دراسة مرضية وكيميائية نسجية على تأثير الميثونين كمضاد للاكسدة في نسيج كبد الارنب تجريباً♦

انتصار رحيم الكناني شهـلة عبد الله حسن

فرع علم الأمراض/كلية الطب البيطري – قسم علوم الحياة/كلية التربية

جامعة الموصل

ABSTRACT

This study conducted to induce the effect of DL-methionine as antioxidant on histochemistry as well as ability to induec histopathological changes in liver tissue of rabbit experimentally . In this study have used nine rabbit at weight rangine between 1100-1300 gm local breed (3 in each group) , divded into 3 groups 1st group considered as control 2nd group treated with 0.4 % DL-methionine while 3rd group treated with 0.8% DL-methionine .

Histological sections revealed histopathological lesions in liver at 0.8 % represented by vacuolar degeneration coagulative necrosis , portal fibrosis , hypertrophy in kupfer cells associated with hemosiderine pigmentation and invitation mononuclar inflammatony cells . In bile duct epithial hyperplasia , periductule cuffing of inflammatory cells have been seen .

Histochemically , results showed sever positive reaction with PAS and BC , moderatia positive reaction with AB at pH 2.5 and BC. When estimation Glutathion (GSH) in liver tissue the results showed significant decrease in GSH concentration in liver tissue at 0.8% of methionine as compared with control group.

الخلاصة

تضمنت هذه الدراسة معرفة تأثير الميثونين DL-methionine كمضاد للتأكسد في كيمياء النسيج فضلاً عن امكانيته في احداث آفات مرضية نسجية في كبد الأرنـب المعاملـة تجريبياً بتركيزين 0.4 و 0.8 % . استخدمت في هذه الدراسة تسعة أرانب محلية تراوحـت أوزانها بين 1000-1300 غرام قسمت عشوائياً الى ثلاث مجاميع (ثلاثة في كل مجموعة)

♦ البحث ملقى في المؤتمر الأول لعلوم الحياة في كلية التربية جامعة الموصل للفترة 4-5 أيلول 2007

مرضية نسجية في الكبد عند الجرعة 0.8 % تمثلت بوجود التنكس الفجوي vacuolar degeneration والتغير الدهني fatty change في هيولي الخلايا الكبدية مع نخر للخلايا الكبدية حول الوريد المركزي و خلايا كوبفر وترسب خضاب الهيموسيدرين فضلاً عن التليف حول القنوات والقنيوات الصفراوية وارتشاح للخلايا الالتهابية وحيدة النواة متمثلة بالخلايا اللمفية كما ولوحظ فرط تنسج الخلايا الظهارية المبطنة للقنيوات الصفراوية . اما في كيمياء النسيج فقد لوحظ وجود التفاعل الموجب الشديد جداً مع تقنية حمض فوق البريوديك Periodic Acid Schiffs (PAS) واسيتون اسود سودان (ABS) وتفاعل موجب معتدل مع تقنية الاليشيان الزرقاء $ABPH_{2.5}$ والبيست كارمين وعند قياس مستوى الكلوتاثايون Glutathione (GSH) فقد اظهرت النتائج انخفاض مستوى GSH بنسيج كبد الأرانب عند التركيز 0.8% مقارنة بمجموعة السيطرة .

المقدمة

يعد الميثونين Methionine احد الأحماض الامينية الأساسية الضرورية Essential amino acids الحاوية على مجموعة الكبريت او مصدراً للكبريت للعديد من المركبات ، يدخل في بناء البروتينات ويشترك في العمليات الايضية من خلال تجهيز الجسم بذرة الكبريت وتعمل على إزالة سمية العديد من المواد السامة والفضلات الايضية(1) ويحسن من وظائف الكبد الطبيعية اذ يستخدم في الدول الغربية لعلاج حالات تشمع الكبد Cirrhosis (2) والأذى الكبدي الناتج عن تعاطي الكحول(3) كما توضحت قابليته في تقليل التأثيرات الجانبية لبعض الأدوية مثل مضادات السرطان(4) ويعتبر الميثونين اساس في تحديد مستويات المركبات الحاوية في تركيبها على عنصر الكبريت ومنها الكلوتاثايون (GSH) ، ويعمل GSH على الاتحاد مع المركبات السامة وتكوين مركبات ذائبة في الماء تطرح عن طريق الكلية وبهذا يكون للميثونين تأثيرات وقائية على GSH حيث يمنع انخفاض مستواه في تركيز المواد الكيميائية السامة(5) . ولغرض معرفة هل للميثونين تأثيرات سلبية عند استخدامها بتراكيز مختلفة على نسيج الكبد صممت هذه الدراسة

