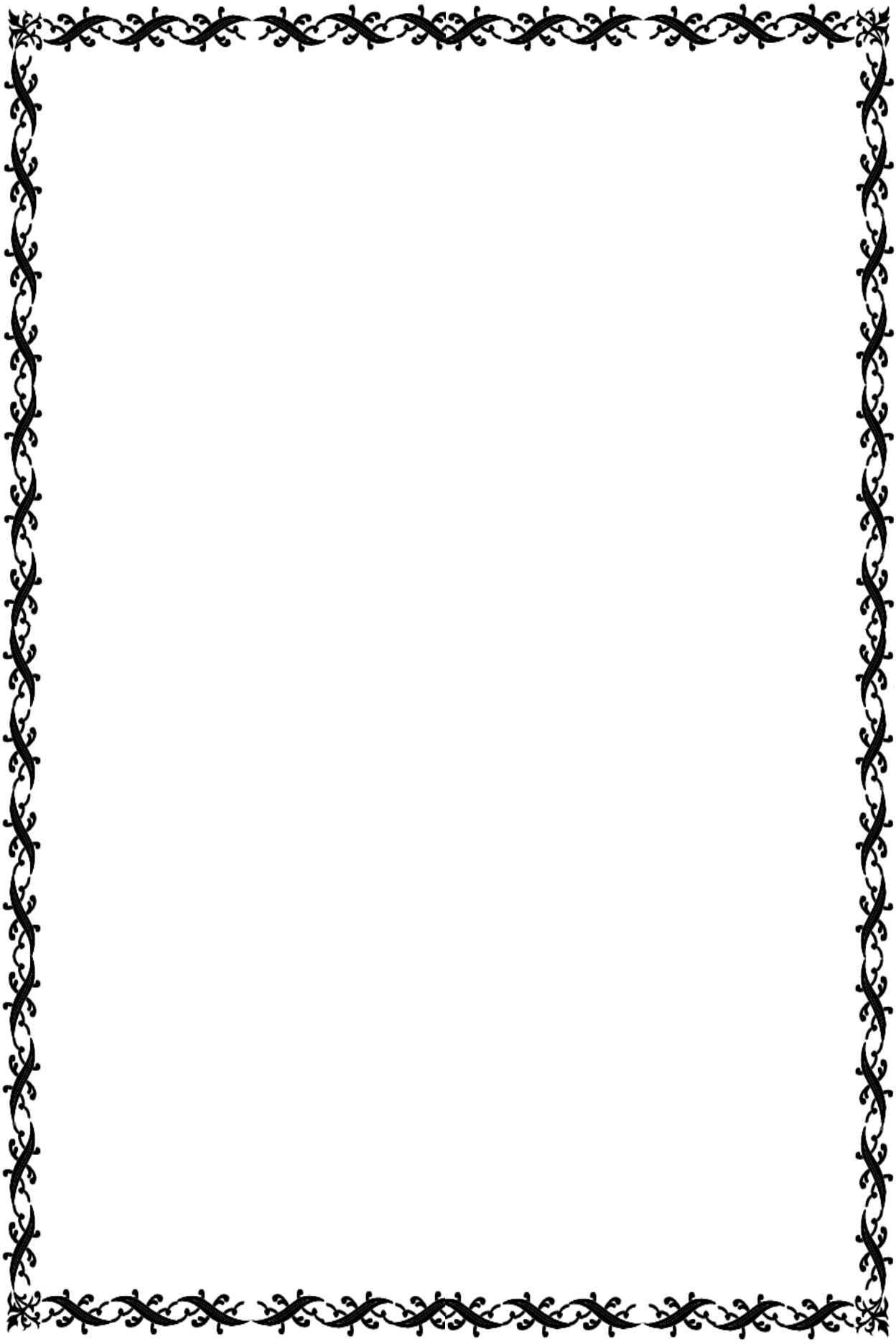
