دراسة التأثير السام لمعقد النحاس الثنائي مع المضاد الحيوي الدوكسيسايكلين في أنسجة الفئران المختبرية

إيمان حسين عبد الصاحب
قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة البصرة

الخلاصة

تضمنت الدراسة الحالية اختبار السمية الحاد لمعقد النحاس الثنائي مع المضاد الحيوي الدوكسيسايكلين في 40 فأر مختبري عن طريق التجريع الفموي باستخدام جرع متدرجة من المعقد(2,1.5,1)غم/كغم اذ سجلت الوفيات الحاصلة خلال 72 ساعة ودرست الاستجابة النسيجية للاعضاء المستهدفة وتمثلت بترسب المعقد في أنسجة الكبد والكلية والرئة والقلب والطحال، كما لوحظ حدوث الالتهابات الشديدة والنخر في أنسجة الكبد والكلية والرئة والأمعاء الدقيقة والغليظة في حين ظهرت أنسجة الدماغ طبيعية.

Study of Toxicity of the copper (II) Complex wirh Doxycycline in Tissues of the Experimental Mice

Iman H. Abid Al-Sahib
Department of Biology , College of Science, University of Basrah

Summary

In this study, acute short toxicity test of copper (II) complex with Doxcycline was examined in 40 of the experimental mice by oral administer of the progressive doses during 72 hours . Histopathological changes in the target organs were clearly evident , dose dependend and varying in severity from precipitate of the complex in the liver , kidney, lung , heart and spleen to the acute inflammation and necrosis in the liver ,lung , small and large intestine , while no Histopathological changes has seen in the brain .

المقدمة

تنتج معظم العقاقير الطبية من المنتجات الطبيعية وهي عبارة عن مركبات عضـوية لـم يدخل المعدن في تركيبها، ولكن في الآونة الأخيرة تم تحضير مجموعة من العقاقير التي يـدخل المعدن في قوامها من خلال تآصره مع ليكاندات عضوية، ولقد وجـد بـأن هـذا النـوع مـن التآصر يزيد الفعالية الحيويـة لهـذه المنتجـات الطبيعيـة العضـوية (Nogrady ، 1988). إن عنصر النحاس من العناصر المهمـة حيويـاً الـذي يـدخل فـي تركيـب الميتـالوبروتين Metaloprotein في مختلف الكائنات الحية (Sorenson، 1979 و Bury وجماعته، 1989 و Antila، 1992)، إذ يمتلك عنصر النحاس سلوكاً مزدوجاً داخل النظام الحيوي ففي الوقت الذي يكون فيه عنصر النحاس مهماً حيوياً وأساسـياً داخـل النظـام الحيـوي فأنـه فـي الوقـت ذاته يعد عنصراً سماً (Klaassen و Doull، 1980)، وقد وجد ان بعض معقـدات النحـاس العضوية تكون أكثر فعالية في معالجة الالتهابات وخاصة التهاب المفاصل وأن فعاليتها أكبر مما هي عليه عند استخدام الليكاندات العضوية وحدها(Xu وجماعتة،1992 و Sorenson،1989).

إن فعالية معقدات أيونات النحاس الثنائي في معالجة الأمراض السرطانية دفعت العديـد مـن الباحثين لدراسة هذا النوع من المعقدات (Sorenson، 1982)، وقد أظهرت الدراسات ان تآصر النحاس الثنائي مع المضاد الحيوي الدوكسيسايكلين Doxycycline ذو فعالية مضادة للجـراثيم وأن المعقد معتدل السمية (Al Riyahi، 2000)، والدوكسيسايكلين مضاد حيوي له تأثير واسـع كابح لنمو الجراثيم إذ يستعمل في معالجة الالتهابات الناتجـة عـن الريكتسـيا والمايكوبلازمـا والكلاميديا والجراثيم الموجبة والسالبة لصبغة كرام (Azarnoff و Belknape، 1996).

