

## دراسة التأثير النسيجي لكبد الفأر الأبيض المصاب تجريبياً بفطر *A.fumigatus* والمعامل بـ *Amphotericin B* و *Trametes sp.*

هديل عبد الله صالح<sup>1\*</sup>، خلود ناجي رشيد<sup>1</sup>، ميلاد عدنان مزهر<sup>2</sup>

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

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

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

معلومات البحث:	الخلاصة:
تأريخ الاستلام: 2020/12/29 تأريخ القبول: 2021/02/28	هدفت الدراسة لمعرفة التغيرات النسيجية في كبد الفئران البيض المصابة بفطر <i>Aspergillus fumigatus</i> بطريقة الحقن داخل الصفاق والغرس داخل الأنف وعلاجها بالمضاد الفطري <i>Amphotericin B</i> والمستخلص الكحولي لفطر <i>Trametes sp.</i> وقد أوضحت النتائج ان الفطر <i>A.fumigatus</i> سبب الى حدوث افات نسيجية متمثلة في تنكس، تنخر، الخلايا الكبدية، تحلل دموي، ارتشاح كبير للخلايا الالتهابية، انفصال الخلايا البطانية لبطانة الوريد المركزي، بينما الكبد لمجاميع الفئران المصابة والمعالجة بـ <i>Amphotericin b</i> ، المستخلص الكحولي لفطر <i>Trametes sp.</i> بينت تحسناً ملحوظاً إذ وجد تنكس، تنخر، عدد من خلايا الكبدية تغلظ نوى منها، تضخم عدد من خلايا كوفر، توسع بعض الجيبانيات الدموية. وفي مقاطع نسيجية أخرى ظهر نسيج الكبد شبه سويا.
الكلمات المفتاحية: <i>Aspergillus</i> <i>Amphotericin B</i> <i>fumigatus</i> <i>Trametes sp.</i> ، الكبد.	

### المقدمة:

يعد فطر *Aspergillus fumigatus* أكثر الفطريات الممرضة الإنتهازية، وينتشر بشكل واسع في الطبيعة لاسيما في التربة، الماء، المواد المتعفنة، ويكون قادراً على النمو بدرجات حرارة عالية [1,2]. ويسبب مجموعة من الأمراض في المثبطين مناعياً كمستلمي نقل الأعضاء، المصابين بمرض نقص المناعة المكتسب HIV، سرطان الدم، ويكون ممرضاً أكثر ويسبب ما يسمى بداء الرشاشيات *Aspergillosis* والذي يصف مجموعة كبيرة من الأمراض الفطرية الغازية [3]. تحدث الإصابة بوساطة استنشاق سبورات الفطر التي تكون صغيرة جداً لتصل الى الأنساح الرئوية للجهاز التنفسي. توجد هذه الأبواغ في الهواء الجوي، عادةً يتم استنشاق عدة مئات منها يومياً، ويتم الازالة بسرعة بوساطة الجهاز المناعي في الأفراد الاصحاء.

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

يتموضع 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 الالتواء القولوني الأيمن والكلىة اليمنى، في حين يقع الفص الأيسر فوق المعدة. ويُمثل الكبد أكبر غدد الجسم إذ يزن حوالي (1.5) كغم في الإنسان. ويتكون نسيجاً من طبقة مصلية، خارجية outer tunical serosa مشتقة من الصفاق تُوجد ضمن محفظة من النسيج الضام

الرقيق تُسمى محفظة جليسون capsule of Glisson تحتوي على وفرة من الألياف المرنة وتغطي سطح الكبد بكامله [10]. أما حشوة الكبد parenchyma فتتكون من الخلايا الكبدية hepatocytes، وهي خلايا كبيرة محتوية على نواة واحدة أو نواتين، وسائتوبلازم ذو خُبيبات ناعمة، تكون بشكل متعدد الأضلاع والزوايا polygonal سداسية، أو خماسية الشكل hexagonal or pentagonal عند المقطع العرضي [11]. تظهر من محفظة جليسون حُويجات trabeculae تُقسم الكبد لعدة فُصيصات كبدية hepatic lobules وتكون هذه الحُويجات رقيقة في الكبد السوي، ولكنها تكون سميكة جداً في الكبد المُصاب بالتليف [12] fibrosis.