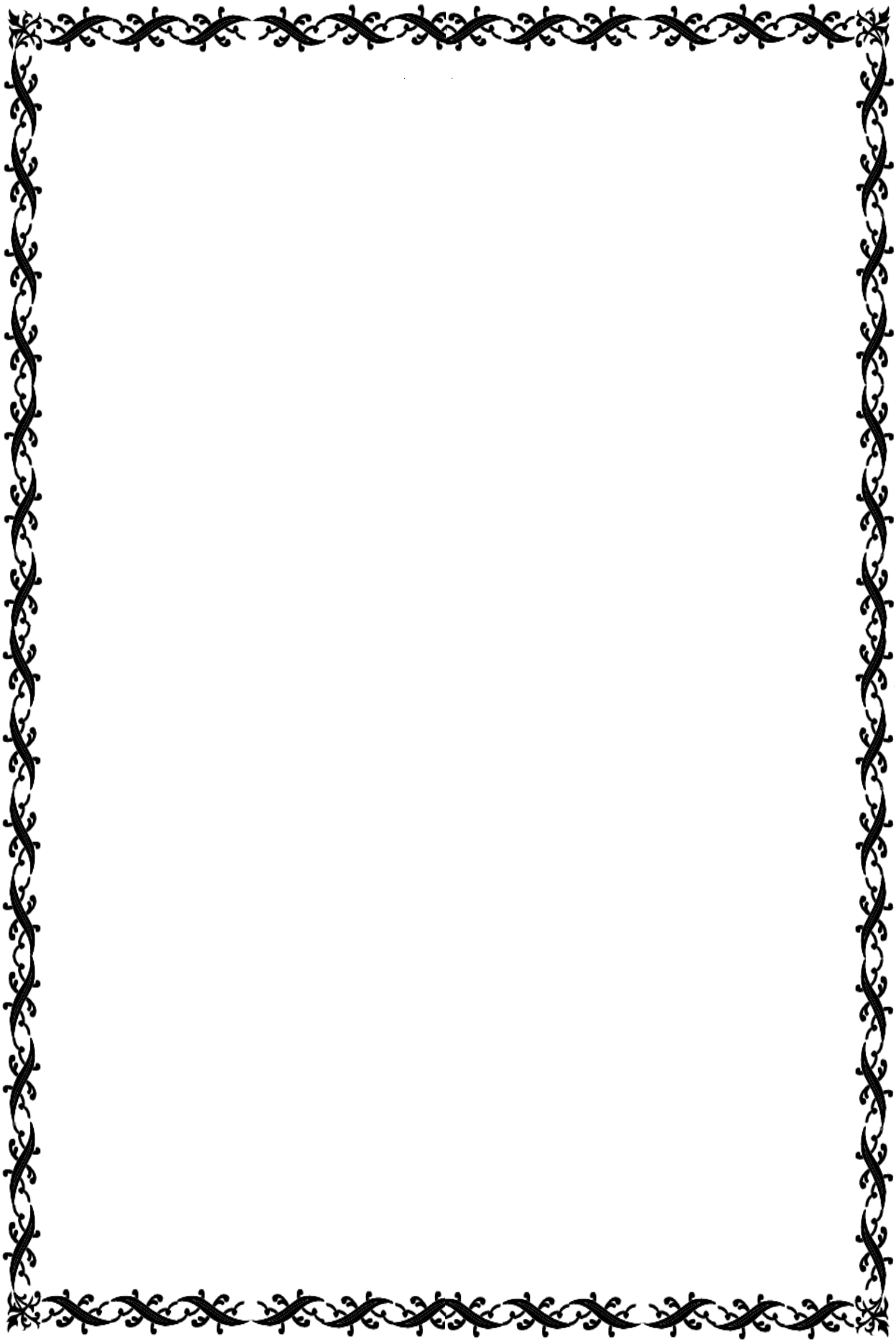
الادارة العامه للمشروعات البيئة

