تأثير فرط إفراز البرولاكتين في كبد ذكور الأرانب

فريال عبد المناف، سعاد رشيد كابان، وجيهة الشماع
قسم علوم الحياة- كلية العلوم- جامعة بغداد, بغداد- العراق
*الاستلام: **2004/2/5*** *القبول: **2004/11/2***

الملخص

استخدمت في هذا البحث ثمانية ارانب نيوزيلندية من الذكور فقط قسمت إلى مجموعتين. ألاولى تم حقنها بالسلبرايد Suliprid لاستحداث حالة فرط افراز البرولاكتين والثانية حقنت بمادة السلبرايد _مجموعة سيطرة). أدى حقن السلبرايد بجرعة (8 ملغم / كغم) إلى حصول ارتفاع معنوي في مستوى البرولاكتين في مصل الدم. كما اوضحت الدراسة النسيجية للكبد حصول ارتفاع معنوي في معدل الخلايا البرنكيمية ثنائية النواة ، كما ظهر ارتفاع معنوي في معدل خلايا كفر وزيادة معنوية في معدل قطر الخلايا البرنكيمية الكبدية في النماذج المحقونة بالسلبرايد بالاضافة الى حدوث اتساع في قطر الوريد المركزي واتساع الجيبانيات الدموية ، لوحظ زيادة في هجرة الخلايا اللمفاوية بين الخلايا البرنكيمية . النتائج تشير إلى دور البرولاكتين في التأثير في الوظائف الكبدية.

Effect of Hyperprolactinaemia on Male Rabbits Liver

Abstract

Eight white male NewZeland rabbits were used to study the effect of hyperprolactinaemia on the liver tissue. Suliprid (8 mg / kg) was used to elevate prolactin level in the serum four rabbits and the another four rabbits used as a control group. The liver histological study showed that there was a significant increase in the number of dinucleated parenchyma cells, significant increase in the number of Kupffer's cell and in the number of liver parenchyma diameters. Also the study showed enlargement in the central blood vessel diameter and sinusoid and increase in lymphocyte migration. The results obtained in this study showed that there was a role for prolactin on liver function.

المقدمة

ان الخلايا الكبدية ليس لها القدرة على التكاثر والتوالد السريع الا ان هنالك ما يشير إلى دور البرولاكتين في تحويل الخلايا turnover الكبدية ونموها [1] و [2]، حيث أوضحت كثير من البحوث وجود مستلمات ترتبط بالفة عالية مع البرولاكتين في الخلايا الكبدية للجرذان [3]، [4]، [5] مما يؤكد دوره في التاثير في الوظائف الكبدية حيث لوحظ ان ارتفاع مستوى البرولاكتين في مصل الدم للارانب يؤدي الى حصول زيادة معنوية في وزن الكبد [6] ويحفز تكاثر وتوالد Proliferation الخلايا الكبدية للفأر [7] والثدييات [2] والجرذان [8]، كما يحفز خلايا الكبد على التكاثر في الاوساط الزرعية خارج الجسم *in vitro* [9].

المواد وطرائق العمل Materials & Methods:

1- حيوانات التجربة Experimental Animals:

استخدمت في هذه التجربة ثمانية ارانب نيوزيلندية بيضاء ومن الذكور فقط، تراوحت أوزانها بين 200-1500 غرام، وضعت في غرفة الحيوانات وتمت تغذيتها بكميات كافية من العليقة والماء يومياً، وتراوحت درجة حرارة الغرفة ما بين 30 – 35 مْ. قسمت الحيوانات إلى مجموعتين متساوية وعوملت كالآتي:

المجموعة الاولى (4 أرانب): تم حقنها بمادة السلبرايد بجرعة مقدارها (8 ملغم / كغم) في عضلة الفخذ يومياً ولمدة 15 يوماً. (حضر محلول السلبرايد باستخدام مذيب متكون من كمية قليلة جداً من حامض الخليك بتركيز 10 % في المحلول الفزيولوجي Saline).

المجموعة الثانية (4 أرانب) : اتخذت كمجموعة سيطرة حيث تم حقنها بمذيب السلبرايد في عضلة الفخذ يومياً ولمدة 15 يوماً.

ذبحت حيوانات التجربة Sacrified بعد انتهاء فترة المعاملة وتم استئصال الكبد لغرض اجراء الدراسة النسيجية كما تم اخذ نماذج من الدم لقياس مستوى هرمون البرولاكتين في المصل وذلك باحداث جرح صغير في الوريد الهامشي الاذني بعد تعقيمه بالكحول ، تترك قطرات الدم النازف لتتجمع في انابيب النبذ بسرعة 3000 xg (بعد ان يتجلط) ولمدة 10 دقائق. تم سحب المصل باستخدام ماصة باستور وحفظ بدرجة – 20 مْ لحين الاستخدام.

