Journal of Agricultural, Environmental and Veterinary Sciences
Volume (5), Issue (3): 30 Sep 2021
P: 1 - 17

AJSRP
ISSN: 2522-3364

مجلة العلوم الزراعية والبيئية والبيطرية
المجلد (5)، العدد (3): 30 سبتمبر 2021م
ص: 1 - 17

Study of the protective effect of alcoholic extract of Silybum (*Gundelia tournefortii*) plant leaves on nonalcoholic fatty liver disease induced by carbon tetrachloride in white mice and its comparison with atorvastatin

Youssef Anour Assaad
Mohamed Dreous
Faculty of Science || Tishreen University || Syria
Reem Salameh
Faculty of Pharmacy || Tishreen University || Syria

Abstract: The study aimed to test the protective effect of the alcoholic extract of *Gundelia tournefortii* leaf on non-alcoholic fatty liver disease induced in white mice and to identify some of the biochemical and histological changes associated with that.

The study was conducted on forty male Mice, and it was divided equally into four groups, Mice of the first experimental group (control) were injected with NaCl physiological solution (0.9%) for 10 weeks, Mice of the second group were injected (i.p) with a single dose of ccl4 (1 ml/ kg) to induce greasiness, and left (24) hours before work, Mice of the third group were injected only once with a dose of ccl4 (1 ml/ kg) and daily doses of the alcoholic extract of the leaves of the *Gundelia tournefortii* plant for 10 weeks (250 mg/ kg of body weight), Group IV mice were injected intraperitoneally only once with a dose of ccl4 (1 ml/ kg) and with daily doses of atorvastatin (250 mg/ kg body weight) for 10 weeks .

The results of the histological study of the livers of mice of the second experimental group showed the emergence of clear lubrication, which some cases reached the point of necrosis (localization of the nucleus in the periphery), while the results of the livers of mice of the third and fourth groups showed a clear improvement in the hepatic cell compared with the second group, where fat was minimal (Natural kernel with no inflammatory foci) and this confirms the important protective role of *Gundelia tournefortii* extract with its active ingredients (besides atorvastatin) against the nonalcoholic lipidosis.

Keywords: Mice, nonalcoholic fatty liver, *Gundelia tournefortii*.

دراسة التأثير الوقائي للمستخلص الكحولي لأوراق نبات السلبين على مرض الكبد الدهني اللاكحولي المستحدث برابع كلوريد الكربون في الفئران البيض ومقارنته بالأتورفاستاتين

يوسف أنور أسعد
محمد دريوس
كلية العلوم || جامعة تشرين || سورية
ريم سلامه

كلية الصيدلة || جامعة تشرين || سورية

المستخلص: هدفت الدراسة إلى اختبار التأثير الوقائي للمستخلص الكحولي لأوراق نبات السلبين في مرض الكبد الدهني اللاكحولي المستحدث في الفئران البيض وتحديد بعض التغيرات الكيميائية الحيوية والنسيجية المرافقة لذلك.

أجريت الدراسة على أربعين فأراً ذكراً، قسمت بالتساوي على أربع مجموعات، حقنت فئران المجموعة التجريبية الأولى (السيطرة) بالمحلول الفيزيولوجي NACL بتركيز (0.9%) لمدة 10 أسابيع، كما حقنت فئران المجموعة الثانية (داخل البريتوان) بجرعة واحدة من رابع كلوريد الكربون ccl4 (1مل/ كغ) لاستحداث التشحم، وتركت مدة (24) ساعة قبل العمل، كما حقنت فئران المجموعة الثالثة لمرة واحدة فقط بجرعة من ccl4 (1مل/ كغ) وبجرعات يومية من المستخلص الكحولي لأوراق نبات السلبين لمدة 10 أسابيع (250 ملغ/ كغ من وزن الجسم)، وحقنت فئران المجموعة الرابعة داخل الصفاق لمرة واحدة فقط بجرعة من ccl4 (1مل/ كغ) مع جرعات يومية من الأتورفاستاتين (250 ملغ/ كغ من وزن الجسم) لمدة 10 أسابيع.

بينت نتائج الدراسة النسيجية لأكباد فئران المجموعة التجريبية الثانية ظهور تشحم واضح وصل في بعض الأحيان لدرجة التنخر (تموضع النواة في المحيط)، في حين أظهرت نتائج أكباد فئران المجموعتين الثالثة والرابعة تحسناً واضحاً في الخلية الكبدية بالمقارنة مع المجموعة الثانية، حيث كان التشحم بحدوده الدنيا (نواة طبيعية مع عدم وجود بؤر التهابية) وهذا ما يؤكد الدور الوقائي المهم لمستخلص أوراق السلبين بمكوناته الفعالة (إلى جانب الأتورفاستاتين) ضد مرض التشحم الكبدي اللاكحولي.

الكلمات المفتاحية: الفئران، التشحم الكبدي اللاكحولي، نبات السلبين.

مقدمة:

اهتم الإنسان منذ القدم بالنباتات الطبيعية التي استخدمت كوسائل علاجية للكثير من الأمراض، وازداد الاهتمام بها كثيراً في السنوات الأخيرة نظراً لأهمياتها بسبب غناها بالمركبات الكيميائية الفعالة وبما تحتويه من مضادات الاكسدة الضرورية للحد من الأضرار الناجمة عن حالات التسمم والتشحم الكبدي والاجهاد التأكسدي وتشكل الجذور الحرة [1] [2].

ينتمي نبات السلبين أو العكوب *Gundelia tournefortii* إلى الفصيلة المركبة أو النجمية Asteraceae، يتواجد في المناطق الجبلية غالباً، موطنه في سورية ولبنان وفلسطين والأردن وإيران وتركيا، وهو نبات شوكي بري معمر، جذوره سميكة، أوراقه ناعمة عادة [3]، وتستخدم كمكونات غذائية في الحساء والسلطات [4].

تحتوي أوراق السلبين على مكونات مهمة مثل: الفلافونوئيدات، غليكوسيدات، صابونين، كربوهيدرات، قلوئيدات، حمض البالمتيك، حمض اللوريك، ألفا أيونين، حمض الميريستيك، 1 – هكساديكانول، 2 – مثيل، فينول، بيتا تورميرون .[5][6]

تشير العديد من الدراسات إلى أهمية نبات السلبين إذ أنه يمتلك دوراً مهماً في خفض مستويات الغلوكوز وشحوم الدم عند معاملة الفئران بالدكساميثازون [7]، كما أنه يزيد من عدد وحركية الحيوانات المنوية ومستوى هرمون التستوستيرون عند الفئران بسبب مكوناته المضادة للأكسدة، كما يُستخدم لعلاج آلام الصدر والسكتات الدماغية، وهو مهدئ ومضاد التهاب ومكافح للطفيليات ومضاد للجراثيم ومضاد أكسدة [8] مضاد للبكتريا والنشاط الالتهابي عند الجرذان[9].

يعرف مرض الكبد الدهني غير الكحولي بأنه تراكم للدهون في الأنسجة الكبدية بنسب تتراوح بين 5% لـ 10% من وزن الكبد العام وذلك في حالة عدم التناول المفرط للإيثانول ويشير هذا المرض إلى مجموعة عديدة من الاضطرابات التي لها صلة به بدءاً من التنكس الدهني البسيط والتهاب الكبد الدهني وصولاً للتليف الكبدي المتقدم وتشمع الكبد [10]، حيث يحدث في البداية كمرحلة أولى ما يسمى التنكس الدهني الكبدي وفيه يتم ترسب الغليسيريدات الثلاثية كقطرات دهنية في أكثر من5% من خلايا الكبد [11]، وغالبا ما يكون التنكس الدهني الكبدي محدودا ذاتيا لكن يمكن أن يتطور إلى ما يسمى التهاب الكبد الدهني اللاكحولي والذي يتميز عن الحالة الأولى بتضخم

الخلايا الكبدية وموت بعضها، بالإضافة إلى حدوث ارتشاحات التهابية وفي بعض الأحيان قد يحدث ترسب في ألياف الكولاجين حيث يصاب (10-29%) من الاشخاص الذين يعانون من الالتهاب الكبدي الدهني اللاكحولي بتليف الكبد وذلك في غضون 10سنوات [12]، ويمكن أن يتطور تليف الكبد في النهاية (4-27%) من الاشخاص المصابون إلى سرطان الكبد [13].

