قسم الكيمياء الحيوية
كلية الصيدلة
جامعة الزقازيق

دراسة كيميائية حيوية لتأثير الخلايا الجذعية المتعلقة باللُحمة المتوسطة المشتقة من نخاع العظم على الشفاء من التليف الكبدى المستحدث فى الجرذان

رسالة مقدمة كمتطلب جزئى لإستيفاء الحصول على درجة دكتوراة الفلسفة فى العلوم الصيدلية

(كيمياء حيوية)

من

أمل محمد حسنى خانم

صيدلانية بمستشفيات جامعة الزقازيق

ماجيستير العلوم الصيدلية (كيمياء حيوية)- كلية الصيدلة- جامعة الزقازيق (٢٠١١)

لجنة الإشراف العلمى

أ.د. هدى السيد محمد

أستاذ و رئيس قسم الكيمياء الحيوية

كلية الصيدلة – جامعة الزقازيق

أ.د. سحر السيد السويفى

أستاذ الكيمياء الحيوية

وكيل الكلية لشئون تنمية البيئة و خدمة المجتمع

كلية الصيدلة جامعة- الزقازيق

أ.د.ليلى أحمد راشد

أستاذ الكيمياء الحيوية

كلية الطب- جامعة القاهرة

د. نهله نبيل يونس

مدرس الكيمياء الحيوية

كلية الصيدلة - جامعة الزقازيق

٢٠١٦م

الملخص العربى

الإنسداد الصَفراوي هو أحد أنواع أمراض الكبد المزمنه و ينتج عن خلل فى إنتاج أو إفراز سائل المَرارة من الكبد ويؤدى هذا الخلل الى إرتفاع مستويات البيليروبين المباشر/ المذاب داخل خلايا الكبد و في الدم، و كذلك إرتفاع مستويات المواد الناتجة عن التحليل، كأملاح المرارة والكوليسترول و غيرها مما يؤدى الى التليف الكبدي. إستخدمت الكثير من الدراسات على الجرذان عملية ربط القناة المرارية لإستحداث مرض الإنسداد الصفراوى الكبدى عن طريق إنسداد القناه المرارية و ما يصاحبها من تليف كبدى نتيجة إعاقة إفراز الصفراء و إرتجاع العصارة إلى الكبد.

تُعد الخلايا الجذعية المتعلقة باللُحمة المتوسطة المشتقة من نخاع العظم أكثر أنواع الخلايا الجذعية إستخداماً فى الدراسات المعملية والسريرية لعلاج أمراض تليف الكبد. فبالإضافه إلى قدرة هذه الخلايا على التميز الى أنسجة متعلقة باللُحمة المتوسطة فهى أيضاً لديها القدرة على التميز إلى خلايا كبدية ولذا عند حقن الخلايا فى الجرذان فإنها تتجه مباشرة إلى الأنسجة المصابة و تشارك فى عملية التجدد فى الخلايا.

السيليمارين و هو إحدى الفلافونيدات الموجودة في أنواع معينة من الخرشوف و قد أُستخدم فى كثير من الأبحاث لعلاج أمراض الكبد حيث أنه مضاد طبيعى للأكسدة و للإلتهابات و أيضا يمنع التليف الكبدى.

إستهدفت الدراسه الحاليه ما يلى :

١- إستكشاف التغيرات فى وظائف الكبد وتراكم الكولاجين والتوتر المؤكسد التى تصاحب التليف الكبدى الناتج عن ربط القناه المرارية المستمر لمدة عشرة أسابيع فى جرذان التجارب.

٢- بحث التأثير الخلوى والجزيئى لخلايا الجذعية المتعلقة باللُحمة المتوسطة المشتقة من نخاع العظم فى تراجع التليف الكبدى و زيادة التجدد فى خلايا الكبد فى نموذجين مختلفين فى التدرج فى التليف الكبدى و هما تليف كبدى من الدرجة الثالثة و الدرجة الرابعة

٣- مقارنة التأثيرالمستفاد من العلاج بالخلايا الجذعية المتعلقة باللُحمة المتوسطة المشتقة من نخاع العظم مع تأثيرعلاج مرجعى و هو السيليمارين.

و لتحقيق هذه الأهداف فقد تم قياس المؤشرات التالية:

١- إختبارات وظائف الكبد: قياس نشاط إنزيمات الألانين ترانس أمينيز و الإسبارتات ترانس أمينيز و مستوى الألبيومين و مجموع البليروبين فى مصل الدم.
٢- العوامل المرتبطة بالتليف الكبدى: محتوى الكبد من الهيدروكسى برولين، مستوى عامل النمو المتحول بيتا-١ فى مصل الدم، التعبير الجينى لكل من ماتريكس ميتالو بروتينيز-٢ و المانع النسيجى للميتالو بروتينيز-١ والنسبة بينهما.
٣- العوامل المرتبطة بالتجدد فى أنسجة الكبد: المستوى الكبدى لعامل نمو الخلايا الكبدية و التعبير الجينى لسيتوكيراتين-١٩.
٤- عوامل التوتر المؤكسد: المستوى الكبدى للجلوتاثيون المختزل و المالونداى الدهيد.

