



## مدل سازی in-vivo فرآیند هیپاتوکارسینوژنز به وسیله تیواستامید

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

مسعود صالحی پور: استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، پرند، ایران (\* نویسنده مسئول) [m.salehypur@gmail.com](mailto:m.salehypur@gmail.com)

فرزانه تفویضی: 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

مدل سازی،

موش،

سرطان کبد،

پاتولوژی،

تیواستامید

**زمینه و هدف:** مدل‌های سرطان موش، کمک قابل توجهی به محققان درباره‌ی مکانیسم‌های تومورزایی در سیستم‌های پویا می‌نماید. یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها، هیپاتوکارسینوما 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 سرطان‌زایی آن به خوبی مشخص نشده است. بنابراین در این مطالعه با مدل‌سازی به بررسی مراحل فرآیند هیپاتوکارسینوژنز 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 دریافت‌کننده تیواستامید به مدت ۲ ماه و (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/ئوزین 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 هیپرتروفی سلول‌های کبدی با بزرگ شدن هسته و سلول‌ها، مرز نشینی هسته و دژنراسیون سلول‌های کبدی، افزایش اتساع فضای دیس، اتساع سینوزوئیدی و فیبروز شدن بافت، و در آخر نکروز کانونی و ایجاد کانون‌های دیسپلاتیک اشاره نمود. بیشترین تغییرات 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 ملتهب 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.

## 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](mailto: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 (TASO<sub>2</sub>) 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-κB, 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.**

## مقدمه

مدل های موشی ابزار بسیار مفیدی برای درک بیولوژی سرطان در محیط پویا هستند و امکان مشاهده in-vivo شروع، پیشرفت و متاستاز تومور تحت عواملی همچون هورمون ها، ارتباطات سلولی گوناگون، رژیم های غذایی و مواد شیمیایی را ارائه می دهند (۱). سرطان (Cancer) به حالتی از اختلال رشد سلول ها گفته می شود که در نتیجه آن تومورها ایجاد می گردند (۲). یکی از شایع ترین انواع سرطان، سرطان کبد (Liver Cancer) است و به عنوان چهارمین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان ها 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 می باشد. آخرین گزارش ها از میزان شیوع سرطان کبد نشان داده که بیشترین کشورهایی که با این بیماری درگیر هستند کشورهای شرق آسیا و آفریقا می باشد. در ایران از هر ۱۰۰ هزار نفر حدوداً ۵ نفر به سرطان کبد مبتلا هستند که آمار بالایی محسوب می شود (۴). مهم ترین علائم و نشانه های سرطان کبد؛ کاهش وزن بدون دلیل، از دست دادن اشتها، بزرگ شدن کبد، زرد شدن چشم ها و پوست (Jaundice)، افزایش کلاسترول و کلسیم خون، کاهش قند خون و افزایش گلبول های قرمز (Erythrocytosis) می باشد (۵).

هیپاتو سلولار کارسینوما (Hepatocellular carcinoma (HCC) رایج ترین شکل سرطان کبد است که سلول های کبدی را درگیر می نماید. هیپاتو کارسینوزن یک فرآیند بیولوژیک بسیار پیچیده است که مراحل گوناگون و مرحله بندی خاص خود را دارد و در ارتباط با بسیاری فاکتورهای زیست محیطی، فاکتورهای وراثتی از جمله فعال سازی غیرطبیعی مسیرهای سیگنالینگ و تعادل میان فعال سازی/غیرفعال سازی پروتئین ها، آنتی انکوژن ها و تمایز سلول های بنیادی سرطان کبد است. تحقیقات نشان داده فعال شدن پروتئین ها منجر به ورود سلول ها به چرخه تکثیر، جلوگیری از آپوپتوز و مهار تمایز می شود. پرتوهای یونیزه، آسیب های فیزیکی، سموم و برخی ترکیبات شیمیایی می توانند منجر به موتاسیون های ژنتیکی و فعال شدن پروتئین ها شوند (۶). ترکیبات شیمیایی بسیاری در تغییر سلامت سلول های کبدی به سرطانی موثرند،

