جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة القادسية
كلية التربية
قسم الكيمياء

تأثير صبغة الكروموسين على انزيمات الكبد في ذكور الجرذان

بحث مقدم من قبل

جمال ناصر حسين

الى مجلس كلية التربية قسم الكيمياء كجزء من متطلبات نيل

شهادة البكالوريوس في الكيمياء

بإشراف

المدرس المساعد . علي نوري فجر المحنة

1438 هـ

2017 م

المقدمة Introduction :

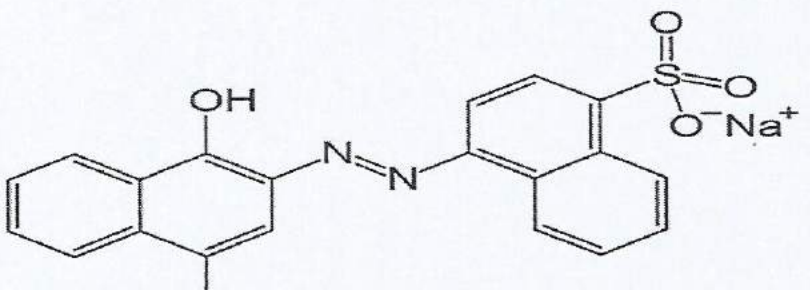
١-١: الأصباغ الغذائية Food Dyes

في السنوات الأخيرة بعد التطور الكبير الحاصل في مجال صناعة الأغذية وتسويقها وتزايد استهلاكها أصبح من الضروري إضافة الكثير من المواد الكيمياوية لها مثل المواد الحافظة والصبغات والنكهات التي تزيد من قيمتها الغذائية ومذاقها فضلاً عن جذب المستهلك إليها كأداة تسويقية [١،٢،٣]. وتعتبر الصبغات الغذائية من المواد المهمة المضافة للأغذية والأدوية إذ تستخدم على نطاقٍ واسع ويوجد منها أكثر من ٢٥٠٠ نوع بمعدل إنتاجية سنوية تبلغ أكثر من ٨ مليون طن[١،٢]. وقد تكون هذه الصبغات إما طبيعية أو صناعية، إذ تعود نسبة ٩٥% من الصبغات المستخدمة خلال السنوات الأخيرة إلى الصبغات الغذائية الصناعية بسبب رخص ثمنها وسهولة إنتاجها [٤].

يتم إضافة الصبغات الغذائية منذ زمن بعيد إلى الكثير من الأغذية الأساسية مثل الأجبان ومنتجات الألبان والأسماك المقلية ومنتجات اللحوم والآيس كريم والعصائر والمربى والحلويات [٥،٦]، الدراسات الحديثة ركزت بشكل واضح على الكثير من الصبغات الغذائية الصناعية والتي ادت الى مُنِعَ إستخدام بعضها بحيث أصبحت مثيرة للجدل بسبب تأثيراتها السامة أو المسرطنة، وهنالك العديد من الأبحاث التي تضمنت دراستها حول الإضطرابات الأيضية والسمية التي تحدث بسبب هذه الصبغات الصناعية على الجرذان وبعض أنواع اللبائن الأخرى[٧،٨،٩]، فضلاً عن ذلك فأن العديد من مركبات الآزو لها تأثيراً ساماً أومسرطناً على الحيوانات المختبرية [10،١١].

١-٢: صبغة الكارمويسين(E122) Carmoisine Dye

الكارمويسين (Carmoisine) من الأصباغ الغذائية الصناعية التي تم إستخدامها لأول مرة في الولايات المتحدة الأمريكية سنة ١٩٣٩[١٢]، تعتبر احد مركبات الازو وهي ذات صيغة جزيئية $C_{20}H_{12}N_2Na_2O_7S_2$ ووزن جزيئي يبلغ ٥٠٢,٤٤ غم/ مول إلى جانب الصيغة التركيبية الواردة في الشكل (١-١) [١٢،١٣].



