Kufa Journal for Veterinary Medical Sciences Vol.5 No.1 (2014) 43-54

Kufa Journal for Veterinary Medical Sciences
www.vet.kufauniv.com

دراسة نسجية مقارنة للتأثير الحامي للكبد بين الكويرسيتين ومستخلص الحلبة في ذكور الجرذان المسممة برباعي كلوريد الكاربون

نور حسون القرةغولي* سحر محمود الجمالي**
محمد داخل الركابي***

* كلية التربية للبنات، جامعة الكوفة
** كلية التربية للبنات، جامعة الكوفة
*** كلية الصيدلة، جامعة الكوفة

الخلاصة:

يعد الكبد العضو الرئيسي المسؤول عن إزالة السموم في الجسم، مما يجعله الاول في مواجهة مختلف المواد الكيميائية الداخلة للجسم من الجهاز الهضمي، وبحسب هذا صممت الدراسة الحالية لمقارنة التأثير الحامي للكويرسيتين ومستخلص الحلبة على الانسجة الكبدية لذكور الجرذان المسممة برباعي كلوريد الكاربون ومعرفة تأثيرهما اذا ماأستعمالا سوية. وأجريت هذه الدراسة في كلية الصيدلة – جامعة الكوفة، وتضمنت أستعمال 35 جرذا من نوع Sprague-Dawley قسمت الى خمس مجاميع : مجموعة السيطرة ومجموعة السيطرة الموجبة والمجموعة المعاملة بالمستخلص والمجموعة المعاملة بالكويرسيتين والمجموعة المعاملة بالمستخلص والكويرسيتين معا. وأستمرت مدة التجريع 7 ايام وفي اليوم الثامن سممت برباعي كلوريد الكاربون وتم قتل الحيوانات بعد مرور 24 ساعة. وأستمرت الدراسة من شهر نيسان – 2013 حتى شهر تموز – 2013 .

تم قياس مستوى الجلوتاثايون والمالونديالدهيد في المتجانس الكبدي. وقد أظهرت نتائج الدراسة: عدم وجود فرق معنوي ($P>0.05$) في مستوى الجلوتاثايون، وارتفاع معنوي ($P<0.05$) في مستوى المالونديالدهيد لدى المجاميع المعاملة مقارنة بمجموعة السيطرة. ودلت النتائج أيضا على وجود ارتفاع وانخفاض معنوي ($P<0.05$) في مستويات الجلوتاثايون والمالونديالدهيد على التتالي لدى الحيوانات المعاملة مقارنة بمجموعة السيطرة الموجبة. كما أوضحت الدراسة الحالية حصول العديد من التغيرات النسجية بتأثير الحقن برباعي كلوريد الكاربون. وفيما يتعلق بمقاطع الانسجة المأخوذة من المجاميع المعاملة : بالمستخلص والكويرسيتين والمعاملة بكليهما معا، فقد أظهرت فعلا حاميا لبذور الحلبة وعقار الكويرسيتين على الانسجة الكبدية المعرضة للتسمم وظهر التأثير الافضل في الحماية لدى المجموعة المعاملة بالمستخلص والكويرسيتين معا.

ونستنتج من الدراسة الحالية أن مستخلص بذور الحلبة والكويرسيتين قد أظهرا تأثيرا وقائيا في حماية الكبد ضد التسمم برباعي كلوريد الكاربون من خلال زيادة مستوى الجلوتاثايون وانخفاض مستوى المالونديالدهيد في المتجانس الكبدي. ونستنتج أيضا أن أستعمال مستخلص بذور الحلبة والكويرسيتين معا أدى الى حماية مضاعفة للانسجة الكبدية عالية الكفاءة نتيجة للتأثير الايجابي الناتج عند أستعمالهما سوية.

الكلمات المفتاحية: نسيج الكبد، الكويرسيتين، نبات الحلبة

Comparative histological study between the hepatoprotective effect of Quercetin and Trigonella fenum graecum extract in carbon tetrachloride induced hepatotoxicity at male rats

Noor Hassoon Al-Qaraghuli* Saher Mahmood Al-Jammali**
Mohammed Dakhil Al-Rekabi***

*College of Education for Girls / Kufa University
**College of Education for Girls / Kufa University
***College of Pharmacy / Kufa University

Abstract:

The liver is the main organ which responsible for the removing of toxins in the body, making it the first in the face of various chemicals from the digestive system, and according to this the study had designed to compare the hepatoprotective effect of the Quercetin and *Trigonella foenum graecum* extract on the liver tissues of male rats were poisoned with carbon tetrachloride, and to know their effects when using together. The study was conducted at the Faculty of Pharmacy - University of Kufa, and included the using of 35 rats from Sprague-Dawley divided into five groups: the control group, the positive control group, the group treated with *Trigonella foenum graecum* extract, the quercetin treated group and the group treated with *Trigonella foenum graecum* extract and quercetin together. The period of dosing was continued for 7 days and on the eighth day all groups(except the control group) were poisoned with carbon tetrachloride. After 24 hours the animals were killed. The study lasted from April 2013 - until July 2013.

The Glutathione and Malondialdehyde levels were estimated in liver homogenized. The results were showed the following: no significant difference ($P>0.05$) in the Glutathione level and a significant increment ($P<0.05$) in the level of Malondialdehyde at the treated groups when compared with the control group. Also the results were obtained a significant decrease and increase ($P<0.05$) in the levels of Glutathione and the Malondialdehyde at the treated animals as compared with the positive control group. The present study was showed numerous histological changes were resulted from the injection with carbon tetrachloride. In related with the tissue sections which have been taken from the treated groups: with the extract, quercetin and the group treated with the together were revealed a protective action for the seeds of *Trigonella foenum-graecum* and quercetin drug on the liver tissues which had been poisoned and the best effect in the protection was showed at the group which treated with the extract and quercetin together.

From this study we can conclude that the *Trigonella foenum-graecum* extract and quercetin may reveal a protective role for the liver against carbon tetrachloride poisoning by increasing the Glutathione level and fall - off the Malondialdehyde level in liver homogenized. Also we conclude the using of *Trigonella foenum-graecum* extract and quercetin together led to a high efficiency double protection for the liver tissues as a result of the positive impact which resulted from their using together.

المقدمة:

يلعب الكبد دورا حيويا في أداء الوظائف الرئيسة للكائن الحي. ويكون عرضة للاصابة التي تسببها المواد الكيميائية نظرا لقدرته الايضية الواسعة والتغاير الخلوي في تركيبه النسجي (1) . وهو العضو الرئيسي المسؤول عن ازالة السموم في جسم الفقريات ويلعب دورا اساسيا في أيض الكاربوهيدرات والبروتين والدهون ويسمح بازالة السموم من العديد من المواد الغريبة، فضلا عن قدرته على تنظيم تخليق وافراز الصفراء (2) .

وأن العديد من المواد الكيميائية مثل الاسيتامينوفين والفوسفور الاصفر ورباعي كلوريد الكاربون تُحدث تلفا في الكبد بطريقة يمكن التنبؤ بها وتعتمد على الجرعة، والالية الاكثر شيوعا في اصابة الخلايا الكبدية تتضمن تكوين النواتج الايضية الضارة من خلال نظام السايتوكروم p450 (3). وتحدث الاصابات السامة غالبا في الكبد أكثر من الاعضاء الاخرى لأن جميع المواد المبتلعة التي يتم أمتصاصها تُنقل أولا الى الكبد، إذ أنه مسؤول عن عملية التمثيل الغذائي والقضاء على العديد من المواد الضارة (2).

