Archive of SID

مجلـه‌ی علمـی، پژوهشـی دانشـگاه علـوم پزشـکی زنجـان
دوره‌ی ۲۵، شمـاره‌ی ۱۱۱، مهر و آبان ۱۳۹۶، صفحات ۲۹ تا ۴۰

بررسی اثر مصرف دوزهای پایین الکل بر کبد جنین موش صحرایی- مطالعه‌ی بافت‌شناسی

مازیار بهرامی[۱]، مهرداد قربانلو[۲]، احمد فرخی[۳]، دکتر رضا نجات‌بخش[۴]

نویسنده‌ی مسئول: گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان reza_nejat@yahoo.com

دریافت: ۹۵/۸/۳ پذیرش: ۹۵/۱۰/۲۶

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

چکیده

زمینه و هدف: *الکل در بدن انسان یک عامل تراتوژن محسوب می‌شود و به راحتی می‌تواند از جفت عبور کند. دوزهای پایین الکل به‌طور رایج در نوشیدنی‌های الکلی مورد استفاده قرار می‌گیرد، بنابراین هدف از این مطالعه، بررسی تغییرات بافتی کبد جنین موش صحرایی نژاد ویستار در اثر مصرف الکل با دوزهای پایین بود.*

روش بررسی: *در این مطالعه‌ی تجربی، موش‌های صحرایی ماده پس از بارداری به یک گروه کنترل و سه گروه تحت آزمایش که در آب آشامیدنی آن‌ها اتانول ۵ درصد، ۱۰ درصد و ۲۰ درصد گنجانده شد بود، تقسیم شدند. دوزهای معین الکل از روز ۸ تا ۲۱ بارداری مورد استفاده قرار گرفت. در روز ۲۱ بارداری جنین‌ها توسط جراحی از رحم مادر خارج و با استفاده از استریومیکروسکوپ، کبدهای آن‌ها نیز خارج شدند. کبدهای جنینی پس از فیکس شدن، پردازش بافتی و برش‌گیری با روش هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی شدند و زیر میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند. داده‌ها توسط نرم‌افزار SPSS و تست ANOVA ارزیابی شدند.*

یافته‌ها: *دوزهای الکل ۱۰ درصد و ۲۰ درصد به میزان قابل توجهی فاکتورهای آسیب بافتی کبد را افزایش دادند ($P<۰/۰۰۱$). این در حالی است که دوز ۵ درصد الکل افزایش معنی‌داری در این فاکتورها ایجاد نکرد.*

نتیجه‌گیری: *مصرف الکل در دوران بارداری حتی در دوزهای پایین می‌تواند باعث تغییرات پاتولوژیک در کبد جنین موش صحرایی در حال تکامل شود. دوز ۵ درصد الکل تغییرات پاتولوژیک واضحی را از نظر بافتی در کبد جنین موش صحرایی ایجاد نمی‌کند. در صورتی که دوزهای ۱۰ درصد و ۲۰ درصد الکل، فاکتورهای التهابی را به طور قابل توجهی در مطالعه‌ی بافت‌شناسی افزایش می‌دهد.*

واژگان کلیدی: الکل، بارداری، کبد، جنین، بافت‌شناسی

مقدمه

استفاده‌ی روز افزون از الکل به‌عنوان یک نوشیدنی در جوامع مختلف به تدریج آثار زیان‌آور آن را آشکار نمود تا جایی که امروزه تحقیقات گسترده‌ای پیرامون اثرات منفی الکل صورت می‌گیرد. سندرم الکلی جنینی (Fetal Alcohol Syndrome) اولین بار در اوایل دهه هفتاد میلادی با علائم تاخیر در رشد، بد شکلی در صورت و عقب‌ماندگی ذهنی در کودکانی که مادران آن‌ها در دوران حاملگی الکل مصرف کرده بودند، شناسایی شد. عقب‌ماندگی

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد زیست‌شناسی جانوری، دانشکده‌ی علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی زنجان، زنجان
۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی زنجان، زنجان
۴- دکترای تخصصی علوم تشریحی، دانشیار گروه علوم تشریحی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

در رشد قبل و پس از تولد، تغییر در مورفولوژی صورت موش صحرایی و اختلال در عملکرد سیستم عصبی مرکزی از عوارض شناخته شده الکل است (۱). مصرف بیش از حد الکل یکی از دلایل شایع در ابتلا به سیروز کبدی است (۲). بررسی آثار الکل بر روی اندام های مختلف بدن ضروری به نظر می‌رسد، به‌طوری که الکل بر ترشح هورمون‌ها اثر منفی می‌گذارد (۳) و باعث صدمه به قلب و ایجاد کاردیومیوپاتی و هایپرتروفی قلب می‌شود (۵و ۴). مصرف بی‌رویه‌ی الکل بر اعضای بدن مادر و جنین اثرات منفی بر جای می‌گذارد (۷و ۶)، همچنین الکل باعث اختلال عملکرد مری، گاستریت حاد و مزمن، تغییر در میزان چربی کبد و هپاتیت، پانکراتیت، سرکوب سیستم ایمنی و اختلالات عملکردی دستگاه تناسلی می‌شود (۸).

مصرف الکل می‌تواند منجر به بسیاری از تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی بر جنین در حال رشد درون رحم شود. الکل می‌تواند از راه‌های غیرمستقیم بسیاری از جمله ایجاد سوء تغذیه وابسته به مادر و تاثیر نامطلوب بر عملکرد جفت منجر به آسیب شود. در جوندگان و پریمات‌ها کاملا اثبات شده است که الکل می‌تواند از طریق جفت از مادر به جنین منتقل شود (۹).

الکل پس از مصرف به سرعت از معده و روده‌ی کوچک به داخل جریان خون جذب و در کل مایعات بدن منتشر می‌شود. متابولیسم آن در گذر اول توسط آنزیم‌های الکل دهیدروژناز معدی و سپس در کبد متابولیسم اصلی آن انجام می‌شود و پس از تبدیل به استالدئید و استات آثار مخرب خود را بر بافت‌های بدن برجای می‌گذارد (۱۱و ۱۰).

کبد جنین یک اندام خون ساز مهم است که در هنگام تولد دچار تغییرات متعدد ریخت‌شناسی و کارکردی می‌شود. به‌عنوان مثال تعداد و حجم هپاتوسیت‌ها افزایش می‌یابد، در حالی که تعداد سلول‌های خون ساز کم می‌شود (۱۲). سینوزوئیدهای کبد جنین متسع هستند و امکان وجود سلول‌های کاپفر در کبد جنین وجود دارد (۱۳).

