

دراسة التأثير النسجي لكبد الفأر الأبيض المصابة تجريبياً بفطر *A.fumigatus* والمعامل بـ *Trametes sp.* و *Amphotericin B*

هديل عبد الله صالح^{1*}, خلود ناجي رشيد¹, ميلاد عدنان مزهر²

1- قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة تكريت. صلاح الدين، العراق. (abdullahhadeel95@yahoo.com)

1- قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة تكريت. صلاح الدين، العراق. (Khuloodnaji@yahoo.com)

2- قسم علوم الحياة، كلية التربية للعلوم الصرفة. جامعة تكريت. العراق. (Miladadnan@tu.edu.iq)

الخلاصة:

هدفت الدراسة لمعرفة التغيرات النسجية في كبد الفئران البيض المصابة بفطر *Aspergillus fumiagatus* بطريقة الحقن داخل الصاق والغرس داخل الأنف وعلاجها بالمضاد الفطري B *Amphotericin* والمخلص الكحولي لفطر *Trametes sp.* وقد أوضحت النتائج أن الفطر *A.fumigatus* سبب إلى حدوث افات نسجية متمثلة في تتكس. بتخر. الخلايا الكبدية تحمل دموي. ارتشاش كبير للخلايا الالتهابية. انفصال الخلايا البطانية لبطانة الوريد المركزي، بينما الكبد لمجاميع الفئران المصابة والممعالج بـ *Amphotericin b* *Amphotericin B*، المستخلص الكحولي للفطر *Trametes sp.* بينت تحسنا ملحوظاً إذ تتكس. بتخر. عدد من خلايا الكبدية تتغاظل نوى منها. تتضخم عدد من خلايا كوفر. توسيع بعض الجيبانيات الدموية. وفي مقاطع نسيجية أخرى ظهر نسيج الكبد شبه سويا.

معلومات البحث:

تأريخ الاستلام: 2020/12/29

تأريخ القبول: 2021/02/28

الكلمات المفتاحية:

Aspergillus
Amphotericin B; *fumigatus*
, *Trametes sp.*.، الكبد.

المقدمة:

يعد فطر *Aspergillus fumigatus* أكثر الفطريات الممرضة الإنتهازية، وينتشر بشكل واسع في الطبيعة لاسيما في التربة، الماء، المواد المتعفنة، ويكون قادرًا على النمو بدرجات حرارة عالية [2,1]. ويسبب مجموعة من الأمراض في المُثبّطين مناعيًّا كمستلقي نقل الأعضاء، المصابين بمرض نقص المناعة المكتسب HIV، سرطان الدم، ويكون مرضًا أكثر ويسبب ما يسمى بداء الرشائيات Aspergillosis والذي يصف مجموعة كبيرة من الأمراض الفطرية الغازية [3]. تحدث الإصابة بواسطة استنشاق سبورات الفطر التي تكون صغيرة جدًا لتصل إلى الأنساخ الرئوية للجهاز التنفسى. توجد هذه الأبواغ في الهواء الجوى، عادةً يتم استنشاق عدة مئات منها يومياً، ويتم الإزالة بسرعة بواسطة الجهاز المناعي في الأفراد الأصحاء.

بالنظر لزيادة استعمال الأدوية المثبطة المناعية في الفترة الأخيرة لمعالجة بعض الأمراض، فإن *A.fumigatus* يكون مسؤولاً على أكثر من (6000.00) حالة وفاة سنويًا بمعدل وفيات (25-90%) [4]. إن استعمال الأدوية المضادة للفطريات مثل B *Amphotericin* يمثل الخيار الأفضل لعلاج الإصابات الفطرية الرئوية لفترات طويلة [6,5]. إلا أن زيادة مقاومة المضادات الحيوية وسميتها لا زالت العوائق الأساسية ضد الحصول على التأثيرات العلاجية، لهذا كان من الضروري البحث عن مواد آمنة وفعالة ضد الأمراض المعدية كالفطريات الكبيرة ومنها الفطر *Trametes sp.* [8,7]، والذي يمثل أحد الفطريات الكبيرة ذي القيمة الغذائية الغنية بالبروتينات، والمركبات الفعالة ويماك خصائص علاجية مهمة كنشاطه المضاد للأحياء المجهرية، للإنتهاكات، للأكسدة، وللسرطان [9].

