جامعة الموصل

كلية التربية للعلوم الصرفة

تقييم دور زيت جنين القمح في الحد من التغيرات المرضية النسجية والمناعية والجينية المحدثة بعقار التاكروليمس في كبد ذكور الفئران البيض

ثامر أحمد محمد الجحيشي

رسالة ماجستير

علوم حياة

بأشراف

الأستاذ المساعد

الدكتورة بيداء عبد العزيز محمد صالح

١٤٤٧هـ ٢٠٢٥م

الخلاصة

يعد زيت جنين القمح من المركبات النباتية حديثة الاكتشاف وله قيمة غذائية ومضادة للأكسدة عالية، أما عقار التاركوليمس فهو من المثبطات المناعية ويستعمل في عمليات زراعة الأعضاء المختلفة، ويعود العقار أيضا إلى مثبطات الكالسينيورين. واكتشف لأول مرة في العام 1998م. تم التحري في الدراسة الحالية عن إمكانية عقار التاكروليمس بتركيز (0.2 و0.4) ملغم /كغم في حث نشاط المسار الداخلي للموت المبرمج في الخلايا الكبدية من خلال قياس التفاعل المناعي النسجي للبروتينات BAX and BCL2، فضلا عن التعبير الجيني لهما ، وإحداث الأضرار التركيبية في نسيج الكبد ،والتأثير على السلوك العصبي الحركي ووزن الحيوانات المختبرة ، وإضافة إلى التغيرات الفسلجية في مصل الدم الخاصة بوظائف الكبد مثل أنزيمي ناقلة أمين الألانين و ناقلة أمين الأسبارتات والمستحثة فقط بالتركيز الأعلى من العقار قيد الدراسة .وهدفت الدراسة الحالية أيضا دراسة دور زيت جنين القمح في تقليل الآثار السامة المحدثة بعقار التاكروليمس وللفترات المعاملة نفسها 14و28 يوماً.

استعمل في التحري العلمي الحالي 80 ذكر فأر أبيض من الجنس *Mus musculus*، بعمر ووزن مناسبين لأجراء تجارب البحث العلمي. فصلت الحيوانات إلى أربع مجاميع لكل فترة زمنية ولكل تركيزين مدروسيّن . احتوت المجموعة الواحدة على خمس حيوانات .و كان ترتيب المجموعات كالآتي : مجموعة السيطرة السالبة (ماء مقطر)، ومجموعة السيطرة الموجبة (زيت جنين القمح تركيزه 1130 ملغم / كغم)، ومجموعتي عقار التاركوليمس بتركيز (0.2 و0.4 ملغم /كغم) ، ومجموعتي عقار التاركوليمس بتركيز (0.2،و0.4 ملغم / كغم) مع زيت جنين القمح . وكانت الفترات الزمنية للمعاملة هي 14 و28 يوماً. بينت النتائج أنَّ لزيت جنين القمح تأثيراً واضحاً في إعادة الوزن الطبيعي للحيوانات المعاملة مسبقا بعقار التاركوليمس عند التركيزين والفترتين المدروستين ،إذ كان هناك انخفاض معنوي عند مستوي احتمالية $P \leq 0.05$ في كل المعاملات للفترة 28 يوماً مقارنة بتلك التي لوحظت في الفترة 14 يوماً . ووجد من الدراسة الآنية أنَّ جميع المعاملين آنفة الذكر لها تأثير واضح على السلوك العصبي الحركي من خلال ما وجد في اختبار الميدان المفتوح أنّ هناك زيادة معنوية عند مستوي احتمالية $P < 0.05$ في عدد المربعات المقطوعة وعدد مرات الوقوف على الأرجل الخلفية من قبل ذكور الفئران البيض في المجموعة المعاملة بالتركيز(0.2)ملغم / كغم من عقار التاركوليمس وزيت جنين القمح (1130) ملغم / كغم للفترة 28 يوماً مقارنة بالمجموعة التجريبية المناظرة لها ولكن للفترة 14 يوماً ،أما عن عدد كرات البراز المطروحة فقد كانت أكثر في المجاميع التجريبية الأولى والثانية وللفترة 28يوماً مقارنة بنظيرتها المعاملة للفترة 14 يوماً .وأضحت نتائج

القراءات المجهرية لمقاطع الأكباد المدروسة تغيرات بنيوية غير طبيعية تمثلت بالنخر التجلطي ، وإرتشاح الخلايا البلعمية ، وتنكس فجوي ، فرط تنسج خلايا كوبفر، أما في الفترة 28 يوماً فقد كان التجزء النووي وتكفف الخلايا الالتهابية حول الوريد المركزي ، وترسب الكولاجين ، وتوسع الجيبانيات هي التغيرات الأكثر وضوحاً.