الفحص المستولوجى:

تم إجراء دراسه هستولوجيه على عينات من أنسجة الكبد بإستخدام الصبغات الآتية:
١- الهيماتوكسيلين و الإيوسين و السايرس ريد ثم تم إجراء تحليل مورفوميترى للنتائج.
٢- صبغه مناعية لبروتين ألفا أكتين للعضلات الملساء ثم تم إجراء تحليل مورفوميترى للنتائج.

التصميم التجريبى :

إستحداث التليف الكبدى

تم تخدير الجرذان كلياً و ربط القناة المرارية. تم تمييز القناة المرارية وعمل عقدتين رابطتين وفى المجموعة الضابطة تم كشف القناة المرارية دون ربطها قبل غلق الجرح البطنى.

تم القيام بدراسة تمهيدية لتقدير درجة التليف الكبدى و إمتداد النخر فى الخلايا الكبدية بعد القيام بربط القناة المرارية. و قد تم سحب عينات من الدم و الأنسجة من الجرذان بعد الجراحة بأسبوع و إثنان و أربعة و ستة و ثمانية و عشرة أسابيع.

- على ضوء نتائج هذة الدراسة التمهيدية، تم تحديد التليف الكبدى من الدرجة الثالثة و الدرجة الرابعة (تحديد هذا التدرج عن طريق مجموع نقاط ميتافير) و إختيارهم ليكونو نقط بداية للعلاج و على هذا الأساس تم تقسيم المجموعات التجريبية كما يلى:

- **المجموعة (١) :** المجموعة الضابطة (ن=١٠)
- **المجموعة (٢) :** المجموعة المصابة بالتليف الكبدى من الدرجة الثالثة والتى تم تقسيمها الى ثلاث مجموعات فرعية:

أ) مجموعة ضابطة للتليف الكبدى من الدرجة الثالثة (G3F): و تشمل مجموعة الجرذان التى تم إجراء جراحة ربط القناة المرارية لها و لم تأخذ أى علاج لمدة ثمانية أسابيع (ن=٢٠).

ب) مجموعة تم علاجها بالخلايا الجذعية المشتقة من نخاع العظم : وقد تم حقنها بالخلايا عن طريق الوريد الذيلى بجرعة ٣ ملايين خلية / للجرذ الواحد مرة واحدة بعد الجراحة بأربع اسابيع وترك الجرذان أربع أسابيع (ن=٢٠).

ج) مجموعة تم علاجها بالسيليمارين : وقد تم إعطائها سيليمارين عن طريق الفم بجرعة ١٠٠ملليجم/كجم /يوم إبتداء من الإسبوع الرابع بعد الجراحة و لمدة أربع أسابيع(ن=٢٠).

- **المجموعة (٣) :** المجموعة المصابة بالتليف الكبدى من الدرجة الرابعة والتى تم تقسيمها الى ثلاث مجموعات فرعية:

أ) مجموعة حاكمة للتليف الكبدى من الدرجة الرابعة (G4F): و تشمل مجموعة الجرذان التى تم إجراء جراحة ربط القناة المرارية لها و لم تأخذ أى علاج لمدة عشرة اسابيع (ن=٢٠).

ب) مجموعة تم علاجها بالخلايا الجذعية المشتقة من نخاع العظم : وقد تم حقنها بالخلايا عن طريق الوريد الذيلى بجرعة ٣ ملايين خلية / للجرذ الواحد مرة واحدة بعد الجراحة بستة اسابيع وترك الجرذان أربع أسابيع (ن=٢٠).

ج) مجموعة تم علاجها بالسيليمارين : وقد تم إعطائها سيليمارين عن طريق الفم بجرعة ١٠٠ملليجم/كجم /يوم إبتداء من الإسبوع الرابع بعد الجراحة و لمدة أربع أسابيع(ن=٢٠).

و قد أظهرت الدراسة النتائج التالية :

<u>أولاً</u> : نتائج التجربة التمهيدية: أوضحت الدراسة أن عملية ربط القناة المرارية قد أحدثت زيادة ذات دلالة إحصائيه فى وظائف و إنزيمات الكبد ثم بدأت هذهالزيادة فى التناقص بدءاً من الإسبوع السادس و الثامن الذى يلى الجراحة لكن ظلت الزيادة ذات دلالة إحصائيه بالمقارنه بالمجموعة الضابطة.

