دراسة هستولوجية وهستوكيميائية مناعية لتقييم تأثيرات مستخلصات الكاموميل مقارنة بالشاي الأخضر على الغدد اللعابية في ذكورالفئران البيضاء المعالجة بعقارالميثوتركسيت

رسالة مقدمة توطئةً للحصول على درجة الدكتوراه في الهستولوجيا

مقدمة من

الطبيبة/ الشيماء محمد عبدالمنعم

المدرس المساعد بقسم الهستولوجيا
كلية الطب- جامعة الفيوم

تحت اشراف

أ.د/ سهير أحمد فوزي

أستاذ الهستولوجيا
كلية الطب - جامعة القاهرة

أ.د/ محمد صلاح الجندي

أستاذ ورئيس قسم الهستولوجيا
كلية الطب - جامعة الفيوم

د. أسماء محمد السيد

مدرس الهستولوجيا
كلية الطب - جامعة الفيوم

كلية الطب - جامعة الفيوم
2019

الملـخص العربي

الميثوتريكسيت هو دواء علاجي كيميائي له تأثيرات سمية كبيرة على أعضاء الجسم ومنها الغدد اللعابية. هدفت هذه الدراسة إلى التحقق من التأثير الوقائي والعلاجي لثمرة البابونج (الكاموميل) مقارنة بالشاي الأخضر على الإصابات الناجمة عن الميثوتريكسيت على الغدد اللعابية الرئيسية لدى ذكور الفئران البيضاء.

أجريت هذه الدراسة على عدد ثمانية وأربعين من ذكور الفئران البيضاء، تم تقسيمها إلى ستة مجموعات تتكون كل منها من ثمانية فئران، وتم تقسيم كل مجموعة إلى مجموعتين فرعيتين بواقع أربعة فئران بكل مجموعة وكان توقيت استخدام الأدوية على النحو التالي:

- **المجموعة الأولى (المجموعة الضابطة):** تم تقسيم هذه المجموعة بالتساوي إلى:
  - **المجموعة الفرعية (١أ):** تلقت هذه المجموعة ١.٦ مل من محلول فسيولوجي (٩, ٪ كلوريد الصوديوم) عن طريق الحقن البريتوني بعد أسبوع واحد (في اليوم الثامن) من بدء التجربة وإعطاء الماء المقطر عن طريق الفم من (اليوم الأول) حتى (اليوم الرابع عشر).
  - **المجموعة الفرعية (١ب):** تلقت تلك المجموعة ١.٦ مل من محلول فسيولوجي (٩, ٪ كلوريد الصوديوم) عن طريق الحقن البريتوني في اليوم الأول من التجربة وإعطاء ماء مقطر عن طريق الفم من (اليوم الثامن) إلى (اليوم الرابع عشر).

- **المجموعة الثانية (المجموعةالمعالجة بالميثوتريكسيت):**تم تقسيم هذه المجموعة أيضًا إلى مجموعتين فرعيتين بالتساوي:
  - **المجموعة الفرعية (٢أ):** تلقت ٤ فئران حقنة واحدة (حقن بريتوني) من ٨٠ مجم / كجم من الميثوتريكسيت الذائبة في محلول ملحي فسيولوجي (٩, ٪ كلوريد الصوديوم) بعد أسبوع واحد (اليوم الثامن) من بدء التجربة مع اعطاء المياه المقطرة من اليوم الأول إلى اليوم الرابع عشر.
  - **المجموعة الفرعية الثانية (٢ب)** : تلقت ٤ فئران حقنة واحدة (حقن بريتوني) من ٨٠ مجم / كجم من الميثوتريكسيت الذائبة في محلول فسيولوجي (٩, ٪ كلوريد الصوديوم) في اليوم الأول من التجربة مع اعطاء المياه المقطرة من اليوم الثامن إلى اليوم الرابع عشر.

