تأثير بعض المركبات البروتينية الفعالة المعزولة من أوراق نبات الهندباء *Chicory Leaf* على بعض المتغيرات الدموية والكيموحيوية في اناث الفئران المصابة بفقر الدم المستحدث بالنزف

حمزة نامق حميد

قسم الكيمياء / كلية التربية

جامعة الموصل

الاستلام	القبول
2012 / 03 / 26	2012 / 06 / 06

Abstract

This study was designed to isolate some of proteinous compounds from the aqueous extract of *Chicory Leaf* by cold acetone precipitation. Using gel filtration technique, two compounds (A and B) were isolated from the proteinous precipitate. Then, the effects of aqueous extract and the proteinous precipitate were studied on some blood values and biochemical variables in mice infected with anemia creator bleeding. These extracts were administrated intraperitoneally and their effects were compared with estate ferrosam.

After one week of treatment the results indicated that the aqueous extracts and their isolated compounds caused a significant increase in packed cell volume (PCV%), white blood cells (WBC) count and total protein in female mice comparing with control group. The results also indicated that treatment with the aqueous extracts crude and proteinous precipitate at doses of 150, 15 mg/Kg body weight respectively produced a significant increase of glutathione and a significant decrease in uric acid the normal level.

The results were also showed that compound A and B at the dose (0.937, 1.05) mg/Kg body weight respectively access level serum iron, hemoglobin blood, PCV% and total protein to the normal level, in addition to similar effect to estate ferrosam effect.

الخلاصة

صممت هذه الدراسة لعزل بعض المركبات البروتينية من المستخلص المائي لورق نبات الهندباء باستخدام ترسيب البروتينات بالاسيتون البارد. وباستخدام تقنية الترشيح الهلامي تم

فصل مركبين A و B من الراسب البروتيني. درست فعالية المستخلص المائي الخام والمواد البروتينية المعزولة منها على بعض المتغيرات الدموية والكيموحيوية في اناث الفئران المصابة بفقر الدم المستحدث بالنزف ومقارنتها مع تأثير عقار الفيروسام ferrosam.

اشارت النتائج بعد اسبوع من المعاملة بالمستخلص المائي الخام والمركبات المعزولة إلى ارتفاع معنوي في النسبة المئوية لحجم خلايا الدم المرصوصة PCV, عدد خلايا الدم البيض RBC ومستوى البروتين الكلي مقارنة بمجموعة السيطرة. كما اشارت النتائج ان المعاملة بالمستخلص المائي الخام والراسب البروتيني وبجرع (150) و (15) ملغم/كغم من وزن الجسم على التوالي إلى ارتفاع معنوي لمستوى الكلوتاثايون وانخفاض معنوي لمستوى حامض اليوريك الى المستوى الطبيعي.

بينت النتائج كذلك وصول مستوى حديد المصل, هيموكلوبين الدم, النسبة المئوية لـ PCV والبروتين الكلي إلى حد المستوى الطبيعي عند المعاملة بالحزم البروتينية A و B وبجرع (0.937) و (1.05) ملغم/كغم من وزن الجسم على التوالي بالإضافة الى التأثير المشابه لتأثير عقار الفيروسام ferrosam.

المقدمة

تحتل النباتات الطبية في الوقت الحاضر مكانة كبيرة في الانتاج الزراعي والصناعي، وهذه النباتات هي المصدر الرئيسي للعقاقير الطبية لمعالجة الأمراض المختلفة[1].

ينتمي نبات الهندباء الى العائلة المركبة (Compositae) ويعرف علمياً باسم Chicorium intybus وجنسه Cichorium، ويحتوي نبات الهندباء على الانيولين والسكروز والسليلوز والبروتين[3,2].

يعد فقر الدم نقص الحديد من اكثر المشاكل الصحية شيوعا في العالم ويعاني منه النساء في عمر الانجاب والحوامل والمرضعات وكذلك الاطفال قبل سن المدرسة[4]. ويعرف فقر الدم نقص الحديد على انه الحالة التي يكون فيها تركيز هيموكلوبين الدم او حجم خلايا الدم الحمراء أو كلاهما اقل من الطبيعي حيث تكون الكريات الحمراء صغيرة الحجم ويبلغ قطرها اقل من 4 مايكرون Microcytic (الحجم الطبيعي 7 مايكرون) وشاحبة اللون Hypochromic[5]. وعادة تحصل حالة فقر الدم نقص الحديد عند عدم كفاية الحديد بالغذاء أو اعاقة عملية امتصاصه واضطرابات المعدة والامعاء وكذلك نتيجة لفقدان الدم بسبب النزف الحاد والمزمن عادة من المناطق المعوية أو البولية أو بسبب حالة الطمث menorrhagia في البنات المراهقات[4]. وتتميز المرحلة المتقدمة لفقر الدم نقص الحديد بفقدان الحديد المخزون وانخفاض في تركيز حديد المصل وانخفاض في تشبع الترانسفيرين وانخفاض مستوى الهيموكلوبين ونسبة حجم خلايا الدم المرصوصة.