أظهرت الدراسة زيادة فى المحتوى الكبدى من الهيدروكسى برولين حتى نهاية التجربة فى الإسبوع العاشر بعد الجراحة و نسبة منطقة التليف المحسوبة بإستخدام صبغة السايرس ريد هذا بالاضافة الى زيادة فى تراكم الكولاجين حتى يصل إلى أعلى مستوياته فى الإسبوع العاشر من الجراحة. كما أدى ربط القناة المرارية الى إستنفاذ المستوى الكبدى للجلوتاثيون المختزل و زيادة مستوى المالوندای الدهيد فى الإسبوع الثانى و الرابع من الجراحة مقارنةً بالمجموعة الضابطة

ثانياً : نتائج ربط القناة المرارية فى مجموعتي التليف الكبدى من الدرجة الثالثة والرابعة:

أظهرت الدراسة زيادة فى نشاط إنزيمات الألانين والاسبارتات ترانس امينيز و مستوى مجموع البليروبين مع إنخفاض فى مستوى الالبيومين فى الدم. كما أحدث إنخفاض شديد فى المستوى الكبدى للجلوتاثيون المختزل و زيادة فى مستوى المالوندای الدهيد مع زيادة ملحوظة فى المحتوى الكبدى من الهيدروكسى برولين ومستوى عامل النمو المتحول بيتا-١ فى مصل الدم ذلك بالمقارنة بالمجموعة الضابطة. كما إزداد التعبير الجينى لكل من المانع النسيجى للميتاللو بروتينيز- ١ و لسيتوكيراتين-١٩ مع إنخفاض التعبير الجينى ماتريكس ميتاللو بروتينيز-٢ النسبة بينهما.هذا بالإضافة الى إنخفاض فى المستوى الكبدى لعامل نمو الخلايا الكبدية.

أظهر الفحص الهستولوجى لإنسجة الكبد زيادة كبيرة فى إلتهاب و إحتقان الأوعية الدموية فى مجموعات التليف الكبدى من الدرجة الثالثة و الرابعه مصحوباً بزيادة فى تراكم الكولاجين و التليف و النسبه الإيجابية للالفا أكتين للعضلات الملساء و ذلك بالمقارنة بالمجموعة الضابطة.

ثالثاً: العلاج بالخلايا الجذعية المتعلقة باللُحمة المتوسطة المشتقة من نخاع العظم:

أظهرت الدراسة تحسن فى وظائف الكبد المرتفعة فى مجموعات التليف الكبدى عن طريق إنقاص نسبة التليف و المحتوى الكبدى من الهيدروكسى برولين و زيادة التعبير الجينى للماتريكس ميتاللو بروتينيز-٢ مع خفض التعبير الجينى لكل من المانع النسيجى للميتاللو بروتينيز- ١ و لسيتوكيراتين-١٩ و مستوى عامل النمو المتحول بيتا-١ فى مصل الدم و قد صاحب ذلك إرتفاع فى المستوى الكبدى لعامل نمو الخلايا الكبدية. أكدت نتائج الفحص

الهستولوجى أن العلاج بالخلايا الجذعية قد أدى إلى خفض نسبة الإحتقان و الإلتهاب و كذلك إنحسار نسبة مساحة التليف و النسبه الإيجابية للألفا أكتين للعضلات الملساء فى مجموعة التليف الكبدى من الدرجة الثالثة و بدرجة أقل فى مجموعة التليف الكبدى من الدرجة الرابعة.

رابعاً: العلاج بالسيليمارين:

أدى تناول السيليمارين الى تحسن وظائف الكبد متمثلة فى خفض النشاط الإنزيمى للأسبارتات ترانس امينيز و تقليل مستوى البليروبين فى الدم مع رفع مستوى الالبيومين إلا أنه لم يحدث أى تحسن ذو دلالة إحصائية فى المستوى الكبدى للجلوتاثيون المختزل و أيضاً مستوى المالوندای الدهيد . كما أظهرت الدراسة إنخفاض فى المحتوى الكبدى للهيدروكسى برولين و التعبير الجينى للمانع النسيجى للميتاللو بروتينيز- ١ و لسيتوكيراتين- ١٩ و مستوى عامل النمو المتحول بيتا-١ فى مصل الدم مع إرتفاع فى التعبير الجينى للماتريكس ميتاللو بروتينيز-٢ و المستوى الكبدى لعامل نمو الخلايا الكبدية بالمقارنه بمجموعات التليف الكبدى.

