

## آثار آسیب ناشی از ایسکمی پرفیوژن مجدد روی بیان ژنی برخی از ایزوفرم‌های سیتوکروم P450 در کبد موش صحرایی

جواد جمشیدیان<sup>۱</sup>، حسینعلی عرب<sup>۲\*</sup>، غلامرضا نیکبخت<sup>۳</sup>، فرهنگ ساسانی<sup>۴</sup> و امیر افخمی<sup>۵</sup>

تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۲

تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۱۱

### چکیده

آسیب ناشی از ایسکمی پرفیوژن مجدد ممکن است سبب تغییرهای عمده در عملکرد کبد شود. کبد، عضو مهمی برای سوخت و ساز بسیاری از ترکیب‌ها و داروهاست که در آن آنزیم‌های سیتوکروم P450 نقشی اساسی ایفا می‌کنند. در مطالعه‌ی حاضر به منظور بررسی آثار ناشی از ایسکمی پرفیوژن مجدد روی بیان ژنی برخی از ایزوفرم‌های سیتوکروم P450، چهار گروه ۵تایی موش صحرایی در معرض یک ساعت ایسکمی لوپار و سپس به ترتیب به مدت ۱، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت تحت پرفیوژن مجدد قرار گرفتند و یک گروه شاهد جراحی هم به عنوان کنترل انتخاب شد. در انتهای زمان‌های پرفیوژن مجدد، نمونه‌ی خون برای اندازه‌گیری تغییرهای آنزیمی، جمع‌آوری و سپس حیوانات به روش مرگ با ترحم کشته شدند و نمونه‌های بافت کبد برای مطالعه‌ی بیان ژنی اخذ گردیدند. از نمونه‌های بافتی، RNA تام استخراج گردید و cDNA از مدل mRNA ساخته شد. میزان بیان mRNA با استفاده از real time PCR و پرایمرهای اختصاصی ایزوفرم‌های سیتوکروم P450 محاسبه گردید. نتایج، نشان داد که میزان آلانین آمینوترانسفراز، آسپارات آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز در تمام گروه‌های در معرض ایسکمی پرفیوژن مجدد به طور معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) افزایش یافت که حداکثر آن در ۶ ساعت بعد از شروع پرفیوژن مجدد بود؛ اما مقادیر mRNA ایزوفرم‌های CYP2E1، CYP3A1 و CYP1A1 در گروه‌های در معرض ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از پرفیوژن مجدد به طور معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) کاهش نشان داد. نتایج این پژوهش، نشان داد که آسیب ناشی از ایسکمی پرفیوژن مجدد کبد، ممکن است سبب کاهش بیان ژنی ایزوفرم‌های سیستم سیتوکروم P450 شود که ممکن است فعالیت‌های سوخت و ساز کبد را متأثر سازد.

**کلمات کلیدی:** ایسکمی، پرفیوژن مجدد، کبد، سیتوکروم P450، بیان ژن، موش صحرایی

### مقدمه

هموراژیک و هیپوولومیک، جراحی و پیوند کبد، برخی از آسیب‌های ناشی از سموم، سندرم بودکیاری و بیماری ونو-اکلوسیو است و ممکن است موجب تغییرهای گسترده در ساختار و عملکرد کبد شود (Teoh and Farrell 2003). تغییرهای ناشی از آسیب ایسکمی پرفیوژن مجدد کبدی به دو فاز مشخص تقسیم شده است: فاز اول که در ۲ ساعت بعد از شروع پرفیوژن مجدد اتفاق می‌افتد، با استرس اکسیداتیو همراه است و موجب تحریک تولید

به عارضه‌ای که بعد از برقراری مجدد جریان خون و تأمین دوباره‌ی اکسیژن در بافتی که قبلاً در معرض ایسکمی قرار داشته، آسیب ناشی از ایسکمی پرفیوژن مجدد گفته می‌شود (Dorweiler et al. 2007, Teoh and Farrell 2003). این شکل از آسیب کبدی را Toledo-pereyra و همکاران در سال ۱۹۷۵ در مطالعات تجربی روی عمل پیوند کبد شرح داده‌اند. این نوع آسیب از وقایع غیرقابل اجتناب متعاقب تروما، شوک‌های

<sup>۱</sup> دانش‌آموخته‌ی دکترای فارماکولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران

<sup>۲\*</sup> دانشیار گروه فارماکولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران

<sup>۳</sup> استاد گروه میکروبیولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران

<sup>۴</sup> دانشیار گروه پاتولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه تهران

<sup>۵</sup> استادیار گروه فارماکولوژی، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد

2001). تاکنون بیش از ۷۷۰۰ سکانس مختلف سیتوکروم P450 شناسایی شده است که در بیش از ۲۷۰ خانواده‌ی مختلف ژنی قرار گرفته‌اند و ۱۸ تای آن‌ها در پستانداران یافت شده‌اند (Nebert and Russell 2002, Nebert and Dalton 2006). نقش آنزیم‌های سیتوکروم P450 در بدن موجودات فراتر از عمل سوخت و ساز مواد مختلف با منشأ اندوژن و آگزوژن می‌باشد. تاکنون سوبستراهای اندوژن مختلفی در بدن برای آنزیم‌های سیتوکروم P450 شناسایی شده‌اند که می‌توان به اسیدهای چرب اشباع و غیراشباع، ایکازانوئیدها، اسیدهای صفراوی، استروئیدها، مشتقات ویتامین D<sub>3</sub>، رتینوئیدها و اوروپورفیرینوژن‌ها اشاره کرد (Nebert and Russell 2002). سوبستراهای آگزوژن این آنزیم‌ها نیز بسیار متنوع هستند و شامل انواع آلایندها و مواد شیمیایی محیطی، فراورده‌های طبیعی حاصل از گیاهان و قارچ‌ها و بیش از ۹۰ درصد از ترکیب‌های دارویی می‌باشند که به صورت بالینی، تجویز می‌شوند (Nebert and Russell 2002, Zhou et al. 2010).