ويعرف رباعي كلوريد الكاربون على أنه عاملا مسمما للكبد، إذ أنه يحرض تسمم الكبد من خلال أنتاج الجذور الحرة والاكسدة الفائقة للدهون في الانسجة الكبدية مما ينتج عنه تضرر الكبد التنخري (4) . كما أن الكبد الهدف الرئيسي لسمية رباعي كلوريد الكاربون لمحتواه العالي من السايتوكروم P-450 (5).

ويعد نبات الحلبة من النباتات الطبية الهامة التي تستعمل في الطب الشعبي، ويمتلك هذا النبات مجموعة واسعة من الانشطة العلاجية منها كونه خافضا للدهون ولسكر الدم ومدرا للبن ومدررا للبول (6) . وكذلك أكتشف اطباء الاعشاب الصينيون دورها الفاعل في علاج أمراض الكلى والكبد (7) .

الكويرسيتين عضو من فئة الفلافونيدات التي تدعى بالفلافانول (Flavanols) والتي تشكل العمود الفقري

للعديد من الفلافونيدات الاخرى بما فيها الحمضيات ومركبات الفلافونيدات الشبيهة بالرتين والنارينجنين(8). ومن أهم خواص الكويرسيتين الطبيعية قدرته على العمل كمضادات للأكسدة من خلال البحث عن الجذور الحرة وأزالتها خارج الجسم (9)، وقد تبين أيضا أن للكويرسيتين وظيفة أخرى هي الحد من التصاق الجزئيات على الخلايا البطانية(10).

الهدف من الدراسة:

1- معرفة التأثير الحامي للكويرسيتين على الخلايا الكبدية.

2- المقارنة بين التأثير الحامي للمستخلص العضوي لبذور نبات الحلبة ومثيله للكويرسيتين والتحقق عن الافضل في حماية التركيب النسجي للكبد وقدرته على أداء وظائفه المختلفة من خلال تقدير مستويات الجلوتاثايون والمالونديالدهيد.

3- دراسة تأثير المستخلص العضوي لبذور الحلبة والكويرسيتين اذا ما تم أستعمالهما سوية وهل سيكون تأثيرهما ايجابي ام سلبي على الخلايا والانسجة الكبدية.

المواد وطرائق العمل:

1- تهيئة الحيوانات المختبرية Preparation of laboratory animals

ثلاثون جرذا مختبريا ابيضا من سلالة Sprague-Dawley تم استعمالهم في هذه الدراسة، اذ تراوحت اوزانهم مابين 200-250gm وبعمر اقل من ثلاثة اشهر. جلبت هذه الجرذان من البيت الحيواني في كلية الصيدلة – جامعة كربلاء و ادخلت الى البيت الحيواني التابع لكلية الصيدلة – جامعة الكوفة، تمت العناية بها حتى أصبحت بالغة جنسيا (أي بعمر ثلاثة أشهر) .

2- بذور نبات الحلبة Seeds of *Trigonella fenum gracum*

تم الحصول على مسحوق البذور الجافة لنبات الحلبة العراقية *Trigonella fenum gracum* من قسم العقاقيروالنباتات الطبية التابع لكلية الصيدلة – جامعة الكوفة، اذ تم التعرف عليها وتصنيفها مسبقا من قبل المعشب الوطني العراقي.

3- الكويرسيتين Quercetin

تم شراء الكويرسيتين من شركة جارو الامريكية (Jarrow formulary, USA) وكان بهيئة مسحوق نقي.

4- طرائق العمل Methods

1-4 تحضير مستخلص نبات الحلبة Preparation seeds of *Trigonella fenum gracum* extract

تم أخذ واحد كيلو غرام (1) kg من البذور الجافة لنبات الحلبة وطحنت في المطحنة الكهربائية للحصول على مسحوق هذه البذور، ثم أستخلص بجهاز الاستخلاص المتتابع بعد أضافة (1500)ml من الهكسان واستمرت هذه العملية مدة 6 ساعات بدرجة حرارة 40 درجة مئوية (لحين أختفاء اللون الاصفر). بعد ذلك أخذ ماتبقى من مسحوق البذور والذي أصبح خاليا من الزيوت وترك ليجف بدرجة حرارة الغرفة مدة 24 ساعة، وأن هذه البقية تمثل بذور نبات الحلبة المطحونة والتي استخلصت منها المواد الفعالة فيما بعد بأستعمال الجهاز نفسه بعد أضافة (2) L من الكحول الاثيلي (80%) مدة 6 ساعات بدرجة حرارة 40 درجة مئوية.

ثم ترك المزيج ليبرد ورشح بوساطة ورق الترشيح. وبعدها تم تبخير الراشح بجهاز المبخر الدوار بدرجة حرارة 40 درجة مئوية، حتى أصبح المستخلص خاليا من الكحول الاثيلي ومحتويا على جميع المكونات الفعالة لبذور نبات الحلبة. وأن الوزن الكلي للمستخلص الناتج هو 173.641 gm (اي انه كل 1 gm من مسحوق البذور يحتوي 173.641 mg من مستخلص المكونات الفعالة). ثم أذيب المستخلص مع 1000 ml من الماء المقطر Distilled Water (D.W.) وبذلك اصبح كل 1 ml من المحلول الناتج يحتوي 1gm من مستخلص مسحوق بذور نبات الحلبة الخام، ثم حقنت الحيوانات قيد الدراسة بهذا المحلول وبحسب أوزانها(11).

2-4 تحضير الكويرسيتين Preparation of quercetin

لقد أستعمل الكويرسيتين بجرعة 10 mg/kg أعطيت للجرذان وفقا لأوزانها وذلك من خلال الحقن داخل الغشاء البريتوني (Intraperitoneally) (12) .

3-4 المجاميع التجريبية Experimental groups

المجموعة الاولى: تم حقن هذه المجموعة بمحلول الملح الفسلجي (Normal saline) داخل الغشاء البريتوني وبجرعة مقدارها 2 ml/kg يوميا لمدة سبعة أيام، وقد أعتبرت هذه المجموعة مجموعة سيطرة.

المجموعة الثانية: تم حقن هذه المجموعة بمحلول الملح الفسلجي (Normal saline) داخل الغشاء البريتوني بجرعة 2 ml/kg يوميا ولمدة سبعة أيام. وجرعت في اليوم الثامن خليط من حجوم متساوية 1:1 من مادة رباعي كلوريد الكاربون وزيت الزيتون داخل الغشاء البريتوني وبجرعة 2 ml/kg لأستحداث ضرر في اكباد الجرذان المعاملة(13) وقد أعتبرت هذه المجموعة مجموعة سيطرة موجبة.

المجموعة الثالثة: تم حقن هذه المجموعة بمستخلص بذور نبات الحلبة داخل الغشاء البريتوني بجرعة 347.282 mg/kg من وزن جسم الجرذ (14) يوميا ولمدة سبعة أيام. وجرعت في اليوم الثامن خليط من حجوم متساوية 1:1 من مادة رباعي كلوريد الكاربون وزيت الزيتون داخل الغشاء البريتوني وبجرعة 2 ml/kg وقد أعتبرت كمجموعة لتقييم الفعالية الوقائية للمستخلص في الجرذان المسممة.

