

# Comparative Effects of Different Doses of Dextran Sodium Sulfate on the Induction of Chronic Colitis in C57BL /6 Mice

Maryam Heidari<sup>1</sup>, Sedigheh Pouya<sup>1</sup>, Seyed Mahmoud Hashemi<sup>1, 2</sup>, Kaveh Baghaei<sup>3</sup>,  
Mohammad Reza Zali<sup>4</sup>

1. Department of Immunology, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Assistant Professor, Department of Applied Cell Sciences, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3. Assistant Professor Basic and Molecular Epidemiology of Gastrointestinal Disorders Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4. Professor, Gastroenterology and Liver Diseases Research Center, Research Institute for Gastroenterology and Liver Diseases, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received: 2019/05/20      Accept:2019/07/31)

## Abstract

**Background:** IBD is a multifactorial disease in two general titles of Crohn's disease and ulcerative colitis. Animal models have provided extensive tools for identifying the underlying causes of the disease. Several methods, including the use of chemical compounds, have been introduced to induce animal model of colitis. In the present study, C57BL / 6 strains were used to induce colitis using dextran sodium sulfate (DSS) and due to the effect of the amount of this substance in the severity of clinical sign and survival, the effects of different doses of 2, 1.5, and %3 DSS were evaluated to create a mouse model in different groups.

**Methods:** In the current experimental study, to induce colitis, mice were divided into four case and control groups (5 mice in each group) and DSS was administrated in drinking water for 4 days and followed for 7 days with normal water. To create a chronic disease model, this process was repeated over three cycles. Clinical manifestations of colitis in mice were monitored daily including weight loss, bleeding, and diarrhea. The mice were sacrificed on day 34 and examined under microscopic and macroscopic examinations. The results of the study were analyzed and reported using Graph pad Prism 5 software.

**Results:** In the DSS%3- group, high incidence of mortality with severe clinical symptoms was observed in 4 out of 5 mice in the study group ( $p$ -value  $<0.05$ ), but in the DSS%1.5- group there was no significant difference in comparison with the healthy group. In addition, administration of %2 DSS resulted in the induction of moderate to no-mortality colitis in mice.

**Conclusion:** It seems that using %2 DSS with the proposed protocol can induce experimental colitis in female C57BL / 6 mice as an optimal dose.

**Keywords:** Inflammatory bowel disease; Animal model; Experimental colitis; Dextran sodium sulfate

\* Corresponding author: Seyed Mahmoud Hashemi

Email: [smhashemi@sbmu.ac.ir](mailto:smhashemi@sbmu.ac.ir)

# بررسی تاثیر دوزهای مختلف دکستران سدیم سولفات در القای کولیت مزمن در موش C57BL/6

مریم حیدری<sup>۱</sup>، صدیقه پویا<sup>۱</sup>، سید محمود هاشمی\*<sup>۲</sup>، کاوه بقایی<sup>۳</sup>، محمدرضا زالی<sup>۴</sup>

۱- گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- گروه علوم سلولی کاربردی دانشکده فناوری‌های نوین دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۳- مرکز تحقیقات علوم پایه و اپیدمیولوژی مولکولی بیماری‌های دستگاه گوارش، پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

۴- مرکز تحقیقات بیماری‌های گوارش و کبد، پژوهشکده بیماری‌های گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۵/۰۹

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۲/۳۰

## چکیده:

**سابقه و هدف:** IBD بیماری چندین عاملی است که در دو عنوان عمومی بیماری کرون و کولیت اولسراتیو طبقه‌بندی می‌شود. تاکنون مدل‌های حیوانی ابزارهای گسترده‌ای برای شناسایی علل سببی این بیماری ارائه داده است. روش‌های متعددی از جمله استفاده از ترکیب‌های شیمیایی برای ایجاد مدل حیوانی کولیت معرفی شده‌اند. در این مطالعه، از سویه موشی C57BL/6 برای ایجاد کولیت با استفاده از دکستران سدیم سولفات (DSS) استفاده شد و به دلیل اثر این ماده در شدت علائم بالینی و بقای حیوانات، آثار دوزهای مختلف ۱/۵، ۲ و ۳٪ DSS، برای ایجاد مدل موشی ارزیابی شد. **روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، برای القای بیماری کولیت آزمایشگاهی، موش‌ها به چهار گروه مورد و شاهد (در هر گروه پنج موش) تقسیم شده و DSS به مدت چهار روز به آب آشامیدنی موش‌ها اضافه شد و به مدت هفت روز با آب معمولی پیگیری شد. برای ایجاد مدل مزمن بیماری، این روند در سه دوره تکرار شد. تظاهر بالینی کولیت در موش‌ها از جمله: کاهش وزن بدن، خونریزی و اسهال به طور روزانه بررسی شد، موش‌ها در روز ۳۴ قربانی شده و مورد بررسی‌های میکروسکوپی و ماکروسکوپی قرار گرفتند. نتایج مطالعه با استفاده از نرم‌افزار Graphpad Prism نسخه پنج تجزیه و تحلیل و گزارش شد. **یافته‌ها:** در گروه ۳ درصد DSS، بروز بالای مرگ و میر با علائم بالینی شدید مشاهده شد، چهار موش از پنج موش در گروه مطالعه، (05/0 > p-Value) ولی در گروه ۱/۵ درصد DSS تفاوت معناداری در مقایسه با گروه سالم مشاهده نشد. همچنین استفاده از ۲ درصد DSS منجر به القای کولیت با علائم متوسط و بدون مرگ و میر در موش‌ها شد. **نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد استفاده از ۲ درصد DSS، با پروتکل ارائه شده می‌تواند به عنوان یک دوز بهینه سبب القای کولیت تجربی در موش C57BL/6 ماده شود.

