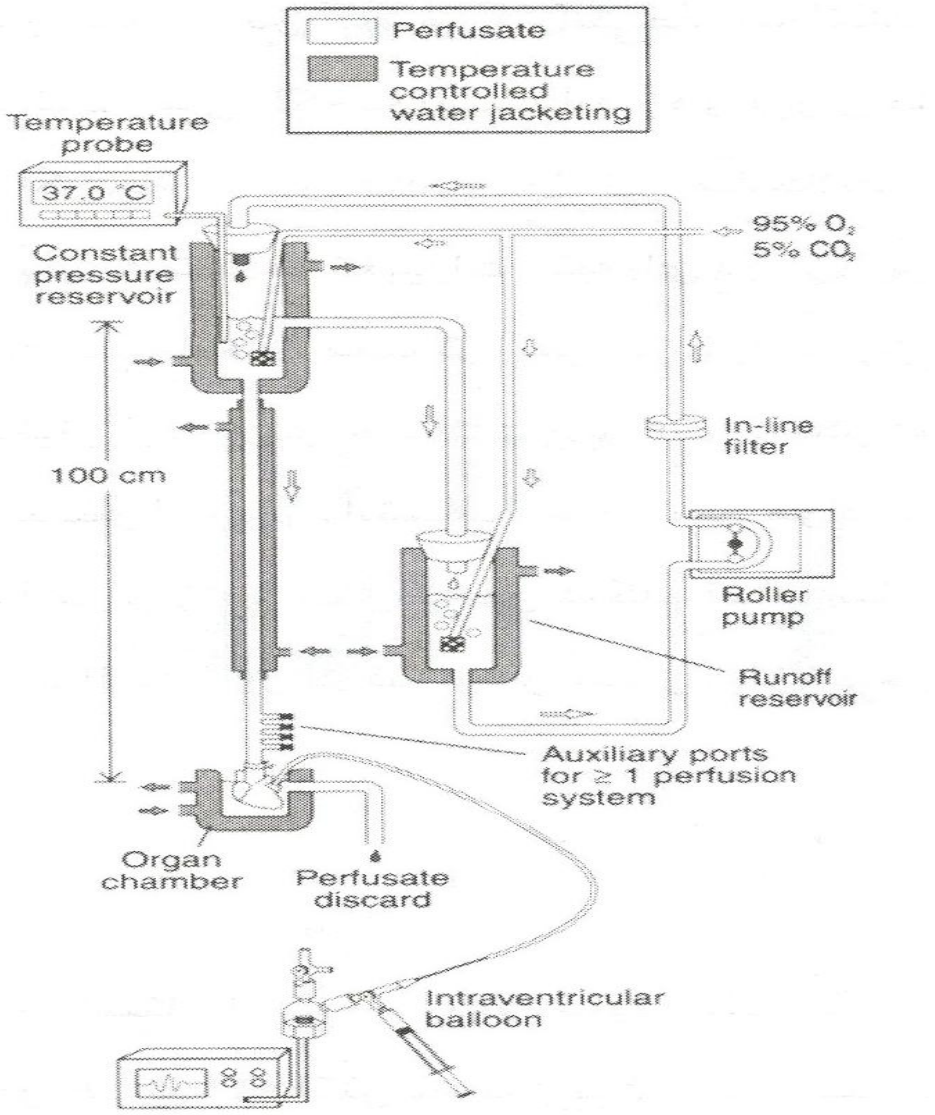
فشار ثابت یا جریان ثابت خون‌رسانی

یکی از مهم‌ترین مزایای خون‌رسانی مجزا این است که فشار و جریان به طور دقیقی کنترل می‌شود، تقدم فشار مورد بحث قرار گرفته است. همان طور که در تصویر 2 نشان داده شده است یک سیستم فشار ثابت از طریق نیروی جاذبه زمین بر روی یک ستون از مواد تزریقی که در ارتفاعی ثابت بر روی ارگان خون‌رسانی شده با یک پمپ مکانیک بدست آمده، انجام می‌شود. در این روش فشار خون‌رسانی ثابت نگه داشته می‌شود اما جریان با مقاومت عروق محیطی ارگان تغییر می‌کند. جهت خون‌رسانی با فشار ثابت این مطلب را پیش می‌کشد که میانگین فشار خون‌رسانی در گردش دست نخورده ثابت است و بنابراین از لحاظ فیزیولوژیکی در سیستم مجزا مرتبط‌تر است.

همان گونه که در تصویر 3 نشان داده شده است به وسیله پمپ کردن مواد تزریقی مستقیماً به یک ارگان مجزا یک سیتم جریان ثابت بوجود می‌آورد که در این حالت جریان ثابت می‌ماند اما فشار خون‌رسانی با مقاومت عروقی ارگان تغییر می‌کند. فشار خون‌رسانی معمولاً کمتر از فشار شریان در بدن موجود زنده است که احتمالاً به علت عصب‌دهی اتونوم و فقدان کاتکول آمین در گردش و کاهش چسبندگی مواد مورد استفاده در خون رسانی (در کریستالوئید یا مواد تزریقی بر پایه خون) می‌باشد.

جهت خون‌رسانی با جریان ثابت این مطلب مطرح است که نبود واسطه‌های اندوکرین و عصبی نرمال قطر طبیعی عروقی هم‌چنین واکنش عروقی تغییر یافته منجر به مقاومت غیرطبیعی عروقی می‌شود و این که تنها خون‌رسانی با جریان ثابت، میزان جریان را در طیف فیزیولوژیک تأمین می‌کند.

باید با دقت از خون‌رسانی بیش از حد اجتناب شود، زیرا ممکن است نتایج زیر را در برداشته باشد صدمات غیرقابل برگشت به شکل ادم، افزایش مقاومت عروقی، خونریزی یا هماتوم مستقیم و یا ترشحات برون‌ریز ممکن است با خون مخلوط شود. خون‌رسانی کم‌تر از نرمال خطر کمتری دربر دارد و ممکن است بسیاری از ارگان‌ها دروه‌های کوتاهی از کاهش جریان را تحمل کنند. در صورت استفاده از جریان ثابت و یا فشار ثابت پمپ‌ها بای ظرفیت کافی داشته باشند. در طول آزمایشات جریان و فشار مواد تزریقی باید تحت مراقبت باشند. جریان ضربانی یک انتخاب در آماده سازی جریان ثابت می‌باشد که عملکرد سیستم قلبی عروقی دست‌نخورده با پمپ‌هایی که ایجاد فشار موجی شکل در عروق خونی می‌کند را توصیه می‌کند. چندین مطالعه مزایای این سیستم را در ارگان مجزا هم‌چنین در جراحی ترمیمی قلبی ریوی نشان داده اند. استفاده از جریان ضربانی ممکن است بیشتر در مطالعات سیستم عروقی حائز اهمیت باشد. فشار ضربان باید از نزدیک مورد مراقبت قرار گیرد، زیرا ظرفیت کم لوله‌های مصنوعی ممکن است، فشار سیستم غیرمرطوب را انتقال داده و موجب آسیب‌زدن به ارگان شود. شاخه جانبی که با ستونی از هوا پرشده به عنوان یک مخزن هم‌گام مؤثر عمل می‌کند. مزایای خون‌رسانی ضربانی باید در برابر هزینه‌ها، پیچیدگی و آسیب‌های خونی اضافی که در این روش ایجاد می‌شود، سنجیده شود.



تصویر 2- محیط ساده با فشار ثابت (ماده تغذیه کننده کریستالوئید، بدون بازگردش). فشار ثابت نگه داشتن ستونی از مایع تغذیه کننده در ارتفاع ثابتی در بالای اندام تعیین می‌گردد. مایع تغذیه کننده به طور مداوم توسط یک پمپ از یک مخزن خروجی به داخل مخزن فشار ثابت پمپ می‌شود. بعد از اینکه سطح مطلوب به دست آمد (به طور مثال، 100 سانتی متر بالاتر از قلب)، ماده تغذیه کننده اضافی از طریق مجرای سرریز به داخل مخزن خروجی سرریز می‌گردد. در این سیستم، ماده تغذیه کننده پس از یک بار عبور از اندام، دور ریخته شده و با اضافه کردن ماده تغذیه کننده گرم و اکسیژن‌دار به داخل مخزن خروجی، جایگزین می‌گردد. دمای تغذیه کننده توسط Water – Jacketing مجاری تغذیه کننده کنترل و بازرسی می‌شود. اکسیژن دار کردن سیستم و PH آن توسط حباب دار نمودن هر دو مخزن توسط مخلوطی از اکسیژن 95% و دی اکسید کربن 5% صورت می‌پذیرد. محفظه اندام دارای درجه حرارت (توسط Water – Jacketing) و رطوبت (توسط غوطه ور کردن اندام در پساب خود) ثابت نگه داشته می‌شود. تصفیه کردن مداوم در مسیر (مثلاً با فیلتر 5 میکرونی)، تمام ذرات اضافی را از ماده تغذیه کننده، قبل از رسیدن آن به مخزن با فشار ثابت، جدا می کند. ورودی‌های اضافی کانولای اندام این امکان را مهیا می‌سازند که دیگر ستون‌ها به طور موازی جهت تعویض سریع و یا متناوب ماده تغذیه کننده، داروها و غیره، جایگزین شوند. از یک بالون داخل بطنی که به یک مبدل فشار متصل شده است نیز جهت بررسی کنترل عملکرد بطنی استفاده می‌شود.

