CC BY

College of Basic Education Research Journal

www.berj.mosuljournals.com

Effect of Gabapentin's on immunohistochemistry response of CASP1, CASP3, and CASP8 proteins in hepatocytes of male albino rats

Sura Salim Mahmood
Baidaa Abdulaziz Mohamed Salah
Department of Biology, College of Education for Pure Science, University of Mosul, Mosul, Iraq,

Article Information

Article history:

Received: July 14.2024

Reviewer: August 3.2024

Accepted: August 12.2024

Key words : protein, gabapentin drug , tissue, liver, rat

Correspondence:

Abstract

Present investigation examined adverse impacts of gabapentin on hepatocytes of white male rats. Present research project included 15 animals. Rats were split into three sets (5 animals each), with first being untreated set, which received purified water, and the other two test sets received medication at levels ranging from 21.8 and 43.6 mg/kg for two months. Activity of CASP1 was assessed to detect both inflammation and apoptosis, CASP3, and CASP8 proteins were also assessed to detect programmed death in liver cells. First test set's liver sections (21.8 mg/kg) exhibited a notable positive reaction to CASPE1 protein. However, entrance region and hepatocyte cytoplasm demonstrated a very significantly positive response in second test set (43.6 mg/kg). CASP3 protein elicited a significantly positive response in hepatic cells of liver of first test set and a strong positive response in liver of second test set. A significant positive response to CASP8 protein was seen in first test set of liver sections, whereas an even greater positive response was seen in second test set of sections. Conclusion, gabapentin is toxic to liver cells when used over extended periods and in excessive amounts. Its effects are evident at protein level by activating pathways linked to inflammation and programmed death.

ISSN: 1992 – 7452

تأثير الكابابنتين على التفاعل المناعي النسجي لبروتينات CASP1، CASP3 ، و CASP8 في الخلايا الكبدية لذكور الجرذان البيض

سورة سليم محمود بيداء عبد العزيز محمد صلاح

قسم الأحياء، كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة الموصل، الموصل، العراق.

الخلاصة

تم التحري في البحث الحالي عن الاثار الجانبية لعقار الكابابنتين على الخلايا الكبدية في ذكور الجرذان البيض . تضمن المشروع الحالي ١٥ حيوان . قسمت الجرذان الى ٣ مجموعات (٥ حيوانات لكل منها). المجموعة الأولى كانت غير معاملة بالعقار ولكنها أعطيت ماءا نقيا ، أما المجموعتين الاخريتين فقد أعطيت العقار بمستويات امتدت من ٢١.٨– ٤٣.٦ ملغم /كغم من وزن الجسم ولمدة شهرين . تم تحليل فعالية بروتين CASP1 لتشخيص حدوث الالتهاب والموت المبرمج كلاهما، فضلا عن تحليل فعالية البروتينات CASP3 و8 CASP لتشخيص الموت المبرمج في الخلايا الكبدية .اظهرت مقاطع كبد المجموعة التجريبية الأولى (٢١.٨ ملغم) تفاعلا موجبا ملحوظا لبروتين CASP1 ، في حين أظهرت المنطقة البوابية وسايتو بلازم الخلايا الكبدية استجابة موجبة عالية في المجموعة التجريبية الثانية (٤٣.٦ ملغم). واظهر بروتين CASP3 استجابة موجبة معنوية في الخلايا الكبدية لكبد المجموعة التجريبية الأولى واستجابة موجبة قوية في كبد المجموعة التجريبية الثانية . و لوحظت استجابة معنوية موجبة لبروتين ٨ CASP في مقاطع كبد المجموعة التجريبية الأولى بينما كانت الاستجابة الموجبة اقوى في المجموعة التجريبية الثانية . نستنتج مما سبق ان عقار الكابابنتين سام بالنسبة للخلايا الكبدية عندما يستعمل لفترات طويلة وبكميات عالية .وتظهر تأثيراته على مستوي البروتين من خلال تنشيط مسارات ترتبط بالالتهاب والموت المبرمج .

الكلمات المفتاحية : بروتين ، عقار الكابابنتين ، نسيج ، كبد ، جرذ

المقدمة

تستخدم العقاقير المضادة للتشنجات بشكل رئيسي لمعالجة مرض الصرع ولكن يمكن ايضا ان تأخذ دورا في معالجة ألم التهاب الاعصاب Neuropathy، داء الشقيقة Migraines، والاضطراب العاطفي القطبي Bipolar affective disorders [1] ومن ابرز العقاقير المضادة للتشنجات هو عقار الگابابنتين Gabapentin ، اذ يستعمل هذا العقار لعلاج النوبات الجزئية Partial seizures، والالم الناتج من الضرر الذي يصيب الاعصاب وخاصة العصب القحفي, ان الضرر الذي يصيب الاعصاب يكون عادة نتيجة الاصابة بداء السكر والمعروف ب الاعتلال العصبي السكري، والالم العصبي الذي يظهر بعد الاصابة بفيروس الهربس Postherpetic neuralgia.ويستخدم العقار لمعالجة الاعتلال الذي يصيب نظام الاعصاب الحسية الجسدية والم الاعتلال العصبي والذي يقترن بإحساس غير طبيعي الذي يدعى بعسر الحس Dysesthesia [2].

أكتشف عقار الگابابنتين في عام ١٩٧٠خلال تجربة أجريت لاكتشاف عقاقير جديدة لمعالجة الاضطرابات العصبية [3].

ويعد العقار آنف الذكر من العقاقير المثبطة للناقل العصبي حامض كاما- امينوبيوتريك aminobutyric Gamma acid (GABA).وقد سمح باستخدام هذا العقار لأول مره في الولايات المتحدة الامريكية عام ١٩٩٣ ويرتبط العقارمن الناحية الوظيفية والتركيبية بعقار اخر هو البريكابلين [٤]. ويعمل هذا العقار على تثبيط تحرير النواقل العصبية المهيجة مساعدا بذلك في استعماله ضد النقل العصبي المرضي والذي يمكن ملاحظته في الم الاعتلال العصبي واضطرابات الصرع [4] ، يلعب هذا العقار دورا في علاج او تقليل الالام في الحيوانات أيضا خاصة بعد اجراء العمليات الجراحية لها من قبل المختصين في مجال الطب البيطري ويستخدم العقار لتقليل نوبات الهلع التي ترافق الحيوانات بالإضافة الى تقليل نوبات الهلع والتوتر التي ترافق الانسان خلال السفر وفضلا عن استعمالاته في تخفيف العديد من المواقف التي تتسم بالتوتر والضغط العصبي [5]. وعلى الرغم من الفؤائد التي يمكن لهذا العقار من تقديمها لعلاج العديد من الحالات المرضية المذكورة اعلاه،الا انه يتسبب في العديد من الاعراض الجانبية ابرزها عدم الاتزان او التموضع الصحيح في المكان Disorientation in space والشعور بالنعاس Sleeping ولكن لاتعد من الاعراض الخطره التي تظهر على سلوك المريض، اذ يمكن أن يزيد استعمال هذا الدواء من خطر الانتحار والاكتئاب التنفسي Respiratory depression والتفاعلات التحسسيه Allergic reaction [6].