يتواجد الكبد في الجزء العلوي الأيمن من التجويف البطني، إذ يحتل المنطقة اليمنى تحت الأضلاع *hypochondrium* وتحت الحجاب الحاجز مباشرةً، وله فصان رئيسان: أيمن وأيسر، الفص الأيمن أكبر من الأيسر، إذ يقع فوق الانتوء القولوني الأيمن والكلية اليمنى، في حين يقع الفص الأيسر فوق المعدة. ويُمثل الكبد أكبر غدد الجسم إذ يزن حوالي (1.5) كغم في الإنسان. ويكون نسجيًا من طبقة مصلية، خارجية outer tunical serosa مشتركة من الصفاق تُوجَد ضمن محفظة من النسيج الضام

الرقيق تسمى محفظة جليسون capsule of Glisson تحتوي على وفرة من الألياف المرنة وتغطي سطح الكبد بкамله [10]. أما حشوة الكبد parenchyma فتكون من الخلايا الكبدية hepatocytes، وهي خلايا كبيرة محتوية على نواة واحدة أو نوتين، وسياتوبلازم ذو حبيبات ناعمة، تكون بشكل متعدد الأضلاع والزوايا polygonal سداسية، او خماسية الشكل hexagonal or pentagonal عند المقطع العرضي [11]. تظهر من محفظة جليسون حويجزات trabeculae تقسم الكبد لعدة فصيقات كبدية hepatic lobules وتكون هذه الحويجزات رقيقة في الكبد السوي، ولكنها تكون سميكه جداً في الكبد المصاب بالتليف fibrosis.[12]

تعد الفصيقات الكبدية الوحدة الوظيفية الأساسية للكبد، ويظهر كل منها بشكل متعدد الأوجه multisided، ويبلغ قطر كل فصيص حوالي 1 مليمتر، وبطول 2 مليمتر، ويمثل وريد مركري صغير central vein، وتوجد حول حافات الفصيقات قنوات بايبية portal canals تحتوي كل منها على فرع من الوريد البابي portal vein، وريد بين الفصيقات و ايضا فرع من الشريان الكبدي hepatic artery، وقناة صفراء صغيرة bile duct هذه التراكيب الثلاث تعرف بالثلاثي البابي او (الثالث) portal triad، والفصيص عبارة عن تركيب متعدد الأوجه مرتب حول الوريد المركزي، الذي يدخل الى الأوردة الكبدية ومنها إلى الوريد الأعواد vena cava، يتتألف الفصيص بشكل رئيس من عدد كبير من صفائح خلوية ذات سماكة واحدة او خلتين تسمى بالصفائح الكبدية hepatic laminae تترتب هذه الصفائح بصورة غير منتظمة [13].

المواد وطرق العمل

الفزلة الفطرية: تم عزل الفطر المستعمل في الدراسة من المراجعين لمراكز العيادات الاستشارية في مدینتي سامراء وتكريت والمصابين بأمراض الجهاز التنفسي في مختبر الفطريات، كلية العلوم، جامعة تكريت، تم زرع الفطر على وسطي Potato Dextrose Agar, Sabouraud Dextrose Agar وتشخيصه بالطرق التقليدية، والتعرف على بعض عوامل الضراوة.

تحضير العالق الفطري لفطر *A.fumigatus*

أخذت مزارع مائة من الفطر المستعمل في الدراسة بعمر (7) أيام، وأضيف اليها (5) مل من الماء المقطر المعقم، والمضاف اليه مادة Tween 80 بتركيز (1%)، تم تحريك الأنابيب بشكل قوي وذلك لفصل سورات الفطر بشكل جيد، ورش المزيج باستعمال اوراق الترشيح Whatman No.1) في ظروف معقمة، ونقل الراشح الفطري والذي يمثل العالق الفطري الى قنينة معقمة، وجرى بعدها حساب عدد الابواغ بوساطة شريحة عد كريات الدم تحت قوة تكبير(X40) في المجهر الضوئي وحسب القانون الآتي:

$$\text{عدد الابواغ الفطرية في مللتر} = \text{معدل عدد الابواغ} \times 4 \text{ مربعات} \times 50$$

تم استعمال العالق الفطري بتركيز (1×10^6) لحدث الإصابة في الفئران البيض السويسيرية [14].

