

دراسات نسيجية على تأثير مستخلص نبات (*Euphorbia inarticulata*) على أنسجة كبد وكلى الجرذان:

دراسة مختبرية وحيوية.

تقديم: غالية حسين المالكي

إشراف: أ.د. سمر عمر عبدالله رباح

المستخلص

إن وجود نبات *Euphorbia inarticulata* Schweinf في منطقة جازان وعدم وجود دراسات علمية سابقة شجع على القيام بالدراسة الحالية والتي تهدف الى: ١- معرفة المكونات الكيميائية النباتية للمستخلصات باستخدام جهاز كروماتوغرافيا الغاز- مطياف الكتلة (GC-MS) وهذه المستخلصات تم الحصول عليها بواسطة الاستخلاص التجزيئي بالهكسان والإيثيل أسيتات والميثانول. ٢-تقييم فعالية المستخلصات مختبريا (*in vitro*)، كمضادة للسرطان ضد ثلاثة انواع من الخلايا السرطانية هي خلايا سرطان الثدي (MCF-7)، خلايا سرطان البروستاتا (PC-3) و خلايا سرطان الكبد (HEPG2)، وقدرتها على ازالة الشوارد الحرة وكذلك فعاليتها كمضادة للميكروبات. ٣- تقييم فعالية المستخلص الميثانولي على الحيوان (*in vivo*) بجرعات ٢٥٠ و ٤٠٠ مج/كج على جرذان التجارب البيضاء السليمة كمجموعة ضابطة موجبة (+ve control) والجرذان التي تم تحفيز اصابتها بسرطان الكبد (HCC) كنموذج مرضى باستخدام رباعي كلوريد الكربون والدايإيثيل نيتروزامين DENA/ CCl₄ وتم التأكد من الفعالية عبر ملاحظة التغيرات في الأنسجة والمؤشرات الكيميائية الحيوية للحيوانات. أوضحت النتائج أن مركبات lupeol و β -amyrin وهي من ضمن مركبات ثلاثي التربينويد كانتا من الأكثر وفرة في جميع المستخلصات بينما كانت الستيرويدات أكثر وفرة في مستخلصي الهكسان و الإيثيل أسيتات، بينما في مستخلص الميثانول كانت الأحماض الدهنية هي الأكثر وفرة. التقييم المختبري ضد الخلايا السرطانية، أظهر أن مستخلص الميثانول لنبات *E. inarticulata* هو الأكثر فعالية ضد الخلايا السرطانية المستخدمة والأعلى نشاطا في ازالة الشوارد الحرة وكذلك الأكثر فعالية ضد الميكروبات المستخدمة مقارنة بنتائج مستخلصي الهكسان والإيثيل أسيتات. أظهرت دراسة سمية المستخلص الميثانولي على جرذان التجارب *In vivo* أن نصف الجرعة المميتة للجرعة الفمية هي ٤ جم/كج. اما دراسة تغيرات مؤشرات الكيمياء الحيوية، فتم توثيق تغيرات معنوية لقيم وظائف الكبد والكلى ودلالات الأورام في الدم لمجموعة النموذج المرضى للسرطان [HCC] مقارنة بالمجموعة الضابطة غير المعاملة وذلك من خلال الزيادة المعنوية لأنشطة انزيمات الكبد ومؤشرات وظائف الكلى، ودلالات الأورام والانخفاض المعنوي لمستويات الألبومين والأديبونيكتين. وقد اظهرت نتائج التجرع الفمي للمستخلص الميثانولي لنبات *E. inarticulata* بالجرعات التالية ٢٥٠ مج أو ٤٠٠ مج، تأثيرا معنويا معدلا لأنشطة الإنزيمات والمؤشرات والدلالات المذكورة أعلاه لتقارب المستوى الطبيعي. كما أظهرت مقارنة قيم قياسات مضادات الأكسدة في الكبد والكلى لمجموعة نموذج الجرذان المرضى HCC بقيم المجموعة الضابطة ارتفاعا معنويا في مستوى كل من المالونالدهيد واكسيد النيتريك وانخفاض معنويا في مستوى الجلوتاثيون ونشاط انزيمات السوبراوكسيد ديسميوتاز والجلوتاثيون بيروكسيداز والجلوتاثيون-اس-ترانسفيراز في الكبد والكلى. في حين سجلت نتائج المجموعات الجرعة فميا بأى من الجرعتين محل الدراسة ٢٥٠ أو ٤٠٠ مج/كج تحسنا معنويا مقارنة بالقيم المناظرة في المجموعة الضابطة. وقد أظهرت الدراسة النسيجية، في مجموعة نموذج الجرذان المصابة بالسرطان HCC حدوث تضخم شديد في القناة الصفراوية، وإنحلال فجوي حاد في خلايا الكبد مع إزدياد في عدد الانوية، والتليف في المنطقة البابية، واتساع واحتقان الوريد البابي، وتكاثر وانتشار خلايا الكوبفر. بالإضافة إلى تجمع الخلايا الإلتهابية وتغيرات دهنية في السيتوبلازم ووجود نزيف وتكاثر النسيج الضام وتتركز في الخلايا الكبدية. بينما أظهر كبد الجرذان الجرعة فميا بتركيز ٤٠٠ مج تحسنا كبيرا في النسيج الكبدى مقارنة بتأثير الجرعة الفمية الأقل ٢٥٠ أو ٤٠٠ مج/كج فكانت منطقة القشرة طبيعية وكانت كل مكونات ترشيج الدم الكلوية [renal corpuscles] وايضاً الأنابيب الكلوية طبيعية باستثناء بعض الأنابيب الكلوية التي أظهرت تورماً في الخلايا الطلائية واما منطقه النخاع فكانت ايضاً طبيعية. اما بالنسبة لبروتينات Bax و Bcl-2 فقد ظهرت باستخدام الصبغة المناعية وأوضحت في كبد وكلى نموذج الجرذان المرضى HCC ظهور تصبغ بروتين Bax في السيتوبلازم لخلايا الكبد والحوصلات والأنابيب الكلوية، بينما كان هناك ظهور بروتين Bcl-2 باهتا. بينما أظهرت المجموعات الجرعة فميا بالمستخلص الميثانولي للجرذان نموذج HCC تأثيرا وقائيا لخلايا الكبد والكلى ضد موت الخلايا المبرمج وهو تأثير يعتمد على الجرعة عن طريق التحكم في تكون بروتينات Bax و Bcl-2.