المجموعة الرابعة: تم حقن هذه المجموعة بعقار الكويرستين داخل الغشاء البريتوني بجرعة 10 mg/kg يوميا ولمدة سبعة ايام. وجرعت في اليوم الثامن خليط من حجوم متساوية 1:1 من مادة رباعي

كلوريد الكاربون وزيت الزيتون داخل الغشاء البريتوني وبجرعة 2 ml/kg وقد أعتبرت كمجموعة لتقييم الفعالية الوقائية للكويرستين في الجرذان المسممة.

المجموعة الخامسة: تم حقن هذه المجموعة بمستخلص بذور نبات الحلبة وعقار الكويرستين معا داخل الغشاء البريتوني بجرعة 347.282 mg/kg و 10 mg/kg على التتالي يوميا ولمدة سبعة ايام. وجرعت في اليوم الثامن خليط من حجوم متساوية 1:1 من مادة رباعي كلوريد الكاربون وزيت الزيتون داخل الغشاء البريتوني وبجرعة 2 ml/kg وقد أعتبرت كمجموعة لتقييم الفعالية الوقائية للمستخلص والكويرستين معا في الجرذان المسممة.

4-4 التضحية بالحيوانات وجمع العينات لتقييم إصابة الانسجة الكبدية

Animals sacrificing and collection of samples for the evaluation of hepatic tissues injury

بعد مرور (24) ساعة من حقن الحيوانات برباعي كلوريد الكاربون. خدرت بمادة ثنائي أثيل أيثر، وشرحت الحيوانات بفتح التجويف البطني، ثم سحب الدم من القلب بالاعتماد على طعنة القلب (Heart puncture) للحصول على الكمية الكافية من الدم الذي وضع في أنبوبة اختبار غير حاوية على مادة مانعة للتخثر. وأستُئصل الكبد من كل جرذ، وتم قياس وزنه باستعمال ميزان حساس.

5-4 تحضير المتجانس النسجي Preparation of tissue homogenateتم

إستئصال اكباد الحيوانات المعاملة ووضع جزءا منها في محلول الفوسفات الدارئ المثلج (pH 7.4) بدرجة حرارة 4 درجة مئوية، ثم وضعت على أوراق ترشيح لقياس أوزانها. وأخذ واحد غرام من الكبد لتحضير (10%) من المتجانس الكبدي بأستعمال نفس المحلول الدارئ (تم مجانسة النسيج وسحقه بأستعمال الهاون الزجاجي ووضع بعد ذلك في وعاء مثلج بدرجة حرارة 4 درجة مئوية) ثم وضع المتجانس في جهاز الطرد المركزي بسرعة rpm3000 ولمدة 15 دقيقة بدرجة حرارة 4 درجة مئوية وأستعملت الطبقة الطافية لغرض تقدير مستويات الجلوتاثايون والمالونديالدهيد (15).

1-5-4 تقدير مستوى الجلوتاثايون المختزل Determination of reduced Glutathione (GSH) level

تم تقدير مستوى الجلوتاثايون من خلال استعمال العدة التشخيصية (Kit) المجهزة من شركة Cayman Chemical ,U.S.A.

2-5-4 قياس المالونديالدهيد في الكبد Measurement of Malondialdehyde in the liver

تم تقدير مستوى المالونديالدهيد من خلال أستعمال العدة التشخيصية (Kit) المجهزة من شركة Cayman Chemical, U.S.A.

6-4 الفحص النسجي Histopathological examination

تمت عملية إعداد المقاطع للفحص النسجي من خلال أخذ غرام واحد من كبد الحيوانات الذي تم تقطيعه الى عينات. ثُبتت في محلول الفورمالين(10%) ثم أُزيل الماء Dehydration منها بزيادة تراكيز الكحول الاثيلي. وتم ترويق Clearing النسيج بأستعمال الزايلين (Xylene) ، ثم طمرت العينات في شمع البرافين، وتم إعداد قوالب من الشمع المطمور به النسيج بوساطة الصب من النماذج المطمورة. وقطعت القوالب بوساطة جهاز المشراح Microtome الى مقاطع بلغ سمكها 5 um ، وتم غسلها في الحمام المائي وتركت في الفرن الكهربائي لأزالة الشمع ثم صبغت العينات بصبغتي الهيماتوكسلين Haematoxyline والايوسين Eosin وفحصت تحت المجهر الضوئي بقوتي تكبير 10 و40X(16).

7-4 التحليل الأحصائي Statistical analysis

تم أستعمال البرنامج الاحصائي الجاهز (Statistical package social sciences) SPSS الاصدار 20 . الذي استعمل فيه ANOVA (تحليل التباين) للمقارنة بين البيانات المختلفة المقاسة عند مستوى أحتمالية ($P<0.05$).

النتائج:

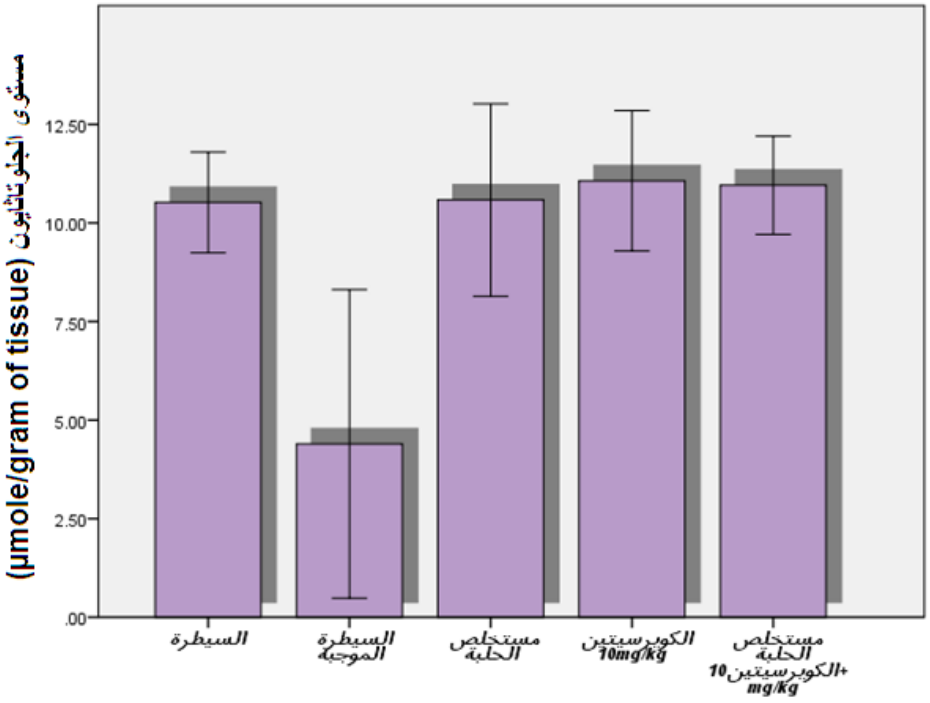
1- تأثير المعاملات المختلفة على مستوى الجلوتاثايون في المتجانس الكبدي

Effect of different treatments on GSH level in liver homogenate

اظهرت النتائج المبينة في الجدول (1) عدم وجود فروقات معنوية ($P>0.05$) في مستوى الجلوتاثايون لدى المجاميع: المعاملة بمستخلص الحلبة والمعاملة بالكويرسيتين والمعاملة بالمستخلص والكويرسيتين معا مقارنة بمجموعة السيطرة، أما مجموعة السيطرة الموجبة فقد اشارت النتائج الى وجود انخفاض معنوي ($P<0.05$) عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة. كما بينت النتائج في الجدول نفسه وجود ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في مستوى الجلوتاثايون لدى المجاميع: المعاملة بالمستخلص والمعاملة بالكويرسيتين والمعاملة بالمستخلص والكويرسيتين معا مقارنة بمجموعة السيطرة الموجبة، في حين لم يظهر فرقا معنويا ($P>0.05$) في المستوى لدى المجموعة المعاملة بالمستخلص مقارنة بالمجموعتين المعاملة بالكويرسيتين والمعاملة بالمستخلص والكويرسيتين معا، وكذلك عند مقارنة المجموعتين المعاملة بالكويرسيتين والمعاملة بالمستخلص والكويرسيتين معا وكما موضح في الشكل (1).

