

تاثیر اختلالات کبدی بر اکوآپورین ۴ در هسته‌های مجاور بطنی و فوق بصری هیپوتالاموس موش صحرائی

دلارام اسلیمی اصفهانی^۱، شهربانو عریان^۲، محمد نبیونی^۳، منیژه کریمیان پیرو^۴، فاطمه قارونی^۴

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

^۲ استاد، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

^۳ دانشیار، گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

^۴ دانشگاه خوارزمی، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: کلستاز که نوعی اختلال در عملکرد کبد است، با تغییر میزان هورمون وازوپرسین و کاهش اخذ آب همراه است. هسته‌های مجاور بطنی (PVN) و فوق بصری هیپوتالاموس (SON) دو ناحیه مهم برای کنترل هومئوستازی مایعات بدن هستند. این عمل می‌تواند با تنظیم جریان آب توسط کانال‌های آبی یا آکوآپورین‌ها صورت گیرد. آکوآپورین ۴ ایزوفورم موثر انتقال دهنده آب در مغز است. به دلیل کاهش اخذ آب در کلستاز و نقش هسته‌های SON و PVN، در این مطالعه به بررسی تغییرات میزان آکوآپورین ۴ پرداخته شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، موش‌های نر نژاد ویستار با وزن ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم به صورت تصادفی به سه گروه هفت‌تایی، شامل موش‌های گروه کنترل (بدون جراحی)، موش‌های گروه شم (جراحی کاذب) و موش‌های گروه کلستاز که مجرای صفراوی آن‌ها بسته شده بود، تقسیم شدند. سپس تراکم آکوآپورین ۴ هسته‌های مجاور بطنی و فوق بصری در تمامی گروه‌ها توسط روش ایمونوهیستوشیمی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج حاصل نشان دهنده تراکم بالای آکوآپورین-۴ در هسته‌های SON و PVN در نمونه‌های شم و کنترل بود، در صورتی که در نمونه کلستاز میزان تراکم آکوآپورین-۴ کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج این تحقیق، مقدار آکوآپورین ۴ در هسته‌های SON و PVN حساس به اسمولاریته و توکسی سیتی، کاهش یافت. احتمالاً کلستاز از طریق افزایش یا کاهش فاکتورهای مرتبط مانند اندوتوکسین‌ها، باعث کاهش تراکم آکوآپورین-۴ و میزان اخذ آب می‌شود.

واژگان کلیدی: اختلالات کبدی، آکوآپورین ۴ هسته مجاور بطنی (PVN)، هسته فوق بصری (SON).

مقدمه

بر عملکرد مغز تاثیر بگذارند و فعالیت بسیاری از سیستم‌های نوروترانسمیتر را تغییر دهند (۲،۳). از نظر فیزیولوژیک به توقف یا کاهش جریان صفرا از کانالیکول‌های صفراوی به دئودنوم روده کلستاز گفته می‌شود (۴) که می‌تواند از نقص عملکردی در تشکیل صفرا در سطح هپاتوسیت‌ها یا سلول‌های مجرای و یا از ترشح و جریان ناقص صفرا در سطح مجرای صفرا حاصل گردد (۵، ۶).

بستن مجرای صفراوی (BDL: Bile duct ligated)، یک مدل آزمایشگاهی مناسب برای القای سیروز کبدی و کلستاز است (۱). مطالعات نشان داده‌اند که سیروز کبدی و کلستاز می‌توانند

آدرس نویسنده مسئول: تهران، گروه علوم جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، دلارام

اسلیمی اصفهانی (email: eslimid@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۹۵/۸/۱۵

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۶/۱/۲۶

سلولی را به نورون های ماگنوسولار به وسیله حرکت آب بین دو سلول منتقل می کنند (۲۱).

مشخص شده که خانواده آکواپورین ها، به ویژه AQP_4 ، در عملکردهای فیزیولوژیک مغز و همچنین در هنگام بروز بیماری ها و اختلالات دارای نقش است (۲۴-۲۲). همان طور که قبلاً گفته شد، SON و PVN به دلیل داشتن سلول های نوروسکرتری ماگنوسولار و سنتز وازوپرسین، دو ناحیه مهم برای کنترل هومئوستازی مایعات بدن هستند (۱۹). علاوه بر این تراکم بالای آکواپورین ۴ بر روی غشای پلاسمایی آستروسیت ها که در مجاورت مویرگ ها و نورون های ماگنوسولار وجود دارند گزارش شده و همچنین به نقش آکواپورین ۴ در تنظیم فشار اسمزی اشاره شده است (۲۵). به دلیل کاهش اخذ آب در هنگام کلستاز و نقش هسته های SON و PVN در تنظیم اخذ آب و اسمولاریته و عملکرد آکواپورین ۴ در درک تغییرات فشار اسمزی، در این مطالعه به بررسی تغییرات سطح آکواپورین ۴ پرداخته شد.

مواد و روشها

در این مطالعه تجربی، از موش های صحرایی نر نژاد ویستار استفاده شد که وزن آن ها ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم بودند. حیوانات در دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی گراد و در دوره ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. موش ها به طور تصادفی به سه گروه کنترل (بدون جراحی)، شم (جراحی بدون انسداد مجرای صفراوی) و کلستاتیک (جراحی همراه با انسداد مجرای صفراوی) تقسیم شدند. تمام آزمایشات بر اساس موازین اخلاقی رفتار با حیوانات انجام شد، که به تایید کمیته اخلاقی دانشکده علوم زیستی دانشکده خوارزمی رسید. بستن مجرای صفراوی مدل معروفی از بیماری کبدی است (۱). به همین منظور ابتدا موش ها با استفاده از کتامین و زایلازین به نسبت های ۱۰:۵۰ mg/kg بیهوش شدند. پس از بیهوشی کامل، توسط چاقوی جراحی یک شکاف طولی به اندازه ۳ سانتی متر در خط میانی شکم ایجاد کرده و پس از یافتن مجرای صفراوی مشترک با استفاده از نخ سیلک در دو نقطه جداگانه مجرا با فاصله از هم گره زده و پس از آن مجرا بریده شد. سپس جدار شکم دوخته شد. پس از گذشت دو هفته از جراحی کلستاز از موش ها خونگیری شد و پس از آن توسط کلروفورم کشته و مغز آن ها خارج شد. جهت تایید کلستاز، مقادیر آنزیم های کبدی در خون اندازه گیری شد. مغزها در فرمالین ۱۰٪ تثبیت شدند. در مرحله بعد، نمونه ها

