أستخلاص أنوية دم الطيور وأثرها في تثبيط تحلل الدم

م. م. عذراء حسين علي

جامعة بغداد / كلية التربية – ابن الهيثم – قسم علوم الحياة

الخلاصة:

تمت دراسة دور أنوية كريات الدم الحمر للدجاج في تثبيط تحلل كريات الدم الحمر وأختبار الهشاشة التنافذية لدم بعض الاشخاص غير المصابين بمرض ذو علاقة بتحلل كريات الدم الحمر. تم أستخدام السابونين وبيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) كمسببات لتحلل كريات الدم الحمر خارج الجسم *Invitro* وملاحظة التحلل الحاصل . ثم تم أضافة مستخلص أنوية كريات الدم الحمر للدجاج وملاحظة دورها في تثبيط التحلل الحاصل وكانت هذه الاختبارات بخمسة طرق وهي :

أولاً: أستخدام محلول كلوريد الصوديوم (0.5%) .

ثانياً: أستعمال محلول كلوريد الصوديوم مع محلول بيروكسيد الهيدروجين (0.6%).

ثالثاً: أستخدام محلول كلوريد الصوديوم مع محلول السابونين (0.12%).

رابعاً: أستعمال محلول كلوريد الصوديوم مع محلول بيروكسيد الهيدروجين ومستخلص أنوية كريات الدم الحمر للدجاج.

خامساً: أستخدام محلول كلوريد الصوديوم مع محلول السابونين ومستخلص أنوية كريات الدم الحمر للدجاج.

أوضحت الدراسة ان نتائج الطريقة الرابعة والخامسة متوافقة مع نتائج الطريقة الاولى من حيث بداية التحلل ومن ثم أكتماله.

الكلمات المفتاحية:

كريات الدم الحمر ، تحلل الدم ، السابونين

المقدمة :

يعتبر مرض انيميا الفول (favism) اكثر امراض تحلل الدم انتشارا في العالم،فهو يصيب حوالي ٤٠٠مليون شخص، يعرف مرض أنيميا الفول بمرض نقص أنزيم Glucose-6-Phosphodehydrogenase (G6PD) ونقص الإنزيم يجعل كرية الدم الحمراء معرضه للتحلل والتكسر قبل موعدها المعتاد فيؤدي الى انخفاض في الهيموجلوبين مع انتشار للمادة الصفراء.(Bilirubin) [1]. يقع الجين الخاص بانزيم G6PD في الشريط رقم ٢٨ من

الذراع الطويلة من كروموسوم أكس ونقصه يؤثر على أغشية كريات الدم الحمراء. [2] في حالة زيادة المواد المؤكسدة مثل تناول الفول والبقوليات و بعض عقاقير الألتهابات يؤدي ذلك الى تبلور الهيموجلوبين في داخل كرية الدم الحمراء وينتج عن ذلك تكسر كرية الدم الحمراء قبل موعدها المعتاد(والذي يستمر في العادة ١٢٠ يوم) فيؤدي الى انخفاض في الهيموجلوبين مع انتشار للمادة الصفراء التي يعجز عن تصفيتها الكبد بشكل سريع[3] .

تختلف الكريات الدموية الحمر في الطيور عنها في اللبائن كونها حاوية على نواة كبيرة تختلف احجامها حسب انواع الطيور [4] ، كذلك أشار [5] بان طول فترة حياة الكريات الحمر للطيور تبلغ حوالي (30-28) يوم مقارنة باللبائن (120-28) يوم [6]. وهنالك الكثير من الدراسات تشير الى عدم أصابة الطيور والضفادع بفقر الدم التحللي وعدم فعالية السابونين في أحداث التحلل لدم هذه الكائنات [9,8,7] والسابونين هو عبارة كليكوسيدات ثلاثية او ستيرويدات . تنتج مادة السابونين بصورة رئيسة عن طريق النبات بوصفها مركبات أيض ثانوية . وكذلك في أنواع من الحيوانات البحرية وبعض البكتريا ولها تركيب رئيس واحد وهو: :2,3-Dihydro-2,5-dihydroxy-6-methyl-4-hydropyrane-4-one (DDMP) تختلف هذه الأنواع تبعاً لتركب.(DDMP) يتمركز السابونين في فلقات فول الصويا ويتواجد في طبقة الإيبكوتيل للبذور البقولية التي تحتويه. والسابونين يقلل من النمو الطبيعي حيث يقلل من معدل استهلاك الإنسان للغذاء كما يكون معقدات غير ذائبة من السابونين والمعادن وخاصة الحديد وهذه بدورها يكون لها نشاط تحللي للدم.