**واژگان کلیدی:** بیماری التهابی روده، مدل حیوانی، کولیت تجربی، دکستران سدیم سولفات.

## مقدمه:

بیماری التهابی روده (IBD) در انسان بیماری مزمن روده با واسطه بی‌نظمی در سیستم ایمنی است که به دو شکل کولیت اولسراتیو (Ulcerative colitis) و بیماری کرون (Crohn's disease) بروز می‌یابد. التهاب در بیماری کرون می‌تواند از دهان تا انتهای روده بزرگ را در برگیرد ولی در کولیت اولسراتیو اغلب به روده بزرگ محدود می‌شود (۱). بیماری بیشتر در افراد جوان (۳۰ - ۱۵ سالگی) ظاهر شده و بر کیفیت زندگی افراد تاثیر می‌گذارد و به تحمیل هزینه‌های درمانی قابل توجه بر افراد مبتلا منجر می‌شود (۲). در حالی که دلیل دقیق بیماری التهابی روده هنوز ناشناخته است، می‌توان از عوامل زیست‌محیطی، ژنتیک، عوامل میکروبی، و نقص ایمنی مخاط (شکست تلورانس مخاطی) در بروز این بیماری نام برد (۳)؛ همچنین سدهای ناکارآمد اپیتلیالی به‌عنوان عامل اصلی فعال شدن پاسخ ایمنی مخاطی مطرح می‌شوند (۴). داروهای سرکوبگر سیستم ایمنی مانند کورتیکواستروئیدها و درمان بیولوژیک anti-TNF-alpha (infliximab, adalimumab) اغلب در درمان حالت فعال

بیماری التهابی روده (IBD) در انسان بیماری مزمن روده با واسطه بی‌نظمی در سیستم ایمنی است که به دو شکل کولیت اولسراتیو (Ulcerative colitis) و بیماری کرون (Crohn's disease) بروز می‌یابد. التهاب در بیماری کرون می‌تواند از دهان تا انتهای روده بزرگ را در برگیرد ولی در کولیت اولسراتیو اغلب به روده بزرگ محدود می‌شود (۱). بیماری بیشتر در افراد جوان (۳۰ - ۱۵ سالگی) ظاهر شده و بر کیفیت زندگی افراد تاثیر می‌گذارد و به تحمیل هزینه‌های درمانی قابل توجه بر افراد مبتلا منجر می‌شود (۲). در حالی که دلیل دقیق بیماری التهابی روده هنوز ناشناخته است، می‌توان از عوامل زیست‌محیطی، ژنتیک، عوامل میکروبی، و نقص ایمنی مخاط (شکست تلورانس مخاطی) در بروز این بیماری نام برد (۳)؛ همچنین سدهای ناکارآمد اپیتلیالی به‌عنوان عامل اصلی فعال شدن پاسخ ایمنی مخاطی مطرح می‌شوند (۴). داروهای سرکوبگر سیستم ایمنی مانند کورتیکواستروئیدها و درمان بیولوژیک anti-TNF-alpha (infliximab, adalimumab) اغلب در درمان حالت فعال

نویسنده مسئول: سید محمود هاشمی

پست الکترونیک: smhashemi@sbmu.ac.ir

(DSS) و گروه کنترل (در هر گروه پنج موش) تقسیم شدند و کولیت مزمن در سه سیکل متوالی ۱۱ روزه، شامل چهار روز مصرف آب حاوی DSS و در ادامه هفت روز مصرف آب معمولی، شد. در دوره القا، مدل موش‌های گروه کنترل آب معمولی دریافت کردند. تمامی محلول‌ها به‌صورت تازه و روزانه تهیه شدند.

#### پایان روزانه علایم بالینی:

در دوره ۳۴ روزه، علایم بالینی موش‌های گروه‌های مختلف شامل میزان بقا، تغییر وزن بدن (توزین روزانه موش‌ها با ترازو)، تغییر قوام مدفوع و شدت خونریزی مشاهده و ثبت شد. میزان شاخص فعالیت بیماری (Disease Activity Index) DAI که از معیارهای سنجش کولیت است، به‌صورت یک عدد واحد از مجموع درجه‌های شدت علایم بالینی شامل: کاهش وزن بدن، میزان خونریزی و اسهال تعریف می‌شود که در نهایت گردآوری و ثبت شد.

