منشور في مجلة جامعة بابل المجلد (15) العدد (4) لسنة 2008 الصفحة 1385-1391

تأثير العسل الطبيعي والمايتومايسين-سي على فعالية انزيم الكلوتاثيون المختزل Glutathione Reductase في الفئران البيضاء *Mus musculus*

عباس حسين مغير الربيعي

كلية التربية الاساسية–جامعة بابل

الخلاصة

درست تأثيرات العسل الطبيعي Natural Honey والمايتومايسين –سي Mitomycin-C (MMC) والتداخل بينهما على فعالية انزيم الكلوتاثيون المختزل Glutathione Reductase (GSR) في كبد الفئران المختبرية البيضاء *Mus musculus* من خلال تقدير فعالية مستخلصات الكبد (Liver) للفئران المجرعة للعسل الطبيعي بالتراكيز (150, 300, 450, 600) ملغم/كغم وزن الجسم والمايتومايسين–سي بجرعة مقدارها (2) ملغم/كغم وزن الجسم في تحويل الكلوتاثيون المؤكسد (GSSG) الى الكلوتاثيون المختزل (GSH). لقد درس تأثير المادتين وبالتراكيز المذكورة اعلاه كلاً منهما على حدة وكما درس تأثير العسل الطبيعي عند تجريعه قبل او بعد تجريع المايتومايسين–سي.

وقد اظهرت النتائج مايلي:

1- ان تجريع العسل الطبيعي وبكافة التراكيز يزيد من فعالية الانزيم مقارنة بمعاملة السيطرة السالبة (غير المجرعة).
2- كما ان تجريع المايتومايسين –سي يزيد من فعالية الانزيم عند المقارنة بمعاملة السيطرة السالبة.
3- ان تجريع العسل الطبيعي قبل او بعد المايتومايسين–سي يزيد من فعالية الانزيم وان هذه الزيادة تختلف معنوياً ($P<0.05$) عن الزيادة الحاصلة بفعل تجريع المادتين كلاً على حدة.
4- تختلف تأثيرات العسل الطبيعي في زيادة فعالية الانزيم باختلاف التراكيز المستعملة ووقت التجريع.

Abstract

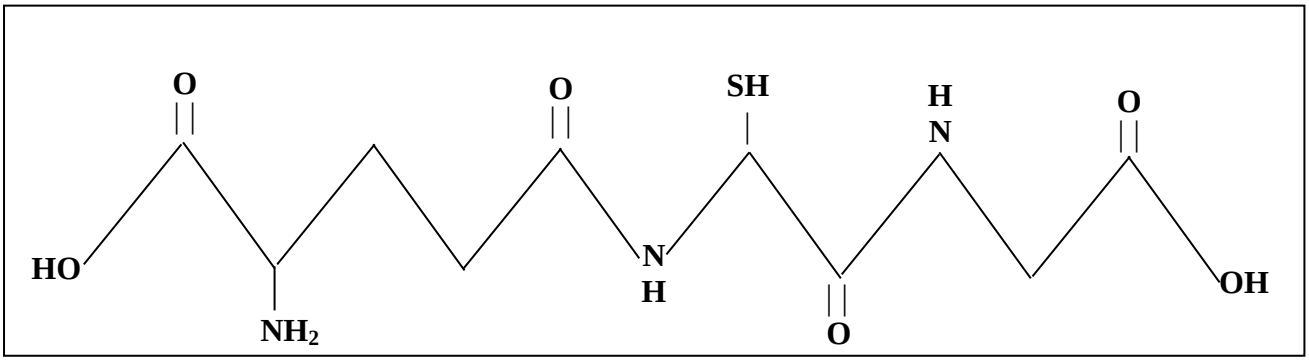
This study was designed to investigate the effect of natural honey at doses (150, 300, 450, 600 mg/Kg body weight) and mitomycin-C[MMC] at dose 2 mg/Kg body weight on the specific activity of glutathione reductase [GSR] in addition to the effect of natural honey when used before or after MMC by determinating the activity of liver extracts of mice in conversion the oxidized glutathione [GSSG] to reduced glutathione [GSH].