ان التاثير الضار لهذا العقار ظهر من خلال ملاحظة العديد من الاعراض الجانبية وتداخلاته الدوائيه مع عدد من مضادات التشنجات الاخرى[6] .تم دراسة التاثير السمي لهذا العقار منذ اقرار استعماله عام ١٩٩٣من قبل منظمة الغذاء والدواء الامريكيه Food and drug administration(FDA) ظهرت في العديد من البلدان زيادة في الاحصائيات التي تناقش او تبين الضرر الذي يسببه هذا العقار،اذ صنف العقار ضمن صنف Class C controlled drugs، ولوحظ ان هذا العقار يتسبب عند جرع معينة بحث وظهور الموت المبرمج Apoptosis، فضلا عن الضرر النسيجي للكلية في الجرذان[7] .

يمتص العقار جيدا عن طريق الفم ويتواجد ضمن البلازما بشكل غير مرتبط. يتفاعل العقار مع العصبونات القشرية Cortical neurons عند الوحدات العصبية الفرعية المساعدة Auxiliary subunitsعند قنوات الكالسيوم ذات الجهد العالي والتي تعرف ايضا بقنوات الكالسيوم المعتمدة على الجهد Voltage-gated calcium channels،وبهذا يزداد تركيز مادة Gamma_aminobutyric acid عند منطقة التشابك العصبي ويحفز استجابة هذا المركب عند الجوانب غير المشبكية في النسيج العصبي ويقلل من تحرير النواقل العصبية احادية الامين [8] . ويعد كل من الكبد والكلية من الاعضاء المهمة في الجسم والتي تقع على عاتقها عملية التخلص من معظم العقاقير وعليه فان اي خلل يصيبها يجعلها غير قادره على أداء وظائفها بشكل صحيح وهذا بدوره يسهم في ترسب العقاقير وخاصه المضادة للتشنجات ومنها مضادات الصرع، اذ ان اصابتها بمرض يمكن ان يطيل من عملية التخلص Elimination من العقار الأم (الاصلي) او من المركب الايضي الفعال Active metabolite وهذا يسبب تراكم العقاقير وبالتالي حدوث سمية سريرية Clinical toxicity ويمكن ان يؤثر ايضاً على ارتباط البروتينات الخلوية وانتشارها وأيض العقار [9] ان المعلومات المتوفرة عن تسبب عقار الگابابنتين بسمية الكبد هي محدودة والميكانيكية التي تسبب هذا الضرر هي غير واضحة ولذا هدفت الدراسة الحالية معرفة تأثير عقار الكابابنتين في حث الالتهاب والموت المبرمج في كبد الذكور الجرذان البيض المعاملة بالتركيزين ٢١.٦،٤٣.٨ ولمدة شهرين من خلال قياس التفاعل المناعي النسجي للخلايا الكبدية للوسمات الجزيئية CASP1 ،CASP3،CASP8 .

المواد وطرائق العمل

تربية الحيوانات

اجريت الدراسة الحالية على ذكور الجرذان البيض البالغة *Rattus noregicus* ، حيث تم اختيار ١٥ منهم و البالغة من العمر ٢-٣شهر، ذات وزن ١٧٦±٥غم. جلبت الجرذان من جامعة جيهان أربيل

اقليم كردستان العراق ونقلت الى بيت الحيوان في كلية الطب البيطري /جامعة الموصل،اذ اجريت الدراسة هناك، وتركت الحيوانات لمدة اسبوعين للتخلص من اثار الاجهاد نتيجة جلبها من منطقة بعيدة مع الاخذ بنظر الاعتبار تغيير الظروف البيئية.ثم بعد ذلك اجريت التجارب عليها.وضعت ذكور الجرذان في اقفاص بيض بلاستيكية نموذجية مغطاة بغطاء حديدي مشبكك. وكانت ابعاد الصندوق ٤٠*٢٤*٥ سم من انتاج شركة London plastic North Icent(LTDL) وتم الاعتناء بالجرذان من خلال فرش (ارضية)اسفل القفص بنشارة خشبية محلية تم استبدالها وتعقيمها اسبوعياً. وضعت الجرذان طيلة فتره الدراسة تحت ظروف مختبرية شبه نموذجية من حيث التهوية ودرجة الحرارة والرطوبة،اذ كانت درجة الحرارة مابين٣(±٢٤) مْ وعرضت الحيوانات لدورة ضوئية بمقدار ١٠ ساعات ضوء و١٤ ساعة ظلام وتم تغذية الحيوانات بعلف مركز معد خصيصاً لهم) [12] .وتم العمل تحت رعاية واشراف وموافقة اللجنة الاخلاقية لمعاملة الحيوان لجامعة الموصل وحسب الكتاب ذو الرقم M.VET.2023.0464 في ٢٠٢٣\١٠\١٢.

العقار المستخدم

العقار المستخدم في الدراسة الحالية ويعرف علميا بأسم

٢- [1-(Aminomethyl)cyclohexy]acetic acid -

وكان تركيز العقار المستخدم(٣٠٠ملغم/كغم من وزن الجسم) [10] ، من انتاج شركة Generis Farmace^Utica,S.A. .

