

نقش کلستاز در ایجاد آسیب بافتی مغز در ناحیه هیپوکامپ موش صحرایی نر نژاد ویستار

دلارام اسلیمی اصفهانی^{۱*}، شهربانو عریان^۱، محمد نبیونی^۲ و منیژه کریمیان پیرو^۱

دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۸ / پذیرش: ۱۳۹۵/۳/۲۶ / چاپ: ۱۳۹۶/۶/۳۱

^۱گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

^۲گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: eslimi@khu.ac.ir

چکیده. به قطع جریان صفرا از کانالیکول‌های صفراوی به روده کلستاز می‌گویند. در سندروم کلستاز تغییر سطح اسیدها، نمک‌های صفراوی، اندوتوکسین‌ها و اوبیوئیدها با آنسفالوپاتی کبدی و آسیب مغزی همراه است. برای بررسی میزان آسیب مغز این مطالعه، تأثیر بستن مجرای صفراوی بر تغییرات هیستولوژیک هیپوکامپ مغز موش صحرایی را نشان می‌دهد. این مطالعه دربارهٔ موش‌های نر نژاد ویستار انجام شد. حیوانات به سه گروه شاهد (بدون جراحی)، گروه شم (جراحی بدون انسداد مجرای صفراوی) و گروه کلستاتیک (جراحی همراه با انسداد مجرای صفراوی) تقسیم‌بندی شدند. پس از دو هفته موش‌ها تحت بی‌هوشی کشته شدند و مغز آنها بلافاصله خارج شد. از نمونه‌های مغز پس از تثبیت و قالب‌گیری، مقاطع بافتی با ضخامت شش میکرون تهیه شد. مقاطع با روش هماتوکسیلین-ئوزین رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری ارزیابی شد. داده‌ها از طریق واریانس یک‌طرفه با استفاده از نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل شدند. از لحاظ آماری p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار فرض شد. چهارده روز پس از کلستاز، در مقاطع بافت هیپوکامپ نکروز، کاهش تراکم سلولی، هسته‌های پررنگ (هتروکروماتین) و چروکیده در بافت هیپوکامپ مشاهده شد. همچنین ضخامت بافتی در بیشتر بخش‌های هیپوکامپ کاهش یافت؛ در صورتی که چنین تغییرات بافتی در بافت مغز موش‌های گروه شم یا کنترل مشاهده نشد. داده‌ها نشان داد که در نتیجه کلستاز و تجمع اسیدهای صفراوی و اندوتوکسین‌ها، تغییرات بافتی مانند نکروز، هسته‌های پررنگ و چروکیده، کاهش تراکم سلولی در هیپوکامپ ایجاد می‌شود. اندوتوکسین‌ها می‌توانند باعث ایجاد آسیب بافتی شوند. این احتمال وجود دارد که کلستاز از طریق افزایش اندوتوکسین‌ها باعث ایجاد آسیب بافتی شده باشد.

واژه‌های کلیدی. صفرا، اندوتوکسین، آنسفالوپاتی کبدی، نکروز

The role of cholestasis in brain hippocampus trauma in male Wistar rat

Delaram Eslimi Esfahani^{1*}, Shahrbanoo Oryan¹, Mohammad Nabiuni² & Manijeh Karimian Peiro¹

Received 28.12.2013/ Accepted 15.06.2016/ Published 22.09.2017

¹Department of Animal Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

²Department of Cell and Molecular Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

*Correspondent author: eslimi@khu.ac.ir

Abstract. In cholestasis syndrome, the change of bile acids, salts, endotoxins and opioids is accompanied with hepatic encephalopathy and brain trauma; therefore, in this study, the histopathological changes of hippocampus after bile duct ligation were investigated. This study was performed on male Wistar rats. The rats were divided into three groups, namely the control, sham and cholestatic groups. After two weeks, the rats were killed under anesthesia and their brains were dissected with no delay. The specimens were processed routinely and were sectioned into slices of 6-micron thickness. The sections were stained by Hematoxyline-Eosin (H&E) method. Subsequently, they were studied using optical microscope. Necrotic cells, the diminution of cell density and wrinkled chromatic nuclei were observed in hippocampus section. In addition, the thickness of hippocampus was mostly decreased. However, in the sham and control groups no changes were observed. Since endotoxin causes tissue trauma, the increase of endotoxin may result in tissue changes in the brain.

Keywords. bile, endotoxin, hepatic encephalopathy, necrosis

مقدمه

کلستاز به لحاظ فیزیولوژیک به توقف یا کاهش جریان صفرا از کانالیکول‌های صفراوی به دئودنوم روده گفته می‌شود و می‌تواند به دو صورت داخل کبدی و خارج کبدی یا انسدادی ایجاد شود (Moezi et al., 2004; Moezi et al., 2006). در نوع داخل کبدی عملکرد هپاتوسیت‌های کبد با مشکل روبه‌رو و تولید صفرا قطع می‌شود ولی در نوع خارج کبدی یا کلستاز انسدادی، مجرا به دلایل مختلف، از جمله کوله لیتازیس، کارسینومای سر پانکراس، تومورهای مجرای صفراوی، و کیسه صفرا، بسته می‌شود و صفرای تولیدشده به جای ورود به روده، وارد جریان خون می‌شود و عوارضی را ایجاد می‌کند که سبب تشخیص بیماری می‌شود. دوره این بیماری سه هفته است که بعد از این دوره، بیماری مزمن می‌شود و تبدیل به سیروز کبدی می‌شود (Podolsky et al., 1998; Nahavandi et al., 2001; Dehpour et al., 2002; Narimani et al., 2001).

