

ایجاد نارسایی حاد کبدی تجربی ناشی از تتراکلرید کربن در مدل موش نژاد NMRI

حسین زارع^۱، شهرام جمشیدی^{۲*}، عباس پیریایی^۳، محمد مهدی دهقان^۴، فرهنگ ساسانی^۵،
صدیقه مولائی^۶، فاطمه نصیری^۶، نادر صدیق^۷

چکیده

زمینه و هدف: ایجاد مدل نارسایی حاد کبدی برای ارزیابی اثرات و بی خطر بودن روش های جایگزین پیوند کبد، به کار می رود. این مطالعه با هدف تعیین دوز مناسب تتراکلرید کربن برای ایجاد نارسایی حاد کبدی در موش نژاد NMRI انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه ابتدا در ۵ گروه موش ۶ تایی، تتراکلرید کربن محلول در روغن زیتون با دوزهای مختلف (به میزان ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن) به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. پس از ۲۴ ساعت سطح سرمی آنزیم های کبد و وضعیت بافت کبد ارزیابی شد. برای بررسی میزان زنده مانده موش ها، تتراکلرید کربن با مقادیر ذکر شده به ۶ گروه موش جدید تزریق و این حیوانات طی ۴ روز مورد مشاهده قرار گرفتند. جهت بررسی تأثیر سم در روزهای بعد، دوز تعیین شده به ۲۴ موش جدید تزریق و ارزیابی های بافتی و سرمی تکرار شد.

یافته ها: با افزایش دوز تتراکلرید کربن، سطح سرمی آنزیم های کبدی و درجه آسیب بافت کبدی افزایش یافت. مقادیر بیش از یک میلی لیتر بر کیلوگرم تتراکلرید کربن باعث ایجاد آسیب حاد کبدی شد. همچنین در میزان یک میلی لیتر بر کیلوگرم، مرگ و میر کم و در مقادیر بیش از ۲ میلی لیتر بر کیلوگرم، مرگ و میر شدید بود. در تزریق تتراکلرید کربن (با دوز ۱/۵ میلی لیتر بر کیلوگرم)، حداکثر افزایش آنزیم های کبدی، ۲۴ ساعت بعد ایجاد شد که به تدریج کاهش یافت. درجه آسیب کبدی در روزهای بعد از تزریق، تقریباً تا روز چهارم یکسان بود، ولی از ۷۲ ساعت به بعد، فاز رژنراسیون کبدی آغاز گردید.

نتیجه گیری: طبق نتایج این مطالعه، تزریق داخل صفاقی تتراکلرید کربن (با دوز ۱/۵ میلی لیتر بر کیلوگرم) در یک نوبت، می تواند دوز مناسبی برای ایجاد مدل نارسایی حاد کبدی در موش نژاد NMRI باشد.

کلیدواژه ها: نارسایی حاد کبدی؛ تتراکلرید کربن؛ موش.

^۱دستیار تخصصی بیماری های داخلی
دام های کوچک، دانشکده دامپزشکی
دانشگاه تهران، تهران، ایران.

^۲استاد بیماری های داخلی، دانشکده
دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

^۳استادار علوم تشریح، دانشکده پزشکی
و دانشکده فزآوری های نوین پزشکی،
دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی،
تهران، ایران.

^۴استاد جراحی، دانشکده دامپزشکی،
دانشگاه تهران، تهران، ایران.

^۵استاد پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی،
دانشگاه تهران، تهران، ایران.

^۶کارشناس ارشد زیست فزآوری
پزشکی، مؤسسه آموزشی و پژوهشی طب
انتقال خون، تهران، ایران.

^۷پزشک عمومی، مرکز تحقیقات
پزشکی، مؤسسه کارگستران پژوهشگر
شریف، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

شهرام جمشیدی، دانشکده
دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

shjamshidi@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۱۹

تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۲۴

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Zare H, Jamshidi Sh, Piryaee A, Dehghan MM, Sasani F, Molaei S, et al.
Induction of acute hepatic failure by carbon tetrachloride in the NMRI mouse
model.

Qom Univ Med Sci J 2015;9(4):74-84. [Full Text in Persian]

مقدمه

کبد بزرگترین ارگان داخلی بدن بوده که واکنش‌های بیوشیمیایی وسیعی را انجام می‌دهد. تقریباً ۸۰٪ کبد از واحدهای عملکردی یا لوبول‌ها تشکیل می‌شوند. کبد در متابولیسم اسیدهای آمینه، کربوهیدرات‌ها، لیپیدها، داروها، همچنین سم‌زدایی، سنتز پروتئین‌های سرم، تولید صفرا و جذب مواد غذایی نقش دارد (۱). بدین ترتیب، کبد یکی از ارگان‌های بسیار مهم و حیاتی بدن است که هرگونه آسیب آن می‌تواند پیامدهای بسیار گسترده‌ای را ایجاد کند. نارسایی حاد کبد به دلیل از دست دادن هموستاز متابولیکی بدن و پیامدهای ناشی از آنسفالوپاتی کبدی، ادم مغزی و نارسایی ارگان‌های مختلف، باوجود درمان‌های گسترده باعث مرگ‌ومیر می‌شود (۲،۳). عوامل ایجادکننده آسیب‌های حاد کبدی متفاوت بوده و در بسیاری از بیماران نیز ممکن است شناخته نشوند (۳). هپاتیت‌های ویروسی، تجویز ترکیبات دارویی یا مسمومیت‌ها از علل شناخته‌شده آسیب‌های کبدی حاد هستند (۴). در یک مطالعه که طی ۸ سال (۲۰۰۰-۱۹۹۲) بر روی ۲۶۷ بیمار مبتلا به آسیب حاد کبدی در اسپانیا صورت گرفت، به ترتیب عوامل زیر در ایجاد آن نقش داشتند: هپاتیت ویروسی (۳۷٪)، علل ناشناخته (۳۲٪)، داروها یا سموم (۱۹/۵٪) و سایر موارد (۱۱/۶٪) (۵). با ارتقای تکنیک‌های جراحی و درمان‌های ایمونولوژیک، پیوند کبد به عنوان یک روش درمانی اثبات‌شده، در نارسایی‌های حاد و مزمن کبد مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲،۳،۵،۶). با این حال پیوند کبد دارای محدودیت‌هایی از قبیل کمبود اهداکننده مناسب، هزینه بالای پیوند و عوارض بعد از عمل جراحی از جمله پس‌زدن بافت پیوندی است (۱۰-۷). با توجه به این محدودیت‌ها، یافتن روش‌های جایگزین، به منظور ترمیم کبد که باعث بهبود زنده‌مانی و کاهش مرگ‌ومیر شوند، ضروری به نظر می‌رسد. همچنین سلول‌درمانی به عنوان یک استراتژی جایگزین پیوند کبد، در ضایعات کبدی مطرح است (۱۰).