جریان مجدد مواد تزریقی در مقابل جریان عادی این مواد

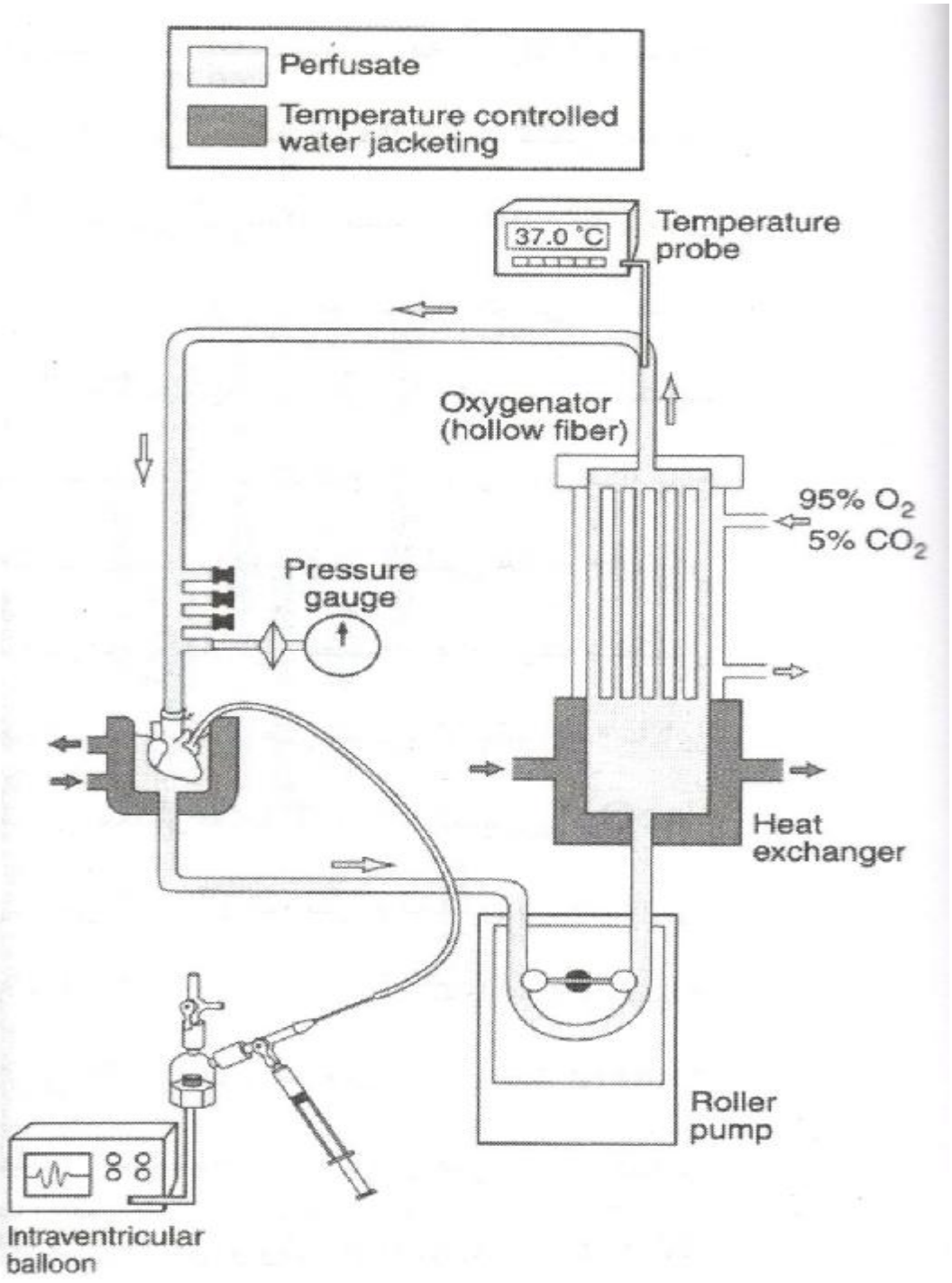
در صورتی که مواد تزریقی دوباره به جریان درآیند مواد زائد حاصله انباشته شده و مواد غذایی و ماحصل آن نه تنها با گذشت زمان بلکه به نسبت اندازه و میزان متابولیک ارگان مورد مطالعه، به اتمام می‌رسند. اگرچه جریان عادی مواد این مشکلات را مرتفع می‌سازد، اما جریان مجدد ممکن است نیاز به مطالعه تغییرات دقیقه‌ای در تزریق ترکیب با **Admixtures** با هزینه بالا در صورت استفاده از ماده تزریقی بر پایه خون داشته باشد. مقدار خالص مواد تزریقی مورد نیاز ارگان در حیوانات بزرگ‌تر ممکن است یک سیستم **One – Pass** را محدود کند. صرف نظر از روش انتخاب شده تأمین مواد مورد نیاز خون‌رسانی در سیستم جریانن عادی یا مواد از دست رفته در هنگام آماده سازی برای سیستم جریان مجدد باید به دقت مورد مراقبت قرار گرفته و در صورت لزوم جای مواد مصرف شده مجدداً جایگزین گردد.

انتخاب نحوه اکسیژن رسانی

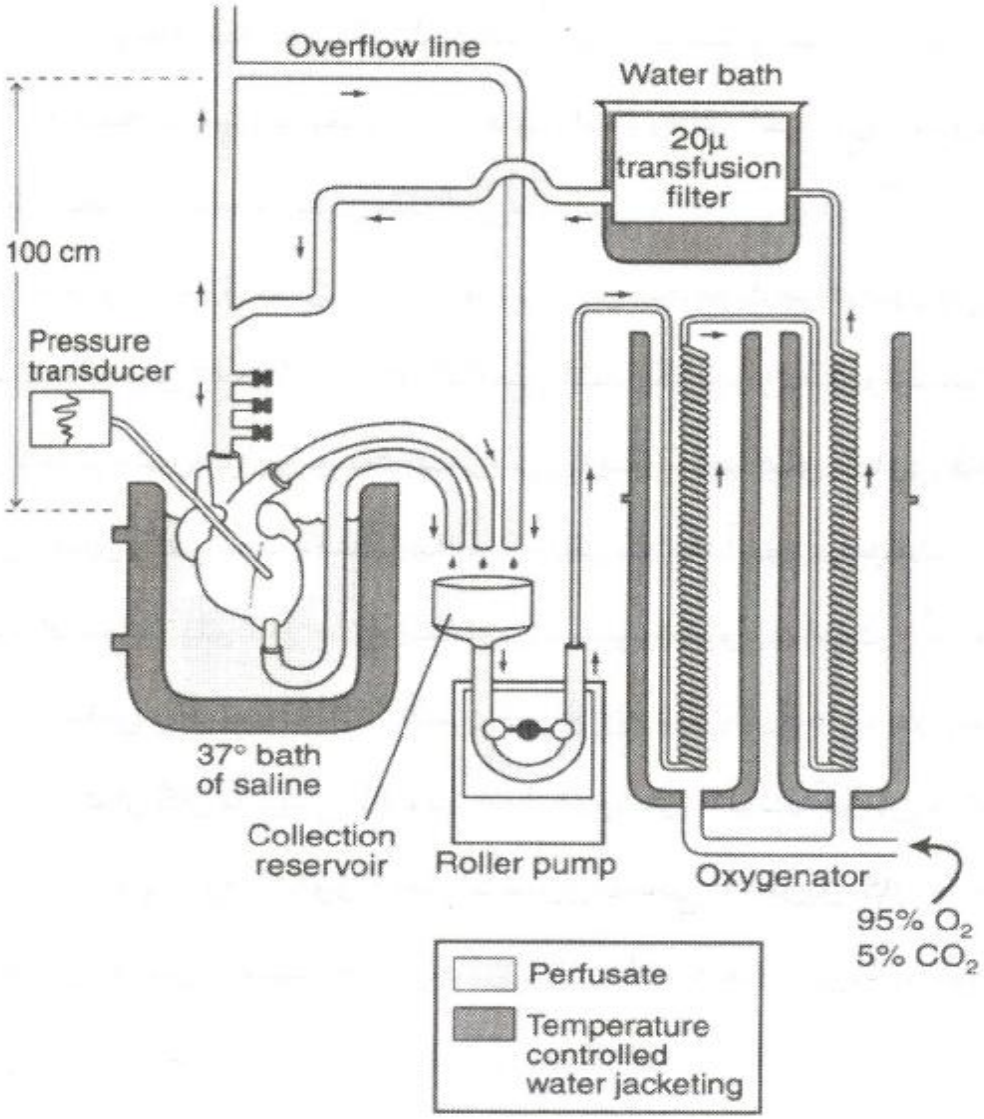
برای دستیابی به نتایج قابل تکرار، به استاندارد در آوردن دقیق فشار گاز تزریقی کاری اساسی است و نیاز است که برای هدایت حداکثر جریان پیش بینی شده در حین دستیابی به تبادلات مناسب گازی، اکسیژن‌رسان در اندازه مناسب باشد. دو روش اکسیژن‌رسان با حباب و اکسیژن‌رسان اکسیژن‌رسانغشایی وجود دارد.