تعد الفُصيصات الكبدية الوحدة الوظيفية الأساسية للكبد، ويظهر كل منها بشكل مُتعدد الأوجه multisided، ويبلغ قطر كل فصيص حوالي 1 ملليمتر، وبطول 2 ملليمتر، ويملك وريد مركزي صغير central vein، وتوجد حول حافات الفصيصات قنوات بابية portal canals تحتوي كل منها على فرع من الوريد البابي portal vein، وريد بين الفُصيصات وايضا فرع من الشريان الكبدي hepatic artery، وقناة صفراء صغيرة bile duct هذه التراكيب الثلاث تُعرف بالثلاثي البابي او (الثالوث) portal triad، والفصيص عبارة عن تركيب متعدد الأوجه مرتب حول الوريد المركزي، الذي يدخل الى الأوردة الكبدية ومنها إلى الوريد الأجوف vena cava، يتألف الفصيص بشكل رئيس من عدد كبير من صفائح خلوية ذات سمك خلية واحدة او خليتين تسمى بالصفائح الكبدية hepatic laminae تترتب هذه الصفائح بصورة غير منتظمة [13].

### المواد وطرائق العمل

**العُزلة الفطرية:** تم عزل الفطر المستعمل في الدراسة من المراجعين لمراكز العيادات الاستشارية في مدينتي 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*

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

$$\text{عدد الأبواغ الفطرية في ملتر} = \text{معدل عدد الأبواغ} \times 4 \times \text{مربعات} \times 50$$

تم استعمال العالق الفطري بتركيز ( $10^6 \times 1$ ) لحدوث الإصابة في الفئران البيض السويسرية [14].

### الحيوانات المختبرية

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

1. **المجموعة الأولى:** جرعت بـ 0.1 مل بالمحلول الفسلجي فمويًا ولمرة واحدة يوميًا 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 بالعلق الفطري والمعاملة بالمستخلص الكحولي لفطر *Trametes* sp بتركيز 100 ملغم/ مل فمويًا بعد مرور اسبوع من الإصابة .
5. **المجموعة الخامسة:** مجموعة الفئران المُجرّعة بعالق الفطر والمعاملة بالمضاد الفطري Amphotericin B وبتراكيز 1 ملغم/ كغم فمويًا بعد أسبوع من الإصابة.

كافة المجاميع تم تثبيطها 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 لحدوث اصابة ثانوية عن طريق البكتيريا تم تجريب الحيوانات بعقار Cefatizdime بتركيز 50 ملغم/ كغم تحت الجلد لكل المجاميع الحيوانية بدءً من اليوم الاول لحقن جرعة المثبط

المناعي الهيدروكورتيزون ولغاية اليوم الأخير من المعالجة، وبعد انتهاء مدة التجربة المتمثلة بـ15 يوماً، جرى تخدير الحيوانات وتشريحها، وفصل العضو المراد دراسته متمثلاً بالكبد.

### تحضير المقاطع النسجية Histological Section Preparation

خُضرت المقاطع النسجية استناداً الى طريقة [17] والمتضمنة: التثبيت fixation، الغسل washing، ازالة الماء dehydration، والترويق clearing، التشريب infiltration، الطمر embedding، التشذيب والتقطيع trimming and sectioning، التلوين staining، التحميل او الإرساء mounting، و تم فحصها وتصويرها 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 المركزي central venule ويفصل بينها الجيبانيات الدموية sinusoids، كما في الشكل (1).

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

أوضحت المقاطع حدوث تورم، تنكس، تنخر الخلايا الكبدية، تحلل أنوية عدد من الخلايا وتغلظ أنوية خلايا أخرى، فضلاً عن سايتوبلازم عدد من الخلايا كان رغوي المظهر، الإحتقان الدموي الجزئي في الوريد المركزي، تنخن جداره، علاوة على زيادة خلايا كوبفر وتضخمها، توسع الجيبانيات الدموية، كما في الشكل (2).

