

Review Article

Animal Models of Liver Cirrhosis and Fibrosis

Rabani V., M.Sc., Baharvand H., Ph.D.*, Pournasr B., M.Sc., Farzaneh Z., M.Sc.

**P.O.Box: 19395-4644, Stem Cells and Developmental Biology Department, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran*

Abstract

Animal modeling is a crucial necessity in clinical studies of liver diseases. Authenticity of the data which are produced using this tool under different conditions and accuracy of the analyses and assessments which would be based on such data sets is completely dependent on the adoption of a standardized methodology for analyzes and assessment of these data sets. Cirrhosis and Fibrosis are among the most important diseases which are studied by animals modeling due to the fact that their final structure is usually similar among a verity of patients and also because they are the common end stage of most chronic liver diseases. Up to now, different approaches such as hepatotoxicity and surgical methods have been utilized to obtain cirrhotic or fibrotic models that either of which has its especial advantages and disadvantages. It is obvious that using models could indicate the production and treatment mechanisms of disease which we elucidate Fibrosis and cirrhosis here. Considering several animal models which were used for liver disease in the world, in this survey we try to explain why, what and how an animal must be choosen for modeling and how could be evaluated.

Key words: Animal model, Liver disease, Fibrosis, Cirrhosis

مدل‌های جانوری سیروز و فیروز کبد

وحیده ربانی،* M.Sc.، حسین بهاروند،** Ph.D.، بهشاد پورنصر،* M.Sc.، زهرا فرزانه،* M.Sc.

* گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی، پژوهشکده رویان، تهران، ایران
** گروه زیست‌شناسی تکوینی دانشگاه علم و فرهنگ جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

تاریخ وصول: فروردین ماه ۸۸، تاریخ پذیرش: خردادماه ۸۸

چکیده

ایجاد مدل حیوانی ابزاری است کاربردی برای مطالعات بالینی که در مطالعات بیماری‌های کبدی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. برای استفاده بهینه از این ابزار بایستی استانداردهایی در راستای ایجاد و ارزیابی خلق شود تا نتایج به دست آمده از آزمایش‌های گوناگون با یکدیگر قابل مقایسه شود. در میان بیماری‌های کبدی موجود که با استفاده از مدل‌سازی روی حیوانات مطالعه می‌شوند، فیروز و سیروز اهمیت خاصی دارد، زیرا اولاً شرایط بیماری تقریباً ساختار یکنواختی در تمام بیماران داشته و ثانیاً میزان شیوع این بیماری‌ها به دلیل آنکه در مراحل آخر همه بیماری‌های کبدی ایجاد می‌شوند، بسیار بالاست. روش‌های مختلف مدل‌سازی در این زمینه مثل استفاده از سموم کبدی و اعمال جراحی آزمایش شده و مزایا و معایب هر کدام تا حدی مشخص شده‌است. واضح است که استفاده از این مدل‌ها، مکانیسم‌های تولید بیماری و بهبود را تا حد زیادی آشکار و قابل مطالعه خواهد ساخت که در اینجا مکانیسم تولید و بهبود فیروز توضیح داده شده‌است. همچنین در این بررسی سعی شده‌است تا با توجه به مدل‌های مختلف حیوانی که در سراسر دنیا برای مطالعه بیماری‌های کبدی استفاده می‌شوند، نکات اصلی در نحوه انتخاب حیوان، ایجاد و ارزیابی مدل در مطالعات به صورت تخصصی تر توضیح داده شود.

کلیدواژه‌ها: مدل حیوانی، بیماری‌های کبدی، فیروز، سیروز

مقدمه

[۶-۴] عصبی [۷] انواع رده‌های اسکلتی [۸]، به صدر امیدهای تازه برای بهبودی بیماری‌های صعب‌العلاج صعود کرده [۹ و ۱۰]، مدل‌سازی حیوانی برای انجام آزمایش‌های پیش‌بالینی دارای اهمیت دو چندان شده‌است. چرا که در بیشتر مطالعات، استفاده از مدل‌های جانوری دست دانشمندان را برای ارزیابی‌ها، بررسی مرحله به مرحله و تأیید فرایض درمانی باز گذاشته و امکان نظریه‌پردازی و کار روی نظریات درمانی را افزایش می‌دهد و روشن است که به غیر از مطالعات در بدن موجود زنده، هیچ ادعایی مبنی بر کارایی روش پیشنهادی قابل استناد نخواهد بود.

استفاده از مدل حیوانی اهمیت ویژه‌ای برای مطالعات پاتولوژیک دارد چرا که استفاده از آن‌ها باعث می‌شود تا بتوان به مطالعه سئوالاتی پرداخت که در انسان دسترسی به پاسخ آن‌ها ناممکن است و از طرفی انجام آزمایش و بررسی نتایج آن بر مدل‌های حیوانی می‌تواند تائیدی بر فرضیه‌های درمانی باشد [۱ و ۲]. در چند سال اخیر که استفاده از سلول‌های بنیادی جنینی و بزرگسالان به دلیل پتانسیل‌های خاصشان مثل توانایی تمایز به رده‌های مختلف سلولی مانند تمایز به سلول‌های قلبی [۳] کبدی

آدرس مکاتبه: تهران، پژوهشکده رویان، مرکز تحقیقات علوم سلولی جهاد دانشگاهی،

گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، صندوق پستی ۴۶۴۴-۱۹۳۹۵

E-mail: Baharvand@RoyanInstitute.com

مدل‌های پیش‌کبدی با استفاده از ایجاد انسداد در پورت و بیشتر مدل‌های داخل کبدی با ایجاد فیروز و سیروز و پس‌کبدی با ایجاد انسداد در سیاهرگ کبدی تولید می‌شود [۱۱]، مانند بیماری بود کیاری (Budd - Chiari) که برای ایجاد این مدل با استفاده از وسایل فلزی در سیاهرگ کبدی انسداد ایجاد می‌شود. البته این مدل هنوز مدل قابل اعتمادی برای انجام مطالعات نخواهد بود. این مدل در سگ‌ها ایجاد شده است [۲۳]. هر چند که در رت‌ها نیز تلاش برای ایجاد این مدل انجام شده است که به دلیل سختی کار از انسداد ورید اجوف تحتانی (Inferiorvena cava) به عروق کبدی القا می‌شود [۲۴]. از این مدل برای مدل افزایش فشار پورت پس‌کبدی نیز استفاده می‌شود.

مدل پاتولوژیکی دیگری توسط تجویز گاوآژ (Gavage) دهانی مونوکرتالین (Monocrotalin) در رت‌ها ایجاد شده است که مشخصات بیماری‌های انسداد عروقی را در کبد مثل هیپربیلیروبینمی (Hyperbilirubinemia)، هپاتومگالی (Hepatomegali) و آسیب نشان می‌دهد. البته از این مدل برای مدل بیماری افزایش فشار پورت به صورت پس سینوزوئیدی داخل کبدی استفاده می‌شود [۱۱ و ۲۵].

۱) مدل حیوانی ایجاد شده برای بررسی بیماری NASH (Non-alcoholic steatohepatitis) که یک استئاتوز غیر الکلی است [۱۵-۱۲].

۲) مدل‌های توصیفی برای پروتئین‌های دخیل در هپاتوتروفیک ویروسی [۱۶].

۳) مدل‌هایی که بیماری‌های ارثی را ایجاد کرده‌اند مانند: رت Gunn که مدل سندرم کریگلر-نجار نوع I (Crigle- Najjar syndrome) است [۱۷]، مدلی از سندرم جانسون دوبین (Dubin Johnson syndrome) که یک هاپیر بیلی رویینما (Hyperbilirubinaemia) است [۱۸]، رت دچار آنالبو مینیک ناگاس (Nagas analbuminemic) [۱۹]، خرگوش دچار هیپرلیپیدیمیک (hyperlipidemic) قابل وراثت واتاناب (watanabe) که مدلی است برای بیماری هیپرکلسترولمیای فمیلیال (Familial hypercholesterolemia) [۲۰]، سگ‌های دالماتیان (Dalmation) با

بنابراین دانشمندان همواره در تلاشند که یا بتوانند شرایط بدن موجود زنده را در محیط آزمایشگاه ایجاد نمایند یا مدلی هر چه شبیه‌تر به آنچه که در بدن در هنگام بیماری‌ها رخ می‌دهد، ایجاد نمایند. از طرفی، تفاوت و پراکندگی در مدل‌های ایجاد شده در آزمایشگاه‌های مختلف و مقالات متعدد باعث شده است تا نتایج با یکدیگر قابل قیاس نبوده و نتیجه‌گیری کلی از مطالعات مختلف صورت نپذیرد. در حالی که مطالعات بایستی به گونه‌ای در راستای یکدیگر طراحی و انجام شوند که پیشرفت در زمینه حل معماها و سوالات درباره یک موضوع را تسهیل نمایند. بنابراین، تنها راه حل مشکل استفاده از مدل‌های محدودی است که در همه آزمایشگاه‌ها قابلیت تکرارپذیری داشته باشد. در این مقاله سعی شده تا با مروری بر مقالات موجود به معرفی مدل‌های مختلف حیوانی که تا کنون در زمینه بیماری‌های کبد مورد استفاده قرار گرفته است، به اختصار پرداخته شود. علاوه بر آن نحوه تولید و میزان کارایی آن‌ها و پیشنهادهایی در زمینه استاندارد سازی آن‌ها در مطالعات کبدی ارائه شده است. از آنجا که سرنوشت اکثر بیماری‌های کبدی به ایجاد فیروز و در نهایت سیروز ختم می‌شود و اغلب مقالات و پژوهش‌ها به ایجاد و بررسی مدل‌های فیروزی و سیروزی نیاز دارد، بنابراین در اینجا به انواع مدل‌های کبدی به اختصار و به مدل‌های حیوانی فیروز و سیروز با دید وسیع‌تری پرداخته شده است.

انواع مدل‌های بیماری‌های کبدی

تا کنون سعی شده است تا برای بیماری‌های گوناگون کبدی مدل‌های حیوانی متناسب طراحی شود تا مطالعات کارآزمایی‌های بالینی تسهیل و قابل اعتماد تر شود. این مدل‌ها شامل موارد زیر است:

مدل‌های فیروزی و سیروزی: با استفاده از روش‌های گوناگون که در ادامه به تفصیل به آن پرداخته شده است. مدل‌های بررسی افزایش فشار پورت: شامل ایجاد مدل‌های انسدادی پیش کبدی (Pre-hepatic)، داخل کبدی (Intra hepatic) (که به سه دسته پیش سینوزوئیدی، سینوزوئیدی و پس سینوزوئیدی تقسیم می‌شود) و پس کبدی (Post hepatic).

مفهوم فیروز: فیروز یا (ترمیم توسط بافت همبند) به معنای ایجاد چارچوبی از بافت گرانولاسیون متشکل از رگ‌های جدید و ماتریکس خارج سلولی سست است. آسیب بافتی شدید یا مداوم همراه با آسیب به هر دو ساختار سلولی پارانشیمی و شبکه داربستی منتهی به موقعیتی خواهد شد که در آن، ترمیم قادر نیست به تنهایی از طریق نوسازی پارانشیمی انجام گیرد. تحت این شرایط، ترمیم از طریق جایگزینی سلول‌های پارانشیمی بازسازی شده همراه با بافت همبند صورت می‌گیرد. چهار جزء اصلی که در این فرایند وجود دارد عبارت است از:

تشکیل عروق خونی جدید (Angiogenesis)، ۲- مهاجرت و تکثیر فیروبلاست‌ها، ۳- رسوب ماتریکس خارج سلولیو ۴- بلوغ و سازمان یابی مجدد بافت فیبری (Remodeling) [۳۱].

فیروز پیشرفته با تجمع ماتریکس خارج سلولی سرشار از کلاژن‌های نوع I و III شناخته می‌شود که تجمع این مواد باعث افزایش فشارورید پورت شده و خطر ابتلا به سرطان کبد را افزایش می‌دهد [۳۱].