به رغم مطالعات قابل توجهی که در مورد روند پاتوفیزیولوژی و مکانیسم‌های مولکولی دخیل در ایجاد ضایعات ناشی از ایسکمی پرفیوژن مجدد در کبد، صورت گرفته است، هنوز در برخی از جنبه‌ها از جمله آثار این ضایعه روی سوخت و ساز داروها و عوامل گزنوبیوتیک، ابهام وجود دارد. مطالعات انجام گرفته هم عمدتاً بر پایه‌ی تغییرهای سوخت و ساز داروها و نه تغییرهای آنزیم‌های متابولیزه کننده، بوده است. علاوه بر این، برخی از مطالعات به اهمیت برخی از ایزوفرم‌های سیتوکروم P450 به عنوان منبع ROS و نقش مهم آن‌ها در پاتوفیزیولوژی آسیب ایسکمی پرفیوژن مجدد، اشاره کرده‌اند (Granville et al. 2004, Shaik and Mehvar 2008). با عنایت به این موارد و با توجه به نقش کلیدی این مجموعه آنزیمی در سوخت و ساز مواد اندوژن و گزنوبیوتیک، این مطالعه به دنبال آن بوده تا تغییرها در بیان ژنی ایزوفرم‌های مهمی چون CYP1A1، CYP3A1 و

و آزاد شدن رادیکال‌های آزاد اکسیژن از سلول‌های مختلف کبدی می‌شود. در این مرحله، فعال شدن سلول‌های کوپفر و سیستم کمپلمان، بیش‌ترین نقش را در ایجاد تغییرهای بافتی به عهده دارند (Tamura et al. 1993, Shiratori et al. 2012). در این مرحله که به آن، فاز حاد پرفیوژن مجدد نیز گفته می‌شود، اشکال مختلف رادیکال‌های آزاد اکسیژن از طریق اکسیداسیون، موجب تخریب پروتئین‌ها، پراکسیداسیون لیپیدها و ایجاد اختلال در DNA می‌شوند که آسیب سلولی را به دنبال خواهد داشت (Dorweiler et al. 2010, Ildefonso and Arias-Diaz 2007). فاز بعدی آسیب کبدی ناشی از ایسکمی پرفیوژن مجدد عموماً در طی ۶ تا ۴۸ ساعت بعد از شروع پرفیوژن رخ می‌دهد و یک ضایعه‌ی التهابی است که به دنبال نفوذ نوتروفیل‌های فراخوان شده به محل، اتفاق می‌افتد. این تغییرها سبب تشدید تولید و آزاد شدن رادیکال‌های آزاد می‌گردد و میزان ضایعات را افزایش می‌دهد (Teoh and Farrell 1991, Jaeschke and Farhood 2003). نوتروفیل‌های فعال شده، سبب آزاد شدن الاستاز، کاتپسین G، هپاریناز، کلاژناز و آنزیم‌های هیدرولیز کننده می‌شوند که به همراه سایر سیتوکین‌های القایی در تشدید آسیب‌های بافتی مشارکت می‌کنند (Teoh and Farrell 2003, Jaeschke 2006, Ildefonso and Arias-Diaz 2010). فرآیندهای مرگ سلولی نکروز و آپوپتوز هر دو ممکن است در آسیب بافتی ناشی از ایسکمی پرفیوژن مجدد، بروز کنند (Gao et al. 1998, Teoh and Farrell 2003).

کبد، ارگان اصلی مسئول سوخت و ساز ترکیب‌های آگزوژن یا گزنوبیوتیک، داروها و بسیاری از مواد اندوژن محسوب می‌شود که سوخت و ساز این ترکیب‌ها عمدتاً در دو فاز و با مشارکت سیستم‌های آنزیمی مختلف، انجام می‌شود. مجموعه آنزیمی سیتوکروم P450 یک ابر خانواده بزرگ و متنوع از هموپروتئین‌ها می‌باشند که به عنوان آنزیم‌های مونواکسیژناز با اضافه کردن یک اتم اکسیژن به یک ترکیب آلی عمل می‌کنند (Parkinson

به محوطه‌ی بطنی، لیگامان‌هایی که کبد را به دیافراگم صفاقی متصل می‌کنند، قطع گردیدند و سپس کبد با ملایمت به صورت واژگون در سطح خارج شکم قرار گرفت. در گروه‌های آزمایش با استفاده از گیره‌ی بولداگ، شریان کبدی و ورید باب که خون‌رسانی به لوب‌های چپ و میانی کبد را انجام می‌دهند، به مدت ۱ ساعت مسدود شدند (Arab et al. 2009). گروه شاهد جراحی هم تحت عمل جراحی بدون گیره‌گذاری قرار گرفت. پس از طی دوره‌ی ایسکمی با برداشتن گیره، کبد‌های چهار گروه تحت درمان به ترتیب به مدت ۱، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت در معرض پرفیوژن مجدد قرار گرفتند. در پایان هر دوره‌ی پرفیوژن، ابتدا از قلب خون‌گیری انجام شد، سپس از حیوانات بلافاصله بعد از آسان‌کشی نمونه‌های بافتی از لوب‌های چپ و میانی کبد جدا گردیدند. نمونه‌های خون جمع‌آوری شده، سانتریفوژ شدند و سرم آن‌ها جدا و برای تعیین تغییرهای آنزیمی به فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد و نمونه‌های بافتی به فریزر ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد منتقل و تا زمان آزمایش‌ها نگاه‌داری شدند.

#### اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های سرمی

پس از خارج نمودن نمونه‌های سرمی از انجماد، فعالیت آنزیم‌های سرمی آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) با استفاده از کیت‌های تجاری شرکت پارس آزمون (ایران) و دستگاه اتو آنالایزر الان اپندورف (آلمان) مورد سنجش قرار گرفتند. در سرم‌های مذکور، فعالیت آنزیم‌های AST و ALT به روش ریت من-فرانکل<sup>۱</sup> و ALP به روش بسی-لوری-بروک<sup>۲</sup> اندازه‌گیری گردید.