المواد وطرائق العمل

استخدمت تسعة ذكور من الأرانب المحلية والتي تراوحت أوزانها بين 1000-1300 غرام تمت تربيتها في حقل كلية الطب البيطري / جامعة الموصل في غرفة خاصة تتوفر فيها الشروط الصحية من تغذية واضاءة وتهوية قسمت عشوائياً الى ثلاث مجاميع :

المجموعة الاولى - عدت مجموعة السيطرة اعطيت الماء والعلف الاعتيادي

المجموعة الثانية – اعطيت العلف المضاف اليه 0.4 % من الميثـونين مـع مـاء الـشرب الاعتيادي

المجموعة الثالثة – اعطيت العلف المضاف اليه 0.6 % من الميثونين مـع مـاء الـشرب الاعتيادي

وبعد مرور 21 يوماً من المعاملة تم تشريح الأرانب لملاحظة التغيرات المرضية العيانية ان وجدت وجمع نماذج الكبد وغمرها في محلول الفورمالين الدارئ المعتـدل 10% لمـدة 72 ساعة بعدها تم تمريرها في تراكيز تصاعدية من الكحول الاثيلي (70- 100%) لتحـضير قوالب شمعية وقطعت الى شرائح نسيجية سمك 4-6 مايكرون .

كما تم تحضير مقاطع نسجية لدراسة كيمياء النسيج حيث استخدمت الصبغات التالية للكـشف عن الكاربوهيدرات والدهون

تقنيات كيمياء النسيج

لدراسة المكونات الكيميائية النسجية تم استخدام تقنيات كيمياء النسيج على التوالي

1- تقنية حمض البريوديك شـيف Periodic Acid Schiffs Technique (PAS) (6) وتستخدم للكشف عن البروتينات السكرية .

2- تقنية PAS بعد الاسئلة Acetylation – PAS (7)

وتستخدم لتمييز نوع المادة الحامضية حيث تقوم الاسئلة بحجب مجموعة الالديهايـد glycol .

3- الاسئلة – الصوبنة Acetylation - saponification - PAS (7) .

4- تقنية ازرق الاليشيان عند الدالة الحامضية PH2.5 (Alecian Blue PH2.2) (6)

وتعتمد هذه التقنية على التفاعل بين محلول الكارمين مـع الـروابط الهيدروجينيـة الموجودة في الكلايكوجين .

5- تقنية المثيلة – ازرق الاليشيان Methylation - AB Ph 2.5

وتستخدم هذه التقنية للكشف والتمييز عن السكريات المتعددة المخاطيـة الكبريتاتيـة الحامضية الضعيفة والقوية (6).

6- المثيلة – الصوبنة – ازرق الاليشيان Methylation - saponification - AB Ph 2.5 (7)

ان عملية المثيلة تحجب الجذور الكربوكسيلية والكبريتاتية وعملية الصوبنة تعيد الجذور الكربوكسيلية فقط وهي تستعمل للتفريق بـين الـسكريات الـسامينية الـسكرية والكربوكسيلية والبروتينات السكرية الكربوكسيلية (تفاعل موجب) (6) .

7- تقنية بيست كارمين Best Carmine lechnique .

8- الكشف عن الكالسيوم باستخدام تقنية (8) Van kossa .

9- تقنية Vangieson للكشف عن التليف او ترسب الالياف الكولاجينية (8) .

10-الدهون استخدمت صبغة أسيتون سودان بلاك ب Aceton sudan black – B تستخدم للكشف عن الدهون غير مفسفرة (6) .