يلعب الكبد الدهني والتراكم الكبدي للغليسيريدات الثلاثية دورا أساسيا في تفاقم الاضطرابات الاستقلابية المختلفة كالسمنة، وداء السكري ومرض مقاومة الأنسولين، وارتفاع ضغط الدم[14]

وقد أشارت الدراسات مؤخرا إلى مخاوف حول مرض التشحم الكبدي اللاكحولي، إذ قد يشكل أحد عوامل الخطر المؤهلة للإصابة بسرطانات قد تتعدى نطاق الكبد وتحصل خارجه [15].

كما أظهرت الدراسات إمكانية تأثير تغير أسلوب حياة الفرد وخاصة في عاداته الغذائية في ارتفاع معدلات الإصابة بمرض الكبد الدهني اللا كحولي وهذا ما تسبب في اعتبار هذا المرض واحد من أكثر الأمراض المزمنة شيوعا [16].

لقد تسبب تكرار حدوث المرض إلى فتح آفاق أخرى للبحث من أجل إيجاد طرق جديدة للوقاية والعلاج، حيث ركزت الدراسات الحديثة على معرفة الجوانب الغذائية المسببة لهذا المرض، كما بينت التأثيرات المحتملة للمستخلصات النباتية العشبية، بالإضافة إلى المكملات الغذائية في منع التراكم الدهني داخل الكبد [17].

يعرف الأتورفاستاتين بـ 3-هيدروكسي3-coenzyme A - metylglutaryl وهو مثبط يقوم بالتقليل من مستويات الدهون بشكل عام، وقد بينت الدراسات التي أجريت على مجموعة من المرضى المصابين بمرض الكبد الدهني اللاكحولي بأنه يثبط ارتفاع الدهون ويخفض من مستوى الكوليسترول، ويعالج دهون الكبد المستحدثة عند فئران التجربة [18]

أهمية البحث وأهدافه:

تأتي أهمية هذه الدراسة في أنها تبحث في الكشف عن بعض تأثيرات المكونات الفعالة لمستخلص أوراق نبات السلبين والتعرف على دورها الوقائي في بعض الاضطرابات المتعلقة بوظائف الكبد (كمرض التشحم الكبدي) كما أنها تلقي الضوء على بعض التغيرات المرافقة له من خلال الكشف عن بعض المعايير الكيميائية المخبرية والتأكيد من إمكانية الاستفادة من موادها الفعالة في مجال الصناعات الدوائية ومقارنتها مع العقار الدوائي الاتورفاستاتين المستخدم لعلاج الشحوم.

تهدف هذه الدراسة إلى الآتي:

- تحديد مستويات كل من (TG، AST،ALT ، سكر الدم) في الفئران البيض المستحدث فيها مرض التشحم الكبدي اللاكحولي.
- اختبار الفعل الوقائي للمستخلص الكحولي المحضر من أوراق نبات السلبين في الفئران المستحدث فيها مرض التشحم الكبدي اللاكحولي من خلال تحديد مستويات المعايير السابقة الذكر.
- اختبار تأثير الأتورفاستاتين في فئران التجربة المستحدث فيها مرض التشحم الكبدي اللاكحولي.
- دراسة التغيرات النسيجية لكبد الفئران المستحدث فيها التشحم الكبدي ومقارنتها مع التغيرات النسيجية لأكباد الفئران المعالجة مع كل من المستخلص الكحولي لأوراق السلبين والأتورفاستاتين كل على حدة.

طرائق البحث ومواده:

1- تحضير المستخلص الكحولي للسلبين:

تم تجفيف الأجزاء الهوائية من أوراق السلبين في الظل عند درجة حرارة الغرفة ثم طحنت إلى مسحوق ناعم في مطحنة ميكانيكية. واستخلص المسحوق منها، ثم مزج (30 غ) من المسحوق مع (300 مل) من الايتانول 95%) لمدة 72 ساعة باستخدام طريقة النقع. ثم رشَح المنقوع باستخدام ورق الترشيح Whatman (رقم 1)، ثم جففت بواسطة المبخر الدوار[19].

2- تحضير المحاليل:

حضر محلول الحقن بحل 250 ملغ من الخلاصة في 10مل من مزيج مكون من (ماء مقطر، DMSO، TWEEN 20) بنسبة (8:1:1)، حقنت الفئران بالمحلول في الصفاق بجرعة قدرها 1ميكرولتر لكل غ من وزن الفار.

3- تحضير تراكيز رابع كلور الكربون:

تم مزج حجم من رابع كلوريد الكربون مع حجم مساو له من زيت الزيتون، ثم حقنت جرعة واحدة منه بمقدار(1مل/ كغ) من وزن الفأر (تركيز ccl4 فيه 50%) [20].

طريقة العمل:

قُسمت فئران التجربة إلى أربع مجموعات، ضمت كل مجموعة (10) فئران ذكور، بعمر (3-4) أشهر، وتراوحت أوزانهم بين (20- 25غ) وتُنسب الفئران المستخدمة في التجربة إلى السلالة (Balb/ c)، حيث تم إحضارها من قسم التقانة الحيوية في هيئة الطاقة الذرية، وضعت الحيوانات في مخابر قسم علم الحياة الحيوانية – جامعة تشرين، لمدة 2-3 أسابيع قبل بدء التجربة من أجل التكيف مع الظروف المناسبة مثل الضوء ودرجة الحرارة (18-20 درجة مئوية). حقنت الفئران كالآتي: (الاولى أو **السيطرة** بـ(0.05 مل) من المحلول الفيزيولوجي (0.9%) فقط ولمدة 10 أسابيع، الثانية بجرعة واحدة من ccl4 (1مل/ كغم) لاستحداث التشحم وتركت مدة 24 ساعة قبل العمل، وحقنت فئران المجموعة التجريبية الثالثة داخل البريتوان بجرعتين مختلفتين الأولى من المستخلص الكحولي لنبات السلبين (مقدار الجرعة 250 ملغم/ كغم من وزن الجسم) لمدة (10) أسابيع، والثانية بجرعة واحدة من ccl4 (1مل/ كغم، وحقنت أيضا فئران المجموعة التجريبية الرابعة جرعتين مختلفتين الأولى من ccl4 (مقدار الجرعة 1 مل/ كغم) لمرة واحدة فقط، والثانية من العقار الدوائي الاتورفاستاتين (مقدار الجرعة 250 ملغ/ كغم من وزن الجسم) ولمدة 10 أسابيع.

جمع عينات الدم والكبد:

بعد الانتهاء من التجربة، تم تخدير الحيوانات عن طريق وضع قطنة مبللة بالايثر الايتيلي على الانف مباشرة لمدة خمس دقائق، ثم تم سحب الدم مباشرة بطعن القلب بإبرة حقن 5 مل، وضع الدم في أنابيب اختبار جافة وترك للتخثر تلقائيا بدرجة حرارة الغرفة لمدة نصف ساعة ثم وضع للتثفيل لمدة 15 دقيقة بسرعة 3000دورة/ دقيقة، جمع المصل بعدها في أنبوب ابندروف مرقم مسبقا، وحفظ المصل بدرجة 4 درجة مئوية لحين إجراء المعايرات الخاصة بمعايير التجربة وهي (TG، AST، ALTالسكر ،) في جهاز الطرد المركزي سبيكتروفوتوميتير، شرحت الفئران

بعدها وتم إزالة الكبد من المجموعات التجريبية الأربعة، وحفظت في عبوات خاصة مرقمة وحاوية على الفورمالين 10% من أجل إتمام الدراسة النسيجية.

