------مجلة علوم الرافدين، المجلد 24، العدد 2، ص65-80، 2013------

عزل ودراسة تأثير التانينات والزيت والفلافونويدات والمركبات البروتينية وغير البروتينية المفصولة من نبات الغافث على الفئران المعرضة للكرب التأكسدي

محمد بحري السعدون **رضوى دحام عبد الهادي**

قسم الكيمياء

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 25/ 9 /2012 ؛ تاريخ القبول 26 /11 / 2012)

الملخص

تضمن البحث تحضير مستخلص مائي بارد لنبات الغافث *Agrimonia Eupatoria* وتم عزل التانينات والزيت والفلافونويدات من هذا النبات، كما تم عزل المركبات البروتينية بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفصل الحاوي على الهلام من نوع Sephadex G-50. إذ تم فصل مركبين هما المركب A وزنه الجزيئي (264667) دالتون والمركب B وزنه الجزيئي (3958) دالتون من الراسب البروتيني البارد. كما تضمن البحث دراسة تأثير المستخلص والمركبات المذكورة أعلاه على مستويات الكلوكوز والكولسترول الكلي وثلاثي الكليسيريد وكولسترول البروتين الدهني عالي الكثافة وكولسترول البروتين الدهني واطئ الكثافة وكولسترول البروتين الدهني واطئ الكثافة جدا في مصل الدم، وكذلك مستويات الكلوتاثايون والمالونداليالديهايد في أنسجة الكبد والكلية والقلب في ذكور الفئران المعرضة للكرب التأكسدي عن طريق الحقن بالتجويف البريتوني.

وأشارت النتائج بعد المعاملة إلى أن المستخلص المائي الخام البارد والمستخلص غير البروتيني والتانينات والزيت والفلافونويدات والراسب البروتيني البارد والمركب البروتيني A والمركب البيتيدي B وبجرع (300 ,17.3 ,4.6 ,5.28 ,17.8 ,3.04 ,5.9 ,10.3) ملغم/كغم من وزن الجسم أدت إلى انخفاض معنوي ($p<0.05$) في مستويات الكلوكوز والكولسترول الكلي وثلاثي الكليسيريد وكولسترول البروتين الدهني واطئ الكثافة وكولسترول البروتين الدهني واطئ الكثافة جدا في مصل الدم ومستوى المالونداليالديهايد في أنسجة الكبد والقلب والكلية. بينما أحدثت ارتفاعا معنويا ($p < 0.05$) في مستوى كوليستيرول البروتين الدهني عالي الكثافة في مصل الدم ومستوى الكلوتاثايون في أنسجة الكبد والكلية والقلب، في حين أحدث المركب البيتيدي B انخفاضا معنويا ($p < 0.05$) في مستوى كولسترول البروتين الدهني عالي الكثافة في مصل الدم. ويمكن الاستنتاج بأن الفلافونويدات لها تأثير اكبر في خفض سكر الدم وأصناف الاوكسجين الفعالة.

Isolating and Studying Effect of Tannins, Oil, Flavonoids , Proteinous and non -proteinous Compounds from (*Agrimonia Eupatoria)* on Mice Exposed to Oxidative Stress

Mohammed B. Al-Saadon **Radwa D. Al-Hadi**
Department of Chemistry
College of Science
University of Mosul

ABSTRACT

The research is concerned with preparing a cold aqueous extracts of *Agrimonia Eupatoria*, to isolate oil, tannins, and falvonoids and proteinous and non proteinous compounds by gel filtration technique and using column containing gel type Sephadex G-50.Two compounds: A M.wt (264667) Dalton, B M.wt (3958) Dalton from the cold protienous precipitate were isolated. The effect of these extracts and the compounds mentioned above was studied on serum glucose, total cholesterol, triglyceride, high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C), low density lipoprotein- cholesterol (LDL-C) and very low density lipoprotein-cholesterol levels, also glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) levels in liver, kidney and heart tissues in mice exposed to oxidative stress via the intra-peritoneally injection.

The results obtained from this study showed that the cold crude aqueous, non-protienous extracts, protenious precipitate, proteinous and peptidic compounds, also the tannins, oil, and falvonoids at the doses of (300, 17.3, 3.04, 5.9, 10.3, 4.6, 5.28, 17.8) mg/kg body weights caused a significant decrease ($p<0.05$) in serum glucose, TC., TG., (LDL-C), (VLDL) and MDA level in liver, kidney and heart tissues. However, a significant increase ($p<0.05$) in serum HDL-C level and GSH level in liver, kidney and heart tissues in mice exposed to oxidative stress was observed while B peptidic compound caused a significant decrease in serum HDL-C level.

Finally, it was found that the falvonoids is more effective as a hypoglycemic and reactive oxygen spices.

المقدمة

الغافث هي عشبه معمرة من النباتات الوعائية المزهرة التي تنتمي الى العائلة الوردية والرتبة ثنائيـة الفلقة. وهي ذات اشواك ناعمة. يبلغ ارتفاع هذه العشبة بحدود (1 م)، ويكون ساقها مكسواً بشعيرات خـشنة وأشواك معقوفة وأوراق مسننة وسطحها الأسفل مكسواً بشعيرات رمادية. أما أزهارهـا فـصغيرة الحجـم صفراء اللون تظهر بشكل مجموعات عنقودية وهي ذات رائحة عطرية. يتواجـد الغافـث فـي الأحـراش المشمسة ومنحدرات الجبال، يتواجد الغافث في أربيل والسليمانية وبعقوبة. وينتشر في الأجزاء المعتدلة ويمتد انتشاره حتى يبلغ شمال ووسط وشرق أوربا وينمو في المراعي والغابات وعلـى جوانـب الطـرق وفـي الأراضي المنخفضة حتى سفوح المرتفعات الجبلية (سعد الدين، 1986).