الحيوانات المختبرية

تضمنت الدراسة الحالية استعمال 25 ذكر فأر أبيض من سلالة c Balb / وعمر (6-8) أسابيع، وكانت اوزانها بين (30-25) غم، وكانت بواقع 5 فئران في المجموعة الواحدة وزرعت الى:

1. المجموعة الأولى: جرعت بـ 0.1 مل بال محلول الفسلجي فموياً و لمرة واحدة يومياً ولمدة (14) يوماً.
2. المجموعة الثانية: تم حقنها بـ 10^6 خلية / مل من عالق *Aspergillus fumigatus* داخل البريتون.
3. المجموعة الثالثة: تم حقن هذه المجموعة بـ 10^6 خلية / مل من العالق الفطري لفطر *Aspergillus fumigatus* بطريقة الغرس الأنفي.
4. المجموعة الرابعة: مجموعة الفئران المجرعة بالعالق الفطري والمعاملة بالمستخلص الكحولي لفطر *Trametes* sp. بتركيز 100 ملغم/ مل فموياً بعد مرور أسبوع من الإصابة.
5. المجموعة الخامسة: مجموعة الفئران المجرعة بعالق الفطر والمعاملة بالمضاد الفطري Amphotericin B وبتركيز 1 ملغم/ كغم فموياً بعد أسبوع من الإصابة.

كافة المجاميع تم تثبيتها مناعياً بوساطة حقنها تحت الجلد بعقار الهيدروكورتيزون بتركيز 250 ملغم/ كغم قبل احداث الإصابة بيومين، وتم اعادة الجرعة الثانية بعد بدء المعالجة عدا مجموعة السيطرة. ومنعاً لحدث اصابة ثانوية عن طريق البكتيريا تم تجريب الحيوانات بعقار Cefatizidime بتركيز 50 ملغم/ كغم تحت الجلد لكل المجاميع الحيوانية بدءاً من اليوم الاول لحقن جرعة المثبت

المناعي الهيدركورتيزون ولغاية اليوم الأخير من المعالجة، وبعد انتهاء مدة التجربة المتمثلة بـ 15 يوماً، جرى تخدير الحيوانات وتشريحها، وفصل العضو المراد دراسته متمثلًا بالكبد.

Histological Section Preparation

حضرت المقاطع النسجية استناداً إلى طريقة [17] والمتضمنة: التثبيت fixation، الغسل washing، إزالة الماء trimming and dehydration، والترويق clearing، التشريب embedding، الطرmer infiltration، التشذيب والقطع sectioning، التلوين staining، التحميل أو الإرساء mounting، وتم فحصها وتصورها تحت المجهر بقوة X40.

النتائج والمناقشة:

1. مجموعة السيطرة

أوضح الفحص المجهرى التركيب السوي لنسيج الكبد المكون من الخلايا الكبدية hepatocytes المنتظمة بشكل شعاعي حول الوريد центральный central venule ويفصل بينها الجيبيات الدموية sinusoids، كما في الشكل (1).

2. المجموعة الثانية (مجموعة الفتران المصابة بالفطر *A.fumigatus* بطريقة الحقن داخل الصفاق)

أوضحت المقاطع حدوث تورم، تتكسر، تنخر الخلايا الكبدية، تحل أنوية عدد من الخلايا وتغليظ أنوية خلايا أخرى، فضلاً عن سايتو بلازم عدد من الخلايا كان رغوي المظهر، الإحتقان الدموي الجزئي في الوريد центральный central venule، تنخر جداره، علامة على زيادة خلايا كوبفر وتضخمها، توسيع الجيبيات الدموية، كما في الشكل (2).

3. المجموعة الثالثة (مجموعة الفتران المصابة بالفطر *A. fumigatus* بطريقة الغرس الأنفي)

