الملخص العربى – رسالة الدكتوراه

دراسة فارماكولوجية للتأثيرات الوقائية المحتملة لبعض مضادات الأكسدة ضد التسمم الكبدى المستحدث تجريبياً فى الجرذان

رسالة مقدمة من

باسم أنور شحاتة مسيحة

مدرس مساعد بقسم الأدوية والسموم

كلية الصيدلة

جامعة بنى سويف

للحصول على

درجة الدكتوراه فى فلسفة العلوم الصيدلية

"أدوية وسموم"

الملخص العربى

يتعلق هذا البحث بدراسة التأثيرات الوقائية المحتملة على الكبد لثلاثة مواد طبيعية هى خلاصات الألوڤيرا وبذر العنب وجوزة الطيب، وذلك مقارنةً بالواقى الكبدى المعيارى الأسيتيل سيستايين. لهذا الغرض، تم عمل نموذجى تسمم كبدى؛ النموذج الأول تم عمله على الجرذان الحية عن طريق الحبس الدموى الكبدى (الإسكيمية الكبدية) متبوعاً بإعادة الإرواء، أما النموذج الثانى فقد تم فى الزجاج على الخلايا الكبدية الحديثة العزل والمُحضّنة مع رابع كلوريد الكربون.

لعمل النموذج الأول فى الجرذان الحية تم ربط القناة الكبدية الثلاثية (الشريان الكبدى والوريد البابى والقناة المرارية) لفترات مختلفة (15 ، 30 دقيقة) متبوعةً بفترات مختلفة من إعادة تدفق الدم (15 ، 30 ، 60 دقيقة) عدا المجموعة الأولى (الجرذان الطبيعية) والمجموعة الثانية (المُعرّضة للعملية الصورية). الأدوية المُختبَرة (الأسيتيل سيستايين بجرعات 150 ، 300 ، 600 مجم/كجم/يوم، والألوڤيرا بجرعات 5 ، 10 ، 20 مل/كجم/يوم، وبذر العنب بجرعات 200 ، 400 ، 800 مجم/كجم/يوم، وجوزة الطيب بجرعات 250 ، 500 ، 1000 مجم/كجم/يوم) تم إعطاؤها يومياً عن طريق الحقن الفموى لمدة سبعة أيام متتالية للجرذان الطبيعية أولاً لدراسة وجود أى تأثيرات لها على الكبد العادى. الأدوية المُختبَرة (الأسيتيل سيستايين بجرعة 300 مجم/كجم/يوم، والألوڤيرا بجرعة 10 مل/كجم/يوم، وبذر العنب بجرعة 400 مجم/كجم/يوم، وجوزة الطيب بجرعة 500 مجم/كجم/يوم) تم إعطاؤها يومياً عن طريق الحقن الفموى لمدة سبعة أيام متتالية متبوعةً بجرعة إضافية مُعطاةً بنصف ساعة قبل الإسكيمية الكبدية (30 دقيقة) المتبوعة بإعادة الإرواء (30 دقيقة). لتقييم درجة الضرر الكبدى تم قياس إنزيمى ألانين ترانس أمينيز وأسبارتيت ترانس أمينيز وكذا مادة الصفراء الكلية والمباشِرة التفاعل والغير مباشِرة التفاعل وذلك فى الدم. تم أيضاً حساب نسبة وزن الكبد لوزن الجسم وقياس

نشاط إنزيم المايلوبيروكسيديز فى الكبد وكذا قياس المحتَوى الكبدى لمادة ثنائى ألدهايد المالون ومادة الجلوتاثيون المختزل وذلك بالإضافة إلى دراسة التغيرات النسيجية المصاحبة فى الكبد.

