Effect of cholestasis on Dynamin-Related Protein 1 (Drp1) gene expression in rat liver

Khosrobakhsh F[1]., PhD, Moloudi M.R., PhD[2], Bigdelo M., MSc[3], Rahimmi A., MSc[3]

1. Assistant Professor, Department of Biological Sciences, Faculty of Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran. (Corresponding Author), Tel: +98-87-33664600, f.khosrobakhsh@uok.ac.ir.
2. Assistant Professor, Liver & Digestive Research Center, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran.
3. MSc Molecular biology, Department of Biological Sciences, Faculty of Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.

ABSTRACT

Background and Aim: Cholestasis is characterized by impaired bile flow, which can cause accumulation of bile acids in the liver and development of metabolic disorders, resulting in hepatocellular necrosis and apoptosis. Mitochondria are a critical cellular organelle that produces most of the cellular energy. Mitochondrial morphology varies from an interconnected filamentous network to isolated dots. This processes are called mitochondrial fission and fusion. Disrupted mitochondrial morphology has been observed in cholestatic liver disease. Dynamin related protein 1 is one of the genes involved in mitochondrial fission and plays a role in apoptosis. In this study we investigated *Drp1* gene expression in the liver of cholestatic rats.

Materials and Methods: In this experimental study, male Wistar rats (290±25g) were divided into three groups of control (non-operated), sham (operated without common bile duct ligation) and BDL (operated with common bile duct ligation). On the 28th day of BDL, rats were weighed and sacrificed. Biochemical assays for measurement of bilirubin level and liver enzymes, and also dissection of liver tissue for histopathological analysis were performed. *Drp1* gene expression was evaluated by semi-quantitative RT-PCR technique.

Results: The results showed that serum levels of total bilirubin and liver enzymes (ALT, AST, ALK) were significantly increased in BDL group compared to those in the control and sham operation groups (P<0.0001 and P<0.001). Histological examination revealed bile ductular hyperplasia, focal liver necrosis and fibrous tissue expansion in BDL group. The result of RT-PCR indicated significant increase of *Drp1* gene expression in the liver of the rats in BDL group compared to that in the other groups (P<0.001).

Conclusion: In this study we found that liver cholestasis increased expression of *Drp1* gene which led to increased mitochondrial-mediated apoptotic effect with resultant liver cell death.

Keywords: Liver, Cholestasis, Mitochondrial dynamics, Dynamin related protein-1 gene

Received: Jan 30, 2017 **Accepted:** May 13, 2017

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

[DOI: 10.22102/22.4.68]

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و دوم / مهر و آبان ۱۳۹۶/ ۷۹-۶۸

بررسی اثر کلستاز بر بیان ژن پروتئین مربوط به دینامین - ۱ درکبد موش بزرگ آزمایشگاهی

فرنوش خسروبخش[۱]، محمد رامان مولودی[۲]، مریم بیگدلو[۳]، آرمان رحیمی[۳]

۱. استادیار گروه علوم زیستی، دانشکده علوم، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران. (مولف مسوول)، تلفن ثابت: ۰۸۷-۳۳۶۶۴۶۰۰، f.khosrobakhsh@uok.ac.ir

۲. استادیار، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.

۳. کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی -مولکولی، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: در بیماری کلستاز انسداد جریان صفرا منجر به تجمع اسیدهای صفراوی در کبد و بروز نارسایی‌های متابولیکی شده و در نهایت منجر به مرگ نکروزی و آپوپتوزی سلولهای کبدی می‌شود. میتوکندری‌ها اندامکهای درون سلولی هستند که بیشترین منبع تولید انرژی سلولی بوده و به‌طور پیوسته تقسیم و مجدداً با هم ترکیب می‌شوند. این فرآیندهای پویا را شکافت و هم‌جوشی غشایی می‌نامند. تغییر پویایی میتوکندری در بیماری کبدی کلستاز مشاهده شده است. ژن پروتئین مربوط به دینامین نوع -۱ از جمله پروتئینهای دخیل در مسیر شکافت غشای میتوکندری است و در بروز آپوپتوز نقش دارد. در این مطالعه اثر کلستاز بر تغییرات بیان ژن *Drp1* در کبد موش‌های صحرایی مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر نژاد ویستار (وزن ۲۵±۲۹۰گرم) در سه گروه کنترل (بدون جراحی)، شم (جراحی بدون انسداد مجرای صفراوی) و کلستاز (جراحی همراه با انسداد مجرای صفراوی) استفاده شد. در روز ۲۸ام پس از انسداد مجرای صفراوی، حیوانات توزین و به منظور بررسی سطح بیلی روبین و آنزیم‌های عملکرد کبدی از آنها خون گیری انجام شد. سپس نمونه‌گیری از بافت کبد جهت بررسی شاخص‌های هیستوپاتولوژیک و همچنین ارزیابی سطح بیان ژن پروتئین مربوط به دینامین نوع [۱]-۱ انجام شد.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه افزایش سطوح سرمی بیلی‌روبین کل[۲] و آنزیم‌های کبدی آلانین آمینوترانسفراز[۳]، آسپارتات آمینوترانسفراز[۴] و آلکالین آمینوترانسفراز [۵] را در گروه کلستاز نسبت به گروه‌های شم و کنترل نشان داد ($P<۰/۰۰۱$ و $P<۰/۰۰۱$). نتایج بررسی شاخص‌های بافتی در گروه کلستاز، افزایش مجاری صفراوی، نکروز بافت کبد و گسترش بافت فیبروزی را نشان داد. نتایج RT-PCR افزایش معنادار ($P<۰/۰۰۱$) بیان ژن *Drp1* کبد گروه کلستاز را نسبت به گروه‌های شم و کنترل نشان داد.

نتیجه‌گیری: این نتایج نشان می‌دهد که افزایش بیان ژن *Drp1* در کبد موش‌های بزرگ آزمایشگاهی کلستازی می‌تواند مربوط به نقش پویایی میتوکندری درآسیب‌شناسی نارسایی کلستاز باشد.

