تأثير الخلاصة الكحولية للحلبة والحبة السوداء في قيم الكوليسترول والشحوم الثلاثية عند الأرانب السليمة والمصابة بالاضطراب الوظيفي المستحدث تجريبياً للكبد

د. بلال سفاف* أ .د. أسعد العبد**

(الإيداع: 17 تشرين الثاني 2022، القبول: 10 نيسان 2022)

الملخص:

أُجري هذا البحث على (60) من ذكور الأرانب بعمر (6) أشهر وهدفت إلى دراسة تأثير كل من الخلاصة الكحولية لبذور الحلبة والحبة السوداء على مستوى تركيز الكوليسترول والشحوم الثلاثية عند الأرانب المحدث عندها اضطراب وظيفي في نشاط الكبد بوساطة رابع كلوريد الكربون. قُسِّمت أرانب التجربة إلى عشر مجموعات ، حيث ضمت المجموعة الأولى (G1)(6 أرانب) واعتبرت كمجموعة شاهد قُدِّم لها الماء والغذاء فقط ، المجموعة الثانية (G2) (6 أرانب) جُرِّعت بالخلاصة الكحولية للحلبة بمقدار (500) ملغ / كغ ، المجموعة الثالثة (G3) (6 أرانب) جُرِّعت بالخلاصة الكحولية للحلبة بمقدار (1000) ملغ / كغ ، المجموعة الرابعة (G4) (6 أرانب) جُرِّعت بالخلاصة الكحولية للحبة السوداء بمقدار (200) ملغ/كغ ، المجموعة الخامسة(G5) (6 أرانب) جُرِّعت بالخلاصة الكحولية للحبة السوداء بمقدار (300) ملغ/كغ، المجموعة السادسة(G6) (6) أرانب تم تجريع كل منها(1) مل/كغ وزن حي من رابع كلوريد الكربون المخلوط مع (1) مل زيت البرافين مرتين أسبوعياً ولمدة أربع أسابيع، المجموعة السابعة (G7) (6)أرانب استحدثت و إصابتها تجريبياً بالاضطراب الوظيفي للكبد بوساطة رابع كلوريد الكربون، حيث جُرِّعت بالخلاصة الكحولية للحلبة بمقدار (500) ملغ/كغ ،المجموعة الثامنة(G8) على(6)أرانب استحدثت و إصابتها تجريبياً بالاضطراب الوظيفي للكبد بوساطة رابع كلوريد الكربون جُرِّعت بالخلاصة الكحولية للحلبة بمقدار (1000) ملغ/كغ ، المجموعة التاسعة (G9) (6) أرانب استحدثت و إصابتها تجريبياً بالاضطراب الوظيفي للكبد بوساطة رابع كلوريد الكربون جُرِّعت بالخلاصة الكحولية للحبة السوداء بمقدار (200) ملغ/كغ ، المجموعة العاشرة (G10) (6) أرانب استحدثت و إصابتها تجريبياً بالاضطراب الوظيفي للكبد بوساطة رابع كلوريد الكربون جُرِّعت بالخلاصة الكحولية للحبة السوداء بمقدار (300) ملغ/كغ. أظهرت نتائج الدراسة أن تجريع الأرانب الطبيعية (السليمة) سواء بالخلاصة الكحولية لبذور الحلبة أو بالخلاصة الكحولية لبذور الحبة السوداء أدت الى حدوث انخفاض معنوي $P\leq0.05$ في قيم الكوليسترول والشحوم الثلاثية لدى هذه الأرانب. كما أن تجريع الأرانب المصابة بالاضطراب الوظيفي للكبد بالخلاصة الكحولية لبذور الحلبة أو بالخلاصة الكحولية لبذور الحبة السوداء أدت أيضاً الى انخفاض معنوي $P\leq0.05$ في قيم الكوليسترول والشحوم الثلاثية عند الأرانب المصابة بالخلل الوظيفي للكبد مقارنة مع أرانب المجموعة السادسة المصابة بالخلل الوظيفي للكبد وغير المجرعة بالخلاصات الكحولية للحلبة أو للحبة السوداء.

الكلمات المفتاحية: بذور الحلبة – بذور الحبة السوداء – رابع كلوريد الكربون–الكوليسترول –الشحوم الثلاثية

*طالب دراسات عليا – جامعة حماه– كلية الطب البيطري.

** اختصاص فيزيولوجيا – جامعة حماه – كلية الطب البيطري.

The impact of alcoholic extract of Fenugreek and Nigella stiva on cholesterol and triglyceride values in healthy rabbits and with experimentally induced functional disorder of the liver

Dr: Bilal Saffaf* **** Prof. Dr. Assad Alabed**

(Received: 17 November 2022, Accepted: 10 April 2022)

Abstract:

This research was conducted on(60) male rabbits at the age(6) months. The target of the research was to study the effect each of the alcohol extraction of fenugreek seeds and nigella stiva seeds on the level of cholesterol and triglycerides in rabbits that have dysfunction in liver activity. mediated by 4th Carbon Chloride. The population study were divided into(10) groups, the first group was coded as G1 (included 6 rabbits), and considered as control group, It had been provided with water and food only, the second group was included 6 rabbits and coded as G2 that was taken alcohol extraction of fenugreek with dose 500 mg /kg while G3 group was included 6 rabbits and taken alcohol extraction of fenugreek with dose 1000 mg/kg. The fourth group was coded as G4 and involved 6 rabbits that were taken alcohol extraction of Nigella Stiva with dose 200 mg./kg. The fifth group was coded as G5 and involved 6 rabbits that were taken alcohol extraction of Nigella Stiva with dose 300 mg./kg. The sixth group was coded as G6 and involved 6 rabbits that were taken dose as 1 ml/kg of live weight of 4^{th} mix with oil pr Carbon Chloride twice weekly for 4 weeks. The seventh group was coded as G7 and involved 6 rabbits that were effected with disordered functional liver using 4th Carbon Chloride and taken alcohol extraction of fenugreek with dose 500 mg /kg. The eighth group was coded as G8 and involved 6 rabbits that were effected with disordered functional liver using 4th Carbon Chloride and taken alcohol extraction of fenugreek with dose 1000 mg /kg. The ninth group was coded as G9 and involved 6 rabbits that were effected with disordered functional liver using 4th Carbon Chloride 1m\kg and taken alcohol extraction of Nigella Stiva with dose 200 mg./kg. The tenth group was coded as G10 and involved 6 rabbits that were effected with disordered functional liver using 4th Carbon Chloride and taken alcohol extraction of Nigella Stiva with dose 300 mg./kg. Results showed that dealing of rabbits with both extractions given significant decrease in healthy rabbits weights ($P \leq 0.05$). As long as dealing with effected rabbits in functional disordered liver in both extractions leaded to significant decrease in effected rabbits via functional disordered liver compare to fourth effected group which none dealing with extractions.

