# بررسی اثر اسید فولیک در فیبروز کبد کلستاتیک القاء شده توسط مدل انسداد مجرای صفراوی در رت

زهرا محمدیان[۱]، اکرم عیدی[۱*]، پژمان مرتضوی[۲]، سیدمحمد توانگر[۳]، احمد اصغری[٤]


## چکیده

کولستاز بیماری کبدی است که در صورت عدم درمان و پیشگیری مناسب موجب فیبروز و سیروز کبدی و در نهایت مرگ می‌شود. به دنبال انسداد مجرای صفراوی (BDL)، اسیدهای صفراوی در کبد تجمع می یابند. تجمع این مواد سمی و رخدادهای متوالی نظیر استرس اکسیداتیو و پاسخ التهابی موجب مرگ سلولی و فیبروز می‌گردد. کبد اندام اصلی ذخیره و متابولیسم فولات است و کمبود فولات رخداد معمول در بسیاری از بیماری‌های کبدی می‌باشد. مطالعه حاضر اثر حفاظتی اسید فولیک در فیبروز کبدی تجربی را مورد بررسی قرار داده است. ۸۱ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در ۹ گروه؛ کنترل سالم، کنترل جراحی، تیمار اسید فولیک، کنترل BDL و BDL+اسید فولیک تقسیم شدند. گروه‌های تیمار، اسید فولیک خوراکی را در دوزهای۱، ۵ و۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به مدت ۲۸ روز دریافت کردند. شدت آسیب کبدی با اندازه گیری نشانگرهای بیوشیمیایی نظیر فعالیت AST، ALT، ALP، غلظت بیلی روبین و آلبومین در نمونه سرم و فعالیت آنزیم سوپراکسید دسموتاز در بافت کبد تعیین شد. برای بررسی ساختارهای هیستوپاتولوژیک کولستاز (هایپرپلازی مجاری صفراوی، فیبروز، نکروز و نفوذ سلول‌های التهابی) از رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون استفاده شد. در گروه‌های BDL تیمار شده با اسید فولیک، فیبروز کبدی به طور معنی‌داری بهبود پیدا کرد و تغییرات بیوشیمیایی ایجاد شده به دنبال BDL در نمونه‌های سرم و کبد تعدیل شد. نتایج تحقیق حاضر نشان می دهد که اسید فولیک دارای اثر حفاظت کبدی است و با کاهش استرس اکسیداتیو و واکنش التهابی از تغییرات فیبروتیک بافت کبد کولستاتیک پیشگیری می کند.


***واژگان کلیدی*** *:اسیدفولیک، انسداد مجرای صفراوی، فیبروز، موش آزمایشگاهی*

تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۲٤

## مقدمه

بیماری‌های مزمن کبدی و به دنبال آن فیبروز کبدی یکی از علل اصلی مرگ و میر جهانی می‌باشند. کلستاز بیماری کبدی است که در صورت عدم درمان و پیشگیری مناسب موجب فیبروز و سیروز کبدی می‌شود (۱۷). به دنبال انسداد مجرای صفراوی (Bile Duct Ligation, BDL)، اسیدهای صفراوی آبگریز سمی در کبد تجمع می یابد. تجمع این مواد سمی و رخدادهای متوالی نظیر استرس اکسیداتیو و پاسخ التهابی با آسیب رساندن به DNA هپاتوسیت‌ها موجب مرگ سلولی، هایپرپلازی مجاری صفراوی و فعال شدن میوفیبروبلاست‌ها می‌شوند. در نتیجه، با افزایش تجمع کلاژن در ماتریکس خارج سلولی، فیبروز کبدی ایجاد می‌گردد (۱). امروزه با توجه به پیشرفت علم پزشکی، پیشگیری از فیبروز کبدی و بهبود فیبروز به یک هدف دست یافتنی در درمان بیماری‌های مزمن کبدی تبدیل شده است (۵). اسید فولیک (ویتامین $B_9$)، شکل صناعی و اکسید شده فولات با دستیابی حیاتی (میزان قابل دسترس بودن یک ماده برای بافت هدف پس از تجویز آن) بالاست. فولات برای متابولیسم DNA، RNA و متیلاسیون پروتئین های متعدد و اجزاء ساختاری سلول لازم است (١٤). کبد اندام اصلی ذخیره و متابولیسم فولات است و جریان صفرا عامل مهمی در گردش کبدی صفراوی آن به شمار می‌رود (۹). بیماری‌های کبدی می‌توانند موجب نقص در شکل‌گیری متابولیت فعال فولات، ۵- متیل تتراهیدروفولات (5MTHF)، برای اشکال کوآنزیمی مورد نیاز بدن شوند (۱۹). کمبود فولات رخداد معمول در بسیاری از بیماری‌های کبدی است و موجب عوارض شدیدی در متابولیسم سلولی، نقص در همانندسازی و تغییرات ساختاری DNA، علائم عصبی و افزایش استرس اکسیداتیـو در بافت کبد می‌شود (١٤). از آنجاکه در مدل انسداد

* ۱- گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران eidi@srbiau.ac.ir, akram_eidi@yahoo.com
۲- گروه پاتوبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۳- گروه پاتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، بیمارستان شریعتی، تهران، ایران
٤- گروه علوم درمانگاهی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران



Archive of SID
www.SID.ir

مجرای صفراوی، جریان صفرا و در نتیجه گردش کبدی صفراوی اسیدفولیک دچار اختلال می‌شود، بررسی اثرحفاظتی مکمل اسید فولیک در فیبروز کبد کلستاتیک القاء شده توسط مدل تجربی انسداد مجرای صفراوی، هدف اصلی این پژوهش می‌باشد.