قياس مستوى GSH في كبد الأرانب

بعد الانتهاء من فترة المعاملة والبالغة 21 يوماً تم قتل الأرانب وعزل نسيج الكبد وحفظه في عبوات بلاستيكية جافة ونظيفة في المجمدة لغرض تقدير مستوى تركيز الكلوتاثايون حسب طريقة(9) ، وباستخدام المطياف الضوئي عند الطول الموجي 412 نانومتر تم حساب تركيز الكلوتاثايون في المعادلة الاتية .

$$\text{GSH cone (Mm/L)} = \frac{\text{Asample} - \text{blank}}{\text{Eoxl}} \times 10^6$$

$$\text{GSH cone (Mm/g tissue)} = \frac{\text{GSH (Mm/L)}}{\text{Eoxl}} \times D$$

Eo = Extinction coefficient = $13600M^{-1}\ cm^{-1}$
L = Light bath (cm)
D = Dilution factor = 6.25

النتائج والمناقشة Results and Discussion

التغيرات المرضية النسجية Histopathological changes

أظهرت المقاطع النسجية لكبد الأرانب المعاملة بالميثونين عند الجرعة 0.4 % وجود تغيرات تنكسية طفيفة تمثلت بالتنكس الفجوي والتغير الدهني(صورة -1) وهذا يعود إلى قابلية الميثونين على تحسين وظائف الكبد والإسراع في إزالة المواد السامة (1) وهذا يعني ان التركيز 0.4 % في الميثونين ليس له تأثير ضار على نسيج الكبد . اما بالنسبة للتركيز 0.8 % فقد أظهرت المقاطع النسجية وجود تغيرات مرضية شديدة تمثلت بالتنكس الفجوي والتغير الدهني الشديد ، فضلاً عن وجود تليف شديد حول القنوات والقنيوات الصفراوية عند الباحة البآبية sever fibrosis around bile lacuna and bile duct وتوسع الجيبانيات Dilation of sinusoid كما واظهرت بعض المقاطع وجود آفات من النخر التجلطي Coagulative necrosis حول الوريد المركزي فضلاً عن ارتشاح للخلايا الالتهابية وحيدة

النواة متمثلة بالخلايا اللمفية فضلاً عن ترسب خضاب الهيموسدرين وتضخم خلايا كـوبفر وفرط تنسج ظهارة القنوات الصفراوية (صورة 2 ، 3 و 4).

ان ظهور الآفات المذكورة انفاً عند استخدام الميثونين بالتركيز 0.8 % قد يعود الى امـتلاك الميثونين لظاهرة التحفيز التناوبي catalytically في عمل مضادات الأكسدة والتـي تعنـي انقلاب عمل الميثونين بشكل سلبي اذ يعمل على زيادة انتاج الليسثين ودهون مفسفرة اخـرى تعمل على زيادة انتاج الكوليسترول وعرقلة الوظائف الايضية للكبد مما يساعد على تحفيـز انتاج الدهون وتجمعها داخل هيولي خلايا الكبد وظهورها بهيئة تغير دهني فـضلاً عـن ان الجرع العالية من الميثونين تؤدي الى زيادة تصنيع الاستلين Acetyl co A المساعد والـذي يتحول الى كوليسترول لتكوين الكليسيريدات الثلاثية(10) .

ان وجود الآفات التنكسية والنخرية قد يعود الى قابلية هذه التراكيز على تحرير جذور الأوكسجين الحرة ومنها H2O2 ومشتقات الأوكسجين الوسطية والتي بدورها تعمـل علـى تزنخ الدهون فضلاً عن ان الميثونين امتلك قابلية تحطم جدار الخلايا الكبدية وخاصة حـول الأوردة المركزية مما يشير الى حدوث نقص في الأوكسجين hypoxia حيـث ذكـر احـد الباحثين قابلية الجرع العالية من الميثونين على تحطيم كريات الدم الحمر ممـا سـبب عـدم وصول الأوكسجين الى انسجة الخلايا (11) والتي ظهر في هذه الدراسة بشكل – Centero lobuler necrosis حيث تعد الخلايا الكبدية اخر جزء يصل اليه الدم المحمل بالاوكـسجين وأول جزء يظهر فيه الآفات النخرية عند حالات السموم (12) اما بالنسبة للتليف فقد يعـود الى قابلية الميثونين على تحفيز انتاج فيتامين C (13) والذي له تأثير في تحفيز انتاج الياف الكولاجين من قبل الاورمات الليفية ، وهذه تحتاج الى دراسة تفصيلية اخرى.

