

## اثرات مصرف جیره غذایی حاوی چربی توسط خرگوشهای باردار بر ویژگیهای فراساختاری سلولهای کبدی ذخیره کننده چربی (F.S.C)<sup>۱</sup> و میزان کاهش ویتامین (آ) در نوزادان آنها

دکتر سید محمد حسین نوری موگهی<sup>۱</sup>، دکتر باقر مینایی زنگی<sup>۲</sup>، فرشته مظفریان<sup>۳</sup>

کبد یکی از اندامهایی است که در متابولیسم چربی و ذخیره ویتامین (آ) نقش مهمی دارد. در این مطالعه اثرات مصرف جیره غذایی حاوی چربی توسط خرگوشهای باردار بر وضعیت فراساختاری سلولهای کبدی ذخیره کننده چربی در نوزادان آنها مورد بررسی قرار گرفته است. پانزده سر خرگوش (سه نر و ۱۲ ماده) بالغ سالم از نژاد آلبینو<sup>۲</sup> با وزن متوسط ۱۸۰۰-۲۰۰۰ گرم و سن متوسط ۶-۵ ماهه از انستیتو پاستور ایران تهیه و به سه گروه که هر کدام شامل ۴ ماده و ۱ نر بود تقسیم شدند. پس از جفت گیری و مشاهده پلاک واژینال. نرها از قفسها خارج و ماده های گروه ۱ با استفاده از جیره غذایی معمولی، گروه ۲ با استفاده از جیره غذایی حاوی ۱۰٪ روغن ذرت و گروه ۳ با استفاده از جیره غذایی حاوی ۱۰٪ روغن ماهی تغذیه شدند. پس از طی دوره بارداری مادران و نوزادان به روش معمولی تغذیه وزمانی که نوزادان به سن ۸ هفتهگی رسیدند از کبد مادران و نوزادان اتوپسی تهیه گردید.

برای نمونه های مادری رنگ آمیزی H&E و مطالعه با میکروسکوپ نوری انجام گرفت. از کبد نوزادان مقاطع نیمه نازکی برای رنگ آمیزیهای H&E و متیلن بلو و بررسی با میکروسکوپ نوری و همچنین تعدادی برش نازک برای بررسی با میکروسکوپ الکترونی تهیه شد. نتایج به دست آمده در مادران نشان دهنده دژنراسیون چربی همراه با فیروزیس بود. از سوی دیگر بررسی مقاطع نیمه نازک بیانگر افزایش سلولهای کبدی ذخیره کننده چربی نسبت به گروه شاهد بوده و مطالعه مقاطع نازک با میکروسکوپ الکترونی نشان دهنده تجمعات چربی درون سلولی در سلولهای ذخیره کننده چربی کبد آنها بوده است. این حقیقت اثبات شده است که همواره بین تجمع چربی در سلولهای ذخیره کننده چربی و استریفیکاسیون ویتامین (آ) و در نتیجه کمبود آن، رابطه ای مستقیم وجود دارد. لذا تصور ما این است که استفاده از چربیها در این تجربه باعث افزایش تجمع چربی های درون سلولی شده و احتمالاً کاهش ویتامین (آ) ناشی از آن منجر به ریزش مو، کم اشتها و زخمهای پوستی در مادران گردیده است.

واژه های کلیدی: کبد خرگوش، ویتامین (آ)، روغن ذرت، روغن ماهی، سلول ذخیره کننده چربی (F.S.C)

\* دانشیار گروه بافت شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

\*\* استادیار گروه بافت شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

\*\*\* مربی گروه علوم تشریحی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارتش

1- Fat Storing Cell

2- Albino

## مقدمه :

کاروتنوئید زرد و قرمز هستند که در کبد تبدیل به ویتامین (آ) می شوند (۲). لذا کاروتنوئید تغییر شکل یافته در پلاسما به واسطه گردش خون، وارد بافت چربی و پوست می شود و یکی از عوامل ایجاد رنگ پوست بوده و نیز رنگ زرد چربی را ایجاد می کند (۳). تری گلیسرید موجود در پلاسما دارای مقداری استرهای رتینل است که بوسیله کبد قابل جذب می گردند (۴) اما اسید رتینوئیک مستقیماً به سمت سیستم پورتال حرکت می کند و وارد جریان خون می گردد (۲). وجود چربی زیاد در جیره غذایی باعث تجمع چربی در سلولهای ذخیره کننده چربی و نیز تمایز فیروپلاست ها و تبدیل آنها به سلولهای فوق الذکر می شود و این پدیده خودبخود باعث کاهش میزان ویتامین (آ) بدن می شود. کاهش ویتامین (آ) می تواند تأثیرات بسیار وخیمی را نه تنها بر روی خود فرد بلکه بر روی نسل بعدی او نیز برجای گذارد که برای دستیابی به بعضی از این آثار تجربه حاضر انجام شده است. در این تحقیق مورفولوژی سلولهایی که تجمع داخل سلولی چربی همراه با استریفیکاسیون ویتامین (آ) را از دیدگاه میکروسکوپ نوری و الکترونی نشان می دهند و نیز اثرات حاصل از مصرف جیره غذایی چربی دار بر کبد نوزادان خرگوشهایی که مادران آنها در دوره بارداری تحت تاثیر این جیره قرار گرفته اند بررسی شده است.

## مواد و روش کار :

در این مطالعه مصرف چربی بصورت جیره غذایی حاوی ۱۰٪ روغن ذرت و نیز جیره غذایی حاوی ۱۰٪ روغن ماهی در دوره بارداری و تاثیرگذاری

کبد بزرگترین عضوی است که در متابولیسم موادی چون پروتئین ها، کربوهیدراتها و لیپیدها و همچنین ویتامین (آ) نقش بسیار مهمی را در بدن ایفا می کند. درک خصوصیات تشریحی کبد از نظر ماکروسکوپی و بررسی تک تک سلولهای کبدی و دیگر اجزای آن از دیدگاه میکروسکوپی، برای شناخت کبد و چگونگی عمل آن در بدن مهم است. زیرا سلولهای کبدی نقش بسیار مهمی در رویدادهای متابولیکی ایفا می کنند و این مطالعه جهت افزایش اطلاعات درخصوص عملکرد سلولهای کبدی ذخیره کننده چربی یا به اصطلاح (F.S.C) است. اعمال بیوشیمیایی کبد در بدن گوناگون بوده و در واقع این اندام در رابطه با جیره های غذایی مختلف به عنوان عضوی مسئول و حساس عمل می کند. انسان در طول زندگی، از ترکیبات غذایی گوناگونی برای ادامه حیات خود استفاده می کند که یکی از آنها چربیها هستند. این مواد می توانند بصورت همراه با ویتامین (آ) در سلولهای ذخیره کننده چربی ذخیره گردند. ترکیبات ویتامین (آ) بصورت رتینول، رتینال و اسید رتینوئیک و استررتینیل بوده، شکل رتینال آن قسمتی از پیگمان بینایی را تشکیل می دهد و لکن اسید رتینوئیک قدرت تاثیر برروی تکثیر و تمایز بافت پوششی را دارد و در بافتهای حیوانات، شکل ذخیره شده ویتامین (آ) را رتینول و یا استر رتینل می گویند (۱). ویتامین (آ) در غذاهایی که منشا گیاهی دارند یافت نمی شود اما پروویتامینهایی که منجر به تشکیل ویتامین (آ) می شوند بمقدار فراوان در بسیاری از غذاهای گیاهی وجود دارند. این پروویتامین ها بصورت