إن الاسم العلمي لنبات الغافث هو *Agrimonia eupatoria* ، أما الأسماء الشائعة الأخرى فإنها تختلف باختلاف اللغات والبلدان، اذ يعرف بالعربية الغافث ويعرف بالانكليزية Agrimony، Liverwort ، Stickwort (مجيد و محمود، 1988). استخدم الغافث بصفة عشب علاجي لقرون طويلة، وقد كان أحد أشهر الأعشاب الشافية بوصفه دواء قابضاً للأنسجة (يعمل على وقف النزف)، ومضاداً للالتهابات (Copland *et al.*, 2003)، لعلاج النزيف المصاحب للسعال والقيء والدم في البول والإسهال ونزيف الرحم، وهو مدرر للبول، كما يستخدم في معالجة الأمراض الجلدية واليرقان، والتهاب الفم والحلق المتقرحين، وكان للغافث سمعة كبيرة لمعالجة الصفراء ومشكلات الكبد (Jingzheng, 2004).

إن الكرب التأكسدي (oxidative stress) الذي ينتج عن نقصان في الأنظمة المضادة للأكسدة بالجسم التي تزيل أصناف الأوكسجين الفعالة Reactive oxygen species (ROS) التي لها فعالية مؤكسدة للخلايا (Robertson, 2004). يعد الكرب ألتأكسدي مسؤولاً عن الكثير من الأمراض والمتلازمات المعقدة والتي تسبب أكسدة LDL-C، فضلا عن تأثيره في اوكسيد النتريك (NO) على الخلايا البطانية للشرايين والخلايا العضلية الملساء بالإضافة لتأثيره السلبي في أيض البروتين داخل الخلية (Thum and Borlak, 2004) كما له تأثير على اوكسيد النتريك، لقد لوحظ زيادة في الكرب التأكسدي عند مرضى داء السكر (Mooradian and Haas, 2011) كذلك يمكن للكرب التاكسدي أن يعمل على زيادة خطورة التعرض لأمراض القلب، يزداد تكون أصناف الاوكسجين الفعالة وتحررها في عدة حالات منها انخفاض مضادات الأكسدة، الشيخوخة، التلوث البيئي، التدخين، الإشعاع وبعض الأدوية (Djeridane *et al.*, 2006).

المواد المستعملة وطرائق العمل

جمع النبات المستعمل:

تم الحصول على نبات الغافث من الأسواق المحلية في مدينة الموصل، وصنف في كلية التربيـة/قـسم علوم الحياة.

تحضير المستخلص المائي البارد لنبات الغافث :

وزن (300) غرام من النبات، ومزج مع الماء المقطر البـارد بنـسبة (1 وزن :3 حجـم)، وسـحق باستخدام آلة الثرم (Blender) لمدة (10) دقائق ثم جمد المزيج لمدة 3 ايام، وتم تكـسير المـزيج كـل 24 ساعة لغرض تحطيم جدران الخلايا، ثم رشح من خلال عدة طبقات من الشاش وفصل المستخلص بجهـاز الطرد المركزي للتخلص من المواد غير الذائبة لمدة (15) دقيقة بسرعة (33520xg) للحصول على راشح رائق (عبد المانع، 2002)، قيس حجم الراشح حيث بلغ (788) سم^3، ثم قدرت كمية البروتين فيـه بحـسب طريقة لاوري المحورة. قلص حجم المستخلص الخام المستحصل عليه إلى الثلث تقريبـا بواسـطة جهـاز "التجفيد" (Lyophilizer) لإجراء الخطوات اللاحقة عليه.

تحضير المسحوق الصلب من المستخلص المائي الخام البارد لنبات الغافث:

وزن (300) غرام من نبات الغافث وأجريت عليه الخطوات المذكورة في الفقرة السابقة. جفف المستخلص الخام الناتج بواسطة جهاز "التجفيد" إلى أن أصبح بشكل مسحوق، ثم حفظ المسحوق في المجمدة عند (20-) °م في أنبوبة محكمة الغطاء لحين حقن الحيوانات به.

فصل الزيت من نبات الغافث :

وضع (90) غم من نبات الغافث في جهاز الاستخلاص (Soxhlet) ثـم أجريـت عمليـة الاسـتخلاص باستخدام الايثر البترولي (80-60)، لمدة (3-2) يوم، ثم بخر المذيب باستخدام جهاز التبخير تحـت الـضغط المخلخل، ووضعت المادة الناتجة في أنبوبة محكمة الغطاء لحين إجراء عملية حقن الحيوانات (Zekovié *et al*.,2009).

فصل الفلافونويدات من نبات الغافث :

وضع (90) غم من نبات الغافث في جهاز الاستخلاص ثم أجريت عملية الاستخلاص باستخدام الميثانول لمدة 3-2 يوم، ثم بخر الميثانول باستخدام جهاز التبخير تحت الضغط المخلخل، ووضعت المادة الناتجة في أنبوبة محكمة الغطاء لحين إجراء عملية حقن الحيوانات (Kato *et al*., 2010).

فصل التانينات من نبات الغافث :

وضع (90) غم من نبات الغافث في جهاز الاستخلاص ثم أجريت عملية الاستخلاص باستخدام الماء المقطر لمدة 3-2 يوم، ثم وضع المحلول الناتج في جهاز " التجفيد" للتخلص من الماء والحصول على

الراسب بشكل مسحوق. حفظ المسحوق في المجمدة في أنبوبة محكمة الغطاء لحين إجراء عملية حقن الحيوانات (Gülçin *et al*., 2010).