كيمياء النسيج

اظهر (جدول –1) تفاعلات نسيج كبد الأرانب المعاملة بالميثونين عند التركيـزين 0.4 و 0.8 مع التقنيات الخاصة بكيمياء النسيج ، اذ اظهر نسيج الكبد تفاعلاً موجب معتـدل وتفاعل موجب شديد جداً مع تقنية PAS مقارنة مع مجموعة السيطرة غير معاملة اذ ظهـر التفاعل موجب (الصورة – 5) الذي اعطى لوناً احمر غامق مما يشير الى قابلية الميثونين على الاسراع في وظائف الكبد ومنها ايض الكربوهيدرات مما سبب ترسب عديد الـسكرايد المخاطي البروتيني وبعض الدهون السكرية glycolipid وهي تشابه نتائج الباحـث (14) الذي اشار الى وجود التفاعل الموجب مع تقنية PAS ، ولتميز نوع المادة المخاطية فيها تـم استخدام عملية الاستلة لحجب مجاميع glycol 1:2 اذ اظهر التفاعل سالب مع تقنية PAS اما بعد اجراء الاستلة تبعتها الصوبنة و PAS فقد عاد التفاعل اذ ظهر موجب شديد جـداً(15)

ولتفرقة وتحيد نوع المادة المخاطية متعددة السكريات استخدمت تقنية AB عند الدالة الحامضية 2.5 وظهر التفاعل موجب معتدل عند التركيز 0.4 وموجب شديد عند التركيز 0.8 % مما يشير ذلك الى ظهور المواد المخاطية الحامضية ذات الكريت وذات مجاميع الكربوكسيلCOO وتم التأكيد من وجود هذه المادة بعد اجراء عملية المثيلة تبعها صوبنة مع AB عند الدالة الحامضية 2.5 (صورة – 6) . ان هذه النتائج تؤكد على ان التفاعل كان صحيحاً وذلك لكون الميثونين له القابلية على تزويد الجسم بالكبريت وهذا يعني هناك فائض في انتاج الكبريت (1) والتي قد يكون لها القابلية على التفاعل لتكوين استرات الكبريت المثيلة الحرة وهي جزء من تفاعل الاستلة و الصوبنة .

ازدادت شدة التفاعل عند التركيز 0.8% مع التقنية المذكورة انفاً بالمقارنة مع مجموعة السيطرة . اما بالنسبة للكلايكوجين فقد اظهر الجدول (1) وجود تفاعل موجب معتدل وموجب شديد لتقنية ابيست كارمين مع كبد الأرانب المعاملة بالميثونين عند التركيزين 0.4 و 0.8 على التوالي اذ ظهر باللون الأحمر الوردي (صورة – 7) مقارنة مع مجموعة السيطرة ، تشير هذه النتائج الى ان للميثونين دور في تحفيز الوظائف الكبدية ومنها ايض وخزن الكلايكوجين .

الدهون :

يبين (الجول – 1) وجود تفاعل موجب شديد جداً لخلايا الكبد مع تقنية اسيتون سودان بلاك عند التركيز 0.8 بينما عند التركيز 0.4 كان التفاعل موجب مقارنة مع مجموعة السيطرة ان النتائج التي تم الحصول عليها جراء تأثير الميثونين خصوصاً عند التركيز 0.8 % يؤكد وجود التغير الدهني الشديد severe fatty change والتي لوحظ تجمعات للقطيرات الدهنية في هيولي الخلايا الكبدية (الصورة – 8) تفسر هذه النتائج الى ان الميثونين تأثير على زيادة تكوين الكوليسترول والكليسيرايدات الثلاثية في المصل والأنسجة ومنها نسيج الكبد وهذا ما اكده الباحثان (12) و (13) .

