



دراسة تأثير عقار تاموكسيفين على خلايا الكبد في اناث الفأر الابيض على المستوى الخلوي

ميسون عبد الامير احمد السلطان

قسم البيولوجي الطبي، كلية الطب، جامعة النهرين. بغداد- العراق

الخلاصة

درس تأثير عقار تاموكسيفين المستخدم في علاج سرطان الثدي على نسيج الكبد في اناث الفئران البيضاء، حيث جرعت ١٠ أنث من الفئران البيضاء بالعقار المذكور بتركيز (0.4 ملغم/كغم) لمدة ٩٠ يوماً قابلتها ١٠ أنث من الفئران البيضاء كمجموعة سيطرة، ولوحظ حدوث تغيرات نسيجية في الكبد من خلال فحص النسيج ودراسته على المستوى الخلوي. تهدف الدراسة الى التعرف على الاضرار التي تسببها عقار تاموكسيفين على نسيج الكبد وأثرها على تلف الكبد على المدى البعيد

EFFECT OF TAMOXIFFEN ON HEPATIC CELL OF FEMALS ALBINE MICE ON THE ELECTRON MICROSOPICAL STUDY

Maysoon Abdul Ameer Ahmed Alsalman

Departement of Medical Biology, College of Medicine, University of Al-Nahrain. Baghdad - Iraq

Abstract

The effect of tamoxiffen which used in the breast cancer treatment were studies on liver tissue of 10 females white mice. Both groups (control and treated) were drunked with (0.4 mg/kg) for 90 days. Clanges in liver tissue were seen through the examination of tissue and studied at the cellular level. The study aims to identify the damage caused by drug tamoxiffen on the liver tissue and its effects for long period.

المقدمة :

الداخلية [9]. مما يؤثر على بعض المستقبلات الاستروجية أو بعض المكونات في الساتيو بلازم وبالتالي يؤدي الى حدوث خلل في بناء mRNA من خلال تنشيطه لعمل Protein Kinase الذي يؤدي الى أضعاف وإيقاف نمو الخلايا الورمية في المرحلة G من دورة حياة الخلية [10].

من المعروف ان اغلب العقاقير (العلاجات) الكيماوية لها تأثيرات سلبية وان عقار التاموكسيفين يؤدي إلى حدوث تلف في DNA الخلايا الكبد [11] وحدثت تخرخلوي [12] والإصابة باليرقان [4,13] إضافة إلى فشل الكبد وتلفية [11] والإصابة بسرطان الكبد [12].

هدفة هذه الدراسة الى تحديد سمية عقار تاموكسيفين بجرع طويلة الامد والاضرار الذي يسببها الى نسيج الكبد والتعرف على تأثيره على تلف الكبد على المستوى البعيد

يعد مرض سرطان الثدي من المشاكل الصحية الكبيرة التي تواجه النساء في العام حيث لا يوجد سبب مباشر للمرض انما تسهم عوامل وراثية وبيئية وهرمونية في احداثه [1] وقد تم استعمال عقار تاموكسيفين كعلاج ضد سرطان الثدي [2].

يعد عقار تاموكسيفين مركب مصنع لاستيرويدي مضاد للاستروجين صنع عام 1967 . واستخدام في علاج سرطان الثدي عام 1970 [3]. ويستخدم حالياً بشكل واسع في علاج الأنواع المختلفة في سرطان الثدي وفي جميع مراحلها سواء كان علاج مساعد لسرطان الثدي الأولي [4,5] علاج أساسي لسرطان الثدي المتقدم [6]. للعقار ألفة عالية للارتباط بالمستقبلات الاستروجينية الموجود في مواضع محددة في الخلية [7].

يرتبط العقار اومؤيضاته تنافسياً على مستقبلات الاستروجين [8] فضلاً عن الفته العالية للارتباط على مواقع الارتباط المضادة للاستروجين والموجودة في أغشية الشبكة البلازمية

المواد وطرق العمل:-

اجريت هذه الدراسة في مختبرات معهد الاجنة والعقم - جامعة النهرين خلال المدة المحصورة بين شباط - ايار ٢٠١٠ تضمنت الدراسة ٢٠ انثى فأر ابيض (بوزن ٢٥-٣٠ غم) وضعت الحيوانات في جميع مراحل التجربة تحت ظروف متشابهة من ناحية الاضاءة وقدمت العليقة والماء بصورة حرة ad libitum تم الحصول على عقار تاموكسفين من المكتب الإعلامي (وزارة الصحة) من شركة Genepharm SA الاردنية تحت الاسم التجاري zymoplex بواقع 20 ملغم للقرص الواحد .