أبحــاث

كليـــة الصيدلـة



الادارة العامه للمشروعات البيئة



تقرير موجز عن نتائج مشروع بحث

أولاً : بيانات المشروع

عنوان المشروع : المثبطات الطبيعية لإيقاف تليف الكبد

حجم التمويل : عشرون ألف جنيه مصرى لاغير

تاريخ توقيع العقد : ٢٠٠٣/٨/٢٤م

مدة المشروع : عـامان

ثانياً : بيانات الباحث الرئيسى والفريق البحثى المعاون

الباحث الرئيسى : أ.د/ فريد عبد الرحيم بدريه

وظيفته : استاذ

الفريق البحثى : د./ على على حسن الجمل

ص/ منى فاروق متولى النقيطى

وآخرون

ثالثاً : الجهات المستفيده من المشروع :

وزارة الصحة والسكان

شركات الدواء

منظمة الصحة العالمية

اليونسكو

رابعاً : النتائج والتوصيات

- ارتباط المشروع بالمجتمع
- يتناول المشروع واحده من أخطر المشكلات الصحيه للمجتمع المصرى وهى " التليف الكبدى " الناتج من الاصابه بالبلهارسيا أو الفيروسات أو التلوث وتشكل هذه المشكله عبئاً على الانتاج والصحه والدخل القومى وما يترتب عليه من عواقب وخيمه.
- محاوله اكتشاف دواء لإيقاف التليف اصبح ضرورة ملحه خاصه اذا كان ذلك سوف يوفر المتطلبات الاساسيه الآتية :

(١) مصدر الدواء – طبيعى ومتوافر فى مصر أو يسهل الحصول عليه .

(٢) درجة الامان للدواء .

(٣) الفعاليه والدقه فى ايقاف التليف فى الكبد .

خامساً : مدى القابلية للتطبيق العملى :

يمكن الاستفاده من هذا البحث من خلال مشروع تطبيقى بين كليه الطب والصيدله وإحدى شركات الأدويه لإنتاج دواء لإيقاف التليف المبكر .

سادساً : المقترحات الخاصه لإمكانيه تسويق نتائج البحث :

عرض البحوث فى ندوات ذات طابع عملى وتطبيقى من خلال شركات وهيئات ذات صفه تنفيذيه .

سابعاً : ملاحظـــات :

البطء الشديد للساده المحكمين مما يؤثر على سرعه إنهاء المشروع ضعف الدعم المالى.

ملخص المشروع باللغة العربية

"المثبطات الطبيعية لايقاف تليف الكبد "

التليف الكبدى ينتج من الخلل الجسيم فى وظائف وخلايا الكبد والتى قد تؤدى إلى تشمع أو تحجر الكبد . ولقد وجد العديد من المثبطات لتليف الكبد التى يمكن أن تؤدى إلى تحسن نسيج الكبد ووظيفته . ولكن تبين من الدراسات لمثل هذه الأدوية أنها سامة وليست متخصصة لايقاف التليف الكبدى فقط بل توقف تخليق الكولاجين فى أجزاء الجسم المختلفة .

لذا فأن الحاجة ملحة لمثل هذه الأدوية التى تتميز بخصوصيتها فى ايقاف تخليق الكولاجين فى الكبد فقط بدون اثار جانبية على أجزاء الجسم الأخرى .

فى هذا البحث قمنا بتجربة المواد النقية والخلاصات ذات المصدر الطبيعى التى تتميز بقدرتها على ايقاف التفاعلات التى تؤدى الى تراكم الكولاجين وذلك باستخدامها كمثبطات لانقسام الخلية والكولاجين ومضادات الشوادر ومضادات الالتهاب والمنشطات المناعية الخاصة بزيادة انتاج الأنترفيرون . فى هذه الدراسة تم استخدام نموذجين لاحداث التليف الكبدى وهى رباعى كلوريد الكربون والبلهارسيا فى خلايا أنسجة حيوانات التجارب وتقيم المواد الطبيعية المستخدمة بناء على مستوى زيادة الأنترفيرون وأنزيمات الكبد ومدى سلامة أنسجة الكبد وعدد التليفات البؤرية فيها .

