

هرمون الجريلين مقابل الخلايا الجذعية وتأثيرهما التآزرى على الجرذان المصابة  
باحتشاء عضلة القلب المحدث تجريبيا

رسالة

توطئه للحصول على درجة الدكتوراه فى الفسيولوجيا (علوم طبية اساسية)

مقدمه من

الطبيبة/ كرسينا صبرى يعقوب

مدرس مساعد بقسم الفسيولوجيا الطبية كلية الطب جامعة الفيوم

تحت اشراف

الأستاذ الدكتور/ حامد محمد عثمان

أستاذ الفسيولوجيا الطبية

كلية الطب – جامعة الازهر

الاستاذة الدكتورة / امانى محمد الامين

استاذ ورئيس قسم الفسيولوجيا الطبية

كلية الطب – جامعة الفيوم

الاستاذة (م.) دكتورة/ ايمى فخرى بشرى

استاذ مساعد الفسيولوجيا الطبية

كلية الطب- جامعة الفيوم

الاستاذة الدكتورة/ عزة محمد الامير

استاذ كيمياء حيوية طبية وبيولوجيا جزئية

كلية طب جامعة الفيوم

كلية الطب

جامعة الفيوم

٢٠٢٣

## الملخص العربي

ستظل أمراض القلب والأوعية الدموية واحدة من أخطر المشاكل الصحية، مما يمثل معدلات عالية من الأمراض والوفيات في جميع أنحاء العالم. تحدث الإصابة القلبية نتيجة إلى نخر الخلايا العضلية، موت الخلايا المبرمج، زيادة نفاذية الأغشية وإطلاق منتجات تحلل التروبونين المحللة للبروتين. قد تحدث إصابة عضلة القلب استجابةً لنقص تروية عضلة القلب أو الأدوية أو نتيجة لعوامل عديدة كما هو الحال في إصابة الكلى والانسداد الرئوي.

تم اكتشاف الآثار الواقية للقلب لهرمون الجريلين من خلال آثاره المضادة للالتهابات ومضادة لموت الخلايا المبرمج ومن خلال تثبيط تنشيط العصب السمبثاوي والخلل البطاني. أظهرت الخلايا الجذعية الوسيطة القدرة على التمرکز داخل الأنسجة التالفة والمصابة بنقص التروية والتي تفرز فيها عوامل النمو، وعوامل تكوين الأوعية الدموية الجديدة، والعوامل المضادة لموت الخلايا المبرمج، والجزيئات المتجددة التي يمكن أن تعزز تجديد الأنسجة.

كان الهدف من هذه الدراسة هو مقارنة الدور الوقائي المحتمل للجريلين بالخلايا الجذعية الوسيطة المأخوذة من الحبل السرى (هلام وارتون) مع إبراز الآليات الكامنة المحتملة. بالإضافة إلى تأثيرهما التآزري معا في علاج عضلة القلب المصابة بالاحتشاء التي يسببها الدوكسوروبوسين في ذكور الفئران البيضاء.

تضمنت هذه الدراسة اربعين من الفئران البيضاء تم تقسيمها عشوائيا الى خمس مجموعات يحتوى كل منها علي ثمانى فئران:

- ١- المجموعة الاولى(المجموعة الضابطة):تم حقن فئران هذه المجموعة بمحلول ملح مرة واحدة داخل تجويف البطن بجرعة ١ مل/كجم.
- ٢- المجموعة الثانية (مجموعة عضلة القلب المصابة):تم احداث الاصابة عن طريق حقن الفئران بالدوكسوروبوسين مرة واحدة بجرعة ٢٥ مجم/كجم داخل تجويف البطن وهي الجرعة المثبتة لاحداث ضرر بعضلة القلب.
- ٣- المجموعة الثالثة (مجموعة عضلة القلب المصابة المعالجة بالجريلين): تم حقن الجريلين بجرعة ١٥٠ ميكروجم/كجم تحت الجلد مرة واحدة قبل احداث اصابة عضلة القلب بيوم واحد وتم احداث الاصابة كما ذكر في المجموعة الثانية
- ٤- المجموعة الرابعة (مجموعة عضلة القلب المصابة والمعالجة بالخلايا الجذعية الوسيطة): تم حقن الخلايا الجذعية بجرعة ١ X 610 X ٠.٥ مل محلول ملحي) داخل الوريد الذيلي ثلاثة ايام قبل حقن الدوكسوروبوسين. تم احداث الاصابة كما ذكر في المجموعة الثانية
- ٥- المجموعة الخامسة (مجموعة عضلة القلب المصابة بالمعالجة بالجريلين والخلايا الجذعية الوسيطة): تم حقن كل من الخلايا الجذعية ثم الجريلين ؛ ثلاثة ايام ويوم واحد بالترتيب قبل حقن الدوكسوروبوسين بالجرعات المذكورة سابقا. تم احداث الاصابة كما ذكر في المجموعة الثانية.

في نهاية التجربة وبعد تقييم معايير أداء القلب وهي (الجزء المقذوف للبطين الأيسر، التقصير الجزئي)، الضغط المطور للبطين الأيسر، المعدل الأقصى لارتفاع ضغط البطين الأيسر ومعدل ضربات القلب. تم جمع عينات الدم والأنسجة من جميع الحيوانات. وفي كل المجموعات الخمس المدروسة، تم قياس مستويات إنزيمات القلب: (كرياتين كيناز، لاكتات ديهيدروجينيز، تروبونين - سي) في البلازما بالإضافة الي قياس المؤشرات الحيوية المؤكدة والتي تتضمن (مالونديالدهايد، كاتالاز، سوبراوكسيد ديسميوتاز) في كل من البلازما وأنسجة القلب. علاوة على ذلك، تم الكشف عن نشاط البروتين في المؤشرات الحيوية الدالة على موت الخلايا المبرمج (بي - سي - ل ٢ وبي ٥٣ وكاسباز ٣) في أنسجة القلب. واخيرا تم إجراء كل من الفحص النسيجي لنسيج القلب باستخدام صبغتي هيماتوكسيلين واوسين وماسون ثلاثي الالوان والكشف الكيميائي المناعي لـ العامل النووي المرتبط بعامل الكريات الحمر ٢ (ان-ار-اف ٢)، وهيماتوكسيناز

أظهرت النتائج أن مجموعة عضلة القلب المصابة حدث بها زيادة ذات دلالة احصائية في انزيمات القلب في البلازما، وزيادة مستويات المالونديالدهايد في البلازما وأنسجة القلب وبي ٥٣ وكاسباز ٣ في أنسجة القلب وايضا زيادة في معدل ضربات القلب، بينما حدث انخفاض ذو دلالة احصائية في مستويات الكاتالاز، سوبراوكسيد ديسميوتاز في البلازما

والقلب، ومستويات بي- سي - ال ٢ القلبية والجزء المقنوف للبطين الأيسر، التنصير الجزئي، الضغط المطور للبطين الأيسر، المعدل الأقصى لارتفاع ضغط البطين الأيسر مقارنة بالمجموعة الضابطة. حيث اثبت ان الدوكسوريوبوسين يسبب تليف القلب من خلال التراكم المفرط للخلايا الليفية وتكوين الندبات التي تؤدي إلى زيادة تصلب القلب وتقليل الانقباض.

