

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

Khosrobakhsh F¹, PhD, Moloudi M.R., PhD², Bigdelo M., MSc³, Rahimmi A., MSc³

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. These 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

بررسی اثر کلستاز بر بیان ژن پروتئین مربوط به دینامین - ۱ در کبد موش بزرگ

آزمایشگاهی

فریاد خسروبخش^۱، محمد رمان مولودی^۲، مریم بیگدلو^۳، آرمان رحیمی^۴

۱. استادیار گروه علوم زیستی، دانشکده علوم، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران. (مؤلف مسؤل)، 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 نکرولی 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 25 ± 290 گرم) در سه گروه کنترل (بدون جراحی)، شم (جراحی بدون انسداد مجرای صفراوی) و کلستاز (جراحی همراه با انسداد مجرای صفراوی) استفاده شد. در روز ۱۲ام پس از انسداد مجرای صفراوی، حیوانات توزین و به منظور بررسی سطح بیلی‌روبین و آنزیم‌های عملکرد کبدی از آنها خون‌گیری 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، آسپاراتات آمینوترانسفراز^۴ و آلکالین آمینوترانسفراز^۵ را در گروه کلستاز نسبت به گروه‌های شم و کنترل نشان داد ($P < 0.001$) و ($P < 0.001$). نتایج بررسی شاخص‌های بافتی در گروه کلستاز، افزایش مجاری صفراوی، نکرول بافت کبد و گسترش بافت فیبروزی را نشان داد. نتایج RT-PCR افزایش معنادار ($P < 0.001$) 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 در آسیب‌شناسی 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)

عبارتند از: پروتئین‌های DRP1 و FIS1 که در شکافت غشای میتوکندری و پروتئین‌های OPA1 و MFN1,2 که در همجوشی میتوکندری نقش دارند. فقدان پروتئین‌های MFN1, MFN2 و OPA1 موجب تکه‌تکه شدن و فقدان DRP1 موجب طویل شدن میتوکندری می‌شود (۸-۶). 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 بیوانرژیکی 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 (۹-۱۱)، 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)^۸ نشان داده شده است (۱۳ و ۱۲)، فرضیه دخالت ساز و کار 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^۹ 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

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 پلازما 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 (۱ و ۲). کلستاز با تغییرات عمیق متابولیکی از جمله تغییر در عملکرد میتوکندری، کاهش اکسیداسیون اسیدهای چرب، کاهش تشکیل اجسام کتون، 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 بیورنز میتوکندری نقش دارند (۴ و ۵).

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^۶ و شکافت^۷ 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

⁸ Non-alcoholic fatty liver disease

⁹ Yu

⁶ Fusion

⁷ Fission

بزرگ آزمایشگاهی، مدل آزمایشگاهی بیماری کلستاز ایجاد شد؛ سپس تغییرات بیان ژن *Drrp1* 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^{۱۱} در محدوده وزنی 25 ± 290 گرم استفاده شده است. حیوانات در حیوان‌خانه دانشکده علوم دانشگاه کردستان با دسترسی کافی به آب و غذا (۲۴ ساعت قبل از جراحی ناشتا بودند)، درجه حرارت 24 ± 24 درجه سانتی‌گراد و دوره روشنایی/تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. حیوانات به صورت کاملاً تصادفی به سه گروه (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 بین‌المللی 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 (50 mg/kg) و زایلازین (10 mg/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 کاملاً ضد عفونی 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 5 ± 70 میلی‌گرم نمونه برداری شد. نمونه‌های جدا شده به داخل میکروتیوب‌های عاری از نوکلئاز که حاوی محلول RNeasy (شرکت کیاژن، آمریکا) بود، منتقل گردیدند. بافت‌های استخراج شده در محلول RNeasy در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری و سپس، محلول RNeasy توسط سمپلر خارج گردید. میکروتیوب‌های حاوی بافت کبد تا زمان استخراج در فریزر -80 درجه سانتی‌گراد 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^{۱۱} 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^{۱۱} 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

¹¹Trizol

¹²Bromochloropropane

¹⁰Wistar

در نهایت خشک کردن رسوب و حل کردن رسوب با آب معکوس مربوط به ژن‌های مورد نظر در نواحی اتصال دو آگرون 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^{۱۷} (کنترلی که در واکنش تبدیل RNA به cDNA از آنزیم نسخه‌بردار معکوس استفاده نشده بود) و کنترل NTC^{۱۸} (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 پلیمرایز: واکنش زنجیره‌ای پلیمرایز 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^{۱۹} 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^{۲۰} (شرکت نانوزل، آلمان) عکس‌برداری از ژل‌ها انجام شد و به کمک برنامه آنالیز عکس [ImageJ، باندهای موجود بر روی ژل آگارز به صورت کمی در آمد.