کبد جایگاه مهمی در زدودن سموم طبیعی و مصنوعی از خون دارد و انواعی از پروتئین‌های ناقل همچون لیپوپروتئین، آلبومین و ترانسفرین را می‌سازد. سلول‌های کبدی با استفاده از آنزیم‌های شبکه آندوپلاسمی صاف و اکسیداسیون و متیلاسیون، مواد متعددی نظیر الکل، استروئیدها، باربیتورات‌ها را غیر فعال می‌سازند. بخش‌های مختلف کبد توسط سمیت الکل تحت تاثیر قرار می‌گیرد، به‌طور مشخص نشان داده شده است که با مصرف الکل تغییرات مهمی در بافت شناسی کبد و ECM (extra cellular matrix) آن رخ می‌دهد (۱۶-۱۴).

درجه‌بندی آسیب کبدی بر اساس چند فاکتور پاتولوژی تعریف می‌شود که عبارتند از: استئاتوز (steatosis) (تجمع قطره‌های چربی در سیتوپلاسم سلول‌های کبد)، التهاب لوبولی (بررسی تمامی فاکتورهای التهابی از جمله تجمع لنفوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها)، متورم شدن هپاتوسیت‌ها (ballooning) (شکل غالب آسیب سلولی در التهاب الکلی کبد است) و فیبروز (۱۷).

گزارش‌های بسیاری از مطالعات در مورد اثرات الکل بر روی رشد و تکامل جنین وجود دارد که نشان می‌دهد مصرف الکل منجر به آسیب کبد می‌شود (۲۲-۱۸)، اما بررسی این مطلب که اثرات منفی مصرف الکل توسط مادر و اثر آن بر روی کبد جنین از چه دوز حداقلی شروع می‌شود، مورد بررسی قرار نگرفته بود که در این مطالعه بررسی فاکتورهای پاتولوژیک طی مطالعه بافت شناسی انجام شد.

روش بررسی

حیوانات: در این مطالعه از ۳۵ سر موش صحرایی نژاد ویستار (۱۰ موش نر با وزن تقریبی ۳۰۰ گرم و ۲۵ موش ماده با وزن تقریبی ۲۵۰ گرم) که از انستیتو پاستور تهران خریداری و به حیوان خانه منتقل شدند، استفاده شد. مراقبت و نگهداری از موش‌ها مطابق با آیین نامه مصوب کار با حیوانات آزمایشگاهی تصویب شده در دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام گردید. موش‌ها ابتدا به مدت یک هفته در شرایط

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

آزمایشگاه یعنی دمای ۲±۲۳ درجه‌ی سانتی‌گراد و سیکل ۱۲ ساعت خاموشی و ۱۲ ساعت روشنایی جهت تطابق با محیط جدید قرار گرفتند. موش‌های نر به‌طور مجزا هرکدام در یک قفس کوچک نگهداری شدند و پس از تطابق با محیط به منظور جفت‌گیری، همراه با موش‌های ماده یک به یک (یک ماده و یک نر در یک قفس) کنار هم قرار داده شدند. صبح روز بعد با مشاهده پلاک واژینال روز صفر حاملگی مشخص شد. سپس موش‌های ماده به قفس‌های دیگری منتقل شدند و موش‌های فاقد پلاک مجددا پس از چند روز استراحت در قفس مجزا در کنار موش نر برای جفت‌گیری قرار داده شدند.

گروه‌های مورد آزمایش: به منظور بررسی اثر الکل بر کبد جنین، در رژیم غذایی موش‌های باردار، الکل با درصدهای مختلف در نظر گرفته شد. دلیل عدم استفاده از روش گاواژ، باردار بودن حیوانات و عدم ایجاد استرس به هنگام گاواژ کردن الکل بود. از روز ۸ تا ۲۱ بارداری، الکل (اتانول مورد استفاده در این پژوهش ساخت شرکت نصر خرم آباد و پروانه ساخت ۵/۸/۷۹/۲۱۶/ک از وزارت بهداشت بود) با درصدهای مختلف در آب نوشیدنی حیوانات ترکیب شد و در دسترس آزاد آن‌ها قرار گرفت. موش‌های باردار به ۴ گروه تقسیم شدند و در هر گروه ۶ سر موش قرار داده شد.

گروه‌ها شامل: گروه کنترل (آب نوشیدنی شهری)، گروه تجربی اول (الکل ۵ درصد)، گروه تجربی دوم (الکل ۱۰ درصد) و گروه تجربی سوم (الکل ۲۰ درصد) بودند و در هر ۴ گروه غذای فشرده مخصوص (پِلت) با دسترسی آزاد قرار داده شد.

آماده سازی کبد جنین‌ها به منظور مطالعه‌ی بافت‌شناسی: موش‌ها در روز ۲۱ بارداری با کلروفرم بیهوش شدند و رحم آنها خارج و پس از آن جنین‌ها بیرون آورده شدند. سپس کبد جنین‌ها با استفاده از استریومیکروسکوپ خارج شد. کبدهای خارج شده به‌وسیله فرمالین ۱۰ درصد بافر شده به مدت ۴۸ ساعت ثابت شدند. مراحل پردازش بافت به این ترتیب انجام شد: برای آبگیری، از الکل با درجات صعودی ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ استفاده گردید و نمونه‌ها پس از شفاف سازی با زایلن به منظور آغشته سازی در پارافین قرار گرفته و قالب‌گیری شدند، سپس توسط میکروتوم، برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرون تهیه شد و روی لام قرار داده شد، لام‌ها در اجاق با دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، به مدت یک ساعت قرار گرفتند تا بافت‌ها ثابت شوند و پارافین از روی لام‌ها حذف شود. سپس رنگ‌آمیزی با روش هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) انجام شد و لام‌ها توسط میکروسکوپ نوری (با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ و ۱۰۰۰) مورد مطالعه قرار گرفتند. با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ و ۱۰ میدان میکروسکوپی از نظر پارامتر های زیر: اتساع سینوزوئیدی (فضاهای خالی بین هپاتوسیت‌ها)، تعداد هپاتوسیت‌ها (بیش‌ترین نوع سلول‌های مزانشیم کبد که هسته‌های آن‌ها رنگ بنفش کم‌رنگ به خود می‌گیرند)، هپاتوسیت های واکوئل‌دار (سلول‌های هپاتوسیتی که هسته‌ای بسیار کم‌رنگ دارند و سیتوپلاسم آن‌ها اتساع یافته است)، سلول‌های کوپفر (سلول‌های بازوفیلیک با هسته‌ای کشیده که رنگ بنفش تیره به خود گرفته‌اند)، نوتروفیل‌ها (سلول‌های بازوفیلیک با هسته‌ی گرد و درشت) و لنفوسیت‌ها (سلول‌های بازوفیلیک با هسته‌ای گرد و کوچکتر از نوتروفیل‌ها) بررسی و ثبت گردید؛ لازم به ذکر است که آزمایشگر (ارزیابی کننده)، نسبت به تجربی یا شاهد بودن نمونه‌ها بی‌اطلاع بود و عمل ارزیابی توسط همکاری دیگر تکرار شده و میانگین اعداد مد نظر قرار گرفته است.