The results revealed the following:

1- Honey at all tested doses and MMC at dose 2 mg/Kg body weight increased the specific activity of GSR in liver of treated mice in comparison with non-treated mice.
2- Honey at all tested doses increased the specific activity of GSR when honey used before or after MMC and this increasing differs significantly in comparison with increasing when the two substances used as alone.
3- The effect of natural honey on increasing the specific activity depends on the concentration and the stage of treatment.

المقدمة

الكلوتاثيون ببتيد ثلاثي Tripeptide يتم انتاجه في الكبد وهو يتكون من ثلاثة احماض امينيـــة هـــي الكلايسين وحامض الكلوتاميك والسيستين (أل فليح، 1986) وان صيغته التركيبية كمافي الشكل رقم (1):



شكل رقم (1) الصيغة التركيبية للكلوتاثيون (عن Meister, 1988)

يعتبر الكلوتاثيون من اقوى مضادات الاكســـدة Antioxidants (Meister, 1988). ويعـــد الكبـــد المخزن الاساسي له بالاضافة الى وجوده في معظم انسجة الجسم (Racker, 1955) ويتم اطلاقه من الكبـــد الى مجرى الدم مباشرة فهو يساعد في المحافظة على سلامة كريات الدم الحمر وحماية خلايا الدم البيض كما يلعب دوراً في عملية ايض الكاربوهيدرات وله تأثيرات مضادة للشيخوخة حيث انه يساعد على تفتيت الدهون وان نقص هذا المركب يؤثر على الجهاز العصبي حيث تشير الدراسات ان كمية هذا المركب تقل كلما تقـــدم الانسان في العمر. يقوم الكلوتاثيون بازالة سمية المركبات الضارة حتى يمكن التخلص منهـــا عـــن طريـــق الصفراء (Hayatsu *et al.*, 1988). ويعمل الكلوتاثيون ايضاً على تثبيط تكوين الجذور الحرة ولذلك فهـــو يحمي الخلايا من التلف (Struznk *et al.*, 2005) كما يساعد في حماية الجسم من الاثار المدمرة للتـــدخين والتعرض للاشعاع (البديري، 2002) والعلاج الكيميائي للسرطان والسموم وهو مضاد قوي لسموم المعـــادن الثقيلة والعقاقير (الربيعي، 2006).

يحمي الكلوتاثيون الجسم بوسائل متعددة فهو يقوم بمعادلة جزيئات الاوكسجين قبـــل ان تـــتمكن مـــن الاضرار بالخلايا (Ketterer, 1988). كما يتعـــاون مـــع الســـلينيوم فـــي صـــنع انـــزيم Glutathione Peroxidase الذي يقوم بمعادلة فوق اوكسيد الهيدروجين (H_2O_2) . ويدخل الكلوتاثيون في تكـــوين انـــزيم Glutathione-S-Transferase وهو من الانزيمات المضادة للاكسدة ويعد فعالاً في ازالة سموم الكبد وكما يلعب الكلوتاثيون دوراً مهما بتثبيط فعالية المواد المؤكسدة وابعاد الضرر الذي قد يحصل في الشرايين والمخ والقلب وخلايا جهاز المناعة والكليتين وعدستي العين والكبد والرئتين والجلد بسبب الاكسدة. كما يحمي مـــن السرطان وخصوصاً سرطان الكبد.

بالاضافة الى وجود الكلوتاثيون في الكبد فهو موجود في الرئتين وفي القناة المعوية.

يوجد الكلوتاثيون في الجسم بشكلين هما الشكل المؤكسد (GSSG) وهو الشكل غير الفعال اما الشـــكل الاخر فهو الشكل المختزل (GSH).

