جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة ديالى

كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

التأثير المناعي والنسجي لمستخلص الدودة الجرذ الشريطية *Hymenolepis diminuta* في علاج الفئران البيض المستحث فيها مرض القولون التقرحي

أطروحة مقدمة إلى

مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة ديالى

هي جزء من متطلبات نيل درجة الدكتوراه في فلسفة علوم الحياة

تقدمت بها

اسراء داود فرحان

بكلوريوس علوم حياة/كلية العلوم / جامعة ديالى (2006–2007)

ماجستير علوم الحياة/كلية التربية للعلوم الصرفة /جامعة ديالى (2016–2017)

إشراف

الاستاذ الدكتورة

نغم ياسين البياتي

1444هـ 2022 م

1.1- المقدمة

مرض ألتهاب الأمعاء Inflammatory Bowel Disease هو مصطلح شامل يستخدم للإشارة إلى الأمراض الالتهابية المختلفة في الجهاز الهضمي التي تشمل كلا من التهاب القولون التقرحي Ulcerative Colitis ومرض كرونCrohn's Disease ، يظهر مرض كرون على أنه تفاعل حبيبي في كل مكان غير متعرج مع خراجات ونواسير عميقة بينما يظهر التهاب القولون التقرحي UC مع آفات تشبه آرثوس تتميز بخراجات الخبايا وتقتصر على الغشاء المخاطي السطحي للقولون (Glocker وGrimbacher ،2012)، ومع ذلك يمكن أن يرتبط مصطلح IBD بأي من هذة الأمراض(Actis واخرون،2011). يبلغ عمر الذروة لظهور مرض التهاب الأمعاء بين العقد الثاني والثالث من العمر ،لا يبدو أنه يظهر تحيزًا في التوزيع الجنسي فكلاهما يصاب بالتهاب القولون التقرحي (Molodecky وآخرون،2012).

بينت الدراسات ان IBD حالة شائعة في الدول الصناعية ،إذ يصاب على أكثر من 1.4 مليون شخص في الولايات المتحدة الأمريكية و 2.2 مليون شخص آخر في أوروبا في العقود القليلة الماضية (Glocker وGrimbacher ،2012).

كانت هناك زيادة تدريجية في حدوث وإنتشار مرض ألتهاب الأمعاء في الدول النامية (Baumgart وآخرون،2011، Burisch وMunkholm ، 2013). إنّ ألاعتراف المتأخر بمرض التهاب الأمعاء كان مصحوبًا بنقص معايير التشخيص المحددة يعني أن القليل من الدراسات حاولت تحديده (Burisch و Munkholm،2013). يبدو أيضًا أن هناك تدرجًا في نسب الأصابة بين الشمال والجنوب في أوروبا ، إذ أظهرت دراسة واحدة ارتفاعًا بنسبة 40٪ و

80٪ من حالات UC و CD ، على التوالي في دول شمال أوروبا مقارنة بدول جنوب أوروبا (Logan و Bowlus ،2010).

قد أظهر Kaplan و Windsor (2021) مؤخرًا أن المتخصصين يركزون على تطورظهور المرض وقاموا بتقسيمه على أربعة مراحل وبائية تتعلق بالسكان: مرحلة الظهور أو البدء (كما في الدول المتطورة)، مرحلة التسارع في الحدوث (كما هو الحال في الدول الصناعية)، ومرحلة الانتشار المركب (في المناطق الغربية وسيكون في طريقه إلى المرحلة الأخيرة التي تسمى مرحلة توازن الانتشار في هذه المناطق).

لا يزال التسبب في أمراض الأمعاء الالتهابية (IBD) غير مفهوم تمامًا. ومع ذلك، تعد العوامل البيئية مكونات أساسية للتسبب بمرض التهاب الأمعاء، إذ ان هناك ارتباط بين مرض التهاب الأمعاء وعدد كبير من العوامل البيئية التي تبدو ذات صلة والتي تشمل التدخين والنظام الغذائي والأدوية و الوضع الاجتماعي والإجهاد والعوامل الميكروبية ونفاذية الأمعاء واستئصال الزائدة الدودية(Sanchez وآخرون ،2013). كما ويبدو أن تداخل العوامل الجينية والبيئية في سياق تفاعلات المضيف – الميكروبات تؤدي إلى إحداث مسببة لمرض التهاب الأمعاء وضعف وظائف الحاجز المعوي ، مما يؤدي إلى انتقال ميكروبات الأمعاء ، ويعزز التنشيط المفرط للجهاز المناعي المخاطي وإنتاج الحركيات الخلوية المبدئة للألتهابات كلها ممكن أن تساهم مجتمعة في تأجيج الألتهاب الذي لوحظ في مرضى التهاب الامعاء(Neurath،2019 ;Schirmer وآخرون ،2019).

إنّ عملية تشخيص مرض التهاب الأمعاء ليست واضحة. ويظهر المرض عادة في المرضى الذين تتراوح أعمارهم بين 20 و 30 عامًا (Benchimol واخرون،2011)، إذ يعانون من عدم

ارتياح في البطن قد تستمر لسنوات حتى يتطور المرض إلى مراحل مزمنة أكثر ، تتميز بالإسهال ووجود مخاط و / أو دم في البراز(Lennard-Jones و Shivananda ،1997).