## مواد و روش کار

حیوانات مورد آزمایش در تحقیق حاضر را ۸۱ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی۳۲۰-۲۶۰ گرم با متوسط سنی ۱۲هفته تشکیل دادند. حیوانات از مرکز پرورش و تکثیر حیوانات آزمایشگاهی انیستیتو پاستور (تهران، ایران) خریداری شدند. حیوانات یک هفته قبل از شروع آزمایش به منظور پرهیز از استرس و سازگار شدن با محیط، به محیط استاندارد آزمایشگاهی دما (۲± ۲۲ درجه سانتیگراد)، رطوبت (۲±۵۶٪) و چرخه روشنایی/تاریکی۱۲ساعت منتقل شدند. حیوانات در طول دوره آزمایش به آب و غذای مخصوص حیوانات آزمایشگاهی (خوراک دام پارس، ایران) به صورت آزاد دسترسی داشتند. پروتکل این مطالعه مطابق اصول اخلاقی مورد تائید کمیته های بین المللی حمایت از حقوق حیوانات آزمایشگاهی انجام شد.

**گروه های تجربی:** حیوانات در ۹ گروه تجربی (n=9) تقسیم شدند. ۱) کنترل سالم؛ ۲) کنترل جراحی (sham- operated) که مراحل جراحی بدون ایجاد انسداد مجرای صفراوی را برای بررسی استرس احتمالی ناشی از جراحی تحمل کردند؛ ۵-۳) گروه های سالم تیمار با دوزهای ۱، ۵ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن مکمل اسید فولیک؛ ٦) کنترل BDL؛ ۹-۷) گروه های BDL تیمار شده با دوزهای ۱، ۵ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن مکمل اسید فولیک. گروه های تیمار دارویی، روزانه اسید فولیک (Sigma, Louis, MO, USA) را در ۰/۵ میلی لیتر حجم نرمال سالین به مدت ۲۸ روز به صورت گاواژ دریافت کردند. تیمار اسید فولیک در موش‌های BDL، روز بعد از جراحی آغاز شد. در انتهای دوره تیمار، حیوانات به مدت ١٤ ساعت پرهیز غذایی شدند و پس از بیهوشی با اتر، خون گیری از قلب صورت گرفت. نمونه های خونی بعد از لخته شدن در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰ دور در ثانیه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. نمونه های سرم جدا شده برای بررسی های بعدی در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید. بلافاصله بعد از خونگیری، کبد خارج شد و بعد از شست و شو با نرمال سالین، لوب چپ آن به دو تکه تقسیم و یک تکه آن برای بررسی آنزیم سوپراکسیددسموتاز (SOD) بعد از انجماد در تانک ازت در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید. تکه دوم بافت کبد در محلول فرمالین بافر۱۰٪ قرار داده شد و مراحل آماده سازی بافتی را سپری کرد.

**روش جراحی انسداد مجرای صفراوی**: هرکدام از حیوانات بعد از توزین با تزریق داخل صفاقی کتامین (۹۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) و زایلازین (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) بیهوش شدند. بعد از آماده سازی و ضدعفونی پوست، محوطه بطنی با برش خط وسط شکم باز شد. سپس مجرای صفراوی عمومی شناسایی و در دو قسمت (اولی زیر تقاطع مجرای کبدی و دومی قبل از ورودی مجرای پانکراسی) توسط نخ بخیه سیلک۰-٤ مسدود گردید و مجرای صفراوی از بین این دو ناحیه قطع شد (۱۲). ۲ میلی لیتر سالین استریل ولرم به درون محوطه بطنی برای جلوگیری از چسبندگی احشاء شکمی ریخته شد. سپس لایه های صفاق و عضلات با نخ ویکریل ۰- ٤ به صورت ممتد و پوست با نخ نایلون ۰-۳ به صورت منقطع بخیه شد. برای جلوگیری از جویده شدن بخیه توسط حیوانات، بر روی موضع از اسپری اکسی تتراسایکلین (اسپری تلخ مزه) استفاده شد. حیوانات تا زمان به هوش آمدن بر روی تشکچه گرم قرار گرفتند و ۵ ساعت بعد از جراحی به قفس منتقل شدند. تمام حیوانات در طول دوره آزمایش زنده ماندند.

**بررسی‌های بیوشیمیایی:** اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT)



www.SID.ir

و آلکالین فسفاتاز (ALP) با روش IFCC و غلظت بیلی روبین توتال (Bill T) و آلبومین (Alb) در نمونه های سرمی به وسیله دستگاه اتوآنالایزر (selectra2، هلند) و دستورالعمل کیت‌های تشخیصی (شرکت پارس آزمون، تهران، ایران) انجام شد. بافت منجمد شده کبد پس از رفع انجماد توسط دستگاه هموژنایزر (Silent Crusher M, Heidolph, Germany) در ۵۰ mM بافر EDTA (pH 7.4) و ۸۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه در ٤°c هموژناز گردید (٦). با توجه به دستورالعمل کیت تشخیصی SOD (Randox, UK) از محلول رویی برای سنجش فعالیت این آنزیم آنتی اکسیدان استفاده شد.