الكالسيوم :

أظهرت النتائج عدم وجود ترسب لأملاح الكالسيوم في نسيج الكبد عند التركيزين 0.4 0.8 مقارنة مع مجموعة السيطرة ولا توجد دراسات سابقة حول تأثير الميثونين على الكالسيوم في الأنسجة .

الألياف :

أظهرت نتائج تفاعل نسيج الكبد عند التركيز 0.8 % مع تقنية Van Gieson وجود ترسب للألياف الكولاجينية حول القنوات والقينوات الصفراوية.

مستوى تركيز الكلوتاثيون GSH

اشارت النتائج في (الجدول – 2) ان مستوى تركيز GSH بنسيج الكبد قد ارتفع معنوياً عند مجموعة الأرانب المعاملة بالميثونين بتركيز 0.4 بينما اظهر انخفاضاً معنوياً عند مجموعة الأرانب المعاملة بالميثونين عند التركيز 0.8 % مقارنة مع مجموعة السيطرة عند مستوى ($P \leq 0.05$) . تشير هذه النتائج الى قابلية الميثونين كمضاد للاكسدة من خلال رفع GSH في كبد الأرانب وهو يطابق ما اشار اليه الباحثان (16) . على ان استخدام الميثونين بتركيز 0.3 غم / كغم عليقة أدى الى رفع مستوى GSH الكبد والقلب في الجرذان المصابة بجرثومة *E. coli* . وأوضح الباحث ؟(18) دور الميثونين في زيادة انتاج الكلوثايون المختزل GSH – P في انسجة افراخ الدجاج خلال الأسابيع الثلاثة في عمر الافراخ عند اضافة 5 غم / كغم من العليقة . وأوضح (19) ان اضافة 0.6 % من الميثونين الى العلف ادى الى زيادة الوزن وخفض مستوى المالونداياالديهايد فضلاً عن رفع مستوى GSH الكبد والقلب والابهر وذلك قد يعود الى استنزاف مستوى GSH في الزيادة او التركيز السمي للميثونين وتاثيره على الكبد مما سبب في خفض مستواه .

جدول (1) : مستوى أو تركيز GSH بنسيج كبد الأرانب المعاملة الميثونين بتركيز 0.4 % و 0.8 % مقارنة مع مجموعة السيطرة.

المجاميع / الكبد	GSH Mm / gm نسيج رطب
مجموعة السيطرة	12.58 ± 0.22 a
مجموعة الأرانب المعاملة بالميثونين بتركيز 0.4	13.02 ± 0.21 b
مجموعة الأرانب المعاملة بالميثونين بتركيز 0.8	8.21 ± 18.2 c

القيم معبر عنها بالمعدل ± الخطأ القياسي

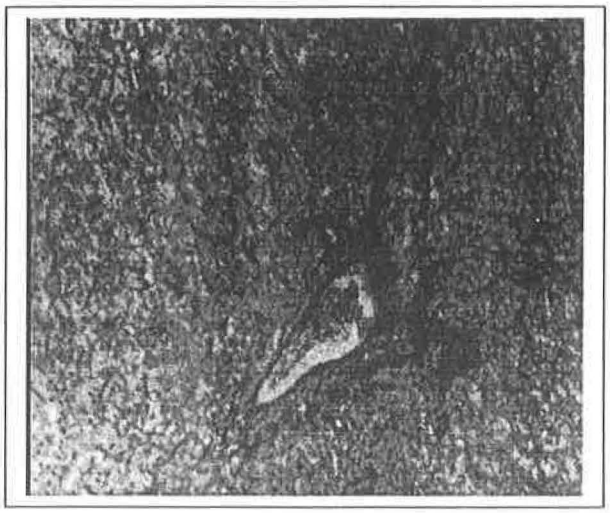
عدد الحيوانات = 3 أرانب لكل مجموعة

جدول (2) : تفاعلات تقنيات كيمياء النسج الخاصة بالكربوهيرات والدهون والكالسيوم لنسيج كبد الأرانب المعاملة بالميثونين عند التركيزين 0.4 و 0.8 % .