يقوم انزيم الكلوتاثيون المختزل (GSR) بتحويل الشكل المؤكسد (GSSG) الى الشكل الفعال (GSH) وبوجود $NADPH_2$ (Meister, 1988) وحسب المعادلة التالية :

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow[\text{Reductase}]{\text{glutathione}} 2GSH + NADP^+$$

وقد بين (Meister, 1988) ان انزيم الكلوتاثيون المختزل يساعد في الاكسدة التحويلية وينشط انقسام ونمو الخلايا. في حين بين (Grace and Logan, 1996) ان هنالك علاقة بين زيادة الكثافة الضوئية وبين زيادة فعالية الانزيم (GSR) والتي تعرض لها النباتات وبالشكل الذي يفوق حاجتها من الضوء حيث اشارت الدراسات الى زيادة محتوى الاوراق من الكلوتاثيون وانزيم الكلوتاثيون المختزل والانزيمات الكاسحة لفوق اوكسيد الهيدروجين (H_2O_2).

وبالنظر لاهمية الكلوتاثيون الكبيرة في المحافظة على انسجة الجسم من التلف ولما يمتلك العسل الطبيعي من فوائد شفائية ذكرها القرآن الكريم في سورة النحل جاءت هذه الدراسة لتبين دور العسل والمايتومايسين سي (باعتباره عاملاً مطفراً) في التأثير على فعالية الانزيم GSR باعتباره العامل الذي يحول الكلوتاثيون الى شكله الفعال.

المواد وطرائق العمل

حضرت اربعة تراكيز من العسل الطبيعية وهي (150، 300، 450، 600) ملغم/كغم وزن الجسم. اما مايتعلق بعقار المايتومايسين–سي (MMC) فقد استخدم بجرعة مقدارها (2) ملغم/كغم وزن الجسم. وقد استخدمت الفئران السويسرية البيضاء *Mus musculus* وبعمر (8–12) اسبوع ووزن (27–32)غرام.

تضمنت الدراسة ثلاثة مراحل:

المرحلة الاولى:

وفيها هيأت خمسة مجموعات تضم كل مجموعة (3) فئران. تمثل المجموعة الاولى السيطرة السالبة وقد جرعت المجموعات الاربعة الاخرى تراكيز العسل (150، 300، 450، 600) ملغم/كغم وزن الجسم لمدة (7) ايام ولم تجرع حيوانات المجموعة الاولى بل تركت تتناول العليقة الاعتيادية لمدة (7) ايام وفي اليوم الثامن شرحت الفئران لجميع المجموعات وقد نزعت كبودها Livers لغرض اجراء الاختبار.

المرحلة الثانية

وفيها هيأت ستة مجموعات تضم كل مجموعة (3) فئران تعد المجموعة الاولى السيطرة السالبة والمجموعة الثانية معاملة السيطرة الموجبة. جرعت الاربعة مجاميع الاخرى تراكيز العسل (150، 300، 450، 600) ملغم/ كغم وزن الجسم ولمدة (7) ايام ولم تجرع حيوانات السيطرة السالبة والسيطرة الموجبة وفي اليوم الثامن جرعت الحيوانات عدا حيوانات السيطرة السالبة عقار المايتومايسن–سي وبجرعة مقدارها (2) ملغم/كغم وزن الجسم وفي اليوم التالي شرحت الحيوانات ونزعت كبودها لاجراء الاختبار.

المرحلة الثالثة

وفيها هيأت ستة مجموعات تضم كل مجموعة (3) فئران وتعد المجموعة الاولى السيطرة السالبة والمجموعة الثانية السيطرة الموجبة جرعت الحيوانات عدا حيوانات السيطرة السالبة عقار المايتومايسين–سي وبجرعة مقدارها (2) ملغم/كغم وزن الجسم ثم جرعت الحيوانات عدا حيوانات السيطرة السالبة وحيوانات السيطرة الموجبة العسل وبالتراكيز (150، 300، 450، 600) ملغم/كغم وزن الجسم للمجموعات الثالثة والرابعة والخامسة والسادسة. وفي اليوم التالي شرحت الفئران و ونزعت كبودها لاجراء الاختبار.

ولغرض تقدير فعالية انزيم الكلوتاثيون المختزل (GSR) فقد استخدمت طريقة (Racker, 1955) والتي تتضمن اولاً تحضير المستخلص الانزيمي حيث يوزن (1)غم من كبد الفأر ويجانس بوجود (1)مل من Biological saline ثم ينقل الى جهاز الطرد المركزي وبعدها يؤخذ الراشح لتقدير فعالية الانزيم مباشرة او

تحفظ في المجمدة وعند درجة (-20)°م . كما استخدمت طريقة Biuret لتقدير كمية البروتين (Bishop *et al.*, 1985).