خلاصة القول، أدى العلاج بالخلايا الجذعية المتعلقة باللُحمة المتوسطة المشتقة من نخاع العظم مقارنةً بالعلاج بالسيليمارين إلى تحسين وظائف الكبد (خفض النشاط الإنزيمى للالانين ترانس امينيز) وتقليل التهاب واحتقان الاوعية الدمويه كما أكدت الفحوص الهستولوجية إنحسار نسبة مساحة التليف و النسبه الإيجابية للألفا أكتين للعضلات الملساء و و زيادة التعبير الجينى للماتريكس ميتاللو بروتينيز-٢ مع خفض التعبير الجينى لكل من المانع النسيجى للميتاللو بروتينيز- ١ وإنقاص المحتوى الكبدى من الهيدروكسى برولين ومستوى عامل النمو المتحول بيتا-١. حفزت الخلايا الجذعية تجدد الخلايا الكبدية عن طريق خفض التعبير الجينى لسيتوكيراتين-١٩ و إرتفاع المستوى الكبدى لعامل نمو الخلايا الكبدية.

خامساً: أوضحت بيانات الإرتباط المستنبطه للمؤشرات المختلفة لهذه الدراسة وجود إرتباط إيجابي ذو دلالة إحصائية بين مستوى عامل النمو المتحول بيتا-١ فى مصل الدم و التعبير الجينى لكل من المانع النسيجى للميتاللو بروتينيز- ١، سيتوكيراتين- ١٩، المحتوى الكبدى من الهيدروكسى برولين، نشاط إنزيمات الألانين و الإسبارتات ترانس امينيز و مستوى مجموع البليروبين. بينما إرتبط مستوى عامل النمو المتحول بيتا-١ فى مصل الدم إرتباطا سلبيا مع التعبير الجينى للماتريكس ميتاللو بروتينيز-٢، المستوى الكبدى لعامل نمو الخلايا الكبدية ،مستوى الالبيومين والجلوتاثيون المختزل.

و على الجانب الآخر المستوى الكبدى لعامل نمو الخلايا الكبدية إرتباطا سلبيا معنويا مع التعبير الجينى لكل من المانع النسيجى للميتاللو بروتينيز- ١، سيتوكيراتين- ١٩، المحتوى الكبدى من الهيدروكسى برولين و أيضا يوجد ارتباط ايجابى بين المستوى الكبدى لعامل نمو الخلايا الكبدية و التعبير الجينى للماتريكس ميتاللو بروتينيز-٢

و من ناحيه أخرى فقد إرتبط التعبير الجينى سيتوكيراتين- ١٩و التعبير الجينى للمانع النسيجى للميتاللو بروتينيز-١ و المحتوى الكبدى من الهيدروكسى برولين. بالإضافه إلى هذا فقد لوحظ أن التعبير الجينى سيتوكيراتين- ١٩ يرتبط إرتباطا سلبيا مع التعبير الجينى للماتريكس ميتاللو بروتينيز-٢.

الخلاصة:

أظهرت الدراسة الحالية النقاط التالية:

- أحدث مرض الإنسداد الصفراوى الكبدى المستحدث فى الجرذان عن طريق ربط القناة المرارية إلتهاب و تليف الكبد مع نقص فى إمكانية تجدد الخلايا الكبدية .
- أظهر العلاج بالخلايا الجذعية المتعلقة باللُحمة المتوسطة المشتقة من نخاع العظم حماية قوية لحالة الكبد المعتل عن طريق تثبيط موت الخلايا الكبدية و تحفيز تجدد الخلايا الكبدية مرة أخرى مع تقليل نسبة التليف فى مجموعة التليف الكبدى من الدرجة الثالثة و أيضاً الرابعة و لكن بدرجة أقل .
- تمثلت آلية عمل الخلايا الجذعية لحماية الخلايا الكبديةعن طريق تقليل تراكم الكولاجين عن طريق زيادة التعبير الجينى للماتريكس ميتاللو بروتينيز-٢ مع إنقاص التعبير الجينى للمانع النسيجى للميتاللو بروتينيز-١ و التوتر المؤكسد و أيضا مستوى عامل النمو المتحول بيتا-١ فى مصل الدم.
- أثبتت الدراسة نجاح العلاج بالخلايا الجذعية المتعلقةباللُحمة المتوسطة المشتقة من نخاع العظم تحفيز تجدد خلايا الكبد عن طريق زيادة المستوى الكبدى لعامل نمو الخلايا الكبدية و خفض التعبير الجينى سيتوكيراتين-١٩.
- أظهر العلاج بالسيليمارين تحفيزلتجدد خلايا الكبد و تقليل نسبه التليف ولكن بدرجة أقل بالمقارنة بالعلاج بلخلايا الجذعية المتعلقة باللُحمة المتوسطة المشتقة من نخاع العظم .

التوصيات

الخلايا الجذعية المتعلقة باللُحمة المتوسطة المشتقة من نخاع العظم قد توفر علاج أحادى لمرض الإنسداد الصفراوى الكبدى، هذا لما لها من امكانية انقاص نسبة الإحتقان و الإلتهاب فى الخلايا وإنحسار التليف الكبدى وتعزيز تجدد خلايا الكبد.