**بررسی هیستوپاتولوژیکی:** برای بررسی هیستوپاتولوژیکی ساختارهای کلستاز خارج کبدی از رنگ‌آمیزی تری کروم ماسون استفاده گردید. تصاویر میکروگراف به وسیله دوربین دیجیتالی متصل به میکروسکوپ نوری (Motic, Spain)گرفته شد. در هر اسلاید ۱۰ زمینه به صورت تصادفی انتخاب و با استفاده از سیستم ارزیابی METAVIR، رتبه هر نمونه تعیین گردید. مقیاس ارزیابی فیبروز: درجه ۰، کبد سالم؛ درجه ۱، نفوذ کلاژن به بعضی فضاهای پورتال، بدون گسترش به دیواره؛ درجه ۲، نفوذ کلاژن در بسیاری فضاهای پورتال با گسترش به دیواره به صورتیکه دیواره ناقصی از مجرای پورتال به سمت ورید مرکزی کشیده می‌شود؛ درجه ۳، سیروز ناقص (دیواره ها کاملا با هم ارتباط دارند و پارانشیم را به فضاهایی مجزا تقسیم می‌کند)؛ درجه ٤، سیروز کامل با دیواره کامل و ضخیم. مقیاس ارزیابی نفوذ سلول‌های االتهابی (لنفوسیت‌ها): درجه ۰، عدم وجود التهاب؛ درجه ۱، حضور کانونی سلولهای التهابی در کمتر از ۲۵٪ بافت کبد؛ درجه ۲، حضور کانونی سلول‌های التهابی در۵۰-۲۵٪ بافت کبد؛ درجه ۳، حضور کانونی ولی گسترده سلول‌های التهابی؛ درجه ٤، حضور همه‌گیر و گسترده سلول‌های التهابی. مقیاس ارزیابی هایپرپلازی مجاری صفراوی: درجه ۰، عدم هایپرپلازی مجاری؛ درجه ۱، هایپرپلازی در کمتر از ۲۵٪ هر لوبول؛ درجه ۲، هایپرپلازی در ۵۰-۲۵٪ هر لوبول؛ درجه ۳، هایپرپلازی به صورت کانونی ولی گسترده و همراه با شکل گیری ناقص ندول؛ درجه ٤، هایپرپلازی به صورت گسترده و همراه با شکل گیری کامل ندول. مقیاس ارزیابی نکروز: درجه ۰، عدم آسیب؛ درجه ۱، آسیب موضعی در کمتر از ۲۵٪ بافت کبد؛ درجه ۲، آسیب موضعی در ۵۰-۲۵٪ بافت کبد؛ درجه ۳، آسیب گسترده ولی موضعی بافت کبد؛ درجه ٤، نکروز گسترده هپاتوسیت‌ها (۲).

**تجزیه و تحلیل آماری:** برای تجزیه و تحلیل آماری داده های بیوشیمیایی و بافتی از نرم افزار SPSS ویرایش ۲۰ استفاده شد. نتایج به صورت میانگین ± انحراف از معیار مقادیر متغیر بیان شد و معنی دار بودن داده ها با استفاده از روش آماری تست Tukey و آنالیز واریانس یک طرفه تعیین گردید. $p< 0.05$ مرز معنی‌دار بودن تفاوت‌ها در نظر گرفته شد.

## نتایج

نتایج مربوط به اثرات مکمل اسیدفولیک در عملکرد کبد در جدول ۱ و ۲ نشان داده شده است. ۲۸ روز بعد از انسداد مجرای صفراوی، غلظت سرمی بیلی روبین و فعالیت آنزیم‌های AST، ALT و ALP نسبت به گروه کنترل سالم، افزایش معنی‌دار ($p<0.001$ ***) و غلظت آلبومین سرم کاهش معنی داری ($p<0.001$ ***) را نشان داد. تیمار موش‌های BDL با دوزهای ۵ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسیدفولیک، موجب کاهش معنی‌داری ($p<0.001$ +++ و$p<0.01$ ++) در فعالیت آنزیم‌های کبدی و غلظت بیلی روبین و افزایش معنی‌داری ($p<0.001$ +++ و$p<0.05$ +) در غلظت آلبومین سرم در مقایسه با گروه BDL شد و کاهش معنی دار ($p<0.001$ ***) فعالیت آنزیم SOD که به دنبال BDL ایجاد شده بود را به میزان طبیعی برگرداند.



Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱-اثر تیمار اسید فولیک بر فعالیت آنزیم های کبدی در موش‌های سالم و BDL

| گروه / شاخص | AST (IU/L) | ALT (IU/L) | ALP (IU/L) |
|---|---|---|---|
| کنترل سالم | ۳۲/۲±۱/۲۵ | ۲۷/۷±۱/٦٤ | ۲۳۸/۱±۱۰/۷۱ |
| کنترل جراحی(sham- operated) | ۳۳/۵±۱/۳۳ | ۲۸/۳±۱/۰۵ | ۲۲۵/۱±٦/۸۵ |
| اسید فولیک (mg/kg) | | | |
| ۱ | ۳۷/۵±۱/٦۵ | ۲۷/۳±۱/۵٦ | ۲۱۸/۲±۷/۰۱ |
| ۵ | ۳۲/۱±۱/۲۱ | ۲۵/۱±۱/۹٤ | ۲۳۲/۱±٦/۳۵ |
| ۱۰ | ۳٦/۲± ۰/۹۵ | ۲٦/۲±۱/۱٤ | ۲۲۵/۲±۸/٦۵ |
| کنترل BDL | ***۲۱۵/۳±۹/۷۱ | ***۱۵٤/۱±۹/۲۳ | ***۳۸۵/۳±۱٤/۵۳ |
| BDL+ اسید فولیک (mg/kg) | | | |
| ۱ | ***۱۹۹/۲±۱۰/۹٤ | ***۱٤۵/۲±٦/۷۲ | ***۳۷۲/۲±۱٦/۷۵ |
| ۵ | ***+++۱۰۳/۷±٦/۷٦ | ***+++۷۱/۵±۸/۳٦ | *++۲۷۵/۵±۱۵/۷۱ |
| ۱۰ | ***+++۱۲۲/۲±٦/۹۵ | ***+++۷٤/۷±۵/٤۵ | **++۲۹۹/۱±۱۳/٤۹ |

p<0.001 ***، p<0.01 ** و p<0.05 * اختلاف از گروه کنترل سالم و p<0.001 +++ و p<0.01 ++ اختلاف از گروه کنترل BDL را نشان می‌دهد.

