



مقاله پژوهشی

مدل‌سازی *in-vivo* فرآیند هپاتوکارسینوژنیز به وسیله تیواستامید

سحر فرزانه: دانشجوی دکتری تکوین، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، پرند، ایران

MS. سعید صالحی پور: استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، پرند، ایران (نویسنده مسئول) m.salehypur@gmail.com

فرزانه توفیضی: دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، پرند، ایران

وحید ناصح: استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، پرند، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

مدل‌سازی،
موش،
سرطان کبد،
پاتولوژی،
تیواستامید

زمینه و هدف: مدل‌های سرطان موش، کمک قابل توجهی به محققان دربارهٔ مکانیسم‌های تومورزایی در سیستم‌های پویا می‌نماید. یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها، هپاتوکارسینوما یا سرطان سلول‌های کبد می‌باشد که از اندام‌های حیاتی متابولیسم مواد شیمیایی است. تیواستامید به عنوان یک سم تخریب‌کننده بافت کبد بوده و در بسیاری از صنایع همچون چرم، نساجی، کاغذ و لاستیک‌سازی مورد استفاده قرار می‌گیرد. اما مکانیسم‌های سرطان‌زاکی آن به خوبی مشخص نشده است. بنابراین در این مطالعه با مدل‌سازی به بررسی مراحل فرآیند هپاتوکارسینوژنیز موش‌های در معرض تیواستامید پرداخته‌ایم.

روش کار: در این تحقیق تعداد ۱۸ راس موش نر در ۳ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. ۱) گروه کنترل؛ ۲) گروه دریافت کننده تیواستامید به مدت ۲ ماه و گروه ۳) موش‌هایی که به مدت ۴ ماه تیواستامید دریافت کردند. پس از پایان هر دوره آزمایش بافت کبد موش‌ها جهت بررسی روند سرطانی شدن در فرمالین جمع‌آوری و پس از رنگ‌آمیزی توسط هماتوکسیلین/اوزین مورد مطالعه قرار گرفتند.

یافته‌ها: در بافت کبد موش‌های گروه کنترل ضایعه پاتولوژیکی مشاهده نشد. از جمله ضایعات بافتی ایجاد شده در طول آزمایش می‌توان به هپیتروفی سلول‌های کبدی با بزرگ شدن هسته و سلول‌ها، مرزنگشینی هسته و دُزنسیون سلول‌های کبدی، افزایش اتساع فضای دیس، اتساع سینوزوئیدی و فیبروز شدن بافت، و در آخر نکروز کانونی و ایجاد کانون‌های دیسپلاتیک اشاره نمود. بیشترین تعییرات و آسیب بافتی در گروه سوم پس از ۴ ماه تیمار مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: ایجاد مدل‌های موشی *in vivo* ابزارهای کلیدی برای مطالعات سرطان‌شناسی، داروسازی، ژنتیک و دیگر تحقیقات به شمار می‌روند. نتایج ما نشان داد تیواستامید می‌تواند به عنوان یک ارگانوسولفور در طی ۴ ماه ساختار سلول‌های کبدی را تغییر دهد و بافت را به شدت ملتئب نماید.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت‌کننده: حامی مالی ندارد.

شیوه استناد به این مقاله:

Farzaneh S, Salehipour M, Tafvizi F, Naseh V. The *in-vivo* Modeling of Hepatocarcinogenesis Process by Thioacetamide. Razi J Med Sci. 2024(8 Oct);31.124.

Copyright: ©2024 The Author(s); Published by Iran University of Medical Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the CC BY-NC-SA 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.en>).

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 4.0 صورت گرفته است.



Original Article

The in-vivo Modeling of Hepatocarcinogenesis Process by Thioacetamide

Sahar Farzaneh: PhD Student in Development Biology, Islamic Azad University of Parand Branch, Parand, Iran
Masoud Salehipour: Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad university of Parand Branch, Parand, Iran (*Corresponding Author) m.salehypur@gmail.com
Farzaneh Tafvizi: Associate Professor, Department of Biology, Islamic Azad university of Parand Branch, Parand, Iran
Vahid Naseh: Assistant Professor, Department of Biology, Islamic Azad university of Parand Branch, Parand, Iran

Abstract

Background & Aims: Mice models as in-vivo model for cancer research provide significant help to researchers about the mechanisms of tumorigenesis in dynamic systems which affected by many factors such as hormones, various cellular communications, diets, and chemicals. One of the most common cancer is hepatocarcinoma or liver cell cancer, which has different stages and caused by various environmental and genetical factors. Thioacetamide is a kind of toxin which destroys liver tissue through affects the mechanisms of cell proliferation, differentiation and apoptosis by the destruction or damage of cell structure induction pathways, increasing the risk of genetic errors and stimulating the evolution of cells into malignant neoplasia, and is used in many industries such as leather, textile, paper and rubber, but its carcinogenic mechanisms are not well defined. In order to diagnose liver cancer, there are various methods including liver function test such as ALT (alanine aminotransferase), AST (aspartate aminotransferase), ALP (alkaline phosphatase), GGT (Gamma glutamyl transferase) and tumor markers such as CEA (Carcinoembryonic Antigen) and AFP (Alpha fetoprotein), which are most widely used prognosticators for determining cancer, but their specificity and sensitivity is not high. Therefore, the direct method of examining the tissue, pathology method is used for the final diagnosis of cancer. It shows the structural changes of the cells. In this study, by using the in-vivo modeling of cancer in mice exposed to a toxic substance, we have investigated different stages of hepatocarcinogenesis process, in order to help doctors to have in-vivo samples at every stage of the occurrence of this cancer for treatment purposes and to make decisions about how to treat and test different drugs.