عزل البروتين وترسيبه بواسطة المذيب العضوي :

أُضيف الأسيتون البارد إلى المستخلص المائي البارد بنسبة (40/60) حجم/حجم على التوالي ببطء مع التحريك المستمر عند درجة حرارة (4)°م (Robyt and White, 1987) وترك المزيج في الثلاجة لمدة 24 ساعة لإتمام عملية الترسيب، أجريت عملية الفصل بجهاز الطرد المركزي المبرد وبسرعة (33250xg) لمدة 20 دقيقة. وضع الراسب البروتيني في جهاز التجفيد لعدة ساعات للحصول على الناتج بشكل مسحوق. وحفظ المسحوق في أنبوبة محكمة الغطاء في المجمدة لحين إجراء عملية الترشيح الهلامي وحقن الحيوانات بوصفه راسب بروتين خام. تم التخلص من الأسيتون في الجزء الرائق من المستخلص المذكور سابقا بواسطة جهاز التبخير الدوار تحت الضغط المخلخل عند درجة (40)°م. تم التأكد من عدم وجود البروتين في الجزء الرائق وذلك بتقدير كمية البروتين بطريقة لاوري المحورة ثم وضع في جهاز "التجفيد" للحصول على ناتج بشكل مسحوق أُطلق عليها المادة غير البروتينية. حفظ المسحوق في المجمدة في أنابيب محكمة الغطاء لحين استعمالها في عملية حقن الحيوانات.

فصل وتنقية وتعيين الأوزان الجزيئية للمركبات البروتينية:

تم تنقية البروتين الخام وتقدير الأوزان الجزيئية للمركبات البروتينية باستخدام عمود فصل ذي أبعـاد (120 x 1.8) سم والحاوي على مادة السيفادكس G-50 وبمعدل جريان (72 سم^3 /ساعة)

الحيوانات المستخدمة:

استخدمت في هذه الدراسة ذكور الفئران البيض (Male Albino Mice) المجهزة من (كلية الطب/ جامعة الموصل) وتراوحت أوزانها بين (30-25) غم. وضعت هذه الفئران في أقفاص خاصة مجهزة ومعدة لهذا الغرض وزودت بالماء والعلف الحيواني الخاص بها باستمرار وأُخضعت جميع الحيوانات للظروف ذاتها من ضوء طبيعي ودرجة حرارة (25±2) °م.

تحديد الجرعة المؤثرة للمستخلص الخام البارد لنبات الغافث :

حقنت المجموعة الأولى في التجويف البريتـوني بـ (0.1) سـم^3 مـن المحلـول الملحـي الفـسلجي (Normal Saline) وعدت مجموعة سيطرة (Control). أما المجاميع من (2-5) فقد حقنت في التجويـف البريتوني بالجرع (400 ,300 ,200 ,100 ملغم/كغم من وزن الجسم) على التوالي من المستخلص المائي الخام البارد لنبات الغافث.

حقن الحيوانات المعرضة للكرب التأكسدي المستحدث ببيروكسيد الهيدروجين:

استخدمت ذكور الفئران البيض ووزنت قبل بدء التجربة وقسمت عشوائيا الى (11) مجموعة كل مجموعة تضم (4) حيوانات وكما يلي:

المجموعة الأولى: مجموعة السيطرة تركت تتناول العلف والماء دون معاملة لمدة 15 يوما.

المجموعة الثانية: عرضت هذه المجموعة للكرب التأكسدي بإعطائها بيروكسيد الهيدروجين بنسبة (0.5 %) مع ماء الشرب ولمدة (15) يوما.

المجموعة الثالثة: عرضت هذه المجموعة للكرب التأكسدي المستحدث ببيروكسيد الهيدروجين (0.5 %) مع الحقن اليومي للانسولين تحت الجلد بجرعة (10) وحدة/كغم ولمدة اسبوع.

المجاميع من (4-11) عرضت للكرب التأكسدي المستحدث ببيروكسيد الهيدروجين (0.5 %) لمدة (15) يوما، ثم حقنت في اليوم السابع في التجويف البريتوني، بالمستخلص الخام والمستخلص غير البروتيني والراسب البروتيني والمركبات البروتينية المفصولة بتقنية الترشيح الهلامي والزيت والتانينات والفلافونويدات بجرع مقدارها (3.04,17.3,300, 5.9, 10.3 ,4.6,5.28, 17.8) ملغم/كغم من وزن الجسم على التوالي.