ناکارآمدی در دفع صفرا به تخریب پارانشیم کبدی، پرولیفراسیون سلول‌های اپیتلیال، فعال شدن سلول‌های ستاره‌ای-شکل کبدی، تولید سیتوکین‌ها و در نهایت فیبروز پیش‌رونده بافت کبد می‌انجامد. سلول‌های ستاره‌ای شکل کبدی سلول‌هایی هستند که به طور معمول در فضای بین سلول‌های پارانشیم کبدی و سلول‌های اندوتلیال سینوس‌های کبدی قرار دارند و نقش آنها ذخیره رتینوئید و چربی است. این سلول‌ها در وضعیت پاتوفیزیولوژیک نظیر فیبروز کبد، رتینوئید خود را از دست می‌دهند و به شکل فیبروبلاست‌ها یا میوفیبروبلاست‌ها مبدل می‌شوند. همچنین در این موقعیت ماتریکس خارج سلولی را تولید می‌کنند که در بازگشت عمل کرد آنها کمک می‌کند (Hong et al., 2007; Chang et al., 2005; Senoo et al., 2004).

از عوارض شایع کلستاز خارج کبدی می‌توانیم به افزایش غلظت نمک‌های صفراوی، رنگدانه‌های صفراوی، کلسترول، اسیدهای چرب، فسفاتیدیلکولین، آلکالین فسفاتاز و پروستاگلندین‌ها در خون اشاره کنیم، علت افزایش این ترکیبات وجود آنها در صفرا، و ورود صفرا به خون است. افزایش بیش از حد اسیدهای صفراوی در جریان خون و تجمع آنها در مغز، به افزایش اسیدیته (کاهش PH) مغز و تحریک هسته سوپرااپتیک نوکلئوس (SON) هیپوتالاموس و تولید بیش از حد آرژنینین-وازوپرسین در مغز می‌-

انجامد (Moezi et al., 2006; Dingon et al., 2011; Ghaffuri et al., 2004; Kiani et al., 2009; Hasanein et al., 2007). همچنین، بر اثر کلستاز میزان اوبیوئیدها نیز افزایش می‌یابد. درباره افزایش اوبیوئیدها هنوز دلیل قطعی وجود ندارد، اما امکان دارد که بر اثر درد ناشی از کلستاز تولید این ترکیبات در مغز افزایش یابد (Hasanein et al., 2007). ادامه کلستاز می‌تواند آسیب‌های بافتی نظیر فیروز کبدی، سیروز کبدی، هپاتیک آنسفالوپاتی و ادم مغزی را ایجاد کند (Cauli et al., 2009; Wright et al., 2007). بر اثر کلستاز، میزان اندوتوکسین‌ها نیز در خون افزایش می‌یابد. اندوتوکسین‌ها ترکیباتی سمی با قابلیت عبور از سد خونی مغزی هستند. در واقع، این ترکیبات به وسیله باکتری‌های گرم منفی روده تولید و بر اثر صفرا به ترکیباتی بی-ضرر مبدل می‌شوند، ولی بر اثر کلستاز و عدم ورود صفرا به روده میزان این مواد در خون افزایش می‌یابد (Moezi et al., 2006).

مطالعات متعددی افزایش تولید نیتریک اکساید اضافی را در طی کلستاز و فیروز کبدی نشان می‌دهند. براساس تحقیقات پیشین، افزایش بیش از حد اندوتوکسین‌ها در جریان خون، پس از کلستاز، و عمل کرد آنها از طریق سیتوکین‌ها باعث القای تولید بیش از حد نیتریک اکساید در مغز می‌شود (Mani et al., 2000). حافظه روندی است که طی آن اطلاعات ذخیره و بازیابی می‌شوند (Kande et al., 2000). حافظه در سیناپس‌ها ذخیره می‌شود (Tehranipour et al., 2011). تغییر در تعداد سلول‌های عصبی و سیناپس‌های آن عاملی مؤثر در افزایش و کاهش حافظه است. هیپوکامپ نقش مهمی در ایجاد حافظه به عهده دارد. این ناحیه از مغز توسط شریان کرونید قدامی، که شاخه‌ای از کاروتید داخلی است، خون‌رسانی می‌شود. این شریان، به دلیل بلند و نازک بودن، مستعد ترومبوزیس است. بنابراین، هیپوکامپ جزء اولین مناطقی از مغز است که در بیماری‌های مختلف نظیر آلزایمر، هانتینگتون، صرع، سکته مغزی، ایسکمی و به ویژه ترومای مغزی دچار آسیب می‌شود (Alipanahzadeh et al., 2012). کاهش حجم هیپوکامپ می‌تواند اختلالاتی را در حافظه و یادگیری ایجاد کند. تغییر در تعداد نورون‌های هیپوکامپ می‌تواند به تغییر حجم هیپوکامپ منجر شود، همچنان‌که به‌طور مشابهی در بیماری آلزایمر کاهش تعداد نورون‌ها مشاهده می‌شود و عمل کرد کاهش می‌یابد. هیپوکامپ بخشی از سیستم لیمبیک است و به علت شباهتی

نشانه‌های کلستاز (زردی، ادرار تیره، اسهال چرب) مشاهده شد که شاخص ایجاد کلستاز در نظر گرفته شد. پس از دو هفته، موش‌های گروه شم، کنترل و کلستاز به وسیله کلروفورم کشته و سپس تشریح شدند.

روش مطالعه بافتی

مغزهای موش‌ها به منظور تثبیت به فرمالین ۱۰ درصد منتقل و سپس وارد روند آنگیری، شفاف‌سازی، حمام پارافین و قالب‌گیری شدند. سپس، به وسیله میکروتوم برش‌هایی به ضخامت شش میکرون از آنها تهیه شد. پس از رنگ‌آمیزی با همتاکسیلین-اوتوزین به وسیله میکروسکوپ نوری تحت بررسی و عکس‌برداری قرار گرفتند (Schacter et al., 1983) و تغییرات بافتی در پنج لام و در پنج میدان دید به صورت تصادفی ارزیابی شدند. به منظور شمارش سلولی و محاسبه درصد از نرم‌افزار ImageJ استفاده شد (Lavazza et al., 2010). ضخامت نواحی مختلف، با قراردادن گراتیکول در اوکولر میکروسکوپ نوری، از ابتدا تا انتهای نواحی هیپوکامپ بر حسب میکرومتر اندازه‌گیری شد.