مفهوم سیروز: سیروز یک تعریف پاتولوژیک مشخص است که با طیفی از تظاهرات بالینی خاص همراه است. یافته‌های اصلی پاتولوژیک، یک آسیب مزمن غیرقابل برگشت در پارانشیم کبدی را نشان می‌دهد که شامل فیروز گسترده همراه با پیدایش ندول‌های رژنراتیو (Regenerative nodule) است. این یافته‌ها نتیجه نکرود سلول‌های کبد، کلاپس شبکه رتیکولر پشته‌ای و در نهایت رسوب بافت همبند، به هم ریختن طرح بستر عروقی و رژنراسیون ندولر باقیمانده پارانشیم کبد است [۳۱].

مکانیسم ایجاد فیروز: فعال شدن سلول‌های ستاره‌ای کبد (HSC: Hepatic Stellate Cell)، اصلی‌ترین عامل ایجاد کننده فیروز کبد است. این سلول‌ها که برای اولین بار در ۱۸۷۶ توسط Von Kupfer به عنوان Sternzellen (سلول‌های ستاره‌ای شکل) تشخیص و بعداً به نام Ito خوانده شد و امروزه همه آن‌ها را به نام سلول‌های ستاره‌ای می‌شناسند. در حالت آرامش،

هیپراورسیمیا (Hyperuricemia) به عنوان مدل نقرس Gout [۲۱]، موش‌های فاقد فوماریل استو استات [۲۲].

مدل هپاتیت ویروسی: جانور مورد استفاده در این مطالعات اغلب شامپانزه بوده و به دلیل هزینه‌های بالای کار با این مدل اکثر دانشمندان به استفاده از انواع دیگری از مدل‌های آزمایشگاهی تمایل دارند [۲۶].

پس از توضیح اختصاری در مورد انواع مدل‌های حیوانی کار شده در زمینه بیماری‌های کبدی به بررسی بیشتر مدل‌های حیوانی فیروز و سیروز خواهیم پرداخت. پیش از هر چیز باید بدانیم فیروز و سیروز چه هستند و چرا از اهمیت ویژه‌ای در زمینه مطالعات درمانی برخوردارند.

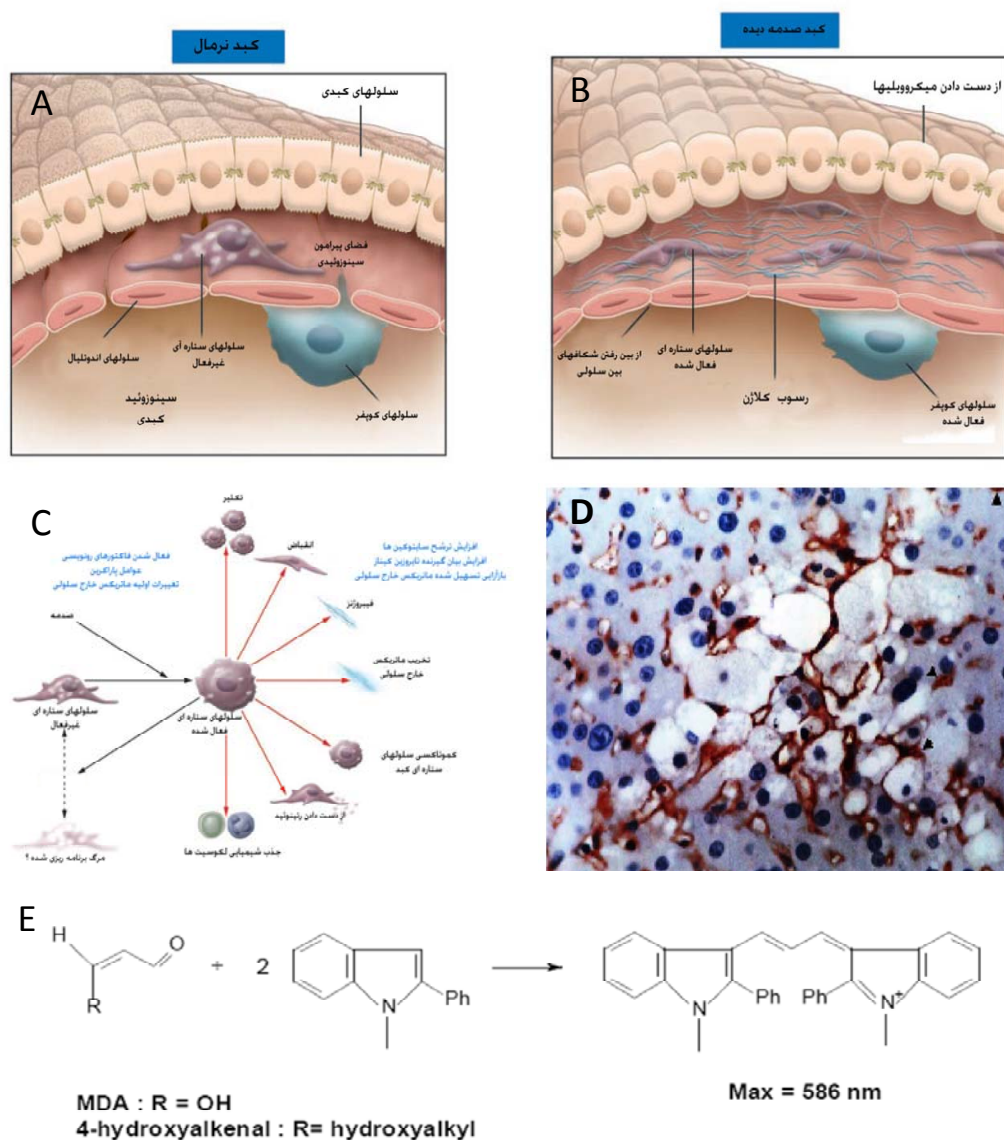
اهمیت مطالعات درمانی فیروز و سیروز

افزایش بیماری‌های مختلف کبدی مثل هپاتیت‌های ویروسی مزمن، استئاتوهپاتیت غیر الکلی (که با سندرم متابولیک و چاقی همراه است)، پارازیتیمیا (Parasitemia)، اختلالات متابولیسمی مادرزادی، آسیب‌های کبدی در اثر مصرف الکل و سموم، در کل دنیا، درصد مرگ و میر در اثر فیروز و سیروز بالا برده است [۲۷]. فیروز کبدی و مرحله انتهایی آن سیروز کبدی معمولاً در همه بیماری‌های مزمن کبدی مشاهده می‌شود [۲۸]. امروزه تنها راه درمان سیروز، پیوند کبد است که به دلیل کمبوددهنده و وجود بیماری‌های قابل سرایت در اثر این پیوند به افراد و همچنین عود مجدد بیماری و از بین رفتن مجدد کبد، درصد درمان از این راه کمتر شده و دانشمندان برای یافتن راه‌های درمانی جدید به سمت درمان‌های ضد فیروزی متمایل شده‌اند [۲۷، ۲۹ و ۳۰].

در ۲۰ سال گذشته، مطالعات بسیاری بر پیشرفت فیروز و عوامل مؤثر بر آن، مانند سلول‌ها، سیتوکاین‌های مختلف، بررسی دقیق ماتریکس خارج سلولی انجام و باعث به‌کارگیری روش‌های مختلف برای درمان شد [۲۹]. این مطالعات جهش علمی بزرگی در دانش موجود در این زمینه بود که در حقیقت با ایجاد سیستم‌های مدل تسهیل شد.

سیتوکاین‌هایی نظیر فاکتور رشد تبدیل کننده بتا (TGF- β : Transforming growth factor) فیبریل کلاژن نوع I را می‌سازد [۳۱ و ۳۷]. مشخص نیست که دقیقاً از چه مرحله‌ای فیروز برگشت ناپذیر می‌شود. این روند پاتولوژیک را باید به عنوان نتیجه نهایی و مشترک تعداد زیادی از آسیب‌های مزمن کبدی در نظر گرفت (شکل ۱).

سلول‌های پری سینوزوئیدالی در فضای دیس قرار دارد و حاوی قطرات اسید رتینوئیک و چربی است [۳۲]. در هنگام آسیب این سلول‌ها در اثر فاکتورهای رها شده از هپاتوسیت‌ها و سلول‌های کوپفر (ماکروفاژهای کبدی) مثل فاکتور نکروز کننده تومور-آلفا (TNF- α : tumor necrosis factor) فعال و از لحاظ ظاهری شبیه به میوفیبروبلاست می‌شود [۳۳-۳۶] و تحت تأثیر



Journal of Iranian Anatomical Sciences, Vol 7, Autumn 2009 & Winter 2010

شده‌است، شواهدی دال بر اجتماع و تجزیه ماتریکس خارج سلولی در فیروز فراهم آورده‌است. فعال شدن HSC ها و تغییر فنوتیپ آن‌ها به شبه میوفیبروبلاست با افزایش بیان کلاژن I همراه بوده و میزان بیان کلاژنازها نیز تغییر می‌کند [۴۴]. تجزیه ماتریکس خارج سلولی در بدن توسط خانواده‌ای از آنزیم‌ها صورت می‌گیرد که ماتریکس متالوپروتیناز Matrix (MMP: Metalloproteinaes) خوانده می‌شود و فعالیت آن‌ها توسط مهارکننده‌های بافتی (TIMP: Tissue inhibitor of matrix Metalloproteinase's) آن‌ها مهار می‌شود [۴۵]. متالوپروتینازها اغلب کلاژنازاست که وابسته به مرحله بیماری یا آسیب انواع مختلفی از آن‌ها بیان و به خارج سلول ترشح می‌شود [۴۵].

مدل‌های مطالعاتی فیروز کبدی: از سلول تا حیوان

مدل‌های مورد استفاده در مطالعات فیروز کبدی به چند دسته اصلی تقسیم می‌شود که هر کدام مزایا و معایب خاص خودشان را دارد. این مدل‌ها عبارت است از:

دسته اول: شامل مدل‌های کشت سلولی است که در این مدل‌ها، سلول‌های خاصی را از کبد سالم یا آسیب دیده جدا می‌کنند و پس از جداسازی به محیط کشت انتقال داده و از این سلول‌های کشت شده به عنوان الگویی از پاسخ کبد به تیمارهای گوناگون استفاده می‌شود. [۳۲، ۳۴، ۴۳، ۴۶ و ۴۷].

مزیت استفاده از این مدل‌ها، مطالعه جزئیات رفتاری سلول‌ها و بررسی میانجی‌های مؤثر بر آن‌ها است. اما این مدل‌ها نمی‌توانند نماینده وقایعی باشد که در بدن موجود زنده اتفاق می‌افتد زیرا اتفاقاتی که در بدن روی می‌دهد، حاصل کنش و واکنشی است که بین سلول‌های مقیم و سلول‌های وارد شده در یک ریز محیط ایجاد می‌شود. در حالی که در محیط کشت این وضعیت فراهم نیست [۳۱].

دسته دوم: شامل بافت‌های انسانی است که توسط بیوپسی یا روش‌های دیگر برداشته می‌شود. این مطالعات برای ارزشمند کردن مشاهدات حاصل از محیط کشت و سیستم

سلول‌های ستاره‌ای فعال شده، از لحاظ متابولیسی و تکثیر فعال بوده و خواص فیروژنیکی و قابلیت انقباض از خود نشان می‌دهد. این سلول‌ها با رهایی ماتریکس متالوپروتینازها و مهار کننده‌های آن‌ها در شکل‌گیری ماتریکس خارج کبدی و هدایت شیمیایی Chemotaxis لوکوسیت‌ها نقش دارد [۳۸].

عوامل ایجاد فیروز: با استفاده از مدل ایجاد آسیب با

تتراکلرید کربن، دو گروه همزمان باهم در سال‌های ۱۹۷۰ ثابت کردند که فیروز با فعالیت قابل ردیابی کلاژنازها همراه است. با توجه به این مشاهدات برای اولین بار پیشنهاد کردند که فیروز پیشرونده نه تنها با تغییر در سنتز ماتریکس خارج سلولی بلکه با تغییر در الگوی از بین رفتن ماتریکس خارج سلولی توصیف می‌شود [۳۹ و ۴۰]. مطالعاتی که در سال‌های اخیر انجام شده‌است نیز این شواهد را تأیید نموده و نشان داده‌است که تغییر در الگوی تحلیل رفتن ماتریکس خارج سلولی در شکل‌گیری فیروز و سیروز مؤثر بوده‌است [۴۱].