به منظور ارزیابی اثرات و بی‌خطر بودن این روش‌های درمانی، نیاز به ایجاد مدل حیوانی مناسب نارسایی حاد کبدی است تا مقلد شرایط پاتوفیزیولوژیکی اختلالات حاد کبدی باشد. تاکنون، مدل‌های حیوانی متعددی در زمینه ایجاد نارسایی حاد کبدی

براساس تکنیک‌های جراحی، تجویز سموم کبدی و یا ترکیبی از این روش‌ها پیشنهاد شده است که هریک از آنها اغلب جنبه خاصی از نارسایی حاد کبدی را منعکس می‌کنند (۳،۶،۱۱). مواد شیمیایی سمی می‌توانند تعدادی از مشخصه‌های بالینی مهم نارسایی حاد کبدی از قبیل هیپوگلیسمی، آنسفالوپاتی و افزایش سطح خونی آنزیم‌های کبدی را ایجاد کنند. بنابراین، طراحی مدل‌های تجربی نارسایی حاد کبدی به وسیله این مواد، به طور گسترده می‌تواند برای بررسی پاتوفیزیولوژی و استراتژی‌های درمانی، مؤثر واقع شود. همچنین پیشرفت‌های سالهای اخیر در درمان نارسایی حاد کبدی وابسته به مطالعه مدل‌های حیوانی بوده که این مدل‌ها تا حدودی توانسته‌اند الگوی‌های بالینی، بیوشیمیایی و بافتی سندرم رخ داده در انسان را منعکس کنند. در بین مواد شیمیایی مختلف، تراکلریدکربن به عنوان یک سم کلاسیک در مطالعات تجربی ایجاد نارسایی کبدی، مورد استفاده قرار گرفته است (۳،۱۱،۱۲).

طبق نظریه Terblanche و Hickman در یک مدل حیوانی مناسب نارسایی حاد کبدی، آسیب ایجادشده باید به طور بالقوه برگشت‌پذیر و قابل تکرار باشد، مرگ حیوان نیز باید به طور مستقیم ناشی از نارسایی کبدی بوده و بین ایجاد آسیب و وقوع مرگ، فرصت کافی برای انجام روش درمانی مورد نظر وجود داشته باشد (۱۳).

طبق بررسی منابع، در مطالعات تجربی انجام‌شده، جنبه‌های مختلف ایجاد مدل نارسایی حاد کبدی به وسیله تراکلریدکربن در موش از جمله تأثیر دوزهای مختلف آن و میزان زنده‌مانی مورد بررسی قرار نگرفته و اطلاعات کاملی در این زمینه وجود ندارد. باوجود اینکه در مطالعات مختلف از تراکلریدکربن با مقادیر متفاوت، به منظور ایجاد آسیب حاد کبدی در موش استفاده شده است (۱۷-۱۴)، اما تاکنون دوز واحدی برای ایجاد نارسایی حاد کبدی که در طی آن باوجود ایجاد آسیب حاد، مشخصه‌های مناسب مدل نارسایی حاد کبدی پیشنهادشده توسط Terblanche و Hickman را فراهم کند نیز مشخص نشده است. این مطالعه با هدف تعیین دوز مناسب تراکلریدکربن برای ایجاد مدل نارسایی حاد کبدی در موش نژاد NMRI انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه به صورت تجربی در موش‌های نر ۸ هفته‌ای نژاد NMRI تهیه شده از مؤسسه تحقیقاتی و سرم‌سازی رازی انجام شد. این حیوانات یک هفته قبل از شروع آزمایش به حیوانخانه آزمایشگاه مرکزی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران منتقل و در شرایط استاندارد از نظر نور (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی)، غذا و آب نگهداری شدند. پروتکل این تحقیق مطابق قوانین بین‌المللی در مورد حیوانات آزمایشگاهی انجام گرفت. در این مطالعه ابتدا موش‌ها به صورت تصادفی به ۷ گروه ۶ تایی (کنترل، شم (دریافت کننده روغن زیتون) و پنج گروه دریافت کننده تراکلریدکربن (به میزان ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن)) تقسیم شدند.

سپس برای ایجاد آسیب حاد کبدی، تراکلریدکربن (MerckSchuchardt, 2221) محلول در روغن زیتون به صورت داخل صفاقی به آنها تزریق شد. حجم همه تزریق‌ها یکسان و مقدار آن ۰/۲ میلی لیتر به ازای هر ۲۵ گرم وزن موش بود. پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان تزریق، نمونه خون از قلب موش‌ها، تحت بیهوشی عمیق با کتامین (دوز ۱۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و گزیلازین (دوز ۱۵ میلی گرم بر کیلوگرم) گرفته شد و درون لوله‌های فاقد ماده ضدانعقاد به آزمایشگاه مرجع، به منظور اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی آسپارات آمینو ترانسفراز (AST) و آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) که از مهم‌ترین شاخص‌های آسیب کبدی هستند، ارسال گردید. سطح سرمی این آنزیم‌ها با استفاده از کیت‌های تولیدی شرکت پارس آزمون و به وسیله دستگاه اتوماتیک آنالیزر (Hitachi 912) اندازه‌گیری شدند. همچنین نمونه‌های کبد پس از انجام کالبدگشایی به منظور ارزیابی هیستوپاتولوژی، در فرمالین ۱۰٪ تثبیت شدند. نمونه‌های کبدی با روش شماره‌گذاری و بدون اینکه گروه‌بندی‌های صورت گرفته در مورد آنها مشخص باشد به روش استاندارد آماده‌سازی شده و به صورت پارافینی قالب‌گیری شده و پس از تهیه برش‌های بافتی و رنگ آمیزی متداول هما توکسلین و ائوزین (H&E)، برای ارزیابی ضایعات بافتی ناشی از تزریق تراکلریدکربن مورد بررسی قرار گرفتند. جهت ارزیابی میزان زنده‌مانی موش‌ها نیز پس از تزریق تراکلریدکربن، ۶ گروه ۱۰ تایی از موش‌ها (گروه‌های ۷-۲)

بررسی شدند. تمامی حیوانات در این مرحله تا ۴ روز پس از تزریق به صورت منظم از نظر میزان مرگ و میر مورد ارزیابی قرار گرفتند و اطلاعات مربوطه ثبت گردید.