تصميم التجربة

اختيرت التراكيز الخاصة بالدراسة الحالية بالاعتماد على الجرعة نصف القاتلة Median lethal dose (LD50) وهي اقل من 5000ملغم /كغم من وزن الجسم والتي تم التوصل اليها من خلال دراسات سابقة .وكانت التراكيز المستعملة في الدراسة الحالية هما 21.8،43.6ملغم/كغم من وزن الجسم والتي تكافئ ٦٠٠ و٢٤٠٠ ملغم/كغم من مضاعفات الجرعة العلاجية المعطاة للانسان والتي تشكل تقريباً 24%و48%من الجرعة نصف القاتلة المذكورة في اعلاه.اذيب كل تركيز في 2مل من الماء المقطر وأعتمد وزن الحيوان لتحديد حجم الجرعة المعطاة . جرعت ذكور الجرذان البيض بعقار الكابابنتين فمويا باستخدام مجرعة خاصة فمويةgavage needle [11]. قسمت الحيوانات الى ثلاث مجموعات (٥حيوانات / مجموعة) : المجموعة الأولى هي مجموعة السيطرة والتي جرعت فمويا بالماء المقطر لمدة شهرين وبشكل يومي ولمرة واحدة ، المجموعة الثانية جرعت فمويا بعقار الكابابنتين بالتركيز ٢١.٨ وبجرعة ٢مل و المجموعة الثالثة جرعت فمويا ٤٣.٦ ملغم / كغم من عقار الكابابنتين وبجرعة ٢ مل ولمدة شهرين وبشكل يومي ولمرة واحدة ، .

جمع العينات

بعد الانتهاء من تجريع الحيوانات بالعقار قيد الدراسة قتلت الحيوانات بطريقة القتل الرحيم Euthansia عن طريق فصل العنق Cervical dislocation ثم نقلت الحيوانات كل على حدى الى حوض التشريح وثبتت ايديها وارجلها بدبابيس التشريح لغرض احداث فتحة في المنطقة البطنية باستخدام مقص وملقط مطهرين واستخراج الكبد ، .بعد ذلك وضع الكبد في طبق بتري كبير الحجم وغمر بالمحلول الملحي (كلوريد الصوديوم) لحين تثبيته وتهيئته للخطوات اللاحقة.ثبتت عينات الكبد بمحلول الفورمالين المنظم بتركيز ١٠ % .

التلوين الكيميائي المناعي النسيجي

وقد تم في الدراسة الحالية استعمال معلمات جزيئية خاصة لغرض الكشف عن التفاعل المناعي النسجي لبروتينات معينة في نسيج الكبد وهي كالاتي:

التشخيص الكيميائي –المناعي النسيجي لجين بروتين CASP1

يقوم هذا الجين بتشفير البروتين الذي يمثل عضوا في عائله السيستين –اسبارتيك –حامض البروتييزو يستخدم للكشف عن الالتهاب والموت المبرمج ، اذ تم التشخيص باستعمال CASP1 polyclonal antibodyوالمصنع من قبل شركة (www.elabscience.com)Elabscience ، ذو الرقم التسلسلي E-AB-70300وتم اجراء التلوين وفق التعليمات المرفقة مع العدة التشخيصية.

التشخيص الكيميائي-المناعي النسيجي لجين بروتين CASP3

وتم الكشف عن هذا البروتين باستخدام CASP3polyclonalantibody والمصنع من قبل شركة Elabscience (www.elabscience.com) ذوالرقم التسلسلي .E-AB-70388 ،وتم اجراء طريقة التلوين حسب التعليمات المرفقة مع العدة التشخيصية.

التشخيص الكيميائي –المناعي النسيجي لجين بروتينCASP8

وتم تشخيص هذا البروتين ومدى فعاليته الخلوية من خلالCASP8 polyclonal antibody والمصنع من شركة (www.elabscience.com)Elabscience ذوالرقم التسلسلي-E-AB 19664وتم العمل حسب التعليمات المرفقة مع العدة التشخيصية الجاهزة.

الفحص ،التصوير المجهري للمقاطع النسيجية

شخصت التغيرات النسيجية المرضية والكشف عن الفعالية النسجية المناعية للبروتينات قيد الدراسة والتي تشفر من قبل جينات معينة باستخدام المجهر الضوئي من نوع Olympus Binocular microscopeمن شركةMiller والمصنع في الولايات المتحدة الامريكية(USA) ، واذ كان المجهر اعلاه

مزود بكاميرا رقمية من نوع omax microscope camera والمصنعة من قبل شركة omax والبلد المصنع هو الصين.China .

١٢.٣التسجيل او العد النسجي

هي أداة تعرف ب Histological scoring . هي طريقة تستخدم لتحويل البيانات شبه الكمية semi quantitative dataمن الانسجة الى ارقام او يمكن توضيحها بانها الطريقة المستعملة لتحويل البيانات غير الرقمية للتغيرات النسجية الى بيانات رقمية والتي يسهل تحليلها احصائيا لتوضيح الفروق بين المجاميع المختلفة والذي تم من خلال فحص المظاهر النسيجية الطبيعية والمرضية لكل المجاميع المدروسة في الكبد وتم توضيحها في الجدول 1 التالي والذي اعتمد في دراسة كافه المتغيرات النسجية] 13,12] في الدراسة الحالية:

الجدول 1: يبين المعايير التي اعتمدت في العد النسجي

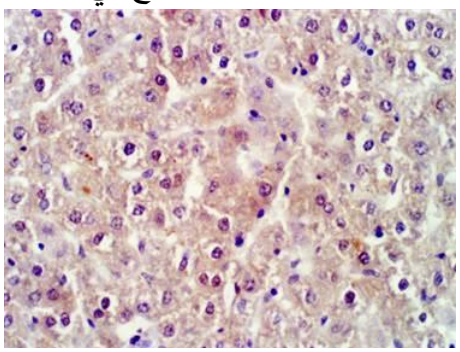
نوع البروتين	٠+	٢+	٣+	٤+	٥+
CASP1	(−) سالب ٠ خلايا/مجال مجهري	ضعيف 1−10(+) خلايا/مجال مجهري	موجب 11−25(+) خلايا/مجال مجهري	(++) موجب ٢٦−٥٠ خلايا /مجال مجهري	(+++) موجب اكثر من ٥٠ خلايا /مجال مجهري
CASP2	(−) سالب ٠ خلايا/مجال مجهري	ضعيف 1−10(+) خلايا/مجال مجهري	موجب 11−25(+) خلايا/مجال مجهري	(++) موجب ٢٦−٥٠ خلايا /مجال مجهري	(+++) موجب اكثر من ٥٠ خلايا /مجال مجهري
CASP3	(−) سالب ٠ خلايا/مجال مجهري	ضعيف 1−10(+) خلايا/مجال مجهري	موجب 11−25(+) خلايا/مجال مجهري	(++) موجب ٢٦−٥٠ خلايا /مجال مجهري	(+++) موجب اكثر من ٥٠ خلايا /مجال مجهري

التحليل الاحصائي

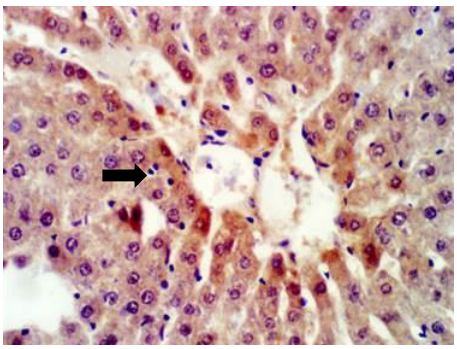
تم تحليل النتائج إحصائياً باستخدام تحليل التباين الأحادي (ANOVA) ثم أخضعت النتائج لاختبار Difference – LSD بأستخدام .(SPSS Microsoft, Ver. 11.5, USA) وكان مستوى الدلالة الإحصائية هو $P\leq0.01$.

