دراسة تأثير المستخلص الكحولي لبذور العنب والشاي الأخضر على التغيرات الانزيمية في الحيوانات المختبرية

أقبال فاضل علوان[1] عصام فاضل الجميلى[2] عمار مولى حمود[1]
حليمة جابر[1] حسين علي محمد[1]

[1] وزارة العلوم والتكنولوجيا، دائرة بحوث الكيمياء، الجادرية، بغداد، العراق
[2] فرع التقنيات الإحيائية، معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الإحيائية للدراسات العليا، جامعة بغداد

الخلاصة

تم التعرف على مركبات المستخلص الكحولي للشاي الأخضر وبذور العنب بوساطة جهاز الفصل السائل العالي الكفاية HPLC فظهر بأنها تحتوي على المركبات الرئيسة Epicatechine و Catechine و Epgallocatchine و Epicatechingallate و Epgallocatechingallate بالنسبة لمستخلص الشاي الأخضر، أما المستخلص الكحولي لبذور العنب فقد كان يحتوي علىProcyanidine B1 و Procyanidine B2 و Procyanidine C1. كما درس تأثير ثلاثة تراكيز مختلفة(1، 5، 25 ملغم/0.1 مليلتر) من هذه المستخلصات المكونة من 125 ملغم من المستخلص الكحولي لبذور العنب و 125 ملغم من المستخلص الكحولي للشاي الأخضر مع إضافة عدد من الفيتامينات (A،C،E) على فعالية انزيمات الكبد (GST،ALP،GPT،GOT) من خلال التجريع عن طريق الفم للفئران المختبرية خلال مدة 4 أسابيع. أشارت النتائج بأنه لا توجد فروقات معنوية (على مستوى $p<0.05$) لتراكيز المستخلصات الكحولية لبذور العنب و الشاي الأخضر على الفعالية النوعية لانزيمات الكبد كما لم تشر النتائج لأي تأثيرات سمية بالجرع المستعملة مقارنة بحيوانات السيطرة.

STUDY THE EFFECT OF MEDICINAL PLANTS ON ENZYMATIC CHANGES IN LABORATORY ANIMALS

Ikbal F. Alwan[1] Essam F. Al-Juamily[2] Amar M. Hamood[1]
Halima A. Jabir[1] Hassain A. Mohamad[1]

[1]Ministry of science and Technology- Chemical ind. Bag and petrochemical hdad – Iraq.
[2]Biotechnology Dep. Genetic Engineering and Biotechnology for Postgraduate Studies Baghdad University.

ABSTRACT

The alcoholic extracted compounds has been identified of green tea and grape seed-mediated by using Performance High Liquid Chromatography (HPLC) appeared to contain the major compounds has been Epicatechine and Catechine and Epgallocatchine and Epicatechingallate and Epgallocatechingallate for green tea extract, and extract the alcoholic grape seed has been Procyanidine B1 and Procyanidine B2 and Procyanidine C1. Also studied the effects of three different concentrations (1, 5, 25 mg / 0.1ml) of these extracts, consisting of 125mg of extract of the alcoholic grape seeds and 125mg of extract alcohol green tea with the addition of a number of vitamins (A,C,E). To the effectiveness of liver enzymes (GST,ALP,GPT,GOT) through the dosage by mouth to laboratory rats during the period of 4 weeks. The results indicated that there were no significant differences ($p < 0.05$) to concentrations of the alcoholic extracts of grape seed and green tea on the effectiveness of specific liver enzymes, nor did it mention the results on any toxicity of oral delivery employed, as compared to control animals.

Key words: Alcoholic Extract of grape seeds, Alcoholic extract of green tea

المقدمة

أزداد إهتمام خبراء الصحة بالوقت الحاضر بإستعمال طب الأعشاب بصوره ملحوظة، وذلك بسبب كونها المصدر الطبى العلاجى الوحيد المتوفر في البلدان النامية و لأنها أصبحت العلاج الطبى البديل الشائع عن العقاقير المصنعه فى البلدان النامية. أستعملت النباتات والاعشاب منذ القدم إذ كان أسلافنا يعزلون المفيد كغذاء و نظراً لآهميه هذه النباتات من الناحيه الطبيه فقد انتشرت زراعتها فى جميع بقاع العالم و تنوع إستعمالها (1).

أجريت العديد من الدراسات لمعرفة التأثيرات السمية للنباتات الطبية المستعملة في علاج الامراض السرطانية والمركبات الكيميائية و بالجرع التي يتناولها الانسان، لغرض الكشف عن التأثيرات الجانبية من خلال دراسة تأثيرات المركبات في زيادة أو نقصان فعالية أنزيمات الكبد والأعضاء الرئيسة التي تتم فيها عملية تأيض المركبات الكيميائية (2،3).