در این تحقیق، دوز مناسب بر این اساس که در عین ایجاد نارسایی حاد کبدی، میزان زنده‌مانی مطلوب، به منظور هرگونه اقدام درمانی برای پژوهشگر نیز فراهم شود، تعیین گردید. لذا تمامی نتایج حاصل از هیستوپاتولوژی و اندازه‌گیری آنزیم‌های سرمی در گروه‌های تحت تزریق، مقادیر مختلف تراکلریدکربن در مرحله اول، همچنین میزان زنده‌مانی موش‌ها در گروه‌های مختلف در مرحله دوم بررسی شد، بدین منظور تراکلریدکربن با دوز ۱/۵ میلی لیتر بر کیلوگرم انتخاب گردید. به منظور بررسی اثرات این دوز در روزهای متعدد، در ۲۴ موش، تزریق داخل صفاقی انجام گرفت، سپس در زمانهای ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بعد از تزریق، در هر نوبت، ۶ موش قربانی شدند و نمونه‌های خون جهت بررسی آنزیم‌های کبدی (AST و ALT)، همچنین نمونه‌های بافت کبد برای بررسی ضایعات هیستوپاتولوژیک جمع‌آوری شد.

نمونه‌های تهیه شده از کبد با استفاده از معیارهای منتشر شده در مطالعات قبلی (۱۸)، به صورت نیمه کمی براساس وسعت نکروز و انتشار سلول‌های التهابی به صورت زیر درجه‌بندی شدند:

صفر: عدم وجود ضایعه؛ ۱: وجود نکروز خفیف هپاتوسیت‌ها همراه با واکنش التهابی خفیف؛ ۲: نکروز منتشر هپاتوسیت‌ها به صورت وصله‌مانند همراه با واکنش التهابی و ۳: از بین رفتن کامل لوپول‌ها، نکروز منتشر هپاتوسیت‌ها همراه با واکنش التهابی منتشر لوپول‌ها.

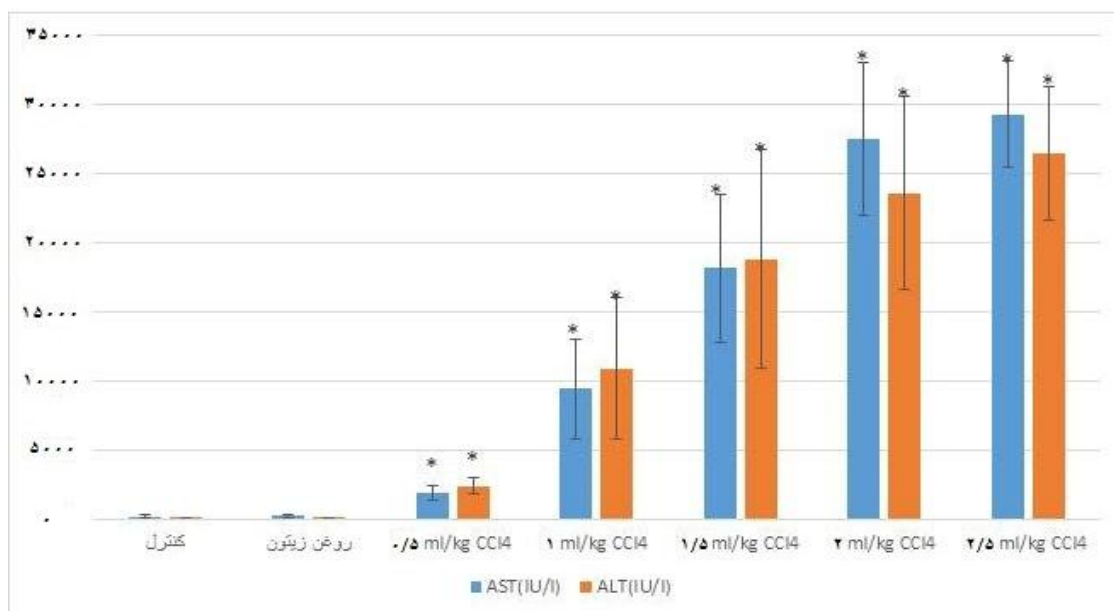
داده‌های سرمی با استفاده از برنامه نرم‌افزاری SPSS نسخه ۱۹ و روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند. در آنالیز واریانس، معنی‌داری اختلاف در سطح ۰/۰۵ میان گروه‌ها با استفاده از آزمون Games-Howell تعیین گردید.

یافته‌ها

در مقایسه مقادیر میانگین AST و ALT، ۲۴ ساعت پس از تزریق در دو گروه تحت تزریق روغن زیتون و گروه کنترل، اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد. بدین ترتیب، تراکلریدکربن محلول در روغن زیتون بر نتایج تجربیات پژوهش حاضر، تأثیری

این پارامترها در همه گروه‌های تزریقی تتراکلرید کربن نسبت به گروه کنترل، اختلاف معنی‌دار بود (نمودار شماره ۱، جدول شماره ۱).

نداشت. همچنین با افزایش دوز تزریقی تتراکلرید کربن، میزان ALT و AST به صورت چشمگیری افزایش یافت، به طوری که بین مقادیر



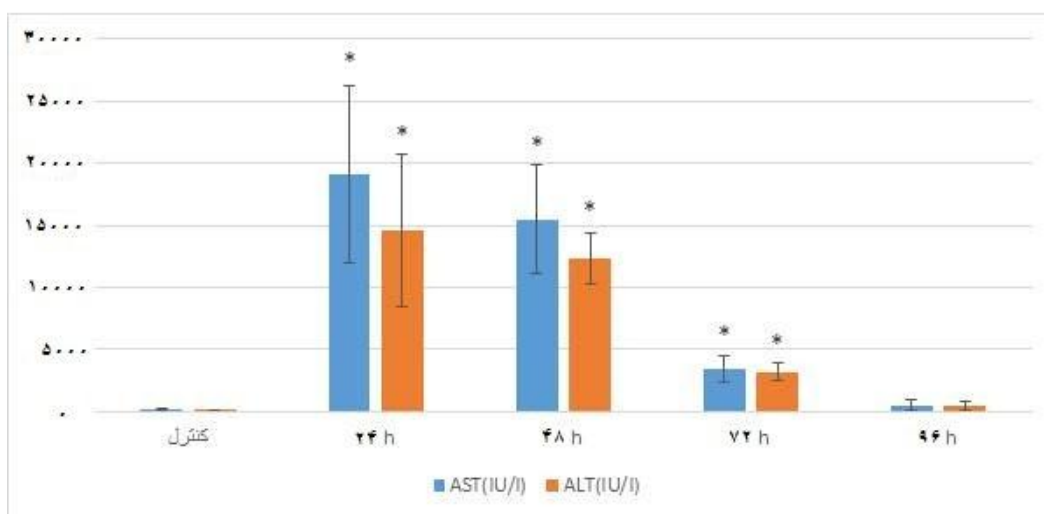
نمودار شماره ۱: سطح AST و ALT سرمی، ۲۴ ساعت پس از تزریق دوزهای مختلف تتراکلرید کربن. (*: اختلاف با $p < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل).