تم تجريع حيوانات اناث الفئران عن طريق الفم بمقدار 0.25 مل لكل حيوان ولمدة ٩٠ يوماً ، حيث قسمت حيوانات التجربة الى مجموعتين :

المجموعة الأولى : بواقع ١٠ فئران جرعت الماء الاعتيادي واعتبرت مجموعة سيطرة .

المجموعة الثانية : بواقع ١٠ فئران جرعت 0.25 مل من محلول الحاوي على عقار تاموكسفين 0.25 ملغم / كغم يومياً ولمدة ٩٠ يوماً حيث تعتبر هذه الجرعة مساوية للجرعة البشرية (٢٠ ملغم يومياً).

تم وزن الفئران في المجموعتين قبل وبعد اجراء التجربة ، ثم شرحت الحيوانات بعد ٩٠ يوماً .

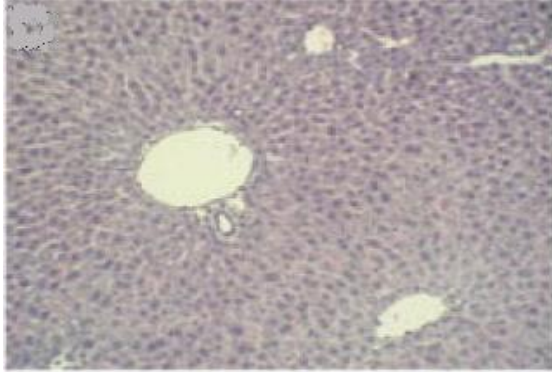
بعد ذلك تم استئصال الكبد من كل فئران لاجراء الفحص النسيجي باستخدام المجهر الضوئي والالكتروني النافذ. حيث وضع الكبد على ورق ترشيح وقطع الى قطع صغيرة بقياس (١×١×٣) تم تثبيته في الفورمالين ١٠% والكلوتر الذي هايد تركيز ٤% وحضرت المقاطع النسيجية باستخدام صبغة ال Methlen Blue و Azure2 اعتماداً على [15].

وثبتت القطع من الكبد بدرأي الفوسفات الحاوي على الكلوتر الذي هايد والفورمالين لمدة ٣ ساعات وبعدها يتم إضافة محلول رابع اوكسيد الاورميوم لمدة ساعة واحدة ، ثم غسلت العينات و سحب الماء منها بواسطة سلسلة تصاعدية من الكحول الايثيلي.

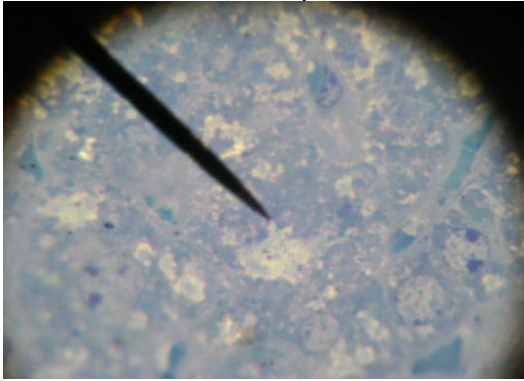
ثم طمرت العينات في الراتنج الخاص به Resin وعملت مقاطع رقيقة، وضع على حامل نحاس، بعدما اضيفت خلاصات اليورانيل وخلاصات الرصاص للعينات ثم فحصت العينات بالمجهر الالكتروني النافذ واعتمدت على [15] في طريقة تحضير العينة للفحص بالمجهر الالكتروني النافذ .