Key words: fenugreek seeds nigella stiva seeds -4th Carbon Chloride – cholesterol Triglycerid

* Postgraduate student, (MSc) – Hama University - Faculty of Vet. Med..

** Professor in physiology , Head of physiology department at Fact. Vet., Med. Hama University, Hama

1-المقدمة:Introduction

توجهت الدراسات والأبحاث العلمية بشكل كبير نحو النباتات الطبية ، بسبب وفرتها وقلة كلفتها الإقتصادية وفعاليتها الدوائية وقلة الآثار الجانبية المرضية لها (Cowan.,1999).

وتعد كل من الحلبة والحبة السوداء من النباتات الطبية الهامة والتي استخدمت في علاج كثير من الأمراض منذ العصور القديمة وكانت جزء من الموروث الشعبي الديني و الثقافي واستنادهم في ذلك على تقاليد دينية وثقافية ، كما أن مخاطر الآثار السلبية الناجمة عن تناول الأدوية الكيميائية دفع الانسان للتداوي بالأعشاب (Huxtable.,1992).

هذا وتعد الحلبة من النباتات الرعوية التي تنتشر في مناطق متعددة من سوريا والعراق ومصر ،وتتركز أهميتها الطبية في البذور والأوراق(Townsend and Guest .,1980 , Usher.1984)

تحتوي بذور الحلبة على حوالي(45 – 60 %) كربوهيدرات و على شكل مادة صمغية تتواجد بشكل ألياف مخاطية نسبتها 50% (GRanick et al.,1996) تتكون بصورة رئيسية من الكالاكتومانان (GxlacToMannan) المتميز بتركيبه، والذي له القابلية على حمل الماء وتعزى إليه بعض خواص الحلبة الطبية ، فهو يمنع امتصاص الكوليسترول في الأمعاء مما يؤدي الى إنخفاض تركيزه في مصل الدم (Madar –and– Strak.,2002).

تستخدم بذور الحلبة في علاج بعض المشاكل المرضية كداء السكري، وارتفاع الكوليسترول، والإلتهابات ومشاكل الجهاز الهضمي وكمضاد للسرطان (Raju et al .,2004) .

تحتوي خلاصات الحلبة على مركبات ستيرويدية صابونية ، تزيد من استهلاك الغذاء وتقلل من مستوى الكوليسترول عند الجرذان (Petit et al .,1995) .

استخدمت بذور الحلبة وأوراقها في العديد من المنتجات العشبية الطبية التي تم استخدامها في التجارب العلمية ، فلقد إنخفض تركيز كل من الكوليسترول والشحوم الثلاثية عند الجرذان المصابة بداء السكري المحدث بالستربتوزتوسين نتيجة تغذيتها على أوراق الحلبة يومياً ولمدة (45) يوم (Annida et al.,2004).

وجد الباحث (الحمداني، 2002) أن تغذية الأرانب على بذور الحلبة أدى إلى إنخفاض معنوي في مستوى تركيز الكوليسترول، وإرتفاع معنوي في مستوى تركيز البروتينات الشحمية عالية الكثافة (HDL) بينما حدث عندها انخفاض معنوي بمستوى البروتينات الشحمية منخفضة الكثافة (LDL) في المصل .

كما لاحظ الباحث (Hannan et al.,2003) أن إعطاء الجرذان الألياف الغذائية القابلة للذوبان لبذور الحلبة أدى إلى انخفاض الغليسريدات الثلاثية و الكوليسترول والبروتينات الشحمية منخفضة الكثافة (LDL) بشكل ملحوظ في المصل . في حين ارتفع تركيز البروتينات الشحمية عالية الكثافة (HDL) وعليه تم الإستنتاج بأن الألياف الغذائية القابلة للذوبان لبذور الحلبة لها دور في إنقاص الدهون عند الجرذان المصابة بداء السكري من النوع الثاني .

وفي دراسة أجريت من قبل الباحث (Bordia et al.,1997) وآخرون لدراسة تأثير تناول بذور الحلبة على سكر الدم والكوليسترول والشحوم الثلاثية عند الإنسان، وقد دلت نتائج هذه الدراسة الى حدوث انخفاض معنوي في مستوى تركيز كل من الكوليسترول والغليسريدات الثلاثية في المصل.

درس الباحثان (issarani and Nagori .,2006) تأثير إعطاء المستخلص الميثانولي لبذور الحلبة على مستوى الغليسريدات الثلاثية ومستوى (HDL) و (LDL) عند الأرانب ،فلاحظا زيادة معنوية في نسبة (HDL) وانخفاض معنوي في نسبة الغليسريدات الثلاثية ونسبة (LDL) عند هذه الأرانب .

تعد الحبة السوداء أو ما يعرف بحبة البركة ،أحد أكثر أنواع النباتات الطبية شيوعاً وأكثرها دراسةً في المجال العلمي .حيث تمتاز بتنوع تركيبها الكيميائي واحتوائها على العديد من العناصر الغذائية الأساسية ،فهي تحتوي على بعض الأحماض الدهنية كحمض اللينوليك ، وحمض الأوليك ، وحمض البالمتيك (Muhammed Ali ,et al .,2003)

وهذه الحموض مفيدة لصحة الإنسان حيث تعمل على تخفيض مستوى تركيز الكوليسترول في الدم .

(Talha et al .,2010)

كما تحتوي الحبة السوداء على نسبة عالية من البروتينات والكربوهيدرات ومن مواد صابونية وبعض المواد المضادة للأكسدة والكوليسترول وأنزيمات هاضمة للدهون مثلاً الليباز(Arice et al .2005)

في دراسة أجريت أدى اعطاء الفئران الخلاصة الميثانولية لبذور الحبة السوداء لمدة (12) أسبوعاً قد خفض تركيز الكوليسترول والشحوم الثلاثية و الغلوكوز في المصل (Ali et al ., 2003).

درس الباحثان (Northern and King,2011) تأثير التطبيق المديد لزيت الحبة السوداء على بعض المعايير الفيزيولوجية عند الجرذان الطبيعية والمصابة بداء السكري حيث أدى ذلك إلى انخفاض معنوي في مستوى الغلوكوز والكوليسترول الكلي والشحوم الثلاثية ، وانخفاض معنوي في نشاط (ALT , AST) وزيادة معنوية في مستوى (HDL) مقارنة مع الجرذان المصابة بداء السكري وغير المعالجة .

كما درس الباحثون (Meral et al.2001) تأثير اعطاء زيت الحبة السوداء لدى الأرانب المصابة بالخلل الوظيفي للكبد على بعض المعايير الدموية و تبين من خلال الدراسة حدوث زيادة معنوية $P\leq0.05$ في نسبة سكر الدم والكوليسترول الكلي في مصل الدم ولاسيما عند أرانب المجموعة المصابة بالخلل الوظيفي للكبد مقارنة مع مجموعة الشاهد . في حين كان هناك انخفاض معنوي في نسبة سكر الدم والكوليسترول الكلي في مصل الدم عند أرانب المجموعة المصابة بالخلل الوظيفي للكبد و المجرعة بزيت الحبة السوداء مقارنة مع أرانب المجموعة المصابة بالخلل الوظيفي للكبد والغير المجرعة بزيت الحبة السوداء .