الدراسة النسيجية:

حضرت أكباد الحيوانات التجريبية وعولجت بالكحول التجاري والكحول المطلق والزيلين، ثم تم تثبيتها بقوالب البارافين. تم عمل مقاطع نسيجية بسماكة (5) ميكرون باستخدام قطاع الأنسجة (Meditome A 550)، ثم عوملت بمحلول الكحول والزيلين تمهيدًا لتلوينها بالهيماتوكسيلين - يوزين وفقًا لطريقةMaity [21]. درست المقاطع النسيجية باستخدام مجهر ضوئي مزود بكاميرا رقمية ومتصل بجهاز كمبيوتر بهدف التعرف على الصورة النسيجية في أكباد الفئران السليمة والمعالجة تحت تأثير الجرعات المختلفة من المستخلص الكحولي لأوراق نبات السلبين ورابع كلوريد الكربون.

التحليل الإحصائي:

استخدم برنامج Statistical Package For Social Sciences (SPSS) للقيام بعملية التحليل الإحصائي واستخلاص النتائج، واتُبعت الأساليب الإحصائية الآتية: المتوسطات الحسابية والأخطاء المعيارية، تحليل التباين الأحادي anova way one للمقارنة بين المتوسطات، اختبار LSD5 عند مستوى 5% للمقارنة بين متوسطات المعايير المدروسة لمختلف المجموعات.

النتائج والمناقشة.

1- نتائج الدراسة الحيوية الكيميائية:

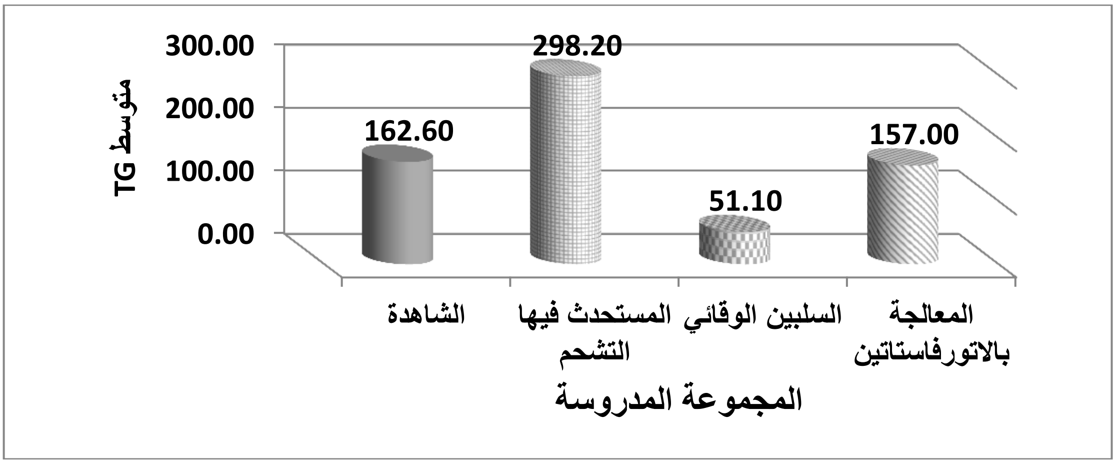
1-1 دراسة تأثير كل من المستخلص الكحولي لأوراق نبات السلبين والأتورفاستاتين، مقارنة مع مجموعة السيطرة والمجموعة المستحدث فيها التشحم فقط.

- معيار TG:

تأثير إعطاء المواد المستخدمة في البحث على مستوى الدهون الثلاثية:

تم استخدام اختبار تحليل التباين one way anova لاختبار الفرق في متوسط TG بين المجموعات المدروسة حيث تبين أن $p\text{-value}<0.05$ وعليه توجد فروق معنوية ذات دلالة إحصائية في متوسط TG بين المجموعات المدروسة ونوضح ذلك بالشكل (1).

n=40 فأر



الشكل (1) متوسطات TG بين المجموعات المدروسة

حيث نلاحظ أن أعلى متوسط لـTG كان في المجموعة المستحدث فيها التشحم حيث كانت أعلى من مجموعة السيطرة بنسبة 83.39%، ومن مجموعة السلبين بنسبة 89.94%، ومن المجموعة المعالجة بالأتورفاستاتين بنسبة 483.56%، كما أن متوسط مجموعة السيطرة كان أعلى من متوسط المجموعة المعالجة بالأتورفاستاتين بنسبة 3.57% ومن السلبين الوقائي بنسبة 218.19%، في حين كان متوسط المجموعة المعالجة بالأتورفاستاتين أعلى من السلبين الوقائي بنسبة 207.24%، ولاستنتاج أماكن تواجد تلك الفروق تم استخدام اختبار LSD5% ونوضح نتائجه في الجدول (1).

الجدول (1) متوسطات TG في مجموعات العمل (السيطرة + التجريبية).

المجموعة	$mean \pm sd$	LSD5%
السيطرة	B 162.6 ± 7.99	23.61
المستحدث فيها التشحم	*C 298.2 ± 46.66	
سلبين وقائي	*A 51.1 ± 8.63	
المعالجة بالأتورفاستاتين	B 157 ± 7.59	

تم ترتيب المجموعات المدروسة تصاعديا حيث أعطيت مجموعة السلبين الوقائي ذات المتوسط الأصغر الحرف A ثم تمت مقارنتها مع المجموعة المعالجة بالأتورفاستاتين حيث لوحظ وجود فروق معنوية بينهما لذا أعطيت هذه المجموعة الحرف B ولدى مقارنة المجموعة المعالجة بالأتورفاستاتين مع مجموعة السيطرة لوحظ عدم وجود فروق معنوية بينهما لذلك أعطيت نفس الحرف B وأخيرا تم مقارنة مجموعة السيطرة مع المجموعة المستحدث فيها التشحم (ذات المتوسط الأعلى) ولوحظ وجود فرق معنوي بينها لذلك أعطيت الحرف C.

وباختصار كل متوسطين لهما حرف مشترك لا يوجد بينهما فرق معنوي (أو كل متوسطين الفرق بينهما أقل من قيمة LSD5% لا يوجد بينهما فرق معنوي) وعليه لا يوجد فرق معنوي ذو دلالة إحصائية بين مجموعة السيطرة والمعالجة بالأتورفاستاتين أما باقي أزواج المجموعات يوجد بينها فرق معنوي.

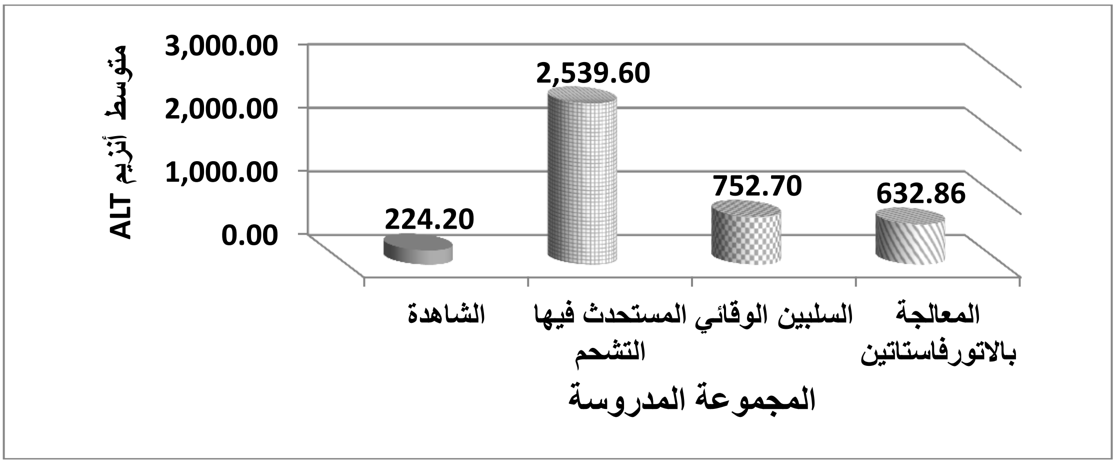
حيث عدد الحيوانات المستخدمة في التجربة n=40

- أنزيم ALT:

تأثير إعطاء المواد المستخدمة في البحث على مستوى أنزيم ALT:

تم اختبار الفرق في متوسط ALT بين المجموعات المدروسة وتبين أن p-value<0.05 وعليه توجد فروق معنوية ذات دلالة إحصائية في متوسط ALT بين المجموعات المدروسة ونوضح ذلك بالشكل (2).

n=40 فأر



الشكل (2) متوسطات قيمALT بين المجموعات المدروسة

حيث نلاحظ أن أعلى متوسط لأنزيم ALT كان في المجموعة المستحدث فيها التشحم حيث كانت أعلى من مجموعة السيطرة بنسبة 237.39%، ومن مجموعة السلبين الوقائي بنسبة301.29 %، ومن المجموعة المعالجة بالأتورفاستاتين بنسبة 1032.74%، كما أن متوسط مجموعة السلبين الوقائي كان أعلى من متوسط المجموعة المعالجة بالأتورفاستاتين بنسبة 18.94% ومن مجموعة السيطرة بنسبة 235.73%، في حين كان متوسط المجموعة المعالجة بالأتورفاستاتين أعلى من مجموعة السيطرة بنسبة 182.27%، ولاستنتاج أماكن تواجد تلك الفروق تم استخدام اختبار LSD5% ونوضح نتائجه في الجدول (2).

الجدول (2) متوسطات ALT في مجموعات العمل (السيطرة + التجريبية)

المجموعة	$mean \pm sd$	LSD5%
السيطرة	A 224.2 ± 15.66	231.09
المستحدث فيها التشحم	*C 2539.6 ± 371.65	
سلبين وقائي	*B 752.7 ± 206.95	
المعالجة بالأتورفاستاتين	*B 632.86 ± 54.07	

تم ترتيب المجموعات المدروسة تصاعديا حيث أعطيت مجموعة السيطرة ذات المتوسط الأصغر الحرف A ثم تمت مقارنتها مع المجموعة المعالجة بالأتورفاستاتين حيث لوحظ وجود فروق معنوية بينهما لذا أعطيت هذه المجموعة الحرف B ولدى مقارنة المجموعة المعالجة بالأتورفاستاتين مع مجموعة السلبين الوقائي لوحظ عدم وجود فروق معنوية بينهما لذلك أعطيت نفس الحرف B وأخيرا تم مقارنة مجموعة السلبين الوقائي مع المجموعة المستحدث فيها التشحم (ذات المتوسط الأعلى) ولوحظ وجود فرق معنوي بينهما لذلك أعطيت الحرف C.

وباختصار كل متوسطين لهما حرف مشترك لا يوجد بينهما فرق معنوي (أو كل متوسطين الفرق بينهما أقل من قيمة LSD5% لا يوجد بينهما فرق معنوي) وعليه لا يوجد فرق معنوي ذو دلالة إحصائية بين مجموعة السلبين الوقائي والمعالجة بالأتورفاستاتين أما باقي أزواج المجموعات يوجد بينها فرق معنوي.

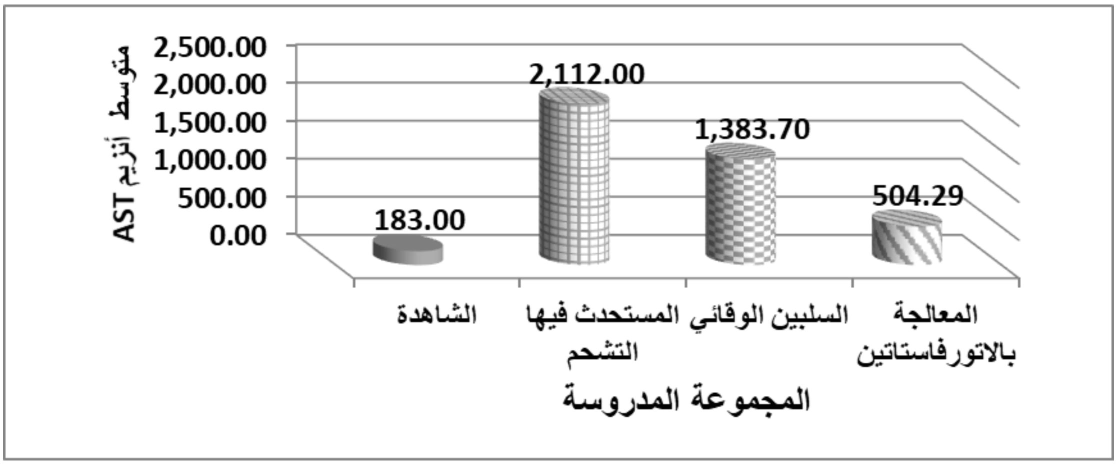
حيث عدد الحيوانات المستخدمة في التجربة n=40

- أنزيم AST:

تأثير إعطاء المواد المستخدمة في البحث على مستوى أنزيم AST:

تم اختبار الفرق في متوسط AST بين المجموعات المدروسة وتبين أن p-value<0.05 وعليه توجد فروق معنوية ذات دلالة إحصائية في متوسط AST بين المجموعات المدروسة ونوضح ذلك بالشكل (3).

n=40 فأر



الشكل (3) متوسطات قيم AST في المجموعات المدروسة

حيث نلاحظ أن أعلى متوسط لأنزيم AST كان في المجموعة المستحدث فيها التشحم حيث كانت أعلى من مجموعة السيطرة بنسبة 52.63%، ومن مجموعة السلبين الوقائي بنسبة 318.81%، ومن المجموعة المعالجة بالأتورفاستاتين بنسبة 1054.09%، كما أن متوسط مجموعة السلبين الوقائي كان أعلى من متوسط المجموعة المعالجة بالأتورفاستاتين بنسبة 174.39% ومن مجموعة السيطرة بنسبة 656.12%، في حين كان متوسط المجموعة المعالجة بالأتورفاستاتين أعلى من مجموعة السيطرة بنسبة 175.57%، ولاستنتاج أماكن تواجد تلك الفروق تم استخدام اختبار LSD5% ونوضح نتائجه في الجدول (3).

الجدول(3) متوسطات AST في مجموعات العمل (السيطرة + التجريبية)

المجموعة	$mean \pm sd$	LSD5%
السيطرة	A183 ± 9.82	
المستحدث فيها التشحم	*D2112 ± 296.51	260.65
سلبين وقائي	*C1383.7 ± 307.13	
المعالجة بالأتورفاستاتين	*B504.29 ± 51.27	

تم ترتيب المجموعات المدروسة تصاعديا حيث أعطيت مجموعة السيطرة ذات المتوسط الأصغر الحرف A ثم تمت مقارنتها مع المجموعة المعالجة بالأتورفاستاتين حيث لوحظ وجود فروق معنوية بينهما لذا أعطيت هذه المجموعة الحرف B ولدى مقارنة المجموعة المعالجة بالأتورفاستاتين مع مجموعة السلبين الوقائي لوحظ وجود فروق معنوية بينهما لذلك أعطيت الحرف C وأخيرا تم مقارنة مجموعة السلبين الوقائي مع المجموعة المستحدث فيها التشحم (ذات المتوسط الأعلى) ولوحظ وجود فرق معنوي بينهما لذلك أعطيت الحرف D.