جدول شماره ۱: میانگین سطح سرمی ALT و AST، ۲۴ ساعت پس از تزریق دوزهای مختلف تتراکلرید کربن و بررسی اختلاف با گروه کنترل

گروه‌ها	آنزیم‌ها	AST(IU/L)	pvalue	ALT(IU/L)	pvalue
کنترل		98±206	N/A	27±60	N/A
روغن زیتون		128±234	0/664	35±66	0/71
0/5 میلی گرم بر کیلوگرم		523±1914	0/001>	552±2412	0/001>
1 میلی گرم بر کیلوگرم		3609±9449	0/002	5111±10926	0/001>
1/5 میلی گرم بر کیلوگرم		5373±18155	0/001>	7940±18830	0/002
2 میلی گرم بر کیلوگرم		5509±27530	0/001>	7012±23613	0/002>
2/5 میلی گرم بر کیلوگرم		3834±29302	0/001>	4847±26482	0/001>

افزایش سطوح آنزیم در زمانهای ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تزریق نسبت به گروه کنترل، معنی‌دار بود، در صورتی که سطح آنزیم‌ها ۹۶ ساعت پس از تزریق، نسبت به موش‌های گروه کنترل، اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (نمودار شماره ۲، جدول شماره ۲ و ۳).

میانگین سطح آنزیم‌های AST و ALT، ۲۴ ساعت بعد از تزریق دوز ۱/۵ میلی لیتر بر کیلوگرم به شدت افزایش یافت، ولی به تدریج در ساعت‌های بعد، دچار کاهش شد. کاهش میانگین آنزیم‌های مذکور بین ساعت ۲۴ و ۴۸، اختلاف آماری معنی‌داری با یکدیگر نداشت، در حالی که اختلاف مابین ساعات ۴۸ و ۷۲، همچنین ۷۲ و ۹۶، معنی‌دار بود.



نمودار شماره ۲: سطح AST و ALT سرمی طی ساعات مختلف پس از ایجاد نارسایی حاد کبدی با دوز ۱/۵ میلی لیتر بر کیلوگرم تراکلرید کربن. (*: اختلاف با $p < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل).

جدول شماره ۲: سطح AST و ALT سرمی طی ساعات مختلف پس از ایجاد نارسایی حاد کبدی با دوز ۱/۵ میلی گرم بر کیلوگرم تراکلرید کربن.

آزمایشها	کنترل	ساعت ۲۴	ساعت ۴۸	ساعت ۷۲	ساعت ۹۶
AST(IU/L)	۲۰۶±۸۹	۷۱۳±۱۹۱۲۸	۴۳۸۹±۱۵۴۶۹	۱۰۸۷±۳۴۱۳	۴۱۲±۵۲۵
ALT(IU/L)	۲۷±۶۰	۶۱۲۳±۱۴۶۱۴	۲۰۲۱±۱۲۳۶۰	۶۷۰±۳۲۰۳	۳۸۹±۴۵۷

جدول شماره ۳: مقادیر pvalue مقایسه میانگین سطح سرمی AST و ALT طی ساعات مختلف پس از ایجاد نارسایی حاد کبدی با دوز ۱/۵ میلی لیتر بر کیلوگرم تراکلرید کربن

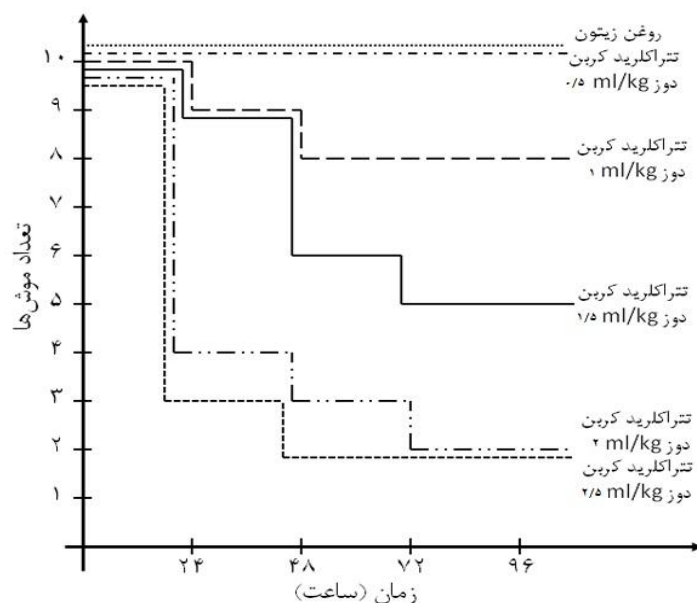
مقایسه زمانهای پس از تزریق		ALT (pvalue)	AST (pvalue)
ساعت ۲۴	ساعت ۴۸	۰/۸۱۷	۰/۹۰۳
	ساعت ۷۲	۰/۰۱۴	۰/۰۳۰
	ساعت ۹۶	۰/۰۰۷	۰/۰۱۲
	کنترل	۰/۰۰۷	۰/۰۱۱
ساعت ۴۸	ساعت ۷۲	۰/۰۰۵	>۰/۰۰۱
	ساعت ۹۶	۰/۰۰۲	>۰/۰۰۱
	کنترل	۰/۰۰۲	>۰/۰۰۱
ساعت ۷۲	ساعت ۹۶	۰/۰۰۴	>۰/۰۰۱
	کنترل	۰/۰۰۴	>۰/۰۰۱
	کنترل	۰/۴۳۱	۰/۲۲۷