#### جمع‌آوری نمونه‌های بافتی و سنجش ماکروسکوپی:

تمامی موش‌ها در روز ۳۴، به‌صورت استنشاقی و با استفاده از CO<sub>2</sub> قربانی شدند. سپس بافت کولون از بدن حیوان استخراج شده و پس از شست‌وشو با بافر PBS از نظر طول با واحد mm و از نظر وزن بافتی با کمک ترازو و واحد mg اندازه‌گیری شد. همچنین تعداد موش‌هایی که دچار مرگ‌ومیر شدند برای سنجش بقا ثبت شد. برای تعیین جنس موش مناسب برای القای کولیت، موش‌های نر در گروهی جداگانه، تحت القای مدل قرار گرفتند و به دلیل حساسیت بالا به آسیب ناشی از DSS، به‌سرعت در روزهای اولیه القای مدل دچار مرگ‌ومیر شدید شده امکان ارائه نتایج حاصل نشد و از روند مطالعه خارج شدند.

#### آنالیز بافت‌شناسی کولون:

نمونه‌های بافت روده، پس از جداسازی در فرمالین ۱۰ درصد فیکس شده و پس از تهیه مقطع و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، از نظر شدت التهاب، تغییرات اپیتلیال روده و تغییر در ساختار مخاط، بررسی شدند.

#### آنالیز آماری:

برای آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار Graphpad Prism نسخه ۵، استفاده شد. از داده‌ها میانگین گرفته‌شده و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون One Way ANOVA. Post Hoc Tukey Unpaired t test استفاده شد. سطح معناداری، کمتر از ۵ درصد در نظر گرفته شد.

#### نتایج:

#### اثر دوزهای مختلف DSS بر علایم بالینی کولیت مزمن:

در این مطالعه اثر دوزهای مختلف DSS بر القای کولیت در چهار گروه موش‌های هم‌ژن C57BL/6 ارزیابی شد و در نتیجه مشاهده شد که استفاده از DSS در آب خوراکی موش‌ها سبب ایجاد علایم بالینی شدید همچون کاهش وزن موش، اسهال و خونریزی رکتال می‌شود. همچنین مشاهده‌های ماکروسکوپی بافتی نشان‌دهنده کاهش در طول روده، قرمزی و التهاب و نیز ضخامت در روده بود و در بررسی‌های آسیب‌شناسی بافتی به‌صورت میکروسکوپی شواهد مبنی بر وجود التهاب، ارتشاح سلولی و تخریب ساختار دیواره روده تایید شد (شکل ۱.E). با سنجش اثر دوزهای مختلف DSS مشخص شد که استفاده از ترکیب ۳ درصد از DSS در آب آشامیدنی موش‌ها سبب بروز علایم بالینی بسیار شدید شامل کاهش وزن معنادار تا (۱۵ گرم) نسبت به گروه نرمال (۲۰-۲۲ گرم) می‌شود (p-Value > 0.05). شدت کاهش وزن موش‌ها در گروه ۳ درصد DSS به‌صورت معناداری بیشتر از سایر گروه‌ها بوده است (p-Value > 0.05). شدت خونریزی در هر دو گروه، ۳ و ۲ درصد DSS دارای تفاوت معنادار با گروه کنترل سالم و نیز گروه ۱/۵ درصد DSS بود (p-Value > 0.05). نتایج خونریزی در بین دو گروه سالم و ۱/۵ درصد DSS فاقد تفاوت معنادار بود. در بررسی قوام مدفوع و بروز اسهال که از عوارض شایع کولیت است، قوام مدفوع در چهار حالت (form: soft، loose، watery) از ۴ تا ۱ در حیوانات مورد مطالعه رتبه‌بندی شد. بر اساس نتایج مشخص شد که وضعیت اسهال و قوام مدفوع در گروه ۳ درصد DSS دارای درجه بالاتر چهار (وخیم‌تر) و دارای تفاوت آماری معنادار نسبت به سایر گروه‌ها و نیز گروه کنترل سالم بوده است (p-Value > 0.05). همچنین نتایج گروه ۲ درصد DSS نیز دارای تفاوت آماری معنادار نسبت به گروه‌های کنترل و نیز تست بود. در نتایج گروه ۱/۵ درصد DSS و کنترل سالم تفاوت آماری معنادار مشاهده نشد.

بیماری و نیز جلوگیری از عود دوباره استفاده می‌شوند (۵,۶) intr ظهور مدل‌های حیوانی التهاب مخاط گوارشی، به درک بهتری از مکانیسم‌های درگیر در هموستاز مخاطی و وقوع بیماری التهابی روده (IBD) منجر شده و نیز امکان شناسایی مکانیسم‌های بیماری‌زایی IBD را برای محققان فراهم کرده است. در مدل‌های حیوانی القا شده به روش شیمیایی با توجه به جنس و سویه حیوان ترکیب‌های شیمیایی از جمله: Dextran Sulfate Sodium (DSS) ۲,۴,۶-Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) و Oxazolone به کار می‌روند (۷,۸).