کلستاز باعث افزایش غلظت نمک های و رنگدانه های صفراوی، کلسترول، اسیدهای چرب، آنزیم های کبدی و پروستاگلندینها در خون می شود. علت افزایش این ترکیبات وجود آن ها در صفرا، و ورود به خون است. کلستاز می تواند آسیب هایی نظیر فیبروز کبدی، سیروز کبدی، هیپاتیک آنسفا لوپاتی و ادم مغزی را ایجاد کند (۷،۸).

در مطالعات صورت گرفته بر روی بیمارانی که دچار انسداد مجرای صفراوی شده بودند، کاهش تمایل به اخذ آب بسیار جلب توجه می کند و این مسئله می تواند اختلالات ناشی از کلستاز را تشدید کند و بهبودی این بیماران را به تاخیر اندازد (۹). محققان نشان داده اند که بستن مجرای صفراوی به طور تجربی و ایجاد کلستاز منجر به کاهش رفتار تشنگی در موش های صحرایی می شود (۱۰،۱۱).

مطالعات نشان داده اند که کلستاز با تغییر میزان هورمون وازوپرسین همراه است. وازوپرسین توسط سلول های نوروسکرتری ماگنوسولار واقع در هسته های مجاور بطنی و فوق بصری هیپوتالاموس ترشح می شود (۱۴-۱۲). هسته های مجاور بطنی و فوق بصری دو ناحیه مهم برای کنترل هومئوستازی مایعات بدن و تنظیم اسمولاریته هستند. مشخص شده که کانال های انتقال آب یا آکواپورین ها حسگر تغییرات فشار اسمزی هستند (۱۵).

آکواپورین ها، کانال های پروتئین های انتقال دهنده آب هستند. حداقل ۱۳ ایزوفرم AQP در بافت های پستانداران تشخیص داده شده اند (۱۶). فراوان ترین آکواپورین در مغز، AQP_4 است که به طور کلی در غشای قاعده ای-جانبی سلول های اپاندیمال و در غشای پلاسمایی آستروسیت ها بیان می شوند. در آستروسیت ها، AQP_4 در سه موقعیت فراوان تر هستند. در انتهای Perivascular آستروسیت، جایی که در تشکیل سد خونی - مغزی درگیر است، در فرایند پیش سیناپسی آستروسیت، جایی که در پاک سازی نوروترانسمیترها موثر است و در پروسه هایی که در ارتباط با گره رانویه و آکسون بدون میلین است (۱۷). AQP_4 در تعدادی از نواحی مغز که مرتبط با ترشح وازوپرسین، تنظیم اسمولاریته و تشنگی هستند، به فراوانی بیان می شود. این نواحی شامل Sub fornical organ (SFO) و Supraoptic nucleus (SON) و Paraventricular nucleus (PVN) است (۱۸، ۱۹). الگوی بیان AQP_4 درون این هسته ها پیشنهاد می کند که این کانال های آب تغییرات فشار اسمزی را ارسال می کنند (۲۰). بنابراین سلول های گلیال واقع در این هسته ها به عنوان اسمومتر عمل کرده و اطلاعات در مورد هومئوستاز آب موجود در خون و یا فضای خارج

نرم افزار Image J کمی شدند. تحلیل اطلاعات به وسیله شاخص‌های آمار توصیفی نظیر میانگین و انحراف معیار و آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی انجام و سطح معنی‌داری نیز ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بررسی تغییرات آنزیم‌های کبدی و بیلی روبین در گروه کلستاتیک نشان دهنده افزایش مقادیر آن‌ها نسبت به گروه‌های کنترل و شم و به عبارتی ایجاد آسیب‌های کبدی و کلستاز و ورود این ترکیبات به خون بود (جدول ۱).

نتایج حاصل از تأثیر کلستاز بر سطح آکوپورین-۴ در سلول‌های هسته مجاور بطنی طی دو هفته پس از کلستاز در شکل ۱ نشان داده شده است. شکل‌ها میزان تراکم بالای آکوپورین-۴ را در ماگنوسلولارها و آستروسیت‌های هسته PVN در نمونه‌های شم و کنترل نشان می‌دهد، در صورتی که در نمونه کلستاز، میزان تراکم آکوپورین-۴ کاهش یافت.