#### استخراج RNA و تعیین بیان ژن ایزوفرم‌های سیتوکروم P450

استخراج RNA از نمونه‌های بافتی به طور جداگانه با استفاده از کیت RNX-Plus™ (Cat.No.:RN7713C)

CYP2E1 را در بازه‌های زمانی مختلف پرفیوژن مجدد در کبد موش صحرائی، مورد بررسی قرار دهد.

#### مواد و روش کار

##### حیوانات و گروه‌بندی

در مطالعه‌ی حاضر، تعداد ۲۵ موش صحرائی بالغ نر نژاد اسپراگ دالی با میانگین وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم از مرکز تکثیر و پرورش حیوانات آزمایشگاهی رازی کرج خریداری شدند و مورد استفاده قرار گرفتند. موش‌های صحرائی مذکور به خانه‌ی حیوانات منتقل شدند و تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفتند. در طی دوره‌ی مطالعه، دمای محل نگاه‌داری حیوانات  $23 \pm 2$  درجه‌ی سانتی‌گراد بود. غذای استاندارد از کارخانه‌ی خوراک دام و طیور پارس، تهیه شد. حیوانات مورد مطالعه به طور تصادفی در پنج گروه پنج‌تایی، شامل یک گروه شاهد جراحی (گروه کنترل) و ۴ گروه تحت درمان قرار داده شدند که به ترتیب در معرض ۱ ساعت ایسکمی و ۱ ساعت پرفیوژن مجدد (گروه یک یا 1hrI/R)، ۱ ساعت ایسکمی و ۶ ساعت پرفیوژن مجدد (گروه دو یا 6hrI/R)، ۱ ساعت ایسکمی و ۱۲ ساعت پرفیوژن مجدد (گروه سوم یا 12hrI/R) و ۱ ساعت ایسکمی و ۲۴ ساعت پرفیوژن مجدد (گروه چهارم یا 24hrI/R) قرار گرفتند. تمامی روش‌های انجام شده روی حیوانات در این مطالعه، بر اساس منشور ملاحظات اخلاقی مؤسسه‌ی مربوط (دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه تهران) صورت گرفته است.

##### روش جراحی و دسترسی به کبد

موش‌ها قبل از آزمایش به مدت یک روز از غذا محروم بودند؛ لیکن دسترسی آزادانه به آب داشتند. در روز آزمایش، ابتدا بیهوشی کامل به دنبال تجویز داخل صفاقی ۸۰ mg/kg کتامین و ۱۰ mg/kg زایلازین انجام گردید و سپس، به میزان ۳۰۰ واحد هپارین از طریق ورید رانی به حیوان تزریق شد. پس از لاپاراتومی و دسترسی

واکنش PCR (محصول شرکت Bioneer، کره) در زمان حقیقی و دستگاه ABI Step One Plus (آمریکا) انجام گردید. تمام داده‌ها در برابر میزان بیان ژن GAPDH (گلیسرآلدئید-۳- فسفات دهیدروژناز) به عنوان کنترل داخلی به صورت نرمال برآورد شدند و نسبت به گروه‌های کنترل، بیان گردیدند. لیست پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۱ آمده است.

### آنالیز آماری

برای محاسبه‌ی آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS16.0 استفاده شد و تمام داده‌ها بر اساس میانگین  $\pm$  خطای معیار نشان داده شدند. سطح معنی‌داری آزمون‌های آماری در مورد همه‌ی آزمون‌ها  $p < 0.05$  در نظر گرفته شد. قبل از آنالیز، با استفاده از آزمون کرومگروف اسمیرنوف، نرمال بودن توزیع داده‌ها بررسی شد و سپس برای مقایسه‌ی میانگین‌های مختلف از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون تکمیلی دانت-سی برای تغییرهای سری و آنزیم‌ها و LSD برای تغییرهای بیان ژن‌ها استفاده گردید.

شرکت سیناژن بر اساس روش گوانیدیوم اسید- ایزوتیوسیانات -فنول-کلروفرم طبق دستورالعمل انجام شد. نمونه‌ها تا زمان ساخت cDNA در فریزر  $-70^{\circ}\text{C}$  درجه‌ی سانتی‌گراد، نگهداری شدند. به منظور حذف DNA استخراج‌شده به همراه RNA، تمام نمونه‌های RNA قبل از به کارگیری در ساخت cDNA با DNase (فرمتاز، آلمان) درمان شدند. غلظت RNA با استفاده از قرائت جذب نمونه‌ها در طول موج  $260\text{ nm}$  توسط اسپکتروفوتومتر بیوفتومتر (اپندورف، آلمان) محاسبه گردید و چنانچه نسبت جذب  $260/280$  بالای  $1/8$  بود نمونه‌ها برای ساخت cDNA مورد استفاده قرار می‌گرفتند. برای ساخت cDNA از کیت Revert Aid First Strand cDNA Synthesis (فرمتاز، آلمان) استفاده گردید. به منظور تأیید بیان ژن‌های ایزوفرم‌های سیتوکروم P450، ابتدا واکنش PCR روی نمونه‌های RNA استخراج‌شده از بافت کبد، انجام گردید. بعد از تأیید بیان ژن برای ارزیابی بیان نسبی ژن‌های مورد نظر از آزمون PCR در زمان حقیقی بر اساس افزایش فلورسانس رنگ سایبرگرین به روش مقایسه‌ای  $\Delta\Delta\text{Ct}$  و با استفاده از استریپ‌های

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای به کار برده شده برای بیان ژن ایزوفرم‌های سیتوکروم P450

پرایمر	توالی (5'→3')	عدد دسترسی به توالی ژن
GAPDH	F GATGGTGAAGGTCGGTGTG	NM_017008
	R ATGAAGGGGTCGTTGATGG	
CYP1A1	F GGGAGGTTACTGGTTCTGG	NM_012540
	R ATGAGGCTGTCTGTGATGTC	
CYP3A1	F TGGTAATAGACTTGAGAGAG	NM_013105
	R GGGCAGATATACATAAGGA	
CYP2E1	F CCTTCCCTCTCCCATCC	NM_031543
	R AACCTCCGCACATCCTTCC	

- 1- Reitman- Frankel
- 2- Bessey- Lowry -Brook

## نتایج

پرفیوژن مجدد به طور معنی داری ( $P \leq 0/05$ ) افزایش یافت که حداکثر مقدار آن‌ها در گروه در معرض ۶ ساعت پرفیوژن مجدد، مشاهده گردید.