Methods: In this research, in order to determine the tolerance and lethal dose of thioacetamide, before starting the main experiment, 18 male mice in 3 groups of 6 were treated for 4 months with different doses of thioacetamide including 100, 200 and 300 mg/L respectively and after observing the process of mortality, causing shock, lethargy and investigating the cause of death after surgery in different groups, the best dose was determined. More than half of the mice in the high-dose group were shock and died in less than a month, while in the low-dose group, the tissues were still healthy after surgery and just in the middle dose receiver mice, the tissue changes was obtained, which was precisely determined during the main test by examining the pathology of the changes. After determining the carcinogenic concentration of thioacetamide, in this study, 200 mg/L (equivalent to 33 mg/l daily TAA) of thioacetamide was consumed as a solution in drinking water to make liver cancer in mice. Mice were euthanized by ketamine/xylazine after 2 and 4 months. Then the livers of mice were separate in formalin to investigate the cancer process. After staining with Hematoxylin/Eosin, the tissue samples were studied using a light microscope with different magnifications by a camera installed on the microscope and a computer system connected to the camera with DINO CAPTURE software.

Results: Liver samples were examined in terms of morphology, cytoplasmic staining, nuclear size and cellular atypia (abnormality and uniformity of cells). Also, for staging in

Keywords

Modeling,
Liver Cancer,
Mice,
Pathology,
Thioacetamide

Received: 08/06/2024

Published: 08/10/2024

case of cancer, the size of tumors, the number of lymph nodes containing tumor and the rate of spread (metastasis) were investigated. No histopathological lesion was observed in the samples taken from the liver of the control group and the liver had a normal structure. Among the tissue lesions created in the group that were euthanized after 2 months, we can mention mild to moderate dysplasia, which is associated with hypertrophy (enlargement) of liver cell nuclei, bordering of nuclei, degeneration of some cells, and swelling of cell walls. Also, in some areas, the expansion of diss space and sinusoid can be seen. The liver tissue of mice exposed to thioacetamide for 4 months is completely necrotic. Hepatic lobules and dysplastic hepatic portal space can be seen and focal structural changes are also observed. Many necrotic foci are seen in the liver, which indicates the destructive effect of thioacetamide in acute liver damage. Hepatic lobules and dysplastic hepatic portal space can be seen and focal structural changes are also observed. Many necrotic foci are seen in the liver, which indicates the destructive effect of thioacetamide in acute liver damage.

Conclusion: In vivo mice models are key tools for oncology, pharmaceutical, genetics and other research studies. Considering that nearly five hundred thousand patients are diagnosed with liver cancer every year and it is associated with a poor prognosis, therefore creating experimental models to define the pathogenesis of HCC that occurs in the early stages of liver cancer can be a solution in the direction of reduce the cost of cancer research. Our results showed that thioacetamide as an organosulfur can change the structure of liver cells and severely inflame the tissue during 4 months. Thioacetamide leading to apoptosis and necrosis of these cells by CYP2E1 enzymes present in liver microsomes through the mechanism of oxidation to thioacetamide S-oxide, which changes the permeability of cells, increases intracellular calcium concentration, increases nuclear volume and inhibits mitochondrial activity by reducing their membrane potential in liver cells. TAA has long been recognized as a hepatotoxin that requires biological activation of S oxidation to thioacetamide oxide (TASO) and then to the highly reactive S-Oxide (TASO₂) and can be tautomerized to acyl species which capable of transforming cellular nucleophiles include phosphatidylethanolamine (PE) lipids and proteins with lysine side chains. Liver cells can effectively oxidize TA to TASO and TA make strongly covalent bonds with lipids and proteins. Exposure to this substance can activate the ROS system (reactive oxygen species) such as nitric oxide (NO), which causes cell death due to interaction with superoxidase ion and the formation of peroxynitrite, which causes a significant decrease in FRAP values, which indicates the capacity of antioxidant. It can also affect the pre-apoptotic signaling pathways through G protein-coupled receptors, as well as the effect on the phosphorylation of the transcription factor P53, the production of inflammatory cytokines such as NF- κ B, the metabolism and apoptosis of cells. In this project, after 2 months of exposure the mice to thioacetamide, liver tissue cells gradually changed towards fibrosis and after 4 months, some cells changed to necrosis, which indicates the irreversible effects of this substance in the body. In conclusion, it seems that mice model has the potential to be used as accessible strategies replace human samples.

Conflicts of interest: None

Funding: None

Cite this article as:

Farzaneh S, Salehipour M, Tafvizi F, Naseh V. The in-vivo Modeling of Hepatocarcinogenesis Process by Thioacetamide. Razi J Med Sci. 2024(8 Oct);31:124.

Copyright: ©2024 The Author(s); Published by Iran University of Medical Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the CC BY-NC-SA 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.en>).

*This work is published under CC BY-NC-SA 4.0 licence.

یکی از آن‌ها تیواسـتامید می‌باشد. تیواسـتامید (TAA) نوعی ترکیب کارسـینوژن (Thioacetamide) است که از طریق تخریب یا آسیب مسیرهای القای ساختار سلولی، افزایش ریسک خطاها ژنتیکی و تحريك تکامل سلول به نئوپلازی بدخیم بر مکانیسم‌های تکثیر، تمایز و آپوپتوز سلول‌ها اثر می‌گذارد^(۸). محققان دریافته‌اند که قرار گیری طولانی مدت در معرض تیواسـتامید می‌تواند سبب دیسـپلازی صفرایی و کلانژوکارسـینوما شود^(۹). TAA یک ترکیب ارگانو سولفور با فرمول شیمیایی C2H5NS است که به صورت ماده جامد کریستالی سفیدرنگ محلول در آب و به عنوان منبع یون سولفور در سنتز ترکیبات آلی و معدنی عمل می‌کند. در ابتدا، تیواسـتامید به عنوان فارچـکش جهت محافظت از مرکبات در مقابله پوسیدگی استفاده می‌شد^(۱۰). همچنین در صنایع چرم، نساجی، کاغذ و به عنوان تثبیت کننده سوخت موتورها و تسريع کننده ولکانس (فرآیند شیمیایی که در آن لاستیک با افزوده شدن شتاب دهنده‌های حاوی گوگرد به مواد پایدار تبدیل می‌شوند) استفاده می‌شد. اما سال‌ها بعد متوجه شدند که یک سم تخریب کننده بافت کبد و به عنوان یک ماده پیش سرطان‌زا از طریق آسیب به ساختار کبد می‌باشد^(۱۱). پس از آسیب به کبد پاسخ‌های التهابی ایجاد می‌شود، سلول‌های کوپفر فعال شده سبب افزایش فاکتورهای رشد می‌شوند که سلول‌های بنیادی خاموش کبد یعنی Stella را فعال می‌کند و سبب تمایزشان به هپاتوکوکتیت‌ها می‌شود. طی این روند بیان کلازن‌هاو MMP‌ها افزایش پیدا نموده و در نهایت، به ترتیب منجر به فیبروز، سیروز و سرطان کبد می‌شوند^(۱۲).