وتأتي أهمية السابونين لكونه مادة سامة ومحللة لكريات الدم الحمر [13,12,11,10] .

المواد وطرائق العمل :

تمت هذه الدراسة بتحضير مستخلص انوية كريات الدم الحمر للدجاج عن طريق جمع عينات الدم من الدجاج و من ثم خفف الدم بأستخدام محلول بفر المثلج (kcl) بتركيز 0.9% ثم وضع في جهازالطرد المركزي بقوة 600 دورة /دقيقة لمدة عشر دقائق ثم غسل ثلاث مرات بنفس المحلول السوي ثم عرض لجهاز الطرد المركزي ثلاث مرات أخرى وبسرع مختلفة[6]، ومن ثم تحضير تركيز (15%) من هذا المستخلص. حضُر محلول السابونين (0.12%) بطريقة Duffus and Slaughter [14] وأجراء اختبار الهشاشة التنافذية بطريقة الغربلة Screening method [15] ل (25) نموذج من دم الاشخاص غير المصابين بأي مرض ذو علاقة بتحلل الدم وكما يلي :

الطريقة الاولى :

أستخدمت (12) أنبوبة من أنابيب دَرهام، قسمت تنازلياً من (25,14) ، وضعت في كل انبوبة اختبار قطرات من محلول كلوريد الصوديوم بتركيز (0.5%) بعدد مساوي لرقم كل انبوبة ومن ثم أكمال عدد القطرات الى (25) قطرة للانابيب من رقم (24-14) بأضافة الماء المقطر. وأخيراً أضافة قطرة من الدم البشري المراد فحصه الى كل انبوبة وكما موضح في الجدول رقم (1) .

الطريقة الثانية :

أضافة قطرة من محلول بيروكسيد الهيدروجين (6%) الى مزيج الطريقة الاولى .

الطريقة الثالثة :

أضافة قطرة من محلول السابونين (0.12%) الى مزيج الطريقة الاولى.

الطريقة الرابعة :

أضافة قطرة من محلول بيروكسيد الهيدروجين (6%) وقطرة من مستخلص الانوية الى مزيج الطريقة الاولى.

الطريقة الخامسة :

أضافة قطرة من محلول السابونين (0.12%) وقطرة من مستخلص الانوية الى مزيج الطريقة الاولى.

تم حضن مزيج الطرق الخمسة بدرجة حرارة الغرفة لمدة ساعتين ثم تم فحص الانابيب الاثني عشر لكل طريقة عينياً بأستخدام عدسة مكبرة ذات قوة تكبير (12 x) لملاحظة التحلل الظاهر في هذه الانابيب وتحديد بداية التحلل وأكماله .

النتائج :

أوضحت النتائج بان السابونين ذو تركيز (0.12%) أحدث تحللاً واضحاً لكريات الدم الحمر فلهذه المادة القدرة على تحليل أغشية كريات الدم الحمر عن طريق إحداث ثقوب ذات قطر يتراوح بين (40-50) أنكستروم في أغشية هذه الكريات من خلال إذابة الدهون في غشاء الكرية الحمراء أو تغير اتجاهات ترتيب جزيئات الدهون في الغشاء الخلوي وبالتالي فان الماء ينفذ إلى داخل الخلية وتنفجر الخلية وتتغير صفات الغشاء وتنشأ به قنوات دقيقة تسمح بمرور الهيموكلوبين وغيره من محتويات الخلية وتنتشر في السائل المحيط بالخلايا . ، وهذا يتفق مع ما أشار اليه الباحثين [13,12,11,10] وعدم فعاليته لكريات الدم الحمر للدجاج والضفادع [9,8,7] .