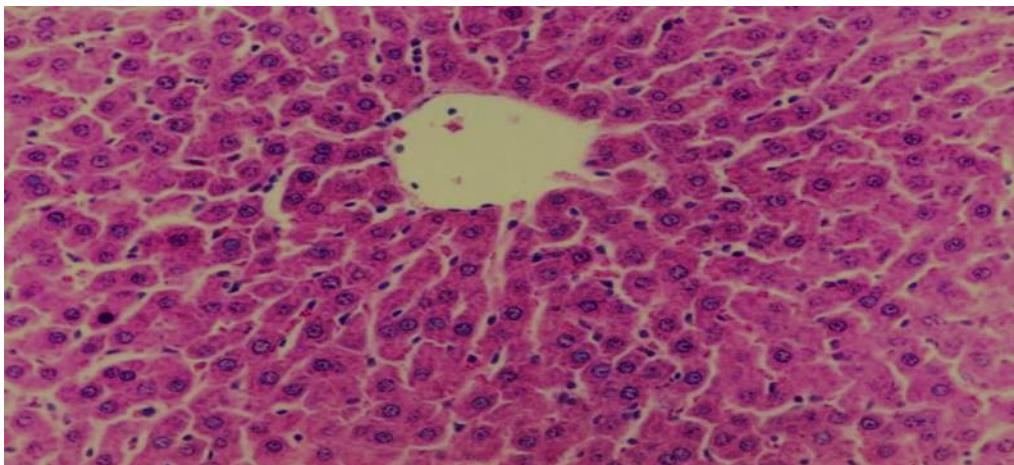
بيّنت المقاطع النسجية تتكسر، تنخر، ضمور الخلايا الكبدية، تغليظ واحتقان أنوية عدد من الخلايا، فضلاً عن الظهور غير السوي للوريد центральный central venule، واحتوائه على الخثار الدموي، والانسلاخ الجزئي لبطانته، علامة على الارتشاح اللمفي، الزيادة في خلايا كوبفر وتضخمها، توسيع الجيبيات الدموية، كما في الشكل (3).

4. المجموعة الرابعة (مجموعة الفتران المصابة بالفطر *A.fumigatus* ومعالجة بالمضاد الفطري Amphotericin B بعد أسبوع من الإصابة).

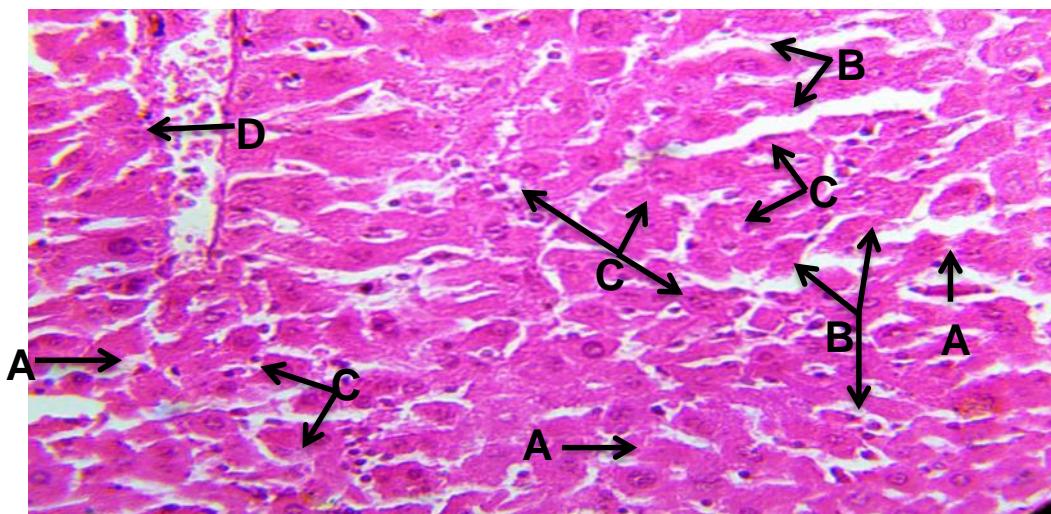
أظهرت النتائج حدوث تتكسر، تنخر عدد من الخلايا الكبدية، تغليظ أنوية عدد آخر منها، فضلاً عن الانسلاخ الجزئي لبطانة الوريد центральный central venule، التضخم في عدد من خلايا كوبفر، توسيع في بعض الجيبيات الدموية، علامة على الظهور شبه السوي لنسيج الكبد في مقاطع نسجية أخرى، كما في الشكل (4).

5. المجموعة الخامسة (مجموعة الفتران المصابة بالفطر *A.fumigatus* ومعالجة بالمستخلص الكحولي لفطر *Trametes* sp بعد أسبوع من الإصابة).