النتائج والمناقشة

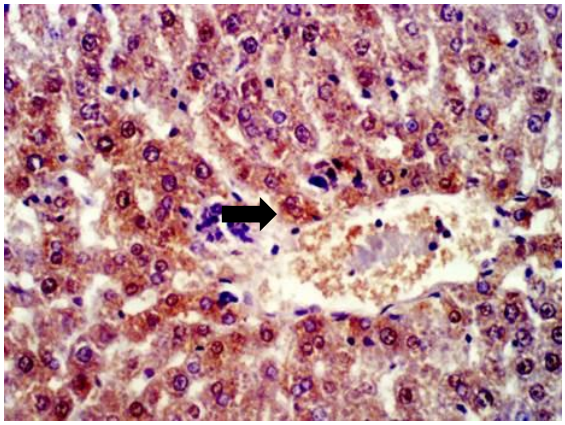
اظهر الفحص المناعي النسيجي لكبد مجموعة السيطرة كما موضح بالصورة ١ تفاعلا سالبا (−) لنشاط بروتين CASP1 في سايتوبلازم الخلايا الكبدية ،اما عن نتائج الفحص المناعي المجهري لمقاطع المجموعة التجريبية الأولى (٢١.٨ ملغم/كغم) فقد لوحظ تفاعلاً موجباً قوياً (++) في نوى وسايتوبلازم الخلايا الكبدية كما هو موضح في الصوره(٢)، في حين اظهر الفحص المناعي النسيجي لمقاطع كبد المجموعة التجريبية الثانية (٤٣.٦ ملغم/كغم) ولنفس المدة أعلاه تفاعلاً موجباً قوياً جدا (+++) في الخلايا الكبدية وحول المنطقة البوابية الصوره كما هو موضح في الصورة(٣).



الصورة ١: مقطع نسجي مستعرض في كبد ذكور الجرذان لمجموعة السيطرة والمجرعة بالماء المقطر، تبين تفاعلا نسجيا مناعيا سالبا (−) في الخلايا الكبدية (Immunohistochemistry −Caspase 1. (400x.



الصورة ٢: مقطع نسجي مستعرض في كبد ذكور الجرذان للمجموعة الثانية والمجرعة فمويا بعقار الكابابنتين بالتركيز ٢١.٨ملغم /كغم ، تبين تفاعلا نسجيا مناعيا موجبا(++) في الخلايا الكبدية وانويتها (السهم الأسود) .



الصورة ٣ : مقطع نسجي مستعرض في كبد ذكور الجرذان المجموعة الثالثة والمجرعة فمويا بعقار الكابابنتين بالتركيز ٤٣.٦ ملغم / كغم من وزن الجسم ،يبين تفاعلا مناعيا نسجيا موجبا قويا جدا (+++) في سايتوبلازم الخلايا الكبدية والمنطقة البوابية (السهم الأسود) . (Immunohistochemistry–Caspase 1. 400x).

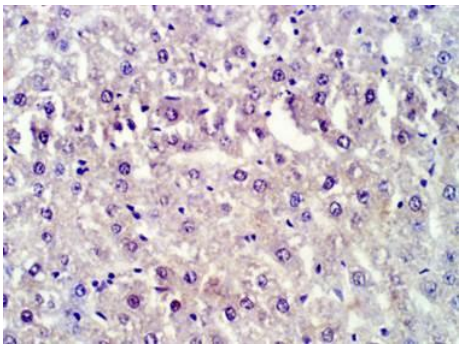
اما عن درجه التفاعل المناعي النسجي في كبد المجاميع المعاملة بالعقار قيد الدراسة ولنفس التراكيز اعلاه ولمدة شهرين فقد اظهرت النتائج في الجدول ٢ زيادة معنوية عند مستوي احتمالية٠.٠١≥ P في المجموعتين التجريبيتين الثانية (٠.٧١± ٣.٠١) والثالثة (٠.٩٢±٣.٨٤) مقارنة بمجموعة السيطرة (٠.١١± ١.١١) .

الجدول (٢):يبين درجة التفاعل المناعي النسجي لبروتين CASP1 في نسيج كبد في ذكور الجرذان البيض المعاملة بعقار الكابابنتين لمدة شهرين.

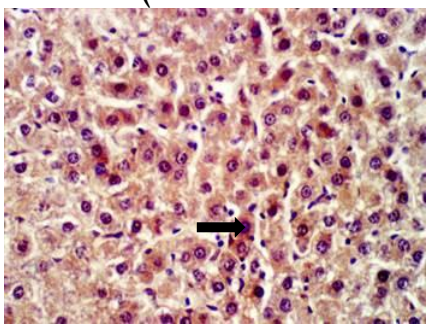
المجاميع	الفترة الزمنية للمعاملة (شهرين)
مجموعة السيطرة (ماء مقطر)	1.11±0.11 D
مجموعة تجريبية (١)	3.01±0.71B
مجموعة تجريبية (٢)	3.84±0.92A

–الاحرف المختلفة تشير الى وجود فروق معنوية بين المجاميع عند مستوى احتمالية P≤0.01

