Al-Kufa University Journal for Biology / VOL.9 / NO.1 / Year: 2017
Print ISSN: 2073-8854 & Online ISSN: 2311-6544

دراسة تأثير زيت الحبة السوداء *Nigella sative* oil على بعض المعايير الفسيولوجية والكيموحيوية لذكور الجرذان البيض المعاملة بسموم الافلاتوكسين B_2,B_1

ا. م.د. أثير باسل العبيدي
كلية العلوم / جامعة الكوفة

ا.م.د.سعاد وحيد كاظم
كلية العلوم / جامعة الكوفة

الخلاصة :

أثبتت نتائج هذه الدراسة قدرة زيت الحبة السوداء على تقليل الاثار السمية للافلاتوكسين B_2,B_1 في معايير الدم الفسلجية والكيموحيوية لذكور الجرذ الابيض إذ أرتفع معدل كريات الدم البيض إلى (12000,12340)كرية\ملم^3 مقارنة بمعاملة السيطرة (8333.3) كرية\ملم^3 ، كما بينت النتائج أن زيت الحبة السوداء قد خفض معدل كريات الدم البيض عند أستعماله مع الافلاتوكسينB_2,B_1 إلى(8675, 8420) كرية\ملم^{3}على التتالي . اما بالنسبة الى معدل تركيز الهيموغلوبين فقد انخفض إلى (7.9, 8.6) غم \ 100مل عند معاملة الحيوانات بالافلاتوكسين B_2,B_1 في حين كان لزيت الحبة السوداء تأثير أيجابي في رفع معنوي لمعدل تركيز الهيموغلوبين في دم الحيوانات المعاملة(زيت الحبة السوداء+AFB_1) ,(زيت الحبة السوداء +AFB_2) إلى (11.2 ,11.8غم \100مل مقارنة مع معاملتي السيطرة (بدون أي اضافة) البالغة(11.23)غم\100مل ومعاملة زيت الحبة السوداء 12.0 غم / 100 مل ، أما معدل مكداس الدم(P.C.V) لوحظ إنخفاضاً ملحوظاً في الحيوانات المعاملة بالافلاتوكسين B_2,B_1 اذ بلغ (23.9 , 25.5)% على التتالي مقارنة بمعاملة السيطرة34% في حين أرتفعت النسبة واصبحت ضمن الحدود الطبيعية عند معاملتي زيت الحبة السوداء والافلاتوكسين B_2,B_1 كلاً على حده اذ بلغت (33.6, 36)% على التتالي . كذلك هو الحال بالنسبة الى معيار معدل ترسب كريات الدم الحمراء فقد ارتفعت معدلات E.S.R في دم الحيوانات المعاملة بسموم الافلاتوكسين B_2,B_1 كلاً على حده الى (2.6, 3.0) ملم /ساعة مقارنة بعاملة السيطرة 1.3 ملم / ساعة في حين خفضت معاملتي زيت الحبة السوداء وبوجود الافلاتوكسين B_2,B_1 كلاً على حده من قيم E.S.R اذ بلغت 1.5 ملم/ساعة مقارنة بمعاملة السيطرة 1.3 ملم/ساعة .

فضلاً على ذلك أشارت النتائج أن المعاملات AFB_2, AFB_1 لها دور ملحوظ في رفع مستوى أنزيمات الكبد GOT الى (22.3 و22.2) وحدة دولية\لتر على التتالي مقارنة مع معاملة السيطرة البالغة (18.5) وحدة دولية\لتر. وكذلك بالنسبة الى انزيم GPT قد ارتفعت تراكيز هذا الانزيم في دم الحيوانات المعاملة بسموم الافلاتوكسين B_2, B_1 وكلاً على حده الى (20.3 و 19.9) وحدة دولية\لتر على التتالي مقارنة مع معاملة السيطرة البالغة (18.3) وحدة دولية\ لتر ، ومن جانب آخر أرتفع معدل سكر الدم (R.P.S) إلى (134.6,136.6) ملغم\100مل suger عند معاملة الحيوانات بسموم B_1 , B_2 مقارنة بمعاملة السيطرة في حين بلغت (98,104.6) ملغم \100مل suger عند المعاملة بزيت الحبة السوداء مع الافلاتوكسين B_1 و B_2 كلاً على حده مقارنة بالسيطرة البالغة (93.6) ملغم \100مل suger .

أثبتت نتائج الدراسة النسيجية لأعضاء الكبد والكلى والامعاء أن سموم الافلاتوكسينB_2,B_1 كانت مؤثرة وتسببت في أحداث تغيرات نسيجية شديدة فيها تمثلت بوجود أحتقان وعائي ونزف دموي في الكبد وتضخم في جدار الكبيبة ،تحلل الزغابات وتقرحها ،وتجمع الخلايا الألتهابية في الامعاء . في حين قللت معاملة زيت الحبة السوداء من التأثير السمي لهذه السموم اذ بينت النتائج من عدم وجود اي تغير نسيجي مرضي في نسيج الكبد والامعاء باستثناء نسيج الكلى والمتمثل في حدوث تضخم بسيط في جدار الكبيبة .

Al-Kufa University Journal for Biology / VOL.9 / NO.1 / Year: 2017
Print ISSN: 2073-8854 & Online ISSN: 2311-6544

المقدمة

يشكل تلوث الاغذية الطبيعية والمصنعة بالسموم الفطرية احد الصعوبات التي يواجهها شعوب العالم لأنها تسببت في احداث العديد من العلل والامراض في الانسان والحيوانات[14] .ترتبط مستويات التلوث بالسموم الفطرية ارتباطاً وثيقاً بالظروف البيئية التي ينمو منها المحصول اضافة الى الطرق المستعملة في عملية النقل لتلك المحاصيل وخزنها [18] فالمحاصيل النامية في المنطقة الحارة الرطبة تكون اكثر عرضة للتلوث بالسموم الفطرية مقارنة بتلك النامية الواقعة على خط الاستواء في المناطق القطبية اذ ان الكثير من بذور المحاصيل الزراعية المختلفة وحبوبها تتعرض للاصابات الفطرية في الحقل في اثناء عملية الحصاد والنقل والخزن ولاسيما الانواع الثالية لأشباه الاجناس *Aspergillus , Penicilum ,Fusarium , Bipolaris* . [8] . إن أفضل طرق للحد من تلوث المواد الغذائية والمحاصيل الزراعية بالسموم الفطرية تكمن في توفير الظروف الملائمة المنتجة لتلك السموم وبالتالي حماية الانسان والحيوان من خطر الإصابة بالإمراض [1] .

