دراسة تأثير مستخلص نبات المرسين على مصل الدم في الجرذان

نورا إبراهيم الزاعل[1] عبد السلام موسى بو الحاج سعد محمد سعد الغرباوي[2]

DOI: https://doi.org/10.54172/mjsc.v21i1.774

الملخـــــص

يهدف هذا البحث إلى معرفة تأثير مستخلص أوراق نبات المرسين علـــى مصـــل دم الجـــرذان البيضاء ، حيث تم تجريع الحيوانات جرعة قدرها 2 جرام/كجم من وزن الجسم يومياً عن طريق الفـــم . وشملت الدراسة 37 جرذ أبيض وتم تقسيمها إلى ثلاث مجاميع ، أعطيت المجموعة الأولى الجرعة لمدة 7 أيام ، أما المجموعة الثانية فقد أعطيت الجرعة لمدة 14 يوم ، والمجموعة الثالثة بعضها أعطيت لها الجرعة لمدة 7 أيام والبعض الآخر لمدة 14 يوم لغرض دراسة بروتينات الدم باستخدام تقنية الترحيل الكهربائي ، وكـــل مجموعة احتوت في داخلها على مجموعة ضابطة .

الحيوانات التي تم معاملتها بالمستخلص حدث لها نزف في الفم والأنف وعند الأطراف ، كمـــا لوحظ عليها الهزال والتعب وفقدان الشهية للأكل بعد حوالي 72 ساعة من المعاملة ، إضافة إلى حـــدوث انخفاض معنوي في وزن الجسم مقارنة بالمجموعة الضابطة . كما أظهرت نتائج الاختبارات البيوكيميائيـــة للمصل وجود انخفاض معنوي في مستوى جلوكوز الدم ، في حين لوحظ حدوث ارتفاع معنوي في كل من البروتين الكلي للمصل ، وألبومين المصل ، وتركيز أيونات الصوديوم والبوتاسيوم . بينما بين الترحيل الكهربائي لبروتينات المصل وجود زيادة في عدد الحزم البروتينية إضافة إلى ظهور بعض الحـــزم البروتينيـــة ذات الأوزان الجزيئية العالية في الجرذان المعاملة بالمستخلص مقارنة بالمجموعة الضابطة .

[1] قسم علم الحيوان ، كلية العلوم ، جامعة عمر المختار ، ص.ب. 919 ، البيضاء – ليبيا .

[2] قسم الخلية والأنسجة ، كلية الطب البيطري ، جامعة القاهرة .

©. المؤلف (المؤلفون) هذا المقال المجاني يتم الوصول إليه من خلال رخصة المشاع الإبداعي(CC BY-NC 4.0)

المقدمـــــة

نظراً لما لوحظ في السنوات الأخيرة من الإستخدام الشائع للنباتات الطبية سواء بصـــورة طبيعية أو على هيئة مستخلصات فقد تم دراســـة نبات المرسين *Myrtus* communis المتواجد طبيعياً في منطقة الجبل الأخضر والذي ينتمي إلى العائلـــة الآسية Myrtaceae ، وهو عبارة عن شـــجيرات صغيرة دائمة الخضرة يتراوح ارتفاعها ما بين 1-3 أمتار تنمو غالباً في الأماكن الرطبـــة والظليلـــة ، وللنبات أفرع كثيرة تحمل أوراقاً متقاربة جلديـــة القوام بيضية أو رمحية الشكل كاملة الحواف مدببة القمم قصيرة الأعناق وذات رائحة عطرية فواحـــة وتحمل الأغصان أزهاراً إبطية وحيدة بألوان بيضاء إلى زهرية وله ثمار لبية غضة سوداء اللون تؤكـــل عند النضج ، ويزهر النبات في الفترة من أبريل إلى ديسمبر والجزء المستخدم منه كامـــل النبـــات . يحتوي النبات على مـــواد ألدهيديـــة Aldehids وفينولية Phenols وراتنجية Ratenges وزيـــوت طيارة أهمهـــا جيرانيـــول Geraniol ومـــايرتول Myrtol وأليوكالبيتول Aliocalpitol وألفـــابينين Alpha-pinene والليمونين Limonene (القاضي ، 1954) .

1- وبما أن مستخلص نبـــات المرســـين شـــائع الاستخدام كعلاج لمرض السكر ، ونظـــراً لأن مرض السكر يعتبر من أكثر الأمـــراض المزمنة انتشاراً ويستوجب استخدام العـــلاج بشكل يومي ولفترات طويلة لذا كان مـــن اللازم معرفة تأثير المستخلص على المـــدى الطويل ، ومن هنا تم اقتراح مشروع هـــذا البحث للتعرف على التغيرات الفسيولوجية الناجمة عن استخدام نبات المرسين وإضـــافة المزيد من المعلومـــات في هـــذا الخصـــوص وخاصة أن المراجع المتاحـــة والدراســـات السابقة تعتبر قليلة وغير كافية .

أهداف البحث

1- دراسة تأثير المستخلص على مصـــل الـــدم باعتباره من المؤشرات الأكثر إظهاراً لما قـــد يحدث من تغير وظيفي .
2- معرفة تأثير المستخلص على بروتينات الـــدم باستخدام تقنية الترحيل الكهربائي .
3- معرفة مدى ارتباط الأثر الضار للمستخلص النباتي بطول الفترة الزمنية للمعاملة .