به منظور تشخیص سرطان کبد روش‌های گوناگونی وجود دارد شامل تست تشخیص آسیب کبدی (Liver Function Test) مانند ALT (Alanine aspartate transaminase)، AST (Aminotransferase)، ALP (Alkaline phosphatase) و GGT (Gamma glutamyltransferase) و تومورمارکرها AFP (Carcino Embryonic Antigen) CEA (Carcino Embryonic Antigen) و AFP مانند (Alpha Feto protein) پر کاربردترین پیش آگهی دهنده‌های تعیین سرطان می‌باشند^(۱۳). اما ویژگی و حساسیت آن‌ها بالا

مقدمه

مدل‌های موشـی ابزار بـسـیار مفیدی برای درک بیولوژی سرطان در محیط پویا هستند و امكان مشاهده in-vivo شروع، پیشرفت و متاستاز تومور تحت عواملی همچون هورمون‌ها، ارتباطات سلولی گوناگون، رژیم‌های غذایی و مواد شیمیایی را ارائه می‌دهند^(۱). سرطان (Cancer) به حالتی از اختلال رشد سلول‌ها گفته می‌شود که در نتیجه آن تومورها ایجاد می‌گردد^(۲). یکی از شایع‌ترین انواع سرطان، سرطان کبد (Liver Cancer) است و به عنوان چهارمین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان‌ها در جهان^(۳) و سیزدهمین سرطان شایع در ایالات متحده با بیش از ۳۰ هزار عامل تشخیص داده شده در ایجاد آن در هر سال می‌باشد. آخرین گزارش‌ها از میزان شیوع سرطان کبد نشان داده که بیشترین کشورهایی که با این بیماری درگیر هستند کشورهای شرق آسیا و آفریقا می‌باشد. در ایران از هر ۱۰۰ هزار نفر حدوداً ۵ نفر به سرطان کبد مبتلا هستند که آمار بالایی محسوب می‌شود^(۴). مهم‌ترین علایم و نشانه‌های سرطان کبد؛ کاهش وزن بدون دلیل، از دست دادن اشتها، بزرگ شدن کبد، زرد شدن چشم‌ها و پوست (Jaundice)، افزایش کلسترول و کلسیم خون، کاهش قند خون و افزایش گلبول‌های قرمز (Erythrocytosis) می‌باشد^(۵).

هپاتو سلولار کار سینوما (HCC) رایج‌ترین شـکل سـرـطـانـ کـبدـ استـ کـهـ سـلـولـهـایـ کـبـدـیـ رـاـ درـگـیرـ مـیـنـمـایـدـ. هـپـاتـوـکـارـسـینـوـژـنـ یـکـ فـرـآـینـدـ بـیـولـوـژـیـکـ بـسـیـارـ پـیـچـیدـهـ استـ کـهـ مـراـحلـ گـونـاـگـونـ وـ مـرـحلـهـبـندـیـ خـاصـ خـودـ رـاـ دـارـدـ وـ درـ اـرـتـبـاطـ باـ بـسـیـارـ فـاـکـتـورـهـایـ زـیـستـ مـحـیـطـیـ،ـ فـاـکـتـورـهـایـ وـرـاثـتـیـ اـزـ جـمـلـهـ فـعـالـ سـازـیـ غـيرـطـبـيـعـیـ مـسـيرـهـایـ سـيـگـنـالـينـگـ وـ تعـادـلـ مـيـانـ فـعـالـ سـازـيـ/ـغـيرـفـعـالـ سـازـيـ پـرـتوـانـكـوـزنـهـ،ـ آـنـتـيـانـكـوـزنـهـ وـ تـماـيزـ سـلـولـهـایـ بـنـيـادـيـ سـرـطـانـ کـبدـ استـ. تـحـقيـقاتـ نـشـانـ دـادـهـ فـعـالـ شـدـنـ پـرـتوـانـكـوـزنـهـ منـجـرـ بـهـ وـرـودـ سـلـولـهـاـ بـهـ چـرـخـهـ تـكـثـيرـ،ـ جـلوـگـيرـىـ اـزـ آـپـوـپـتوـزـ وـ مـهـارـ تـماـيزـ مـيـشـودـ. پـرـتـوهـاـيـ يـونـيـزـهـ،ـ آـسـيـبـهـايـ فيـيـزـيـكـيـ،ـ سـمـومـ وـ بـرـخـىـ تـرـكـيـباتـ شـيـمـيـاـيـيـ مـيـتـوانـدـ منـجـرـ بـهـ مـوـتـاسـيـونـهـايـ ژـنـتـيـكـيـ وـ فـعـالـ شـدـنـ پـرـتوـانـكـوـزنـهـ شـونـدـ^(۶). تـرـكـيـباتـ شـيـمـيـاـيـيـ بـسـيـارـ درـ تـغـيـيرـ سـلامـتـ سـلـولـهـايـ کـبـدـيـ بـهـ سـرـطـانـيـ موـثـرـنـدـ،ـ