اکسیژن‌رسان حبابی کم‌هزینه تر بوده و برای محلول کریستالوئید خالص مناسب است. این دستگاه‌ها برای سلول‌های خونی و پروتئین موجود در مواد تزریقی بر پایه خون بیشتر اثر مخرب دارند. به اکسیژن‌رسان حبابی برای مواد تزریقی کریستالوئید خالص به وسیله هوادهنده‌های آکواریومی که با قیمت تجاری در دسترسند و حباب گاز را به درون هریک از حرفه‌ها داخل می‌کنند (این مواد دهنده‌ها عموماً **Air Stones** نامیده می‌شوند) به سادگی به کار گرفته می‌شود. اکسیژن‌رسان غشائی با هزینه کم‌تر و طراحی مهندسی توسط دکتر کارل آپستین **Carl Apstein** و همکارانش به ما معرفی شده است. (تصویر 4). در این سیستم خون تازه گاو هپارینه شده است (15000/**L**) و سه مرتبه به وسیله سانترفیوژ با محلول **Krebs-Henseleite** شسته شده است.

جنتامایسین نیز به سلول‌های فشرده اضافه می‌شود (تا غلظت نهایی به **mg/L** 2 برسد و 1 تا 3 روز در یخچال گذاشته می‌شود. هنگامی که برای استفاده آماده شد، گلبول قرمز دوباره به صورت سوسپانسیون (محلول) در آورده می‌شود. (به صورت 260 میلی‌لیتر گلبول قرمز فشرده در **ml** 240 محلول **Krebs – Henseleite**) و پس با اضافه کردن محلول ذخیره و غلظت نهایی 4% آلبومین، **M/L m** 0/4 پالمیتات و یک واحد/ میلی‌لیتر هپارین به حجم 600 میلی‌لیتر رسانده می‌شود. گلبول قرمز معلق به وسیله پمپ شدن از ورای دو مارپیچ سیلیکونی طویل که به‌طور متوالی به یکدیگر متصل شده‌اند. (با قطر داخلی 0/058 اینچ و قطر خارجی 0/077 اینچ) اکسیژن رسانی می‌شود. هر یک از این حلقه‌ها وارد یک سیلندر شیشه‌ای حاوی یک **Water Jacketed** که بالای آن باز است، می‌شود و از پایین به بالای سیلندر پمپ می‌شود. برای بدست آوردن بیشترین مقدار تبادل گازی، اکسیژن (O_2 95% و CO_2 5%) از پایین هر سیلندر شیشه‌ای عبور می‌کند و از طریق لوله‌های سیلیکونی پخش می‌شود. اکسیژن‌رسانی (**Po2** به طور نرمال 200-300 **mmHg**) به وسیله افزایش میزان جریان گاز و فشار دی اکسید کربن (به طور معمول 45 - 35 **mmHg** است) از طریق افزایش نسبی جدار سیلندر شیشه‌ای افزایش می‌یابند. خون اکسیژن‌رسانی شده، از طریق فیلتر ترانسفوزیونی 20 میکرونی **Water-Jacketed** عبور می‌کند و همان طور که قبلاً شرح داده شد، در یک فشار ثابت به دست می‌آید. این سیستم یک اکسیژن‌رسانی بی ضرر را برای تحقیق بر روی ارگان‌های کوچک ارائه می‌کند.



تصویر 3- مدل ساده با جریان ثابت (ماده تغذیه کننده بر پایه خون، با بازگردش مجدد) بسیاری از خصوصیات این سیستم (کنترل دما، نحوه اکسیژن‌دار کردن و کنترل PH)، شبیه مدل فشار ثابت است. تفاوت قابل توجه این است که یک اکسیژن‌دار کننده قابل تهیه از بازار و به صورت یک رشته مورافرار، خون را اکسیژن‌دار می‌نماید. یک پمپ چرخنده مسدود کننده، جریان ثابتی را (به جای فشار ثابت) ایجاد می‌نماید تا اندام را خون‌رسانی نماید. فشار ماده تغذیه کننده توسط یک سوزن فشاری (Pressure – Gauge) (و یا مبدل فشاری) کنترل می‌گردد. به علت گرانی و دسترسی محدود، معمولاً به جای این که خون را دور بریزند، آن را دوباره به چرخش در می‌آورند. توجه داشته باشید که این مثال‌ها، تنها دو نوع از مثال‌های بی‌شمار موجود هستند که به نیازهای تجربی فرد بستگی دارند.



تصویر 4ـ قلب مجزای خونرسانی شده. یک اکسیژن‌دار کننده ارزان و با ساخت آسان این امکان را مهیا می‌سازد تا با استفاده از مواد تزریقی را پایه خون با جنبه‌های غیرفیزیولوژیک مواد تزریقی با پایه کریستالوئید، مقابله شود. نحوه استفاده از این اکسیژناتورها مشابه مدل‌هایی است که قبلاً توضیح داده شدند.

یک سیستم پارابیوتیک که نخستین بار در سال 1904 شرح داده شد و در تصویر 5 نیز نشان داده شده است، به طور مستقیم به یک ارگان مجزا، خون شریانی را از یک حیوان حمایت‌کننده تزریق می‌کند. انواع متفاوتی از این روش وجود دارد، اما به طور کلی خون وریدی گرفته می‌شود و به ورید جوگولار حیوان حمایت کننده که نه تنها به عنوان یک اکسیژن رسان زنده عمل می‌کند بلکه هم‌چنین هموستاز خون‌رسانی را نیز حفظ می‌کند، بازگردانده می‌شود. یکی از معایب این روش احتمال وجود یک واکنش ناسازگاری بین خون و بافت ارگان مجزا می‌باشد.

گازی که به طور معمـول برای اکسیژن‌رسانی و محافظـت مـواد تزریق غیـرخونی استفاده می‌شود، حاوی O_2 95% و $5CO_2$% می‌باشد، اگرچه Co_2 در سیستم‌های بر پایه خون به طور عموم مورد نیاز نیست. بررسی تأمین کننده‌های گازی قبل از شروع آزمایش

برای تعیین کافی بودن مقدار ماده تزریقی که بعداً مورد استفاده قرار می‌گیرد، انجام می‌شود. ادامه جریان گاز برای اکسیژن رسانی ضروری است و به وسیله دیدن اکسیژن‌رسان حبابی یا لمس قسمت خالی اکسیژن‌رسان پرده ای، بررسی می‌شود. بررسی متناوب فشار گاز تزریقی، PH در طول آزمایش و تأیید جریان گاز هم به عنوان یک ضرورت انجام می‌شود. کنترل دقیق اکسیژن‌رسانی از طریق گازرسانی خارج از بدن صورت می‌گیرد. هیپوکسی به وسیله تزریق حباب با نیتروژن، القا می‌شود.

لوله، کانال و مخزن

انتخاب لوله با قطر کافی برای هدایت میزان جریان پیش‌بینی شده، بدون ایجاد اغتشاش بیش از حد (اما با برخی محدودیت‌ها از نظر قطر و طول لوله‌ها که موجب کاهش حجم ابتدایی می‌شود) انجام می‌یابد. معمولاً لوله‌های لاستیکی سیلیکون و پلی وینیل کلرید (PVC) مورد استفاده قرار می‌گیرد.