المواد وطرق البحث

أولاً – حيوانات التجربة

Experimental animals

تم في هذه الدراسة استخدام الجـــرذان البيضاء White albino rats والتي تعتبر من أفضل حيوانات التجارب للدراسة حيث أنها تتميز بمعدل إخصاب عالي وفترة حمل قصيرة (22 يوم) ولـــيس لها موسم خاص للتزاوج وتنجب عدد كبير في كل

حمل وذات حجم مناسب (الحميدي وآخرون 1998) ، حيث تم إحضار هذه الجرذان من جمهورية مصر العربية والتي لم يسبق لها أن تعرضت أو تعاملت بأي مواد كيميائية ، ووضعت الذكور مع الإناث في معمل خاص بتربية الحيوانات بقسم الأحياء بكلية العلوم جامعة عمر المختار حيث تراوحت درجة حرارة المعمل بين 21-25 درجة مئوية وتراوحت فترات الإضاءة الطبيعية بين 12 ساعة ضوء و 12 ساعة ظلام ، وتركت لمدة 5 أشهر قبل بدء الدراسة وذلك لغرض التأقلم على الظروف البيئية الجديدة ولزيادة فرصة التكاثر حتى يتاح استخدام أكبر عدد منها ، وخلال هذه الفترة تم تغذيتها بعليقة خاصة وتم توفير الغذاء والماء لها بصورة حرة .

ثانياً : تحضيرالمستخلص النباتي

Preparation of plant extract

تمت عملية تجميع النبات من منطقة حبون بمدينة البيضاء خلال شهر أبريل إذ يتميز النبات في هذه الفترة بنمو خضري جيد ، وتم عزل الأوراق الغضة الخضراء وتركت حتى الجفاف بعيداً عن أشعة الشمس ومن ثم تمت عملية الاستخلاص حسب طريقة Sato et al. (1990) والتي ذكرها الزاعل (2007) .

ثالثاً – تجريع الحيوانات

تم تجريع الحيوانات بالجرعة التي حددت سابقاً على أنها الجرعة المثالية المستخدمة لخفض مستوى السكر في الدم عند المرضى المصابين بداء السكري وهي 2 جرام من المستخلص الإيثانولي المائي لكل كيلوجرام من وزن الجسم (El-Fellah et al., 1984) ، وشملت هذه التجربة عدد 37 جرذ بعمر يتراوح ما بين 14-17 أسبوع وبوزن يتراوح ما بين 200-250 جرام ، وقد تم تقسيمها إلى ثلاث مجاميع وأعطيت لها الجرعة عن طريق الفم باستخدام أنبوب المعدة Stomach tube حسب المدة والكيفية المحددة لكل مجموعة .

– المجموعة الأولى

تم استخدام 14 جرذ ، قسمت إلى مجموعة ضابطة Control (7 جرذان) ومجموعة معاملة (7 جرذان) ، وقد تم تجريعها بجرعات يومية بتركيز 2 جم/كجم وتم ذبحها بعد 7 أيام من بداية المعاملة وذلك لإجراء الاختبارات البيوكيميائية .

– المجموعة الثانية

تم استخدام 14 جرذ ، قسمت إلى مجموعة ضابطة Control (7 جرذان) ومجموعة معاملة (7 جرذان) ، وقد تم تجريعها بجرعات يومية بتركيز 2 جم/كجم وتم ذبحها بعد 14 يوم من بداية المعاملة .

– المجموعة الثالثة

تم استخدام 9 جرذان ، قسمت إلى مجموعة ضابطة Control (3 جرذان) ومجموعتين معاملتين (3 جرذان/مجموعة) ، وقد تم تجريعها

بجرعات يومية بتركيز 2 جم/كجم وتم ذبحها بعد 7 و 14 يوم من بداية المعاملة وذلك لدراسة تأثير الجرعة على نمط بروتينات الدم .

رابعاً – فحص مصل الدم

Haematological examination

تم أخذ 2 مل من الدم في أنبوبة لا تحتوي على مضاد للتخثر وترك حتى التجلط ثم عرض للطرد المركزي باستخدام جهاز الطرد المركزي (Scientific-1020-Centurtion) بسرعة 2500 د/ق لمدة 15 دقيقة للحصول على المصل ، ثم أخذت العينات لمعمل التحاليل حيث أجريت الاختبارات البيوكيميائية لها لقياس كلاً من :

1- مستوى الجلوكوز في الدم

تعتمد هذه الطريقة على قياس معدل استهلاك الأكسجين خلال أكسدة الجلوكوز إلى حامض الجلوكونيك بواسطة إنزيم الجلوكوز أوكسيديز Glucose oxidase الذي يتناسب معدل تغيره طردياً مع تركيز الجلوكوز . تم تقدير الجلوكوز باستخدام جهاز Beckman Glucose Analyzer 2 وباستخدام مجموعة كواشف من شركة بيكمان الأيرلندية Beckman,Ireland . يقيس هذا الجهاز الجلوكوز بواسطة قياس معدل الأكسجين باستعمال الكترود الأكسجين ، حيث ينقل حجم دقيق من العينة يدوياً بواسطة الماصة إلى الكاشف الإنزيمي في الغرفة المحتوية على الإلكترود الذي يستجيب لتركيز الجلوكوز، فالدائرة الإلكترونية الصلبة تقيس معدل الأكسجين المستهلك والذي يتناسب طردياً مع تركيز الجلوكوز في العينة ومقدم لوح العداد الرقمي يعطي القراءة مباشرة بالملليجرام لكل 100مل من المصل .

$$\beta - D\,\text{Glucose} + O2 \xrightarrow{\text{Glucose oxidase}} \text{Gluconic acid} + H2O2$$

2- مستوى البروتين الكلي في المصل

تم تقدير البروتين الكلي للمصل باستخدام جهاز Colorimeter المصنع من قبل شركة Jenway-LTD وباستخدام مجموعة كواشف مجهزة من نفس الشركة ، وقد تمت عملية القياس عند طول موجي قدره 545 نانوميتر وأخذت القراءة من لوح العداد الرقمي بالجرام لكل 100 مل من الدم .

3- مستوى ألبومين المصل

تم تقدير ألبومين المصل وذلك عن طريق قدرة اتحاده بصبغة Bromo Crexsol Green (BCG) بدرجة حموضة (pH = 4) باستخدام جهاز Beckman Albumin Analyzer 2 وباستخدام مجموعة كواشف مجهزة من شركة بيكمان الأيرلندية وقد تمت عملية قياس تركيز الألبومين عند طول موجي قدره 620 نانوميتر

وأخذت القراءة من لوح العداد الرقمي بالجرام لكل 100 مل من الدم .

