تأثير الفلافونيدات المعزولة من نبات الجعدة (*teucrium polium*) في بعض المتغيرات الكيموحيوية لمصل دم الجرذان السليمة والمصابة بداء السكر المستحدث بالالوكسان

فرح سمير صالح

شعبة العلوم الأساسية / كلية الزراعة والغابات

جامعة الموصل

الاستلام **القبول**

05 / 04 / ٢٠١٠ **٢١ / ٠٧ / ٢٠١٠**

ABSTRACT

This study included preparing aflvonoids extract from teucrium polium plant in which isolating and identifying these compounds by thin layer chromatography (TLC) had been done. The aim of this study is to find the effect of this extract on serum glucose, total cholesterol, triglyceride (T.G), high density lipo protein-cholestrol (HDL-C), low density lipo protein-cholestrol (LDL-C), very low density lipo protein-cholestrol (VLDL-C), total protein and albumin levels in blood serum of normal and alloxan-induced diabetic-albino male rats. Extract was administrated intraperitioneally. The results indicated that there were significant decrease in glucose, total cholesterol and triglyceride levels in normal and diabetic animals which were treated for one week. The results showed that there were no significant changes in the level of high density lipo- protein in normal and diabetic animals which were treated for one week. On the other hand there were significant decrease in the level of low density lipo- protein and very low density lipo-protein in normal and diabetic animals which were treated for week, the result indicated that there were no significant change in the level of total protein and albumin in all treated animals.

الخلاصة

تضمنت الدراسة تحضير مستخلص الفلافونيدات من نبات الجعدة، إذ تم عزل وتشخيص هذه المركبات بتقنية كروماتوغرافي الطبقة الرقية (TLC) وهدفت الدراسة إيجاد تأثير هذا

المستخلص في مستويات الكلوكوز ، الكوليسترول الكلي ، الكليسيريدات الثلاثية ، كوليسترول البروتين الدهني عا لي الكثافة وواطئ الكثافة وواطئ الكثافة جداً، البروتين الكلي والألبومين في مصل دم ذكور الجرذان البيض السليمة والمصابة بداء السكر المستحدث بالالوكسان عن طريق الحقن بالتجويف البريتوني . أشارت النتائج إلى حدوث انخفاض معنوي ($p<0.05$) في مستوى الكلوكوز والكولسترول والكليسيريدات الثلاثية في كل من الحيوانات السليمة والمصابة بالسكري المعاملة لمدة أسبوع وأظهرت النتائج أيضا عدم وجود فرق معنوي ($p>0.05$) في مستوى البروتين الدهني عالي الكثافة في كل من الحيوانات السليمة والمصابة المعاملة لمدة أسبوع، ويلاحظ وجود انخفاض معنوي في مستوى البروتين الدهني واطئ الكثافة وواطئ الكثافة جداً في الحيوانات السليمة والمصابة المعاملة لمدة أسبوع ، وأشارت النتائج إلى عدم وجود أي تغير معنوي في مستوى البروتين الكلي والألبومين في جميع الحيوانات المعاملة.

المقدمة

منذ أن خلق الله الإنسان والحيوان ووجدت الأمراض التي تصيبهما و خلق الله النباتات وجعلها غذاء لا تستغني عنه الأحياء ووضع فيها الدواء للأمراض وأعطى الحيوان الذي لا يعقل ولا يفكر غريزة الاهتداء إلى نوعية النبات الذي يشفيه من مرضه في حين اهتدى الإنسان العاقل إلى النباتات الشافية من الأمراض بالدراسة والتجربة والاستنتاج. وقد برع المصريون القدماء في علم التداوي بالأعشاب حيث استخدموا العديد من الأعشاب في علاج الكثير من الأمراض فضلا عن استخدامها في التحنيط والزينة (1). وعلى الرغم من التطور الكبير في ميادين الكيمياء والصيدلة وظهور المئات بل الآلاف من المركبات التي تعالج الأمراض إلا إن الإنسان عاد من جديد إلى التداوي بالإعشاب والنباتات الطبية بعد ما وجد إن للعقاقير الكيميائية بعض الآثار السلبية المصاحبة للتأثير الطبي الأساسي المستخدم لأجله والتي قد لا تكتشف إلا بالتراكم بعد مدة طويلة من استعمال العقار (2)، ومن هذه النباتات نبات الجعدة (*Teucrium polium*) حيث ينتمي هذا النبات إلى العائلة الشفوية (Labiatae) وهو نبات عشبي واسع الانتشار غرب وشرق أسيا وأوربا وشمال أفريقيا (4,3)، يحتوي نبات الجعدة على العديد من المركبات الكيميائية مثل استر الأحماض الدهنية (fatty acid esters)، الفينولات المتعددة (poly phenols) والفلافونيدات (flavonids)(5) ويعتقد بان التأثير العلاجي لهذا النبات يعود إلى احتوائه على مواد ذات خواص مضادة للأكسدة (6)واستخداماته الطبية قديمة تعود إلى أكثر من ألفي سنة آذ تم استخدامه في الطب الشعبي القديم كمدرر ، مضاد للبكتريا والتشنج ومضاد للالتهابات (7) واستخدم بشكل واسع لخفض سكر الدم (8) تهدف هذه الدراسة إلى إمكانية عزل الفلافونيدات من نبات الجعدة باستخدام جهاز الاستخلاص السكسوليت (Soxelet) وتشخيصها نوعيا باستخدام كروماتوغرافي الطبقة الرقيقة (TLC) (Thin layer chromatography) ومن ثم