الجدول (1): تأثير المعاملات المختلفة على مستوى الجلوتاثايون لدى ذكور الجرذان

مجاميع المعاملة	المعدل ± الخطأ القياسي مستوى الجلوتاثايون (µmole/gram of tissue)
السيطرة	0.49±10.52
السيطرة الموجبة	*1.52±4.395
مستخلص الحلبة	0.94±10.583
الكويرسيتين 10 mg/kg	0.69±11.07
مستخلص الحلبة + الكويرسيتين 10 mg/kg	0.48±10.95



الشكل (1): مقارنة بين المجاميع المختلفة لذكور الجرذان بالنسبة لمستوى الجلوتاثايون

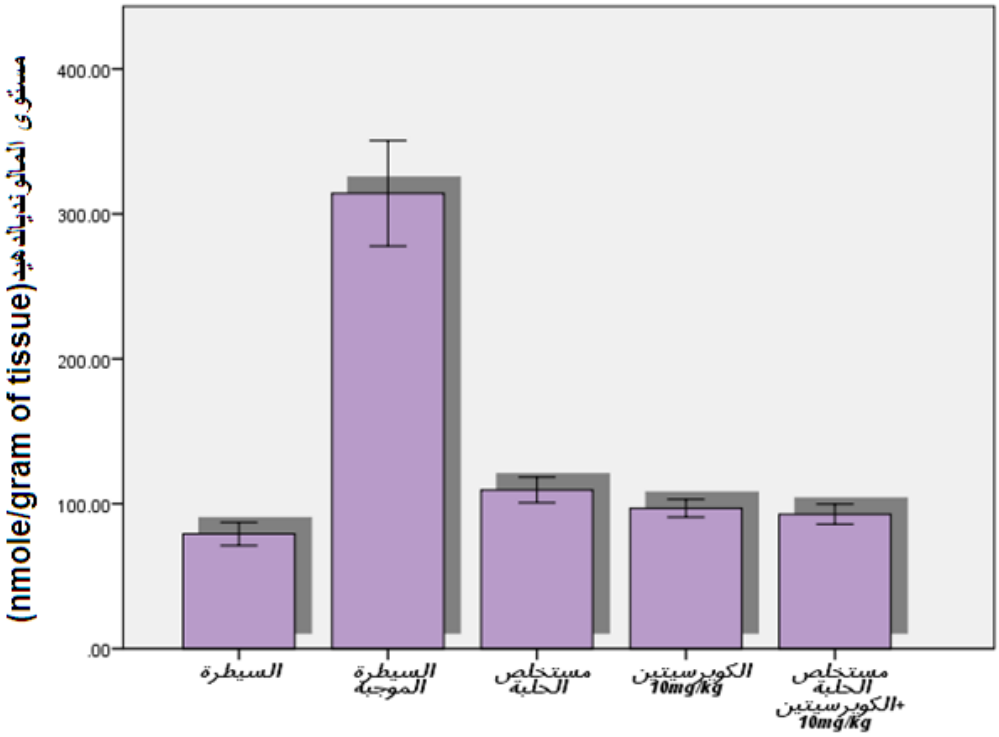
2- تأثير المعاملات المختلفة على مستوى المالونديالدهيد في المتجانس الكبدي

Effect of different treatments on MDA level in liver homogenate

دلت النتائج المذكورة في الجدول (2) وجود ارتفاع معنوي ($P<0.05$) في مستوى المالونديالدهيد لدى المجاميع: السيطرة الموجبة والمعاملة بمستخلص الحلبة والمعاملة بالكويرسيتين مقارنة بمجموعة السيطرة، الا أن المستوى قد أظهر انخفاضا معنويا ($P<0.05$) لدى المجاميع: المعاملة بالمستخلص والمعاملة بالكويرسيتين والمعاملة بالمستخلص والكويرسيتين معا مقارنة بمجموعة السيطرة الموجبة. وأظهرت النتائج عدم وجود فروقات معنوية ($P>0.05$) في المستوى لدى المجموعة المعاملة بالمستخلص مقارنة بالمجموعتين المعاملة بالكويرسيتين والمعاملة بالمستخلص والكويرسيتين، وكذلك لدى المجموعة المعاملة بالكويرسيتين مقارنة بالمعاملة بالمستخلص والكويرسيتين معا كما موضح في الشكل (2).

الجدول (2): تأثير المعاملات المختلفة على مستوى المالونديالدهيد لدى ذكور الجرذان

مجاميع المعاملة	المعدل ± الخطأ القياسي مستوى المالونديالدهيد (nmole/gram of tissue)
السيطرة	3.13±79.16
السيطرة الموجبة	14.12±314.16*
مستخلص الحلبة	3.43±109.5*
الكويرسيتين 10 mg/kg	2.40±96.83
مستخلص الحلبة + الكويرسيتين 10 mg/kg	2.67±92.83

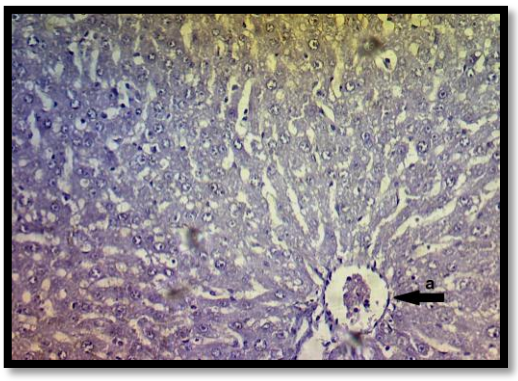


الشكل (2): مقارنة بين المجاميع المختلفة لذكور الجرذان بالنسبة لمستوى المالونديالدهيد

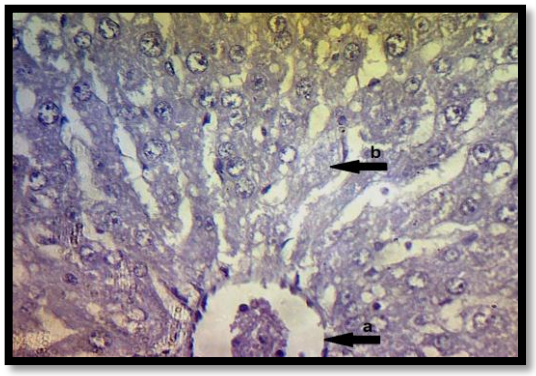
3-الفحص النسجي لمقاطع الكبد في ذكور الجرذان Histopathological examination of liver sections at male rats

