ASSESSMENT OF THE POTENTIAL PROPHYLACTIC EFFECT OF NATURALLY OCCURRING SUBSTANCE IN LIPOPOLYSACCHARIDES TOXICTITY INDUCED IN MALE RAT

Thesis submitted to

Faculty of Science

In partial fulfillments required for M.Sc. Degree

of Science in Biochemistry

By

Alaa Samir Ibrahim Hegazy

B.Sc. in Biochemistry, Faculty of Science

Alexandria University, 2010

Faculty of Science

Alexandria University

2015

P.U.A. Library

Library of : Ph.D.m

Serial No : 208

Classification : 572

ملخص البحث

الصدمة الإنتانية هو حالة طبية ناتجة عن عدوى شديدة وإنتان أو تعفن الدم، على الرغم من أن الميكروب قد يصيب مجموع أجهزة الجسم أو منطقة محدودة معينة . من الممكن أن تسبب هذه الصدمة ؛ متلازمة الإختلال الوظيفى لعديد من أجهزة الجسم (المعروفة سابقاً بإسم فشل العديد من أجهزة الجسم) والوفاة . يعتبر الأطفال، والأفراد الذين يعانون من نقص المناعة، وكبار السن ؛ هم أكثر ضحايا هذه الحالة شيوعا، لا تستطيع أجهزتهم المناعية التعامل مع العدوى بفعالية كما هو الحال بالنسبة للأشخاص البالغين الأصحاء. يتم رعاية المرضى الذين يعانون من الصدمة الإنتانية فى كثير من الأحيان بوحدات العناية المركزة . يبلغ معدل وفيات من الصدمة الإنتانية ما يقرب من ٢٥ - ٥٠٪.

يعتبر الإلتهاب هو السبب الرئيسى لجميع الأمراض . كما أن المادة عديدة السكاريد الدهنى البكتيرية هي واحدة من أقوى عوامل الشراسة (الفوعة) البكتيرية من حيث الخواص الداعمة للإلتهاب . قد يثير إعطاء جرعات صغيرة من المادة عديدة السكاريد الدهنى من أنواع بكتيرية عديدة فى الوريد ؛ بدء حدوث إستجابات التهابية حادة تشبه من حيث النوعية لتلك التى تحدث أثناء المراحل المبكرة من الصدمة الإنتانية .

فى ظل الظروف الفسيولوجية العادية، يوجد هناك توازن إستتبابى بين تكوينات أنواع الأكسجين التفاعلى والتخلص منها بواسطة مركبات كاسحة مضادة للأكسدة داخلية المنشأ . إلا أن وطأة الاكسدة تحدث عندما يتم الإخلال بهذا التوازن عن طريق تكوين مفرط لأنواع الأكسجين التفاعلى .

تعتبر أنواع الأكسجين التفاعلى كسلاح ذو حدين ؛ فمن الناحية الفسيولوجية، تعتبر مستويات أنواع الأكسجين التفاعلى المنخفضة والمسيطر عليها التى تنتجها الخلايا المناعية مفيدة بدون شك حيث تعتبر واحدة من آليات الدفاع ضد العدوى، كما قد تعمل بمثابة جزيئات منذرة . فى حين أن مستوى أنواع الأكسجين التفاعلى الناتج عن الحيوان المنوى البشرى ضرورى لتنظيم وظائف الحيوان المنوى الطبيعية أثناء نضجه ؛ مثل إكتساب القدرة التلقيحية، التنشيط الزائد، رد فعل الجسيم الطرفى، والإندماج بالبويضة . ولكن يعتبر الإفراط فى إنتاج هذه الجذور المرتبط بوجود التهابات؛ عامل مساهم رئيسى فى إرتفاع معدلات الوفيات المرتبطة بالعديد من الأمراض، كما يمكن أن تؤدى فى بعض الأحيان إلى خلل مميت بأجهزة الجسم . علاوة على ذلك، يمكن لأنواع الأكسجين التفاعلى أن تؤكسد كل من الدهون، الأحماض الأمينية، والكربوهيدرات مسببة حدوث طفرة أو تجزئة بالحمض الريبى النووى المنزوع الأكسجين.

وبالتالى، فإن إرتفاع كل من المركبات الداعمة للأكسدة (مادة تفاعلية من ثيو حمض باربيتيوريك، أكسيد النيتريك و إنزيم أكسيداز الزانثين) - والسيتوكينات الداعمة للإلتهابات ؛ مثل (عوامل نخر الورم - الفا، إنزيم سينسيز أكسيد النيتريك المحرض، ونطاق من إنزيمات مفكِكة وفاصلة للعناصر الفلزية عن البروتينات - ١٧) يؤدى إلى نخر الأنسجة وضعف نسبى للخصوبة، حيث تشير الدلائل والبراهين إلى أن الضرر الناتج عن وساطة أنواع الأكسجين التفاعلى على الحيوانات المنوية، هو أحد المسببات التى تسهم إسهاماً كبيراً فى حدوث ٣٠٪ - ٨٠٪ من الحالات .

وقد أجريت هذه الدراسة لتقييم هدفين أساسيين . إستهدف الهدف الأول بحث الآثار السلبى لسمية المادة عديدة السكاريد الدهنى فى كل من نسيجى الخصية وخلايا الكبد، والثانى لتقييم التأثير الوقائى للمنتجات التى تحدث بشكل طبيعى لكل من الخلاصة الخام لنباتى عود الروح المغربى ونبات الكالونا، مقابل السمية الناجمة عن المادة عديدة السكاريد الدهنى فى ذكور الفئران .

لقد تم إختيار كل من نباتى ؛ عود الروح المغربى و الكالونا اللذان خضعا للدراسة بناءاً على مكوناتهما النشطة التي تحتوى على مضادات أكسدة إلى جانب خصائصهما المضادة للإلتهابات، وقد تم تحضير كل منهما فى خلاصة الكحول الإثيلى الكاملة . تم إحداث حالة إنتان فى فئران التجارب، بواسطة طريقة سهلة تتمثل فى إستخلاص غير فينولى لمادة عديدة السكاريد الدهنى المشتقة من سلالات بكتيريا الإشريشيا القولونية، تم تصميمها بتقنية عالية النقاء .

تم تصنيف ٣٤ فأراً ناضج جنسياً من سلالة (سبراج داولى) إلى ٥ مجموعات : المجموعة الضابطة التى تم إعطاؤها محلول ملح طبيع عن طريق الفم (وعددها ٦ فئران)، وهى تمثل مجموعة الفئران الأصحاء - بينما تم حقن فئران المجموعة المستحثة (وعددها ١٠ فئران) داخل التجويف البريتونى بالمادة عديدة السكاريد الدهنى بجرعة ٤ ملجم / كجم من وزن الجسم وتركت حية لمدة ١٢ ساعة - أما المجموعة المذيبة بدون مذاب (وعددها ٦ فئران) فقط أعطيت ٠.٦٦ مجم / كجم من مادة جليكول البولى إثيلين (تركيز ٢٠٪) (وهذه المادة عبارة عن أداة مذيبة لخلاصة النبات) يومياً لمدة ثلاثة أسابيع ثم أعطيت جرعة واحدة من المادة عديدة السكاريد الدهنى داخل التجويف البريتونى بما يعادل ٤ مجم / كجم من وزن الجسم وتركت حية لمدة ١٢ ساعة.

تمثل المجموعة التى عولجت بخلاصة بنات عود الروح المغربى ؛ المجموعة المحمية (وعددها ٦ فئران)، قد أعطيت ٢٠٠ مجم من النبات / كجم يومياً من وزن الجسم لمدة ثلاثة أسابيع، ثم تم حقنها بالمادة عديدة السكاريد الدهنى داخل التجويف البريتونى بجرعة بلغت ٤ مجم / كجم من وزن الجسم وتركت حية لمدة ١٢ ساعدة . أما المجموعة التى عولجت بنبات الكالونا (وعددها ٦ فئران) ؛ وهى تمثل أيضا مجموعة محمية أخرى فقد تم إعطاؤها ٢٠٠ مجم / كجم من وزن الجسم من النبات يومياً لمدة ثلاثة أسابيع، ثم تم حقنها بجرعة بلغت ٤ مجم / كجم من وزن الجسم بالمادة عديدة السكاريد الدهنى داخل التجويف البريتونى، ثم تركت حية لمدة ١٢ ساعة .

تم جمع عينات منوية من أنسجة البربخ من جميع المجموعات التجريبية، وتم تحليل العينات بشكل روتينى بواسطة التحليل المنوى بمساعدة الحاسوب .

وقد أجريت قياسات البلازما البيوكيميائية الروتينية على نماذج مختلفة عمن حيوانات التجارب . تم تحديد المواد الداعمة للأكسدة ومضادات الأكسدة الأنزيمية وكذلك الغير إنزيمية بقياس الطيف الضوئى بكل من البلازما، خلايا الكبد، وأنسجة الخصية . تم قياس كل من هرمون التستوستيرون بمصل الدم و الإنترلوكين - ١ بيتا بواسطة عتاد قياسات الإمتزاز المناعى المرتبط بالإنزيم (الإليزا) . تم عمل عزل للحمض النووى الريبوزى من الخلايا الكبدية وأنسجة الخصية، ثم إجراء تفاعل البوليميريز التسلسلى بالطريقة السريعة بتقنية الرحلان الكهربائى بهلام الأجاروز لرؤية المورث الجينى (جين مدبرات شئون المنزل) وتحديده كما، وكذلك إنزيم الأكسجينيز الحلقى - ٢، إنزيم سينسيز أكسيد النيتريك المحرض، وعوامل نخر الورم - الفا، في خلايا الكبد و الجليسيرالدهيد نازعة الفوسفات (جين مدبرات شئون المنزل)، وعوامل نخر الورم - الفا، ونطاق من إنزيمات مفكِكة وفاصلة للعناصر الفلزية عن البروتينات - ١٧فى أنسجة الخصية .

علاوة على ذلك، تم عزل الحمض الريبى النووى المنزوع الأكسجين من الخصية فى جميع المجموعات التجريبية لرؤية تجزئة الحمض النووى بالإضافة إلى قطع الحمض الريبى النووى المنزوع الأكسجين المتعدد الأشكال والذى قد تم تضخيمه بشكل عشوائى بإستخدام إنزيم البروتينيز الفلزى ٧٧ مادة عازلة عشوائية واحدة توضع على هلام الأجاروز.

أدى إعطاء المادة عديدة السكاريد الدهنى إلى حدوث التهاب بأجهزة الجسم، تم تأكيده عن طريق وجود زيادة فى السيتوكينات الدهنى الداعمة للألتهاب مقترنة بإرتفاع فى الجزيئات الداعمة للأكسدة . على الرغم من إرتفاع مستوى الإنزيمات المزيلة للسموم، إلا أنها لم تستطع أن تواجه للتأثير المتلف للمادة عديدة السكاريد الدهنى .

أحدثت المادة عديدة السكاريد ال الدهنى إستجابة فى خلايا الكبد فى صورة مرحلة حادة تجلت فى إنخفاض معدل تخليق وتكوين البروتين، وزيادة فى إنزيمات الكبد المزيلة للسموم، مع زيادة فى عوامل نخر الورم - الفا ، إنزيم الأكسجينيز الحلقى - ٢، والسيتوكينات الإلتهابية الخاصة بإنزيم سينسيز أكسيد النيتريك المحرض، وكذلك الجزيئات الداعمة للأكسدة مثل (المادة التفاعلية من ثيو حمض باربيتيوريك، أكسيد النيتريك وإنزيم أكسيداز الزانثين)، مسبباً حدوث تلف بالأنسجة ناجم عن أنواع الأكسجين التفاعلى، وقد تم تدعيم ذلك عن طريق الفحص النسيجى الذى كشف عن التهاب، نخر، وتليف بابى بالكبد .

تسبب إعطاء المادة عديدة السكاريد الدهنى لإى حدوث قلة النطاف أى نقص عدد الحيوانات المنوية بالإضافة إلى وهن النطاف بالخصية مع إنخفاض فى مستوى هرمون التستوستيرون فى الدم، مقترناً بمستويات عالية من المركبات الداعمة للتأكسد (إنزيم أكسيداز الزانثين، مادة تفاعلية من ثيو حمض باربيتيوريك، أكسيد النيتريك، والإنترلوكين - ١ بيتا) التى تؤثر على كل من الإنطاف (تكوين الحيوانات المنوية) وحركة الحيوانات المنوية التقدمية . وبالإضافة إلى هذه التغيرات، كان هناك تعبير مفرط فى كل من ؛ مجال من الإنزيمات المفكِكة والفاصلة للعناصر الفلزية عن البروتينات - ١٧ وعوامل نخر الورم - الفا، حيث يدل ذلك على حدوث التهاب كنتيجة طبيعية لحالة إجهاد تأكسدى.

علاوة على ذلك، فإن حقن المادة عديدة السكاريد الدهنى أدى إلى تفتيت الحمض الريبى النووى المنزوع الأكسجين بسبب موت الخلايا و حدوث طفرات، حيث تم تأكيد حدوثها عن طريق النقص الشديد فى عدد الجسيمات النووية والتراجع فى طول الحمض الريبى النووى المنزوع الأكسجين، وكذلك التغير فى بصمة الحمض الريبى النووى المنزوع الأكسجين المتعدد الأشكال والتى قد تم تضخيمه بشكل عشوائى، حيث تنوعت أعداد الأجزاء المتفتتة من الحمض الريبى النووى الونزوع الأكسجين بشكل واضح .

إلا أنه مع محاولة المعالجة المسبقة بنباتى عود الروح المغربى والكالونا، فإن القياسات والمعايير الروتينية قد أظهرت تحسن كبير وواضح أو حتى أن يتم الحفاظ عليها عند حدودها الفسيولوجية . أظهر إعطاء المادة عديدة السكاريد الدهنى للفئران التى سبق معالجتها بخلاصة من نبات الكالونا ؛ نتائج أفضل بوضوح من تلك النتائج التى تم رصدها للفئران التى حقنت بالمادة عديدة السكاريد الدهنى وقد سبق معالجها بنبات عود الروح المغربى .

أظهرت المعالجة المسبقة بنبات الكالونا تحسن ملحوظ في تكوين الحيوانات المنوية، وحركتها . كما كشفت عن أن الهيئة التفصيلية للأنابيب الدقيقة الناقلة للمنى تقريباً طبيعية مع وجود بطانة وبزرات نطاف طبيعية . كما أنها قمعت أيضاً قمع شبكة الشلال الإلتهابى، وطان ذلك مدعوماً بإنخفاض فى مستوى كل من المواد الداعمة للأكسدة والسيتوكينات الداعمة للإلتهاب . وكانت هذه النتائج تنعكس أيضاً على الجلايا الكبدية فضلاً عن أنسجة الخصية . يحافظ نبات الكالونا على سلامة بنية الأغشية المخاطية للخلايا الكبدية، ولم تكن هناك أى علامات على وجود نزف أو موت خلوى . علاوة على ذلك، فقد أدى نبات الكالونا إلى نقصان جميع المواد الداعمة للإلتهابات والأكسدة.

من ناحية أخرى أظهر نبات عود الروح المغربى تحسناً متوسطاً فى كل من خلايا الخصية والأنسجة الكبدية، ولكنها فشلت فى العودة إلى الحدود الفسيولوجية، والذى أكده نتائج الفحص النسيجى .

في الختام، نستنتج أن المركبات الداعمة للتأكسد يمكنها ببساطة أن تصيب الإستتباب التأكسدى للخلايا المنوية والكبدية بالخلل، مسببة إلتهابات خفيفة أو مزمنة، مصحوبة بنقصان نسبى فى الخصوبة وتلف خلايا الكبد وأنسجة الخصية . يعتبر نبات الكالونا مادة مضادة للأكسدة حديثة وفعالة، ولديها تأثير وقائى لحماية الأنسجة من سمية المادة عديدة السكاريد الدهنية بدون أاى آثار جانية تذكر مقارنة بنبات عود الروح المغربى .