جدول ۲- اثر دوزهای مختلف اسید فولیک در غلظت سرمی بیلی روبین و آلبومین و فعالیت آنزیم سوپر اکسید دسموتاز کبدی در موش‌های سالم و BDL

| گروه / شاخص | Bill (T) (mg/dl) | Alb (g/dl) | SOD (U/mg protein) |
|---|---|---|---|
| کنترل سالم | ۰/۲٤± ۰/۰۱ | ۱/۹± ۰/۱٤ | ۱۷/۵± ۰/٦۲ |
| کنترل جراحی(sham- operated) | ۰/۲۷± ۰/۰۱ | ۲/۲± ۰/۱۲ | ۱۸/۲± ۰/٦۰ |
| اسید فولیک (mg/kg) | | | |
| ۱ | ۰/۳۲± ۰/۰۲ | ۱/۸± ۰/۱٤ | ۱۹/۱±۱/٦۳ |
| ۵ | ۰/۲۸± ۰/۰۲ | ۲/۳± ۰/۰۵ | **۲۳/۷±۱/۲۳ |
| ۱۰ | ۰/۲۷± ۰/۰۲ | ۲/٤± ۰/۰٦ | ***۲۹/۱±۱/۰٦ |
| کنترل BDL | ***۸/۸۲± ۰/٤٤ | ***۰/۸± ۰/۰۷ | ***۱۰/۸± ۰/٦۵ |
| BDL+ اسید فولیک (mg/kg) | | | |
| ۱ | ***۸/٤۱± ۰/۱۷ | ***۰/۹± ۰/۰٤ | ***۹/۸±۱/٤۹ |
| ۵ | ***+++٤/۵۱± ۰/۲۳ | **+++۱/٤± ۰/۰۸ | ++۱٦/۳±۱/۰۵ |
| ۱۰ | ***+++۵/۱۳± ۰/۲۲ | ***+۱/۳± ۰/۰۹ | ++۱۷/۳±۱/۹۲ |

p<0.001 *** و p<0.01 ** اختلاف از گروه کنترل سالم و p<0.001 +++, p<0.01 ++ و p<0.05 + اختلاف از گروه کنترل BDL را نشان می دهد.

نتایج بررسی هیستوپاتولوژیکی در جدول ۳ و تصاویر بافتی کبد در نگاره ۱ نشان داده شده است. هپاتوسیت‌ها، سینوزوئیدها، ورید مرکزی و مجاری پورتال در موش‌های گروه‌های کنترل سالم و سالم تیمار دارویی دارای ساختار بافتی طبیعی بود. نفوذ کلاژن از فضای پورتال به دیواره لوبول‌ها با ایجاد دیواره فیبروزی کامل اما نازک موجب ایجاد سیروز ناقص در کبد موش‌های BDL شد.

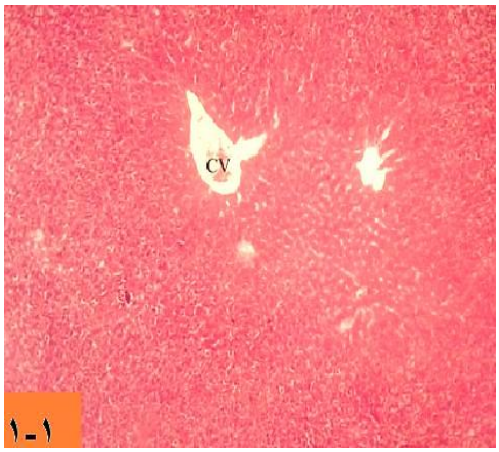

www.SID.ir
Archive of SID

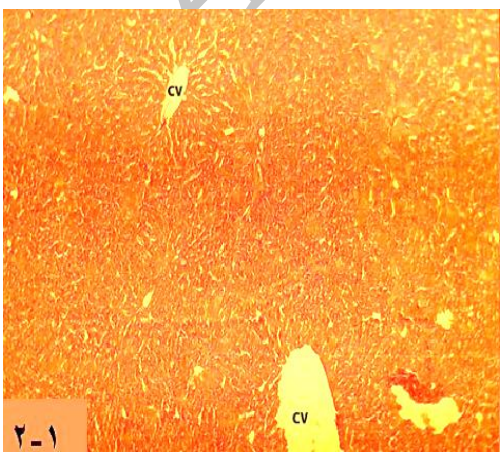
هایپر پلازی شدید مجاری صفراوی، نفوذ سلولهای التهابی (لنفوسیت ها) و نکروز بافتی (درجه ۳) در کبد حیوانات این گروه مشاهده شد. در گروه تیمار دوز ۱ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسیدفولیک، نفوذ کلاژن در بسیاری فضاهای پورتال و دیواره ها مشاهده شد به طوریکه دیواره فیبروزی ناقصی از مجرای پورتال به سمت ورید مرکزی کشیده شد. هایپرپلازی متوسط مجاری صفراوی در این گروه دیده شد. اسیدفولیک در گروه های BDL تیمار با دوزهای ۵ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن، با کاهش نفوذ کلاژن، فیبروز را محدود به فضای پورتال و تعداد معدودی از دیواره لوبولها (درجه۲-۱) کرد و موجب کاهش معنی داری در نفوذ سایر ساختارهای کلستاز خارج کبدی شد. در بین دوزهای مورد مطالعه، دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن مکمل اسید فولیک بیشترین تاثیر را در کاهش فیبروز کبدی القاء شده به دنبال انسداد مجرای صفراوی، نشان داد.