النتائج :

اظهرت النتائج من خلال فحص المقاطع النسيجية بالمجهر الضوئي وجود تأثيرات واضحة لعقار تاموكسفين لخلايا الكبد فقد ادى العقار الى احداث تغيرات نسيجية كبيرة منها عدم انتظام الحبال الكبدية (heptic cords) وتخر لبعض الخلايا اضافة لحصول الاحتقان Congestion في الانسجة الكبدية مقارنة في نسيج الكبد في حالة السيطرة (الصورة 1,2)

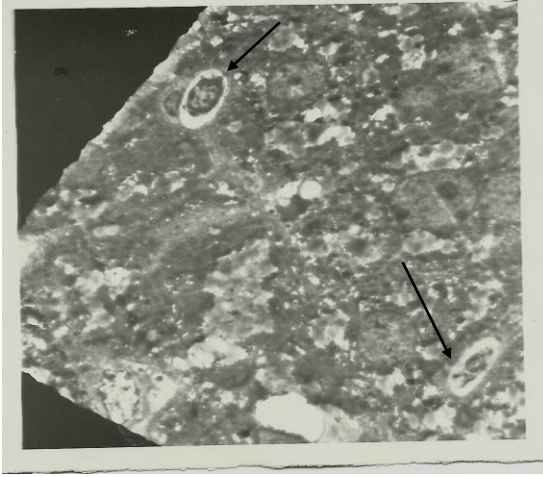


صورة ١: مقطع يمر في كبد انثى الفأر في حالة السيطرة (X1603)

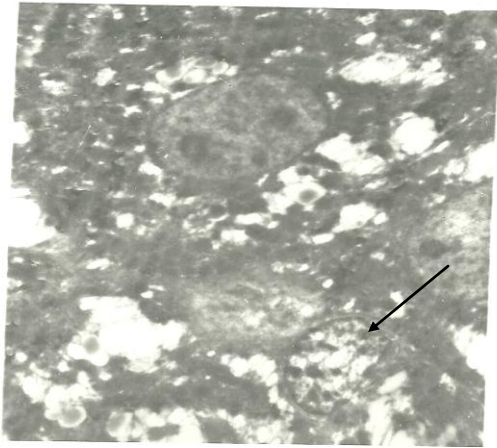


الصورة ٢: مقطع يمر في كبد انثى الفأر المعاملة بعقار التاموكسفين لاحظ عدم انتظام الحبال الكبدية ، حدوث الاحتقان (X1603)

كما ظهرت حالات التهابية كثيرة مع توسع الجيباتيات الكبدية الدموية وارتشاح infiltration واضح في الخلايا الالتهابية وحيدة النوى inflammation cells اضافة الى فرط التنسج لخلايا كفر Kupffer cells، اي زيادة خلايا كفر مع وجود بعض التجمعات للخلايا العدة neutrophili cells الخلايا الالتهابية Lymphocytes cells ، (صورة ٣).

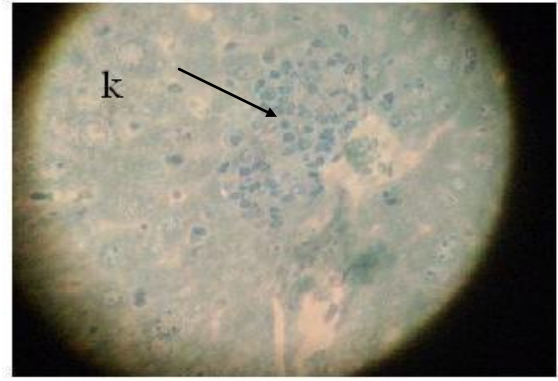


الصورة رقم (٥) مقطع في المجهر الالكتروني النافذ لكبد انثى الفأربعار (الثاموكسفين) ، لاحظ توسع القنبيوات الصفراوية وعدم وجود الزغابات (X7900).
كما وظهر تنخر في بعض خلايا الكبدية متمملا بتحلل الانوية واختفاءها (صورة ٦).



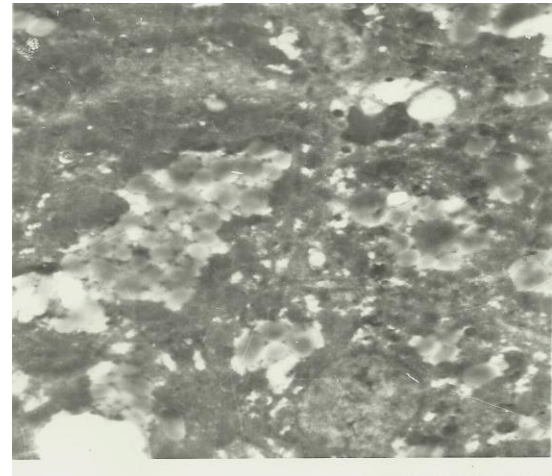
صورة ٦: مقطع في المجهر الالكتروني النافذ لكبد انثى الفأربعار المعاملة بعقار الثاموكسفين

لاحظ تنخر بعض الخلايا الكبدية وتحلل بعض الخلايا الكبدية (3400X). اضافة الى حدوث تليف في بعض الخلايا الكبدية وظهور الاليف الغراوانية مرتبة بهيئة حزم ليفية (صورة ٧، ٨).