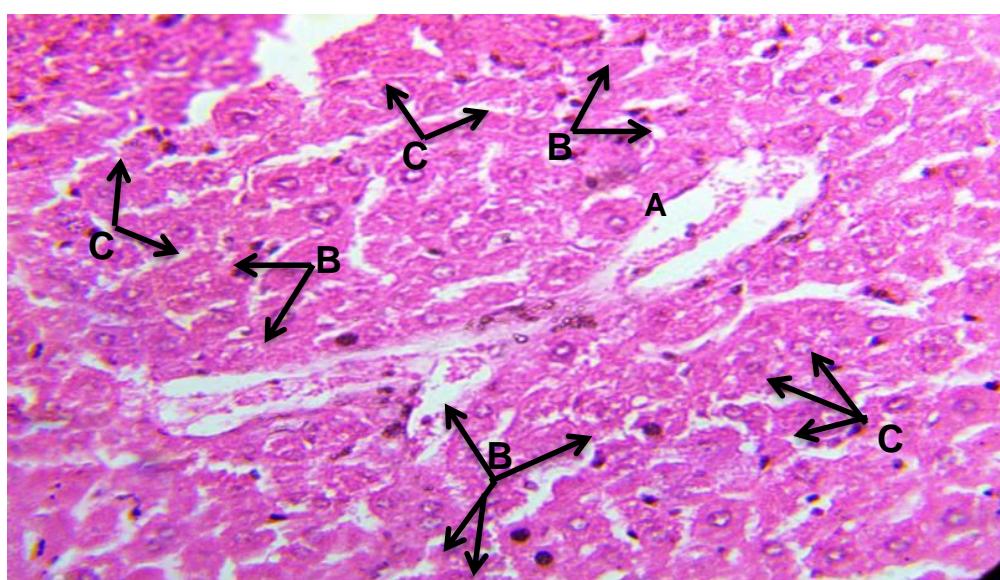
أظهرت النتائج حدوث تتكسر، تنخر الخلايا الكبدية، تغليظ أنوية عدد آخر منها، علامة على احتقان الوريد центральный central venule، والانسلاخ الجزئي لبطانته، فضلاً عن توسيع الجيبيات وتضخم خلايا كوبفر، وفي البعض منها كان الظهور سوي للوريد центральный central venule والخلايا الكبدية، كما في الشكل (5).



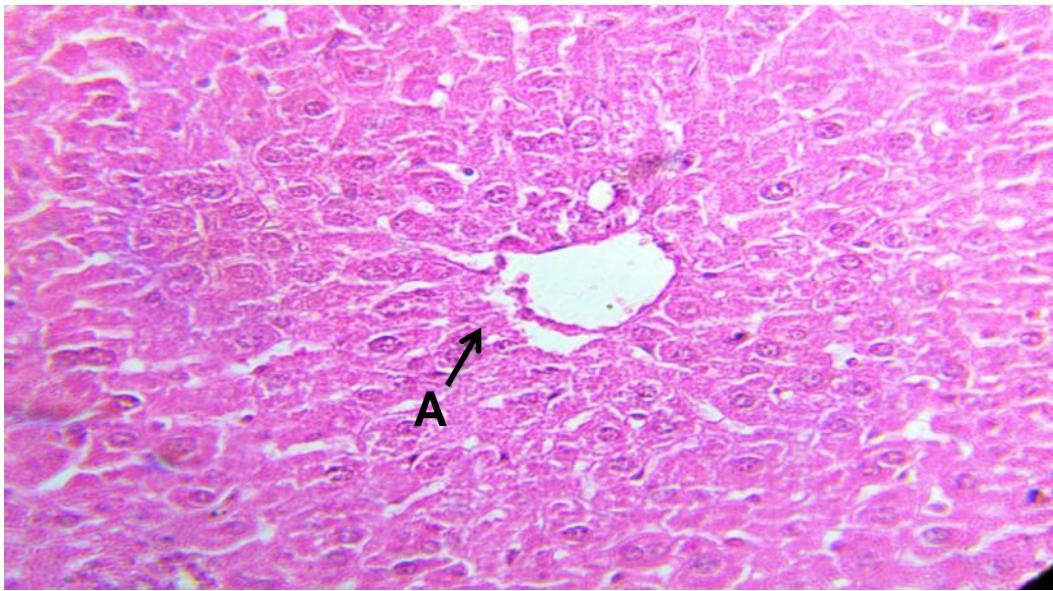
الشكل (1): صورة تشريحية مجهرية لكبد فأر من مجموعة السيطرة، توضح فيها الخلايا الكبدية hepatocytes المنتظمة باشكال الشعاعي radial وحول الوريد المركزي central- venule ويفصل بينها الجيبانيات الدموية .sinsuoids .(X40, H&E).