تغییرات فعالیت آنزیم‌های سرمی ALT، AST و ALP در فعالیت آنزیم‌های سرمی ALT، AST و ALP در مقایسه با گروه کنترل جراحی در زمان‌های مختلف

جدول ۲: میانگین فعالیت آنزیم‌های سرمی آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) و آلکالین فسفاتاز (ALP) در گروه‌های مختلف مورد مطالعه

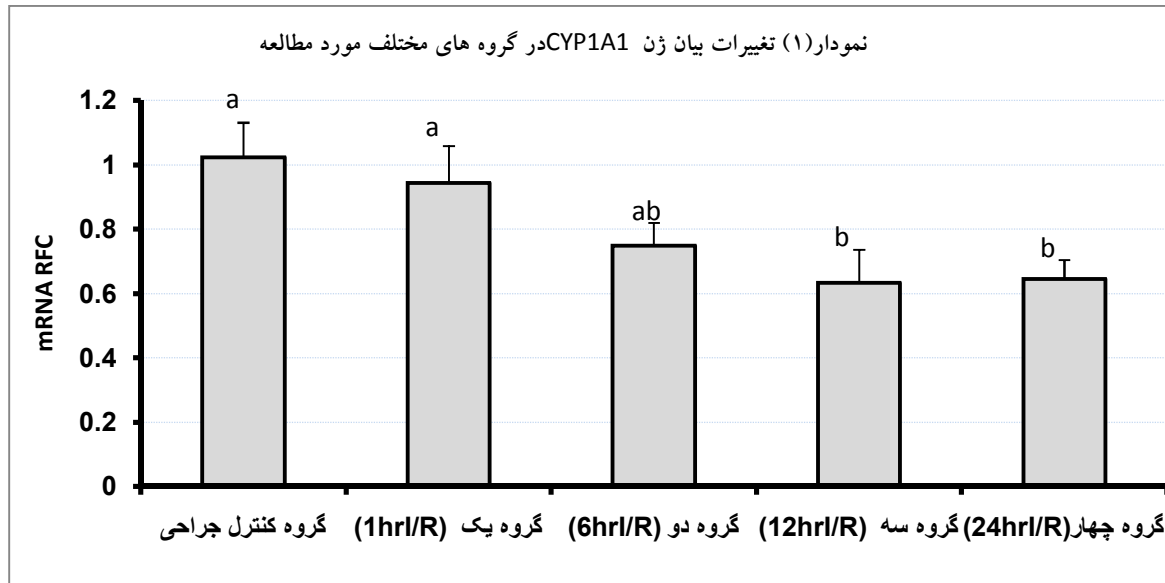
ALP(IU/L)	ALT(IU/L)	AST(IU/L)	آنزیم گروه*
۱۲۴/۲±۱۰/۱۸ <sup>a</sup>	۶۹±۵/۱۴ <sup>a</sup>	۹۶/۲±۸/۹۸ <sup>a</sup>	کنترل جراحی
۲۸۳/۲±۴۰/۹۵ <sup>b</sup>	۴۲۵/۴±۵۶/۳۹ <sup>b</sup>	۴۹۷/۲±۳۶/۱۹ <sup>b</sup>	گروه یک
۵۷۶/۲±۹۴/۲۴ <sup>c</sup>	۱۰۰۱/۶±۱۳۰/۶۶ <sup>c</sup>	۱۰۵۹/۹±۹۰/۰۱ <sup>c</sup>	گروه دو
۵۳۰±۵۸/۱۵ <sup>c</sup>	۷۳۸/۶±۷۶/۸۵ <sup>d</sup>	۸۵۰/۴±۷۷/۹۸ <sup>c</sup>	گروه سه
۳۵۰/۴±۴/۸۴ <sup>b</sup>	۵۷۲/۲±۳۳/۴ <sup>e</sup>	۶۵۰/۶±۴۷/۹۷ <sup>d</sup>	گروه چهار

\* گروه‌های آزمایشی یک، دو، سه و چهار، ابتدا در معرض ۱ ساعت ایسکمی و در ادامه به ترتیب به مدت یک، شش، دوازده و بیست و چهار ساعت تحت پرفیوژن مجدد، قرار گرفتند. داده‌ها به صورت میانگین±خطای معیار هستند و حروف مشابه در هر ستون عمودی، بیانگر عدم اختلاف معنی دار در بین گروه‌های مختلف می‌باشد ( $P > 0/05$ ).