روش و ابزار گردآوری اطلاعات

محاسبات با استفاده از روش تحلیل واریانس یک‌طرفه برای مقایسه گروه‌ها به وسیله نرم‌افزار SPSS انجام شد. بعد از هر F معنی‌دار، تحلیل به کمک test Post hoc Tukey ادامه یافت. از لحاظ آماری p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار فرض شد. شمارش سلولی با نرم‌افزار Image J انجام شد.

نتایج

بررسی‌های صورت گرفته حاکی از مرگ سلولی به همراه کاهش تراکم سلولی و کاهش ضخامت هیپوکامپ در نمونه‌های کلستاز شده نسبت به نمونه‌های کنترل و شم است. شکل ۱ اسلاید A نمونه کنترل و اسلاید B نمونه شم است که تفاوتی ندارند و مقایسه آنها با اسلاید C که شکل نمونه کلستاز است تفاوت‌های بافتی را نشان می‌دهد.

باتوجه به بررسی‌های مورفولوژی مشخص شد که هیپوکامپ در نمونه کلستاز نسبت به نمونه‌های کنترل و شم دارای کاهش ضخامت بوده و بررسی‌های کمی نیز مؤید این موضوع است. نتیجه بررسی‌های کمی نواحی ۱ تا ۷ هیپوکامپ که در شکل ۲ با پیکان مشخص شده‌اند در جدول شماره ۱ مشاهده می‌شود. البته

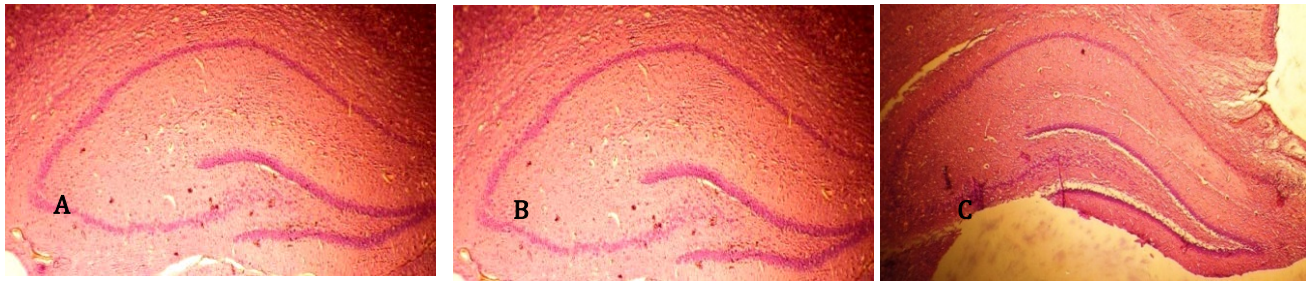
که به اسب دریایی دارد به این نام معروف شده و دارای بخش‌های مختلفی شامل CA_1 , CA_2 , CA_3 سوبیکولوم و شکنج دندان‌های است (Tehranipour et al., 2011). تحقیقات پیشین نشان دادند که کلستاز به کاهش حافظه و افزایش اندوتوکسین‌ها منجر می‌شود و هر دو این عوامل می‌توانند باعث تخریب بافت هیپوکامپ شوند، از این رو هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر هیستوپاتولوژیکی کلستاز بر پیامدهای ایجاد شده در مغز است شامل نکروز بافت هیپوکامپ و تغییر تعداد نورون‌های نواحی CA_1 , CA_2 و CA_3 و نورون‌های شکنج دندان‌های (DG) هیپوکامپ، هتروکروماتین شدن سلول‌ها و چروکیدگی هسته آنها در بافت هیپوکامپ که درباره موش صحرایی نر نژاد ویستار صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی از موش‌های نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۰۰-۲۵۰ گرم در حیوان‌خانه گروه علوم جانوری دانشکده علوم زیستی دانشگاه خوارزمی در شرایط کنترل شده با دمای ۲۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد و سیکل ۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی استفاده شد. کلیه موش‌ها دسترسی آزادانه به آب آشامیدنی و غذای مخصوص حیوانات آزمایشگاهی داشتند و در وضعیت یکسان نگهداری می‌شدند. در این تحقیق موش‌ها به سه گروه هشت‌تایی کنترل، شم و کلستاز تقسیم شدند.

جراحی شم و کلستاز

در جراحی کلستاز (بستن مجرای صفراوی)، ابتدا موش‌ها با استفاده از کتامین و زایلازین با نسبت‌های $50:10 \text{ mg/kg}$ بیهوش شدند. سپس به وسیله الکل سطح شکمی درست در زیر جناغ تا ۳ سانتی‌متری پایین‌تر از استخوان جناغ ضدعفونی و به وسیله تیغ موهای این ناحیه تراشیده شد و پوست و عضله در دو مرحله جدا برش زده شدند. پس از آن، با کمک پنس سرکج مجرای صفراوی مشترک از زیر کبد خارج شد و بعد از جداسازی رگ خونی، دو طرف مجرا با نخ ابریشم بسته شد و در نهایت بین دو گره به وسیله قیچی بریده شد و مجرا قطع شد و سپس عضله و پوست در دو مرحله جدا بخیه شد (Belayev et al., 2003). در گروه شم تمام مراحل ذکر شده برای عمل کلستاز انجام شد، ولی مجرا بسته نشد. دو روز بعد از مسدود کردن مجرای صفراوی، در حیوانات



شکل ۱ - مقاطع بافت هیپوکامپ. اسلاید **A**: نمونه کنترل، اسلاید **B**: نمونه شم و اسلاید **C**: نمونه کلستاز است که دچار نکروز بافتی شده است (بزرگنمایی $\times 40$ ، رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین).