درس الباحث (Zaoui) وزملاؤه عام (2001) تأثير إعطاء بذور الحبة السوداء عن طريق الفم بجرعة (10) ملغ / كغ من الوزن الحي ولمدة(12) أسبوع على نشاط أنزيمات الكبد عند الجرذان ، وأشاروا إلى عدم حدوث أي تأثير معنوي لبذور هذه الحبة على نشاط هذه الأنزيمات . في حين لاحظ إنخفاض معنوي في مستوى تركيز الكوليسترول الكلي والغليسريدات الثلاثية في الدم عند هذه الجرذان.

2-المواد وطرائق العمل Materials and Methods :

تحضير الحظائر:

تم اجراء التجربة في حظيرة وحدة أبحاث كلية الطب البيطري جامعة حماة حيث تم تطهير الحظيرة بمحلول الفورمالين بمعدل 5 ليتر/200 ليتر من الماء قبل البدء بوضع أرانب التجربة في الحظيرة . ثم تطبيق اجراءات المعايير الصحية وذلك بوضع المطهر الخاص(محلول يود 1/1000 مل ماء)على مدخل الحظيرة إضافة إلى التنظيف والتطهير اليومي .

مجاميع الدراسة The Study Groups :

استخدم (60) أرنب ذكراً بعمر أكثر من (6) أشهر وبوزن يتراوح مابين (1000-1200)غ ، تم الحصول عليهم من الأسواق المحلية، وضعت الأرانب في حظيرة وحدة أبحاث الطب البيطري و المزودة بالمعالف والمشارب وتم ضبط درجة حرارة على (22) درجة مئوية ، كما تمت تغذية الأرانب على علف دواجن يحتوي على(3150) كيلو كالوري \كغ وبروتين خام بنسبة(21%) يتكون العلف من(كسبة فول الصويا، وذرة وزيت الصويا وفوسفات ثنائي الكالسيوم بالإضافة الى

الفيتامينات وبعض الأملاح) هذا وقد تركت الأرانب لمدة (10) أيام من أجل التأقلم مع ظروف التربية ولاستبعاد المريض منها **وقسمت بعد ذلك الى عشر مجموعات على الشكل التالي:**

1- المجموعة الأولى :

مجموعة الشاهد وضمت (6) أرانب تم تجريعها الماء المقطر(ورمزت بالرمز G1).

2- المجموعة الثانية:

ضمت (6) أرانب جرعت الخلاصة الكحولية للحلبة بمقدار (500) ملغ/ كغ وزن حي(ورمزت بالرمز G2)

3- المجموعة الثالثة:

ضمت (6) أرانب جرعت الخلاصة الكحولية للحلبة بمقدار(1000) ملغ /كغ وزن حي(ورمزت بالرمز G3).

4- المجموعة الرابعة:

ضمت (6) أرانب جرعت الخلاصة الكحولية للحبة السوداء بمقدار (200) ملغ/ كغ وزن حي(ورمزت بالرمز G4)

5- المجموعة الخامسة:

ضمت (6) أرانب جرعت الخلاصة الكحولية للحبة السوداء بمقدار(300) ملغ /كغ وزن حي(ورمزت بالرمز G5)

6- المجموعة السادسة:

ضمت (6) أرانب تم تجريع كل منها برابع كلور الفحم بمعدل(1) مل/كغ وزن حي مرتين أسبوعياً و لمدة (4) أسابيع و لم تعط أي خلاصة كحولية (ورمزت بالرمز G6).

7- المجموعة السابعة :

ضمت (6) أرانب مصابة بالخلل الوظيفي للكبد بواسطة (1) مل/كغ وزن حي رابع كلور الفحم ،وجرعت الخلاصة الكحولية للحلبة بمقدار (500) ملغ/ كغ وزن حي (ورمزت بالرمز G7)

8- المجموعة الثامنة :

ضمت (6) أرانب مصابة بالخلل الوظيفي للكبد بواسطة رابع كلور الفحم ، وجرعت الخلاصة الكحولية للحلبة بمقدار (1000) ملغ /كغ وزن حي(ورمزت بالرمز G8)

9- المجموعة التاسعة :

ضمت (6) أرانب مصابة بالخلل الوظيفي للكبد بواسطة رابع كلور الفحم ، وجرعت الخلاصة الكحولية للحبة السوداء بمقدار (200) ملغ/ كغ وزن حي ورمزت (ورمزت بالرمز G9)

10- المجموعة العاشرة :

ضمت (6) أرانب مصابة بالخلل الوظيفي للكبد بواسطة رابع كلور الفحم ، وجرعت الخلاصة الكحولية للحبة السوداء بمقدار(300) ملغ /كغ وزن حي(ورمزت بالرمز G10)

طريقة احداث الاضطراب الوظيفي للكبد تجريباً :

لإحداث التسمم للكبد عند الأرانب تجريباً بوساطة رابع كلور الفحم (ccl4) تم مزج رابع كلور الفحم مع زيت البرافين بنسبة (1:1)

وتم اعطاء كل أرنب (1) مل من هذا المزيج/كغ وزن حي عن طريق الفم بمعدل مرتين بالأسبوع ولمدة أربعة أسابيع.

تحضير الخلاصة الكحولية للحلبة :

تم تحضير الخلاصة الكحولية لبذور الحلبة حسب طريقة (Natarajan and Dhananjayan 2007)

على الشكل التالي:

1- نظفت بذور الحلبة من الشوائب وذلك بتنقيتها يدوياً.
2- بعد ذلك تم غسلها بالماء المقطر سريعاً للتخلص من الشوائب والأتربة العالقة.
3- ثم نقع (100)غ من مسحوق بذور الحلبة النظيفة في (300) مل من الكحول الميثيلي في بيشر زجاجي تم تغطيته بورق القصدير وحفظ المنقوع لمدة أسبوع بالثلاجة مع مراعاة التحريك المستمر له .
4- تمت تصفية المنقوع بوساطة مصفات خاصة. ثم تم ترشيح المنقوع باستخدام ورق ترشيح نوع (whatman).
5- بعد ذلك تم تثفيل الراشح بوساطة جهاز الطرد المركزي بمثفلة بسرعة(3500) دورة /الدقيقة ولمدة (5) دقائق.
6- تم تبخير الراشح باستعمال جهاز المبخر الدوراني بدرجة حرارة (40) م° لحين الحصول على سائل كثيف.
7- تم تجفيف السائل الكثيف باستعمال الحمام المائي بدرجة (37) م° لمدة (48) ساعة للحصول على الخلاصة شبه الصلبة والتي كانت بوزن 4500 ملغ/100 غ من بذور الحلبة ثم حفظت الخلاصة بالثلاجة على درجة حرارة (4) م° لحين الاستخدام .