آنالیز آماری: داده‌های مربوط به تعداد هپاتوسیت‌ها، هپاتوسیت‌های واکوئله، سلول‌های کوپفر، نوتروفیل‌ها و لنفوسیت‌ها توسط نرم‌افزار SPSS و آزمون ANOVA (post hoc Tukey) ارزیابی شدند. نتایج به صورت انحراف معیار ± میانگین ارائه گردید و شرط معنی‌داری داده‌ها $P<0/05$ در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است که اتساع سینوزوئیدها به‌طور کیفی گزارش شده است.

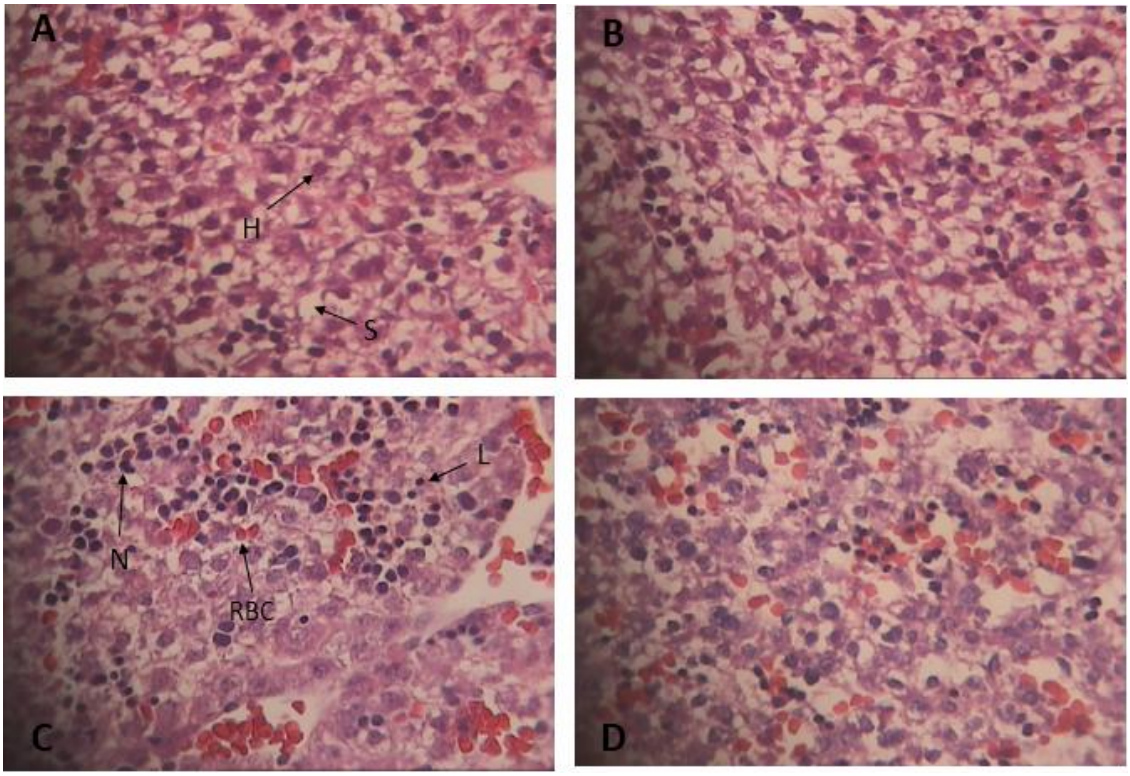
www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

یافته‌ها

موش‌های ماده در سه گروه تجربی یعنی، گروه ۱ (الکل ۵ درصد)، گروه ۲ (الکل ۱۰ درصد) و گروه ۳ (الکل ۲۰ درصد) با گروه کنترل مقایسه شدند. یافته‌های این مطالعه نشان داد که وزن مادر و جنین در گروه‌های الکل ۱۰ درصد و ۲۰ درصد نسبت به‌گروه کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵). اما این کاهش در گروه الکل ۵ درصد در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار نبود (P>۰/۰ ۵). تعداد سلول‌های هپاتوسیت (H) در گروه الکل ۵ درصد در مقایسه با گروه کنترل، افزایش معنی‌داری را نشان نداد اما در گروه‌های الکل ۱۰ درصد و ۲۰ درصد افزایش تعداد هپاتوسیت‌ها نسبت به گروه کنترل معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). این در حالی است که در گروه الکل ۲۰ درصد در مقایسه با گروه الکل ۱۰ درصد افزایش کیفی در تکثیر سلول‌های هپاتوسیت دیده شد. اتساع سینوزوئیدی (S) در گروه آزمایشی الکل ۵ درصد نسبت به گروه کنترل کم بود اما در گروه آزمایشی ۲ و ۳ اتساع سیوزوئیدی زیاد بود (شکل ۱، تصاویر A, B, C, D).