أظهرت صور المقاطع النسجية لأكباد الحيوانات في مجموعة السيطرة فرع من الوريد المركزي(a) كما موضح في الصورة (1) وكذلك بينت الصورة (2) فرع من الوريد المركزي(a) والخلايا الكبدية الطبيعية(b). وأوضحت صور المقاطع لأكباد الحيوانات في مجموعة السيطرة الموجبة هجوم الخلايا الالتهابية وتجمعها بكثرة في الانسجة المحيطة بالاوعية الدموية (a) وتحلل شديد في الخلايا الكبدية (Severe degeneration) (b) كما موضح في الصورة (3). وظهر أيضا تفجي في الخلايا الكبدية (a) مع تنخر واضح(b) وكما مبين في الصورة (4)، وأوضحت الصورة (5) أحتقان (Congestion) في الاوردة الكبدية (a) والصورة (6) تحلل شديد في الخلايا الكبدية(a) وتكسر الانوية (b). وفيما يتعلق بصور الفحص النسجي الخاصة بأكباد الحيوانات المعاملة بمستخلص الحلبة فقد بينت الصور منطقة محمية تُظهر شكلا طبيعيا للخلايا(a) ومنطقة تظُهر أثار لتحلل خفيف في الخلايا الكبدية (Mild degeneration) (b) كما موضح في الصورة (7)، أما الصورة (8) فقد أظهرت تغلظ في الانوية وهي مرحلة بسيطة تسبق موت الخلايا الكبدية(a). ودلت صور

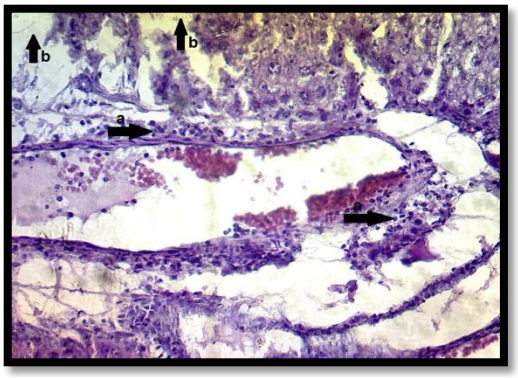
المقاطع النسجية لاكباد الجرذان في المجموعة المعاملة بالكويرسيتين على وجود تغلظ في الانوية(a) كما مبين في الصورة (9)، أما الصورة (10) فقد أشارت الى وجود تجمع للخلايا الالتهابية (a) وشكل طبيعي للنسيج الكبدي(b). وفيما يتعلق بالمجموعة المعاملة بالمستخلص والكويرسيتين معا فقد أوضحت المقاطع النسجية في اكباد الحيوانات شكل طبيعي للنسيج الكبدي(a) والوريدالكبدي المركزي(b) كما موضح في الصورة (11)، وظهر في الصورة (12) تجمع للخلايا الالتهابية(a) وشكل طبيعي للنسيج الكبدي(b).



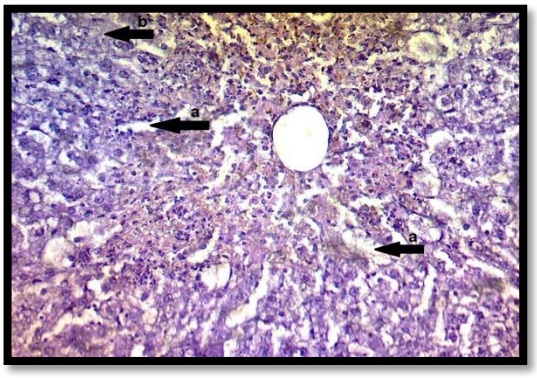
الصورة: (1)



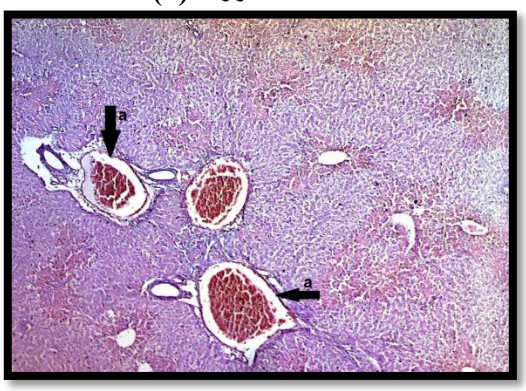
الصورة: (2)



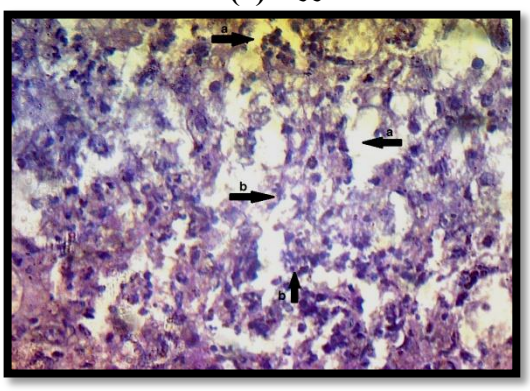
الصورة: (3)



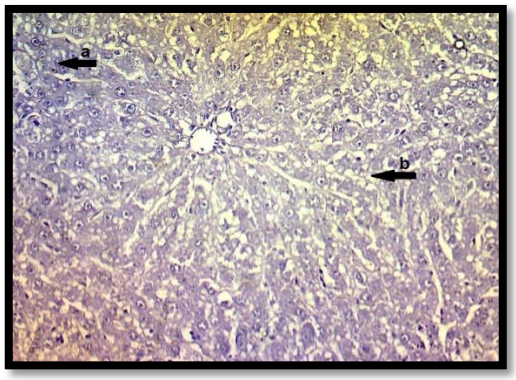
الصورة: (4)



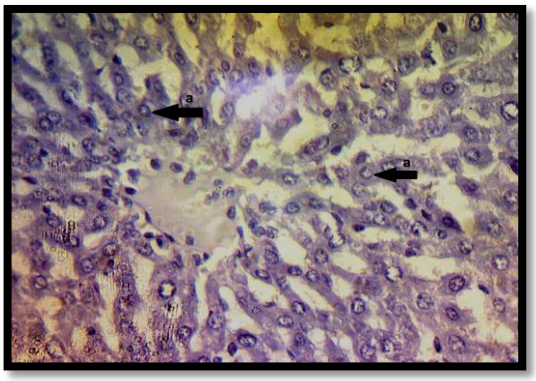
الصورة: (5)



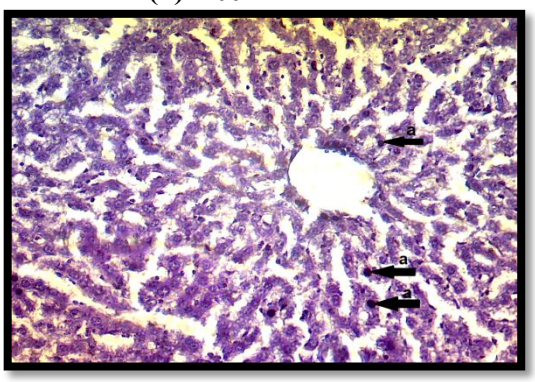
الصورة: (6)



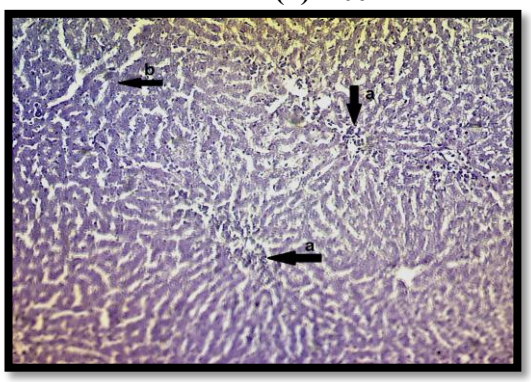
الصورة: (7)