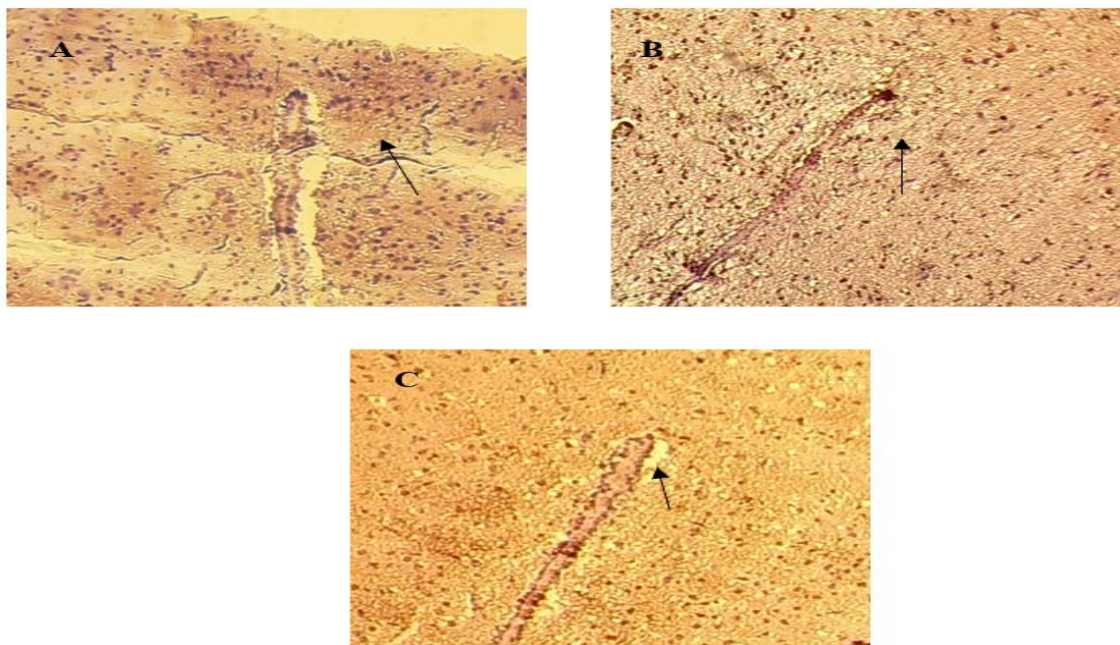
نتایج حاصل از تأثیر کلستاز بر بیان پروتئین AQP₄ در هسته فوق بصری هیپوتالاموس در شکل ۲ نشان داده شده است. این شکل‌ها، کاهش بیان پروتئین AQP₄ در نمونه‌های کلستاتیک، در مقایسه با نمونه‌های شم و کنترل، در هسته فوق بصری هیپوتالاموس را نشان می‌دهند. نتایج حاصل از تأثیر کلستاز بر بیان پروتئین AQP₄ در شبکه کورویید در نمودار ۱ نشان داده شده است. این تصاویر که با استفاده از نرم افزار Image J کمی شده، نشان دهنده کاهش میزان پروتئین AQP₄ در نمونه‌های کلستاتیک در مقایسه با نمونه‌های کنترل و شم در هسته‌های مجاور بطنی و فوق بصری است (به ترتیب $p < 0/01$ و $p < 0/001$).

وارد روند آب‌گیری، شفاف سازی، آغشتگی با پارافین و قالب‌گیری شدند. پس از تهیه مقاطع سریال ۶ میکرونی به کمک میکروتوم، رنگ آمیزی لام‌های تهیه شده به روش هماتوکسیلین-آئوزین انجام شد و بررسی‌های بافتی به وسیله میکروسکوپ، میکرومتر و گراتیگول انجام گرفت. برای شمارش سلولی از نرم افزار Image J استفاده شد. در هر مقطع بافتی ده ناحیه به صورت تصادفی مشخص و شمارش و میانگین سلول‌ها در هر میلی‌متر مربع محاسبه شد. در ضمن، اندازه‌گیری‌ها و شمارش سلولی در هر نمونه از هر گروه مورد آزمایش در ده مقطع بافتی انجام گرفت. برای آنالیز ایمونوهیستوشیمی، پس از پارافین زدایی و آب‌دهی برش‌ها، برش‌های بافتی به منظور بازیابی آنتی ژنی، در بافر سیترات ۱۰ میلی مولار با pH=۶ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. حذف مکان‌های اتصال غیراختصاصی آنتی بادی اولیه با قراردادن برش‌ها در آلبوین سرم گاوی (سیگما) ۴ درصد در PBS برای یک ساعت در دمای معمولی اتاق انجام شد. سپس برش‌ها با آنتی بادی پلی کلونال آکوپورین ۴ (Abcam) به مدت ۲۴ ساعت در چهار درجه سانتی‌گراد در اتاق مرطوب و در کنترل منفی، برش‌ها فقط با محلول ۴ درصد PBS-BSA انکوبه شدند. پس از شستشو در PBS، مهار فعالیت پراکسیداز سلولی با قراردادن لام‌ها در محلول هیدروژن پراکسیداز ۰/۳ درصد در متانول به مدت ده دقیقه انجام شد. سپس لام‌ها شسته و با آنتی‌بادی ثانویه برای آکوپورین ۴ (Abcam) به مدت یک ساعت در دمای معمولی اتاق در اتاق مرطوب انکوبه شدند. آشکار سازی با استفاده از نشانگر دی‌آمینوبنزیدين (DAB) با استفاده از کیت ضمیمه ایمونوهیستوشیمی (Laboratories, Inc., Montgomery, Tx)، با ایجاد رسوب قهوه‌ای انجام گرفت. سپس آنالیز برش‌ها با میکروسکوپ نوری (Ziess آلمان) انجام شد و اطلاعات توسط

