

Effect of Quinoa Seeds on Enzymatic and Non-Enzymatic Antioxidants in Serum of Stressful Local Rabbits by Hydrogen Peroxide

*Raghdan H. Mohsin, *Amera K. Nasser, and **Jwad K. Al-Abadi

*Animal Production department, Agriculture College, University of Basra, Iraq

**Medical Technical College, University of Southern Technical, University of Basra

Corresponding author E-Mail: Alhusseiny77@yahoo.com

Abstract: The present study aimed to determine the content of the quinoa seed extract from the active substances. The study also included the effect of powder and extract of quinoa seeds on the enzymatic and non-enzymatic antioxidants in the serum of local rabbit which is stressed by hydrogen peroxide. The level of Malondialdehyde in the serum of the rabbit was also measured. The results of the study showed that the quinoa extract contains phenols, alkaloids, glucosides, flavonoids, resins and tannins. The local rabbit dosage with the extract of quinoa seeds or powder resulted in higher levels of the efficacy of Glutathione Peroxidase, Catalysis and Glutathione compared to the control group, which decreased levels of hydrogen peroxide. There was also a significant increase in the concentration of Malondialdehyde for the group of stressful rabbits and its decreased significantly when feeding on quinoa powder or extract.

Keywords: Quinoa, enzymatic antioxidant, non-enzymatic antioxidant , serum stress, rabbit, hydrogen peroxides

تأثير بذور الكينوا على مضادات الانزيمية واللانزيمية في مصل دم الارانب المحلية المجهدة بفعل بيروكسيد الهيدروجين

*رغدان هاشم محسن الشرع و*اميره كاظم ناصر و** جواد كاظم مهدي

قسم الانتاج الحيواني - كلية الزراعة، جامعة البصرة

**الكلية الطبية التقنية- جامعة البصرة - جمهورية العراق

المستخلص

هدفت الدراسة الحالية الى معرفة محتوى مستخلص بذور الكينوا على المواد الفعالة ودراسة تأثير مسحوق ومستخلص بذور الكينوا على مضادات الانزيمية واللانزيمية في مصل دم الارانب المحلية المجهدة بفعل بيروكسيد الهيدروجين مع قياس مستوى المالون ثانى الالديهايد في مصل دم الارانب. اوضحت نتائج الدراسة احتواء المستخلص الكحولي لبذور الكينوا على الفينولات والقلويات والكلايكوسيدات و الفلافونيدات والراتنجات والثانينات. كما اوضحت نتائج التجربة ان تجريب الارانب المحلية بالمستخلص الكحولي لبذور الكينوا ومسحوقة ادى الى ارتفاع مستويات فعالية انزيم كلوتاثيون بيروكسيديز وانزيم الكاتلizer والكلوتاثيون مقارنة بمجموعة السيطرة التي انخفضت فيها مستوياتها بفعل بيروكسيد الهيدروجين. وكذلك لوحظ ارتفاع معنوي في تركيز المالون الديهايد لمجموعة الارانب المجهدة وانخفاض مستوى مسحوقها معنويًا عند التغذية على مسحوق ومستخلص بذور الكينوا.

المقدمة

لقد تطور علم التغذية البشرية تطوراً كبيراً وسريعاً خلال العقدين الأخيرين من القرن الماضي مرافقاً للتطور والتقدم العلمي الحاصل في المجالات كافة، إذ ان الأمور الجديدة المستحدثة في التغذية ، هي دراسة تأثير بعض المواد الموجودة بشكل طبيعي في الغذاء لما لها من فوائد فسليجة تحد او تخفض من مخاطر الاصابة بالأمراض المزمنة ، وهذه ، المواد يطلق عليها مضادات الأكسدة (Khalaf et al., 2008) .