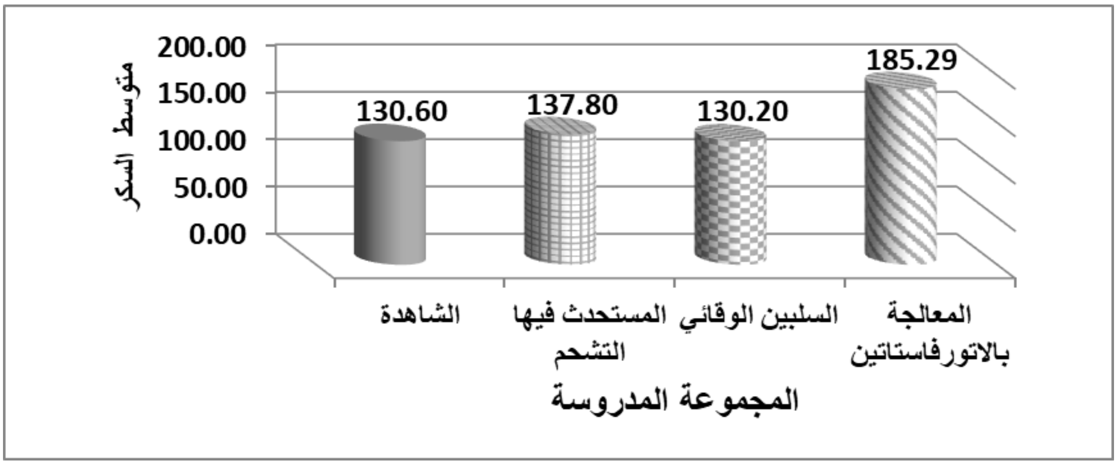
وباختصار كل متوسطين لهما حرف مشترك لا يوجد بينهما فرق معنوي (أو كل متوسطين الفرق بينهما أقل من قيمة LSD5% لا يوجد بينهما فرق معنوي) وعليه يوجد فرق معنوي ذو دلالة إحصائية بين جميع أزواج المجموعات حيث عدد الحيوانات المستخدمة في التجربة n=40

- السكر:

تأثير إعطاء المواد المستخدمة في البحث على مستوى السكر في الدم

تم اختبار الفرق في متوسط السكر بين المجموعات المدروسة أن p-value>0.05 وعليه لا توجد فروق معنوية ذات دلالة إحصائية في متوسط السكر بين المجموعات المدروسة ونوضح ذلك بالشكل (4).

n=40 فأر



الشكل (4) متوسطات قيم السكر في مجموعات العمل

حيث نلاحظ أن أعلى متوسط للسكر كان في المجموعة المعالجة بالأتورفاستاتين حيث كانت أعلى من المجموعة المستحدث فيها التشحم بنسبة 34.46%، ومن مجموعة السيطرة بنسبة 41.87%، ومن مجموعة السلبين الوقائي بنسبة 42.31%، كما أن متوسط المجموعة المستحدث فيها التشحم كان أعلى من متوسط مجموعة السيطرة بنسبة 5.51 % ومن السلبين الوقائي بنسبة 5.84%، في حين كان متوسط مجموعة السيطرة أعلى من السلبين الوقائي بنسبة 0.31%، ولاستنتاج أماكن تواجد تلك الفروق تم استخدام اختبار LSD5% ونوضح نتائجه في الجدول (4).

الجدول (4) متوسطات قيم السكر في مجموعات العمل (السيطرة + التجريبية)

المجموعة	$mean \pm sd$	LSD5%
السيطرة	A130.6 ± 16.46	9.9
المستحدث فيها التشحم	A137.8 ± 8.93	
سلبين وقائي	A130.2 ± 19.13	
المعالجة بالأتورفاستاتين	*B185.29 ± 6.26	

تم ترتيب المجموعات المدروسة تصاعديا حيث أعطيت مجموعة السلبين الوقائي ذات المتوسط الأصغر الحرف A ثم تمت مقارنتها مع مجموعة السيطرة حيث لوحظ عدم وجود فروق معنوية بينهما لذا أعطيت هذه المجموعة نفس الحرف A ولدى مقارنة مجموعة السيطرة مع المجموعة المستحدث فيها التشحم لوحظ أيضا عدم وجود فروق معنوية بينهما لذلك أعطيت أيضا نفس الحرف A وأخيرا تم مقارنة المجموعة المستحدث فيها التشحم

مع المجموعة المعالجة بالأتورفاستاتين (ذات المتوسط الأعلى) ولوحظ وجود فرق معنوي بينهما لذلك أعطيت الحرف B.

وباختصار كل متوسطين لهما حرف مشترك لا يوجد بينهما فرق معنوي (أو كل متوسطين الفرق بينهما أقل من قيمة LSD5% لا يوجد بينهما فرق معنوي) وعليه يوجد فرق معنوي ذو دلالة إحصائية فقط بين المجموعة المعالجة بالأتورفاستاتين وباقي المجموعات.

نتائج الدراسة النسيجية:

2-1- تأثير رابع كلوريد الكربون على كبد الفئران:

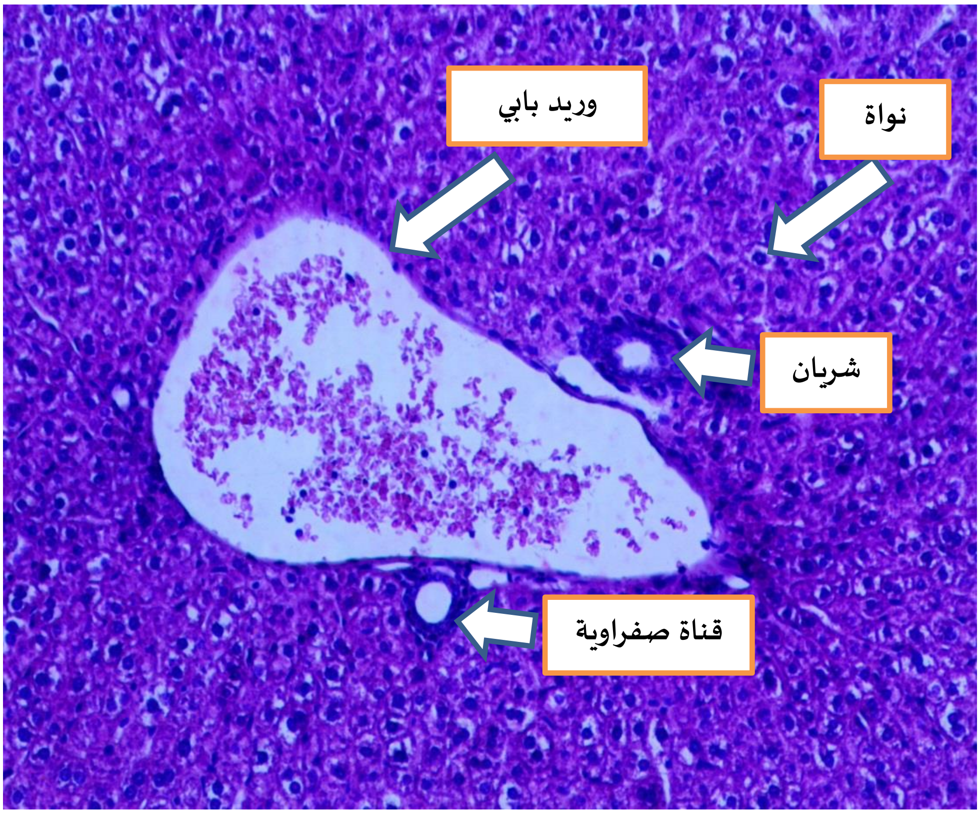
أظهرت نتائج الدراسة النسيجية لكبد فئران المجموعة التجريبية الثانية المعاملة برابع كلوريد الكربون حدوث تشحم شمل كامل الساحة المجهرية ووصل أحيانا هذا التشحم إلى درجة التنخر حيث لوحظ تشكل استحالات شحمية في الخلايا الكبدية مما أدى إلى تغير تموضع نواة الخلية المتشحمة من المركز باتجاه المحيط من جراء المعاملة برابع كلوريد الكربون كما هو مبين في الشكل (6).