تؤدي اصناف الاوكسجين الفعالة والتي تنتج اثناء المسارات الايضة في خلايا الدم واغلب الخلايا الأخرى في الجسم دورا أساسيا في نشوء العديد من الحالات المرضية التي تصيب الانسان والحيوان، إذ لها القابلية على تدمير الجزيئات الكبيرة مثل DNA والبروتينات والسكريات وكذلك الاحماض الدهنية غير المشبعة التي تعتبر اهداف محتملة لمجاميع الاوكسجين الفعالة. وتشمل اصناف الاوكسجين الفعالة، جذر سوبر اوكسايد السالب $\dot{O}_2^-$ وجذر الهيدروكسيل $H\dot{O}$ و جذرالبيروكسيل $RO\dot{O}$ وجذر اوكسيد النتريك $N\dot{O}$ وجذر الالوكسيل $R\dot{O}$[7,6]. يقوم الكائن الحي بالتصدي لتأثيرات الاوكسجين الفعالة من خلال موانع الاكسدة وبذلك يؤخر بشكل ملحوظ ضرر الاكسدة, وقد لوحظ حدوث الكرب التاكسدي في حالة عدم قدرة هذه الاليات الدفاعية بازالة التاثيرات التاكسدية للجذور الحرة لذا اشارت معظم الدراسات الحديثة الى التركيز على دور موانع الاكسدة في الوقاية من الكرب التاكسدي[8].

اظهرت العديد من الدراسات التاثير الوقائي في المركبات التي تعمل على ازالة الجذور الحرة اذ تعد مضادات الاكسدة احدى الاليات المهمة التي تعمل مع الحمية الغذائية على منع الاصابة والتعرض للامراض[9].

المواد وطرائق العمل

الحيوانات المستخدمة

استخدمت في هذه الدراسة اناث الفئران البيض المجهزة من كلية التربية/جامعة الموصل, وتقاربت اوزانها بين (23–28 غم) وضعت في اقفاص خاصة معدة ومجهزة لهذا الغرض، وزودت بالماء والعلف الحيواني الخاص بها باستمرار واخضعت جميع الحيوانات للظروف ذاتها من ضوء طبيعي ودرجة حرارة (25) °م.

طرائق العمل

تحضير المستخلص المائي لورق نبات الهندباء :

وزن (100) غرام من ورق نبات الهندباء، وطحنت باستخدام آلة الثرم (Blender) لمدة 10 دقائق ومزجت مع الماء المقطر بنسبة (1 وزن:6 حجم). بعدها جمدت عند (−20)°م ثم تركت تذوب عند درجة حرارة الغرفة, كررت العملية عدة مرات لاتمام تكسير الجدار الخلوي عن طريق التجميد والتذويب. بعد ذلك حرك الخليط لمدة ساعتين تحت تأثير المحرك المغناطيسي الكهربائي مع مراعاة التبريد في حمام ثلجي. ورشح من خلال عدة طبقات من الشاش وفصل المستخلص بجهاز الطرد المركزي المبرد لمدة (10) دقائق بسرعة (33520xg) للتخلص من المواد غير الذائبة وللحصول على راشح رائق[10] وقيس حجم الراشح (480) سم^3، وقدرت كمية البروتين فيه حسب طريقة لاوري المحورة[11]، وبعدها يكون المستخلص معدا لإجراء العملية التالية وهي الترسيب بالاسيتون.

تم إعادة طريقة العمل للتجربة اعلاه وذلك للحصول على المستخلص المائي الخام وذلك بتجفيد المستخلص المائي لحين الحصول على مادة جافة (تم حفظه في المجمدة لحين اجراء التجارب اللاحقة).

عزل البروتينات وترسيبها

تم ترسيب البروتينات من المستخلص المائي باستخدام الأسيتون البارد وبنسبة (60:40) حجم: حجم على التوالي[12]، تم الحصول على الراسب البروتيني بعد فصله بجهاز الطرد المركزي المبرد وبسرعة 6000xg ولمدة 20 دقيقة. بعد ذلك وضع الراسب البروتيني في جهاز التجفيد لعدة ساعات للحصول على المادة البروتينية بشكل مسحوق (تم حفظه في المجمدة لحين اجراء التجارب اللاحقة).

فصل وتنقية البروتين

تم تنقية بروتين الخام الذي عزل بالترسيب وذلك باستخدام تقنية الترشيح الهلامي Gel Filtration (13) , من خلال عمود فصل ذي أبعاد 1.8x120سم، والحاوي على مادة السيفاديكس (Sephadex G-100) بارتفاع 110سم وبمعدل جريان 30 مل/ساعة، حيث تم فصل حزم بروتينية والتي تم تجفيفها بجهاز التجفيد لحين الحصول على مسحوق وعدت هذه مركبات بروتينية (تم حفظها في المجمدة لحين اجراء التجارب اللاحقة).

تعين الوزن الجزيئي التقريبي للمركبات البروتينية المفصولة

استخدم نفس عمود الفصل المذكور اعلاه لتعيين الوزن الجزيئي التقريبي للمركبات البروتينية المفصولة لورق نبات الهندباء بعد تمرير محاليل المواد القياسية المعلومة الوزن الجزيئي فيه ومحلول البروتين الخام[14].

تحديد الجرع المؤثرة

استخدمت اناث الفئران والتي تراوحت أوزانها (23-28)غم قسمت إلى (5) مجاميع تضم كل مجموعة (4) فئران لكل من (المستخلص المائي الخام والراسب البروتيني والمركب البروتيني A و B) لورق نبات الهندباء وعوملت كما يأتي:

تحديد الجرعة المؤثرة للمستخلص المائي الخام

1. المجموعة الأولى فئران مصابة بفقر الدم عدت مجموعة سيطرة.

2. المجاميع من (2–5) حقنت في التجويف البريتوني بالجرع (50، 100، 150، 200 ملغم/كغم) من وزن الجسم على التوالي من المستخلص المائي الخام لورق نبات الهندباء.

تحديد الجرعة المؤثرة للراسب البروتيني

1. المجموعة الاولى فئران مصابة بفقر الدم عدت مجموعة سيطرة.
2. المجاميع من (2–5) حقنت في التجويف البريتوني بالجرع (10، 15، 20، 25 ملغم/كغم) من وزن الجسم على التوالي من الراسب البروتيني لورق نبات الهندباء.