ان معظم السموم الفطرية المعروفة حالياً لايوجد لها علاج معين يمكن استعماله في حالة حدوث تسمم به. لذلك ظهرت توجهات بحثية لدراسة امكانية استعمال بعض الاغذية بوصفها مواد ضارة لتلك السموم ومنها على سبيل المثال العسل والتمور وقشور الرمان الذي اثبتت احدى الدراسات فاعليتها الكبيرة في خفض السموم والتأثيرات السمية للافلاتوكسينات ولهذا اتجهنا الى ايجاد مواد طبيعية قادرة على تخفيف من سمية تلك السموم من خلال استخدام مادة زيت الحبة السوداء *Nigella sative* oil . ينتمي نبات الحبه السوداء جنس *Nigella* الى العائلة الشقائقية (الحوداتية) Ranunculaceae وهو نبات حولي شتوي وعشبي النمو ذات اوراق بسيطة مفصصة تفصصياً عميقا , وان هذه الفصوص خيطية , رمادية, اما ازهاره فهي ذات كوؤس ملونة بيضاء يميزها لونها الازرق وبتلاته متشعبة مرتبطة عند القاعدة ومنفصلة عند القمة بين ما تكون بذوره سوداء ذات رائحة مميزة وطعمه حامض وتوجد في ثمار جرابية [4] . ودرست الحبه السوداء من قبل العديد من الباحثين وحللت مركباتها كيميائياً وتم عزل العديد من المركبات الطبية . ووجد انها تحتوي على زيت اساس Essential oil احماض دهنية Fatty acidوزيت عطري Volatile oil وبروتينات وسكريات ورطوبة 5 – 8 % ورماد 4.5% وصابونينات Saponine وتانينات Tannins وقلويدات Alkaloids وكلايكوسيدات Glycosids وفلافونات Flavonoids [6]. ولوحظ ان للحبة السوداء قيمة غذائية عالية لأحتوائها على العناصر الغذائية الرئيسية فهي غالبا ما تستعمل بالمطيبات الغذائية أو التوابل [15].

المواد وطرائق العمل

أولاً : الكشف عن قدرة عزلات الفطر *A. flavus* على انتاج سموم الافلاتوكسين B_2,B_1 باستعمال تقنية الصفائح الرقيقة (Thin layer chromatography). وقد اتبعت الطريقة التي ذكرها [22] و هي تتضمن الخطوات الآتية:

1.تنقية عزلات الفطر : تم تهيئة أطباق بتري (9سم) حاوية على وسط P.D.A والذي تم تحضيره وذلك بأخذ 200غم من البطاطا بعد غسلها وتقطيعها الى قطع صغيرة ثم وضعها في اناء معدني ثم اضيف لها 1لتر من الماء المقطر وغليت لمدة 30 دقيقة وبعدها رشحت بواسطة قطعة شاش نظيفة واضيف الى الراشح 20غم/لتر سكر الدكستروز و (15)غم /لتر اكار , وعقم الوسط بجهاز الموصدة لمدة 20دقائق وبحرارة 121م˚ وتحت ضغط 1جو وبعد تبريده اضيف اليه المضاد الحيوي كلورامفينيكول بمقداره 250غم/لتر بعدها وضعت اقراص من PDA المنماة عليها عزلة الفطر ***A.flavus*** بقطر 5 ملم في مركز الطبق كررت العملية ثلاث مرات (مكررات) بعدها حضنت الاطباق لمدة 7 ايام .

2. استخلاص سموم الافلاتوكسين B_2,B_1 : تم اتباع طريقة كل من [22] وذلك بأخذ مستعمرة فطرية لكل عزلة من عزلات الفطر التالي على الوسط الزرعي PDA وبعد تقطيعها الى قطع صغيرة نسبيا" ووضعت في خلاط مع

كمية 50 مل من الكلوروفورم تم مزجها لمدة 3 دقائق ثم رشح المزيج بواسطة اوراق ترشيح No.0.01 ركز الراشح بالفرن تحت درجة حرارة 60 مº الى ان جفت العينة وهكذا كررت العملية مع عزلات الفطر المدروسة جميعها .

3. تشخيص سموم الافلاتوكسين B_2,B_1 : تم الكشف عن وجود الافلاتوكسين بأستعمال تقنية صفائح الكروموتوغرافيا الرقيقة TLCوالمطلية بالسيلكا جل لمدة ساعة قبل الاستعمال مع استعمال نظام الفصل المكون من الكلوروفورم والميثانول بنسبة 2:98 ، وتم تحضير السموم القياسية B_2,B_1 بأذابة1ملغم من كل منها في 5 مل من الكلوروفورم ليصبح تركيز كل سم قياسي هو 200 مايكروغرام\مل. بعد ذلك تم أعادة اذابة كل عينة من العينات المحضرة من عزلات الفطر بأضافة 1 مل كلوروفورم ثم وضع السم القياسي B_1 على لوحة السيلكا جل وعلى بعد 1.5 سم من الحافة السفلى بواسطة أنبوبة شعرية وبكمية20 مايكروليتر والى جانب هذه البقعة على حافة 2 سم وضعت بقعة اخرى للسم القياسي B_2 بعد ذلك وضعت بقع عينات العزلات الفطرية بجانب السموم القياسية مع ترك مسافة 2 سم بين بقعة وأخرى وبعد الانتهاء من وضع العينات على صفيحة نقلت الصفيحة ووضعت في حوض الفصل الحاوي على نظام المشار اليه وبكمية 100 مل وتركت الصفيحة في الحوض الى حين وصول الطور المتحرك Mobil Phase الى اقرب نهاية حافة لوحة السيلكا جل 1.5 سم عن الحافة العليا بعدها رفعت اللوحة وتركت قليلا" لتجف ثم فحصت تحت الاشعة فوق البنفسجية 360نانوميتر .

ثانياً : تقييم كفاءة مستخلص زيت الحبة السوداء في معرفة الاثار السامة للأفلاتوكسينB_2,B_1 في النظم الحيوية لذكور الجرد الابيض .