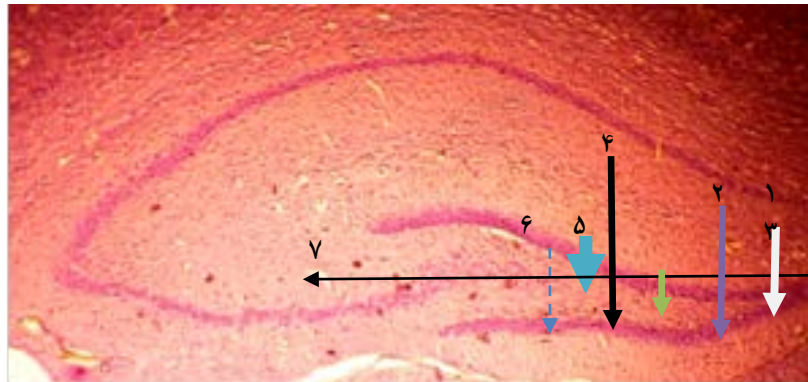
Fig. 1. Hippocampal tissue sections, **A**: control, **B**: sham, **C**: cholestasis brain tissue necrosis were increased in cholestatic sample, (40X- H&E).

بررسی‌های بافتی ناحیه CA3 هیپوکامپ حاکی از وقوع نکروز، وجود سلول‌های هتروکروماتین و کاهش تراکم سلولی در این ناحیه در نمونه‌های کلستازی است. در صورتی که چنین تغییرات بافتی در نمونه‌های شم و کنترل مشاهده نشد. شکل ۵ اسلاید A نمونه کنترل و اسلاید B نمونه شم است، که دارای تفاوت چشمگیری با اسلاید C که مربوط به نمونه کلستاز است. در نمونه کلستاز سر پیکان سلول‌های هتروکروماتین را نشان می‌دهد. بررسی‌های بافتی ناحیه DG هیپوکامپ حاکی از وقوع نکروز، کاهش تراکم سلولی و وجود سلول‌های هتروکروماتین در این ناحیه در نمونه‌های کلستازی است، در صورتی که در نمونه‌های شم و کنترل چنین تغییرات بافتی وجود نداشت. وجود فضاهای خالی در شکل نمونه کلستاز گویای مرگ سلولی و وجود نکروز همراه با آماس است. شکل ۶ اسلاید A نمونه کنترل و اسلاید B نمونه شم است که دارای تفاوت معناداری با اسلاید C که مربوط به نمونه کلستاز است. در نمونه کلستاز سر پیکان نکروز را نشان می‌دهد.

بررسی‌های کمی نواحی مختلف هیپوکامپ نشان داد که تعداد سلول‌های سالم در این نواحی در نمونه‌های کلستاز نسبت به نمونه‌های شم و کنترل کاهش یافته و سلول‌ها در نمونه‌های کلستاتیک دچار نکروز و هتروکروماتین شده‌اند در صورتی که چنین تغییرات بافتی در نمونه‌های کنترل و شم وجود ندارد. نتایج حاصل از این بررسی‌ها در جدول شماره ۲ آورده شده است. مشاهدات مطالعه حاضر نشان داد که، در موش‌های گروه کلستاز روند کاهش ضخامت در بیشتر بخش‌های هیپوکامپ اتفاق افتاد. همچنین در این گروه سلول‌ها حالت‌های نکروز، هسته‌های هتروکروماتین و چروکیده را نشان دادند و تراکم سلول‌های سالم در هیپوکامپ

کاهش ضخامت در نواحی ۳ و ۴ اتفاق نیفتاده و داده‌های آن از نظر آماری بی‌معنی بودند.

بررسی‌های بافتی ناحیه CA1 هیپوکامپ وجود نکروز و حالت‌های هتروکروماتینی شده رادر نمونه‌های کلستازی در مقایسه با همین ناحیه در نمونه‌های کنترل و شم نشان داد. در این ناحیه از هیپوکامپ نمونه‌های کلستازی تراکم سلول‌های سالم در مقایسه با تراکم سلول‌های سالم در نمونه‌های شم و کنترل کاهش نشان داد. همچنین سلول‌های هتروکروماتین در این ناحیه از هیپوکامپ در نمونه کلستاز مشاهده شد. در صورتی که چنین تغییراتی در بافت هیپوکامپ نمونه شم و کنترل وجود نداشت. شکل ۳ اسلاید A از ناحیه CA1 هیپوکامپ نمونه کنترل است و اسلاید B ناحیه CA1 هیپوکامپ نمونه شم است، که در مقایسه با اسلاید C که همین ناحیه در نمونه کلستاز است ضخامت بیشتری دارند و سلول‌های آنها سالم و بدون نکروز و به‌صورت یوکروماتینی است. پیکان سفید نشان دهنده سلول‌های هتروکروماتین در ناحیه CA1 است. بررسی‌های کیفی ناحیه CA2 حاکی از وقوع نکروز در بافت‌های کلستازی است. مقایسه اسلاید ناحیه CA2 در نمونه شم با نمونه کنترل تفاوتی را نشان نمی‌دهد، در صورتی که مقایسه آنها با اسلاید نمونه کلستاز حاکی از کاهش تراکم سلولی، وجود نکروز و سلول‌های هتروکروماتین در این ناحیه از هیپوکامپ در نمونه کلستاز است. شکل ۴ اسلاید A ناحیه CA2 هیپوکامپ نمونه کنترل و اسلاید B ناحیه CA2 هیپوکامپ نمونه شم است، که مقایسه آنها تفاوت چندانی را نشان نمی‌دهد. اسلاید C شکل همین ناحیه در نمونه کلستازی است که تفاوت چشمگیری را از نظر ظاهر و تراکم سلولی با نمونه کنترل و شم نشان می‌دهد. پیکان گویای سلول‌های نکروز و هتروکروماتین است.



شکل ۲- نواحی هیپوکامپ (بزرگنمایی $\times 40$).
Fig. 2. Hippocampus regions (40X).