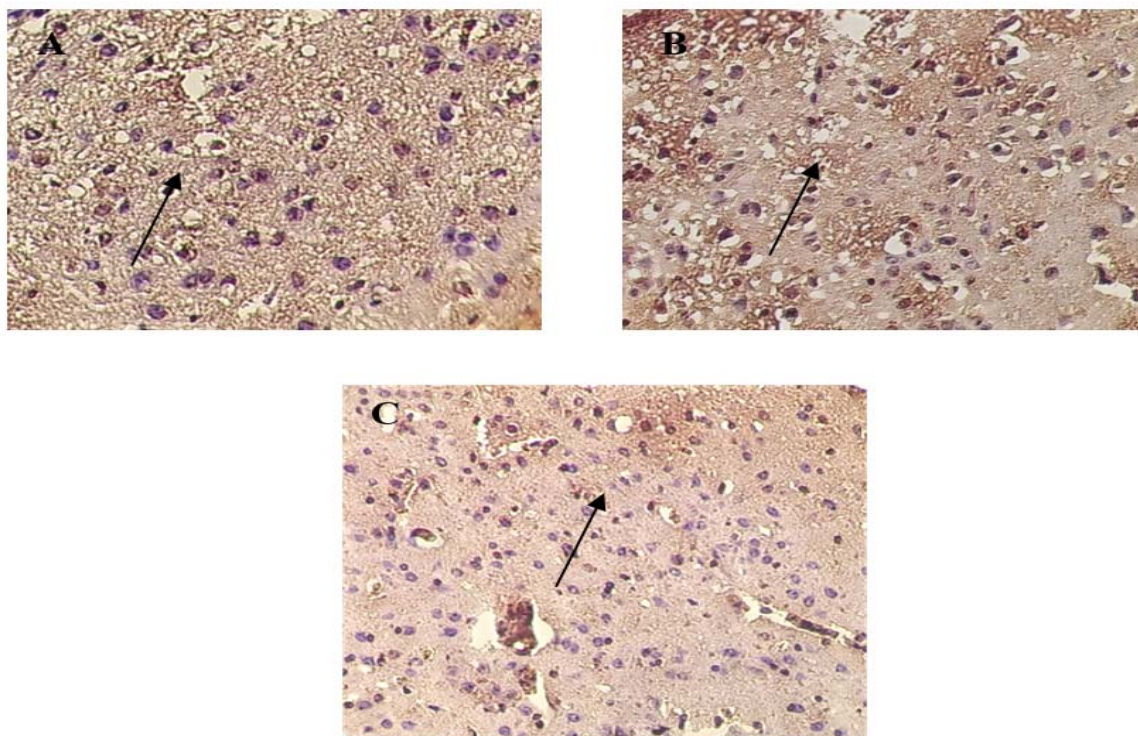
جدول ۱. میانگین (± انحراف معیار) تغییرات آنزیم‌های کبدی و بیلی‌روبین در گروه‌های شم، کنترل و کلستاز

کلستاتیک	شم	کنترل	
†*۱۳۱/۶۵±۱۰/۶	۴۱/۶±۱/۲۳	۳۳/۸۷±۳/۸۴	آل‌آنین آمینوترانسفراز (IU/L)
†*۱۱۰/۲۵±۹/۹۷	۳۱/۵۴±۴/۷۶	۳۶/۱۲±۲/۷۸	آسپارات آمینوترانسفراز (IU/L)
†*۶۵۵/۸۷±۹/۷۹	۳۱۱/۹±۷/۲۱	۳۶۳/۶۲±۸/۶۸	آل‌کالین فسفاتاز (IU/L)
†*۲۲/۹۶±۱/۶	۳/۹۶±۱/۲	۴/۴۶±۰/۱۶	گاما گلو تامیل ترانسپپتیداز (IU/L)
†*۵۸/۶۲±۷/۱۳	۶/۱۲±۳/۳۱	۵/۶±۱/۷	بیلی‌روبین کل (mg/dl)
†*۳۲/۱۱±۷/۹۸	۳/۴±۲/۸	۲/۹±۱/۱	بیلی‌روبین مستقیم (mg/dl)

* $p < 0/001$ در مقایسه با گروه کنترل؛ † $p < 0/001$ در مقایسه با گروه شم



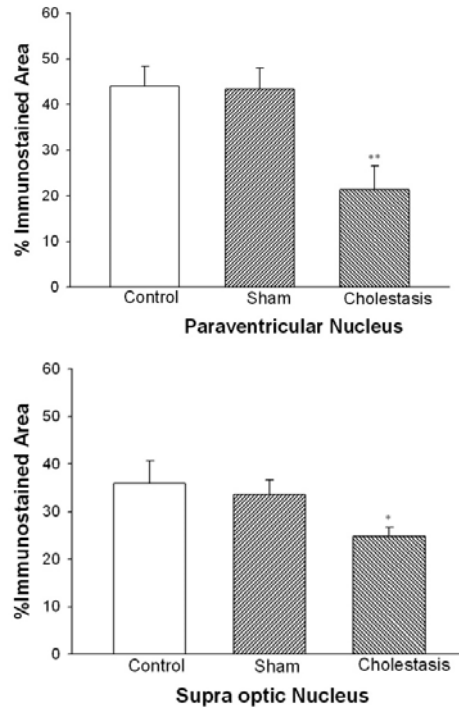
شکل ۱. برش کرونال از مغز رت بالغ نر در ناحیه هسته مجاوریتنی هیپوتالاموس با بزرگنمایی $\times 400$. اسلاید A مربوط به نمونه کنترل، اسلاید B مربوط به نمونه شم و اسلاید C مربوط به نمونه کلستاز هستند. مقایسه این اسلایدها بیانگر کاهش میزان تراکم آکواپورین-۴ در نمونه کلستاز است که با فلش نشان داده شده است.



شکل ۲. برش کرونال از مغز رت بالغ نر در ناحیه هسته فوق بصری با بزرگنمایی $\times 400$. اسلاید A مربوط به نمونه کنترل، اسلاید B مربوط به نمونه شم و اسلاید C مربوط به نمونه کلستاز است. مقایسه این اسلایدها بیانگر کاهش میزان تراکم آکواپورین-۴ در نمونه کلستاز است که با فلش نشان داده شده است.