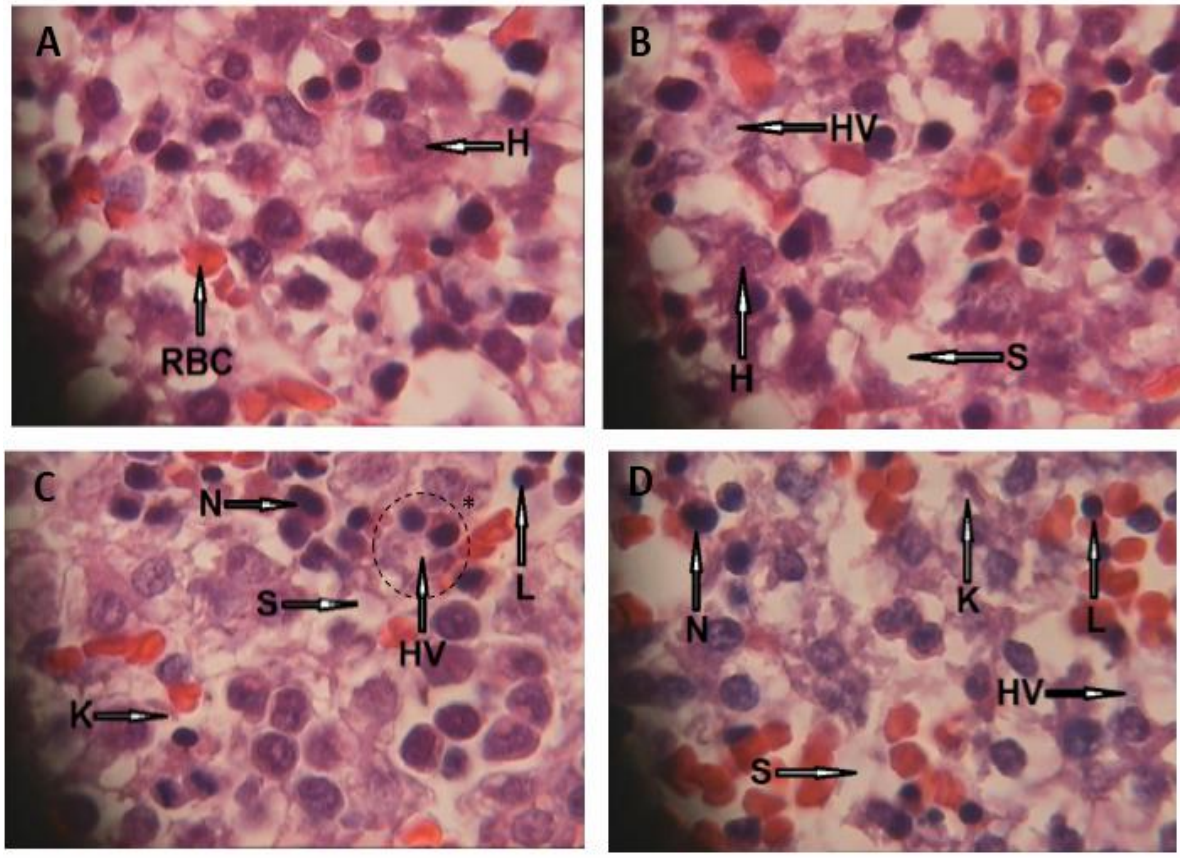
شکل ۱: مورفولوژی بافت کبد جنین موش صحرایی در روز ۲۱ بارداری تحت تاثیر مصرف دوزهای مختلف الکل توسط مادر باردار. A. گروه کنترل؛ B. گروه ۱ (دوز الکل ۵ درصد)؛ C. گروه ۲ (دوز الکل ۱۰ درصد)؛ D. گروه ۳ (دوز الکل ۲۰ درصد). H (هپاتوسیت)، S (سینوزوئید)، N (نوتروفیل)، L (لنفوسیت)، RBC (سلول قرمز خون). (بزرگ نمایی ×۴۰۰، رنگ‌آمیزی H&E)

تعداد هپاتوسیت‌های واکوئله (HV) در گروه آزمایشی الکل ۵ درصد نسبت به گروه کنترل افزایش یافت اما این افزایش معنی‌دار نبود (P> ۰/۰۵)، اما در گروه‌های آزمایشی الکل ۱۰ درصد و الکل ۲۰ درصد تعداد واکوئل‌های هپاتوسیت افزایش معنی‌داری را در مقایسه با گروه کنترل نشان داد (P< ۰/۰۵)، (شکل ۲، تصاویر A, B, C, D؛ نمودار ۱). افزایش تعداد

www.SID.ir

Archive of SID

سلول‌های کوپفر (k) در گروه آزمایشی الکل ۵ درصد در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار نبود. اما در گروه‌های آزمایشی الکل ۱۰ درصد و الکل ۲۰ درصد، این افزایش در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بود (P<۰/۰۵)، (شکل ۲، نمودار ۲). تعداد نوتروفیل (N) در گروه آزمایشی الکل ۵ درصد نسبت به گروه کنترل افزایش داشت اما تفاوت معنی‌دار نبود، این در حالی است که در گروه‌های آزمایشی الکل ۱۰ درصد و الکل ۲۰ درصد این افزایش معنی‌دار بود (P<۰/۰۵)، (شکل ۲، نمودار ۳). تعداد لنفوسیت (L) در گروه آزمایشی الکل ۵ درصد در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری را نشان نداد اما در گروه‌های آزمایشی الکل ۱۰ درصد و الکل ۲۰ درصد این افزایش در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بود (P<۰/۰۵)، (شکل ۲، نمودار ۴). در هیچ‌یک از گروه‌ها با این روش رنگ‌آمیزی آپوپتوز و فیبروز مشاهده نشد.