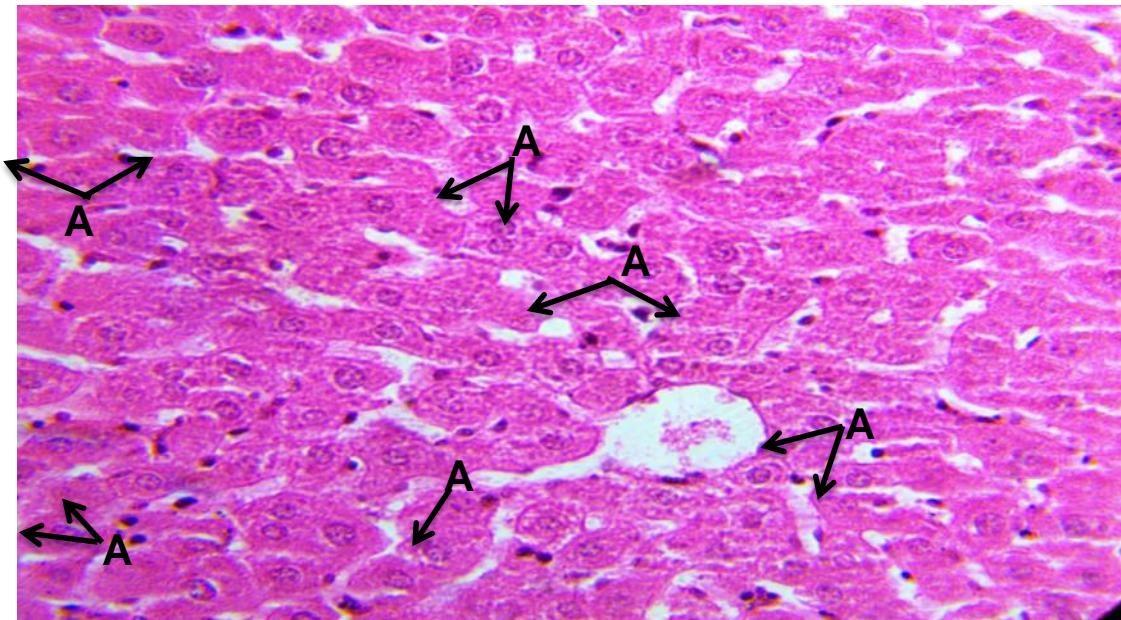
الشكل (2): صورة مجهرية تشريحية لكبد فأر من المجموعة امجرعة يفطر *A. fumigatus*. بطريقة الحقن داخل البريتون، تبين فيها تنكس لعدد من خلايا كبدية >A<, اتساع للجيبانيات الدموية >B{ sinuosids dilitated الزبادة ا عدد خلايا كوبفر وتضخمها >C<), تشنن الجدران واحتقان وتواسع جيباني >D<.(X 40 ، H E &).).



الشكل (3): صورة مجهرية للكبد الفار من مجموعة مصابة. يافطر *A. fumigatus*, يلاحظ عند الظهور الغير طبيعي للوريد المركزي و ذمة ليفية داخلها>A<(A)، التنكس عالم فيخلايا الكبدية وو تغاظط الأنيوتها× (B)، كثرة اعدد خلايا كوبفر وتضخمها C}.(X0 4، &H E).



الشكل (4): صورة لكبد من مجموعة المجررة بالفطر *A. fumigatus* والمعاملة بالضماد الطفري Ampterothiocin B بعد مرور أسبوع من الإصابة. يلاحظ اسنان لطانية الوريد المركزي (A)، ظهور الشبه سووي للنسيج الكبدي عموماً. (4X0، &HE).



الشكل (5): صورة مجهر لكبد من المجموعة المحقونة بالفطر *A. fumigatus* والمجزرة بالمستخلص الكوهوبي لفطر *Tremetes sp.* بعد أسبوع على الإصابة، تبين فيه ازديادة عداد خلايا كوفير وضمخها (A)، ظهور السووي للوريد المركزي. وخلايا كبدية. (X4، H & E).