ان تقدير فعالية الانزيم قد تم على اساس ان الهيدروجين ينتقل من NADPH2 الى GSSG ومن ثم قياس التفاعل بواسطة (Spectrophotometer) على موجة مقدارها (340) نانوميتر وتسجل القراءات كل (30) ثانية حيث ان استمرار التفاعل يؤدي الى انخفاض الامتصاص نتيجة تحول (GSSG) الى (GSH) وان الفعالية النوعية تعبر عن عدد وحدات الانزيم لكل ملغم بروتين من المستخلص الانزيمي حيث تمثل مقدار الانخفاض في الامتصاص بفعل (1) مل من المستخلص الانزيمي خلال دقيقة واحدة لكل ملغم من البروتين وتحت ظروف التفاعل.

كررت التجارب لمرتين ثم حللت النتائج احصائياً لغرض ايجاد اقل فرق معنوي L.S.D وعند احتمالية (0.05) بين معدلات المعاملات.

النتائج

يبين الجدول رقم (1) ان تجريع الفئران العسل قد احدث زيادة معنوية ($P<0.05$) في فعالية انزيم الكلوتاثيون المختزل (GSR) حيث كانت لمعاملة السيطرة السالبة (الحيوانات غير المجرعة العسل) (1.54) وقد اصبحت (3.02، 3.72، 3.20) عند تجريع الفئران التراكيز (150، 300، 450، 600) ملغم/كغم وزن الجسم على التوالي ويلاحظ ان الزيادة الحاصلة في فعالية الانزيم (GSR) بفعل تجريع العسل بتركيز (300) ملغم/كغم وزن الجسم كانت الافضل من بين المعاملات .

ويلاحظ من الجدول رقم (2) ان تجريع الفئران المايتومايسين-سي بجرعة مقدارها (2) ملغم/كغم وزن الجسم قد احدث زيادة معنوية ($P<0.05$) في فعالية الانزيم (GSR) لتصبح (2.44) بعدما كانت لمعاملة السيطرة السالبة (1.54).

اما مايتعلق بالتداخل بين تراكيز العسل والمايتومايسين -سي وتأثيره على فعالية الانزيم (GSR) فيلاحظ في الجدول رقم (2) ان تجريع الفئران تراكيز العسل قبل تجريع المايتومايسين-سي قد احدث زيادة معنوية ($P<0.05$) في فعالية الانزيم حيث ادى تجريع التراكيز (150، 300، 450، 600) ملغم/كغم وزن الجسم الى زيادة فعالية الانزيم لتصبح (10.55، 12.01، 12.08، 10.88) على التوالي وان هذه الزيادة تختلف معنوياً ($P<0.05$) عن الزيادة الحاصلة بفعل تجريع المايتومايسين-سي لوحده.

اما عند تجريع تراكيز العسل بعد المايتومايسين-سي فيلاحظ في الجدول رقم (2) انها قد احدثت زيادة معنوية ($P<0.05$) في فعالية الانزيم (GSR) ولجميع التراكيز عند المقارنة بالزيادة الحاصلة بفعل تجريع المايتومايسين-سي لوحده حيث اصبحت (7.44، 8.24، 8.04، 8.64) عند تجريع التراكيز (150، 300، 450، 600) على التوالي وكانت عند تجريع المايتومايسين-سي لوحده (2.44) في حين كانت للسيطرة السالبة (1.54). وكانت المعاملة بالتركيز (600) ملغم/كغم وزن الجسم هي الافضل من بين المعاملات.

اما عند المقارنة بين الزيادة الحاصلة في فعالية الانزيم (GSR) بفعل تجريع تراكيز العسل قبل او بعد المايتومايسين فيلاحظ في الجدول رقم (2) والشكل رقم (1) ان تجريع تراكيز العسل قبل تجريع المايتومايسين-سي كانت الافضل وان الفروقات في الزيادة الحاصلة كانت معنوية ($P<0.05$) بين المعاملتين قبل او بعد المايتومايسين-سي.