رسوب دهی RNA و جداسازی RNA کل اضافه شد. تیمار شده با دی اتیل پیروکربنات^{۱۳} و مهار کننده آنزیم RNase^{۱۴} انجام شد و در نهایت RNA استخراج شده در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

سنجش کیفی و کمی RNA: به منظور بررسی کیفیت RNA کل استخراج شده، از الکتروفورز آن بروی ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. باندهای واضح RNA های ریوزومی ۲۸S و ۱۸S و نسبت تقریبی دو به یک باندها، به عنوان ملاک سالم بودن RNA کل استخراج شده در نظر گرفته شد (شکل ۱). سنجش کمی برای تعیین غلظت RNA کل، به روش اسپکتروفوتومتری انجام شد و از میزان جذب به دست آمده در طول موج ۲۶۰ نانومتر برای تعیین غلظت RNA کل استخراج شده از نمونه‌ها استفاده شد. میزان کمی غلظت RNA به دست 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 RNA استخراج شده است در جدول ۱ آورده شده است.

ساخت cDNA: غلظت RNA 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 پلیمرایز (RT-PCR)^{۱۵} نیمه کمی^{۱۶} برای بررسی تغییرات بیان ژن استفاده شد. توالی mRNA ژن‌های *Drp1* (NM-053655) و بتا اکتین (NM-031144) و نواحی اتصال آگرون‌ها از داده پایگاه اطلاعاتی NCBI به دست آمد. برای جلوگیری از تکثیر احتمالی DNA، یکی از پرایمرهای رفت و

¹⁷No reverse transcriptase control

¹⁸No template control

¹⁹DNA ladder

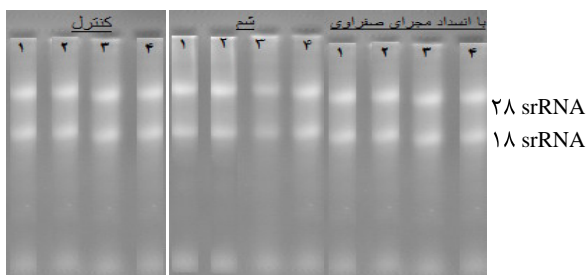
²⁰Gel documentation system

¹³Diethyl Pyrocarbonate (DEPC)

¹⁴ RNase inhibitor

¹⁵Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

¹⁶Semi-quantitative



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 rRNA ریپوزومی ۲۸S و ۱۸S می‌باشد.

جدول ۱- نتایج اندازه‌گیری غلظت و شاخص‌های خلوص rRNA 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	۱/۳۲	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

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 کلسکار در مقایسه با گروه کنترل و شم پرداخته شد. تحلیل آماری: نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد (SEM) شاخص‌ها در هر گروه بیان شد. بعد از اطمینان از نرمال بودن توزیع متغیرهای کمی با استفاده از آزمون کولموگوروف-اسمیرنوف^{۲۱}، از آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و بدنبال آن آزمون تکمیلی Tukeys برای مقایسه‌های چندگانه استفاده شد. در همه تحلیل‌ها $P < ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

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 کلروفورم 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 تولون، 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 همتوکسیلین-ائوزین رنگ‌آمیزی شدند. به منظور نگاه‌داری طولانی مدت برش‌های بافتی با استفاده از