Paraventricular nucleus (PVN) بیان می‌شود (۱۴، ۱۵). بررسی‌ها مشخص می‌کنند که AQP4 که در غشای قاعده‌ای - جانبی سلول‌های اپاندیمال و در غشای پلاسمایی آستروسیت‌ها بیان می‌شود و در هومئوستاز مغز و تنظیم اسمولاریته مرکزی دارای نقش است (۲۸، ۲۹). مطالعات نشان دادند که تغییرات اسمزی و ادم در نورون‌های شبکه‌ای باعث تغییر بیان و موقعیت آکوپورین گلیاها در موش‌های صحرایی می‌شود (۳۰). مطالعات نشان داده‌اند که بیماری‌های کبدی می‌توانند بر عملکرد مغز و متابولیسم آن تاثیر گذارند و باعث تغییرات مورفولوژیک و همچنین تورم آستروسیت‌ها و ادم مغزی شوند و مشخص شده که آکوپورین ۴ در این موارد نقش دارد (۳۱). مشاهده شده که آکوپورین ۴ نقش مهمی در هومئوستاز یونی از طریق تسهیل انتشار آب بازی می‌کند. در برخی مطالعات mRNA آکوپورین ۴ در هنگام ادم مغزی افزایش می‌یابد (۳۳، ۳۲). همچنین حذف AQP4، موجب وخیم‌تر شدن ادم مغز و ازوژنیک ناشی از نشت مایع می‌شود و در ادم سیتوتوکسیک حذف AQP4 باعث کاهش سرعت جریان خروجی آب از مغز می‌شود. همچنین بیان بیش از حد AQP4 در موش‌های تراخیخته منجر به شدت یافتن تورم سیتوتوکسیک مغز می‌شود. در موش‌های دچار ادم سیتوتوکسیک، حذف AQP4 منجر به کاهش میزان آب ورودی به مغز و در نتیجه کاهش اثرات مخرب ادم مغزی می‌شود (۳۴).

در سال ۱۹۹۳ Barry Clement و همکارانش نشان دادند، که در گروه‌های کلاستاتیک، بر اثر کلاستاز سلول‌های کوپفر کبدی توانایی پاکسازی شان کاهش یافته و میزان اندوتوکسین دو هفته پس از کلاستاز در خون افزایش می‌یابد، اندوتوکسین‌ها ترکیباتی سمی هستند که بر اثر فعالیت باکتری‌های گرم منفی در روده تولید شده 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. اندوتوکسین‌ها توانایی تخریب بافت را دارند (۳۵). مطالعات نشان داده‌اند با افزایش توکسی‌سیتی در مغز، influx و efflux آب کاهش یافته، و علت آن را به آسیب بافتی هسته‌های SON و PVN نسبت داده‌اند (۳۶). با توجه به پژوهش حاضر می‌توان این گونه بیان کرد که با توجه به نقش این هسته‌ها در تنظیم هوموستازی و میزان اخذ آب (۳۷-۳۹)، کاهش میزان اخذ آب در رت‌های کلاستاتیک به آسیب بافتی این هسته‌ها مرتبط بوده و می‌تواند دلیلی منطقی برای کاهش دریافت آب عنوان شود. طبق نتایج مطالعه حاضر، این احتمال وجود دارد که بین



نمودار ۱. اطلاعات کمی شده توسط نرم افزار Image J. نمودار A متعلق به هسته مجاور بطنی و نمودار B متعلق به هسته فوق بصری است. مقایسه این اسلایدها بیان گر کاهش میزان تراکم آکوپورین-۴ در نمونه‌های کلاستاتیک نسبت به نمونه‌های کنترل و شم است ($p < 0.01$ * و $p < 0.01$ **).

بحث

نتایج این تحقیق نشان دهنده کاهش کانال‌های آکوپورین ۴ در هسته فوق بصری و مجاور بطنی هیپوتالاموس است. مطالعات نشان می‌دهند که اخذ آب در هنگام کلاستاز کاهش یافته و هومئوستاز آب دچار تغییر می‌شود. تنظیم هومئوستاز آب ممکن است به وسیله تغییر بیان و توزیع آکوپورین ۴ صورت گیرد که باعث ساماندهی حرکت آب می‌شود. حرکت آب قلب مکانیسم تنظیم مکانیسم اسمز و ترشح اکسی‌توسین و ازوپرسیین است (۲۱).

هسته‌های SON و PVN در تنظیم اسمز و هومئوستاز آب دارای نقش هستند و در هنگام تحریکات اسمزی تحت تاثیر تقبیرات شیمیایی و ساختاری ایجاد شده قرار می‌گیرند. تحقیقات نشان داده که کانال‌های انتقال آب آکوپورین در تنظیم اختلالات اسمزی ایجاد شده نقش دارند (۲۶، ۲۷). AQP4 که فراوان ترین آکوپورین در مغز است، در تعدادی از نواحی مغز مرتبط با تنظیم اسمولاریته شامل Sub fornical organ (SFO) و Supraoptic nucleus (SON)

پلاسمایی آستروسیت ها واقع شده‌اند، صورت می‌گیرد (۱۹). Liu و همکارانش نشان داده‌اند که آنتاگونیست وازوپرسین، به طور قابل توجهی منجر به افزایش بیان آکوپورین ۴ در کورتکس مغز می‌شود (۴۸).

Zelenina و همکارانش بیان داشته‌اند که وازوپرسین از طریق گیرنده V_1 که در مغز وجود دارد، باعث کاهش نفوذ پذیری آبی آکوپورین ۴ در مغز می‌شود. همچنین محققین اعلام داشته‌اند، اثر وازوپرسین بر روی بیان پروتئین کانال آبی آکوپورین ۴ می‌تواند به صورت دوگانه عمل کند (۴۹). در واقع، گیرنده V_1 وازوپرسین با فعال کردن دو مسیر پروتئین کینازی متفاوت، که شامل پروتئین کیناز C و کیناز وابسته به کلسیم - کالمودولین II است، می‌تواند منجر به تنظیم مثبت و یا منفی بیان آکوپورین ۴ شود؛ به گونه‌ای که PKC در نهایت منجر به تنظیم منفی و CaMKII منجر به تنظیم مثبت می‌شود (۴۹). با توجه به افزایش وازوپرسین در جریان کلستاز، در مطالعه حاضر این احتمال وجود دارد که وازوپرسین از طریق مسیر PKC منجر به کاهش کانال‌های آبی آکوپورین ۴ در نمونه‌های کلستازی، در مقایسه با نمونه های شم و کنترل شده، می‌گردد.