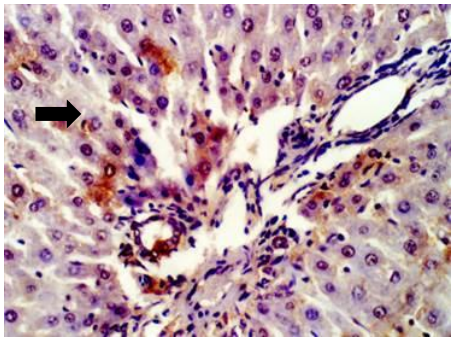
تتشابه نتائج الدراسة الحالية مع ما أشار اليه [14]عند معاملة الفئران بتراكيز محددة من عقار acetaminophen حقنا في البريتون،اذ لاحظ الباحثان ارتفاع المؤشرات الحيوية للالتهاب في الكبد وذلك من خلال الارتفاع في الاستجابة المناعية النسجية ل TNF−α وCASP1مما يسبب ارتفاع الاجهاد التأكسدي في النسيج الكبدي وبالتالي حدوث نخر الخلايا الكبدية مع زيادة في ارتشاح الخلايا العدلة Infiltration of neutrophils والبلاعم الكبيرة Macrophages في النسيج الكبدي.ويمكن القول ان العقار قيد الدراسة عند اعطاءه بجرعات عالية ولمدة شهرين يسبب سمية عالية في نسيج الكبد ويمكن تضمين مراحلها بتوليد مركبات أيضية سامة والاجهاد التأكسدي وفقدان بيوت الطاقة لوظيفتها وحصول الالتهاب والذي حتما سيؤدي الى موت الخلية الكبدية وهذا التفسير المحتمل لسلسلة الاحداث التي تسببت بالتغيرات في نسيج الكبد ضمن الدراسة الحالية وجاء هذا متفقا مع ماذكره [15]. وتتشابه النتائج الحالية من حيث حث حالة الالتهاب (والذي يتمثل في الاستجابة الموجبة للخلايا الكبدية للتفاعل المناعي لبروتين Casp1) في كبد القوارض مع ماذكره [16] حول ان هناك العديد من السايتوكينات تحث حدوث الضرر في الكبد من TNF−α،اذ تتحفز هذه السايتوكينات بعد تعريض الكبد للمعاملة بعدد من العقاقير السامة عند جرع وفترات زمنية معينة مثل مسكنات الالام،اذ ان تنشيط NLRP3 يقود او يسبب انقسام pro−IL−1βلكي ينشط السايتوكاين المعروف بأسم IL−1βمن خلال تنشيط بروتينCASP1،وبينت الدراسات ان IL−1βهو من يحث من حفزه اذ يحفز ارتشاح كتلة من الخلايا الوحيدة infiltration of monocytesوالخلايا العدلة في الكبد والذي بدوره يسبب تفاقم الضرر النسجي الكبدي وابرزها حصول النخر الخلوي خلال المعالجة بالعقاقير المضادة للإلام مثل عقار البارسيتموال.[17] واظهر الفحص المناعي النسجي لمقاطع كبد مجموعة السيطرة لذكور الجرذان البيض لمدة شهرين تفاعلا سالبا (−) للأجسام المضادة لبروتين CASP3 في الخلايا الكبدية كم هو موضح في الصورة(٤). في حين اظهرت الخلايا الكبدية في كبد المجموعة التجريبية الثانية (٢١.٨ملغم /كغم) تفاعلاً موجباً قوياً (++) كما اشير اليه في الصورة الصوره(٥)، اما عن كبد المجموعة التجريبية الثالثة(٤٣.٦ ملغم /كغم) فقد لوحظ هناك تفاعلاً موجباً قوياً (++) كما تبين في الصورة(٦).



الصورة ٤ : مقطع نسجي مستعرض في كبد ذكور الجرذان لمجموعة السيطرة والمجرعة فمويا بالماء المقطر لمدة شهرين تفاعلا مناعيا نسجيا سالبا (−) للاجسام المضادة لبروتين CASP3 .
(Immunohistochemistry −Caspase 3. 400x).



الصورة ٥: مقطع نسجي مستعرض في كبد ذكور الجرذان المجموعة الثانية والمجرعة فمويا بالتركيز ٢١.٨ ملغم / كغم من وزن الجسم، يبين تفاعلا مناعيا نسجيا قويا (++) (السهم الأسود) للأجسام المضادة لبروتين CASP3 (.Caspase 3.400x− Immunohistochemistry)



الصورة ٦ : مقطع نسجي مستعرض في كبد ذكور الجرذان المجموعة الثانية والمجرعة فمويا بالتركيز ٤٣.٦ ملغم / كغم من وزن الجسم يبين تفاعلا مناعيا نسجيا قويا (++) (السهم الأسود) للأجسام المضادة لبروتين CASP3
(Immunohistochemistry −Caspase 3.400x)

اشارت النتائج في الجدول٣ عن درجة التفاعل المناعي النسجي للبروتين اعلاه في المجوعتين التجريبيتين المجرعتين بالعقار قيد الدراسة ولنفس التراكيز انفة الذكر ولمدة شهرين فقد اظهرت النتائج وجود زيادة معنوية عند مستوى احتمالية P≤٠.٠١ في المجموعتين التجريبيتين الثانية (٣.٢١±٠.٢٩)و الثالثة (٣.٦٨±٠.٤١) مقارنة بمجموعة السيطرة(٠.٩٩±٠.٤٣) .

المجاميع	الفترة الزمنية (شهرين)
مجموعة السيطرة (ماء مقطر)	0.99±0.43D
المجموعة التجريبية الثانية (٢١.٨)	1.97 ±0.09C
المجموعة التجريبية الثالثة (٤٣.٦)	3.68±0.41A

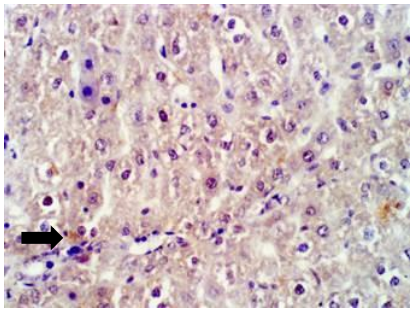
الجدول (3):يبين درجة التفاعل المناعي النسجي لبروتين CASP3 في نسيج كبد في ذكور الجرذان البيض المعاملة بعقار الگابابنتين لمدة شهرين

-الاحرف المختلفة تشير الى وجود فروق معنوية بين المجاميع عند مستوى احتمالية P≤0.01