يعتبر تحلل كريات الدم الحمر في الطريقة الاولى نتيجة طبيعة الدم البشري [1] ، إذ ان التراكيز في الانابيب (25,24,23) لاتسمح بالتنافذ بين خلايا الدم والمحلول المحيط بها وذلك لان المحلول في هذه الانابيب مفرط التوتر Hypertonic Solution الذي يعتبر عال التركيز مما يؤدي الى فقدان قدرا من ماء الخلايا وانكماشها الى حد معين[16]. اما التراكيز في الانابيب (22) نزولاً الى (14) فأن لها قابلية متزايدة تدريجياً لحصول التنافذ مما يؤدي لحدوث تحلل جزئي من الانبوب (22) وأكتماله في الانبوب (17–14) إذ يعتبر المحلول في هذه الانابيب الاخيرة منخفض التوتر Hypotonic solution والذي يؤدي الى دخول الماء الى الخلايا حتى يصل إلى درجة يزيد فيها الضغط الهيدروستاتيكي على جدران الخلايا ولما كانت هذه الجدران غير مرنة فإنها تنفجر وتتحلل الخلايا وينطلق محتواها من الهيموكلوبين ويعرف هذا التحلل الدموي Hemolysis [16]. أما في الطريقة الثانية حيث أُستعمل محلول بيروكسيد الهيدروجين فان التحلل الجزئي قد بدأ بشكل مبكر في الانبوبة (25) وأكتماله في الانبوبة (20) حيث يلاحظ بان التحلل حدث في جميع التراكيز ، وكذلك الحال في الطريقة الثالثة حيث ظهر التحلل الجزئي في الانبوبة (24) وأكتماله في الانبوبة (21) عندما تم استعمال السابونين ، اما الطريقة الرابعة والخامسة فعند أضافة قطرة من محلول مستخلص الانوية فان النتيجة قد عادت تقريباً الى الحالة الطبيعية الظاهرة في الطريقة الاولى وكما مبين في الجدول رقم (2) .

المناقشة :

أن مادة بيروكسيد الهيدروجين تعتبر من مجاميع الاوكسجين الفعالة ولها دور مهم في عملية البلعمة والقضاء على الميكروبات من خلال تأثيرها في الحديد واللاكتوز[17]والتي تعتبر من العناصر المهمة لأدامة حياة الميكروبات البكتيريه وفعله المعروف في احداث التحلل الدموي يأتي من أنتاج بعض الادوية لهذه المادة [18]والتي تقوم بأكسدة خضاب الدم ومن ثم تحلل كريات الدم الحمر خصوصاً عندما يعاني الانسان من نقص في أنزيم (G6PD) المعادي لهذه المادة المؤكسدة [15] ينتج انزيم G6PD جين موجود على كروموسوم أكس يعرف بجين انزيم G6PD.و حين يتعطل هذا الجين يحدث مرض انيميا الفول.ولذلك يعتبر هذا المرض مرضاً من امراض الجينات الوراثية. يحدث في داخل الخلية الحمراء عدة تفاعلات كيميائية و على شكل شبكة مترابطة من المواد الكيميائية تتفاعل مع بعضها البعض و مدعومة بالعديد من الأنزيمات.و لو ركزنا على احد هذه الشبكات و المعروفة بتفاعل فسفات البنتوز.، دور انزيم G6PD هو انتاج مادة البنتوز من جلوكوز الفوسفات السداسي و تحويل مادة النيكوتونوميد ادنين للفوسفات الثنائي النووي (NADP) الى مادة ا لنيكوتونوميد ادنين للفوسفات الثنائي