از میان ترکیب‌های شیمیایی مورد استفاده، دکستران سولفات سدیم ترکیبی با انحلال‌پذیری بالا در آب، دارای بار مولکولی به‌شدت منفی به دلیل حضور گروه‌های سولفات در ساختار شیمیایی و آثار سمی بر سلول‌های اپیتلیال مخاطی است که به کاهش انسجام لایه مخاطی و افزایش نفوذپذیری سلول‌های لایه مخاط منجر می‌شود. در ادامه فلور میکروبی و آنتی‌ژن‌های حاصل از آن‌ها وارد فضای لامینا پروپریا می‌شود که به برانگیختگی عوامل لنفوییدی ذاتی و اکتسابی و ترشح ترکیب‌هایی مانند سایتوکاین‌ها، کموکاین‌ها و واسطه‌های پیش التهابی آن‌ها منجر می‌شود و آسیب سلولی در دیواره مخاطی روده ایجاد می‌شود (۹,۱۰). علایم بالینی و آسیب بافتی ناشی از مصرف DSS، شمای مشابه التهاب مخاط در انسان به‌ویژه از نوع کولیت اولسراتیو را بارز می‌کند (۱۱). در مدل‌های حیوانی با توجه به هدف مطالعه، جنس، سن و وزن موش، کولیت به دو صورت حاد و مزمن القا می‌شود. در مدل مزمن، اغلب در بازه زمانی بین پنج تا هفت روز، DSS در محلول آب خوراکی حیوان استفاده شده و در ادامه با مصرف آب معمولی پیگیری می‌شود که تمام این پروسه در سیکل‌های متعددی از سه تا پنج سیکل با توجه به غلظت DSS و نیز بازه‌های زمانی انتخاب‌شده انجام می‌گیرد که طیفی از علایم بیماری شامل: کاهش وزن، اسهال، خونریزی و نیز آسیب بافتی را ایجاد می‌کند (۱۲,۱۳). مدل‌های موشی کولیت در حالت حاد، با تجویز دوز بالایی از DSS در یک دوره زمانی کوتاه، پنج تا ۱۰ روزه القا شده و در ادامه تست‌های تشخیصی انجام می‌شود (۷,۱۴).

از آنجا که بیماری التهابی روده، بیماری مزمن چندعاملی است (۱۵) و در امور پژوهشی مربوط به آن، القای یک مدل آزمایشگاهی مناسب که بیشترین شباهت را به سیر بالینی بیماری در انسان داشته باشد، امری ضروری محسوب می‌شود. بنابراین این مطالعه با هدف سنجش و عیب‌یابی القای موفق کولیت در کشور ایران، با شرایط حیوانخانه‌های آموزشی و سویه‌های موشی رایج در کشور برای دستیابی به مقدار بهینه DSS استفاده شده و مدت زمان تجویز برای القای مدل کولیت تجربی در گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در سال ۱۳۹۶ انجام شده است. در این مطالعه، دوزهای مختلف DSS شامل ۱/۵، ۲ و ۳ درصد در سیکل‌های متوالی در القای مدل مزمن از نظر علایم بالینی و آسیب‌شناسی بافتی ارزیابی و مقایسه شده است.

#### مواد و روش‌ها:

#### نوع مطالعه:

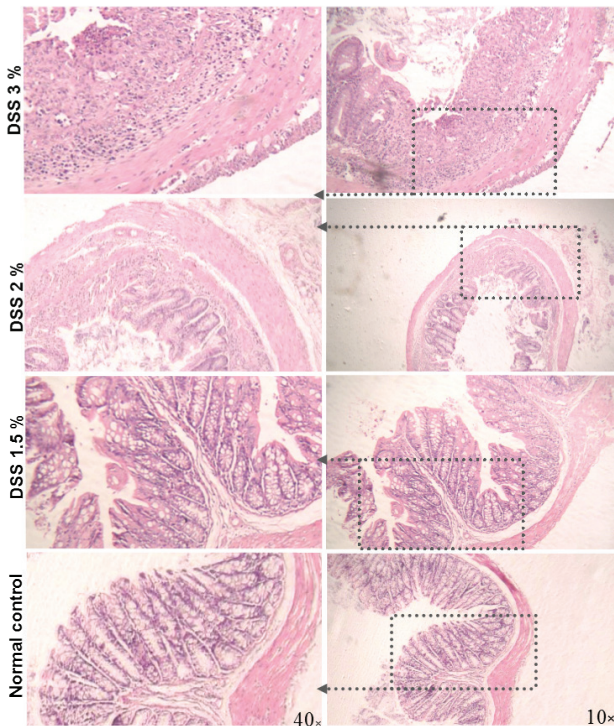
این مطالعه از نوع تجربی اصیل (original experimental research) است.