نفذت هذه التجربة وفق الخطوات التالية :

1- تم تهيئة 18 حيوان من ذكور الجرذ الابيض بعمر 8 اسابيع حيث قسمت الى ستة مجاميع كل مجموعة ضمت 3 حيوانات

2- معاملة الحيوانات : وتم تنفيذها بالمعاملات الاتية :

المعاملات	توصيف المعاملات
معاملة AFB_1	جرعت الحيوانات بالأفلاتوكسين B_1 فقط بتركيز 100 مايكروغرام / كغم وزن كل 48 ساعة .
	جرعت الحيوانات بالأفلاتوكسين B_2 فقط بتركيز 100 مايكروغرام / كغم وزن كل 48 ساعة .
معاملة AFB_2	جرعت الحيوانات بالأفلاتوكسين B_1 فقط بتركيز 100 مايكروغرام / كغم وزن وبعد مرور 24 ساعة من التجريع جرعت بمادة زيت الحبة السوداء وبتركيز 1 مل / كغم وزن .
معاملة AFB_1+زيت الحبة السوداء	جرعت الحيوانات بالأفلاتوكسين B_2 فقط بتركيز 100 مايكروغرام / كغم وبعد مرور 24 ساعة من التجريع جرعت بمادة زيت الحبة السوداء وبتركيز 1 مل / كغم وزن .
معاملة AFB_2+زيت الحبة السوداء	جرعت بمادة زيت الحبة السوداء وبتركيز 1 مل / كغم وزن كل 24 ساعة .
معاملة زيت الحبة السوداء	معاملة الحيوانات بالمحلول الفسلجي فقط كل 24 ساعة .
معاملة السيطرة	

كررت هذه المعاملات أربع مرات و على مدار 8 أيام وتركت 14 يوم . و تم خلال هذه المدة متابعة الأعراض السريرية التي يمكن ظهورها على الحيوانات المعاملة و بعد انتهاء مدة التجربة تم التضحية بالحيوانات بعد أن خدرت بمادة الكلوروفورم و شرحت عن طريق فتح التجويف البطني و سحب الدم بطريقة طعنة القلب (Heart puncture) ووضع قسم من الدم المسحوب في انابيب حاوية على مادة التخثر (EDTA) والقسم الآخر وضع في أنابيب غير حاوية على مادة (EDTA) لإجراء فحوصات الدم الفسيولوجية و الكيموحيوية. ثم أخذت أعضاء الكبد و الكلى و الأمعاء من الجرذان و حفظت في مادة الفورمالين بتركيز 10% لدراسة التغيرات الفسلجية فيها [13].

أ: الدراسة الفسلجية : شملت الدراسة الفسلجية الاختبارات الآتية

1- حساب تركيز الهيموغلوبين الكلي : وضع 5 مل من محلول درابكن في أنبوبة اختبار نظيفة وأضيف إليها 0.02 مل من الدم المسحوب رجت الأنبوبة جيدا ثم تركت مدة 10 دقائق بعدها تم تصفير مقياس الهيموغلوبين (Hemoglobin meter) بالماء المقطر , ثم وضع الأنبوب في الجهاز وتمت القراءة بوحدات (G/DL) , وبطول موجي 540 نانوميتر .[5] .

2 - حساب مكداس الدم (P.C.V) : جمعت كمية من الدم في أنابيب شعرية مع ترك 15 ملم من كل أنبوبة فارغة ثم أغلقت إحدى نهايات الأنابيب بالطين الصناعي ووضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي بسرعة (11000 دورة / دقيقة) ولمدة 5 دقائق ، قرأت بعدها النسبة المئوية لمكداس الدم(P.C.V%) بواسطة المسطرة المدرجة(Hematocrit reader). [13]

. (Brown , 1976)

3 - حساب معدل كريات الدم البيض : وضع 0.4 مل من محلول المنظم في أنبوبة اختبار نظيفة وأضيف إليها 0.02 مل من الدم المسحوب بواسطة ماصة سالي , رج المزيج جيدا ثم نقلت قطرة منه الى شريحة Haemocytometer , وفحصت تحت قوة التكبير (100 x) إذ تم حساب عدد كريات الدم البيض وفق المعادلة أدناه :

$$W.B.C.S/\ mm^3 = numbers\ cell\ counted \times 50$$

4- حساب معدل ترسيب كريات الدم الحمراء (E.S.R)

استعملت طريقة Westergreens method لتقدير معدل ترسيب كريات الدم الحمراء , حيث وضع 0.5 مل من محلول التخفيف في أنبوبة زجاجية ثم أضيف اليها 2 مل من الدم ومزجت جيدا وسحب المحلول المتكون بواسطة ماصة ويستر كرين (Westergreens pipette) وعلقت بوضع عمودي قائم لمدة ساعة واحدة بعدها قرئت قيمة E.S.R وسجلت بوحدات (ملم/ ساعة) .

ب : المعايير الكيموحيوية وشملت ماياتي :

اولاً : تقدير فعالية أنزيمي الكبد (GOT و GPT)

1- أنزيم GOT

تم تقدير مستوى أنزيم GOT في مصل دم الحيوانات المعاملة حسب تعليمات الشركة المصنعة (Spain Linear Chemical)وكما هو مبين أدناه:

أنبوبة الكفء Blank	العينة Sample	السيطرة Control	القياسي Standar	المحاليل Solutions
0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	o.4 ml	**GOT substrata**
_	o.1ml	-	-	**Serum**
o.1ml	-	-	0.1ml	**D.W**
_	-	-	0.1ml	**Working pyruvat stander**

حضنت الأنابيب في حمام مائي لمدة 60دقيقة بدرجة حرارة 37 م ° وأضيف إليها مايلي:

أنبوبة الكفء Blank	العينة Sample	أنبوبة السيطرة control	أنبوبة القياسي standar	المحاليل Solutions
0.5ml	0.5ml	0.5ml	0.5ml	**DN.PH**
_	_	0.1ml	-	**Serum**

تركت الأنابيب لمدة 20دقيقة ثم أضيف إليها مادة

5ml	5ml	5ml	5ml	**NaOH(0.4N)**

2-أنزيم GPT

أنبوبة الكفء Blank	العينة sample	أنبوبة السيطرة control	أنبوبة القياسي standar	المحاليل Solutions
0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.4 ml	**GPT substrate**
_	0.1 ml	_	_	**Serum**
0.1 ml	_	_	0.1 ml	**D.W**
_	_	_	0.1 ml	**Working pyruvate stander**

حضنت الأنابيب بدرجة حرارة 37م ° ولمدة 30 دقيقه بعدها يضاف لها :

0.5 ml	0.5 ml	0.5ml	0.5ml	**DN.PH**
–	–	0.1ml	-	**Serum**

تركت لمدة 20 دقيقه ثم أضيف للأنابيب مادة:

5ml	5ml	5ml	5ml	**NaOH(0.4N)**

تركت لمدة 10 دقائق ثم قرأت النماذج على طول موجي 510 نانوميتر بجهاز المطياف .