2- الدراسة النسيجية Histological Study:

اخذت قطع من الكبد وتم تثبيتها بمحلول بوين Bouin Solution لمدة 8 ساعات. حضرت الشرائح بطريقة البرافين [10] وبسمك 5 مايكرون. استخدمت صبغتي الهيماتوكسلين والايوسين الكحولي لغرض دراسة التغييرات النسيجية بمقارنتها مع نماذج السيطرة حيث تناولت الدراسة :

1- قياس قطر الوريد المركزي وملاحظة التغيير الحاصل في سعة الجيوب الدموية بين اشرطة الخلايا الكبدية.
2- قياس كثافة الخلايا البرنكيمية ثنائية النواة وذلك بحساب عدد الخلايا الثنائية النواة في اربعة مربعات في زوايا المسطرة بالاضافة الى المربع المركزي ولاربع فصيصات لنفس المقطع وثلاث مقاطع لكل نموذج أي بمعدل 60 قراءة اخذت بصورة عشوائية للمجوعة المحقونة بالسلبرايد ومثلها لمجموعة السيطرة.
3- حساب كثافة خلايا كبفر Kepper's cells بنفس الطريقة السابقة ولكلا المجموعتين.
4- حساب التغيير الحاصل بشكل الخلايا البرنكيمية.

وبالنظر لعدم انتظام شكل الخلايا الكبدية البرنكيمية، تم قياس البعدين (الطول اوالعرض) لـ 80 خلية من كل مقطع باستخدام المايكرومتر العيني ocular micrometer، وتم استخراج المعدل الحسابي لهذين البعدين [11] ، كما تم تحليل النتائج احصائياً باستخدام اختبار-t.

3- قياس تركيز البرولاكتين:

تم قياس تركيز البرولاكتين في مصل الدم باستخدام تقنية الاختبار المناعي الاشعاعي المتري Immunoradio metric assay وبالاستعانة بالمنحنى القياسي (شكل 1) ووفقا للخطوات المذكورة في التعليمات المرفقة مع عدة الفحص المستوردة من شركة Immunotech **(Bejman coulter company)** الفرنسية. تم قياس النشاط الاشعاعي المنبعث في نظير اليود الموسوم I 125 باستخدام عداد كاما من نوع Rack – 1270) gamma II).

4- النتائج والمناقشة:

أ- قياس مستوى البرولاكتين:

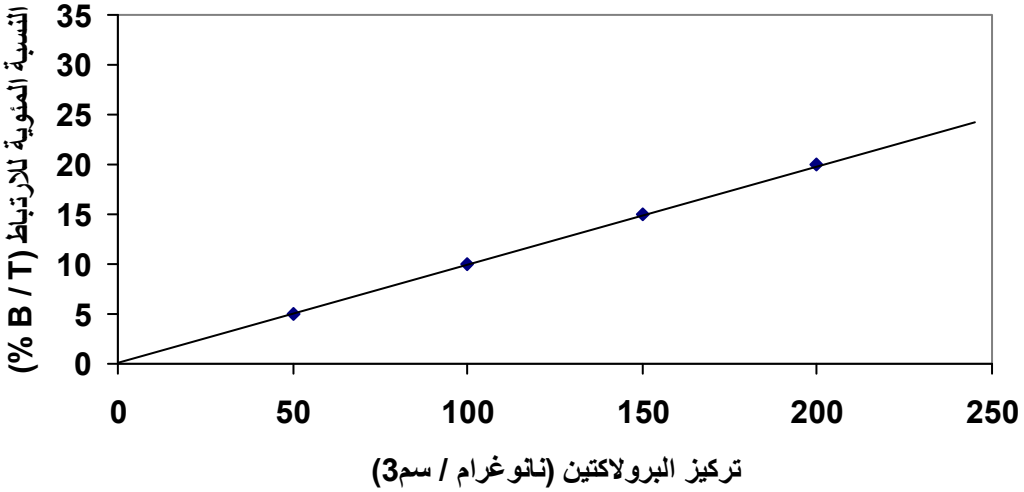
ادت المعاملة بمادة السلبرايد (8 ملغم / كغم) إلى حصول ارتفاع معنوي ($P < 0.01$) في مستوى البرولاكتين ، حيث بلغ تركيز البرولاكتين في مصل الدم في نهاية فترة المعاملة (10.2 نانوغرام / سم^3) عند مقارنته بتركيز البرولاكتين في مجموعة السيطرة البالغ (3.5 نانوغرام / سم^3) (شكل 2).

وهذا يشير إلى تأثير السلبرايد المحفز لانتاج وافراز البرولاكتين من الخلايا اللاكتوفورية المسؤولة عن افرازه [12]. وجاء هذا متوافقاً مع نتائج البحوث العديدة التي اجريت على ذكور الجرذان حيث وجد ان السلبرايد يؤثر على السيطرة التثبيطية لتحرر البرولاكتين من النخامي الغدي Adenohypophysis [13] وذلك بارتباطه النوعي بالادينيليت سايكليز لمستلمات البرولاكتين [14].