وتنصف مضادات الأكسدة بقدرتها وقابليتها على أن تتأكسد ولذلك تساهم في إيقاف سلسلة التفاعلات الناتجة عن الجذور الحرة وبالتالي تساهم في الحد من انتشار وزيادة استمرار بعض الأمراض، حيث تعمل على خفض الاضرار التاكسدية على مستوى الخلايا والجزئيات الحيوية التي تسببها الانواع الاوكسجينية Reactive Oxygen Species (ROS) والنتروجينية Reactive Nitrogen Species (RNS) ، فقد وجد ان ROS و RNS تساهم في التخريب التاكسدي مسببة بذلك ظهور او استمرار العديد من الامراض عند الانسان (Valko et al., 2007) .

ونظراً لكون العديد من النباتات معروفة بانتاجها لمركبات ذات نشاط حيوي، حيث يعمل الكثير منها كمضادات للاكسدة او مضادات للبكتيريا فقد ركزت الكثير من الدراسات على اختبار هذه الفعالية، فقد اشارت الدراسات الحديثة الى دور النباتات الطبيعية كمضادات اكسدة بديل عن الادوية والمعالجات الكيميائية إذ احتل العلاج بالنباتات والأعشاب الطبية مكاناً وحيزاً كبيرين في علوم الطب والصيدلة اذ أصبح مصدراً امناً لصناعة الأدوية .

وتعد الكينوا مصدراً مهماً لمضادات الأكسدة التي تقاوم الجذور الحرة مما يجعلها فعالة في مواجهة علامات التقدم بالعمر والعديد من الامراض الاخرى بسبب احتوائها على المواد الفعالة ومضادات الاكسدة (Shirwaikar et al., 2004). ونظراً لقلة الدراسات المتوفرة عن دور الكينوا كمضاد اكسدة وتاثيرها على بعض المعايير الكيموحيوية هدفت الدراسة الى الكشف عن المواد الفعالة في بذور الكينوا ومعرفة تاثيرها في التقليل من تأثير الإجهاد التاكسدي في الارانب المحلية من خلال قياس فعالية مضادات الاكسدة الانزيمية واللانزيمية في مصل الدم .

المواد وطرق العمل

جمع النباتات وتحضير العينات

جمعت البذور قيد الدراسة من الاسواق المحلية كلا على حده ، وطحنت النماذج في المطحنة الكهربائية بشكل ناعم وغربت ثم وضعت في اكياس من البولي اثيلين معلمة وخزنـت بالثلاجة عند درجة حرارة 4°C لحين الاستخدام.

تحضير المستخلص الكحولي لبذور الكينوا

تم اعتماد طريقة الاستخلاص الكحولي وحسب طريقة Harbone (1973) في تحضير المستخلص النباتي إذ وزن 100 غم من مسحوق بذور الكينوا ، واضيف عليه 500 مل كحول اثيلي تركيز 98% ، مزج جيداً وترك لمدة 24 ساعة في درجة حرارة المختبر (25°C) بعدها رشح المستخلص باستعمال ورق ترشيح الراشح عند درجة حرارة 40°C ترك Rotary Vaccum Evaporator الراشح عند درجة حرارة الغرفة للتخلص من المذيب بشكل تام حتى حصل على مادة مركزـة شديدة الزوجـة ، زيد على كل 2 غم من هذه المادة 50 مل ماء مقطر لغرض عمل التراكـيز ووضـعت في قانـى معـتمـة محـكـمة الغـلق وـحـفـظـتـ فيـ الثـلاـجـةـ عـلـىـ درـجـةـ حرـارـةـ 4°C لـحـينـ الاستـعمـالـ.

الكشفـاتـ الاولـيةـ

تم اجراء الكـشـفـاتـ الكـيـمـيـائـيـةـ الاولـيـةـ عـلـىـ مـسـتـخلـصـ بـذـورـ الكـيـنـواـ الكـحـوليـ لـتـعـرـفـ عـلـىـ الـمـرـكـبـاتـ الـاـيـضـيـةـ الثـانـيـةـ وكـمـاـ يـأـتـيـ :-

كشف القلويدات والفينولات : حسب طريقة Harbone (1984)

كشف الفلافونويدات : تم الكشف عن الفلافونيدات حسب طريقة Al-Khazaraji (1991)

الكشف عن الكليكوسيدات: تم الكشف حسب طريقة سركيس والراوي (1980)