ثانياَ: تقدير مستوى سكر الكلوكوز في مصل الدم

تم تقدير مستوى سكر الكلوكوز في مصل الدم وحسب تعليمات الشركة المصنعة Spain- Linear chemicals وكما هو مبين أدناه :

أنبوبة الكفء **Blank test**	أنبوبة العينة **Sample test**	أنبوبة القياسي **Standar test**	المحاليل **Solutions**
1 mL	1 ml	1 mL	**Working solution**
–	µ 10	–	**Serum**
–	10 ml	10 ml	**Stander**
10 ml	-	-	**D.W.**

وضعت الأنابيب في حاضنة بدرجة حرارة 37مْ لمدة 5 دقائق وقيست الامتصاصية للنماذج بجهاز المطياف الضوئي وعلى طول موجي 500 نانوميتر وبوحدات dl/mg.

ج. تحضير المقاطع النسيجية Histological Section Preparation

حضرت المقاطع النسجية في مختبر الشرائح المجهرية التابع لمختبر التحليلات / مستشفى الصدر التعليمي، إذ اتبعت طريقة [10]والتي تضمنت ما يلي:

1.الأنكاز(Dehydration) :

مررت النماذج في تراكيز تصاعدية من الكحول الأثيلي(70 , 80 , 90 , 95 , 100 و 100 %) لمدة 1.5-2 ساعة في كل تركيز و ذلك لإزالة الماء منها.

2.الترويق(Clearing) :

روقت العينات بالزايلين مرتين و لمدة 1-1.5 ساعة لكل مرة و ذلك لإزالة محلول الأنكاز من الأنسجة

3.التشريب (Infiltration):

شربت العينات بشمع البرافين المنصهر بدرجة حرارة 56-58ْم و ذلك بوضع العينات فيها مرتين و لمدة 1 - 1.5 ساعة لكل مرة .

4.الطمر (Embedding) :

طمرت العينات في قوالب خاصة حاوية على شمع البرافين المنصهر و تركت لتتصلب.

5. التقطيع(Sectioning) :

حضرت مقاطع نسيجية متسلسلة بسمك 5 مايكرومتر بإستعمال جهاز المشراح الدوار (Rotary microtome) و ثبتت النماذج على شرائح زجاجية بإستعمال لاصق البومين مايز(Meyer 's albumine) بعدها وضعت الشرائح في الفرن بدرجة 56-58 م^{o} بصورة عمودية لمدة 20 دقيقة لإزالة الشمع الزائد .

6. التصبيغ(Staining):

صبغت المقاطع بصبغة الهيماتوكسلين إذ مررت الشرائح في (زايلين-كحول أثيلي مطلق 100%- كحول 95%- 90 %- 70 %- صبغة الهيماتوكسلين) لمدة دقيقتين لكل منها ، ثم غسلت المقاطع بماء الحنفية ، و غطست في صبغة الآيوسين لمدة دقيقتين و غسلت بعدها بماء الحنفية ثم مررت بتراكيز تصاعدية في كل من الكحول الأثيلي (70%-90%-95%-100%) و الزايلين و لمدة دقيقتين لكل تركيز.

7. التحميل(Mounting) :

وضع غطاء الشريحة بإستعمال كندا بلسم . وبعدها تم تشخيص المقاطع النسيجية لملاحظة التغيرات النسيجية من قبل أ.م .د. حيدرصالح جفات - كلية العلوم / جامعة الكوفة .

النتائج والمناقشة

أولا : تقييم كفاءة مادة زيت الحبة السوداء *Nigella Sativa* Oil في الحد من الأثار السامة للأفلاتوكسين B_1 وB_2 في النظم الحيوية لذكور الجرذ الأبيض .

أ. المعايير الفسلجية :

1- معدل تركيز الهيموغلوبين: أوضحت النتائج أن المعاملات AFB_1 و AFB_2 أثرت سلباً في أنخفاض معدلات تركيز الهيموغلوبين في دم الحيوانات المعاملة بها أذ أنخفض الى (7.9 , 8.6)غم / 100مل مقارنة بمعاملة السيطرة البالغة 11.23 غم / 100 مل وأثبتت نتائج الأختبار أن مادة زيت الحبة السوداء الفعل الأيجابي في رفع تركيز الهيموغلوبين الى النسبة الطبيعية أذ بلغت 12.0 / 100مل مقارنة بمعاملات الافلاتوكسينB_1 وزيت الحبة السوداء والافلاتوكسينB_2 وزيت الحبة السوداء والبالغة 11.2 , 11.8 غم / 100 مل.جدول (1) .

وهذه النتيجة مقاربة لما توصل اليه [3] ان استخدام مادة العسل مع سموم الافلاتوكسين B_1 , B_2 وكلاً على حده خفضت من التأثير السمي لهذه السموم اذ بلغت معدلات تركيز الهيموغلوبين (12.4 و 11.8) غم / 100مل على التتالي مقارنة بمعاملة السيطرة . وهذه النتيجة مقاربة أيضاً لما ذكره [2] ان استخدام مستخلص قشور الرمان المائي مع سموم الافلاتوكسين B_1 , B_2 وكلاً على حده خفض من التأثير السمي لهذه

السموم اذ بلغت معدلات تركيز الهيموغلوبين (12 و 11.8) غم /100مل على التتالي مقارنة بمعاملة السيطرة 12.1 غم/100مل .

وقد يرجع سبب أنخفاض تراكيز الهيموغلوبين في دم الحيوانات المعاملة بالأفلاتكوكسين B_1 وB_2 الى زيادة الأنتاج المفرط لعوامل الأستجابة المناعية ومنها السايتوكاينيز عند الحيوان المجرع بالسموم التي تسبب زيادة عملية الأكسدة في الخلية مما يزيد الجذور الحرة التي تهاجم خلايا الدم الحمراء مسببة تحطمها وبالتالي قلة الهيموغلوبين وكذلك قد يعود السبب الى أن الأفلاتوكسينات لها القابلية على الأرتباط الشديد في بروتينات الدم التي تشمل الألبومين والكلوبيولين والترانسفرين المسوؤلة عن تخليق الكريات الدم الحمر مما ينتج عنه قلة كميتها أو أنها تؤثر في التوازن الدموي وهذا ماأشار أليه [20].وقد أشارت دراسات عديدة الى قدرة زيت الحبة السوداء على زيادة معدل تركيز الهيموغلوبين في الحيوانات المعاملة بهذه السموم وقد يرجع ذلك الى أحتواء هذا الزيت على المكونات الأساسية من البروتينات والكلوبيولينات وذلك لأحتواء ايضاً على عناصر أهمها الحديد والنحاس اللذان يدخلان في بناء الهيموغلوبين وكذلك أعزي سبب هذا الأرتفاع الى وجود مواد فعالة أهمها Nigellin و Nigellon الذي يعود لهما الأثر الطبي أضافة الى مادة الفسفور ومادة الكاروتين (مولد فيتامين A) . [25] .