- **المجموعة الثالثة (المجموعة المعالجه بالشاي الأخضر):** أعطيت فئران تلك المجموعة جميعها مستخلصا من الشاي الأخضر عن طريق الفم بجرعة مقدارها (٤٠ مجم / كجم / يوم) مذابة في الماء المقطر بواسطة أنبوب معوي داخل المعدة. وتم تقسيم الفئران إلى مجموعتين فرعيتين بالتساوي:
  - **المجموعة الفرعية (٣أ):** تلقت ١.٦ مل من محلول فسيولوجي (٩, ٪ كلوريد الصوديوم) عن طريق الحقن البريتوني في اليوم الثامن من التجربة ، مع بدء إعطاء مستخلص الشاي الأخضر من اليوم الأول إلى اليوم الرابع عشر.

- **المجموعة الفرعية (٣ب):** أعطيت فئران تلك المجموعة ١,٦ مل من محلول فسيولوجي (٩, ٪ كلوريد الصوديوم)عن طر يق الحقن البريتوني في اليوم الأول من التجربة مع البدء في اعطاء مستخلص الشاي الأخضر من اليوم الثامن إلى اليوم الرابع عشر.

- **<u>المجموعة الرابعة (المجموعة المعالجة بمستخلص الكاموميل):</u>** تلقت جميع فئران تلك المجموعة مستخلص الكاموميل عن طريق الفم بواقع جرعة مقدارها (١٠٠ مجم / كجم / يوم) مذابة في ماء مقطر بواسطة أنبوب معوي داخل المعدة. وتلقى كل فأر ٢٠ مجم (١ مل) من خلاصة الكاموميل. تم تقسيم الفئران إلى مجموعتين فرعيتين متساويتين في العدد:
  - **المجموعة الفرعية (٤أ):** أعطيت فئران تلك المجموعة ١,٦ مل من محلول فسيولوجي (٩, ٪ كلوريد الصوديوم) عن طريق الحقن البريتوني في (اليوم الثامن) من بداية التجربة والبدء في إعطاء مستخلص الكاموميل من اليوم الأول إلى اليوم الرابع عشر.
  - **المجموعة الفرعية (٤ب) :** تلقت فئران تلك المجموعة ١,٦ مل من محلول فسيولوجي (٩, ٪ كلوريد الصوديوم) عن طريق الحقن البريتوني في اليوم الأول من التجربة وبدأ إعطاء مستخلص الكاموميل من اليوم الثامن إلى اليوم الرابع عشر.

- **<u>المجموعة الخامسة (المجموعة المعالجة بـ الميثوتريكسيت و الشاي الأخضر):</u>** تلقت جميع فئران تلك المجموعة مستخلص من الشاي الأخضر عن طريق الفم بواقع جرعة مقدارها (٤٠ مجم / كجم / يوم) مذابة في الماء المقطر من خلال أنبوب تغذية داخل المعدة ، وتنقسم هذه المجموعة أيضًا إلى مجموعتين فرعيتين متساويتين في العدد:
  - **المجموعة الفرعية الوقائية (٥أ):** تم حقن تلك المجموعة (حقن بريتوني) بجرعة واحدة ١,٦ مل من الميثوتريكسيت (٨٠ مجم / كجم المذابة في محلول ملحي فسيولوجي ٩, ٪ كلوريد الصوديوم) في اليوم الثامن من التجربة، مع البدء في إعطاء الشاي الأخضر من اليوم الأول إلى اليوم الرابع عشر.
  - **المجموعة الفرعية العلاجية (٥ب):** تم حقن تلك المجموعة (حقن بريتوني) بجرعة واحدة ١,٦ مل من الميثوتريكسيت(٨٠ مجم / كجم المذابه في محلول ملحي فسيولوجي ٩, ٪ كلوريد الصوديوم) في اليوم الأول من التجربة، مع البدء في إعطاء الشاي الأخضر من اليوم الثامن إلى اليوم الرابع عشر.
- **<u>المجموعة السادسة (المجموعة المعالجة بـ الميثوتريكسيت والكاموميل):</u>** تلقت فئران تلك المجموعة جميعها مستخلص الكاموميل عن طريق الفم بواقع جرعة مقدارها (٤٠مجم / كجم / يوم) مذابة في الماء المقطر بواسطة أنبوب معوي داخل المعدة وتنقسم هذه المجموعة أيضًا إلى مجموعتين فرعيتين متساويتين في العدد:
  - **المجموعة الفرعية الوقائية (٦أ):** تم حقن تلك المجموعة (حقن بريتوني) بجرعة واحدة ١,٦ مل من الميثوتريكسيت (٨٠ مجم / كجم المذابه في محلول ملحي فسيولوجي ٩, ٪ كلوريد الصوديوم) في اليوم الثامن من التجربة، مع البدء في إعطاء الكاموميل من اليوم الأول إلى اليوم الرابع عشر.
  - **المجموعة الفرعية العلاجية (٦ب):** تم حقن تلك المجموعة (حقن بريتوني) بجرعة واحدة ١,٦ مل من الميثوتريكسيت (٨٠ مجم / كجم المذابه في محلول ملحي فسيولوجي ٩, ٪ كلوريد الصوديوم) في اليوم الأول من التجربة، مع البدء في إعطاء الكاموميل من اليوم الثامن إلى اليوم الرابع عشر.