لاحظ Singh وآخرون (4) من جانب أن المواد المضادة للأكسدة تؤدي إلى إستحثاث الزيادة في نشاط انزيم Glutathione – S- Transferase (GST) إذ يعد هذا الانزيم من الانزيمات متعددة الوظائف من خلال إزالة المتأيضات السمية لبعض المسرطنات والمطفرات. أن الزيادة في فعالية الانزيم تحدث نتيجة لزيادة عمليات التصنيع في الخلية أو كأستجابة لعمليات النمو الحاصلة في الخلية. وتوجد ثلاث أنزيمات مختلفة، Glutamate Pyruvic Transaminase (GPT) Glutamate Oxaloacetate Transaminase (GOT), Alkaline Phosphates (ALP) تستخدم لقياس أو تحديد مدى الضرر الذي يحصل في الخلايا الكبدية و خصوصاً الانزيمين (ALP),(GPT). إذ يتركز كل من هذين الانزيمين في الخلايا الكبدية.(5)

تحتوي النباتات التي تتكون منها التركيبة الدوائية على مركبات الفلوفونايد و التي تستعمل لعلاج الأمراض السرطانيه و هى مستخلص(OPC) Oligameric Pronthocyanidine لبذور العنب وهو من مجموعة المركبات المضادة للاكسدة ويقلل من مستوى الجذور الحرة ويثبط عمل انزيم الاورنثين ديكاربوكسليز ومن ثم يمنع تكون الخلايا متعدد البروتين أي أنه يعمل على إيقاف نمو الخلايا السرطانية، ومستخلص الشاى ألاخضر (الكاتجين) catachin و epicatachin epigallocatechin وهي مركبات مهمة في تقليل الجذور الحرة ولأهميتها في علاج السرطان ومسبباته (6) فضلاً عن فيتامينات A، C، E وهي مركبات مهمة في تقليل الجذور الحرة ولأهميتها في علاج أمراض السرطان ومسبباته و منع بعض التهابات الكبد (2).

تهدف الدراسة الحالية معرفة فعالية وقوة التركيبة الدوائية ضد عملية الأكسدة وتلف خلايا الكبد وذلك من خلال عمل الانزيمات(GOT, GPT, ALP) في أعضاء الحيوان المختبري بعد تجريعه بتراكيز مختلفة لمدة إسبوعين و4 أسابيع و كذلك انزيم GST.

المواد وطرائق العمل

المحاليل المستعملة

حضرت المستخلصات بطريقة المحلول الكحولي 50% كحول- 50% ماء وبنسبة 7.5:1 ثم سخن الخليط بدرجة حرارة 50°م لمدة ساعتين مع التحريك المستمر و بعدها رشح و ركز الراشح بوساطة المبخر الدوار ثم جفد المحلول بجهاز التجفيد بالتبريد للحصول على مسحوق. تم قياس المركبات الفعالة في المسحوق مع نماذج قياسية مجهزة من شركة Spulco. أستعمل جهاز HPLC (7) من نوع A6 Shimadza وعمود ODS C_{18} وقد أعتمد الطورالمتحرك المكون من محلولين(A) الذي يتكون من ماء لا آيوني مع حامض الفسفوريك 1000 -1 حجم/حجم والمحلول(B) مكون من أسيتونايترايل مع حامض الفسفوريك 1000-1 حجم/جحم، وكان معدل سرعة الطور المتحرك يساوي 1 مليلتر/دقيقة وقدرت الامتصاصية على طول موجي 254 نانومتر، بينما كانت تركيبة كل كبسولة مؤلفة من :

1. مستخلص بذور العنب (OPC).
2. مستخلص الشاي الأخضر (الكاتشين).

تم تجريع الحيوانات بمعدل 4 كبسولات يومياً. وقد أختيرت هذه النسب إعتماداًعلى دراسات علمية لها علاقة بالمواد الفعالة والتركيز الأمثل لها في معالجة الأمراض (8).

الحيوانات المختبرية

أختبر 16 فأراً ذكراً من نوع Balb بعمر5 أو8 أسبوع وبوزن بين 20-25 غم وزعت عشوائياً إلى أربعة مجاميع متساوية منفصلة ووضعت في أقفاص بلاستيكية. غذيت الحيوانات فضلاً عن العلف المركز والماء على تراكيز مختلفة من التوليفة للمستخلصات النباتية وهي 1،5،25 ملغم/0.1 مليلتر يومياً و لمدة 4 أسابيع تم بعدها التضحية بالحيوانات وأخذ الكبد والدم وحفظت لحين إجراء الاختبارات عليه.