أن إدخال عنصر النحاس في التآصر مع المضاد الحيوي الدوكسيسـايكلين قـد زاد مـن الفعالية الحيوية لهذا المضاد ويقلل إلى درجة كبيرة من سميته لذلك يمكن استخدام هـذا المعقـد كبديل للمضاد الحيوي (Al-Riyahi، 2000)، لهذا كان الهدف من الدراسة الحالية دراسة التأثير السمي لمعقد النحاس الثنائي مع الدوكسيسايكلين في أنسجة وأعضاء مختلفة أخذت مـن فئـران مختبرية معاملة بجرع متدرجة من المعقد تمهيداً للاختبار الدوائي.

المواد وطرق العمل

تحضير معقد أيون النحاس الثنائي مع الدوكسيسايكلين (Al-Riyahi، 2000).

تم استخلاص المادة الفعالة الدوكسيسايكلين من عقـار الدوكسيسـدار Doxydar بإذابـة محتويات عدد من الكبسولات التي تحتوي على 1 غم من المادة الفعالة (الدوكسيسايكلين) في 40 مل من الماء المقطر مع التحريك السريع، ثم رشح المحلول وبخر بجهاز المبخر الدوار، إذ تـم الحصول على بلورات صفراء اللون تمثل المادة الفعالة.

تم تحضير المعقد من خلال مزج محلول 1 غم من الدوكسيسايكلين 0.00216 مول مع محلول 0.1843 غم من كلوريد النحاس الثنائي 0.00108 مول في 20 مل من الماء المقطر مع التحريك السريع في درجة حرارة الغرفة، إذ تكونت بلورات خضراء اللون ثم جمع الراسب بالترشيح وغسل بالأسيتون مرات عديدة وجفف تحت الضغط المخلخل.

اختبار السمية الحاد (قصير الأمد) Acute (short-term) toxicity

استخدم في هذا الاختبار 40 فار مختبري من كلا الجنسين وكانت أوزانها (25±5)غم و بعمر شهرين تقريبا قسمت إلى 4 مجاميع وقد تم تجريع أحدى المجاميع 0.5 مل من محلول الملح الفسيولوجي Normal Saline واعتبرت هذه مجموعة السيطرة، بينما أعطيت بالطريقة نفسها جرع متدرجة من المعقد (1، 1.5، 2) غم/كغم لحيوانات المجاميع الأخرى وقد تم مراقبة الحيوانات لمدة 72 ساعة (Al-Riyahi، 2000)، إذ تم تشريح كل حيوان حال موته، أما الحيوانات غير المتوفاة فقد تم قتلها بكسر النخاع الشوكي وتشريحها عند انتهاء فترة المراقبة من أجل دراسة الاستجابة النسيجية للسمية الحادة (Klaassen، Doull، 1980).

التحضير النسيجي:

لغرض دراسة التأثيرات السمية لمعقد النحاس الثنائي مع الدوكسيسايكلين أخذت قطع من الكبد والكلية والقلب والرئة والطحال والدماغ والأمعاء الدقيقة والغليظة وحضرت المقاطع النسيجية باتباع طريقة شمع البارافين (Luna، 1960)، ثم صبغت المقاطع بصبغة Haematoxylin-Eosin للفحص بالمجهر الضوئي (Drury وجماعته، 1967).

النتائج

أظهرت المقاطع النسيجية التي أخذت من الفئران المعاملة في اختبار السمية الحاد، أن زمن موت الفئران يتناسب طردياً مع تأثير المعقد على أنسجة الأعضاء المستهدفة وعكسياً مع وجوده مترسب في الأنسجة، إذ كانت المادة المترسبة أقل أو غير موجودة والتأثير أكثر وضوحاً على الأنسجة المأخوذة من الفئران التي ماتت بعد 72 ساعة من تلك التي أخذت من الفئران التي ماتت في الساعات الأولى والتي ظهرت فيها المادة المترسبة أكثر انتشاراً والتأثير أقل وضوحاً، وقد اختلف التأثير من نسيج إلى آخر ومن منطقة إلى أخرى في النسيج نفسه وكما يأتي:

1- الكبد

أظهرت نتائج الفحص المجهري للمقاطع النسيجية لأكباد الحيوانات المعاملة ارتشاح الخلايا الالتهابية حول الأوردة المركزية والأوعية الدموية المحتقنة بكريات الدم الحمراء، كما لوحظت المادة مترسبة في الأوعية الدموية والجيبانيات والخلايا الكبدية مع تنخر necrosis النسيج بسبب تحلل السايتوبلازم أو تحلل الأنوية (شكل-1).

2- الكلية

أثبت الفحص المجهري لكلى الحيوانات المعاملة احتقان الأوعية الدموية وتجمع الخلايـا الدفاعية حولها مع وجود المعقد مترسباً فيها وبين الكبيبـات والانيبيبـات الكلويـة (شـكل-2)، وظهور حالات النزف الدموي (شكل-3)، كما لوحظ وجود تلف عام في النسيج الكلوي فالكبيبات أما تالفة (شكل-4) أو غير منتظمة أو منكمشة (شكل-5)، وقد وجدت معظم الانيبيبات الكلويـة تالفة بسبب التنخر Necrosis، فضلاً عن تجمع الخلايا الدفاعية بين الكبيبات(شكل-6).

3-الرئة

أوضحت نتائج الفحص المجهري للمقاطع النسيجية لرئات الحيوانات المعاملة ظهور أعراض مرضية حادة تمثلت بالتلف الحاصل في نسيج الرئة من خلال ملاحظة التنخرات الرئوية كما وجدت المادة مترسبة في جدران الحويصلات الهوائية (شكل-7)، ولوحظت الحويصلات الهوائية ممتلئة بالسوائل المخاطية الحامضية الاصطباغ مع احتقان الأوعية الدموية وارتشاح الخلايا الدفاعية وتجمعها بشكل كثيف حول الأوعية الدموية (شكل-8)، فضلاً عن حدوث نزف في الحويصلات الهوائية وارتشاح الخلايا الدفاعية فيها (شكل-9)، كما لوحظ تثخن واسع في جدران الحويصلات الهوائية (شكل-10)، وظهرت حالة النزف في القصبات الرئوية وتجمع كثيف للخلايا الدفاعية حولها (شكل-11).

4- القلب

احتوت تجاويف القلب في الحيوانات المعاملة على المعقد مترسباً بشكل بقع أو منتشراً مع كريات الدم (شكل-12)، كما لوحظ وجود النخر في بعض المناطق متمثلاً بتحلل أنوية الخلايا العضلية غالباً وبشكل أقل تحلل في السايتوبلازم (شكل-13).

5- الطحال

أظهرت الدراسة النسيجية لطحال الحيوانات المعاملة وجود المعقد مترسباً بشكل بقع، فضلاً عن وجود بقايا خلوية في بعض مناطق اللب الأبيض (بشكل-14).

6- الدماغ

أظهر الفحص المجهري للمقاطع النسيجية المأخوذة من المخ (شكل-15-A) والمخيخ (شكل 15-B) عدم حدوث أي تغيرات نسيجية واضحة.

7- الأمعاء الدقيقة والغليظة

تمثلت التغيرات النسيجية للأمعاء الدقيقة المأخوذة من الحيوانات المعاملة بتحلل النظام الخلوي للزغابات والطبقة المخاطية وارتشاح الخلايا الدفاعية (شكل-16)، وظهرت الخلايا منكمشة أو متنخرة في الطبقة تحت المخاطية (شكل-17)، في حين أوضح الفحص المجهري للأمعاء الغليظة بوجود مناطق متنخرة في الطبقة المخاطية وتحلل الطبقة تحت المخاطية وتفكك الطبقة العضلية (شكل-18) كما لوحظ وجود النزف الدموي في تجويف الأمعاء الغليظة (شكل-19).

المناقشة

اعتماداً على الاستخدام المقترح للدواء تجـري اختبـارات السـمية الممهـدة للاختبـار الدوائي لدراسـة التـأثيرات الضـارة للـدواء والتـي تتبـع مفهـوم الجرعـة - الاسـتجابة (dose-response concept) (العلاقة بين درجة استجابة النظام الحيوي وكمية المادة السـامة Klaassen) و Doull، 1980)، وقد لوحظ في الدراسة الحالية حدوث تغيرات نسيجية مرضية في أعضاء الفئران المعاملة بجرع متدرجة من معقد النحاس الثنائي مـع الدوكسيسـايكلين وقـد اختلفت هذه التغيرات في شدتها في الأعضاء المختلفة، ففي الكبد ظهرت علامات تشير إلى بداية حدوث الالتهاب الحاد والتي تمثلت باحتقان الأوعية الدموية وقد يعزى ذلك إلى حدوث فرط الدم الفاعـل hyperaemia (ازديـاد جريـان الـدم) نتيجـة للتوسـع الشـرياني فقـد ذكـر Mac Swen و Whaley (1992) أن ارتخاء الشرايين الذي يعقبه ارتفاع في ضغط الدم يؤدي إلى زيادة في معدل مرور الدم من الحيز الشرياني إلى الحيز الوريدي مسبباً احتقانها، وعليه فان الشرايين والأوردة تتوسع كثيراً في فرط الدم الفاعل لأنها تمتلئ بكاملها بالدم.

كما لوحظ خلال هذه الدراسة ارتشاح الخلايا الدفاعية وتجمعها فـي أكبـاد الحيوانـات المعاملة والذي قد يكون سببه وجود المعقد مترسباً في النسـيج ممـا حفـز الجهـاز المنـاعي على إنتاج هذه الخلايا الدفاعية، كما أن النخر الحاصل في الكبد قد يكـون نـاتج عـن مـوت

مجاميع من خلايا النسيج، إذ ذكر، Kingsbury (1980) أن ترسب النحاس في الكبد يؤدي إلى تحلل الخلايا الكبدية، كما أن الدوكسيسايكلين له تأثير سام على الخلايا الكبدية (Lienart وجماعته، 1992) إذ انه مثبط تنافسي للسايتوكروم P – 450 (Cytochrome P-450) في الخلايا الكبدية (Pichard وجماعته، 1992).

أما في الكلية فأن علامات الالتهاب كانت أكثر وضوحاً إذ فضلاً عن الاحتقان الدموي وارتشاح الخلايا الدفاعية فقد وجدت كريات الدم الحمراء في الفسحات النسيجية وهذا يدل على وجود تأثير حادة في الطبقة الطلائية الداخلية للأوعية الدموية، كما لوحظ وجود تلف عام في النسيج الكلوي وهذا قد يعزى إلى الوظيفة التركيزية للخلايا الطلائية للنبيبات الكلوية فأنها تتعرض إلى مستويات عالية التركيز من المواد السامة لذا فأن الموت السمي لخلايا النبيبات الكلوية مألوف جداً وأن تلف النبيبات الكلوية يؤدي إلى حدوث حالة سريرية خطيرة إلا وهي قصور الكلية الذي قد يكون مميتاً إذا لم يحدث تجدد في النبيبات الكلوية وذلك بتكاثر الخلايا التي بقيت حية (Anderson، 1980)، وعليه فأن موت الحيوانات أثناء اختبار LD_{50} في الدراسة الحالية قد يعود إلى القصور الكلوي.

أظهرت الفحوصات النسيجية للرئة في الدراسة الحالية أعراض مرضية مماثلة لما لوحظ في الكلية ولكن بشكل أكثر وضوحاً، إذ لوحظ تجمع كثيف للخلايا الدفاعية حول الأوعية الدموية والقصيبات الهوائية وقد أشار Vuillemenot (2004) إلى إن استخدام الدوكسيسايكلين في العلاج يؤدي إلى زيادة الخلايا اللمفاوية في الرئة، كما لأحظ Roszkowski (1992) أن استخدام الدوكسيسايكلين في علاج الأورام الرئوية أدى إلى زيادة وانتشار هذه الأورام، وهذا قد يعلل كثافة الخلايا الدفاعية التي ربما قد تكون بداية نشوء الورم الحبيبي نتيجة لاستمرار تواجد الأجسام الغريبة المتمثلة بترسب المعقد في النسيج والذي قد يسبب تفاعل فرط الحساسية المؤدي إلى ظهور بعض المركبات الحامضية الاصطباغ والتي تتكون من مواد مخاطية وهذا ما لوحظ في الدراسة الحالية.

أن وجود المعقد مترسباً في القلب والطحال كان مصحوباً بالنخر النسيجي نتيجة لتحلل الانوية أو السايتوبلازم، لكن لم يكن بمستوى الضرر الذي لوحظ في الكلية أو الرئة، كما ظهرت علامات الالتهاب واضحة في الأمعاء الدقيقة والغليظة في حين بدت أنسجة الدماغ طبيعية.

المصادر

Al-Riyahy, A.A. (2000). Synthesis, spectrospic study and biological activity of copper (II) and Vanadium (IV) complexes with some antibiotics . M.Sc. thesis. Coll. Sci., Univ. Basrah.

Anderson, J.R (1980), Muir's text book of pathology 11th ed. Edward Arnold, Norwich.

Antila, H. (1992), The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health . Ph.D. thesis . Univ. Turku.

Azarnoff, D.and Belknape, S.(1996) ,In drug development of gastrointestinal disorders . physician genr . 7(1):70-75

Bury,A.,oding,RJ,Fleet,M.B.,Stevens,A.and.Gomen,P.S.J.,(**1989**) , In platinium and other metal coordination compounds in cancer chemotherapy . Inorg.Biochem,37,1

Drury, R.A.B. ;wallington, E.A. and cameron, S.R. (1967), carilton's histological technique, 4th ed. Oxford Univ. press, New York .

King sbury, J.M. (1680). phytotoxicology. In: casarett and Doull's toxicology : the Basic Science of poisonous,Doull, J.klaassen, C.D.and Amder, M.O. (eds.). 2nd ed. Macmillan publishing Co., Inc., New Yourk, USA.

Klaassen, C.D. and Doull, J. (1980). Evalution of safty: toxicology evalution . In Casarett and Doull's toxicology: the Basic Science of poisonous . Doull, J., klaassen, C.D. and Amder, M.O. (eds.) 2nd ed. Macmillan publishing Co., Inc., New Yourk, USA .

Lienart, F., morissens, M., Jacops, S. and Ducobu, J. (1992) . Doxycycline and hepatoxicity. Acta. Clin. Belg. 47(3):205-8

Luna, L.C. (1960). Mannual of Histologic stainning Methods of Armed Forced Institute of pathology 3th ed. Me Graw_Hill Book Company, New Yourk, London.

Mac sween, R.M. and whaley, k. (1992) .Maurix tex book of pathology 13th ed. Edward Arnold, London .

Nogrady, T. (1988), Medicinal Chemistry, University Press, Oxford.

Pichard, L.; Fabre .I. ; Fabre, G. ;Domergue, J. ; Saint-Aubert, B. Mourad, G.and Maurel, P.(1990). Cyclosporin A drug intractions .Screening for inducers and inhibitors Cytochrom P. 450 in primary culture of human hepatocytes in liver microsomes . Drug Metab.Dispos.sep.oct;18(5):595-606.

Roszkowski,k.,Beuth,J.,ko,H.L.,Roszkowski,W,Jeljaszewicz,J.end Pulverer,G.Influence of 12 antibiotics on antitumor immunity in BALB/C-mice zentralbl – Bakteriol. Jan, 276(2):280-7

Sorenson, J.R.J. (1979), Copper chelates as possible active forms of the antiarthritic drugs . Prog. Med. chem. 19, 135.

Sorenson, J.R.J.(1982). Metal ions in biological system. Vol. 14, ed Hsigel Marcel Delker, New Yourk, p.77

Sorenson, J.R.J. (1989) , Copper complex – aunique class of antiarthritic drugs . prog. Med. Chem. 26,437. sorenson, J.R.J. (1979), Prog. Med. chem. 19, 135.

Vuillemenot, B.R; Rodriguez, J.F.and Hoyle,G.W. (2004) ymphoid tissue and emphyseman in the lungs of transgenic mice inducibly 19-expressing tumor necrosis Factor –alpha. Am. J. Respir. Cill. Mol. Biol. Apr ; 30(4): 438-48.

Xu, R . X . ; Antholine, W . E . and petering, D . H . (1992) ,Temporal Profile of optical transmission probe for pulsed laser irradiation of amorphous slicon . Biological. Chem, 267,2,950 .