لعمل النموذج الثانى فى الزجاج تم عزل الخلايا الكبدية بطريقة تدفيق الكولاچينيز ثم تقسيم المُعلّق الخلوى فى ست عشرة قارورة زجاجية مستديرة (فلاسكة). جميع الفلاسكات (عدا واحدة تُركت كمقياس طبيعى)، تم تحضينها مع رابع كلوريد الكربون (بتركيز 5 ملليمولار). باقى الفلاسكات (عدا واحدة تُركت كمقياس للتسمم) تم تعريضها للأدوية المستخدمة و/أو لأحد مثبطىّ إنزيم مُصَنِّع أكسيد النيتريك (مادة إلّ-نيم كمُثبّط غير متخصص لكلٍّ من الإنزيم التكوينى والإنزيم المُستَحَثّ ومادة أمينوجوانيدين كمُثبّط للإنزيم المُستَحَثّ فقط) قبل تعريضها لرابع كلوريد الكربون بثلاثين دقيقة، مُتمثّلةً هكذا فى الأسيتيل سيستايين (5 ملليمولار)، الألوڤيرا (100 ميكرولتر/مل)، بذر العنب (100 ميكروجرام/مل)، جوزة الطيب (100 ميكروجرام/مل)، الإل-نيم (5 ملليمولار)، الأمينوجوانيدين (1 ملليمولار)، الأسيتيل سيستايين مع الإل-نيم، الأسيتيل سيستايين مع الأمينوجوانيدين، الألوڤيرا مع الإل-نيم، الألوڤيرا مع الأمينوجوانيدين، بذر العنب مع الإل نيم، بذر العنب مع الأمينوجوانيدين، جوزة الطيب مع الإل نيم، وجوزة الطيب مع الأمينوجوانيدين. درجة تسمم الخلايا الكبدية تم تقييمها عن طريق قياس نسبة التسرب الخلوى لإنزيم اللاكتيت ديهيدروچينيز وإنتاج مادتى ثنائى ألدهايد المالون وأكسيد النيتريك، والمحتَوى الخلوى لكل من الجلوتاثيون والكالسيوم وثلاثى فوسفات الأدينوسين. تم قياس هذه المعايير فى العينات المأخوذة من الفلاسكات عند أوقات - 30، صفر، 30، 60، 90، 120 دقيقة وذلك نسبةً لتوقيت إضافة رابع كلوريد الكربون.

ويمكن تلخيص أهم نتائج هذه الدراسة فيما يلى:

١. الإسكيمية الكبدية لمدة 15 دقيقة متبوعةً بفترات إعادة تدفق دم مختلفة (15، 30، 60 دقيقة) لم تؤدّ إلى أى ارتفاع حقيقى فى نشاط إنزيمى الألانين ترانس أمينيز أو الأسبارتيت ترانس أمينيز بالدم وذلك مقارنة بالجرذان الطبيعية أو الجرذان المُعرّضة للعملية الصورية، فيما عدا ارتفاع حقيقى فى نشاط إنزيم الأسبارتيت ترانس أمينيز بعد 60 دقيقة من إعادة تدفق الدم.

٢. الإسكيمية الكبدية لمدة 30 دقيقة متبوعةً بفترة إعادة تدفق الدم لمدة 30 دقيقة أدت إلى ارتفاع حقيقى فى نشاط إنزيمى الألانين ترانس أمينيز والأسبارتيت ترانس أمينيز وذلك مقارنة بالجرذان الطبيعية أو الجرذان المُعرّضة للعملية الصورية. عند إطالة فترة إعادة الإرواء إلى 60 دقيقة ازداد أيضاً نشاط كلٍّ من الإنزيمين بشكل حقيقى مُقارناً بذلك المُقاس بعد 30 دقيقة من إعادة تدفق الدم.

٣. الإسكيمية الكبدية لمدة 30 دقيقة متبوعةً بفترة إعادة تدفق دم لمدة 30 دقيقة أدت أيضاً إلى ارتفاع حقيقى فى تركيز كلٍّ من الصفراء الكلية والصفراء مباشِرة التفاعل مع انخفاض حقيقى فى محتوى الكبد من الجلوتاثيون مصحوباً بارتفاع المحتَوى الكبدى من مادة ثنائى ألدهايد المالون وكذا إنزيم المايلوبيروكسيديز وذلك بالإضافة إلى تغيرات نسيجية واضحة تمثلت فى تسلُّلات خلوية واحتقان دموى مع فقد النسق النسيجى الطبيعى. لم يؤدِّ هذا النموذج إلى أى تغير حقيقى فى تركيز الصفراء الغير مباشرة التفاعل بالدم أو فى نسبة وزن الكبد لوزن الجسم.