دوزهای مختلف تیواستامید شامل mg/L ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ به ترتیب تیمار شدند و پس از مشاهده روند مرگ و میر، ایجاد شوک، بی‌حالی و بررسی عامل مرگ پس از جراحی گروههای مختلف بهترین دوز تعیین گردید. بیش از نیمی از موش‌های گروهی که دوز بالا دریافت می‌کردند در کمتر از یک ماه دچار شوک و مرگ شدند، در گروهی که دوز پایین در یافته می‌کردند پس از جراحی همچنان بافت‌ها سالم بوده و تنها دوز میانی تغییرات بافتی حاصل شده بود که طی آزمایش اصلی با بررسی پاتولوژی تغییرات به صورت دقیق مشخص گردید.

پس از تعیین غلظت مناسب ماده سرطان‌زای تیواستامید، در این پژوهش میزان mg/L ۲۰۰ (معادل TAA mg/l ۳۳ روزانه) تیواستامید جهت ایجاد سرطان کبد در موش‌ها به صورت محلول در آب آشامیدنی خورانده شده. موش‌ها پس از بازه‌های زمانی ۲ ماهه و ۴ ماهه، توسط کتمانی و زایلازین (Sigma-K113) بیهوده شدند. نمونه‌های بافت کبدشان به منظور بررسی هیستوپاتولوژی جدا سازی شدند و در محلول فرمالین ۱۰٪ (Merck, Germany) قرار داده شد. جهت مطالعه‌ی هیستولوژیک کبد موش‌ها و آماده‌سازی لام از بافت‌ها پس از مرحله فیکس کردن، به ترتیب مراحل: آبغیری (توسط غلظت‌های مختلف اتانول)، قالب گیری (در پارافین)، برش و رنگ‌آمیزی انجام گرفت. قالب گیری و تهیه برش بافتی کبد در آزمایشگاه پاتولوژی توسط دستگاه MK 1210 Pooyan, Iran) Tissue processor طی ۱۶ ساعت انجام گردید. برای هر نمونه ۱۰ اسلاید بافتی با سایز برش ۵ میکرون در نظر گرفته شد. لام‌ها با استفاده از هماتوکسیلین و ائوزین (SIGMA, H&E) با جهت بررسی‌های آسیب شناسی رنگ آمیزی شدند. با استفاده از میکروسکوپ نوری (OLYMPUS) با بزرگنمایی‌های متفاوت آسیب سلول‌ها و بافت کبد توسط دوربین نصب شده بر روی میکروسکوپ و سیستم DINO را یا نهای متصل به دوربین دارای نرم افزار CAPTURE بررسی شدند.

نمی‌باشد. بنابراین از روش مستقیم بورسی بافت یعنی روش پاتولوژی که مستقیماً تغییرات ساختاری سلول‌ها را نشان می‌دهد در جهت تشخیص نهایی سرطان‌ها استفاده می‌گردد. هدف علم پاتولوژی یا آسیب شناسی، مطالعه مکانیسم‌های بیماری‌ها و اختلالات بافت‌ها و همچنین در ک نحوه واکنش بدن به آسیب‌ها می‌باشد. امروزه استفاده از مدل‌های آزمایشگاهی کمک قابل توجهی به درک ما از بیولوژی سرطان نموده و به عنوان استراتژی‌های درمانی جدید و مفید جایگزین نمونه‌های انسانی هستند (۱۴).

بنابراین در مطالعه حاضر به منظور ایجاد مدل هپاتوکارسینوژنر و مشاهده روند تغییر ساختار بافت کبد در نمونه‌های in-vivo پس از تیمار موش‌های آزمایشگاهی در طی زمان‌های مختلف توسط تیواستامید، نمونه‌های بافتی به روش هیستوپاتولوژی مورد آنالیز قرار خواهند گرفت.

روش کار

جهت انجام تحقیق حاضر ۱۸ راس موش نر نژاد NMRI ۸-۶ هفت‌ماهی (با میانگین وزنی ۳۰ گرم) از موسسه رازی تهیه شد. حیوانات در حیوانخانه دانشگاه آزاد واحد پرند در شرایط کنترل شده درجه حرارت $۱\pm 22^{\circ}\text{C}$ ، رطوبت حدود $۶۰\pm 10\%$ و با دوره‌ی روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته نگهداری شدند. تمامی آزمایش‌ها طبق موازین اخلاقی و دستورالعمل‌های نگهداری و استفاده از حیوانات با کد اخلاق IR.IAU.VARAMIN.REC.1399.003 انجام گرفت. سپس موش‌ها به صورت تصادفی در ۳ گروه ۶ تایی تقسیم شدند. دسته اول یا گروه کنترل موش‌های طبیعی هستند که به روش نرمال پرورش داده می‌شوند و به آن‌ها آب و غذا داده می‌شود. گروه دوم موش‌هایی که به مدت ۲ ماه آب حاوی دوز تعیین شده تیواستامید آشامیدند. دسته سوم موش‌هایی که به مدت ۴ ماه توسط تیواستامید تیمار شدند.