تحديد الجرعة المؤثرة للمركب البروتيني A

1. المجموعة الأولى فئران مصابة بفقر الدم عدت مجموعة سيطرة.
2. المجاميع من (2–5) حقنت في التجويف البريتوني بالجرع (0.312، 0.625، 0.937، 1.25 ملغم/كغم) من وزن الجسم على التوالي بالمركب البروتيني A المفصول من الراسب البروتيني لورق نبات الهندباء.

تحديد الجرعة المؤثرة للمركب البروتيني B

1. المجموعة الأولى فئران مصابة بفقر الدم عدت مجموعة سيطرة.
2. المجاميع من (2–5) حقنت في التجويف البريتوني بالجرع (0.35، 0.7، 1.05، 1.4 ملغم/كغم) من وزن الجسم على التوالي بالمركب البروتيني B المفصول من الراسب البروتيني لورق نبات الهندباء.

وبعد اربع ساعات من أجراء عملية الحقن تم سحب الدم من الفئران من جيب محجر العين، وقيس مستوى هيموكلوبين الدم حالا, ثم اختيرت الجرعة الأكثر تأثيرا في رفع مستوى هيموكلوبين الدم وعدت الجرعة المؤثرة.

استحداث فقر الدم بالنزف

تم استحداث فقر الدم باجراء نزف من جيب محجر العين(Orbital sinus puncture) وذلك بعمل جرح بسيط باستخدام الانبوبة الشعرية المحتوية على الهيبارين Heparinized Capillary tub [15] ادى ذلك الى نزف دموي بحدود (5–8) قطرات. وكررت عملية النزف في اليوم الثالث قبل بدىء التجربة فاحدثت العملية فقر دم واضح تم التعرف عليه بقياس تركيز الهيموكلوبين وحجم خلايا الدم المرصوصة PCV.

حقن الحيوانات المصابة بفقر الدم

استخدمت اناث الفئران البيض التي تقاربت اوزانها بين (23-28)غم، قسمت عشوائيا الى (6) مجاميع تضم كل مجموعة (3) فئران، فضلا عن مجموعة سيطرة سليمة، وكما ياتي:

أ. مجموعة السيطرة السليمة تركت تتناول العلف والماء دون معاملة.

ب. مجموعة السيطرة المصابة بفقر الدم.

ت. المجاميع من (7−2) فئران مصابة بفقر الدم مع حقنها يومياً ولمدة اسبوع في التجويف البريتوني بكل من المستخلص المائي الخام ومادة الراسب البروتيني الخام والمركبات البروتينية A & B المفصولة بتقنية الترشيح الهلامي وبجرع مقدارها (150, 15, 0.937, 1.05 ملغم/كغم) من وزن الجسم على التوالي في حين حقنت مجموعة اخرى بعقار الفيروسام ferrosam وبجرعة مقدارها (500ملغم/60كغم) من وزن الجسم قدرت هذه الجرعة حسابيا نسبة الى قيمة الجرعة المؤثرة والمتناولة من قبل الانسان.

الحصول على عينات الدم والسيرم

خدرت الحيوانات بالايثر لبضع ثوان نهاية كل تجربة وجمعت عينات الدم من وريد زاوية العين الداخلية بواسطة عمل جرح بسيط فيها باستخدام الانبوبة الشعرية المحتوية على الهيبارين[15] وذلك لإجراء فحوصات الدم. بينما تم جمع عينات سيرم الدم بنفس الطريقة اذ جمع الدم في انابيب جافة ونظيفة خالية من مانع التخثر ثم سمح للدم بالتجلط وفصل المصل (Serum) بواسطة جهاز الطرد المركزي بسرعة (1008xg) ولمدة (10) دقائق. ثم وضع المصل في المجمدة لحين تقدير بعض المتغيرات الكيموحيوية.

تحاليل الدم

العد الكلي لكرات الدم الحمراء

العد بواسطة المجهر وشريحة العد Haemocytometer عن طريق: مزج 20 ميكروليتير من الدم مع 4 مل من محلول Hayem's الفسيولوجي ويتم الرج بلطف لتمام خلط الدم بالمحلول, ومن ثم تملأ شريحة العد Hemocytometer بماصة شعرية بعد وضع غطاء الشريحة. بعدها تعد كريات الدم الحمراء بواسطة العدسة الشيئية تحت الميكروسكوب بقوة تكبير 40X[16].

تقدير مستوى الهيموكلوبين في الدم.

تم مزج 20 µL عينة دم في انبوبة زجاجية تحوي على 5 مل من محلول درابكن Drabkin Solution، ثم قياس الامتصاص الضوئي عند الطول الموجي 540 nm[17].

العد الكلي لكريات الدم البيض

العد بواسطة المجهر وشريحة العد Haemocytometer عن طريق: مزج 20 ميكروليتير من الدم مع 0.38 مل محلول Turkey's ويتم الرج بلطف لتمام خلط الدم بالمحلول, ومن ثم تملأ شريحة العد Hemocytometer بماصة شعرية بعد وضع غطاء الشريحة. بعدها تعد كريات الدم البيض بواسطة العدسة الشيئية تحت الميكروسكوب بقوة تكبير 40X [16].

تقدير حجم خلايا الدم المرصوصة

تم تقدير حجم خلايا الدم المرصوصة باستعمال الانبوبة الشعرية المحتوية على الهيموكلوبين بعمل جرح بسيط في زاوية العين الداخلية[15] ثم ملؤها بالدم وسد نهايتها السفلى بمادة لينة مناسبة ثم اجراء الطرد المركزي لها باستخدام جهاز المنبذة لمدة (10) دقائق بسرعة (33520xg) ثم قراءة النسبة المئوية لحجم خلايا الدم المرصوصة PCV على مسطرة القراءة الخاصة[18].