جدول ۳- میزان آسیب بافتی کبد موش‌های صحرایی نر سالم و BDL تیمار شده با دوزهای مختلف مکمل اسید فولیک بر اساس رنگ آمیزی تری کروم ماسون

| گروه / شاخص | نکروز | نفوذ سلول‌های التهابی | هایپرپلازی مجاری صفراوی | فیبروز (نفوذ کلاژن) |
|---|---|---|---|---|
| کنترل سالم | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| کنترل جراحی(sham- operated) | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| اسید فولیک (mg/kg) | | | | |
| ۱ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۵ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| ۱۰ | ۰ | ۰ | ۰ | ۰ |
| کنترل BDL | ***۳/۰ ± ۰/۲۶ | ***۳/۰ ± ۰/۰۰ | ***۳/۰ ± ۰/۰۰ | ***۳/۰ ± ۰/۲۹ |
| BDL+ اسید فولیک (mg/kg) | | | | |
| ۱ | ***۳/۰± ۰/۲۵ | ***+۲/۲± ۰/۲۱ | ***+۲/۳± ۰/۲۱ | ***+۲/۲± ۰/۱۷ |
| ۵ | ***+۲/۰± ۰/۲۵ | ***++۱/۸± ۰/۳۰ | ***+++۱/۰± ۰/۰۰ | ***++۱/۸± ۰/۳۰ |
| ۱۰ | ***+++۱/۰± ۰/۰۰ | ***++۱/۳± ۰/۲۱ | ***+++۱/۰± ۰/۰۰ | ***+++۱/۰± ۰/۰۰ |

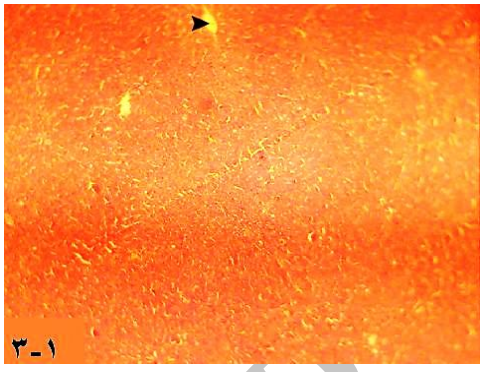
*** $p<0.001$ اختلاف از گروه کنترل سالم و +++ $p<0.001$, ++ $p<0.01$ و + $p<0.05$ اختلاف از گروه کنترل BDL را نشان می دهد.