النووي المؤكسد(NADPH).يوجد عدة طرق اخرى لأنتاج مادة (NADPH) في جميع خلايا الجسم ماعدا كريات الدم الحمراء،فتفاعل فسفات البنتوز هي الطريقة الوحيد لأنتاج (NADPH) [19] يكمن اهمية مادة (NADPH)في انه يحافظ على جعل مادة الجلتثيون في داخل كرية الدم الحمراء في حالة مختزلة قابلة لسحب الهيدروجين من أي مادة مؤكسدة كالفول والبقوليات و بعض عقاقير الألتهابات وحماية كرية الدم الحمراء من التكسر. عند نقص انزيم G6PD يؤدي لنقص تكون مادة (NADPH) ويجعل مادة الجلتثيون في حالة مؤكسدة(حالة الأكسدة هي خسارة الالكترونات وهي عكس الاختزال).الى هذا الحد لا تتأثر الكريات الدم الحمراء بهذا النقص،ولكن عندما يأكل الشخص مادة الفول فان الهيموجلوبين في داخل الخلية الحمراء يتبلور نتيجة لعدم حمايتة من قبل مادة الجلتثيون و بذلك تتكسر الكريات الدم الحمراء مؤدية الى فقر دم وصفار[3] . اما في هذا البحث فقد تم الاستيعاض عن المادة المؤكسدة باستخدام محلول بيروكسيد الهيدروجين ، حيث أعطى نتائج جيدة في إحداث التحلل بمستخلص أنوية كريات الدم الحمر جدول رقم (2).

الاستنتاجات :

أن عدم أصابة الطيور والضفادع بفقر الدم الانحلالي وعدم تأثير السابونين و بيروكسيد الهيدروجين في إحداث التحلل لكريات الدم الحمر لهذه الكائنات [9,8,7] قد يعود لاحتواء كريات دمها الحمر على أنوية او عوامل أخرى وهذا ما ساعدنا في أستنباط الفكرة وأستخلاص أنوية كريات الدم الحمر للدجاج ومن ثم أستعمال هذا المستخلص كمثبط للتحلل الذي تم أجراءه خارج الجسم (Invitro) بأستخدام بيروكسيد الهيدروجين والسابونين فكانت النتائج كما كان متوقع لها وهذا قد يعتبر تفسير أبتدائي لظاهرة عدم أصابة الطيور والضفادع بفقر الدم الانحلالي ، كما يؤمل أستخدام هذا المستخلص في الجسم (Invivo) وذلك للتوصل الى محاولة تثبيط إنحلال الدم داخل الجسم الحاصل بسبب تعاطي بعض الادوية والمواد المؤكسدة لخضاب الدم او التعرض لبعض السموم الحالة للدم .

جدول رقم (1)

تحلل كريات الدم الحمر باستخدام محلول كلوريد الصوديوم (0.5%)

المواد المستخدمة	رقم أنابيب درهم											
	25	24	23	22	21	20	19	18	17	16	15	14
محلول كلوريد الصوديوم (0.5%)	25	24	23	22	21	20	19	18	17	16	15	14
ماء مقطر (قطرات)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
دم بشري طبيعي (قطرات)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

جدول رقم (2)

بداية واكتمال الهشاشة التنافذية للدم باستخدام محلول كلوريد الصوديوم (0.5%) في الطريقة رقم (١) واستخدام محلول كلوريد الصوديوم مع محلول بيروكسيد الهيدروجين (0.6%) في الطريقة رقم (٢). واستعمال محلول كلوريد الصوديوم مع محلول السابونين (0.12%) في الطريقة رقم (٣). و أستعمال محلول كلوريد الصوديوم مع محلول بيروكسيد الهيدروجين ومستخلص أنوية كريات الدم الحمر للدجاج في الطريقة رقم (٤). أستخدام محلول كلوريد الصوديوم مع محلول السابونين ومستخلص أنوية كريات الدم الحمر للدجاج في الطريقة رقم (٥).