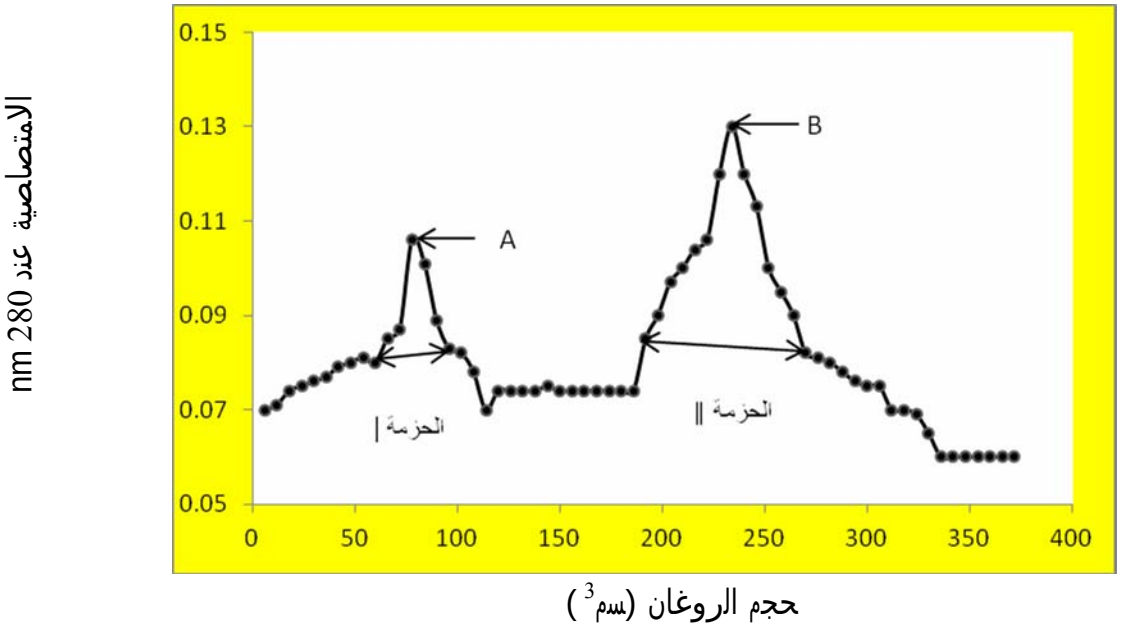
تقدير المتغيرات

قدر مستوى الكلوكوز باستخدام عدة تحاليل (Kit) نوع (RANDOX, United Kingdom) وهي طريقة أنزيمية، كما قدر الكولسترول الكلي وثلاثي الكليسيريد وكولسترول البروتين الدهني عالي الكثافة وكولسترول البروتين الدهني واطئ الكثافة باستخدام عدة تحاليل (Kit) نوع (BIOLABO, France) وهي طريقة أنزيمية أيضاً (Burtis and Ashwood, 1999)، كما قدر مستوى الكلوتاثايون في أنسجة القلب والكبد والكلية بطريقة المان المحورة (James *et al.*, 1982). قدر أيضا مستوى المالونداليالديهايد في الأنسجة باستخدام الطريقة المتبعة من قبل الباحثين (Volken *et al.*, 2001).

النتائج والمناقشة

فصل المواد البروتينية من الراسب البروتيني بتقنية الترشيح الهلامي:

تم فصل مادة الراسب البروتينية المعزولة من المستخلص المائي البارد لنبات الغافث إذ أعطى روغان مادة الراسب البروتينية المعزولة من المستخلص المائي البارد لنبات الغافث قمتين واضحتين عند إمرار محلولها في عمود فصل ذي أبعاد (1.8 x 120) سم والحاوي على مادة السيفادكس G-50 وبمعدل جريان (72 سم^3/ساعة) كما في الشكل (1)



الشكل 1: المظهر الجانبي لروغان الراسب البروتيني المعزول من المستخلص المائي الخام لنبات الغافث بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفصل الحاوي على الهلام Sephadex G-50 الأسهم A و B تمثل حجم الروغان للقمم الاولى (78) سم^3 والثانية (234) سم^3 على التوالي للمركبات البروتينية المفصولة، حجم كل جزء (6) سم^3 وبمعدل جريان (72 سم^3/ساعة).

الأوزان الجزيئية التقريبية للمركبات البروتينية المفصولة:

لغرض تعيين الأوزان الجزيئية التقريبية للمركبات المفصولة بتقنية الترشيح الهلامي استخدم عمود الفصل ذي الابعاد (1.8 × 120) سم، وتم إمرار عدد من المواد المعلومة الوزن الجزيئي، تراوحت أوزانها الجزيئية بين (204-2000.000) دالتون، ومن ثم تم تعيين حجوم الروغان لهذه المواد.

وعند رسم حجم الروغان (Elution volume) لكل مادة مقابل لوغارتم الوزن الجزيئي تم الحصول على المنحنى القياسي لتقدير الوزن الجزيئي والذي من خلاله يمكن تحديد الوزن الجزيئي التقريبي للمركبات المفصولة.

الجدول 1 : حجوم الروغان لمواد معلومة الوزن الجزيئي والأوزان الجزيئية التقريبة للمركبات البروتينية التي مررت على عمود فصل ذو أبعاد (1.8 × 120) سم والحاوي على الهلام Sephadex G-50

المادة	الوزن الجزيئي (دالتون)	حجم الروغان (سم^3)
الدكسترات الازرق Blue dextran	2000000	60
البومين مصل البقر(Bovine serum albumin (BSA	67000	120
الفا-اماليليز α-amylase	58000	127
البومين البيض Eggs albumin	45000	140
ببسين Pepsin	36000	163
تربسين Trypsin	23000	175
هرمون الانسولين Insulin Hormone	5750	230
هرمون الاوكسيتوسين Oxytocin Hormone	1051	291
التربتوفان Tryptophan	204	330
المركب البروتيني **A** المفصول من الراسب البروتيني للمستخلص المائي الخام البارد لنبات الغافث	.1264667	78
المركب الببتيدي **B** المفصول من الراسب البروتيني للمستخلص المائي الخام البارد لنبات الغافث	3958.2	234

تحديد الجرعة المؤثرة في خفض مستوى الكلوكوز في الدم:

يمكن تحديد جرعة المستخلص المائي الخام البارد لنبات الغافث الأكثر تأثيرا في خفض مستوى الكلوكوز في دم ذكور الفئران البيض السليمة، من ملاحظة الجدول (2)، إذ يظهر من الجدول بأن الجرعة المؤثرة هي (300) ملغم/كغم من وزن الجسم.

الجدول 2 : تحديد جرعة المستخلص المائي الخام البارد لنبات الغافث الأكثر تأثيرا في خفض مستوى الكلوكوز في مصل الدم لذكور الفئران

	السيطرة	جرعة المستخلص المائي الخام البارد ملغم/كغم وزن الجسم			
		100	200	300	400
تركيز الكلوكوز* ملي مول/لتر	7.02± 0.4	6.02± 1.39	6.1± 1.21	3.99± 0.43	4.33± 0.51

*تشير قيم الكلوكوز الى المعدل ± الانحراف القياسي

تأثير الأنسولين والمستخلص المائي الخام البارد والمستخلص غير البروتيني والراسب البروتيني والمركبات البروتينية المفصولة والزيت والتانينات والفلافونويدات لنبات الغافث على بعض المتغيرات الكيموحيوية لمصل دم ذكور الفئران المعرضة للكرب التأكسدي:

أ) تأثير المستخلص المائي الخام البارد والمستخلص غير البروتيني والراسب البروتيني والمركبات البروتينية A،B المفصولة:

أدت معاملة الفئران المعرضة للكرب ألتأكسدي المستحدث ببيروكسيد الهيدروجين بهذه المركبات وبجرع (5.9,10.3,3.04,17.3,300) ملغم/كغم وزن الجسم على التوالي الى حدوث انخفاض معنوي ($p<0.05$) في مستويات الكلوكوز والكولسترول الكلي وثلاثي الكليسيريد وكولسترول البروتين الدهني واطئ الكثافة وكولسترول البروتين الدهني واطئ الكثافة جدا. غير أنها أحدثت ارتفاعا معنويا ($p < 0.05$) في مستوى كولسترول البروتين الدهني عالي الكثافة باستثناء المركب البيتيدي B الذي أحدث انخفاضا معنويا ($p < 0.05$) في كولسترول البروتين الدهني عالي الكثافة مقارنة مع الفئران المعاملة ببيروكسيد الهيدروجين المخلوط مع ماء الشرب فقط، كما هو مبين في الجدول (3).