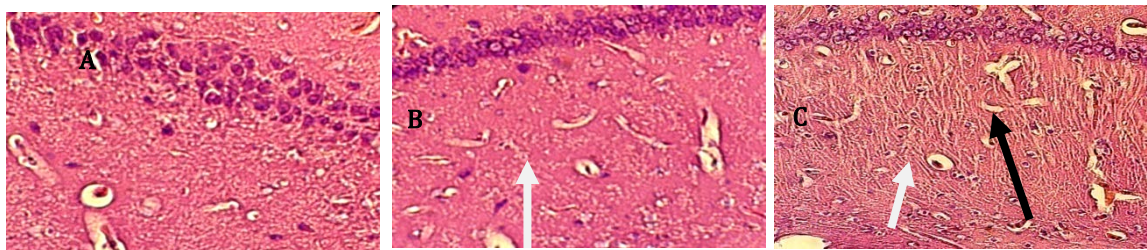
جدول ۱- ضخامت نواحی هیپوکامپ در گروه‌های کنترل، شام و کلستاز، $p < 0.05$, Mean \pm SE

Table 1. Thickness of hippocampal regions in control, sham and cholestasis groups. Mean \pm SE, $p < 0.05$.

گروه	ضخامت ناحیه ۱ (μm)	ضخامت ناحیه ۲ (μm)	ضخامت ناحیه ۳ (μm)	ضخامت ناحیه ۴ (μm)	ضخامت ناحیه ۵ (μm)	ضخامت ناحیه ۶ (μm)	ضخامت ناحیه ۷ (μm)
کنترل	۳۹۹/۴ ± ۰/۷/۲	۵۲۹/۱۸ ± ۳/۰/۱	۱۸۶/۱۰ ± ۵۰/۰/۹	۶۵۰/۱۱ ± ۵۰/۰/۱۳	۱۹۲/۴ ± ۸/۰/۱۱	۳۰۲/۶ ± ۰/۰/۱۳	۲۲۹۵/۳۱ ± ۴۴/۰/۷۲
شام	۳۹۸/۴ ± ۰/۰/۲۷	۵۲۸/۱۷ ± ۹/۰/۴۰	۱۸۹/۱۰ ± ۷۰/۰/۲۱	۶۵۴/۹ ± ۰/۰/۳۳	۱۹۵/۴ ± ۸/۰/۳۸	۳۰۲/۵ ± ۳/۰/۳۴	۲۳۰۲/۲۶ ± ۰/۹/۵۲
کلستاز	۳۱۷/۷ ± ۸/۰/۴۱	۴۴۰/۱۲ ± ۱/۰/۳۲	۱۶۷/۵ ± ۱/۰/۲۳	۶۴۲/۵ ± ۵/۰/۲۱	۱۷۱/۲ ± ۹/۰/۹۳	۲۷۶/۳ ± ۹/۰/۷۰	۲۰۷۴/۲۴ ± ۰/۰/۳۸

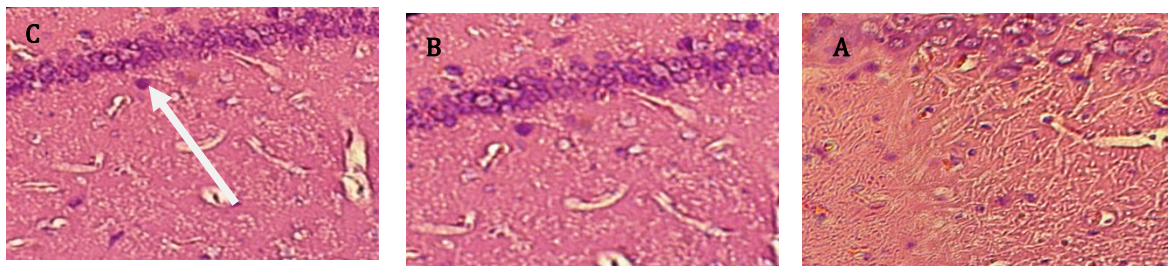
*در مقایسه با گروه کنترل و □ در مقایسه با گروه شام.

*in compare with control group, □ in compare with sham group



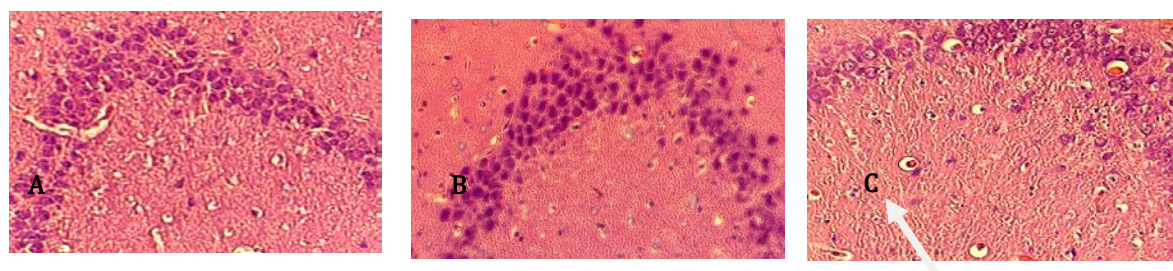
شکل ۳ - مقاطع بافتی ناحیه CA1 هیپوکامپ. اسلاید A: نمونه کنترل، اسلاید B: نمونه شام و اسلاید C: نمونه کلستاز. پیکان سیاه نشان‌دهنده سلول‌های هتروکروماتین و پیکان سفید نشان‌دهنده نکروز بافتی است (بزرگنمایی $\times 400$ ، رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اوتوزین).

Fig. 3. Hippocampal CA1 region tissue slides, **A:** control, **B:** sham, **C:** cholestasis. Heterochromatin cells (black arrow), tissue necrosis (white arrow), (400X- H&E).