2- معدل مكداس الدم P.C.V

اثبتت نتائج هذا الأختبار ان معاملة الحيوانات بسموم الأفلاتوكسين B_2,B_1 أثر سلباً في خفض معدلات مكداس الدم اذ بلغت (23.9, 25.5) % مقارنة بمعاملة السيطرة البالغة 34 % في حين كانت جميع معاملات مادة زيت الحبة السوداء مع الافلاتوكسينات B_2,B_1 أثر أيجابي في رفع مكداس الدم للحيوانات المعاملة ضمن الحدود الطبيعية أذ بلغت (33.6 , 36)% على التتالي مقارنة بمعاملة زيت الحبة السوداء البالغة 38% .

وهذه النتائج مقاربة لما توصل أليه[17] اذ انخفض معدل مكداس الدم في الجرذان المحقونة بسم الأوكراتوكسين والستريتين خلال حقن 6 أسابيع . وهذه النتيجة مطابقة لما توصل اليه [2] ان استخدام مستخلص قشور الرمان المائي مع سموم الافلاتوكسين B_2 , B_1 وكلاً على حده خفض من التأثير السمي لهذه السموم اذ بلغت معدلات مكداس الدم (34.6 و 31) % مقارنة بمعاملة السيطرة 37.3% .

وقد يرجع السبب في أنخفاض معدل مكداس الدم الى تأثير تلك السموم على مصادر انتاج كريات الدم الحمر في نخاع العظم . أذ أن هناك علاقة طردية بين التعداد الكلي لكريات الدم الحمر ومكداس الدم. ومن جانب أخر يمكن تفسير الأرتفاع الحاصل في مكداس الدم في الحيوانات المعاملة بزيت الحبة السوداء الى وجود أحماض أمينية مشبعه وغير مشبعه بنسبة كبيرة وبروتينات وعناصر معينة وأحماض امينية تلعب دوراً مهماً في تصنيع البروتينات والأنزيمات. جدول رقم (1) .

3- معدل تعداد خلايا الدم البيض W.B.C

أظهرت النتائج المبينة في الجدول (1) الى أرتفاع معدل كريات الدم البيض في دم الحيوانات المعاملة بسموم الأفلاتوكسين B_1 وB_2 حيث بلغت (12340 , 12000) كرية / ملم^3 على التتالي وبفارق معنوي عن معاملة السيطرة البالغة (8333.3) وأدى أستعمال مادة زيت الحبة السوداء مع تلك السموم عودة معدلات أعداد الخلايا الدم البيض الى المستوى الطبيعي حيث بلغت في معاملتي (AFB1+زيت الحبة السوداء) و (AFB2+زيت الحبة السوداء) (8675 , 8420)كرية / ملم^3 على التتالي في بعاملة زيت الحبة السوداء البالغة 8400 كرية / ملم^3 .

وهذه النتيجة مقاربة لما توصل اليه[2] ان استخدام مستخلص قشور الرمان المائي مع سموم الافلاتوكسين B_2 , B_1 وكلاً على حده خفض من التأثير السمي لهذه السموم اذ بلغ معدل تعداد خلايا الدم البيض الى(8500و 7000) كرية / ملم^{3}مقارنة بمعاملة السيطرة 8600 كرية / ملم^3.

أن بسبب زيادة معدل كريات الدم البيض يعود الى وجود أفرازات للمنتجات الأيضية من قبل الفطر *A. flavus* تسبب في حدوث أفراز مفرط في عوامل الأستجابة المناعية ومنها (TEM) (Cytokinase) (Inter Leukir) (Tumer necrosis) وخاصة السايتوكاينز المسؤول عن حدوث الألتهاب الأولي وهو مسؤول في الأستجابة المناعية [19] . وأن الأنتاج المفرط لهذه المكونات من المحتمل أن يكون سبب هذه الزيادة في أعداد كريات الدم البيض في دم الجرذان البيض المعاملة بالسموم .

4- معدل ترسيب كريات الدم الحمراء (E.S.R) :

بينت النتائج الاختبار ارتفاع معدل ترسيب كريات الدم الحمراء في الحيونات المعاملة بسموم الافلاتوكسين B_2 , B_1 اذ بلغت (3.0 و 2.6) ملم / ساعة مقارنة بمعاملة السيطرة البالغة 1.3 ملم / ساعة في حين انخفضت هذه المعدلات الى (1.9 و 1.7) ملم /ساعة في معاملتي زيت الحبة السوداء مع الافلاتوكسين B_1 , B_2 على التتالي مقارنة بمعاملة زيت الحبة السوداء البالغة 1.4 متم / ساعة . جدول (1) .

وهذه النتيجة مقاربة لما توصل [7] ان علائق الحيوانات الملوثة بالفطر *A. flavus* والافلاتوكسين B_2 , B_1 قد سبب في ارتفاع معدل ترسيب كريات الدم الحمراء لدى الطيور المعاملة اذ بلغت (4.8) ملم /ساعة مقارنة بمعاملة السيطرة البالغة 1.3 ملم /ساعة .

جدول (1) تاثير مادة زيت الحبة السوداء *Nigella sative* Oil في خفض الاثار السمية في بعض معايير الدم الفسلجية لذكور الجرذ الابيض الناجمة عن الافلاتوكسينات المختبرة

المعاملة	Hb غم\100مل	P.C.V (%)	W.B.C كرية\ملم^3	E.S.R ملم\ ساعة
معاملة AFB_1 فقط	7.9	23.9	12340	3.0
معاملة AFB_2 فقط	8.6	25.5	12000	2.6
معاملة زيت الحبة السوداء + AFB_1	11.2	33.6	8675	1.9
معاملة زيت الحبة السوداء + AFB_2	11.8	36	8420	1.7
معاملة زيت الحبة السوداء فقط	12.0	38	8400	1.4
معاملة السيطرة بدون أي اضافة	11.23	34	8333.3	1.3
L.S.D	0.92	5.07	527.66	0.9

ثانياَ: تأثير مادة زيت الحبة السوداء في خفض التأثيرات السمية للافلاتوكسينات المختبرة على بعض معايير الدم الكيموحيوية لذكور الجرذ الابيض :

1 - مستوى السكر في الدم (R.P.S) :