إن الانخفاض المعنوي الحاصل في مستوى الكلوكوز عند المعاملة بالمركبات المذكورة أعلاه قد يعزى إلى قدرة هذه المستخلصات على تنشيط خلايا بيتا لتزيد من إفرازها للأنسولين (Huang *et al*., 2011)، أما الانخفاض الحاصل في مستوى الكولسترول الكلي وكولسترول البروتين الدهني واطئ الكثافة فقد يعزى إلى قدرة هذه المستخلصات على تثبيط أنزيم بيتا-هيدروكسي مثيل كلوتاريل مساعد الأنزيم A ريدكتيز المسؤول عن بناء الكولسترول (Li *et al*., 2012)، أو تقليل كمية البروتين الدهني متوسط الكثافة المتحول الى البروتين الدهني واطئ الكثافة (Murray *et al*., 2009).

كما يعزى تأثير انخفاض مستوى ثلاثي الكليسيريد إلى زيادة إفراز الأنسولين الذي بدوره يثبط أنزيم اللايبيز الحساس للهرمون وبالتالي يمنع تحلل الدهون في الأنسجة الدهنية (Murray *et al*., 2009)، في حين يعزى الارتفاع المعنوي الحاصل في مستوى كولسترول البروتين الدهني عالي الكثافة، نتيجة للمعاملة بالمستخلصات المذكورة آنفا، إلى قدرة هذه المستخلصات على تنشيط انزيم اللايبوبروتين لايبيز الذي يجهز جزيئات البروتين الدهني عالي الكثافة بالدهون الفوسفاتية وapoA-1 أثناء سحب الكليسيريدات الثلاثية من الكايلوميكرونات والبروتين الدهني واطئ الكثافة جدا (VLDL)، أو أن هذه المستخلصات تحفز خلايا الكبد والأمعاء على إنتاج البروتين الدهني عالي الكثافة في الدم (Murray *et al*., 2009).

الجدول 3 : تأثير المستخلص المائي الخام البارد والمستخلص غير البروتيني والراسب البروتيني والمركبات البروتينية المفصولة من نبات الغافث على بعض المتغيرات الكيموحيوية لمصل دم ذكور الفئران المعرضة للكرب التأكسدي

المعاملات	الكلوكوز (ملي مول/لتر)	الكوليستيرول الكلي (ملي مول/لتر)	ثلاثي الكليسيريد (ملي مول/لتر)	كوليستيرول البروتين الدهني عالي الكثافة (ملي مول/لتر)	كوليستيرول البروتين الدهني واطئ الكثافة (ملي مول/لتر)	كوليستيرول البروتين الدهني واطئ الكثافة جدا (ملي مول/لتر)
السيطرة(المحلول الملحي الفسلجي)	c 7.02± 0.40	c 4.44± 0.3	a 1.09± 0.13	b 0.98± 0.21	d 2.99± 0.37	ab 0.47± 0.05
فئران معاملة بـ(H_2O_2 0.5%) مع ماء الشرب فقط	d 8.98± 1.35	c 4.52±0.42	b 2.35± 0.18	b 0.96± 0.12	d 2.57± 0.45	c 1.01± 0.08
فئران معاملة بـ(H_2O_2 0.5%) + الانسولين	a 3.34± 0.58	ab 2.6± 0.36	a 0.85± 0.05	cd 1.63± 0.15	ab 0.59± 0.4	a 0.36± 0.02
فئران معاملة بـ(H_2O_2 0.5%) + مستخلص الخام	bc 5.74± 1.36	ab 2.91±0.35	a 1.21± 0.21	d 1.89± 0.13	ab 0.5± 0.33	ab 0.52± 0.09
فئران معاملة بـ(H_2O_2 0.5%) + غير البروتيني	c 6.48± 0.54	ab 2.96±0.39	a 0.92± 0.04	bc 1.34± 0.28	bc 1.22± 0.59	ab 0.4± 0.01
فئران معاملة بـ(H_2O_2 0.5%) + الراسب البروتيني	c 6.99± 0.39	b 3.33±0.45	a 1.42± 0.53	e 2.32± 0.52	a 0.39± 0.27	b 0.62± 0.23
فئران معاملة بـ(H_2O_2 0.5%) + المركب البروتيني A	b 5.15± 0.5	a 2.36±0.21	a 1.17± 0.15	bc 1.21± 0.16	ab 0.63± 0.33	ab 0.51± 0.07
فئران معاملة بـ(H_2O_2 0.5%) +المركب الببتيدي B	bc 6.06± 0.67	ab 2.81±1.13	a 1.39± 0.74	**a** 0.49± 0.42	c 1.71± 0.85	ab 0.6± 0.32

الأحرف المختلفة عموديا تعني وجود فرق معنوي عند مستوى ($p < 0.05$) ، تشير القيم أعلاه إلى المعدل ± الانحراف القياسي.