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

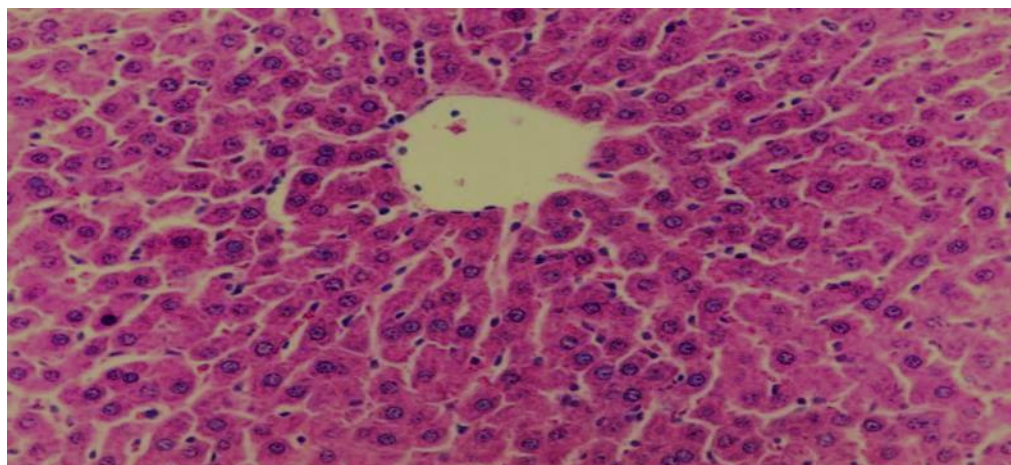
بينت المقاطع النسجية تنكس، تنخر، ضمور الخلايا الكبدية، تغلظ واختفاء أنوية عدد من الخلايا، فضلاً عن الظهور غير السوي للوريد المركزي، واحتوائه على الخثار الدموي، والانسلاخ الجزئي لبطانته، علاوة على الارتشاح اللمفي، الزيادة في خلايا كوبفر وتضخمها، توسع الجيبانيات الدموية، كما في الشكل (3).

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

أظهرت النتائج حدوث تنكس، تنخر عدد من الخلايا الكبدية، تغلظ أنوية عدد آخر منها، فضلاً عن الانسلاخ الجزئي لبطانة الوريد المركزي، التضخم في عدد من خلايا كوبفر، توسع في بعض الجيبانيات الدموية، علاوة على الظهور شبه السوي لنسيج الكبد في مقاطع نسجية أخرى، كما في الشكل (4).

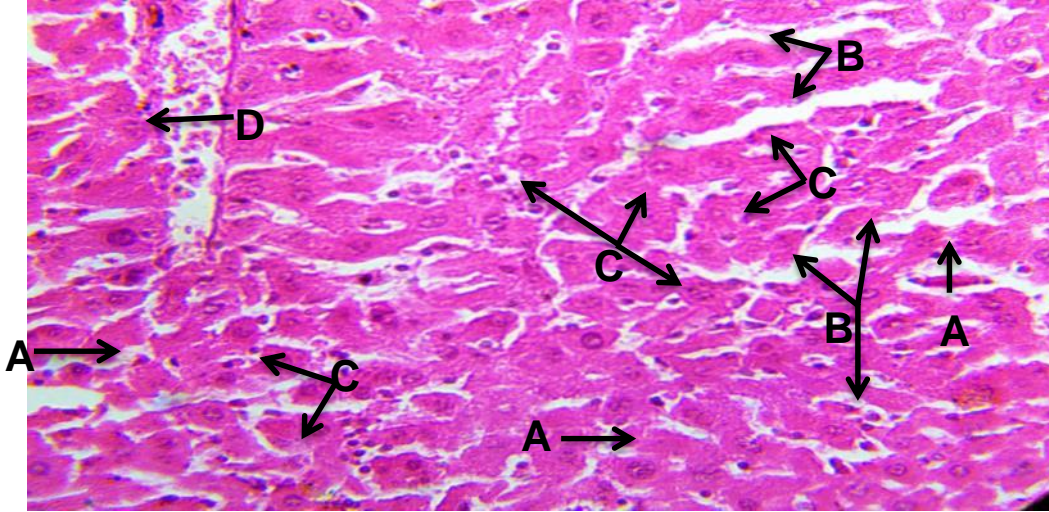
#### 5. المجموعة الخامسة (مجموعة الفئران المصابة بالفطر *A.fumigatus* والمعاملة بالمستخلص الكحولي لفطر *Trametes* sp. بعد اسبوع من الإصابة).

أظهرت النتائج حدوث تنكس، تنخر الخلايا الكبدية، تغلظ أنوية عدد آخر منها، علاوة على احتقان الوريد المركزي وتنخن جداره، والانسلاخ الجزئي لبطانته، فضلاً عن توسع الجيبانيات وتضخم خلايا كوبفر، وفي البعض منها كان الظهور سوي للوريد المركزي والخلايا الكبدية، كما في الشكل (5).