لاستیک سیلیکون مـزایای هم‌چون فقـدان خاصیت ارتعاش و انعطاف‌پذیری بیشتر نسبت به لوله PVC را داراست ولی گران‌تر است و به خاطر نفـوذپذیری نسبت به گاز، در صورتی که جریان برای مـدت کوتاهی قطـع گردد، مستعد شکل‌گیری حباب است. لوله‌های PVC کم‌هزینه‌تر و غیرقابل نفوذ می‌باشند اما به علت سختی که دارند، در طول مـراحل ساخت، مستعد پرورش آلـودگی می‌باشند. بنابراین در موقع استفاده از خون کامل تا موقع استفاده از محلول کریستالوئیدی، کاربرد آن ممکن است خطرناک باشد.

لوله اتصالی که اغتشاش را کاهش می‌دهد و ضد آب و گاز می‌باشد. این رابط در جهت شریانی جریان قرار می‌گیرد که برای جلوگیری از نشت مواد تزریقی یا مکش هوا به داخل سیستم (اثر ونتوری) است. خم کردن این ارتباط ممکن است مشکل را حل کند.

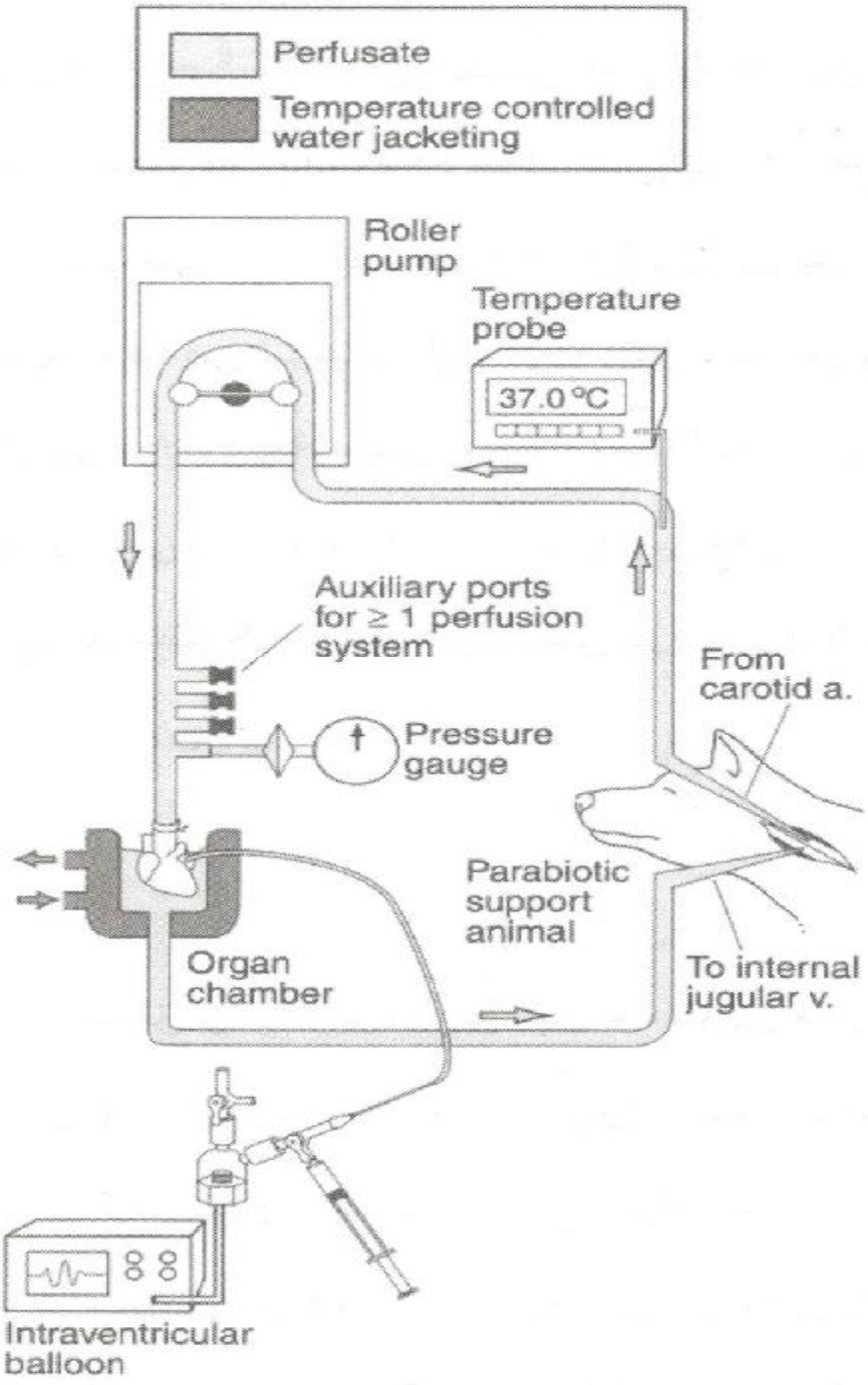
نوک لوله باید لبه یا شیار داشته باشد که ساختار لوله‌ای شکل بتواند با خط اتصال تأمین شود. اگر یک لوله آهنی به کار برده می‌شود یک ناودان می‌تواند محل اتصال باشد. اگر لوله پلاستیکی و یا شیشه‌ای به کار گـرفته می‌شود، داغ کردن نوک آن و تماس آن با یک سطح سرد می‌تواند آن را به شکل رضایت‌بخشی لبه‌دار کند. لوله باید به طور دقیـق قرار داده شود که مانعی برای رگ‌های حمایت کننده کوچک‌تر نباشد (به عنوان مثال هنگامی که عروق کـرونری آئورت صعودی از قلب را لوله گذاری می‌کنند) هم‌چنین باید در نظر گرفت که یک لوله آهنی ممکن است به عنوان یک الکترود برای تحریکات الکتریکی یا مراقبت از دپولاریزه کردن الکتریکی عمل کند.

اگر گردش وریدی لوله‌گذاری می‌شود (به خصوص در سیستم گردش مجدد) لوله‌های بزرگ‌تری برای به دست آوردن درناژ وریدی کافی نسبت به لوله‌گذاری در قسمت شریانی مورد نیاز است. مخزن وریدی باید حجم و جریان لازم را بدون افزایش فشار هیدروستاتیک وریدی، انباشته کند. بودن ارتفاع مورد تأیید امکان خارج کردن هوا را ایجاد کرده و راکد بودن خون را به حـداقل می‌رساند. برخی از محققین بر این باورند که در خون رسانی درازمدت و موفق، نگهداری فشار وریدی نرمال و مراقبت از فشار (به عنوان مثال فشار وریدی پورت در خون رسانی کبد) دارای اهمیت است.

اجتناب از آمبولی

آمبولی میکروسکوپی و یا ماکروسکوپی ممکن است در خون رسانی مصنوعی ایجاد اختلال کند. از میکرو آمبولی می‌توان با فیلترگذاری مناسب مواد تزریق جلوگیری کرد. برای سیستم کریستالوئیدی از فیلترگذاری خطی با فیلتر 5 میکرونی می‌توان استفاده کردف اما در سیستم بر پایه خون، فیلترهایی 15 میکرونی مورد نیاز است. در طول یک خون‌رسانی گسترده، فیلتر مسدود شده و در بهترین حالت خود را به صورت کاهش جریان یا افزایش ناگهانی فشردگی لوله نشان می‌دهد. در فیلترهایی که به صورت ردیفی قرار دارند، ممکن است یکی از فیلترها به صورت اتفاقی پاره شود و میکروآمبولی را در یک ارگان پخش کند و تنها تظاهر آن می‌تواند به صوت اختلال ناگهانی در عملکرد ارگان باشد. به کمک جایگزینی منظم و دقیق فیلترها می‌توان از این اتفاق جلوگیری کرد.

آمبولی ماکروسکوپی معمولاً حباب‌های هوایی هستند که به وسیله برقراری سیستم استفاده کننده از تله‌های هوا در جای مناسب و تأمین ارتباط لوله‌ای و بازرسی متناوب لوله پس از خون‌رسانی می‌توان از بروز این پدیده پیشگیری کرد. در سیستم‌های کلوئیدی و یا خونی، کف و یا پروتئین تغییر ماهیت یافته می‌تواند مشکل آفرین باشد و به همین دلیل استفاده از مواد ضد کف را ضروری می‌سازد.