4- مستوى أيونات الصوديوم والبوتاسيوم

تم تقدير أيونات الصوديوم والبوتاسيوم باستخدام جهاز Beckman-Na^+ & K^+- Analyzer 2 ومجموعة كواشف مجهزة من قبل شركة بيكمان الأيرلندية ، وقد تمت عملية القياس عند طول موجي قدره 545 نانوميتر وأخذت القراءة مباشرة من لوح العداد الرقمي بالملي مول .

خامساً – ملاحظة النمط البروتيني بواسطة الترحيل الكهربائي

أخذت عينات الدم وأجريت لها عملية الترحيل الكهربائي Electrophoresis على هلام متعدد الأكريل آمايد بوجود الـ Sodium dodecyl sulphate (SDS) استناداً إلى طريقة Laemmli (1970) وذلك لغرض دراسة التغيرات الناتجة على مستوى البروتينات ، وقد تم في هذه الطريقة تحضير المحاليل التالية :

محلول 1– محلول أكريل آمايد / بس Acrylamid bis / : ويتكون من إذابة 29.2 جم أكريل آمايد و 0.8 جم بس في 70 مل من الماء المقطر ، بعد الإذابة بشكل كامل تم إكمال الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر ثم مرر المحلول خلال مرشح 0.45 ميكروميتر وحفظ في قنينة داكنة عند درجة 4°م لمدة لا تتجاوز 30 يوم .

محلول 2– هلام الفصل Resolving gel : ويتكون من 12 مل من محلول أكريل آمايد / بس Acrylamid/bis و 15 مل من 0.75 مولر Tris-hydrochloric acid (Tris-HCl) (pH = 8.8) و 0.3 مل من 10% Sodium dodecyl sulphate (SDS) و 2.46 مل من الماء المقطر و 0.015 مل من الـ N, N, N, Tetramethylen diamin (TEMED) ، وعرض الخليط لظروف تفريغ هوائية لمدة 15 دقيقة ثم أضيف إليه 0.25 مل من 12% APS المحضر آنياً .

محلول 3– هلام التراص Stacking gel : ويتكون من 1.5 مل من محلول أكريل آمايد / بس Acrylamid/bis و 1.2 ملي مولر Tris-HCl (pH = 6.8) و 0.1 مل من 10% SDS و 7.3 مل من الماء المقطر و 0.015 مل من الـ TEMED ، وعرض الخليط لظروف تفريغ هوائية لمدة 15 دقيقة ثم أضيف إليه 0.08 مل من 12% APS المحضر آنياً .

محلول 4– محلول الترحيل Electrode buffer : يتكون من 0.025 مولر Tris- (pH = 8.3) HCl و 0.192 مولر جلايسين و 0.1 مل من 10% SDS .

محلول 5– محلول التكسير Cracking buffer : يتكون من 60 ملي مولر Tris-HCl (pH = 6.8) و 1% SDS و 1% 2-

mercaptoethanol و 10% جليسـرين و 0.01% صـبغة البروموفينـول الزرقـاء Bromophenol blue .

محلول 6– محلول TE : ويتكون من 50 ملي مولر Tris-HCl و 20 ملـي مـولر مـن الـ Disodium Ethylene Diamin Na2- (pH = 8) Tetra Acetic acid (EDTA وعقم بجهاز التعقيم .

محلول 7– المحلول المثبـت Fixing solution : يتكون من 40% كحـول ميثيلـي و 10% ثلاثي كلـورو حـامض الخليـك (TCA) Trichloroacetic acid .

محلول 8– محلول التصبيغ Staining solution : يتكون من 0.25 ملجم صبغة كومازي الزرقاء المذابـة في 40% كحـول ميثيلـي و 10% حامض الخليك ، بعد ذوبان الصـبغة رشـح المحلول ثم حفظ بدرجة حرارة الغرفة .

محلول 9– محلول إزالـة الصـبغة Destaining solution : يتكون من 40% كحول ميثيلي و 10% حامض الخليك .

وقد تم ترحيل الـبروتين المسـتخلص باتباع الخطوات التالية :

1- تحضير الهلام

حضر هلام بسمك 1.5 ملم وارتفـاع 20 سم ثم غطي الهلام بالماء المقطر لطرد الفقاعات الهوائية وترك لمدة 45–60 دقيقة لإكمال عمليـة البلمرة والتصلب . وضع المشط بين صفيحتي الهلام بعد سحب طبقة الماء ثم أحضر هلام التـراص وتم صبه مباشرة على سطح هلام الفصل . ترك الهلام لمدة 30–45 دقيقة حتى تصلب في درجة حـرارة الغرفة ووضعت صفيحتا الجهاز الحاويتـان علـى الهلام في المكان المخصص لها من الجهـاز ومـلء مستودع خلية الترحيل بمحلول الترحيل .

2- نموذج البروتينات القياسية

تم استخدام البروتين القياسـي Sigma Marker ™Low المصنع من قبل شركة Sigma المتكون من Low Molecular Weight :

1- Albumin , bovine serum وزنه الجزيئي 66KDa .
2- Ovalbumin, chicken egg وزنه الجزيئي 45KDa .
3- Glyceraldehyde – 3 – phosphate Dehydrogenase, rabbit muscle وزنـه الجزيئي 36KDa .
4- Carbonic Anhydrase, bovine erythrocytes وزنه الجزيئي 29KDa .
5- Trypsinogen, bovine pancreas وزنـه الجزيئي 24KDa .
6- Trypsin Inhibitor, soyabean وزنـه الجزيئي 20KDa .
7- α-Lactalbumin, bovin milk وزنـه الجزيئي 14.2KDa .

8- Aprotinin, bovine lung وزنه الجزيئي 6.5KDa .

3- تحضير العينات

تم تعليق 300 ميكروجرام من كل عينة بروتينية في 90 ميكروليتر من (محلول TE) ثم أضيف له 210 ميكروليتر من محلول التكسير في أنبوبة أبندروف المعقمة ثم حضن الخليط في حمام مائي مغلي لمدة 2-5 دقائق .

