تأثير مستخلص بذور الحلبة في خلايا وانزيمات الكبد في ذكور الفئران البيض

هديل محمد قاسم
قسم علوم الحياة ، كلية العلوم ، الجامعة المستنصرية . بغداد- العراق

الخلاصة

تتضمن الدراسة الحالية دراسة تأثير مستخلص بذور الحلبة Fenugreek لقياس الفعالية النوعية للانزيمات في خلايا الكبد للفأر الابيض ,Glutamic Oxaloacetic Transaminase (GOT) Glutamic Pyruvic Transfaminase (GPT), Alkaline Phosphatase (ALP) استخدم في البحث ٢٠ فأرا من الذكور قسمت الى مجموعتين متساويتين، جرعت المجموعة الاولى بمحلول مستخلص بذور الحلبة بجرعة مقدارها (١٥٠ ملغم / كغم من وزن الجسم) لمدة ٢١ يوماً والمجموعة الثانية وهي مجموعة السيطرة جرعت بالمحلول الملحي الفسيولوجي (Normal Saline) جرعة مقدارها (٠.١ ملغم / كغم من وزن الجسم) وتم بعد انتهاء التجربة قتل وتشريح الحيوانات وبعدها تم استئصال الكبد ووضعه في محلول الحفظ (الفورمالين) لغرض الدراسة النسيجية لخلايا الكبد والقسم الاخر من مجانس خلايا الكبد تم حفظه في انابيب حاوية على المحلول الملحي المتعادل بتركيز ٠.٩ % ووضعت الانابيب في المجمده في درجة حراره (-٢٠) م ° لحين الاستعمال من اجل قياس الفعاليه النوعية للانزيمات الكبدية (GOT) و (GPT) و (ALT) وان هذه الانزيمات لا تتلف في التجميد، في حين ان هناك بعض الانزيمات تتلف في التجميد. **وقد اظهرت النتائج مايلي** :- حصول انخفاض ولكن غير معنوي في قيم الانزيمات (GPT , GOT ALP) , عند المقارنة مع مجموعة السيطرة. أما نتائج الدراسة النسيجية فقد اظهرت النتائج التي اجريت بواسطة الفحص المجهري بالمجهر الضوئي ان الخلايا الكبدية قد احتفظت بشكلها الاعتيادي دون حدوث اي تغيير عند المقارنة مع شكل الخلايا في مجموعة السيطرة.

EFFECT OF FENUGREEK SEEDS EXTRACT ON LIVER CELLS AND ENZYMES OF ALBINO MALE

Hadeel M. Kassim
Department of Biology , College of Sciences , University of Al-mustansirya. Baghdad - Iraq

Abstract

The present study included the studies the effect of Fenugreek extract seeds on Glutamic oxaloacetic transminase (GOT), Glutamic pyruvic transminase (GPT) and Alkaline phosphatase (ALP) on liver cell of male albino mice. Group (1) of mice were administrated orally with fenugreek solution at a concentrated of (150 mg/kg of body weight) for 21 days for control treatment 10 mice was administrated with normal saline solution at adose of 0.1 mg/kg of body weight. At end animals were killed and their liver were removed and kept in formaline solution to histological study and another part of liver kept in 0.9% saline solution to measure specific activity of liver enzymes and tissue study. **The result**: indicated no significant reduction in liver enzyme (GOT, GPT, ALP) and no change in tissue of liver only few that there is used light microscopic during histological study.