تم التضحية بالفئران في جميع المجموعات بعد ١٤يومًا من بدء التجربة واستخراج الغدد اللعابية الرئيسية (الغدة اللعابية تحت الفك و الغدة النكفية و الغدة اللعابية تحت اللسان)، ليتم فحصها من خلال تحضيرقطاعات منها حيث تعرضت للآتي:

١ .صبغة الهيماتوكسيلين والإيوسين.

٢. صبغة المالوري ثلاثي الصبغات.

٣ .الصبغات الهستوكيميائية المناعية لكل من67 KI و Caspase 3

تم إجراء الدراسة القياسية والتحليل الاحصائي للنسبة المئوية لمساحة كل من ألياف الكولاجين والتفاعل المناعي ل Caspase 3 وعدد النواة المناعية الإيجابية ل67 KI .

المجموعة الأولى (المجموعة الضابطة): أظهرت كلتا المجموعتين الفرعيتين أن الغدة اللعابية تحت الفك كانت مرتبطة ارتباطًا وثيقًا بالغدة اللعابية تحت اللسان وتجمعا معًا داخل نسيج ضام واحد. وتتكون من حويصلات مصلية تفصلها مناطق نسيج ضام يحتوي على أوعية دموية وقنوات ناقله مثل (قنوات مقسمه، قنوات حبيبيه ، قنوات مخططة ، قنوات التفريغ) . كما تم الكشف عن التفاعل المناعي لـ 67 KI ولوحظ ظهوره في أنوية عدد قليل من الخلايا المبطنه للحويصلات و القنوات في حين كان التفاعل المناعي ل Caspase 3 سلبيا.

أظهرت الغدة النكفية وجود حويصلات مصلية يتخللها العديد من القنوات ونسيج ضام قليل جدا يحتوي على شعيرات دموية. وتحتوي على العديد من قنوات مثل (قنوات مقسمه و قنوات مخططه و قنوات التفريغ) وجاء التفاعل المناعي لكل من 67 KI و Capase-3 سلبيا.

أظهرت الغدة اللعابية تحت اللسان وجود حويصلات مخاطية يفصلها نسيج ضام قليل جدا. وينتشر العديد من القنوات المخططة وقنوات التفريغ في النسيج الضام بين الحويصلات. ولم تتم ملاحظة وجود قنوات مقسمه بشكل واضح. وأظهرت النتائج وجود تفاعل مناعي لـ 67 KI في أنوية عدد قليل من الخلايا، وأيضا وجود تفاعل مناعي لـ Caspase 3 في سيتوبلازم عدد محدود من الخلايا.

وأظهرت نتائج **المجموعة الثانية (مجموعة الميثوتريكسيت)** ، المجموعة الفرعية ٢أ (بعد أسبوع واحد من حقن الميثوتريكسيت) تأثيرات سمية للخلايا في جميع الغدد (الغدة اللعابية تحت الفك ، الغدة النكفية و الغدة اللعابية تحت اللسان). وأظهرت الغدد اللعابية فقدان التركيب الطبيعي وانخفاض كبير في الحويصلات وقنوات التفريغ. كانت هناك فجوات منتشرة بين الحويصلات كما لوحظ وجود بعض الخلايا ذات السيتوبلازم المفرغ في الحويصلات وقنوات التفريغ بالاضافه الى أنوية قاتمة اللون تحتوى على الكروماتين النووي المكثف. وقد لوحظ اتساع في القناة مع وجود إفرازات راكدة مع وجود تمدد واحتقان في الأوعية الدموية.