بود (۳ موش از ۱۰ موش) و در ۷۲ ساعت بعد از تزریق، این میزان به ۵۰٪ رسید. در حیوانات گروه ۶ (دریافت کننده تراکلرید کربن با دوز ۲ میلی لیتر بر کیلوگرم) و گروه ۷ (دریافت کننده تراکلرید کربن با دوز ۲/۵ میلی لیتر بر کیلوگرم)، ۲۴ ساعت بعد از تزریق، مرگ و میر بالای ۵۰٪ بود (به ترتیب ۶ و ۷ موش از ۱۰ موش) و در طی ۷۲ ساعت بعد از تزریق، این میزان به ۸۰٪ رسید. در تمام گروه‌ها، موش‌هایی که تا ۷۲ ساعت بعد از تزریق،

در این مطالعه تمام حیوانات گروه ۲ (دریافت کننده روغن زیتون) و گروه ۳ (دریافت کننده تراکلرید کربن با دوز ۰/۵ میلی لیتر بر کیلوگرم)، ۴ روز پس از تزریق سالم بودند. در حیوانات گروه ۴ (دریافت کننده تراکلرید کربن با دوز ۱ میلی لیتر بر کیلوگرم)، ۴۸ ساعت بعد از تزریق، میزان مرگ و میر ۲۰٪ (۲ موش از ۱۰ موش) افزایش یافت. در گروه ۵ (دریافت کننده تراکلرید کربن با دوز ۱/۵ میلی لیتر بر کیلوگرم) حداکثر مرگ و میر، بعد از ۴۸ ساعت

صفر بود (نمودار شماره ۳).

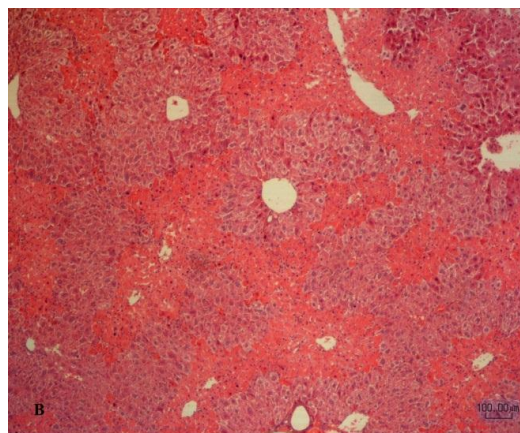
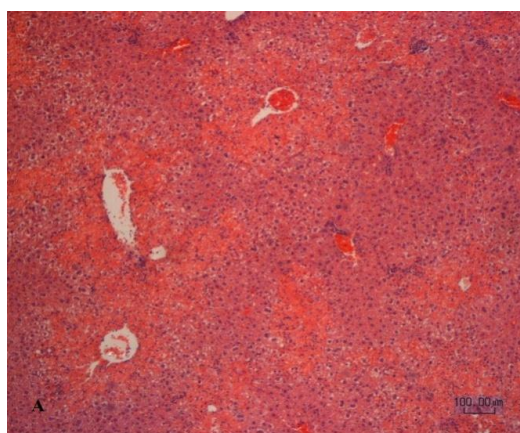
اثرات سمی تراکلرید کربن را تحمل کرده بودند، از ۷۲ ساعت به بعد زنده ماندند و میزان مرگ و میر پس از آن، در آنها



نمودار شماره ۳: میزان زنده ماندن موش‌های تحت مطالعه در مدت ۴ روز بعد از تزریق دوزهای مختلف تراکلرید کربن و روغن زیتون.

در کبدهای آسیب دیده، نکروز ناشی از تراکلرید کربن؛ بیشتر در ناحیه مرکز لوبولی دیده شد. از طرفی، میزان آسیب کبدی تا ۴ روز بعد از تزریق تراکلرید کربن با دوز ۱/۵ میلی لیتر بر کیلوگرم، همچنان یکسان باقی ماند (آسیب کبدی درجه ۲)، هرچند که در ۷۲ ساعت بعد از تزریق، نشانه‌هایی مبنی بر ترمیم بافتی در مقاطع هیستوپاتولوژی (به صورت جایگزینی هپاتوسیت‌های سالم به همراه حضور خفیف فیبروبلاست‌ها و رشته‌های همبند ظریف در نقاط نکروزه) به طور خفیف مشاهده گردید (شکل شماره ۱).

تزریق تراکلرید کربن (با دوز ۰/۵ میلی لیتر بر کیلوگرم) تأثیری در ایجاد نکروز بافتی و التهاب کبد نداشت، هرچند تغییر چربی خفیفی در هپاتوسیت‌ها مشاهده گردید. در حالی که تزریق مقادیر یک میلی لیتر بر کیلوگرم و بیش از آن، باعث ایجاد آسیب بافت کبدی شد. همچنین تزریق تراکلرید کربن (در مقادیر ۱/۵ و ۱ میلی لیتر بر کیلوگرم) موجب ایجاد آسیب کبدی درجه ۲ گردید و بالاترین سطح آسیب کبدی در تزریق مقادیر ۲/۵ و ۲ میلی لیتر بر کیلوگرم ایجاد شد که موجب آسیب کبدی درجه ۳ گردید.



شکل شماره ۱: تغییرات هیستوپاتولوژی در کبد موش‌های تحت مطالعه، ۲۴ ساعت بعد از تزریق مقادیر مختلف تراکلرید کربن.

(رنگ آمیزی هماتوکسیلین و انوزین، با بزرگنمایی ۴۰x).

A: نکروز انعقادی مرکز لوبولی چندکانونی همراه با نفوذ سلول‌های التهابی در ناحیه پورتال با دوزهای ۱/۵ و ۱ میلی لیتر بر کیلوگرم
B: نکروز انعقادی حاد مرکز لوبولی چندکانونی همراه با اتصال نکروتیک (Bridging Necrosis) با دوزهای ۲/۵ و ۲ میلی لیتر بر کیلوگرم

بحث

در حال حاضر، مواد شیمیایی سمی مختلفی به منظور ایجاد مدل‌های حیوانی نارسایی حاد کبدی از قبیل استامینوفن، تراکلرید کربن، گالاکتوز آمین و تیواستامید مورد استفاده قرار می‌گیرند (۳). استفاده از روش‌های جراحی برای ایجاد نارسایی حاد کبدی نیاز به صرف وقت، هزینه‌های بالا، اتاق جراحی، وسایل، همچنین جراح حرفه‌ای دارد. به علاوه، نتایج به دست آمده از این روش‌ها اغلب متناقض بوده و مدل ایجاد شده در یک حیوان ممکن است در حیوان دیگر قابل تکرار نباشد (۱۹).