تصویر 5- یک قلب مجزای پارابیوتیک (جریان ثابت، ماده تزریقی با پایه خون، بازگردش ماده). این تناوب مناسب، از یک حیوان حمایت کننده پارابیوتیک جهت تأمین خون شریانی یک اندام مجزا (توسط یک پمپ) استفاده می‌کند. بعد از پرفیوژن، خون وریدی دوباره جمع‌آوری شده و به داخل بدن حیوان حمایت کننده وارد می‌شود تا دوباره اکسیژن دار شده و از نظر هومئوستاز تنظیم گردد. می‌توان فشار یا میزان جریان را ثابت نگه داشت. در صورت تمایل، می توان کاری کرد تا فشار شریانی و حیوانی حمایت کننده به طور مستقیم خونرسانی اندام مجزا را تأمین نماید.

کنترل دما

جهت کنترل دمای ارگان و پیشگیری از خشکی بافتی، قرار دادن ارگان در یک محفظه ضروری است. دو فضا عموماً مورد استفاده قرار می‌گیرد: 1- محفظه‌ای با دمای کنترل شده و فضال مرطوب گازی، 2- یک حمام مایع فیزیولوژیک که ارگان برای کنترل دما و رطوبت، در آن فرو برده می‌شود. حمام مایع ممکن است مزایای هیدروستاتیک را تأمین کند و بروز ادم را در مراحل آماده‌سازی ارگان مجزا به وسیله افزایش فشار بافتی محدود کند. دمای مواد تزریقی و محفظه ارگان به طور کلی به وسیله حمام آبی اضافی و با ترکیبی از یونش آبی، سیستم گرمادهنده یا یونش گرمایی (در سیستم پارابیوتیک) کنترل می‌شود.

استحکام بیشتر

در یک سیستـم مجـزا، محقق وظیـفه برقـراری هوموستازی فیزیولوژیک و تحریک ارگان را برعهده دارد. در طول انجام آزمایش همه پارامتـرهای سیستم (فشار شریانی، جریان، فشار وریدی (اگر قابل اجرا باشد)، سطح مواد تزریقی، جریان گاز، دما، اکسیژن‌رسانی، وضعیت اسید و باز، وضعیت شیمیایی مواد تزریقی در خون‌رسانی و تحریکات الکتریکی و ثبت آن) و هم‌چنین پایداری عملکرد ارگان باید به‌طور مداوم مورد مراقبت قرار گیرد. یک دوره از پایداری ارگان مجزا ضروری است تا این ارگان محیط جدیدش انطباق پیدا کند. نسبت به نوع ارگان 15 - 60 دقیقه زمان برای این کار، مورد نیاز است، اما پارامترهای مورد نظر آزمایش (مانند عملکرد مکانیکی بطن و یا تولید نمک صفراوی) باید مورد بررسی قرار گیرند تا تأیید شود که پایداری واقع شده است. مدارکی از پایداری و خون‌رسانی آزمایشی گسترده لازم است قبل از شروع آزمایش، تهیه شود. بنابراین نتایج دقیقاً منعکس کننده ناپایداری سیستم نیستند. بسیاری از محققان در فاصله‌های زمانی منظم خون‌رسانی ارگان را کنترل می‌کنند تا از کیفیت کنترل مطمئن شوند. در هر زمانی از آزمایش تخریب در عملکرد ارگان ممکن است نشان‌دهنده مشکلی در سیستم باشد. یک بار که این زنگ خطر دیرهنگام به صدا درآمد، اعتبار آزمایشات بعدی مورد تردید قرار می‌گیرد. به خاطر داشته باشید که عملکرد ارگان به طور اجتناب ناپذیر تخریب می‌شود و آزمایش باید از طریق پایداری انجام شود. تعدای از ارگان‌ها واکنش ایدیوسنکراتیک نسبت به خون‌رسانی مجزا نشان می‌دهند. کبد به اسپاسم وریدی و کلیه به اسپاسم شریانی تمایل دارند. ریه‌ها مستعد شکل‌گیری ادم هستند و در صورت آگاهی از وجود این مشکلات می‌توان بر آن‌ها غلبه کرد.

نگهداری سیستم

اهمیـت نگه‌داری مناسب و هم‌چنین تمیز کردن سیستم غیرقابل انکار است. در سیستم‌های حاوی خون و یا پروتئین، از دور خارج کـردن وسایل یک بار مصرف کاربرد دارد. تمیز کردن وسایل قابل مصرف مجدد، برای برداشتن باقیمانده‌های خونی و غوطه‌ور کردن وسایل به مدت یک شبانه‌روز در پراکسید هیدروژن از راه‌های تمیز کردن وسایل است. روز بعد باید وسایل را با آب داغ در حال جـریان شست و سپس با آب مقطر و بعد با سالین و در نهایت با کریستالوئید فیزیولوژیک دستگاه‌ها را شستشو داد.

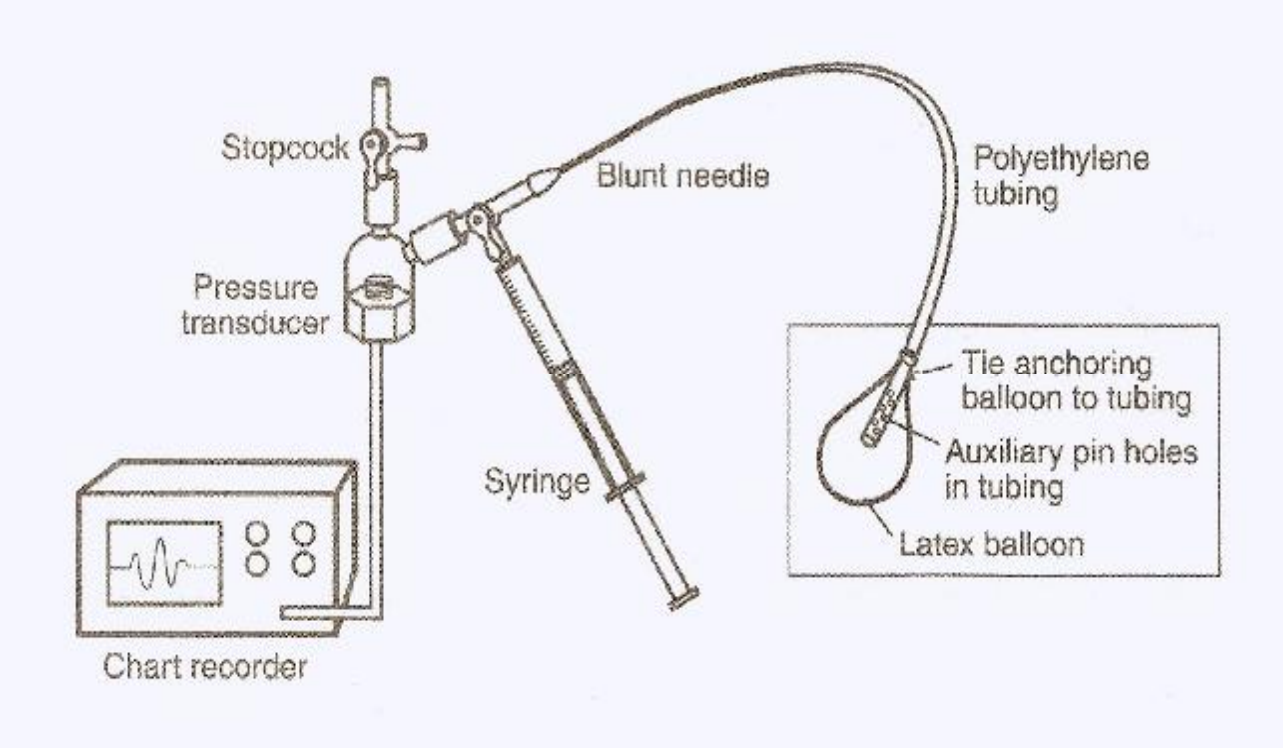
اما زمانی که از مواد کریستالوئید استفاده می‌شود، تمیز کردن آن هم ساده‌تر می‌باشد. بدین صورت که قبل و بعد از استفاده، وسایل را با آب داغ در حال جریان شسته و سپس با آب غیر یونیزه تصفیه شده، وسایل را تمیز می‌کنند. تعدادی از محققین پیشنهاد کرده‌اند که از آب جوش برای برداشت باقیمانده‌های گلوکز مورد استفاده در اغلب خون‌رسانی‌ها استفاده شود. از کارهای دیگر که باید انجـام شود، تعویض تمام فیلترها قبل از شستشوی اولیه با کریستالوئید می‌باشد. بر اساس یک برنامه دوره‌ای بسته به میزان مصرف یا ناپایداری و سیستم‌های غیر توصیـف شده، تمام وسایل شیشه‌ای و غیرقابل تعـویض در محلـول اسید سولفوریک کرمیک برای 24 ساعت غوطه‌ور می‌شود و بعد برای 24-48 ساعت وسایل در داخل آب قرار می‌گیـرند و بعد از شستشو، سر هم کردن دستگاه با لوله‌های جدید صورت می‌گیرد.