یکی از آن ها تیواستامید می باشد. تیواستامید (Thioacetamide (TAA) نوعی ترکیب کارسینوژن غیرژنوتوکسیک است که از طریق تخریب یا آسیب مسیرهای القای ساختار سلولی، افزایش ریسک خطاهای ژنتیکی و تحریک تکامل سلول به نئوپلازی بدخیم بر مکانیسم های تکثیر، تمایز و آپوپتوز سلول ها اثر می گذارد (۸). محققان دریافته اند که قرار گیری طولانی مدت در معرض تیواستامید می تواند سبب دیسپلازی صفاوی و کلانژوکارسینوما شود (۹). TAA یک ترکیب ارگانو سولفور با فرمول شیمیایی  $C_2H_5NS$  است که به صورت ماده جامد کریستالی سفیدرنگ محلول در آب و به عنوان منبع یون سولفور در سنتز ترکیبات آلی و معدنی عمل می کند. در ابتدا، تیواستامید به عنوان قارچ کش جهت محافظت از مرکبات در مقابل پوسیدگی استفاده می شد (۱۰). همچنین در صنایع چرم، نساجی، کاغذ و به عنوان تثبیت کننده سوخت موتورها و تسریع کننده ولکانس (فرآیند شیمیایی که در آن لاستیک با افزوده شدن شتاب دهنده های حاوی گوگرد به مواد پایدار تبدیل می شوند) استفاده می شد. اما سال ها بعد متوجه شدند که یک سم تخریب کننده بافت کبد و به عنوان یک ماده پیش سرطان زا از طریق آسیب به ساختار کبد می باشد (۱۱). پس از آسیب به کبد پاسخ های التهابی ایجاد می شود، سلول های کوپفر فعال شده سبب افزایش فاکتورهای رشد می شوند که سلول های بنیادی خاموش کبد یعنی Stella را فعال می کند و سبب تمایز شان به هیپاتوسیت ها می شود. طی این روند بیان کلژن ها و MMP ها افزایش پیدا نموده و در نهایت، به ترتیب منجر به فیبروز، سیروز و سرطان کبد می شوند (۱۲).

به منظور تشخیص سرطان کبد روش های گوناگونی وجود دارد شامل تست تشخیص آسیب کبدی (Liver Function Test) مانند ALT (alanine aminotransferase)، AST (aspartate aminotransferase)، ALP (alkaline phosphatase)، GGT (Gamma glutamyltransferase) و تومور مارکرها مانند CEA (Carcino Embryonic Antigen) و AFP (Alpha Feto protein) می باشد که به عنوان پر کاربردترین پیش آگهی دهنده های تعیین سرطان می باشند (۱۳). اما ویژگی و حساسیت آن ها بالا

دوزهای مختلف تیواستامید شامل ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ به ترتیب تیمار شدند و پس از مشاهده روند مرگ و میر، ایجاد شوک، بی حالی 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 دریافت 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  $200 \text{ mg/L}$  (معادل  $33 \text{ mg/l TAA}$  روزانه) تیواستامید جهت ایجاد سرطان کبد در موش‌ها به صورت محلول در آب آشامیدنی خوراند شده. موش‌ها پس از بازه‌های زمانی ۲ ماهه و ۴ ماهه، توسط کتامین و زایلازین (Sigma-K113) بیهوش شدند. نمونه‌های بافت کبدشان به منظور بررسی هیستوپاتولوژی جدا سازی شدند و در محلول فرمالین ۱۰٪ (Merck, Germany) قرار داده شد. جهت مطالعه هیستولوژیک کبد موش‌ها و آماده‌سازی لام از بافت‌ها پس از مرحله فیکس کردن، به ترتیب مراحل: آگیری (توسط غلظت‌های مختلف اتانول)، قالب‌گیری (در پارافین)، برش و رنگ‌آمیزی انجام گرفت. قالب‌گیری 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) جهت بررسی‌های آسیب‌شناسی رنگ‌آمیزی شدند. با استفاده از میکروسکوپ نوری (OLYMPUS) با بزرگ‌نمایی‌های متفاوت آسیب سلول‌ها و بافت کبد توسط دوربین نصب شده بر روی میکروسکوپ و سیستم رایانه‌ای متصل به دوربین دارای نرم افزار DINO CAPTURE بررسی شدند.

نمی‌باشد. بنابراین از روش مستقیم بررسی بافت یعنی روش پاتولوژی که مستقیماً تغییرات ساختاری سلول‌ها را نشان می‌دهد در جهت تشخیص نهایی سرطان‌ها استفاده می‌گردد. هدف علم پاتولوژی یا آسیب‌شناسی، مطالعه مکانیسم‌های بیماری‌ها و اختلالات بافت‌ها و همچنین درک 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 هپاتوکارسینوزن 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 ۶-۸ هفته‌ای (با میانگین وزنی ۳۰ گرم) از موسسه رازی تهیه شد. حیوانات در حیوانخانه دانشگاه آزاد واحد پرند در شرایط کنترل شده درجه حرارت  $22 \pm 1$ ، رطوبت حدود  $60 \pm 10\%$  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.

