دراسة هستوكيمائية مناعية عن تأثير الزنجبيل على سرطان القولون فى الفئران

مقدمة من
إيمان محمد محمد حسين عبداللا
بكالوريوس علوم- ١٩٩٩ (حيوان وكيمياء)- كلية العلوم بالفيوم – جامعة القاهرة
ماجستير- ٢٠٠٥ (علم الحيوان- علم الأنسجة وكيمياء الأنسجة)- كلية العلوم – جامعة الفيوم

للحصول على درجة دكتوراه الفلسفة
(علم الحيوان- علم الخلية والأنسجة وكيمياء الأنسجة المناعية(

لجنة الإشراف:
١ ـ أ.د. خالد حسين حسن زغلول
أستاذ علم البيئة
قسم علم الحيوان ـ كلية العلوم ـ جامعة الفيوم

٢ ـ المرحوم أ.د. محمد فتحى إسماعيل
أستاذ بيولوجياعلم الخلية
قسم علم الحيوان ـ كلية العلوم ـ جامعة المنصورة

2010

دراسة هستوكيمائية مناعية عن تأثير الزنجبيل على سرطان القولون فى الفئران

رسالة مقدمة من
إيمان محمد محمد حسين عبداللا
بكالوريوس علوم- ١٩٩٩ (حيوان وكيمياء)- كلية العلوم بالفيوم – جامعة القاهرة
ماجستير- ٢٠٠٥ (علم الحيوان- علم الأنسجة وكيمياء الأنسجة)- كلية العلوم – جامعة الفيوم

للحصول على
درجة دكتوراه الفلسفة
(علم الحيوان- علم الخلية والأنسجة وكيمياء الأنسجة المناعية)

قسم علم الحيوان
كلية العلوم – جامعة الفيوم

2010

الملخص العربـــى

سرطان القولون من أكثر أنواع السرطان المسببة لموت الإنسان فى أنحاء العالم. ويلعب الغذاء دورا أساسيا فى حدوث النوع من السرطانات وتقدمه. ويرجع حدوث وانتشار هذا المرض فى معظم دول العالم الثالث إلى انتشار عادات الحياة المعيشية الأوروبية بين شعوب هذه الدول وكثرة استخدام الأغذية الغنية بالدهون واللحوم. بالإضافة إلى تعرض الإنسان لعديد من المواد المسببة للسرطان (مثل مركبات الهيدرازين) فى البيئة.

سرطان القولون عبارة عن مرض ناتج لحدوث الأكسدة فى الخلايا ويؤدى إلى تدمير الـ DNA وحدوث الطفرات فى الجينات. وتحدث سلسلة من موت الخلايا وتجديدها وانتاجها بدرجة كبيرة. ولذلك فقد تم تخطيط هذه الدراسة للتأكد من أهمية الزنجبيل كمضاد للأكسدة فى الفئران المعاملة بالمادة المسرطنة Azoxymethane (AOM).

مجموعات الدراسة:

تم توزيع فئران الدراسة وعددها ٤٨ فأرا إلى ٦ مجموعات (تشتمل كلا منها على ٨ فئران)

١ - المجموعة الضابطة (C) – التغذية العادية

٢ - مجموعة الزنجبيل (G)

وفى كلا المجموعتين كانت مدة المعاملة ٦ أسابيع

٣ - مجموعة المادة المسرطنة AOM(T)

تم حقن الحيوانات بالمادة المسرطنة بجرعتين (بينهما أسبوع) ثم أجريت الدراسات عليها بعد ٤ أسابيع. مجموعتى دراسة تأثير الزنجبيل المضاد (قبل وبعد المعاملة بالمادة المسرطنة)

٤ - المجموعة (A) تم إمداد الفئران بالزنجبيل لمدة ١٠ أسابيع

٥ - المجموعة (B) تم إمداد الفئران بالزنجبيل لمدة ١٢ أسبوع

وفى كلا المجموعتين تم حقن الحيوانات بالمادة المسرطنة بجرعتين (بينهما أسبوع) إعتبارا من الأسبوع الثالث من بداية الإمداد بالزنجبيل.