٤. لم ينتج عن الحقن الفموى اليومى للأسيتيل سيستايين المذاب فى المحلول الملحى (150 ، 300 ، 600 مجم/كجم/يوم) أو خلاصة الألوڤيرا المُخففة بمحلول الفوسفات (5 ، 10 ،20 مل/كجم/يوم)، أو خلاصة بذر العنب المُعلقة فى محلول التوين-80 (200 ، 400 ، 800 مجم/كجم/يوم)، أو خلاصة جوزة الطيب المُعلقة فى محلول التوين- 80 (250 ، 500 ، 1000 مجم/كجم/يوم) لمدة سبعة أيام متتالية عن أى تغير حقيقى فى إنزيمى الألانين ترانس أمينيز والأسبارتيت ترانس أمينيز وذلك مقارنة بالجرذان الطبيعية التى تلقّت المُذيبات فقط.

٥. وقاية الجرذان بالأسيتيل سيستايين (300 مجم/كجم/يوم) يومياً عن طريق الحقن الفموى لمدة سبعة أيام متتالية متبوعةً بجرعة إضافية مُعطاةً بنصف ساعة قبل الإسكيمية الكبدية (30 دقيقة) المتبوعة بإعادة الإرواء (30 دقيقة) أدت إلى حماية كبدية واضحة والتى استُدلّ عليها من الانخفاض الحقيقى لإنزيمى الألانين ترانس أمينيز والأسبارتيت ترانس أمينيز بالدم وذلك مُقارنةً بالجرذان المُعرّضة للإسكيمية الكبدية دون إعطائها الأسيتيل سيستايين. أدَّت الوقاية بالأسيتيل سيستايين أيضاً إلى انخفاض حقيقى فى كلٍّ من ثنائى ألدهايد المالون وإنزيم المايلوبيروكسيديز مع ارتفاع حقيقى فى المحتَوى الكبدى من الجلوتاثيون (بلغ الثلاثة مستوى الجرذان المُعرَّضة للعملية الصورية). لم يؤدِّ الأسيتيل سيستايين إلى انخفاض تركيز الصفراء الكلية أو الصفراء مباشرة التفاعل فى الدم ولكن أدى إلى تغيرات نسيجية جوهرية تمثلت فى الحفاظ على النسق النسيجى للكبد فى صورة قاربت النسق الطبيعي.

٦. الحقن الفموى اليومى للجرذان بخلاصة الألوڤيرا (10 مل/كجم/يوم) لمدة سبعة أيام متتالية متبوعةً بجرعة إضافية مُعطاةً بنصف ساعة قبل الإسكيمية الكبدية المتبوعة بإعادة الإرواء أدى إلى حماية الكبد بصورة واضحة تمثلت فى انخفاض حقيقى لإنزيمى الألانين ترانس أمينيز والأسبارتيت ترانس أمينيز بالدم مصحوباً بارتفاع حقيقى فى محتَوى الكبد من الجلوتاثيون مع انخفاض حقيقى فى كلٍّ من ثنائى ألدهايد المالون وإنزيم المايلوبيروكسيديز (الأخير بلغ مستوى الجرذان المُعرَّضة للعملية الصورية)، وذلك مُقارنةً بالجرذان المُعرّضة للإسكيمية الكبدية دون إعطائها الخلاصة ولكن لم تؤدِّ خلاصة الألوڤيرا إلى انخفاض تركيز الصفراء الكلية أو الصفراء مباشرة التفاعل فى الدم. التغيرات النسيجية دعّمت النتائج القياسية وتمثلت فى انخفاض ملحوظ فى درجة تسلل الخلايا الالتهابية وكذلك الاحتقان الدموى.