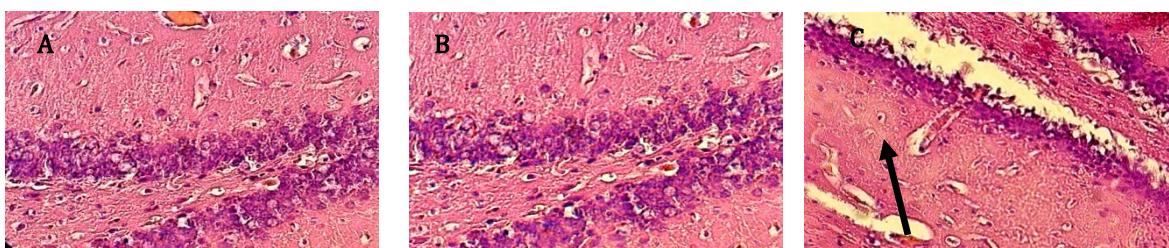
شکل ۴- مقاطع بافتی ناحیه CA2 هیپوکامپ اسلاید. **A:** نمونه کنترل، اسلاید **B:** نمونه شام و اسلاید **C:** نمونه کلستاز. پیکان سیاه نشان دهنده سلول‌های هتروکروماتین و پیکان سفید نشان دهنده نکروز بافتی است (بزرگنمایی $\times 400$ ، رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین).

Fig. 4. Hippocampal CA2 region tissue slides, **A:** control, **B:** sham, **C:** cholestasis. Heterochromatin cells (black arrow), tissue necrosis (white arrow), (400X- H&E).



شکل ۵- مقاطع بافتی ناحیه CA3 هیپوکامپ. اسلاید **A:** نمونه کنترل، اسلاید **B:** نمونه شام و اسلاید **C:** نمونه کلستاز. پیکان سیاه نشان دهنده سلول‌های هتروکروماتین و پیکان سفید نشان دهنده نکروز بافتی است (بزرگنمایی $\times 400$ ، رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین).

Fig. 5. Hippocampal CA3 region tissue slides, **A:** control, **B:** sham, **C:** cholestasis. Heterochromatin cells (Black arrow), tissue necrosis (white arrow), (400X- H&E).



شکل ۶- مقاطع بافتی ناحیه DG هیپوکامپ. اسلاید **A:** نمونه کنترل، اسلاید **B:** نمونه شام و اسلاید **C:** نمونه کلستاز. پیکان سیاه نشان دهنده سلول‌های هتروکروماتین و پیکان سفید نشان دهنده نکروز بافتی است (بزرگنمایی $\times 400$ ، رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین).

Fig. 6. Hippocampal DG region tissue slides, **A:** control, **B:** sham, **C:** cholestasis. Heterochromatin cells (black arrow), tissue necrosis (white arrow), (400X- H&E).

حالت‌های هتروکروماتینی در نواحی ذکر شده هیپوکامپ منجر شود. همچنین در گروه‌های کلستاتیک، کلستاز به کاهش ضخامت هیپوکامپ در نواحی مختلف منجر شد، علاوه بر این در گروه‌های کلستاتیک دژنره شدن سلول‌های عصبی در ناحیه DG هیپوکامپ مشاهده شد. هیپوکامپ جزء اولین مناطقی از مغز است که در بیماری‌های مختلف نظیر آلزایمر، هانتینگتون، صرع، سکته مغزی، ایسکمی و بویژه ترومای مغزی دچار آسیب می‌شود. تحقیقات

آنها کاهش یافته بود. در صورتی که در گروه‌های شام و کنترل چنین تغییرات بافتی رخ نداده بود.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که کلستاز می‌تواند به تخریب نورون‌های هیپوکامپ در نواحی CA1, CA2, CA3، تخریب نورون‌های لایه گرانولار DG (Dentate Gyrus)، ایجاد نکروز و

جدول ۲- درصد هتروکروماتین در سلول‌های نواحی مختلف هیپوکامپ در گروه‌های کنترل، شم و کلستاز، Mean \pm SE, $p < 0.05$.

Table 2. Heterochromatin percentage in the cells of hippocampal regions in control, sham and cholestatic groups. Mean \pm SE, $p < 0.05$.

گروه	ناحیه CA1	ناحیه CA2	ناحیه CA3	ناحیه DG
کنترل	۰/۰ \pm ۰/۰	۰/۰ \pm ۰/۰	۰/۰ \pm ۰/۰	۰/۰ \pm ۶/۳۳
شم	۰/۰ \pm ۱۰/۱۰	۰/۰ \pm ۰/۰	۰/۰ \pm ۰/۰	۰/۰ \pm ۹۰/۴۳
کلستاز	۲۳/۲ \pm ۶/۰۹ \square *	۲۱/۱ \pm ۱/۸۸ \square *	۲۳/۳۰ \pm ۲/۰۸ \square *	۳۱/۲ \pm ۷۰/۷۲ \square *

* در مقایسه با گروه کنترل و \square در مقایسه با گروه شم.

*in compare with control group, \square in compare with sham group.

صورت مزمن می‌تواند نوروزنر ناحیه DG هیپوکامپ را متوقف کند و به دژنره شدن نورون‌ها منجر شود. همچنین توکسین‌ها می‌توانند نوروپروژنیتور هیپوکامپ را مهار کنند و به این ترتیب به تغییرات بافتی در هیپوکامپ منجر شوند (Harry *et al.*, 1992; Qin *et al.*, 2008).

Qin و همکاران (2008) اثبات نمودند که افزایش توکسین‌ها می‌تواند باعث تولید TNF α در کبد شود و پس از تولید توسط سلول‌های کوپفر وارد خون شده و از طریق رسپتورهای خود از سد خونی - مغزی عبور نموده و وارد مغز شود. همچنین طبق بررسی‌های آنها میزان بیان mRNA پروتئین TNF α در مغز بر اثر توکسین‌ها ۴۷ برابر افزایش یافته و در کبد ۳۱ برابر افزایش می‌یابد و این امر می‌تواند، به آسیب‌های بافتی مغز منجر شود، که این امر با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. Iwai و همکاران (2001) نشان دادند، که سلول‌های کوپفر کبدی این توانایی را دارند که، در پاسخ به افزایش TNF α و برای حذف آن، TNF β را تولید کنند. همچنین Prins و همکاران (2005) اثبات کردند که سلول‌های کوپفر نقش کلیدی در میزان TNF α خون و سایر بافت‌ها را، به‌عهده دارند و همچنین این سلول‌ها نقش مؤثری در حذف عوامل التهابی ایجاد شده بر اثر توکسین‌ها به‌عهده دارند ولی بر اثر کلستاز توانایی خود را از دست می‌دهند، لذا میزان این عامل نکروزکننده در خون افزایش می‌یابد.