٦ - مجموعة دراسة تأثير الزنجبيل المضاد بعد المعاملة بالمادة المسرطنة (D) وفيها تم حقن الحيوانات بالمادة المسرطنة بجرعتين (بينهما أسبوع) وبعد أربع أسابيع تم إمداد الفئران بالزنجبيل لمدة ٤ أسابيع وكانت الجرعة المستخدمة من الزنجبيل ١٠ mg/kg b.w. أما المادة المسرطنة فكانت ١٠ µg/kg b.w.

ولمتابعة التغيرات فى مجاميع الدراسة المختلفة، تم إجراء الدراسات الآتية:

أولا :الدراسات الهستولوجية

أ - الحيوانات غير المعاملة

أظهرت القطاعات أن جدار القولون يتكون من طبقة خارجية تعرف بالطبقة المصلية، يليها طبقة طلائية ثم طبقة عضلية يربطها مادة لاحمة ونسيج طلائى. وتبطن الطبقة الداخلية للقولون بطبقة مخاطية وتجاويف تتفرع إلى غدد أنبوبية مبطنة بطبقة طلائية وبها خلايا غدية مفرزة.

ب - الحيوانات المعاملة بالزنجبيل

لم يحدث أى تغيير معنوى فى أنسجة قولون حيوانات هذه المجموعة عن الحيوانات غير المعاملة.

ج - الحيوانات المعاملة بالمادة المسرطنة **AOM**

ظهرت عدة تغيرات مرضية تختلف حدتها فى الطبقة المخاطية للقولون المأخوذة من الحيوانات المعاملة بالمادة المسرطنة.

د - التاثيرات المضادة للزنجبيل

وكان لإستخدام الزنجبيل قبل وبعد المعاملة بالمادة المسرطنة(AOM) تأثيرا معنويا فى تثبيط الإصابة بالسرطان، معتمدا على مدة المعاملة بالزنجبيل. وكانت المعاملة بالزنجبيل قبل وبعد المعاملة

بالمادة المسرطنة بالمجموعتين(A & B) أكثر تأثيرا عن تلك بعد المعاملة بالمجموعة (D).

أوضحت دراسة كيمياء الأنسجة للقولون فى فئران المجموعة الضابطة والمعاملة بالزنجبيل أنه تم صبغ الميوسين باللون الأزرق عند استخدام صبغة ال Alcian blue. وعلى العكس فإن تأثير هذه الصبغة كان ضعيفا على الطبقة المخاطية فى الفئران المعاملة بـ AOM. وعند المعاملة بمادة AOM و الزنجبيل زادت قدرة الخلايا الكأسية على قبول الصبغة وحدوث زيلدة واضحة فى أعداد تلك الخلايا وحجمها.

ثانيا: دراسات كيمياء الأنسجة المناعية:

أجريت هذه الدراسة بالكشف عن ثلاثة أنواع من الأجسام المضادة:

أ – بالكشف عن PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) فى أنوية خلايا الطبقة المخاطية لقولون فئران مجموعة الضابطة والمجموعة المعاملة ب الزنجبيل. أما فى الفئران المعاملة بـ AOM فقد لوحظت نسب عالية من هذه الأجسام فى أنوية خلايا التجاويف وخلايا الطبقة المخاطية. وعند المعاملة بالزنجبيل والمادة المسرطنة فقد ظهر نقص معنوى فى نسبPCNA فى أنوية خلايا الطبقة المخاطية والتجاويف.

ب – بالكشف عن CEA (carcinoembryonic antigen) فى خلايا الطبقة المخاطية المأخوذة من فئران المجموعة الضابطة والمجموعة

المعاملة بالزنجبيل كانت النتيجة سلبية. أما فى الخلايا المأخوذة من الحيوانات المعاملة بالمادة المسرطنة فكانت النتيجة إيجابية وسجلت بها نسب عالية من هذه الأجسام المضادة.