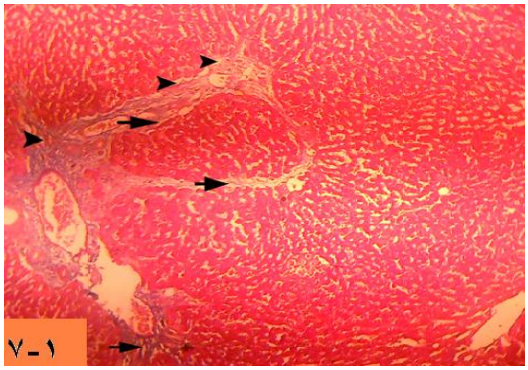


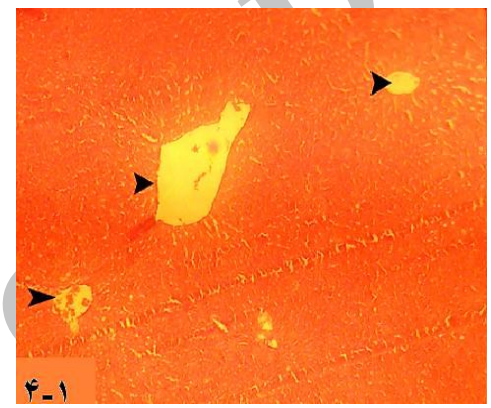



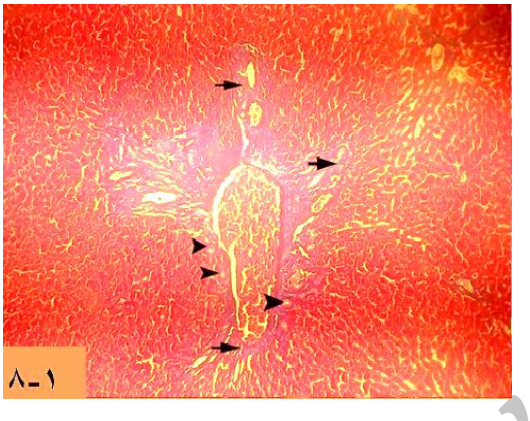


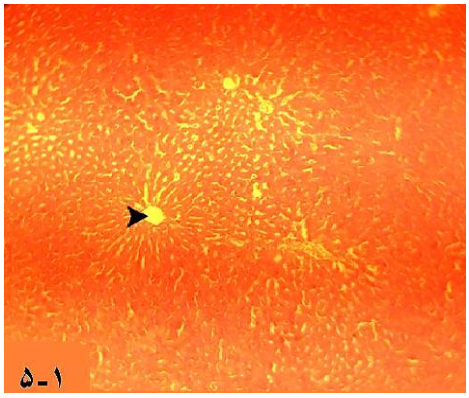

Archive of SID
www.SID.ir

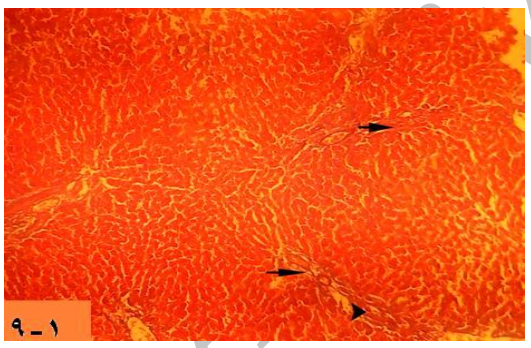


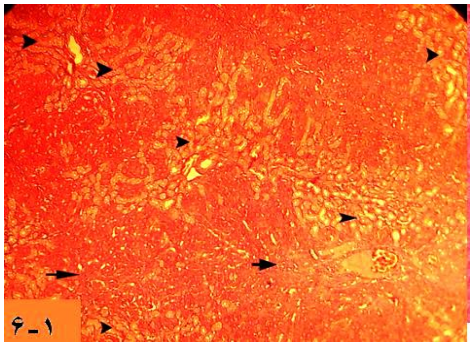




نگاره ۱: تصاویر بافت کبد موش‌های BDL و BDL تیمار دارویی در مقایسه با گروه های کنترل سالم و تیمار دارویی. در گروه کنترل سالم (۱-۱) و کنترل جراحی (۱-۲)، سیاهرگ مرکزی (CV) و هپاتوسیتهای سالم اطراف آن دیده می‌شود ( *Trichrome 160)؛ در گروه های سالم تیمار با اسید فولیک ۱ (۱-۳)، ۵ (۱-٤) و ۱۰ (۱-۵) میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن، سیاهرگ مرکزی (نوک پیکان) و هپاتوسیت‌های سالم اطراف آن دیده می‌شود (Trichrome*120)؛ در گروه کنترل BDL (۱-٦) و BDL تیمار با اسید فولیک ۱ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن (۱-۷)، هیپرپلازی شدید مجاری صفراوی (نوک پیکان) و نفوذ بافت همبندی به صورت دیواره های نازک (پیکان) دیده می‌شود (Trichrome*160)؛ در گروه های BDL تیمار با اسید فولیک ۵ (۱-۸) و (۱-۹) ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن، نفوذ بافت همبندی به صورت دیواره های نازک و ناقص (پیکان) و هیپرپلازی خفیف مجاری صفراوی (نوک پیکان) دیده می‌شود (Trichrome*160).


www.SID.ir

## بحث

در مدل تجربی انسداد مجرای صفراوی، استرس اکسیداتیو و نقص در سیستم دفاع آنتی اکسیدانی نقش کلیدی در آسیب هپاتوسیت‌ها و فرآیند فیبروز کبدی دارد (۱). مکانیسم‌های ایجاد کننده کلستاز به طور کامل شناخته نشده اند، اما بعضی فاکتورهای کلیدی که در مطالعات اخیر به آنها اشاره شده است، شامل مرگ سلولی به دنبال نکروز یا آپوپتوز، استرس اکسیداتیو، پاسخ التهابی و آزادسازی سیتوکین‌های پیش فیبروزی است که منجر به فعال شدن میوفیبروبلاست‌ها، تعدیل ماتریکس خارج سلولی، تکثیر سلول‌های اپیتلیالی مجاری صفراوی و سلول‌های کبدی و در نهایت فیبروز می‌شود(۵). فیبروز کبدی موجب اختلال در عملکردهای طبیعی کبد می‌گردد. با توجه به نتایج تحقیق حاضر، افزایش فعالیت آنزیم‌های کبدی ALT ، AST و ALP در سرم موش‌های BDL، نشان دهنده میزان و وسعت آسیب ساختاری بافت کبد در مدل های تجربی است (۱۶و ۱۳). آنزیم‌های AST و ALT به طور طبیعی در سیتوپلاسم هپاتوسیت‌ها قرار دارند؛ ولی در طول کلستاز، به دنبال استرس اکسیداتیو و آسیب به سلول‌های کبدی از منافذ غشاء هپاتوسیت‌ها خارج و وارد جریان خون می‌شوند (۱۶و ۱۳، ۱۱). آنزیم ALP از لحاظ هیستوشیمی در داخل میکروویلی مجاری صفراوی و فضای سینوزوئیدال هپاتوسیت‌ها قرار دارد و مکانیسم ورود آن به جریان خون، غیر اختصاصی و به همراه نشت صفرا از مسیر پارا سلولار اتصالات محکم کانالیکول‌ها به سینوزوئیدهای کبدی است(۱۶). مطالعات متعددی پیشنهاد می‌کنند که مکمل‌های آنتی اکسیدانی به طور معنی‌داری پراکسیداسیون لیپیدی و نکروز کبدی را مهار می‌کنند (۳). اسید فولیک با اثر حفاظت کبدی خود موجب ثبات DNA و غشاء سلولی (۲۰) می‌شود و در نتیجه از آسیب و نارسایی کبدی در شرایط کلستاز پیشگیری می‌کند. کاهش غلظت سرمی آلبومین در موش‌های BDL مورد مطالعه با نتایج سایر مطالعات مطابقت می‌کند (۱۳). آلبومین سرم با نیمه عمری در حدود ۲۰ روز، بهترین نشانگر عملکرد کبدی است و در بیماری‌های مزمن کبدی نظیر سیروز، معمولا غلظت سرمی آن به دنبال کاهش ظرفیت سنتز کبدی کاهش می‌یابد (۱۶). تیمار اسید فولیک در دوزهای ۵ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در گروه‌های BDL، افزایش معنی‌داری در غلظت آلبومین سرم در مقایسه با گروه BDL ایجاد کرد. از آنجائیکه افزایش سطح سرمی آلبومین ارتباط مستقیمی با میزان بهبودی بافت کبد دارد (۱۶)، می‌توان گفت که تیمار اسید فولیک موجب می‌شود که تعداد کمتری از هپاتوسیت‌ها در مقایسه با گروه BDL دستخوش تغییرات پاتولوژیک و مرگ سلولی شوند و در نتیجه سنتز و متابولیسم پروتئین‌ها به میزان کمتری دچار تغییر شود(۱۶). از سوی دیگر با توجه به آنکه بیشتر فولات پلاسما (۴۰-۳۰٪) با اتصال سستی به آلبومین سرم متصل است و در کلستاز کبدی میزان سنتز آلبومین کاهش می‌یابد، پس میزان دستیابی حیاتی فولات در کلستاز کم می‌شود و می‌توان به وسیله آن کمبود فولات در بیماری‌های مزمن کبدی را توجیه کرد (۱۴). از سوی دیگر، تیمار موش‌های BDL با اسید فولیک موجب افزایش دستیابی حیاتی اسید فولیک برای واکنش‌های سنتتیک و افزایش سنتز پروتئین و آلبومین می‌شود(۲۰). افزایش سرمی غلظت بیلی روبین توتال منعکس کننده تغییرات کلستاتیک حاد، مزمن و انسدادی است که منجر به کاهش مجاری صفراوی برای دفع بیلی روبین می‌شود (۱۳و۱۱). از آنجائیکه صفرا مسیر دفعی اولیه برای بیلی روبین است، در نتیجه با کاهش جریان صفرا در شرایط کلستاز، بیلی روبین به داخل روده دفع نمی‌شود. از سوی دیگر، احتباس مزمن صفرا باعث اتساع مجاری صفراوی و تکثیر آنها می‌شود؛ در نتیجه احتمالا بر اثر پاره شدن مجاری صفراوی متسع و تخلیه مستقیم صفرا به درون لنفی که کبد را ترک می‌کند، بیلی روبین به خون وارد می‌شود (٤). اسید فولیک با کاهش میزان آسیب کبدی و کاهش هایپرپلازی و آسیب مجاری صفراوی از تخلیه مستقیم صفرا به داخل لنف و خون پیشگیری می کند. با توجه به نتایج