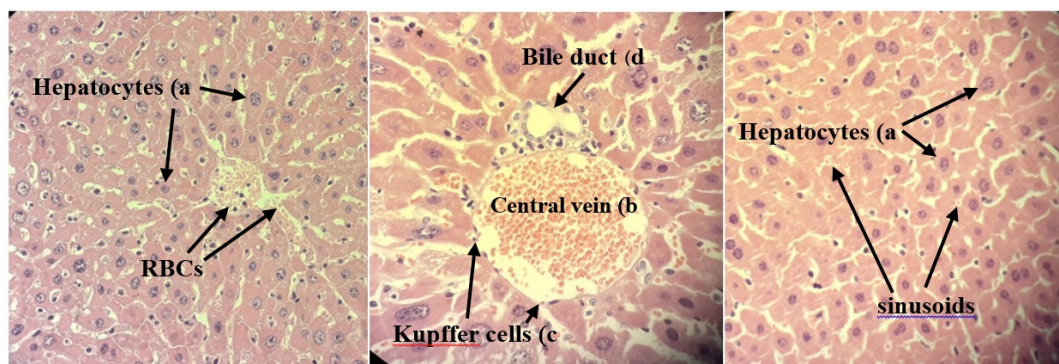
در این آزمایش جهت تعیین تحمل و غلظت کشنده ترکیب تیواستامید، پیش از شروع آزمایش اصلی، ابتدا ۱۸ موش در ۳ گروه ۶ تایی به مدت ۴ ماه توسط

## یافته‌ها

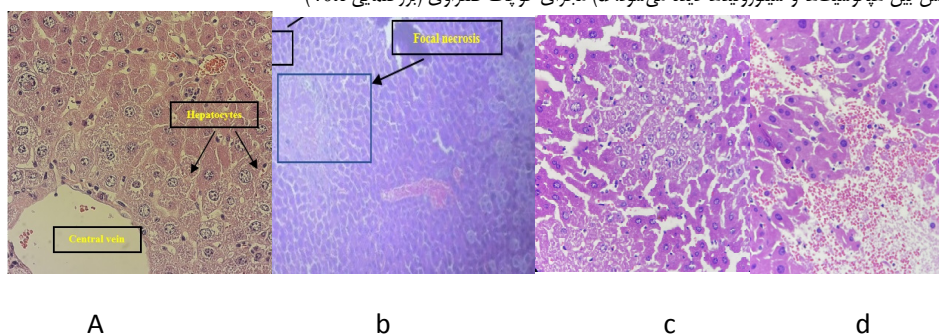
هسته سلول‌های کبدی، مرز نشینی هسته‌ها، دژنراسیون برخی سلول‌ها و تورم دیواره سلول‌ها همراه است. همچنین در برخی مناطق افزایش اتساع فضای دیس و سینوزوئید قابل مشاهده است. در برخی نمونه‌ها سیتوپلاسم سلول‌های کبدی واکوئوله، هسته‌ها غیره‌ما (آنیزونوکلئوزیس) و تغییرات دژنراتیو به صورت Steatosis و feathery مشخص 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

نمونه‌های کبد به لحاظ مورفولوژی، رنگ آمیزی 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).