الكشف عن الراتنجات والتانينات: تم الكشف حسب طريقة Shihata, 1951)

الدراسة الكيموحيوية

أحداث الاجهاد التاكسدي

لغرض سحب كمية (10 سم³) من الدم وتم جمع الدم في أنابيب اختبار بلاستيكية Plain tubes ذات الاستخدام لمرة واحدة خالية من مانع التخثر ومن ثم فصل المصل بواسطة جهاز الطرد المركزي بسرعة 2500 دورة / دقيقة لمدة 15 دقيقة وقسم المصل الذي تم الحصول عليه الى اربعة اجزاء بأنابيب Eppendorf tube (لتجنُب عملية التذويب والتجميد المتكرر للعينة)، تم حفظ المصل بدرجة (-20 م°) لغرض إجراء الفحوصات الكيموحيوية التي اشتملت عليها الدراسة.

تقدير فعالية الكلوتاثيون بيروكسيديز في مصل الدم

قدرت الفعالية حسب الطريقة المذكورة في Odajima et al. (2010) وحسب المعادلة التالية

$$\Delta A / \text{min} = \frac{V_t}{V_s} - E$$

$$1000 \times \frac{V_t}{V_s} - E$$

$$V_t = \text{الحجم الكلي}$$

$$V_s = \text{حجم المصل}$$

$$50000 = E$$

الامتصاصية في الدقيقة 5 – الامتصاصية في الدقيقة 0

5

تقدير فعالية انزيم الكتاليز في مصل الدم

يتم تقدير فعالية انزيم الكتاليز وذلك بقياس النقصان في الامتصاصية نتيجة استهلاك المادة الأساسية بيروكسيد الهيدروجين وحسب طريقة Sedlak et al. (2001). ووفقاً للمعادلة التالية:

$$\text{Catalase k/ml} = \frac{V_t}{V_s} * \frac{2.3}{\Delta T} * \log \frac{A_1}{A_2}$$

*60

$A_1 = A$ at 15 Sec

$A_2 = A$ at 30 Sec

$V_t = \text{total volume.}$

$V_s = \text{sample volume}$

$\Delta T = 15 \text{ Sec}$

وبعد التعويض يمكن تبسيط المعادلة الى:

$$\text{Catalase k/ml} = 13.8 * \log \frac{A_1}{A_2}$$

استخدم في هذه الدراسة (40) حيوانا من إناث الارانب المحلية والمجهزة من (اسوق البصرة المحلية تراوحت اوزانها بين (1600-1650 كغم)، تم وضع الارانب في قواطع مغطاة باغطية مصنوعة من BRC. فرشت الارضية بالتين والذي كان يراعى استبداله كل يومين للفحاظ على نظافة الحظيرة والحيوانات. تراوحت درجة الحرارة في الحظيرة بين (20-25 م) وبظروف تهوية جيدة وفترة اضاءة 12 ساعة ضوء و 12 ساعة ظلام. اعطيت الحيوانات الماء الحاوي على بيروكسيد الهيدروجين بتركيز 0.5% وكانت الحيوانات تتغذى على العلقة الجاهزة (مجهزة من معمل العلف في كلية الزراعة – جامعة البصرة).

قسمت حيوانات التجربة وكالاتي:

المعاملة الاولى T1: معاملة السيطرة طبيعية

المعاملة الثانية T2: جرعت اسم³/كغم يوميا من الزيت النباتي وبدون اعطاء مستخلص او مسحوق بذور لكتينوا

المعاملة الثالثة T3: جرعت اسم³/كغم يوميا من الزيت النباتي مع اعطاء 0.1 غم مسحوق بذور الكينوا .

المعاملة الرابعة T4: جرعت اسم³/كغم يوميا من الزيت النباتي مع اعطاء 0.2 غم مسحوق بذور الكينوا .

المعاملة الخامسة T5: جرعت اسم³/كغم يوميا من الزيت النباتي مع اعطاء 0.4 غم مسحوق بذور الكينوا .

المعاملة السادسة T6 : جرعت اسم³/كغم يوميا من الزيت النباتي مع اعطاء 0.1 غم مستخلص بذور الكينوا .