با مطالعات مختلف روی کشت سلول‌های گوناگون کبدی و ایجاد روش‌هایی برای خالص‌سازی سلول‌های کبدی در اواخر دهه ۸۰ میلادی، مشخص شده که HSC های فعال شده منشاء اصلی تولید کلاژن کبدی در زمان ایجاد و پیشرفت فیروز هستند و با وجود آنکه تا آن زمان هپاتوسیت‌ها رامسئول این امر می‌دانستند، طی آزمایشی دانشمندان نشان دادند که در محیط کشت در صورت آلودگی هپاتوسیت‌ها با HSC ها ترشح کلاژن صورت می‌گیرد. در مطالعه دیگری نشان داده شد که HSC ها به‌طور عمده و سلول‌های اندوتلیالی به میزان کمتر، منبع سازنده اصلی کلاژن در کبد فیروتیک‌اند [۳۴، ۴۲ و ۴۳].

ماتریکس خارج سلولی: تا به امروز تصور می‌شد که فیروز در بهترین حالت غیر قابل برگشت و در بدترین حالت پیشرونده است. اما امروزه، مطالعاتی که روی سلول‌ها و مدل‌ها انجام شده‌است، این نظریه را زیر سؤال می‌برد [۲۷]. مطالعاتی که روی مدل‌های کشت سلولی فیروز انجام

آن‌ها با استفاده از اعمال جراحی مدل‌سازی می‌شود، مثل بستن مجرای صفراوی (BDL: Bile duct ligation) [۵۱، ۵۳ و ۵۴].

۱- ایجاد مدل با استفاده از هیاتو توکسین‌ها

از سموم زیادی که می‌توانند باعث آسیب کبد، هپاتیت و مرگ سلول‌ها در پارانشیم کبد شوند، برای مدل‌سازی آسیب سمی کبدی استفاده شده‌است. این مدل‌ها که مدل مسمومیت کبدی خوانده می‌شود، از لحاظ انجام از سایر مدل‌ها آسانتر بوده و با مسائل بالینی ارتباط بیشتری برقرار می‌کند و بیشتر می‌توان شرایط مدل‌سازی که پیش از این در مورد آن صحبت شد را در این روش‌ها رعایت کرد. این سموم کبدی می‌تواند به‌طور انتخابی نکروزه‌های پری پورتال (Periportal) یا ستتری لوبولار (Centrilobular) ایجاد کند و از این لحاظ با بیماری‌های اصلی کبد، همخوانی دارد. مزیت دیگر استفاده از سموم برای ایجاد مدل این است که می‌توان از دوزهای بالای سم برای آسیب حاد و از دوزهای پایین همان سم و تکرار دوزها برای ایجاد آسیب مزمن استفاده نمود [۱۱].

سموم می‌تواند به‌طور مستقیم با راه اندازی مکانیسم‌های سلولی و مولکولی مثل تخریب غشاء (تداخل واکنش میان فاکتورهای رشد و گیرنده‌های غشا)، اختلال در بیان ژن و سنتز پروتئین، ایجاد واکنش‌های التهابی (افزایش تولید سیتوکاین و رادیکال‌های آزاد اکسیژن) و فعال‌سازی سلول‌های غیر پارانشیمی باعث القای آسیب کبدی شود [۵۵]. از سموم رایج در ایجاد مدل فیروز کبدی می‌توان به تتراکلرید کربن (CCL4)، دی-گالاکتوزآمین (D-galactosamina) اتانول، تیواستامید (Thio acetamide) و استامینوفن (Acetaminophen) دی‌متیل نیتروزآمین (D-Methyl nitrosamine) اشاره کرد.

الف- تتراکلرید کربن: تتراکلرید کربن از سموم کبدی کلاسیک است و با میانجی‌گری متابولیت‌های وابسته به شکسته شدن در سیتوکروم P450 باعث ایجاد آسیب سلولی کبد می‌شود. در این مسیر، اولین گام شکل‌گیری رادیکال تری‌کلرومتیل دوباره فعال و باعث پراکسید شدن لیپیدهای کبد شده و غشای هپاتوسیت

مدل حیوانی دارای اهمیت است [۵۰-۴۸]. در صورت انتخاب دقیق نمونه و به‌کارگیری روش‌های مولکولی پیشرفته می‌توان اطلاعات زیادی از این بافت‌ها به‌دست آورد [۳۱].

دسته سوم: شامل ایجاد مدل‌های فیروز حیوانی است. بزرگ‌ترین و تنها عیب مدل‌های حیوانی اینست که انسان نیستند. ولی از مزایای آن می‌توان به این چند مورد اشاره کرد: استفاده از مدل‌های حیوانی به دانشمندان فرصت می‌دهد تا نمونه برداری مداوم از بافت انجام دهند و به مقداری از بافت دسترسی داشته باشند که برای انجام کارهای سلولی و مولکولی و پاتولوژیکی مورد نیاز است. از طرفی اخیراً با دستکاری‌های ژنتیکی و ابزارهای مولکولی دقیق، می‌توان از موش‌ها به عنوان مدل‌هایی برای شناسایی مکانیسم فیروز استفاده کرد [۳۱].

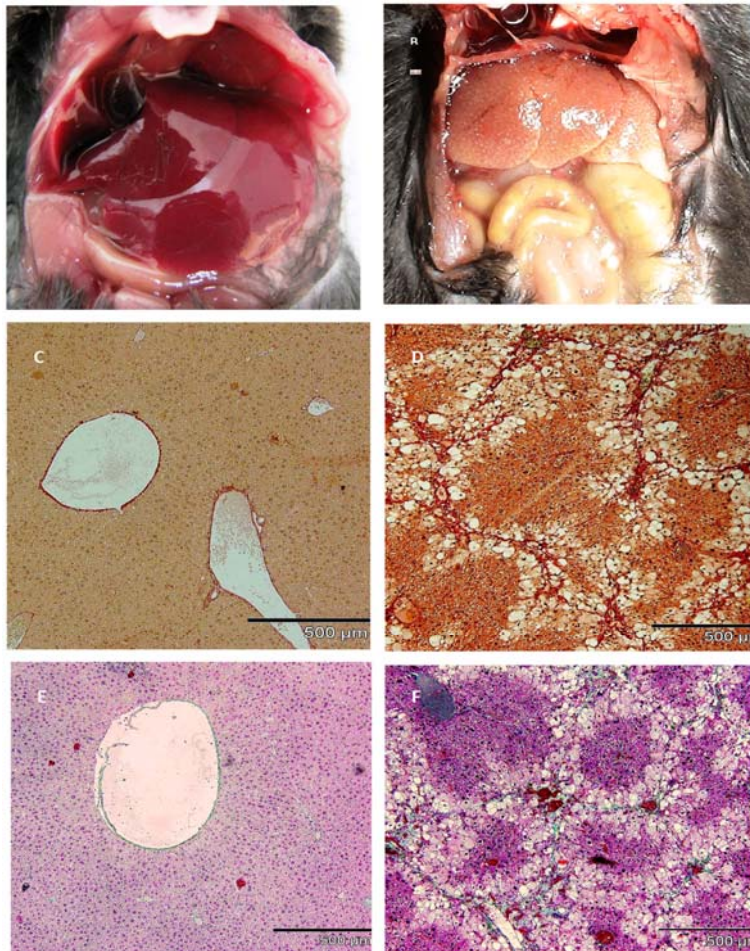
از آنجا که تمام مطالعات درمانی پیش از مرحله بالینی بایستی با انجام فرایند درمانی مورد نظر بر حیوان مدل همان بیماری تأیید شود [۵۱] و برای آنکه نتایج حاصل از تحقیقات ارزشمند باشند، باید مدلی را برای ایجاد مدل فیروزی ایجاد کرد که علاوه بر خصوصیات اصلی و مشترک عنوان شده در بخش‌های پیشین، شرایط زیر را نیز داشته باشد [۵۲ و ۵۳]:

- ۱- تظاهرات بالینی شبیه به آنچه که در بیماری‌های انسانی دیده می‌شود را نشان دهد؛
- ۲- تغییرات مرحله‌ای و از لحاظ پیشرفت پاتولوژیکی مجزا داشته باشد؛
- ۳- قابلیت تکرار بالا و مرگ و میر پایین داشته باشد؛
- ۴- تغییرات برگشت‌پذیر و غیر قابل برگشت فیروز را ایجاد کند؛
- ۵- پیشرفت پاتوفیزیولوژیکی داشته باشد.

مدل‌های حیوانی رایج برای مطالعات فیروزی و سیروزی

مدل‌های حیوانی رایجی که برای ایجاد فیروز آزمایشگاهی استفاده شده‌است به دو دسته اصلی تقسیم می‌شود:

مدل‌هایی که در آن‌ها از آسیب‌های سمی کبدی استفاده شده‌است (مثل مسمومیت با تتراکلرید کربن) و مدل‌هایی که در



شکل ۲. A: نمای ماکروسکوپی کبد نرمال، B: نمای ماکروسکوپی کبد پس از استفاده از ۱۶ تزریق تتراکلرید کربن به منظور ایجاد فیروز، C: نمای میکروسکوپی کبد نرمال با رنگ آمیزی سیروس رد، D: کبد فیروزه با همان رنگ آمیزی، E: نمای میکروسکوپی کبد نرمال با رنگ آمیزی تری کروم ماسون، F: کبد فیروزه با همان رنگ آمیزی [۱۰۵].

بعد از ۸ تا ۱۲ هفته، سیروز ایجاد می‌شود [۵۴]. تجویز حاد تتراکلرید کربن باعث القای هپاتیت حاد در محل پری ونولار آغازین (Primary perivenular) می‌شود. تجویز پی در پی باعث ایجاد آسیب مزمن کبدی و در نهایت ایجاد سیروز می‌شود. از این روش برای ایجاد سیروز در رت‌ها [۵۶]، موش [۵۷] و خرگوش [۵۸] استفاده شده‌است. محل تجویز در میان آزمایشگاه‌های مختلف متفاوت است، ولی مؤثرترین آن به صورت خوراکی [۵۹ و ۶۰]، داخل صفاقی [۶۱ و ۶۲] و به صورت تنفسی (Inhalatory) [۶۲] بوده‌است. استفاده زیرجلدی به دلیل بازدهی کم در تولید سیروز توصیه نمی‌شود.

را از بین می‌برد. این وضعیت باعث فعال شدن سلول‌های کوپفر کبد و سلول‌های ستاره‌ای می‌شود که آن‌ها نیز به نوبه خود پس از فعال شدن با آزادسازی سیتوکاین‌ها، رادیکال‌های اکسیژن و فعال کردن گرانولوسیت‌های نوتروفیلی آسیب را ادامه می‌دهند. این نوع آسیب کبدی با نکروز سانتریلوبولار (Zone3) همراه است [۵۱]. مسمومیت کبد با تتراکلرید کربن باعث تخریب هپاتوسیت‌ها، نکروز، التهاب و فیروز می‌شود. به سیستم عروقی که مسئولیت تغذیه و پرکردن سینوزوئیدهای کبد را دارد آسیب وارد کرده و در عملکرد آن‌ها اختلال ایجاد می‌کند که در این مسیر، ابتداعروق پورت و بعد شبکه عروق مرکزی را درگیر می‌سازد. با ادامه آسیب،

پایه پاسخ جانور به دوز قبلی که با توجه به وزن اضافه شده / وزن از دست داده در نظر گرفته شده بود، انتخاب شد [۵۹]

ب- **دی گالاکتوز آمین:** این ماده با ایجاد محدودیت بین سلولی متابولیت یوریدین (Uridine) در کبد مسمومیت ایجاد می‌کند. البته برای انجام این کار فرض می‌شود که با فاکتورهایی مثل اندوتوکسینما (Endotoxina) ادغام می‌شود. از این ماده بیشتر برای ایجاد آسیب فوق حاد (hepatic failour Fulminant) کبدی استفاده شده است.