4- الترحيل الكهربائي

تم إضافة العينات المحضرة (100 ميكروليتر لكل نموذج) في الشق المخصص لها بواسطة حقنة نوع Hamilton ثم ربطت الدائرة الكهربائية وأجريت عملية الترحيل الكهربائي بفرق جهد 200 فولت وبتيار قدره 2 أمبير واستمر ذلك حتى اقتربت حزمة صبغة البروموفينول الزرقاء من نهاية الهلام . بعد الإنتهاء من عملية الترحيل رفع الهلام وغمر في محلول التثبيت لمدة ساعة واحدة وغمر بعدها في محلول التصبيغ لمدة ساعة واحدة أيضاً . وضع الهلام في محلول إزالة الصبغة حيث يستمر الغسل بهذا المحلول لعدة تبديلات حتى تزال الصبغة من أرضية الهلام بشكل كامل وتظهرالحزم البروتينية بصورة واضحة .

5- حساب الوزن الجزيئي

تم حساب الوزن الجزيئي للبروتينات من خلال رسم العلاقة بين لوغاريثم الوزن الجزيئي للبروتينات القياسية والحركة النسبية Relative mobility (Rm) لها وذلك حسب المعادلة التالية :

$$\text{الحركة النسبية Rm} = \frac{\text{المسافة التي قطعها البروتين}}{\text{المسافة التي قطعتها صبغة البروموفينول الزرقاء}}$$

بعد استخراج الـ Rm وإسقاطها على المنحنى القياسي (شكل-2) أمكن تقدير الوزن الجزيئي للحزم Bands البروتينية المرحلة ومقارنتها مع البروتين المستخلص من حيوانات المجموعة الضابطة وبوجود البروتينات القياسية .

سادساً - التحليل الإحصائي

Statistical analysis

أدخلت البيانات لجهاز الحاسوب حيث تم تحليلها إحصائياً باستخدام برنامج Minitab 13 وذلك عن طريق تحليل التباين باتجاه واحد One way Analysis of Variance (ANOVA) (Ott, 1984) .

النتائج والمناقشة

أولاً – فحص مصل الدم

1- التغير في مستوى جلوكوز المصل

يوضح جدول 1 نتائج التحليل الإحصائي لمستوى جلوكوز المصل في الجرذان المعاملة بمستخلص نبات المرسين مقاساً بالملليجرام لكل 100 مل من الدم ، حيث لوحظ وجود فروق معنوية بين الجرذان المعاملة والجرذان الضابطة ، فقد أدت المعاملة لمدة أسبوع إلى حدوث انخفاض معنوي في مستوى الجلوكوز (11.7±57.9) مقارنة بالمجموعة الضابطة (18.2±106.9) ، كذلك لوحظ الإنخفاض بعد المعاملة لمدة أسبوعين (10.1±56.4) مقارنة بجرذان المجموعة الضابطة (16.0±102.1) .

2- التغير في مستوى البروتين الكلي للمصل

يتضح من خلال جدول 2 وجود فروق معنوية في مستوى البروتين الكلي لمصل الجرذان بعد المعاملة بمستخلص نبات المرسين مقاساً بالجرام لكل 100 مل من الدم ، فقد لوحظ حدوث ارتفاع معنوي في تركيز البروتين بعد أسبوع من المعاملة (11.0 ± 2.2) مقارنة بالمجموعة الضابطة (± 0.9 7.2) ، وقد زاد هذا التركيز بشكل كبير بعد المعاملة لمدة أسبوعين (16.0 ± 1.2) مقارنة بالمجموعة الضابطة (7.2 ± 0.2) .

3- التغير في مستوى ألبومين المصل

يوضح جدول 3 مدى تأثير مستخلص نبات المرسين على مستوى ألبومين المصل في الجرذان مقاساً بالجرام لكل 100 مل من الدم . حيث تبين أن هناك انخفاض طفيف غير معنوي في مستوى تركيز الألبومين بعد أسبوع من المعاملة (2.7 ± 0.5) مقارنة بالمجموعة الضابطة (± 0.9 3.1) ، في حين أدت المعاملة لمدة أسبوعين إلى حدوث ارتفاع معنوي لألبومين المصل (4.4±0.2) مقارنة بجرذان المجموعة الضابطة (3.2±1.1) .

4- التغير في تركيز أيونات الصوديوم والبوتاسيوم

يبين جدول 4 مدى تأثير مستخلص نبات المرسين على مستوى تركيز أيونات الصوديوم (Na^+) في الجرذان مقاسة بالملي مول ، حيث أوضحت النتائج وجود ارتفاع معنوي لأيونات الصوديوم بعد المعاملة لمدة أسبوع (± 4.4 144.7) مقارنة بالمجموعة الضابطة (139.1 ± 2.6) ، إلا أن المعاملة لمدة أسبوعين أدت إلى انخفاض تركيز هذه الأيونات (141.9 ± 2.0) مع عدم وجود فرق معنوي بينها وبين المجموعة الضابطة (139.4 ± 2.1) .

يظهر جدول 5 تأثير مستخلص نبات المرسين على مستوى تركيز أيونات البوتاسيوم

(K^+) مقاسة بالملي مول ، حيث تبين أن هناك ارتفاع معنوي في تركيز أيونات البوتاسيوم في الجرذان المعاملة لمدة أسبوع (7.2 ± 0.7) مقارنة بالمجموعة الضابطة (5.8 ± 0.3) ، كما أدت المعاملة لمدة أسبوعين إلى حدوث ارتفاع معنوي كبير (8.5±0.6) مقارنة بالمجموعة الضابطة (5.8±0.4) .