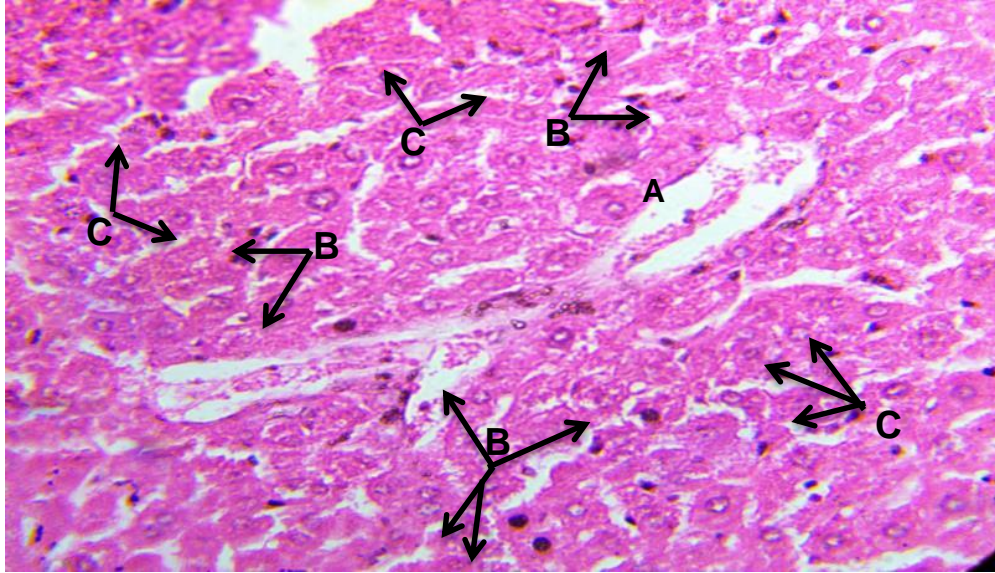




الشكل (1): صورة تشريحية مجهرية لكبد فأر من مجموعة السيطرة، توضح فيها الخلايا الكبدية hepatocytes المنتظمة بالشكل الشعاعي radial وحول الوريد المركزي central- venule ويفصل بينها الجيبانيات الدموية sinusoids. (X40، H&E).

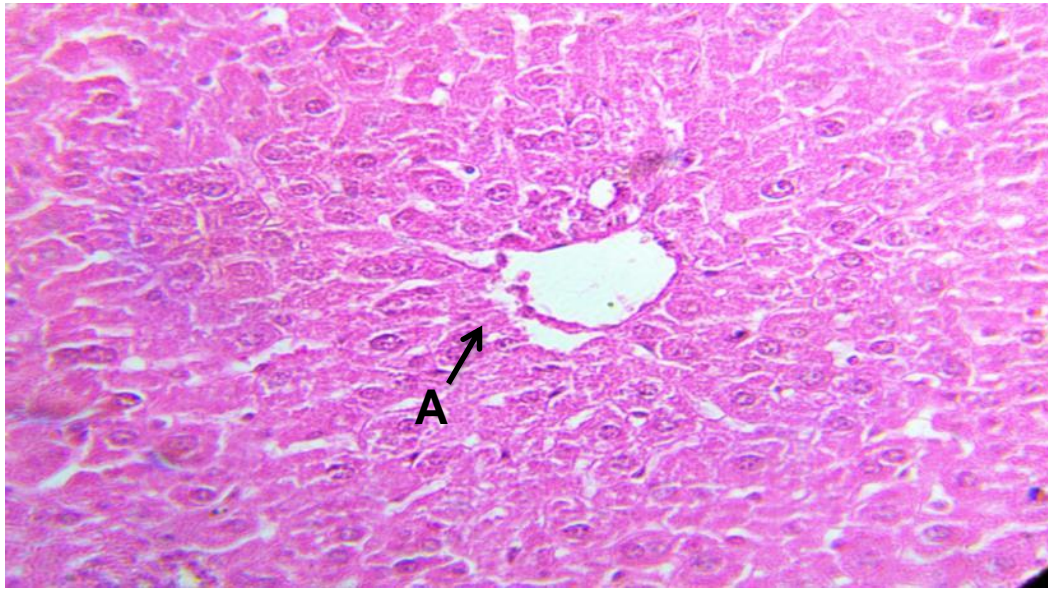


الشكل (2): صورة مجهرية تشريحية لكبد فأر من المجموعة المجرعة بفطر *A. fumigatus* بطريقة الحقن داخل البريتون، تبين فيها تنكس لعدد من خلايا كبدية >A<، اتساع للجيبانيات الدموية dilated sinusoids >B< الزيادة اعدد خلايا كوبفر وتضخمها >C<، تتخّن الجدران واحتقان وتوسع جيباني >D<. (X 40، H E &).