وأشار الباحثون[20,19,18] الى ان الضرر الحاصل في الكبد المقترن بحصول الموت المبرمج يحصل بسبب أن هذه الحالة تنتظم بشكل أولي من خلال عائلة بروتينات (Bcl-2) B-cell leukemia lymphoma والتي تشمل كل من Bcl2والذي يمثل بروتين مضاد لحالة الموت المبرمج Antiapoptic والبروتين الاولي لحث الموت المبرمج (Bax)Pro-apoptotic Bcl2 associated،اذ ان كل من Bcl2وBaxتنظم وبشكل متبادل فعالية ونشاط بروتين caspase3والذي بدوره ينهي الموت المبرمج من خلال الانقسام الهدف Targeted cleavageللبروتينات الخلوية التي تدخل في تجزء ال DNA،تحطم الهيكل الخلوي ومختلف العمليات التقويضية الاخرى وهذا يتشابه مع ما تم التوصل اليه خلال الدراسة الحالية من تنشيط لبروتين CASP1في الكبد.وتتشابه نتائج الدراسة الحالية مع ماذكره [21] عن التأثير السام لمعاملة كبد الجرذان بمركب الفلوريد Fluoride،اذ اعطيت الجرذان عدد من التراكيز وهي ٥٠،١٠٠،٢٠٠ملغم/لتر لمدة ١٢٠يوم وكانت ابرز التأثيرات التي لوحظت هي تغيرات مظهرية مع زيادة معنوية للموت المبرمج وتحطم ال DNAوخاصة عند التراكيز العالية وبينت نتائج الفحص المناعي النسجي وتفاعل البوليميريز المتسلسل الخطي ان هناك استجابة موجبة لبروتين caspase3وcaspas9والتعبير النسبي ل mRNAوالذي يزداد بزيادة تركيز NaFوبهذا فان مركب الفلوريد يحفز مسارات الموت المبرمج عن طريق تحفيز بروتينات caspase.وتتوافق نتائج الدراسة الحالية الى حد كبير مع ما أشار اليه [22] ان الجرذان المصابين بنقص التروية في الكبد hepatic I/R injuryيعانون من زيادة معنوية في التعبير عن بروتين caspase 3.ولاتتفق نتائج النتائج الحالية مع ما

أشار اليه الباحثون[24,23] عند معاملة الجرذان بعقاري Gemfibrozal وSilymarin تتسببان بانخفاض في مستوي نشاط بروتين caspase3الكبدي مما يشير الى حصول ضرر وظيفي وتركيبي فيه.ويمكن توضيح زيادة التفاعل المناعي لبروتين caspase3في الخلايا الكبدية في الدراسة الحالية وبدرجات متفاوتة الى زيادة الاجهاد التأكسدي نتيجة المعاملة بالعقار قيد الدراسةوخاصة في المجموعتين التجريبيتين الاولى والثانية والذي يزيد من فرصة تولد وتنشيط مسارات الموت المبرمج.وتتشابه نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل اليه [25] عند معاملة كبد الجرذان بمركبCCl4، اذ تسبب بضرر نسجي حاد للكبد وزيادة معنوية في مستوى التفاعل المناعي النسجي لبروتيني Baxو3Caspaseمشيراً بذلك الى بدء عمليات الموت المبرمج في الخلايا الكبدية. ان موت الخلية والناتج من معاملة معينة قد تكون عقار (عامل كيميائي) او عامل فيزيائي فاءنه يتم اطلاق بعض الجزيئات الصغيرة داخل الخلايا من البروتينات او جزيئات صغيرة متكونة جزيئيا وتدعى بأسم Micro RNAs والذي يتحرر من الخلايا الكبدية الى الفراغ خارج خلوي extracellular spaceويمكن ان تتسرب الى الدورة الدموية وهذا ما لاقى اهتماما كبيرا باعتباره اشارات او علامات غير جراحية لمراقبة موت الخلايا في الكبد [26] .

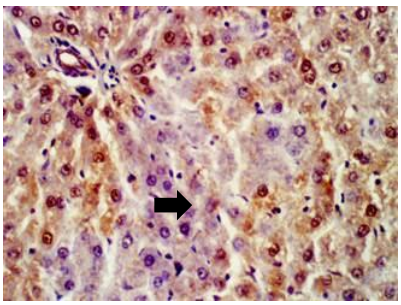
وبين الفحص المجهري كما موضح في صورة ٧ الى حصول تفاعلا موجبا ضعيفا (+) في الخلايا الكبدية للاجسام المضادة لبروتين CASP8 لمجموعة السيطرة ، اذ يظهر هذا التفاعل بشكل حبيبات بنية او ذهبية اللون . واظهر الفحص المجهري لكبد المجموعتين التجريبتين الثانية (٢١.٨ملغم /كغم) بالعقار قيد الدراسة كما هو موضح في الصورة ٨ تفاعلا موجبا قويا (++)في الخلايا ، في حين اظهرت الخلايا الكبدية تفاعلاً موجباً قوياً جدا(+++) في المجموعة التجريبية الثالثة (٤٣.٦ملغم /كغم) كمت هو موضح في الصوره(٩).



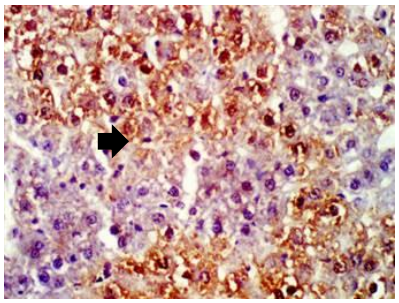
الصورة ٧ : مقطع نسجي مستعرض لكبد ذكور الجرذان البيض لمجموعة السيطرة والمجرعة فمويا بالماء المقطر ولمدة شهرين تفاعلا مناعيا موجبا ضعيفا (+) (السهم الأسود) للاجسام المضادة لبروتين CASP8 .

(Immunohistochemistry –Caspase8 . 400x)

.



الصورة ٨ : : مقطع نسجي مستعرض لكبد ذكور الجرذان البيض للمجموعة التجريبية الأولى والمجرعة فمويا بالتركيز ٢١.٨ ملغم / كغم ولمدة شهرين تفاعلا مناعيا نسجيا موجبا قويا (++) (السهم الأسود) للاجسام المضادة لبروتين CASP8 . (400x . Caspase8− Immunohistochemistry).



الصورة٩: مقطع نسجي مستعرض لكبد ذكور الجرذان البيض للمجموعة التجريبية الثانية والمجرعة فمويا بالتركيز ٤٣.٦ ملغم / كغم ولمدة شهرين تفاعلا مناعيا نسجيا موجبا قويا جدا (+++) (السهم الأسود) للأجسام المضادة لبروتين CASP8.(400x . Caspase8− Immunohistochemistry) .

اما عن درجه التفاعل المناعي النسجي لبروتين CASP8 في خلايا الكبد للمجاميع التجريبية المعاملة بالعقار قيد الدراسة ولمدة شهرين ، فقد بينت النتائج كما موضح في جدول ٤ وجود زيادة معنوية عند مستوى احتماليه٠.٠١≥Pفي المجموعتين التجريبيتين الثانية (٢.١٨±٠.١٦) والثالثة (٣.٤٣±٠.٧٣) مقارنة بمجموعة السيطرة (١.٠٩±٠.٦٢) ولوحظ ايضا ان الزيادة في درجة التفاعل تزداد بزيادة التركيز وحسب ما ظهرت في المجاميع التجريبية .