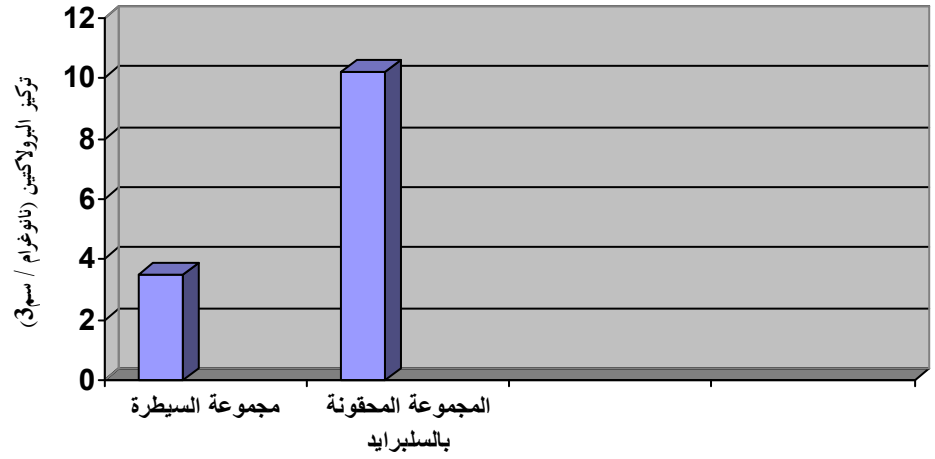
ب – الدراسة النسيجية:

ان تركيز الهرمون في مصل الدم يعكس الوضع الفسلجي للهرمون وان فرط مستوى البرولاكتين عن الحد الطبيعي hyperprolactinaemia قد يكون له تأثير مباشر في ادامة النمو أو قد يكون تاثيره غير مباشر، التأثير غير المباشر قد يكون من خلال تحفيز افراز الكبد لعوامل تعمل تآزرياً synergistically مع البرولاكتين على خلايا الهدف [15] و 1] حيث عرف للبرولاكتين وظائف عامة كثيرة في الفقريات

منها تحفيز النمو لمختلف اعضاء الهدف target organs ومنها الكبد.



شكل (1): المنحنى القياسي لمعرفة تركيز البرولاكتين في مصل الدم.



شكل (2) : تركيز البرولاكتين في مصل دم الأرانب البالغة

وان وجود مستلمات البرولاكتين في خلايا الكبد تشير إلى ان الكبد هو هدف للبرولاكتين وان العلاقة ما بين الكبد والنخامية ربما موجود ومهم في تنظيم العمليات الفزيولوجية مثل دورات النمو [3] ، حيث اتضح في الدراسة النسيجية حصول ارتفاع معنوي ($P < 0.01$) في معدل عدد الخلايا ثنائية النواة في كبد الحيوانات التي استحدثت فيها حالة ارتفاع مستوى البرولاكتين حيث بلغ (3.6 ± 0.29) عند مقارنته مع مجموعة السيطرة البالغ (1.7 ± 0.63) في المساحة المعينة (شكل 3 ، 5) و (شكل 4 ، 6).

كما اظهرت النتائج حصول ارتفاع معنوي ($P < 0.01$) في معدل عدد خلايا كبفر في النماذج المحقونة بالسلبرايد حيث بلغ (6.81 ± 0.5) عند مقارنته مع مجموعة السيطرة الذي بلغ معدل عدد الخلايا فيها (3 ± 0.46) في المساحة المعينة (شكل 3 ، 5) و (شكل 4 ، 6). مما سبق يتضح زيادة فعالية أو نشاط الخلايا الكبدية بارتفاع مستوى البرولاكتين في مصل الدم الذي قد

