

دراسة هستولوجية ومناعية عن تأثير اعشاب استراجلس ممبرينيشيس و الخلايا الجذعية المشتقة من الأنسجة الدهنية في علاج تليف الكبد المستحدث بعقار ثيواسيتاميد في ذكور الجرذان البيضاء

رسالة توطئه للحصول على درجة الدكتوراه في علم الانسجة

مقدمة من

الطبيبة / ماريهام جورج لوقا يعقوب

مدرس مساعد بقسم هستولوجيا

كلية الطب – جامعة الفيوم

تحت إشراف

أ.د. سهام عبد الحميد القلعاوي

أستاذ هستولوجيا - كلية الطب

جامعة القاهرة

أ.د. محمد صلاح الجندي

أستاذ ورئيس قسم هستولوجيا - كلية الطب

جامعة الفيوم

د. عبير ابراهيم عبد اللاه

استاذ مساعد هستولوجيا

كلية الطب – جامعة القاهرة

أ.د. ليلى احمد راشد

أستاذ الكيمياء العضوية - كلية الطب

جامعة القاهرة

قسم هستولوجيا

كلية الطب – جامعة الفيوم

٢٠١٩

المخلص العربي

يعتبر الكبد أحد أهم الأعضاء في جسم الإنسان حيث يتحكم في توازن الجسم عن طريق التمثيل الغذائي للدهون والكربوهيدرات والبروتينات. ويؤدي تليف الكبد إلى تراكم للبروتينات خارج الخلية وخاصة الكولاجين وهو ما يحدث في معظم أنواع أمراض الكبد المزمنة. وتلعب الخلايا النجمية في الكبد دوراً هاماً في إحداث تليف الكبد. وقد أجريت العديد من الأبحاث على الخلايا الجذعية ووجد أنها قد تمثل مستقبلاً واعداً لعلاج الكثير من الأمراض المستعصية مثل الأمراض الإنتكاسية التحليلية والأمراض المناعية ولهذا فمن الممكن أن يكون له دور مستقبلي في علاج تليف الكبد بدرجاته المختلفة. وهو ما يعزى إلى قدرة هذه الخلايا العالية على التشكل والتطور وإعادة ضبط الخصائص المناعية. الاسترجاع هو واحد من الأعشاب الصينية الطبية التي قيل أنها قادرة على حماية الكبد، وتنظيم وظائفه، وتحسين الدورة الدموية، وإصلاح تلف خلايا الكبد وتخفيف أعراض أمراض الكبد.

هدفت هذه الدراسة إلى مقارنة تأثير الاسترجاع كعشبة طبية صينية تقليدية مقابل الخلايا الجذعية البسيطة المفصولة من الأنسجة الدهنية للجرذان وتجربتها على كبد جرذان متليفة ناتجة عن عقار (يوسيتاميد).

تم استخدام أربعة وخمسين من ذكور الجرذان البيضاء في هذا البحث وتقسيمهم إلى ثلاث مجموعات رئيسية موزعة لمجموعات فرعية كما يلي:

المجموعة الأولى: (الضابطة): تتألف من ١٨ جرذاناً وتم تقسيم هذه المجموعة أيضاً إلى ٦ مجموعات فرعية بكل واحدة ٣ جرذان:

١- **المجموعة الفرعية (أ):** تم حقن كل جرذ في الغشاء البيريتوني (IP) ماء مقطر معقم ١ مليليتراً ثلاث مرات أسبوعياً لمدة أربعة أسابيع.

٢- **المجموعة الفرعية (ب):** تم حقن كل جرذ في الغشاء البيريتوني من الماء المقطر المعقم ١ مليليتراً ثلاث مرات أسبوعياً لمدة ثمانية أسابيع.

٣- **المجموعة الفرعية (ج):** تم تحضير الجرذان كما في المجموعة الفرعية (ب) وإعطاؤهم جرعة ١ مليليتراً فموية من محلول ملحي يومياً عبر أنبوب المعدة بدءاً من الأسبوع الخامس (اليوم ٢٩) حتى نهاية الأسبوع الثامن.

٤- **المجموعة الفرعية (د):** تم تحضير الجرذان كما في المجموعة الفرعية (ب) وفي بداية الأسبوع الخامس (اليوم ٢٩) وتم حقن كل جرذ في الغشاء البيريتوني ١ مليليتراً محلول ملحي.