آسیب فوق حاد کبدی (FHF) در حقیقت ناهنجاری بسیار نادر اما بسیار کشنده کبدی است که مشخصه آن اختلال عملکردی شدید کبد بدون وجود پیشینه بیماری کبدی است و نتیجه آن هم ایجاد انسفالوپاتی (Encephalopathy) و کوآگلپاتی (Coagulopathy) کبدی است [۶۴].

برای ایجاد آسیب حاد کبدی در اثر این ماده دررت از تزریق داخل صفاتی 0.5-3g/kgbw محلول در آب مقطر [۶۷-۶۵] در خرگوش‌هایی با میانگین وزن ۱ تا ۲ کیلوگرم از تزریق وریدی ۴/۲۵ میلی مول به ازای هر کیلوگرم وزن بدن از محلول در ۹ میلی‌لیتر دکستروز ۵ درصد [۶۸] در سگ‌هایی با میانگین وزنی ۳۰ کیلوگرم از تزریق وریدی ۱/۵g/kgbw - ۱ محلول در دکستروز ۵ درصد دی گالاکتوز آمین استفاده شده است [۶۹].

ج- **تیواستامید (TAA: Thioacetamide):** از این سم برای القای سیروز کبدی و انسفالوپاتی هپاتیک حاد استفاده می‌شود. در رت‌هایی با میانگین وزنی ۱۵۰ تا ۳۰۰ گرم، تزریق داخل صفاقی TAA 250 mg/kgbw در طی ۲ تا ۳ روز آسیب حاد کبدی ایجاد می‌کند [۷۰ و ۷۱]. از این ماده نیز به صورت گسترده برای ایجاد سیروز استفاده می‌شود. این ماده هم در محل پری ونولار (Perivenular) و هم در پری پورتال تأثیر می‌گذارد. از این ماده برای ایجاد سیروز در رت [۷۲] و موش [۷۳] استفاده شده است. تیواستامید را می‌توان در آب آشامیدنی [۷۲] یا از طریق تزریق داخل صفاقی [۷۴ و ۷۵] استعمال نمود. البته تزریق داخل صفاقی نتایج ثابت‌تری را نشان می‌دهد [۷۵]. با استفاده از تیواستامید

مطالعات نشان می‌دهد که باوجود ثابت بودن محل تجویز به دلیل یکسان نبودن برنامه‌های تجویزی در آزمایشگاه‌های مختلف تنوع زیادی در میان مقالات درمورد تعبیر از یک کبد به عنوان کبد فیروزه یا سیروزه به چشم می‌خورد. بنابراین بایستی در مورد نحوه ایجاد مدل، زمان ایجاد فیروز و سیروز و اینکه آیا واقعاً سیروز ایجاد شده است یا خیر، توضیحات کافی و مستدلی در مقالات آورده شود. گاهی برای بالا بردن میزان سیروز از فنوباریتال در حدود (۰/۳ میلی گرم) در آب آشامیدنی، یک هفته قبل از شروع تزریقات استفاده می‌شود [۱۱]. موش‌ها ۱۲ تا ۱۵ هفته پس از تجویز تتراکلریدکربن، سیروز میکرونودول (شکل ۲ FوD) افزایش فشار پورت، شنت سیستمیک پورت (Port-systemic shunt) (۶۰-۳۰٪) و گردش هیپر دینامیک نشان می‌دهند [۶۳]. اگر موش‌ها را برای ۱۲ تا ۲۰ هفته نگه دارند بیشتر آن‌ها آسیب را نشان خواهند داد (شکل ۳).



شکل ۳. ایجاد آسیب در اثر استفاده از تتراکلرید کربن در موش C57 برای ایجاد مدل سیروزی پس از ۱۶ هفته. A: پیش از باز کردن صفاق تجمع مایع داخل صفاق دیده می‌شود. B: پس از باز کردن صفاق و خروج مایع تجمع چربی در اطراف احشا و به خصوص کبد ایجاد شده است [۶].

یکی از بزرگترین پیچیدگی‌های این مدل تفاوت در حساسیت رت‌ها به تتراکلرید کربن است که باعث می‌شود نتوان گروه هموزنی از رت‌های سیروزی شده را ایجاد کرد. به این ترتیب در آزمایشی، محلولی را که شامل دوز مخصوص برای هر رت به صورت انفرادی بود، استفاده کردند. این دوز بر

صفافی، پس از پنج هفته، فیروز همراه با افزایش فشار پورت در رت‌ها مشاهده شد، اما هیچ نشانه‌ای از گردش هیپردینامیک نداشته‌اند و پس از سیزده هفته، فیروز کامل به همراه آسیت در این رت‌ها دیده شد [۵۳، ۸۴ و ۸۵]. از این ماده به علت خواص سرطان‌زایی بالای آن، کمتر استفاده می‌شود [۱۱].

و- اتانول: تأثیر این ماده بر کبد با جزئیات مطالعه شده است، اما به دلیل آنکه در طراحی آزمایش‌ها به‌ویژه در زمان‌بندی و میزان تجویز اتانول تنوع زیادی وجود دارد، آنالیز نتایج بسیار دشوار است [۸۶]. از طرفی ایجاد فیروز با اتانول نیاز به زمان زیاد دارد ولی در مطالعات انجام شده، از زمان‌های کوتاه‌تری از تجویز اتانول استفاده شده است، در نتیجه آسیب کبدی کمتر و میزان ارتشاح بیشتر از میزان نکروز بوده است [۸۷].

۲- ایجاد مدل با اعمال جراحی

مدل‌های فراوانی با انجام اعمال جراحی برای مطالعات ترمیمی کبد ایجاد شده است. مثل برداشتن بخشی از کبد، شنت‌های سیستمیک، بستن انشعاب پورت و مجرای صفراوی که از میان این روش‌ها، دو روش انسدادی که بیشتر استفاده شده، توضیح داده می‌شود:

الف- بستن انشعاب پورت (Portal vein ligation): در

۱۸۶۱ برای اولین بار دانشمندان با بستن یکی از انشعابات پورت، لوب مزبور را آتروفی و باعث هیپرتروفی سایر لوب‌های کبد شدند [۵۱]. در این روش قسمت‌های دیگر کبد دچار هیپرپلازی جبرانی می‌شود ولی نواحی نکروزی مولتی فوکال (Multi focal) در آن‌ها ایجاد می‌شود (شکل ۴) و در قسمتی که رگ پورت آن بسته شده است، آتروفی پیشرونده دیده می‌شود تا آنجا که حجم آن قسمت به ۱/۱۰ حالت عادی می‌رسد. یک هفته پس از عمل در این لوب، نکروز سانتریلوبولار که در برگرفته ۱/۴ کل پارانشیم کبد است، مشاهده می‌شود. البته این مدل برای مطالعات آسیب کبدی به ندرت و فقط در موارد خاص به کار می‌رود [۸۸ و ۸۹].

می‌توان سیروز ماکروندولار همراه با افزایش فشار پورت طی ۱۲ هفته تزریق دارو در حیوان ایجاد کرد [۷۲، ۷۵ و ۷۶]. اگر زمان استفاده از این دارو طولانی‌تر شود، بایستی گردش هیپردینامیک احیا شود [۷۶]. یکی از مشخصه‌های این مدل آنست که همه وقایع عکس مدل تراکلرید کربن است، فیروز حتی برای هفته‌ها پس از قطع دارو باقی می‌ماند [۷۵] و حتی بعد از گذشت ۱۸ هفته احتمال ایجاد کلانژیوکارسینوما وجود دارد [۷۷].

د- استامینوفن: مسمومیت با استامینوفن یا پاراستامل

(Paracetamol) از رایج‌ترین علل آسیب حاد کبدی است [۷۸]. در شرایط عادی استامینوفن در کبد با ترکیب شدن با گلوکونیدها (Glucuronids) و سولفات‌ها دچار دگرگونی‌های زیستی (Biotransformation) می‌شود و معمولاً از طریق کلیه‌ها دفع می‌شود [۷۹]. اما به دلیل دخالت سیستم سیتوکروم اکسیداز P450 متابولیزه می‌شود که باعث تولید سمی به نام ان-استیل - بنزوکوئینونیمین (N-acetyl-benzoquinoneimine) می‌شود که این سم از طریق تشکیل رادیکال‌ها و فعال‌سازی سلول‌های کوپفر باعث القای آپوپتوسیز و نکروز می‌شود [۷۹]. اما به دلیل دخالت سیستم سیتوکروم اکسیداز p450 در زدودن این ماده از کبد، که بین گونه‌ها و وابسته به سن متفاوت است، استانداردسازی در مدل‌های ایجاد شده با این ماده بسیار مشکل است [۷۸].

در رت‌ها از تجویز داخل شکمی (Intra gastric) استامینوفن با دوز ۱۴۰۰-۷۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، برای ایجاد آسیب حاد کبدی قابل برگشت که نکروز وسیع هپاتوسل‌ها را باعث می‌شود، استفاده شده است [۸۰ و ۸۱]. در حیوانات بزرگتر مثل سگ و خوک برای مدل‌سازی با استامینوفن ۳ روز فونوباربتال و سپس استامینوفن با دوز ۱-۴ g/kgbw تجویز شده است [۸۲ و ۸۳].

ه - دی متیل نیتروز آمین (DMNA): این هپاتوتوکسین باعث

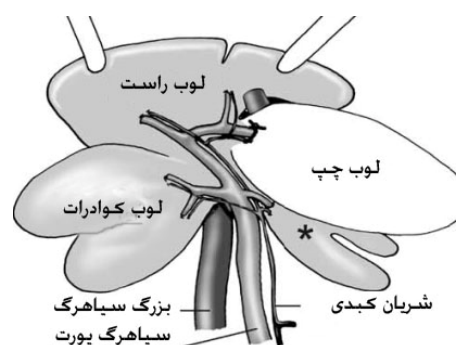
ایجاد نکروز هپاتوسلولار می‌شود. بعد از تجویز پی در پی و داخل

پنجم تا ۲۰ درصد بالا می‌رود. استفاده از آنتی بیوتیک‌های پیش‌گیری کننده Prophylactic (آمپی سیلین ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن یا موارد مشابه) قبل از عمل و استفاده هفتگی از ویتامین k (۵۰ میلی گرم) ماندگاری رت‌ها را پس از عمل BDL افزایش می‌دهد (شکل ۵) [۹۴].

یکی از مشخصات این مدل، توانایی ایجاد کیست صفراوی است که می‌تواند باعث فشردگی رگ پورت در هیلوم Hilum شود. این مشکل را نیز می‌توان با تزریق فرمالین ۱۰ درصد (۱۲۰ ماکرولیتر به ازای ۱۰۰ گرم) از طریق کاتتر P10 در مجرای صفراوی قبل از ایجاد انسداد حل کرد [۹۵ و ۹۶]. در بعضی مطالعات برای جلوگیری از تشکیل کیست از تزریق Ethibloc که ماده‌ای برای آمبولی حفرات و رگ‌ها است، استفاده کرده‌اند [۹۷]. بعضی از محققین نیز تک تک لوبول‌ها را بسته‌اند [۹۸ و ۹۹]. این مدل فیروز - سیروز صفراوی را در عرض ۴-۶ هفته ایجاد می‌نماید. بررسی با آزمون‌های بافت‌شناسی تکثیر شدید کلانژیولار (Cholangiolar) و گسترش شدید فیروز پورتال را نشان می‌دهد. ولی به هم ریختگی ساختار اصلی کبد که نشانه اصلی فیروز است به ندرت یافت می‌شود [۱۰۰]. در این مدل، رت‌ها پس از دو هفته افزایش فشار پورت خفیف و پس از ۴ هفته افزایش شدید نشان می‌دهند [۱۰۱]. این مدل همانند استفاده از سموم در ایجاد سیروز با ایجاد مانع در نواحی سینوزوئیدال باعث افزایش فشار پورت می‌شود، بنابراین از این مدل‌ها با نام مدل‌های سینوزوئیدی افزایش فشار پورت هم یاد می‌شود.