آمیزی و با میکروسکوپ نوری زایس<sup>۱</sup> مورد مطالعه قرار گرفت. لکن بافت کبدی نوزادان هم این مراحل و هم مراحل آماده سازی جهت مطالعه با میکروسکوپ الکترونی را طی نمودند. یعنی قالب گیری با رزین انجام شد و سپس با اولترامیکروتوم برشهای نیمه نازک<sup>۲</sup> تهیه و با روش تولوئیدین بلو رنگ آمیزی شدند، تساه موقیعت سلولهای ذخیره کننده چربی بمنظور مطالعه میکروسکوپ الکترونی در ساختار کبدی مشخص شود. آنگاه توسط اولترامیکروتوم مقاطع نازک (کمتر از ۰/۱ میکرون) تهیه و توسط میکروسکوپ الکترونی مورد مطالعه قرار گرفتند.

#### نتایج :

نتایج بررسی مقاطع نیمه نازک بافت کبدی مادران و نوزادان بشرح زیر است:

الف- مادران : بررسی مقاطع تهیه شده از کبد مادران توسط میکروسکوپ نسوری نشان داد که ساختمان کبدی هر دو گروه مصرف کننده چربی گیاهی و جانوری در مقایسه با گروه شاهد دچار دژنراسانس چربی همراه با آماس فیبروزی گردیده است (شکل ۱). این حیوانات در طول دوره بارداری خود ریزش موی بسیار زیاد و زخمهای پوستی داشته و از وزن آنها کاسته گشته و بسیار بیاشتها شده بودند که این امر مویید کاهش ویتامین (آ) در بدن آنها است.

ب- نوزادان : گروه شاهد: مقاطع نیمه نازک رنگ آمیزی شده با تولوئیدین بلو در محدوده بین دیواره سینوزئیدها و هیپاتوسیتها سلولهایی با اندازه بسیار کوچک و هسته های تقریباً گرد که

چربیهای مصرف شده بر سلولهای F.S.C کبدی در نوزادان متولد شده از آنها انجام گرفته است.

پانزده سر خرگوش البینو (۱۲ ماده + ۳ نر) با وزن متوسط بین ۱۸۰۰-۲۰۰۰ گرم و سن ۵ تا ۶ ماهه که از انستیتو پاستور ایران تهیه و به سه گروه ۵ تایی بدین ترتیب که هر گروه شامل ۴ حیوان ماده و یک حیوان نر بود تقسیم و هر گروه در یک قفس جداگانه نگهداری شد. پس از جفت گیری و مشاهده پلاک واژینال که علامت حاملگی موفق است نرها از آزمایش خارج شده و ماده ها به سه گروه ۴ تایی تقسیم و در طول دوره بارداری به سه روش زیر تغذیه گردیدند.

گروه اول به نام گروه شاهد نام گذاری شده و از جیره غذایی معمولی خرگوش که از انستیتو پاستور ایران تهیه شده بود تغذیه گردیدند.

گروه دوم از جیره غذایی حاوی ۱۰٪ روغن ذرت و گروه سوم از جیره غذایی حاوی ۱۰٪ روغن ماهی استفاده نمودند. پس از طی دوره بارداری که برای خرگوش بین ۲۸ الی ۳۲ روز است نوزادان در کنار مادران قرار گرفته و هر دو به روش معمولی تغذیه شدند.

پس از طی ۸ هفته مادران و نوزادان توسط کلروفرم بیهوش و سپس ذبح شده و کبد آنها از بدن خارج و بوسیله فرمالین ۱۰٪ فیکس شد. سپس بافتهای کبدی مذکور به شرح زیر برای مطالعه کبد مادران با میکروسکوپ نوری و مطالعه کبد نوزادان با میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی آماده شدند. بافت کبدی مادران پس از پاساژ و قالب گیری و تهیه برشهای ۵-۶ میکرونی به روش H&E رنگ

1- Zisse

2 - Semithin

تیره همان مقاطع، رشته‌های کلاژن نوع سه می‌باشد. نکته قابل ذکر این است که مشخصات سلولهای (PSC) و هیاتوسیتها در کبد نوزادانی که مادران آنها از روغن ماهی استفاده کرده بودند با گروه استفاده کننده از روغن ذرت مشابه بود.