يبدأ UC من القولون البعيد (بالقرب من فتحة الشرج)؛ وينتشر صعودًا عبر القولون(Ochsenkuhn و D'Haens ،2011). إذ يعاني ثلث مرضى التهاب القولون التقرحي فقط من ألتهاب القولون القاصي وقت التشخيص وثلثيهم يعانون من التهاب القولون الأيسر أو التهاب القولون العام الأكثر خطورة(Solberg واخرون،2009).

تشمل خيارات العلاج التقليدية amino salicylates، المضادات الحيويةantibiotics ، وcorticosteroids وغيرهامن العوامل المثبطة للمناعة مثل methotrexate وazathioprine، لكن خيارات العلاج تختلف اختلافًا كبيرًا بين البلدان (Baumgart وآخرون ،2011). عادةً ما يكون الإجراء الأول هو العلاج بأستخدام amino salicylates، وعندما يفشل ذلك العلاج يبدأ العلاج بـ Glucocorticoids، الخط الثاني للعلاج ، والذي يعد مثبط للمناعة ومن ثم يتميز بالعديد من الآثار الجانبية غير المرغوب فيها . ويوجد مستقبلات glucocorticoid في معظم الخلايا ، مما يجعل خيار العلاج هذا غير محدد ويترك المرضى عرضة للإصابة بالعدوى(Rhen وCidlowski ،2005). ومن الأدوية الأخرى الشائعة الاستخدام للتهدئة والادامة ادوية methotrexate وazathioprine (Immuran)؛ يمكن أن يكون لها آثار جانبية ضارة بسبب التثبيط المناعي العام (Ding وآخرون،2015).

أما Methotrexate فهو دواء مضاد لحامض الفوليك ومضاد للاستقلاب تم تصنيعه في البداية ولا زال يستخدم حاليًا لعلاج السرطانات(Ding وآخرون،2015)، قد يعاني المرضى الذين يتناولون الميثوتريكسات من آثار جانبية للعلاج الكيميائي مثل الغثيان والصداع وزيادة خطر

تلف الكبد(Armagan وآخرون،2015) ، والدواء غير مناسب للنساء الحوامل بسبب أنشطته المضادة لحامض الفوليك (Dunn وآخرون، 2015).

فيما يعد Azathioprine عامل مثبط آخر للمناعة يشيع استخدامه في مرضى رفض الطعم والمرضى الذين يعانون من أمراض المناعة الذاتية بما في ذلك داء الذئبة الاحمراري وألتهاب المفاصل الروماتزم (Suarez-Almazor واخرون،2000 ; Saavedra وآخرون ،2015). التأثير الجانبي الأكثر إثارة للقلق لهذا الدواء هو زيادة خطر الإصابة بسرطان الغدد الليمفاوية خاصة عند الأشخاص الذين يعانون من مرض ألتهاب الأمعاء(Kandiel واخرون،2005).

هناك أمل كبير في المزيد من علاجات الأجسام المضادة وحيدة النسيلة monoclonal المستهدفة والتي تستهدف عامل نخر الورم ، مثل infliximab و adalimumab . عن طريق منع عامل نخر الورم ، إذ يحد infliximab من الالتهاب عن طريق تثبيط التعبير عن البين الابيضاضي والاوساط المبدئة للالتهابات ، مما يؤدي إلى الموت المبرمج للخلايا التائية المسببة للأمراض و الحد من موت الخلايا المبرمج للخلايا التائية التنظيميةRegulatory T Cells (Tregs) والخلايا المعوية، والحث على التئام الجروح عن طريق الضامة النشطة البديلةAlternate active macrophages (AAMacs)، والحد من التعبير عن جزيئات الالتصاق وتنظيم توازن مصفوفات البروتينات المعدنية (matrix metalloproteinases MMPs) ومثبطات الأنسجة من البروتينات المعدنية metalloproteinases (TIMPs). و هناك حاجة كبيرة لم تتم تلبيتها لمزيد من العلاجات المستهدفة والأكثر أمانًا لمرضى التهاب الأمعاء(Guo وآخرون،2013).

بذلك فأن مرض التهاب الأمعاء يعد عبئًا اقتصاديًا كبيرًا إذ تنفق العديد من الحكومات ميزانيات ضخمة لعلاج هذا المرض (DeVol واخرون،2007).

تستقر الديدان الطفيلية في مضيفها من أجل استغلاله للحصول على مغذياتها ولديها القدرة على التسبب في أعراض مرضية في المضيف يمكن أن تؤدي إلى احداث امراضية تتباين بين الضعيفة بدون اعراض الى الشديدة التي قد تؤدي الى الوفيات و تنتشر عدوى الديدان الطفيلية بشكل كبير في جميع أنحاء العالم ، لكن توزيع العدوى يظهر أنها أكثر انتشارًا في البلدان النامية (Flynn واخرون،2007).