اگرچه استریل کردن برای مطالعات کوتاه‌مدت غیرضروری است، با این وجود ممکن است آلودگی باکتریایی دستگاه اتفاق بیفتد، به خصوص موقعی که از منابع غذایی غنی و یا سیستم خونی استفاده می‌شود. استریلیزه کردن را در مواردی ناپایدای غیرقابل شرح تکرار شونده در نظر بگیرید.

فیزیولوژی ارگان مجزا

ارگان‌های مجزا یک گرایش وابسته به زمان برای بدست آوردن وزن دارند. با محلول‌های کریستالوئید عاری از پروتئین آب تدریجاً از بستر عروقی خارج می‌شود و ادم نسوج را به وجود می‌آورد. این پدیده از دو راه قابل پیشگیری است: 1- افزایش فشار اسموتیک کلوئید مـواد خون‌رسانی درای آلبومین و 2- افزایش فشار بافتی (که عمـوماً در قلب جدا شده انجام می‌گیرد) از طریق فرو بردن قلب تا 2- 1 سانتیمتـر در داخل این حمام مـوجب افزایش فشار هیدرواستاتیک می‌شود و بدین وسیله ادم بافتی را کاهش می‌دهد، بدون فرو بردن قلب در درون حمام، وزن فشار خشک (نسبت وزن بافت خشک به وزن بافت مرطوب) در قلب خوک گونیا بعد از خون‌رسانی با محلول سالین از 20-21% به 16% بعد از 30 دقیقه کاهش پیدا می‌کند. حجم خارج سلولی قلب موش که با محلول **Krebs-Henseleit** خون‌رسانی شده 2% بعد از 15 دقیقه، 5% بعد از 30 دقیقه و 17% بعد از 60 دقیقه افزایش می‌یابد. پس از 4 ساعت خون‌رسانی همراه با غوطه‌ور کردن، وزن بافت خشک میوکارد بطن چپ به 2% ± 17/2 محدود می‌شود، در حالی که قابلیت حیات آن بیشتر می‌شود.

در نهایت تخریب عملکرد ارگان مجزا به خاطر نبود هموستاز نرمال و هم‌چنین غیرفیزیولوژیک از پاسخ فیزیولوژیک به دستکاری‌های آزمایشگاهی حیاتی می‌باشد.



تصویر 6- ساختن و استفاده از بالون‌های داخل بطنی: سوزنی پهن جهت اتصال لوله پلی اتیلن به سرراهی مسدودکننده مورد استفاده قرار می‌گیرد. در انتهای دیگر لوله که در داخل بالون قرار دارد، سوراخی کوچک ایجاد می‌شود تا از جریان مایع (از داخل سرنگ) و انتقال فشار به مبدل توسط خود بالون لاتکسی جلوگیری نشود. بالون‌های لاتکس را می‌توان از بازار خریداری کرد و یا از کانوم‌های لاستیکی درست کرد. آن‌ها باید آندامی بزرگ‌تر از بطن مورد نظر باشند تا در بیشترین حجم ممکن، فشاری توسط خود بالون ایجاد نشود. با یک نخ ابریشمی، بالون را محکم به لوله پلی اتیلن می‌بندند. فشار داخل بطنی از بالون به یک مبدل الکترومغناطیسی فشار انتقال پیدا می‌کند. از سرنگی با اندازه مناسب جهت تغییر دقیق حجم بالون استفاده می‌شود و پس از این که اندازه‌گیری انجام شد، از طریق سه‌راهی مسدود کننده آن را از سیستم جدا می‌کنند.

مثال‌ها

در اینجا دو مثال ارائه می‌شود. برای اطلاع از جزئیات جامع مراجعه به بخش کتابشناسی توصیه می‌شود: خواندن این جزئیات بسیار ساده‌تر از کشف دوباره آن‌ها است.

قلب

اسکار لانگلن دورف اولین کسی بود که یک روش تحقیق برای مطالعه قلب مجزای یک پستاندار اختراع کرد. او شرح داد که چگونه خون‌رسانی وارونه آئورت صعودی یک دریچه سالم را می‌بندد و موجب خون‌رسانی در عروق کرونری می‌شود. در این حالت غیر از درناژ ورید کرونر، حفره‌های قلب خالی باقی می‌ماند. یک منبع تکنیکی از تکنیک اصلی لانگندورف و تغییرات مدرن آن مقاله دورنیگ و دنرت می‌باشد. "خون‌رسانی مجزای قلب با خون گرم براساس روش لانگندورف" می‌باشد.

پارامترهای متفاوتی در قلب مجزا مورد بررسی قرار می‌گیرند. جریان کرونری و خود تنظیمی در پاسخ به تنگ‌کننده‌های اندوژنوس و اگزوژنوس ممکن است با یا بدون تعدیل آندوتلیوم مورد بررسی قرار گیرد. ضربان میوکارد، ریتم و اختلال ریتم، پتانسیل الکتریکی، دپولاریزاسیون و زمان بازگشت می‌تواند در پاسخ به داروهای قلبی، هیپوکسی، ایسکمی و یا تحریک الکتریکی مورد مطالعه قرار گیرد. تحقیقات بیوشیمیایی، متابولیک و بافت شناسی در مورد بحث در مقدمه همگی امکان‌پذیرند. درمان‌های دارویی انفارکتوس میوکارد به طور تجربی، القا شده، بارگیــری مزمن قلبی و پیوند تماماً زمینه‌های مناسب برای تحقیقند. در گذشته ارزیابی انقباضات قلبی به خاطر تغییر در ضربان قلب، فشــار خون‌رسانی، پیش بار و پس بار، غالباً ارزیابی تغییرات واقعی مربوط به فقدان انقباض را دچار اشتباه می‌کرد، در حالی که قلب مجــزا امکان به اســتاندارد درآورد دقیق هر یک از این متغیرها را می‌دهد و بنابراین عملکرد بطنی می‌تواند با یکی از دو مدل پایه‌ای: (1) قلب در حال کار کردن و (2) قلبی که کار نمی‌کند، به قدر کافی مــورد بررسی قرار گیرد.

در هر دو مدل، با تخریب یا قطع کردن گره سینوسی و گذاشتن ضربان‌ساز خارجی مقدار ضربان ثابت قلب را می‌توان تولید کرد. گذاشتن ضربان‌ساز دهلیز راست با دو میکروالکترود دهلیزی یا یک وسیله کوچک آهنی در کانال آئورت و یک میکروالکترود دهلیزی برای انقباض و هدایت در بطن نرمال، مناسب است.

امپلیتود تحریکات نباید بیشتر از 4 ولت باشد، زیرا آزاد شدن نوراپی نفرین از سیستم عصبی سمپاتیک قلب ممکن است یک اثر اینوتروپیک مثبت داشته باشد.

استاندارد کردن برای پیش‌بار و پس‌بار قلبی که کار نمی‌کند با گذاشتن یک بالون در بطن چپ صورت می‌گیرد که در عین حال برای تعیین عملکرد بطن چپ نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد. همان طور که در تصویر 6 شرح داده شده است، ساختن بالون به وسیله گره زدن یک تکه مناسب از لاتکس برروی یک کاتتر نیمه سفت (پلی اتیلن) به دست می‌آید. ابتدا بالون برای حذف حباب هوا با مایع پر شده، سپس مایع تخلیه می‌شود و بالون به دستگاه مبدل فشار مکانیکی به الکتریکی وصل می‌شود. تأیید نفوذپذیری بالون نسبت به آب و هوا به وسیله افزودن حجم (بکار بردن تست فشار) انجام می‌شود که در صورت وجود نشت، خود را به صورت کاهش فشار نشان می‌دهد. نقاط مستعد نشت عبارتند: از لیگاتور نگهدارنده بالون روی کاتتر، کاتتر، منطقه مبدل خود مبدل و یا محل اتصال قسمت‌های مختلف دستگاه به یک‌دیگر.

برای تعیین درست فشار بطن چپ و انجام بررسی، بالون از طریق یک اتریوتومی از طریق دریچه میترال وارد بطن چپ می‌شود. البته بعد از جاسازی، مطمئن شوید که نوک کاتتر به سر قلب فشار نمی‌آورد و مانع ثبت فشار نمی‌شود.