در این مطالعه تغییرات مشاهده شده چهارده روز پس از کلستاز نشان‌دهنده تغییرات بافتی هیپوکامپ بر اثر کلستاز بود. در مقاطع بافتی هیپوکامپ مغز موش‌های کلستاتیک، چهارده روز پس از کلستاز، نکروز سلول‌ها، هتروکروماتین شدن هسته‌های سلولی و چروکیدگی شدن آنها، کاهش ضخامت بافتی در بیشتر نواحی

نشان می‌دهند که کلستاز می‌تواند التهاب بافت مغز و کاهش حافظه را ایجاد کند و تحقیقات دیگر بر ساختار بافتی هیپوکامپ نشان داده‌اند که اختلال در حافظه و التهاب مغز می‌تواند به آسیب بافتی هیپوکامپ منجر شوند که این امر با نتایج این مطالعه مطابقت دارد (Alipanahzadeh *et al.*, 2012). Clement و همکاران (1992) نشان دادند، که در گروه‌های کلستاتیک و بر اثر کلستاز سلول‌های کوپفر کبدی توانایی پاکسازی شان کاهش یافته و میزان اندوتوکسین دو هفته پس از کلستاز در خون افزایش می‌یابد، اندوتوکسین‌ها ترکیباتی سمی هستند که بر اثر فعالیت باکتری‌های گرم منفی در روده تولید می‌شوند و بر اثر فقدان صفرا در روده کوچک این ترکیبات به خون وارد شده و از سد خونی - مغزی عبور نموده و وارد مغز می‌شوند. Harry و همکاران (1999) بیان کردند که، موش‌های کلستازی در مقایسه با موش‌های سالم حساسیت بیشتری نسبت به اندوتوکسین‌ها دارند و سلول‌های کبدی در موش‌های کلستازی دچار مرگ سلولی می‌شوند. همچنین نشان دادند که در موش‌های کلستازی میزان TNF α ، افزایش چشمگیری را نشان می‌دهد، که این عامل نکروزکننده تومور می‌تواند در مرگ سلول‌های کبد مؤثر باشد.

Wright و همکاران (2007) نشان دادند، که اندوتوکسین‌ها در موش‌های کلستازی می‌توانند به ایجاد کما و ادم منجر شوند، آنها با تزریق لیپولی ساکارید به موش‌های سالم و کلستاز توانستند، در موش‌های کلستازی حالت‌های قبل از کما و ادم سیتوتوکسیک را القا نمایند. هیپوکامپ بخشی از مغز است که می‌تواند پس از مرگ نورون‌هایش، مجدد تکثیر نورون‌ها را داشته باشد، اما تحقیقات محققان نشان دادند که، افزایش توکسین‌ها می‌تواند به التهاب نورون‌ها و کاهش نوروزنر منجر شود. افزایش توکسین‌ها به -

REFERENCES

- Alipanzade, H., Soleimani, M., Soleimani, A., Mehdizadeh, M. and Katebi, M. 2012. Effect of transforming growth factor alpha of dentate gyrus neurons and pyramidal cells of CA1 subfield of hippocampus following ischemia-reperfusion in rats. – J. Gorgan University of Med. Sci. 14: 21-27.
- Belayev, A., Saul, I., Liu, Y. and Zhao, W. 2003. Enriched environment delays the onset of hippocampal damage after global cerebral ischemia in rats. – Brain. Res. 964: 121-127.
- Cauli, O., Rodrigo, R., Liansola, M., Montoliu, C., Monfort, P. and Piedrafita, B. 2009. Glutamatergic and gabaergic neurotransmission and neuronal circuits in hepatic encephalopathy. – Metab. Brain. Dis. 24: 69-80.
- Chang, M.L., Yeh, C.T., Chang, P.Y. and Chen, J.C. 2005. Comparison of murine cirrhosis models induced by Hepatotoxin administration and common bile duct ligation. – World J. Gastroenterol. 11: 4167-4172.
- Dehpour, R., Seyyedi, A., Rastegar, H., Namirani, K., Moezi, L. and Sadeghipour, H. 2002. The non-adrenergic non-cholinergic relaxation of anococcygeus muscles of bile duct-ligated Rats. – Eur. J. Pharmacol. 445: 31-36.
- Ghaffuri, K., Tourr Savadkouhi, S., Honar, H., Riazi, K., Shafaroodi, H., Moezi, L., Ebrahimkhani, M.R., Radj-abzadeh Tahmasebi, M.S. and Dehpour, A.R. 2004. Obstructive cholestasis alters intestinal transit in mice: role of opioid system. – Life Sci. 76: 397-406.
- Gharoony, F., Oryan, Sh., Nabiuni, M., Eslimi Esfahani, D., Hosseiny, T., Karimian Peiro, M. and Parsa, S. 2015. The histopathological effects of cholestasis on hypothalamic paraventricular and supraoptic nucleus on male Wistar rats. – Nova Biologica Rep. 1: 77-85.
- Harry, D., Anand, R., Holt, S., Davies, S., Merley, R., Frnando, B., Goodier, D. and Moore, K. 1999. Increased sensitivity to endotoxemia in the bile duct ligated cirrhotic rat. – Hepato. 30: 1198-1205.
- Hasanein, P., Parviz, M., Keshavarz, M., Javanmardi, K., Allahtavakoli, M. and Ghaseminejad, M. 2007. Modulation of cholestasis-induced antinociception in rats by two NMDA receptor antagonists: MK-810 and magnesium sulfate. – Eur. J. Pharma. 554: 123-127.
- Hong, J.Y., Sato, E.F., Hiramoto, K., Nishicawa, M. and Inoue, M. 2007. Mechanism of liver injury during Obstructive jaundice: role of nitric oxide splenic cytokines, and intestinal flora. – J. Clin. Biochem. Nutr. 40: 184-193.
- Iwai, M., Cui, T.X., Kitamura, H., Saito, M. and Shimazu, T. 2001. Increased secretion of tumour necrosis factor and interleukin 6 from isolated, perfused liver of rats after partial hepatectomy. – Cytokine 13: 60-64.
- Kande, E.R., Schwartz, J.H. and Jessel, T.M. 2000. Principles of Neural Science. – 1st. New York: Mc. Graw-Hill. pp: 10-35.
- Kiani, S., Valizadeh, B., Hormazdi, B., Samadi, H., Njafi, T., Samini, M. and Dehpour, A.R. 2009. Alteration in male reproductive system in experimental cholestasis roles for opioids and nitric oxide overproduction. – Eur. J. Pharmacol. 615: 246-251.