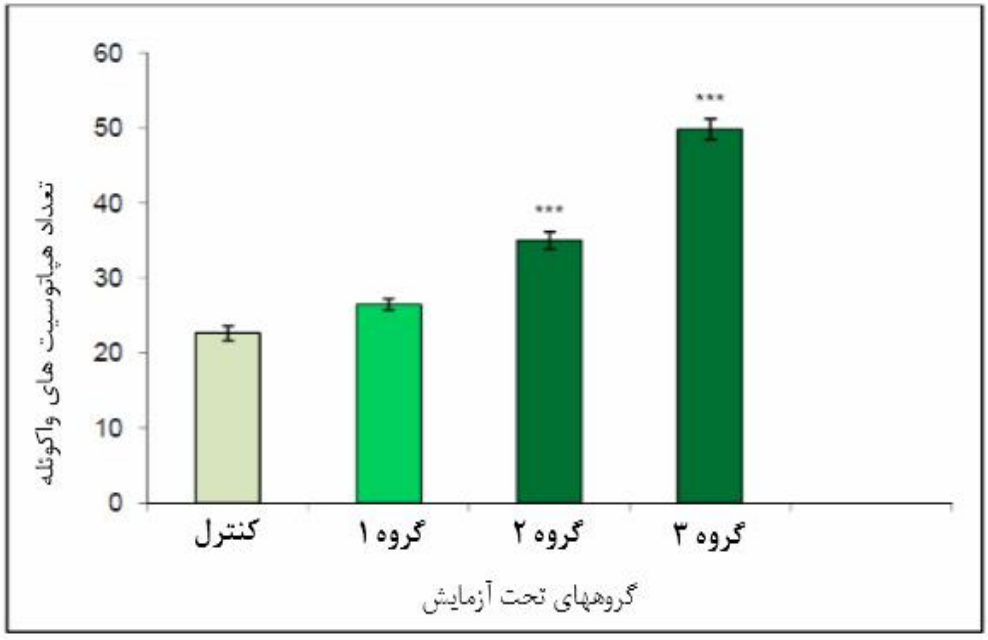
شکل ۲: مورفولوژی بافت کبد جنین موش صحرایی در روز ۲۱ بارداری تحت تاثیر مصرف دوزهای مختلف الکل توسط مادر باردار. (بزرگ نمایی ۱۰۰۰، رنگ‌آمیزی H&E). A. گروه کنترل (تعداد هپاتوسیت‌های واکوئل دار و سلول‌های کوپفر و سلول‌های سفید خون نسبت به گروه‌های دیگر کمتر هستند). B. گروه ۱ (الکل با دوز ۵ درصد). C. گروه ۲ (الکل با دوز ۱۰درصد). D. گروه ۳ (الکل با دوز۲۰ درصد). H (هپاتوسیت)، RBC (سلول قرمز خون)، HV (هپاتوسیت واکوئل‌دار)، S (سینوزوئید)، N (نوتروفیل)، K (سلول کوپفر)، L (لنفوسیت)، *(نشان دهنده‌ی یک هپاتوسیت واکوئل دار است که توسط لنفوسیت‌ها احاطه شده است).

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

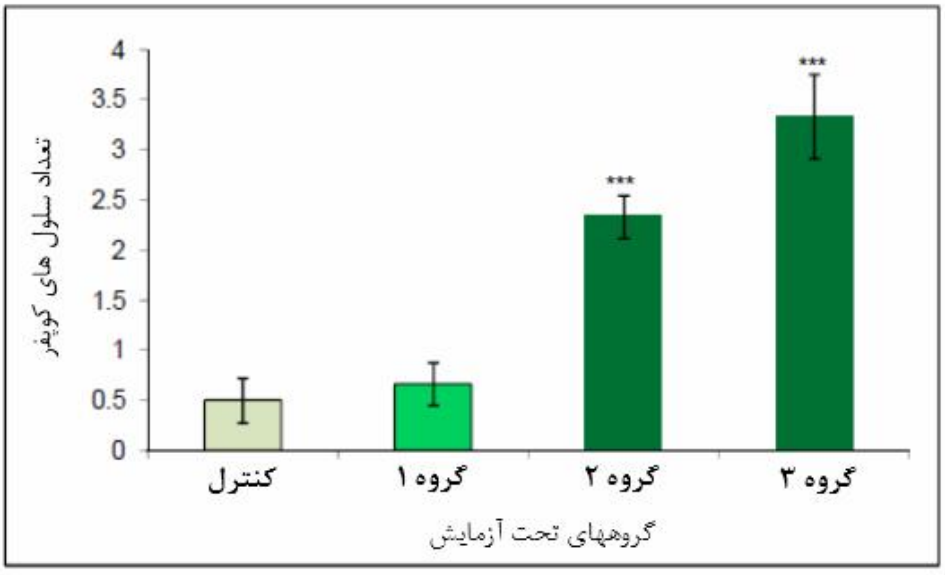
www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017



*نمودار ۱: اثر مصرف الکل در دوزهای گروه ۱: ۵درصد، گروه ۲: ۱۰درصد و گروه ۳: ۲۰درصد توسط موش باردار، بر تعداد هپاتوسیت‌های واکوئله در بافت کبد جنین موش. تعداد جنین‌ها در هر گروه ۶ سر می‌باشد. داده‌ها شامل میانگین ± خطای استاندارد می‌باشند. علامت **** ***نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار گروهای تجربی ۲ (الکل ۱۰درصد) و ۳ (الکل ۲۰درصد) نسبت به گروه کنترل می‌باشد. (P≤ ۰/۰۰۱***)***

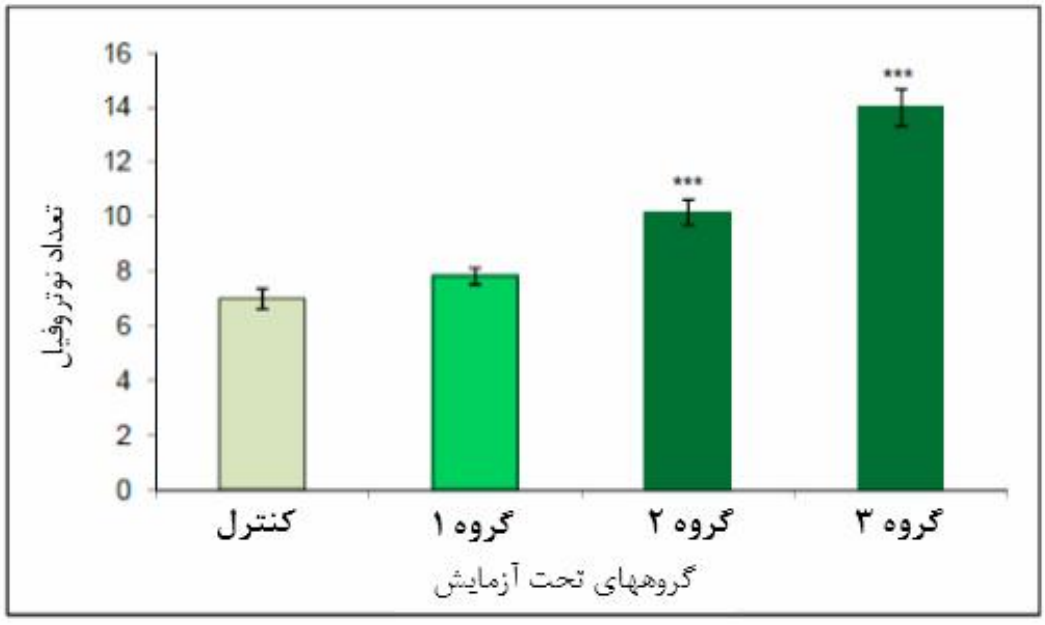


*نمودار ۲: اثر مصرف الکل در دوزهای گروه ۱: ۵ درصد، گروه ۲: ۱۰ درصد و گروه ۳: ۲۰ درصد توسط موش باردار، بر تعداد سلول‌های کوپفر در بافت کبد جنین موش. تعداد جنین‌ها در هر گروه ۶ سر می‌باشد. داده‌ها شامل میانگین ± خطای استاندارد می‌باشند. علامت **** ***نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار گروهای تجربی ۲ (الکل ۱۰ درصد) و ۳ (الکل ۲۰ درصد) نسبت به گروه کنترل می‌باشد. (P≤۰/۰۰۱***)***