کلید واژه‌ها: کبد، کلستاز، پویایی میتوکندری، ژن پروتئین مربوط به دینامین نوع -۱

وصول مقاله:۹۵/۱۱/۱۱ اصلاحیه نهایی:۹۶/۲/۱۸ پذیرش:۹۶/۲/۲۳

1 Dynamin-related protein (Drp1)
2 Total bilirubin(TBil)
3 Alanine Aminotransferase (ALT)
4 Aspartate Aminotransferase (AST)
5 Alkaline Phosphatase (ALP)

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

[DOI: 10.22102/22.4.68]

مقدمه

کبد از مهم‌ترین اندام‌های بدن است که نقش مهمی در بسیاری از اعمال متابولیکی بدن از جمله سنتز و متابولیسم پروتئینهای پلاسمایی، تولید صفرا، هومئوستاز گلوکز، غیر فعال کردن و سمیت زدایی عوامل مختلف دارد. بیماری کبدی کلستاز با مسدود شدن جریان صفرا از کبد به روده و تجمع اسیدهای صفراوی، بیلی‌روبین و کلسترول در کبد و پلاسما مشخص می‌شود. تجمع اسیدهای صفراوی در بیماری کلستاز، علت اصلی آسیب کبدی است که باعث مرگ سلولی آپوپتوز و یا نکروز و در نهایت بروز سیروز و از دست دادن کبد می‌گردد (۲و۱). کلستاز با تغییرات عمیق متابولیکی از جمله تغییر در عملکرد میتوکندری، کاهش اکسیداسیون اسیدهای چرب، کاهش تشکیل اجسام کتونی، کاهش سطح انرژی و افزایش گلیکولیز همراه است (۳). در کلستاز تولید گونه‌های فعال اکسیژن در میتوکندری منجر به ایجاد استرس اکسیداتیو و در نتیجه آسیب سلول‌های کبدی می‌شود. همچنین در طی کلستاز تجمع برخی از گونه‌های مولکولی اسیدهای صفراوی در کبد باعث مرگ سلول‌های پارانشیمی، اختلال در عملکرد سلول‌های هپاتیک و نتیجتاً تخریب کبد می‌شود (۳). هنگامی که عارضه کلستاز طولانی مدت می‌شود بعلت تخلیه و حذف DNA میتوکندری فقدان تجدید میتوکندری‌ها به اختلال در عملکرد آن‌ها کمک می‌کند که در نهایت منجر به کاهش سنتز پروتئین‌هایی می‌شود که در بیوژنز میتوکندری نقش دارند (۵و ۴).

میتوکندریها، اندامک‌های پویای درون سلولی هستند که بطور مداوم در حال به هم پیوستن و یا تقسیم شدن هستند و این روند در اثر فرآیندهای همجوشی[6] و شکافت[7] غشاهای خارجی و داخلی آنها صورت می‌گیرد. پروتئین‌های اصلی که در فرآیندهای شکافت و همجوشی غشاهای میتوکندری نقش دارند، پروتئین‌های خانواده GTPase هستند که از مخمر تا پستانداران حفظ شده‌اند. مهمترین این پروتئین‌ها عبارتند از: پروتئین‌هایDRP1 و FIS1 که در شکافت غشای میتوکندری و پروتئین‌های OPA1 و MFN1,2 که در همجوشی میتوکندری نقش دارند. فقدان پروتئین‌های MFN2،MFN1 و OPA1 موجب تکه‌تکه شدن و فقدان DRP1 موجب طویل شدن میتوکندری می‌شود (۶-۸). حذف این پروتئین‌ها در سلولها منجر به کاهش میزان آدنوزین تری فسفات (ATP) تولید شده در غشای داخلی میتوکندری می‌شود. بدین وسیله سلول از یک سو دچار نارسایی‌های بیوانرژتیکی شده و از سوی دیگر تولید گونه‌های اکسیژن آزاد در این میتوکندری‌های آسیب دیده افزایش می‌یابد. از آنجاییکه اینگونه نوسانات و تغییرات در تنظیم انرژی طبیعی بدن در بیماریهای متابولیکی گزارش شده است (۱۱-۹)، بنابراین نقشی که پویایی میتوکندری می‌تواند در بروز آنها ایفا کند دیدگاه جدیدی است که می‌تواند در شناخت آسیب‌شناسی این بیماریها موثر باشد. با استناد به مطالعاتی که تغییر شکل ساختار میتوکندری در بیماران مبتلا به بیماری کبد چرب غیرالکلیک (NAFLD[8]) نشان داده شده است (۱۳و ۱۲)، فرضیه دخالت ساز وکار پویایی میتوکندری در پیشرفت آسیب‌زایی بیماریهای متابولیکی تقویت می‌شود.

پروتئین DRP1، که در شکافت غشای میتوکندری نقش دارد، در جنبه‌های مهمی از جمله شکل، اندازه، بازسازی و ترمیم میتوکندری دخالت دارد و نیز در توزیع میتوکندری در داخل سلول‌ها نقش مهمی را ایفا می‌کند (۱۴). با توجه به اینکه نقش میتوکندری در آسیب‌شناسی کلستاز حائز اهمیت می‌باشد و همچنین برای اولین بار در مطالعه‌ی یو[9] و همکاران نقش شکافت غشایی میتوکندری در مسیر آسیب کبدی ناشی از کلستاز نشان داده شده است (۱۵)، این سوال قابل طرح است که آیا در جریان کلستاز، بیان ژن *Drp1* تغییر می‌نماید؟ در این پژوهش با انجام عمل جراحی بر روی موش بزرگ آزمایشگاهی و مسدود کردن مجرای صفراوی مشترک و جلوگیری از تخلیه صفرا، روی موش

[6] Fusion
[7] Fission
[8] Non-alcoholic fatty liver disease
[9] Yu

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]
[DOI: 10.22102/22.4.68]

بزرگ آزمایشگاهی، مدل آزمایشگاهی بیماری کلستاز ایجاد شد; سپس تغییرات بیان ژن *Drp1* در موش‌های کلستازی ۲۸ روز پس از جراحی مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

حیوانات مورد آزمایش: در این تحقیق تجربی از ۲۴ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر نژاد ویستار[10] در محدوده وزنی ۲۵±۲۹۰ گرم استفاده شده است. حیوانات در حیوان - خانه دانشکده علوم دانشگاه کردستان با دسترسی کافی به آب و غذا (۲۴ ساعت قبل از جراحی ناشتا بودند)، درجه حرارت ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد و دوره روشنایی/تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. حیوانات به صورت کاملاً تصادفی به سه گروه (n=۸) کنترل (جراحی نشده)، شم (با عمل جراحی بدون انسداد مجرای صفراوی) و کلستاز (با عمل جراحی و انسداد مجرای صفراوی) تقسیم شدند. تمام آزمایشات بر اساس موازین اخلاقی رفتار با حیوانات انجام شد که به تایید کمیته اخلاقی دانشگاه کردستان مطابق با قوانین بین المللی رسیده است.