#### موش:

موش‌های C57BL/6 نر و ماده، ۸-۶ هفته، وزن ۲۰-۲۲ گرم، سالم از نظر بالینی، از پژوهشگاه رویان تهران خریداری شد. موش‌ها مدت دو هفته زودتر از انجام آزمایش برای تطابق در محیط جدید خریداری و در شرایط استاندارد و استریل آزمایشگاهی، در قفس‌های جداگانه نگه‌داری شدند. با توجه به هم‌ژن بودن موش‌ها و با نظر مشاور آماری در هر گروه مطالعه پنج موش قرار داده شد، دسترسی به آب و غذای کافی برای موش‌ها فراهم بوده و تمام آزمایش‌ها بر اساس مصوبه شورای نگه‌داری از حیوانات دانشگاه شهید بهشتی تهران انجام شد.

#### القای کولیت:

برای مقایسه غلظت‌های مختلف (DSS (30-55 kDa; TdB Consultancy) در القای کولیت مزمن در موش‌های ماده، انواع ۳، ۲ و ۱/۵ درصد آن در آب آشامیدنی، تهیه شد؛ موش‌های مطالعه شده به چهار گروه مورد (۱/۵، ۲، ۳ درصد



مشاهده نشد (شکل ۲)

شکل ۲. نمای آسیب‌شناسی بافتی: به ترتیب از بالا به پایین در نمای بافتی کولون استخراج‌شده از بدن حیوانات در گروه‌های مطالعه، ۳ درصد، ۲ درصد، ۱/۵ درصد DSS و کنترل سالم کاهش شدت آسیب بافتی و ارتشاح سلول‌های التهابی مشاهده شده است.

**بحث:**

نتایج این مطالعه مشخص کرد که در دوره ۳۴ روزه آزمایش، غلظت‌های بالای DSS (۳ درصد)، ارتباط مستقیمی با بروز نوسانات شدید علائم بالینی، آسیب‌های ایجادشده در بافت روده و حتی افزایش مرگ‌ومیر داشت و در صورت استفاده از غلظت‌های پایین‌تر، علائم بیماری در بازه زمانی کوتاه‌تری رفع شدند و بهبودی حاصل شد. شایان توجه است که کولیت آزمایشگاهی، مدل تجربی است که در آن مرگ‌ومیر نقطه پایان آزمایش در نظر گرفته نمی‌شود، بنابراین با در نظر گرفتن موارد فوق، می‌توان تا حدودی از بروز مرگ‌ومیر ناخواسته در آزمایش اجتناب کرد (۱۳).

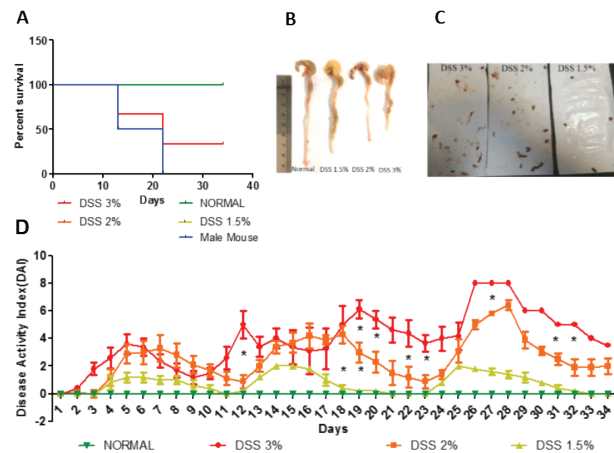
القای موفق و قابل تکرار کولیت ناشی از DSS، بستگی به عوامل کلیدی متعددی دارد. از جمله منبع DSS، وزن مولکولی، غلظت، مدت زمان، سویه موشی، منبع تهیه موش، سن، جنس و وزن بدن و نیز عوامل محیطی از جمله شرایط بهداشت محل نگهداری (۱۶). با توجه به حاصل نشدن نتیجه لازم از گزارش مطالعه‌های پیشین در ارائه یک دوز مشخص و ثابت برای همه محققان، این مطالعه با هدف سنجش و عیب‌یابی القای موفق کولیت در کشور ایران، با شرایط حیوانخانه‌های آموزشی و سویه‌های موشی رایج در کشور برای دستیابی به مقدار بهینه DSS استفاده شده و مدت زمان تجویز برای القای مدل کولیت تجربی انجام شده است. علاوه بر غلظت و مقدار DSS به کاررفته، جنس موش‌ها نیز از فاکتورهای بسیار مهم و تأثیرگذار در کیفیت مدل القا شده است (۱۶) نقش جنسیت در بروز التهاب به اثبات رسیده است و هم در انسان و هم در موش بروز و پیشرفت بیماری‌های اتوایمیون در جنس مونث بیشتر گزارش شده است (۱۷، ۱۸) در این مطالعه القای کولیت مزمن، در هر دو جنس نر و ماده طراحی شد، گروه موش‌های نر (پنج موش) در سیکل‌های مطالعه دچار مرگ و میر بسیار شدید شدند (هر پنج موش) و امکان ارائه نتایج بالینی وجود نداشت، بنابراین به دلیل طولانی بودن زمان مطالعه در مدل مزمن، در صورت استفاده از جنس نر، میزان مرگ‌ومیر افزایش خواهد یافت و مغایر با پروتکل‌های اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی است، استفاده از موش ماده برای القای کولیت مزمن تجربی پیشنهاد می‌شود. البته ذکر