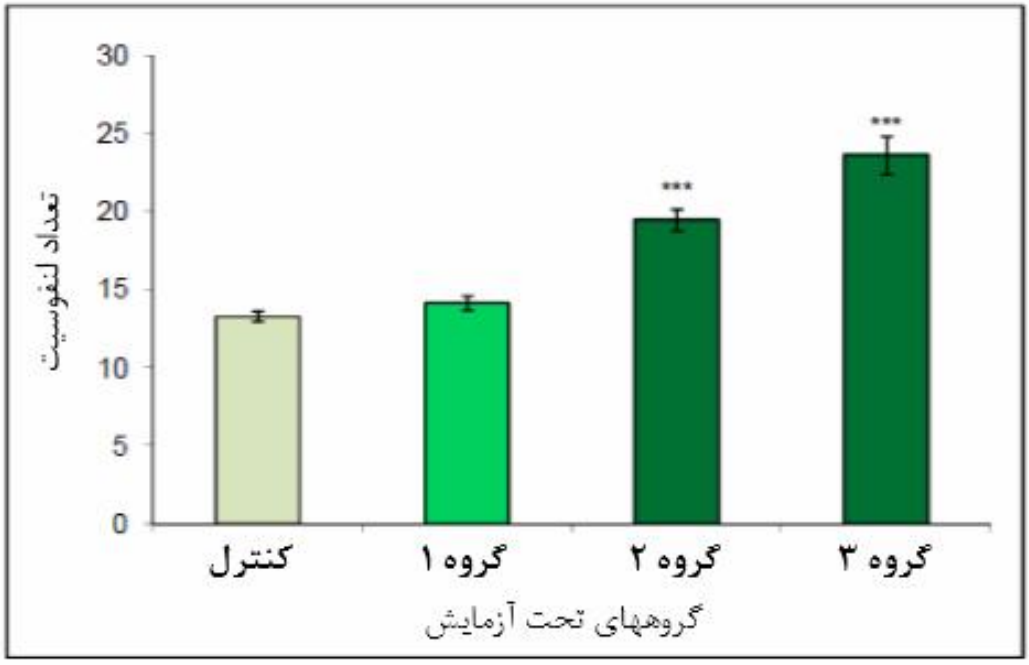
www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017



*نمودار ۳: اثر مصرف الکل در دوزهای گروه ۱: ۵ درصد، گروه ۲: ۱۰ درصد و گروه ۳: ۲۰ درصد توسط موش باردار، بر تعداد نوتروفیل‌ها در بافت کبد جنین موش. تعداد جنین‌ها در هر گروه ۶ سر می‌باشد. داده‌ها شامل میانگین ± خطای استاندارد می‌باشند. علامت *** **نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار گروه‌های تجربی ۲ (الکل ۱۰درصد) و ۳ (الکل ۲۰درصد) نسبت به گروه کنترل می‌باشد. ***(P≤۰/۰۰۱)***



*نمودار ۴: اثر مصرف الکل در دوزهای گروه ۱: ۵ درصد، گروه ۲: ۱۰ درصد و گروه ۳: ۲۰ درصد توسط موش باردار، بر تعداد لنفوسیت‌ها در بافت کبد جنین موش. تعداد جنین‌ها در هر گروه ۶ سر می‌باشد. داده‌ها شامل میانگین ± خطای استاندارد می‌باشند. علامت *** **نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنی‌دار گروهای تجربی ۲ (الکل ۱۰ درصد) و ۳ (الکل ۲۰ درصد) نسبت به گروه کنترل می‌باشد(***p ≤ ۰/۰۰۱)***

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

بحث

این مطالعه نشان داد که از دوز الکل ۱۰ درصد به بالا تغییرات پاتولوژیک قابل توجهی از نظر بافتی در کبد جنین موش صحرایی ایجاد می‌شود. مشخص شد که افزایش دوز الکل، تعداد هپاتوسیت‌های واکوئل‌دار کبد را افزایش می دهد. مطالعات قبلی نیز نشان دادند که با افزایش الکل، تعداد واکوئل‌های هپاتوسیت‌ها افزایش یافته و در بافت کبد التهاب ایجاد می‌کند (۲۳). در این مطالعه تغییرات تعداد سلول‌های کوپفر، نوتروفیل‌ها و لنفوسیت‌ها با دوز الکل رابطه‌ی مستقیم داشت و با افزایش دوز الکل، تعداد این سلول‌ها افزایش پیدا کرد. این نتایج با نتایج مطالعات دیگر هم‌خوانی دارد (۲۳).

الکل باعث تغییرات پاتولوژیک در عملکرد کبد می‌شود و در ترشح پروتئین‌های پلاسما اختلال ایجاد می‌کند. فشار انکوتیک (فشاری که توسط پروتئین‌های پلاسما بر دیواره‌ی عروق وارد می‌شود) باعث می‌شود تا در نتیجه‌ی این اختلالات که منجر به فقدان جدی ATP و افزایش کلسیم داخل سلولی می‌شود، قابلیت کنترل حجم غشای پلاسمایی هپاتوسیت‌ها مختل شده و شبکه‌ی رشته‌های بینابینی تخریب گردد و آماس و نکروز انکوتیک ایجاد شود (۱۷)، در نتیجه هپاتوسیت‌ها که فراوان‌ترین نوع سلول‌ها در کبد هستند (۲۴) به شکل متورم (ballooning) و وزیکولی دیده می‌شوند که نشان‌دهنده‌ی اختلال در عملکرد سلول است.