بينت نتائج هذا الاختبار ان دم الحيوانات المعاملة بسموم الأفلاتوكسين B_1 و B_2 وكلاَ على حده حصل فيها ارتفاعا في مستوى سكر الدم الى (136.6 و 134.6) ملغم\100مل على التتالي و بفارق معنوي $p \leq 0.05$ عن معاملة السيطرة البالغة (93.6) ملغم\ 100مل . في حين كان لمعاملة زيت الحبة السوداء اثر ايجابي في خفض مستوى سكر الدم عند معاملة الحيوانات (زيت الحبة السوداءمع الافلاتوكسين B_1 وB_2 كلاَ على حده اذ بلغت (104.6و 98) ملغم \100مل مقارنة بمعاملة السيطرة . و هذه الدراسة تتفق مع ما توصل اليه [24] ان السموم المنتجة من قبل الفطر *Pencillium* مثل الاوكراتوكسين A و حامض البنسلين Penicillinic acid و المعطاة للدجاج قد تسبب في خفض مستوى الكولسترول و رفع مستوى السكر في دم الدجاج المعامل مقارنة مع معاملة السيطرة, فقد وجد[23] في تجاربه السريرية على مرضى داء السكري ان زيت الحبة السوداء ومكوناته الفعالة له تأثير فعال في معالجة مرضى الداء السكري . (جدول 2).

2- تقدير مستوى انزيمي الكبد Gpt , Got:

أوضحت النتائج المبينة في الجدول (2) ان معاملات الأفلاتوكسينات B_1 , B_2 كلاَ على حده أثرت معنوياَ في رفع معدل انزيم الكبد Got حيث بلغ (22.3 و 22.2) وحدة دولية \لتر على التتالي مقارنة بمعاملة السيطرة البالغة 18.5 وحدة دولية \لتر وأدى أستعمال مادة زيت الحبة السوداء مع تلك السموم عودة معدلات أنزيم Got الى المستوى الطبيعي حيث بلغت في معاملتي زيت الحبة السوداء وسموم B_1 و B_2 وكلاَ على حده الى (19.5و 19.3) وحدة دولية\لتر مقارنة بمعاملتي السيطرة (18.5 و 18.6) وحدة دولية\ لتر . في حين كان لانزيم Gpt أثراَ معنويا في دم الحيوانات المعاملة بسموم الافلاتوكسينB_1 , B_2 اذ بلغ (20.3 و 19.9)وحدة دولية\ لتر على التتالي مقارنة مع معاملة السيطرة البالغة 18.3 وحدة دولية \ لتر وكانت معاملة زيت الحبة السوداء مع سم , B_2 B_1 وكلاَ على حده قد خفض من تركيز انزيم Gpt الى (18.5 و 18) وحدة دولية\لتر . جدول (2) . وهذا التأثير ربما يعود على تغير في وظائفه [16]) . وهذه النتائج مقاربة لعدد من الدراسات فقد أشار [12] الى ان سموم الترايكوشينات رفعت مستوى انزيمي GoT و GpT, و جاءت نتائج الباحثين [11] متفقة مع نتائج هذه الدراسة اذ وجدت ان سموم الفطر *Penicillium* spp. مثل Ochratoxin A و Penicillic acid ترفع من مستوى هذين الانزيمين.

ويعزى سبب هذا الارتفاع الى ان للسموم الفطرية تأثيرات متعددة على خلايا الكبد منها حدوث تحلل لهذه الخلايا علما ان هذه الخلايا تحتوي على هذين الانزيمين مما يؤدي الى تحررهما و من ثم ارتفاع مستواهما في الدم أو ان السموم تؤثر في أعضاء أخرى كالكلية و أغشية الشبكة الاندوبلازمية, اذ يتواجد فيها هذين الانزيمين أيضا اذ ان سموم الأفلاتوكسينات B_1 و B_2 تحدث خللا في نظام النقل الحيوي في الجسم [21].

ومن جانب آخر يمكن تفسير قدرة معاملات زيت الحبة السوداء المتداخلة مع سموم الأفلاتوكسين B_1 و B_2 في انخفاض مستوى الانزيمين و يرجع الى ان مكونات هذه المادة هي التي تعمل على وقاية وظائف الكبد من الأضرار الناتجة عن السموم . [9] .

Al-Kufa University Journal for Biology / VOL.9 / NO.1 / Year: 2017
Print ISSN: 2073-8854 & Online ISSN: 2311-6544

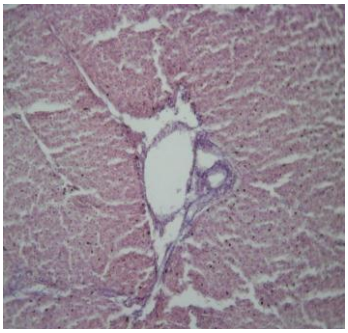
جدول (2) تاثير مادة زيت الحبة السوداء *Nigella sative* Oil في خفض الاثار السمية في بعض معايير الدم الكيموحيوية لذكور الجرذ الابيض الناجمة عن الافلاتوكسينات المختبرة

المعاملة	GOT وحدة دولية \ لتر	GPT وحدة دولية \ لتر	ملغم \ 100مل Sugar
معاملة AFB_1 فقط	22.3	20.3	136.6
معاملة AFB_2 فقط	22.2	19.9	134.6
معاملة زيت الحبة السوداء + AFB_1	19.5	18.5	104.6
معاملة زيت الحبة السوداء + AFB_2	19.3	18	98
معاملة الحبة السوداء فقط	18.6	18.3	91
معاملة السيطرة بدون أي اضافة	18.5	18.3	93.6
L.S.D	2.07	1.4	12.6

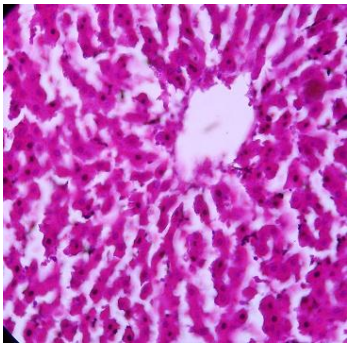
ثالثاً : الدراسة النسيجية :

أثبتت الدراسة النسيجية ان مادة زيت الحبة السوداء قد وفرت حماية لأنسجة الاعضاء المدروسة (الكبد , الكلى والامعاء) من التغيرات المرضية الحاصلة في تلك الأنسجة من جراء سموم الافلاتوكسين B_1 , B_2 ، في حين خفضت معاملة زيت الحبة السوداء من التأثير السمي لهذه السموم اذ بينت النتائج من عدم وجود اي تغير نسيجي مرضي في نسيج الكبد والامعاء باستثناء نسيج الكلى والمتمثل في حدوث تضخم بسيط في جدار الكبيبة . (صورة 1 ,2 ,3).