دراسة تأثير هذه المركبات المعزولة على بعض المتغيرات الكيموحيوية في مصل دم الجرذان السليمة والمصابة بداء السكر المستحدث بالالوكسان.

المواد وطرائق العمل

تحضير مستخلص الفلافونيدات

تم الحصول على نبات الجعدة من الأسواق المحلية لمدينة الموصل ، وقد صنف في كلية العلوم قسم علوم الحياة، ثم وزن (1000)غم من النبات وتم تنظيفه من الشوائب والأتربة ثم طحن النبات باستخدام آلة الطحن (Blender) لحين الحصول عليه بشكل مسحوق ناعم باودر (Powder) ووضع المسحوق في جهاز الاستخلاص (Soxelet) وأضيف له الايثانو ل وترك لمدة (3-4) أيام بعد ذلك بخر الايثانول باستخدام جهاز التبخير تحت الضغط المخلخل وأضيف بعد ذلك (50) سم٣ من الميثانول الساخن (40-50)م° مع الرج السريع إذ تترسب مادة صلبة بنية اللون(9).

تشخيص المركبات باستخدام كروماتوغرافي الطبقة الرقيقة TLC

استخدمت الألواح الزجاجية المغطاة بمادة هلام السليكا جيل المجهزة من شركة (Merch W.G)، بسمك (0.25)ملم وبأبعاد (20x20)سم وتمت دراسة ومعرفة قيم معدل الجريان Rf باستخدام نظام المذيب (ن-بيوتانول :حامض الخليك :ماء) (4:1:5v/v/v)BAW ومقارنتها مع القيم المنشورة لمركبات الفلافونيدات عند استخدام الظروف نفسها(10).

الحيوانات المستخدمة

استخدمت في هذه الدراسة ذكور الجرذان البيض من Albino Rats المجهزة من كلية الطب البيطري والتي تراوحت أعمارها (10-12)أسبوع وبمعدل وزن (170.7±١٥.٤)غم ووضعت في أقفاص بلاستيكية مجهزة ومعدة لهذا الغرض وزودت ب الماء والعلف الحيواني الخاص بها وأخضعت للظروف المناسبة من ضوء ودرجة حرارة (12ساعة ضوء و12ظلام).

تحديد الجرعة المؤثرة

استخدمت جرذان سليمة بمعدل وزن (170.7±١٥.٤)غم وقسمت إلى اربعة مجاميع تضم كل مجموعة(5) جرذان عوملت كما يلي:

١. المجموعة الأولى : حقنت في التجويف البريتوني (0.25) مل من المحلول الملحي الفسلجي وعدت مجموعة سيطرة.

٢. المجاميع من (2-4) حقنت في التجويف ألبروتوني بالجرع (20،10،1)ملغم/ كغم من وزن الجسم على التوالي بمستخلص الفلافونيدات وبعد ساعتين من إجراء عملية الحقن تم سحب الدم من الجرذان من جيب محجر العين وتم قياس مستوى كلوكوز الدم ثم اختيرت الجرعة الأكثر تأثيراً (20 ملغم/ كغم) في خفض مستوى كلوكوز الدم وعدت جرعة مؤثرة.

حقن الحيوانات

حقنت ذكور الجرذان بالفلافونيدات بجرعة (20) ملغم/كغم من وزن الجسم وبعدها استمر الحقن لمدة أسبوع.

استحداث داء السكر في الجرذان

استخدمت ذكور الجرذان البيضاء بمعدل وزن (170.7±١٥.٤)غم وقسمت إلى مجموعتين تضم كل مجموعة 5 جرذان حقنت الجرذان المراد استحداث داء السكر بها بمادة الالوكسان Alloxan المحضرة أنيا وبجرعة 100ملغم/كغم من وزن الجسم في التجويف البريتوني (11) بعد تجويعها لمدة 24ساعة. ثم تم التأكد من حدوث داء السكر بها يوميا ولمدة أسبوع وذلك بفحص الإدرار بواسطة الشريط الكاشف (Test Tape(R),Eli-Lily and Co.USA).