شكل (١-١): الصيغة التركيبية لصبغة E122[١٢]

تُحضَّر صبغة E122 من قطران الفحم أو من ملح الديزانيوم من خلال إرتباطه بمجموعة(-N=N-) إلى مركبات هيدروكربونية أروماتية شديدة التفاعل لها القابلية العالية على الذوبان في الماء معطيةً اللون الأحمر عند الذوبان مما تؤدي إلى تحسين اللون ووسيلة جذب للمستهلك؛ إذ تستخدم هذه الصبغة في العديد من المجالات منها معاجين الاسنان وبعد تناول الاغذية الحاوية على صبغة لكارمويسين سوف تختزل بواسطة إنزيمات P450 إلى أمينات عطرية[١٤،١٥].

١-٣:التاثيرات الكيموحيوية للصبغات الغذائية

تُعدُ الأصباغ الغذائية واحدة من مركبات الآزو الحاوية على مجموعةالآزو Asoالجسرية(-N=N-) ذات التهجين الثنائي (Sp2)والمرتبطة بالنظام الأروماتي، وتصنف بدورها إلى أحادية وثنائية وثلاثية الآزو، ويوجد اكثر من ٣٠٠٠نوع من صبغات الازو والتي تستخدم بشكل واسع في الاغذية [١٣،١٦،١٧]. تكمن مخاطرالصبغات بعد تناول الاغذية الحاوية عليها حيث يتم اختزالها الى أمينات أروماتية بواسطة إنزيمات الإختزال وذلك بعد إنتقالها من جدار الأمعاء الدقيقة إلى الكبد؛ إذ يتم إختزالها بشكلٍ كامل إلى أمينات أروماتية تتأكسد بوجود إنزيمات الأكسدة مثل P450 إلى مشتقاتN-hydroxy، وهذا التحول الحيوي يحدث في معظم الثديات ومن ضمنها الإنسان[١٠،١٣]، كما أن التأثير المسرطن أو السام للأصباغ الغذائية يكون إما بشكلٍ مباشر أوغير مباشر من خلال التحول الحيوي لمركبات الآزو في عمليات الأيض؛ إذ إنَّ إستعمال هذه الأصباغ من قِبل الإنسان لفترة طويلة يمكن أن يسبب بعض الأمراض له مثل فقر الدم وعسر الهضم والإعتلال العصبي في الدماغ وأمراض الكبد والكلى والطحال ونقص النمو وكذلك أمراض الحساسية والطفح الجلدي والربو فضلاً عن الأمراض السرطانية المختلفة [١٦،١٧]

الكثير من الباحثين درسوا التاثيرات الايضية والسمية لمعظم المضافات الغذائية على الجرذان ولبائن أخرى. حيث إشارة العديد من البحوث ان هذه الصبغات الغذائية لها

تـأثيرات ضـارة علـى DNA فـي خلايـا الكبـد والكليـة ، كمـا تـؤدي الـى انخفـاض وزن الجسـم والكولسـترول عـالي الكثافـة HDL وزيـادة أنزيمـات الكبـد فـي الـدم[١٨،١٩،٢٠]. كمـا أشـارَ كـلاً مـن Al-Horam et al.,(2009) and Cemek et al.,(2014) إلـى إنَّ المضـافات الغذائيـة مثـل صـبغتيّ التتـرازين Tartrazine والحمـراء تـؤدي إلـى إنخفـاض معنـوي فـي وزن الجسـم يـزداد طرديـاً مـع زيـادة الجرعـة [٣،٢١]. كمـا لاحـظَ Bawazir .A 2010 أن صـبغة الشـوكولا البنيـة تـؤدي الـى ضـرر فـي أنسـجة الكبـد والعضـلات والأمعـاء و زيـادة تركيـز الإنـزيمين AST و ALT فـي الـدم[٢٢] . فضـلا عـن ذلـك لاحـظ Gauto etal 2010 و Soltan etal 2012 ان صـبغة التتـرازين Tartrazine لهـا تـاثير واضـح علـى بعـض معـايير الخصـوبة فـي ذكـور الجـرذان البـيض والتـي شـملت انخفـاض واضـح فـي وزن الاعضـاء التناسـلية وانخفـاض عـدد النطـف وقابليتهـا علـى الحركـة كـم قلت لزوجة السائل المنوي(٤،٢٣) .