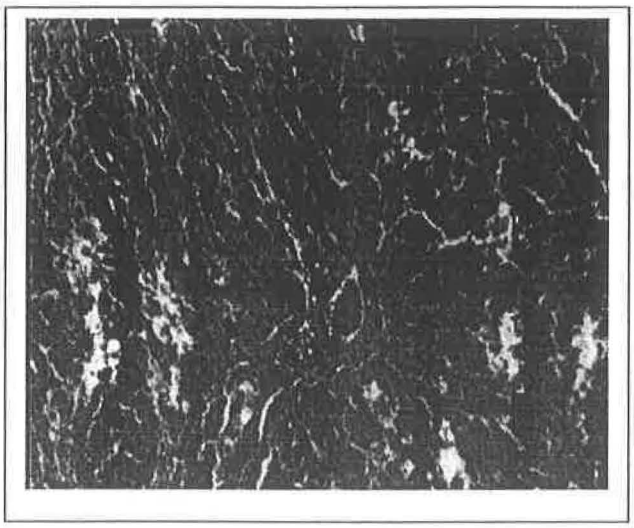
التقنية	المجاميع		
	كبد مجموعة الأرانب مجموعة السيطرة	كبد مجموعة الأرانب المعاملة 0.4% ميثونين	كبد مجموعة الأرانب 0.8% ميثونين
الكاربوهيدرات			
PAS	+	++	++++
الاستلة – PAS	–	–	–
الاستلة – الصوبنة PAS	+	++	++++
Best carmine	+	++	+++
الاليشيان الزرقاء PH2.5	±	++	+++
المثيل – AB Ph2.5	–	–	–
المثيل – صوبنة– AB Ph2.5	±	++	+++
الدهون			
اسيتون اسود سودان B	–	+	++++
الكالسيوم			
الفون كوسا	–	–	–
الالياف			
فان كيزن	+	+	++

شدة التفاعل : الموجب الشديد جداً ++++ الموجب الشديد +++ المعتدل ++ تفاعل الموجب +

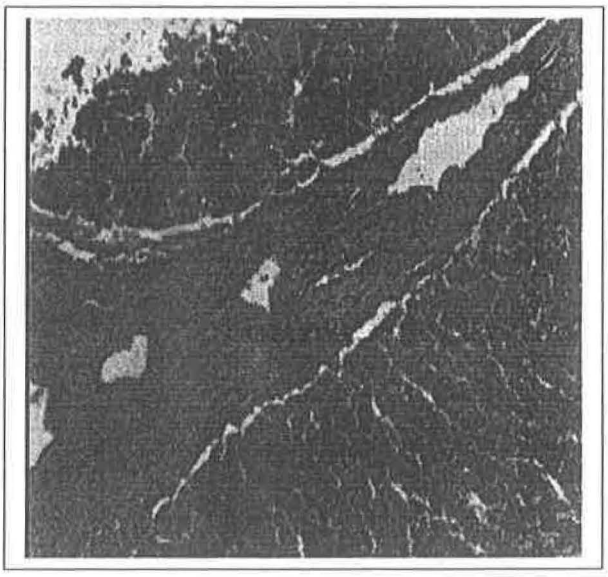
تفاعل سالب – تفاعل متغاير ±



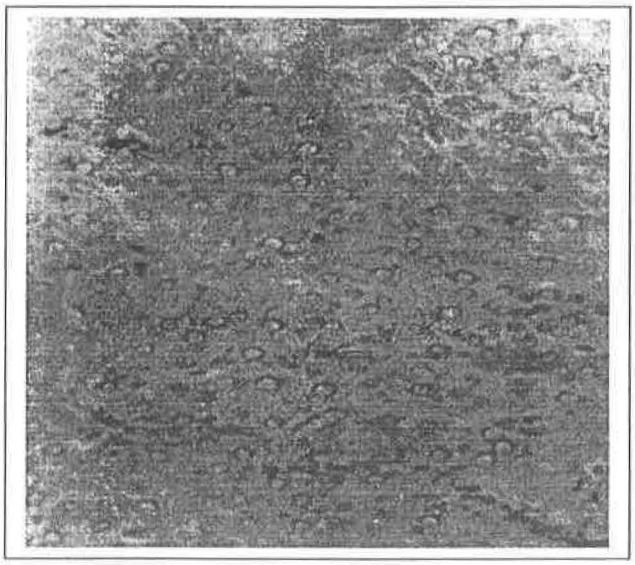
صورة (1) مقطع نسيجي لكبد أرنب معامل بالميثونين بتركيز 0.4 % يوضح التنكس الفجوي والتغير الدهني الطفيفين (1,2) H&E x100