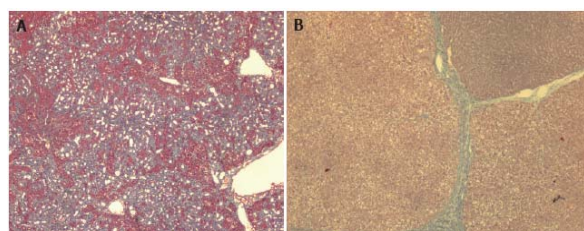
۳- ایجاد مدل سیروزی با استفاده از رژیم غذایی

رژیم غذایی فاقد کولین، متیونین یا رژیم غذایی با پروتئین کولین کم و غنی شده با چربی، باعث تولید استئاتوز کبدی همراه با استرس اکسیداتیو واضح و در پی آن باعث تولید التهاب و فیروز می‌شود [۵۳ و ۱۰۲]. سیروز بعد از ۲۴-۱۲ هفته ایجاد



شکل ۴. بستن انشعاب پورت، قسمت‌های خاکستری بخش‌های عملکردی کبد هستند. قسمت سفید عملکرد کبد را ندارد [۵۱].

ب- بستن مجرای صفراوی (BDL): در این روش با بستن مجرای صفراوی، سلول‌های اپیتلیالی صفرا و سلول‌های اوال (Oval cell) (که پیش‌سازهای هیپاتوسیت هستند) تکثیر می‌شود و در نتیجه باعث تکثیر لوله‌های صفراوی، التهاب پورت و فیروز می‌شود [۹۰ و ۹۱]. این مدل یک مدل سیروز صفراوی ثانویه (Secondary biliary cirrhosis) تولید می‌کند که در رت‌ها بسیار مطالعه شده است [۹۲]. این مدل برای مطالعه تأثیر عدم وجود کیسه صفرا مناسب بوده و در خرگوش [۵۸] و موش [۹۳] هم انجام شده است. در موش بعد از بستن مجرای صفراوی کاهش شدید در کیسه صفرا دیده می‌شود که ممکن است باعث کلیتونوم پرفوریشن (Cholepeitonum perforation) شود [۱۱].



شکل ۵. مقایسه بین ظاهر و خصوصیات میکروسکوپی کبد ۶ هفته پس از استفاده از ایجاد انسداد مجرای صفراوی (A) و ۱۲ هفته پس از استفاده از TAA (B) [۱۱].

در این روش، دو ناحیه انسدادی، یکی در محل اتصال مجاری صفراوی و دیگری بالاتر از ورودی پانکراس ایجاد می‌شود و حرکت صفرا را مختل می‌سازد. مرگ و میر بعد از هفته

نشان می‌دهد.

ب- آنزیم‌های سرمی: کبد حاوی هزاران آنزیم است که بعضی از آن‌ها با غلظت بسیار کمتر در سرم خون نیز وجود دارد از این آنزیم‌ها می‌توان به آمینوترانسفرازها (آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST: Aspartate amino transferase) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT: Alanin amino transferase) اشاره کرد. انواع آسیب‌های سلولی می‌تواند باعث افزایش متوسط این آنزیم‌ها در خون شود. آنزیم‌هایی مثل آلکالاین فسفاتاز (Alkaline phosphatase)، نوکلئوتیداز (S- Nucleotidase)، گاماگلوتیل ترانس پپتیداز (Gamma Glutamyle Transpeptidase) (GGT: هم در این ارزیابی‌ها به کار برده می‌شوند که نمایانگر اختلالات کلستاتیک هستند.

ج- فاکتورهای انعقادی: از آنجا که اکثر فاکتورهای انعقادی خون در سلول‌های کبدی ساخته می‌شود، اندازه‌گیری آن‌ها با توجه به بازگردش سریع آن‌ها، سریع‌ترین معیار مستقل عملکرد سنتتیک کبد است؛ برای این منظور از سنجش زمان پروترومبین کمک می‌گیرند.

د- آلبومین سرم، آلبومین منحصراً توسط هپاتوسیت‌های کبد سنتز می‌شود و اندازه‌گیری آن اختصاصی کبد بوده و عملکرد کبد را نشان می‌دهد.

۲- آزمون برای اثبات فعال شدن سلول‌های

ستاره‌ای کبد

سلول‌های ستاره‌ای کبد که در حالت آرامش در فضای دیس (فضای بین سینوزویدهای هپاتوسیت‌ها) قرار دارند در شرایط آسیب کبدی فعال می‌شوند و تغییر فنوتیپ می‌دهند. در فرم فعال این سلول‌ها اکتین مخصوص عضلات صاف (α -SMA: α - Smooth muscle actin) بیان می‌شود. بنابراین ردیابی و نشان دادن بیان شدن این پروتئین از طریق رنگ آمیزی ایمنوهیستوشیمی و آزمایش‌های مولکولی قابل اثبات است [۱۰۵] (شکل ۶).

می‌شود اما این مدل هنوز به خوبی توصیف نشده است [۱۱].

مطالعات فوق علاوه بر آن که باعث کامل‌تر شدن درک دانشمندان از فیروز (علل ایجاد و روش‌های بهبود آن) شده‌است، ثابت نمود که کبد یک مدل عمومی بسیار کاربردی برای بررسی‌های التهابی و ترمیمی است که در مسیر این دو فرایند پاسخ ترمیمی سلول‌های اپلتیالی، میوفیبروبلاست‌ها و اجزای ماتریکس خارج سلولی نقش دارد [۱۰۳، ۱۰۴ و ۱۰۶].

اما برای انجام مطالعات طراحی روش‌ها و آزمون‌هایی برای ارزیابی ایجاد، میزان پیشرفت یا بهبودی فیروز (که عوامل اصلی فیروز یعنی فعال شدن سلول‌های ستاره‌ای کبد، ایجاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن، (استرس اکسیداتیو) و میزان کلاژن را مورد بررسی قرار دهد) ضروری است که در انتخاب بسیاری از آن‌ها از آزمون‌های سنجش عملکرد کبد در انسان استفاده شده‌است. در این بخش به آزمون‌هایی که ارزیابی‌های سلامت و عملکرد کبد را ارزیابی می‌کند، به‌طور مختصر پرداخته شده‌است.

آزمون‌های ارزیابی کبد

۱- آزمون‌های بیوشیمیایی

آزمون‌های بیوشیمیایی معمولاً به منظور ارزیابی عملکرد کبد به کار برده می‌شود. این آزمون‌ها دارای محدودیت‌هایی هستند. به‌طور مثال در انسان این آزمون‌ها ممکن است در بیماران دچار بیماری‌های وخیم کبدی، نرمال و در مورد افراد نرمال، غیر طبیعی باشد. این آزمون‌ها به ندرت به‌طور اختصاصی وضعیت کبد را نشان می‌دهد و معمولاً نیاز به تکرارهای متعددی مثلاً در یک دوره ۶ ماهه دارند. از این آزمون‌ها می‌توان به موارد زیر با اندک توضیحی اشاره کرد:

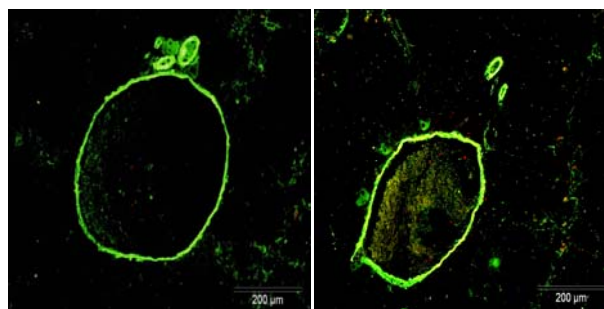
الف- اندازه‌گیری بیلی‌روبین سرم خون به صورت مستقیم و بیلی‌روبین تام که معمولاً نوع مستقیم آن در بیماری‌های غیر ارثی و رایج کبد و دستگاه صفراوی، تغییر

رسید. از این روش‌ها به‌عنوان کلید طلایی تشخیص بیماری‌های کبدی یاد می‌شود. در آنالیزهای بافت‌شناسی با استفاده از رنگ‌آمیزی‌های مختلف می‌توان تغییرات ایجاد شده در سلول‌ها مثل آپوپتوسیز، نکروز، استئاتوز و ... و رسوب کلاژن و فیروز را به‌طور قطعی مطالعه و حتی با استفاده از جداول امتیازدهی معروفی که در این موارد وجود دارد و در کتب تخصصی پاتولوژی مفصلاً در مورد آن‌ها توضیح داده شده‌است، میزان آسیب وارده را به‌صورت کمی ارایه کرد. جدول ۱، نحوه امتیازدهی به بافت‌های کبدی در مطالعات حیوانی انجام شده توسط نویسندگان را نشان می‌دهد.

جدول ۱. نحوه امتیازدهی به اسلایدهای بافتی برای تعیین میزان درجه نکروز و فیروز [۶]

درجه نکروز	
۰	نکروزی دیده نمی‌شود.
۱	گروه‌های کوچکی از هپاتوسیت در گیرنکروز مرکزی شده‌اند.
۲	نکروز سانتریلوبولار کامل در کمتر از ۱/۴ لوب‌های کبد دیده می‌شود.
۳	نکروز سانتریلوبولار کامل در بیشتر از ۱/۴ لوب‌های کبد و در کمتر از نصف لوب‌ها دیده می‌شود.
۴	نکروز کامل تقریباً بیشتر از نصف لوب‌های کبد را درگیر کرده‌است.
درجه فیروز	
۱	تجمع فیبریل‌های کلاژن حول رگ مرکزی، ولی بافت فیروز شده و گسترش یافته‌ای در محوطه رگ مرکزی دیده نمی‌شود.
۲	زوائد فیروزی از رگ مرکزی گسترش یافته‌اند ولی بین آن‌ها در ناحیه پورت یا پایین رگ مرکزی پلی وجود ندارد.
۳	رشته‌های فیروزی بین رگ‌های مرکزی و ناحیه پورت به هم متصل شده‌اند.
۴	سیروز به همراه نودول‌های هپاتوسیت که توسط بافت فیروزه احاطه شده‌اند.

راه دیگر کمی‌کردن این نتایج استفاده از نرم افزارهای مختلفی است که می‌تواند رنگ‌های اختصاصی استفاده شده را به‌صورت عددی که نشان دهنده تعداد پیکسل‌های موجود از آن رنگ نسبت به رنگ زمینه در صفحه نمایشگر است، نشان دهد (مثل نرم افزار Metamorph) [۱۰۸] به‌هر صورت با تهیه لام‌های بافت‌شناسی می‌توان آسیب‌های گوناگونی را از لحاظ پاتولوژیکی مورد بررسی قرار داد و با استفاده از آن‌ها به قضاوت درست و



شکل ۶. رنگ‌آمیزی ایمونوهیستوشیمی با استفاده از آنتی‌بادی علیه اکتین عضلات صاف. A: رنگ‌آمیزی با همان آنتی‌بادی در کبد موش نرمال، B: رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی علیه عضله صاف در کبد فیروزه موش [۱۰۵].

۳- آزمون برای نشان دادن میزان استرس

اکسیداتیو در بافت

ایجاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن و محصولات آن از اساسی‌ترین مکانیسم‌های ایجاد آسیب سلولی است. در کبد نیز مانند سایر بافت‌ها، ایجاد این رادیکال‌ها و محصولات آن، میانجی آسیب سلولی کبدی و شروع آسیب ثانویه با فعال کردن سلول‌های ستاره‌ای کوپفر می‌شود [۳۷].

برای اندازه‌گیری میزان این اکسیداسیون در بافت، راه‌های گوناگونی وجود دارد که از اصلی‌ترین آن‌ها اندازه‌گیری پراکسید شدن لیپیدها است که از آن به‌عنوان اندیکاتور استرس اکسیداتیو استفاده می‌شود. پراکسیدلیپیدها ناپایدار بوده و در اثر ترکیب با مواد دیگر، ترکیبات مختلفی مثل ترکیبات کربونیل باز فعال شده (Reactive carbonyl component) و MDA (Malonaldehyde) تولید می‌کند [۱۰۶] (شکل ۲-E).