المناقشة

اظهرت التحليلات الاحصائية لنتائج الدراسة الحالية ان فعالية انزيم الكلوتاثيون المختزل (GSR) لمعاملة السيطرة السالبة (جدول رقم 1) هي اقل معنوياً ($P<0.05$) عن فعالية الانزيم عند تجريع الفئران تراكيز العسل (150، 300، 450، 600) ملغم/كغم وزن الجسم وقد يعود السبب في ذلك الى ان تجريع العسل يزيد من كمية الكلوتاثيون (Meister, 1988) وان زيادة المادة الاساس Substrate سوف يزيد بالنتيجة فعالية الانزيم (آل فليح، 1986) ان تأثير العسل في زيادة فعالية الانزيم يتفق مع ماوجده (الربيعي، 1999) حيث وجد ان تجريع الفئران مستخلصات الثوم بجرعة مقدار (100) ملغم/كغم وزن الجسم قد زاد من فعالية انزيم الكلوتاثيون المختزل (GSR) في كبد الفئران.

اما في حالة تجريع المايتومايسين–سي (جدول رقم 2) فيلاحظ كذلك زيادة فعالية الانزيم وقد يعود السبب في ذلك الى تكوين الجذور الحرة او المتأيضات Metabolites الغريبة عن الجسم وان الكلوتاثيون يعمل على حجز Trap او اخماد Quenching الجذور الحرة وان زيادة فعالية الانزيم ربما تعمل في اصلاح الضرر في الاحماض النووية والمواقع الاخرى التي يمكن ان تتضرر بفعل وجود المادة المطفرة (Struznka *et al.*, 2005) وهذه النتائج تتفق مع ماوجده (الربيعي، 1999) حيث لاحظ ان تجريع الفئران فوسفيد الخارصين بجرعة مقدارها (80) ملغم/كغم وزن الجسم قد زاد من فعالية الانزيم GSR في الكبد. كما تتفق مع (Grace and Logan, 1996; Cakmak and Marschne, 1992) حيث يعمل الانزيم ضد العوامل المؤكسدة.

واما في حالة تأثير التداخل عند تجريع تراكيز العسل قبل او بعد تجريع المايتومايسين–سي (جدول رقم 2) فيلاحظ ان فعالية انزيم الكلوتاثيون المختزل (GSR) قد ازدادت معنوياً ($P<0.05$) عن فعالية الانزيم عند تجريع المايتومايسين–سي لوحده وان السبب في ذلك قد يعود الى ان الكلوتاثيون يعمل على تثبيط المواد المطفرة (Mutagenes) عن طريق التفاعل الكيميائي بوساطة مجموعة الثايول (Thiol) او قد يعمل على تسهيل عزل او حجز المواد المطفرة في الخلايا غير المستهدفة او في تحفيز ازالة السمية كما يعمل في تسهيل اصلاح اضرار الاحماض النووية (Nucleic Acids) وان هذه الزيادة في فعالية الانزيم لغرض توفير الكلوتاثيون المختزل GSH بالكمية التي يمكنها العمل في الدفاع عن الجسم تجاه المواد المطفرة والضارة فقد لاحظ الباحثان Deflora و Ramel (1988) ان مجموعة الثايول Thiol في الكلوتاثيون المختزل GSH تثبيط القابلية التطفيرية لـ MNNG في القناة المعوية من خلال الدفاع الكيميائي ضد المواد المحبة للالكترونات (Electrophils) ويعد (GSH) من المواد التي تمتلك خصائص المواد المحبة للنواة (Nucleophils) تتنافس مع الـ DNA في التفاعل الكيميائي مع المطفرات المحبة للالكترونات (Electrophils) .