ب) تأثير الزيت والتانينات والفلافونويدات لنبات الغافث :

لقد أدى حقن الفئران بهذه المواد بجرع (17.8, 4.6, 5.28) ملغم/كغم وزن الجسم على التوالي إلى حدوث إنخفاض معنوي ($p< 0.05$) في مستويات الكلوكوز والكولسترول الكلي وثلاثي الكليسيريد وكولسترول البروتين الدهني واطئ الكثافة وكولسترول البروتين الدهني واطئ الكثافة جدا، في حين حدث

ارتفاع معنوي ($p < 0.05$) في مستوى كولسترول البروتين الدهني عالي الكثافة عند المقارنة مع الفئران المعاملة ببيروكسيد الهيدروجين مع ماء الشرب فقط. كما مبين في الجدول (4).

إن الانخفاض المعنوي الحاصل في مستوى الكلوكوز نتيجة المعاملة بهذه المركبات، قد يعزى إلى قدرة هذه المركبات على زيادة دخول الكلوكوز إلى داخل الخلية (عن طريق تحفيز العربات الناقلة على جدار الخلية، وبالتالي زيادة دخول الكلوكوز إلى الخلية) أو التقليل من نسبة أصناف الأوكسجين الفعالة (Nayak *et al*., 2011)، أما الانخفاض الحاصل في مستوى كولسترول البروتين الدهني واطئ الكثافة فقد يعزى إلى قدرة هذه المركبات في التقليل من أكسدة مستقبلات apo B-100 receptors من خلال التقليل من أصناف الأوكسجين الفعالة (Garjani *et al*., 2009).

الجدول 4 : تأثير الزيت والتانينات والفلافونويدات المفصولة من نبات الغاف على بعض المتغيرات الكيموحيوية لمصل دم ذكور الفئران المعرضة للكرب التأكسدي

المعاملات	الكلوكوز (ملي مول/لتر)	الـكولسترول الكلي (ملي مول/لتر)	ثلاثي الكليسيرايد (ملي مول/لتر)	كولسترول البروتين الدهني عالي الكثافة (ملي مول/لتر)	كولسترول البروتين الدهني واطئ الكثافة (ملي مول/لتر)	كولسترول البروتين الدهني واطئ الكثافة جدا (ملي مول/لتر)
السيطرة (المحلول الملحي الفسلجي)	b 7.02± 0.40	c 4.44± 0.3	ab 1.09± 0.13	a 0.98± 0.21	b 2.99± 0.37	ab 0.47± 0.05
فئران معاملة بـ(H_2O_2) 0.5%) مع ماء الشرب فقط	c 8.98± 1.35	c 4.52±0.42	d 2.35± 0.18	a 0.96± 0.12	b 2.57± 0.45	d 1.01± 0.08
فئران معاملة بـ(H_2O_2) 0.5%) + الانسولين	a 3.34± 0.58	ab 2.6± 0.36	a 0.85± 0.05	c 1.63± 0.15	a 0.59± 0.4	a 0.36± 0.02
فئران معاملة بـ(H_2O_2) 0.5%) + الزيت	b 6.90± 1.86	b 3.04±0.48	c 1.69±0.43	b 1.29±0.07	a 1.01±0.33	c 0.73±0.19
فئران معاملة بـ(H_2O_2) 0.5%) + التانينات	a 4.99± 1.21	a 2.21±0.20	bc 1.41±0.58	ab 1.15±0.23	a 0.44±0.36	bc 0.61±0.25
فئران معاملة بـ(H_2O_2) 0.5%) + الفلافونويدات	a 4.69± 1.16	ab 2.71±0.38	ab 0.96±0.04	b 1.29±0.19	a 1.0±0.31	ab 0.41±0.02

الاحرف المختلفة عموديا تعني وجود فرق معنوي عند مستوى ($p < 0.05$)

تشير القيم أعلاه إلى المعدل ± الانحراف القياسي.

تأثير الانسولين والمستخلص المائي الخام البارد والمستخلص غير البروتيني والراسب البروتيني والمركبات البروتينية المفصولة والزيت والتانينات والفلافونويدات على أنسجة الكبد والكلية والقلب لذكور الفئران المعرضة للكرب التأكسدي:

أ) تأثير المستخلص المائي الخام البارد والمستخلص غير البروتيني والراسب البروتيني والمركبات البروتينية B,A المفصولة من نبات الغافث:

أدت معاملة ذكور الفئران المعرضة للكرب التأكسدي بالمستخلصات المذكورة آنفا و بجرع (10.3,5.9,3.04,17.3,300) ملغم/كغم وزن الجسم إلى حدوث إرتفاع معنوي ($p < 0.05$) في مستوى الكلوتاثايون في أنسجة الكبد والكلية والقلب باستثناء مستخلص الخام الذي أحدث انخفاضا غير معنوي في مستوى الكلوتاثايون، غير أن المستخلص غير البروتيني الذي أدى إلى حدوث إرتفاع غير معنوي في نسيج الكبد وانخفاض معنوي في نسيج القلب، في حين أحدثت هذه المستخلصات جميعا انخفاضا معنويا ($p < 0.05$) في مستوى المالونداليالديهايد في أنسجة الكبد والكلية والقلب عند المقارنة مع الفئران المعاملة ببيروكسيد الهيدروجين المخلوط مع ماء الشرب فقط، وكما هو موضح في الجدول (5).

إن قدرة هذه المستخلصات في رفع مستوى الكلوتاثايون قد يعزى إلى تنشيط فعالية أنزيم كاما- كلوتاميل ترانس ببتايديز وإن قدرة هذه المستخلصات في خفض مستوى المالونداليالديهايد قد تعزى إلى تنشيط فعالية أنزيم NADPH oxidase أو أنزيم nitric oxide synthase (NOS) وبالتالي انخفاض بيروكسدة الدهون (Taira *et al*., 2012).