جدول 1 تأثير مستخلص نبات المرسين على مستوى الجلوكوز في مصل الجرذان مقاساً بالملليجرام / 100 مل من الدم

العينة	عدد المعاملات (N)	المتوسط ± الانحراف القياسي $\bar{X}$ ± S.D	الفروق المعنوية عند 0.05
المجموعة الضابطة	7	106.857 ± 18.24	a
معاملة لمدة أسبوع	7	057.857 ± 11.68	b
المجموعة الضابطة	7	102.142 ± 16.00	a
معاملة لمدة أسبوعين	7	056.428 ± 10.08	b

• الحروف المختلفة تعني وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية $P < 0.05$

• الحروف المتشابهة تعني عدم وجود فروق معنوية

جدول 2 تأثير مستخلص نبات المرسين على مستوى البروتين الكلي في مصل الجرذان مقاساً بالجرام / 100 مل من الدم

العينة	عدد المعاملات (N)	المتوسط ± الانحراف القياسي $\bar{X}$ ± S.D	الفروق المعنوية عند 0.05
المجموعة الضابطة	7	07.240 ± 0.889	a
معاملة لمدة أسبوع	7	11.028 ± 2.217	b
المجموعة الضابطة	7	07.200 ± 0.216	a
معاملة لمدة أسبوعين	7	15.985 ±1.239	c

جدول 3 تأثير مستخلص نبات المرسين على مستوى الألبومين في مصل الجرذان مقاساً بالجرام / 100 مل من الدم

العينة	عدد المعاملات (N)	المتوسط ± الانحراف القياسي $\bar{X}$ ± S.D	الفروق المعنوية عند 0.05
المجموعة الضابطة	7	3.142 ± 0.8791	a
معاملة لمدة أسبوع	7	2.700 ± 0.4726	a
المجموعة الضابطة	7	3.242 ± 1.0659	a
معاملة لمدة أسبوعين	7	4.357 ± 0.1988	b

جدول 4 تأثير مستخلص نبات المرسين على مستوى تركيز أيونات الصوديوم في مصل الجرذان مقاسة بالملي مول

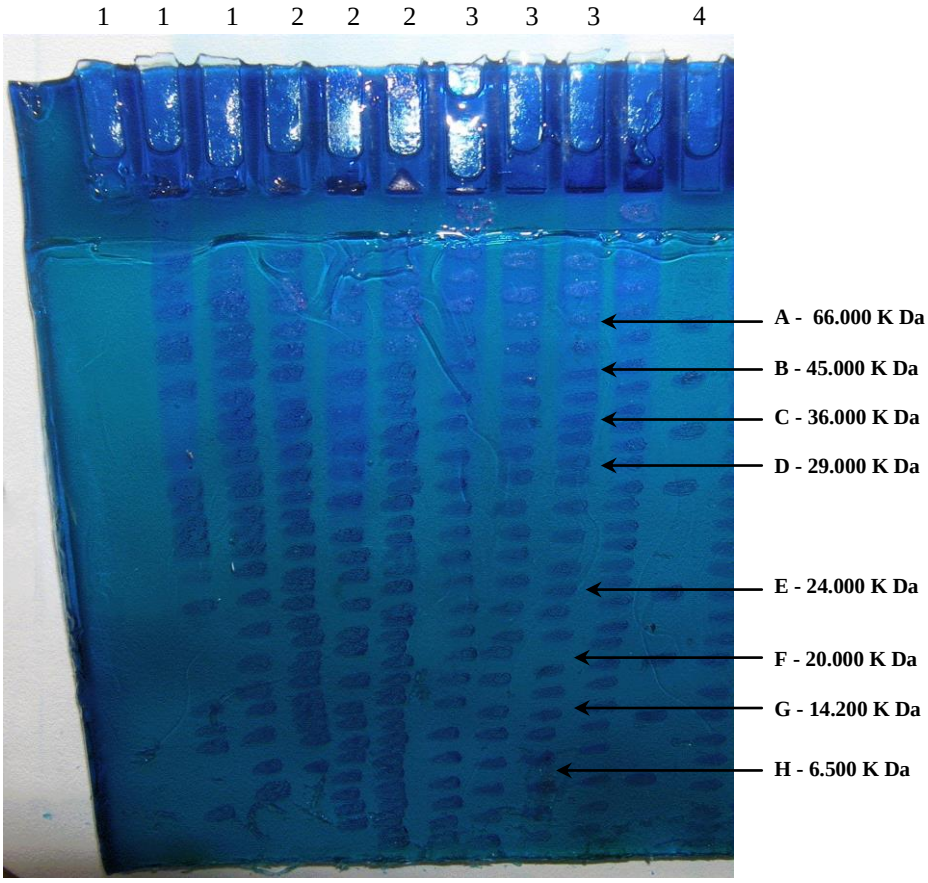
العينة	عدد المعاملات (N)	المتوسط ± الانحراف القياسي $\bar{X}$ ± S.D	الفروق المعنوية عند 0.05
المجموعة الضابطة	7	139.142 ± 2.61	a
معاملة لمدة أسبوع	7	144.714 ± 4.39	b
المجموعة الضابطة	7	139.428 ± 2.07	a
معاملة لمدة أسبوعين	7	141.857 ± 1.95	ab

جدول 5 تأثير مستخلص نبات المرسين على مستوى تركيز أيونات البوتاسيوم في مصل الجرذان مقاسة بالملي مول

العينة	عدد المعاملات (N)	المتوسط ± الإنحراف القياسي $\bar{X}$ ± S.D	الفروق المعنوية عند 0.05
المجموعة الضابطة	7	5.800 ± 0.3266	a
معاملة لمدة أسبوع	7	7.157 ± 0.6828	b
المجموعة الضابطة	7	5.751 ± 0.3505	a
معاملة لمدة أسبوعين	7	8.500 ± 0.6000	c