الصورة ٣ : مقطع يمر في كبد انثى الفأربعار المعاملة بعقار (الثاموكسفين) ، لاحظ توسع الجبيبات الدموية ، ارتشاح الخلايا الالتهابية وحيدة النوى فرط التنسج لخلايا كفر (k)(X1756) خلايا كفر

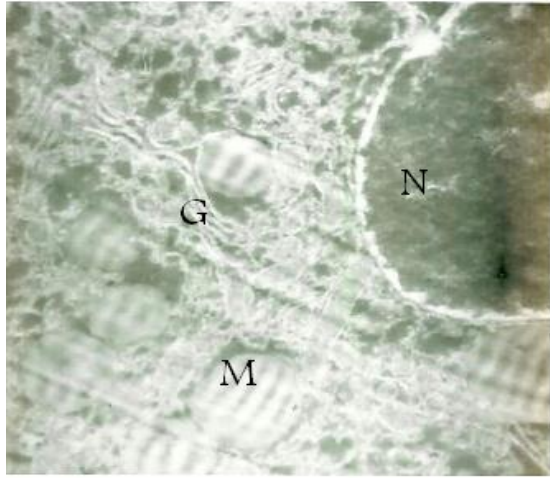
اما بالنسبة للفحص بالمجهر الالكتروني النافذ فقد اظهر العقار تأثيرات واضحة في خلايا الكبد حيث ظهر حدوث تضخم في الخلايا الكبدية لاسيما الخازنة للدهون اذ ازدادت بالحجم ، مع ظهور قطيرات دهنية Fatydrop في سايتوبلازم بعض خلايا الكبدية (صورة ٤).



صورة ٤: مقطع في المجهر الالكتروني لكبد انثى الفأربعار المعاملة بعقار الثاموكسفين ، لاحظ تضخم الخلايا الخازنة للدهون ووجود قطيرات دهنية في ساتوبلازم الخلايا الكبدية (10500X) .

كما اظهرت هذه النتيجة توسع القنبيوات الصفراوية الحاوية على الخثرة الصفراوية مع فقدان وقلة نمو الزغابات الدقيقة (صورة ٥) .

كما اظهرت هذه النتيجة ايضاً تأثير عقار التاموكسفين على الاجسام الحالة (Lysosomes) حيث ادى الى تضخم او عيبتها اضافة التجزئتها وتحللها (الصورة ١٠) .

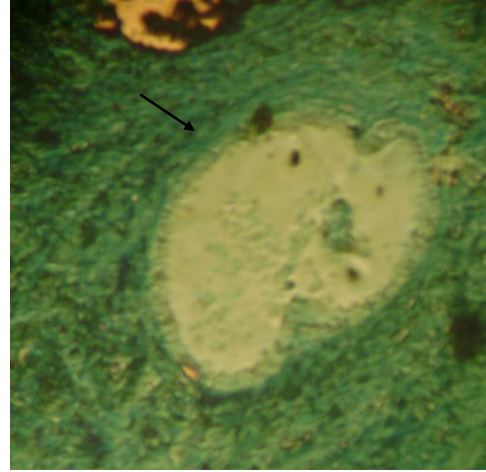


صورة ١٠: مقطع في المجهر الالكتروني النافذ لكبد انثى الفأر المعاملة بعقار التاموكسفين لاحظ تجزئة اجسام الحالة كولجي (G)=المتقدرات، (M)=النواة، (N) = النواة، (G)=اجسام كولجي. (10500X)