Archive of SID

www.SID.ir

به دست آمده از این پژوهش، فعالیت آنزیم SOD کبدی در موش‌های BDL به میزان زیادی کاهش یافت. این آنزیم بلافاصله و به دنبال BDL افزایش می یابد و از این طریق موجب افزایش مکانیسم دفاعی بر ضد استرس اکسیداتیو القاء شده بر اثر BDL می‌شود (۷)؛ اما در طول کلستاز، افزایش شکل گیری رادیکال های آزاد موجب خالی شدن ذخایر آنزیم‌های آنتی اکسیدانی نظیر SOD می‌گردد (۱۱). کاهش استرس اکسیداتیو که همراه با افزایش سطوح آنزیم های آنتی اکسیدان نظیر SOD ایجاد می‌شود، می‌تواند نقش اساسی در درمان کلستاز انسدادی ایفا نماید (۷). مطالعات نشان می‌دهند که فعالیت SOD علاوه بر اثر حافظت کبدی، نقش مهمی در پیشگیری از استرس اکسیداتیو ایفا می‌کند (۱۱) و اسید فولیک موجب حفظ فعالیت آنتی اکسیدانی آنزیم SOD در موش‌های چاق دریافت کننده چربی بالا می‌گردد (۱۵). از آنجا که اسیدفولیک موجب افزایش فعالیت این آنزیم در کبد موش‌های سالم نیز شد؛ می‌توان این احتمال را مطرح کرد که اسید فولیک می‌تواند نقش تحریکی در مراحل مختلف سنتز این آنزیم داشته باشد و در انسداد مجرای صفراوی میزان سنتز آن را در حد طبیعی حفظ نماید. احتمالا اثر حفاظتی اسید فولیک در کبد کلستاتیک به وسیله اثر آنتی اکسیدانی آن میانجیگری می‌شود، اسید فولیک می تواند با افزایش فعالیت آنزیم آنتی اکسیدان SOD در موش‌های کلستاتیک و یا از طریق مشارکت در سنتز نوکلئوتیدها، آسیب اکسیداتیو ایجاد شده در DNA هپاتوسیت‌ها را ترمیم نماید. با توجه به اینکه کبد در پاسخ به آسیب، توانایی تنظیم رشد و اندازه خود را داراست (۲۰)، اسید فولیک می تواند فرآیند بازیابی و بهبود بافت کبد در کلستاز را با مشارکت در واکنش های زیستی متعدد تسریع نماید. مطالعه حاضر نشان داد که اسید فولیک، به طور معنی داری از پیشرفت فیبروز کبدی در کلستاز خارج کبدی پیشگیری می کند. انسداد مجرای صفراوی موجب هایپرپلازی مجاری صفراوی و نفوذ بافت همبند (کلاژن نوع ۱ و ٤) به مجاری پورتال و دیواره ها می‌گردد. در کلستاز، نفوذ وسیع سلول‌های التهابی به ویژه لوکوسیت ها، مونوسیت‌ها و ماکروفاژها به پارانشیم بافت کبد و مجاری پورتال، صورت می گیرد. همچنین، سلول‌های شعاعی کبد که در حالت طبیعی به صورت غیر فعال می‌باشند، به دنبال استرس اکسیداتیو فعال می‌شوند و بعد از تغییر شکل به سلول‌های ایمنی بیان کننده α-SMA ( آلفا- اکتین عضله صاف)، موجب سنتز و تجمع کلاژن در ماتریکس خارج سلولی می‌گردند (۱۸). مطالعات پیشنهاد می کنند که سلول‌های شعاعی کبد می‌توانند کموتاکسی لکوسیت‌ها و چسبندگی آنها را به وسیله تولید فاکتورهای کموتاکتیک و یا مولکول‌های چسباننده سلولی (cell adhesion molecules) نظیر MIP-2، ICAM-1 و VCAM-1 تحریک کنند. از سوی دیگر، لوکوسیت ها به طور بالقوه با تولید بعضی میانجی‌های فیبروزی نظیر ($TGF\text{-}\beta_1$) Transforming growth factor-beta 1 بر سلول‌های شعاعی کبد اثر گذاشته و موجب افزایش سنتز ماتریکس خارج سلولی در بیماری‌های مختلف کبدی می‌گردد (۱۰). اسید فولیک به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی در مطالعات متعددی موجب کاهش آسیب بافت کبدی در موش‌های تیمار شده با تتراکلریدکربن (٦)، دریافت کننده چربی بالا (۱۵) و متوتروکسات (۹) شده است. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که مکمل‌های آنتی اکسیدانی به طور معنی‌داری پراکسیداسیون لیپیدی و نکروز کبدی را مهار می‌کنند (۸). اسید فولیک می‌تواند با کاهش هایپرپلازی مجاری صفراوی، نفوذ سلول‌های التهابی، نکروز و فیبروز کبدی در انسداد مجرای صفراوی خارج کبدی، از تمامیت ساختاری بافت کبد حفاظت کند.