طبق مطالعات صورت گرفته، کلستاز مرتبط با هیپوکسی و کاهش فشار است. تعدادی از فاکتورها از جمله نمک‌های صفاوی، اندوتوکسین و افزایش پروستاگلندین‌ها، می‌توانند از دلایل این اثرات باشند. تاثیر هیپوکسی در تنظیم پایین آکوپورین ۴ در کشت اولیه آستروسیت‌ها اثبات شده است (۵۲-۵۰). از طرف دیگر، Taya و همکاران در سال ۲۰۱۰ گزارش دادند که تاثیر هیپوکسی و کاهش فشار در کنار هم بر روی بیان آکوپورین ۴، بسیار بیشتر از تاثیر هر کدام به طور جداگانه است؛ به گونه‌ای که این دو عامل باعث کاهش قابل توجه در بیان آکوپورین ۴ در مغز شده‌اند (۵۳). با توجه به این شواهد، هیپوکسی و کاهش فشار که در کلستاز رخ می‌دهند، می‌توانند احتمالاً از عوامل موثر در کاهش تراکم کانال‌های آبی آکوپورین ۴ باشند که در این تحقیق بدان اشاره شده است.

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که افزایش وازوپرسین، دوپامین، اندوتوکسین، هیپوکسی و کاهش فشار که براساس مطالعات گذشته در هنگام کلستاز رخ می‌دهند، هر یک می‌توانند دلایل احتمالی برای کاهش آکوپورین ۴ در هسته‌های فوق بصری و مجاور یطنی هیپوتالاموس باشند. تحقیقات نشان داده‌اند که بیان آکوپورین-۴ در مغز تحت تأثیر عوامل زیادی قرار داشته و بسته به شرایط مختلف تغییر

کاهش دریافت آب و کاهش کانال‌های آبی آکوپورین ۴ در هسته‌های SON و PVN ارتباط نزدیکی وجود داشته باشد (۴۰).

بر اساس مطالعات گذشته، دوپامین نیز از عواملی است که باعث کاهش تنظیم بیان آکوپورین ۴ در کشت اولیه آستروسیت‌ها می‌شود (۴۱). از طرف دیگر، زرین دست و همکارانش بیان داشتند که فعالیت سیستم دوپامینرژیک در موش‌های دارای کلستازیس افزایش می‌یابد (۴۲). همچنین طی تحقیقات سایر محققین، گیرنده D_2 دوپامین پس از BDL دچار تنظیم مثبت شده است (۴۳). بنابراین دوپامین نیز می‌تواند یکی دیگر از عوامل احتمالی موثر در کاهش تراکم کانال‌های آبی آکوپورین ۴ باشد، که در این مطالعه بدان اشاره شد.

در سال ۲۰۰۸، Lichter- Konecki و همکارانش نشان دادند که افزایش طولانی مدت آمونیاک می‌تواند بیان آکوپورین-۴ در مغز را کاهش دهد (۴۴). در سال ۲۰۱۲، مطالعات Tripodi, V. و همکارانش نشان دادند که در کلستاز بر اثر بسته شدن مجرا میزان آمونیاک افزایش یافته و علاوه بر آن محصولات ناشی از تجزیه آن نیز در خون افزایش می‌یابد. در واقع آمونیاک محصول طبیعی تخریب پروتئین‌ها توسط باکتری‌های روده، هیدرولیز گلوتامین در کلیه‌ها و فرایند دامیناسیون در کبد است. آمونیاک تولید شده به این سبک توسط کبد به اوره تبدیل می‌شود، اما در اثر کلستاز و نقص در عملکرد کبد، این ماده سمی در خون تجمع یافته و از طریق گردش خون از سد خونی-مغزی نیز عبور کرده و می‌تواند در آخر منجر به انسفالوپاتی و کما شود. همچنین هیپرآمونیا سبب فعالیت میکروگلیال‌ها در برخی نواحی مغز می‌شود، که در نهایت منجر به التهاب نورونی و یا عصبی می‌شود (۴۷-۴۵). لذا این امر محتمل است که کلستاز بر اثر افزایش ترکیباتی نظیر دوپامین و آمونیاک می‌تواند منجر به کاهش بیان آکوپورین-۴ شود.

Doignon و همکارانش در سال ۲۰۱۰ اعلام داشتند که تحریک ترشح وازوپرسین در موش‌های دارای کلستازیس، احتمالاً کبد را در برابر استرس‌های تنشی و ازدیاد اسیدهای صفاوی محافظت می‌کند (۱۳). همچنین مطالعات نشان داده‌اند که وازوپرسین از جمله عواملی است که می‌تواند در تنظیم بیان آکوپورین ۴ در مغز موثر باشد. وازوپرسین از طریق گیرنده V_1 خود در مغز می‌تواند نقش مهمی در تنظیم هومئوستازی آب و یون‌های مغزی ایفا کند. این عمل به واسطه تنظیم جریان آب در آکوپورین‌ها که در غشای

اکوابورین-۴ کاهش می‌یابد. کلستاز می‌تواند بسیاری از مسیرهای سیگنالینگ نورواندوکرین را متأثر ساخته و به طرق مختلف منجر به کاهش تراکم اکوابورین و تخریب‌های بافتی شود. لذا نیاز به مطالعات بیشتر در این زمینه وجود دارد.