جراحی: در گروه کلستاز حیوانات تحت عمل جراحی قرار گرفته و مجرای صفراوی آن‌ها بسته شد (BDL: Bile Duct Ligation). با تزریق داخل صفاقی ترکیب کتامین (۵۰mg/kg) و زایلازین (۱۰mg/kg) به نسبت حجمی ۵ به ۲، حیوانات بیهوش و ناحیه میانی شکم کاملاً تراشیده و ضد عفونی شد. یک شکاف طولی به اندازه ۳ سانتیمتر در خط میانی شکم ایجاد، پوست شکم باز شد. بعد از کنار زدن کبد و پیدا شدن مجرای صفراوی (با کمترین دستکاری احشاء اطراف)، با استفاده از نخ سیلک سه صفر در دو نقطه جداگانه مجرای صفراوی مسدود شده و مابین آن دو نقطه، بوسیله کوتر قطع گردید. بعد از آن جدار شکم بخیه شد. پس از اتمام عمل جراحی، میزان یک میلی‌لیتر سالین نرمال داخل صفاق تزریق گردید. بعد از پایان کار، محل جراحی با بتادین و الکل کاملا ضدعفونی گردید. در گروه شم تمام مراحل بالا به غیر از بستن مجرای صفراوی انجام شد. یک روز بعد از انجام عمل جراحی، تغییر رنگ ادرار و زرد شدن گوش حیوان، نشان دهنده موفقیت در عمل BDL بود. در صورتی که موشها فاقد این علائم بودند از مطالعه خارج می‌شدند (۱۶).

نمونه‌گیری: قبل از عمل جراحی و ۲۸ روز پس از عمل جراحی وزن کل بدن در گروه‌های آزمایشی کنترل، شم و کلستاز اندازه‌گیری شد. به دنبال آن موش‌ها با ترکیب کتامین و زایلازین بیهوش شده و دیواره شکمی برش داده شد. سپس از ورید شکمی ۴ سی‌سی خون گرفته، از ناحیه لوب خنجری کبد قطعاتی با وزن ۵±۷۰ میلی‌گرم نمونه برداری شد. نمونه‌های جدا شده به داخل میکروتیوب‌های عاری از نوکلئاز که حاوی محلول RNAlater (شرکت کیاژن، آمریکا) بود، منتقل گردیدند. بافت‌های استخراج شده در محلول RNAlater در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری و سپس، محلول RNAlater توسط سمپلر خارج گردید. میکروتیوب‌های حاوی بافت کبد تا زمان استخراج در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید (۱۷). برای سنجش سطوح سرمی بیلی‌روبین و آنزیم‌های کبدی از کیت تشخیص طبی (شرکت پارس آزمون، ایران) استفاده شد.

استخراج RNA از بافت کبد: استخراج RNA به روش استفاده از تریزول[11] و با استفاده از محلول RNX-Plus (شرکت سیناژن، ایران) مطابق با مطالعات قبلی انجام شد (۱۷). برای استخراج RNA، یک قطعه از بافت کبد هر موش بزرگ آزمایشگاهی به وزن ۷۰ میلی‌گرم در داخل محلول RNX-Plus با هموژنایزر (مدل Silent Crusher S، شرکت هایدولف، آلمان) یکنواخت شد. سپس با اضافه کردن BCP[12] و انجام مراحل سانتریفیوژ میکروتیوب‌ها، سه لایه شفاف، سفید و کدر تشکیل شد. فاز آبکی شفاف توسط سمپلر به میکروتیوب جدید منتقل گردید و در ادامه ایزوپروپانول سرد و اتانول به منظور

[10] Wistar

[11] Trizol

[12] Bromochloropropane

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

[DOI: 10.22102/22.4.68]

رسوب دهی RNA و جداسازی RNAی کل اضافه شد. تیمار شده با دی اتیل پیروکربنات[13] و مهار کننده آنزیم RNase[14]انجام شد و در نهایت RNAی استخراج شده در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

سنجش کیفی و کمی RNA: به منظور بررسی کیفیت RNAی کل استخراج شده، از الکتروفورز آن بروی ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. باندهای واضح RNAهای ریبوزومی ۲۸s و ۱۸s و نسبت تقریبی دو به یک باندها، به عنوان ملاک سالم بودن RNAی کل استخراج شده در نظر گرفته شد (شکل ۱). سنجش کمی برای تعیین غلظت RNAی کل، به روش اسپکتروفوتومتری انجام شد و از میزان جذب به‌دست آمده در طول موج ۲۶۰ نانومتر برای تعیین غلظت RNAی کل استخراج شده از نمونه‌ها استفاده شد. میزان کمی غلظت RNA به‌دست آمده‌ی چهار نمونه‌ی تصادفی از نمونه‌های هر گروه آزمایشی و نسبت میزان جذب این نمونه‌ها در طول موج‌های ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر و طول موج‌های ۲۶۰ به ۲۳۰ نانومتر، که نشان دهنده میزان خلوص RNAی استخراج شده است در جدول ۱ آورده شده است.

ساخت cDNA: غلظت RNAی استفاده شده برای ساختن cDNA در تمام نمونه‌ها یکسان‌سازی شد و از غلظت ۱ میکروگرم استفاده شد. ساخت cDNA توسط کیت شرکت فرمنتاز و مطابق روش کار پیشنهادی موجود در کیت انجام گرفت.