سنجش میزان MDA و همچنین سنجش TBARS (Thiobarbituric acid reactive substance) یا مواد بازفعال شده تیوباربیتوریک اسید از راه‌های دیگر اندازه‌گیری میزان اکسیداسیون لیپیدی است [۱۰۷].

۴- آنالیزهای بافت‌شناسی و پاتولوژی

آنالیزهای بافت‌شناسی و پاتولوژی در بررسی آسیب‌های کبدی، بسیار کارآمد است. حتی در موارد انسانی نیز به‌دلیل آنکه با یک بیوپسی ساده از کبد می‌توان به نتایج و تشخیص نهایی قطعی

واسپکتروفتومتری سنجید [۱۰۹].

آیا سیروز بهبود می‌یابد؟

با توجه به مطالعات گوناگونی که انجام شده است نمی‌توان به سادگی گفت که سیروز یک فیروز پیشرفته است. بلکه یک فیروز پیشرفته همراه با به هم ریختگی ساختار کبد، هپاتوسیت‌های نابه‌جا، ترمیم، تشکیل نودول و تغییرات عروقی است. هر چند که شواهدی دال بر بهبود سیروز پس از درمان عامل بیماری گزارش شده است، اما آیا اینکه ساختار کبد نیز دوباره به شکل اول بازمی‌گردد یا خیر هنوز مورد سؤال است [۱۱۰]. شواهد آزمایشگاهی وجود دارد که نشان می‌دهد، سیروز ممکن است به نقطه‌ای برسد که هیچ برگشتی را نتوان برای آن متصور شد. در مدلی از سیروز ایجاد شده با تتراکلرید کربن حتی بعد از یک دوره بهبودی طولانی هم، بازگشت به ساختار اولیه بسیار محدود بوده و کبد همچنان سیروتیک باقی مانده است [۱۱۱]. اما در صورتی که ماتریکس خارج سلولی ایجاد شده که میکرونودول‌ها را تشکیل می‌دهد، تجزیه شود، از شدت ماکرونودول‌های سیروزی نیز کاسته می‌شود [۱۱۲]. به نظر می‌رسد باور اینکه سیروز به حالت طبیعی برگردد، سخت باشد، اما وانلس (Wanless) و همکارانش براساس داده‌های به‌دست آمده از کارهایشان نشان داده‌اند که حتی در مراحل نهایی سیروز هم، سازمان‌یابی مجدد ماتریکس خارج سلولی انجام می‌شود [۵۰]. مطالعات نشان داده‌است که در مدل موشی با توانایی تولید کلاژنی که ماتریکس متالوپروتئینازها قادر به تجزیه و شکستن آن نبود، دو مسئله مهم برای بهبود فیروز شامل تجزیه کلاژن‌های ایجاد شده و القای آپوپتوسیز سلول‌های ستاره‌ای رخ نخواهد داد [۱۱۳] که این آزمایش باز هم نقش اساسی و مهم متالوپروتئینازها را در فرایند ایجاد و بهبود فیروز کبدی نشان می‌دهد. بحث درباره این مکانیسم‌ها نیاز به مجالی گسترده‌تر دارد. به هر حال فیروز و سیروز کبد چه از لحاظ مکانیسم ایجاد و چه به لحاظ روش‌های درمان هنوز از سئوالات مهم دانشمندان بوده و تحقیق روی این آسیب‌ها همچنان ادامه دارد.

قطعی رسید. در مدل‌های فیروزی که میزان نکروز، آپوپتوز، فیروز و الگوی فیروزو میزان آن برای پژوهشگران مهم است، از رنگ آمیزی‌های اختصاصی در هر مورد استفاده می‌شود. به‌طور مثال برای میزان آپوپتوسیز از رنگ آمیزی TUNEL، برای رنگ‌آمیزی رشته‌های کلاژن از رنگ آمیزی تری کروم ماسون (Masson trichrome stain) و سیریوس رد (Sirius red) و ... استفاده می‌شود (شکل ۲ C,D,E,F). لازم به ذکر است که رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین وائوزین برای تعیین میزان نکروز و فیروز کافی است اما برای دقت بیشتر و مستندتر بودن کار از رنگ‌آمیزی‌های اختصاصی استفاده می‌شود.

۵- آزمون‌های تعیین میزان کلاژن

در کارهای تحقیقاتی روی مدل‌های فیروزی، اهمیت میزان کلاژن تیپ I و در مواردی هم تیپ III و به عبارت دیگر ماتریکس خارج سلولی به اندازه‌ای است که اجزای اصلی آن مثل کلاژن‌ها و عوامل دخیل در آن مثل ماتریکس متالوپروتئینازها را با آزمون‌های مولکولی نیز بررسی می‌کنند. از طرف دیگر، برای هر چه کمی‌تر کردن کار می‌توان با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی هم، میزان کلاژن را به‌دست آورد. برای این کار از اندازه‌گیری میزان هیدروکسی پرولین (Hydroxyproline) استفاده می‌شود.

الف- اندازه‌گیری محتوای هیدروکسی پرولین بافت: اسید آمینه هیدروکسی پرولین در بدن به‌طور عمده در کلاژن‌ها یافت می‌شود و در حدود ۱۳ درصد از کل اسید آمینه بدن را تشکیل داده و یکی از مشتقات پرولین است.

معمولاً برای اندازه‌گیری این اسید آمینه از ادرار استفاده می‌شود؛ چرا که در حدود ۱۰ درصد از هیدروکسی پرولین آزاد شده در طول کاتابولیسم، کلاژن با ادرار دفع می‌شود. اما در صورتی که بخواهیم میزان این اسید آمینه را در بافت خاصی مثل کبد به‌دست آوریم، می‌توان این اسید آمینه را توسط هیدرولیزاسیدی از بافت جدا کرد و میزان آن را با روش‌های بیوشیمیایی و استفاده از محلول ارلیخ (Ehrlich's solution)

استانداردسازی

پس از پرداختن به مدل‌های گوناگون به نظر می‌رسد پرداختن به نکات کلی استانداردسازی، انتخاب یک مدل حیوانی و شرایط ایجاد آن اجتناب‌ناپذیر است. این استانداردها به صورت خلاصه در جدول ۲ و ۳ آمده است.

جدول ۲. مشخصات کلی که برای انتخاب حیوان مدل باید در نظر گرفته شود [۱].	
تکرارپذیری	درصد حیواناتی که در زمان معین به مرحله مورد نظر می‌رسند.
اختصاصی بودن	مدل باید ناهنجاری دلخواه را بدون بروز سایر عوارض پیچیده بروز دهد.
هزینه	نه تنها هزینه‌های مستقیم بلکه هزینه‌های غیر مستقیم مثل هزینه نگهداری و زمان دستیابی به مدل مورد نظر نیز باید در نظر گرفته شود. یک مدل گران‌قیمت ولی مطمئن می‌تواند ارزانتر از یک مدل ارزان ولی بی‌ثبات به حساب آید.
ایمنی	جانور مورد نظر و روش مدل‌سازی نباید برای محقق خطر آفرین باشند.
اندازه و گونه	حجم نمونه خون مورد نیاز، نیاز به دسترسی به عروق و میزان مصرف دارو تعیین کننده اندازه و گونه حیوانی مورد استفاده است.
اخلاقیات	کمیت‌های مختلف اخلاقی ممکن است نظرات متفاوتی نسبت به هم، در مورد یک مدل واحد داشته باشند.
قابلیت اجرا	اینکه آیا آزمایشگاه تجهیزات، نیروی انسانی مورد نیاز و... را برای ایجاد مدل دارد یا خیر؟

جدول ۳. فاکتورهایی که برای ثابت نگه داشتن استاندارد بین آزمایشگاه‌ها برای مدل‌سازی بهتر است در نظر گرفته می‌شود. برای مدل‌سازی سیروزی قسمت‌های ۱ تا ۶ کافی است [۱].

۱	وزن بدن
۲	وزن اندام: کبد، طحال، بیضه
۳	بررسی‌های بافت شناسی
۴	محتوای کلاژنی کبد
۵	آزمون‌های استاندارد کبدی و کلیوی
۶	درجه هایپر امونیا
۷	وزن بدن به میزان کلی آب بدن
۸	پروفایل هورمونی: انسولین و گلوکاگون
۹	آمینوگرام پلازما

ایجاد مدل چه با عمل جراحی و چه در اثر القای سموم باید

در ساعات مشخصی از روز انجام شود (مثلاً بین ۹ تا ۱۲ صبح) زیرا ایجاد مدل آسیب کبدی با ترمیم کبد ارتباط تنگاتنگی دارد و ترمیم کبد از ریتم شبانه‌روزی خاصی برخوردار است. اگر از ایجاد مدل با عمل جراحی استفاده می‌شود، روش بیهوشی و دوره پس از جراحی باید استاندارد باشد و از داروهایی نظیر هالوتان و ترامادول که در کبد متابولیزه می‌شوند، برای بیهوشی جانور استفاده نشود. در طول جراحی و بعد از آن، حرارت بدن را باید با استفاده از صفحه گرماده (Hot plate) یا نور مادون قرمز ثابت نگه داشت. در هر مطالعه‌ای، حتماً باید گروه کنترل و شم (Sham) در نظر گرفته شود تا بتوان تغییرات حاصل از استرس عمل، دستکاری کبد و حتی بیهوشی و تجویز داروها را که می‌تواند بر نتایج کار تأثیر داشته باشد، از نتایج اصلی کار جدا کرد [۱۱۴].

محققان برای ارزیابی ایجاد آسیب و بهبود بیماری، در برخی از مطالعات از کمی‌کردن اندازه کبد، حجم کبد، استفاده از اندیس‌های میتوئیکی و ردیابی آن‌ها با رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی و ... استفاده نموده‌اند. اما بایستی این نکته را در نظر گرفت که در مدل‌هایی که از سموم استفاده شده است، اندازه‌گیری حجم و وزن کبد اندیس‌های مشکوکی هستند، زیرا ایجاد چربی، حضور سلول‌های التهابی، هیپرتروفی و آتروفی هیپاتوسیت‌ها و کم و زیاد شدن محتویات کلاژنی، این اندیس‌ها را تحت تأثیر قرار داده، آن‌ها را متغیر، غیر قابل اعتماد و غیر قابل مقایسه می‌سازد [۵۵]. باید توجه داشت که برای ایجاد مدل بایستی شرایط دیگری را هم در انتخاب جانور در نظر گرفت.

استفاده از جانوران گوناگون (از موش تا خوک) در مطالعات کبدی رایج است اما امروزه به علت امکاناتی که استفاده از موش‌ها برای محققین فراهم آورده است (دسترسی به موش‌های ترنسژنیک (Transgenic) و ناک اوت (Knock out)؛ تمایل به استفاده از این حیوانات کوچک، در مطالعات بیشتر است [۱۱].

نتیجه‌گیری و چشم‌اندازهای آینده

از آنجا که تأیید تأثیرات روش‌های درمانی مفروض و آزمایشی

مکانیسم‌های ایجاد و بهبود بیماری‌ها در طراحی و ارایه فرضیه‌های درمانی دارد، بایستی در آینده وقت و انرژی بیشتری را صرف مدل‌سازی در راستای کشف مکانیسم‌ها نمود تا از یک سو؛ بتوان مدل‌های مشابه‌تری با بیماری‌های انسانی ایجاد کرد و از سوی دیگر؛ فرضیه‌های مستدل و محکم‌تری برای درمان بیماری‌ها در نظر گرفته و راهی مطمئن به سوی درمان قطعی آن‌ها گشوده شود.