در رتبه‌بندی عوارض بالینی بیماری کولیت، DAI (کاهش وزن، قوام مدفوع و خونریزی) بر اساس نتایج، در بین گروه‌های ۳ و ۲ درصد DSS تفاوت آماری معنادار با گروه کنترل و نیز گروه ۱/۵ درصد DSS ثابت شد ( $p > 0.05$ ) همچنین نتایج گروه ۱/۵ درصد DSS در مقایسه با گروه کنترل سالم فاقد تفاوت معنادار بود (شکل ۱.D).

بررسی‌های میکروسکوپی از نظر طول کولون، نشان داد که با بروز التهاب در روده موش‌های مطالعه شده پس از مصرف DSS، اندازه طول کولون کاهش یافته است و در بین گروه‌های مختلف مطالعه با دریافت مقدار متفاوت DSS و نیز در مقایسه با گروه کنترل سالم تفاوت آماری معنادار مشاهده شد ( $p > 0.05$ ). تفاوت طول کولون در بین گروه ۱/۵ درصد DSS و ۲ درصد DSS از نظر آماری معنادار نبود (شکل ۱.B).

در سنجش بقا، در گروه ۳ درصد DSS میزان مرگ‌ومیر بسیار بالا (چهار موش از پنج موش موجود در گروه مطالعه) ثبت شد. در گروه ۲ درصد DSS میزان مرگ‌ومیر (فاقد مرگ‌ومیر) و نیز شدت بیماری در موش‌ها به‌طور معنادار نسبت به گروهی که میزان ۳ درصد DSS دریافت کردند، کمتر بوده است همچنین گروه ۱/۵ درصد DSS فاقد موارد مرگ در موش‌های مورد مطالعه بود. در نمودار بقا، گروه موش‌های نر نیز وارد شدند؛ در این گروه موش‌ها (۵ موش) در پنج روز اول دوره مصرف DSS دچار مرگ‌ومیر شده و از روند مطالعه حذف شدند (شکل ۱.A).

در گروه سوم این مطالعه با دوز ۱/۵ درصد DSS برای القای کولیت مزمن در موش‌ها، مشخص شد که علائم بالینی مینی بر القای بیماری محسوس نبوده و در مواردی مانند میزان خونریزی رکتال، قوام مدفوع (شکل ۱.C) و نیز DAI (شکل ۱.D)، اختلاف معناداری در مقایسه با گروه کنترل موش‌های سالم مشاهده نشد.



شکل ۱. سنجش اثر دوزهای مختلف DSS بر علائم بالینی کولیت مزمن موشی: A، بررسی درصد بقا. B، مقایسه طول روده و C، میزان خونریزی و قوام مدفوع در موش‌های مطالعه شده D، ارزیابی شاخص فعالیت بیماری (DAI). آزمون آماری استفاده شده One Way Anova. تفاوت آماری کمتر از ۵ درصد معنادار در نظر گرفته شده است.

**آثار پاتولوژیک دوزهای مختلف DSS بر بافت روده:**

در بررسی‌های میکروسکوپی آسیب‌شناسی بافتی، در گروهی که میزان ۳ درصد DSS در آب آشامیدنی مصرف کرده بودند، تغییر بافتی به‌مراتب شدیدتری ایجاد شده به‌نحوی که ساختار بافتی کریپت‌های روده به‌شدت تخریب شده و ارتشاح سلولی فراوان مشاهده شد. به‌این ترتیب به نظر می‌رسد که افزایش دوز DSS التهاب را به سمت مدل حاد پیش می‌برد؛ میزان آسیب بافتی در گروه ۲ درصد DSS نیز در مقایسه با بافت سالم مشهود بود؛ در گروه ۱/۵ درصد DSS میزان آسیب بافتی وارد شده به کلون بسیار خفیف بوده و نسبت به گروه سالم تفاوت قابل ملاحظه‌ای