تقدير بعض المتغيرات الكيموحيوية

تقدير كمية حديد المصل

قدر مستوى حديد المصل باستخدام عدة التحليل Kit نوع (Biolabo) وهي طريقة انزيمية، وتم قراءة الامتصاص الضوئي للون المعقد الناتج باستخدام المطياف الضوئي عند الطول الموجي 600 nm[19].

تقدير مستوى الكلوتاثايون في مصل الدم

قدر مستوى الكلوتاثايون في مصل الدم من قبل الباحثين (Seldlak & Lindsay) و (Tietz) وتعتمد الطريقة على اختزال مجموعة الثايول لكلوتاثايون بواسطة محلول المان الحاوي على مادة (DTNB) (5,5¯-dithio bis(2-nitrobenzoic acid مكونا ناتجا ملونا تقاس شدة امتصاصه عند الطول الموجي 412 nm [19، 20].

تم حساب مستوى الكلوتاثايون في مصل الدم حسب المعادلة:

$$GSH\ (\mu mol\ /L) = A\ /\varepsilon.L \times 10^6$$

A= الامتصاصية ε= الامتصاصية المولارية

تقدير حامض اليوريك في مصل الدم

قدر مستوى حامض اليوريك في مصل الدم باستخدام عدة التحليل Kit نوع (Biolabo) وهي طريقة انزيمية، وتم قراءة الامتصاص الضوئي للون المعقد الناتج باستخدام المطياف الضوئي عند الطول الموجي 520 nm [19].

تقدير البروتين الكلي بمصل الدم

عينت كمية البروتينات في مصل الدم باستخدام طريقة العالم لاوري المحورة[11].

التحليل الإحصائي Statistical analysis

حللت النتائج المستحصل عليها عمليا باستخدام تحليل التباين الاحادي One way analysis of variance كما تم تحديد الاختلافات الخاصة بين المجاميع باستخدام اختبار دنكن Duncan [21] وكان مستوى التمييز الاحصائي المقبول عند 5%(P<0.05).

النتائج والمناقشة

ايجاد كمية البروتينات الكلية ونسبها المئوية وكفاءة الترسيب بالاسيتون في المستخلص المائي الخام لورق نبات الهندباء

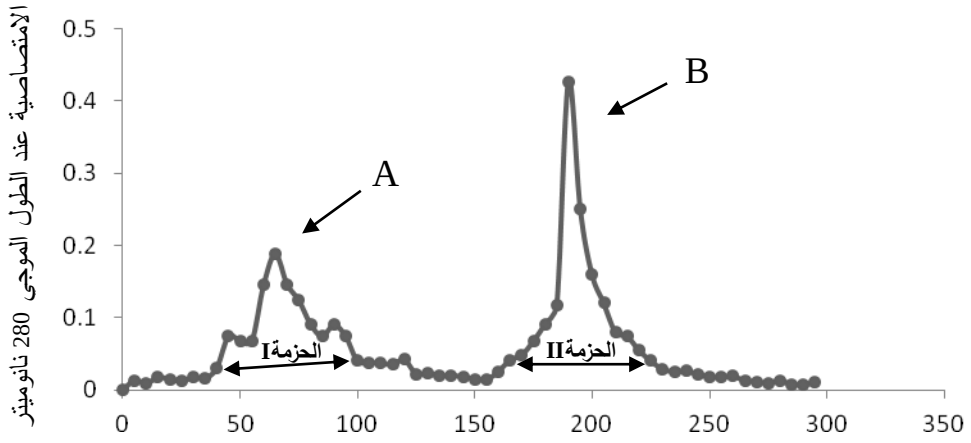
يوضح الجدول (1) كمية البروتينات المقدرة بطريقة العالم لاوري المحورة ونسبتها المئوية وكفاءة ترسيبها بالأسيتون في المستخلص المائي الخام.

الجدول (1): كمية البروتينات ونسبتها المئوية في المستخلص المائي الخام لورق نبات الهندباء وكفاءة الترسيب بالأسيتون

نوع المستخلص	تركيز البروتين (ملغم/سم^3)	الحجم الكلي للمستخلص (سم^3)	كمية البروتين الكلي في المستخلص(ملغم)	نسبة البروتين في النبات (%)	وزن النبات (غم)	وزن البروتين المحصل عليه عملياً (ملغم)	كفاءة الترسيب بالأسيتون (%)
المستخلص المائي الخام لورق نبات الهندباء	11.72	480	5625.6	5.62	100	4300	76.4

فصل مواد الرواسب البروتينية

تعد طريقة الترشيح الهلامي احدى الطرائق المتبعة عالميا لفصل المركبات اعتمادا على الاختلاف في حجم جزيئاتها، فالجزيئات الكبيرة تمر أولا من خلال عمود الفصل أما الجزيئات الصغيرة فسوف تتمكن من اختراق الهلام لذلك فانها تستغرق مدة زمنية اطول فتظهر اخيرا[22].
أعطى روغان مادة الراسب البروتيني المعزولة من المستخلص المائي لورق نبات الهندباء قمتين واضحتين عند إمرار محلولها في عمود الفصل المذكور سابقا والمبينة في الشكل (1).