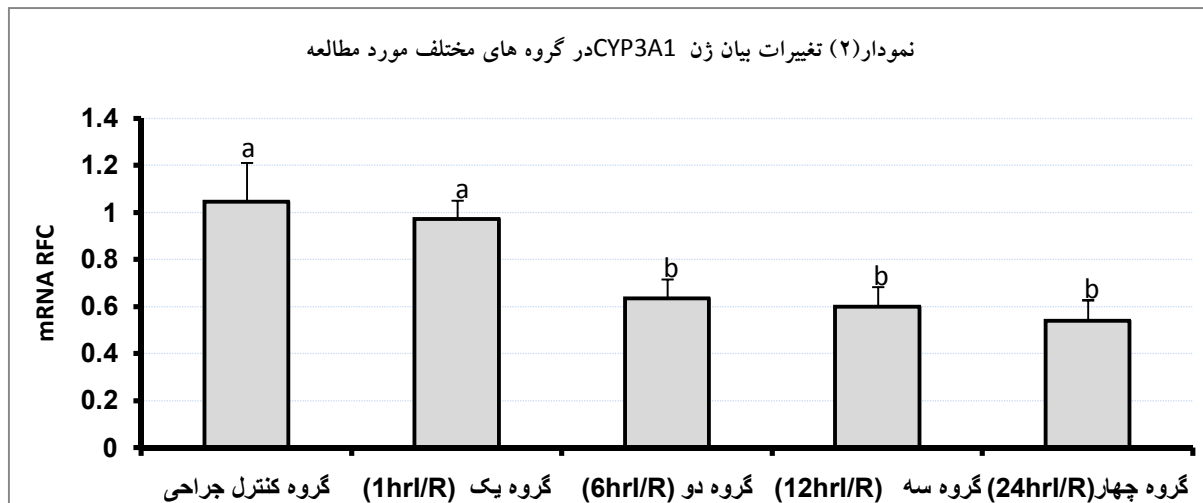
### بیان ژنی ایزوفرم‌های سیتوکروم P450

معنی دار بود ( $P \leq 0/05$ ). کاهش معنی داری نیز در بیان ژنی ایزوفرم CYP3A1 در گروه در معرض ۶ ساعت پرفیوژن مجدد در مقایسه با گروه کنترل جراحی و گروه در معرض ۱ ساعت پرفیوژن مجدد، مشاهده گردید ( $P < 0/05$ ). در نمودارهای ۱ تا ۳ تغییرهای بیان ژن سه ایزوفرم مختلف سیتوکروم P450 در کبد گروه‌های مختلف مطالعه که تحت یک ساعت ایسکمی و بازه‌های زمانی مختلف پرفیوژن مجدد قرار گرفته بودند، به همراه گروه کنترل، مقایسه شده است.

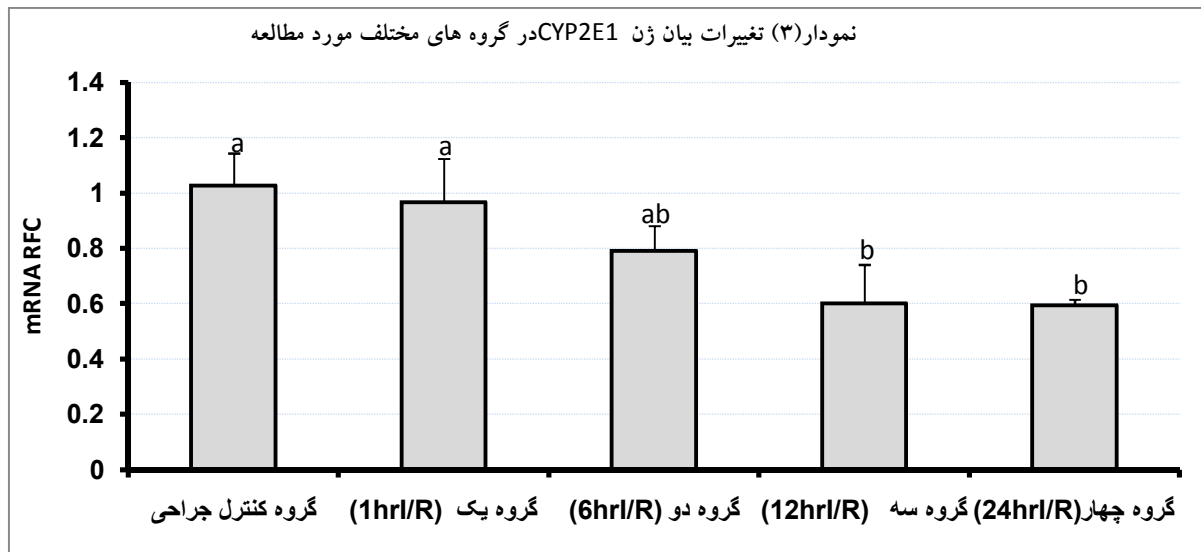
مقایسه‌ی تغییرهای ژنی ایزوفرم‌های مختلف سیتوکروم P450 در نمونه‌های بافت کبد جمع‌آوری شده از گروه‌های مختلف تحت مطالعه، نشان داد که بیان ژن‌های ایزوفرم‌های CYP1A1، CYP2E1، CYP3A1 در گروه‌های در معرض ۱۲ و ۲۴ ساعت پرفیوژن مجدد در مقایسه با گروه کنترل، به طور معنی داری کاهش یافته است ( $P \leq 0/05$  و  $P \leq 0/01$ ). این کاهش در بیان ژنی گروه‌های در معرض ۱۲ و ۲۴ ساعت پرفیوژن مجدد در مقایسه با گروه در معرض یک ساعت پرفیوژن مجدد نیز



نمودار ۱: مقایسه‌ی تغییرات بیان ژن CYP1A1 در رت‌های گروه کنترل جراحی و گروه‌های آزمایشی یک (1hr I/R)، دو (6hr I/R)، سه (12hr I/R) و چهار (24hr I/R) که ابتدا در معرض ۱ ساعت ایسکمی و در ادامه به ترتیب به مدت یک، شش، دوازده و بیست و چهار ساعت تحت پرفیوژن مجدد قرار گرفتند. مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد بیان شده‌اند و حروف متفاوت روی ستون‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار در گروه‌های مختلف می‌باشند.



نمودار ۲: مقایسه‌ی تغییرات بیان ژن CYP3A1 در رت‌های گروه کنترل جراحی و گروه‌های آزمایشی یک (1hr I/R)، دو (6hr I/R)، سه (12hr I/R) و چهار (24hr I/R) که ابتدا در معرض ۱ ساعت ایسکمی و در ادامه به ترتیب به مدت یک، شش، دوازده و بیست و چهار ساعت تحت پرفیوژن مجدد قرار گرفتند. مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد بیان شده‌اند و حروف متفاوت روی ستون‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار در گروه‌های مختلف می‌باشند.