المقدمة

يعد الكبد احد الغدد المهمة في الجسم وذات اهمية كبيرة حيث له الدور الكبير في القيام بوظائف متعددة منها طرح الفضلات خارج الجسم عن طريق الجلد والجهاز البولي عبر الدم وكذلك تكوين املاح الصفراء والتي تساعد على هضم الدهون وتخزين الكلايكوجين والفيتامينات[1]. ويقوم الكبد بانتاج وتكوين انزيمات وهي Glutamate Oxaloacetate (GOT) Transaminase وان هذا الانزيم يوجد في كل من القلب والكلى والعضلات ويتحرر هذا الانزيم من الخلايا في حالة تحطمها لذا نرى تركيزه يزداد في مصل الدم عند الاصابة بالتهابات الكبد بالاضافة الى سرطان الدم الحاد واحشاء الرئة [2]. وايضا يوجد انزيم اخر يفرز من الكبد يعرف بالانزيم الناقل لمجموعة الامين الذي يعرف باسم Glutamate (GPT) Pyruvate Transminase وان هذا الانزيم تختلف نسبته من كائن لاخر ومن نسيج لاخر [3]. وايضا يوجد في الكبد انزيم اخر يسمى Alkaline Phosphate (ALP) ويوجد هذا الانزيم في انسجة الجسم وبمستويات مختلفة ويتواجد بتراكيز عالية في خلايا جران الامعاء والانابيب الكلوية وان وظيفته هي مساعدة خلايا الامعاء على الامتصاص ونقل الفسفور الاعضوي ويرتفع مستوى هذا الانزيم في امراض السكري والامراض الكبدية مثل التهاب الكبد الفيروسي والانسرادات الكبدية[4]. وفي الاونة الاخيرة تم التوجه الى استعمال الاعشاب والتداوي بالاعشاب بدلا من العلاج بمواد كيمياوية معينة ولكن هناك بعض المحاذير التي يجب الانتباه عليها عن استخدام الموا العشبية وفي هذا البحث تم تسليط الضوء على عشب الحلبة واسمه العلمي Trigonella Foenum وان الموطن الاصلي لهذا الجنس هو الجزء الشمالي لقارة افريقيا او قارة استراليا باكملها [5]. ويعو هذا الجنس للفصيلة البقولية Fabaleae التي تتميز بانها عشبية وحولية[6] .وتستعمل الحلبة بشكل واسع على شكل كمادات او لصوق خارجية وكذلك اكتشفوا اطباء الاعشاب الصينيون دورها الفاعل في علاج امراض الكلى والكبد[7] .وتحتوي الحلبة على السيترويدات الصابونية حيث وجد ان لها دور في تخفيض نسبة الكوليسترول في الدم وذلك من خلال تثبيط اليات تكوين الكوليسترول [8]. وايضاً توجد دراسات اجراها Aziz, M وآخرون [9] ان استخدام مستخلص بذور الحلبة واعطائها لذكور الفئران يساهم في الحفاظ على شكل النسيج الكبدي في الفئران في حال استخدام جرعات متوسطة من المحلول، وايضاً تؤدي هذه الطريقة في المحافظة على مستوى الانزيمات الكبدية (GOT), (GPT), (ALP) بالاضافة الى كمية الكولسترول المنتجة في مصل الدم. اما في حالة زيادة الجرعات وبقاء مدة التجربة مدة اطول سوف يؤدي الى حدوث وظهور تغيرات طفيفة في النسيج الكبدي.، هذه الدراسة جاءت مشابهة لما قام به Abdel-Barry و AL- Hakiem [10] حيث وجدوا من خلال استخدام مستخلص بذور الحلبة لاناث الفئران لايؤدي الى حدوث تغيرات نسيجية في مجانس خلايا الكبد. ان الهدف من الدراسة هو معرفة تأثير مستخلص بذور الحلبة لقياسي الفعالية النوعية للانزيمات من خلايا الكبد للفأر الابيض.

المواد وطرائق العمل

استخدمت في هذه الدراسة ٢٠ فأرا من سلالة الفئران (Albino) تم الحصول عليها من مركز الرقابة الدوائية، قسمت الفئران المختبرية الى مجموعتين، احتوت كل مجموعة على عشر حيوانات ووضعت كل مجموعة في قفص منفرد، وزودت بالماء والعليقة بشكل مستمر وبكميات كافية يوميا.

المحاليل المستخدمة

المحلول الملحي الفسيولوجي (normal saline) تمت اذابة ٠.٩ غم من NaCl النقي في ١٠٠ ملليتر من الماء المقطر .

محلول الحلبة

تم طحن حبوب الحلبة التي تم الحصول عليها من مركز الاعشاب في ساحه الاندلس واتبعت طريقة Gradelet وجماعته [11] .في الحصول على محلول الحلبة المائي، حيث تم اضافة ٥٠ غم من مسحوق الحلبة في لتر من الماء المقطر الدافئ للحصول على جرعة تركيزها ١٥٠ ملغم/كغم من وزن الجسم.