وبينت النتائج أنّ معاملة الأكباد بالتركيز الثاني(0.4) من عقار التاركوليمس وللفترة 28 يوماً سبب تليفاً ،وبوادر الموت المبرمج ، واحتقان واسع في الجيبانيات، وتحسنت التغيرات المرضية في الكبد في المجموعة المعاملة بالتركيز (0.2)ملغم / كغم من التاركوليمس وزيت جنين القمح ، إذ لوحظ انخفاض في عدد الخلايا الكبدية المتنكسة ، وارتشاح طفيف لخلايا البلعمية حول القنية الصفراوية للفترة 14 يوماً .وأخذت الآفات المرضية في التحسن أكثر خلال الفترة 28 يوماً ، فلوحظ استمرار التأثير المضاد للأكسدة للزيت في نسيج الكبد بالتقدم أكثر وأكثر حتى المجموعة المعاملة بالتركيز (0.4)ملغم / كغم من عقار التاركوليمس وزيت جنين القمح قيد الدراسة ، فلوحظ انخفاض كبير في الخلايا التي تعاني من النخر التجلطي واحتقان طفيف حول الجيبانيات الكبدية ، التركيب السوي للوريد المركزي وللقنية الصفراوية.

أما عن تأثير المعاملة بعقار التاركوليمس (0.2) ملغم /كغم على التفاعل المناعي النسجي لبروتين BAX في الخلايا الكبدية وللفترة 14 يوماً فقد لوحظ استجابة موجبة (+) فيها. وكانت الاستجابة الكيميائية المناعية النسجية تقع مابين التفاعل الموجب البسيط(+) والموجب الشديد جدا(+++) في الخلايا الكبدية المعاملة بالتركيز (0.4) ملغم /كغم وللفترة الزمنية أعلاه نفسها. وكانت الاستجابات مشابهة لما ذكر أعلاه في أكباد المعرضة للفترة 28 يوماً .اما المجموعة المعاملة بالتاكرولميس عند التركيزين المدروسين وزيت جنين القمح وللفترة 14 يوماً فقد أظهرت تفاعلاً موجبا بسيطا (++)، وتفاعلاً موجباً أكثر شدة (++) وعلى التوالي للأجسام المضادة لبروتين BAX .وكانت التفاعلات المناعية النسجية للأكباد المعاملة بالتركيزين (0.2 و0.4) ملغم / كغم مشابهة بلاستجابات في المجموعتين المناظرتين لها والمعرضة للفترة 28 يوماً .وبينت نتائج التسجيل النسجي الرقمي لتفاعلات الخلايا الكبدية تجاه بروتين BAX، زيادة معنوية عند مستوي احتمالية $P \leq 0.0\ 1$ في المجاميع المعاملة بالتركيزين الأول والثاني من عقار التاركوليمس وزيت جنين القمح وللفترتين 14 و28 يوماً في عدد الخلايا المتفاعلة إيجابياً مع الأجسام المضادة لبروتين BAX مقارنة بما لوحظ في مجموعة السيطرة السالبة ولكنها كانت أقل عدداً مما لوحظ في عدد الخلايا المتفاعلة في المجموعة المعاملة بعقار التاركوليمس (0.4)ملغم /كغم وزيت جنين القمح مقارنة بما ذكر سابقاً.