تقدير المتغيرات

- قياس مستوى الكلوكوز: قدر مستوى الكلوكوز باستخدام عدة التحليل من نوع [Biocon^R - Biosub^R - Glu - Enzymatic Colorimetric Test (GOD-PAD) Germany].
- قياس مستوى الكوليسترول الكلي : قدر مستوى الكوليسترول باستخدام عدة التحليل من نوع [Biolabo-Enzymatic-Colorimetric-Test(CHOD-PAP)France].
- قياس مستوى الكليسيريدات الثلاثية :تم قياس مستوى الكليسيريدات الثلاثية باستخدام عدة التحليل من نوع .[Biolabo-GOP Method Germany]
- قياس مستوى البروتين الدهني عالي الكثافة للكوليسترول في مصل الدم: تم قياس مستوى (HDL-C) باستخدام عدة التحليل من نوع [Biolabo-HDL-CHOL (PTA) Precipitant Germany].
- قياس مستوى البروتين الدهني واطئ الكثافة للكوليستوول في مصل الدم : تم حساب تركيز البروتين الدهني واطئ الكثافة باستخدام العلاقة الآتية

LDL-c (mg/dL)=(Total cholesterol)-(HDL-c)-(Triglycerid/5) (12)

- قياس مستوى البروتين الدهني واطئ الكثافة جداً للكوليسترول في مصل الدم: تم حساب التركيز باستخدام العلاقة الآتية.

VLDL-C(mg/dL)=Triglycerid /5(12)

- البروتين الكلي: تم تقدير البروتين الكلي في مصل الدم باستخدام عدة التحليل المجهزة من شركة (Biolabo) الفرنسية.
- الألبومين : تم تقدير كمية الألبومين باستخدام طريقة برموكريسول الأخضر وتم استخدام المحاليل المجهزة من شركة RANDOX.

التحليل الإحصائي:

حللت نتائج مستوى الكلوكوز والكوليسترول الكلي والكليسيريدات الثلاثية وكوليسترول البروتين الدهني عالي الكثافة وواطئ الكثافة وواطئ الكثافة جدا والبروتين الكلي والألبومين إحصائيا وذلك باستخدام تحليل التباين الأحادي (One way analysis of variance)، كما تم تحديد الفروقات الإحصائية بين المجاميع باستخدام اختبار دنكن(13) واعتبر التغير معنوياً عند مستوى احتمالية $p \leq 0.05$.

النتائج والمناقشة

تشخيص مركبات الفلافونيدات المعزولة بواسطة كروماتوغرافي الطبقة الرقيقة TLC

أوضحت قياساتTLC باستخدام هلام السليكا ونظام BAW(4:1:5v/v/v) وبعد رش الصفيحة بالامونيا لوحظ ظهور أربع بقع كما موضح بالشكل (1) وعند مقارنة قيم Rf لهذه البقع مع مثيلاتها المنشورة لهذه العائلة وتحت الظروف نفسها(10) وجد بأنها تمثل المركبات المشار إليها في الجدول (1)، والذي يوضح قيم Rf لمركبات الفلافونيدات المستخلصة ومقارنتها مع مثيلاتها المنشورة والمقاسة تحت نفس الظروف.

الجدول (1): قيم (معدل الجريان) Rf المقاسة والمنشورة لمركبات الفلافونيدات المعزولة

المركبات	Rf(x100)	
	المقاسة	المنشورة
كورستين 5–كلايكوسيد	28	30
كورستين 3-4–كلايكوسيد	39	35
كورستين 3–كلايكوسيد	59	58
غير معروف	73	–

الشكل (1): يوضح الكروماتوغرام لبعض الفلافونيدات المفصولة من نبات الجعدة باستعمال نظام المذيب BAW(4:1:5v/v/v).

تحديد الجرعة المؤثرة للمركبات المعزولة

يوضح الجدول (2) تحديد الجرعة الأكثر تأثيراً في خفض مستوى الكلوكوز في ذكور الجرذان البيضاء السليمة بالفلافونيدات المعزولة من نبات الجعدة وقد تبين من إن قيمة الجرعة الأكثر فعالية هي(20)ملغم/كغم من وزن الجسم.