٧. وقاية الجرذان بخلاصة بذر العنب (400 مجم/كجم/يوم) عن طريق الحقن الفموى اليومى لمدة سبعة أيام متتالية متبوعة بجرعة إضافية مُعطاةً بنصف ساعة قبل الإسكيمية الكبدية أدت إلى حماية واضحة لكبد الجرذان استُدلّ عليها من الانخفاض الحقيقى لإنزيمى الألانين ترانس أمينيز والأسبارتيت ترانس أمينيز بالدم وذلك مُقارنةً بالجرذان المُعرّضة للإسكيمية الكبدية دون إعطائها بذر العنب. حدث أيضاً ارتفاع حقيقى فى المحتَوى الكبدى من الجلوتاثيون مصحوباً بانخفاض حقيقى فى ثنائى ألدهايد المالون (بلغ كلاهما مستوى الجرذان المُعرَّضة للعملية الصورية) و كذا إنزيم المايلوبيروكسيديز. لم يؤدِّ إعطاء الخلاصة إلى انخفاض تركيز الصفراء الكلية أو الصفراء مباشرة التفاعل فى الدم ولكن أدى إلى تغيرات نسيجية جوهرية تمثلت فى استعادة النسق النسيجى للكبد مع انخفاض درجة التسلل الخلوى.

٨. الحقن الفموى اليومى للجرذان بخلاصة جوزة الطيب (500 مجم/كجم/يوم) لمدة سبعة أيام متتالية متبوعةً بجرعة إضافية مُعطاةً بنصف ساعة قبل الإسكيمية الكبدية المتبوعة بإعادة الإرواء أدى إلى حماية الكبد بصورة واضحة تمثلت فى انخفاض حقيقى لإنزيمى الألانين ترانس أمينيز والأسبارتيت ترانس أمينيز بالدم مصحوباً بارتفاع حقيقى فى محتَوى الكبد من الجلوتاثيون مع انخفاض حقيقى فى كلٍّ من ثنائى ألدهايد المالون وإنزيم المايلوبيروكسيديز، وذلك مُقارنةً بالجرذان المُعرّضة للإسكيمية الكبدية دون إعطائها الخلاصة، ولكن لم تؤدِّ خلاصة الألوڤيرا إلى انخفاض تركيز الصفراء الكلية أو الصفراء مباشرة التفاعل فى الدم. التغيرات النسيجية دعّمت النتائج القياسية وتمثلت فى استعادة واضحة للنسق النسيجى الكبدى.

٩. الحقن الفموى اليومى للجرذان بالخلاصات الثلاثة معاً بنفس جدول الجرعات السابقة أدى إلى حماية واضحة للكبد تمثلت فى انخفاض حقيقى لإنزيمى الألانين ترانس أمينيز والأسبارتيت ترانس أمينيز بالدم مع ارتفاع حقيقى فى محتَوى الكبد من الجلوتاثيون وانخفاض حقيقى فى كلٍّ من ثنائى ألدهايد المالون وإنزيم المايلوبيروكسيديز (حيث بلغ الثلاثة الأُخر مستوى الجرذان المُعرَّضة للعملية الصورية)، وذلك مُقارنةً بالجرذان المُعرّضة للإسكيمية الكبدية دون إعطائها الخلاصات. لم تؤدِّ الخلاصات معاً إلى انخفاض تركيز الصفراء الكلية أو الصفراء مباشرة التفاعل فى الدم ولكن أدت إلى استعادة واضحة للنسق النسيجى الكبدى بشكلٍ قارَبَ الجرذان الطبيعية.

١٠. تحضين خلايا الكبد المعزولة فى الزجاج مع رابع كلوريد الكربون (5 ملليمولار) أدى إلى تغيرات حقيقية فى كل المعايير التى تم قياسها تمثلت فى ارتفاع نسبة التسرب الخلوى لإنزيم اللاكتيت ديهيدروچينيز وزيادة إنتاج مادة ثنائى ألدهايد المالون وانخفاض المحتَوى الخلوى للجلوتاثيون مصحوباً بارتفاع محتوى الكالسيوم، وذلك بعد 30 دقيقة من إضافة رابع كلوريد الكربون. تمثل التسمم الخلوى أيضاً فى زيادة التسرب الخلوى لإنزيم اللاكتيت ديهيدروچينيز وزيادة إنتاج مادتى ثنائى ألدهايد المالون وأكسيد النيتريك و كذا ارتفاع المحتَوى الخلوى للكالسيوم مع انخفاضه لكل من الجلوتاثيون وثلاثى فوسفات الأدينوسين بعد 60 ، 90 ، 120 دقيقة من إضافة رابع كلوريد الكربون وذلك مُقارَنةً بالمقياس الطبيعى.