الشكل (1): المظهر الجانبي لروغان الراسب البروتيني المعزول من المستخلص المائي الخام لورق نبات الهندباء بتقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفصل ذي الابعاد (1.8 x120) سم والحاوي على الهلام من نوع Sephadex G-100 الاسهم A وB تمثل حجم الروغان للقمم الاولى (65) سم^3 والثانية (190) سم^3 على التوالي للمركبات البروتينية المفصولة، حجم كل جزء (5) مل وبمعدل جريان (30سم^3 /ساعة).

يوضح الجدول (2) كمية البروتينات المقدرة بطريقة العالم لاوري المحورة ونسبتها المئوية للراسب البروتيني والحزم البروتينية A و B بالإضافة إلى كفاءة فصل الحزم البروتينية A و B في العمود المستخدم بتقنية الترشيح الهلامي.

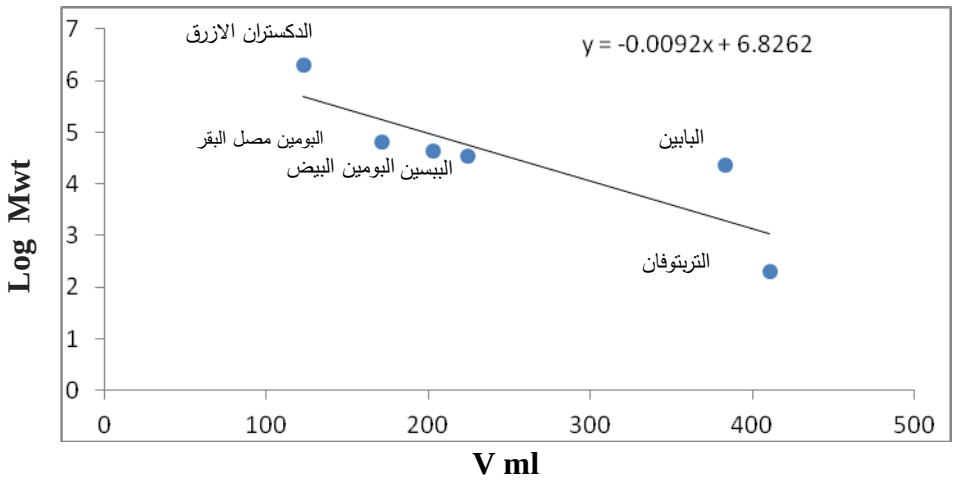
الجدول(2): كمية البروتين للمحلول المركز قبل تمريره على عمود الفصل والمركبات البروتينية الناتجة من الترشيح الهلامي

نوع البروتين	تركيز البروتين (ملغم/سم^3)	الحجم الكلي (سم^3)	كمية البروتين الكلي (ملغم)	النسبة المئوية (%)	كفاءة الفصل (%)
الراسب البروتيني الناتج من المستخلص المائي الخام لورق نبات الهندباء قبل التمرير في عمود الفصل	3.63	2	7.26	100	92
الحزمة البروتينية A المفصول بتقنية الترشيح الهلامي من الراسب البروتيني	0.04	65	2.6	35.8	
الحزمة البروتينية B المفصول بتقنية الترشيح الهلامي من الراسب البروتيني	0.063	65	4.09	56.33	

الوزن الجزيئي التقريبي للمركبات البروتينية المفصولة

لتعين الوزن الجزيئي التقريبي للمركبات البروتينية المفصولة بتقنية الترشيح الهلامي مرر عدد من المواد المعلومة الوزن الجزيئي خلال عمود الفصل المستخدم سابقا تراوحت أوزانها الجزيئية بين (204-2000000) دالتون، بعد ذلك تم تعيين حجوم الروغان لهذه المواد كما هو مبين في الجدول (3).

تم الحصول على المنحني القياسي الشكل (2) لتقدير الوزن الجزيئي من رسم العلاقة بين حجم الروغان ولوغاريتم الوزن الجزيئي لكل من (الدكستران الازرق Blue dextran، البومين مصل البقر Bovine serum albumin (BSA)، البومين البيض Eggs albumin، الببسين Pepsin، البابين Papain والتربتوفان Tryptophan) والذي من خلاله يمكن تحديد الوزن الجزيئي التقريبي للمركبات المفصولة والمبينة في الجدول(3).



الشكل (2): المنحني القياسي لتقدير الوزن الجزيئي التقريبي للبروتينات

الجدول (3): الأوزان الجزيئية التقريبية للمركبات البروتينية المفصولة بتقنية الترشيح الهلامي.

المادة	حجم الروغان (سم3)	الوزن الجزيئي التقريبي (دالتون)
الحزمة البروتينية A المفصول من الراسب البروتيني للمستخلص المائي الخام لورق نبات الهندباء	65	1691219
الحزمة البروتينية B المفصول من الراسب البروتيني للمستخلص المائي الخام لورق نبات الهندباء	190	119729

تحديد الجرعة المؤثرة في رفع مستوى هيموكلوبين الدم

يوضح الجدول (4) قيم الجرع الاكثر تأثيراً في رفع مستوى هيموكلوبين الدم لإناث الفئران المصابة بفقر الدم للمستخلص المائي الخام والراسب البروتيني والمركب البروتيني A والمركب البروتيني B لورق نبات الهندباء على التوالي.