نمودار ۳: مقایسه‌ی تغییرات بیان ژن CYP2E1 در رت‌های گروه کنترل جراحی و گروه‌های آزمایشی یک (1hr I/R)، دو (6hr I/R)، سه (12hr I/R) و چهار (24hr I/R) که ابتدا در معرض ۱ ساعت ایسکمی و در ادامه به ترتیب به مدت یک، شش، دوازده و بیست و چهار ساعت تحت پرفیوژن مجدد قرار گرفتند. مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد بیان شده‌اند و حروف متفاوت روی ستون‌ها بیانگر اختلاف معنی‌دار در گروه‌های مختلف می‌باشند.

#### بحث

شده توسط ایسکمی پرفیوژن مجدد ممکن است تغییرهایی اساسی در عملکردهای مختلف سلول‌های کبدی از جمله تغییر در بیان ژنی آنزیم‌های متابولیزه کننده، مثل ایزوفرم‌های سیتوکروم P450 به دنبال داشته باشد. مقایسه‌ی تغییرهای بیان ژنی در گروه‌های مختلف در مطالعه‌ی حاضر، نشان داد که مقادیر mRNA ایزوفرم‌های CYP2E1، CYP3A1 و CYP1A1 در گروه‌های در معرض ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت بعد از پرفیوژن مجدد در مقایسه با گروه کنترل، به طور معنی‌دار کاهش داشته است که این امر حاکی از اثر ضایعات ایسکمی پرفیوژن مجدد روی آنزیم‌های متابولیزه کننده‌ی کبد می‌باشد.

مطالعات مختلف، نشان می‌دهند که پراکسیداسیون لیپیدها موجب اختلال در عملکرد آنزیم‌های میکروزومی از جمله آنزیم‌های سیتوکروم P450 می‌شود (Eum and Lee et al. 2000, Lee 2004). شواهد هم‌چنین، حاکی است که بیان آنزیم‌های سیتوکروم P450 در وضعیت‌های مختلف آسیب اکسیداتیو کاهش می‌یابد (Umanna et al.

پس از برقراری پرفیوژن مجدد در بافت‌های کبدی که قبلاً در معرض ایسکمی قرار گرفته‌اند، آبخاری از اتفاقات سلولی و مولکولی بروز می‌کند که در نهایت به آسیب سلول‌های کبدی منجر می‌شود. این آسیب که تحت عنوان ضایعه‌ی ایسکمی پرفیوژن مجدد نامیده می‌شود، باعث بروز تغییر در ساختار و عملکرد کبد می‌گردد (Dorweiler et al. 2007, Ildefonso et al. 2010). کبد عضو بسیار مهم در سوخت و ساز ترکیب‌ها و داروهای مختلف می‌باشد که در آن، آنزیم‌های سیتوکروم P450 نقش اساسی ایفا می‌کنند. مطالعه‌ی حاضر در نظر داشته است تا آثار ضایعات ناشی از ایسکمی پرفیوژن مجدد روی بیان ژنی ایزوفرم‌های اصلی سیتوکروم P450 را مورد بررسی قرار دهد. افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم‌های سرمی ALT، AST و ALP در گروه‌هایی که در معرض یک ساعت ایسکمی و بازه‌های زمانی مختلف پرفیوژن مجدد قرار گرفته بودند، حاکی از بروز ضایعه‌ی ایسکمی پرفیوژن مجدد بوده است. از طرف دیگر، ضایعات ایجاد

معنی دار بیان ژن CYP3A1 در مطالعه‌ی حاضر، پس از ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پرفیوژن مجدد با روند افزایشی وقوع آپوپتوز در این زمان‌ها ( Dorweiler et al. 2007, ) همخوانی دارد. مطالعات (Ildfonso et al. 2010) متعددی، وقوع مرگ سلولی ناشی از آپوپتوز را در جریان ضایعه‌ی ایسکمی پرفیوژن مجدد در کبد، ثابت کرده‌اند. بر اساس این مشاهدات، ۵۰ تا ۷۰ درصد سلول‌های اندوتلیال و ۴۰ تا ۶۰ درصد هپاتوسیت‌ها، در طی مرحله‌ی پرفیوژن مجدد متحمل آپوپتوز می‌شوند ( Cursio et al. 1999, Kohli et al. 1999, Teoh and Farrell 2003). برخی از مطالعات، نشان داده شده که ایسکمی پرفیوژن مجدد، موجب کاهش بیان گیرنده آریل هیدروکربن (AHR) می‌شود و کاهش بیان AHR با کاهش بیان ژنی برخی از ایزوفرم‌های سیتوکروم P450 از جمله CYP1A1 همراه است (Umannova et al. 2008). این یافته‌ها نیز با نتایج تحقیق حاضر مبنی بر اثر آسیب ایسکمی پرفیوژن مجدد بر کاهش بیان ژن ایزوفرم‌های سیتوکروم P450 هم‌خوانی دارد. در برخی از مطالعات به نقش آنزیم‌های سیتوکروم P450 میتوکندریایی، نظیر CYP1A1/2، CYP2B1/2، CYP2E1 و CYP3A1/2 به عنوان مولد اشکال واکنش‌پذیر اکسیژن (ROS) اشاره شده که ممکن است در پاتوفیزیولوژی این آسیب، نقش داشته باشد؛ البته این پدیده در ساعات اولیه‌ی پرفیوژن مجدد (۳ ساعت اول) اتفاق می‌افتد (Shaik and Mehvar 2008) و بر اساس نتایج حاضر به نظر می‌رسد با افزایش دوره‌ی پرفیوژن مجدد بیان این آنزیم‌ها کاهش پیدا می‌کند و یا این که ایزوفرم‌های مختلف سیتوکروم P450 به طور متفاوت، تحت تأثیر آسیب ناشی از ایسکمی پرفیوژن مجدد قرار می‌گیرند.