١١. إضافة الأسيتيل سيستايين (5 ملليمولار) للمعلق الخلوى قبل رابع كلوريد الكربون بنصف ساعة أدّت إلى حماية ملحوظة للخلايا تمثلت فى انخفاض نسبة التسرب الخلوى لإنزيم اللاكتيت ديهيدروچينيز وزيادة المحتَوى الخلوى للجلوتاثيون بعد 30 دقيقة من إضافة رابع كلوريد الكربون وذلك مُقارنةً بمقياس التسمم، كما تمثلت أيضاً فى تصحيح مستوى كُلٍّ من اللاكتيت ديهيدروچينيز وثنائى ألدهايد المالون والجلوتاثيون والكالسيوم وثلاثى فوسفات الأدينوسين بعد 60 دقيقة ومستوى كُلٍّ من اللاكتيت ديهيدروچينيز وثنائى ألدهايد المالون والجلوتاثيون وأكسيد النيتريك والكالسيوم وثلاثى فوسفات الأدينوسين بعد 90 ، 120 دقيقة من إضافة رابع كلوريد الكربون.

١٢. إضافة خلاصة الألوڤيرا (100 ميكرولتر/مل) للمعلق الخلوى قبل رابع كلوريد الكربون بنصف ساعة أدّت إلى حماية ملحوظة للخلايا تمثلت فى تحسين مستوى كلٍّ من اللاكتيت ديهيدروچينيز

والجلوتاثيون والكالسيوم بعد 60 ، 90 دقيقة ومستوى كُلٍّ من اللاكتيت ديهيدروچينيز وثنائى ألدهايد المالون والجلوتاثيون وأكسيد النيتريك والكالسيوم وثلاثى فوسفات الأدينوسين بعد 120 دقيقة من إضافة رابع كلوريد الكربون وذلك مُقارنةً بمقياس التسمم.

١٣. إضافة خلاصة بذر العنب (100 ميكروجرام/مل) للمعلق الخلوى قبل رابع كلوريد الكربون بنصف ساعة أدّت إلى حماية ملحوظة للخلايا تمثلت فى تحسين مستوى كلٍّ من اللاكتيت ديهيدروچينيز والجلوتاثيون والكالسيوم بعد 60 دقيقة ومستوى كُلٍّ من اللاكتيت ديهيدروچينيز وثنائى ألدهايد المالون والجلوتاثيون وأكسيد النيتريك والكالسيوم وثلاثى فوسفات الأدينوسين بعد 90 ، 120 دقيقة من إضافة رابع كلوريد الكربون وذلك مُقارنةً بمقياس التسمم.

١٤. إضافة خلاصة جوزة الطيب (100 ميكروجرام/مل) للمعلق الخلوى قبل رابع كلوريد الكربون بنصف ساعة أدى إلى حماية ملحوظة للخلايا تمثلت فى تحسين مستوى الكالسيوم بعد 30 دقيقة من إضافة رابع كلوريد الكربون. تمثلت أيضاً فى تحسين مستوى كُلٍّ من اللاكتيت ديهيدروچينيز والكالسيوم بعد 60 ، 90 دقيقة ومستوى كُلٍّ من اللاكتيت ديهيدروچينيز وثنائى ألدهايد المالون والجلوتاثيون وأكسيد النيتريك والكالسيوم وثلاثى فوسفات الأدينوسين بعد 120 دقيقة من إضافة رابع كلوريد الكربون وذلك مُقارنةً بمقياس التسمم.

١٥. إضافة مادة إل-نيم (5 ملليمولار) للمعلق الخلوى قبل رابع كلوريد الكربون بنصف ساعة أدّت إلى ارتفاع مستوى كُلٍّ من اللاكتيت ديهيدروچينيز وثنائى ألدهايد المالون والكالسيوم مع انخفاض مستوى الجلوتاثيون بعد 30 دقيقة من إضافة رابع كلوريد الكربون وذلك مُقارنةً بمقياس التسمم. أدّت إضافة الإل-نيم أيضاً إلى انخفاض مستوى مادة أكسيد النيتريك مُقارنةً بمقياس التسمم وذلك بعد 30 ، 60 ، 90 ، 120 دقيقة من إضافة رابع كلوريد الكربون.