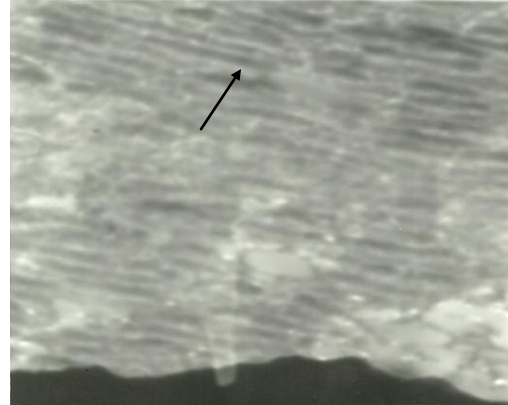
المناقشة

يعتبر الكبد من اهم الاعضاء التي تتأثر بأزالة الأثار السمية ومختلف المؤيضاات للعقاقير المختلفة ومنها عقار تاموكسفين حيث يبدأ التأثير عليه من بداية فعل العقار او قد يصل العقار او مؤيضااته للحد السمي مما يؤدي لفقدان بعض الخلايا الكبدية وظيفتها او موتها الذي يودي الى عرقلة وظيفه الكبد [16].

كما لوحظ توسع الأوعية الدموية بسبب عقار تاموكسفين الذي قد يعزى إلى تحرر حامض الاركيديونك الموجود في الدهون الفسفورية التي تتخل ضمن تركيب الخلايا الكبدية [17] مما يؤدي إلى تنشيط التصنيع الحيوي لأنزيم السايكلو اوكسجينز Cyclooxygenase مما يؤدي لتنشيط أنواع معينة من الموثينات Prostaglandins والتي تسبب في توسع الأوعية الدموية وإحداث توسع في القنوات الصفراوية [16] أما بالنسبة الى تنخر بعض الخلايا الكبدية فيحدث بسبب التأثير التراكمي لمؤيضاات عقار تاموكسفين في خلايا الكبد إضافة إلى تجمع بعض القطيرات الدهنية في سايتوبلازم بعض الخلايا الكبدية، وسبب حدوث الخثرة الصفراوية نتيجة لتجمع مواد متكتفه في القنوات الصفراوية المتوسعة ربما تعود لتأثير عقار تاموكسفين الذي أدى إلى أحداث اضطرابات في خلايا الكبد والصفراء مما سبب في فشل عمل الصفراء Chalstaeis [١١] إضافة إلى ذلك فقد لوحظ ان عقار التاموكسفين يحدث اضطرابات في بعض الغدد

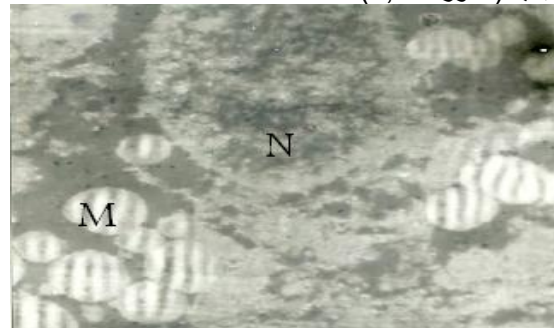


الصورة ٧: مقطع يمر في كبد انثى الفأر المعاملة بعقار التاموكسفين لاحظ تليف بعض الخلايا الكبدية ووجود الالياف الغراوانية المرتبة كحزم ليفية .



الصورة ٨: مقطع في المجهر الالكتروني النافذ لكبد انثى الفأر المعاملة بعقار التاموكسفين لاحظ تليف بعض الخلايا الكبدية وجود وظهور الالياف الغراوانية بهيئة حزم ليفية التكبير (10500X).

ويلاحظ ايضاً توسع بالمتقدرات Mitochondria متضمناً الحجم واللثافات والطيات مع حدوث توسع في اغشية الخلايا الكبدية (صورة ٩، ١٠)



الصورة ٩: مقطع في المجهر الالكتروني نفاذ لكبد انثى الفأر المعاملة بعقار التاموكسفين لاحظ توسع في حجم متقدرات وزيادة اللثافات والطيات فيها، (7900X) . (N) = النواة، (M)=المتقدرات.