المجاميع	الفترة الزمنية (شهرين)
مجموعة السيطرة (ماء مقطر)	٠.٦٢±١.٠٩D
المجموعة التجريبية ١	٠.١٦±٢.٩٨B
المجموعة التجريبية ٢	٠.٧٣±٣.٤٣A

الجدول (4):**يبين درجة التفاعل المناعي النسجي لبروتين CASP8 في نسيج كبد في ذكور الجرذان البيض المعاملة بعقار الگابابنتين لمدة شهرين.**

-الاحرف المختلفة تشير الى وجود فروق معنوية بين المجاميع عند مستوى احتمالية .P≤0.01

تتشابه نتائج الدراسة الحالية من حيث الاستجابة الموجبة لبروتين CASP8في خلايا الكبد،اذ ان التفاعل الايجابي ازداد بشكل طردي مع زيادة التركيز المستخدم في الدراسة مع ما اشار اليه [27]. ان عقار Doxorubcinوالمستخدم بشكل واسع في علاج السرطان،يسبب حث او تنشيط الموت المبرمج من خلال تنشيط بروتين CASP8في الخلايا العضلية القلبية Cardiomyocytesفي الحيوانات،او عند حقنه في الوريد للجرذان البيض لمدة ٥ اسابيع،اذ لاحظوا زيادة معنوية في نشاط بروتين CASP8في البطينات وايضا اشارت نتائج اختبار TUNELالى وجود خلايا موجبة التفاعل في بطينات نفس الجرذان دلالة على تنشيط مسار الموت المبرمج.ويمكن ان تعزى تحفيز مسار الموت المبرمج والبروتينات الخاصة به الى تراكم الاجهاد التأكسدي الذي نتعرض له الشبكة الاندوبلازمية Endoplasmic reticulum خلال معاملة الكبد بالعقار قيد الدراسة مما قد يسبب تراكم الجذور الحرة والذي بدوره يسبب خطأ في تنظيم dysregulation ايونات الكالسيوم (Ca+2 balance)مما يسبب حث inductionفي استجابة unfolded protein [28] وهناك ثلاث بروتينات رئيسية تدخل في حث الاستجابة للاجهاد وهي the protein kinase RNA،inositol-reguring enzymel و activating transcription factor (ATF6)والذي في حالات الاقتران الداخلي يبقى خامل inactivatedبواسطة الارتباط او الاتصال بbinding immunoglobulin protein وبهذا فان الزيادة في unfolded proteins التي ترتبط مع محولات الطاقةtransducers ل immunoglobulin binding تحفز على تنشيطها. وبهذا اذا كانت الاليات المبرمجة في الخلية لاتستطيع من تقليل الاجهاد في الشبكة الاندوبلازمية الداخلية فيتم تحفيز موت الخلية وعن طريق الية معقدة تتضمن الكاسبيزات Caspase activation منهاCaspas8 ،وتسرب أيونات Ca+2 من الشبكة الاندوبلازمية،فضلا عن تلف بيوت الطاقةMitichondrial damage وتتشابه نتائج الدراسة الى حد ما مع ماذكره[29]ان عقار السبسيلاتين يرفع وبشكل معنوي من نسبة فعالية

CD95في الخلايا اللمفاوية المعزولة isolated lymphocytes مشيراً الى دوره في زيادة التعبير للسايتوكينات الالتهابية والموت المبرمج،اذ ان العقار يسبب زعزعة استقرار البلازما plasmalemmeal destabilizationوزيادة سيولة الغشاء membrane fluidity increase مما يسبب تنشيط مستقبلات الموت Fas/death receptors CDas وحصول هكذا تغيرات تنشط المسار الخارجي Extrinsic pathwayللموت المبرمج وتساهم في الموت الخلوي[30]

الاستنتاج

نستنتج من نتائج البحث الحالي ان عقار الكابابنتين له اثار سلبية على التركيب النسجي للكبد ويحفز مساري الالتهاب من خلال تحفيز الإنتاج المفرط لبروتين CASP1 والموت المبرمج من خلال تأثيره على مستوي التعبير عن البروتينات CASP3 و8 CASP ، اذ انه سبب تفاعلا مناعيا موجبا للبروتينات الانفة الذكر و تباينت شدته حسب التركيز المستخدم في الدراسة والفترة الزمنية قيد الدراسة في سايتوبلازم الخلايا الكبدية . وبهذا فأن استعمال هكذا عقاقير يجب ان يكون تحت الاشراف الطبي وحسب الفترات والجرعات الموصي بها .

شكر وتقدير

يتقدم الباحثان بجزيل الشكر الى جامعة الموصل و كلية التربية للعلوم الصرفة / موصل / العراق ، لما قدموه من دعم علمي وتسهيل مهمه عمل الباحثين لاتمام هذا البحث واظهاره على اتم وجه .

تضارب المصالح

لا يوجد تضارب للمصالح في البحث الحالي

المصادر

1) Wiebe S ,Tellez-Zenteno JF,Shapiro M .Management of a first seizume.An evidence-based approach to the first.Epilepsia.2008; 49(suppli):50-7. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2008.01451.x.
2) Atta lN,Cruccu,G,Baron R,Haanpaa,M,Hansson P,JensenTS,Nurmikko T .EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain.European Journal of Neurology. 2010;17(9):1113-Ie88.Doi;10.111lj.1468-
3) Taylor C P and Thorpe A J. Calcium channel alpha 2 -delta ligands: gabapentin and pregabalin. Edition: IIPublisher: Elsevier Ltd.2007 https://www.researchgate.net/publication/237837243-Calcium-channel-alpha-2-delta-ligands-gabapentin-and-pregabalin.
4) Hendrich J ,Van Minh,AT.,Heblich,F ,Nieto-Rostro,M ,Watschinger K ,Striessing J,Wratten j,Davies,A,Dolphin,A C.Pharmacological disruption of calcium channel trafficking by the alpha2delta ligand ganapentin.Proc-Natl Acad sci USA.٢٠٠٨;105(9):3628-33.Doi:10.1073lpnas.0708930105.