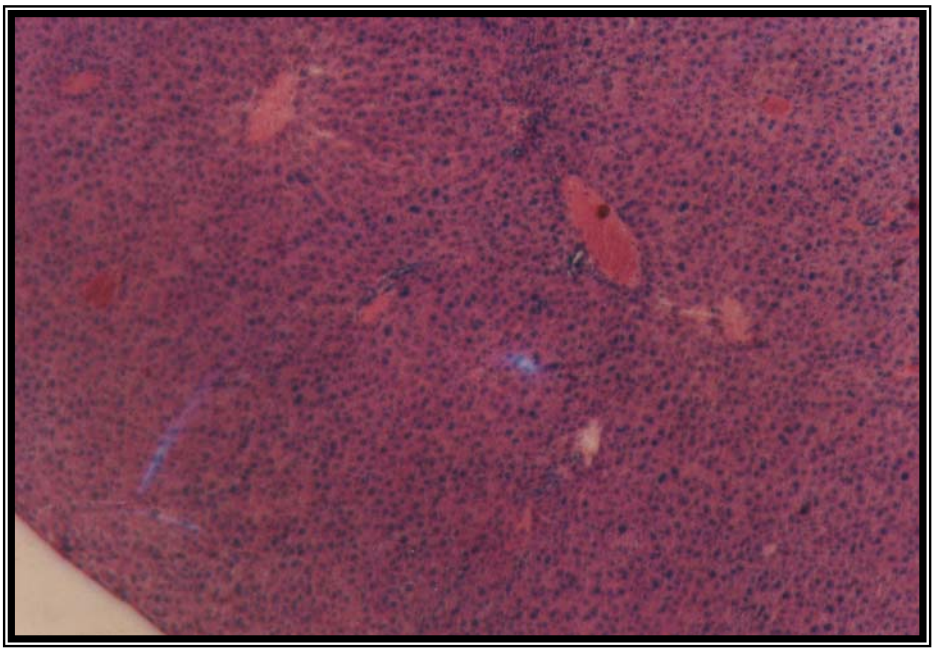
يشير الى احتمال ان للبروlاكتين دور كـ mitogen للخلايا الكبدية، وجاء هذا متوافقاً مع ما لوحظ في دراسة اجريت خارج الجسم من ان للبرولاكتين تأثير محفز على تكاثر الخلايا proliferation في انسجة الاعضاء غير التكاثرية ومنها الكبد، ان الية تأثير وتنظيم البرولاكتين لنمو الخلايا cell growth غير مفهوم بصورة كاملة قد يكون البروتين كاينيز protein kinase واحد من العوامل التي تنقل الاشارة من البرولاكتين عبر الغشاء البلازمي له دور في تنظيم تأثير البرولاكتين المحفز induced لتكاثر الخلايا في الكبد [9].

كما ان للبرولاكتين تحفيز سريع لافعال انقسام خلايا الكبد من خلال mitogen protein kinase عند حقنه في بريتون اناث الجرذان [8] وفي بحث لا حق لنفس الباحثين اتضح ان حقن البرولاكتين ينشط البروتين كاينيز (mitogen activated protein kinase) في الكبد وهذا قد يكون من خلال مستلمات البرولاكتين التي تلعب دور في بدء انطلاق سير التفاعلات pathway signaling triggering pathway [9] و [18].

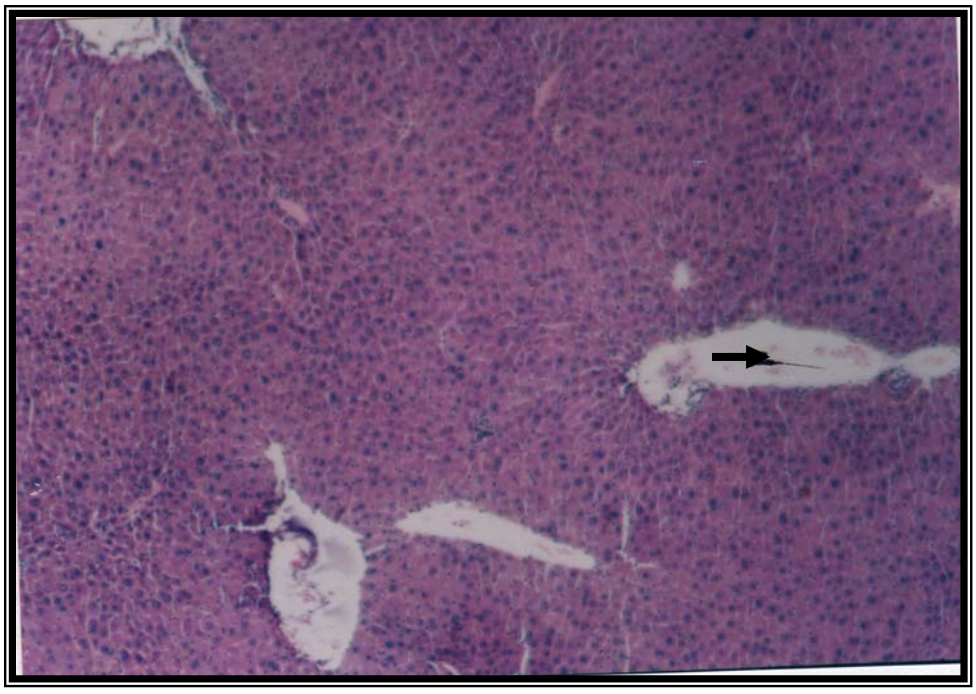
الا انه في دراسة اخرى اتضح ان حقن البرولاكتين في بريتون انثى الفأر يثبط فعالية الخلايا الكبدية السرطانية من دون تأثير على نمو وفعالية الخلايا الكبدية الأخرى [7].

كما ويشير الجدول (1) الى ان حقن السلبرايد ادى الى ظهور زيادة معنوية ($P<0.01$) في معدل قطر الخلايا البرنكيمية الكبدية والتي ظهرت بشكل متطاول مع حصول زيادة ملحوظة في معدل قطر النواة وانعدام وجود الحبيبات السايتوبلازمية في هذه الخلايا (شكل 6) عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة (شكل 5).