٥- **المجموعة الفرعية (هـ):** تم إعداد كل جرذ كما هو الحال في المجموعة الفرعية (ب)، ثم تلقى جرعة (٥٠٠ مجم/ كجم) واحدة يومية عن طريق الفم من عشبة الاستراجلس الذائبة في ١ ملليلتر من المحلول الملحي بإستخدام أنبوب المعدة في بداية الاسبوع الخامس (اليوم ٢٩) وحتى نهاية الاسبوع الثامن.

٦. **المجموعة الفرعية (و):** تم إعداد كل جرذ كما هو الحال في المجموعة الفرعية (ب)، ثم الحقن في الغشاء البيريتوني الخلايا الجذعية الوسيطة و المستخلصة من النسيج الدهني من الجرذان المحمله بمادة PKH26 ($10^6 \times 3$ خلية/ جرذ في ١ ملليلتر من المحلول الملحي) في بداية الاسبوع الخامس (اليوم ٢٩).

* **المجموعة الثانية: (مجموعة ثيواسيتاميد الغير معالج):** تتكون من ١٦ جرذًا، تم تقسيمها إلى مجموعتين فرعيتين، ٨ جرذان لكل منهما:

١- **المجموعة الفرعية الثانية (أ):** تم الحقن في الغشاء البيريتوني بـ ٢٠٠ مجم/ كجم من مادة ثيواسيتاميد الذائبة في ١ ملليلتر من الماء المقطر المعقم لكل جرذ، ثلاث مرات أسبوعيا لمدة ٤ أسابيع فقط.

٢- **المجموعة الفرعية الثانية (ب):** تم الحقن في الغشاء البيريتوني بـ ٢٠٠ مجم/ كجم من مادة ثيواسيتاميد الذائبة في ١ ملليلتر من الماء المقطر المعقم لكل جرذ، ثلاث مرات أسبوعيا لمدة ٨ أسابيع.

* **المجموعة الثالثة (المجموعة المعالجة):** تتكون من ٢٠ جرذًا. تم تقسيمهم إلى مجموعتين فرعيتين ١٠ فئران لكل منهما:

١- **المجموعة الفرعية الثالثة (أ) (المجموعة المعالجة بمادة الاستراجلس):**

عولجت الجرذان على النحو الوارد في المجموعة الفرعية الثانية (ب). بالإضافة إلى ذلك تلقى كل جرذ جرعة يومية واحدة عن طريق الفم (٥٠٠ مجم / كجم) من مادة الاستراجلس الذائبة في ١ ملليلتر من المحلول الملحي لكل جرذ بإستخدام أنبوب المعدة في بداية الاسبوع الخامس (اليوم ٢٩) حتى نهاية الاسبوع الثامن.

٢- **المجموعة الفرعية الثالثة (ب) (المجموعة الفرعية المعالجة بالخلايا الجذعية):**

عولجت الجرذان على النحو الوارد في المجموعة الفرعية الثانية (ب). بالإضافة إلى ذلك تم الحقن في الغشاء البيريتوني بالخلايا الجذعية الوسيطة و المستخلصة من النسيج الدهني من الجرذان المحمله بمادة PKH26 ($10^6 \times 3$ خلية/ جرذ في ١ ملليلتر محلول ملحي) في بداية الاسبوع الخامس (اليوم ٢٩).

تمت التضحية بحيوانات جميع المجموعات الفرعية في نهاية الأسبوع الثامن بإستثناء المجموعات الفرعية الأولى (أ) والثانية (أ) تم التضحية بهم في بداية الأسبوع الخامس (اليوم ٢٩).

تم إجراء التحليل البيوكيميائي لكل من الترانساميناسات و (الزلال) و (بروكولاجين) و أجري تقييم مورفومتري لتقدير النسبة المئوية من (الكولاجين) و α -SMA و NF- κ B في الصبغات المناعية. وتم إجراء التحليل الإحصائي للدراسات البيوكيميائية والقياسات المورفومترية.

في هذه الدراسة أظهرت المجموعة الأولى (المجموعة الضابطة) التكوين الكبدي الطبيعي التي تبدو فيها الخلايا الكبدية و كأنها تشع من الأوردة الكبدية المركزية لفصيصات الكبد والمناطق البابية الطبيعية موجودة على أطراف هذه الفصيصات. و وجدت كمية ضئيلة من الكولاجين فقط حول الأوردة الكبدية المركزية وفي المناطق البابية.