يعزى سبب حدوث التكيس والتاخر في الخلايا الكبدية إلى السموم الفطرية التي ينتجها الفطر *A.fumigatus* مثل الجليونوكسين ذات التأثير الضار في انسجة المضيف، أما حدوث الاحتقان الدموي فقد يكون بسبب قابلية الفطر على احداث التجلط والتزف داخل الأوعية الدموية التي يغزوها، وأما تحلل أنوية الخلايا فقد يعود إلى افراز الفطر سموم خارجية قادرة على تحلل كريات الدم الحمر والخلايا المنواة كالهيمولايسين [16].

أشار [18,17] إلى امتلاك Amphotericin B فعالية مضادة للفطريات *in vivo* *in vitro* عند استعماله في التجارب على الحيوانات المصابة بداء الرشاشيات Aspergillosis، داء المبيضات Candidiasis، Coccidioidomycosis. بين [19] إن حقن الجرذان بمضاد Amphotericin B أدى إلى حدوث ضرر في النبيب الكلوية والتهاب النسيج الخلالي، بينما عند استعمال حمل Ampotericin B يلاحظ أي اضرار في النسيج الكلوي.

أكد عدد من البحوث الحديثة ان الفطر *Trametes* يمتلك فعالية مضادة للتأكد بسبب احتواه على التаниنات التي تعمل على منع اكسدة المكونات الخلوية الأساسية نتيجة تراكم الجذور الحرة، وبالتالي تلف الأنسجة الناتج عن حقن العالق الفطري لـ *A.fumigatus* إذ تعمل على حماية الاغشية الخلوية والعضيات [21,20]، كما لها القدرة على تشبيط القابلية التطيرية وذلك بوساطة تشبيط الانزيمات المرتبطة بالنشاط التحولي، قابليتها على كبح نمو الخلية السرطانية، ولها دور في تشبيط نمو الاحياء المجهرية [22].

المصادر:

- 1- Fang, W. and Latgé, J.P. Microbe Profile: *Aspergillus fumigatus*: a saprotrophic and opportunistic fungal pathogen. *Microbiology.*, 2018, 164, (8): 1009–1011.
- 2-Ahmed, N.Sh. and Al-Shamary, E.I. ‘Antioxidant production from local fungal isolate,. *Iraqi Journal of Agricultural Sciences.*, 2019, 50, (1): 398-408.
- 3-Kosmidis, C. and Denning, D.W. ‘The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis, *Thorax.*, 2015, 70: 270-277.
- 4-Dhingra, S. and Cramer, R.A. (2017). ‘Regulation of sterol Biosynthesis in the Human Fungal Pathogen *A.fumigatus*: Opportunities for Therapeutic Development, *Frontiers in Microbiology.*, 8: 92
- 5-Felton, T.; Troke, P.F. and Hope, W.W. ‘Tissue penetration of antifungal agents,. *Clinical Microbiology Reviews.*, 2014, 27, (1): 68–88.
- 6-Al-Khikani, F.H. and Al-Janabi, A.A. ‘Topical Amphotericin B formulas: promosing new application,. *International Journal of Medical Science and Current Research.*, 2019, 2, (2): 187–196.
- 7-Balan, V.; Munafo, J.P.J.; Pattathil, S.; Merritt, B.B.; Sivasankari, V. and Ngo, W.O. ‘Protocols to evaluate the nutritional and potential health benefits of edible mushrooms,. *Curr. Biotechnol.*, 2018, 7, (1): 34-58.
- 8-Kundakovic, T. and Kolundzic, M. ‘Therapeutic properties of mushrooms in managing adverse effects in the metabolic syndrome,. *Curr. Top. Medi. Chem.*, 2018, 13, (21): 2734–2744.
- 9- Cruz, A.; Pimentel, L.; Rodríguez-Alcalá, L.M.; Fernandes, T. and Pintado, M. ‘Health benefits of edible mushrooms focused on *Coriolus versicolor*, : A review. *Journal of Food and Nutrition Research.*, 2016, 4: 773-781.
- 10- Cui, D.; Naftel, J.P.; Daley, W.P.; Lynch, J.C.; Haines, D.E.; Yang, G. and *et al.* ‘Atlas of Histology with Functional and Clinical Correlations, 2014, 1st edition.
- 11-Singh, I. ‘Text book of Human Histology with Color Atlas and Practical Guide, J.A.Y.P.E.E, 2011, Six edition.
- 12-Abdel-Misih, S.R.Z. and Bloomston, M. ‘Liver Anatomy,. *Surg. Clin. North. Ame.*, 2010, 90, (4): 643–653.
- 13-Faller, A.; Schuenke, M. and Schuenke, G. ‘The human body: an introduction to structure & function,. Thieme Stuttgart. New York., 2004, pp: 423-426, 442-452.