١-٤: الجذور الحرةFree Radicals

هـي عبـارة عـن ذرة أو جزيئـة أو آيـون يحتـوي علـى إلكتـرون واحـد أو إكثـر منفـرد فـي مـدارهُ الخـارجي، وهـي جزيئـات غيـر مسـتقرة جـداً لـذلك تحتـاج إلـى إلكتـرون لكـي تصـبح مسـتقرة، وتكـون ذات طاقـة عاليـة وشـديدة وهـذا يجعلهـا تتفاعـل بسـرعة عاليـة مـع آلمركبـات المسـتقرة لتكـون شـكل أكثـر إسـتقراراً [٢٤]. تتكـون الجـذور الحـرة بصـورة طبيعيـة فـي الجسـم مـن خـلال الفعاليـات الايضـية للخلايـا خـلال سلسـلة نقـل الالكترونـات فـي المايتوكونـدريا وان زيـادة تراكيـزً الجـذور الحـرة عـن الحـد الطبيعـي وتسـبب نشـوء وتتطـور العديـد مـن الأمـراض مثـل السـرطان، امـراض القلـب والعقـم وامـراض الرئـة فضـلا عـن ارتفـاع ضـغط الـدم وأمـراض الغـدة الدرقيـة [25] ،كمـا أن الجـذور الحـرة لهـا القابليـة علـى أكسـدة آلجزيئـات الحيويـة فـي إغشـية الخلايـا مثـل الحـوامض النوويـة والـدهون والبروتينـات والكربوهيـدراتً وهـذا يسـبب تغيـراً فـي تركيـب الخليـة ممـا يـؤدي إلـى المـوت المبـرمج للخلايـا [٣٢] .مـن جانـب اخـرُ وجـد بعـض البـاحثين ان وجـود الجـذور الحـرة بتراكيـز واطئـة مفيـد للجسـم بالعديـد مـن الاليـات حيـث تعمـل الجـذور الحـرة كمشـرات لتحفيـز العديـدة مـن الانزيمـات مثـل الكـاتليز فضـلا عـن دورهـا فـي الاليـات الدفاعيـة المناعية ضد الجراثيم وتنضيم نمو الخلايا[٢٦،٢٧].

١-٤-١: مصادر الجذور الحرة Sources of Free Radicals

١-٤-١-١: مصادر خارجية Exogenous Sources: وتشمل الغذاء ،التدخين ، الملوثات البيئة ،التناول المفرط للأدوية والتعرض للإشعاعات [٢٨،٢٩].

١-٤-١-٢: مصادر داخلية Exogenous Sources: وتشمل المايتوكوندريا Mitochondria والخلايا الإلتهامية Phagocytes والبيروكسيسومات Peroxisomes وتفاعلات الخلايا الداخلية المتضمنة إنزيم Xanthine oxidase وأكسدة الدهون الفوسفاتية (مسار حامض الآرشيدونك) وأفقار العظلة القلبية وإعادة تزويدها بالدم و تفاعلات الخلايا المتضمن إنتقال العناصر (Cu^{+1} و Fe^{+2}) والعمليات الإلتهابية Inflammatory process[٣٠].

١-٤-٢: أنواع الجذور الحرة Type of Free Radicals

وتُقسَّم إلى نوعين:

أولاً: أصناف الأوكسجين الفعالة Reactive Oxygen Species (ROS)

وهي جزيئات عضوية أو لاعضوية يكون فيها الأوكسجين حاوياً على ألكترون منفرد، ومن سوبر اوكسيد $O_2^{\cdot -}$ وجذريّ الهيدروكسيل $OH^{\cdot}$ والكوكسيل $ROO^{\cdot}$ [٣٠].