با توجه به نتایج این پژوهش، اسید فولیک با تخفیف میزان آسیب اکسیداتیو و کاهش نفوذ سلول‌های التهابی از شدت واکنش‌های التهابی و تغییرات فیبروتیک بافت کبد کلستاتیک می‌کاهد. همچنین با مهار سلول‌های شعاعی کبد، از تغییر شکل این سلول‌ها به میوفیبروبلاست و در نتیجه سنتز کلاژن و پیشرفت فرآیند فیبروژنز پیشگیری می‌نماید و می‌تواند به


www.SID.ir

عنوان مداخله درمانی موثر در کلستاز خارج کبدی مورد توجه قرار گیرد.

## فهرست منابع


1- Aksu, B., Umit, H., Kanter, M., Guzel, A., Aktas, C., Civelek, S., Uzun, H. (2010): Effects of methylene blue in reducing cholestatic oxidative stress and hepatic damage after bile-duct ligation in rats. J.Acta. histochemica.112:259-269.

2- Ara, C., Kirimlioglu, H., Karabulut, A.B., Coban, S., Ay, S., Harputluoglu, M., Yilmaz, S. (2005): Protective effect of resveratrol against oxidative stress in cholestasis. J. Surg Res. 127(2):112-117.

3- Bassiouny, A.R., Zaky, A., Kandeel, K.M. (2011): Alteration of AP-endonucleasel expression in curcumin-treated fibrotic rats. J. Ann. Hepatology. 10(4):516-530.

4- Copple, B.L., Jaeschke, H., Klaassen, C.D. (2010): Oxidative stress and the pathogenesis of cholestasis. Semin.Liver. Dis. 30(2):195-204.

5- Czaja, A.J. (2014): Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease.World. J.Gastroenterol. 20(10):2515-2532.

6- Ebaid, H., Bashandy, S.A., Alhazza, I.M., Rady, A., El-Shehry, S. (2013): Folic acid and melatonin ameliorate carbon tetrachloride-induced hepatic injury,oxidative stress and inflammation in rats. J.Nutr.Metab (Lond).10(1):20.

7- Kim, H.G., Han, J.M., Lee, H.W., Lee, J.S., Son, S.W., Choi, M.K., Lee, D.S., Wang, J.H., Son, C.G. (2013): CGX, a multiple herbal drug, improves cholestatic liver fibrosis in a bile duct ligation-induced rat model. J.Ethnopharmacol. 145(2):653-662.

8- Krishnamurthy, P., Wadhwani, A. (2012): Antioxidant enzymes and human health. In El-Missiry MA, ed. Antioxidant Enzyme, InTech [ISBN 978-953-51-0789-7]. Available from: www. intechopen. com / books / antioxidant-enzyme.

9- Maha, E.S. (2009): Evaluation of the possible protective role of folic acid on the liver toxicity induced experimentally by methotrexate in adult male albino rats. Egy. J.Histol. 32(1):118-128.

10- Maher, J.J. (2001): Interactions between hepatic stellate cells and the immune system. Semin.Liver. Dis. 21(3):417-426.

11- Oh, C.J., Kim, J.Y., Min, A.K., Park, K.G., Harris, R.A., Kim, H.J., Lee, I.K. (2012): Sulforaphane attenuates hepatic fibrosis via NF-E2-related factor 2-mediated inhibition of transforming growth factor-β/Smad signaling. Free.Radic.Biol. Med. 52(3):671-682.

12- Olteanu, D., Nagy, A., Dudea, M., Filip, A., Muresan, A., Catoi, C., Mircea, P.A., Clichici, S. (2012): Hepatic and systemic effects of rosuvastatin on an experimental model of bile duct ligation in rats. J. Physiol. Pharmacol. 63(5):483-496.

13- Pan, P.H., Lin, S.Y., Ou, Y.C., Chen, W.Y., Chuang, Y.H., Yen, Y.J., Liao, S.L., Raung, S.L., Chen, C.J. (2010): Stearic acid attenuates cholestasis-induced liver injury. J. Biochem. Biophys. Res. Commun. 391(3):1537-1542.

14- Ponziani, F.R., Cazzato, I.A., Danese, S., Fagiuoli, S., Gionchetti, P., Annicchiarico, B.E., D'Aversa, F., Gasbarrini, A. (2012): Folate in gastrointestinal health and diseas, review. Eur. Rev. Med.Pharmacol. Sci.16(3): 376-385.

15- Sarna, L.K., Wu, N., Wang, P., Hwang, S.Y., Siow, Y.L. (2012): Folic acid supplementation attenuates high fat diet induced hepatic oxidative stress via regulation of NADPH oxidase. Can.J. Physiol. Pharmacol. 90(2):155-165.

16- Thapa, B.R., Walia, A. (2007): Liver function tests and their interpretation. Indian. J. Pediatrics. 74.

17- Tomur, A., Kanter, M., Gurel, A., Erboga, M. (2011): The efficiency of CAPE on retardation of hepatic fibrosis in biliary obstructed rats. J.Mol.Histol. 42(5):451-458.

18- Wu, M.S, Liao, C.W., Du, W.Y., Kao, T.C., Su, K.E., Lin, Y.H., Chang, C.C., Fan, C.K. (2008): Enhanced expression of transforming growth factor-β1 in inflammatory cells, α-smooth muscle actin in stellate cells, and collagen accumulation in experimental granulomatous hepatitis caused by Toxocaracanis in mice. J. Acta. Trop. 105(3):260-268.




Archive of SID

www.SID.ir

19- Yates, J.R., Ferguson-Smith, M.A., Shenkin, A., Guzman-Rodriguez, R., White, M., Clark, B.J. (1987): Is disordered folate metabolism the basis for the genetic predisposition to neural tube defects?.Clin. Genet. 31(5):279-287.

20- Zviarynski, I.U., Zavodnik, L.B. (1999): The effect of folic acid on the drug metabolizing liver function in man with viral hepatitis. Exp.Toxicol.Pathol. 51(4-5):455-457.

Archive of SID



www.SID.ir