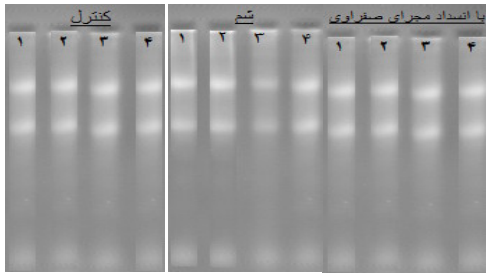
بررسی تغییرات بیان ژن *Drp1*: در این تحقیق از روش رونویسی معکوس – واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (RT-PCR)[15] نیمه کمی[16] برای بررسی تغییرات بیان ژن استفاده شد. توالی mRNAی ژن‌های *Drp1* (NM-053655) و بتا اکتین (NM-031144) و نواحی اتصال اگزون‌ها از داده پایگاه اطلاعاتی NCBI به دست آمد. برای جلوگیری از تکثیر احتمالی DNA، یکی از پرایمرهای رفت و در نهایت خشک کردن رسوب و حل کردن رسوب با آب معکوس مربوط به ژن‌های مورد نظر در نواحی اتصال دو اگزون طراحی گردید که توالی آن‌ها در جدول ۲ آورده شده است. به علاوه برای اطمینان از عدم تکثیر احتمالی قطعات DNA ژنومی در هنگام انجام PCR، کنترل NRT[17] (کنترلی که در واکنش تبدیل RNA به cDNA از آنزیم نسخه‌بردار معکوس استفاده نشده بود) و کنترل NTC[18] (کنترل بدون اضافه کردن نمونه cDNA) در انجام PCR استفاده شد. عدم تکثیر قطعات مورد انتظار و قطعات دیگر در PCR این نمونه‌های کنترل، حاکی از عدم آلودگی نمونه‌های RNA استخراج شده با DNA ژنومیک بود.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز: واکنش زنجیره‌ای پلیمراز طبق برنامه مندرج در جدول ۳ اجرا شد. باند مربوط به ژن *Drp1* در PCR های با ۲۷ چرخه، بیشترین وضوح را داشت. پس از اتمام PCR، محصولات تکثیر شده به منظور بررسی میزان بیان ژن، بر روی ژل آگارز دو درصد، الکتروفورز گردید. از خط کش ژنی[19] ۱۰۰ جفت بازی برای تشخیص محل باندها و تایید تکثیر قطعات مورد انتظار از ژن بتا اکتین و ژن *Drp1* بر روی ژل آگارز استفاده شد. پس از رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید به مدت ۲۰ دقیقه، با استفاده از ژل داک[20] (شرکت نانوژل، آلمان) عکس‌برداری از ژل‌ها انجام شد و به کمک برنامه آنالیز عکس ImageJ، باندهای موجود بر روی ژل آگارز به صورت کمی در آمد.

[13]Diethyl Pyrocarbonate (DEPC)
[14] RNase inhibitor
[15]Reverse transcriptase-polymerase chain reaction
[16]Semi-quantitive
[17]No reverse transcriptase control
[18]No template control
[19]DNA ladder
[20]Gel documentation system

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

[DOI: 10.22102/22.4.68]



شکل ۱ - تصویر ژل الکتروفورز مربوط به RNAهای استخراج شده از بافت کبد در سه گروه آزمایشی. اعداد ۱ تا ۴ نمایانگر شماره‌ی چهار نمونه تصادفی در هر گروه آزمایشی می‌باشد. در هر نمونه باند نشان داده شده مربوط به RNAی ریبوزومی ۲۸S و ۱۸S می‌باشد.

جدول ۱- نتایج اندازه‌گیری غلظت و شاخص‌های خلوص RNAی استخراج شده از بافت کبد در سه گروه آزمایشی. اعداد ۱ تا ۴ نمایانگر شماره‌ی چهار نمونه تصادفی در هر گروه آزمایشی می‌باشد. غلظت RNA بر حسب میکروگرم بر میکرولیتر می‌باشد.

	کنترل				شم				با انسداد مجرای صفراوی			
	۱	۲	۳	۴	۱	۲	۳	۴	۱	۲	۳	۴
غلظت RNA	۱/۴۵	۱/۳۵	۱/۲۵	۱/۴	۱/۲۳	۱/۲۶	۱/۳۶	۱/۳۲	۱/۳۰	۱/۳۲	۱/۳۸	۱/۴۷
نسبت ۲۶۰/۲۸۰	۱/۸۵	۱/۹۶	۱/۹۰	۱/۹۹	۱/۵۸	۱/۹۸	۱/۷۶	۱/۶۶	۱/۸۶	۱/۹۵	۲/۰۱	۲/۰۹
نسبت ۲۶۰/۲۳۰	۲/۱۵	۲/۰۷	۲/۰۵	۲/۰۸	۲/۰۶	۱/۹۸	۱/۳۴	۲/۱۰	۱/۰۹	۱/۴	۱/۲۷	۲/۰۳

بررسی هیستوپاتولوژی کبد: برش بافتی از کبد سه گروه آزمایشی، برای بررسی تغییرات بافتی تهیه شد. ۲۸ روز پس از انسداد مجرای صفراوی موش‌ها با کلروفرم کشته شدند. سپس کبد آن‌ها از بدن خارج شده و پس از شستشو، از فرمالین ۱۰ درصد به عنوان تثبیت کننده استفاده شد و با استفاده از الکل، آبگیری و با استفاده از تولوئن، شفاف سازی انجام شد. در مراحل بعد نمونه‌ها در داخل پارافین مذاب قالب‌گیری شدند و با استفاده از میکروتوم روتاری (مدل DS 8402 شرکت دید سبز، ایران) برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرون انجام شد. نمونه‌ها روی لام قرار گرفتند و سپس با هماتوکسیلین– ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. به منظور نگه‌داری طولانی مدت برش‌های بافتی با استفاده از چسب انتلان و لامل، نمونه‌ها روی لام فیکس شدند. سپس با میکروسکوپ نوری (شرکت micros AUSTRIA، اتریش) به بررسی بافت کبدی و تغییرات ایجاد شده پس از کلستاز در مقایسه با گروه کنترل و شم پرداخته شد.