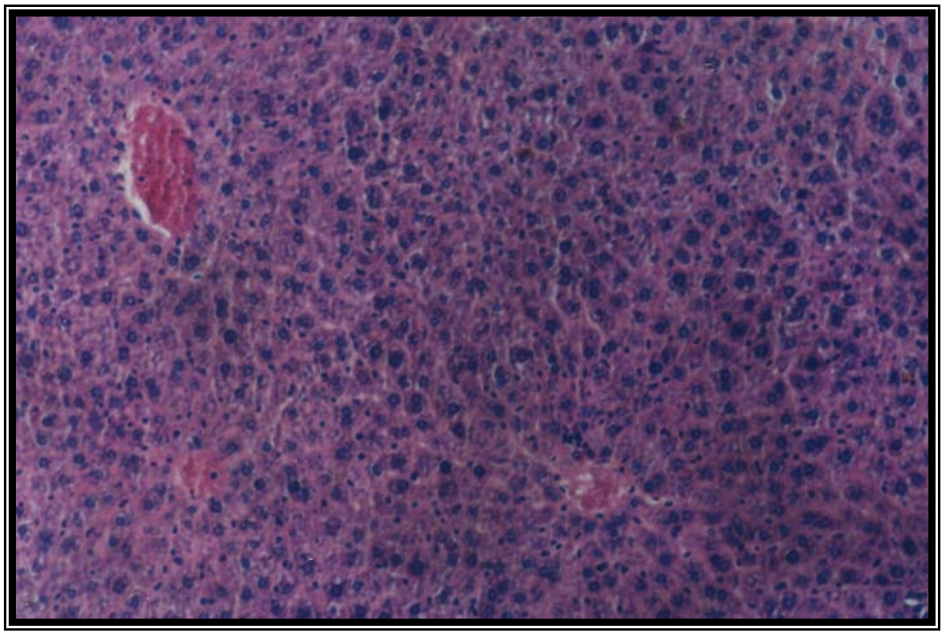
يتضح من ملاحظة هذه النتائج ان ارتفاع مستوى البرولاكتين أدى إلى تضخم الخلايا الكبدية وذلك قد يكون بالتأثير على المحتويات الخلوية الكبدية [19]، جاءت هذه النتيجة متوافقة مع ما ذكر من ان ارتفاع مستوى البرولاكتين يؤدي إلى تضخم الخلايا الكبدية [20]. كما ان زيادة قطر النواة _انتفاخها) وظهورها ذات صبغة فاتحة يشير إلى نشاطها الحيوي الذي قد يكون نتيجة لأرتفاع مستوى البرولاكتين الذي تاشير إلى دوره المحفز في انقسام الخلايا وان انخفاضه يؤدي إلى اخماد فعالية الخلايا [21]، كما ان انعدام الحبيبات السايتوبلازمية في الخلايا الكبدية للحيوانات المعاملة بالسلبرايد (شكل 6) قد يكون نتيجة لحصول تغيير في فعالية انزيمات الكبد حيث يحتوي سايتوبلازم الخلايا الكبدية على الدهون والحديد والنشا وتتباين كمياتها تبعاً للنشاط الوظيفي للخلايا، كما ان البرولاكتين يثبط انزيم لايبيز البروتينات الدهنية لذا ان ارتفاع الهرمون يؤثر على كمية الدهون والاحماض الدهنية في حبيبات خلايا الكبد [22] ، حيث لوحظ ان للبرولاكتين تأثير في ايض الدهون من خلال تعزيز فعالية انزيم Lipoprotein lipase في الكبد [23]. كما انه يسهم في ايض الكاربوهيدرات في الكبد [24]. فضلاً عن ما سبق يشير شكل (2) وشكل (4) وجدول (1) إلى زيادة في سعة الوريد المركزي بالاضافة الى حدوث ارتشاح الخلايا الدموية في اشباه الجيوب بين اشرطة الخلايا الكبدية (شكل 6)، وهذا قد يكون نتيجة لتأثير ارتفاع معنوي للبرولاكتين في مصل الدم في التنظيم الاوزموزي مما أدى الى زيادة نضوحية جدران الاوعية الدموية وبالتالي ركود وتجمع الخلايا الدموية، كما يلاحظ هجرة الخلايا (شكل 4) اللمفاوية الى انسجة الكبد والذي يوضح دور البرولاكتين في الجهاز المناعي [25] من خلال تحوير استجابة الخلايا اللمفاوية [26] حيث اشير في بحث اخر الى دور البرولاكتين كعامل نمو وتمايز لمفاوي ودموي [27]. النتائج تشير الى ان البرولاكتين عامل مهم لتكاثر ونمو الخلايا الكبدية.