سلول‌های کوپفر، ماکروفاژهای ساکن در کبد هستند که برای حذف سریع میکروارگانیسم‌ها در گردش خون اهمیت دارند. سلول‌های کوپفر فعال‌شده در آسیب کبدی منبع مهم میانجی‌های التهابی شامل سایتوکاین‌ها، ایکوزانوئیدها، سوپراکسیدها، نیتریک اکسیدها و تاییدی بر افزایش سمیت مواد شیمیایی هستند (۲۵). همچنین این سلول‌ها نقش کلیدی را در پاسخ‌های ایمنی طبیعی و دفاع میزبان از طریق بیان و ترشح میانجی‌های التهابی دارا می‌باشند. به جز سلول‌های کوپفر، افزایش نوتروفیل‌ها و به ویژه افزایش لنفوسیت‌ها یک پاسخ مهم از بافت کبد در برابر مواد آسیب‌رسان می‌باشد. از آنجایی که در تحقیقات انجام شده در گذشته آسیب رسانی دوز الکل ۳۰ درصد به بالا در موش صحرایی در دوران بارداری و در حیوان بالغ کاملا اثبات شده بود (۲۶)، لذا دوزهای مورد آزمایش به منظور ارزیابی دوزهای پایین الکل انتخاب شدند. در این پژوهش تاثیر مصرف الکل ۵ و ۱۰ و ۲۰ درصد جایگزین آب نوشیدنی بر بافت کبد جنین مورد بررسی قرار گرفت. دوز مورد نظر الکل از روز ۸ تا روز ۲۱ بارداری در دسترس حیوانات گذاشته شد، زیرا در روزهای ابتدایی هنوز کاشت (Implantation) رویان اتفاق نیفتاده، بنابراین از نظر خونی با مادر ارتباط ندارد و دلیل دیگر این است که از هفته‌ی دوم به بعد اثرات مواد توکسیک در جنین بروز بیشتری دارد (۲۷).

مقدار و مدت زمانی که الکل مورد استفاده قرار می‌گیرد از فاکتورهای مهم تاثیرگذار بر میزان اختلال عملکردی کبد هستند. به‌طوری که با افزایش زمان، مقدار اختلالات افزایش پیدا می‌کنند. روش استفاده از الکل در آب نوشیدنی (A-DW) ساده‌ترین روش مصرف الکل است که الگوی متناوب و ادواری مصرف الکل در انسان را تقلید می‌کند (۲۸)، در این روش تا دوز ۴۰ درصد الکل نیز قابل تجویز است که منجر به ایجاد پاسخ‌های جدی کبدی و سیستمیک می‌شود (۲۹). اما استفاده بیشتر از الکل در این روش نرخ مرگ و میر را بالا برده و نیاز به مراقبت زیاد و تعیین دقیق طول مدت مطالعه دارد (۲۸). در این مطالعه نیز از این روش استفاده شد. این روش استفاده از الکل در آب نوشیدنی باعث استئاتوز (Steatosis) و التهاب می‌شود اما در کبد ایجاد فیبروز و سیروز نمی‌کند (۳۰).

مدارک قاطعی درباره الکل نوشی مادر و ناهنجاری‌های مادرزادی وجود دارد، نقایصی شامل ناهنجاری‌های جمجمه‌ای صورتی (کوتاهی شیار پلکی، هایپوپلازی آرواره)، تغییر شکل اندام‌ها (تغییر وضعیت و حرکت مفاصل) و نقایص قلبی و عروقی (ناهنجاری‌های دیواره بطنی) این ناهنجاری‌ها همراه با عقب ماندگی‌های عقلی و نارسایی رشد، سندرم الکلی جنینی

www.SID.ir

Archive of SID

نام دارد. جالب اینکه حتی مصرف متوسط الکل در طی بارداری ممکن است برای رویان مضر باشد (۳۳-۳۱). استفاده طولانی مدت اتانول منجر به افزایش قابل توجهی در محتوی کل لیپیدهای کبدی، تری‌اسی‌گلیسرول و اسیدهای چرب غیر استریفیه در جنین‌ها و نوزادان موش صحرایی می‌شود (۳۴).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که افزایش سلول‌های کوپفر، افزایش نوتروفیل‌ها و به ویژه افزایش لنفوسیت‌ها نشان‌دهنده‌ی عکس العمل کبد به سم خارجی است. در دوزهای ۱۰ درصد و ۲۰ درصد مصرف الکل نه تنها باعث آسیب در خود حیوان می‌شود بلکه در طول بارداری از جفت عبور کرده و روی کبد جنین اثر منفی می‌گذارد. دوز ۵ درصد الکل اثر منفی قابل توجهی بر تعداد هپاتوسیت‌های واکوئل‌دار، سلول‌های کوپفر، لنفوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها کبد جنین موش صحرایی نداشت.

قدردانی و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد زیست‌شناسی جانوری، گرایش تکوین مصوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال است. در پایان مراتب سپاس فراوان خود را از دکتر مهرانگیز صدوقی و دکتر محمد حسین حیدری و همکاران گروه آناتومی دانشکده‌ی علوم پزشکی شهید بهشتی ابراز می‌داریم.

References

1- Beattie J. Alcohol exposure and the fetus. *Eur J Clin Nutr.* 1992; 46: S7-S17.

2- Kumar M, Sarin S. Is cirrhosis of the liver reversible? *Indian J Pediat.* 2007; 74: 393-9.

3- Stancic-Rokotov D, Sikiric P, Seiwerth S, et al. Ethanol gastric lesion aggravated by lung injury in rat. Therapy effect of antiulcer agents. *J Physiol.* 2001; 95: 289-93.

4- Hu F, Hepburn H, Li Y, Chen M, Radloff S, Daya S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. *J Ethnopharmacol.* 2005; 100: 276-83.

5- Molina P, Zambell K, Norenberg K, et al. Consequences of alcohol-induced early dysregulation of responses to trauma/hemorrhage. *Alcohol.* 2004; 33: 217-27.

6- Adams M, Hirst M. The influence of adrenal medollectomy on the development of ethanol-induced cardiac hypertrophy. *Canadian J physiol Pharmacol.* 1986; 64: 592-6.

7- Adams M, Hirst M. Ethanol-induced cardiac hypertrophy: correlation between development and the excretion of adrenal catecholamines. *Pharmacol Biochem Behav.* 1986; 24: 33-8.

8- Fleming M, Mihic S, Harris R. Ethanol. Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed Edited by Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG New York, McGraw-Hill. 2001: 429-46.

9- Lochry E, Riley E. Retention of passive avoidance and T-maze escape in rats exposed to alcohol prenatally. *Neurobehav Toxicol.* 1980; 2: 107-15.