كما أوضحت الدراسات فى الحيوانات المعاملة بالمادة المسرطنة AOM بعد وقبل المعاملة بالزنجبيل نقص متوسط أو كبير فى قيم ال CEA فى السيتوبلازم، معتمدا على مدة التعريض للزنجبيل.

ج - بالكشف عنp ٥٣ كانت النتائج سلبية فى الخلايا الطلائية لقولون حيوانات كلا المجموعتين الضابطة والمعاملة بالزنجبيل. أما فى الحيوانات المعاملة بالمادة المسرطنة AOM فقد تم تسجيل وجود p٥٣ فى أنوية الخلايا المصابة بالسرطان. وقد لوحظ نقص معنوى فى كميته فى أنوية الأغشية المخاطية لتجاويف القولون فى الحيوانات المعاملة بالمادة المسرطنة و الزنجبيل ، مقارنة بتلك المسجلة فى الحيوانات المعاملة بالمادة المسرطنة فقط، ويختلف التأثير حسب مدة المعاملة.

- يستخدم جهاز الإنسياب الخلوى **The flow cytometer** لتقدير كمية الحمض النووى DNA بالخلايا فى المراحل المختلفة لدورة حياة الخلية. فبالنسبة للخلايا المخاطية المأخوذة من قولون حيوانات المجموعة الضابطة، لم يلاحظ أى علامات لبداية حدوث السرطان حيث كانت نسب القيم المقدرة لمراحل نمو الخلايا (G1، S-phase، G2) ٩٤,٥٦%، ٠,٥٥% ، ٤,٨٩% على الترتيب؛ بينما كانت ٩٧,٥٦%، ٠,٥٥%، ١,٨٩% فى العينات المأخوذة من الفئران المعاملة بالزنجبيل. أما عند المعاملة بالمادة المسرطنة AOM فكانت النسب المقدرة على الترتيب: ٧,٦٦

%، ٢,٥٥%، ١٠,٧٩%. وعند معاملة الفيران بـ ١٠ أو ١٢ جرعة من الزنجبيل ١٠ (mg/kg b.w) وجرعتين من المادة المسرطنة AOM (10 µg/kg b.w.)، اعتبارا من الأسبوع الثالث فكانت النسب المقدرة للمراحل المذكورة على الترتيب: ٤٧,٦٦%، ٢,٥٥%، ٥٠,٧٩%؛ ٩٧,٦٦%، ٠,٥٥%، ٥٥%. أما عند المعاملة بالمادة المسرطنة ثم تركت الحيوانات لمدة ٤ أسابيع ثم تم إمدادها بالزنجبيل لمدة ٤ أسابيع فكانت النتائج المسجلة على الترتيب: ٢٧,٦٦%، ١١,٥٥%، ٦٠,٩٧%.

وبذلك تؤكد نتائج هذه الدراسة الدور الهام للزنجبيل كنبات طبى وغذائى فى تثبيط تأثير المواد المسببة لسرطان القولون.

-5-
الخلاصـــــة

يتعرض الإنسان طبيعيا لكثير من المواد المسببة للسرطان خصوصا فى الغذاء مثل مواد الـ Hydrazine . ويحدث سرطان القولون نتيجة للإجهاد الدائم Oxidative stress ، مسببا تغيرات فى الـ DNA وحدوث طفرات فى الجينات المسببة للسرطان. وقد صممت الدراسة الحالية لتوضيح دور الزنجبيل كمضاد لحدوث سرطان القولون فى االفيران المعاملة بمادة Azoxymethane (AOM) .

أوضحت الدراسات الهستولوجية فى الفيران غير المعامة (الكنترول) ، والمعاملة بالزنجبيل فقط، عدم ظهور أى نوع من الأورام فى أنسجة وغدد القولون. واحتوت الأقبية خلايا كأسية كثيرة.