افزایش ناگهانی در حجم بالون به طور مؤثری پیش‌بار بطن چپ را افزایش می‌دهد و امکان بررسی غیروابسته عملکرد سیتولیک و دیاستولیک بطن را می‌دهد. آنالیز عملکرد دیاستولیک به دو صورت انجام می‌گیرد:

1- از طریق نقشه منحنی کمپلیانس فشار انتهای دیاستولی در مقابل حجم بالــون و 2- مقایسه فشار انتهای دیاستولی در حجــم پایه که یک فشار انتهای دیاستــولیک ایجاد می‌کند (مثلاً 10 یا 5 mmHg) و اندازه‌گیری دوباره فشار انتهای دیاستول در همان حجم بعد از یک مداخله. بررسی ساده نحوه اجرای سیستول به وسیله مقایسه:

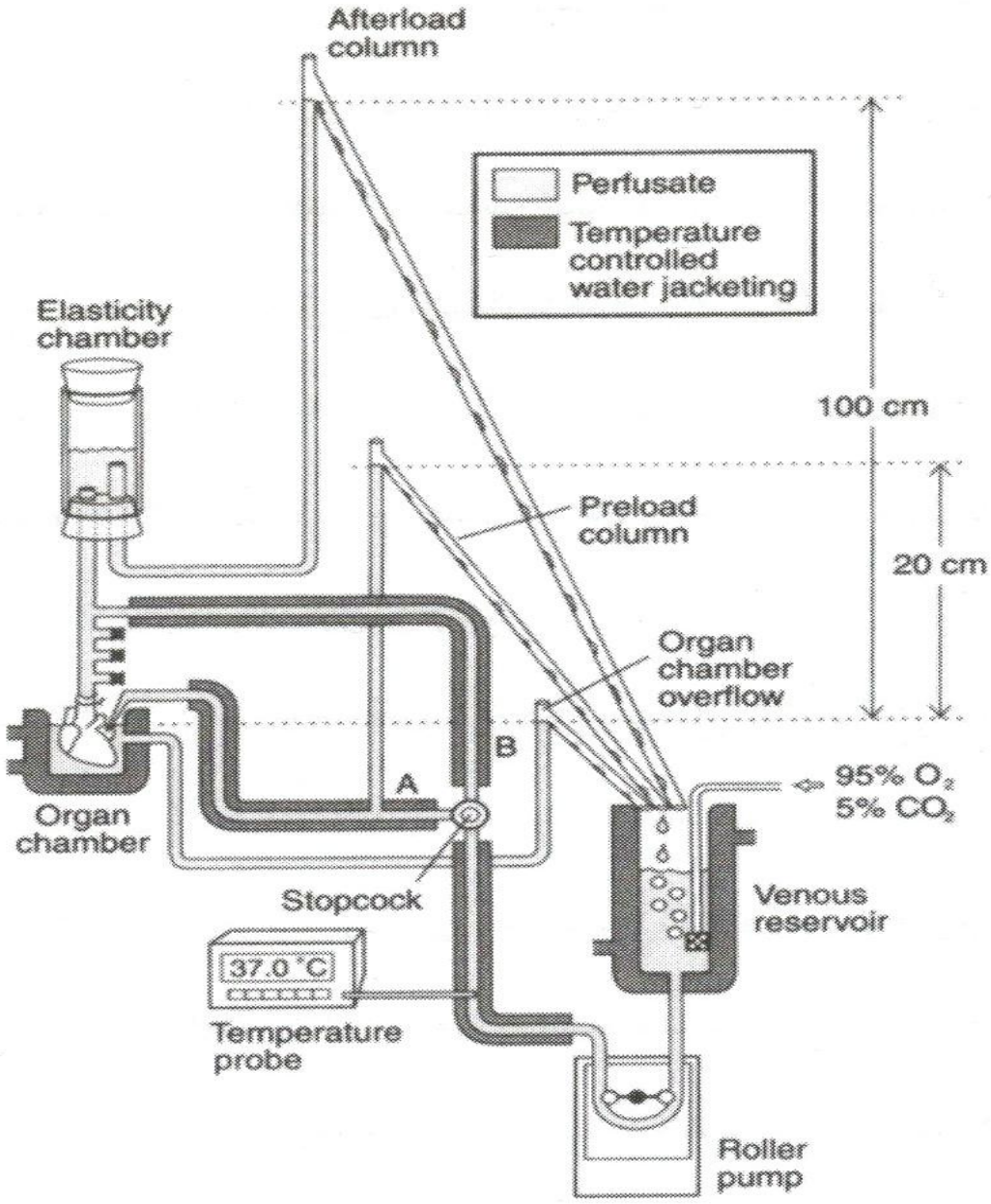
1- حد فشار سیستولیک یا فشار توسعه یافته (ماکزیمم فشار سیستولیک منهای فشار دیاستولیک) در یک حجم مشابه و 2- ماکزیمم فشار توسعه یافته در محدوده حجمی بالون، صورت می‌گیرد. با تمایز الکترونیک سیگنال فشار، ضربان انقباض بطنی (معیاری برای عملکرد سیستولیک) و استراحت (معیار عملکرد دیاستولیک) بدست می‌آید. پارامترهای عملکرد نرمال برای گونه‌های بسیاری شناخته شده است. این مطلب دارای اهمیت ویژه‌ای است که بالون بطن چپ ایزوولمیک آسیب میوکاردی قابل ملاحظه‌ای را بوجود نیاورده و این که حتی با پیش‌بار نسبتاً بالا (60 **mmHg** تا) مانعی برای جریان کرونری وجود ندارد.

مدل پایه‌ای دوم برای بررسی عملکرد بطن قلب در حال کار کردن است. همان‌طور که در تصویر 7 شرح داه شده است، قلب در حال کار کردن به وسیله وارد کردن لوله دوم در داخل دهلیز چپ تکمیل می‌شود و امکان می‌دهد که مواد خون‌رسانی تحت فشار ثابت (پیش‌بار ثابت) از دریچه میترال به داخل بطن چپ جریان پیدا کند و در طول سیستول مواد خون‌رسانی در مقابل پیش بار ثابت (یک ستون از مواد خون‌رسانی در لوله آئورت) بر می‌گردد و به این ترتیب کار تکمیل شده است. طراحی یک سیستم امکان برگشت آسان میان مدل‌های در حال کار و یا مدل‌های در حال کار و یا مدل‌هایی که کار نمی‌کنند را می‌دهد. قلب در حال کار کردن نیازمند یک محفظه کمپلیانس ممانعت کند. این حالت بیشتر فیزیولوژیک است، زیرا قلب با فشار مواد خون‌رسانی را پمپ می‌کند و به وسیله سیستم طراحی شده وادار به بکارگیری فشار خون رسانی می‌شود. به هر حال در نظر داشته باشید که پر شدن دهلیز با فشار ثابت، حجم بطنی را در حضور تغییرات کمپلیانس بطنی به استاندارد در نمی‌آورد و عملکرد بطن از طریق اندازه‌گیری خروجی قلب یا تجزیه و تحلیل پیچیده و چند بعدی عملکر قلب (به عبارت دیگر کریستال‌های سونومیکرومتریک و مبدل‌های فشار یا کاتترهای ایمپدانس) به سادگی بررسی می‌شود.

کبد

کبد مجزا امکان مطالعه روندهای بیوشیمیایی استاندارد، جریان خون، جریان لنف، مصرف اکسیژن، ترکیبات بافتی و بافت شناسی را می‌دهد و هم‌چنین فرصت‌های منحصر بفردی برای مطالعه ترکیبات و جریان نمک‌های صفراوی (بیلی روبین، نمک‌های صفراوی، آلکالاین فسفاتاز، **PH** و الکترولیت‌ها)، تنظیم خون‌رسانی، عملکرد هپاتوسیت (متابولیسم گلیکوژن)، متابولیسم و پاکسازی داروها و سموم، هم‌چنین ترشح متابولیت‌ها به داخل صفرا را می‌دهد. پیش درمانی حیوانات با داروها و یا عمل جراحی برای تغییر پارانشیم کبد و یا درخت صفراوی پتانسیل فوق‌العاده‌ای را به این تکنیک افزوده می‌کند.