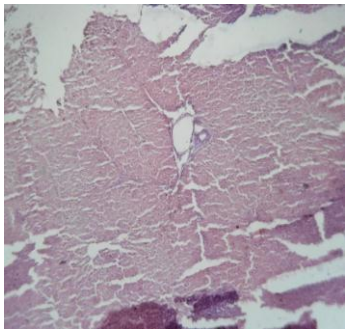
وترجع قدرة مادة زيت الحبة السوداء على حماية تلك الأنسجة من آثار الافلاتوكسينB_1,B_2 غير معروفة لحد الأن عدم وجود دراسة سابقة حول هذا الموضوع بحسب المصادر المتوفرة .



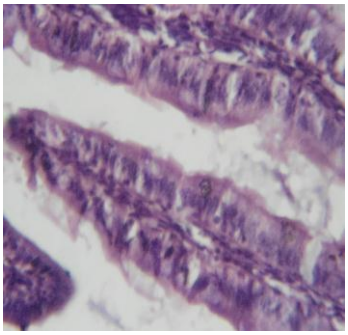
- معاملة السيطرة Aصورة (1) (بدون إضافة أي شيء)



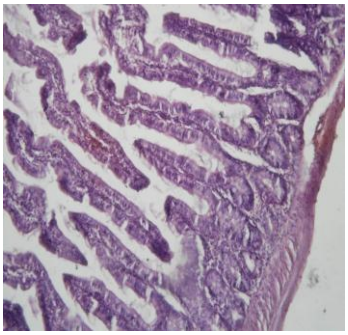
- مقطع في نسيج الكبد لذكور الجرذ B الأبيض (معاملة زيت الحبة السوداء مع الافلاتوكسين B_1)



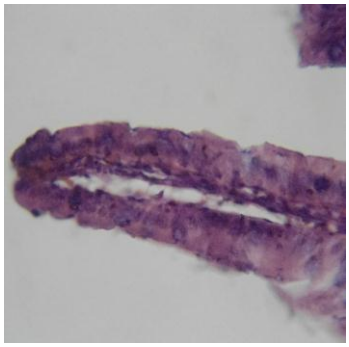
- مقطع في نسيج الكبد لذكور الجرذ C الأبيض (معاملة زيت الحبة السوداء مع الافلاتوكسين B_2)



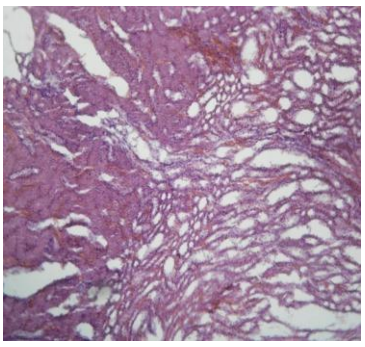
- معاملة السيطرة Aصورة 2) ((بدون إضافة أي شيء)



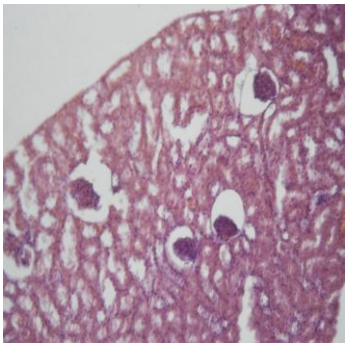
- مقطع في نسيج الأمعاء لذكور B الجرذ الأبيض (معاملة زيت الحبة السوداء مع الافلاتوكسين B_1)



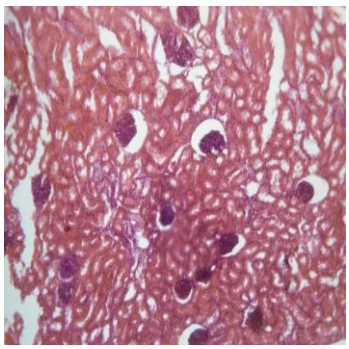
- مقطع في نسيج الأمعاء لذكور C الجرذ الأبيض (معاملة زيت الحبة السوداء مع الافلاتوكسين B_2)



- معاملة السيطرة Aصورة (3) (بدون إضافة أي شيء)



- مقطع في نسيج الكلية لذكور B الجرذ الأبيض (معاملة زيت الحبة السوداء مع الافلاتوكسين B_1)



- مقطع في نسيج الكلية لذكور C الجرذ الأبيض (معاملة زيت الحبة السوداء مع الافلاتوكسين B_2)

المصادر

1. **أبراهيم،أسماعيل خليل وكركز محمد ثلج الجبوري. (1998).**السموم الفطرية.الطبعة الثانية.مركز اباء للابحاث الزراعية.
2. **الجبوري ، سهاد محمد مدفون . (2012) .** دراسة امكانية استخدام بعض المواد الطبيعية في التقليل من الاثار السمية للافلاتوكسينات B_1 , B_2 في النظم الحيوية لذكور الجرذ الابيض . رسالة ماجستير . كلية العلوم - جامعة الكوفة .
3. **الخلف ، سما صفاء عبد الامير . (2011) .** دراسة التأثيرات السمية للفطر*Aspergillus flavus* على بعض المعايير الفسيولوجية والكيموحيوية والنسيجية لدى لذ كورالجرذ الابيض وإمكانية السيطرة في الحد من تلك التأثيرات . رسالة ماجستير. كلية العلوم -جامعة الكوفة .
4. **الدجوي، علي .(1996) .** موسوعة إنتاج النباتات الطبية والعطرية .الكتاب الأول ،مطبعة مد بولي،مصر .
5. **سود،رمنيك.(1992).**تقنية المختبر الطبي،طرائق وتفسيرات (ترجمة د.صالح خميس،د.عبد الرزاق جبار ود.باقر عبيس).وزارة التعليم العالي والبحث العلمي-بغداد ،العراق.
6. **العاني ، رقيب عاكف وميسر مجيد جرجيس وكامل سلمان جبر .(1989).**أمراض المحاصيل الحقلية .وزارة التعليم العالي والبحث العلمي - جا معة بغداد .
7. **العبيدي ، اثير باسل عباس .(2011).** تصنيع مستحضر حيوي من البكتريا *Bacillus licheniformis* لمكافحة بعض الفطريات المنتجة لسموم الافلاتوكسن في علائق الدواجن. . اطروحة دكتوراه. كلية العلوم - جامعة الكوفة .
8. **ميخائيل ،سمير وتركي بيد ر،(1982).** أمراض البذور . دار الكتب للطباعة والنشر - جامعة الموصل .
9. **AL- Qarawi A.A.;Musa H.M.;Ali B.E.H.;Abdel-Rahman H. and EL-Mougy S.A.(2004).**Protective effect of extacts from dates (phoenix dactylifera L.) on carbon tetra chloride- induced hepatotoxicity in rats. Intern JAPPI.Res.Vet.Med;2 :176-180 .
10. **Bancroft, J.D. and Stevens A.(1982).** Theory and practice of Histology techniques . Churchill living Stone , New -York.117.
11. **Benkerroum,S.and Elaraki,T.A.(2001).**Study of toxiginic moulds and mycotoxin in poultry feed .Review .Med.Vet.125(4):335-342.
12. Bondy,G.S.and Pestka,J.J.(2002). Immunodulation by fungal toxins .J.Toxins.Toxicol.Enu Health. B.3:109-143.
13. **Brown,B.A.(1976).**Principles and procedure.2nd ed.,Lea and Febiger .Philadelphia.New York.pp,78.
14. **Cast,. (2003)**. Mycotoxins: risks in plant , , animal, and human systems . (Council for Agricultural Science and Technology) .Task Force Report , Ames low ,USA,No. 139, PP,45-60.