14-Mohammed, S.J.; Noaimi, A.A.; Sharquie, K.E.; Karhoot, J.M.; Jebur, M.S.; Abood, J.R. and *et al.* ‘A Survey of Dermatophytes Isolated from Iraqi Patients in Baghdad City., Al-Qadisiyah Medicinal Journal, 2017, 11, (19): 10-20.

15- الحاج، حميد أحمد. التحضيرات المجهرية الضوئية، النظرية والتطبيق. دار المسيرة للنشر والتوزيع والطباعة. الطبعة الأولى، عمان – الأردن، 2010، ص238.

16- Ajay, P.; Brett, J. and Donald, H. ‘Fungal hemolysins., Med. Myco., 2015, 51: 116.

17- Sionov, E. and Segal, E. ‘Treatment of murine systemic aspergillosis with polyene-intralipid admixtures, Med. Mycol., 2004, 42: 73–80.

18-Sidhu, R.; David, B.L.; Arash, H.; Piruthiviraj, N. and Royce, H.J. ‘Evaluation of Amphotericin B Lipid Formulations for Treatment of Severe Coccidioidomycosis., Journal of Antimicrobial and Chemotherapy., 2018, 62, (7).

19-Kwon, G.S.; Jeong, Y.K.; Jieming, G.; Dae, H.S.; Celeste, A. and Weixiong, Z. Pharmacokinetics and Renal Toxicity of Monomeric Amphotericin B in Rats after a Multiple Dose Regimen, J. Pharm Nanotechnol, 2016, 4, (1): 16–23.

20-Daniyan, S.Y.; Galadima, M.; Ijah, U.J.J.; Odama, L.E.; Yusuf, A.Y. and Abbas, Y. *In vitro* antimicrobial screening of *Piliostigma thonningii*(shum). milne-red head leaves extracts against clinical isolation of methicillin resistant and methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*, International Journal of Pure and Applied Sciences., 2010, 4, (1): 88-94.

21-Islam, A.; Jfa, M.K.; Alam, M.B. and Hossain, M.S. *In vitro* Antioxidant and Cytotoxic potential of *Costus speciosus* (Koen.) smith rhizome. I.J.P.S.R., 2010, 1, (10): 138-144.

22-Özgör, E.; Meltem, U.; İrem, Ç.; Semiha, S.Y. and Nevin, K. ‘Investigation of antimicrobial activity of different *Trametes versicolor* extracts on some clinical isolates, Biological Chemistry., 2016, 43: 267-272.

Study of the histological effect of liver of white mice experimentally infected with *A. fumigatus* and treated with Amphotericin B and *Trametes* sp.

Hadeel Abdullah Salih^{1*}, Kholod Naji Rasheed¹, Melad Adnan Mezher²

1-Department of Biology, College of Science, University of Tikrit, Iraq

2- Department of Biology, College of Education for Pure Science, University of Tikrit, Iraq

Article Information

Received: 29/12/2020

Accepted: 28/02/2021

Keywords:

Aspergillus fumigatus,
Amphotericin B ·*Trametes*
sp.

Abstract

This study done to investigate the pathohistological lesions in the liver of white mice infected with *Aspergillus fumigatus* by two main procedures: intraperitoneal injection, nasal implantation and an oral attempt to treat them with the antifungal AmB and the *Trametes* sp. The result show that *A.fumigatus* led to the occurrence of tissue changes represented by the occurrence of degeneration necrosis of hepatocytes hemorrhage large infiltration of inflammatory cells and separation of lining endothelial cells of central vein, While liver of groups of mice that infected with *A.fumigatus* and treated with the antifungal AmB and the *Trametes* sp it showed improvement as degeneration and necrosis of number of hepatocytes. Pyknotic nuclei, enlargement number of Kupffer cells, expansion of some blood sinuses, another histological sections showed the semi normal liver tissue.