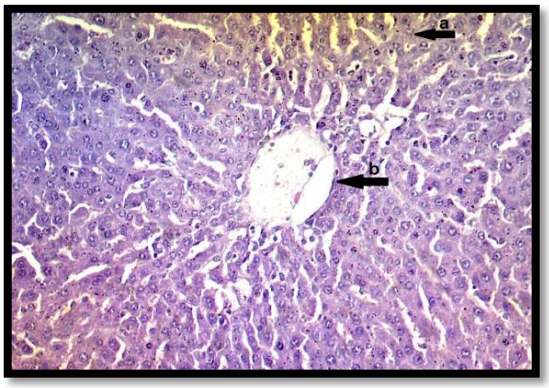
الصورة: (8)



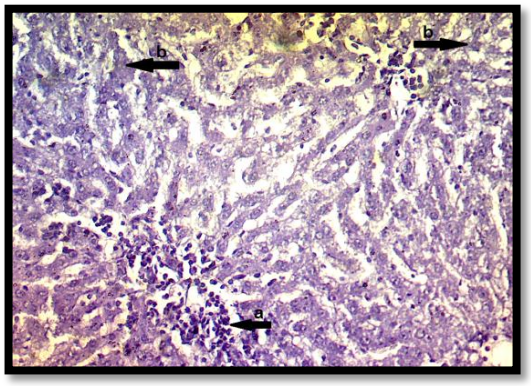
الصورة: (9)



الصورة: (10)



الصورة: (11)



الصورة: (12)

المناقشة :

1-تأثير المعاملات المختلفة على مستويات الجلوتاثايون والمالونديالدهيد في المتجانس الكبدي
Effect of different treatments on GSH and MDA levels in liver homogenate

أن الانخفاض الملاحظ في مستوى الجلوتاثايون لدى مجموعة السيطرة الموجبة والارتفاع في مستوى المالونديالدهيد لدى تلك المجموعة ، قد يعلل الى الحقيقة العلمية التي تؤكد أن الجلوتاثايون يعد مركبا وقائيا يوفر الحماية الكافية للخلايا والانسجة الكبدية ضد تأييض رباعي كلوريد الكاربون السام وذلك من خلال فعله كعامل مختزل يبحث ويرتبط مع الجذور الحرة المتكونة مما يتسبب في أستهلاك الجلوتاثايون وخفض مستواه معنويا كما أكدت بعض البحوث ذلك (18,17). وعلى النقيض من هذا فأن تعرض اكباد الحيوانات قيد الدراسة لهذه المادة قد يزيد من مستوى المالونديالدهيد في متجانس اكباد تلك الحيوانات وذلك لكونه من نواتج الاكسدة الفائقة للدهون (19)، وربما حدث ذلك نتيجة لتحطم الخلايا الكبدية وتضرر الاغشية المحيطة بها بفعل التعرض لرباعي كلوريد الكاربون.

وأتفق الارتفاع في مستوى الجلوتاثايون والانخفاض في مستوى المالونديالدهيد لدى المجموعة المعاملة بالمستخلص مقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة مع دراسة أجراها (20)، والتي أظهرت نتائجها وجود تحسن واضح في معايير الاجهاد التأكسدي من خلال انخفاض مستوى المالونديالدهيد وارتفاع مستوى الجلوتاثايون في الخلايا الكبدية والذي كان مماثلا

لمستواهما في مجموعة السيطرة. وفيما يتعلق بمجموعة السيطرة الموجبة فقد أظهرت نتائج الدراسة أرتفاعا معنويا في مستوى المالونديالدهيد قابله أنخفاضا معنويا في مستوى الجلوتاثايون.

وقد يرجأ الارتفاع الملاحظ في مستوى الجلوتاثايون لدى المجموعة المعاملة بمستخلص بذور الحلبة الى ماتمتلكه تلك البذور من مكونات كيميائية فعالة تتمثل بالكاربوهيدرات والبروتينات والاحماض الامينية والمركبات القلويدية والفلافونيدية والصابونيات الستيرويدية والفيتامينات المختلفة وخاصة البيتا-كاروتين والرايبوفلافين والثيامين والبيوتين والبيريدوكسين وسيانوكوبل امين والتوكوفيرول وحامض النيكوتينيك، فضلا عن أحتوائها على العديد من الاملاح المعدنية والتي تتمثل بأيونات الكالسيوم والصوديوم والبوتاسيوم والحديد والفسفور وغيرها من المكونات الاخرى (21)، التي ربما أظهرت تأثيرا وقائيا للخلايا الكبدية وقد أسهمت وبشكل فعال في حمايتها من التأثير السمي الناتج عن التعرض لرباعي كلوريد الكاربون، مما ينتج عنه ارتفاع مستوى الجلوتاثايون في المتجانس الكبدي على اعتباره من أهم المركبات الوقائية الذاتية للخلايا الكبدية(17). وربما يكون هذا ماحصل فعلا في الدراسة الحالية.

ومن المحتمل أن يعزى هذا الارتفاع الى محتوى تلك البذور من مضادات الاكسدة المختلفة (14)، التي ربما كان لها الدور الحيوي الفعال في الارتباط مع الجذور الحرة وازاحتها خارج الجسم، الامر الذي قد يؤدي الى إحداث ارتفاع معنوي في مستوى الجلوتاثايون داخل الخلايا الكبدية لأمتلاكه خواص وقائية عالية (17).

وفيما يتعلق بالانخفاض الملاحظ في مستوى المالونديالدهيد في المتجانس الكبدي للجرذان المعاملة بمستخلص الحلبة، فقد يعلل أيضا الى محتوى تلك البذور من مضادات الاكسدة القوية والتي ربما لعبت دورا أساسيا في التخلص منه من خلال الاقتران معه وازالته من الانسجة الكبدية الى خارج الجسم، فقد أشارت بعض الدراسات الى أن بذور الحلبة تحتوي العديد من تلك المضادات التي تعمل على خفض مستوى الدهون فائقة الاكسدة (19).

كما بين (14)، أن أستعمال مسحوق تلك البذور وبجرعة مقدارها 2 mg/kg يوميا يعمل على تعزيز جميع مضادات الاكسدة في الجرذان الطبيعية والمسرطنة عند ارتفاع مستوى المالونديالدهيد الناتج من الاصابات الكبدية.

أما فيما يتعلق بتأثير الكويرسيتين على مستويات الجلوتاثايون والمالونديالدهيد، فقد يعلل الى كون هذا العقار من العقاقير التي تُظهر تأثيرا حاميا يقي الخلايا من الاضرار الناتجة عن التعرض للمواد السامة (19) ومنها رباعي كلوريد الكاربون المستعمل في الدراسة الحالية.

أما المجموعة المعاملة بالمستخلص والكويرسيتين معا فقد أشارت نتائجها الى عدم وجود فروق في المستويات عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة، والى ارتفاع الجلوتاثايون وانخفاض المالونديالدهيد عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة الموجبة، وتعلل تلك النتيجة الى تكاتف التأثير الايجابي لمكونات مستخلص الحلبة والفعل الحامي لعقار الكويرسيتين معا على الانسجة الكبدية وحمايتها وبالتالي المحافظة على معايير الاجهاد التأكسدي بصورة طبيعية مماثلة لمستوياتها في مجموعة السيطرة لدى الحيوانات قيد الدراسة.