الجدول 5 : تأثير المستخلص المائي الخام والمستخلص غير البروتيني والراسب البروتيني والمركبات البروتينية في مستويات الكلوتاثايون والمالوندايالديهايد على أنسجة الكبد والكلية والقلب لذكور الفئران المعرضة للكرب التأكسدي

المعاملات	الكلوتاثايون (نانومول/غم)			المالوندايالديهايد (نانومول/غم)		
	الكبد	الكلية	القلب	الكبد	الكلية	القلب
السيطرة(المحلول الملحي الفسلجي)	a 4584±196	ef 4444± 379	de 4262±314	abc 386± 12.5	cd 546± 39.5	bc 500± 13.7
فئران معاملة بـ(H_2O_2 0.5%) مع ماء الشرب فقط	a 2155±128	ab 1736±121	bc 3230±199	d 894± 30.5	f 1093± 12.8	d 967± 21.9
فئران معاملة بـ(H_2O_2 0.5%) + الانسولين	a 3928±160	cd 3101±190	de 4477±162	abc 458± 34.7	bc 448± 27	bc 508± 10.4
فئران معاملة بـ(H_2O_2 0.5%) + مستخلص الخام	a 1538±393	a 1456±395	a 1657±568	a 185± 21.5	e 681± 63.8	bc 454±74.3
فئران معاملة بـ(H_2O_2 0.5%) + غير البروتيني	a 3818±718	bc 2397±870	de 4341±520	c 578± 32.5	de 581± 27	ab 359±19.4
فئران معاملة بـ(H_2O_2 0.5%) + الراسب البروتيني	c 55757±7317	f 4764±814	cd 3737±607	ab 289±120.4	a 164± 31.5	a 189± 56.2
فئران معاملة بـ(H_2O_2 0.5%) + المركب البروتيني A	a 608±5656	c 2727±490	e 4788±425	a 202± 20.7	b 365±125	bc 548± 221
فئران معاملة بـ(H_2O_2 0.5%) + المركب البيتيدي B	b 15413±1907	de 3863±311	b 2846±668	bc 561±472.7	bcd 470±160.6	c 576±241.2

الأحرف المختلفة عموديا تعني وجود فرق معنوي عند مستوى ($p < 0.05$)

تشير القيم أعلاه إلى المعدل ± الانحراف القياسي.

ب) تأثير الزيت والتانينات والفلافونويدات لنبات الغافث :

أدت معاملة الفئران المعرضة للكرب التأكسدي بمركبات الزيت والتانينات والفلافونويدات بجرع (5.28، 4.6 ,17.8) ملغم/كغم وزن الجسم إلى ارتفاع معنوي ($p < 0.05$) في مستوى الكلوتاثايون في أنسجة الكبد والكلية والقلب، باستثناء الزيت إذ أدى إلى حدوث انخفاض معنوي في مستوى الكلوتاثايون في نسيج القلب فقط، في حين أحدثت هذه المركبات انخفاضا معنويا ($p < 0.05$) في مستوى المالوندايالديهايد في أنسجة الكبد والكلية والقلب عند المقارنة مع الفئران المعاملة ببيروكسيد الهيدروجين المخلوط مع ماء الشرب فقط. كما مبين في الجدول (6).

إن الارتفاع المعنوي الحاصل في مستوى الكلوتاثايون قد يعزى إلى تنشيط أنزيم كاما-كلوتاميل سيستين سينثيز γ-GCS ، او زيادة فعالية أنزيم كلوتاثايون سينثيتيز GSH synthetase، أو قد تعمل هذه المركبات على تثبيط أنزيم كاما-كلوتاميل ترانس بيبتيديز (Li *et al*., 2011)، أما الانخفاض المعنوي الحاصل في مستوى المالوندايالديهايد فربما يعزى إلى أن هذه المركبات تعمل على إيقاف أو منع نشوء خطوة البدء في خطوات تكوين الجذور الحرة أو قد تعمل على كسر خطوات الانتشار وبالتالي يُنخفض مستوى الجذور الحرة وتقل عملية بيروكسدة الدهون المتمثلة بالمالوندايالديهايد (Hossain *et al*., 2011).

وقد أشارت العديد من الدراسات إلى قابلية الفلافونويدات الموجودة في العديد من النباتات على إزالة الجذور الحرة وخفض مستوى المالوندايالديهايد (Bajpai *et al*., 2009; Shah and Hossain, 2011).

الجدول 6 : تأثير الزيت والتانينات والفلافونويدات في مستويات الكلوتاثايون والمالوندايالديهايد في أنسجة الكبد والكلية والقلب لذكور الفئران المعرضة للكرب التأكسدي

المعاملات	الكلوتاثايون (نانومول/غم)			المالوندايالديهايد (نانومول/غم)		
	الكبد	الكلية	القلب	الكبد	الكلية	القلب
السيطرة (المحلول الملحي الفسلجي)	A 4584±196	ef 4444± 379	de 4262±314	abc 386± 12.5	cd 546± 39.5	bc 500± 13.7
فئران معاملة بـ(H_2O_2 0.5%)مع ماء الشرب فقط	a 2155±128	ab 1736±121	bc 3230±199	d 894± 30.5	f 1093± 12.8	d 967± 21.9
فئران معاملة بـ(H_2O_2 0.5%) + الانسولين	a 3928±160	cd 3101±190	de 4477±162	abc 458 ± 34.7	bc 448± 27	bc 508± 10.4
فئران معاملة بـ (H_2O_2 0.5%) + الزيت	c 58028±8959	e 4125±622	a 2108±283	ab 209± 32.9	a 321± 228.6	a 267± 126.9
فئران معاملة بـ(H_2O_2 0.5%) + التانينات	b 13882±1469	de 3721±495	de 4286±651	a 189± 16.6	a 332± 74.5	a 261± 17
فئران معاملة بـ (H_2O_2 0.5%) + الفلافونويدات	a 4142±1044	f 4857±875	de 4266±493	b 233± 26.4	a 168± 27.9	a 264± 14.5

الأحرف المختلفة عموديا تعني وجود فرق معنوي عند مستوى ($p < 0.05$) تشير القيم أعلاه إلى المعدل ± الانحراف القياسي.

المصادر العربية

سعد الدين، شروق محمد كاظم (1986). "الأعشاب الطبية". دار الشؤون الثقافية العامة، بغـداد، العـراق، ص56 .