می‌کند. نتایج این تحقیق نشان داد که دو هفته پس از کلستاز، در بافت مغز و به ویژه در هسته‌های فوق بصری و مجاور یطنی هیپوتالاموس که از بخش‌های مؤثر در اخذ آب و حساس به اسمولاریته و توکسی‌سیتی هستند، میزان تراکم

REFERENCES

1. Sheen JM, Huang LT, Hsieh CS, Chen CC, Wang JY, Tain YL. Bile duct ligation in developing rats: temporal progression of liver, kidney, and brain damage. *J Pediatr Surg* 2010;45:1650-8.
2. Rodrigo R, Cauli O, Gomez-Pinedo U, Agusti A, Hernandez-Rabaza V, Garcia-Verdugo J, et al. Hyperammonemia Induces Neuroinflammation That Contributes to Cognitive Impairment in Rats With Hepatic Encephalopathy. *Gastroenterology* 2010;139:675-84.
3. Eslimi D, Oryan S, Nasehi M, Zarrindast MR. Effects of opioidergic systems upon anxiolytic-like behaviors induced in cholestatic rats. *Eur J Pharmacol* 2011;670:180-5.
4. Reyes H, Simon FR. Intrahepatic cholestasis of pregnancy: an estrogen-related disease. *Semin Liver Dis* 1993;13:289-301.
5. Trauner M. Molecular alteration of canalicular transport systems in experimental models of cholestasis: possible functional correlations. *Yale J Biol Med* 1997;70:365-78.
6. Trauner M, Meier PJ, Boyer JL. Molecular regulation of hepatocellular transport systems in cholestasis. *J Hepatol* 1999;31:165-78.
7. Cauli O, Rodrigo R, Liansola M, Montoliu C, Monfort P, Piedrafita B, et al. Glutamatergic and gabaergic neurotransmission and neuronal circuits in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2009;24:69-80
8. Wright G, Davies NA, Shawcross DL, Hodges SJ, Zwingmann C, Brooks HF, et al. Endotoxemia produces coma and Brain swelling in bile duct-ligated rats. *Hepatology* 2007;45:1517-26.
9. Oms L, Martinez-Rodenas F, Valverde J, Jimenez W, Sitges-Werra A. Reduced water and sodium intake associated with high levels of natriuretic factor following common bile duct ligation in the rabbit. *Br J Surg* 1990;77:752-5.
10. Mani AR, Nahavandi A, Mani AH, Dehpour AR. Role of nitric oxide in hypodipsia of rats with obstructive cholestasis. *J Pharm Pharmacol* 2001;53:277-81.
11. Martínez-Ródenas F, Oms LM, Carulla X, Segura M, Sancho JJ, Piera C, et al. Measurement of body water compartments after ligation of the common bile duct in the rabbit. *Br J Surg* 1989;76:461-4.
12. Niermann H, Amiry-Moghaddam M, Holthoff K, Witte OW, Ottersen OP. A novel role of vasopressin in the brain: modulation of activity-dependent water flux in the neocortex. *J Neurosci* 2001;21:3045-51.
13. Doignon I, Julien B, Lanneau VS, Garcin I, Alonso G, Nicou A, et al. Immediate neuroendocrine signaling after partial hepatectomy through acute portal hyperpressure and cholestasis. *J Hepatol* 2011;54:481-8.
14. Cunningham JT, Nedungadi TP, Walch JD, Nestler EJ, Gottlieb HB. FosB in the supraoptic nucleus contributes to hyponatremia in rats with cirrhosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2012;303:177-85.
15. Da silva MP, Ventura RR, Varanda WA. Hypertonicity increases no production to modulate the firing rate of magnocellular neurons of the supraoptic nucleus of rats. *Neuroscience* 2013;250:70-9.
16. Marinelli RA, Lehmann GL, Soria LR, Marchissio MJ. Hepatocyte aquaporins in bile formation and cholestasis. *Front Biosci* 2011;17:2642-52.
17. Iacovetta C, Rudloff E, Kirby R. The role of aquaporin 4 in the brain. *Vet Clin Pathol* 2013;41:32-44.
18. Badaut J, Lasbennes F, Magistretti PJ, Regli L. Aquaporins in Brain: Distribution, Physiology, and Pathophysiology. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:367-78.
19. Niermann H, Amiry-Moghaddam M, Holthoff K, Witte O, Ottersen OP. A Novel Role of Vasopressin in the Brain: Modulation of Activity-Dependent Water Flux in the Neocortex. *J Neurosci* 2001;21:3045-51.
20. Wells T. Vesicular osmometers, vasopressin secretion and aquaporin-4: a new mechanism for osmoreception? *Mol Cell Endocrinol* 1998;136:103-7.
21. Mesbah-Benmessoud O, Benabdesselam R, Hardin-Pouzet H, Dorbani-Mamine L, Grange-Messent V. Cellular and Subcellular Aquaporin-4 Distribution in the Mouse Neurohypophysis and the Effects of Osmotic Stimulation. *J Histochem Cytochem* 2011;59:88-97.