2-2- تأثير رابع كلوريد الكربون والمستخلص الكحولي للسلبين على كبد الفئران:

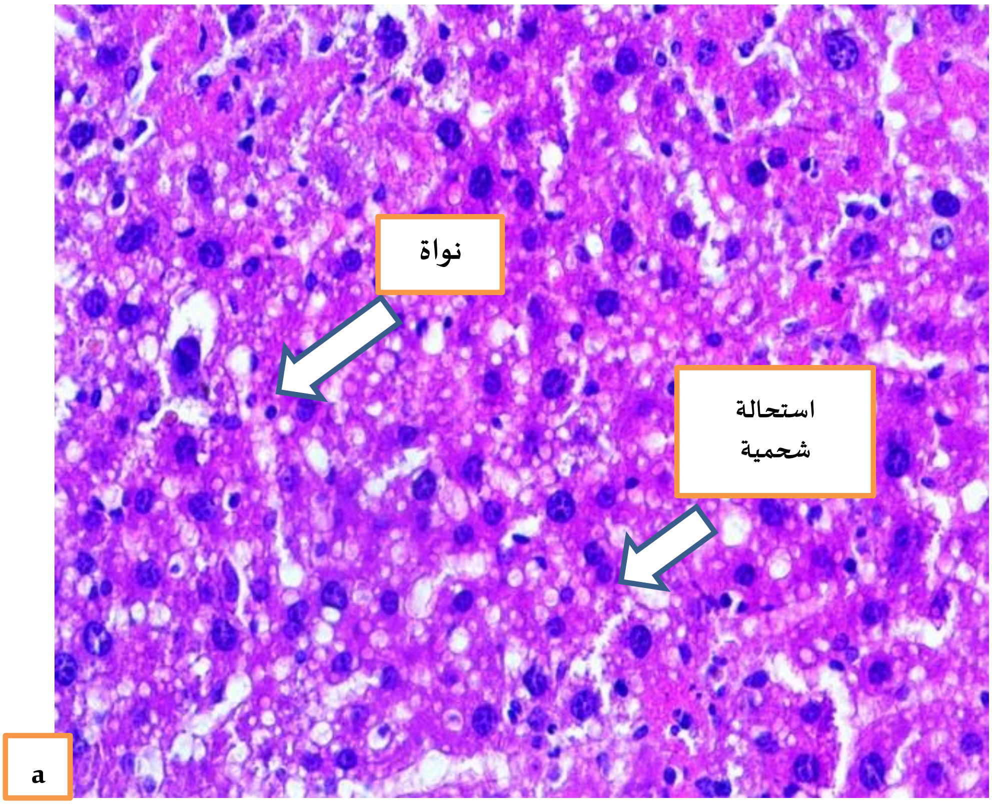
أظهرت نتائج الدراسة النسيجية لكبد فئران المجموعة التجريبية الثالثة المعاملة بجرعات منفردة من رابع كلوريد الكربون وبجرعات يومية من المستخلص الكحولي للسلبين (لمدة 10 أسابيع) تحسنا واضحا في الخلية الكبدية بالمقارنة مع المجموعة الثانية، حيث كان التشحم بحدوده الدنيا حيث نلاحظ وجود عدد قليل جدا من الاستحالات الشحمية والبؤر الإلتهابية كما هو مبين في الشكل (7).

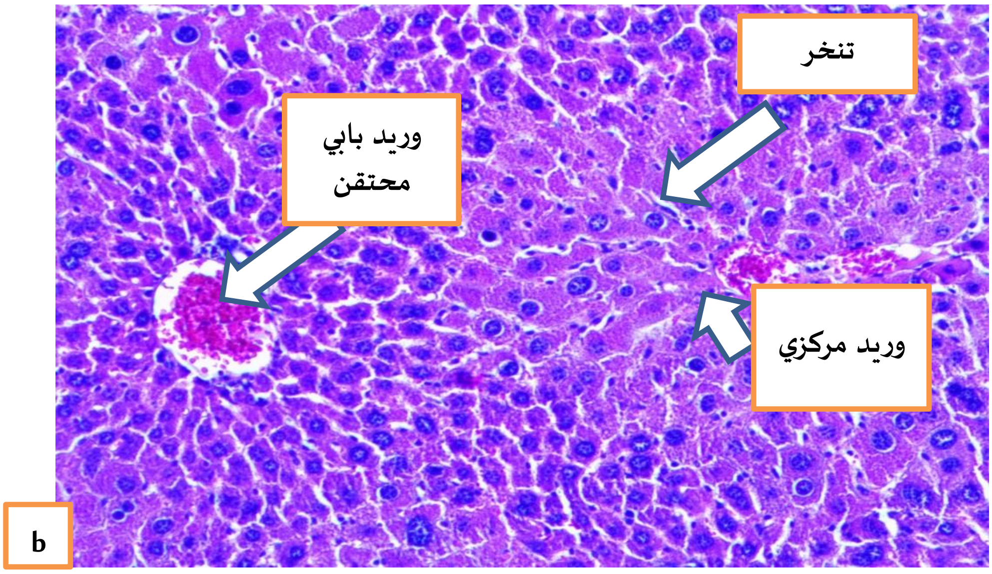
2-3- تأثير رابع كلوريد الكربون وعقار الأتورفاستاتين على كبد الفئران:

أظهرت نتائج الدراسة النسيجية لكبد فئران المجموعة التجريبية الرابعة المعاملة بجرعات منفردة من رابع كلوريد الكربون وجرعات يومية من عقار الأتورفاستاتين (لمدة 10 أسابيع) أيضا تحسنا واضحا في الخلية الكبدية، حيث لم يلاحظ وجود فراغات شحمية أي أن التشحم بحدوده الدنيا مقارنة بالمجموعة الثانية، كما لوحظ تراجع في الأذية الشحمية والخلايا الكبدية متجمعة على شكل حبال كما هو مبين في الشكل (8).

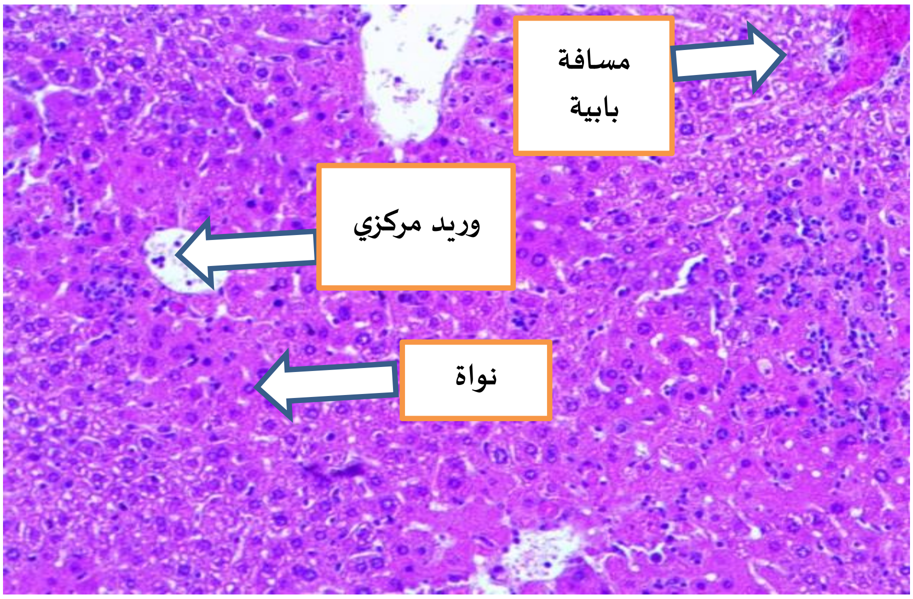


الشكل (5) مجموعة السيطرة: وريد بابي محتقن، الخلايا الكبدية طبيعية مع نوى مركزية (x40)، الصبغة المستخدمة الهيماتوكسيلين – يوزين.