در تحقیقات پیشین، موش‌های Inbred تا حدودی برای ایجاد مدل نارسایی حاد کبدی مورد توجه بوده‌اند (۱۷-۱۴). این در حالی است که موش‌های Outbred ارزان‌تر بوده و طول عمر زیادی دارند. همچنین این موش‌ها نسبت به بیماری‌ها مقاوم‌تر و سرعت رشد بالایی نیز دارند، مهم‌تر اینکه موش‌های Outbred از لحاظ اندازه، بزرگتر از Inbred بوده و همین ویژگی باعث شده است که موش‌های Outbred برای استفاده در تحقیقات مناسب‌تر باشند. مطالعه حاضر به ایجاد مدل نارسایی حاد کبدی در موش NMRI که نوعی موش Outbred محسوب می‌شود، پرداخته است. مدت زمان زیادی است که اثرات سمی تراکلرید کربن بر کبد مشخص شده است (۲۰). بیشتر اثرات سمی تراکلرید کربن در اثر متابولیسم شدن به رادیکال‌های تری کلرو متیل به وسیله سیتوکروم P450 ایجاد می‌شود. این رادیکال‌ها به طور مستقیم با اسیدهای چرب غیر اشباع در سلول‌های کبدی واکنش داده و می‌توانند باعث ایجاد رادیکال‌های آزاد شوند. رادیکال‌های آزاد به طور مستقیم یا غیر مستقیم منجر به آسیب لیپیدها، اسیدهای نوکلئیک و ترکیبات دیگر سلول‌ها خواهند شد. همزمان، فعال شدن سلول‌های کوپفر، باعث آزاد شدن سیتوکاین‌ها، رادیکال‌های اکسیژن و گرانولوسیت‌های موجود در نوتروفیل‌ها و ایجاد آسیب بیشتر می‌شود (۲۱، ۲۲). در برخی مطالعات دیگر، تراکلرید کربن علاوه بر نکروز، با ایجاد آپوپتوز باعث القای مرگ سلولی نیز شده است. آسیب‌های سلولی ناشی از تراکلرید کربن بیشتر در مرکز لوبول‌ها ایجاد می‌شوند (۲۳). در مطالعه حاضر، نارسایی حاد کبدی به وسیله تراکلرید کربن در موش نژاد NMRI ایجاد شد و سپس با استفاده از روش‌های ارزیابی هیستوپاتولوژی،

آزمایش بیوشیمیایی و میزان زنده‌مانی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، ابتدا اثرات سمی دوزهای مختلف تراکلرید کربن در یک نوبت تجویز در بافت کبد موش‌ها، همچنین تأثیر آن بر میزان آنزیم‌های سرمی شاخص آسیب کبدی (ALT, AST) بررسی شد و پس از مشخص شدن دوز مناسب جهت ایجاد نارسایی حاد کبدی که با توجه به یافته‌ها، دوز ۱/۵ میلی لیتر بر کیلوگرم معرفی شد، اثرات این دوز با استفاده از روش‌های هیستوپاتولوژی و تغییر آنزیم‌های سرمی اختصاصی کبد به مدت ۴ روز متوالی تحت بررسی قرار گرفت.

Banas و همکاران (۱۴، ۲۴) در مطالعه خود از تراکلرید کربن (با دوز ۰/۵ میلی لیتر بر کیلوگرم) به صورت تجویز داخل صفاقی در یک نوبت در موش‌های نژاد BALB/c، همچنین Kim و همکاران (۱۶) در موش‌های نژاد C57BL/6 با همین دوز، برای ایجاد آسیب حاد کبدی و مطالعه تأثیر سلول‌های بنیادی استفاده کردند. در حالی که در مطالعه حاضر تجویز همین دوز تراکلرید کربن در موش‌های NMRI با وجود افزایش پارامترهای بیوشیمیایی و ایجاد تغییر چربی در هپاتوسیت‌های کبدی، نتوانست باعث ایجاد نکروز و التهاب بافتی گردد که این اختلاف می‌تواند به دلیل تفاوت‌های نژادی موش‌ها باشد. براساس نتایج مطالعه حاضر تزریق تراکلرید کربن (با دوز ۰/۵ میلی لیتر بر کیلوگرم) در یک نوبت، باعث ایجاد نارسایی حاد کبدی در موش نژاد NMRI نمی‌شود، به ویژه اینکه در این دوز هیچ گونه مرگ و میری (که شاخصه بروز نارسایی کبدی حاد است) نیز مشاهده نگردید. در مطالعه‌ای دیگر، Pulavendran و همکاران (۱۷) نیز برای ایجاد آسیب حاد کبدی در موش‌های نژاد BALB/c، از تراکلرید کربن (با دوز یک میلی لیتر بر کیلوگرم) در ۳ روز متوالی، روزانه یک بار استفاده کردند و بدین طریق تفاوت‌های ضد التهابی و ضد فیبروزی سلول‌های بنیادی مزانشیمی و هماتوپوئیتیک را با یکدیگر مقایسه کردند. همچنین Cho و همکاران (۱۵) از تراکلرید کربن (با دوز یک میلی لیتر بر کیلوگرم) در دو نوبت به فاصله ۲۴ ساعت در موش‌های نژاد C57BL/6 استفاده کردند. در این دو مطالعه، میزان زنده‌مانی موش‌ها در گروه‌های مختلف مورد بررسی قرار نگرفته است. در مطالعه حاضر، تزریق مقدار مشابه تراکلرید کربن در یک نوبت هر چند باعث افزایش معنی‌دار

روند بهبود بررسی شده و کمتر به میزان زنده‌مانی توجه شده است. با این حال به‌تازگی در اکثر مطالعات، یکی از مهم‌ترین روش‌های ارزیابی درمان، بهبود زنده‌مانی است (۱۲، ۱۳، ۲۵، ۲۶). بدین ترتیب تراکلریدکربن با مقادیر ۲ و ۲/۵ میلی‌لیتر بر کیلوگرم در موش‌های سوری می‌تواند کشنده باشد و نارسایی‌های غیرقابل‌برگشتی را در کبد ایجاد کند. منظور از پنجره‌درمانی نیز وجود زمان کافی پس از ایجاد نارسایی کبدی تا مرگ حیوان است تا در طی آن بتوان درمان مورد نظر، همچنین ارزیابی آن را بر روی جراحات کبدی انجام داد. براساس نتایج این تحقیق، مقادیر ۲ و ۲/۵ میلی‌لیتر بر کیلوگرم، بلافاصله در طی ۲۴ ساعت باعث مرگ می‌شود که فرصتی برای انجام درمان و ارزیابی تأثیر آن، وجود نخواهد داشت. بدین ترتیب این مقادیر را نمی‌توان به‌منظور ایجاد مدل نارسایی حاد کبدی پیشنهاد نمود. همچنین برای اطمینان از مدت زمان کافی زنده‌مانی حیوانات در گروه کنترل و آنالیز نتایج حاصله از آن و مقایسه آن با گروه درمان، به‌نظر می‌رسد تراکلریدکربن با دوز ۱/۵ میلی‌لیتر بر کیلوگرم که مرگ‌ومیر متوسطی را موجب می‌شود، دوز مناسبی برای ایجاد مدل نارسایی حاد کبدی در موش نژاد NMRI می‌باشد.