2- تأثير المعاملات المختلفة على الانسجة الكبدية Effect of different treatments on liver tissue

لقد دل الفحص النسجي لمقاطع الكبد لدى مجموعة الجرذان المعاملة برباعي كلوريد الكاربون على حصول العديد من التغيرات في أنسجة اكباد تلك الحيوانات والتي تمثلت بهجوم الخلايا الالتهابية وتجمعها بكثرة في الانسجة المحيطة بالاوعية الدموية والتحلل الشديد في الخلايا الكبدية، كما أشارت أيضا الى تفجي في الخلايا الكبدية مع تنخر واضح في تلك الخلايا، فضلا عن احتقان في الاوردة الكبدية وتكسر انوية الخلايا الكبدية، وقد قاربت هذه النتيجة ماتوصل اليه (20)، الذي أشار الى حصول اضرار في الانسجة الكبدية المعاملة برباعي كلوريد الكاربون تمثلت بالتنخر وأرتشاح للخلايا الالتهابية وتجمع للدهون وركود صفراوي.

وربما تعلل التغيرات النسجية الناتجة عن التأثير السلبي لرباعي كلوريد الكاربون الى الفعل السمي لهذه المادة التي ربما عملت على تحطيم البناء النسجي للخلايا الكبدية وبالتالي تحلل محتوياتها السايتوبلازمية والنووية، فقد أشار (20) ، الى أن تعرض اكباد الجرذان الطبيعية لهذه المادة قد سبب انواع مختلفة من الاصابات الكبدية تمثلت بتحرر الدهون فائقة الاكسدة وتجمعها في المتجانس الكبدي نتيجة لتأثير الجذور الحرة وثلاثي كلوريد الكاربونCCl_3 التي خلقها رباعي كلوريد الكاربون(22) الامر الذي أدى الى تنخر واضح في خلايا الكبد وتنكس دهني.

أو قد تعلل الى الارتفاع المعنوي الملاحظ في مستوى المالونديالدهيد في الانسجة الكبدية للجرذان المسممة والذي تم توثيقه في الدراسة الحالية، وبما أنه يعد ناتجا من نواتج الاكسدة الفائقة للدهون (23) ، لذا ربما سبب الارتفاع في مستواه تأثيرا ضارا لتلك الخلايا ومما زاد الامر سوءا الانخفاض المعنوي الملاحظ في مستوى الجلوتاثايون والذي تم توثيقه في الدراسة الحالية أيضا لكونه يمتلك خواصا مضادة للأكسدة، كما يعمل على حماية الخلايا من الجذور الحرة والبيروكسيد (24).

قد أظهرت المقاطع النسجية للمجموعة المعاملة بمستخلص بذور الحلبة تأثيرا ايجابيا لهذه البذور في حماية الانسجة الكبدية وقد قاربت هذه النتيجة ماتوصل اليه (20)، الذي بين أن لبذور الحلبة تأثيرا واقيا للخلايا

الكبدية من خلال تحفيز قدرتها على النمو واعادة تجددها، كما أن لها دورا فعالا في التقليل من التغيرات النسجية من خلال منع تجمع الدهون. وربما يعلل ذلك الى محتوى بذور الحلبة من المركبات الفلافونيدية التي تُظهر خواصا مضادة للبكتريا والالتهابات المختلفة كما أنها تمتلك فعالية مضادة للأكسدة عالية جدا تمكنها من مهاجمة الجذور الحرة وازالتها من الخلايا، كما أكد ذلك (25).

أو من المحتمل أن ترجأ هذه النتيجة الى محتوى مستخلص بذور الحلبة من الفيتامينات المتعددة (21) التي ربما أظهرت فعلا واقيا لحماية الانسجة الكبدية من الضرر والتنخر، فقد أوضحت العديد من الدراسات بأن التأثير السمي لرباعي كلوريد الكاربون ينخفض كثيرا عند معاملة الحيوانات المختبرية ببعض الفيتامينات والتي تمثلت: بالبيتا-كاروتين وفيتامين C (حامض الاسكوربيك) وفيتامين E (التوكوفيرول)(28,27,26,). أو قد تعود الى ماتحتويه بذور الحلبة من صابونيات ستيرويدية مختلفة الانواع مثل: ياموجينين (Yamogenin) وتايجوجينين (Trigogenin) وجايتوجينين(Gitogenin) (21) التي تمتلك فعالية مضادة للألتهاب تماثل تلك التي تظهرها العقاقير الستيرويدية، إذ تعمل تلك الفعالية على تثبيط تكون البروستاكلاندين نوع E_2 ومن خلال هذه الالية فأنها تُظهر فعلها الايجابي في منع الالتهاب (29). ومن المحتمل أن ترجأ نتيجة الدراسة الحالية الى الاسباب جميعها المشار اليها أنفا.

وفيما يتعلق بتأثير الكويرسيتين على الانسجة الكبدية، فربما يعلل الى التأثير الواقي للكويرسيتين على أعتباره أحد المركبات الفلافونيدية (30)، التي من المحتمل أن تُظهر تأثيرا مضادا للأكسدة في مواجهة الجذور الحرة الناتجة من تسمم الخلايا الكبدية. كما أنه من المحتمل أن يُظهر خواصا مضادة للالتهاب من خلال تنشيط تخليق الانزيمين الاوكسيجنيز الحلقي (Cyclooxygenase) والليبوكسيجينيز (Lipoxygenase)كما أكد ذلك (29).

أما المجموعة المعاملة بمستخلص بذور الحلبة والكويرسيتين معا فقد كانت الافضل من حيث الكفاءة العالية في حماية الانسجة والخلايا الكبدية من التغيرات النسجية المختلفة الناتجة من التعرض لرباعي كلوريد الكاربون، ومن المحتمل أن يعلل ذلك الى التأثير التآزري للمكونات الكيميائية الفعالة للأثنين معا (الحلبة والكويرسيتين) مما أعطى تأثيرا ايجابيا مضاعفا في وقاية المكونات الخلوية من التعرض للتنخر بفعل التسمم.

الاستنتاجات:

1- لقد أظهر الكويرسيتين في نموذج الجرذان تأثيرا معتدا حاميا للخلايا الكبدية من التسمم برباعي كلوريد الكاربون من خلال المحافظة على معايير GSH وMDA والوصف النسجي.

2- كما بين المستخلص العضوي لبذور نبات الحلبة في نموذج الجرذان تأثيرا معتدا حاميا للخلايا الكبدية من التسمم برباعي كلوريد الكاربون من خلال المحافظة على معايير GSH وMDA والوصف النسجي.

3- أن أستعمال مستخلص بذور نبات الحلبة والكويرسيتين معا قد أديا الى حماية الانسجة الكبدية من التسمم وبكفاءة بايولوجية أعلى من كفاءتهما منفردين مما يدل على أن أحدهما قد ساند الاخر في إظهار التأثير الواقي للكبد.

التوصيات:

1- التوصية بزيادة التحقق من النتائج لنفس المشكلة الصحية عن طريق اعتماد معايير أكثر دقة على المستوى الجزيئي ومدعمة بالتقنيات الحديثة مثل PCR و specific biomarker.

2- اعتماد عينة أوسع من الحيوانات ونموذج تسمم أدق.