5) Wendy,B.(2008).internet article.veterianary partner.vin.com ldefault.aspx?pid=192398id=495256. Revieweed Revised. 2008;08 (11):2021.
6) Tanabe M,Takasu,K ,Kasuya N,Shimizu,S,Honda,M,Ono H. Role of descending noradrenergic system and spinal &2adrenergic receptors in the effects of gabapentin on thermal and mechanical nociception after partial nerve injury in the mouse.Br.J.Phsrmacol.2005;144:703-714.Doi:10.1038lsj.bjp.0706109.
7) Welson N N,Rofaeil R R,Ahmed S M,Gaber S S,Batiha G. Retracted: Vitamin E protects against gabapentin-induced chronic hepatic and renal damage associated with the inhibition of apoptosis and tissue injury in rats.Life science,2021; 267, 118940. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118940.
8) Patel R,Dickenson A H. Mechanisms of the gabapentinoidsand&2&-1 calcium channel subunite in neuropathic pain-pharmacol Res Perspect. 2016;4(2):eoo205-https://doi.org/10.1002/prp2.205.
9) Asconape J J.(2014).Use of antiepileptic drugs in hepatic and renal disease.Handb clin Neurol. 2014;119:417-417. https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4086-3.00027-8
10) Wiffen P J,Derry S,Bell R F,Rice A S,Tolle T R . Gabapentin for chronic neuropathic pain in adults. CDSR.2017; (6): CD007938. Doi: 10.1002/14651858.CD007938.pub4.

11) France L R,Leal M G,Sasso-Cerri E,Vasconcelos A,Debeljuk L, Russel L D . Cimetidine (Tagamet) Is a Reproductive Toxicant in Male Rats Affecting Peritubular Cells. Biol. Reprod .2001; 63(5): 1403–1412, https://doi.org/10.1095/biolreprod63.5.1403.

12) Adams E J A , Green J , Clark AH , Youngson J . Comparison of different scoring systems for immunohistochemical staining. J. Clin. Pathol.1999; 52. 75-7.Doi. 10.1136/jcp.52.1.75.

13) Rizzardi A E , Johnson A T , Vogel R I et al. Quantitative comparison of immunohistochemical staining measured by digital image analysis versus pathologist visual scoring. Diagn Pathol.2012; 7, 42 . https://doi.org/10.1186/1746-1596-7-42.

14) Elshal,M and Abdelmageed M E.(2022). Diacerein counteracts acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice via targeting NLRP3/caspase-1/IL-1β and IL-4/MCP-1 signaling pathways. Arch. Pharm. Res. 2022; 45, 142–158 . https://doi.org/10.1007/s12272-022-01373.

15) Ezhilarasan,D and Mary D J.(2020). Acetaminophen Induced Liver Injury: Metabolism and Inflammation Perspectives. Journal of Contemporary Issues in Business and Government, 2020; 26 (2): . DOI: 10.47750/cibg.2020.26.02.242.

16) Tilg H, Kaser A , Moschen A R.(2006). How to modulate inflammatory cytokines in liver diseases. Liver International, 2006; 26: 1029–1039. https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2006.01339.x

17) Seok J K, Kang H C,Cho Y Y,Lee H S , Lee J Y.(2021). Therapeutic regulation of the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases. Arch. Pharm. Res. 2021; 44, 16–35 . https://doi.org/10.1007/s12272-021-01307-9.

18) Tsukahara M and Kitazumi I . Regulation of DNA fragmentation: the role of caspases and phosphorylation. FEBS Journal ,2011; 287(3): 427-441. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07975.x

19) Youle R J and Martinou J C.(2011). Mitochondria in Apoptosis: Bcl-2 Family Members and Mitochondrial Dynamics. Developmental Cell,2011; 21(1):92-101 Doi:10.1016/j.devcel.2011.06.017.

20) Oz H S and Chen T S. Green-tea Polyphenols Downregulate Cyclooxygenase and Bcl-2 Activity in Acetaminophen-induced Hepatotoxicity. Dig Dis Sci. 2008; 53, 2980–2988 . https://doi.org/10.1007/s10620-008-0239-5.

21) Song G H,Huang F B,Gao J P ,Liu M L,Pang W B,Li W B,Yan X Y,Huo M J ,and Yang X . Effects of Fluoride on DNA Damage and Caspase-Mediated Apoptosis in the Liver of Rats.Biol Trace Elem Res. 2015; 166(2):173-82. Doi: 10.1007/s12011-015-0265-z .

22) Kabil S L . Diacerein Ameliorates Liver Ischemia Reperfusion Insult in Rats. Egypt. j. basic clin. pharmacol. 2018; 8 , Article ID 101371, 14 pages doi:10.11131/2018/101371.

23)Younis N N,Shaheen M A and Mahmoud M F. Silymarin preconditioning protected insulin resistant rats from liver ischemia-reperfusion injury: role of endogenous H2S. J. Surg. Res .2016; 204(2):398-409 https://doi.org/10.1016/j.jss.2016.04.069.

24) El-Sisi A,Hegazy S and El-Khateeb E.(2014). Effects of Three Different Fibrates on Intrahepatic Cholestasis Experimentally Induced in Rats.PPAR Research. 2013;(1). https://doi.org/10.1155/2013/781348.

25) Cao L , Ding W , Du J, Rui Jia , Liu Y , Zhao C, Shen Y , Yin G.(2015). Effects of curcumin on antioxidative activities and cytokine production in Jian carp (Cyprinus carpio var. Jian) with CCl4-induced liver damage. Fish & Shellfish Immunology. 2015;V 43, (1): 150-157. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.12.025.

26) Eguchi A,Wree A and Feldstein A E.(2014). Biomarkers of liver cell death .J. Hepatol. 2014;60(5). Doi:https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.12.026 .

27) Uneo M,Kakinuma Y ,Yuhi K I ,Murakoshi N,Lemitsu M.(2006). Doxorubicin Induces Apoptosis by Activation of Caspase-3 in Cultured Cardiomyocytes In Vitro and Rat Cardiac Ventricles *In Vivo*. J Pharmacol Sci , 2006; 101 (2): 151-158 . Doi: 10.1254/jphs.fp0050980

28) Barda L ,Uzi D,Scaiewicz V ,Mills M,Mueller,T,Gonzales-Rodriguez A.(2013). CHOP is a critical regulator of acetaminophen-induced hepatotoxicity. J. Hepatol.2013; 59(3): 495-503 https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.04.024.

29) Bagnoli M,Balladore E,Luison E,Alberti P,Raspagliesi F.(2007). Sensitization of p53-mutated epithelial ovarian cancer to CD95-mediated apoptosis is synergistically induced by cisplatin pretreatment. Mol Cancer Ther. 2007; 6 (2): 762–772. https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0357.

30) Maccio A and Madeddu C.(2013). Cisplatin: An old drug with a newfound efficacy – from mechanisms of action to cytotoxicity.Export Opinion,2013; 14(3) .Doi:10.1517/14656566.2013.813934.