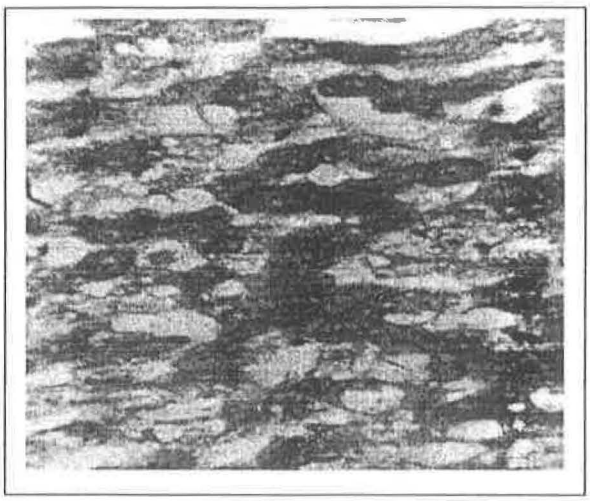
صورة (2) مقطع نسيجي لكبد ارنب معامل بالميثونين بتركيـز 0.8 % يوضح التنكس الفجوي الشديد (1) والتغير الـدهني (2) H&E x400



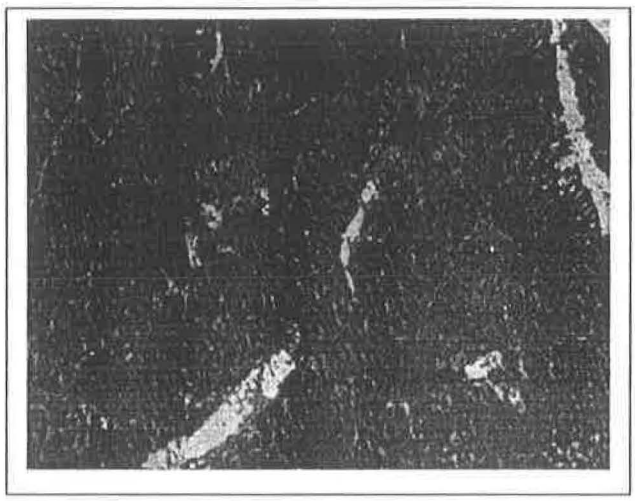
صورة (3) توضح التليف حول القنوات والقنيوات الصفراوية (1) وارتشاح للخلايا الالتهابية وحيدة النواة (2) H&E x400



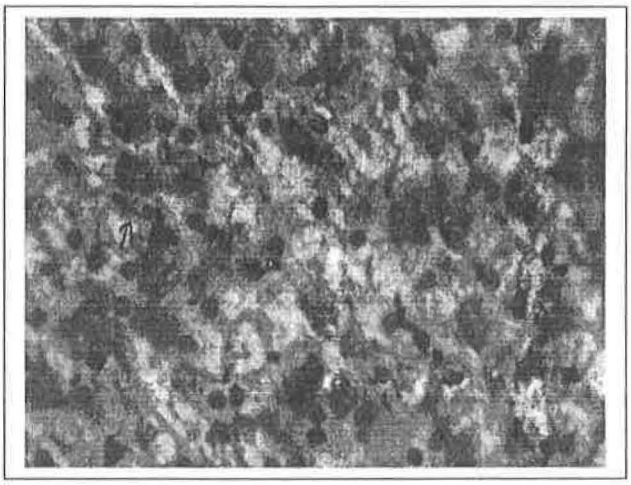
صورة (4) توضح ترسب خضاب الهيموسيدرين في نـسيج الكبـد (خلايا كوبفر) (→) H&E x400