المعاملة السابعة T7 : جرعت اسم³/كغم يوميا من الزيت النباتي مع اعطاء 0.2 غم مستخلص بذور الكينوا .

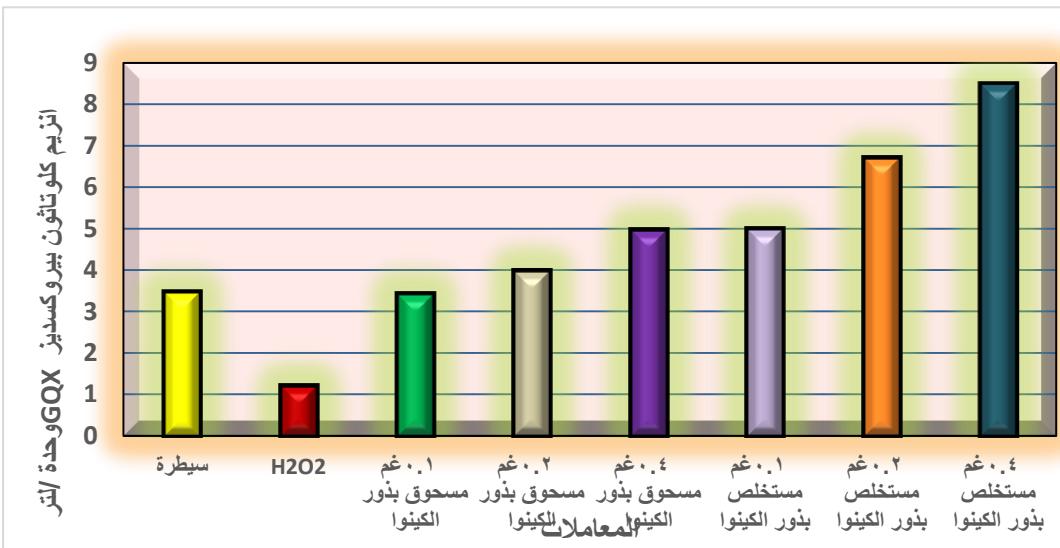
المعاملة الثامنة T8: جرعت اسم³/كغم يوميا من الزيت النباتي مع اعطاء 0.4 غم مستخلص بذور الكينوا .

الحصول على العينات الدموية

بعد مرور 24 ساعة على آخر جرعة، جُمعَت نماذج الدم من الحيوانات عن طريق طعنة في القلب وهي طريقة تم اعتمادها

النبات ومستخلصاته آلية مضادة للأكسدة أو أنها تعمل على تنشيط مضادات الأكسدة الانزيمية الكاسحة للجذور الحرة (Shirwaikar et al., 2004) ومن هذه المركبات الفعالة وكما اشارت نتائج الدراسة الحالية الفلافونيدات و الكلابيكوسيدات .

الجذور الحرة الناتجة عن H_2O_2 .. واما سبب ارتفاع مستوى الانزيم في دم الارانب بعد تجريعها بمسحوق ومستخلص بذور الكينوا فيعود الى قدرة المركبات الفعالة الموجودة في مسحوق بذور لكتينوا ومستخلصها في إزالة الجذور الحرة ، أو امتلاك بذور لكتينوا ومستخلصها في إزالة الجذور الحرة ، أو امتلاك