مقایسه شد و برای القای کولیت حاد، هفت روز مصرف 4 DSS درصد و در ادامه پنج روز آب معمولی برای سه سیکل متوالی به عنوان دوز بهینه در نظر گرفته شد (۳). نتایج حاصل از این آزمایش با نتایج حاصل از مطالعه حاضر در تضاد است، هرچند که نوع مدل ایجاد شده در دو آزمایش متفاوت است و در مطالعه Ahmed G. Abdel Salam در ابتدا برای تعیین غلظت مناسب DSS، نوع حاد بیماری در نظر گرفته شد. در این مطالعه از (30-55 kDa; TdB Consultancy) DSS استفاده شد، از آنجا که ترکیب DSS با وزنهای مولکولی و نامهای تجاری مختلف در دسترس محققان قرار دارد، به نظر می‌رسد هر مطالعه نیازمند ارزیابی دوز بهینه با توجه به منبع DSS موجود باشد. پس از مصرف 2 DSS درصد به شکل مزمن در سه سیکل ۱۱ روزه شامل چهار روز مصرف محلول DSS و هفت روز مصرف آب معمولی نتایج بالینی مورد نظر حاصل شد. طبق مطالعات انجام گرفته توسط همین تیم پژوهشی و مقاله‌های منتشر شده (۲۲،۲۳) در صورت استفاده از ترکیب DSS با نام تجاری و وزن مولکولی مشابه و موش با نژاد و سن و جنس مشابه، پروتکل استفاده شده دارای تکرارپذیری خواهد بود.

#### نتیجه‌گیری:

با توجه به مطالعه‌های موجود، استفاده از غلظت‌های بالای DSS در فرم حاد بیماری رایج بوده و در صورت استفاده از آن‌ها در فرم مزمن، تعداد زیادی از حیوانات آزمایشگاهی از دست خواهند رفت. بنابراین طبق نتایج به دست آمده، استفاده از DSS ۲ درصد در القای فرم مزمن کولیت مناسب بوده و نتایج قابل قبولی را فراهم کرده است.

#### تشکر و قدردانی:

مقاله حاضر، حاصل اجرای طرح تحقیقاتی مصوب در معاونت پژوهشی دانشکده پزشکی با کد ثبت ۷۵۱۶ است.

این مطالعه با حمایت مالی مرکز تحقیقات گوارش و کبد بیمارستان طالقانی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شد. به این وسیله از همکاری صمیمانه آن مرکز تشکر و قدردانی می‌شود.

این نکته الزامی است که در مدل‌های حاد کولیت موشی، به دلیل مدت‌زمان کوتاه‌تر پایش، ۷-۱۰ روز، استفاده از موش‌های نر رایج‌تر است. برخی از مطالعه‌ها غلظت DSS را عامل مهمی برای توسعه مزمن کولیت نمی‌دانند، بلکه مجموعه عواملی همچون محیط نگهداری و سویه ژنتیک موش‌های مطالعه شده بر اثربخشی القای کولیت تجربی در نظر گرفته می‌شود (۳،۱۶).

Silvia Melgar و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که موش‌های سویه C57BL/6 استعداد بیشتری در ابتلا به کولیت مزمن ناشی از DSS را دارند، در مقابل، موش BALB/c به سرعت پس از حذف DSS، از نظر علائم بالینی، آسیب بافتی و نشانگرهای التهابی بهبود می‌یابد. در مطالعه ما مشخص شد که غلظت ۲ درصد DSS به مدت چهار روز برای ایجاد مدل مزمن در موش‌های C57BL/6 ماده از نظر علائم بالینی و وخامت بیماری وضعیت قابل قبولی را ایجاد می‌کند. این نتایج در مطالعه‌های دیگر نیز تایید شده است که در آن موش‌های C57BL/6 در معرض ۲ درصد DSS به مدت پنج روز در معرض کولیت مزمن قرار گرفتند (۱۹).

Bernhard Egger و همکاران در سال ۲۰۰۰، اثر غلظت‌های ۲/۵، ۵ و ۷ درصد DSS با جرم مولکولی ۴۰ KD از شرکت (ICN, Costa Mesa, Ca- Sil (lif., USA را به مدت هفت روز در موش‌های BALB/c، بررسی کردند و در نتیجه ارتباط خطی بین افزایش غلظت DSS و آسیب بافتی تایید شد (۲۰). via Melgar و همکاران در سال ۲۰۰۰ اثر غلظت‌های ۳ و ۵ درصد DSS (45kDa; TdB Consultancy M Uppsala, Sweden) در موش‌های C57BL/6 و BALB/c را مقایسه کردند که DSS 5 درصد به بروز علائم بسیار شدیدی منجر شد (۱۹). در سال ۲۰۱۳، Hyung-Sik Kim و همکاران از DSS ۳ درصد برای القای کولیت حاد استفاده کردند؛ شامل هفت روز مصرف آب حاوی (OH, USA) DSS MPBiochemicals, Solon, و هفت روز مصرف آب معمولی. در نقطه پایانی آزمایش آن‌ها یعنی روز ۱۴، ۸۵ درصد جمعیت موش‌ها از دست‌رفته بودند (۲۱) در آزمایشی که توسط Ahmed G. Abdel Salam و همکاران در سال ۲۰۱۴ انجام شد، اثر غلظت‌های ۲، ۴، و ۵ درصد DSS

2013;139(1):71-86.

8. Gadaleta RM, Garcia-Irigoyen O, Moschetta A. Exploration of Inflammatory Bowel Disease in Mice: Chemically Induced Murine Models of Inflammatory Bowel Disease (IBD). *Curr Protoc Mouse Biol.* 2017;7(March):13-28.