الاختبارات الانزيمية

تحديد مستوى وفعالية انزيمي GOT وGPT

تمت دراسة مستوى وفعالية الانزيمين GPT و GOT وذلك بأخذ كبد الفأر و تقطيعه الى قطع صغيره وهرسه مع حجم معلوم (3 مليلتر) من دارئ الفوسفات الفسيولوجي ثم نبذ الخليط مركزياً من أجل الحصول على راشح الكبد المهروس (9) والذي تم تحديد فعالية هذين الانزيمين حسب طريقة Reitman *et al.* (10) وكما يأتي:

إستعملت أنبوبتي إختبار لكل نموذج، مثلت الأولى العينة الضابطة Blank و الثانية عينة النموذج Sample، حضرت هذه النماذج وفق الطريقة المذكورة من قبل الشركة المجهزة Randox, U.K. وتم معرفة فعالية هذين الانزيمين في الراشح عن طريق جدول خاص لكل أنزيم من هذين الانزيمين.

تحديد مستوى و فعالية انزيم ALP

أستعملت راشح الكبد لتحديد فعالية انزيم Alkaline phosphates (ALP)، تم إتباع الطريقة الموصوفة من قبل Kind and King (11)، أستعملت أربعة أنابيب اختبار لكل نموذج مثلت الأولى عينة النموذج Sample و الثانية ضابطة النموذج Blank و الثالثة مثلت العينة القياسية Standard وأخيراً مثلت الرابعة العينه الضابطه Blank، وحضرت هذه النماذج وفق الطريقة المذكورة من قبل الشركة المجهزة Randox, U.K. مع العدة، مزجت جيداً ووضعت الانابيب في مكان مظلم لمدة دقائق، قيست بعدها الكثافة الضوئية للمحاليل على طول موجي 510 نانوميتربجهاز المطياف الضوئي.

وتم حساب كفاءة أنزيم ALP بوساطة المعادلة الأتية:

$$\text{الفعالية الانزيمية (وحدة/ لتر)} = \frac{\text{قراءة عينة النموذج – قراءة عينة ضابطة النموذج}}{\text{قراءة العينة القياسية}} \times 142$$

تحضير محلول الدم

شُلت الحيوانات عن طريق الإزاحة العنقية وأخذ الدم من قلب الفأره ووضع في أنبوبة أختبار تحتوي على EDTA كمادة مانعة للتخثر. مزج المحلول مع محلول الفوسفات الملحي ونبذ مركزياً بوساطة جهاز الطرد المركزي بسرعة 2000 دورة/ دقيقة لمدة 10 دقيقة. أخذ الراشح وأضيف إليه 1 مليلتر ماء مقطر وحفظ بدرجة -20 ° م لحين الاستعمال.

تحديد مستوى و فعالية انزيم GST

أُستعملت العينات ذاتها لقياس كفاءة أنزيم Glutathione – S- Transfers إستناداً لطريقة *et al.* Francoise (12) وحسب المعادلة الآتية:-

$$\text{فعالية أنزيم GST في كريات الدم الحمر (وحدة /غرام هيموغلوبين)} = \frac{\text{الفرق في قراءة الامتصاص} \times 31.25}{\text{هيموغلوبين (غرام / سم}^3\text{)}}$$

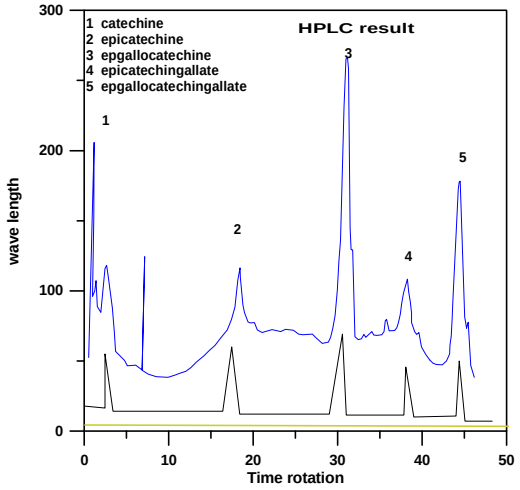
أخضعت نتائج مستويات الانزيمات (GPT، GOT، ALP) في مستخلص الكبد ومصل الدم GST إلى تحليل التباين بإستعمال برنامج الاحصائي الجاهز SAS (2001) لمعرفة أصغر فرق معنوي بين معدلات المجاميع وأعتمد تحليل LSD / Least Significant difference عند مستوى إحتمالية ($p<0.05$) لمعرفة الفروق المعنوية بين مستويات المعاملات المختلفة.