كما يلاحظ ايضاً ان تجريع تراكز العسل قبل تجريع المايتومايسين–سي قد ادى الى زيادة في فعالية الانزيم (GSR) اكبر بالمقارنة مع الزيادة الحاصلة بفعل تجريع تراكيز العسل بعد تجريع المايتومايسين–سي وان السبب في ذلك قد يعزى الى ان عمل المواد المثبطة للطفرات يعتمد على المرحلة التي تؤدي خلالها هذه المواد عملها او فعلها (Alekperov, 1982; Alekperov, 1984).

المصادر

البديري، نضال عبد الحسين (2002). دراسة قابلية العسل ومستخلصات التمر الزهدي في ثبيط التـــأثيرات الوراثية الخلوية والدموية لاشعة كاما في الفئران البيض، رسالة ماجستير، جامعة الكوفة.

الربيعي، عباس حسين مغير (1999). تأثير مستخلصات الثوم في ثبيط الفعل التطفيري لفوسفيد الخارصين واشعة كاما في الفئران البيضاء. اطروحة دكتوراه، جامعة بابل.

الربيعي، عباس حسين مغير (2006). تأثير العسل الطبيعي في ثبيط الاثر التطفيري لعقار المايتومايســـين- سي في الفئران البيضاء. مجلة جامعة بابل، المجلد13، العدد 3: 500-510.

آل فليح، خولة احمد (1986). مدخل الى الكيمياء الحياتية، وزارة التعليم والبحث العلمي، جامعة الموصل.

Alekperov, V. (1982). Antimutagens and the problem of controlling the action of environmental mutagens In : Sugimura, T. Kondo, S. and Takebe, K. (Eds.) Environmental mutagens and carcinogens. Liss, New York: 361-368.

Alekperov, V. (1984). Antimutagens: theoretical and practical aspects. Nauka, Moscov, 128pp.

Bishop, M.; Duben-vontafen, J. and Fody, E. (1985). Clinical chemistry principles, producers, correlation. U.S.A.P: 181-182.

Cakmak, I and Marschner, H. (1992). Magnesium deficieny and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and glutathione reductase in bean leaves. Plant Physiol. 98(4): 1222-1227.

Deflora, S. and Ramel, G. (1988). Mechanism of inhibitor of mutagenesis and carcinogenesis. Classification and overview. Mutat. Res. 202: 285-306.

Grace, S. and Logan, B . (1996). Acclimation of folar antioxidant system to growth irradiance in three broad-leaved evergreen species. Plant Physiol. 112(4): 1631-1640.

Hayatsu, H.; Arimoto, S. and Negishi, T. (1988). Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Mutat. Res. 202: 429-446.

Ketterer, B (1988). Protective role of glutathione and glutathione transfereses in mutagenesis and carcinogenesis. Mutat. Res. 202: 343-361.

Meister, A. (1988). Glutathione metabolism and it's selective modification. J. B iol. Chem. 263(33): 17205-17208.

Racker, E. (1955). Method in Enzymology. 127: 722-725.

Struznka, L.; Chalimoniuk, M. and Sulkowski. G. (2005). The role of asteroglia in Pb-exposed adult rat brain with respect to glutamate toxicity. Toxicology. (212)2-3: 185-194.

جدول رقم (1) تأثير العسل الطبيعي على فعالية انزيم الكلوتاثيون المختزل (GSR) في كبد الفئران البيضاء.

تركيز العسل ملغم/كغم وزن الجسم	فعالية الانزيم Unit/mg protein
0.0 (سيطرة سالبة)	1.54
150	3.02
300	3.72
450	3.22
600	3.20
% 5 L.S.D	1.022

جدول رقم (2) تأثير العسل الطبيعي والمايتومايسين –سي على فعالية انزيم الكلوتاثيون المختزل GSR في كبد الفئران البيضاء

العاملة ملغم/كغم وزن الجسم		فعالية الانزيم Unit/mg protein
سيطرة سالبة		1.54
مايتوماسين–سي 2 ملغم/كغم وزن الجسم		2.44
تجريع تراكيز العسل قبل المايتومايسين–سي	150	10.55
	300	12.10
	450	12.08
	600	10.88
تجريع تراكيز العسل بعد المايتومايسين–سي	150	7.44
	300	8.24
	450	8.04
	600	8.64
L.S.D.	%5	0.866