به طور خلاصه، افزایش معنی دار فعالیت آنزیم‌های ALT, AST و ALP در گروه‌هایی که در معرض ایسکمی پرفیوژن مجدد قرار گرفته بودند، حاکی از بروز ضایعه در کبد موش‌های صحرائی تحت مطالعه بوده است. ضایعات ایجاد شده، موجب کاهش بیان ژنی برخی از

تولید و آزاد شدن رادیکال‌های آزاد بین سلولی به ویژه در فاز تأخیری پرفیوژن مجدد، ممکن است موجب تغییر در بیان ژن‌ها گردد (Eum and Lee 2004). هیپوکسی سلولی ممکن است به عنوان یک سیگنال کلیدی فعال‌کننده‌ی عوامل تنظیم‌کننده‌ی نسخه‌برداری، نظیر عامل القا کننده‌ی هیپوگزانتین ۱، فاکتور هسته‌ای کاپا بی (NFkB) و پروتئین فعال کننده-۱ (AP-1) و فرآیندهای پروتئین کیناز فعال شونده توسط استرس (SARK) باشد. در بافت‌هایی که در معرض ایسکمی پرفیوژن مجدد قرار می‌گیرند، افزایش تولید ROS سبب کاهش ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها می‌شود و رادیکال‌های آزاد اکسیژن با لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA سلولی، وارد واکنش شده، منجر به آسیب/مرگ سلولی و فعال شدن فاکتور هسته‌ای کاپا بی (NFkB) می‌شوند ( Tamura et al. 2012, Dorweiler et al. 2007, Hensley et al. 2000). البته فعال شدن NFkB در ضایعه‌ی ایسکمی پرفیوژن مجدد، علاوه بر این که از طریق ROS پدید می‌آید (Stancovski and Baltimore 1997) توسط سیتوکین‌هایی نظیر اینترلوکین ۱ و TNF $\alpha$  و پیام‌رسانی به دنبال تحریک گیرنده‌های شبه TOLL توسط قطعات هیالورونان حاصل از تخریب بافتی هم بروز می‌کند (Taylor et al. 2004, Oyama et al. 2004). در برخی از مطالعات به نقش عواملی نظیر AP-1 و NFkB در کاهش بیان ژن‌های CYP1A1 و CYP2B1 اشاره شده است (Eum and Lee 2004). مطالعات برون تنی و درون تنی متعدد نشان داده است که اینترلوکین ۱ و ۶ و TNF $\alpha$  در شرایط عفونت و التهاب ممکن است موجب کاهش بیان آنزیم‌های سیتوکروم P450 شوند (Morgan 1997, ) نتایج بعضی از مطالعات نیز نشان داده که افزایش بیان ژن CYP3A1 اثر محافظتی مشخصی روی کبد دارد. CYP3A1 ژن هدف گیرنده‌ی پرگن X (PXR) محسوب می‌شود و فعال شدن PXR روی افزایش بیان پروتئین BCL-xl اثر مهاری دارد و موجب کاهش آپوپتوز می‌گردد (Iannelli et al. 2010)؛ بنابراین کاهش



آنزیم‌های متابولیزه کننده‌ی کبد می‌باشد که این امر ممکن است در عملکرد متابولیسمی کبد، تأثیر گذار باشد.

ایزوفرم‌های مهم سیتوکروم P450 نظیر CYP2E1، CYP1A1 و CYP3A1 گردید. این نتایج، حاکی از اثر ضایعات ناشی از آسیب ایسکمی پرفیوژن مجدد روی

## تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود واجب می‌دانند از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران برای تأمین اعتبار مورد نیاز این پژوهش و هم‌چنین از همکاری‌های خانم منصوره بهارلو و غلامرضا شمس در انجام دادن آزمایش‌ها تشکر و قدردانی کنند.

## منابع

- Arab, H.A.; Sasani, F.; Rafiee, M.H.; Fatemi, A. and Javaheri, A. (2009). Histological and biochemical alterations in early-stage lobar ischemia reperfusion in rat liver. *World Journal of Gastroenterology*, 15 (16): 1951-1957.
- Cursio, R.; Gugenheim, J.; Ricci, J.E.; Crenesse, D.; Rostagno, P.; Maulon, L. et al. (1999). A caspase inhibitor fully protects rats against lethal normothermic liver ischemia by inhibition of liver apoptosis. *The Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB) Journal*, 13: 253-261.
- Dorweiler, B.; Pruefer, D.; Andrasi, T.B.; Maksan, S.M.; Schmiedt, W.; Neufang, A. and Vahl, C.F. (2007). Ischemia-reperfusion injury. *European Journal of Trauma and Emergency Surgery*, 6: 600-612.
- Eum, H.A. and Lee, S.M. (2004). Effects of Trolox on the activity and gene expression of cytochrome P<sub>450</sub> in hepatic ischemia/reperfusion. *British Journal of Pharmacology*, 142: 35-42.
- Gao, W.; Bentley, R.C.; Madden, J.F. and Clavien, P.A. (1998). Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of prevention of injury in rat liver transplantation. *Hepatology*, 27: 1652-1660.
- Granville, D.J.; Tashakkor, B.; Takeuchi, C.; Gustafsson, A.B.; Huang, C.; Sayen, M.R. et al. (2004). Reduction of ischemia and reperfusion-induced myocardial damage by cytochrome P450 inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 1321-1326.
- Hensley, K.; Robinson, K.A.; Gabbita, S.P.; Salsman, S. and Floyd, R.A. (2000). Reactive oxygen species, cell signaling and cell injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 28: 1456-1462.
- Iannelli, A.; de Sousa, G.; Zucchini, N.; Saint-Paul, M.C.; Gugenheim, J. and Rahmani, R. (2010). Anti-apoptotic pro-survival effect of clotrimazole in a normothermic ischemia reperfusion injury animal model. *Journal of Surgical Research*, 171: 101-107.
- Ildelfonso, J.A. and Arias-Díaz, J. (2010). Pathophysiology of liver ischemia Reperfusion injury. *Cirugía Española (English Edition)*, 87(4): 202-209.
- Jaeschke, H. and Farhood, A. (1991). Neutrophil and Kupffer cell induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver. *American Journal of Physiology*, 260: 355-362.
- Jaeschke, H.; Farhood, A. and Bautista, A.P. (1993). Complement activates Kupffer cells and neutrophils during reperfusion after hepatic ischemia. *American Journal of Physiology*, 264: 801-809.
- Jaeschke, H. (2006). Mechanisms of liver injury. II. Mechanisms of neutrophil induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 290: 1083-1088.
- Kohli, V.; Selzner, M.; Madden, J.F.; Bentley, R.C. and Clavien, P.A. (1999). Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Transplantation*, 67: 1099-1105.
- Lee, S.M.; Park, M.J.; Cho, T.S. and Clemens, M.G. (2000). Hepatic injury and lipid peroxidation during ischemia and reperfusion. *Shock*, 13: 279-284.
- Lentsch, A.B.; Kato, A.; Yoshidome, H.; McMasters, K.M. and Edwards, M.J. (2000). Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia reperfusion injury. *Hepatology*, 32: 169-173.