نتیجه‌گیری

طبق نتایج این مطالعه، تجویز تراکلریدکربن در یک‌نوبت و به‌میزان ۱/۵ میلی‌لیتر بر کیلوگرم با توجه به پارامترهای تغییرات هیستوپاتولوژی و شاخص‌های سرمی آسیب کبدی، به‌خصوص میزان بقای موش‌ها می‌تواند دوز مناسبی برای ایجاد نارسایی حاد کبدی در موش نژاد NMRI باشد. این مدل که مطابق معیارهای مطرح‌شده توسط Terblanche و Hickman (۱۳) در ارتباط با مدل مناسب حیوانی نارسایی حاد کبدی بوده است، محققین را قادر خواهد ساخت تا روش‌های درمانی جایگزین پیوند کبد را در نارسایی حاد کبدی مورد ارزیابی قرار دهند.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر برگرفته از طرح تحقیقاتی مصوب (شماره طرح پژوهشی ۱۳/۶۸۱) دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی است، که با همکاری دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران به انجام رسیده است.

آنزیم‌های کبدی نسبت به گروه کنترل و تغییرات نکروتیک و التهابی بافت کبد شد، ولی مرگ و میر را افزایش نداد (تنها ۴۸ ساعت بعد از تزریق، ۲۰٪ مرگ و میر رخ داد). بدین ترتیب با توجه به نتایج به دست آمده، تزریق میزان یک میلی‌لیتر بر کیلوگرم در موش NMRI باعث ایجاد آسیب حاد کبدی براساس یافته‌های سرمی و هیستوپاتولوژی خواهد شد، هرچند در مطالعات تجربی که با هدف بررسی میزان زنده‌مانی صورت می‌گیرند، ممکن است مقدار ذکرشده به دلیل مرگ و میر کم، مناسب نباشد. میزان زنده‌مانی، عامل تعیین‌کننده مهمی در ارزیابی اثرات روش‌های درمانی نوین جایگزین پیوند کبد در نارسایی‌های حاد محسوب می‌شود (۱۳). از آنجا که میزان مرگ و میر می‌تواند با شدت نکروز و افزایش آنزیم‌های کبدی در نارسایی‌های حاد کبدی ارتباط داشته باشد (۱۵)، لذا در مطالعات تجربی، بهبود زنده‌مانی، نشان‌دهنده تأثیر درمان صورت گرفته است. در مطالعه حاضر، با افزایش میزان تجویز تراکلریدکربن، میزان مرگ و میر بالا رفت، که بالطبع با افزایش آنزیم‌های سرمی و سطح آسیب کبدی نیز همراه بود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد تراکلریدکربن با دوز ۱/۵ میلی‌لیتر بر کیلوگرم باعث افزایش شدید آنزیم‌های کبدی و بروز تغییرات بافتی چشمگیر در ساختار کبد شده و علاوه بر آن، طی ۷۲ ساعت بعد از تزریق، مرگ و میر به‌طور متوسط رخ می‌دهد. درحالی‌که مقادیر ۲ و ۲/۵ میلی‌لیتر بر کیلوگرم به دلیل ایجاد حداکثر آسیب بافتی کبد، باعث مرگ و میر بالایی می‌شوند که براساس نتایج این مطالعه، مقادیر مذکور به‌شدت در موش NMRI سمی و کشنده است. همچنین بررسی هیستوپاتولوژی بافت کبد نیز مؤید آسیب شدید پیشرونده سلول‌های کبد بوده و یافته‌های هیستوپاتولوژیک با مقادیر آنزیم‌های کبدی و میزان زنده‌مانی مطابقت دارد.

Terblanche و Hickman، چهار مشخصه مناسب مدل نارسایی حاد کبدی را پیشنهاد کردند که دو مورد از آنها برگشت‌پذیری و داشتن پنجره درمانی است (۱۳). برگشت‌پذیری بدین معنی است که درمان مناسب بتواند باعث جلوگیری از ادامه جراحات و زنده ماندن بیمار شود. در اکثر مطالعات قبلی صورت گرفته بر روی آسیب‌های حاد کبدی، بیشتر پارامترهای بیوشیمیایی و پاتولوژی، به‌منظور ارزیابی چگونگی

نویسندگان بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از مسئولین و همکاران این دو دانشکده ابراز می‌دارند. همچنین از همکاری آقای دکتر حسین غلامی دستیار دوره تخصص پاتولوژی و آقای رضا سامانی کارشناس بخش پاتولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران صمیمانه قدردانی می‌شود.

References:

1. Mitra V, Metcalf J. Metabolic functions of the liver. *Anaesth Intensive Care Med* 2012;13(2):54-5.
2. Chiang CH, Chang CC, Huang HC, Chen YJ, Tsai PH, Jeng SY, et al. Investigation of hepatoprotective activity of induced pluripotent stem cells in the mouse model of liver injury. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:219060.
3. Tunon MJ, Alvarez M, Culebras JM, Gonzalez-Gallego J. An overview of animal models for investigating the pathogenesis and therapeutic strategies in acute hepatic failure. *World J Gastroenterol* 2009;15(25):3086-98.
4. Kelly JH, Koussayer T, He D-E, Chong MG, Shang TA, Whisennand HH, et al. An improved model of acetaminophen-induced fulminant hepatic failure in dogs. *Hepatology* 1992;15(2):329-35.
5. Escorsell A, Mas A, de la Mata M. Acute liver failure in Spain: Analysis of 267 cases. *Liver Transpl* 2007;13(10):1389-95.
6. Shito M, Balis UJ, Tompkins RG, Yarmush ML, Toner M. A fulminant hepatic failure model in the rat. *Dig Dis Sci* 2001;46(8):1700-8.
7. Mohamadnejad M, Alimoghaddam K, Mohyeddin-Bonab M, Bagheri M, Bashtar M, Ghanaati H, et al. Phase 1 trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis. *Arch Iran Med* 2007;10(4):459-66.
8. Mohamadnejad M, Namiri M, Bagheri M, Hashemi SM, Ghanaati H, Zare Mehrjardi N, et al. Phase 1 human trial of autologous bone marrow-hematopoietic stem cell transplantation in patients with decompensated cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2007;13(24):3359-63.
9. Nikeghbalian S, Pournasr B, Aghdami N, Rasekhi A, Geramizadeh B, Hosseini Asl SM, et al. Autologous transplantation of bone marrow-derived mononuclear and CD133(+) cells in patients with decompensated cirrhosis. *Arch Iran Med* 2011;14(1):12-7.
10. Vosough M, Moslem M, Pournasr B, Baharvand H. Cell-based therapeutics for liver disorders. *Br Med Bull* 2011;100(1):157-72.
11. Manibur Rahman T, Hodgson. Animal models of acute hepatic failure. *Int J Exp Pathol* 2000;81(2):145-57.
12. Piryaee A, Valojerdi MR, Shahsavani M, Baharvand H. Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells on nanofibers and their transplantation into a carbon tetrachloride-induced liver fibrosis model. *Stem Cell Rev* 2011;7(1):103-18.
13. Terblanche J, Hickman R. Animal models of fulminant hepatic failure. *Dig Dis Sci* 1991;36(6):770-4.
14. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, et al. IFATS collection: in vivo therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury. *Stem Cells* 2008;26(10):2705-12.
15. Cho KA, Ju SY, Cho SJ, Jung YJ, Woo SY, Seoh JY, et al. Mesenchymal stem cells showed the highest potential for the regeneration of injured liver tissue compared with other subpopulations of the bone marrow. *Cell Biol Int* 2009;33(7):772-7.

16. Kim SJ, Park KC, Lee JU, Kim KJ, Kim DG. Therapeutic potential of adipose tissue-derived stem cells for liver failure according to the transplantation routes. *J Korean Surg Soc* 2011;81(3):176-86.
17. Pulavendran S, Vignesh J, Rose C. Differential anti-inflammatory and anti-fibrotic activity of transplanted mesenchymal vs. hematopoietic stem cells in carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. *Int Immunopharmacol* 2010;10(4):513-9.
18. Santucci L, Fiorucci S, Chiorean M, Brunori PM, Di Matteo FM, Sidoni A, et al. Interleukin -10 reduces lethality and hepatic injury induced by lipopolysaccharide in galactosamine-sensitized mice. *Gastroenterol* 1996;111(3):736-44.
19. Francavilla A, Makowka L, Polimeno L, Barone M, Demetris J, Prelich J, et al. A dog model for acetaminophen-induced fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 1989;96(2 Pt 1):470-8.
20. Hubner G. Ultrastructural liver damage caused by direct action of carbon tetrachloride in vivo and in vitro. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* 1965;339(3):187-97.
21. Recknagel RO. Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol Rev* 1967;19(2):145-208.
22. Johnston DE, Kroening C. Mechanism of early carbon tetrachloride toxicity in cultured rat hepatocytes. *Pharmacol Toxicol* 1998;83(6):231-9.
23. Shi J, Aisaki K, Ikawa Y, Wake K. Evidence of hepatocyte apoptosis in rat liver after the administration of carbon tetrachloride. *Am J Pathol* 1998;153(2):515-25.
24. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, et al. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24(1):70-7.
25. Belardinelli MC, Pereira F, Baldo G, Vicente Tavares AM, Kieling CO, da Silveira TR, et al. Adult derived mononuclear bone marrow cells improve survival in a model of acetaminophen-induced acute liver failure in rats. *Toxicology* 2008;247(1):1-5.
26. Panella C, Makowka L, Barone M, Polimeno L, Rizzi S, Demetris J, et al. Effect of ranitidine on acetaminophen-induced hepatotoxicity in dogs. *Dig Dis Sci* 1990;35(3):385-91.

Induction of Acute Hepatic Failure by Carbon Tetrachloride in the NMRI Mouse Model

Hossein Zare¹; Shahram Jamshidi^{2*}; Abbas Piryaei³; Mohammad Mahdi Dehghan⁴; Farhang Sasani⁵; Sedigheh Molaei⁶; Fatemeh Nasiri⁶; Nader Sadigh⁷

Abstract

¹Resident of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

²Professor of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

³Assistant Professor of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine & Department of Tissue Engineering, Faculty of Advanced Technology in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

⁴Professor of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

⁵Professor of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

⁶Master of Sciences of Medical Biotechnology, Blood Transfusion Research Center, Tehran, Iran.

⁷General Practitioner, Medical Research Center, Sharif Entrepreneur & Researcher Institute, Tehran, Iran.

***Corresponding Author:** Shahram Jamshidi, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

Email: shjamshidi@ut.ac.ir

Received: 8 Feb, 2015

Accepted: 15 Mar, 2015

Background and Objectives: Production of a model of hepatic failure is used to evaluate the effectiveness and safety of alternative methods of liver transplantation. This study aimed to determine the appropriate dosage of carbon tetrachloride (CCl₄) to induce acute hepatic failure in NMRI mice.

Methods: In this study, at first, a mixture of CCl₄ dissolved in olive oil was administered intraperitoneally to 5 groups of 6 mice. After 24 hours, serum level of liver enzymes and the status of liver tissue were evaluated. To investigate the survival of mice, CCl₄ (at doses of 0.5, 1, 1.5, 2, and 2.5ml/kg.bw) was administered to 6 new groups of mice, and these animals were monitored for 4 days. To assess the effect of the toxin in the next days, the determined dose was administered to 24 new mice, and serum and histological evaluations were repeated.

Results: The serum level of liver enzymes and the degree of hepatic lesions were significantly increased with increased dose of CCl₄. Values more than 1ml/kg of CCl₄ induced acute liver damage. Also, the value of 1ml/kg decreased mortality rate and values more than 2ml/kg increased mortality rate. Maximum increase in serum levels of liver enzymes was observed 24 hours after injection of CCl₄ (at the dose of 1.5ml/kg), which decreased gradually. The degree of liver damage in days after the injection was the same until the fourth day, but the liver regeneration phase was initiated after 72 hours.

Conclusion: According to the results of this study, a single intraperitoneal administration of CCl₄ at the dose of 1.5ml/kg CCl₄ could be an appropriate dosage for the production of a model of acute hepatic failure in NMRI mouse.

Keywords: Liver Failure, Acute; Carbon Tetrachloride; Rats.