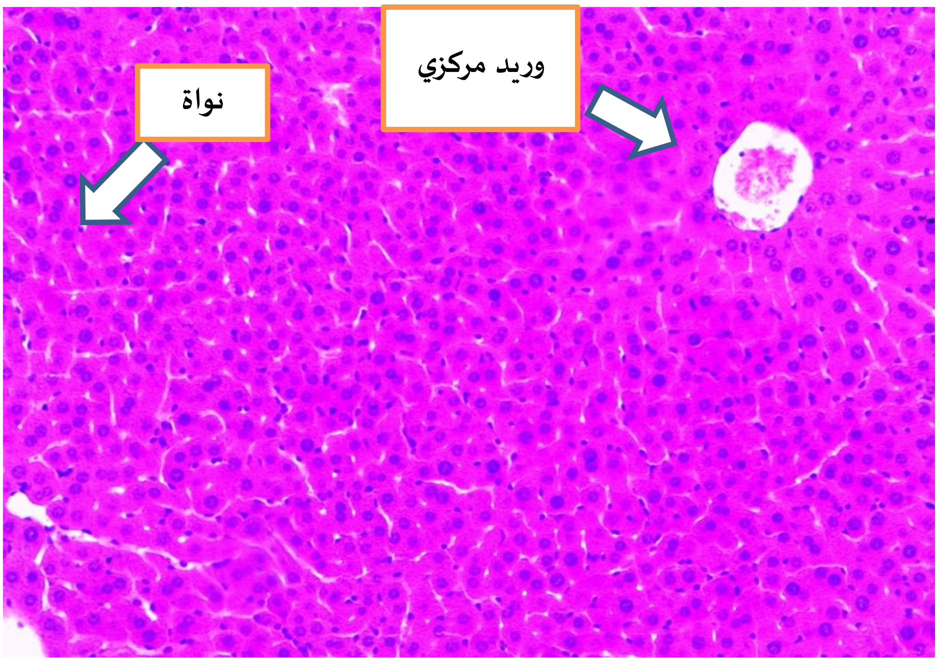


الشكل (6) بعض المقاطع النسيجية في أكباد المجموعة الثانية التي جرعت برابع كلوريد الكربون. (a) ظهور الاستحالات الشحمية في المقطع النسيجي مما دفع النواة المركزية باتجاه المحيط (x100). (b) تضرر النسيج الكبدي لدرجة التنخر والسيتوبلاسما أيوزينية وحدود الخلايا غير واضحة بالإضافة لظهور التنخر حول الوريد المركزي(x100) الصبغة المستخدمة الهيماتوكسيلين – يوزين.



الشكل (7) مقطع نسيجي في أكباد المجموعة الثالثة التي جرعت بمستخلص السلبين وبرابع كلوريد الكربون: حيث نلاحظ تحسنا واضحا وتراجع علامات الأذى في الخلايا الكبدية مع عودة الخلايا لوضعها الطبيعي (x40) الصبغة المستخدمة الهيماتوكسيلين – يوزين.

.



الشكل (8): مقطع نسيجي في أكباد المجموعة الرابعة التي جرعت بالأتورفاستاتين وبرابع كلوريد الكربون: نلاحظ تراجع علامات الأذى في الخلايا الكبدية وعودتها لوضعها الطبيعي (x40) الصبغة المستخدمة الهيماتوكسيلين – يوزين.

المناقشة:

أظهرت النتائج في الجدول (2) أن أعلى متوسط لـ TG كان في المجموعة المستحدث فيها التشحم مقارنة مع مجموعة السيطرة ومجموعات السلبين والعقار الدوائي (الأتورفاستاتين)، كما كانت الفروق معنوية P<0.05 بين مجموعة السلبين ومجموعة الأتورفاستاتين مقارنة مع المجموعة المستحدث فيها التشحم، فالمعالجة برابع كلوريد الكربون تتسبب بتجمع الدهون داخل سيتوبلاسما الخلية الكبدية، مما أثر بشكل واضح وجلي على وظائفها بشكل عام [22]، كما تسببت المعالجة بجرعة منفردة من رابع كلوريد الكربون (الجدول 4، الجدول 6) إلى ارتفاع معنوي P<0.05 لتراكيز كل من ALT و AST في مصل دم حيوانات المجموعة الثانية بالمقارنة مع مجموعة السيطرة. يتفق ذلك مع نتائج الدراسات الأخرى التي بينت بأن تجريع الفئران والجرذان بالباراسيتامول [23][24]، والرصاص [25]، والمبيدات مثل الباراكوت ديكلوريد [26]، والجينتاميسين [27]، ومضادات الاكتئاب مثل دولوكستين و ترازودون [29][28]، والمعادن الثقيلة كالكادميوم، تحث جميعها على الإجهاد التأكسدي لخلايا الكبد مسببة ارتفاع كل من ALT و AST [30] يعود سبب ذلك إلى تضرر خلايا الكبد وأكسدة الجزيئات الضخمة في الانسجة [31] وتشكل جذور حرة مؤكسدة (ROS) تهاجم لبيدات الغشاء الخلوي مؤدية إلى تحطيمها وتحرر الأنزيمات في الدوران الدموي مع ارتفاع في تراكيزها [32]

تظهر نتائج الدراسة الحالية التي استخدم فيها التجريع المتزامن (جرعة منفردة من رابع كلوريد الكربون في المجموعتين الثالثة والرابعة + حقن لمدة 10 أسابيع بالمستخلص الكحولي لأوراق السلبين في المجموعة الثالثة وحقن بنفس الفترة الزمنية بعقار الأتورفاستاتين في المجموعة الرابعة) إلى انخفاض معنوي P<0.05 في متوسطات قيم ALTوAST في مصل دم حيوانات المجموعتين بالمقارنة مع فئران المجموعة الثانية المستحدث فيها التشحم وهذا يؤكد التأثير الوقائي لكل من المستخلص الكحولي لأوراق السلبين والأتورفاستاتين في حماية خلايا الكبد، وقد يعود سبب ذلك إلى إمكانية تأثير بعض المواد الفعالة الموجودة في أوراق السلبين مثل (الفلافونوئيدات والفينولات) وعملها كمضادات أكسدة وربما تفاعلها بشكل مباشر مع الجذور الحرة وإنتاج مركبات مستقرة كيميائيا تحارب الجذور

الحرة وتخفض من معدلات الاجهاد التأكسدي [34] [33]، كما يعود انخفاض تراكيز ALT وAST في المجموعة الرابعة أيضا إلى أهمية مكونات الأتورفاستاتين الدوائية في حماية خلايا الكبد وتخفيضه لمستويات الدهون والكوليسترول [18]، وبمقارنة تأثير كل من المستخلص الكحولي لأوراق نبات السلبين في المجموعة الثالثة والاتورفاستاتين في المجموعة الرابعة على تراكيز ALT،AST، TG ، فقد ظهر التشابه إلى حد كبير، إذ أظهرت النتائج انخفاضا معنويا P<0.05 في متوسطات قيم المعايير السابقة في المجموعتين، مما يشير إلى الأهمية الطبية لمكونات كل منهما الفعالة في حماية خلايا الكبد من التضرر.

وبمقارنة تغير معدلات سكر الدم في مجموعات العمل، أظهرت نتائج الدراسة أنه لا وجود لفروق معنوية P>0.05 بين المجموعات الثلاث الأولى (السيطرة، المستحدث فيها التشحم، السلبين)، بينما كان الفرق معنويا P<0.05 وذو دلالة إحصائية بين فئران المجموعة الرابعة المعالجة بالأتورفاستاتين وباقي مجموعات العمل، مما يظهر دور الأتورفاستاتين في رفع معدل سكر الدم وقد يعود سبب ذلك إلى أن الأتورفاستاتين يقلل من حساسية الأنسولين ويزيد نسبة السكر في الدم المحيط [35].

لقد أظهرت نتائج الدراسة النسيجية في أكباد فئران المجموعة الثانية حدوث تشحم واضح وصل في بعض المقاطع لدرجة التنخر والتضرر الخلوي، حيث لوحظ تشكل استحالات في الخلايا الكبدية مع تغير تموضع النواة في الخلايا المتشحمة الشكل(6) من المركز باتجاه المحيط، كما لوحظ تحسنا واضحا في أكباد فئران المجموعة الثالثة، وهذا مايؤكد احتواء المستخلص الكحولي لأوراق نبات السلبين على مضادات أكسدة تقلل من الإجهاد التأكسدي وتحمي الخلايا من الضرر المحدث برابع كلوريد الكربون، وقد كان التحسن واضحا أيضا في أكباد فئران المجموعة الرابعة، حيث ظهر تأثير محتواه الكيميائي مماثل تقريبا كما ظهر في أكباد فئران المجموعة الثالثة.