تحضير الخلاصة الكحولية لبذور الحبة السوداء :

من أجل تحضير الخلاصة الكحولية لبذور الحبة السوداء اعتمدت الطريقة الموصوفة من قبل (Deshmuk and Borle ,.1975) حيث تم نقع (100) غ من مسحوق بذور الحبة السوداء في (300) مل من الكحول الميثانولي في بيشر زجاجي تم تغطيته بورق القصدير ، وحفظ المنقوع لمدة أسبوع في الثلاجة مع مراعات التحريك المستمر له.

تم ترشيح هذا المنقوع باستعمال ورق الترشيح، ثم عُرِّض الراشح للتثفيل بقوة (3500) دورة /الدقيقة لمدة (5) دقائق، بعد ذلك تم تبخير الرشح باستعمال جهاز المبخر الدوراني بدرجة حرارة (40) م° لحين الحصول على سائل كثيف ،ثم جفف السائل الكثيف باستعمال الحمام المائي بدرجة حرارة (37) م° لمدة (48) ساعة بهدف الحصول على الخلاصة المركزة شبه الصلبة ،والتي كانت بوزن 6000 ملغ/100 ملغ بذور الحبة السوداء، والتي تحتوي المواد الفعالة . وضعت هذه الخلاصة في الثلاجة بدرجة حرارة (4) م° لحين الاستخدام .

جمع عينات الدم:

تم أخذ عينات دموية من الوريد الأذني ومن الوريد الفخذي لأرانب التجربة بوساطة محاقن سعة (5) مل ، وقد تم أخذ هذه العينات الدموية في بداية التجربة ثم كل (20) يوم ولمدة شهرين .

وتم تفريغ عينات الدم المسحوبة في أنانيب اختبار لا تحتوي على مانع تخثر، ثم تركت الأنابيب لمدة (5) دقائق بشكل مائل قبل وضعها في المثفلة وتثفيلها بسرعة (3500)دورة /بالدقيقة لمدة(15) دقيقة، للحصول على المصل ومن ثم سحب المصل بوساطة ميكروبيت(Micropipette) و تم توزيعه في أنابيب ابندروف سعة (1.5) مل سجلت عليها البيانات المطلوبة (رقم العينة، رمز المجموعة، تاريخ أخذ العينة ،وتم حفظ هذه الأنانيب بدرجة حرارة (20-) م° في المجمدة لحين اجراء اختبارات معايرة الكولستيرول والشحوم الثلاثية في مصل الدم

الاختبارات البيوكيميائية :

1- معايرة الكوليسترول في مصل الدم : Determination of serum cholesterol level

تمت معايرة الكوليسترول في مصل الدم وفقا لطريقة (Trender.1970)

باستخدام مجموعة اختبار جاهزة (Kit) ذي الرمز (cat.No.12841) والمصنفة من قبل شركة (Medichem) وهي طريقة إنزيمية يتم فيها تحويل الكوليسترول وأسترات الكوليسترول إلى صبغة وردية اللون وفق المعادلة التالية :

$$\text{Cholesterol esters} + 3H_2O \xrightarrow{\text{cholesterolesferase}} \text{Cholesterol} + R\text{-CooH}$$

$$\text{Cholesterol} + O_2 \xrightarrow{\text{cholesterol Oxidase}} 4\text{-Cholestenone} + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + 4\text{-aminophenozone} + \text{pherol} \xrightarrow{\text{Peroxides}} 4H_2O + \text{Dye}$$

Dye=4(p–benzoquinone – Monoimino)– phenazone

وتمت قراءة العينات عند طول موجة قدرها (505 NM) باستخدام جهاز أطياف الضوئي Model UV– 9200 Spectrophotometer Spectronic instrument وحسب تركيز الكوليسترول وفق المعادلة التالية :

$$\text{choelestrol concentration (mg/dl)} = \frac{\text{(A)sample}}{\text{(A)Standard}} \times \text{Standard . con(mg/dl)}$$

2–معايرة الغليسريدات الثلاثية في مصل الدم Determination of serum Triglycerides Level

تمت معايرة الغليسريدات الثلاثية في مصل الدم وفق الطريقة (Trender –1970) باستخدام مجموعة اختبار جاهزة (Kit) ذي الرمز (Cot.No.12851) والمصنفة من قبل شركة (Medichem) وهي طريقة إنزيمية يتم فيها حلمهة الغليسريدات إلى صبغة وردية وفق المعادلة التالية :

$$\text{Triglycerdes} + 3H_2O \xrightarrow{\text{LPI}} \text{Glycerol} + R\text{-cooh}$$

$$\text{Glycerol} + ATP \xrightarrow{\text{GK}} \text{Clycerol } -3 \text{ phosphate} + ADP$$

$$\text{Glycerol-3-phosphate} + o2 \xrightarrow{\text{GPO}} \text{Dihydroxyacetone} + \text{phosphate} + H2O2$$

$$H2O2 + 4\text{-aminophenazone} + 4\text{- chlorophenol} \xrightarrow{\text{POD}} 2H2O + Hcl + \text{dye}$$

Dye = 4(p-benzoquinone- monoimino)- phenazone

وتمت قراءة العينات عند طول موجة قدرها (550 NM) باستخدام جهاز المطياف الضوئي

SepctrophotometerSpeotronicInstument Model UV-9200 وحسب تركيز الغليسيريدات الثلاثية وفق المعادلة التالية :(A) Sample/(A)Standard

$$\text{Triglycerides concentration (mg/dl)} = \frac{\text{(A) Sample}}{\text{(A)Standard}} \times \text{Standard con.(mg/dl)}$$

التحليل الاحصائي: Statistical Analysis:

استخدم في التحليل الإحصائي برنامج التحليل الاحصائي (Statiatix, Version 14.0, 2015)
واستخدام اختبار التباين باتجاه وحيد (AOV, Analysis of variance) لتحديد الفروق المعنوية بين قيم المعطيات المدروسة عند مستوى $P \leq 0.05$ ..

3-النتائج Results :

تم استخدام طريقة تحليل الفرق الوحيد لمقارنة قيم الكوليسترول والشحوم الثلاثية للأرانب السليمة والمصابة بالخلل الوظيفي للكبد بعد تجريعها بالخلاصة الكحولية للحلبة والحبة السوداء

1-مقارنة قيم الكوليسترول في مجموعات الدراسة في الأيام (1-20-40-60) من التجربة

الجدول رقم (1): الوصف الإحصائي لتأثير المعاملة بالخلاصة الكحولية لبذور (الحلبة و الحبة السوداء) بقيمتين مختلفتين في مستوى الكوليسترول مقدراً بـ (mg/dl) في مجموعات أرانب التجربة السليمة والمصابة بالخلل الوظيفي للكبد بواسطة المزيج (رابع كلور الفحم مع زيت البرافين).