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

10- Cotran R, Kumar V, Collins T, Robbins S. Robbins pathologic basis of disease: WB Saunders Company; 1999.

11- Boé D, Nelson S, Zhang P, Bagby G. Acute ethanol intoxication suppresses lung chemokine production following infection with Streptococcus pneumoniae. *J Infect Dis.* 2001; 184: 1134-42.

12- Badylak S. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. 2002: Elsevier.

13- A J NS, K SA. A study on histology of fetal liver. *Nat J Clin Anatom.* 2015; 4: 29.

14- Reif S, Terranova V, El-Bendary M, Lebenthal E, Petell J. Modulation of extracellular matrix proteins in rat liver during development. *Hepatology.* 1990; 12: 519-25.

15- Akay MT, Koçkaya EA. The determination of immunolocalization of ECM components and growth factors in placentas of pregnant rats treated with alcohol. Ankara: TUBITAK, 2002.

16- Bielawski D, Abel E. Acute treatment of paternal alcohol exposure produces malformations in offspring. *Alcohol.* 1997; 14: 397-401.

17- Sakhuja P. Pathology of alcoholic liver disease, can it be differentiated from nonalcoholic steatohepatitis? *World J Gastroenterol.* 2014; 20: 16474-9.

18- Das S, Vasudevan D. Biochemical diagnosis of alcoholism. *Indian J Clin Biochem.* 2005; 20: 35-42.

19- Dinu V, Zamfir O. Oxidative stress in ethanol intoxicated rats. Revue roumaine de physiologie (Bucharest, Romania: 1990). 28: 63.

20- Fernández-Checa J, Kaplowitz N, Colell A, García-Ruiz C. Oxidative stress and alcoholic liver disease. *Alcohol Health Res W.* 1997; 21: 321-4.

21- Husain K, Scott B, Reddy S, Somani S. Chronic ethanol and nicotine interaction on rat tissue antioxidant defense system. *Alcohol.* 2001; 25: 89-97.

22- Oh S, Kim C, Chun H. Chronic ethanol consumption affects glutathione status in rat liver. *J Nutrition.* 1998; 128: 758-61.

23- Bataller BGaR. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology.* 2011; 141: 1572-85.

24- Gores HMaGJ. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology.* 2008; 134: 1641-54.

25- Ono MY Bi, Hardison E, Mastrangelo M, Tweardy D. Increased susceptibility to liver injury after hemorrhagic shock in rats chronically fed ethanol: role of nuclear factor-κb, interleukin-6, and granulocyte colony-stimulating factor. shock. 2004; 21: 519-25.

26- Keegan A MR, Batey R. Ethanol-related liver injury in the rat: a model of steatosis, inflammation and pericentral fibrosis. *J Hepatol.* 1995; 23: 591-600.

27- Claire Coles PD. Critical periods for prenatal alcohol exposure. Alcohol Health & Research World. 1994; 18: 22-29.

28- Elizabeth Brandon-Warner PD, Laura W, Schrum C, Schmidt M, Iain H. Rodent models of alcoholic liver disease: of mice

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

and men. alcohol : 2012; 46: 715-25.

29- Brandon Warner BS, Walling L, Laura W, Lain H. Chronic ethanol feeding accelerates hepatocellular carcinoma progression in a sex-dependent manner in a mouse model of hepatocarcinogesis. *Alcohol Clin Exp Res.* 2012;36:641-53.

30- Brandon-Warner BS, Tracy L. Walling BS, Laura W, et al. Chronic ethanol feeding accelerates hepatocellular carcinoma progression in a sex-dependent manner in a mouse model of hepatocarcinogesis. *Alcohol Clin Exp Res.* 2012; 36: 641-53.

31- Bertrand J FL, Weber MK. Guidelines for identifying and referring persons with fetal alcohol syndrome. *MMWR Recomm Rep.* 2005; 1-14.

32- Hoyme HE MP, Kalberg WO, et al. A practical clinical approach to diagnosis of fetal alcohol spectrum disorders: clarification of the 1996 institute of medicine criteria. *Pediatrics.* 2005: 39-47.

33- Sokol RJ D-BV, Nordstrom B. Fetal alcohol spectrum disorder. *JAMA.* 2003: 2996-9.

34- AK R. Effects of maternal ethanol consumption on hepatic lipid biosynthesis in foetal and neonatal rats. *J Biochem.* 1978; 174: 213-9.

www.SID.ir

Archive of SID

Effect of Low Doses Consumption of Alcohol on Rat's Fetal Liver – A Histological Study

Bahrami M[1], Ghorbanlou M[2], Farrokhi A[2], Nejatbakhsh R[3]

[1]Dept. of Biology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran

[2]Dept. of Anatomy, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

[3]Dept. of Anatomy, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

Corresponding Author: Nejatbakhsh R, Dept. of Anatomy, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

E-mail: reza_nejat@yahoo.com

Received: 24 Oct 2016 **Accepted:** 15 Jan 2017

Background and Objective: Alcohol is a teratogenic agent for humans and can easily pass through the placenta. Low doses of alcohol are commonly found in alcoholic drinks, therefore the purpose of this study was to investigate the histological changes of fetal rat livers influenced by low doses of alcohol consumption.

Materials and Methods: In this experimental study, pregnant female rats were divided into a control group and three experimental groups which were on a diet of 5%, 10% and 20% of alcohol in their drinking water. The specified doses of alcohol were delivered from the 8th day of pregnancy until the 20th day. On the 21st day of pregnancy, the fetuses were surgically removed from the mother's uterus and the livers of the fetuses were removed with the help of a stereo microscope. Following fixing, processing and sectioning, the fetal livers were stained using H&E and were studied under a light microscope. Data were analyzed by SPSS software and ANOVA.

Results: Alcohol doses of 10% and 20% significantly increased histopathological liver factors ($p<0.001$). But a 5% dose of alcohol didn't have a significant effect on liver histology.

Conclusion: Alcohol usage during pregnancy, even at low doses, may lead to pathologic changes in the liver of a developing rat fetus. A 5% dose of alcohol does not lead to significant pathologic changes in the histology of the fetal rat liver, while doses of 10% and 20% of alcohol significantly increases inflammatory factors in histological studies.

Keywords: Alcohol, Pregnancy, Fetus, Liver, Histology

Downloaded from zums.ac.ir at 9:57 IRDT on Wednesday June 7th 2017

www.SID.ir