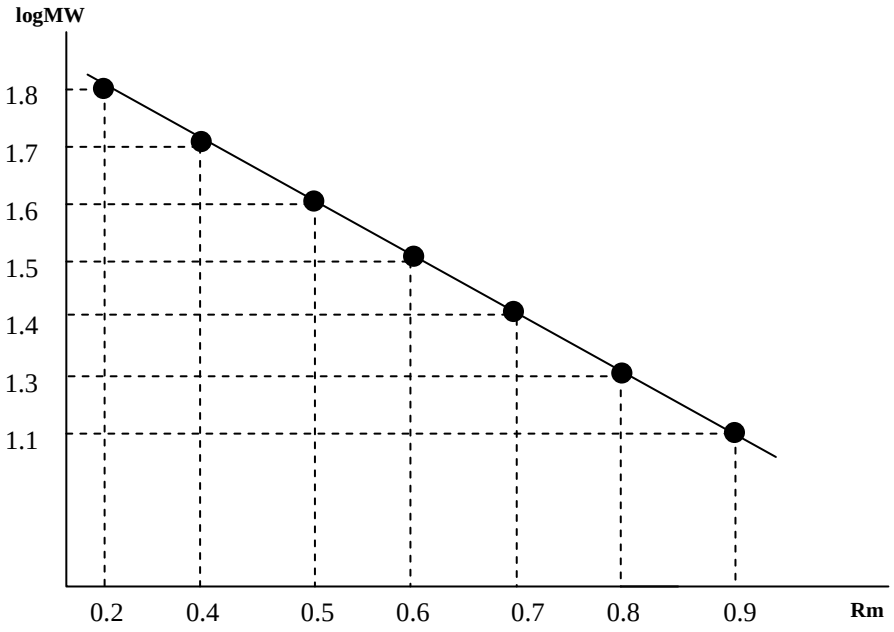
ثانياً – ملاحظة النمط البروتيني بواسطة الترحيل الكهربائي

تم تقدير الأوزان الجزيئية لبروتينات الدم عن طريق استخراج المسافة التي قطعتها الحزم Bands البروتينية (شكل–1) وإسقاطها على المنحنى القياسي (شكل–2) حيث أمكن تقدير الوزن الجزيئي للحزم المرحلة ومقارنتها مع بروتينات مصل المجموعة الضابطة وبوجود البروتينات القياسية . ويبين جدول 6 الأوزان الجزيئية مقاسة بالكيلودالتون (KDa) لبروتينات المجموعة الضابطة والمجموعتين المعاملتين بالمستخلص لمدة أسبوع وأسبوعين ، حيث لوحظ ظهور بعض الحزم البروتينية ذات الأوزان الجزيئية العالية في المجموعتين المعاملتين مقارنة بالمجموعة الضابطة مع ملاحظة اختفاء بعض الحزم البروتينية (60.6 ، 44.7 ، 41.7 ، 35.5 ، 31.2 ، 25.2 ، 16.6 ، 15.8 ، 15.1 ، 14.1 ، 13.2 ، 7.9) فى الجرذان المعاملة لمدة أسبوع مقارنة بجرذان المجموعة الضابطة ، وفى المقابل ظهرت حزم جديدة في المجموعتين المعاملتين (63.1 ، 56.2 ، 52.5 ، 45.5 ، 23.5 ، 21.9 ، 12.9 ، 12.6) والتي لم تظهر في المجموعة الضابطة .



شكل 1 الترحيل الكهربائي لبروتينات الدم في مصل الجرذان ، يوضح الحزم البروتينية الموجودة في مصل الجرذان المعاملة لمدة أسبوع (1) ، والمعاملة لمدة أسبوعين (2) وجرذان المجموعة الضابطة ، (3) وحزم البروتينات القياسية (4) وهى :

A = Albumin, bovine serum. B = Ovalbumin, chicken egg.
C = Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, rabbit muscle.
D = Carbonic anhydrase ,bovine erythrocytes. E = Trypsinogen, bovine pancreas.
F = Trypsin inhibitor, soybean. G = α-Lactalbumin, bovine milk.
H = Aprotinin, bovine lung.



شكل 2 منحنى يوضح العلاقة بين لوغاريتم الوزن الجزيئي والحركة النسبية لحزم البروتين القياسي

لوحظ في دراستنا الحالية حدوث انخفاض في مستوى جلوكوز الدم في الجرذان المعاملة بالمستخلص لمدة أسبوع وانخفض أكثر بعد أسبوعين من المعاملة . وتتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه علي (2007) في دراسته لنبات الحلبة وتأثيره على جلوكوز الدم حيث وجد أن لبذور نبات الحلبة تأثير مخفض لمستوى السكر في الدم . وقد فسر هذا الانخفاض على ضوء التثبيط العكسي لإنزيم α-Glucosidase الموجود في الطبقة المخاطية للأمعاء الدقيقة (Sepici et al., 2004; Onal et al., 2005) أو قد يكون كنتيجة لزيادة معدل تحلل الجلوكوز والذي تم ملاحظته من النشاط المرتفع لإنزيم Glucokinase في الدراسة التي قام بها Sepici et al. (2004) . هذه النتائج تتفق مع El-Fellah et al. (1984) من ناحية اعتبار نبات المرسين علاجاً فعالاً لتخفيض مستوى السكر في الدم ، بينما لا تتفق نتائج دراستنا مع ما توصل إليه نفس الباحثين حيث أنهم وجدوا أن لمستخلص المرسين تأثير مثبط لجلوكوز الدم في الفئران المستحث فيها مرض السكري فقط وليس في الفئران الطبيعية ، وهذا قد يكون ناتج عن الاستعمال القصير المدى للمستخلص والذي لم

يتجاوز الـ 72 ساعة ، في حين تضمنت دراستنا استخدام المستخلص لمدة أسبوع وأسبوعين . كما وجد Bnouham et al. (2003) أن المستخلص المائي لنبات الحريق يؤدي إلى خفض مستوى السكر في الدم ، وقد فسر ذلك من خلال قدرة نبات الحريق على تقليل امتصاص الجلوكوز في الأمعاء ، أو عن طريق تثبيط نشاط إنزيم الأميليز Amylase الموجود في الغدد اللعابية والأمعاء وبالتالي تحطيم النشا ببطء أكثر والتفليل من ارتفاع السكر في الدم (Deng and Tao, 1998) ، أو عن طريق زيادة نفاذية أغشية الخلايا للجلوكوز . هذا وقد أشار Puri et al. (2002) إلى أن إعطاء مستخلص بذور نبات الحلبة للجرذان قد أدى إلى تحفيز إفراز الإنسولين من جزر لانجرهانس وبالتالي حدوث انخفاض في مستوى الجلوكوز في الدم . وعلى العكس من ذلك فقد وجد Sepici et al. (2004) أن مستخلص نبات المرسين لم يؤثر على الإنسولين الموجود في المصل سواء في الأرانب الطبيعية أو المستحث فيها السكر . وقد أعزى هؤلاء البحاث هذا الإنخفاض في مستوى السكر إلى الكميات الكبيرة للجليكوجين الكبدي الذي يتكون بعد إعطاء المستخلص .