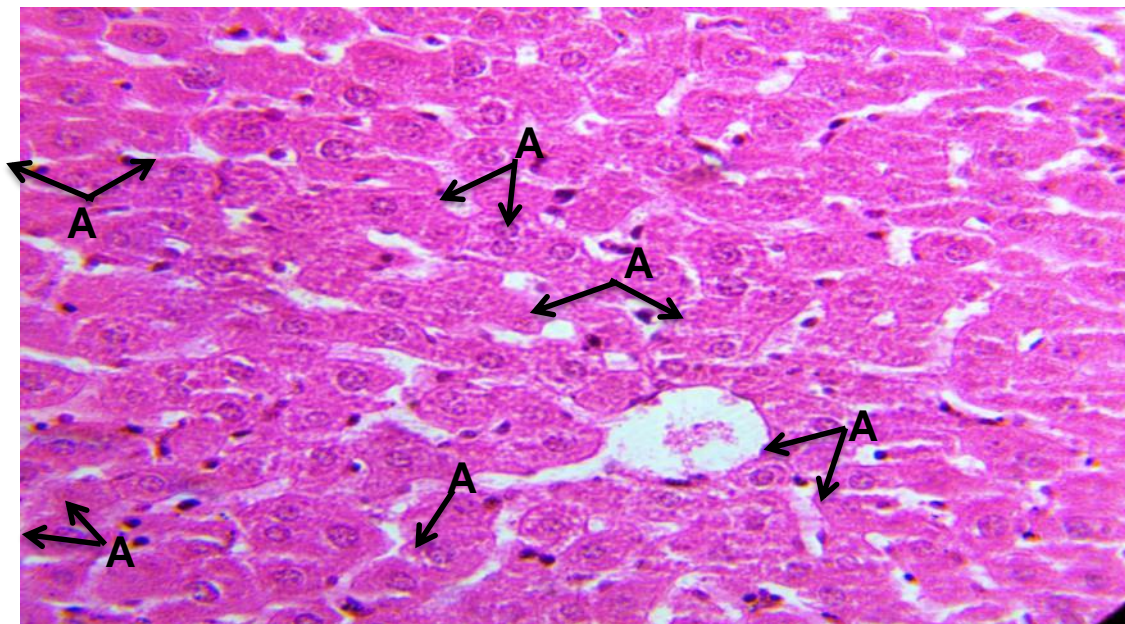


الشكل (3): صورة مجهرية لكبد الفأر من مجموعة مصابة. يافطر *A. fuimgatus* (البغرس الأنفي) (التطقي)، يلاحظ عند الظهور الغير طبيعي للوريد المركزي و ذومة ليفية داخلها >A<، التنكس عالم في خلايا الكبدية و و تغلظ الأنويثها ×B<، كثرة اعدد خلايا كوبفر وتضخمها >C<). (X0 4، & H E).





الشكل (4): صورة لكبد من مجموعة المجرعة بالفطر *A. fumigatus* والمعاملة بالضمد الطفري *Ampterhoicin B* بعد مرور أسبوع. من الإصابة. يلاحظ اسنلاخ جزئي لطبانة الوريد الممرزي ( $A>$ )، ظهور الشبه سووي للنسيج الكيدي عموماً. (4X0، &HE).



الشكل (5): صورة مجهر لكبد من المجموعة المحقونة بالفطر *A. fumigatus* والمجرعة بالمستخلص الكحول لـ *Tremates sp.* بعد أسبوع. عل الإصابة، تبين فيه ازيادة عداد لخلايا كوفبر وضمخها ( $A>$ )، ظهور السوي للوريد الممرزي. وخلايا. كبدية. (X4، H & E).

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

أشار [18,17] الى امتلاك Amphotericin B فعالية مضادة للفطريات *in vivo* و *in vrito* عند استعماله في التجارب على الحيوانات المصابة بداء الرشاشيات *Aspergillosis*، داء المبيضات *Candidiasis*، *coccidiomycosis*. بيّن [19] إن حقن الجرذان بمضاد Amphotericin B أدى الى حدوث ضرر في النبيبات الكلوية والتهاب النسيج الخلوي، بينما عند استعمال micelles Amphotericin B لم يلاحظ أي اضرار في النسيج الكلوي.

أكد عدد من البحوث الحديثة ان الفطر *Trametes* يمتلك فعالية مضادة للتأكسد بسبب احتوائه على التانينات 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 تثبيط القابلية التطفيرية وذلك بواسطة تثبيط الانزيمات المرتبطة بالنشاط التحولي، قابليتها على كبح نمو الخلية السرطانية، ولها دور في تثبيط 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: promosisng 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, 1<sup>st</sup> 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<sup>1\*</sup>, Kholod Naji Rasheed<sup>1</sup>, Melad Adnan Mezher<sup>2</sup>

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. Pycknotic nuclei, enlargement number of Kupffer cells, expansion of some blood sinuses, another histological sections showed the semi normal liver tissue.