الجدول(4): تحديد الجرعة المؤثرة للمستخلص المائي الخام والراسب البروتيني والمركب البروتيني A والمركب البروتيني B لورق نبات الهندباء في رفع مستوى هيموكلوبين الدم gm/dl لإناث الفئران المصابة بفقر الدم

سيطرة مصابة بفقر الدم	جرعة المستخلص المائي الخام ملغم/كغم من وزن الجسم			
	50	**100**	**150**	**200**
0.35±11.26	1.35±11.26	1.2±12.16	0.65±13.93*	1.47±12.3
سيطرة مصابة بفقر الدم	جرعة الراسب البروتيني ملغم/كغم من وزن الجسم			
	10	**15**	**20**	**25**
0.35±11.26	0.7±15.6	1±16. 6*	0.75±15.6	3.5±12.8
سيطرة مصابة بفقر الدم	جرعة المركب البروتيني A ملغم/كغم من وزن الجسم			
	0.312	**0.625**	**0.937**	**1.25**
0.35±11.26	0.8±14.1	0.98±15.46	0.8±15.73*	1.35±14.93
سيطرة مصابة بفقر الدم	جرعة المركب البروتيني B ملغم/كغم من وزن الجسم			
	0.35	**0.7**	**1.05**	**1.4**
0.35±11.26	1.07±13.13	1.91±13.16	1.07±15.16*	1.85±13.13

تشير قيم الهيموكلوبين الى المعدل± الانحراف القياسي

* تشير الى الجرعة المؤثرة

تأثير عقار الفيروسام Ferrosam والمستخلص المائي الخام والراسب البروتيني والمركبات البروتينية A & B على بعض القيم الدموية

خلايا الدم الحمر

أدت المعاملة بعقار الفيروسام Ferrosam والراسب البروتيني والمركب البروتيني B وبالجرع المشار اليها في الجدول (5) في التجويف البريتوني لاناث الفئران المصابة بفقر الدم ارتفاعا معنويا ($p<0.05$) في مستوى عدد خلايا الدم الحمر, بينما لم تؤد المعاملة بالمستخلص المائي الخام والمركب البروتيني A اي فرق معنوي عند المقارنة مع مجموعة السيطرة المصابة بفقر الدم كما هو مشار اليه في الجدول(5).

وقد يعزى سبب هذا الارتفاع الى تحفيز إنتاج خلايا الدم الحمراء في نخاع العظم. او زيادة امتصاص حديد الهيم.

مستوى الهيموكلوبين

أدت المعاملة بعقار الفيروسام Ferrosam والراسب البروتيني والمركب البروتيني A والمركب البروتيني B وبالجرع المشار اليها في الجدول(5) في التجويف البريتوني لاناث الفئران المصابة بفقر الدم ارتفاعا معنويا ($p<0.05$) في مستوى هيموكلوبين الدم, ماعدا الحقن بالمستخلص المائي الخام لم يؤد اي فرق معنوي عند المقارنة مع مجموعة السيطرة المصابة بفقر الدم كما هو مشار اليه في الجدول(5).

وقد يعزى السبب الى زيادة قابلية امتصاص الحديد المخزون في الجسم على شكل فريتين Ferritin (بروتين خزن الحديد بالجسم) نتيجة المعاملة بهذه المركبات يقابلها زيادة تركيز الهيموكلوبين نتيجة لزيادة تكوينه.

خلايا الدم البيض

أدت المعاملة بعقار الفيروسام Ferrosam وجميع المركبات والرواسب المفصولة من ورق نبات الهندباء وبالجرع المشار اليها في الجدول (5) في التجويف البريتوني لاناث الفئران المصابة بفقر الدم ارتفاعا معنويا ($p<0.05$) في مستوى عدد خلايا الدم البيض عند المقارنة مع مجموعة السيطرة المصابة بفقر الدم كما هو مشار اليه في الجدول(5).

وقد يعزى سبب هذا الارتفاع الى حث نظام المناعة نتيجة المعاملة بهذه المركبات المعزولة لصد العدوى والتي تولد جذور الأوكسجين الحرة الضارة, وهذه الجذور الحرة يمكن أن تؤدي إلى حدوث إلتهابات مزمنة.

النسبة المئوية لحجم خلايا الدم المرصوصة

أدت المعاملة بعقار الفيروسام Ferrosam وجميع المركبات والرواسب المفصولة من ورق نبات الهندباء وبالجرع المشار اليها في الجدول(5) في التجويف البريتوني لاناث الفئران المصابة بفقر الدم ارتفاعا معنويا ($p<0.05$) في النسبة المئوية لحجم خلايا الدم المرصوصة PCV عند المقارنة مع مجموعة السيطرة المصابة بفقر الدم كما هو مشار اليه في الجدول(5).

جدول(5): تأثير عقار الفيروسام Ferrosam والمستخلص المائي الخام والراسب البروتيني والمركبات البروتينية A & B في مستويات خلايا الدم الحمراء وخلايا الدم البيضاء وهيموكلوبين الدم وحجم خلايا الدم المرصوصة في دم اناث الفئران المصابة بفقر الدم

المعاملات	خلايا الدم الحمراء $\times 10^6$ µmol/L	الهيموكلوبين g/dl	خلايا الدم البيضاء $\times 10^3$ µmol/L	PCV%
فئران سيطرة سليمة معاملة	0.6±2.4 bc	1.65±14.63 c	0. 2 ±3.3 b	5±45 bc
فئران سيطرة مصابة بفقر الدم	0.06±1.41 a	0.35±10.96 a	0.49±2.16 a	1±34 a
فئران مصابة بفقر + المستخلص المائي الخام(150ملغم/كغم)	0.44±1.84 ab	1.85±12.4 ab	0.41±4.93 c	1.±41.66 b

فئران مصابة بفقر + الراسب البروتيني (15ملغم/كغم)	0.56±2.18 bc	0.35±13.63 bc	0.6±5.8 d	2.3±42 bc
فئران مصابة بفقر + المركب البروتيني A (0.937ملغم/كغم)	0.25±1.83 ab	0.35±13.63 bc	0. 5±5.1 cd	1.66±42 bc
فئران مصابة بفقر + المركب البروتيني B (1.05ملغم/كغم)	0.05±2.75 c	0.7±14.3 c	0.35±3.83 b	1.22±44 bc
فئران مصابة بفقر + عقار الفيروسام Ferrosam (500ملغم/60كغم)	0.15±2.73 c	0.17±15.1 c	0.25±8.65 e	0.75±46.33 bc