#### بحث و نتیجه‌گیری :

چربی ماده‌ای است که می‌تواند در درون سلول، در فضای بین سلولی، به صورت آزاد و نیز به صورت ترکیب با مواد دیگر دیده شود. از طرفی ترکیبی است که هم قابلیت حلالیت دارد و هم می‌تواند غیرقابل حل باشد و به صورت یک ماده کلوتیدی در آب دیده شود.

هنگامی که اثرات ترکیبات غیراشباع لسیتین را در بوجود آوردن تروما بر روی خرگوش بررسی می‌کردند، متوجه شدند که به علت بالا رفتن کلسترول، حیوان دچار کبد چرب می‌گردد و در واقع بالا رفتن کلسترول خون موجب ایجاد این عارضه می‌شود (۶،۵).

در تجربه حاضر مصرف چربی بر ساختمان کبد مادر اثر نموده و ایجاد یک هیپاتیت فیبروزه کرد. که این اختلال مورفولوژی هیاتوسیتهای کبد و فیزیولوژی بدن حیوان اثر گذاشته است. به طوری که حیوان مصرف کننده چربی با دوزهای مذکور دچار ریزش مو، سخت شدن پوست، کاهش وزن و بی‌اشتهایی گردیده است. در مقاطعی که با میکروسکوپ نوری بررسی گردید هیچ نوع اختلالی در شکل هیاتوسیت‌های نوزادان متولد شده از این مادران مشاهده نگردید. از طرفی تغییرات ساختاری مقاطع نیمه نازک تهیه شده از کبد نوزادان با میکروسکوپ نوری

دو سوم حجم سیتوپلاسم را اشغال کرده اند را نشان می‌دهد. ضمناً سیتوپلاسم آنها زمینه‌ای شفاف و تقریباً توخالی داشته و کل سلول که در واقع دارای شکلی چند وجهی است در شکل میکروسکوپی نشان داده شده سه وجهی دیده می‌شود (شکل ۲).

همچنین در مقاطع فوق الذکر بین هیاتوسیتها و دیواره سینوزوئیدی، سلولی با تجمع چربی درون سیتوپلاسمی (F.S.C) قابل مشاهده است که دارای هسته‌ای کشیده، بازوفیلیک، پررنگ و چسبیده به دیواره می‌باشد. سیتوپلاسم سلول مذکور حاوی وزیکولهای شفافی با اندازه‌های بزرگ و کوچک است و سلول به شکل سه وجهی و در محدوده بین دیواره سینوزوئید و هیاتوسیتها قابل مشاهده است (شکل ۳).

شکل ۴ نشان‌دهنده الکترون میکروگرافی از کبد خرگوش نوزادی می‌باشد که مادرش در طی دوره بارداری از جیره غذایی حاوی روغن ذرت استفاده کرده است. در این میکروگراف ساختمان فراساختاری یک سلول چند وجهی ذخیره کننده چربی مشخص شده است. این سلول دارای زوائد سیتوپلاسمی مزه ماندی بوده و تمام حجم سیتوپلاسم را وزیکولهای شفاف بزرگ و کوچک چربی پر کرده و قطرات چربی جذب شده توسط آن در کنار دیواره سیتوپلاسمی دیده می‌شوند. این سلول در فضای دیس<sup>۱</sup> در مجاورت هیاتوسیت و دیواره سینوزوئیدی قرار دارد. در فضای دیس، دانه‌های تیره رنگی مشخص است که این دانه‌ها در واقع مقاطع عرضی از رشته‌های بافت همبندی می‌باشد که زمینه اطراف سلول را پر کرده و زمینه

می‌شوند(۱). گزارشات موجود دال بر این حقیقت است که این نوع سلولها، در پاسخ به آسیبهای کبدی، افزایش پیدا کرده و به واسطه جذب چربیهای که از طریق استریفیکاسیون ویتامین (آ) بوجود آورده اند بر حجمشان افزوده میشود(۶).