Histological Studies on the Effect of *Euphorbia inarticulata* Plant Extract On Liver and Kidney Tissues in Rats: In Vitro and In Vivo Study

By: Ghaliah Hussain S Almalki

Supervised By: Prof. Dr. Samar Omar Abdullah Rabah

Abstract

The existence of *Euphorbia inarticulata* Schweinf in Jazan region and lack of literature researches on it encourage the present study for 1- phytochemical screening by GC-MS of the active components of fractionated extractions, hexane, ethyl acetate and methanol plant extracts. 2- In vitro evaluation of their anticancer activity against three cell lines, breast carcinoma (MCF-7), prostate (PC-3), hepatocellular carcinoma (HEPG2), antioxidant and their antimicrobial potentials assessment. 3-In vivo evaluation of the methanol extract administration dosed 250 and/or 400 mg/kg in normal and hepatocellular carcinoma (HCC) rat model induced by DENA/CCl₄ through biochemical and histopathological investigations. Results showed that lupeol and β -amyrin were the most abundant triterpenoids in all extracts and the most abundant in hexane and ethyl acetate were steroids while in methanol were fatty acids. In vitro, *E. inarticulata* methanol extract showed the highest activity against used cancer cell lines. As well as the highest in free radical scavenging activity. Moreover, the most effective against used microbes all as compared to hexane and ethyl acetate extracts results. In vivo LD₅₀ estimated for orally administered methanol extract in rats was 4 g/kg. Biochemically, serum's liver and kidney function markers and tumor markers altered in the rat HCC model group as compared to the control values through significant increased AST, ALT, ALP, LDH and γ -GT enzymes activities and urea, uric acid, creatinine, T-BIL, AFP, TNF- α IL-6 and significant decreased albumin and adiponectin levels. Supplementation of *E. inarticulata* methanol extract by either 250 mg or 400 mg to the animal model showed significant reverse in the aforementioned enzymes activities and the other biochemical levels. The higher dose showed advantage over the lower one in normalizing the AST, LDH and γ -GT enzymes activities. The liver and kidney antioxidants parameters estimated showed in HCC group as compared to control values significant increase in liver and kidney MDA and NO contents and significant decrease in the tissues GSH content and SOD, GPx and GST enzymes activities. Both 250mg and 400mg rat model supplemented groups recorded significant reverse of the aforementioned tissues antioxidants as compared to the corresponding values of the rat model group. Histopathologically, HCC group showed severe bile duct hyperplasia, severe vacuolar degeneration in hepatocytes with nuclear Pyknosis, fibrosis in portal area, congested and dilated portal vein, hyperactivation and proliferation of kupffer cells, inflammatory cells aggregation, cytoplasm fatty changes, hemorrhage proliferation of connective tissue and necrosis of hepatocytes. While, liver section of 400 mg treated rats showed slight karyomegally of hepatocytic nuclei and foamy cytoplasm of hepatocytes and bi nucleation of hepatocytes. While, kidney cortex of HCC group revealed dissociation of glomerulus, perivascular oedema, inflammatory cells infiltration and congested hypertrophied blood vessel, focal mononuclear aggregation, fibrous connective tissue proliferation, necrosis and a nucleated epithelial cell in the renal tubules and intertubular hemorrhage. The supplemented model with either 250 or 400 mg/kg extracts detected normal cortical region with normal renal corpuscles and renal tubules except some renal tubules showed swelling of epithelial cells and normal medullary region. The Bax and Bcl-2 protein in liver and kidney immunostaining showed in HCC model group, Bax immunostaining in the cytoplasm of liver cells and glomeruli and renal tubules, while faint cytoplasmic reaction to Bcl-2 antibodies. The methanol extract supplemented groups showed protection effect in a dose dependent manner of the hepatorenal apoptosis in the HCC induced rat model by downregulation of the Bax and Bcl-2 protein expressions.