المجموعات	مجموعة أولى شاهد سلبي G1	مجموعة ثانية G2	مجموعة ثالثة G3	مجموعة رابعة G4	مجموعة خامسة G5	مجموعة سادسة شاهد إيجابي G6	مجموعة سابعة G7	مجموعة ثامنة G8	مجموعة تاسعة G9	مجموعة عاشرة G10
اليوم 1	55,40	55,00	50,30	55,10	55,00	166,20	165,00	164,30	165,00	164,90
اليوم 20	57,20	53, 40	51,00	53,90	52,30	175,50	158,00	145,60	155,50	157,20
اليوم 40	62,90	51,90	50,20	52,00	52,00	179,00	150,20	138,50	151,20	140,00
اليوم 60	64,25	50,60	49,20	51,00	51,00	183,00	148,00	13320	150,30	139,00

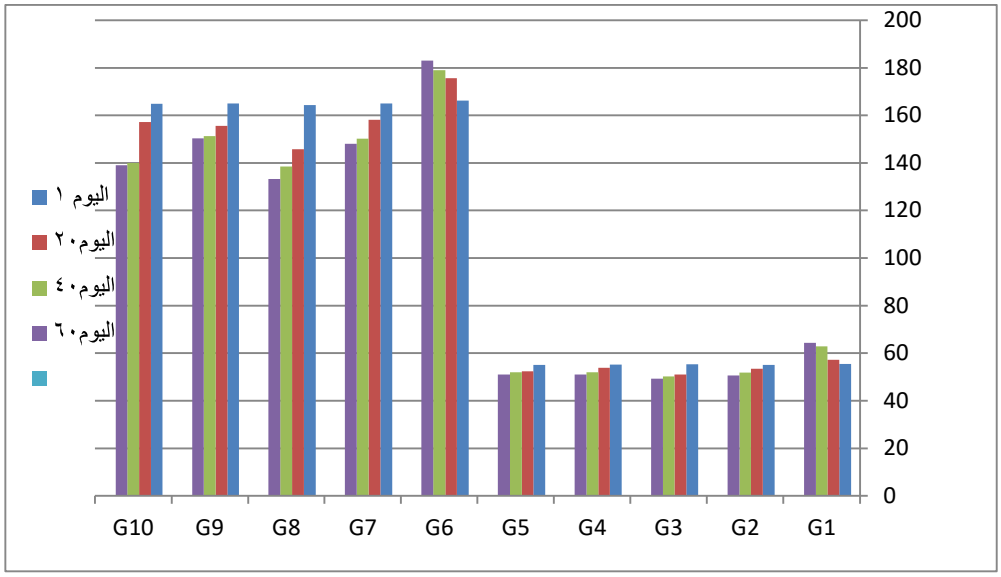
الفروقات المعنوية الكوليسترول في مجموعات الدراسة في الأيام (1-20-40-60) من التجربة

	المجموعة 2&1	المجموعة 4&3	المجموعة 6&5	10&9&8&7&6
اليوم 1	P>0.05 *	P=0.01 **	P=0.00000 ***	P>0.005 *
	المجموعة 5&4&3&2&1 مع بقية المجاميع P=0.00001 ***			
اليوم 20	المجموعة 2&1	المجموعة 4&3&2	المجموعة 5&4&3&2&1 مع بقية المجاميع	
	**P=0.01	P>0.05*	***P=0.00000	
	10&9&8&7&6 P>0.05*			
اليوم 40	المجموعة(1) مع 5&4&3&2&	10&9&8&7&6		
	P=0.00000 ***	P>0.05 ***		
اليوم 60	المجموعة(1) مع 5&4&3&2&	10&9&8&7&6		
	P=0.00000 ***	P>0.05 ***		
	المجاميع 5&4&3&2&1 مع بقية المجاميع P=0.00000***			

*=لا توجد فروقات معنوية

**= فروقات معنوية بسيطة

***= فروقات معنوية مرتفعة (واضحة جداً)



المخطط رقم (1): الوصف الإحصائي لتأثير المعاملة بالخلاصة الكحولية لبذور (الحلبة و الحبة السوداء) بقيمتين مختلفتين على مستوى الكوليسترول مقدراً بـ (mg/dl) في مجموعات أرانب التجربة السليمة والمصابة بالاضطراب الوظيفي التجريبي للكبد بواسطة المزيج (رابع كلور الفحم مع زيت البرافين).

لقد أظهرت نتائج الدراسة لقيم الكوليسترول الجدول رقم (1) وجود فروق معنوية حيث كانت($p\leq0,05$) بين قيم الكوليسترول عند مجموعة الشاهد، وقيمه عند مجموعات التجربة (G5-G4-G3-G2) التي تم تجريعها بالخلاصة الكحولية للحلبة والحبة السوداء خلال جميع المراحل العمرية للدراسة جدول رقم (1) و المخطط رقم (1)، حيث بلغت قيمه عند مجموعة الشاهد (64.25-62.90-57.20-55.40) mg/dl على التوالي في الأيام (1- 20- 40- 60) يوماً.

بينما بلغت قيمه في المجموعة (G2) المجرعة بالخلاصة الكحولية للحلبة بمقدار 500 ملغ/كغ (50.60-51.90-53.40-55.00) mg/dl على التوالي للأيام (1-20-40-60) يوماً من التجربة.

وكانت قيمه في المجموعة (G3) المجرعة بالخلاصة الكحولية للحلبة بمقدار (1000) ملغ/كغ من الوزن الحي (49.20-50.20-51-55.30) mg/d على التوالي للأيام (1-20-40-60) من التجربة.

كما كانت قيمه في المجموعة (G4) المجرعة بالخلاصة الكحولية للحبة السوداء بمقدار (200) ملغ/كغ وزن حي (51-52-53.90-55.10) mg/dlعلى التوالي للأيام (1-20-40-60) من التجربة.

وكانت قيمه في المجموعة (G5) المجرعة بالخلاصة الكحولية للحبة السوداء بمقدار (300) ملغ/كغ وزن حي (51-52-52.30-55) mg/d على التوالي للأيام (1-20-40-60) من التجربة.

وعند مقارنة المجموعة (G6) التي تم إحداث الاضطراب الوظيفي للكبد عندها بوساطة رابع كلوريد الفحم مع مجموعات التجربة (G10-G9-G8-G7) والمحدث لديها خلل وظيفي بالكبد أيضاً من خلال تجريعها برابع كلور الفحم ، وتم تجريعها بالخلاصات الكحولية للحلبة والحبة السوداء على التوالي خلاصة كحولية حلبة بمقدار (500) ملغ/كغ – خلاصة كحولية حلبة بمقدار(1000) ملغ/كغ – خلاصة كحولية حبة سوداء(200)ملغ/كغ – خلاصة كحولية حبة سوداء(300) ملغ/كغ وزن حي. حيث لوحظ عدم وجود فروق معنوية في اليوم الأول من التجربة.