تتفق نتائج الدراسة النسيجية الحالية مع نتائج الدراسات والأبحاث العلمية التي أظهرت الدور الوقائي لبذور الكتان [36] وزيت بذور الكتان في منع الإجهاد التأكسدي ومنع الانتباج الخلوي لأنسجة الكبد المحدث بعديد السكاريد الشحمي [37]، وتقليل الإفراط في تراكم الدهون في الأنسجة الكبدية والاستحالة البالونية [39] [38].

الاستنتاجات:

1- الدور المهم لرابع كلوريد الكربون في إحداث التشحم الكبدي.
2- الدور الوقائي للمستخلص الكحولي لأوراق نبات السلبين ضد التشحم الكبدي وآثاره المحدثة.
3- الدور المهم للأتورفاستاتين ضد التشحم الكبدي وآثاره المحدثة.
4- لا تأثير للمستخلص الكحولي لأوراق نبات السلبين على تغير معدل سكر الدم، في حين أثر الأتورفاستاتين بشكل إيجابي.

قائمة المراجع:

1- Azwanida N. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation, 2015.

2- Juma KK, Maina SG, Muriithi JN, Mwangi BM, Mworia KJ, Mwonjoria MJ, Ngeranwa JN, Mburu ND. Protective Effects of Urtica dioica and Cimetidine® on Liver Function Following Acetaminophen Induced Hepatotoxicity in Mice, 2015.

3- Jamshidzadeh A, Fereidooni F, Salehi Z, Niknahad H. Hepatoprotective activity of Gundelia tourenfortii.pp 233-237, 2005.
4- Ertug F, An ethnobotanical study in Central Anatolia. pp 155–182, 2000.
5- Al-Younis NK, Argushy ZM. Antibacterial evaluation of some medicinal plants from kurdistan region. pp256-261, 2009.
6- Hildebert W, Hubertus N, Aynehchi Y. Molluscicidal saponins from Gundelia tournefortii. Pp 2505-2508, 1984.
7- Azeez O H, Kheder A E, Effect of Gundelia tournefortii on some biochemical parameters in dexamethasone-induced hyperglycemic and hyperlipidemic mice. Pp 73–79, 2012.
8- Samani M A, Rafieian M K, Azimi N, Gundelia: a systematic review of medicinal and molecular perspective. pp 1238–1247, 2013.
9- Darwish R M, Aburjai T A, Effect of ethnomedicinal plants used in folklore medicine in Jordan as antibiotic resistant inhibitors on Escherichia coli. pp 10, 2010.
10- Cohen J C, Horton J D, Hobbs H H. Human fatty liver disease: old questions and new insights. Pp 1519-1523, 2011.
11- Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, Browning JD, Reingold JS, Grundy S, Hobbs HH, Dobbins RL Am, Physiol Endocrinol Metab.pp 462-468, 2005.
12- Argo CK, Caldwell SH, *Clin. Liver Dis.* 2009.
13- Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison SA, Hepatology.pp 32- 1820, 2010.
14- Moore JB, the hepatic consequence of obesity and the metabolic syndrome.pp 211- 220, 2010.
15- Sanna C, Rosso C, Marietti M, Bugianesi E. Non-alcoholic fatty liver disease and extra-hepatic cancers. Pp 717, 2016.
16- Fan JG. Epidemiological studies of nonalcoholic fatty liver disease in China. Pp 4-6, 2010.
17- Farzaei MH, Rahimi R, Farzaei F, Abdollahi M. Traditional medicinal herbs for the management of diabetes and its complications.pp 874-887, 2015.
18- Gomez Dominguez E, Gisbert J P, Moreno Monteagudo J A, Garcia Buey L, Moreno Otero R, A pilot study of atorvastatin treatment in dyslipemid non-alcoholic fatty liver patients, pp 1643–1647, 2006.
19- Alviano SW, Antoniolli RA, Farias ML, Luiz WG..In vitroantioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteriabased on Brazilian folk medicine. pp545 – 552, 2008.
20- Sook Song IM, Multiple alterations of canalicular membrane transport activities in rats with CCl4 -induced hepatic injury, Pp 482- 489(2003).
21- Maity T, Ahmad A, Pahari N, Ganguli, S), Hepatoprotective activity of mikania scandens (L.) willd. against diclofenac sodium induced liver toxicity in rats.pp 185-189, 2012.

22- Meinrad B, Lutz WD. Weber, Eberhard Becker and Andreas Stampfl, Mechanism of Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity. Hepatocellular Damage by Reactive Carbon Tetrachloride Metabolites, pp 649-659, 2001.
23- Fadel H, Darious M, shhada K, Effect of aqueous extract of rosemary leaves on some liver function in rabbits after acetaminophen treatment, 2015.
24- Tung B, Hai N, Son P, Hepatoprotective effect of Phytosome Curcumin against paracetamol-induced liver toxicity in mice.
25- Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences Vietnam, 2017.
26- Wang J, Yang Z, Lin L, Zhao Z, Liu Z, Liu X, Protective Effect of Naringenin Against Lead-Induced Oxidative Stress in Rats. Pp 354-359, 2012.
27- Ujowundu C, Nwaogu L, Ujowundu F, Oparaeche N, Oyarebu A. Hepatotoxicity of Paraquat Dichloride and Ameliorative Effect of Nutritional Supplements, 2018.
28- Galaly S, Ahmed O, Mahmoud A, thymoquinone and curcumin prevent gentamicin-induced liver injury by attenuating oxidative stress, inflammation and apoptosis. pp823-832, 2014.
29- Abdel Salam O, Youssef Morsy S, Sleem A. the effect of different antidepressant drugs on oxidative stress afte lipopolysaccharide administration in mice. Pp203-290, 2011.
30- Voican C, Corruble E, Naveau S, Perlemuter G. Antidepressant- Induced Liver Injury: A Review for Clinicians. Pp 404-415, 2014.
31- Rehman H, Aziz A, Saggu S, VanWert A, Zidan N, Additive toxic effect of deltamethrin and cadmium on hepatic, hematological, and immunological parameters in mice, pp 495-502, 2017.
32- Sivakumar V, Sadiq A, Rajan M, Jayanthi M, Paari E. Hepatoprotective Effect of Solanum xanthocarpum in Paracetamol Induced Hepatic Damage in Experimental Animals, pp 125- 130, 2014.
33- Bogen K, Benson J, Yost G, Morris J, Dahl A, Clewell H, Krishnan K, Omiecinski K. Naphthalene metabolism in relation to target tissue anatomy, physiology, cytotoxicity and tumorigenic mechanism of action, 2018.
34- AL Jumail F, AL Azawi A. hepatoprotective activity of lignan compound from flaxseed (linumusitatissimum l.) against acetaminopheninduced hepatotoxicity in rabbits, pp 56-72, 2013.
35- Zamzami M, Baothman O, Samy F, Abo-Golayel M, Amelioration of CCl4-Induced Hepatotoxicity in Rabbits by Lepidium sativum Seed, 2019.
36- Kwang K K, Michael J. Quon, Seung H H, Yonghee L, Soo J, Kim R, Eak K S, Atorvastatin Causes Insulin Resistance and Increases Ambient Glycemia in Hypercholesterolemic, pp1209– 1216, 2009.
37- Darious M, Daoud A, Dawarw A, Effect of flaxseed alcoholic extract on naphthalene-induced liver damage in Syrian hamsters, 2020.
38- Abdel Salam O, Youssef Morsy S, Sleem A, the effect of different antidepressant drugs on oxidative stress afte lipopolysaccharide administration in mice.pp 290-203, 2011.

39- Xu J, Gao H, Song L, Yang W, Chen C, Deng Q, Huang Q, Flaxseed oil and alphalipoic acid combination ameliorates hepatic oxidative stress and lipid accumulation in comparison to lard, 2013.

40- Xu J, Rong S, Gao H, Chen C, Yang W, Deng Q, Huang Q, Xiao L, Huang F. A, Combination of Flaxseed Oil and Astaxanthin Improves Hepatic Lipid Accumulation and Reduces Oxidative Stress in High Fat-Diet Fed Rats, 2017.