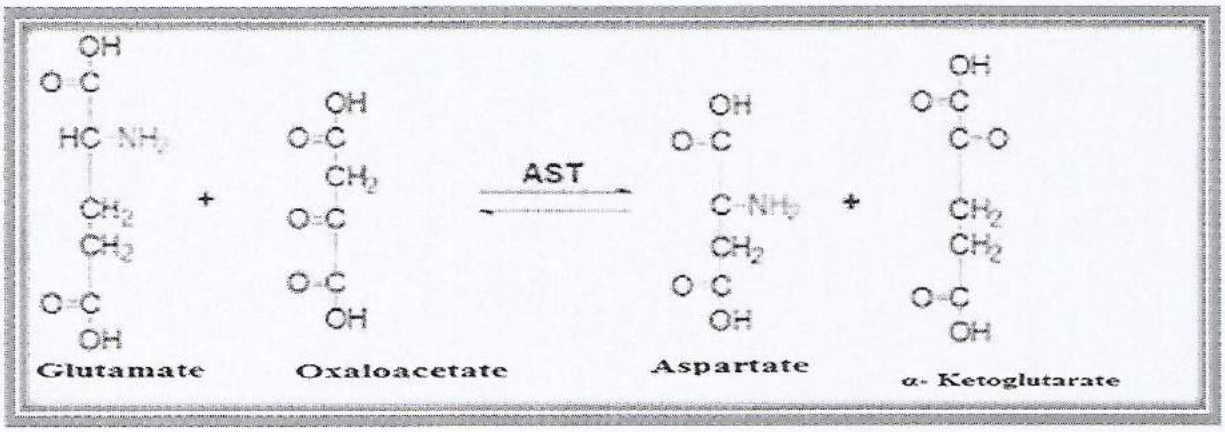
ثانياً: أصناف النتروجين الفعالة Reactive Nitrogen Species (RNS)

١-٥: التغيرات الحيوية في وظائف الكبد Biological Changes in Liver Functions

يعتبر الكبد عضوي حيوي مهم له دور رئيسي في العمليات الايضية للكاربوهيدرات والبروتينات وفي تصنيع بروتينات البلازما وإنتاج بعض الإنزيمات المختلفة وإزالة سمية العقاقير ومركز لتايض السموم والمركبات الضار الناتجة من العلميات الايضية،لذلك سوف يكون عرضه لكثير من الامراض وان اي تغير في وظيفة لكبد سوف يسبب الكثير من المشاكل للجسم . ولقد استعمل الباحثين قياس أنزيمات الناقلة للاميين ALTوAST ونشاط أنزيم ALP القاعدي ومعاير اخرى مثل البروتينات الدهنية Lipoproteins الكوليسترول كدليل لمعرفة التغيرات المرضية التي تحدث في الكبد[٣١].

١-٥-١: الأسبارتيت الناقل لمجموعة الأمين Aspartate amino transferase (AST)

وهو من الانزيمات الناقلة، ويُعرف أيضاً بأسم Glutamate oxaloacetate transferase (GOT)؛ إذ يعمل على تحفيز نقل مجموعة الأمين من الكلوتاميتGlutamate إلى الأوكزالواستيتOxaloacetate، وكما هو موضح في الشكل (١-١٠) [٣٢].

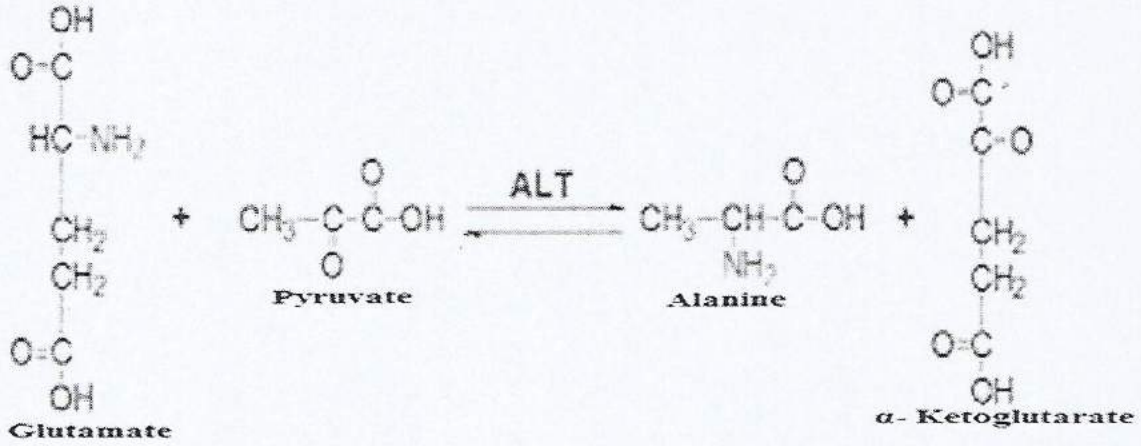


شكل (١-١٠): التفاعل المحفز بواسطةإنزيمAST[٣٢]