النتائج والمناقشة

فحوصات HPLC

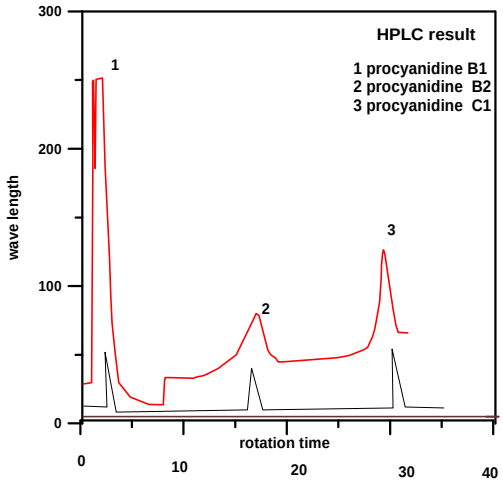
يتضح من الشكل (1) عملية فصل مستخلص الشاي الأخضر بأستعمال جهاز HPLC ، إذ يلاحظ وجود المركبات Epicatechine و Catechine و Epgallocatechingallate و Epicatechingallate و Epgallocatechine

وبزمن الاحتجاز 42.25 و 29.5 و 17.6 و 7.8 و 2.88 على التوالي. أن تحليل مستخلص الشاي الأخضر مشابة إلى تحليل إستعمل من قبل Song *et al.* (13) لمستخلص الشاي الأخضر من حيث المركبات الموجودة فيه وكذلك مطابقتها إلى زمن الاحتجاز.



الشكل(1) : نتائج تحليل الكروموتوغرافي بأستعمال جهاز HPLC للمستخلص الكحولي للشاي الأخضر.

يتضح من الشكل(2) عملية فصل المستخلص الكحولي لبذور العنب بأستعمال جهاز HPLC عند المركبات proanthocyanidineB1 و proanthocyanidinsB2 و proanthocyanidineC1 بزمن الاحتجاز 1.28و18.8و 29.3 دقيقةعلى التوالي.



الشكل (2): تحليل الكروموتوغرافي بأستعمال جهاز HPLC للمستخلص الكحولي لبذور العنب.

مستوى فعالية أنزيم ALP

أنزيم ALP واسع الانتشار في مناطق مختلفة من الجسم مثل الأمعاء و نخاع العظم والكبد و الكلية ولكن بتراكيز مختلفة و قليلة مقارنة مع الانزيمات الآخرى (14). تتغير فعالية الانزيم بتغاير درجة الحرارة وقيمة الرقم الهيدروجيني، وكذلك تركيز المادة الأساس مع وجود المواد المنشطة أو المثبطة في وسط التفاعل (15).

يتضح من الجدولين (1و2) نتائج دراسة أنزيم ALP لمستخلص الكبد لمدة تجريع أسبوعين و أربعة أسابيع لمعرفة تأثيره على الحيوانات المختبرية باستعمال تراكيز مختلفة من مستخلصات النباتات للتركيبة الدوائية في مدة التجريع مقارنة مع نماذج السيطرة فوجد بأنه ليس هناك فروقات معنوية ($p<0.05$) لها تأثير على نشاط وفعالية أنزيم ALP عند التراكيز العالية للتركيبة في مستخلص الكبد مما يدل على أنه لا يوجد تأثير سمي للتركيبة الدوائية في الانسان عند أستعمالها لعلاج الأمراض السرطانية لان مستخلصات النباتات تحتوي على مواد بايوفلافونايد ضد عملية الاكسدة والعديد من الفيتامينات (A،E،C) وكل هذه المواد تظهرفعالية مضاده للتطفير.

الجدول رقم(1): تأثير المستخلص الكحولي للتركيبة الدوائية على فعالية انزيم ALP في الحيوانات المختبرية لمدة أسبوعين.

تركيز المعاملة ملغم / 0.1 مليلتر	الفعالية النوعية (وحدة /لتر) الكبد/ ALP	الفعالية النوعية (وحدة / لتر) الكلية/ALP	الفعالية النوعية (وحدة / لتر) الدم/ALP
السيطرة ماء مقطر	63.62 ± 0.11^{a}	168.2 ± 0.08^{ab}	44.2 ± 0.03^{a}
1	63.63 ± 0.08^{a}	168.28 ± 0.05^{b}	44.1 ± 0.09^{a}
5.0	63.67 ± 0.05^{a}	168.32 ± 0.04^{b}	44.3 ± 0.09^{a}
25.0	63.67 ± 0.09^{a}	168.53 ± 0.05^{a}	44.29 ± 0.05^{a}

*** الحروف المتشابهة بين الاعمدة تعني عدم وجود فرق معنوي عند مستوى (P<0.05)**

الجدول رقم(2): تأثير المستخلص الكحولي للتركيبة الدوائية على فعالية انزيم ALP في الحيوانات المختبرية لمدة 4 أسابيع.