- and C75BL\6 Mice and in human MCL-5 Cell .Cargnogenesis ., 13:2197- 2203 .
7. Sutherland R.L.; Murphy L.C.; Foo, M.s. and Green M**1980** High affinity antioestrogen binding site distinct from the Oestrogen receptor Nature., **288:273-275**
 8. Buckl,M.M and Goa, k.l. **1989**Tamoxifen are appraisal of its pharmacodynamic and pharmacokinetics properties therapeutic use. Drugs, **37:451-490**
 9. Tchou,J.;Jou,N.;Rodemaker,A.;Jordan V.C. and Marrow ,M. **2004** Acceptance of tamoxifen chemoprevention by physicians and women at risk. Cancer., **100:1800-1806**
 10. O'brian, C.A.; Liskamp,O.M.; Solomon, O.H.; and Wienstein, I.B. **1985**Inhibition of protein kinase C by tamoxifen. Cancer Res., **45:2462-2465**
 11. Floren -Beshbishy .H.A;Mahamadin, A.M.; Nagy,A and Abdel.naim,A.B. **2010**Amelioration of tamoxifen _induced liver injuary in rats by grape seed extract black seed extract and curcumin Indian J.of Exp.Biology ; **48:280-288**
 12. EL, L.C.; Heberts, M.F.; Venook, A.P.; Jordan, V.C, and Sombery, K.A. **1998** Tamoxifen in liver diseasepotential exacerbation of hepatic dysfunction Ann.Oncel ., **9:1123-1126**
 13. Ching, C.K.; Smith, P.G and long, R.G. **1992** Tamoxifen associated hepatocellular damage and agranulocytosis.Lancet. **339:940-943**
 14. Rosenthal T.C and Puck, S.M **1999** Screening for generic risk of breast cancer. Am FAM physician, **59:99-104**
 15. Yanoff M (1973) : Formaldehyde-glutaraldehyde fixation . Am.J. Ophthalmol .76: 303
 16. Park, W.C.: Kim, B; Won, K.; Lees,A. and Cho, S.**2003**Tamoxifen induces aortic
- الصماء كالمبيض والغدة الكظرية مع اضطرابات وظيفة الكبد وتليفه[12]. ان زيادة حجم بعض الخلايا الكبدية ربما يعود إلى تأثير العقار على انخفاض مضخة الصوديوم البوتاسيوم حيث يؤدي إلى احتباس الصوديوم نتيجة لزيادة الضغط التنازلي داخل الخلية وانتفاخها[18]. قد يعود سبب زيادة ارتشاح الخلايا الالتهابية الى انجذاب هذه الخلايا للمناطق المتضررة والمحاولة في إصلاح وترميم تلك المنطقة [19] . ان توسع المتقدرات مقارنةً بالمتقدرات الطبيعية مع وجود بعض التغيرات بداخلها ، اضافة الى زيادة تجزئة الاجسام الحالة لجهاز كولجيش Golgi apparatus مما ادى الى استنزاف في مايسمى GAK .(Cycline-G-associated kinase) الامر الذي سبب حصول تغيرات في شكل وطبيعة وحجم الاجسام الحالة [٤، ١٢].
- المصادر:**
1. 5- sudo ,k,Monism ,F.J and Katzenellenbogen ,B .S 1983 Antiestrogen binding site dite distinct from the estrogen receptor sub cellular localization ligant specificity and distribution in of the rat endocrinology 112:425-434.
 2. Park, W.C. and Jordan, V.C. **2002**Selective estrogen receptor modulator (SERM) and their receptors in breast cancer prevention trends .Mol. Med., **8:82-88**.(Abstract)
 3. Nayfield, S.G.; Karp, J.E.; Ford, I.G.; Dorr, F.A. and Kramer, B.S. **1991** Potential role of tamoxifen in prevention of breast cancer .J.Nalt. Cancer Enst., **83:1450-1459**
 4. Lee , D.; Xim, X. E.; and Greene, L.E. **2008** Essential role of cyclin-G-asso ciated kinase (Auxilin-2) in Deeloring and mature mice .Mol.Biol.Cell, **19**
 5. Love, R.R.; Nguyen, B.D.; Nguyen, N.K., Mohsin S.K.; Dang .T.H.; Xing , Y.; Zhang , Q.; Hillner, E and David,A**2002**Ophorectomy and tamoxifen adjuvant therapy in premenopausal vitnamese and Chinese women with operable breast cancer. J.Clin . Oncology.; **20:2559-2566**
 6. White ,T.N. Davies ,A., Smith , L., Venitt ,S .and Hewer ,A**1992** Genotoxis potential of tamoxifen and analogues in female Fischer f3440r rat BD A\2