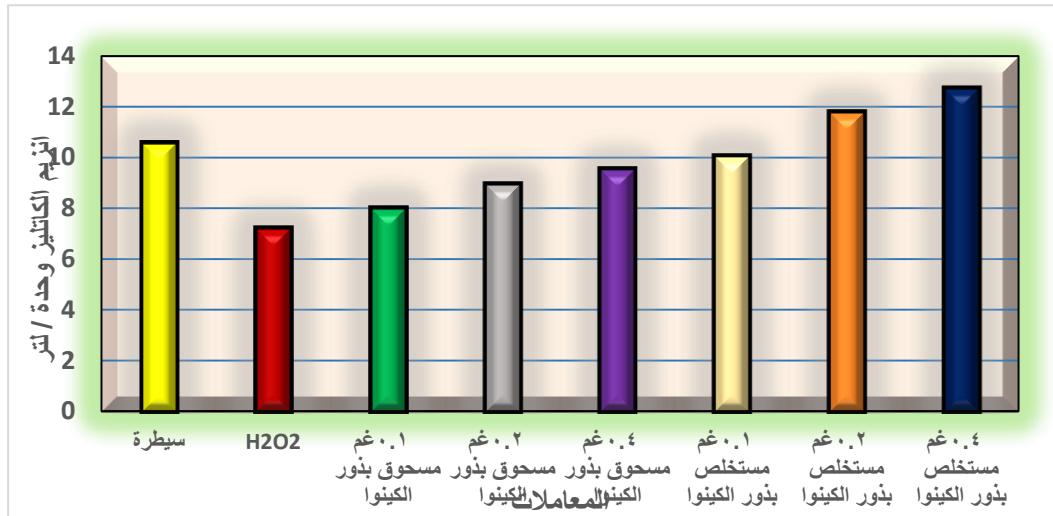


شكل (1). تأثير مسحوق بذور الكينوا ومستخلصها الكحولي في مستوى انزيم الكلوتاثيون ببروكسيدز في دم الارانب المصابة بالاجهاد التاكسدي

7.24 وحد/لتر وانخفاض متوسط فعالية الانزيم الى 10.26 وحد/لتر في الارانب المجهدة بفعل ببروكسيد الهيدروجين. وقد يعزى السبب في الانخفاض إلى زيادة أصناف الأوكسجين الفعالة ROS الناتجة من الإجهاد التاكسدي والتي أدت إلى الانخفاض في نشاط انزيم الكتاليز، إذ إنّ السبب الرئيس لانخفاض فعالية الكتاليز هي استهلاكه عن طريق المركبات المسببة للأكسدة التي تقوم بتحطيم غشاء الخلايا ومن أهمها: المالون تبائي الالديهيد الذي يتواجد بمستويات عالية في دم الارانب المعرضة للإجهاد التاكسدي لذلك وُجدت علاقة سلبية بين مستوى ومستوى فعالية الكتاليز انزيم

يُعد انزيم الكتاليز من الانزيمات واسعة الانتشار في الطبيعة وفي جميع الكائنات الهوائية التنفس وفي الخلايا التي تحتوي على الساينوكروم وظيفته الأساسية إزالة التأثيرات السمية لبروكسيد الهيدروجين من خلال إزاحة معقدات السموم في تفاعلات ببروكسيد الهيدروجين كما يعمل على إزالة الالكترونات التي تقود لإنتاج O_2^- (Alassadi and Abd-allah, 2008).

أظهرت نتائج الدراسة الحالية المبينة في الشكل (2) حدوث انخفاض معنوي ($P < 0.05$) في نشاط انزيم الكتاليز لإناث الأرانب البيض المعرضة للإجهاد التاكسدي المستحدث ببروكسيد الهيدروجين عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة السليمة، حيث بلغت متوسط فعالية الانزيم في الارانب السليمة الطبيعية