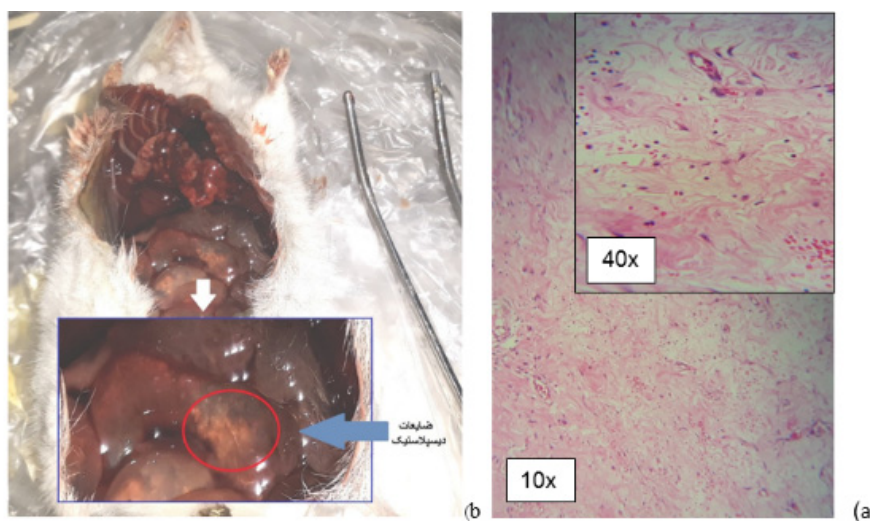
از جمله ضایعات بافتی ایجاد شده در گروهی که پس از ۲ ماه یوتانایز شدند می‌توان به دیسپلازی خفیف تا متوسط اشاره نمود که با هیپرتروفی (بزرگ شدن)



شکل ۱- بررسی میکروسکوپی بافت کبد گروه کنترل. (a) سلول‌های کبدی (هپاتوسیت‌ها) با سیتوپلاسم صورتی دانه‌دار و هسته مدور مرکزی به صورت نرمال و شعاعی در اطراف ورید مرکزی تا محیط لوبول آرایش یافته‌اند و (c) سلول‌های کوچک ستاره‌ای در فضای اطراف سینوزوئیدی (موبیرگ‌های خونی نامنظم با فضای وسیع که به صورت نوارهایی بین صفحات سلولی از مرکز به محیط ادامه دارند و جدارشان علاوه بر سلول‌های اندوتلیال معمولی تعدادی سلول کوپفر که وظیفه تصفیه خون را بر عهده دارند نیز وجود دارد) قرار گرفته‌اند. فضای بین هپاتوسیت‌ها و سینوزوئیدها دیده می‌شود. (d) مجرای کوچک صفراوی (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 مرز نشینی 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 فیروز 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 استئاتوزیس رخ می‌دهد. (d) کف آلود شدن یا واکوئوله شدن سیتوپلاسم سلول‌های کبدی، سینوزوئیدها پر خون (دیلاته) و تجمع رنگدانه صفرا در هپاتوسیتها (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 فیروز 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 پراکندگی نامنظم هسته سلول‌ها نیز قابل مشاهده است. (b) وجود ضایعات دیسپلاستیک برآمده سفید رنگ با اندازه بیش از ۱ میلی متر در سطح بافت حین بیوپسی قابل مشاهده است.

عامل مهمی در تعیین در مان 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 علائم 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 نشدند 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 ۲۰-۱۵٪ موارد HCC ممکن است در کبدهای غیرفیبروتیک یا کبدهایی با حداقل فیروز 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 مسومیت‌های کبدی و فیروز 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 گرفتند 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 هپاتوکارسینوزن به وسیله بررسی الگوی رشد و بلوغ غیر عادی سلول‌ها را فراهم نموده است. در فرآیند این تحقیق چند تغییر ساختاری در بافت کبد قابل مشاهده بود که به ترتیب می‌توان به هیپرتروفی سلول‌ها، فیبروزن و دیسپلازی شدید اشاره نمود. از آنجایی که سرطان کبد یک بیماری چند مرحله‌ای است و به طور کلی تعیین زمان و مرحله گذاری سرطان‌ها