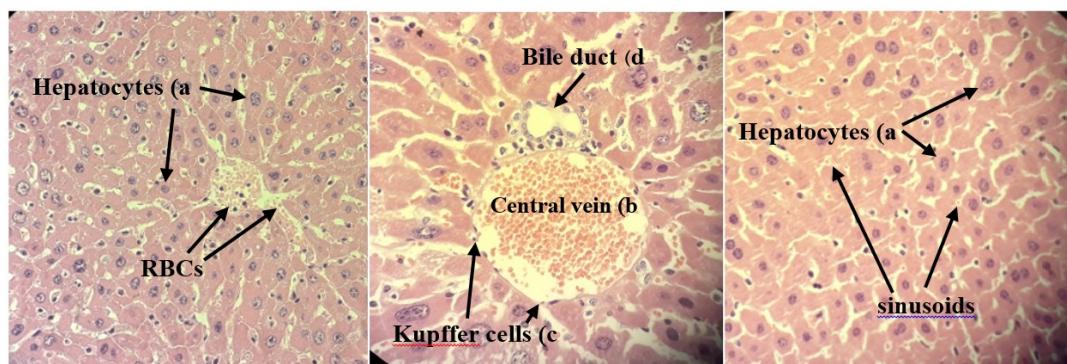
در این آزمایش جهت تعیین تحمل و غلظت کشنده ترکیب تیواستامید، پیش از شروع آزمایش اصلی، ابتدا ۱۸ موش در ۳ گروه ۶ تایی به مدت ۴ ماه توسط

هسته سلول‌های کبدی، مرزنگینی هسته‌ها، دژنراسیون برخی سلول‌ها و تورم دیواره سلول‌ها همراه است. همچنین در برخی مناطق افزایش اتساع فضای دیس و سینوزوئید قابل مشاهده است. در برخی نمونه‌ها سیتوپلاسم سلول‌های کبدی واکوئله، هسته‌ها غیرهم‌نازد (آنیزونوکلئوزیس) و تغییرات دژنراتیو به صورت feathery و Steatosis مشخص است (شکل ۲). همانطور که در شکل مشاهده می‌شود بافت کبد موش‌هایی که به مدت ۴ ماه در معرض تیواستامید بوده‌اند کاملاً نکروز شده است. لوبول‌های کبدی و فضای پورتال کبدی دیسپلاستیک قابل رویت بوده و تغییرات ساختاری فوکال نیز مشاهده می‌گردد. کانون‌های نکروتیک متعدد در کبد دیده می‌شود که نشان دهنده

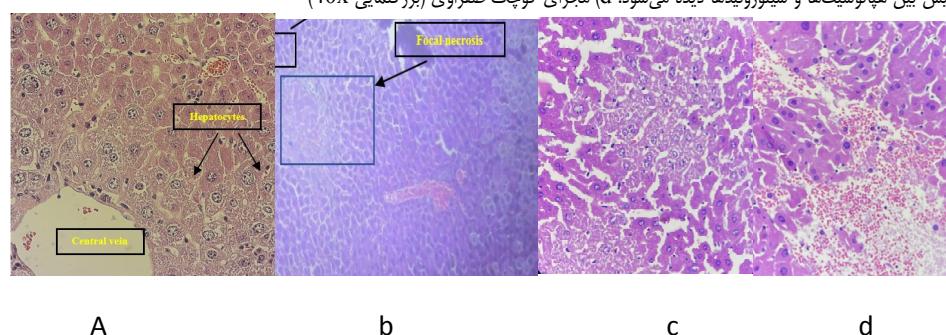
یافته‌ها

نمونه‌های کبد به لحاظ مورفولوژی، رنگ‌آمیزی سیتوپلاسمی، اندازه هسته و آتیپی سلولی (ناهنجاری و ناهم‌شکلی سلول‌ها) مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین جهت مرحله بندی در صورت ایجاد سرطان، اندازه تومورها، تعداد غدد لنفاوی حاوی تومور و میزان گسترش (متاستاز) مورد بررسی قرار گرفت. در نمونه‌های اخذ شده از کبد موش‌های گروه کنترل ضایعه هیستوپاتولوژیکی مشاهده نشد و کبد دارای ساختار طبیعی بود (شکل ۱).

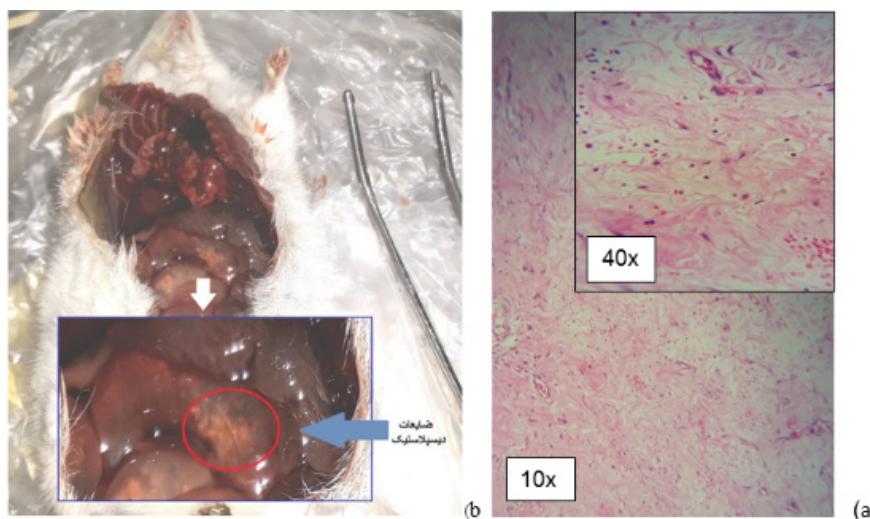
از جمله ضایعات بافتی ایجاد شده در گروهی که پس از ۲ ماه یوتانایز شدند می‌توان به دیسپلازی خفیف تا متوسط اشاره نمود که با هیپرتروفی (بزرگ شدن)