الجدول (2): تحديد الجرعة المؤثرة للفلافونيدات المعزولة من نبات الجعدة

	مجموعة السيطرة	الجرع المعطاة للحيوانات بالملغم/كغم من وزن الجسم		
		1	10	20

تركيز الكلوكوز ملغم/100مل	5.7±90	3±94.06	5.6±80.46	1.4±59.72
نسبة التغير %	–	+ 4.51	- 10.6	- 33.64

تشير القيم أعلاه الى المعدل ± الانحراف القياسي

تأثير الفلافونيدات المعزولة من نبات الجعدة على مستوى الك لوكوز، الكوليسترول الكلي، الكليسيريدات الثلاثية، كوليسترول البروتين الدهني عالي الكثافة وواطئ الكثافة وواطئ الكثافة جدا، البروتين الكلي والألبومين

نلاحظ من الجدول (3) حصول انخفاض معنوي ($p<0.05$) في قيمة الكلوكوز في كل من الحيوانات السليمة والمصابة بالسكري و المعاملة لمدة أسبوع وقد يعزى هذا الانخفاض إلى كون هذا المستخلص قد يعمل على زيادة وتحسين إفراز الأنسولين من خلايا بيتا أو قد يعمل على تجديد خلايا بيتا (14)، وفي الوقت نفسه أدى حقن الفلافونيدات إلى حدوث انخفاض معنوي وبنسب متفاوتة لكل من الحيوانات السليمة والمصابة بالسكري والمعاملة لمدة أسبوع عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة السليمة والمصابة على التوالي في مستوى الكوليسترول الكلي والكليسيريدات الثلاثية كما موضح بالجدول (3) وربما يعود السبب في الانخفاض إلى قدرة الفلافونيدات والتي تعد من المواد المضادة للأكسدة على خفض مستوى كوليسترول الدم وتعزيز عملية ايضه وتحويله إلى مركبات أخرى والحد من عملية خزنه في الأنسجة (15)، كما إن تأثير المستخلص الخافض للدهون ربما يعود السبب فيه إلى رفع فعالية الانسولين الداخلي إذ كلما كان ايض الكلوكوز طبيعيا كلما كان ايض الدهون طبيعياً (16)، ويلاحظ بان المستخلص لم يودي إلى حدوث فرق معنوي ($p>0.05$)في مستوى كوليسترول البروتين الدهني عالي الكثافة في كل من الحيوانات السليمة والمصابة المعاملة لمدة أسبوع،ويشير الجدول (3) إلى إن إعطاء المستخلص لمدة أسبوع أدى إلى حصول انخفاض معنوي في مستوى كوليسترول ا لبروتين الدهني واطئ الكثافة في الحيوانات السليمة والمصابة عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة ويعزى هذا الانخفاض إلى قدرة المستخلص على التقليل من كمية البروتين الدهني متوسط الكثافة المتحول إلى البروتين الدهني واطئ الكثافة(17)، ويلاحظ من الجدول (3)حصول انخفاض معنوي في مستوى كوليسترول البروتين الدهني واطئ الكثافة جدً ا في الحيوانات السليمة والمصابة المعاملة عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة وحصول هذا الانخفاض بديهي بسبب حصول الانخفاض في مستوى الكليسيريدات الثلاثية (18) كما أدت المعاملة إلى عدم حصول أي تغير معنوي في مستوى البروتين الكلي والألبومين في الحيوانات السليمة والمصابة المعاملة لمدة أسبوع وهذا يتفق مع (19، 20).

جدول(3): تأثير الفلافونيدات المعزولة من نبات الجعدة في مستويات الكلوكوز،اللئوليسترول الكلي، الكليسيريدات الثلاثية، كوليسترول البروتين الدهني عالي الكثفة وواطئ الكثافة وواطئ الكثافة جدا، البروتين الكلي والألبومين لمصل دم الحيوانات المعاملة لمدة أسبوع

المجاميع	الكلوكوز ملغم/100مل	الكوليسترول ملغم/100مل	الكليسيريدات الثلاثية ملغم/100مل	البروتين الدهني عالي الكثافة ملغم/100مل	البروتين الدهني واطئ الكثافة ملغم/100مل	البروتين الدهني واطئ الكثافة جداً ملغم/100مل	البروتين الكلي ملغم/100مل	الالبومين ملغم/100مل
سيطرة سليمة	0.6±107 b	4.4±130.8 b	5.5 ±42.85 a b	4.4±90.3 b	1.4±32 b	1.1±8.5 ab	0.7±7.09 a	0.1±4.2 a
حيوانات مصابة بالسكري	14.5±206.7 a	5.2±163.3 a	2.7±50.5 a	5.1±103.7 a	1.2±49.5 a	0.5±10.07 a	0.6±6.4 a	0.07±4.03 a
حيوانات سليمة معاملة لمدة أسبوع	9.5±74.18 c 39.7%	2.2±105.7 c	5.6±28.6 c	1.8±80.2 b	10.52±19.8 c	0.4±5.7 c	0.5±6.8 a	0.3±4.1 a
حيوانات مصابة معاملة لمدة أسبوع	7.1±93.74 bc 54.6%	7.05±135.7 b	3.1±35.4 cb	9.1±96.7 ab	10.9±32.6 b	0.63±7.08 b	0.5±6.8 a	0.1±4.5 a