تبين الدراسة الحالية وجود ارتفاع معنوي في البروتين الكلي للمصل بعد المعاملة بالمستخلص لمدة أسبوع وأسبوعين ، خلافاً لما ذكره علي (2007) عن تأثير مستخلص بذور نبات الحلبة . وقد أعزي ارتفاع مستوى البروتين الكلي للمصل إلى التأثير المنشط للنبات على خلايا الجهاز المناعي مما قد يزيد من إفراز الخلايا للجلوبيولينات المناعية حيث أن بعض أنواع بروتينات المصل تصنع في خلايا الجهاز المناعي (Yuan et al., 1992) ، كما يحتمل أن تكون زيادة إفراز البروتينات مرتبطة بحدوث خلل في نسيج الكبد المسئول عن تنظيم إفرازها أو بسبب ارتفاع معدل هرمونات الغدة الدرقية في الدم حيث أن زيادة تركيز هذه الهرمونات يعمل على تحفيز تكوين البروتين في جميع خلايا الجسم (الكبيسي ، 2002) .

كما أوضحت نتائج هذه الدراسة أن المعاملة لمدة أسبوع بالمستخلص أدت إلى انخفاض طفيف غير معنوي بمستوى ألبومين المصل ، في حين أن المعاملة لمدة أسبوعين أدت إلى حدوث ارتفاع معنوي لألبومين المصل . بينما وجد علي (2007) أن إعطاء مستخلص بذور نبات الحلبة للجرذان لم يؤدي إلى أية تأثيرات ملحوظة على مستوى ألبومين المصل . ويمكن أن يكون الانخفاض النسبي للألبومين في بداية المعاملة نتيجة للتأثيرات الجانبية للمستخلص على الخلايا الكبدية مما أدى إلى خلل في تنظيم الإفراز ، بينما قد يكون الارتفاع المعنوي للألبومين في نهاية التجربة مرتبط بمعدل إفراز هرمونات الغدة الدرقية أو نتيجة تلف

شديد في خلايا الكبد مما أدى إلى إفراز الألبومين بكميات كبيرة (الكبيسي ، 2002) .

سجل في هذه الدراسة ارتفاع معنوي في تركيز أيونات الصوديوم بعد أسبوع من المعاملة وقد يعزى ذلك إلى نقص السكر في الدم والذي يؤدي بدوره إلى إعادة نقل الصوديوم من الخلية إلى السائل الخارج خلوي ليتسنى الإبقاء على ضغط إسموزي متساوٍ خارج الخلية وداخلها (منسي والشريدة، 2001) ، في حين أن المعاملة لمدة أسبوعين أدت إلى انخفاض نسبي غير معنوي في مستوى أيونات الصوديوم ويحتمل أن يكون السبب هو قلة إعادة امتصاص الصوديوم من قبل الأنيبيبات الكلوية نتيجة لانسدادها (منسي والشريدة، 2001) .

أشارت النتائج إلى وجود ارتفاع معنوي في تركيز أيونات البوتاسيوم في الجرذان المعاملة لمدة أسبوع وأسبوعين والسبب في ذلك قد يرجع إلى حدوث التهاب في المسالك البولية أو الفشل الكلوي (منسي والشريدة ، 2001) . بالإضافة إلى ذلك فإن التغيرات في مستوى أيونات الصوديوم والبوتاسيوم قد تكون ناتجة من تثبيط مضخة الصوديوم والبوتاسيوم $Na^+ - K^+$ ATPase المسئولة عن المحافظة على المعدل الطبيعي لهذه الأيونات داخل الخلية وخارجها (Hirano et al., 1989) .

بينت نتائج الترحيل الكهربائي لبروتينات المصل أن هناك زيادة في أعداد الحزم البروتينية ، إضافة إلى ظهور حزم بأوزان جزيئية عالية في الجرذان المعاملة بمستخلص نبات المرسين مقارنة بالمجموعة الضابطة ، وهذا يدل على أن هناك ارتفاع في مستوى تركيز البروتين الكلي للمصل والذي قد ينتج عن زيادة إفراز الخلايا للجلوبيولينات المناعية (Yuan et al., 1992) أو كنتيجة لارتفاع معدل إفراز هرمونات الغدة الدرقية المحفزة لتكوين البروتينات (الكبيسى ، 2002) . هذا وقد لوحظ أيضاً من خلال الترحيل الكهربائي اختفاء بعض الحزم البروتينية في المجموعة المعاملة لمدة أسبوع وظهور حزم بروتينية أخرى بأوزان جزيئية مختلفة ، ويرجح أن تكون بعض الحزم المختفية هي لبروتين الألبومين الذي لوحظ انخفاضه النسبي في الدم بعد أسبوع من المعاملة والسبب في ذلك قد يكون ناتج عن اضطراب في وظيفة الكبد كنتيجة لخلل في هذا النسيج (الكبيسى ، 2002) .

الاستنتاجات والتوصيات
Conclusions and Recommendation

من خلال الدراسة الحالية التي تضمنت اختبار تأثير الجرعة المخفضة لسكر الدم (2 جم/كجم) للمستخلص الإيثانولي المائي لأوراق

نبات المرسين على مصل الدم فقد أمكن التوصل إلى أهم الاستنتاجات والتوصيات التالية :

1- إن الجرعة المحددة لمستخلص نبات المرسين (2 جم/كجم) والمستخدمة لتخفيض مستوى السكر في الدم لها تأثيرات ضارة على المستوى الفسيولوجي .