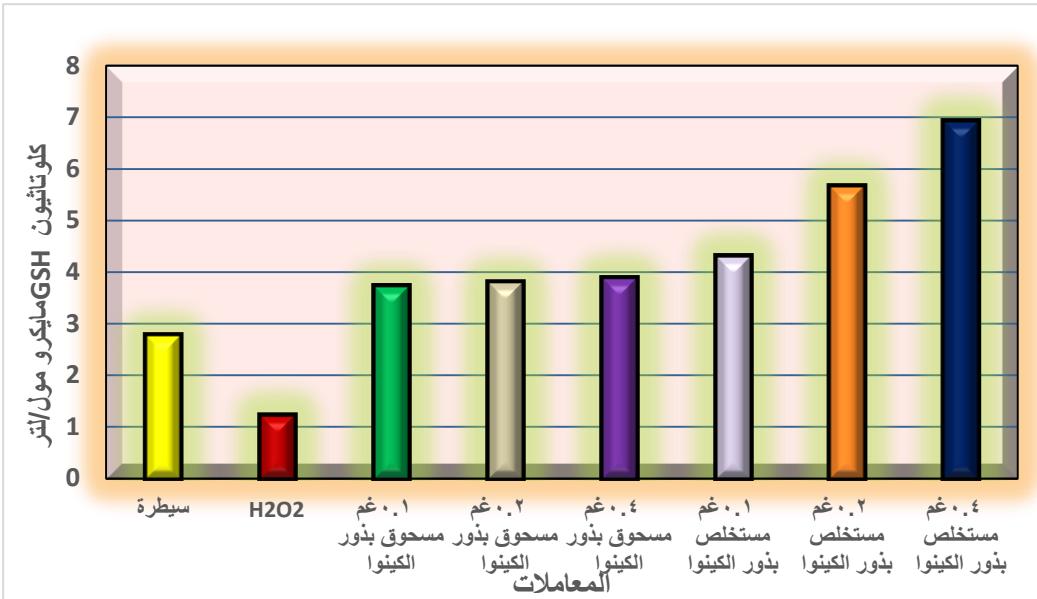
شكل (2). تأثير مسحوق بذور الکینوا ومستخلصها الكحولي في مستوى إنزيم الكاتاليز في مصل دم الارانب المعرضة للاجهاد التأكسي

الهيدروجين والتي بلغ متوسط تركيز الكلوتاثيون فيها 1.25 مايكرومول/لتر وارتفاع تركيز مستوى الكلوتاثيون معنوياً في المجاميع التي غذيت على مسحوق الکینوا بتركيز 0.1 و 0.2 و 0.4 غم/ كغم الى 3.75 و 3.82 و 3.91 مايكرومول/لتر على التوالي والمجاميع التي جرعت بمستخلص الکینوا الكحولي بتركيز 0.1 و 0.2 و 0.4 غم/كغم ارتفع الكلوتاثيون في دم افرادها ليصل الى متوسط 4.33 و 5.68 و 6.95 مايكرومول/لتر على التوالي وهو بهذا يكون قد تفوق على متوسط الكلوتاثيون في دم ارانب مجموعة السيطرة السليمة التي بلغ مستوى الكلوتاثيون في مصل دم افرادها 2.80 مايكرومول/لتر. واثبتت النتائج تفوق معنوي لمستخلص بذور الکینوا في رفع مستوى الكلوتاثيون في دم الارانب المجهدة مقارنة بمسحوق البذور. وقد يعزى انخفاض مستوى GSH في دم الارانب المعرضة للاجهاد التأكسي الى اسباب عده منها زيادة معدل استهلاك GSH الذي يعد من أهم مضادات الأكسدة غير الانزيمية في إزالة الجذور الحرة ونواتجها اذ يتحول من الشكل الفعال إلى الشكل غير الفعال ثانوي الكبريت Glutathione disulfide او قد يعود السبب في انخفاض GSH إلى قلة الشهية لدى المصابين مما يؤدي إلى انخفاض في مستويات مضادات الأكسدة الغذائية وهو ما لوحظ في الجرذان المعاملة ببيروكسيد الهيدروجين التي كانت تتوقف عن الاكل احياناً لربما بسبب قلة الشهية .

في حين أظهرت نتائج المجموعة المعاملة بالمستخلص الكحولي لبذور الکینوا ارتفاعاً معنوياً في نشاط إنزيم الكاتاليز CAT بالمقارنة مع المجموعة السليمة والارانب المعرضة للاجهاد التأكسي ببيروكسيد الهيدروجين عند اعطائها مسحوق بذور الکینوا بتركيز 0.1 و 0.2 و 0.4 ملغم/كغم الى 8.02 و 8.97 و 9.56 وحدة/لتر على التوالي وكان الارتفاع معنويًا ومتوفقاً على مجموعة السيطرة الطبيعية والمجاميع الأخرى عند تجريب الارانب المستخلص الكحولي لبذور الکینوا ووصل الى أعلى مستوى له 12.75 وحدة/لتر عند التركيز 0.4 ملغم/كغم ، وقد يعزى السبب في ارتفاع نشاط إنزيم الكاتاليز للدور الفعال للمركيبات النشطة المضادة للأكسدة التي يمتلكها نبات الکینوا كما يمكن أن يعزى السبب إلى الدور الحيوي لإنزيم الكاتاليز في إزالة جزيئات بيروكسيد الهيدروجين المتكون أثناء العمليات الحيوية وتحويله إلى ماء (Zamocky and Koller., 1999).