ولقد وجد أن هناك علاقة بين التركيب البنائى للمركبات والفعالية الكبيرة على تثبيط الكولاجين وايقاف التليف فى مراحلة المتعددة . كانت مركبات (ليبان ، يرسان ، أولينان) .

يشمل الوصف التفصيلى على الأجزاء الآتية :

- **تحضير المواد الداخلة فى مكونات كل نبات طبى فى هذه الدراسة .**
- **الطريقة والظروف الخاصة لتحضير كل مركب .**
- **تقييم كل مكون كيميائيا وحيويا .**
- **تقييم المكونات على الأنسجة الحيوانية .**
- **تقييم المكونات على حيوانات التجارب .**
- **تقييم المركبات ضد خلايا الكبد النجمية (HSC-Hepatic Stellate Cells) :**
- **يتم تحضير معلق من خلايا الكبد (HSC5) بتركيز ٤× (١٠)٤ خلية / ملل وتحتوى على ١٠% من (Calf Serum) .**
- **يتم تنمية الخلايا لمدة تتراوح ما بين ٤٨-٧٢ ساعة داخل حضان درجة حرارته ٣٧ درجة مئوية ونسبة ثانى أكسيد الكربون به ٥% .**
- **يتم الحصول على الخلايا بإضافة محلول من إنزيم التربسين (٠.٠٥%) ويتم عد الخلايا بإستخدام الهيموسيتوميتر للحصول على تركيز الخلايا المطلوب .**

- يتم إضافة ١٠٠ ميكروليتر من الخلايا ذات تركيز ٤× (١٠)٤ خلية / ملل إلى كل عين فى الشريحة البلاستيكية ذات الـ ٩٦ عينا وتوضع فى الحضان عند درجة حرارة ٣٧ درجة مئوية و ٥% ثانى أكسيد الكربون ولمدة ٢٤ ساعة فقط .
- يتم إستبدال محتويات كل عين فى الشريحة البلاستيكية بـ ١٠٠ ميكروليتر من محلول ٠.٠٤% الـ (Calf Serum) .
- بعد ٤٨ ساعة من وضع الخلايا فى الحضانة يتم إضافة مادة PDGF لكل عين للحصول على ١٠٠ ميكروجرام فى ملل . تضاف عينات المستحضر حيث يوضع كل تركيز ثلاث مرات للحصول على تركيز نهائى ٥٠ نانومول / ملل . توضع عيون بدون المواد وأخرى بدون مادة الـ PDGF .
- بعد ٢٤ ساعة من وضع الخلايا فى الحضانة تحت الظروف المذكرة آنفا يتم التخلص من كل السوائل العالقة بالشريحة البلاستيكية ثم يتم بعد ذلك تثبيت الخلايا بإستخدام ١٠% من محلول فورمالين فى ملح ويترك لمدة ٣٠ دقيقة ثم يتلخص من محلول الفورمالين وتصبغ بـ ٠.٠٥% محلول كريستال تيوكيب .
- يتم إزالة وغسل الصبغة الزائدة من الشرائح البلاستيكية بالماء .
- تذاب الصبغة فى محلول الـ DMSO (٢٠٠ ميكروليتر) لكل عين ثم يتم قياس تركيز الخلايا بإستخدام سبكتروفوتومتر بذلك عند ٥٩٥ نانوميتر .

زراعة انسجة خلايا الكبد النجمية وتجربة أدوية عليها للحد من تحويلها إلى خلايا ليفية ومنع التليف المبكر للكبد .

وكانت النتائج كالآتى :

جدول (١)

تأثير مكونات المستحضر (الكركم ، الجليسرهزين ، مشتقات الكندر)

على الخلايا النجمية للكبد

المركب	الفعالية	السمية (ميكروجرام /ملل)
الكركم	٨٦.٣% عند تركيز ٢٠ ميكروجرام /ملل	أكثر من ٢٠٠ ميروجرام/ملل
الجليسرهزين	٩١.٢% عند تركيز ٤٠ميكرجرام/ملل	١٦٠ميكروجرام/ملل
خلاصة الكندر الكحولية	٦٠.٤% عند تركيز ٨٠ ميكروجرام/ملل	٩٠ ميكروجرام/ملل
خلاصة الكندر المتعادلة	٣٨.٧% عند تركيز ١٢٠ ميكروجرام/ملل	١٢٠ ميكروجرام/ملل
خلاصة الكندر الحامضية	٩٣.٦% عند تركيز ٢٠ ميكروجرام/ملل	١٢٠ ميكروجرام/ملل
حمض البوزويلك	١٠٠% عند تركيز ٢٠ ميكروجرام/ملل	١٢٠ ميكروجرام/ملل
المستحضر	٩٥% عند تركيز ٢٠ ميكروجرام/ملل	أكثر من ٢٠٠ ميكروجرام/ملل

جدول (٢)

تأثير مكونات المستحضر (الكركم ، الجليسرهزين ، مشتقات الكندر)

على الخلايا الكلى للقرد الأخضر المصابة بفيروس الهربس – ١

المركب	التأثير ضد الفيروس (µg/ml)	التأثير السام (µg/ml)
الكركم	٥٠% عند تركيز ٨٠ ميكروجرام /ملل	أكثر من ٢٠٠ ميروجرام/ملل
الجليسرهزين	٢٥% عند تركيز ٢٠٠ميكرجرام/ملل	أكثر من ٢٠٠ ميروجرام/ملل
خلاصة الكندر الكحولية	٥٠% عند ٤٠ ميكروجرام/ملل	٨٠ ميكروجرام/ملل
خلاصة الكندر المتعادلة	٧٥% عند تركيز ٨٠ ميكروجرام/ملل	١٢٠ ميكروجرام/ملل
خلاصة الكندر الحامضية	١٠٠% عند تركيز ٢٠ ميكروجرام/ملل	١٢٠ ميكروجرام/ملل
حمض البوزويلك	٧٥% عند تركيز ٨٠ ميكروجرام/ملل	١٦٠ ميكروجرام/ملل
المستحضر	٨٠% عند تركيز ٤٠ ميكروجرام/ملل	أكثر من ٢٠٠ ميكروجرام/ملل

١) تقييم المستحضر على زيادة إنتاج الإنترفيرون – جاما :

أ) الحصول على الخلايا الليمفاوية (من الطحال والغدة الثيمونية) .

يتم ذلك بحقن جرزان من BALB/c mice بجرعات فى العضل كالآتى :

- الكركم (مادة الكوركومين بـ ٥٠ ميكروجرام/ ملل) لعدد ٥ جرزان
- الجليسروهزين ١٠٠ ميكروجرام / ملل لعدد ٥ جرزان لمدة ٧ أيام متتالية
- البوزويلك ١٠٠ ميكروجرام/ ملل لعدد ٥ جرزان

يتم الحصول على الطحال والغدة الثيموتية من كل الجرزان ووضعها فى محلول من MEM وغسلها عدة مرات بمحلول بارد من MEM بعد التخلص من الأنسجة . يتم عد الخلايا الحية والتأكد من حيويتها .

ب) زراعة الخلايا الليمفاوية:

يتم زراعة الخلايا الليمفاوية التى تم الحصول عليها فى وسط RPM1 – 1640 والمزودة بـ ١٠% FBS ومضادات حيوية . يتم زراعة الخلايا بتركيزات ٤ × (١٠) ٦ خلية /ملل بإضافة أو بدون إضافة المركبات ثم وضعها فى الحضان (٥% ثانى أكسيد الكربون ، ٣٧ درجة مئوية) .

ت) تقييم المركبات على زيادة إفراز الإنترفيرون :

- يتم إذابة المركبات فى محلول فوسفات (PBS) تركيزه M ٠.٠١ مع ضبط درجة الأيون الهيدروجينى عند ٧.٢ بواسطة IN هيروكسيد صوديوم .
- يتم فصل الدم من كل مجموعة من الجرزان وفصل السيرم وتعيين قدرة السيرم على تثبيط نمو الفيروس (الهربس – أوستوماتيس) على خلايا الفيرو .
- يتم حساب مستوى الإنترفيرون بعد فترات زمنية تتراوح بين ساعتين إلى ٤٨ ساعة وذلك بإستخدام الطريقة التى تعتمد على قياس جاما – إنترفيرون بواسطة طريقةو الإنزيمات والأجسام المضادة فى خطوتين :

الأولى : بالتفاعل مع الأجسام المضادة لـ جاما – إنترفيرون فى ميكرتيتربليت .

الثانية بإضافة الأجسام المضادة الثانية للأجسام المضادة لـ " جاما – إنترفيرون " المتصلة بـ (سترتافيدين بيروكسيد) .

ويترك ميكرتيتربليت فى الحضان ويتم قياس اللون والذى يتناسب مع تركيز الجاما – إنترفيرون كما هو مبين بالجدول ٣ .

جدول (٣)

تأثير مكونات المستحضر (الكركم ، الجليسرهزين ، مشتقات الكندر)

على زيادة إفراز الإنترفيرون – جاما الموجود فى السيرم

المركب	المعاملات	معدل الإنترفيرون (جاما) (وحدة/ملل)
الكركم	تربسين (٢٠٠ ميكروجرام/ملل،ساعتين) الحرارة (٥٦ درجة ، ٣٠دقيقة) الحمض (pH2.0 ، ٤٠ درجة مئوية، ١٨ ساعة)	١٨٠ أقل من ٢٠ أقل من ٢٠ أقل من ٢٠
الجليسرهزين	تربسين (٢٠٠ ميكروجرام/ملل،ساعتين) الحرارة (٥٦ درجة ، ٣٠دقيقة) الحمض (pH2.0 ، ٤٠ درجة مئوية، ١٨ ساعة)	٢٢٠ أقل من ٢٠ أقل من ٢٠ أقل من ٢٠
خلاصة اللبان الكحولية	تربسين (٢٠٠ ميكروجرام/ملل،ساعتين) الحرارة (٥٦ درجة ، ٣٠دقيقة) الحمض (pH2.0 ، ٤٠ درجة مئوية، ١٨ ساعة) أقل من ٢٠	١٦٠ أقل من ٢٠ أقل من ٢٠
خلاصة اللبان المتعادلة	تربسين (٢٠٠ ميكروجرام/ملل،ساعتين) الحرارة (٥٦ درجة ، ٣٠دقيقة) الحمض (pH2.0 ، ٤٠ درجة مئوية، ١٨ ساعة)	١٨٠ أقل من ٢٠ أقل من ٢٠ أقل من ٢٠
خلاصة اللبان الحامضية	تربسين (٢٠٠ ميكروجرام/ملل،ساعتين) الحرارة (٥٦ درجة ، ٣٠دقيقة) الحمض (pH2.0 ، ٤٠ درجة مئوية، ١٨ ساعة)	٢٣٠ أقل من ٢٠ أقل من ٢٠ أقل من ٢٠
حمض البوزويلك	تربسين (٢٠٠ ميكروجرام/ملل،ساعتين) الحرارة (٥٦ درجة ، ٣٠دقيقة) الحمض (pH2.0 ، ٤٠ درجة مئوية، ١٨ ساعة)	٢٢٠ أقل من ٢٠ أقل من ٢٠ أقل من ٢٠
المستحضر	تربسين (٢٠٠ ميكروجرام/ملل،ساعتين) الحرارة (٥٦ درجة ، ٣٠دقيقة) الحمض (pH2.0 ، ٤٠ درجة مئوية، ١٨ ساعة)	٢٣٠ أقل من ٢٠ أقل من ٢٠ أقل من ٢٠

جدول (٤)

تأثير مكونات المستحضر (الكركم ، الجليسرهزين ، مشتقات الكندر)

على حث زيادة إفراز الإنترفيرون في الجرزان ذات الجهاز المناعى المثبط

المركبات	المعاملات (الجرعة) لكل جرز	معدل الإنترفيرون (وحدة/ملل)
محلول فوسفات +الكركم		١٨٠
الكركم	هيدروكورتيزون (٢.٥ مجم)	أقل من ٢٠
الكركم	تريبان بلو (٢.٥ مجم)	أقل من ٢٠
محلول فوسفات + الجليسرهزين		٢٢٠
الجليسرهزين	هيدروكورتيزون (٢.٥ مجم)	أقل من ٢٠
الجليسرهزين	تريبان بلو (٢.٥ مجم)	أقل من ٢٠
محلول فوسفات + خلاصة الكندر الكحولية		١٦٠
خلاصة الكندر الكحولية	هيدروكورتيزون (٢.٥ مجم)	أقل من ٢٠
خلاصة الكندر الكحولية	تريبان بلو (٢.٥ مجم)	أقل من ٢٠
محلول فوسفات + خلاصة الكندر المتعادلة		١٨٠
خلاصة الكندر المتعادلة	هيدروكورتيزون (٢.٥ مجم)	أقل من ٢٠
خلاصة الكندر المتعادلة	تريبان بلو (٢.٥ مجم)	أقل من ٢٠
محلول فوسفات + خلاصة الكندر الحامضية		٢٣٠
خلاصة الكندر الحامضية	هيدروكورتيزون (٢.٥ مجم)	أقل من ٢٠
خلاصة الكندر الحامضية	تريبان بلو (٢.٥ مجم)	أقل من ٢٠
محلول فوسفات + حمض البوزويلك		٢٢٠
حمض البوزويلك	هيدروكورتيزون (٢.٥ مجم)	أقل من ٢٠
حمض البوزويلك	تريبان بلو (٢.٥ مجم)	أقل من ٢٠
محلول فوسفات + المستحضر		٢٣٠
المستحضر	هيدروكورتيزون (٢.٥ مجم)	أقل من ٢٠
المستحضر	تريبان بلو (٢.٥ مجم)	أقل من ٢٠

تقييم المستحضر ومكونات على حيوانات التجارب :

تمت هذه التجارب على فئران ذكور تتراوح أوزانها مابين ١٨٠ – ٢٠٠جرام .

المجموعـــــــة الأولى : ١٠ فئران تم إستخدامها كمجموعة قياسية أى تتناول الطعام والماء فقط .

المجموعـــــــة الثانيـــــة: ١٠ فئران تم إعطاؤها عن طريق الفم رابع كلور الكلوريد بجرعات متدرجة من ٠.٠٤ ، ٠.٠٨ ، ٠.١٦ ملل لكل فأر على مدار أسبوعين لإحداث تسمم كبدى بطئ يعقبه تليفا ثم تشمع ثم إستسقاء .

المجموعـــــــة الثالثـــــة: ١٠ فئران تم إعطاؤها عن طريق الفم مادة الكركومين بجرعة ١٠٠ مجم / كجم ثلاث مرات أسبوعيا .

المجموعـــــــة الرابعـــــة: ١٠ فئران تم إعطاؤها عن طريق الفم مادة الجليسرهزين بجرعة ٥٠ مجم/ كجم ثلاث مرات أسبوعيا .

المجموعـــــــة الخامســـــة: ١٠ فئران تم إعطاؤها عن طريق الفم خلاصة اللبان الدكر الحامضية بجرعة ١٠٠ مجم / كجم ثلاث مرات أسبوعيا .

المجموعـــــــة السادســـــة: ١٠ فئران تم إعطاؤها الكركومين (مثل المجموعة الثالثة) ولكن بعد أسبوع من إعطاؤها رابع كلور الكلوريد ذلك ٣ مرات أسبوعيا لمدة ٥ أشهر .

المجموعـــــــة الســـــابعة: ١٠ فئران تم إعطاؤها الجليسرهزين (مثل المجموعة الرابعة) ولكن بعد أسبوع من إعطاؤها رابع كلور الكلوريد – يستمر ذلك ٣ مرات أسبوعيا لمدة شهر .

المجموعـــــــة الثامنـــــة: ١٠ فئران تم إعطاؤها خلاصة اللبان الحامضية (مثل المجموعة الخامسة) ولكن بعد أسبوع من إعطاؤها رابع كلور الكلوريد – يستمر ذلك ٣ مرات أسبوعيا لمدة شهر .

المجموعـــــة التاســـــعة: ١٠ فئـران تـم إعطاؤهـا المستحضـر عـن طريـق الفـم ٣ مـرات أسبوعيا بجرعة ١٠٠ مجم/ كجم .

المجموعـــــة العاشـــــرة: ١٠ فئـران تـم إعطاؤهـا المستحضـر عـن طريـق الفـم (مثـل المجموعة التاسعة) ولكن بعد أسبوع من إعطاؤها رابـع كلـور الكلوريد – يستمر ذلك ٣ مرات أسبوعيا لمدة شهر .

المجموعـة الحاديـة عشـرة: ١٠ فئران تم إعطاؤها " سيلامارين " بجرعة ٥٠ مجم / كجم عن طريق الفم ٣ مرات أسبوعيا لمدة شـهر من إعطاؤها رابـع كلور الكلوريد .

نتائج تقييم المستحضر ومكوناته على حيوانات التجارب :

جدول (٥)

تأثير المستحضر (الكركم ، الجليسرهزين ، مشتقات الكندر)

على وظائف الكبد

المركبات	إنزيم ALT (وحدة/ملل)	إنزيم AP (وحدة%)	بيليروبين (مجم ٪)	ألبومين (g%)
المجموعة الضابطة	٣٣.٥	٢١.٥	٠.٢٢	٣.٦
رابع كلور الكربون	١٢٩.٥	٥١.٤	٠.٧٢	٣.٥
الكركم	٣٢.٥	٢٠.٤	٠.١٨	٣.٦
الكركم + رباعى كلور الكربون	٣٨.٧	٢٢.٢	٠.٢٤	٣.٥
الجليسرهزين	٢٩.٨	٣٧.٨	٠.٤١	٣.٤
الجليسروهزين + رباعى كلور الكربون	٦٣.٦	٢٧.٤	٠.٨٢	٣.٦
خلاصة الكندر الحامضية	٣٥.٣	٣٣.١	٠.٣٨	٣.٢
خلاصة الكندر الحامضية + رباعى كلور الكربون	٤٣	٢٩.٦	٠.٤٣	٣.٤
المستحضر	٢٨.٧	٢٦.٥	٠.٣٨	٣.٦

تبين الأشكال المرفقة قطاعات مختلفة فى أنسجة الكبد موضحا بها الوريد البابى والخلايا الكبدية وتوزيع الكولاجين ومدى التليف الذى تم إحداثه بواسطة رباعى كلور الكربون . وتم صباغة الأنسجة بالعديد من الصبغات مثل " هيموتوكسلين والأيوسين " لتوضيح مدى تهتك خلايا الكبد ، و "الماسون ترايكروم " لتوضيح مدى التليف ومكانه فى أنسجة الكبد المختلفة. لقد أوضحت كل هذه الدراسات قدرة المستحضر على حماية خلايا الكبد من التهتك وتثبيط الألياف داخل خلايا الكبد وخاصة حول الوريد البابى كما هو مبين بالأشكال المرفقة .

المثبطات الطبيعية لإيقاف تليف الكبد

تطبيقات البحث : يمكن تطبيق المشروع على المستوى قبل الاكلينيكى ثم الاكلينيكى لعمل مستحضر طبيعى آمن يؤخذ فى حالات الإلتهاب الكبدى (الفيروسية والكيميائية و المتشحم) لمنع تدهور الكبد وإيقاف التليف .