أما في اليوم (20) من التجربة فلوحظ وجود انخفاض معنوي($P\leq0.05$) في قيم الكوليسترول عند مجموعات أرانب التجربة (G10-G9-G8-G7) حيث بلغت القيم عندها

(G6) على التوالي مقارنة مع قيمة الكوليسترول عند المجموعة mg/dl(157.20-155.50-145.60-158.00) المصابة بالخلل الوظيفي للكبد بوساطة رابع كلوريد الفحم حيث بلغت قيمته عندها (175.50) mg/dlجدول رقم (1).

وكذلك في اليوم (40) من التجربة لوحظ أيضا انخفاض معنوي $P\leq0.05$ في قيمـــــــة الكوليسترول عنـــــد مجموعات أرانب التجربة (G10-G9-G8-G7)حيث بلغت قيم مستوى الكوليسترول في المصل عندها mg/dl(140.00-150.20-138.50-151.20). على التوالي، مقارنة مع قيمته عند المجموعة (G6) المصابة بالخلل الوظيفي للكبد بوساطة رابع كلوريد الكربون حيث بلغت قيمه في المصل عندها (179,00) mg/dlجدول رقم (1).

أما في اليوم (60) من التجربة فقد لوحظ استمرار انخفاض قيم مستوى الكوليسترول معنوي $P\leq0.05$ عند مجموعات التجربة (G10-G9-G8-G7) التي أجهدت برابع كلوريد الفحم وجرعت الخلاصات الكحولية للحلبة و الحبة السوداء بمقادير مختلفة مقارنة مع المجموعة (G6) المصابة بالخلل الوظيفي للكبد بوساطة رابع كلوريد الكربون جدول رقم (1).

2-مقارنة قيم الشحوم الثلاثية في مجاميع الدراسة في الأيام (1-20-40-60) من التجربة

الجدول (2): الوصف الإحصائي لتأثير التجريع بالخلاصة الكحولية لبذور (الحلبة و الحبة السوداء) بقيمتين مختلفتين في مستوى الشحوم الثلاثية مقدراً بـ (mg/dl) في مجموعات أرانب التجربة السليمة والمصابة بالخلل الوظيفي للكبد بواسطة المزيج (رابع كلور الفحم مع زيت البرافين).

المجموعات	مجموعة أولى شاهد سلبي G1	مجموعة ثانية G2	مجموعة ثالثة G3	مجموعة رابعة G4	مجموعة خامسة G5	مجموعة سادسة شاهد إيجابي G6	مجموعة سابعة G7	مجموعة ثامنة G8	مجموعة تاسعة G9	مجموعة عاشرة G10
اليوم 1	105,3	103,1	101,7	103,00	100,3	145,50	143,6	142,00	143,00	142,00
اليوم 20	106,2	100,7	98,3	100,00	98,7	156,20	150,00	140,10	141,70	140,80
اليوم 40	111,3	98,1	96,25	99,2	97,20	160,90	148,00	137,30	140,00	138,00
اليوم 60	114,4	95,8	91,2	93,2	92,30	167,00	145,00	134,20	138,00	136,00

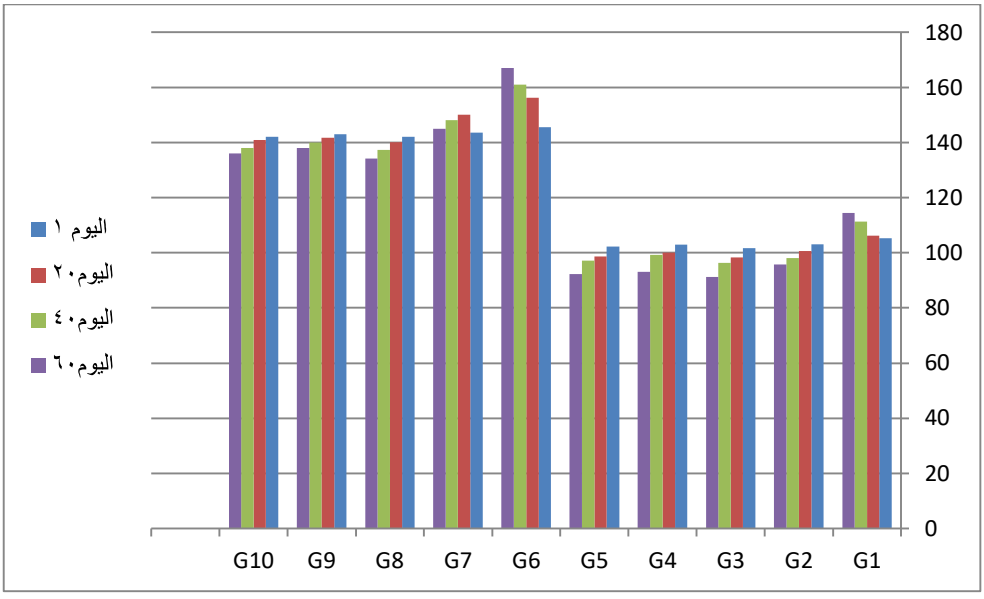
الفروقات المعنوية الشحوم الثلاثية في مجموعات الدراسة في الأيام (1-20-40-60) من التجربة :

	المجموعة 1&2&3&4	المجموعة(5) مع 1&2&3&4	المجاميع6&7&8&9&10
اليوم 1	P>0.05 *	P=0.01 **	P>0.005 *
	المجاميع 1&2&3&4&5 مع بقية المجاميع P=0.0000 ***		
اليوم 20	المجموعة(1) مع 2&3&4&5	المجموعة 6&7&8&9&10	1&2&3&4&5 مع بقية المجاميع
	**P=0.01	P>0.05*	P=0.000001
اليوم 40	المجموعة(1) مع 2&3&4&5&6	6مع 7&8&9&10	1&2&3&4&5 مع 6
	P=0.01 **	P=0.00000 ***	P=0.00000 ***
اليوم 60	المجموعة(1) مع 2&3&4&5	6 مع 7&8&9&10	1&2&3&4&5 مع 6
	P=0.00000 ***	P=0.00000 ***	P=0.00000 ***

=لا توجد فروقات معنوية

**= فروقات معنوية بسيطة

***= فروقات معنوية مرتفعة (واضحة جداً)



المخطط رقم(2): الوصف الإحصائي لتأثير المعاملة بالخلاصة الكحولية لبذور (الحلبة و الحبة السوداء) بقيمتين مختلفتين على مستوى الشحوم الثلاثية مقدراً بـ (mg/dl) في مجموعات أرانب التجربة السليمة والمصابة بالخلل الوظيفي للكبد بواسطة المزيج (رابع كلور الفحم مع زيت البرافين).