به دلیل اینکه استرهای رتینیل ابتدا در سلولهای ذخیره کننده چربی تجمع پیدا می کنند(۸). این سلولها در فضای دیس قرار گرفته و دارای استعداد آزاد سازی استر رتینیل، بصورت رتینول از سلول میباشند(۶).

از نتایج این تحقیق میتوان برداشت کرد که افزایش چربی خون (که حاصل از مصرف جیره غذایی حاوی چربی می باشد) باعث کاهش ویتامین (آ) در بدن می گردد. زیرا این سلولها که چربی را در خود ذخیره می کنند، سلولهایی هستند که این امر را از طریق استریفیکاسیون ویتامین (آ) انجام می دهند(۹). لذا بر اساس نتایج به دست آمده در این تجربه احتمالاً تجمع چربی در سلولهای ذخیره کننده آن همراه با کاهش میزان کلی ویتامین (آ) در بدن خواهد بود. نتایج این بررسی نشان می دهد که نه تنها جیره غذایی حاوی روغن (هم روغن ذرت و هم روغن ماهی) می تواند به طور مستقیم باعث کاهش ویتامین (آ) از طریق استریفیکاسیون آن گردد، بلکه این آزار و اختلال می تواند در تکامل کبد جنینی نیز اثر داشته باشد بدون اینکه نسل بعد تحت تاثیر مستقیم جیره غذایی حاوی روغن های مورد تجربه در این تحقیق قرار گیرد.

و تغییرات فراساختاری مقاطع نازک تهیه شده از کبد آنها با میکروسکوپ الکترونی بررسی گردید. نتایج بررسیها نشان داد که تغییرات مشاهده شده در سلولهای ذخیره کننده چربی گویای بروز اختلال در اعمال فیزیولوژیک کبد است. با توجه به گزارشات موجود در رابطه با این مطلب که اصلی متابولیسم ویتامین (آ) در کبد را چربی بعهده دارد(۷)، انتظار می رود که اختلال فوق الذکر با کمبود ویتامین (آ) نیز همراه باشد.

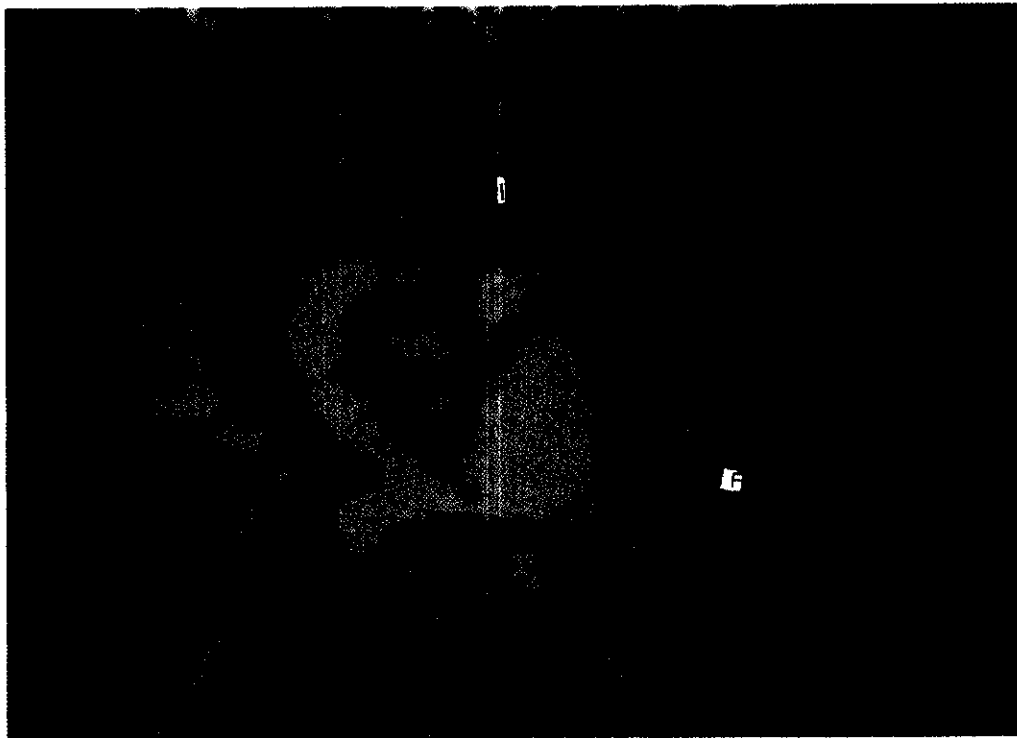
سلولهای ذخیره کننده چربی که در سال ۱۹۷۳ برای اولین بار توسط Ito مشخص شده اند (۲) سلولهایی هستند که چربی را بوسیله استریفیکاسیون ویتامین (آ) در خود ذخیره می کنند. لذا این سلولها را بنام سلولهای ذخیره کننده ویتامین<sup>۱</sup> (آ) نامگذاری کرده اند (۸، ۱۱).