²¹ Kolmogorov-Smirnov

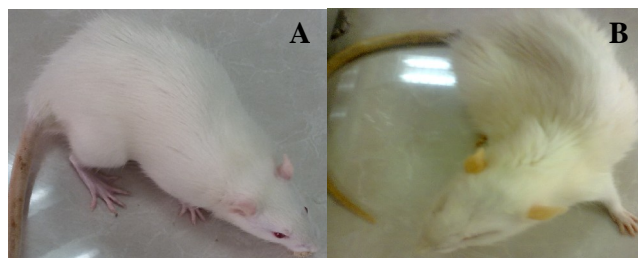
یافته‌ها

در این پژوهش، مقایسه ظاهر موش‌های بزرگ آزمایشگاهی گروه کلاستاتیک با موش‌های گروه شم تغییر رنگ گوش‌ها، دم و زرد شدن ادرار را نشان داد (شکل ۲). همچنین موش‌های کلاستاتیک کاهش وزن معنی‌داری ($P < 0/002$) را بعد از جراحی نشان دادند، در صورتیکه این کاهش وزن در موش‌های گروه شم معنی‌دار نبود ($P = 0/909$). این یافته‌ها موفقیت آمیز بودن پروتکل القایی را در گروه‌های آزمایشی نشان داد.

بررسی سطح T Bil در گروه کلاستاتیک در مقایسه با دو گروه دیگر تفاوت معنی‌داری نشان داد ($P < 0/001$). این الگو در مورد میزان سطح سرمی آنزیم‌های AST, ALT, ALP نیز صادق بوده و افزایش معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/001$) (جدول ۴). میزان معنی‌داری آنزیم ALP ($P < 0/001$) بیشتر از میزان معنی‌داری آنزیم‌های ALT و AST ($P < 0/001$) بود. بررسی مقاطع میکروسکوپی بافت

کبد در موش‌های کلاستاتیک نشان داد که کلاستاز باعث هجوم بافت فیروز و تجمع لوکوسیتها در اطراف مجاری سیاهرگ مرکز لوبولی و تکثیر مجاری صفراوی می‌شود (شکل ۳ 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 ($P < 0/001$) میزان بیان ژن *Drp1* را در گروه کلاستاتیک 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*

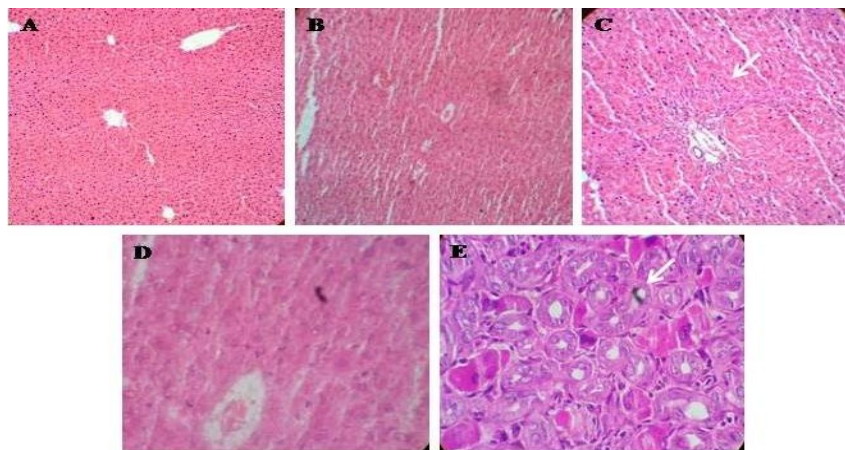
ژن	پرایمر	توالی (5'-3')	دمای اتصال (°C)	قطعه تکثیر شده (bp)
<i>Drp1</i>	رفت	ATGCTCGCTATCACTGCCAAC	۵۹	۴۵۴
	معکوس	CGTTTGCCAGTAAGCAATTTAACC	۵۹	
<i>β-act</i>	رفت	GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG	۵۹	۲۰۰
	معکوس	ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA	۵۹	

جدول ۳- برنامه تنظیم شده برای PCR

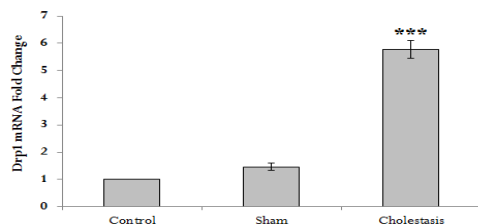
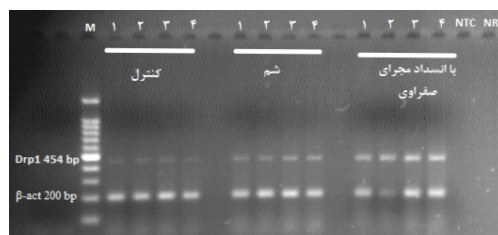
ردیف	تعداد چرخه‌ها	مراحل	زمان (ثانیه)	دما (°C)
۱	۱ چرخه	واسرشت اولیه	۳ دقیقه	۹۵
۲		واسرشت	۳۰ ثانیه	۹۴
۳	۲۷ چرخه	اتصال پرایمرها	۳۰ ثانیه	۵۹
۴		بسط	۲ دقیقه	۷۲
۵	۱ چرخه	بسط نهایی	۱۰ دقیقه	۷۲