تحلیل آماری: نتایج به صورت میانگین±خطای استاندارد (SEM) شاخص‌ها در هر گروه بیان شد. بعد از اطمینان از نرمال بودن توزیع متغیرهای کمی با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف[21]، از آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و بدنبال آن آزمون تکمیلی Tukeysبرای مقایسه‌های چندگانه استفاده شد. در همه تحلیل‌ها $P<$ ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

[21] Kolmogorov-Smirnov

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

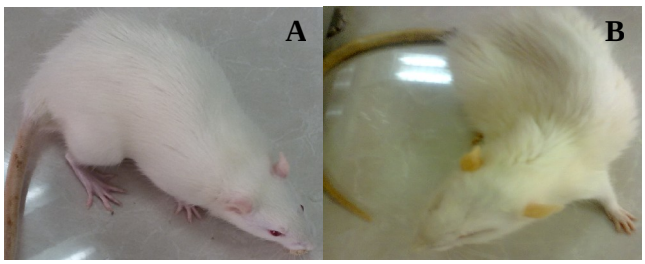
[DOI: 10.22102/22.4.68]

یافته‌ها

در این پژوهش، مقایسه ظاهر موش‌های بزرگ آزمایشگاهی گروه کلستاتیک با موش‌های گروه شم تغییر رنگ گوش‌ها، دُم و زرد شدن ادرار را نشان داد (شکل۲). همچنین موش‌های کلستاتیک کاهش وزن معنی‌داری ($P< ۰/۰۰۲$) را بعد از جراحی نشان دادند، در صورتیکه این کاهش وزن در موش‌های گروه شم معنی دار نبود ($P= ۰/۹۰۹$). این یافته‌ها موفقیت آمیز بودن پروتکل القایی را درگروههای آزمایشی نشان داد.

بررسی سطح T Bil در گروه کلستاتیک در مقایسه با دو گروه دیگر تفاوت معنی‌داری نشان داد ($P<۰/۰۰۱$). این الگو در مورد میزان سطح سرمی آنزیم‌های AST, ALT, ALP نیز صادق بوده و افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P<۰/۰۰۱$)(جدول ۴). میزان معنی‌داری آنزیم ALP ($P<۰/۰۰۰۱$) بیشتر از میزان معنی‌داری آنزیم‌های ALT و AST ($P<۰/۰۰۱$) بود. بررسی مقاطع میکروسکوپی بافت کبد در موش‌های کلستاتیک نشان داد که کلستاز باعث هجوم بافت فیبروز و تجمع لوکوسیتها در اطراف مجاری سیاهرگ مرکز لوبولی و تکثیر مجاری صفراوی می‌شود (شکل۳ C و E).

در بررسی بیان ژن *Drp1*، شدت باندهای مربوط به ژل الکتروفورز به مقادیر کمی تبدیل شده و سپس مقادیر به دست آمده برای بیان ژن *Drp1* در هر موش نسبت به مقادیر به دست آمده برای ژن بتا اکتین، نرمال شده است. بیان ژن در گروه کنترل به عنوان ۱۰۰ درصد بیان نسبی ژن *Drp1* در نظر گرفته شد و داده‌های مربوط به بیان ژن *Drp1* در سایر گروهها نسبت به گروه کنترل مقایسه شد. این نتایج افزایش معنی‌دار ($P<۰/۰۰۱$) میزان بیان ژن *Drp1* را در گروه کلستاتیک به نسبت گروه‌های کنترل و شم نشان می‌دهد (شکل ۴).



شکل ۲- مقایسه ظاهری موش صحرایی گروه شم (A) با موش صحرایی ۲۸ روز پس از انسداد مجرای صفراوی (B). زرد شدن گوش‌ها و دم در موش صحرایی جراحی شده با انسداد مجرای صفراوی به وضوح دیده می‌شود.

جدول ۲- توالی پرایمرهای طراحی شده برای ژن‌های *Drp1* و *β-act*

ژن	پرایمر	توالی (5'-3')	دمای اتصال (^{0}C)	قطعه تکثیر شده (bp)
Drp1	رفت	ATGCTCGCTATCACTGCCAAC	۵۹	۴۵۴
	معکوس	CGTTTGCCAGTAAGCAATTTAACC	۵۹	
β-act	رفت	GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG	۵۹	۲۰۰
	معکوس	ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA	۵۹	

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

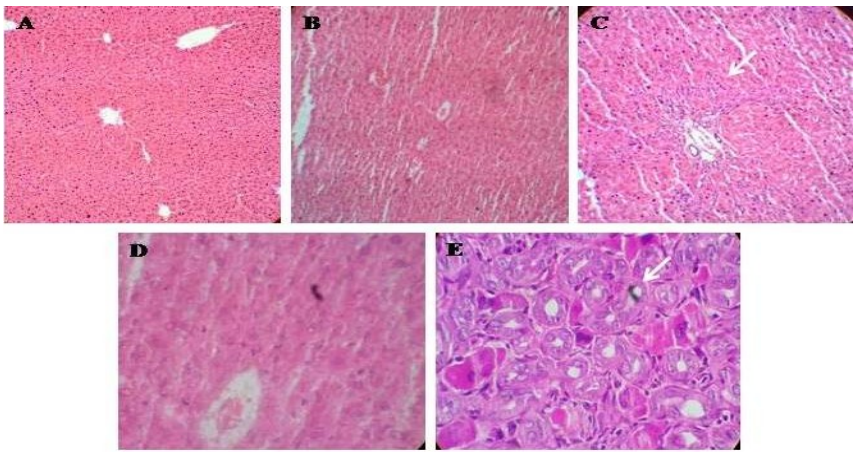
[DOI: 10.22102/22.4.68]

جدول ۳- برنامهٔ تنظیم شده برای PCR

ردیف	تعداد چرخه‌ها	مراحل	زمان (ثانیه)	دما (^{0}C)
۱	۱ چرخه	واسرشت اولیه	۳ دقیقه	۹۵
۲	۲۷ چرخه	واسرشت	۳۰ ثانیه	۹۴
۳		اتصال پرایمرها	۳۰ ثانیه	۵۹
۴		بسط	۲ دقیقه	۷۲
۵	۱ چرخه	بسط نهایی	۱۰ دقیقه	۷۲

جدول ۴- نتایج تغییرات فیزیولوژیک ناشی از انسداد مجرای صفراوی شامل اندازه‌گیری سطح سرمی بیلی‌روبین کل و آنزیم‌های کبدی. $P<0.0001$*** و $P<0.001$** نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گروه‌های شم و کنترل.