محلول دارئ الفوسفات القاعدي (50m M)

حضر هذا المحلول بإذابة ٨.٧ غرام من فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين المائية و٩.٨ غرام من فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين المائية في ١٠٠٠ مل من الماء

المقطر المعقم وثبت الاس الهيدروجيني عند pH=8 وحفظت في الثلاجة في ٤ م ° الى حين الاستعمال.

مجاميع الحيوانات المعاملة مختبريا

المجموعة الاولى

وهي مجموعة السيطرة، فقد تم معاملتها بإعطائها المحلول الفسيولوجي عن طريق الفم وبجرعة مقدارها ٠.١ ملغم/ كغم من وزن الجسم واعطيت مرتين باليوم ولمدة ٢١ يوماً.

المجموعة الثانية

تمت معاملتها بإعطائها محلول الحلبة المحضر عن طريق الفم مرتين في اليوم بفارق اربع ساعات بجرعة مقدارها ١٥٠ ملغم/كغم من وزن الجسم ولمدة ٢١ يوماً.

المؤشرات الانزيمية

بعد تشريح الفئران تم استخراج الكبد وحفظه في انابيب حاوية على المحلول الملحي المتعادل بتركيز ٠.٩% ووضعت الانابيب في المجمدة في درجة حرارة -٢٠م° لحين الاستعمال. تم مجانسة الكبد باستخدام المجانس الزجاجي Glass Homogenizer واجريت هذه العملية والعمليات التالية في وسط بارد باستخدام كمية من الثلج للحيلولة دون تلف الانزيمات، وذلك باستخدام محلول منظم (50m M) ذي pH= 8 وبنسبة ١:٣ (وزن/ حجم) استمرت عملية المجانسة الى ان اصبح مزيجاً متجانساً بعد ذلك تم نقل المجانس النسيجي الى جهاز الطرد المركزي المبرد من نوع (MSE) Chilspin2 ونبذ بسرعة (٣٧٠٠) دورة / دقيقة ولمدة ٢.٥ دقيقة وعند درجة حرارة (صفر)، كررت هذه العملية ثلاث دورات وفي كل مره يهمل الراشح ويؤخذ الراسب وبعدها اضيف الى الراسب (١) مل من محلول دارئ الفوسفات ونقل الى جهاز الطرد المركزي ونبذ بسرعة (١٥٠٠٠) دورة / دقيقة لمدة (١٠) دقائق ثم اخذ الراشح ووضع في انابيب خاصة وحفظ في المجمدة بدرجة حرارة - ٢٠ م° لحين استعماله في قيلس فعالية الانزيمات.

تقدير فعالية انزيم GOT

تم تقدير فعالية انزيم ال GOT بوحدات (U/L) في مجانس خلايا الكبد بإستخدام الطريقة اللونية Colorimetric method باستخدام عدة Kit جاهزة من شركة Randox البريطانية ووفقا لطريقة Reitman,S. and Frankel, A.S وذلك بحساب كمية oxaloacetate المتحررة من المادة الاساس وعلى وفق المعادلة الاتية :-

$$\alpha-oxoglutarate + L-asparatate \xrightarrow{GOT} L-glutamate + oxaloacetate$$

تم قراءة طيف الامتصاص عند الطول الموجي ٥٤٦ نانوميتر بإستخدام جهاز المطياف نوع (speclronic-20) يتم حساب فعالية الانزيم من المعادلة الاتية :-

فعالية انزيم GOT= امتصاصية النموذج-امتصاصية السيطرة ومن ثم تسقط الامتصاصية على قيم منحنى القياس للانزيم المذكورة في العدة لغرض حساب فعالية الانزيم بـ(U/L) وحدة دولية / لتر.