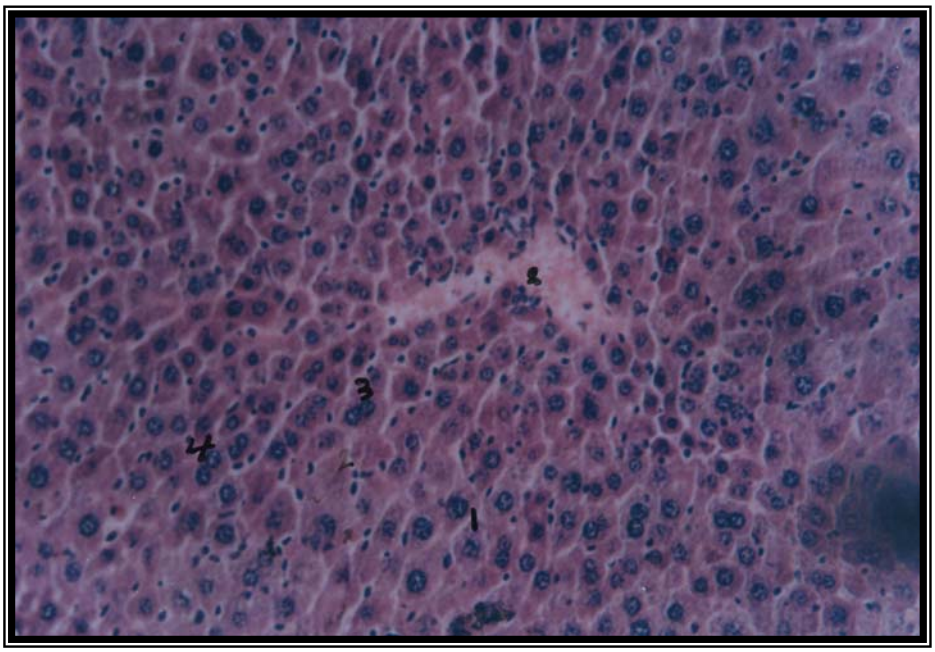
شكل (1): مقطع في الكبد لنموذج السيطرة يوضح نسيج الكبد بصورة عامة (50 X) صبغة الهيماتوكسلين – ايوسين.



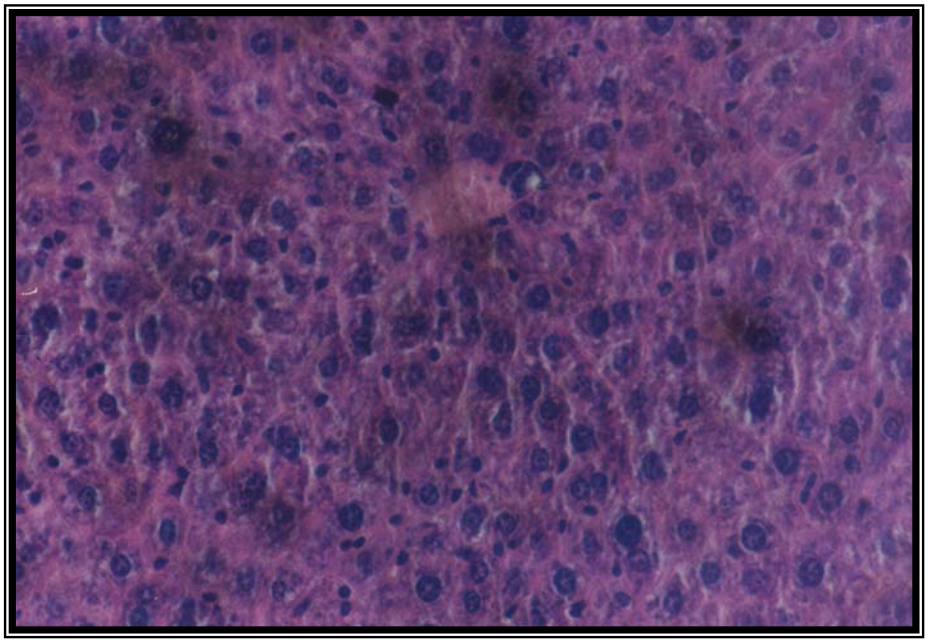
شكل (2): مقطع في الكبد محقون بالسلبرايد يوضح سعة الوريد المركزي ⟵ (50 X) صبغة الهيماتوكسلين – ايوسين.