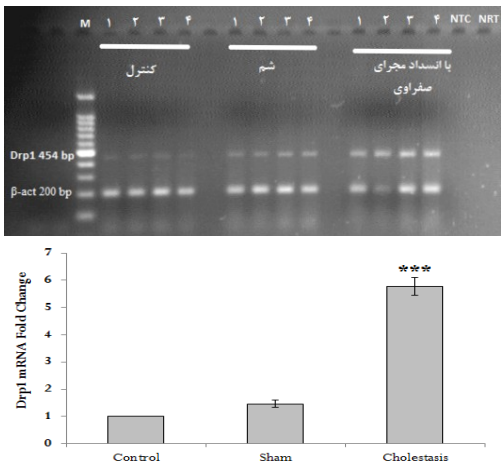
فاکتور سرمی	کنترل	شم	با انسداد مجرای صفراوی
T Bil (mg/dl)	۰/۳۰± ۰/۲۵	۰/۲۵± ۰/۱۷	۸/۳۸± ۲/۲***
ALT (u/l)	۲۳ ± ۶	۲۳± ۵/۵	۵۶± ۱۴**
AST (U/L)	۱۶۳±۳۶	۱۵۸± ۵۳	۳۲۹±۸۱ **
ALP (U/L)	۵۹۹± ۱۷۵	۳۶۸±۹۷	۱۲۳۸ ± ۱۶۸***



شکل ۳-مقاطع میکروسکوپی بافت کبد موش‌های سه گروه کنترل ، شم و با انسداد مجرای صفراوی. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین. شکل‌های A تا C به ترتیب مربوط به مقاطع موش کنترل، شم و کلستاتیک است. نوک پیکان بافت فیبروزی و سلولهای لوکوسیت را در اطراف سیاهرگ مرکز لوبولی نشان می‌دهد (شکل C)(بزرگنمایی x100). شکل‌های D و E به ترتیب مربوط به مقطع کبدی موش‌های گروه کنترل و گروه کلستاتیک است. نوک پیکان تکثیر مجاری صفراوی را نشان می‌دهد (شکل E). (بزرگنمایی x400).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

[DOI: 10.22102/22.4.68]



شکل ۴- قسمت بالا تصویر ژل الکتروفورز مربوط به بیان ژن*Drp1* و ژن *β – Actin* در سه گروه آزمایشی. علامت M نشان دهندهٔ نشانگر یا خط‌کش ژنی ۱۰۰ جفت بازی و اعداد ۱ تا ۴ بر روی چاهک‌ها مشخص کنندهٔ شمارهٔ ۴ نمونه تصادفی در هر گروه آزمایشی می‌باشد. محل باندهای ژن‌های *Drp1* و *Actin– β* در کنار هر باند آنها مشخص شده است. NTC (نمونهٔ کنترل بدون استفاده از cDNAحداقل برای یکی از نمونه‌های آزمایشی در انجام PCR)، NRT (نمونهٔ کنترل بدون استفاده از آنزیم رونویسی معکوس در تولید cDNA حداقل برای یکی از نمونه‌های آزمایشی). قسمت پایین نمودار میزان بیان ژن *Drp1* را به نسبت گروه کنترل نشان می‌دهد. $P<0.001$*** تفاوت معنی دار با گروه کنترل و گروه شم را نشان می دهد.

بحث

نتایج سطوح سرمی تستهای عملکردی کبد در گروههای مختلف در این مطالعه نشان داد که با القاء کلستاز کبدی سطح این آنزیمها نسبت به نتایج گروههای کنترل و شم بصورت معنی‌دار افزایش یافت. این نتایج هماهنگ با مطالعات مشابه در رابطه با القاء مدل کلستاز کبدی و افزایش سطح سرمی آنزیمهای عملکردی کبد بود (۲۰-۱۸). همچنین بررسیهای پاتولوژیک کبد و تغییرات مشاهده شده در گروه کلستاز در مقایسه با سایر گروهها نشان داد که القاء مدل در حیوانات گروه کلستاز بدرستی انجام شده و با سایر نتایج در این زمینه هم خوانی دارد (۲۲و ۲۱و ۱۸).

بررسی‌های انجام شده روی بیماران مبتلا به کلستاز و روی مدل‌های مطالعاتی کلستاز تغییر هومئوستاز انرژی را نشان می‌دهد. در کلستاز با تجمع اسیدهای صفراوی بسته به میزان آبگریز بودن آنها، اثرات سیتوتوکسیک روی هپاتوسیت‌ها اعمال می‌شود. بخشی از این اثرات مربوط به ورود اسیدهای صفراوی در غشاء میتوکندری هپاتوسیت‌ها و کاهش محتویات فسفولیپیدی و به این ترتیب به‌هم‌ریختگی ترکیب غشای میتوکندری است. این ویژگی اسیدهای صفراوی می‌تواند باعث تغییر سیالیت و پتانسیل غشای میتوکندری و کاهش تولید ATP شود. در واقع اسیدهای صفراوی به صورت مستقیم فعالیت کمپلکس‌های آنزیمی زنجیره انتقال الکترون را تخریب می‌کنند و روی عملکردهای آنها یعنی تولید ATP و گونه‌های فعال اکسیژن اثر منفی دارند (۳). کاهش تحریک بیوژنز میتوکندری و حذف mtDNA نیز در کلستاز طولانی مدت نشان داده شده است (۴). استرس‌های متابولیکی مانند کلستاز که به میتوکندری‌های سلول آسیب وارد می‌کنند، می‌توانند باعث فعال شدن

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

[DOI: 10.22102/22.4.68]