رقم الطريقة	رقم أنابيب درهم											
	25	24	23	22	21	20	19	18	17	16	15	14
1	−	−	−	+ −	+ −	+ −	+ −	+ −	+	+	+	+
2	+ −	+ −	+ −	+ −	+ −	+	+	+	+	+	+	+
3	−	+ −	+ −	+ −	+	+	+	+	+	+	+	+
4	−	−	−	+ −	+ −	+ −	+ −	+ −	+ −	+	+	+
5	−	−	+ −	+ −	+ −	+ −	+ −	+ −	+	+	+	+

- : لايوجد تحلل صفر %

\+ : تحلل كامل 100%

± : تحلل جزئي

Refernces :

1- Guyton, AC and Hall, JE (1996). Medical physiology .9th ed. W.B. Saunders, Philadelphia.pp.1233-1237.
2- Melzig MF, Bader G and Loose R (2001). Investigation of the mechanism of membrane activity of selected triterpenoid saponins . Planta Medica 67, 43-48 .
3- Harris-Young,L (1995).Principles of hematology.Wmc.Brown Puplishers,U.K.
4- Iucas,A.M. and Jamro,Z.G (1961). Atlas of avian hematology, Washingten, D.C: U,S,D,A. Washington.
5- Hevesy, J.O (1954). Life cycle of the red corpuscles of the hen. Poult, Sci., 33,239.
6- Edward L. Gershey and Lewis J. Kleinsmith (1969). Phosphorylation of Nuclear Proteins In Avian Erythrocytes.Department of Zology. The University of Michgan, Vol 85 , June , 881-889.
7- Anderson, J.O(1957). Soybean Saponins studies of their effect on birds, mammals and cold-blooded Organisms.Poult.Sci.,36 , 874-879
8- Peterson,D.W (1950). Effect of Steroids on the growth of Chicks fed high alfalfa diets or diets containing quillaya saponin . J,Nutrition 42:597-608.
9- Ishaaya, I.B, A., and Tencer, Y.(1969).Soybean Saponins studies of their effect on Birds, Mammals and cold –blooded Organisms. J.Sci.Fd.Agric,Vol. 20,July.(7): 433-436.
10- Francis, Zohar, Harinder P.S. and Klaus (2002). The biological action of saponins in animal system: a review. Br. J. Nutrition 88(6): 587-605.
11- Oda K, Matsuda H, Murakami T, Katayama S, Ohgitani T, and Yoshikawa M (2000). Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. Biological Chemistry 381, 67-74.
12- Foerster and Hartmut (2006). MetaCyc pathway: saponin biosynthesis. New York City: Academic Press: p.161.
13- Haralampidis K, Trojanowska M, and Osbourn AE(2002).Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology 75,31-49.
14- Duffus, CM and Slaughter (2003). Seeds and their uses. john wiley and sons. New York.
15- Ramnik,S (2001). Medical Laboratory technology.P.107,Vashist Printing sevice. Bhajanpur a Delhi-53.
16- Waugh, A.; Grant, A. (2007). Anatomy and Physiology in Health and Illness. Edinburgh: Elsevier. pp. 25–26.
17- Tang, Y. Shi, R. Kang et al (2007). Hydrogen peroxide stimulates macrophages and monocytes to actively release HMGB1, Journal of Leukocyte Biology, vol. 81, no. 3, pp. 741–747.

18- Fernández-Zamorano A, Arnalich F, Codoceo R, Vigara MR, Valverde F, Jara P, Vázquez JJ (1988). Hemolytic anemia and susceptibility to hydrogen-peroxide hemolysis in children with vitamin E-deficiency and chronic liver disease. Department of Laboratory and Child Health, La Paz Hospital, Facultad Autónoma de Medicina, Madrid, Spain;19(5-6):317-34.

19- Bedard, K. and Krause, H. (2007). The NOX family of ROS generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology, Physiological Reviews, vol. 87, no. 1, pp. 245–313.

Extraction nucleous from Red Blood Cells of Birds and their influence of Hemolytic

Assistant Lecturer. Athraa Hussein Ali

Biology Department – College of Education-Ibn AL Heithamt
University of Baghdad

Abstract

Studies were conduced to test the Osmatic fragility of human Blood uninfected with any disease by five meyhods, First using Sodium chloride at (0.5%),Second using Sodium chloride with hydrogen peroxide at (6%), third using Sodium chloride with Saponin (0.12%),fourth using Sodium chloride,hydrogen peroxide and RBCs nucleous extracted at (15%), fith method used Sodium chloride, Saponin and RBCs nucleous extracted.
The study show that result of fourth and fifth methods similar with first one.

Key words

Red corpuscles , Hemolysis , Saponin