شکل ۱- بررسی میکروسکوپی بافت کبد گروه کنترل. (a) سلول‌های کبدی (هیاتوسیت‌ها) با سیتوپلاسم صورتی دانه‌دار و هسته مدور مرکزی به صورت نرمال و شعاعی در اطراف (b) ورید مرکزی تا محیط لوبول آرایش یافته‌اند و (c) سلول‌های کوچک ستاره‌ای در فضای اطراف سینوزوئیدی (مویرگ‌های خونی نامنظم با فضای وسیع که به صورت نوارهای بین صفحات سلولی از مرکز به محیط ادامه دارند و جدارشان علاوه بر سلول‌های اندوتیال معمولی تعدادی سلول کوپفر که وظیفه تصفیه خون را بر عهده دارند نیز وجود دارد) قرار گرفته‌اند. فضای دیس بین هیاتوسیت‌ها و سینوزوئیدها دیده می‌شود. (d) مجرای کوچک صفرایی (بزرگنمایی 40x)



شکل ۲- بررسی پاتولوژیکی کبد گروهی که به مدت ۲ ماه در معرض تیواستامید قرار گرفتند. (a) هسته سلول‌ها بزرگ شده به سمت دیواره‌ها رفته و اصطلاحاً مرزنگینی کرده و در برخی مناطق دچار هیپرتروفی شده و (b) دیواره سلول‌ها دچار تورم ابری شده و سلول‌ها به دلیل آسیب ماده شیمیایی تیواستامید به سمت فیبروز رفته، اتساع فضای دیس و اتساع سینوزوئیدی، نکروز کانونی در برخی مناطق نیز کلی قابل مشاهده است (از سمت چپ به ترتیب بزرگنمایی 10x و 40x). (c) در شرایط استرس سلول‌های کبدی چربی را به صورت غیرعادی در خود ذخیره می‌کنند و حالت استاتوزیس رخ می‌دهد. (d) کف آلد شدن یا واکوئله شدن سیتوپلاسم سلول‌های کبدی، سینوزوئیدها پرخون (دیلاته) و تجمع رنگدانه صفراء در هیاتوسیتها (feathery changes) (بزرگنمایی 100x).



شکل ۳- هیستوپاتولوژی کبد گروهی که به مدت ۴ ماه در معرض تیواستامید قرار گرفتند. (a) در این مرحله افزایش فیبروبلاست‌ها و سلول‌های ستاره‌ای (کوپفر) کبدی در فضای پورتال به وضوح قابل مشاهده است و بافت همبند اضافی که موجب ایجاد فیبروز گشته است، سبب از هم گسیختن ساختار طبیعی کبد شده است. در این تصویر ساختار سلول‌ها به طور کامل از بین رفته و اغلب سلول‌ها دچار نکروز شده‌اند. از هم گسیختگی بافت و پراندگی نامنظم هسته سلول‌ها نیز قابل مشاهده است. (b) وجود خایای دیسپلاتیک برآمده سفید رنگ با اندازه بیش از ۱ میلی متر در سطح بافت حین بیopsی قابل مشاهده است.

عامل مهمی در تعیین درمان آن‌ها می‌باشد، ایجاد مدل‌های حیوانی سرطانی و تعیین مرحله‌بندی استاندارد آن‌ها می‌تواند کمک شایانی برای متخصصان سرطان باشد. همچنین با توجه به شباهت فرآیند میزان انتشار سرطان در نمونه‌های موشی که مشابه الگوی مرحله‌بندی تومورها در انسان می‌باشد؛ در مراحل ابتدایی ابتلا عالیم خفیفتر بوده یعنی در گروه دوم هنوز سلول‌های بافت کبد نوعی مکانیسم جبرانی در پاسخ به وضعیت استرس ایجاد کرده‌اند و آسیب‌ها هنوز منجر به نکروز نشدن و در مراحل بالاتر یعنی گروه سوم که طولانی‌تر در معرض تیواستامید قرار گرفتند تغییرات دژنراتیو به وضوح قابل مشاهده بوده و در برخی مناطق سبب نکروز سلول‌ها شده بودند. همان‌طور که اشاره شد HCC یک بیماری چند مرحله‌ای است که بروز آن با عوامل محیطی، رژیم غذایی و سبک زندگی مرتبط است. برخلاف سایر سرطان‌ها، HCC معمولاً در ارگانی که پیش از این آسیب دیده است (اغلب در شرایط هپاتوپاتی مزمن، سیروز یا در ارتباط با بیماری‌های وراثتی همچون هموکروماتوز) ایجاد می‌شود اما حدود ۱۵-۲۰٪ موارد HCC ممکن است در کبد‌های غیرفیروزیک یا کبد‌هایی با حداقل فیبروز پورتال بدون

تأثیر مخرب تیواستامید در آسیب حاد کبدی می‌باشد (شکل ۳).

بحث

مدل‌های موشی به عنوان ابزاری ساده، ارزشمند، قابل دسترس و به صرفه پیرامون تحقیقات سرطان می‌باشند. بسیاری از مطالعات، تیواستامید را به عنوان دومین عامل ایجاد مسمومیت‌های کبدی و فیبروز در تولید مدل‌های القای سرطان کبد پیشنهاد نموده‌اند (۱۵). نتایج بررسی‌های هیستوپاتولوژیکی در موش‌هایی که به عنوان مدل حیوانی در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفته‌اند طی زمان‌های مختلف پس از مواجهه با ماده‌ی شیمیایی تیواستامید حاکی از تغییر ساختاری سلول‌های بافت کبد در طولانی مدت می‌باشد و امکان مشاهده روند هپاتوکارسینوژنیز به وسیله بررسی الگوی رشد و بلوغ غیر عادی سلول‌ها را فرآهن نموده است. در فرآیند این تحقیق چند تغییر ساختاری در بافت کبد قابل مشاهده بود که به ترتیب می‌توان به هیپرتروفی سلول‌ها، فیبروزن و دیسپلاتیزی شدید اشاره نمود. از آنجایی که سرطان کبد یک بیماری چند مرحله‌ای است و به طور کلی تعیین زمان و مرحله گذاری سرطان‌ها