References

1. Mullen KD, Mc Cullough AJ. Problems with animal models of chronic liver disease: suggestions for improvement in standardization. *Hepatology* 1989; 9(3): 500-3.
2. Vorobioff J, Bredfeldt JE, Groszmann RJ. Hyperdynamic circulation in portal-hypertensive rat model: a primary factor for maintenance of chronic portal hypertension. *Am J Physiol* 1983; 244 (1): 52-7.
3. Baharvand H, Azarnia M, Parivar K, Ashtiani SK. The effect of extracellular matrix on embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2005; (38): 495-503.
4. Baharvand H, Hashemi SM, Kazemi Ashtiani S, Farrokhi A. Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems in vitro. *Int J Dev Biol*, 2006; 50(7): 645-52.
5. Baharvand H, Hashemi SM, Shahsavani M. Differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatocyte-like cells in a serum-free adherent culture condition. *Differentiation* 2008; 76(5): p.465-77.
6. Transplantation of Human mesenchymal stem cells into mouse CCL4 –induced cirrhotic liver *Farhangestan alum pezeshki* 2008; 1(1): 20-30.
7. Baharvand H, Mehrjardi NZ, Hatami M, Kiani S, Rao M, Haghghi MM. Neural differentiation from human embryonic stem cells in a defined adherent culture condition. *Int J Dev Biol* 2007; 51(5): 371-8.
8. Baghban Eslaminejad M, Nazarian H, Taghiyar L. Mesenchymal Stem Cell isolation from the removed medium of Rat bone marrow primary culture and their differentiation into skeletal cell lineages. *Yakhteh* 2007; 10: 65-73.
9. Mohamadnejad M, Namiri M, Bagheri M, Hashemi SM, Ghanaati H, Zare Mehrjardi N, et al. Phase 1 human trial of autologous bone marrow-hematopoietic stem cell transplantation in patients with decompensated cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2007; 13(24): 3359-63.
10. Ahmadi H, Baharvand H, Ashtiani SK, Soleimani M, Sadeghian H, Ardekani JM, et al. Safety analysis and improved cardiac function following local autologous transplantation of CD133(+) enriched bone marrow cells after myocardial infarction. *Curr Neurovasc Res* 2007; 4(3): 153-60.
11. Abraelde JG, Pasarín M, García-Pagán JC, Abraelde. Animal models of portal hypertension. *World J Gastroenterol* 2006; 12(41): 6577-84.
12. Kulinski A, Vance DE, Vance JE. A choline-deficient diet in mice inhibits neither the CDP-choline pathway for phosphatidylcholine synthesis in hepatocytes nor apolipoprotein B secretion. *J Biol Chem* 2004; 279(23): 23916-24.
13. Koteish A, Mae Diehl A. Animal models of steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002; 16(5): 679-90.

14. **Raubenheimer PJ, Nyirenda MJ, Walker BR.** Raubenheimer, P.J., M.J. Nyirenda, and B.R. Walker, A choline-deficient diet exacerbates fatty liver but attenuates insulin resistance and glucose intolerance in mice fed a high-fat diet. *Diabetes* 2006; 55(7): 2015-20.
15. **Oliveira PJ, Rolo AP, Seica R, Santos MS, Palmeira CM, Moreno AJ.** Chronic cholestasis and cardiac mitochondrial function in Wistar rats: a model for cardiovascular alterations in chronic liver disease? *Rev Port Cardiol* 2003; 22(1): 67-75.
16. **Vig P, Russo FP, Edwards RJ, Tadrous PJ, Wright NA, Thomas HC, Alison MR, Forbes SJ.** The sources of parenchymal regeneration after chronic hepatocellular liver injury in mice. *Hepatology* 2006; 43(2): 316-24.
17. **Cornelius CE, Arias IM.** Animal model of human disease. Crigler-Najjar Syndrome. Animal model: hereditary nonhemolytic unconjugated hyperbilirubinemia in Gunn rats. *Am J Pathol* 1972; 69(2): 69-72.
18. **Jansen PL, Oude Elferink RP.** Hereditary conjugated hyperbilirubinemia in Wistar rats: a model for the study of ATP-dependent hepatocanalicular organic anion transport. *Adv Vet Sci Comp Med* 1993; 37: 175-95.
19. **Nagase S, Shimamune K, Shumiya S, Nagase S.** Albumin-deficient rat mutant. *Science* 1979; 205(4406): 590-1.
20. **Watanabe Y.** Serial inbreeding of rabbits with hereditary hyperlipidemia (WHHL-rabbit). *Atherosclerosis* 1980; 36(2): 261-8.
21. **Provoost AP, Madern GC, Sinaasappel M, Terpstra OT, Molenaar JC.** Successful prolonged correction of an inborn metabolic defect by heterotopic auxiliary liver transplantation in a dog model. *Transplant Proc* 1993; 25(2): 1950-1.
22. **Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, et al.** Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6(11): 1229-34.
23. **Sweat ER, Musicant ME, Annetts DL, Goodhead B, Orloff MJ.** Production of hepatic outflow block and ascites with an ameroid constrictor. *Surg Forum* 1966; 17: 376-8.
24. **Orloff MJ, Daily PO, Girard B Orloff, M.J.** Treatment of Budd-Chiari syndrome due to inferior vena cava occlusion by combined portal and vena caval decompression. *Am J Surg* 1992; 163(1): 137-42.
25. **DeLeve LD, McCuskey RS, Wang X, Hu L, McCuskey MK, Epstein RB, et al.** Characterization of a reproducible rat model of hepatic veno-occlusive disease. *Hepatology* 1999; 29(6): 1779-91.
26. **Saito S, Heller T, Yoneda M, Takahashi H, Nakajima A, Liang JT.** Lifestyle-related diseases of the digestive system: a new in vitro model of hepatitis C virion production: application of basic research on hepatitis C virus to clinical medicine. *J Pharmacol Sci* 2007; 105(2): 138-44.
27. **Iredale JP.** Cirrhosis: new research provides a basis for rational and targeted treatments. *Bmj* 2003; 327(7407): 143-7.
28. **Friedman SL.** Liver fibrosis -- from bench to bedside. *J Hepatol*, 2003; 38 Suppl 1: S38-53.
29. **Battaller R, Brenner DA.** Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115(2): 209-18.
30. **Fallowfield JA, Iredale JP.** Targeted treatments for cirrhosis. *Expert Opin Ther Targets* 2004; 8(5): 423-35.
31. **Iredale JP.** Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest* 2007; 117(3): 539-48.
32. **Geerts A.** History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21(3): 311-35.
33. **Friedman HZ, Langman CB, Favus MJ.** Vitamin D metabolism and osteomalacia in cystic fibrosis. *Gastroenterology* 1985; 88(3): 808-13.

34. **Friedman SL, Rockey DC, McGuire RF, Maher JJ, Boyles JK, Yamasaki G.** Isolated hepatic lipocytes and Kupffer cells from normal human liver: morphological and functional characteristics in primary culture. *Hepatology* 1992; 15(2): 234-43.
35. **Maher JJ.** Hepatic fibrosis caused by alcohol. *Semin Liver Dis* 1990; 10(1): 66-74.
36. **Maher JJ.** Primary hepatocyte culture: is it home away from home? *Hepatology* 1988; 8(5): 1162-6.
37. **Taniguchi M, Takeuchi T, Nakatsuka R, Watanabe T, Sato K.** Molecular process in acute liver injury and regeneration induced by carbon tetrachloride. *Life Sci* 2004; 75(13): 1539-49.
38. **Friedman SL.** Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000; 275(4): 2247-50.
39. **Okazaki I, Maruyama K.** Collagenase activity in experimental hepatic fibrosis. *Nature* 1974; 252(5478): 49-50.
40. **Montfort I, Pérez-Tamayo R.** Collagenase in experimental carbon tetrachloride cirrhosis of the liver. *Am J Pathol* 1978; 92(2): 411-20.
41. **Arthur MJ, Mann DA, Iredale JP.** Tissue inhibitors of metalloproteinases, hepatic stellate cells and liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 1998; 13 Suppl: S33-8.
42. **Maher JJ, Bissell DM, Friedman SL, Roll FJ.** Collagen measured in primary cultures of normal rat hepatocytes derives from lipocytes within the monolayer. *J Clin Invest* 1988; 82(2): 450-9.
43. **Otto DA, Veech RL.** Isolation of a lipocyte-rich fraction from rat liver nonparenchymal cells. *Adv Exp Med Biol* 1980; 132: 509-17.
44. **Stefanovic B, Hellerbrand C, Brenner DA.** Regulatory role of the conserved stem-loop structure at the 5' end of collagen alpha1(I) mRNA. *Mol Cell Biol* 1999; 19(6): 4334-42.
45. **Arthur MJ.** Fibrogenesis, Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000; 279: G245-G249.
46. **Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, Bissell DM.** Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82(24): 8681-5.
47. **Pinzani M, Gentilini P, Abboud HE.** Phenotypical modulation of liver fat-storing cells by retinoids. Influence on unstimulated and growth factor-induced cell proliferation. *J Hepatol* 1992; 14(2-3): 211-20.
48. **Dufour JF, DeLellis R, Kaplan MM.** Reversibility of hepatic fibrosis in autoimmune hepatitis. *Ann Intern Med* 1997; 127(11): 981-5.
49. **Benyon RC, Iredale JP, Goddard S, Winwood PJ, Arthur MJ.** Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 is increased in fibrotic human liver. *Gastroenterology* 1996; 110(3): 821-31.
50. **Wanless IR, Nakashima E, Sherman M.** Regression of human cirrhosis. Morphologic features and the genesis of incomplete septal cirrhosis. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124(11): 599-607.
51. **Palmes D, Spiegel HU.** Animal models of liver regeneration. *Biomaterials*, 2004; 25(9): 1601-11.
52. **Bisgaard HC, Thorgeirsson SS.** Thorgeirsson, Hepatic regeneration. The role of regeneration in pathogenesis of chronic liver diseases. *Clin Lab Med* 1996; 16(2): 325-39.
53. **Tsukamoto H, Matsuoka M, French SW.** Experimental models of hepatic fibrosis: a review. *Semin Liver Dis* 1990; 10(1): 56-65.
54. **Constandinou C, Henderson N, Iredale JP.** Modeling liver fibrosis in rodents. *Methods Mol Med* 2005; 117: 237-50.
55. **Czaja MJ, Weiner FR, Flanders KC, Giambrone MA, Wind R, Biempica L, et al.** In vitro and in vivo association of transforming growth factor-beta 1 with hepatic fibrosis. *J Cell Biol* 1989; 108(6): 2477-82.
56. **Jiménez W, Clária J, Arroyo V, Rodés J,**