- Morgan, E.T. (1997). Regulation of cytochromes P<sub>450</sub> during inflammation and infection, *Drug Metabolism Reviews*, (29): 1129-1188.
- Nebert, D.W. and Dalton, T.P. (2006). The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 6: 947-960.
- Nebert, D.W. and Russell, D.W. (2002). Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet*, 360:1155-1162.
- Oyama, J.; Blais, C.Jr.; Liu X.; Pu M.; Kobzik, L.; Kelly, R.A. et al. (2004). Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation*, 109: 784-789.
- Parkinson, A. Biotransformation of xenobiotics. In: Kelaassen C.D. (2001). *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. 6<sup>th</sup> ed. New York, McGraw-Hill Inc, pp: 133-224.
- Shiratori, Y.; Ohmura, K.; Hikiba, Y.; Matsumura, M.; Nagura, T.; Okano, K. et al. (1998). Hepatocyte nitric oxide production is induced by Kupffer cells. *Digestive Diseases and Sciences*, 43(8): 1737-1745.
- Shaik, I.H. and Mehvar, R. (2008). Effects of cytochrome P<sub>450</sub> inhibition by cimetidine on the warm hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Journal of Surgical Research*, 159: 680-688.
- Stancovski, I. and Baltimore, D. (1997). NFκB activation: the I kappa B-kinase revealed? *Cell*, 91: 299-302.
- Tamura, T.; Kondo, T.; Pak, S.; Nakano, Y.; Murata, S.; Fukunaga, K. and Ohkohchi, N. (2012). Interaction between Kupffer cells and platelets in the early period of hepatic ischemia reperfusion injury: An in vivo study. *Journal of Surgical Research*, 178: 443-451.
- Taylor, K.R.; Trowbridge, J.M.; Rudisill, J.A.; Termeer, C.C.; Simon, J.C. and Gallo, R.L. (2004). Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 17079-17084.
- Teoh, N.C. and Farrell, G.C. (2003). Hepatic ischemia reperfusion injury: Pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 18(8): 891-902.
- Toledo-Pereyra, L.H.; Simmons, R.L. and Najarian, J.S. (1975). Protection of the ischemic liver by donor pretreatment before transplantation. *The American Journal of Surgery*, 129: 513-517.
- Umannová, L.I.; Machala, M.; Topinka, J.; Nováková, Z.; Milcová, A.; Kozubík, A. and Vondráček, J. (2008). Tumor necrosis factor-alpha potentiates genotoxic effects of benzo[a]pyrene in rat liver epithelial cells through upregulation of cytochrome P450 1B1 expression. *Mutation Research*, 640: 162-169.
- Zhou, S.F.; Zhou, Z.W. and Huang, M. (2010). Polymorphisms of human cytochrome P450 2C9 and the functional relevance. *Toxicology*, 278: 165-188.

## Effects of ischemia-reperfusion injury on the gene expression of some cytochrome P450 isoforms in the rat liver

Jamshidian, J.<sup>1</sup>; Arab, H.A.<sup>2</sup>; Nikbakht, G.R.<sup>3</sup>; Sasani, F.<sup>4</sup> and Afkhami, A.<sup>5</sup>

Received: 23.06.2014

Accepted: 02.11.2014

### Abstract

Hepatic ischemia-reperfusion (IR) injury may affect different biological and functional roles of the liver. Liver accounts as an important organ for metabolizing different compounds and drugs in which cytochrome P<sub>450s</sub> (CYPs), play an important role. This study aimed to investigate the effects of IR injury on the gene expression of the major CYPs isoforms in the rat liver. Four groups (n=5) of male Sprague-Dawley rats underwent 60 min lobar hepatic ischemia followed by 1, 6, 12 or 24h reperfusion, and a sham-operated group was selected as control. At the end of each reperfusion period, blood samples were taken to evaluate enzyme alterations induced by IR and then animals were euthanatized and tissue samples were taken to study IR-induced changes in gene expression of some CYPs isoforms. Total RNA was isolated from the rat liver tissue and then cDNA was synthesized from an mRNA template. The level of mRNA expression in the liver was analyzed by real-time PCR using specific primers for CYP450 isoforms. The levels of ALT, AST and ALP in the groups subjected to IR was significantly (P<0.05) increased during different times of reperfusion and reached to the peak 6h after the reperfusion. However, the level of CYP1A1, CYP3A1 and CYP2E1 mRNA was significantly (P<0.05) decreased during 6, 12 and 24h of reperfusion. These results showed that IR injury may induce down regulation of the individual CYP<sub>450</sub> isoforms and these changes may affect CYP-mediated drug metabolizing activities by the liver.

**Key words:** Ischemia, Reperfusion, Liver, Cytochrome P450, Gene expression, Rat

---

1- PhD Graduated of Pharmacology, Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran

2- Associate Professor, Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran

3- Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran

4- Associate Professor, Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Iran

5- Assistant Professor, Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

**Corresponding Author:** Arab, H.A., E-mail: harab@ut.ac.ir