هیپوکامپ و کاهش تراکم سلول‌های سالم مشاهده شد که ادامه این امر می‌تواند با تخریب حافظه همراه باشد که با مطالعات قبلی نویسندگان این مقاله همخوانی دارد (Gharoony *et al.*, 2015). این احتمال وجود دارد که افزایش اندوتوکسین‌ها و آثار منفی آن‌ها بر ساختار بافتی هیپوکامپ به ایجاد چنین تغییراتی منجر شود که البته، اظهار نظر قطعی در باره آن نیاز به مطالعه بیشتری دارد.

سپاسگزاری

نگارندگان از خانم‌ها طلیعه‌السادات حسینی‌نیا و فاطمه قارونی به خاطر همکاری‌های بی‌دریغشان، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

- Lavazza, C., Carlo-Stella, C., Giacomini, A., Cleris, L. and Righi, M.** 2010. CD34 cells engineered to express membrane-bound tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand target both tumor cells and tumor vasculature. – J. Gastroente. 139: 675-684.
- Mani, A., Nahavandi, A. and Dehpour A.R.** 2000. Role of nitric oxide in hypodipsia in rats with obstructive cholestasis. – J. Pharm. Pharmacol. 53: 227-234.
- Moezi, L., Rezayat, M., Samini, M., Shafaroodi, H., Ejtemie, S.H., Ebrahim Khani, M.R. and Dehpour, A.R.** 2004. Potentiation of anandamide effects in mesenteric beds isolated from bile duct-ligated rats: role of nitric oxide optic tectum. – Eur. J. Pharmacol. 489: 53-59.
- Moezi, L., Shafaroodi, H., Sarcar, S., Emami-Razavi, S.H., Sanatkar, M., Mirazi, N. and Dehpour, A.R.** 2006. Involvement of nitrenergic and opioidergic systems in the hypothermia by cholestasis in rats. – J. Pathophys. 13: 227-232.
- Nahavandi, A., Dehpour, A.R., Mani, A., Homayounfar, H., Abdoli, A. and Abdolhoseini, M.R.** 2001. The role of nitric oxide in bradycardia of rats with obstructive cholestasis. – Euro. J. Pharmacol. 411: 135-141.
- Narimani, K., Samini, M., Ejtemaei mehr, S., Gaskari, S.A. and Rastegar, H.** 2001. Mesenteric vascular bed responsiveness in bile duct-ligated rat's: roles of opioid and nitric oxide systems. – J. Pharmacol. 423: 185-193.
- Podolsky, D.K. and Dienstag, J.** 1998. Liver and Biliary Tract Diseases In: Harrison's Principles of Internal Medicine. – 14th Editions Eugene Braunwald, AB Isselbacher, J Kurt, Mc. Grawhill. 1437-1516 pp.
- Prins, H.A., Meijer, C., Boelens, P.G., Nijveldt, R.J., Siroen, M.P., Masson, S., Daveau, M., Scotte, M., Diks, J. and van Leeuwen, P.A.** 2005. The role of Kupffer cells after major liver surgery. – J. Parenter. Enteral. Nutr. 29: 48-55.
- Qin, L., He, J., Hanes, R., Pluzarev, O., Hong, J.S. and Crews, F.T.** 2008. Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. – J. Neuroinflamm. 128: 200-204.
- Schacter, B.A., Joseph, E. and Firneisz G.** 1983. Effect of cholestasis produced by bile duct ligation on hepatic heme and hemoprotein metabolism in rats. – Gastroentero. 2: 227-235.
- Tehranipour, M. and Sabzalizade, M.** 2011. Effect of cannabis sativa alcoholic extract on hippocampus neuronal on density in Rats. – J. Gorgan University of Med. Sci. 13: 12-17.
- Wright, G., Davies, N.A., Shawcross, D.L., Hodges, S.J., Zwingmann, C., Brooks, H.F., Mani, A.R., Harry, D., Stadlbauer, V., Zou, Z., Williams, R., Davies, C., Moore, K.P. and Jalan, R.** 2007. Endotoxemia produces coma

and brain swelling in bile duct-ligated rats. – Hepato. 46: 1517-1526.

How to cite this article:

Eslimi Esfahani, D., Oryan, Sh., Nabiuni, M. and Karimian Peiro, M. 2017. The role of cholestasis in brain hippocampus trauma in male Wistar rat. – Nova Biologica Rep. 4: 128-136.

اسلیمی اصفهانی، د.، عریان، ش.، نبیونی، م. و کریمیان پیرو، م. ۱۳۹۶. نقش کلستاز در ایجاد آسیب بافتی مغز در ناحیه هیپوکامپ موش صحرایی نر نژاد ویستار. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۴: ۱۲۸-۱۳۶.