ويوجد ASTفي جميع الخلايا في السايتوبلازموالمايتوكوندريا، كما يوجد في الكبد والقلب والعضلات الهيكلية بتراكيز أعلى مما هي عليه في مصل الدم، وأن أي ضرر يصيب هذه الأعضاء يؤدي إلى زيادة مستوى الإنزيم في الدم [٣٣]، فضلاً عن ذلك فأن مستوى فعاليةAST يزداد في حال حدوث ضرر أو موت للخلايا الكبدية، وهو بذلك يعد دالة جيدة على أمراض الكبد المزمنة؛ إذ إنَّ الخلل في مستواه يدل على وجود تكسر في البروتين في الجسم ووجود خلايا مهدمة [٣٤].

١-٥-٢: الألانين الناقل لمجموعة الأمين Alanine amino transferase (ALT)

يصنف هذا الإنزيم ضمن الإنزيمات الناقلة، ويعرف أيضاً بأسم Glutamate pyruvate transferase (GPT)، ويساعد هذا الإنزيم على تكوين حامض الكلوتامكGlutamic acid



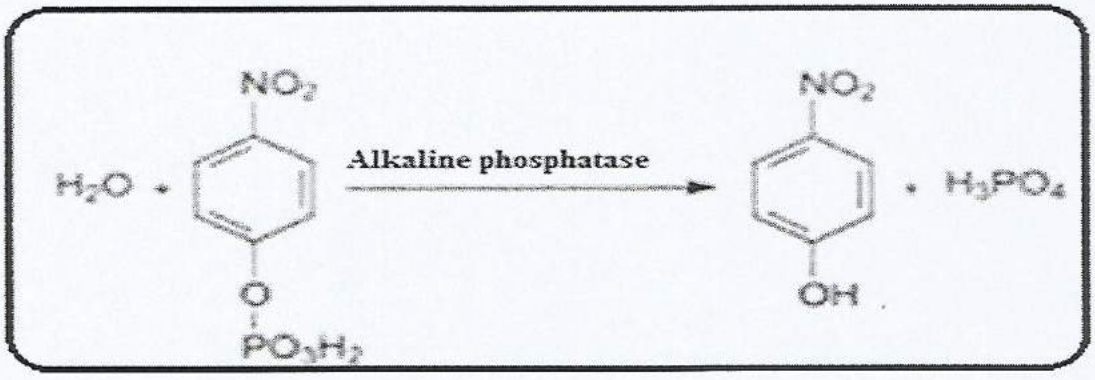
من α-Ketoglutarate من خلال نقل مجموعة الأمين منGlutamate، وكما في الشكل (١-١١) [٣٥].

شكل (١-١١): التفاعل المحفز بواسطة إنزيم ALT[٨٠]

ويوجد هذا الإنزيم في السايتوبلازموالمايتوكوندريا لجميع الخلايا، وتزداد فعاليته في المصل عند حصول تلف للكبد وتحطيم شديد للبروتين في العضلات، إلى جانب ذلك فإنه يكون بمستوى أعلى في الكبد في الحالة الطبيعية بينما يرتفع مستواه في مصل الدم في حالة أمراض الكبد [36]. وهو بذلك يعد من الإنزيمات التشخيصية الذي يمكن من خلالها تشخيص العديد من الأمراض [35].

١-٩-٣: إنزيم الفوسفاتيز القاعدي Alkaline phosphatase (ALP)

يُصنَّف ضمن الإنزيمات المميّئةHydrolyase ويعمل على تحفيز التحلل وإزالة مجموعة الفوسفات من بعض أنواع الجزيئات ومنها النيوكليوتيدات والبروتينات والقلويدات[٣٥] وكما فيالمعادلةالشكل (١-١٢).