١٦. إضافة مادة الأمينوجوانيدين (1 ملليمولار) للمعلق الخلوى قبل رابع كلوريد الكربون بنصف ساعة أدّت إلى انخفاض مستوى كُلٍّ من اللاكتيت ديهيدروچينيز وثنائى ألدهايد المالون والكالسيوم مع ارتفاع مستوى كلٍّ من الجلوتاثيون وثلاثى فوسفات الأدينوسين بعد 120 دقيقة من إضافة رابع كلوريد الكربون وذلك مُقارنةً بمقياس التسمم. كما أدّت إضافة الأمينوجوانيدين إلى انخفاض مستوى مادة أكسيد النيتريك مُقارنةً بمقياس التسمم وذلك بعد 90 ، 120 دقيقة من إضافة رابع كلوريد الكربون.

١٧. إضافة مادة الإل-نيم مع الأسيتيل سيستايين أو الألوڤيرا أو بذر العنب أو جوزة الطيب للمعلق الخلوى قبل رابع كلوريد الكربون بنصف ساعة أدّت إلى ارتفاع مستوى اللاكتيت ديهيدروچينيز بعد 30 ، 60 ، 90 ، 120 دقيقة، وارتفاع مستوى ثنائى ألدهايد المالون بعد 90 دقيقة (فى حالة بذر العنب) و 120 دقيقة (فى حالة الأسيتيل سيستايين)، وانخفاض مستوى أكسيد النيتريك بعد 30 ، 60 ، 90 ، 120 دقيقة، وارتفاع مستوى الكالسيوم بعد 60 دقيقة (فى حالتى الأسيتيل سيستايين والألوڤيرا) و 90 دقيقة (فى حالة بذر العنب) وذلك من إضافة رابع كلوريد الكربون ومُقارنةً بالمقاييس المقابِلة المُعامَلة بالمثل دون إضافة الإل-نيم.

١٨. إضافة مادة الأمينوجوانيدين مع الألوڤيرا أو بذر العنب أو جوزة الطيب (ولكن ليس مع الأسيتيل سيستايين) للمعلق الخلوى قبل رابع كلوريد الكربون بنصف ساعة أدّت إلى انخفاض مستوى أكسيد النيتريك بعد 120 دقيقة من إضافة رابع كلوريد الكربون وذلك مُقارنةً بالمقاييس المقابِلة المُعامَلة بالمثل دون إضافة الأمينوجوانيدين.

الاستنتاج:

١. يمثّل كلٌّ من الإسكيمية الكبدية المتبوعة بإعادة الإرواء وخلايا الكبد حديثة العزل المُسمَّمة برابع كلوريد الكربون نموذجى تسمم كبدى جيّدين، وذلك فى الجرذان الحية وفى الزجاج، على الترتيب.

٢. الأسيتيل سيستايين والألوڤيرا وبذر العنب وجوزة الطيب لها جميعاً تأثيرات واقية للكبد ضد التسمم المُستحدَث بالإسكيمية حيوياً أو برابع كلوريد الكربون زجاجياً. تُعزى القدرة الوقائية لأى من هذه المواد، على الأقل جزئياً، إلى تأثيراتها المضادة للأكسدة أو المضادة للالتهاب أو المُعدِّلة للتفاعلات المناعية أو الغالقة لقنوات مرور الكالسيوم أو المُنظّمة للسريان الدموى.

٣. المنع الغير مُتخصص لإنزيم مُصَنِّع أكسيد النيتريك (التكوينى والمُستَحَثّ) بمادة إل-نيم يُزيد التسمم الخلوى المُستحدَث زجاجياً برابع كلوريد الكربون على الخلايا الكبدية حديثة العزل من الجرذان، كما يقلل التأثيرات الوقائية لكلٍّ من الأسيتيل سيستايين والألوڤيرا وبذر العنب وجوزة الطيب، بينما المنع المتخصص لإنزيم مُصَنِّع أكسيد النيتريك (المُستَحَثّ فقط) يقلل التسمم الخلوى المُستحدَث زجاجياً برابع كلوريد الكربون دون التأثير على القدرة الوقائية للأسيتيل سيستايين أو الألوڤيرا أو بذر العنب أو جوزة الطيب.

د. باسم أنور شحاتة

قسم الأدوية والسموم