تقدير فعالية انزيم GPT

تم تقدير هذا الانزيم في مجانس خلايا الكبد بإستخدام الطريقة اللونية، وذلك بإستخدام عدة جاهزة من انتاج شركة Randox البريطانية ووفقا لطريقة Reitman,S. and Frankel, A.S. [12] وذلك بحساب كمية pyruvate المتحررة من المادة الاساس وعلى وفق التفاعل الاتي :-

$$\alpha-oxoglutarate + L-alanine \xrightarrow{GPT} L-glutamte + pyruvate$$

تم قراءة طيف الامتصاص عند طول موجي ٥٤٦ نانوميتر بإستخدام جهاز مطياف نوع (spectromic -20)

تقدر فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي (ALP)

تم تقدير فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي في مجانس خلايا الكبد بإستخدام الطريقة اللونية باستخدام عدة جاهزة من انتاج شركة Bioreievx الفرنسية وطبقا لطريقة Kind وKing [13] وذلك بحساب كمية الفينول المتحررة من المادة الاساس وهي على وفق التفاعل الاتي:-

$$Phenyl\,\mathrm{phosphate} \xrightarrow[\mathrm{pH10}]{\mathrm{ALP}} \mathrm{phenyl} + \mathrm{phosphate}$$

وقراءة اللون عند طول موجي قدره ٥١٠ نانوميتر بإستخدام جهاز مطياف من نوع (spectomic -20) وتتم حساب فعالية الانزيم بنفس الطريقة التي تم بها حساب فعالية GOT. يتم حساب فعالية الانزيم من المعادلة الاتية :-

امتصاصية النموذج – امتصاصية الكفئ

فعالية الانزيم = ---------------------------------------× تركيز المحلول القياسي

امتصاصية المحلول القياسي

وقد كان تركيز المحلول القياسي هو ٢٠ وحدة لكل ١٠٠ مل أو ١٤٢ وحدة لكل لتر [14].

التحليل الاحصائي

تم تحليل البيانات وفق التصميم العشوائي الكامل Complete Random Designer (CRD) لدراسة تأثير المعاملات المختلفة في الصفات المدروسة، وقورنت الفروقات المعنوية بين المتوسطات بإختبار اقل فرق معنوي Least Significant Difference (L.S.D) اضافة الى استخدام T. test (T) واستعمال البرنامج Statistical Packages for Social Sciences (SPSS) في التحليل الاحصائي.

النتائج

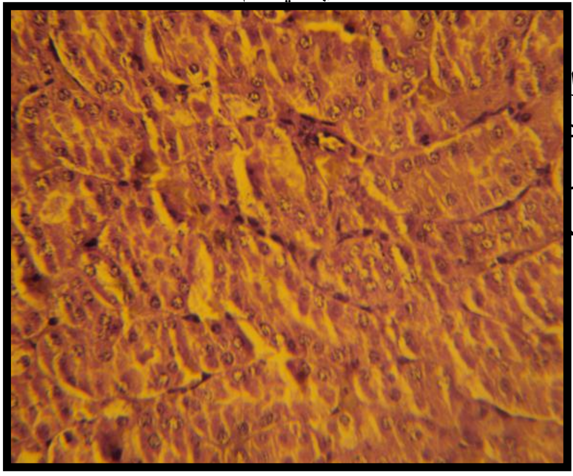
يوضح (الجدول ١) فعالية الانزيمات (GOT, GPT, ALP) في مجانس الكبد للحيوانات المعاملة وغير المعاملة بمستخلص بذور الحلبة، حيث تم استخدام (١٠) فئران معاملة و(١٠) فئران غير معاملة، وتم الحصول على النتائج الآتية:

جدول ١: تأثير مستخلص بذور الحلبة في الفعالية النوعية لبعض انزيمات خلايا الكبد

Treatment	Enzymes activity (U/L)		
	GOT (U / L)	GPT (U / L)	ALP (U / L)
Control	١٣ ± ١.٥٨	١٢.٢ ± ٠.٨٣	١٢٨.٦ ± ٣٧.٠٣
Seed extract	١٢.٤ ± ١.٨١	١٠.٣ ± ١.٠٣*	١١٣.٨ ± ٢٦.٤٠*

- انخفاض غير معنوي عند مستوى احتمالية ٠.٠٥

وقد وجد ان محلول مستخلص بذور الحلبة ادى الى حصول انخفاض طفيف ولكن غير معنوي في قيم كل من الانزيمات الثلاثة.