وفي المجموعة الفرعية ٢ب ، بعد أسبوعين من حقن الميثوتريكسيت ، أصبحت جميع الظواهر السابقة واضحة مع ظهورأشكال من التسلل الخلوي والخلايا الميتة. وأظهرت كلتا المجموعتين الفرعيتين ٢أ و ٢ب زيادة واضحة في محتوى الكولاجين في الفواصل وحول القنوات. كشفت النتائج عن وجود زيادة ذات دلالة إحصائية في النسبة المئوية لمساحة الكولاجين مقارنة بالمجموعة الضابطة كما وجدت زيادة ذات دلالة إحصائية لدى المجموعة الفرعية ٢ب مقارنة بالمجموعة الفرعية ٢أ في كل من الغدة اللعابية تحت الفك و الغدة النكفية. ظهر التفاعل المناعي ل 67 KI في عدد قليل من أنوية الخلايا العنيبية والخلايا القنوية في كلتا المجموعتين الفرعيتين ٢أ و ٢ب إلا أن ذلك التفاعل لم يكن ذا دلالة احصائية مقارنة مع المجموعة الضابطة. أما بالنسبة لتفاعل Caspase 3 في المجموعة الثانية فقد كشفت كلتا المجموعتين الفرعيتين زيادة ذات دلالة إحصائية مقارنة بالمجموعة الضابطة في جميع الغدد. وكانت الزيادة في موت الخلايا المبرمج في المجموعة الفرعية ٢ب ذات دلالة إحصائية مقارنة مع المجموعة الفرعية ٢أ في جميع الغدد.

كشف فحص العينات المأخوذة من **المجموعة الثالثة** (المعالجه بالشاي الأخضر) **والمجموعة الرابعة** (المعالجه بالكاموميل) نتائج قريبة من العينات الطبيعية للمجموعة الضابطة في جميع الغدد. وأظهرت المجموعتان الثالثة و الرابعة عدم وجود فروق ذات دلالة إحصائية في النسبة المئوية لمساحة الكولاجين مقارنة بالمجموعة الضابطة. وظهر التفاعل المناعي ل KI 67 في عدد قليل من أنوية الخلايا المبطنة للعنيبيات والخلايا القنوية في جميع الغدد في المجموعة الثالثة، ولم يظهر التفاعل في جميع الغدد في المجموعة الرابعة. وكان التفاعل غير دال إحصائيا مقارنة مع المجموعة الضابطة. أما تفاعل Caspase 3 كان ضعيفا في جميع غدد المجموعة الثالثة، ولم يظهر في المجموعة الرابعة. وكان التفاعل غير دال إحصائيا مقارنة مع المجموعة الضابطة.