سایتو کاین های التهابی همچون (Nuclear NF-kB factor Kappa B) (۲۳)، متابولیسم و آپوپتوز سلولها را دستخوش تغییر نماید (۲۲). در تحقیقات مشابه پس از تیمار نمونه های سلولی و *in-vivo* (در جوندگان) دریافته اند که تیوا ستامید می تواند سبب افزایش میزان سرمی آنزیم های آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) با آسیب به کبد گردد (۱۹). در این پروژه پس از مدت ۲ ماه قرار گیری موش ها در معرض تیواستامید، سلول های 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 می تواند به پزشکان کمک نماید تا در هر مرحله ای از بروز این سرطان بتوانند برای اهداف درمانی و تصمیم گیری در مورد نحوه درمان و آزمایش داروهای مختلف نمونه های *in-vivo* در اختیار داشته باشند. همچنین با توجه به اینکه هر ساله نزدیک به پانصد هزار بیمار مبتلا به سرطان کبد تشخیص داده می شود و با پیش آگهی ضعیف همراه است، بنابراین ایجاد مدل های تجربی جهت تعریف پاتوزن HCC که در مراحل اولیه سرطان کبد بروز می کند، می تواند به عنوان راه حلی در جهت کاهش هزینه تحقیقات پیرامون سرطان باشد. ساخت مدل حیوانی سرطانی به محققان این فرصت را می دهد تا غربالگری ها و تحقیقات خود را در شرایطی که تومور در تعامل با عوامل مختلف و متابولیسم های درونی قرار دارد، مورد بررسی قرار دهند. اگرچه اخیرا موش های مهندسی ژنتیک شده (۲۴) نیز امکان شناسایی مسیرهای دخیل در سرطانها را فراهم آورده اند، اما به دلیل نیاز صرف هزینه، زمان و امکانات بسیار، دستیابی به آنها محدود می باشد و مدل های القایی توسط مواد شیمیایی گزینه های مناسبی جهت بررسی آسیب های کبدی هستند. پیشنهاد می گردد آزمایشات فوق توسط انواع دیگر سموم در گونه های مختلف مورد بررسی قرار گیرد و از مارکرها مانند فاکتورهای مولکولی و ابزارهای تشخیصی دیگر همچون سی تی اسکن و سونوگرافی که روش های کم تهاجم تری نسبت به روش بیوپسی و پاتولوژی هستند استفاده

فیروز سپتوم رخ دهد (۱۶). آسیب کبد که یکی از اندام های حیاتی بدن در تنظیم پروسه های فیزیولوژیک و متابولیسم است، عوارض خطرناکی در پی دارد. بیش از ۲۰۰۰ ماده شیمیایی متفاوت که توسط انسان ساخته شده اند در زندگی روزمره وجود دارند که این ترکیبات در بدن متابولیزه می گردند و کبد عواض صلی است که در این فرآیند شرکت می کند (۱۷). تیواستامید یک سم تخریب کننده بافت کبد و به عنوان یک ماده پیش سرطانزا از طریق آسیب به ساختار کبد می باشد (۱۱). تیواستامید توسط آنزیم های CYP2E1 (۱۸) موجود در میکروزوم های 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 پتانسیل غشایی (۲۰) آنها در سلولها کبدی منجر به آپوپتوز و نکروز (۱۸) این سلولها می شود (۱۹). TAA مدت هاست که به عنوان یک سم کبدی شناخته شده است که نیاز به فعال سازی بیولوژیکی S اکسیداسیون به تیواستامید اکسید (TASO) و سپس به S بسپار واکنش پذیر S-Oxide (TASO2) دارد و می تواند توتومریزه شود به گونه های آسیله که قادر به تغییر نوکلئوفیل های سلولی شامل لیپیدهای فسفاتیدیل اتانول آمین (PE) و پروتئین های با زنجیره جانبی لیزین هستند (۲۱). سلول های کبدی می توانند به طور موثری TA را به TASO اکسید نموده و TA با لیپیدها و پروتئینها به شدت اتصالات کوالانت برقرار می کنند (۲۱). تحقیقات نشان داده است که قرار گرفتن در معرض این ماده می تواند با فعال نمودن سیستم ROS (گونه های فعال اکسیژن) مانند نیتروژن اکساید (NO) که سبب مرگ سلولها در اثر برهمکنش با یون سوپراکسیداز و تشکیل پروکسی نیتريت می شود، که باعث کاهش معنی دار مقادیر Ferric reducing FRAP (antioxidant power) که نشان دهنده ظرفیت آنتی اکسیدانیست شود (۲۰ و ۲۲). همچنین می تواند بر مسیرهای سیگنالینگ پیش آپوپتوتیک از طریق گیرنده های جفت شونده با G پروتئین و همچنین اثر بر فسفریلاسیون 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. Printice 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.

گردد.

### تقدیر و تشکر

بدینوسیله از جناب آقای دکتر امامی که در ایجاد بلوک و لام گیری نمونه ها ما را یاری نمودند و همچنین خانم دکتر مژگان شاه حسینی که در آنالیزهای پاتولوژی دلسوزانه اطلاعات خود را در اختیار ما گذاردند 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 می باشد.

### ملاحظات اخلاقی

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

### مشارکت نویسندگان

سحر فرزانه: انجام کار پژوهشی و نگارش مقاله؛ مسعود 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 بررسی های 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(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. Shahsavan S, Hosseini S E. Evaluating the effect of curcumin on Thioacetamide –induced liver in mature male 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.