3- اعتماد المحاولات السريرية للمركبات ذات السلامة العلاجية المثبتة في الانسان.

4- اعتماد الطريقة العلاجية فضلا عن الطريقة الوقائية.

5- تقييم المحاولات العلاجية لتسمم الكبد بالمركبات الطبيعية وأختيار المركبات ذات الفاعلية والسلامة العالية لحل مشكلة التسمم الكبدي.

6- تنقية وتقييم الأثر الحامي للكبد لمكونات بذور الحلبة الذائبة عضويا.

المصادر:

1. Khan, T. and Sultana, S. (2009). Antioxidant and hepatoprotective potential of *Aegle marmelos* Correa against CCl4-induced oxidative stress and early tumor events. J. Enz. Inhib. Med. Chem., 24 (2): 320-7.

2. Casarett and Doull's. (2008). toxicology; the basic science of poisons, 7th ed. Mc-Graw Hill, pp: 557-576.

3. Sunita, T.; Vupta, V. and Sandeep, B. (2008). Comparative study of antioxidant potential of tea with and without additives, Indian. J. physiol. Pharmacol., 44: 215-219.

4. Ram, V.J. and Goel, A. (1999). Curr. Med. Chem., 6, 217-254.

5. Södergren, E.; Cederberg, J.; Vessby, B. and Basu, S . (2001). Vitamin E reduces lipid peroxidation in experimental

liver, kidneys and testes of rats. Phytother. Res., 16(1): 28-32.

14. Devasena, T. and Menon, V.P. (2002). Enhancement of circulatory antioxidants by fenugreek during 1,2-dimethyl hydrazine-induced rat colon carcinogenesis. J. Biochem. Mol. Biol. Biophys., 6(4): 289-292.

15. Bhattacharyya, D.; Pandit, S.; Mukherjee, R.; Das, N. and Sur, T.K. (2003). Hepatoprotective effect of himoliv , a poly herbal formulation in rats. Indian. J. Physiol. Pharmacol., 47(3): 435-440.

16. Junqueira, L.C.; Carneiro, J. and Kelley, R. (1995). Basic Histology. 8th ed. Lange medical book, pp: 1-2, 306-314.

17. Nishida, K.; Ohta, Y.; Kongo, M. and Ishiguro, I. (1996). Response of endogenous produced glutathione through hepatic glutathione redox cycle to enhancement of hepatic lipid peroxidation with the development of acute liver injury in mice intoxicated with carbon tetrachloride. Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol., 93(2): 198-218.

18. Hewawasam, P.R.; Jayatilaka, K.A.P.W.; Pathirana, C. and Mudduwa, L.K.B. (2004). Hepatoprotective effect of *Epaltes diraricata* extract on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in mice. Indian. J. Med. Res., 120: 30-34.

19. Pavanato, A.; Tunon, M.J.; Sanchez-Campos, S.; Marroni, C.A.; Llesuy, S.; Gonzalez-Gallego, J. and Marroni, N. (2003). The effects of quercetine on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. Dig. Dis. Sci., 48(4): 824-829.

20. Said, A.M. (2005). The hepatoprotective activity of fenugreek seeds extract against carbon tetrchloiride-induced liver toxicity in rats. A thesis. hepatotoxicity in rats. Eur.. J. Nutr., 40 (1):10-6.

6. AL-atwi, L.F. (2010). Clinical evaluation for the diuretic effect of the alcoholic extract of *Trigonella faenum-gracum* seeds (fenugreek) on rabbits. Kufa. J. for Veterinary. Med. Sci., 1(1): 116-121.

7. Prasanna, M. (2000). Hypolipidemic effect of fenugreek. A clinical study Indian. J. phramcol., 32:34-6.

8. Madhavan, P.N.; Nair, L.; Zainulabedin, M.; Saiyed; Nimisha, H. ;Gandhi and Ramchand, C.N. (2009). The flavonoid, quercetin, inhibits HIV-1 infection in normal peripheral blood mononuclear cells. Am. J. Infec. Dis., 5 (2): 142-148.

9. Hubbard, G.P.; Wolffram, S. and de Vos, R. (2006). Ingestion of onion soup high in quercetin inhibits platelets aggregation and essential components of collagen-stimulated platelet activation pathway in man: A pilot study. Br. J. Nutr.,96(3):428-8.

10. Lakhanpal, P. and Kumar, D. (2007). Quercetin: a versatile flavonoid.Inter. J. Med. Update., 2.

11. AL-Hakeemi, A.A. (2002). Isolation of Trigonelline from Iraqi fenugreek seeds and studying its effect on blood glucose level and lipid profile in normal and alloxan-diabetic rabbits. M.Sc. thesis. Dept of clinical pharmacy, College of Pharmacy, University of Baghdad.

12. Janbaz, K.H.; Saeed, S.A. and Gilani, A.H. (2004). Studies the protective effects of caffeic acid and quercetin on chemical-induced hepatotoxicity in rodents. Phyto. Med., 11: 424-430.

13. Fadhel, Z.A. and Amran, S. (2002). Effects of black tea extract on carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation in

Ruiter, G.C.; Seifert-Bock, I.; Knook, D.L. and Brouwer, A. (1995). Beta-carotene (provitamin A) decrease the severity of CCl_4 –induced hepatic inflammation and fibrosis in rats. Liver., 15(1): 1-8.

27. Ademuyiwa, O.; Adesanya, O. and Ajuwon, O.R. (1994). Vitamin C in CCl_4 hepatotoxicity, a preliminary report. Hum. Exp. Toxicol., 13(2): 107-109.

28. Nazirogla, M.; Cay, M.; Ustundag, B.; Aksakal, M. and Yekelev, H. (1999). Protective effects of vitamin E on carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. Cell. Biochem. Funct., 17(47): 253-259.

29. Kim, H.P.; Mani, I.; Iversen, L. and Ziboh, V.A. (1998). Effects of naturally-occurring flavonoids and biflavonoids on epidermal cyclooxygenase and lipooxygenase from guinea-pigs. Prostagland. Leukot. Essent. Fatty Acids., 58(1): 17-24.

30. Hollman, P. C.; van Trijp, J. M.; Mengelers, M. J.; de Vries, J. H. and Katan, M. B. (1997). Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man. Cancer. Letters., 114:139-140.

College of pharmacy. University of Baghdad.pp:4-51.

21. Bralles, J.; Anderson, L.; and Phillipson, J.D. (2002). Herbal medicine 2nd ed. Pharmaceutical Press, Publication division of the Royal Pharmaceutical Society of Great British. pp: 209-211.

22. Lin, H.M.; Tseng, HC.; Wang, CJ.; Lin, JJ. ;Lo, CW. and Chou, FP. (2008).Hepatoprotective effects of solanumnigrum Linn. Extract against CCl4-induced oxidative damage in rats. Chemico-Biol. Interact., 171: 283- 293.

23. Marnett, L. J. (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. Mut. Res., 8: 83-95.

24. Pompella, A.; Visvikis, A.; Paolicchi, A.; De Tata, V. and Casini, A.F. (2003). "The changing faces of glutathione, a cellular protagonist". Biochem. Pharmacol., 66 (8): 1499–503.

25. Miller, A.L. (1996). Antioxidant flavonoids: structure, function and clinical usage. Alter. Med. Rev., 1(2): 103-111.

26. Seifert, W.F.; Bosma, A.; Hendviks, H.F.; Van Leeuwen, R.E.; Van Thiel-de