قبلاً اعلام شده بود که افزایش ویتامین (آ)، باعث تجمع داخل سلولی چربی در سلولهای فوق می گردد (۱۲، ۱۳) درحالیکه تجربه حاضر نشان می دهد که افزایش چربی خون که به دلیل مصرف جیره غذایی پر چرب در گروههای مورد آزمایش، در مقایسه با گروه شاهد ایجاد می شود نیز باعث تجمع چربی در سلولهای ذخیره کننده چربی می گردد. وجود این سلولها غالباً در ناحیه سه<sup>۲</sup> لبولهای را پاپورت<sup>۳</sup> کبدی مشاهده می گردد (۸) بدین نحو که هنگامی که سلولهای هپاتوسیت تحت تاثیر عوامل آزار رسان قرار گیرند، بصورت پاراکرین بر سلولهای ذخیره کننده چربی اثر کرده و باعث افزایش سلولهای مذکور و در نتیجه افزایش ذخیره میزان اسید رتینوئیک در کبد

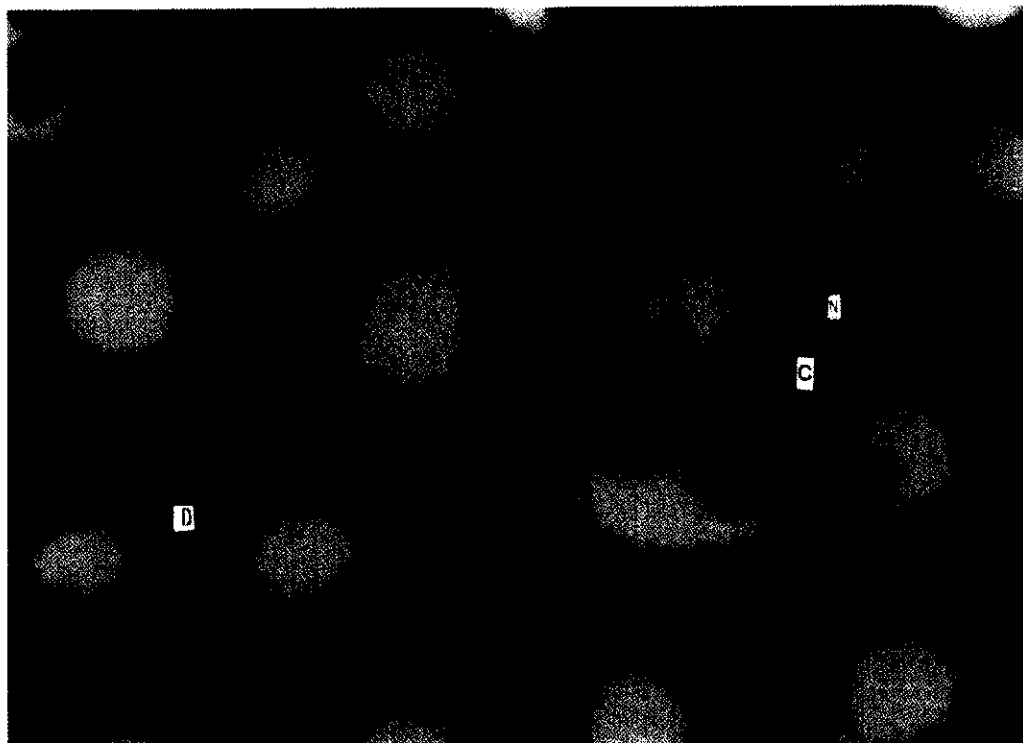
1- Vitamin- A storing Cell

2- Zone III

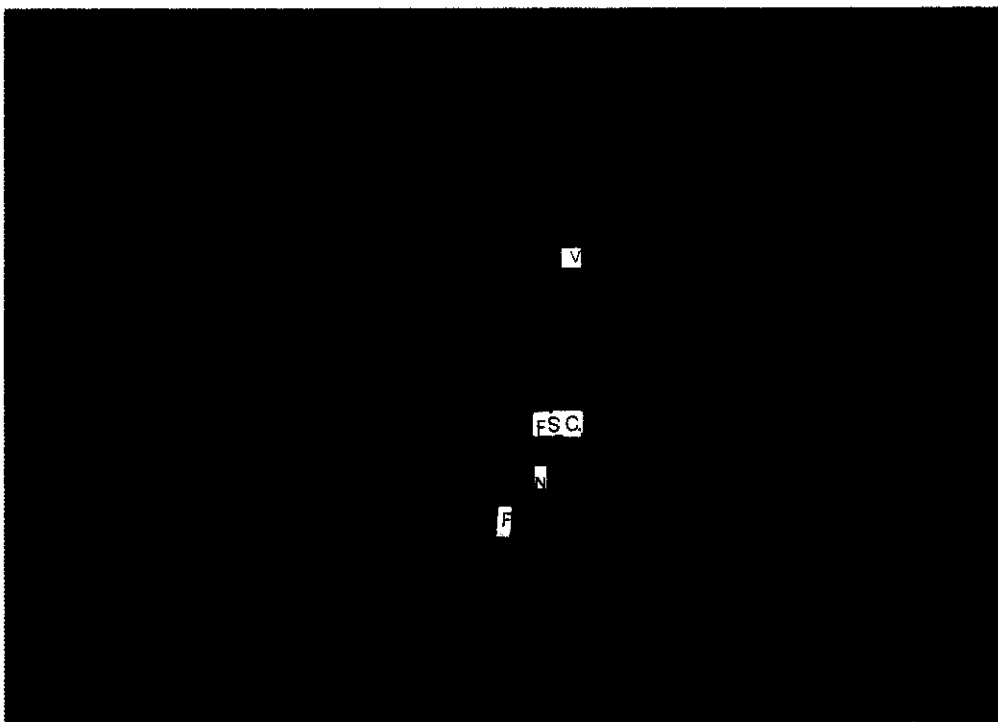
3- Rapaport



شکل ۱- مقطعی از کبد خرگوش بالغ ماده ای که در طول دوره بارداری از جیره غذایی حاوی ۱۰٪ روغن ذرت استفاده کرده است. به دژنرسانس چربی (F) همراه با آماس فیبروزی (I) در پارانشیم کبد توجه نمایید (رنگ آمیزی H & E، بزرگنمایی X 25).