اظهرت المجموعات التي عولجت من إصابة عضلة القلب سواء كانت بالجريلين أو بالخلايا الجذعية أو بالاثنتين معا زيادة ذات دلالة احصائية للكاتالاز، سوبراوكسيد ديسميوتاز في كلا من البلازما والقلب ومستوى بي- سي- ال ٢ بالقلب، الجزء المقنوف للبطين الأيسر، التنصير الجزئي، الضغط المطور للبطين الأيسر، المعدل الأقصى لارتفاع ضغط البطين الأيسر، وفي الوقت نفسه تسببوا في انخفاض ذو دلالة احصائية في مستويات كرياتين كيناز، لاكتات ديهيدروجيناز، تروبونين - سي في البلازما، كلا من (مالونديالدهايد، ومستويات بي ٥٣) في البلازما والقلب، ومستوي كاسباز ٣ بالقلب ومعدل ضربات القلب مقارنة بمجموعة عضلة القلب المصابة غير المعالجة. حيث يمكن للخلايا الجذعية أن تتمايز وتنصرف ميكانيكياً وكهربائياً كخلايا عضلة القلب الأصلية.

لم تظهر نتائج مجموعات العلاج الفردي سواء باستخدام الجريلين أو الخلايا الجذعية اي دلالة احصائية في معظم المتغيرات مقارنة بالمجموعة الضابطة باستثناء الفرق الملحوظ ذو الدلالة الاحصائية في مؤشرات موت الخلايا المبرمج في أنسجة القلب ومالونديالدهايد في كلا من البلازما والقلب في المجموعتين المعالجتين بالجريلين والخلايا الجذعية مقارنة بقيمهم في المجموعة الضابطة. كما لوحظ اختلاف ذو دلالة احصائية في المجموعة المعالجة بالخلايا الجذعية فيما يتعلق بمستويات المالونديالدهايد في البلازما والقلب، ومستوى الكاتالاز بالقلب، ومستوى السوبراوكسيد ديسميوتاز في البلازما ومعدل ضربات القلب عند مقارنتها بالمجموعة الضابطة. التأثير الوقائي للجريلين ضد إصابة القلب يحدث من خلال تثبيط إنتاج انترلوكين- ٦ القلبي، والذي بدوره ينشط إشارات جاك ٢ / ستيبت ٣ في القلب.

فيما يتعلق بنتائج إنزيمات القلب وعلامات الأوكسدة لم يكن هناك تغيير ذو دلالة احصائية في مجموعة العلاج المشترك بالجريلين والخلايا الجذعية مقارنة بالمجموعات المعالجة بكل على حدة، بينما لوحظ اختلاف ذو دلالة احصائية في مؤشرات موت الخلايا المبرمج في أنسجة القلب في مجموعة العلاج المشترك مقارنة بمجموعات العلاج الاحادي مما يشير إلى تفوق تأثير العلاج المشترك على تأثير كلا من الجريلين أو الخلايا الجذعية على حدة في التخفيف من عملية موت الخلايا المبرمج. لم يظهر تأثير اكبر في مجموعة العلاج المشترك من المجموعات المعالجة احاديا، ويرجع ذلك لان العلاج الفردي، سواء عن طريق الجريلين وحده أو الخلايا الجذعية وحدها، أدى إلى تحسين غالبية العلامات الحيوية وقربها من مستوياتها الطبيعية كما هي في المجموعة الضابطة.

وفقاً لفحص الانسجة باستخدام صبغتي الهيماتوكسلين والايوسين كان في المجموعة المصابة اضطراب في بنية عضلة القلب: مثل نموج ألياف عضلة القلب، وتطرف النوى داخل الخلايا (نوى متضخمة محيطية)، بالإضافة الي احتقان عدد كبير من الأوعية الدموية، وتسلل خلايا الالتهاب. بينما لوحظ تحسنا في السمات المرضية النسجية في المجموعة المعالجة بالجريلين حيث أظهرت نوى مركزية الموقع وعدد قليل من الأوعية الدموية المحتقنة. كما لوحظ في كل من مجموعة الخلايا الجذعية ومجموعة العلاج المشترك، كانت ألياف عضلة القلب مرتبة بشكل منظم مع ظهور التخطيط الطبيعي للعضلة، ونوى حويصلية مركزية، واختفاء كل من تسلل الخلايا الالتهابية والتنكس الفراغي والحد الأدنى من احتقان الأوعية الدموية.