لقد أظهرت نتائج الدراسة لقيم الشحوم الثلاثية الجدول رقم (2) وجود انخفاض معنوي $P\leq0.05$ بين قيم الشحوم الثلاثية عند مجموعة الشاهد، وقيمة عند مجموعات التجربة (G2–G3–G4–G5) التي تم تجريعها بالخلاصة الكحولية للحلبة والحبة السوداء خلال جميع المراحل العمرية للدراسة جدول رقم (2) و المخطط رقم (2)، حيث بلغت قيمة عند مجموعة الشاهد (105.30–106.20–111.30–114.4) mg/dl على التوالي في الأيام (1–20 –40 –60) يوماً.

بينما بلغـــت قيمة في المجموعة (G2) المجرعة بالخلاصة الكحوليـــة للحلبـــة بمقدار 500 ملغ/كغ (95.8–98.1–100.7–103.1) mg/dl على التوالي للأيام (1–20–40–60) يوماً من التجربة.

وكانت قيمة في المجموعة (G3) المجرعة بالخلاصة الكحولية للحلبة بمقدار (1000) ملغ/كغ من الوزن الحي (91.20–96.25–98.30–101.7) mg/d على التوالي للأيام (1–20–40–60) من التجربة.

كما كانت قيمة في المجموعة (G4) المجرعة بالخلاصة الكحولية للحبة السوداء بمقدار (200) ملغ/كغ وزن حي (93.20–99.20–100–103) mg/dl على التوالي للأيام (1–20–40–60) من التجربة.

وكانت قيمة في المجموعة (G5) المجرعة بالخلاصة الكحولية للحبة السوداء بمقدار (300) ملغ/كغ وزن حي (92.30–97.20–98.70–102.30) mg/d على التوالي للأيام (1–20–40–60) من التجربة.

وعند مقارنة المجموعة (G6) التي تم إحداث خلل وظيفي للكبد عندها بوساطة رابع كلوريد الفحم مع مجموعات التجربة (G7_G8_G9_G10) وهي أيضا تم إحداث خلل وظيفي بالكبد عندها من خلال تجريعها برابع كلور الفحم ، وتم تجريعها بالخلاصات الكحولية للحلبة والحبة السوداء على التوالي ،خلاصة كحولية حلبة بمقدار (500) ملغ/كغ – خلاصة كحولية حلبة بمقدار(1000) ملغ/كغ – خلاصة كحولية حبة سوداء(200)ملغ/كغ – خلاصة كحولية حبة سوداء(300) ملغ/كغ وزن حي. حيث لوحظ عدم وجود فروق معنوية في اليوم الأول من التجربة.

أما في اليوم (20) من التجربة فلوحظ وجود انخفاض معنوي($P\leq0.05$) في قيم الشحوم الثلاثية عند مجموعات أرانب التجربة (G7_G8_G9_G10) حيث بلغت القيم عندها (140.80–141.70–140.10–150)mg/dl. على التوالي مقارنة مع قيمة الشحوم الثلاثية عند المجموعة (G6) المصابة بالخلل الوظيفي للكبد بوساطة رابع كلوريد الفحم حيث بلغت قيمته عندها (156.20) mg/dl جدول رقم (2).

وكذلك في اليوم (40) من التجربة لوحظ أيضا انخفاض معنوي $P\leq0.05$ في قيم الشحوم الثلاثية عند مجموعات أرانب التجربة (G7_G8_G9_G10)حيث بلغت قيمة في المصل عندها(138–140–137.30–148) mg/dl على التوالي، مقارنة مع قيمته عند المجموعة (G6) المصابة بالخلل الوظيفي للكبد بوساطة رابع كلوريد الكربون حيث بلغت قيمته في المصل عندها (160.90) mg/dl جدول رقم (2).

أما في اليوم (60) من التجربة فقد لوحظ استمرار انخفاض قيمة الشحوم الثلاثية عند مجموعات التجربة (G7_G8_G9_G10) التي أُجْهدت برابع كلوريد الفحم وجرعت الخلاصات الكحولية للحلبة و الحبة السوداء بمقادير مختلفة مقارنة مع المجموعة (G6) المصابة بالخلل الوظيفي للكبد بوساطة رابع كلوريد الكربون جدول رقم (2)

4–المناقشة

تأثير الخلاصة الكحولية للحلبة والحبة السوداء في قيم الكوليسترول والشحوم الثلاثية عند الارانب السليمة والمصابة بالخلل الوظيفي للكبد

أشارت نتائج دراستنا المبنية في الجدول رقم (1–2) أن تجريع الأرانب بالخلاصة الكحولية للحلبة والحبة السوداء قد أدى الى انخفاض معنوي $P\leq0.05$ في مستوى كل من الكوليسترول والشحوم الثلاثية عند الأرانب السليمة وتلك المصابة بالخلل

الوظيفي للكبد خلال جميع مراحل التجربة . وتتوافق هذه النتائج مع ما وجده الباحثان Madar – (and- Stark.,2002). ربما يمكن تفسير انخفاض مستوى الكوليسترول والشحوم الثلاثية عند مجموعات أرانب السليمة والمصابة بالخلل الوظيفي للكبد والمجرعة للخلاصة الكحولية للحلبة الى احتواء بذور الحلبة على حوالي (45-60%) كربوهيدرات ، على شكل مادة صمغية تتواجد بشكل ألياف مخاطية تتكون بصورة رئيسية من الكالاكتومانان المتميز بتركيبه الخاص والذي له قابلية على حمل الماء وهو يمنع امتصاص الكوليسترول والدهون من الأمعاء مما يؤدي الى انخفاض تراكيزها في مصل الدم (GRanick et al.,1996) كما تتوافق نتائجنا مع الباحث (Annida et al.,2004) الذي وجد انخفاض في تركيز كل من الكوليسترول والشحوم الثلاثية عند الجرذان المصابة بداء السكري نتيجة تغذيتها على أوراق الحلبة يومياً ولمدة (45) يوماً.

وكذلك توافقت نتائجنا مع الباحث الحمداني (2002) الذي لاحظ أن اعطاء بذور الحلبة للأرانب السليمة أدى الى انخفاض معنوي في مستوى الكوليسترول ومستوى البروتينات الشحمية منخفضة الكثافة (LDL)، بينما حدث عندها ارتفاع معنوي في مستوى البروتينات الشحمية مرتفعة الكثافة (HDL) في المصل .