شكل (١-١٢): التفاعلالمحفزبواسطةإنزيمALP[٣٦]

يوجد إنزيم ALP بتراكيز عالية في جدران الأمعاء والقناة الصفراوية الكبدية Hepatobiliarytractوالمشيمةوالخلاياالمكونة للعظمOsteoblasts of bone، ويختلف الوزن الجزيئي لهُ بحسب مصدر النسيج الذي يتواجد فيه إذ يتراوح بين (٧٠٠٠٠ – ١٢٠٠٠٠) دالتون [٣٧] بينما يزداد تركيزه في حال حصول مرض [٣٧].

الهدف من البحث

١- معرفة تأثير الاصباغ الغذائية منها E122 على انزيمات وظائف الكبد

٢- معرفة علاقة بين اضطراب في عمليات الكبد واستخدام المضافات الغذائية

2-المواد وطرائق العمل Materials and Methods

1.2-الأجهزة والمواد المستخدمة :

1.1.2- الأجهزة :

تم استعمال الاجهزة المدرجة في الجدول (1-2) في اجراء التجارب الخاصة بالدراسة الحالية :

جدول (1-2): الأجهزة

ت	الأجهزة والأدوات	الشركة المصنعة ومنشأها
١	Incubator	LapTech,Korea
٢	Centrifuge	Kubota, Japan
٣	Water bath	K-GEMMYCO - Norway
٨	Micropipette	Kanal pipette/ Hirschman (Germany)
١٠	Spectrophotometer	Genesys,USA

2.1.2-المواد الكيميائية: تم استعمال المواد ذات المناشئ العالمية والنقاوة العالية وكما موضحة في الجدول (2-2).

الجدول (2-2) : المواد الكيميائية

ت	اسم المادة	الشركة المصنعة والمنشأ
1	Tartrazine (E102)	Ajanata Chemical Industries(India)
٣٤	ALT kit	Spineract – Spain
٣٧	AST kit	Biosystems – Spain
	ALP Kit	Biosystems – Spain

٢- ٣**تصميم التجربة** حيوانات التجربة Experimental animals : أُجريت هذه الدراسة في البيت الحيواني التابع لقسم علوم الحياة/ كلية التربية / جامعة القادسية استُخدمت في هذه الدراسة ١٢ حيوان ناضجا جنسيا وبعمر ثمانية أسابيع وكانت أوزانها بين (٢٣٠-٢٣٥) غرام التي تم شراؤها من البيت الحيواني التابع لكلية الطب البيطري /جامعة القادسية وضعت الحيوانات في أقفاص بلاستيكية أبعادها ٥٠ × ٣٥ × ١٥سم وبمعدل ستة حيوانات للقفص الواحد في غرفة مساحتها٣ × ٤ م . عرضت الحيوانات جميعها لنفس الظروف من درجة الحرارة ٢٠-٢٥مْ ، نظمت بواسطة مكيف الهواء . أما معدل الإضاءة فكانت ١٢ ساعة ضوء و١٢ ساعة ظلام وأعطيت الحيوانات العليقة المركزة والماء بصورة حرة ثم وزعت بصورة عشوائية وتركت لمدة أسبوعين للتأقلم وبعدها وزنت الحيوانات لتحديد الجرعة من الصبغة قيد الدراسة وكانت الجرعة المستخدمة *175*ملغم/ كغم .

٢-٤ طرائق العمل

٢-٤-١تقدير فعالية انزيم اسبارتيت امينوترانسفريز فى مصل الدم

Estmiation of serum Aspartate Aminotranaseferase Activity

أ- مبدأ الطريقة :

تم الاعتماد على الطريقة اللونية لتقدير فعالية انزيم AST في مصل الدم وحسب المعادلة الاتية :

$$\alpha\text{-Oxoglutarate} + \text{L-Aspartate} \xrightarrow{\text{AST}} \text{Oxaloacetate} + \text{L-Glutamate}$$

اذ تتفاعل الاوكزالات مع 2-4-Dinitropheny hydrazine لتكون مشتق الاوكزالات الملون الذي له اعلى امتصاصية عند الطول الموجي 546 نانوميتر[٣٨] .