الكلوتاثيون

توضح نتائج الشكل (3) تركيز الكلوتاثيون في امصال دم اناث الارانب المحلية المعرضة للاجهاد التأكسي والذي يلاحظ فيه ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في تركيز الكلوتاثيون في المجاميع التي غذيت على بذور الکینوا والمجرعة بمستخلصها مقارنة بالارانب التي تعرضت للاجهاد التأكسي بفعل بيروكسيد

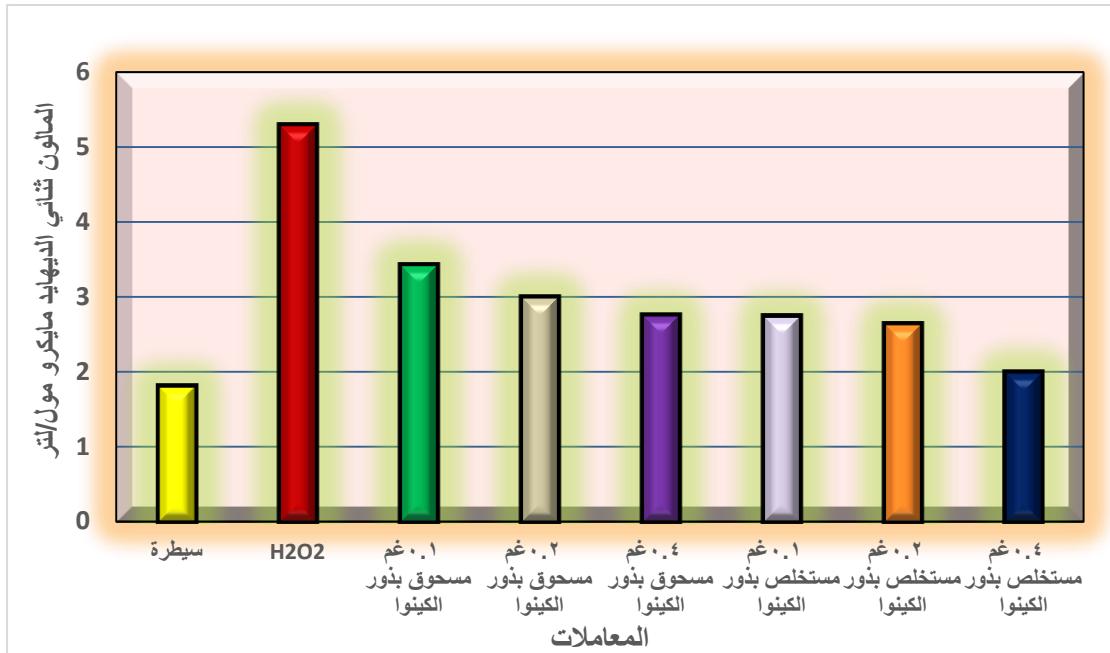


شكل (3). تأثير مسحوق بذور الکینوا ومستخلصها الكحولي في مستوى الكلوتاينيون في الارانب المصابة بالاجهاد التاكسدي