كذلك توافقت مع نتائج دراسة للباحثان(Kaviarsan and Nuradha .,2007) اللذان لاحظا أن اعطاء بذور الحلبة للأرانب المصابة بالخلل الوظيفي للكبد أدى الى انخفاض معنوي في مستوى الكوليسترول الكلي وسكر الدم في المصل عندها .
كما توافقت نتائج الدراسة (Ali et al .,2003) بأن إعطاء الفئران الخلاصة الميثانولية لبذور الحبة السوداء لمدة 12 أسبوعاً خفض تركيز الكوليسترول والشحوم الثلاثية والسكر في الدم .
وأيضاً مع نتائج دراسة للباحث (Meral et al .,2001)الذي وجد أن اعطاء زيت الحبة السوداء للأرانب المصابة بالخلل الوظيفي للكبد أدى الى انخفاض معنوي في نسبة سكر الدم والكوليسترول الكلي والشحوم الثلاثية في المصل عندها .
وأيضاً مع دراسة للباحث (Zaoui) وزملاؤه عام (2001) الذين درسوا تأثير اعطاء بذور الحبة السوداء عن طريق الفم بجرعة (10) ملغ /كغ من الوزن الحي ولمدة (12) أسبوع على نشاط أنزيمات الكبد عند الجرذان ، لوحظ انخفاض معنوي $P\leq 0.05$ في مستوى الكوليسترول الكلي والغليسريدات الثلاثية في المصل عند هذه الجرذان .

5-الاستنتاجConclusion:

مما سبق نجد أن كلاً من الخلاصة الكحولية للحلبة والحبة السوداء قد ساعدت في معالجة اضطراب الكبد المستحدث تجريبياً عند أرانب التجربة و خفضت من الإجهاد التأكسدي والتسممي الناجم عن تجريع رابع كلوريد الكربون لهذه الأرانب وساهمت بشكل معنوي في تخفيض مستوى الكولسيترول والشحوم الثلاثية في مصل دم هذه الارانب.

المراجع العلمية العربية :

1-الحمداني خالد حساني سلطان جرجس (2002) : تأثير ورق الزيتون وبذور الحلبة في بعض الصفات الفسلجية و الانتاجية في الأرانب ، رسالة ماجستير ، كلية الزراعة والغابات ،جامعة الموصل .

References:

1- Ali B.H, Blunden ,G. Phytother. Res'' (2003): Pharmacological and ToxicalProporties of Nig. Apr.17(4).

2-Annida, B., StanelyMainzen. Prince, p.(2004): Supplementation of fenugreek leaves lower lipid profile in streptozotocin- induced diabetic rats.J Med Food.7(2):153-6.

3- Arice, M. Sagdic, O. andGecge,U(2005) : Antibacterial effect of Turkish black cumin (Nigella sativaL.) oils. Turkey Vol.56.Fasc:259-262

4- Bordia, A., Verma,SK., Srivastava, KC.(1997): Effect of ginger(ZingiberofficinaleRosc.) and fenugreek (Trigonellafoenum – graecum) on blood lipids, blood sugar and platelet aggregation in patients with coronary artery disease . Prostaglandins LeukotEssent Fatty Acids:56(5):379-84.

5-Cowan,M.M.(1999): Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Review . 12:564-582.

6-Deshmuk , S.andBorle ,M.(1975):Studies on the insecticidal properties of indigenous plant products . G.Ethropharmacol .,37 :11-18.

7-Granick, B., Neubauer, D., DerMarderosian, A., editors.(1996) . The Lawrence review of natural products . St. Louis : Facta and Comparisons ;p.1-3.

8- Hannan , JM., Rokeya, B.,Faruque, O.,Nahar ,N.,Mosihuzzaman , M., Azad Khan , AK., Ali , L.(2003) : Effect of soluble dietary fibre fraction of Trigonellafoenum – graecum on glycemic , insulinemic , Lipidemic and platelet aggregation satus of Type2 diabetic model rats .J.Ethnopharmacol.88(1):73-77.

9- Huxtable RJ.(1992) : The pharmacology of extinction. J Ethnopharmacol 37: 1-11.

10- Issarani, R.. Nagori B . P.(2006): Effect of different galactomannans on absorption of cholesterol in rabbits Vol. 6\1 83-86.

11-Kaviarasan ,S. and C.V.A nuradha.(2007): Fenugreek (Trigonellafoenumgraecum) seed polyphenols protect liver from alcohol toxicity arole on hepatic detoxification system and apoptosis . phamazie 62(4):299-304.

12- Madar, Z., Stark, AH.(2002).New legume sources as therapeutic agents . Br J Nutr. 88(suppl 3):S287-S292.

13 – Meral I, Yener Z , Kahraman T, Mert N(2001).Effect of Nigella sativa on glucose concentration , Lipid peroxidation , antioxidant defence system and liver damage in experimentally inoduced diabetic rabbits .J.Vet . Med . Physiol . Pathol . Clin . Med.48 (10):593-9

14-Muhammed Ali ,. Nickavara , B.Mojab , Z. and Javidnia,k (2003) :Chemical Composition of the Fixed and Volatile Olis of Nigella Sativa L.From Iran.

15-Natarajan ,B. and Dhananajayan ,A . (2007): Pharmacological effects of TrigonellaFaenumgraecum seed on various isolated perfused smooth muscle Pharmacol .Magaz .,(10): 77-80

16-Northern B. King A.(2011): Long –term effects of Nigella sativa L.oil on Some physiological parameters in normal and Streptozotocin – induced diabetic rats Vol.1,No.3,46-53

17- Petit, P.R., Y. D. Sauvaire, D.M.Hillaire-Buys, O.M.Leconte, Y.G.Baissaca, and G.R.Ponsin, and G.R.Ribes(1995): Steroid saponins from fenugreek seeds : extraction, purification , and pharmacological investigation on feeding behavior and plasma cholesterol. Steroids 60(10):674-680.

18- Raju, J., J.M. Patlolla, M. V. Swamy, and C. Rao.(2004). Diosgenin, a steroid saponin of TrigonellaFoenum – graecum (Fenugreek) inhibits azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation in F344 rats and induces apoptosis in HT-29 human colon cancer cells. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 13(8):1392-1398.

19- Talha E . E.Abbas and Mohamed E. Ahmed (,2010); Effect of supplementation of Nigella sativa seeds to the broiler chicks diet on the performance and carcass guality . International Journal of Agriculture Sciences , ISSN : 0975-3710 , Volume 2 , Issue 2 , pp-09-13.

20- Townsend C.C.,andGuest,E(1980): Flora of Irag .vol.4(part1)Ministry of Agriculture and Agrarian reform.Baghdad .pp.495

21- Trender, C.;Clin. Clem.;(1970):Biochem,8,658.

22- Usher, G.(1984).A Dictionary of Plants Used by Man. CBS publishers and Distributors. Delhi.pp 465.

23- Zaoui, A.a, . CherrahbY, K. Alaouib, N. Mahassinec, H. Amaroucha and HassarbM.(2001): Effects of Nigella sativa fixed oil on blood homeostasis in rat.