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)	0.30 ± 0.25	0.25 ± 0.17	8.38 ± 2.2 ***
ALT (u/l)	23 ± 6	$23 \pm 5/5$	56 ± 14 **
AST (U/L)	163 ± 36	158 ± 53	329 ± 81 **
ALP (U/L)	599 ± 175	368 ± 97	1238 ± 168 ***



شکل ۳- مقاطع میکروسکوپی بافت کبد موش‌های سه گروه کنترل، شم و با انسداد مجرای صفراوی. رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و انوزین. 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 100x). 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 400x).



شکل ۴- قسمت بالا تصویر ژل الکتروفورز مربوط به بیان ژن *Drp1* و ژن β -*Actin* در سه گروه آزمایشی. علامت M نشان دهنده نشانگر یا خط کش ژنی ۱۰۰ جفت بازی و اعداد ۱ تا ۴ بر روی جاهکدها مشخص کننده شماره ۴ نمونه تصادفی در هر گروه آزمایشی می باشد. محل باندهای ژن های *Drp1* و *Actin* - β در کنار هر باند آنها مشخص شده است. NTC (نمونه کنترل بدون استفاده از cDNA) حداقل برای یکی از نمونه های آزمایشی در انجام PCR، NRT (نمونه کنترل بدون استفاده از آنزیم رونویسی معکوس در تولید cDNA) حداقل برای یکی از نمونه های آزمایشی. قسمت پایین نمودار میزان بیان ژن *Drp1* را به نسبت گروه کنترل نشان می دهد. $P < 0.001$ *** 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 معنی دار 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 (۲۲ و ۲۱ و ۱۸).

بررسیهای انجام شده روی بیماران مبتلا به کلستاز و روی مدل های مطالعاتی کلستاز تغییر همئوستاز انرژی را نشان می دهد. در کلستاز با تجمع اسیدهای صفراوی بسته به میزان

آبگریز بودن آنها، اثرات سیتوتوکسیک روی هپاتوسیتها اعمال می شود. بخشی از این اثرات مربوط به ورود اسیدهای صفراوی در غشاء میتوکندری هپاتوسیتها و کاهش محتویات فسفولیپیدی و به این ترتیب به هم ریختگی ترکیب غشای میتوکندری است. این ویژگی اسیدهای صفراوی می تواند باعث تغییر سیالیت و پتانسیل غشای میتوکندری و کاهش تولید ATP شود. در واقع اسیدهای صفراوی به صورت مستقیم فعالیت کمپلکس های آنزیمی زنجیره انتقال الکترون را تخریب می کنند و روی عملکردهای آنها یعنی تولید ATP و گونه های فعال اکسیژن اثر منفی دارند (۳). کاهش تحریک بیوژنز میتوکندری و حذف mtDNA نیز در کلستاز طولانی مدت نشان داده شده است (۴). استرس های متابولیکی مانند کلستاز که به میتوکندری های سلول آسیب وارد می کنند، می توانند باعث فعال شدن

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 فیروز 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

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 نهایتاً فعال شدن کاسپازها صورت می‌گیرد (۳). تغییر مورفولوژی میتوکندری به صورت 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 (۱۳ و ۱۲). در مطالعه‌ای 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 گلیکوکونداکسی کولات (GCDC^{۲۲})، یکی از مهمترین اسیدهای صفراوی سمی انباشته شده در فرایند کلستاز، نیز به دست 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

²³ Mitochondrial Fission Factor

²⁴ (AMP)-Activated Protein Kinase

²² Glycochenodeoxycholate

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.

(۴). این پروتئین با فسفریلاسیون پروتئین MF۱ 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 به واسطه‌ی افزایش پروتئین DRP1 باشد.

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.

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, Hespeneide 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.

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.