2- ضرورة إجراء المزيد من الدراسات عن نبات المرسين والنباتات الطبية الأخرى من نواحي عديدة ، وتحديد مدى إمكانية استخدامها في الطب البديل .

3- يجب أن يكون استخدام النباتات الطبية تحت إشراف طبي وخاصة أن هذه النباتات قد تحدث تداخلات دوائية عند استعمال بعض الأدوية الأخرى وخاصة الأدوية المخفضة لمستوى السكر .

Physiological studies on the effect of Myrtus communis extract on the blood serum in rats

Noura I. Al-Zail* **Abdusalam M. Aboalhaj** **Saad M. S. El-Gharbawy**

Abstract

The aim of this study was to test the effect of the ethanolic extract of *Myrtus communis* leaves on the blood serum in white rats. The animals were given a dose of 2 g/kg orally. 37 rats were divided in to 3 groups. The first group was given the dose daily for 7 days and the second one was treated for 14 days. In the third group some animals were given the dose for 7 days and some for 14 days for the purpose of studying the blood proteins profile using electrophoresis. Each group included some animals as a control.

The animals which were treated with the extract showed bleeding through mouth and nose and were lethargic and tired and lost apetite. Furthermore, the weight of these animals was significantly lower than those in the controls. Biochemical analysis showed significant reduction in the level of glucose in the blood, while there was significant increase in the level of total serum protein, serum albumin, the concentration of sodium and potassium ions .Gel electrophoresis showed an increase in the number of protein bands as well as the appearance of new protein bands with high molecular weights in the treated animals in comparison with the control.

* Zoology Department / Faculty of science / Omar El-Mukhtar University.

* Cytology and Histology Department / Faculty of veterinary medicine / Cairo University.

المراجـــــع

الحميدي ، أحمد راشد . الدوخي ، عثمان عبد الله والغندور ، محمـــد حامـــد (1998) . الأساسيات في عملي أجنة الفقاريـــات (الوصفي والتجريبي). الطبعـــة الأولى . منشورات جامعة الملك سعود . المملكة العربية السعودية .

الزاعل ، نورا إبراهيم (2007) . دراســـة التـــأثير الفسيولوجي والنسيجي لمستخلص نبات المرسين *Myrtus* على بعـــض أنســـجة الجرذان . أطروحة ماجستير . قسم علم الحيـــوان . جامعـــة عمـــر المختـــار . الجماهيرية الليبية .

القاضـــي ، عبـــد الله عبـــد الحكـــيم (1954) . استعمالات بعض النباتـــات في الطـــب الشعبي الليبي . الجـــزء الثالـــث . دار الحكمة للطباعـــة والنشـــر والتوزيـــع. الجماهيرية الليبية . 107–109 .

الكبيسي ، خالد (2002) . الكيمياء الحيويـــة – العلوم الطبية المساعدة . الطبعة الأولى . دار وائل للنشر والتوزيـــع . عمـــان – الأردن .

علي ، رابحة عيسى (2007) . تأثير التغذية بالحلبة في بطانـــة الـــرحم وبعـــض المعـــايير الفسيولوجية لإناث الجرذان . أطروحة ماجستير . قسم علم الحيوان . جامعـــة عمر المختار . الجماهيرية الليبية .

منسي ، عرسان إرشيد والشريدة ، محمد شـــريف (2001) . مقدمة في الكيمياء الحيويـــة السريرية . الجزء الثـــاني . دار وائـــل للطباعة والنشر . عمان – الأردن .

Bnouham, M., Merhfour, F. Z., Ziyyat, A., Mekhfi, H., Aziz, M. and Legssyer, A. (2003). Antihyperglycemic activity of the aqueous extract of *Urtica dioica*. Fitoterapia., 74(7): 677-681.

Deng, Z. Y. and Tao, B. Y. (1998). Effect of green tea and black tea on blood glucose, triglycerides and antioxidants in aged rats. J. Agricult Food Chem., 46: 3875-3878.

El-Fellah, M. S., Akhter, M. H. and Khan, M. T. (1984). Anti-hyperglycaemic effect of an extract of *Myrtus communis* in streptozotocin-induced diabetes in mice. J. Ethnopharmacol., 11(3): 275-281.

Hirano, T., Homma, M. and Oka, K. (1989). Effects of stining nettle root extracts and their steroidal components on the Na □, K □-ATPase of the benign prostatic hyperplasia. Planta Med., 55(5): 452-454.

Laemmli, U. K. (1970). Detection of antibodies against *Echinococcus granulosus* major antigens and their subunits by

Indian. J. Physiol. Pharmacol., 46: 457-462.

Sato, T., Onse, Y., Nagase, H. and Kito, H. (1990). Mechanism of antimutagenicity of aquatic plant extracts against benzo(a) pyrene in the *Samonella* assay. Mut. Res., 241: 283-290.

Sepici, A., Gurbuz, I., Cevik, C. and Yesilada, E. (2004). Hypoglycaemic effects of myrtle oil in normal and alloxan-diabetic rabbits. J. Ethnopharmacol., 93(2-3): 311-318.

Yuan, D., Wilder, J. and Dany, T. (1992). Activation of B-lymphocytes by natural Killer cells Int. Immunol., 4:1373.

immunoblotting. Transactions of the Royal society of Tropical Medicine & Hygiene., 85: 239-243.

Onal, S., Timur, S., Okutucu, B. and Zihnioglu, F. (2005). Inhibition of alpha-glucosidase by aqueous extracts of some medicinal herbs. Prep. Biochem. Biotechnol., 35(1): 29-36.

Ott, L. (1984). An introduction to statistical methods and Data Analysis 2nd edition. Duxburg Press, Boston, USA.

Puri, D., Parabhu, K. M. and Murthy, P. S. (2002). Mechanism of action of a hypoglycemic principle isolated from fenugreek seeds.