على الرغم من أن هناك ادلة على قدرات التعديل المناعي لمنتجات الاخراج والافراز لمختلف انواع الديدان إلا ان الأليات التي تتعلق بالديدان التي تؤدي الى هذا التعديل فضلاً عن الاليات الجزيئية والخلوية التي تتفاعل عن طريقها هذة الديدان الطفيلية مع الجهاز المناعي للمضيف والتي تؤدي الى التنظيم المناعي مازالت غير مفهومة لحد الان بشكل كامل ولقد ثبت ان منتجات الديدان الطفيلية لها القدرة على تحفيز التنشيط البديل للخلايا الضامة (Harnett و Harnett، 2010)

وبينما تعد الاصابة بالديدان الطفيلية من الآمراض الألتهابية التي تضر بالمضيف إلا أن الاصابة بها تعد مفيدة من جهة اخرى إذ أن تلك الاصابات تؤدي الى تحفيز الاستجابة المناعية التنظيمية التي تعمل على تثبيط الاستجابة المناعية الالتهابية وذلك عن طريق تنشيط الاستجابة المناعية الناتجة من خلايا مثل الخلايا البلعمية ، الخلايا البائية والخلايا التائية التنظيمية وأن افرازات هذة الخلايا من البين الابيضاضي (السيتوكينات) مثل TGF-β و IL-4 و IL-5 و

IL-10 و IL-13 تعمل على تعديل الاستجابة المناعية بما يؤدي الى تقليل الاستجابة الالتهابية او منعها (Weinstock و Elliott , 2013 ; Harnett و Harnett ،2017).

اهداف الدراسة

هدفت الدراسة الحالية إلى معرفة الدور الوقائي للمستخلص العام للدودة الجرذ الشريطية *H.diminuta* في علاج التهاب القولون التقرحي وقد تم تحقيق هذا الهدف من خلال :

1- إستحثاث مرض ألتهاب القولون التقرحيUC في الحيوانات المختبرية.

2- إصابة حيوانات المختبر بمستضدات الديدان لإظهار مدى قدرتها ومساهمتها في علاج أو الوقاية من التهاب الأمعاء التقرحي نسيجياً.

3- تقييم مستوى بعض الحركيات الخلوية مثل البين الابيضاضي IL-4 و IL-10 و IL-17 في مصل الدم للمجموعات التجريبية لتقدير مساهمتها في إحداث أو تثبيط أو تنظيم مرض التهاب الأمعاء ودور مستضدات الديدان في احداث تغير في مستوياتها.

4- التحري عن التعبير الجيني لجين *CXCL1* في حيوانات التجارب لتقدير دورها في إحداث مرض التهاب الأمعاء ودراسة تأثر التعبير الجيني بالمستضدات المحقونة

الخلاصة

يشكل مرض ألتهاب القولون التقرحي Ulcerative Colitis مرض مزمن وهو أكثر شيوعا في الشباب لكن بالامكان ان يحدث عند الاطفال وكبار العمر والذي يحدث نتيجة للتأكل الموضعي في الغشاء المخاطي المبطن للقولون ويرافق التهاب القولون التقرحي ظهور نزيف في البراز ونزيف من منطقة المستقيم وتقلصات والم في منطقة البطن.

تهدف الدراسة الحالية الى معرفة الدور المحتمل للديدان المعوية في العلاج أو الحماية من مرض التهاب القولون التقرحي في الفئران المستحثة بواسطة حامض الخليك acetic acid، والتحري عن متسويات البين الابيضاضي (IL-4,IL-10,IL-17) في المصل الفئران والتعبير الجيني للجين(*CXCL1*) في المقاطع النسجية للعينات للبحث عن دور هذه الديدان في تعديل أو تحور المناعة ودور الجينات في استحثاث المرض . اذ شملت الدراسة استخدام 50 فارا ذكر بالغ بعمر 8–10 اسابيع من النوع الابيض السويسري *Mus musculus* . قسمت الحيوانات على خمس مجموعات ، المجموعة الاولى تضمنت مجموعة السيطرة تم تجريعها بالماء المقطر . اما المجموعة الثانية فهي مجموعة الفئران التي تم استحثاث مرض التهاب القولون فيها باستعمال حامض الخليك بتركيز4% ، في حين تمثلت المجموعة الثالثة بمجموعة الفئران المجرعة بمستخلص الديدان فقط ،اما المجموعة الرابعة فتمثلت بمجموعة الفئران المستحثة بمرض التهاب القولون والمجرعة بالمستخلص ، بينما المجموعة الخامسة التي تسمى بمجموعة التحدي فتمثلت بمجموعة الفئران المجرعة بالمستخلص ومن ثم استحثت بمرض التهاب القولون التقرحي ، سحب الدم من المجاميع لغرض قياس التغيرات في مستويات البين الابيضاضي فضلاً عن تشـريح الحيوانات لاستخراج القولون وتثبيت قسما منها بمحاليل التثبيت لاجراء الخطوات المتسلسلة في تحضير المقاطع النسجية والقسم الاخر ثبت في TRIzol Reagent لغرض اجراء فحص PCR.