لوحظ ايضا تحسين ذو دلالة احصائية في نسبة ترسب الكولاجين التي تم اكتشافها بواسطة صبغة ماسون ثلاثي الالوان في المجموعة المصابة مقارنة بمجموعات العلاج الثلاثة عن طريق العلاج إما باستخدام الجريلين أو الخلايا الجذعية أو كلاهما، ومع ذلك لا يزال هناك فرق ذو دلالة احصائية بين مجموعات العلاج الثلاث والمجموعة الضابطة مع عدم وجود فرق بين مجموعة الخلايا الجذعية ومجموعة العلاج المشترك.

فيما يتعلق بالكشف المناعي الكيميائي النسيجي للعامل النووي المرتبط بعامل الكريات الحمر ٢ (ان-ار-اف ٢) ؛ تم اكتشاف زيادة ذو دلالة احصائية في النشاط المناعي له في السيتوبلازم والنواة في المجموعة المصابة مقارنة بفقران المجموعة الضابطة التي أظهرت التعبير السيتوبلازمي فقط، في حين لوحظ انخفاضا ذو دلالة احصائية في المجموعة المعالجة بالجريلين مقارنة بالمجموعة المصابة ولكن لا يزال يتم التعبير عنه في كل من السيتوبلازم والنواة.. أسفر العلاج بالخلايا الجذعية سواء مفردة او في العلاج المشترك عن زيادة كبيرة في النشاط المناعي السيتوبلازمي والنووي ان - ار - اف ٢ مقارنة بالمجموعات المصابة والضابطة والمعالجة بالجريلين، مع عدم ملاحظة أي فرق بين مجموعتي الخلايا الجذعية.

أما بالنسبة للنشاط المناعي السيتوبلازمي ل هيموكسيجيناز ١، فقد لوحظت زيادة نو دلالة احصائية في نسبة النشاط المناعي السيتوبلازمي لهيموكسيجيناز ١ في المجموعة المصابة مقارنة بالمجموعة الضابطة مع انخفاض في مستويات الهيموكسيجيناز ١ في السيتوبلازم لمجموعات العلاج الثلاث. ومع ذلك، لا يزال هناك فرق ملحوظ بين مجموعات العلاج والمجموعة الضابطة وكذلك بين مجموعات العلاج الثلاث نفسها.

#### الخلاصة:

٢] تحسنت تقريبا كل المؤشرات الحيوية لتلف عضلة القلب والمؤشرات الحيوية للإجهاد التأكسدي ووظيفة البطين الأيسر التي تم تقييمها بواسطة معايير أداء القلب وكذلك التغيرات النسيجية المرضية وترسب الكولاجين الملحوظ في مجموعات العلاج الثلاث بشكل ملحوظ عند مقارنتها بمتوسط القيم المقابلة في مجموعة إصابة القلب غير المعالجة. لم يُلاحظ تقريبا أي دور متفوق لمجموعة العلاج المشتركة فوق مجموعات العلاج الاحادية.

٢] أظهر العلاج المشترك تأثيراً متوقفاً فوق تأثير العلاج الاحادى (بالجرلين او الخلايا الجذعية) في التخفيف من عملية موت الخلايا المبرمج من خلال التحسن في المؤشرات الحيوية الدالة على موت الخلايا المبرمج داخل انسجة القلب.

٢] تم تحسين التعبير السيتوبلازمي والنووي للعامل النووي المرتبط بعامل الكريات الحمر

(٢) ان- ار- اف (٢) وكذلك التعبير السيتوبلازمي ل هيموكسيجيناز ١ بواسطة الكشف الكيميائي المناعي في مجموعات العلاج الثلاث. أظهرت المجموعات المعالجة بالخلايا الجذعية (المجموعة الرابعة والخامسة) على وجه الخصوص نشاطاً مناعياً معززاً ل (ان- ار- اف ٢) الذي يلقي الضوء على الدور المحتمل الذي تلعبه الخلايا الجذعية في تخفيف التأثير الضار التأكسدي لدوكسوريوبيسين على عضلة القلب.