اما الدرا

احتفظت

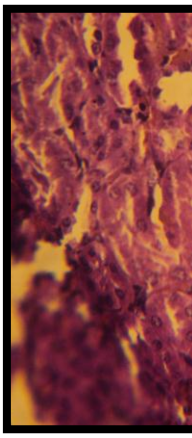
مع شكل

الفم الم

(١,٢

شكل (2) صورة الكبد لمجموعة السيطرة

(H&E 100 X)



شكل ١: صورة الكبد المعامل بمستخلص بذور الحلبة

(H&E 100 X)

المناقشة

تبين النتائج المدرجة في (الجدول 1) حدوث انخفاض طفيف غير معنوي في قيم كل من الانزيمات الكبدية (GOT, GPT, ALP) مما يدل على ان محلول مستخلص بذور الحلبة الذي تم استخدامه في التجربة لم يكن له تاثير سمي على

الخلايا الكبدية لذكور الفئران مما يدل ان الخلايا في النسيج الكبدي قد احتفظت بشكلها ولم يحدث اي تحلل heamolysis مما يعلل عدم ارتفاع نسبة الانزيمات (GOT, GPT, ALP) في مجانس خلايا الكبد عند اجراء الاختبار (الفحوصات الانزيمية). وان هذه النتيجة جاءت مطابقة لدراسة اجراها كل من Muralidhara وآخرون [15] التي اوضحوا فيها ان استخدام مستخلص بذور الحلبة المطحونة واعطائها لذكور الفئران والجرذان خلال فترة محددة لايؤثر في مستوى الانزيمات الكبدية وانما تبقى تقريبا بمستوى البروتينات والكولسترول في الجسم حتى وان ظهرت تغيرات ولكنها تكون طفيفه وغير مؤثرة. بينما نجد في بحوث اخرى نتائج مغايرة حيث وجد Bonnefoi وآخرون [16] حدوث ارتفاع معنوي في قيم الانزيمات الكبدية (ALP, GOT, GPT) وان سبب هذا الارتفاع هو امتلاك بعض الاعشاب بعض المواد السُميه والتي من الممكن ان تكون الحلبة من ضمن تلك الاعشاب او ربما عند استخدامها لفترات طويلة مما يؤدي الى ظهور آثار سمية على الخلايا الكبدية مما يزيد من نفاذية الاغشية لينتج عنها نضوج هذه الانزيمات وانزيمات اخرى الى مصل الدم. في حين وجد الجنابي [17]ان المركبات الفلافوندية المستخلصة من اعشاب اخرى مثل حبة البركة لا تملك تأثيرات انعكاسية في فعالية انزيمات الكبد في مجانس خلايا الكبد. وايضا في دراسة اجراها أمين وجماعته [18]وجد ان المواد الصابونية والسيترويدات الصابونية الموجودة في عشب الحلبة ليس لها تأثير سمي في الانزيمات الكبدية بحيث من شأن تلك المواد القابلية في الحفاظ على مستويات الكوليسترول في الدم بصورة منخفضة [19]. وقد اشار Basch وجماعته [20] ان استخدام مستخلص بذور الحلبة الكحولي واعطائها لذكور الجرذان وبجرعة (٢٠٠ ملغم/كغم من وزن الجسم) تساعد في المحافظة على موازنة نسب الانزيمات المضادة للاكسدة وبالتالي التقليل من سميتها في الجسم. ووجد كل من Abdel-Barry و AL-Hakiem [10]ان استخدام زيت الحلبة لاناث الفئران والجرذان لايكون له اي تأثير سمي تجاه خلايا الكبد وانزيماتها وهذه النتيجة مطابقة لما تم الحصول في التجربة الحالية، في الوقت الذي نجد فيه نفس النتيجة من حيث قيم الانزيمات الكبدية (GOT, GPT, ALP) وكذلك شكل الخلايا الكبدية الطبيعي [15].

الاستنتاج

من خلال النتائج التي تم الحصول عليها نستنتج ان محلول مستخلص بذور الحلبة المحضر من بذور الحلبة المطحونة ليس له اي تأثير سمي في نسيج الكبد والانزيمات المفرزه منه (GOT , GPT ,ALP) في ذكور الفئران البيض.