سایتوکاین‌های التهابی همچون NF-kB (Nuclear factor Kappa B) (۲۳)، متابولیسم و آپوپتوز سلول‌ها را دستخوش تغییر نماید (۲۲). در تحقیقات مشابه پس از تیمار نمونه‌های سلولی و in-vivo (در جوندگان) دریافت‌هایند که تیواستامید می‌تواند سبب افزایش میزان سرمی آنزیم‌های آلانین‌آمینوترانسферاز (ALT)، آسپارتات آمینوترانسферاز (AST) و آلkalین فسفاتاز (ALP) با آسیب به کبد گردد (۱۹). در این پژوهه پس از مدت ۲ ماه قرار گیری موش‌ها در معرض تیواستامید، سلول‌های بافت کبد به تدریج به سمت فیروزه شدن تغییر یافته و پس از ۴ ماه برخی سلول‌ها دچار نکروز شدند که حاکی از اثرات برگشت ناپذیر این ماده در بدن است. این تحقیق می‌تواند به پژوهشکاران کمک نماید تا در هر مرحله‌ای از بروز این سرطان بتوانند برای اهداف درمانی و تصمیم گیری در مورد نحوه درمان و آزمایش داروهای مختلف نمونه‌های in-vivo در اختیار داشته باشند. همچنین با توجه به اینکه هر ساله نزدیک به پانصد هزار بیمار مبتلا به سرطان کبد تشخیص داده می‌شود و با پیش‌آگهی ضعیف همراه است، بنابراین ایجاد مدل‌های تجربی جهت تعریف پاتوزن HCC که در مراحل اولیه سرطان کبد بروز می‌کند، می‌تواند به عنوان راه حلی در جهت کاهش هزینه تحقیقات پیرامون سرطان باشد. ساخت مدل حیوانی سرطانی به محققان این فرست را می‌دهد تا غربالگری‌ها و تحقیقات خود را در شرایطی که تومور در تعامل با عوامل مختلف و متابولیسم‌های درونی قرار دارد، مورد بررسی قرار دهند. اگرچه اخیراً موش‌های مهندسی ژنتیک شده (۲۴) نیز امکان شناسایی مسیرهای دخیل در سرطان‌ها را فراهم آورده‌اند، اما به دلیل نیاز صرف هزینه، زمان و امکانات بسیار، دستیابی به آن‌ها محدود می‌باشد و مدل‌های القایی تو سط مواد شیمیایی گزینه‌های منا سبی جهت بررسی آسیب‌های کبدی هستند. پیشنهاد می‌گردد آزمایشات فوق توسط انواع دیگر سوموم در گونه‌های مختلف مورد بررسی قرار گیرد و از مارکرها مانند فاکتورهای مولکولی و ابزارهای تشخیصی دیگر همچون سی‌تی اسکن و سونوگرافی که روش‌های کم‌تهاجمتری نسبت به روش بیوپسی و پاتولوژی هستند استفاده

فیروز سپتوم رخ دهد (۱۶). آسیب کبد که یکی از اندام‌های حیاتی بدن در تنظیم پروسه‌های فیزیولوژیک و متابولیسم است، عوارض خطرناکی در پی دارد. بیش از ۲۰۰۰ ماده شیمیایی متفاوت که توسط انسان ساخته شده‌اند در زندگی روزمره وجود دارند که این ترکیبات در بدن متابولیزه می‌گردند و کبد عضواً صلی است که در این فرآیند شرکت می‌کند (۱۷). تیواستامید یک سم تخریب کننده بافت کبد و به عنوان یک ماده پیش‌سرطان‌زا از طریق آسیب به ساختار کبد می‌باشد (۱۱). تیواستامید توسط آنزیم‌های CYP2E1 (۱۸) موجود در میکروزوم‌های کبدی از طریق مکانیسم اکسیداسیون به تیواستامید-S-اکسید که سبب تغییر نفوذپذیری سلول‌ها، افزایش غلظت کلسیم داخل سلولی، افزایش حجم هسته (۱۹) و مهار فعالیت میتوکندریایی از طریق کاهش پتانز سیل غشایی (۲۰) آن‌ها در سلول‌ها می‌شود منجر به آپوپتوز و نکروز (۱۸) این سلول‌ها می‌شود (۱۹). مدت‌های است که به عنوان یک سم کبدی S-شناخته شده است که نیاز به فعال سازی بیولوژیکی S-اکسیداسیون به تیواستامید اکسید (TASO) و سپس به S-بسیار واکنش‌پذیر TASO2 S-Oxide (TASO2) دارد و می‌تواند توتومریزه شود به گونه‌های آسیله که قادر به تغییر نوکلئوفیل‌های سلولی شامل لیپیدهای فسفاتیدیل اتانول آمین (PE) و پروتئین‌های با زنجیره جانبی لیزین هستند (۲۱). سلول‌های کبدی می‌توانند به طور موثری TA را به TASO اکسید نموده و TA با لیپیدها و پروتئین‌ها به شدت اتصالات کوالانت برقرار می‌کند (۲۱). تحقیقات نشان داده است که قرار گرفتن در معرض این ماده می‌تواند با فعال نمودن سیستم ROS (گونه‌های فعال اکسیژن) مانند نیتروژن اکساید (NO) که سبب مرگ سلول‌ها در اثر برهمکنش با یون سوپراکسیداز و تشکیل پروکسی نیتریت می‌شود، که باعث کاهش معنی‌دار مقادیر FRAP (Ferric reducing antioxidant power) که نشان دهنده ظرفیت آنتی‌اکسیدانیست شود (۲۰ و ۲۲). همچنین می‌تواند بر مسیرهای سیگنال‌ینگ پیش آپوپوتیک از طریق گیرنده‌های جفت شونده با G پروتئین و همچنین اثر بر فسفویلاسیون فاکتور رونویسی P53 تولید

National and Provincial Levels in Iran Between 1990 and 2015: A Meta Regression Analysis. Hepatitis Monthly. 2017;18(1):e62009.