فرآیند تکه تکه شدن (شکافت) میتوکندری شوند. این تکه تکه شدن منجر به تخریب میتوکندری‌های معیوب از طریق میتوفاژی یا در موارد آسیب شدید منجر به آپوپتوز می‌شود (۲۳). در مطالعات گذشته بر روی کلستاز، تنظیم القاء آپوپتوز کبدی را به مکانیسم‌های چندگانه نسبت داده‌اند. این محققین معتقدند از یک سو تحریک گیرنده‌های مرگ موجود بر روی غشای سلول مانند Fas و از سوی دیگر مرگ وابسته به میتوکندری در القاء آپوپتوز کبدی نقش دارند. در آپوپتوز میتوکندریایی، تجمع نمکهای صفراوی باعث نفوذپذیر کردن غشای خارجی میتوکندری و آزادسازی پروتئین‌های پیش آپوپتوزی مانند سیتوکروم c به سیتوزول شده و نهایتا فعال شدن کاسپازها صورت می‌گیرد (۳). تغییر مورفولوژی میتوکندری به‌صورت بروز شکافت و تکه تکه شدن غشای آن، وقوع آپوپتوز را تسهیل می‌کند (۲۶-۲۴). در فرایند استئاتوز کبدی، تغییرات مورفولوژی میتوکندری در داخل سیتوزول سلولهای هپاتوسیت مشاهده شده است (۱۳و ۱۲). در مطالعه‌ایی که بر روی کبد بیماران با عارضه کلستاز خارج کبدی انجام شد، کاهش سطح بیان پروتئین MFN2 مشاهده شد. این پروتئین در فرایند هم‌جوشی غشای میتوکندری (عکس شکافت غشایی) ایفای نقش می‌کند. این محققین کاهش سطح بیان پروتئین MFN2 را در کشت سلولهای هپاتوسیت طبیعی انسانی در حضور گلیکوکنوداکسی‌کولات (GCDC[۲۲])، یکی از مهمترین اسیدهای صفراوی سمی انباشته شده در فرایند کلستاز، نیز به‌دست آوردند (۲۷). به این ترتیب تغییر مورفولوژی میتوکندری و یا به عبارتی تغییر پویایی میتوکندری در کلستاز دیده شده است.

از دیگر فاکتورهای مهم تاثیرگذار در فرایند تغییر مورفولوژی و بروز شکافت میتوکندری، پروتئین سیتوزولی DRP1 است. در هنگام وقوع آپوپتوز در سلول، افزایش حضور و فعالیت این پروتئین دیده می‌شود. در واقع DRP1 با دخالت در مسیر شکافت میتوکندری، به روند آپوپتوز کمک می‌کند (۲۸). در مطالعه حاضر، بررسیهای بیان ژن *Drp1* نشان داد که القاء مدل کلستاز کبدی در موش صحرایی باعث افزایش بیان ژن *Drp1* سلولهای هپاتوسیت کبدی در گروه کلستاز در مقایسه با سایر گروهها شد. افزایش احتمالی سطح فعالیت بیان ژن و پروتئین DRP1 در سلولهای کبدی یکی از علل احتمالی اثرات کلستاز بر کبد است. یافته‌ی این مطالعه موید آن است که افزایش بیان ژن پروتئین DRP1 در سلولهای کبدی در اثر القاء کلستاز در مدل حیوانی ناشی از افزایش روند آپوپتوز در این سلولهای آسیب دیده است.

در تایید یافته‌های ما در مطالعه‌ی انجام شده توسط یو و همکاران بر روی سلولهای هپاتوسیت در محیط کشت، نشان می‌دهد که GCDC، موجب تکه تکه شدن میتوکندری و مرگ سلولی می‌شود و با کنترل بیان ژن پروتئین DRP1 در این سلولها، فرایند آپوپتوز و تولید ROS کاهش می‌یابد. در ادامه، این محققین با القای کلستاز در موشهای تراریخته نقش ژن *Drp1* را مورد بررسی قرار دادند. نتایج آنها نشان داد که مهار بیان ژن *Drp1* باعث کاهش ROS و آپوپتوز می‌شود و این مطلب نشان دهنده‌ی نقش این پروتئین در فرایند آسیب سلولی می‌باشد. نکته حائز اهمیت اینکه مهار ROS در کاهش شکافت میتوکندری نقشی ندارد در حالیکه مهار فرایند شکافت میتوکندری، موجب کاهش تولید ROS می‌شود (۱۵). از طرف دیگر در موشهای با عارضه بیماری کبد چرب غیر الکلی، مهار پروتئین DRP1 باعث بهبود علائم کبدی مانند فیبروز و آسیب کبدی می‌شود (۲۹). پروتئین MFF[۲۳] یکی از گیرنده‌های روی غشای خارجی میتوکندری است که در هنگام شکافت غشایی، پروتئین DRP1 سیتوزولی را به طرف میتوکندری می‌کشاند (۳۰). در مدل حیوانی بیماری کلستاز کاهش فعالیت پروتئین AMPK[۲۴] دیده شده است

[22] Glycochenodeoxycholate

[23] Mitochondrial Fission Factor

[24] (AMP)-Activated Protein Kinase

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

[DOI: 10.22102/22.4.68]

(۴). این پروتئین با فسفریلاسیون پروتئین MFF باعث فعال شدن آن و وقوع شکافت میتوکندری می‌شود (۳۰). بنابراین افزایش بیان پروتئین DRP1 در مدل کلستاز می‌تواند پاسخی جبران از طرف سلول باشد تا بتواند اثر کاهش فعالیت AMPK را جبران کند و از کاهش فرآیند شکافت،که برای بروز آپوپتوز ضروری است، جلوگیری کند.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که القاء کلستاز کبدی در مدل حیوانی، موجب افزایش بیان ژن *Drp1* در سلولهای کبدی می‌شود. بنابراین یکی از مسیرهای احتمالی در تخریب و مرگ سلولهای کبدی در بیماری کلستاز می‌تواند افزایش فرایند شکافت میتوکندری به‌واسطه‌ی افزایش پروتئین DRP1 باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشکده علوم دانشگاه کردستان و مرکز تحقیقات گوارش و کبد دانشگاه علوم پزشکی کردستان اعلام می‌دارند.