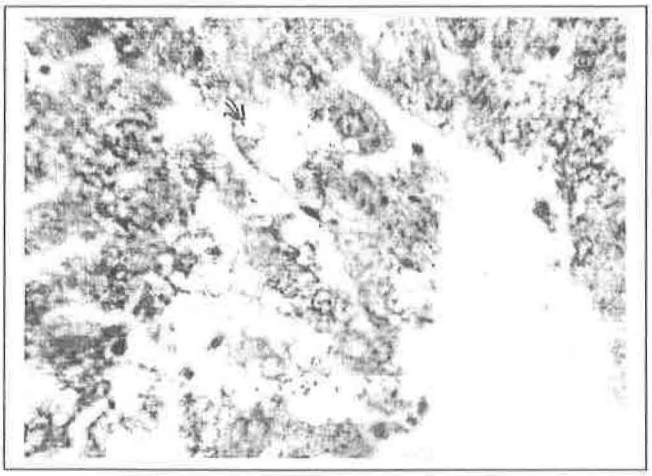
صورة (5) توضح التفاعل الموجب الشديد جداً مع تقنية PAS x400 H&E



صورة (6) توضح التفاعل الموجب المعتدل مع تقنية AB عند الدالة الحامضية 2.5 تقنية AB H&E x400



صورة (7) توضح التفاعل الموجب المعتدل مع تقنية H&E BC x400



صورة (8) توضح التفاعل الموجب الشديد مع تقنية اسيتون اسود سودان H&E x400

المصادر

1- Brown R. , Carol , C . and Teodoro , B. Stop depression now . New York . Putnam Publishing .1999

2- Metoe J. M. ; Camara , J. ; Fernander D. E. and Paz , J. F. J. Hepatol ..55:415-25. (1999).

3- Lieber , E.S. and Herman , A. L. Am . J. Clin Nutr. 58 : 430-42 . (2001)

4- Restord ; Rho , M. ; Dewan D. ; Herbest , L. ; Stup A. K. and Zurk L. Neurotoxicology. 20 : 731 – 48. (1997)

5- Fuchs , C. S. . J. Nutr.. 131 : 3135 . (2001)

6- Pears , A. G. E. 4thed . Analyteal Technology , Churchill Livigstone , Edin burgh , 1-2 , 149.

7- Culling , C.A.; Allison , R. T and Barr , W.T.cellular pathology technique 4th ed. Buttworth London(1985).

8- Luna , L. G. . Mc-Graw – Hill Book Company . New york (1968) .

9- Morone (1979).

10- Davis J. and Little wood , B.S. NC Engle wood cliffs , Newjersy pp:163-172 . .(1979).

11- Pillips , M. and Baetz , A. . Plenum press Newyork , London ,.135: 63-99. (1980)

12- الملاح والكناني المجلة العراقية للعلوم البيطرية(2004) .

13- زكي ، احمد محمد . تاثير الثاوين والميثونين على مستوى بعض مضادات الأكسدة في الجرذان المعرضة للإجهاد التاكسدي بيروكسيد الهيدروجين. ، رسالة ماجستير ، كلية الطب البيطري ، جامعة الموصل (2007).

14- Apompella , E. ; Maellavo ; Afcasi , C. I. and M. Comport . Am J. Of Patho .. 129: 259 -301 (1987).

15- Barka Anderson , D. J. New york , Evanston London . (1963) .

16- الكناني والملاح المجلة العراقية للعلوم البيطرية (2005)

17- Al- Hamadan and Grimble , R. F. Int , J. Vitaar . Netr . Res . 73 : 468 – 77. (2003).

18- Nemethk ; Mezes M. ; Gaal F. ; Balogh K. and Husveth . Animal Physiol . Acta , Vet . Hung. 52 : 369- 378 . (2004)

19-الكناني ، انتصار رحيم عبيد . دراسة قابلية الأذى التاكسدي لبيروكسيد الهيدروجين في إحداث التصلب العصبي تجريبياً في أفراخ الدجاج .. أطروحة دكتوراه ، كلية الطب البيطري ، جامعة الموصل(1998) .