المصادر

١. الناجي، رمزي والصفدي، عصام ٢٠٠٥. علم وظائف الاعضاء. دار اليازوري العلمية للنشر والتوزيع (عمان) الطبعة العربيه ص ١٨٨-١٨٩.
2. Harold, A; Harper, P.H. **1971**; Review of physiology ical chemistry, 13thed.Maruzen Asian Edition.
3. Zilva, J.F. ; Pannall, P.R. and Mayne, D.M. **1988**. Clinical chemistry in Diagnosis and management Edward Arnold London. west Aftica the critical role of weaning. International. J. of Epidemiology.
4. Fandek, N. and Moreau, D. **1975**. Clinical laboratory test 2nd springhouse corporation, pp:35.
5. Brinker F. Herb contradictions and Drug Interactions. sandy, OR Electric Medical publications. **1998**; 70–1.
6. Sharma RD, Sarkar DK, Hazar B, et al. Hypolipidaemic effect of fenugreek seeds. Achronic study in non–insulin dependent diabetic patients phytother. Res **1996**; **10**:332-334.
7. Prasanna M. Hypolipidemic effect of fenugreek. A clinical study Indian J phramcol **2000**; **32**:34-6.
8. Sauvaire Y; Ribes G; Baccou JC Loubatieres Mariani MM. Implication of steroid saponins and sapogenins in the hypocholestrolemic effect of fenugreek Lipids (**1991**); **26**:191-7.
9. Aziz, M. Hassan, Wagdy, K. B. Khalil, Kawakab A. Ahmed. (**2006**). Genetic and histopathology studies on mice: effect of fenugreek oil on the efficiency of ovarin and liver tissues. African Journal of Biotechnology. Vol. **5**(5), pp. 477-483, 1 March **2006**.
10. Abdel–Barry JA, AL-Hakiem MH **(2000**). Acute intraperitoneal and oral toxicity of the leaf glycosidic extract of trigonella foenumgraecum in mice. J. Ethnopharmacol. Apr. **70** (1):65–68.
11. Gradelet, S.; Bon, A.; Berges, R.; Suschetet, M. and Astorg, P. **1998**.

Dietary carotenoids inhibit Aflatoxin BL, African J. Biotech (**2**): 46-49.

12. Reitman, S. and Frankel, A. S. (**1957**). A. colorimetic method for the determination of serum glutamic oxalo acetate and glutamic pyruvic transamines. Amer. J. Clin path-**28**:56-58.
13. Kind, P.R. N. and King, E.J.**1954** Estimation of plasma phosphates by determination of hydrolysed phenol with amino pyrines. J. CTH. path **7**:322-3.26.

١٤. الطائي. شذى علي شفيق. (**٢٠٠٥**). تأثير فلافونويدات بعض انواع نباتية في الفعل التطفيري لعقار الميثوثركسيت MTX وسم افلا B1. اطروحة دكتوراه. قسم علوم الحياة. كلية العلوم،الجامعة المستنصرية. بغداد، العراق. ص ٧٥.

15. Muralidhara; Narasimhamurthy, K; Viswanatha, Ramesh,. B.S.(**1999**) Acute and Subchronic toxicity assessment of debitterized fenugreek powder in the mouse and Rat. Food- chem. -Toxicol. Department of Biochemistry & Nutrition, central Food Technological Research in statute, My sore, India. **1999** Aug; **37**(8): 831–838.
16. Bonnefoi, M.; Hasim, M.; Sauvagnac, P.; Burgat, V. and Braun, J. P. **1989**. Liver enzyme changes in a Guinea–pig modle of Facial cenzema (sporidesmiotoxicosis) Enzyme, **42**:39-46.

١٧. الجنابي، سندس جميل. **١٩٩٨**. تأثير بعض المواد الحافظه للاغذية في نمو الفطر Aspergillus flavus link ex Fries وانتاجه للافلاتوكسين في الطحين. رسالة ماجستير / كلية التربية ابن الهيثم – جامعة بغداد.

18. Amin A, Alkaabi A, AL- Falasi S, Daoud SA(**2005**). Chemopreventive activities of Trigonella foenum graecum (Fenugreek) against breast cancer. cell Biol International **29**:687–694.
19. Raghuram TC, Sharma RD, Sivakumar SH, Sahay, BK (**1994**). Effect of Fenugreek seeds on intravenous glucose disposition in non–insulin dependent diabetic patients. phytother. Res. **8**:83–86.
20. Basch E, Ulbricht C, Kuo G, Szapary P, smith M (**2003**). Therapeutic applications of Fenugreek, Alternative Med. Rev. **8**:20–27.