شکل ۲- مقطع نیمه نازکی از بافت کبدی خرگوش نوزادی که مادرش در طول دوره بارداری از جیره غذایی معمولی استفاده کرده است. همانگونه که مشاهده می شود هپاتوسیت دارای حالتی طبیعی، هسته ای گرد (N)، سیتوپلاسمی آبی و کم رنگ (C) میباشد. ضمناً فضای دبس (D) نیز مشخص است (رنگ آمیزی تولوئیدین بلسو، با بزرگنمایی X 1000).



شکل ۳- مقطع نیمه نازکی از بافت کبد خرگوش نوزادی که مادرش از جیره غذایی حاوی ۱۰٪ روغن ذرت استفاده کرده است. هپاتوسیت‌ها دارای سیتوپلاسمی حاوی وزیکولهای شفاف (V) است (دژنراسانس). در حد بین سینوزوئیدها و هپاتوسیت‌ها و سلولهای F.S.C مشخص می‌باشند. این سلولها دارای هسته‌ای برجسته و نزدیک به دیواره سلولی (N) و سیتوپلاسمی حاوی وزیکولهای شفاف قطرات چربی (F) می‌باشند (رنگ آمیزی تولوئیدین بلو با بزرگنمایی X 1000).



شکل ۴- الکترون میکروگراف تهیه شده از کبد خرگوش نوزادی که مادرش از جیره غذایی حاوی ۱۰٪ روغن ذرت استفاده کرده است. این شکل محتویات سیتوپلاسمی یک سلول ذخیره کننده چربی و محیط پیرامونی آن را نشان میدهد. همانگونه که مشاهده می‌شود قطرات چربی ذخیره شده در سلول بصورت واکوئل‌هایی با اندازه‌های مختلف (F) و رشته‌های کلاژن (C) قابل رویت اند.  
(T.E.M ، بزرگنمایی X4000)

**References:**

- 1-Goodman Dew S, Blomstrand R, Weiner B. et al The intestinal absorption and metabolism of vitamin A and beta- Carotene in man. *J. Clin. Invest.* 1966; 45: 1915-1941.
- 2-Ito T. Recent advances in the study of the fine structure of the hepatic sinusoidal wall: A review. *Gunma. Rep. Med. Sci.* 1973; 6: 163-185.
- 3-Bannasch P. Spongiosis hepatitis: Specific changes of the perisinusoidal liver cell induced in rats by N- nitrosomorpholine. *Lab. Invest.* 1981; 44:252-264.
- 4-Borono P. Effects of alcohol on the development of biochemical and morphologic finding of liver in rabbit. *DTSCH-Z-Verdau-Stoff Wechsekelker.* 1985; 45(1): 7 -19.
- 5-Goodman D, Dew S, tluang, H, Shinatori, T. Mechanism of the biosynthesis of vitamin A and beta- carotene. *J. Biol. Chem.* 1966; 241: 1929-1940.
- 6-Gressner AM, Bachem- MG. Molecular mechanisms of liver fibrogenesis- a homage to the role of activated fat storing cells. *Digestion.* 1995; 56(5): 46-58.
- 7-Wake K. "Sternzellen" in the liver; perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. *Am. J. Anat.* 1971; 132: 429-462.
- 8-Wake K. Perisinusoidal stellated cells (Fat- storing cells, interstitial cells. Lipocyte), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A- storing cells in extrahepatic organs. *Int. Rev. Cytol.* 1980; 66: 303-353.
- 9-Akerman K. The Structure of the Liver Sinusoids and the Sinusoidal Cells in the Liver morphology, Biochemistry, Physiology. 36 ed. New York: Academic Press. 1963; 608-610.
- 10-Bartok I. Ultrastructural of the hepatic perisinusoidal cells in man and other mammalian species. *Anat. Rec.* 1979; 194: 571-586.
- 11-Lanfou J. Etude ultrastrucurale des cellules perisinusoid ales due foie dans trois cas de mucopolysaccharidoses. *Pathol. Biol.* 1972; 20:15-21.
- 12-Bronfecnmajer S. Fat storing cells (lipocytes) in human liver. *Arch. Pathol.* 1966; 82: 447-453.