.15 **Chakravarly,H.L.(1976).** Plant weath of Iraq . Adiction ary of economic Plants .Vol.1.Botany directorate, Ministry of Agriculture and Agrarian Reform , Baghdad .

.16 **Doill,R.and Peto,R.(1981).**The cause of cancer: quantities estimates of avoidable risk of cancer in united state tody .J.Nat.Cancer Inst.66:1193

.17 **Gupta,M.;Sasmal,D.;Bandyo Padhyay S.;Bagchi G.;Chatterjee,T.and Dey,S.(1983).**Hematology changes produced in mice by Ochratoxin A and citrinin toxicology.26(1):55-62.

.18 **Jonsyn-Ellis ,F.E.(2000).**Seasonal variation in exposure frequency and concentration levels of aflatoxins and ochratoxins in urine samples of boys and girls.Mycopathologia.152:35-40.

.19 **A.;David, M.;Broti ,M.(1998).**Histopathology ,O.Chuchil Living stone **.Kemacki** .New York.pp:12-14.

.20 **Kubena, L.F. ; Harry, R. B. ; Corrier,D. E. and Huff,W. E.(1997) .** Effect of feeding contaminated with DON and vomitoxin in female white leghorn chickens from day old throught egg production .poult .sci.66:1612-1618.

.21 **Meerdink,G.L.(2004).**Aflatoxins.In plumtee,Kilt.(ed.). Clinical veterinary toxicology.LitteRock,Arkamsas.USA.PP:231-235.Mickrochim.1(2):89- 96.

.22 **Sobolev V.S. , Dorner J.W. (2002).**Cleanup procedure for determination of aflatoxins in major agricultural commodities by liquid chromatography . *Journal of Association of Official Analytical Chemists International* ,85: 642- 45 .

.23 **Srinivasan,K.(2005).**Plant foods in the management of diabetes mellitus :Spices as beneficial and diabetic food adjuncts International Journal of food sciences and Nutrition,56(6):399-414.

.24 **Stoytocho,S. Geno , A. and Dimitar ,P.L.P.(1999)**. Some antidotes and paraclinical investigations in experimental intoxication with Ochratoxins A and penicillic acid in chicks .Veterinarski.Arhiv .69(4):179-189.

.25 **Ur- Rahman A. and Malik S. (1985)** . Isolation and structure determination of *Nigelliciu ,* anoval alkaloid from the seed of *Nigella sativa* . Tetrahedron letters , 26 (23) ; 2759 _ 62 .

Astudy of *Nigella sativa* oil effect on some physiological and biochemical parameters in male albino rate treated with aflatoxins B_1 and B_2

Abstrect

The present study indicate the *Nigella sativa* oil has great effect on physiological and biochemical parameters .It rises the rate of (WBCs)to (12000,12343) cell\mm^3.in animal treated by AFB_1 and AFB_2 compare with control treated by (8333.3) cell\mm^3 More over the result s show that Nigella sativa oil has reduced therateof (WBCs) the inclued in normal rates when used blood treated by with aflatoxins (AFB_1+ *Nigella sativa* oil, AFB_2 + *Nigella sativa* oil) to (8420,8675) cell\mm_3 respectively ,at the same time the hemoglobin concentration rate was decreased to (7.9,8.6)g\100ml when the animales trearedby B1 and B2. When as *Nigella sativa* oil was posstive effect of sigificant riase of hemoglobin concentration of animal which treated by (AFB1+ *Nigella sativa* oil, AFB2+ *Nigella sativa oil*) to (11.2,11.8)g\100 ml compared with control treatment (with out in addition) to (11.23) g\100 ml and *Nigella sativa* oil treatment (12.0) g\100 ml .

Either (P.C.V) was observed clear decreased of animal treated in B_1,B_2 that reached (25.5,23.9)% compared with control treatmen(34)%t.while as The presentage (AFB_1+ *Nigella sativa* oil ,AFB_2+ *Nigella sativa oil*)to (33.6,36)% respectively. when used Red blood cells sidement rates were increased of of E.S.R.animal treatment by AFB_1andAFB_2 to(2.6,3.0)mm\hr compered with control treatment (1.3)mm\hr,when as decrease in *Nigella sativa* oil with present aflatoxins aflatoxinsB_1,B_2 both in one from E.S.R.value to(1.5) mm\ hr that compared with control (1.3) mm\ hr More over the results refer that the treatment (AFB_1, AFB_2) have clear role rising of liver enzymes GOT to (22.2,22.3)IU\L respectively. Compared with the control l ment(18.5)IU\L. and the same as the ratio of GPT enzymes that concentration was increased the enzymes GPT, GOT treated by B_1 B_2 both in one to (19.9,20.3) IU\L respectively.Compared with the control treatment to(18.3) IU\L .

When as blood suger rate was increased (RPS) to (136.6,134.6) mg\100ml suger when the animal treatment by (AFB_1,AFB_2) compared with the control treated .While as reached (104.6,98)mg\100 ml suger when animal treatment of (AFB_1+ *Nigella sativa* oil,AFB_2+ *Nigella sativa* oil) compared by control reached to (93.6)mg\100ml suger ,the results improved that histological study the organes(liver, kideny and inestinal) that the aflatoxins B_1 and B_2 that effected and caused occurrence severs histological changenes that repesentive of presen t congestion and bleeding in arteries and veins of liver and enlargementof cell as well as to inflammation of glomeruli of renal necrosis in the intestinal and the fall of the villi and analyzes. The substance *Nigella sativa oil* was alleviuting the pathology effects of these organ referred to as the results and some time removal that effects in the tissue study.