اقربت القيم من عينة السيطرة غير المجهدة والتي بلغ متوسط المالونالديهايد فيها 1.8 مايكرومول/لتر ويلاحظ من نتائج الشكل ايضا ان المستخلص الكحولي لبذور الکینوا تفوق في خفض كمية المالونالديهايد في دم الارانب المجهدة مقارنة بمسحوق بذور الکینوا . وقد يعزى سبب الانخفاض في تركيز MDA إلى فعالية المركبات الفينولية المتعددة والفلافونيدات في المستخلص الكحولي لبذور الکینوا والتي تثبيط تفاعلات تكوين الجذور الحرة و تعمل على إزالتها وهي تعمل على زيادة نشاط الإنزيمات الكبدية المضادة للأكسدة مثل الكتاليز Catalase، سوبرأوكسайд دسميوتيز(SOD) وكلوتاينيون بيروكسيديز(Gpx) التي تعمل جميعاً على تثبيط أكسدة وبيروكسيدة الدهون وبالتالي تمنع إنتاج المالونالديهايد (Mehmet et al.,2008).

تركيز المالون ثانوي الالديهايد

توضح نتائج الشكل (4) انخفاض معنوي ($P<0.05$) في مستوى الملون الديهايد عند تجريب ذكور الارانب مسحوق ومستخلص بذور الکینوا مقارنة بالارانب المجهدة حيث بلغ متوسط MD 5.30 في مصل الارانب المجهدة وغير مجرعة بمسحوق ومستخلص الکینوا وانخفاض معنويا الى 3.44 و 3.00 و 2.70 مايكرومول/لتر عند اعطاء الارانب مسحوق الکینوا بمستوى 0.1 و 0.2 و 0.4 غ/كغم على التوالي و عند تجريب الارانب المستخلص الكحولي لبذور الکینوا كان الانخفاض معنويا ($P<0.05$) في مستوى المالونالديهايد في دم الارانب اذ بلغت المتوسطات 2.75 و 2.65 و 2.00 للتركيز المذكورة على التوالي. و يتضح من النتائج ان هذا الانخفاض كان واضحا حيث



شكل (4). تأثير مسحوق بذور الكينوا على مستخلصها الكحولي في مستوى المالونالديهايد في مصل دم الارانب المعرضة لللاجهاه التاكسدي.

المصادر

- سركيس ، جورج يوناثان و الراوي، جاسم محمد علي و كاطع ،
جاسم محمد (1980). التشخيص النظامي للمركيبات
العضوية، مطبعة جامعة بغداد.
- Khalaf, N.A., Shakya, A.K.; Al-Othman, A., El-Agbar, Z., and Farah, H., 2008. Antioxidant activity of some common plantes. *Turk. J. Biol.*, 32, p. 51-55.
- Mehmet, E.Z., Mehmet,O., and Mehmet, T., 2008. "Effect of *Lawsonia inermis* treatment on mice with sarcoma". *African Journal of Biotechnology*. 7(16), pp. 2781-2786.
- Odajima, N., Betsuyaku, T., Nagai, K., Moriyama, C., Wang, D.H., Takigawa, T., Ogino, K., and Nishimura, M., 2010. The role of catalase in pulmonary fibrosis. *Respir Res*. 11, p. 183.
- Sedlak, J. and Lindsay, R.H., 2001. "Analytical biochemistry" 1968 p.192 . cited by Al-Zamely(2001).
- Al-Zamely, O.M., Al-Nimer, M.S. and Muslih, R.K., Detection the level of peroxynitrite and related with antioxidants status in the serum of patient with acute myocardial infraction . *Natl. J. Chem.*, 4, p. 625-637.
- Guidet, P. and Shah, S., 1989. The level of Malondialdehyde after activation with H₂O₂ and CuSO₄ and inhibition by defroxamine and molsidomine in the serum of patient with acute microcrdial infraction. *National J. Chem.*, 5, p. 139-148.
- Harbone, J.B., 1984. Phytochemical method second Edition, Chapman, Hall, New York.

- Shihata, I.M., 1951. A pharmacological study of *Anagallis arvensis* M. D. Vet. Thesis .Cairo University.
- Shirwaikar, A., Rajendran, K., and Kumar, D., 2004. "Antidiabetic activity of aqueous leaf extract of *Annona squamosa* in streptozotocin nicotin amide type-2 diabetic rats". *J.Ethnopharm*,91, p. 171-175.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M. and Telser J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and humandisease. *Int JBiochem Cell Biol.* 39, p. 44-84.