الحروف المختلفة عموديا تعني وجود فرق معنوي عند مستوى احتمالية (0.05)

تشير القيم اعلاه الى المعدل± الانحراف القياسي

تأثير عقار الفيروسام Ferrosam والمستخلص المائي الخام والراسب البروتيني والمركبات البروتينية A & B على بعض المتغيرات الكيموحيوية

الكلوتاثايون

أدت المعاملة بالمستخلص المائي الخام والراسب البروتيني وبجرع (150, 15)ملغم/كغم من وزن الجسم على التوالي في التجويف البريتوني لإناث الفئران المصابة بفقر الدم ارتفاعا معنويا ($p<0.05$) في مستوى الكلوتاثايون بينما أدت المعاملة بالمركبات البروتينية A و B وعقار الفيروسام ارتفاع غيرمعنوي في مستوى نفس المتغير عند المقارنة مع مجموعة السيطرة المصابة بفقر الدم وكما موضح في الجدول(6). وقد يعزى ذلك الى زيادة فعالية انزيم كلوتاثايون ريدكتيز الذي يعمل على اختزال الكلوتاثايون المؤكسد الى الشكل المختزل باستخدام NADPH عاملاً مختزلاً.

حامض اليوريك

أدت المعاملة بعقار الفيروسام Ferrosam والمستخلص المائي الخام والراسب البروتيني والمركب البروتيني A و B وبالجرع المشار اليها في الجدول(6) في التجويف البريتوني لاناث الفئران المصابة بفقر الدم انخفاضا معنويا ($p<0.05$) في مستوى حامض اليوريك عند المقارنة مع مجموعة السيطرة المصابة بفقر الدم كما هو مشار اليه في الجدول(6). ان انخفاض مستوى

حامض اليوريك ربما يرجع سببه الى فقدان تراكيز عالية من هذا الحامض مع الادرار نتيجة المعاملة بالمركبات والمواد المفصولة من اوراق نبات الهندباء.

البروتين الكلي Total protein

أدت المعاملة بالمستخلص المائي الخام والراسب البروتيني والمركبات البروتينية A و B وبجرع (150, 15, 0.935, 1.05)ملغم/كغم من وزن الجسم على التوالي في التجويف البريتوني لإناث الفئران المصابة بفقر الدم ارتفاعا معنويا ($p<0.05$) في مستوى البروتين الكلي بينما لم يحدث اي فرق معنوي عند المعاملة بعقار الفيروسام Ferrosam وبجرعة (500ملغم/60كغم) من وزن الجسم عند المقارنة مع مجموعة السيطرة المصابة بفقر الدم، كماهو موضح في الجدول(6). وربما يعزى السبب الى ارتفاع شدة الكرب التأكسدي بالنسبة للمجموعة المعاملة بعقار الفيروسام ولهذا كان الانخفاض في مستوى البروتين الكلي لدى مرضى هذه المجموعة بالمقارنة مع بقية المجاميع.

تركيز حديد مصل الدم

أدت المعاملة بعقار الفيروسام Ferrosam والمركب البروتيني A والمركب البروتيني B وبالجرع المشار اليها في الجدول(6) في التجويف البريتوني لاناث الفئران المصابة بفقر الدم ارتفاعا معنويا ($p<0.05$) في مستوى حديد المصل بينما لم تؤد المعاملة بالمستخلص المائي الخام والراسب البروتيني فرقا معنويا في مستوى نفس المتغير عند المقارنة مع مجموعة السيطرة المصابة بفقر الدم كما هو مشار اليه في الجدول(6). وقد يرجع السبب في ذلك الى زيادة امتصاص الحديد من الجسم في الفئران المصابة بفقر الدم عند المعاملة بهذه المركبات المفصولة من ورق نبات الهندباء.

جدول(6): تأثير عقار الفيروسام Ferrosam والمستخلص المائي الخام والراسب البروتيني والمركبات البروتينية A & B في مستويات سيرم الحديد والبروتين الكلي وحامض اليوريك والكلوتاثايون في مصل دم اناث الفئران المصابة بفقر الدم

المعاملات	سيرم الحديد mg/dl	البروتين الكلي mg/cm3	حامض اليوريك µm0l/L	الكلوتاثايون µm0l/L
فئران سيطرة سليمة معاملة	0.84±2.92 c	1.8±11.36 b	17.21±98.56 ab	3.45 ±12.86 b
فئران سيطرة مصابة بفقر الدم	0.39±1.95 a	0.62±7.4 a	48.49±261.2 c	0.4±7.75 a
فئران مصابة بفقر + المستخلص المائي الخام(150ملغم/كغم)	0.67±2.05 ab	1.25±11.23 b	11.9±99.36 ab	0.9±12.03 b

فئران مصابة بفقر + الراسب البروتيني (15ملغم/كغم)	0.35±1.9 a	2.3±10.93 b	13.1±83.49 a	1.32±12.05 b
فئران مصابة بفقر + المركب البروتيني A (0.937ملغم/كغم)	0.13±2.65 bc	1.66±11.3 b	9.22±151.32 b	3.45±8.96 a
فئران مصابة بفقر + المركب البروتيني B (1.05ملغم/كغم)	0.08±2.71 bc	1.22±10.66 b	7.14±111.26 ab	0.4±8.37 a
فئران مصابة بفقر + عقار الفيروسام Ferrosam (500ملغم/60كغم)	0.09±2.8 c	0.75±9.83 a	50.87±138.03 ab	0.9±8.37 a