9. Yan Y, Kolachala V, Dalmasso G, Nguyen H, Laroui H, Sitaraman S V., et al. Temporal and Spatial Analysis of Clinical and Molecular Parameters in Dextran Sodium Sulfate Induced Colitis. Bereswill S, editor. *PLoS One* [Internet]. 2009 Jun 29 [cited 2017 Mar 12];4(6):e6073.

10. Poritz LS, Garver KI, Green C, Fitzpatrick L, Ruggiero F, Koltun WA. Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. *J Surg Res* [Internet]. 2007 Jun 1 [cited 2017 Mar 12];140(1):12-9.

11. Kiesler P, Fuss IJ, Strober W. Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. *C Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2015;1(February):154-70.

12. Kim JJ, Shajib MS, Manocha MM, Khan WI. Investigating Intestinal Inflammation in DSS-induced Model of IBD. *J Vis Exp* [Internet]. 2012;(February):1-6.

13. Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M. Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr Protoc Immunol.* 2014;(February):1-14.

14. Jiminez J a., Uwiera TC, Douglas Inglis G, Uwiera RRE. Animal

#### منابع:

- Dennis Kasper (Author), Anthony Fauci (Author), Stephen Hauser (Author), Dan Longo (Author), J. Jameson (Author) JL (Author). *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 19th editi. McGraw-Hill Education; 3000 (595-596) p.
- Hamid Afshar , Hamed Daghighzadeh , Peyman Adibi , Monireh Seraj, Shadab Nasr, Nasrin Masacli, Ali Toghiani RBS. The Stressors and Perceived Social Support in the Patients with Ulcerative Colitis. *J Isfahan Med Sch.* 2011;28(113, 1st):752-8.
- Abdel Salam AG, Ata HM, Salman TM, Rashed L a., Sabry D, Schaa-lan MF. Potential therapeutic utility of mesenchymal stem cells in inflammatory bowel disease in mice. *Int Immunopharmacol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;22(2):515-21.
- Geremia A, Biancheri P, Allan P, Corazza GR, Di A. Autoimmunity Reviews Innate and adaptive immunity in in fl ammatory bowel disease. *Autoimmun Rev* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;13(1):3-10.
- Lewis RT, Maron DJ. Efficacy and complications of surgery for Crohn's disease. *Gastroenterol Hepatol.* 2010;6(9):587-96.
- Bressler B, Sands BE. Review article: Medical therapy for fistulizing Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;24(August):1283-93.
- Dothel G, Vasina V, Barbara G, Ponti F De. Pharmacology & Therapeutics Animal models of chemically induced intestinal in fl ammation : Predictivity and ethical issues. *Pharmacol Ther* [Internet]. Elsevier Inc.;

- models to study acute and chronic intestinal inflammation in mammals. *Gut Pathog* [Internet]. BioMed Central; 2015;7:29.
15. Ananthakrishnan AN, Xavier RJ, Podolsky DK. Inflammatory bowel diseases : pathogenesis. *Yamada's Textb Gastroenterol*. 2016;1364-77.
  16. Sambasivarao S V. Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Colitis in Mice. NIH Public Access. 2013;18:1199-216.
  17. Ngo ST, Steyn FJ, McCombe P a. Gender differences in autoimmune disease. *Front Neuroendocrinol*. Elsevier Inc.; 2014;35(3):347-69.
  18. Bábícková J, Tóthová L, Lengyelová E, Bartoňová A, Hodosy J, Gardlík R, et al. Sex Differences in Experimentally Induced Colitis in Mice: a Role for Estrogens. *Inflammation*. 2015;38(5):1996-2006.
  19. Melgar S, Karlsson A, Michaëlsson E. Acute colitis induced by dextran sulfate sodium progresses to chronicity in C57BL/6 but not in BALB/c mice: correlation between symptoms and inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288(6):G1328-38.
  20. Egger B, Bajaj-Elliott M, MacDonald TT, Inglin R, Eysselein VE, Büchler MW. Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: cytokine profile and dose dependency. *Digestion*. 2000;62(4):240-8.
  21. Kim HS, Shin TH, Lee BC, Yu KR, Seo Y, Lee S, et al. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cells reduce colitis in mice by activating NOD2 signaling to COX2. *Gastroenterology* [Internet]. Elsevier, Inc; 2013;145(6):1392-403.
  22. Heidari M, Aghdaei HA, Hashemi SM. The immunomodulatory effects of adipose - derived mesenchymal stem cells and mesenchymal stem cells - conditioned medium in chronic colitis. 2018;(April):1-13.
  23. Pouya S, Heidari M, Baghaei K, Asadzadeh Aghdaei H, Moradi A, Namaki S, et al. Study the effects of mesenchymal stem cell conditioned medium injection in mouse model of acute colitis. *Int Immunopharmacol* [Internet]. Elsevier; 2018;54(October 2017):86-94.