في **المجموعة الخامسة** (مجموعة الميثوتريكسيت و الشاي الأخضر المختلطة) أظهرت المجموعة الفرعية ٥أ (الوقائيه) تحسنا ملحوظا مقارنة بمجموعة الميثوتريكسيت، واقتصرتاثيرالميثوتريكسيت على عدد قليل من الخلايا المبطنة للحويصلات والخلايا القنوية. وفي المجموعة العلاجية أيضا (المجموعة الفرعية ٥ب) أظهرت جميع الغدد تحسنا واضحا مقارنة مع مجموعة الميثوتريكسيت. وانخفض محتوى الكولاجين بشكل واضح في المجموعة الفرعية ٥أ والمجموعة فرعية ٥ب في جميع الغدد مقارنة بمجموعة الميثوتريكسيت. وكان هذا الانخفاض ذو دلالة إحصائية مقارنة مع مجموعة الميثوتريكسيت بينما لا يوجد فرق ذو دلالة إحصائية في الغدة النكافية مقارنة بالمجموعات الضابطة. كان هناك زيادة في عدد الأنوية الايجابية ل KI 67 في المجموعة الفرعية ٥أ (الوقائية). و كانت هذه الزيادة ذات دلالة إحصائية في الغدة اللعابية تحت الفك مقارنة بالمجموعات الفرعية (٥ب) و(٢ب) والمجموعة الرابعة. بينما أظهرت المجموعة العلاجية (المجموعة الفرعية٥ب) عدد قليل من الخلايا المتكاثرة في جميع الغدد بنسبة ليست ذات دلالة إحصائية مقارنة بالمجموعة الضابطة. بينما شهدت كل من الغدة النكافية والغدة اللعابية تحت الفك انخفاضا ذو دلاله إحصائيه بالنسبة للتفاعل المناعي ل KI 67 مقارنة بالمجموعة الوقائية (المجموعة الفرعية ٥أ) كما أظهرالتفاعل المناعي ل Caspase 3 في المجموعة الوقائية (المجموعة الفرعية ٥أ) انخفاضاً في التفاعل في جميع الغدد ذا دلالة إحصائية مقارنة مع المجموعات الفرعية (٢أ) و (٢ب) في الغدة اللعابية تحت الفك و الغدة النكافية بينما أظهرت الغدة اللعابية تحت اللسان انخفاضا ذو دلاله احصائيه مقارنة بالمجموعة الفرعية (٢أ) فقط. كذلك أظهرت المجموعة العلاجية (المجموعة الفرعية ٥ب) انخفاضا في النسبة المئوية لمساحة Caspase 3 ذو دلالة إحصائية مقارنة مع المجموعة الفرعية (٢أ) والمجموعة (٢ب) في الغدة اللعابية تحت الفك ، و كان الانخفاض أيضا ذو دلاله احصائيه في الغدة النكافية و الغدة اللعابية تحت اللسان مقارنة بالمجموعة الفرعية (٢ب). وكانت التفاعلات في جميع الغدد لكلتا المجموعتين الفرعيتين ذات دلالة إحصائية مقارنة مع المجموعة الضابطة، والمجموعة الثالثة (الشاي الأخضر) والمجموعة الرابعة (الكاموميل). وكان التفاعل الخاص بالغدة اللعابية تحت الفك و الغدة النكافية بالمجموعة العلاجية ذو دلالة إحصائية مقارنة بالمجموعة الوقائية.

أما في **المجموعة السادسة** (مجموعة الميثوتريكسيت والكاموميل المختلطة)، أظهرت المجموعة الفرعية الوقائية (٦أ) تحسنا واضحا مع انخفاض عدد الأوعية الدموية المتمدده والمحتقنه ، ووجد عدد قليل من الخلايا الحويصلية المتحللة في الغدة اللعابية تحت الفك، الغدة النكفية والغدة اللعابية تحت اللسان مقارنة بمجموعة الميثوتريكسيت. وفي المجموعة العلاجية (المجموعة الفرعية ٦ب) أظهرت جميع الغدد تحسنا واضحا مع انخفاض نسبة الفجوات السيتوبلازمية واحتقان الأوعية الدموية مقارنة بمجموعة الميثوتريكسيت.

وفي المجموعة الوقائية ، (المجموعة الفرعية ٦أ) ، أظهرت الغدة اللعابية تحت الفك ، الغدة النكفية و الغدة اللعابية تحت اللسان إنخفاضا في النسبة المئوية لمساحة الكولاجين في العينات المصبوغة بالمالوري ثلاثي الصبغات. وكان هذا الانخفاض ذو دلالة إحصائية في الغدة اللعابية تحت الفك و الغدة اللعابية تحت اللسان مقارنة بمجموعة الميثوتريكسيت ، بينما كان الانخفاض بالنسبة للغدة النكفية في النسبة المئوية لمساحة الكولاجين ذو دلالة إحصائية مقارنة بالمجموعة الفرعية ٢ب ولكن لا يوجد دلاله إحصائيه مقارنة مع المجموعة الفرعية ٢أ. وأيضا أظهرت جميع الغدد في المجموعة الفرعية العلاجية (٦ب) انخفاضا في النسبة المئوية لمساحة الكولاجين بشكل ذو دلاله إحصائيه في الغدة اللعابية تحت الفك بالمقارنة مع المجموعة الفرعية ٢ب، وذو دلالة إحصائية عالية في الغدة النكفية و الغدة اللعابية تحت اللسان مقارنة بكلتا المجموعتين الفرعيتين ٢أ و ٢ب.كما أظهرت