ووجد تفاعل مناعي لـ α -SMA في أوساط الأوردة الكبدية المركزية، وأوعية المناطق البابية. وأظهرت NF- κ B تفاعل مناعي سلبي في أجزاء مصبوعة بها.

أظهرت صبغة (مالوري) ثلاثية الألوان في المجموعة الفرعية الثانية (أ) التي تلقت ثيواسيتاميد لمدة ٤ أسابيع أنسجة متضخمة مع تسلل خلوي إتهابي بين الفصيصات الكبدية. ووجد خلل في فصيصات التكوين الكبدي واحتقان ملحوظ في الأوردة الكبدية المركزية وتمدد في فروع الأوردة البابية. وظهر أن بعض الخلايا الكبدية لها "سيتوبلازم أسيدوفيلي" ونوي حويصلية دائرية مركزية مع نويات بارزة، في حين وجدت أنوية أخرى كثيفة داكنة. ووجد أدنى كميات من ألياف الكولاجين في النسيج الضام الحاجز بين الفصيصات الكبدية، حول الوريد الكبدي المركزي وفروع الوريد البابي والجيوب الدموية. و تفاعل مناعي إيجابي لـ α -SMA في الخلايا الكبدية النجمية (HSCs) التي ظهرت كخلايا متفرعة نجمية مع فروع دقيقة متعددة تمتد بين الفصيصات الكبدية، وحول الوريد الكبدي المركزي وفروع الوريد البابي وبين الخلايا الكبدية. وتفاعل مناعي إيجابي لـ NF- κ B قليل في سيتوبلازم الخلايا الكبدية، وتفاعل مناعي سلبي في الخلايا الإتهابية حول الوريد الكبدي المركزي وحول فروع الوريد البابي.

أظهرت صبغة (مالوري) ثلاثية الألوان في المجموعة الفرعية الثانية (ب) التي تلقت ثيواسيتاميد لمدة ٨ أسابيع تضخم الحواجز الليفية بين الفصيصات الكبدية وأوتار الخلايا الكبدية التي تشع من الوريد الكبدي المركزي وتمدد في الوريد الكبدي المركزي والجيوب الدموية فضلاً عن فروع الوريد البابي التي كانت محتقنة أيضاً. وأظهرت بعض خلايا الكبد تجايف في السيتوبلازم ووجدت أنوية أخرى غليظة. ووجد زيادة ملحوظة في ألياف الكولاجين في الحاجز بين الفصيصات الكبدية، حول الوريد الكبدي المركزي والمسالك البينية وبين الخلايا الكبدية. α -SMA الخلايا المناعية (خلايا نجمية متفرعة) تمتد بين الفصيصات الكبدية، وحول الوريد الكبدي المركزي وفروع الوريد البابي في المناطق الداخلية. وتفاعل مناعي إيجابي

سيتوبلازمي لـ NF-κB في خلايا الكبد، والخلايا الإلتهابية حول الوريد الكبدي المركزي وحول فروع الوريد البابي.

المجموعة الفرعية الثالثة (أ) (المجموعة الفرعية المعالجة بمادة استراجلس):

أظهرت صبغة (مالوري) ثلاثية الألوان اضطراب محدد في الأجزاء المصبوغة من الخلايا الكبدية التي كانت طبيعية تقريباً مع "سيتوبلازم أسيدوفيلي" ونواة حويصلية دائرية مركزية مع النويات البارزة. وبعض الخلايا الكبدية كانت تحتوي على اثنين من الأنوية. وقد ظهر أن الوريد الكبدي والوريد البابي ممددان مع بعض الإحتقان. وكان هناك تسلل خلوي إتهابي حول شعب الوريد البابي وأدنى كميات من الكولاجين في النسيج الضام الحاجز بين الفصيصات الكبدية و حول الوريد الكبدي المركزي في المناطق البابية وبين الخلايا الكبدية. وأدنى تفاعل مناعي إيجابي لـ α-SMA في جدران الأوعية البابية والوريد الكبدي المركزي وتفاعل مناعي إيجابي لـ NF-κB في سيتوبلازم خلايا الكبد المتعددة حول الوريد الكبدي المركزي. وحول فروع الوريد البابي، وتفاعل مناعي سلبي في الخلايا الإلتهابية.