ب-طريقة العمل:

تم اعتماد الخطوات الاتية لتقديرفعالية AST في مصل الدم:

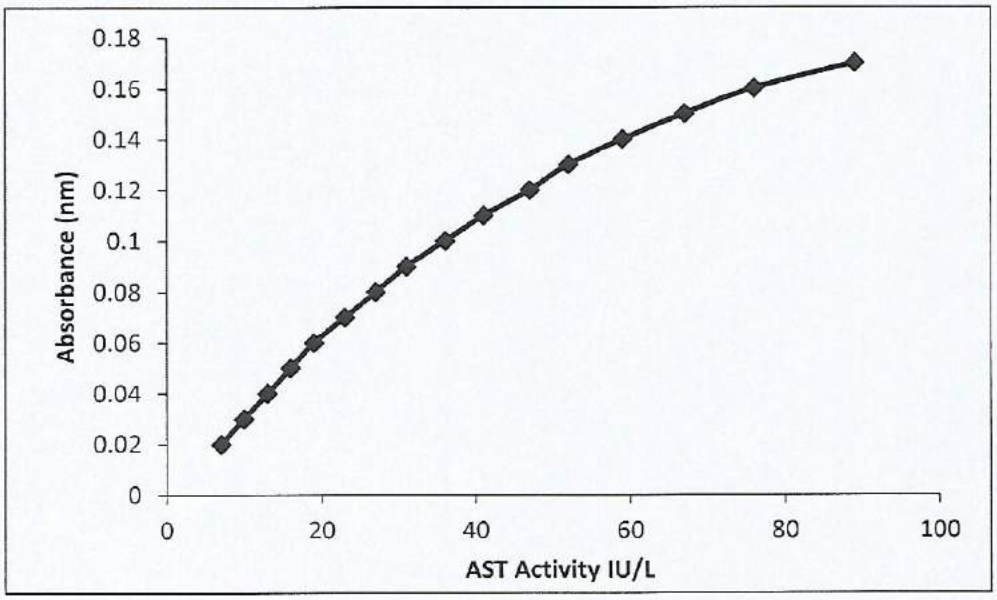
Blank	Sample	Reagent
-	0.1 مل	مصل الدم
0.5 مل	0.5 مل	(R1)محلول الفوسفات المنظم
0.1 مل	-	ماء مقطر
مزج وحضن لمدة 30 دقيقة عند 37 °م		
0.5 مل	0.5 مل	محلول 2-4 داي نايتروفينول

(R2)هايدرازين		
مزج وترك لمدة 20 دقيقة عند 25 °م		
(R3)هيدروكسيد الصوديوم	5 مل	5 مل

مزجت الانابيب جيدا ثم تم قراءة الامتصاصية لانبوب العينة بعد 5 دقائق عند الطول الموجي 546 نانوميتر بواسطة جهاز المطياف الضوئي بعد تصفيره بالكفئ

د-الحسابات :

تم حساب فعالية الانزيم بالاعتماد على المنحني الموضح في الشكل (٢-١) :



شكل (9-2): المنحني القياسي لانزيم AST

2.4.2- قياس فعالية الاننين امينوترانسفريز في مصل الدم

Estimation of serum Activity Alanine Aminotransferase

أ- مبدأ الطريقة :

تم الاعتماد على الطريقة اللونية لتقدير فعالية انزيم ALT في مصل الدم وحسب المعادلة الاتية:

$$\text{L-Alanine} + \alpha\text{- Oxaglutarate} \xrightarrow{\text{ALT}} \text{Pyruvate} + \text{L-Glutamate}$$

اذ يتفاعل البايروفيت مع 2-4-Dinitropheny hydrazine لتكون مشتق البايروفيت الملون الذي له اعلى امتصاصية عند الطول الموجي 546نانوميتر .[٣٨]

ب- طريقة العمل:

تم اعتماد الخطوات الاتية لتقدير ALT في مصل الدم: