

**"دراسة فيتوكيميائية وبيولوجية لبعض النباتات المستخدمة في الطب التقليدي
المصري مع النشاط المحتمل كمضادات لسرطان الدم"**

رسالة مقدمة من

شيماء محمد محمد عبد الجواد

للحصول على درجة الدكتوراه في العلوم الصيدلانية

"عقاقير"

تحت إشراف

أ.د./ منى حافظ حنة
أستاذ العقاقير - كلية الصيدلة -
جامعة الفيوم - مصر

أ.د./ هشام إبراهيم محمد العسكري
أستاذ العقاقير - كلية الصيدلة -
جامعة القاهرة - مصر

أ.د./ غادة أحمد فوزي
أستاذ العقاقير - كلية الصيدلة -
جامعة القاهرة - مصر

أ.د./ سمير أنيس روس
أستاذ العقاقير - مركز أبحاث
المنتجات الطبيعية - كلية الصيدلة -
جامعة المسيسيبي - الولايات
المتحدة الأمريكية

قسم العقاقير
كلية الصيدلة
جامعة القاهرة
مصر

فبراير/ ٢٠٢٣

Arabic Summary الملخص العربي

الفصل الأول

سرطان الدم النخاعي المزمن هو رابع نوع من أنواع السرطانات السائدة في صعيد مصر. وقد أثبتت الدراسات الحديثة ارتباط العديد من عوامل الخطر بحدوث الأورام الخبيثة بالدم في صعيد مصر مثل تقدم العمر، داء السكري، فيروس التهاب الكبد الوبائي C، السمنة، التعرض للمواد الكيميائية الزراعية والتعرض للمجال الكهرومغناطيسي. وتوجد العديد من الاستراتيجيات العلاجية المستخدمة حاليًا في مصر لعلاج مرضى سرطان الدم النخاعي المزمن، بما في ذلك استخدام هيدروكسي يوريا ومثبطات التيروسين كيناز (مثل إيماتينيب) والإنترفيرون ألفا وكذلك زرع الخلايا الجذعية (HSCT). وبالرغم من ذلك هناك العديد من العوائق للخطط العلاجية لمرضى سرطان الدم النخاعي المزمن في مصر مثل عدم توفر متبرعين مناسبين لـ HSCT، والتكلفة العالية لمثبطات التيروسين كيناز (TKIs) المستخدمة حاليًا، وانخفاض فعالية الأدوية الأخرى مثل هيدروكسي يوريا وإنترفيرون ألفا، فضلًا عن المقاومة المتطورة لمثبطات التيروسين كيناز. في ضوء ما سبق يتوجب وضع خطة بحثية للبحث عن علاجات أكثر فعالية وأمنة واقتصادية ومن الممكن أن يكون استخدام المنتجات الطبيعية حلاً لهذه المعوقات.

الهدف من هذه الدراسة هو فحص بعض النباتات الطبية التي تنمو في صعيد مصر وتستخدم طبيًا، حيث يسود سرطان الدم النخاعي المزمن، لإمكاناتها المضادة لسرطان الدم بغرض فصل المركبات المضادة لسرطان الدم من النباتات المختارة النشطة بيولوجيًا.

تم استخلاص مائة جرام من الملحيق المجففة بالهواء لستة وخمسين نباتًا طبيًا مختارًا كلاً على حدا بالإيثانول ٧٥٪ وتم فحص المستخلصات كمضاد لخلايا سرطان الدم K562 باستخدام تركيز ١٠ ملجم / مللي باستخدام مقايسة استبعاد التريبان الأزرق وتم حساب النسبة المئوية للمثبطات. أوضحت النتائج أن المستخلصات النباتية الأكثر فاعلية ضد سرطان الدم K562 هي مستخلص أوراق السيسبان ومستخلص جذور الكركم ومستخلص أوراق السبانخ ومستخلص العفص ومستخلص أوراق الزعتر (النسبة المئوية للتثبيط = ١٠٠، ٩٠.٢، ٩.٨٨، ٨٧، ٢.٨٥ ٪ تثبيط، على التوالي، مقارنة بالمرجع "تاكسول"، ٧.٩٠ ٪).

وهناك دراسات سابقة عن النشاط السام للخلايا للمركبات المفصولة من مستخلص جذور الكركم والعفص وأوراق الزعتر ضد خلايا الليوكيميا K562. ولكن لم يتم إجراء أي دراسات سابقة (مع الأخذ في الاعتبار السمية الخلوية) لمستخلصات أو مركبات أوراق السيسبان وأوراق السبانخ ضد نفس النوع من الخلايا السرطانية المذكورة سلفاً، وتبعاً لذلك، تم اختيار مستخلصات أوراق السيسبان وأوراق السبانخ لمزيد من الدراسة الفيتوكيميائية والبيولوجية.

الفصل الثاني

أسفرت تجزئة مستخلص أوراق السيسبان المائي الإيثانولي النشط بيولوجيًا إلى فصل وتعريف مركب جديد (٣٣) وهو (Hederatriol 3-O-β-D-glucuronic acid methyl ester)، بالإضافة إلى أربعة وثلاثين مركبًا معروفًا يشمل تسعة عشر ترايثيربينويدات (٣-٧، ١٩-٢٤، ٢٦، ٢٩-٣٥)، ثلاث ستيرويدات (٢، ٨، ٢٥)، أحد عشر مركبًا من جليكوسيدات الفلافونويدات (١٠-١٨، ٢٧-٢٨)، كحول دهني واحد (١) ومركب فينول أميني واحد (٩). وجددير بالذكر أن ثلاثين مركبًا (١، ٣-٤، ٦-١٨، ٢٠-٣٣، ٣٥) تم التعرف عليهم لأول مرة في هذا النبات.

- أسفر التحليل الكيميائي لمجزء الهكسان من أوراق السيسبان النشط بيولوجيا باستخدام جهاز GC / MS إلى التعرف على ستة عشر مركبًا في الجزء القابل للتصبن منها خمس مركبات رئيسية وهي

Methyl palmitate, methyl elaidate, methyl lineoleate, methyl linolenate and ethyl linolenate بالإضافة إلى ذلك، تم التعرف على اثني عشر مركبًا في الجزء الغير قابل للتصبن منها خمس مركبات رئيسية تم تحديدها على أنها

Phytol, Stigmasta-5, 22-dien-3-ol, acetate, (3, beta, 22 Z), Stigmastan-3, 5, 22-trien, Stigmasta-3, 5-diene, and Stigmasterol.

وقد تم تنقية الجزء الغير قابل للتصبن وقد أسفر عنه فصل مركبين آخرين وهما:

Phytol (1), stigmasterol (2).

- أسفر الفحص الفيتوكيميائي لمجزء الإيثيل أسيتات لأوراق السيسبان والنشط بيولوجيًا إلى فصل وتعريف ستة عشر مركبًا وهم كالآتي:

Liquidambaric lactone (3), Maslinic lactone (4), Oleanolic acid (5), 11 α ,12 α -Epoxy-oleanolic lactone (6), Oleanderolide (7), Stigmasterol glucoside (8) *P*-aminophenol (9), Quercetin-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside (10) Quercetin-3-*O*- β -D-glucopyranoside (11), Quercetin-3-*O*- α -L-arabinoside (12), Quercetin-3-*O*- β -D-xyloside (13), Mauritianin (14), Isorhamnetin 3-*O*-(2,6-di-*O*- α -rhamnosyl)- β -D-galactopyranoside (15), Clitorin (16), 3-[[*O*-6-Deoxy- α -L-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-*O*-[6-deoxy- α -L-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]- β -D-glucopyranosyl) oxy] -5,7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one (17) and Kaempferol-3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)[α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-(4-*O*-*E*-*p*- coumaroyl- β -D-galactopyranoside) (18).

- أسفر الفحص الفيتوكيميائي للمجزء المائي إلى فصل وتعريف مركب جديد (33) واحد وقد تمت تسميته ب

(Hederatriol 3-*O*- β -D-glucuronic acid methyl ester)

، بالإضافة إلى ستة عشر مركبًا معروفًا وهم:

Betulinic acid (19), Ursolic acid (20), 3 β -*O*-(*cis*-*p*-Coumaroyl)-2 α -hydroxyurs-12-en-28-oic acid (21), 3 β -*O*-(*trans*-*p*-Coumaroyl)-2 α -hydroxyurs-12-en-28-oic acid (known as Jacoumaric acid) (22), Obtuslin (23), Corosolic acid (24), β -Sitosterol glucoside (25), Hederagenin 3-*O*- β -D-glucuronopyranoside 6'-*O*-methyl ester (26), Kaempferol-3-*O*-rutinoside (27), Isorhamnetin-3-*O*-rutinoside (28), Hederagenin 3-*O*- β -D-glucuronopyranoside (29), 11-Ketocorosolic acid (30), Hederagenin (31), Oleanolic acid 3-*O*- β -D-glucuronopyranoside

6`methyl ester (32), Oleanolic acid 3-*O*- β -D-glucuronopyranoside (34) and Chikusetsusaponin II (35).

- وقد تم فصل المركبات باستخدام الطرق الكروماتوجرافية المختلفة مثل هلام السيليكا، RP-18، سيفاديكس، وكروماتوجرافيا عمود الراتينج HP-20 وكذلك تقنية preparative HPLC. تم التعرف على المركبات الكيميائية المفصلة باستخدام من التقنيات الطيفية المختلفة مثل ^{13}C -NMR, ^1H -NMR, DEPT-135, APT, DEPTQ-135, HRMS و HMBC, HSQC.
- تم تقييم النشاط البيولوجي للمركبات المفصلة كمضاد لخلايا سرطان الدم K562 في المختبر وأسفرت النتائج نشاطاً ملحوظاً لأحد عشر مركباً من ترايثيربينويدات. أظهرت سبع مركبات (34، 35، 36، 37، 38، 39، 40، 41، 42، 43، 44) تأثيراً عالياً مضاداً للتكاثر ($\text{IC}_{50} = 22.3, 30.8, 31.3, 33.7, 36.6, 37.5, 41.5$) ميكرومتر، على التوالي، في حين أن أربع مركبات (32، 33، 45، 46) أظهر نشاطاً أكثر اعتدالاً مع ($\text{IC}_{50} = 56.4, 67.6, 83.3, 112.3$) ميكرومتر، على التوالي.
- تم إجراء دراسة ميكانيكية أيضاً على مستوى الجينات الجزيئية ضد العديد من عوامل النسخ التي تشير إلى المسارات التي تم دمجها في حدوث السرطان. أظهرت النتائج أن المركبات (34، 35) أظهرت تثبيطاً محدداً لمسار ($\text{IC}_{50} = 3.8, 4.6$) Wnt ميكرومتر، على التوالي بينما أظهر المركب (36) تثبيطاً محدداً لمسار Smad ($\text{IC}_{50} = 3.8$) ميكرومتر. أظهر المركب (34) أنه غير بشدة مسارات إشارات Smad, E2F ($\text{IC}_{50} = 5$) ميكرومتر.
- تم فحص المستقلبات النشطة بيولوجياً بشكل أكبر في الدراسات الحاسوبية عن طريق الالتحام الجزيئي ضد العديد من الأهداف المتعلقة بخط الخلية K562 وقد أظهرت النتائج أن المركبين (34 و 35) أظهروا تقارب ارتباط قوي تجاه topoisomerase (درجة الالتحام = 7.80- و 9.29 كيلو كالوري / مول، على التوالي). وكذلك أظهر المركبان (36 و 37) تقارب ارتباط قوي تجاه EGFR-Tyrosine kinase (درجة الالتحام = 7.12- و 7.35 Kcal / Mole، على التوالي). علاوة على ذلك، أظهر المركب (34) تقارب ارتباط قوي تجاه Abl kinase (درجة الالتحام = 7.05 Kcal/ Mole)

الفصل الثالث

تم نشر العديد من المقالات المرجعية حول نبات السيسبان. ومع ذلك، ناقشت جميع دراسات المرجعية السابقة فقط الأنشطة البيولوجية والاستخدامات الطبية العرقية، ولكن ليس كيمياء النبات. لذلك، فإن الهدف من هذه المقالة المرجعية المقدم هو تقديم بيانات تفصيلية عن المركبات المفصلة من أوراق السيسبان، والعلاقة بين هذه المركبات والنشاط البيولوجي شاملاً النتائج الجديدة حول هذا النبات الممثلة في هذه الرسالة بالإضافة إلى نتائج الدراسات السابقة. في فصل المقالة المرجعية هذا، تم التوضيح عن فصل 68 مركباً من أوراق السيسبان المصنفة منهم ستيرويدات (1-6)، ترايثيربينويدات (7-22)، صابونيات (23-42)، فلافونويدات (43-55)، كومارين (56-58)، ومكونات دهنية (59-65) وغيرها من المكونات (66-68). كما تم إضافة الاستخدامات المختلفة لأوراق نبات السيسبان مثل الاستخدامات الزراعية والخصائص العلاجية والتي تشمل نشاطات متعددة كمضادات الأكسدة ومضادات الميكروبات والفيروسات والديدان ومضادات للقواقع ومضادة للخصوبة ومضادة

للالتهابات ومضادة لمرض السكري ومضادة لفرط لارتفاع نسبة الدهون بالدم ومضادة للسرطان ومساعدات للنوم وخصائص طاردة للبعوض. والهدف الأساسي من هذه المراجعة هو التركيز على كيمياء النبات وكيف يمكن أن تكون هذه المركبات المختلفة مسؤولة عن الأنشطة البيولوجية المختلفة.

الفصل الرابع

- أدت تجزئة مستخلص الإيثانول المائي لأوراق السبانخ النشط بيولوجيًا إلى فصل وتعريف سبعة عشر مركبًا معروفًا وهي مركبات الفلافونويدات والستيرويدات والكاروتينات والأحماض الدهنية والكحول والإستر. تم فصل المركبات (٢-٤ و ١٢) سابقاً من أوراق السبانخ بينما المركبات (١، ٣، ١٣-١٧) تم فصلهم لأول مرة من أوراق السبانخ.
- أسفر الفحص الفيتوكيميائي لمجزئ الهكسان من أوراق السبانخ النشط بيولوجيًا باستخدام جهاز GC / MS إلى التعرف على خمسة وعشرين مركبًا في الجزء القابل للتصنيف منها خمسة مكونات رئيسية وهي ميثيل بالميتات، - methyl (Z) hexadec-11-enoate، methyl oleate و methyl linoleate و methyl linolenate بالإضافة إلى اثني عشر مركبًا في الجزء الغير قابل للتصنيف منهم سبعة مكونات رئيسية وهي حمض البالمتيك، والفيتول، وحمض الأوليك، وحمض لينوليديك، وحمض اللينولينيك، وستيجماستيرونول وجاما سيتوستيرونول. بالإضافة إلى ذلك، تم فصل المركبات من الجزء الغير قابل للتصنيف باستخدام الطرق الكروماتوجرافية وهم اثني عشر مركبًا كالتالي:
Hexaprenol (1), Phytol (2), 18-[(1-oxohexadecyl) oxy]-9-octadecenoic acid (3), 24-methylenecycloartanol (4), (2E,6E)-3,7,11,15,19 pentamethylcosa-2,6-dien-1-ol (5), Palmitic acid (6), γ -sitosterol (7), Stigmasterol (8), 25,26-dihydroelasterol (9), 22,23-dihydrospinasterol (10), Spinasterol (11), Lutein (12).
- أسفر الفحص الفيتوكيميائي لمجزئ الإيثيل أسيتات لمجزئ من أوراق السبانخ النشط بيولوجيًا إلى فصل والتعرف على خمسة فلافونيدات وهم:
Isoswertisin 2"-O-xyloside (13), Vitexin 2"-O-xyloside (14), Margaritene (15), Vitexin-2"-O-Isorhamnetin 3-O- β -D-xylopyranosyl (1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside (17). rhamnoside (16)
- تم تقييم نشاط المركبات المفصولة كمضاد لخلايا سرطان الدم K562 في المختبر وأظهرت ثلاث مركبات نشاطًا ضعيفًا. أوضحت الدراسة البيولوجية أن المركبات (١، ٢، ٣) أظهرت نشاطًا ملحوظًا مضادًا للتكاثر ضد خلايا K562 ($IC_{50} = 44.89, 33.28, 70.58$) ميكروغرام / مل على التوالي.
- تم فحص المستقبلات النشطة بيولوجيًا بشكل أكبر في الدراسات الحاسوبية عن طريق الالتحام الجزيئي ضد العديد من الأهداف المتعلقة بخط الخلية K562 وقد أظهرت النتائج أن المركبات (١، ٢، ٣) أظهرت تقاربًا قويًا للارتباط تجاه topoisomerase (درجة الالتحام = ١٢.٥٠ و ٩.١٩ و ١٣.٢٩ كيلو كالوري / مول، على التوالي) وأظهرت أيضًا ارتباطًا قويًا تقارب تجاه Abl kinase (درجة الالتحام = ١١.٩١، ٩.٣٥ و ١٢.٥٩ Kcal / mol على التوالي). كشفت دراسة الديناميكيات الجزيئية أن المركب (٣) أنتج معقدات مستقرة مع كل من topoisomerase و Abl kinase بقيم RMSD تساوي 1.81 و ١.٨٥ Å على التوالي. بالإضافة إلى ذلك، أوضحت الدراسات السابقة النشاط المضاد لسرطان الدم للمكونات الرئيسية للجزء

القابل للتصبن لمجزي الهكسان وهي حمض linolenic و methyl oleate و methyl linolenate بسبب نشاطها ضد خلايا K562.

الفصل الخامس

تم تقديم مونوجرافات للنباتات المختارة وهي أوراق السيسبان و أوراق السبانخ وفقاً لإرشادات منظمة الصحة العالمية لدراسات النباتات الطبية و التي تضمنت التعريف والمرادفات والأسماء المحلية والوصف والمكونات النباتية ذات الأهمية (المظهر العام الطازج أو المجفف ، الخصائص الحسية ، الخصائص المجهرية لمسحوق النبات) ، التوزيع الجغرافي ، اختبارات الهوية العامة ، اختبارات النقاء (علم الأحياء الدقيقة ، الرماد الكلي ، الرماد غير القابل للذوبان في الأحماض ، المستخلص القابل للذوبان في الماء ، المستخلص القابل للذوبان في الكحول ، بقايا المبيدات الحشرية ، المعادن الثقيلة ، المخلفات المشعة ، واختبارات النقاء الأخرى) ، الكيمائية المقاييسات ، والمكونات الكيميائية الرئيسية ، وأشكال الجرعات ، والاستخدامات الطبية (الاستخدامات الموصوفة في دستور الأدوية والأنظمة التقليدية للطب ، والاستخدامات الموصوفة في الطب الشعبي ، غير المدعومة بالبيانات التجريبية أو السريرية) ، وعلم الأدوية التجريبي وعلم الأدوية الإكلينيكي ، وموانع الاستعمال ، التحذيرات والاحتياطات و التفاعلات المضادة و الجرعات.