4. Rawla P, Sunkara T, Muralidharan P, Raj JP. Update in global trends and aetiology of hepatocellular carcinoma. Contemp Oncol (Pozn). 2018;22(3):141–150.

5. Keane JT, Elangovan H, Stokes RA, Gunton JE. Vitamin D and the Liver—Correlation or Cause? Nutrients. 2018;10(4):496.

6. King RJB (2000) Cancer Biology, 2nd edn. Prentice Hall, Edinburgh.

7. Chen C, Wang G. Mechanisms of hepatocellular carcinoma and challenges and opportunities for molecular targeted therapy. World J Hepatol. 2015;7(15): 1964–1970.

8. Santos NP, Colaço AA, Oliveira PA. Animal models as a tool in hepatocellular carcinoma research: A Review. Tumour Biol. 2017;39(3):1010428317695923.

9. Hui Emma Zhang, James M. Henderson, Mark D. Gorrell, Animal models for hepatocellular carcinoma. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease. 2018;1865(5): 993–10.

10. Ahmad A, Pillai KK, Najmi AK, Ahmad SH J, Pal SN, Balani DK. Evaluation of hepatoprotective potential of jigrine post-treatment against thioacetamide induced hepatic damage. J Ethnopharmacol. 2002;79:35–41.

11. National Toxicology Program. Report on Carcinogens (12th Ed.). 2011;403–404.

12. Nguyen-Lefebvre AT, Ajith A, Portik-Dobos V, Horuzsko DD, Arbab AS, Dzutsev A, et al. The innate immune receptor TREM-1 promotes liver injury and fibrosis. J Clin Invest. 2018;128(11):4870–4883.

13. Polanski M, Anderson NL. A list of candidate cancer biomarkers for targeted proteomics. Biomark Insights. 2007 Feb 7;1:1–48.

14. Cheon DJ, Orsulic S. Mouse models of cancer. Annu Rev Pathol. 2011;6:95–119.

15. Wallace MC, Hamesch K, Lunova M, Kim Y, Weiskirchen R, Strnad P, et al. Standard operating procedures in experimental liver research: thioacetamide model in mice and rats. Lab Anim. 2015 Apr; 49(1 Suppl):21–9.

16. Schlageter M, Terracciano LM, D'Angelo S, Sorrentino P. Histopathology of hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol. 2014;20(43):15955–64.

17. Kabiri N, Ahangar Darabi M. Hepatoprotective Effects of Kombucha Tea and Silymarin Against Thioacetamide Induced Liver Toxicity in Rats. Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services. 2014;36(5):80–87.

18. Jaya Chilakapati, Kartik Shankar, Midhun C.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از جناب آقای دکتر امامی که در ایجاد بلوک و لامگیری نمونه‌ها ما را یاری نمودند و همچنین خانم دکتر مژگان شاه حسینی که در آنالیزهای پاتولوژی دلسوزانه اطلاعات خود را در اختیار مان گذاردهند و همکاران گرامیمان جناب آقای آرش مسلم و خانم آنیتا دادک، مراتب سپاسگزاری خود را اعلام نموده. این تحقیق در مرکز حیوانخانه دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند انجام شده و به عنوان بخشی از پایان نامه دکترای تخصصی به شناسه IR.IAU.VARAMIN.REC.1399.003 می‌باشد.

ملاحظات اخلاقی

نگهداری حیوانات آزمایشگاهی مطابق با راهنمای انسنتیتوی ملی سلامت در حیوانخانه آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی پرند با کد اخلاق به شناسه IR.IAU.VARAMIN.REC.1399.003 انجام شده است.

مشارکت نویسنده‌گان

سحر فرزانه: انجام کار پژوهشی و نگارش مقاله؛ م سعید صالحی پور: نویسنده مسئول، استاد راهنمای اول اینجانب در دوره دکترا و ارائه دهنده عنوان پژوهش؛ فرزانه تفویضی: استاد راهنمای دوم اینجانب در دوره دکترا و همکاری در نگارش مقاله حاضر؛ وحید ناصح: استاد مشاور اینجانب در دوره دکترا و کمک در بررسی‌های پاتولوژیک.

References

1. Zhang W, Moore L, Ji P. Mouse models for cancer research. Chin J Cancer. 2011 Mar; 30(3):149–52.
2. Hassanpour SH, Dehghani MA. Review of cancer from perspective of molecular. J Cancer Res Pract. 2017;(4):127–129.
3. Rezaei N, Far FF, Khademiureh S, Sheidaei A, Gohari K, Delavari F, et al. Liver Cancer Mortality at

Korrapati, Ronald A. Hill, Harihara M. Mehendale. Saturation toxicokinetics of thioacetamide: role in initiation of liver injury. *Drug Metab Dispos.* 2005;33(12): 1877-1885.

19. Shahsavani S, Hosseini S E. Evaluating the effect of curcumin on Thioacetamide –induced liver in maturemale rats. *Journal of Birjand University of Medical Sciences.* 2018;25(2):94-103.

20. Ghosh S, Sarkar A, Bhattacharyya S, Sil PC. Silymarin Protects Mouse Liver and Kidney from Thioacetamide Induced Toxicity by Scavenging Reactive Oxygen Species and Activating PI3K-Akt Pathway. *Front Pharmacol.* 2016;7:481.

21. Koen YM, Sarma D, Hajovsky H, et al. Protein targets of thioacetamide metabolites in rat hepatocytes. *Chem Res Toxicol.* 2013;26(4):564–574.

22. Benzie IF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.* 1999;299:15-27.

23. El-Kashef DH, Serrya MS. Sitagliptin ameliorates thioacetamide-induced acute liver injury via modulating TLR4/NF-KB signaling pathway in mice. *Life Sci.* 2019;228:266–273.

24. Heindryckx F, Colle I, Van Vlierberghe H. Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. *Int J Exp Pathol.* 2009;90(4):367-86.