الغدة اللعابية تحت الفك في المجموعة الوقائية و الغدد الغدة اللعابية تحت اللسان في المجموعات الوقائية والعلاجية زيادة ذات دلالة إحصائية مقارنة بالمجموعة الضابطة والمجموعه الثالثة (الشاي الأخضر) والمجموعه الرابعة (الكاموميل). وأظهر أيضا التفاعل المناعي ل KI 67 زيادة ملحوظه وكانت بشكل رئيسي في خلايا التفريغ للغدة اللعابية تحت الفك ، الغدة النكفية و الغدة اللعابية تحت اللسان في كلتا المجموعتين الفرعيتين٦أ و٦ب و كانت هذه الزيادة ذات دلالة إحصائية عالية في الغدة النكفية من المجموعة الوقائية مقارنة بالمجموعة الضابطة ،الميثوتريكسيت ٢أ و ٢ب والمجموعة الثالثة (الشاي الأخضر) والمجموعة الرابعة (الكاموميل)، والمجموعة الفرعية ٥ب .اما الزياده في الغده النكفيه في المجموعة العلاجيةفكانت ذو دلاله احصائيه مقارنة مع المجموعة الضابطة والمجموعة الرابعة والمجموعة الفرعية ٢أ وكل من المجموعات الفرعية ٥أ و ٥ب. وأظهر التفاعل المناعي ل Caspase 3 في كل من المجموعة الفرعية ٦أ و ٦ب انخفاضا في موت الخلايا المبرمج في جميع الغدد مقارنة بمجموعة الميثوتريكسيت. وكان هذا الانخفاض ذو دلالة إحصائية عالية في الغدة اللعابية تحت الفك و الغدة النكفية لكل من المجموعات الفرعية ٦أ و ٦ب مقارنة بالمجموعة الفرعيه ٢أ و ٢ب .بينما كان هذا الانخفاض في الغده اللعابيه تحت اللسان في كلا من المجموعه الفرعيه ٦أ و ٦ب ذو دلاله إحصائيه مقارنة بالمجموعة الفرعية ٢ب.

الخلاصة:

يعد الميثوتريكسيت (دواء العلاج الكيميائي) ، له تأثير سام على الغدد اللعابية.

الشاي الأخضر له تأثير وقائي ضد هذه التأثيرات السامة للخلايا واستخدامه للوقاية (قبل حقن الميثوتريكسيت) أكثر فعالية من استخدامه كعلاج (بعد حقن الميثوتريكسيت).

ثبت أيضا أن الكاموميل له تأثير وقائي ضد هذه التأثيرات السامة للخلايا حيث أنه يقلل من تليف وموت الخلايا المبرمج مع زيادة تكاثر الخلايا وتجديدها بشكل رئيسي في الغدة النكفية. ولوحظ نفس التأثيرات الى حد كبيرعند استخدامها سواء كوقائي أو علاجي واستخدامها كعلاجي أكثر فعالية الى حد ما من الشاي الأخضر.

التوصيات:

١- لا يوصي باستخدام الميثوتريكسيت في المرضي الذين يعانون من التهاب الغشاء المخاطي بالفم وأمراض الغدد اللعابية حيث انه يؤدي الي زيادة هذه المشاكل.

٢- يمكن استخدام الشاي الأخضروالكاموميل للوقاية من الاثار الضارة الناتجة عن استخدام الميثوتريكسيت بأمان وذلك لكونهما من المنتجات الطبيعية بدون اثار جانبية قوية دون الحاجة لاحتياطات كثيرة قبل استخدامهما بالاضافة لسهولة وتنوع طرق تناولهما في اكثر من صورة.

٣- يجب عمل المزيد من الأبحاث عن امكانية وامان استخدام الشاي الأخضر والكاموميل للوقاية والعلاج من التأثيرات السامة والضارة للميثوتريكسيت في البشر.