وكشفت النتائج أيضا أنَّ المجاميع المعاملة بعقار التاركوليمس عند التركيز (0.4)ملغم /كغم وللفترة 14 يوماً أظهرت استجابة موجبة وموجبة شديدة جداً تجاه الأجسام المضادة لبروتين BCL2 مشيرا إلى تأثيره في حث الفعل المضاد للموت المبرمج في الخلايا الكبدية .وازدادت الاستجابة للمجموعة نفسها وعند التركيز نفسه ولكن للفترة 28 يوماً. وأشارت نتائج قياسات التعبير الجيني باستخدام تقنية qPCR إلى أنّ التعبير الجيني لبروتين BAX في المجموعة المعاملة بالتركيز (0.4)ملغم /كغم من عقار التاكروليمس إزداد وبشكل واضح وللفترة 14 يوماً .وانخفض التعبير الجيني في المجموعة المعاملة بعقار التاركوليمس عند التركيز الثاني مع زيت جنين القمح وللفترة 14 يوماً . وانخفض التعبير الجيني له في المجموعة المعاملة بالتركيز الأعلى من عقار التاركوليمس وزيت جنين القمح ولنفس الفترة آنفة الذكر نفسها ولوحظ في الدراسة الحالية انخفاض في التعبير الجيني لبروتين BCL2 في المجموعة المعاملة بالتركيز الأعلى من عقار التاركوليمس وللفترة 14 يوماً مقارنة بمجموعة السيطرة السالبة ، في حين كان التعبير الجيني له مرتفعاً نوعاً ما إذا ما قورنت بمجموعة السيطرة السالبة في المجموعة المعاملة بالعقار وزيت جنين القمح وللفترة سابقة الذكر نفسها مما يدل على دور زيت جنين القمح في حث الفعالية المضادة للموت المبرمج. وازداد التعبير الجيني للبروتين انف الذكر لنفس للمعاملة أعلاه نفسها ولكن للفترة الزمنية 28 يوماً .بينت النتائج أيضا أن التركيز الأعلى لعقار التاركوليمس سبب ضرراً فسلجياً في اثنين من المعايير الفسلجية المعتمدة لتقييم وظيفة كل من أنزيمي AST و ALT في مصل دم الحيوانات المعاملة لفترة 14 يوماً وازداد الضرر خلال فترة التعريض 28 يوماً . وتحسن مستوي ونشاط هذين الأنزيمين في المجاميع المعاملة بالتركيز الأعلى للعقار وزيت جنين القمح ولكلا فترتي التعريض.

Abstract

Wheat germ oil is a recently discovered plant compound with high nutritional and antioxidant value. Tacrolimus is an immunosuppressant used in organ transplants. It is also a calcineurin inhibitor and was first discovered in 1998. In the present study, the potential of tacrolimus (0.2 and 0.4 mg/kg) to induce the activity of the intrinsic pathway of apoptosis in hepatocytes was investigated by measuring the immunohistochemical reaction of BAX and BCL2 proteins as well as their gene expression, causing structural damage in liver tissue, influencing the motor neuronal behavior and weight of the tested animals, in addition to physiological changes in the blood serum related to liver functions such as the enzymes alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase, which were induced only by the higher concentration of the drug under study. The current study also investigated the role of wheat germ oil in reducing the aforementioned toxic effects over the same treatment periods, which are 14 and 28 days. In the present thesis, 80 male albino mice of the genus *Mus musculus*, of appropriate age and weight for conducting these scientific research experiments, were used. The animals were divided into four groups for each treatment period and each studied concentration. Each group contained five animals. The groups were arranged as follows: negative control group (distilled water), positive control group (wheat germ oil at a concentration of 1130 mg/kg), two tacrolimus groups (0.2 and 0.4 mg/kg), and two tacrolimus groups (0.2 and 0.4 mg/kg) with wheat germ oil. The treatment periods were 14 and 28 days.The results showed that wheat germ oil had a clear effect in restoring the normal weight of animals previously treated with tacrolimus at the two concentrations and periods studied, as there was a significant decrease at the probability level of $P \leq 0.05$ in all treatments for the 28 days compared