وعلى العكس، فقد ظهرت تغيرات هستولوجية مرضية فى الغشاء المخاطى لقولون للحيوانات المعاملة بالمادة المسرطنة Azoxymethane (AOM) فقط،تتراوح بين التضخم الكمى إلى النمو الشاذ. وقد بدت كثير من الغدد والأقبية غير منتظمة الشكل والنمو.

وجد أن المعاملة بالزنجبيل قبل وبعد المعملة (مجموعتى A&B) وبعد المعاملة بالمادة المسرطنة (مجموعة D) أحدثت تثبيط معنوي واضح للسرطان، معتمدا على مدة وميعاد التعريض. وكان تأثير التعريض قبل وبعد المعاملة (A&B) أكثر تأثيرا من التعريض بعد المعاملة بالمادة السرطنة (مجموعة D).

أوضحت الدراسات الهستولوكيميائية لقولون حيوانات مجموعات الكنترول والمعاملة بالزنجبيل حدوث استجابة واضحة للميوسين الحمضى لصبغه الألشين الزرقاء. وعلى العكس، فى الفئران المعاملة بالمادة المسرطنة (AOM) فقد كانت استجابة الأغشية المخاطية للصبغة ضعيفا. أما فى الحيوانات المعاملة بالمادة السرطنة والزنجبيل فقد لوظت زيادة فى استجابة الخلايا الكأسية للصبغة.

أوضحت الدراسات الكيميائية المناعية باستخدام الأدلة PCNA, CEA and p٥٣ استجابة سلبية للأجزاء المخاطية فى قولون حيوانات الكنترول والمعاملة بالزنجبيل، وعلى العكس فقد كانت الإستجابة إيجابية واضحة فى الحيوانات المعاملة بالمادة المسرطنة (*P*<0.0011, *P*< 0.0001 and *P* <٠.٠٠٦ AOM). []، على الترتيب.

وجد أن المعاملة بالزنجبيل قبل وبعد المعملة (مجموعتى A&B) وبعد المعاملة بالمادة المسرطنة (مجموعة D) أحدثت تثبيط معنوي واضح للسرطان، معتمدا على مدة وميعاد التعريض للزنجبيل. وباستخدام الدليل PCNA كانت قيم P المحسوبة هى على الترتيب <٠.٠٠٨، <٠.٠٥ and <٠.٠٠٥ . وباستخدام الدليل CEA كانت قيم P المقدرة <٠.٠٠٠٧، <٠.٠٠٠٩١ and <٠.٠٥ على الترتيب. أما عند استخدام pc٥٣ فكانت تلك القيم على الترتيب <٠.٠٠٩، <٠.٠٥ and <0.007. .

أوضح تقدير المحتوى الخلوى من الـ DNA باستخدام جهاز الإنسياب الخلوى أن متوسط النسب المئوية لخلايا G1, S phase & G٢ كانت على الترتيب ٩٤.٥٦%، ٠.٥٥% and ٤.٨٩% للكنترول، ٩٧.٥٦%، ٠.٥٥% and١.٨٩% للمعاملة بالزنجبيل فقط، ٨٧.٦٦%، ٢.٥٥% and ١٠.٧٩% عند المعاملة بالمادة المسرطنة (AOM، 47.66%, 2.55% and 50.79%; and 97.66%, 0.55% and ٥٥%. عند المعاملة بالزنجبيل قبل وبعد المعاملو بالمادة المسرطنة (مجموعتى A&B) على الترتيب، ٢٧.٦٦%، ١١.٥٥% and ٦٠.٧٩% عند المعاملة بالزنجبيل بعد المعاملة بالمادة المسرطنة (مجموعة D).

أوضحت هذه الدراسة أن استخام الزنجبيل كان له تأثير كيميائى مناعى وعلاجى لسرطان القولون.