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

تشير القيم أعلاه إلى المعدل±الانحراف القياسي

المصادر

١) نيبال نادر، موسوعة التداوي بالأعشاب الطبية. دار يوسف للطباعة وا لنشر والتوزيع، بيروت لبنان (2005).

٢) سهام الهواري، النباتات الطبية كغذاء ودواء، المجلة العربية السعودية (1986).

3) M. S. Suleiman; A. S. Abdul-Ghani; S. Al-Khali and R. Amin, Effect of Teucrium polium boiled leaf extract on intestinal motility and blood pressure,J.Ethnopharmacol, 22:111-116,(1998).

4) M. Tariq; A. M. Ageel; M. A. Al-Yahia; J. S. Mossa and M. S. Al-Said, Anti-inflammatory activity of Teurcium polium, Int. J. Tissue React., 11:185-188, (1989).

5) Paris, H.; Nargues, Y.; Sanaz, V. G.; Azadeh, M.; Ggolamreza, D., and Mohammad, A., In vivo antioxidant potential of Teucrium

polium as compared to & -tocopherol. Acta. Pharm., 57:123-129 (2007).

6) Dixon R. A.; Xie D. Y., and Sharma S. B., Proanthocyanidins-afinal frontier in flavonoid research?, New phytol., 165:9-28, (2005).

7) Predrag, L.; Suha, D.; Irian, P; Uri, C.; Hassan, A., and Arieh, B., Aqueous extract of Teucrium polium possess remarkable antioxidant activity in vitro, CAM., 20:1-10 (2006).

8) M. A. Esmaeili and R. Yazdanparast, Hypoglyclasemic effect of Teucrium polium: studies with rat pancreatic islets, J. Ethnopharmacol, 95:27-30, (2004).

9) Harborne, J. B., Phytochemical methods. Aguide to modern technique of plant analysis,1st. Edn., printed in Great Britain by Cox &Wyman Ltd., London, pp. 52-73, (1973).

10) Kirshner J. G., Thin-layer chromatography. Vol. XIV.2nd. edn., Arnold Weissberger, Editor, Printed in USA, pp.817, (1978).

11) Szkudelski, T.; Kandulska, K.; and Okulicz, M. Alloxan in vivo does not only extet deleterious effect on pancreatic B cells Physiol. Res., 47:343-346 (1998).

12) Burtis, C. A., and Ashwood, E. R., Text Book of clinical chemistry, 3rded., W. B., Saunders company, London, UK., pp.840-843, (1999).

13) Toro G.; and Ackermann P. G., Practical clinical chemistry. Little, Borwn and Company, Boston, pp.354, (1975).

14) Ghavaez-Miranl, A. A.; Garcia-Vega, L. M., and Flores-Saenz T. L., Studies on hypoglycemic activity of Mexican medical plant, Proc. West. Pharmacol s]Soc., 45:118-124, (2002).

15) Robak J., Winder C. K. and Gryglyewski R. J., Bioactivity of flavonoides, Cir., 93(2):170-177, (2004).

16) Khan A.: Sadar M., and Khan M. M. A., Effect of various doses of cinnamon on lipid profile in diabetic individuals, Pakistan J. Nutr., 2(5):312-319, (2003).

17) Murray, R. K.: Granner, D. K.: Mayes, P. A. and Rodwell, V. W., Harper' s Biochemistry, 25thed., Appleton and Lange, USA, (2000).

18) Verger, B. L., Dislipdemia in diabetes mellitus review of mailipo-protein and their consequences on the development of the Atherogenesis. Diabetes Metabolsim, 25(3):32-40(1999).

19) Hamid, R. R.; Hasan, Y.; Leila, H.; Narges, B.; and Mohammad, K., Acute and subchronic toxicity of Teucrium polium total extract in rats, Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 4:245-249, (2005).

20) Esmaeilim, A. and Yazdanparast, R., Biochemical side effect of teucrium polium on the plasma membranes alkaline phosphatase of k562 cells, Malays. Appl. Biol., 34(1):65-69, (2005).