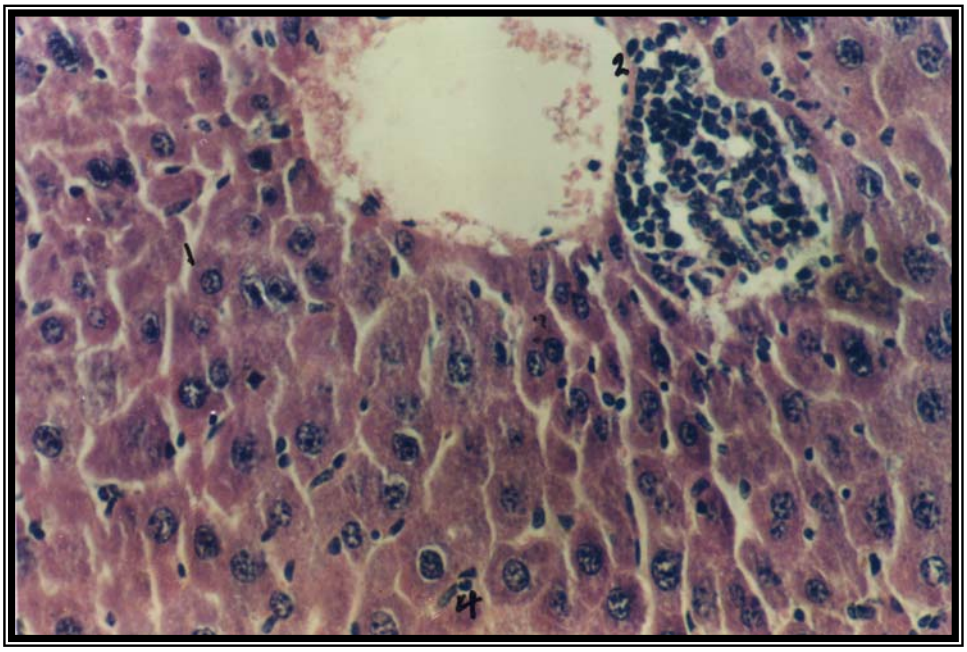
شكل (3): مقطع في الكبد لنموذج سيطرة يوضح تراص الخلايا البرانكيمية الكبدية (200 X) صبغة الهيماتوكسلين – ايوسين



شكل (4): مقطع في الكبد لنموذج محقون بالسلبرايد يوضح سعة الجيوب (1) وارتشاح الخلايا اللمفاوية بين اشرطة الخلايا الكبدية (2) وكثافة خلايا كبفر والخلايا الثنائية النواة (3) (200 X) صبغة الهيماتوكسلين – ايوسين.



شكل (5): مقطع في الكبد لنموذج السيطرة (400 X) صبغة الهيماتوكسلين – ايوسين.



شكل (6): مقطع في الكبد لنموذج محقون بالسلبرايد يوضح سعة اشباه الجيوب الدموية (1) وارتشاح الخلايا اللمفاوية (2) والخلايا ثنائية النواة (3) وزيادة خلايا كبفر (4) (400 X) صبغة الهيماتوكسلين – ايوسين.

جدول رقم (1): يوضح تأثير فرط افراز البرولاكتين على عدد الخلايا ثنائية النواة وخلايا كبفر وقطر الخلايا البرنكيمية وسعة الوريد المركزي في كبد ذكور الارانب.

	المجموعة المحقونة بالسلبرايد **8** ملغم / كغم	مجموعة السيطرة
معدل عدد الخلايا ثنائية النواة في المساحة المعينة	0.29 ± 3.6 **	0.63 ± 1.7
معدل عدد خلايا كبفر **Kupffer's cells** في المساحة المعينة.	0.50 ± 6.81 **	0.46 ± 3
سعة الوريد المركزي **µm**	3.44 ± 105 **	1.99 ± 65.7
معدل قطر الخلايا البرنكيمية µm	0.27 ± 9.43 **	0.16 ± 7.16

القيم تمثل المعدل ± الخطأ القياسي

**** فرق معنوي على مستوى $P < 0.01$.**

µm مايكروميتر

References:

1. Bole-Feysor, C.; Goffin, V.; Edery M., Binart N. and Kelly P. A. **1998**. *Prolactin (Prl) and its receptor: Actions, signal transdunction pathways and phenotypes observed, in Prl receptor Knockout Mice. Endocrine reviews*. 19 (3): 225-268.
2. Vergani, G.; Mayerhofer, A.; and Bartke A. **1994**. *Acute effects of rats growth hormone (GH), Human GH and prolactin on proliferating rat liver cells in vitro: a study of mitotic behavior and ultra structural alteration*. Tissue cell. 26 : 457-465.
3. Rose, J. and Wert, C. **1993**. *Prolactin Binding sites in the adrenal glands of mink (Mustela Vison)*. Comp. Biochem. Physiol. 104 (4): 759-763.
4. Fluckiger, E.; del pozo, E. and Von Worder, K. **1982**. *Prolactin. Physiology, pharmacology and clinical findings. Springer-Verlag* Berlin, Hiedelberg. Germany.
5. Mustafa, A.; Noberg, F.; Bogdanric, N., Isla, A.; Suliman, I.; Lindaren, U., Roos, P. and Adem, A. **1995**. *Prolactin binding sites in rat brain and liver : effects of longterm overiecetomy and overian steroids*. Neurosci-Left. 200 : 179-182.
6. Bourouba, R. **2002**. *Study on the mechanism of bromocriptin and sulpiride on prolactin action in male rabbit's spleen and liver*. (M. Sc. Thesis, University of Baghdad).
7. Takada., T. ; Yamamoto, T. ; Koike, K. ; Kando, Y. ; Miyake, A. ; Sugihara, A. ; Tsujimura, T. and Terada, N. **1997**. *Effect of prolactin and estrogen on cell proliferation of the mouse liver induced by partial hepatectomy*. In vivo. 11 (5): 409-413.
8. Piccoletti, R. ; Bendinelli, P., Bernelli-Zazzera, A. **1994**. *Rapid stimulation of anitogen – activated protein kinase of rat liver by prolactin*. Biochen-T 303 (pt2) : 429-33.
9. Devito, W. J. ; Avakian, C.; Stone, S. and Okulicz, W. C. **1993**. *Prolactin stimulated mitogenesis of cultured astrocytes is mediated by protein kinase C. dependent mechanism*. Journal of Neurochemistry 60 (3) : 835-842.
10. Humason, G. L. **1972**. *Animal tissue techuiques.* W. tl. Free man and company, San Francisco, PP. 313-350.
11. Al-Kuffaishi, H. S. **1970**. *Neurosecretory intertidal gastropod mollusks Littorina littorea (L.)* (M. Sc. Thesis, University of Sheffield).
12. McMurdo, M. E. T. ; Howie, P. W. ; Lewis, M. ; Marnie, M. ; McEwen, J. and Mcneilly, A. S. **1987**. *Prolactin response to low doses sulipride*. Br.J. Clin. Pharmacol. 24 : 133-137.
13. Collu, R. and Bouvier, C. **1987**. *Effects of sulipride and apomorphine on prolactin release in adrenalectomized animals*. Role of sodium ions. Brain Res. 401: 23-29.
14. Chohen, H. ; Sabbagh, I. ; Guillaumot, P. and Beatrand, J. **1985**. *Increased dopaminergic inhibition of prolactin in the*

hypoprolactinaemia IPL unde rat J. Endocr. 107 : 325-329.

15. Nicoll C. S. ; Hebert, N. ; Stieny, S. and Delidow, B. **1983**. *Asynergist of prolactin's mitogenic activity (synlactin) is secreted by the liver*. Am. Zool. 23 : 899.
16. Christoph, C. ; Mick, W. and Nicoll, C. S. **1985**. *Prolactin directly stimulates the liver in vivo to secrete a factor (synlactin) which acts synergistically with the Hormane. Endocrinology*. 116 : 2049 – 2053.
17. Crowe, P. D. ; Buckley, A. R. ; Zorn, N. E. and Rui, H. **1991**. *Prolactin activates protein Kinase C and stimulates growth related gene expression in rat liver*. Mol. Cell. Endocrinol. 79 : 29-35.
18. Ouhtit, A. ; Ronsin, B., ; Kelly, P. A. and Morel, G. **1994**. *Ultrastructural expression of prolactin receptor in rat.* Biol. Cell. 82 : 169-176.
19. Lloyd, R. W. ; Jin, L. ; Chang, A. ; Kulig, E. ; Camper, S. A. ; Ross, B. D. ; Downs, T. R. and Frohman, L. A. **1992**. *Morphologic effects of hGRH gene expression on the pituitary, Liver and pancreas of MT hGRH transgenic mice: An insitu hybridization analysis*. Am. J. Pathol. 141 : 895-906.
20. Bernton, E. W. ; Melzer, M. S. and Holaday, J. W. **1988**. *Suppression of Macrophage activation and T-lymphocyte Function in Hyperprolactenimic mice*. Science. 239 : 401-404.
21. Igal, RA. ; de Gomez-Dumm, IN. and Goya, RG. **1998**. *Modulation of rat liver lipid metabolism by prolactin. Prostaglandins*. Leukot. Essent. Fatty acids 59 : 395-400.
22. Machida, T. ; Taga, M. and Minaguchi, H. **1990**. *Effect of prolactin (PRL) on lipoprotein Lipase (LPL) activity in the rat fetal liver*. Asia Oceania J. obstet. Gynaecol. 16 : 261-265.
23. Villaba, M. ; Zabala, M. T. ; Martsnez-Serrano, A. ; dela Colina, R. ; Satrustegui, J. and Garcia-Ruiz, J. P. **1991**. *Prolactin increases cytosolic free calcium concentration in hepatocytes of lactating rats*. Endocrinology. 129: 2857-2861.
24. Matera, L. ; Cesano, A. ; Bellono, G. and Oberholtzer, E. **1992**. *Modulatory effect of prolactin on the resting and mitogen induced activity of T,B and NK lymphocytes*, Bran Behav. Immun, 6 : 409.
25. Clevenger, C. V. ; Freier, O. O. and Klineo, J. B. **1998**. *Prolactin receptor signal transduction in cells of the immune system*. J. Endocrinol. 157 : 187-197.
26. Delhase, M. ; Vergani, P. ; Malur, A. ; Hooghe-Peters, S. L. and Hoogher, R. J. **1993**. *The transcription factor Pit-1 / GHF-1 is expressed in hemopoietic and lymphoid tissues*. Eur. J. Immunnol. 23 : 951-955.