المجموعة الفرعية الثالثة (ب) (المجموعة الفرعية المعالجة بالخلايا الجذعية):

أظهرت الخلايا الجذعية الوسيطة المحمله بمادة PKH26 التي شوهدت بواسطة مجهر الفلورسنت. وكشفت أيضاً عن ظهور أوتار الخلايا الكبدية في الفصيصات و التي بدت طبيعية تقريباً (مع "سيتوبلازم أسيدوفيلي" ونواة حويصلية دائرية مركزية مع النويات البارزة) وبعض الخلايا الكبدية كانت تحتوي على اثنين من النوى. ووجد تمدد خفيف واحتقان طفيف في الأوردة الكبدية المركزية وفروع الوريد البابي و أدنى كميات من الكولاجين في النسيج الضام الحاجز بين الفصيصات الكبدية و حول الوريد الكبدي المركزي و في المناطق البابية وبين الخلايا الكبدية التي تمت ملاحظتها في صبغة (مالوري) ثلاثية الألوان. وتفاعل مناعي لـ α-SMA ظهر فقط في جدار الوريد الكبدي المركزي وفي فرع الوريد البابي. وتفاعلات مناعية إيجابية سيتوبلازمية لـ NF-κB في عدد قليل من الخلايا الكبدية حول الوريد الكبدي المركزي وتفاعل سلبي في الخلايا الإلتهابية وفي خلايا الكبد حول فروع الوريد البابي.

أظهرت المجموعة الفرعية الثانية (أ) في صبغة (مالوري) ثلاثية الألوان زيادة كبيرة في مستوى

المصل من البروكولاجين ، ومتوسط مساحة % من ألياف كولاجينية و متوسط مساحة % α-SMA، متوسط مساحة % من NF-κB ، ومستويات المصل الترانساميناسات و إنخفاض ملحوظ في الزلال مقارنة بالمجموعة الضابطة. وأظهرت المجموعة الفرعية الثانية (ب) نفس النتائج بالمقارنة مع مجموعة الضابطة والمجموعة الفرعية الثانية (أ). وأظهرت المجموعة الفرعية الثالثة (أ) إنخفاضاً ملحوظاً في مستوى البلازما من (الترانساميناسات) والبروكولاجين متوسط مساحة % من الكولاجين و α-SMA و NF-κB، وزيادة ملحوظة في مستوى (الزلال) عند مقارنتها بالمجموعات الفرعية الثانية (أ) والثانية (ب) التليفية الغير

مع الجة، وأخيراً أظهرت المجموعة الفرعية الثالثة (ب) انخفاضاً ملحوظاً في مستوى البلازما من
الترانساميناسات البروكولاجين، و متوسط مساحة % من الكولاجين و α -SMA و NF- κ B، وزيادة
محوظة في مستوى (الزلال) عند مقارنتها بالمجموعات الفرعية الثانية (أ) والثانية (ب) والثالثة (أ)

الخلاصة و التوصيات:

الخلايا الجذعية لها تأثير جزئي على تحسين تليف الكبد في الجرذان الناجم عن الثيواسيتاميدو
إضح أنه كان أفضل من الأستراجالس الذي وجدت لديه القدرة على مقاومة ترسب الكولاجين وأيضاً لديه
صائص مضادة للالتهابات كمضاد للأكسدة. لكن الخلايا الجذعية أكثر فعالية من الأستراجالس حيث أنه
تشب يحتاج إلى مدة أطول لإظهار نفس التأثير.

التوصيات:

- قد يصبح من الممكن استخدام العلاج بالخلايا الجذعية في علاج تليف الكبد للحث على الشفاء
السريع وتقصير فترة المعاناة لهؤلاء المرضى.
- نحتاج إلى المزيد من الدراسات لتحديد الفترة المثلى من الوقت للحصول على الشفاء الكامل عن
طريق العلاج بالأستراجالس أو الخلايا الجذعية.
- مطلوب مزيد من الدراسات لتحديد مدى فعالية الجمع بين الخلايا الجذعية والأستراجالس في
علاج أمراض الكبد.
- هناك حاجة إلى مزيد من البحوث لتقييم سلامة الإستخدام على المدى الطويل من الأستراجالس
والعلاج بالخلايا الجذعية في التهاب الكبد المزمن.
- ستكون هناك حاجة لمزيد من الدراسات لتوجيه الخلايا الجذعية من الدورة الدموية إلى مناطق
الإصابة وكيفية توجيهها وتمييزها بمجرد وصول الخلايا إلى النسيج المستهدف.