22. Amiry-Moghaddam M, Frydelund DS, Ottersen OP. Anchoring of aquaporin-4 in brain: molecular mechanisms and implications for the physiology and pathophysiology of water transport. *Neuroscience* 2004;129:997-1008.
23. Badaut J, Hirt L, Granziera C, Bogousslavsky J, Magistretti PJ, Regli L. Astrocyte-specific expression of aquaporin-9 in mouse brain is increased after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21:477-82.
24. Frigeri A, Nicchia GP, Nico B, Quondamatteo F, Herken R, Roncali L, et al. Aquaporin-4 deficiency in skeletal muscle and brain of dystrophic mdx mice. *Faseb J* 2001;15:90-8.
25. HG Zhang, YH Xiao, LF Yang, Wei-heng SU, Xin-gang GUAN, Yu WANG, et al. Altered Taurine release in hypothalamus of aquaporin-4 knockout mice. *Chem Res* 2010;26:406-8.
26. Antunes-Rodrigues J, De Castro M, Elias LL, Valenca MM, McCann SM. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev* 2004;84:169-208.
27. Nagelhus EA, Veruki ML, Haug FM, Laake JH, Nielsen S, Agre P, et al. Aquaporin-4 water channel protein in rat retina and optic nerve: polarized expression in Muller cells and fibrous astrocytes. *J Neurosci* 1998;18:2506-19.
28. Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, Bourque C, Agre P, Ottersen OP. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci* 1997;17:171-80.
29. Rash JE, Yasumura T, Hudson CD, Agre P, Nielsen S. Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:11981-6.
30. Qin Y, Fan J, Ye X, Xu G, Liu W, Da C. High salt loading alters the expression and localization of glial aquaporins in rat retina. *Exp Eye Res* 2009;89:88-94.
31. Rama Rao KV, Norenberg MD. Aquaporin-4 in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2007;22:265-75.
32. García-Moreno LM, Conejo NM, González-Pardo H, Aller MA, Nava MP, Arias J, et al. Evaluation of two experimental models of hepatic encephalopathy in rats. *Braz J Med Biol Res* 2005;38:127-32.
33. Papadopoulos MC, Verkman AS. Aquaporin-4 and brain edema. *PediatrNephrol* 2007;22:778-84.
34. Haussinger D, Kircheis G, Fischer R, Schliess F, vom Dahl S. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema? *J Hepatol* 2000;32:1035-38.
35. Clements B, Halliday I, Irwin P, McCaigue M, Rowlands, BJ. Decreased Kupffer cell Clearance capacity to endotoxemia in cholestasis. *Gut* 1992;33:S78.
36. Mbarek S, Saidi T, Chaouacha-Chekir RB. Textbook of Neuroendocrinology and Behavior, Effect of Cadmium contaminated diet in controlling water behavior by Meriones shawi, InTech: Chapter 7
37. Otsubo H, Onaka T, Suzuki H, Katoh A, Ohbuchi T, Todoroki M, et al. Centrally administered relaxin-3 induces Fos expression in the osmosensitive areas in rat brain and facilitates water intake. *Peptides* 2010;31:1124-30.
38. Takahashi A, Ishimaru H, Ikarashi Y, Kishi E, Maruyama Y. Opposite regulation of body temperature by cholinergic input to the paraventricular nucleus and supraoptic nucleus in rats. *Brain Res* 2001;909:102-11.
39. O Shea RD, Gundlach AL. Food or water deprivation modulate nitric oxide synthase(NOS) activity and gene expression in rat hypothalamic neurons: correlation with neurosecretory activity? *J Neuroendocrinol* 1996;8:417-25
40. Mani AR, Nahavandi A, Mani AH, Dehpour AR. Role of nitric oxide in hypodipsia of rats with obstructive cholestasis. *J Pharm Pharmacol* 2001;53:277-81.
41. Beaumont A, Hayasaki K, Marmarou A, Barzo P, Fatouros P, Corwin F. The effects of dopamine on edema formation in two models of traumatic brain injury. *Acta Neurochir Suppl* 2000;76:147-51.
42. Reza Zarrindast M, Eslimi Esfahani D, Oryan S, Nasehi M, Torabi Nami M. Effects of dopamine receptor agonist and antagonists on cholestasis-induced anxiolytic-like behaviors in rats. *Eur J Pharmacol* 2013;702:25-31.
43. Frampton GA, Li H, Ramirez J, Demorrow S. Biogenic amines serotonin and dopamine regulate cholangiocyte hyperplastic and neoplastic growth. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2010;15:1:63-8.
44. Lichter-Konecki U, Mangin, JM, Gordish-Dressman H, Hoffman EP, Gallo V. Gene expression profiling of astrocytes from hyperammonemic mice reveals altered pathways for water and potassium homeostasis in vivo. *Glia* 2008;56:365-77.
45. Tripodi V, Contin M., Fernandez MA, Lemberge A. Bile acids content in brain of common duct ligated rats. *Ann Hepatol* 2012;11:930-4.

46. Hawkins RA, Jessy J, Mans AM, De Joseph MR. Effect of reducing brain glutamine synthesis on metabolic symptoms of hepatic encephalopathy. *J Neurochem* 1993;60:1000-6.
47. Jones EA, Smallwood RA, Craigie A, Rosenoer VM. The enterohepatic circulation of urea nitrogen. *Clin Sci* 1969;37:825-36.
48. Liu X, Nakayama S, Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP, Bhardwaj A. Arginine-vasopressin V1 but not V2 receptor antagonism modulates infarct volume, brain water content, and aquaporin-4 expression following experimental stroke. *Neurocrit Care* 2010;12:124-31.
49. Zelenina M. Regulation of brain aquaporins. *Neurochem Int* 2010;57:468-88.
50. Namiranian K, Samini M, Mehr SE, Gaskari SA, Rastegar H, Homayoun H, et al. Mesenteric vascular bed responsiveness in bile duct-ligated rats: roles of opioid and nitric oxide systems. *Eur J Pharmacol* 2001;423:185-93.
51. Nunes H, Lebrec D, Mazmanian M, Capron F, Heller J, Tazi KA, et al. Role of Nitric Oxide in Hepatopulmonary Syndrome in Cirrhotic Rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:879-85.
52. Imamura M, Luo B, Limbird J, Vitello A, Oka M, Ivy D, et al. Hypoxic pulmonary hypertension is prevented in rats with common bile duct ligation. *J Appl Physiol* 2005;98:739-47.
53. Taya K, Marmarou CR, Okuno K, Prieto R, Marmarou A. Effect of secondary insults upon aquaporin-4 water channels following experimental cortical contusion in rats. *J Neurotrauma* 2010;27:229-39.