to that observed in the 14-day period.The current study found that all the above mentioned factors have a clear effect on the motor neurological behavior through what was found in the open field test that there is a significant increase in the number of squares cut and the number of times standing on the hind legs by male white mice at the probability level of $P \leq 0.05$ in the group treated with a concentration of (0.2) mg/kg of tacrolimus and wheat germ oil (1130) mg/kg for 28 days compared to the corresponding experimental group but for the period of 14 days.As for the number of excreted fecal balls, it was higher in the first and second experimental groups for the 28 days compared to their counterparts treated for the 14-day period.The results of microscopic readings of the studied livers showed structural changes represented by coagulative necrosis, infiltration of macrophages, vacuolar degeneration, and hyperplasia of Kupffer cells. However, in the 28 days, there was nuclear fragmentation and confluence of inflammatory cells around the central vein, collagen deposition, and expansion of the sinusoids. The results showed that treating the livers with the second concentration of the drug tacrolimus for a period of 28 days caused fibrosis, signs of apoptosis, and widespread congestion in the sinusoids. The pathological changes in the liver improved in the group treated with 0.2 mg/kg of tacrolimus and wheat germ oil, as a decrease in the number of degenerated hepatocytes was observed, and a slight infiltration of macrophages around the bile duct for 14 days. The pathological lesions improved further during the period of 28 days, as the antioxidant effect of the oil continued to progress in the liver tissue, even in the group treated with 0.4 mg/kg of tacrolimus and wheat germ oil under study. A significant decrease in cells suffering from coagulant necrosis and slight congestion around the hepatic sinusoids was observed, as well as a normal structure of the central vein and bile duct. As for the effect of treatment with tacrolimus

(0.2) mg/kg on the immunohistochemical reaction to BAX protein in hepatocytes for a period of 14 days, a positive response (+) was observed in them. The immunohistochemical response was between a simple positive reaction (+) and a very strong positive reaction (+++) in hepatocytes treated with a concentration of (0.4 mg/kg for the same period above. The responses were similar to what was mentioned above in livers exposed for 28 days. The group treated with tacrolimus at the two studied concentrations and wheat germ oil for 14 days showed a slight positive reaction (++) and a more severe positive reaction (++), respectively, for antibodies to the BAX protein. The tissue immune reactions of the livers treated with the two concentrations (0.2 and 0.4) mg/kg were similar to the responses in the two corresponding groups exposed for one day.The results of digital histological recording of hepatic cell reactions to BAX protein showed that there was a significant increase at the probability level of 1 $P \leq 0.0$ in the groups treated with the first and second concentrations of tacrolimus and wheat germ oil for the periods of 14 and 28 days in the number of cells that reacted positively with antibodies to BAX protein compared to what was observed in the negative control group, but it was less in number than what was observed in the number of cells that reacted in the group treated with tacrolimus (0.4) mg/kg and wheat germ oil compared to what was previously mentioned. The results also revealed that the groups treated with tacrolimus at a concentration of 0.4 mg/kg and for 14 days had a positive and very strong positive response to antibodies to BCL2 protein, indicating its effect in inducing the anti-apoptotic action in hepatic cells. The response increased for the same group at the same concentration, but for 28 days.The results of gene expression measurements using qPCR technology indicated that the gene expression of the BAX protein in the group treated with a concentration of (0.4) mg/kg for 14 days. Gene

expression decreased in the group treated with the drug tacrolimus at the second concentration with wheat germ oil for 14 days. Its gene expression decreased in the group treated with the highest concentration of tacrolimus and wheat germ oil for the same period mentioned above. In the current study, a decrease in the gene expression of BCL2 protein was observed in the group treated with the highest concentration of tacrolimus for the 14 days compared to the negative control group, while its gene expression was somewhat high when compared to the negative control group in the group treated with the drug and wheat germ oil for the same period mentioned above, indicating the role of wheat germ oil in inducing anti-apoptotic activity. Gene expression of the aforementioned protein increased for the same treatment above but for the 28 days. The results also showed that the highest concentration of tacrolimus caused physiological damage to two of the approved physiological parameters used to evaluate the function, namely AST and ALT, in the serum of animals treated for a period of 14 days, and the damage increased during the 28-day exposure period. The levels and activity of these two enzymes improved in the groups treated with the highest concentration and wheat germ oil for both exposure periods.

University of Mosul

College of Education

for Pure Sciences

Evaluation of the role of wheat germ oil in mitigating tacrolimus-induced histopathological, immunological, and genetic alterations in the livers of male albino mice

Thamer Ahmed Mohammed Al-Juhayshi

M.Sc Thesis

Biology

Supervised By

Asst to.Prof.

Dr. Baidaa Abdulaziz Mohamed Salah

2025 A.D **1447 A.H**