کبد تحت خون‌رسانی مجزا به دلیل قابلیت ایجاد پدیده‌ای که به عنوان انسداد جریان خروجی ورید کبدی شناخته شده است، تکامل تکنیکی خاصی پیدا کرده است. این مشکل، نخستین بار در سال 1915، در کبد سگ‌هایی که با کریستالوئید، خون‌رسانی شده بودند، در پاسخ به هیستامینی یا پتپون در فشار ثابت گزارش شد. در سال 1928، در خون‌رسانی بر پایه خون با فشار ثابت، حیات ارگان بهبود یافت و در نهایت خون‌رسانی با فشار ثابت تلاش صورت گرفت. در سال 1951 توصیفی از خون‌رسانی با فشار ثابت استفاده از خون انتشار یافت و به دنبال آن در سال 1953 با خون اتوبوگ، پمپ‌های قابل تنظیم و پیشگیری از هر گونه ایسکمی، در محیطی که قاطعانه به عنوان مدلی برای مطالعات فیزیولوژیک پایه‌گذاری شد، تعدیل گردد. هارد کستل و ریچی (**Hardcastles H.D.Ritche, J.D.**) تحت عنوان "خون‌رسانی ارگان مجزا، یک بازنگری عالی از ویژگی‌های خون‌رسانی کبد مجزا ارائه کردند.



تصویر 7- مدل قلب در حال کار کردن (فشار ثابت، بازگردش جریان). بالون داخل بطنی از این جهت که باری غیرفیزیولوژیک (ایزوولمیک) را بر قلب وارد می‌کند، مورد انتقاد قرار گرفته است. محیط قلب در حال کار کردن، قلب را وادار می‌سازد تا فشار خون‌رسانی خود را، خود تأمین کرده و در ضمن خون را نیز پمپ کند. به ترتیب کاری را انجام می‌دهد که قابل اندازه گیری است. وقتی که شیر سه‌راهی به طرف دهلیز چپ (A) باز می‌شود، ماده تغذیه کننده اکسیژن‌دار شده، تحت فشار ثابتی که توسط ارتفاع ستون پیش‌بار کنترل می‌شود، به دهلیز چپ وارد می‌گردد. سپس از دریچه میترال گذر کرده و سپس توسط بطن چپ به داخل کانول آئورت پمپ می‌شود، خروج در برابر مقاومتی صورت می‌گیرد که توسط ارتفاع ستون پس بار مشخص می‌گردد. همین ستون است که فشار ثابت لازم برای جریان رو به عقب ماده تغذیه کننده اکسیژن دار به سمت قلب را تأمین می‌نماید.

متن شیر سه‌راهی به سمت دهلیز چپ (A) و باز کردن آن به سمت کانولای آئورت (B)، سیستم را به یک محیط در حال استراحت تبدیل می‌کند. ماده تغذیه کننده طبق روش معمول و به صورت عقب گرد به شریان های کرونر داده می‌شود.

توجه داشته باشید که طراحی این دستگاه نیازمند این است که ماده تغذیه کننده (Pcofusate) از جریان کرونر (در روش در حال استراحت) یا برون ده قلب (در روش در حال کار کردن) سریع‌تر پمپ شود تا ماده تغذیه کننده همواره از ستون‌های فشار ثابت، سر ریز گردد. این طرح، میزان اکسیژن‌زدایی از ماده تغذیه کننده و یا هدر رفتن گرما از آن را با جلوگیری از رکود آن کاهش می‌دهد. در ضمن توجه داشته باشید که ساختن ستون پیش‌بار از آسپیراسیول هوا به داخل دهلیز چپ در روش در حال استراحت حتی پس از این که فشار ستون پیش بار به صفر نزول کرد، جلوگیری می‌نماید. کلامپ کردن ستون پیش بار، خودبخود پیش‌بار را از روی قلب بر می‌دارد. در نهایت، توجه داشته باشید که ستون‌های سرریز (پیش بار و پس بار) ورودی‌های هوا دارند که خروج آزاد را تسهیل نموده و از کاهش فشار ستون‌ها به طریق اثر سیفونی (Siphoning Effect) جلوگیری می‌نماید.

گرفتن خروجی ورید کبدی پس از شروع خون‌رسانی، به صورت ادم، سیانوز و لکه دار شدن ارگان مشخص می‌شود. پس از افزایش فشار پورت، مایع سروزی در سطح کبد جاری شده و جریان صفراوی در روندی غیر قابل برگشت کاهش می‌یابد. در آماده سازی اولیه توقف جریان خروجی در عرض 30 دقیقه پس از شروع خون‌رسانی اتفاق می‌افتد. تکنیک‌های بعدی چندین ساعت پایداری را قبل از شروع تخریب جدی بدست آوردند. عوامل بسیاری از جمله هیستامین، اندوتوکسین و عوامل دارویی و افزایش فشار ورید کبی می‌توانند در ایجاد این پدیده دخالت داشته باشند. پایه فیزیولوژیک آن ممکن است اسپاسم عضله صاف در دیواره شاخه‌های کوچک ورید کبدی باشد.

کاهش توقف خروجی جریان ورید کبدی به وسیله مشاهده نکات برجسته متعددی صورت می‌گیرد. این کار از لحاظ جراحی، اجتناب از دستکاری غیرضروری ارگان، پیشگیری از ایسکمی با لوله‌گذاری در ورید پورت و شریان کبدی صورت می‌گیرد. برخی استفاده از خون هم نوع را ضروری در نظر می‌گیرند. افزودن خون Homologous که با کبد Porcine آماده شده، مطابقت داده نشده است، موجب سقوط آشکار در جریان خون کبد می‌شود. زمانی که خون Homologous مورد استفاده قرار گیرد، حتی با تطابق خون، توقف زودرس جریان خروجی اتفاق می‌افتد.

از آن جا که هماتوکریت پایین، خون‌رسانی را تسهیل کرده و همولیز را کم‌تر می‌کند از این رو خون رقیق شده و اکسیژن‌رسانی شده، ترجیح داده می‌شود. ترکیبی از خون Autologous و محلول تعدیل شده Kreb معمولاً برای دستیابی به هماتوکریت 30 درصد برای کبد مجزای Greyhound به کار می‌رود. حفظ PH بالای 7/30 ممکن است به نگهداری مقاومت ثابت عروقی کمک کند. خون‌رسانی با جریان ثابت از فشار ثابت موفقیت‌آمیزتر است. ثابت نگه داشتن فشار ورید پورت در بدست آوردن پایداری مفید است. در شروع خون‌رسانی مصنوعی، فشار ورید پورت بالاست، اما به تدریج تا کم‌تر از 10 سانتیمتر آب کاهش می‌یابد. فشاری که به طور ثابت افزایش می‌یابد و یا بالاتر از 15 سانتیمتر آب است، نشان دهنده تخریب روند آماده سازی و تهدید به توقف جریان خروجی است. نگهداری دقیق دستگاه خون‌رسانی برای جلوگیری از ایجاد آلودگی توسط مواد و یا پروتئین‌هایی که موجب توقف جریان خروجی ورید کبدی می‌شوند، ضروری است. بروز آسیب اضافی بر خون و تغییر ماهیت دادن پروتئین‌ها در اکسیژناتورهای حبابی ممکن است در توقف جریان خروجی ورید کبدی سهیم باشند. لوله‌های سیلاستیک بر لوله‌های PVC نشت کنند.

کبد عموماً نیازمند 1 ساعت پایداری است. پس از این که فشار ورید پورت پایین می‌آید و ثابت می‌ماند، جریان صفراوی افزایش می‌یابد، ثابت می‌ماند و ترکیبات صفراوی هم ثابت می‌ماند، به دست می‌آید. پتاسیم پلاسما و غلظت گلوکز معمولاً به وسیله تخریب سلول‌های پارانشیم کبد بالا می‌رود، اما بعداً ثابت می‌شود و مطالعه نباید قبل از به دست آمدن پایداری صورت بگیرد.

تفسیر

ارگان مجزا یک مدل غنی از امکانات است. محدودیت‌های آن کم و برای بیشتر قسمت‌ها نشان دهنده عدم کفایت دانش فیزیولوژیک و نیازمندی های لازم برای افزایش طول زندگی در سیستم مجزا می‌باشد. در نتیجه مشخصاً خون‌رسانی گسترده در حال حاضر عملی نیست، بنابراین در تعمیم نتایج به دست آمده از سیستم مجزا به پاسخ ارگان ثابت در بدن، احتیاط لازم است. مگر آن که خون رسانی مجزا برای محقق موشکاف ابزاری قدرتمند بوده و از لحاظ اقتصادی، میزبانی سرشار از مزایای تجربی در قالب یک مدل را اعطاء کند، میزبانی که توانایی‌اش در ابتدا به وسیله تخیل محدود می‌شود.