عبد المانع، خالد صالح عمر (2002). عزل البروتينات والأجزاء غير البروتينية من نباتي السبحبح وخس الزيت ودراسة تأثيرها على مستوى السكر في الدم. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل.

مجيد، سامي هاشم ؛ محمود، مهند جميل (1988). "النباتات والأعشاب العراقية بين الطب الشعبي والبحث العلمي". دار الثورة للصحافة والنشر، بغداد، العراق، ص9.

المصادر الأجنبية

Bajpai, V. K.; Yoon, J. I.; Chul Kang, S. (2009). Antioxidant and antidermatophytic activities of essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *Food and Chemical Toxicology,* **47**(6), 1355-1361.

Burtis, C.A.; Ashwood, E.R. (1999). "Tietz Textbook of Clinical Chemistry". 3rd ed., W.B. Saunders Company, London, pp. 840-841.

Copland, A.; Nahar, L.; Tomlinson, C.T.M.; Hamilton, V.; Middleton, M. ; Kumarasamy, Y. (2003). Antibacterial and free radical scavenging activity of the seeds of *Agrimonia eupatoria*. *Fitoterapia* ,**74** , 133-135.

Djeridane, A.; Yousfi, M.; Nadjemi, B.; Boutassouna, D.; Stocker, P.; Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.*, **97** , 654–660.

Garjani, A.; Fathiazad, F.; Zakheri, A.; Akbari, N. A.; Azarmie, Y.; Fakhrjoo, A. (2009). The effect of total extract of Securigera securidaca L. seeds on serum lipid profiles, antioxidant status, and vascular function in hypercholesterolemic rats. *J. Ethnopharm.,* **126** (3), 525-532.

Gülçin, I.; Huyut, Z.; Elmastas, M.; Aboul-Enein H. Y. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian J. Chem.,* **3**, 43-53.

Hossain, M. A.; Shah, M. D.; Gnanaraj, C.; Iqbal, M. (2011). In vitro total phenolics, flavonoids contents and antioxidant activity of essential oil, various organic extracts from the leaves of tropical medicinal plant *Tetrastigma* from Sabah. *Asian P. J. med.,* **4**(9), 717-721.

Huang, X.; Sun, M.; Li, D.; Liu, J.; Guo, H.; Dong, Y.; Jiang, L. (2011). Augmented NADPH oxidase activity and p22phox expression in monocytes underlie oxidative stress of patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **91**(3), 371-380.

James, R.C.; Goodman, D.R.; Harbison, R.D. (1982). Hepatic glutathione and hpatotoxicity, changes induced by selected marcortics. *J. Pharmaco. Therap*., **221**, 708-714.

Jingzheng, S. (2004). Effects of Herba *Agrimonia* on Hepatocarcinogenesis in Rats . Ph.D. thesis, The Chinese University of Hong Kong, pp. 28-31.

Kato, H.; Li, W.; Koike, M.; Wang, Y.; Koike, K.(2010). Phenolic glycosides from *Agrimonia pilosa. Phytochemistry.* **71**(16), 1925-1929.

Li, C.; Guo, T., Zhou, D.; Hu, Y.; Zhou, H.; Wang, S. (2011) A novel glutathione modified chitosan conjugate for efficient gene delivery. *J. Controlled Release,* **154**(2), 177-188.

Li, J. J.; Yang, P.; Liu, J.; Jia, Y. J.; Li, Z. C.; Guo, Y. L. (2012). Impact of 10 mg rosuvastatin daily or alternate-day on lipid profile and inflammatory markers. *Clinica Chimica Acta*. **413**,139-142.

Mooradian, A. D.; Haas, M. J.(2011). Glucose-induced endoplasmic reticulum stress is independent of oxidative stress: A mechanistic explanation for the failure of antioxidant therapy in diabetes. *Free Radical Bio. Med.*, **50**(9), 1140-1143.

Murray, R.K.; Granner, D.K.; Mayes, P.A.; Rodwell, V.W. (2009). "Harper's Biochemistry". 25th ed., Appleton and Lange, USA, pp. 155-156.

Nayak, B. S.; Butcher, D. M.; Bujhawan, S.; Chang, D.; Chang, S.; Cabral-Samaroo, D. (2011). Association of low serum creatinine, abnormal lipid profile, gender, age and ethnicity with type 2 diabetes mellitus in Trinidad and Tobago. *Diabetes Research and Clinical Practice,* **91**(3), 342-347.

Robertson, R. P. (2004). Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucosetoxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J. Biol. Chem*. **279**, 42351–42354.

Robyt, F.J. ; White J.B. (1987). "Biochemical Techniques. Theory and Practice". Brookes/Cloe Publishing Company, Monterey, California, pp. 115-118

Shah, M. D.; Hossain, M. A.(2011) Total flavonoids content and biochemical screening of the leaves of tropical endemic medicinal plant Merremia borneensis. *Arabian J. Chem*. http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.12.033

Taira, J.; Ohmine, W.; Ogi, T.; Nanbu, H.; Ueda, K. (2012) Suppression of nitric oxide production on LPS/IFN-Î³-stimulated RAW264. 7 macrophages by a novel catechin, pilosanol N, from *Agrimonia pilosa* Ledeb. *Bio. Org. Med. Chem.*, **22**, 1766-1769.

Thum, T.; Borlak J. (2004). Mechanistic role of cytochrome P450 monooxygenases in oxidized low density lipoprotein-induced vascular injury. *Cir. Res*., **94**, 312-319.

Volken, E.; Nurperi G.; Ahmet, B. (2001). N-acetyl cystine reduces cerebral lipid peroxidation in a rat model of infantile hydrocephalus. *J. Neurol. Sci*., Issue 1302-1310.

Zekovie, Z. P.; Lepojevie, Z. D. ; Mujie, I. O. (2009). Laurel extracts obtained by steam distillation, supercritical fluid and solvent extraction. *J. Natu. Pro.*, **2**, 104-109.