References

1. Li T, Chiang JY. Bile Acid signaling in liver metabolism and diseases. J Lipids 2012;2012:754067.
2. Malhi H, Gores GJ. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. Gastroenterology 2008;134:1641-54.
3. Arduini A, Serviddio G, Tormos AM, Monsalve M, Sastre J. Mitochondrial dysfunction in cholestatic liver diseases. Front Biosci 2012;4:2233-52.
4. Arduini A, Serviddio G, Escobar J, Tormos AM, Bellanti F, Vina J, et al. Mitochondrial biogenesis fails in secondary biliary cirrhosis in rats leading to mitochondrial DNA depletion and deletions. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2011;301:119-27.
5. Perez-Carreras M, Del Hoyo P, Martin MA, Rubio JC, Martin A, Castellano G, et al. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology 2003;38:999-1007.
6. Landes T, Leroy I, Bertholet A, Diot A, Khosrobakhsh F, Daloyau M, et al. OPA1 (dys)functions. Semin Cell Dev Biol 2010;21:593–8.
7. Rahimmi A, Khosrobakhsh F, Izadpanah E, Moloudi MR, Hassanzadeh K. N-acetylcysteine prevents rotenone-induced Parkinson's disease in rat: An investigation into the interaction of parkin and Drp1 proteins. Brain Res Bull 2015;113:34-40.
8. Yu T, Wang L, Yoon Y. Morphological control of mitochondrial bioenergetics. Front Biosci 2015;20:229-46.
9. Yu T, Robotham JL, Yoon Y. Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. Proc Natl Acad Sci USA 2006;103:2653-8.
10. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. Gastroenterology 2001;120:1183-92.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

[DOI: 10.22102/22.4.68]

11. Lomonaco R, Sunny NE, Bril F, Cusi K. Nonalcoholic fatty liver disease: current issues and novel treatment approaches. Drugs 2013;73:1-14.
12. Caldwell SH, Swerdlow RH, Khan EM, Iezzoni JC, Hespenheide EE, Parks JK, et al. Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. J Hepatol 1999;3:430-4.
13. Caldwell SH, de Freitas LAR, Park SH, Moreno MLV, Redick JA, Davis CA, et al. Intramitochondrial crystalline inclusions in nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology 2009;49:1888-95.
14. Reddy PH, Reddy TP, Manczak M, Calkins MJ, Shirendeb U, Mao P. Dynamin-related protein 1 and mitochondrial fragmentation in neurodegenerative diseases. Brain Res Rev 2011;67:103-18.
15. Yu T, Wang L, Lee H, O'Brien DK, Bronk SF, Gores GJ, et al. Decreasing mitochondrial fission prevents cholestatic liver injury. J Biol Chem 2014;289:34074-88.
16. Izadpanah E, Hassanzadeh K, Yousefinejad V, Shahveisi K, Fatahi N, Moloudi MR. Effect of selegiline on liver cholestasis induced by bile duct ligation in rat. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences (SJKUMS) 2016;21:20-30. [In Persian]
17. Ahmadi S, Karami Z, Mohammadian A, Khosrobakhsh F, Rostamzadeh J. Cholestasis induced antinociception and decreased gene expression of MOR1 in rat brain. Neuroscience 2015;284:78-86.
18. Giménez-Garz? C, Salhi D, Urios A, Ru?z-Sauri A, Carda C, Montoliu C, et al. Rats with mild bile duct ligation show hepatic encephalopathy with cognitive and motor impairment in the absence of cirrhosis: effects of alcohol ingestion. Neurochem Res 2015;40:230-40.
19. Nabavizadeh F, Moloudi R, Dehpour AR, Nahrevanian H, Shahvaisi K, Salimi E. The effects of cholestasis and cirrhosis on gastric acid and pepsin secretions in rat: Involvement of nitric oxide. Iran J Basic Med Sci 2010;13:207-12.
20. Moloudi MR, Hassanzadeh K, Rouhani S, Zandi F, Ahmadi A, Khalwatian P, et al. Effect of chloroformic extract of Cichorium intybus on liver function tests and serum level of TNF-α in obstructive cholestasis in rat. Scientific Journal of Kurdistan University of Medical Sciences (SJKUMS) 2014;19:10-19.
21. Mitchell C, Mahrouf-Yorgov M, Mayeuf A, Robin MA, Mansouri A, Fromenty B, et al. Overexpression of Bcl-2 in hepatocytes protects against injury but does not attenuate fibrosis in a mouse model of chronic cholestatic liver disease. Lab Invest 2011;91:273-82.
22. Eslimi ID, Oryan S, Nabuni M, AzarinaZ M, Tabatabaei Z.S. The considering of histological changes of liver in cholestatic rats in different time periods. Cell Tissue Res 2013;4:55-61.
23. Mishra P, Chan DC. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. Nat Rev Mol Cell Biol 2014;15:634-46.
24. Montessuit S, Somasekharan SP, Terrones O, Lucken-Ardjomande S, Herzig S, Schwarzenbacher R, et al. Membrane remodeling induced by the dynamin-related protein Drp1 stimulates Bax oligomerization. Cell 2010;142:889-901.
25. Youle RJ, Karbowski M. Mitochondrial fission in apoptosis. Nat Rev Mol Cell Biol 2005;6:657-63.
26. Green DR, Galluzzi L, Kroemer G. Metabolic control of cell death. Science 2014;345:1250256.
27. Chen Y, Lv L, Jiang Z, Yang H, Li S, Jiang Y. Mitofusin 2 protects hepatocyte mitochondrial function from damage induced by GCDCA. PloS One 2013;8:e65455.
28. Elgass K, Pakay J, Ryan MT, Palmer CS. Recent advances into the understanding of mitochondrial fission. Biochim Biophys Acta 2013;1833:150-61.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

[DOI: 10.22102/22.4.68]

29. Galloway CA, Lee H, Brookes PS, Yoon Y. Decreasing mitochondrial fission alleviates hepatic steatosis in a murine model of nonalcoholic fatty liver disease. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2014;307:G632-41.
30. Toyama EQ, Herzig S, Courchet J, Lewis TL, Los?n OC, Hellberg K, et al. AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress. Science 2016;351:275-81.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-11-17]

[DOI: 10.22102/22.4.68]