- Carbon tetrachloride induced cirrhosis in rats: a useful tool for investigating the pathogenesis of ascites in chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 1992; 7(1): 90-7.
57. **Kamada Y, Tamura S, Kiso S, Matsumoto H, Saji Y, Yoshida Y, et al.** Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin. *Gastroenterology* 2003; 125(6): 1796-807.
 58. **Burns RC, Wu Y, Sitzmann JV.** Sitzmann, Role of cirrhosis in the hemodynamic response to hemorrhage in portal hypertension. *Surgery* 1995; 117(5): 488-93.
 59. **Proctor E, Chatamra K.** Chatamra, High yield micronodular cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 1982; 83(6): 1183-90.
 60. **Kobayashi N, Ito M, Nakamura J, Cai J, Gao C, Hammel JM, Fox JJ,** Hepatocyte transplantation in rats with decompensated cirrhosis. *Hepatology* 2000; 31(4): 851-7.
 61. **Hernández-Muñoz R, Díaz-Muñoz M, Suárez-Cuenca JA, Trejo-Solís C, López V, Sánchez-Sevilla L, et al.** Adenosine reverses a preestablished CCl₄-induced micronodular cirrhosis through enhancing collagenolytic activity and stimulating hepatocyte cell proliferation in rats. *Hepatology* 2001; 34(4 Pt 1): 677-87.
 62. **Graupera M, García-Pagán JC, Titos E, Claria J, Massaguer A, Bosch J, et al.** 5-lipoxygenase inhibition reduces intrahepatic vascular resistance of cirrhotic rat livers: a possible role of cysteinyl-leukotrienes. *Gastroenterology* 2002; 122(2): 387-93.
 63. **Vorobioff J, Bredfeldt JE, Groszmann RJ,** Increased blood flow through the portal system in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 1984;87(5):1120-6.
 64. **Pawa S, Ali S.** Liver necrosis and fulminant hepatic failure in rats: protection by oxyanionic form of tungsten. *Biochim Biophys Acta*, 2004; 1688(3): 210-22.
 65. **Baumgartner D, LaPlante-O'Neill PM, Sutherland DE, Najarian JS.** Effects of intrasplenic injection of hepatocytes, hepatocyte fragments and hepatocyte culture supernatants on D-galactosamine-induced liver failure in rats. *Eur Surg Res* 1983; 15(3): 129-35.
 66. **Grün M, Liehr H, Thiel H, Rasenack U,** Effects of endotoxemia on renal and intrarenal hemodynamics of rats with or without portacaval anastomosis. *Z Gastroenterol* 1976; 14(2): 285-97.
 67. **Grun M, Liehr H, Rasenack U.** Significance of endotoxaemia in experimental "galactosamine-hepatitis" in the rat. *Acta Hepatogastroenterol (Stuttg)* 1977; 24(2): 64-81.
 68. **Blitzer BL, Waggoner JG, Jones EA, Gralnick HR, Towne D, Butler J, et al.** A model of fulminant hepatic failure in the rabbit. *Gastroenterology* 1978. 74(4): 664-71.
 69. **Diaz-Buxo JA, Blumenthal S, Hayes D, Gores P, Gordon B.** Galactosamine-induced fulminant hepatic necrosis in unanesthetized canines. *Hepatology* 1997; 25(4): 950-7.
 70. **Maddison JE, Dodd PR, Johnston GA, Farrell GC.** Brain gamma-aminobutyric acid receptor binding is normal in rats with thioacetamide-induced hepatic encephalopathy despite elevated plasma gamma-aminobutyric acid-like activity. *Gastroenterology* 1987; 93(5): 1062-8.
 71. **Albrecht J, Hilgier W.** Arginine in thioacetamide-induced hepatogenic encephalopathy in rats: activation of enzymes of arginine metabolism to glutamate. *Acta Neurol Scand* 1986. 73(5): 498-501.
 72. **Li X, Benjamin IS, Alexander B.** Reproducible production of thioacetamide-induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality. *J Hepatol* 2002. 36(4): 488-93.
 73. **Okuyama H, Nakamura H, Shimahara Y, Uyama N, Kwon YW, Kawada N, et al.** Overexpression of thioredoxin prevents

- thioacetamide-induced hepatic fibrosis in mice. *J Hepatol* 2005; 42(1): 117-23.
74. **Luo B, Liu L, Tang L, Zhang J, Ling Y, Fallon MB.,** ET-1 and TNF-alpha in HPS: analysis in prehepatic portal hypertension and biliary and nonbiliary cirrhosis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286(2): G294-303.
 75. **Popov Y, Patsenker E, Bauer M, Niedobitek E, Schulze-Krebs A, Schuppan D.,** Halofuginone induces matrix metalloproteinases in rat hepatic stellate cells via activation of p38 and NFkappaB. *J Biol Chem* 2006; 281(22): 15090-8.
 76. **Laleman W, Vander Elst I, Zeegers M, Servaes R, Libbrecht L, Roskams T, et al.** A stable model of cirrhotic portal hypertension in the rat: thioacetamide revisited. *Eur J Clin Invest* 2006; 36(4): 242-9.
 77. **Yeh CN, Maitra A, Lee KF, Jan YY, Chen MF.** Thioacetamide-induced intestinal-type cholangiocarcinoma in rat: an animal model recapitulating the multi-stage progression of human cholangiocarcinoma. *Carcinogenesis* 2004; 25(4): 631-6.
 78. **Bolesta S, Haber SL.** Hepatotoxicity associated with chronic acetaminophen administration in patients without risk factors. *Ann Pharmacother*, 2002; 36(2): 331-3.
 79. **Rahman TM, Hodgson HJ.** Animal models of acute hepatic failure. *Int J Exp Pathol* 2000; 81(2): 145-57.
 80. **Leonard TB, Morgan DG, Dent JG.** Ranitidine-acetaminophen interaction: effects on acetaminophen-induced hepatotoxicity in Fischer 344 rats. *Hepatology* 1985; 5(3): 480-7.
 81. **Zieve L, Anderson WR, Dozeman R, Draves K, Lyftogt C.** Acetaminophen liver injury: sequential changes in two biochemical indices of regeneration and their relationship to histologic alterations. *J Lab Clin Med* 1985; 105(5): 619-24.
 82. **Miller DJ, Hickman R, Fratter R, Terblanche J, Saunders SJ.** An animal model of fulminant hepatic failure: a feasibility study. *Gastroenterology* 1976; 71(1): 109-13.
 83. **Francavilla A, Makowka L, Polimeno L, Barone M, Demetris J, Prelich J, et al.** A dog model for acetaminophen-induced fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 1989; 96(2 Pt 1): 470-8.
 84. **Jenkins SA, Grandison A, Baxter JN, Day DW, Taylor I, Shields R.** A dimethylnitrosamine-induced model of cirrhosis and portal hypertension in the rat. *J Hepatol* 1985; 1(5): 489-99.
 85. **Veal N, Oberti F, Moal F, Vuillemin E, Fort J, Kaassis M, et al.** Spleno-renal shunt blood flow is an accurate index of collateral circulation in different models of portal hypertension and after pharmacological changes in rats. *J Hepatol* 2000; 32(3): 434-40.
 86. **Ingram LO, Aldrich HC, Borges AC, Causey TB, Martinez A, Morales F, et al.** Morphological and biochemical effects of a low ethanol dose on rat liver regeneration: role of route and timing of administration. *Dig Dis Sci* 1999; 44(10): 1963-74.
 87. **Diehl AM, Chacon M, Wagner P.** The effect of chronic ethanol feeding on ornithine decarboxylase activity and liver regeneration. *Hepatology* 1988; 8(2): 237-42.
 88. **Gaglio PJ, Liu H, Dash S, Cheng S, Dunne B, Ratterree M, et al.** Liver regeneration investigated in a non-human primate model (*Macaca mulatta*). *J Hepatol*, 2002; 37(5): 625-32.
 89. **Rozga J, Jeppsson B, Bengmark S.** Portal branch ligation in the rat. Reevaluation of a model. *Am J Pathol* 1986; 125(2): 300-8.
 90. **Sakamoto T, Ezure T, Lunz J, Murase N, Tsuji H, Fung JJ, et al.** Concanavalin A simultaneously primes liver hematopoietic and epithelial progenitor cells for parallel expansion during liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Hepatology* 2000; 32(2): 256-67.
 91. **Iredale JP, Benyon RC, Arthur MJ, Ferris WF, Alcolado R, Winwood PJ, et al.** Tissue inhibitor

- of metalloproteinase-1 messenger RNA expression is enhanced relative to interstitial collagenase messenger RNA in experimental liver injury and fibrosis. *Hepatology* 1996; 24(1): 176-84.
92. **Lee SS, Girod C, Brailion A, Hadengue A, Lebrech D.** Hemodynamic characterization of chronic bile duct-ligated rats: effect of pentobarbital sodium. *Am J Physiol* 1986; 251(2 Pt 1): G176-80.
 93. **Biecker E, Neef M, Sägeser H, Shaw S, Koshy A, Reichen J.,** Nitric oxide synthase 1 is partly compensating for nitric oxide synthase 3 deficiency in nitric oxide synthase 3 knock-out mice and is elevated in murine and human cirrhosis. *Liver Int* 2004; 24(4): 345-53.
 94. **Beck PL, Lee SS.** Vitamin K1 improves survival in bile-duct-ligated rats with cirrhosis. *J Hepatol* 1995; 23(2): 235.
 95. **Castañeda B, Debernardi-Venon W, Bandi JC, Andreu V, Pérez-del-Pulgar S, Moitinho E, Pizcueta P, et al.** The role of portal pressure in the severity of bleeding in portal hypertensive rats. *Hepatology* 2000; 31(3): 581-6.
 96. **Castañeda B, Morales J, Lionetti R, Moitinho E, Andreu V, Pérez-Del-Pulgar S, et al.** Effects of blood volume restitution following a portal hypertensive-related bleeding in anesthetized cirrhotic rats. *Hepatology* 2001; 33(4): 821-5.
 97. **Cho JJ, Hocher B, Herbst H, Jia JD, Ruehl M, Hahn EG, et al.** An oral endothelin-A receptor antagonist blocks collagen synthesis and deposition in advanced rat liver fibrosis. *Gastroenterology* 2000; 118(6): 1169-78.
 98. **Aller MA, Lorente L, Alonso S, Arias J.** A model of cholestasis in the rat, using a microsurgical technique. *Scand J Gastroenterol* 1993; 28(1): 10-4.
 99. **Aller MA, Duran M, Ortega L, Arias JL, Nava MP, Prieto I, et al.** Comparative study of macro- and microsurgical extrahepatic cholestasis in the rat. *Microsurgery* 2004; 24(6): 442-7.
 100. **Kountouras J, Billing BH, Scheuer PJ.** Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol* 1984; 65(3): 305-11.
 101. **Franco D, Gigou M, Szekely AM, Bismuth H.** Portal hypertension after bile duct obstruction: effect of bile diversion on portal pressure in the rat; *Arch Surg* 1979; 114(9): 1064-7.
 102. **Nanji AA.** Animal models of nonalcoholic fatty liver disease and steatohepatitis. *Clin Liver Dis* 2004; 8(3): 559-74.
 103. **Albanis E, Friedman SL.** Friedman, Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy. *Clin Liver Dis* 2001; 5(2): 315-34.
 104. **Iredale JP.** Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury. *Semin Liver Dis* 2001; 21(3): 427-36.
 105. **Rabani, V., Baharvand H.** Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on CCl4-induced mouse hepatic injury possibly through matrix metalloproteases and differentiation into hepatocyte-like cells. *Hepatitis* 2009; submitted.
 106. **Yagi H, Deguchi K, Aono A, Tani Y, Kishimoto T, Komori T.** Growth disturbance in fetal liver hematopoiesis of Mll-mutant mice. *Blood* 1998; 92(1): 108-17.
 107. **Ohkawa K, Hayashi N, Yuki N, Kasahara A, Oshita M, Mochizuki K, et al.** Disease stage of chronic hepatitis C assessed by both peritoneoscopic and histologic findings and its relationship with response to interferon therapy. *Gastrointest Endosc* 1997; 45(2): 168-75.
 108. **Wang L, Potter JJ, Rennie-Tankersley L, Novitskiy G, Sipes J, Mezey E.** Effects of retinoic acid on the development of liver fibrosis produced by carbon tetrachloride in mice. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1772(1): 66-71.
 109. **Takahra T, Smart DE, Oakley F, Mann DA.** Induction of myofibroblast MMP-9 transcription

- in three-dimensional collagen I gel cultures: regulation by NF-kappaB, AP-1 and Sp1. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(2): 353-63.
110. **Desmet VJ.** Cystic diseases of the liver. From embryology to malformations. *Gastroenterol Clin Biol* 2005; 29(8-9): 858-60.
111. **Abdelkefi A, Torjman L, Ben Romdhane N, Ladeb S, El Omri H, Ben Othman T, et al.** First-line thalidomide-dexamethasone therapy in preparation for autologous stem cell transplantation in young patients (<61 years) with symptomatic multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 2005; 36(3): 193-8.
112. **Issa R, Zhou X, Constandinou CM, Fallowfield J, Millward-Sadler H, Gaca MD, et al.** Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking. *Gastroenterology* 2004; 126(7): 1795-808.
113. **Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, Vuthoori S, et al.** Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest* 2005; 115(1): 56-65.
114. **Moolten FL, Oakman NJ, Bucher NL.** Accelerated response of hepatic DNA synthesis to partial hepatectomy in rats pretreated with growth hormone or surgical stress. *Cancer Res* 1970; 30(9): 2353-7.