الحروف المختلفة عموديا تعني وجود فرق معنوي عند مستوى احتمالية (0.05)، تشير القيم اعلاه الى المعدل± الانحراف القياسي

من خلال الدراسة أعلاه يمكن الاستنتاج ان المعاملة بالمركب البروتيني B أدت الى ارتفاع معنوي في مستوى (عدد خلايا الدم البيض, عدد خلايا الدم الحمر, هيموكلوبين الدم, النسبة المئوية لحجم خلايا الدم المرصوصة, حديد المصل والبروتين الكلي) في دم ومصل دم إناث الفئران المصابة بفقر الدم. وبذلك يمكن أن يستعمل المركب البروتيني B في معالجة فقر الدم كبديل عن عقار الفيروسام ferrosam وكذلك يمكن ان يستخدم كمضاد حيوي بعد التأكد من عدم وجود اثار جانبية.

الشكر

يسرني أن أتقدم بوافر شكري الى السيد محمد حازم نجم (بكتريولوجي /م.الجمهوري التعليمي/قسم الاحياء المجهرية) لما قدمه لي من العون لانجاز هذا البحث.

المصادر

1) Raji R. and Raveendran K. "Medicinal plants used by forest tribe of Mananthavady Thaluk Wayanadu district". Life sciences Leaflets 13:421 – 426, (2011).

2) Niness K. "Breakfast foods and the health benefits of inulin and oligofructose". Publication no. American Association of Cereal Chemists, Inc., 44(2) : 79-81, (1999).

3) Jurgonbski A., Milala J., Jusbkiewicz J., Zdunbczyk Z. and Krol k. "Composition of Chicory Root, Peel, Seed and Leaf Ethanol Extracts and Biological Properties of Their Non-Inulin Fractions". Food Technol. Biotechnol.49 (1) 40–47 (2011).

4) Ali1 A., Gihan A. F., Hanan A. F. and Nagwa A. "Epidemiology of iron deficiency anaemia: Effect on physical growth in primary school children, The importance of hookworms". International Journal Of Academic Research. 3(1). (2011)

5) شرف, خالد حمادي حميد (1998). التوافر الحيوي لحديد اللحوم والبقوليات والخضراوات الورقية للجرذان التي تعاني من الانيميا والسليمة. (اطروحة دكتوراه) قسم الصناعات الغذائية, كلية الزراعة والغابات, جامعة الموصل.

6) Aksoy H., Koruk M. and Akçay F. "Serum The relationship between malondialdehyde and ceruloplasmin in chronic liver disease". Turk. J. Biochem, 28 (2): 32-34. (2003).

7) Murray R. K., Granner D. K., Myes P. A. and Rodwell V. W. "Harper's biochemistry". 25th ed., Appleton and Lange, USA, P.611. (2003).

8) Kratchanova M., Denev P., Ciz M., Lojek A. and Mihailov A. "Evaluation of antioxidant activity of medicinal plants containing Polyphenol compounds. Comparison of two extraction systems". Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry – BAS, Laboratory of Biologicaly Active Substances, Plovdiv, Bulgaria. 57(2). P.229–234.(2010).

9) Armstrong M.A., Chestnutt J.E. and Youmg I.S "The effect of dietary treatment on lipid peroxidation and antioxidant status in newly diagnosed non insulin dependent diabetes". Free rad. Biol. Med., 21(5): 19-26, (1996).

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

11) Schacterle G.R. and Pollack J.K. "A simplified method for the quantitative assay of small amount of protein in biological materials". Anal. Biochem., 51: 654-655, (1973).

12) Robyt F.J. and White J.B., Biochemical techniques, theory and practice. Brookes/Cole publishing company, Monterey, California, P268, (1987).

13) Stanton P., Gell filtration chromatograophy. human a press., 251:55-74, (2003).

14) Clark j.M. and Switzer R.L., Experimental biochemistry. San Francisco, USA, PP.73-77, (1977).

15) Timm, K., Orbital venous anatomly of the rat: lab. Anemal Sci. 29:663, (1979).

16) Antia B. S., Okokon J. E., Nwidu L. L. and Jackson C. L. "Effect of Subchronic Administration of Ethanolic Stembark Extract of

Mammea Africana Sabine on Haematological and Biochemical Parameters of Rats". African Journal of Biomedical Research, Vol. 9, P. 129-132، (2006).

17) Butnaru E, Mircea C, Agoroaei L, Ilicenco D, Proca M. "Variation of carboxyhemoglobin and of thiocyanates in smokers". Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi. 2002 Oct-Dec;106(4):782-6, (2002).

18) Guyton. A. C. "Textboock of medical physiology". 11th edi. Elsevier saunders, Elsevier Ink- Philadelphia, Pennsylvania. 425-426, (2006).

19) Tietz N.W. "Text book of clinical chemistry". 3ed ED. C.A. Burtis, E.R. Ashwood, W.B. Saunders, pp.490-491, 1000-1025, 1245-12550, 1698-1704, (1999).

20) Seldlak, J. and Lindsay, R. H. (1968). "Analytical biochemistry" p. 192. Cited AL-zamyl (2001).

21) Steel R.G. and Torrie J.H. "Principles and procedures of statistics biometrical approach". 2nd ed., Mc Graw.Hill Inc., Singapore, p. 183, (1984).

22) Plummer D.T., An Introduction of Practical Biochemistry. 2nd ed., McGraw-Hill Book Company, UK. p 61, (1978).