تركيز المعاملة ملغم / 0.1 مليلتر	الفعالية النوعية (وحدة / لتر) الكبد/ ALP	الفعالية النوعية (وحدة / لتر) الكلية/ALP	الفعالية النوعية (وحدة /لتر) الدم/ALP
السيطرة ماء مقطر	63.69 ± 0.11^{a}	168.1 ± 0.08^{ab}	44.26 ± 0.03^{a}
1	63.63 ± 0.08^{a}	168.24 ± 0.05^{b}	44.23 ± 0.09^{a}
5.0	63.69 ± 0.05^{a}	168.24 ± 0.04^{b}	44.28 ± 0.09^{a}
25.0	63.69 ± 0.09^{a}	168.23 ± 0.05^{a}	44.29 ± 0.05^{a}

***الحروف المتشابهة بين الاعمدة تعني عدم وجود فرق معنوي عند مستوى (P<0.05)**

مستوى فعالية انزيم GOP و GOT

يوجد انزيم GPT بنسب عالية في الكبد أكثر من بقية الانزيمات ويعد مقياس لمعرفة مدى تضرر الخلايا الكبدية. أما انزيم GOT يتضح بأن نسبته تتذبذب بين الارتفاع و الانخفاض علماً بأن هناك بعض الأمراض المؤدية إلى رفع أو خفض نسبة انزيمات الكبد عن القيمة الطبيعية لها وعلاقة دور هذه النباتات في خفض نسبة الانزيمات عند إرتفاعها أو رفع نسبتها عند انخفاضها و ذلك لأحتوائها على مركبات فلافينويد.

يلاحظ في الجدولين (3و4) بأن فعالية الانزيماتGPT وGOT لمدة اسبوعين و4 أسبوع لم تسجل أية فروقات معنوية ($P<0.05$) بالمقارنة مع السيطرة الموجبة خلال مدة تجريع المستخلص للتركيبة بالتراكيز المختلفة وفي مدة الدراسة.

لذا يمكن الاستنتاج بأن التركيبة ليس لها تأثير على أزيمات الكبد قيد الدراسة، وهذه النتائج جاءت مطابقة لما ورد في كل من Paula and Andreas (16) و Bergmeyer (17).

الشكل رقم (3) : تأثير التراكيز المختلفة لمستخلص التركيبة في فعالية الانزيمين GPT و GOT في الحيوانات المختبرية لمدة أسبوعين.

تركيز المعاملة ملغم / مليلتر	الفعالية النوعية (وحدة / لتر)	الفعالية النوعية (وحدة / لتر)	الفعالية النوعية (وحدة / لتر)	الفعالية النوعية (وحدة / لتر)
	GPT / الكبد	GPT / الدم	GOT / الكبد	GOT / الدم
السيطرة (الماء المقطر)	152.4 ± 0.11^{a}	84.8 ± 0.05^{a}	70.15 ± 0.04^{b}	57.15 ± 0.05^{b}
1.0	152.41 ± 0.08^{b}	84.82 ± 0.05^{a}	70.15 ± 0.04^{a}	57.15 ± 0.00^{b}
5.0	152.43 ± 0.08^{b}	84.82 ± 0.04^{a}	70.15 ± 0.06^{a}	57.15 ± 0.13^{a}
25.0	152.43 ± 0.04^{a}	84.82 ± 0.06^{a}	70.15 ± 0.05^{a}	57.15 ± 0.12^{ab}

***الحروف المتشابهة بين الاعمدة تعني عدم وجود فرق معنوي عند مستوى ($P<0.05$).**

الجدول رقم (4) : تأثير التراكيز المختلفة لمستخلص التركيبة على فعالية الانزيمين GPT و GOT في الحيوانات المختبرية لمدة 4أسابيع.

تراكيز المعاملة ملغم / مليلتر	الفعالية النوعية (وحدة / ملغم بروتين) GPT/ الكبد	الفعالية النوعية (وحدة / ملغم بروتين) GPT / الدم	الفعالية النوعية (وحدة / ملغم بروتين) GOT / الكبد	الفعالية النوعية (وحدة / ملغم بروتين) GOT / الدم
السيطرة (الماء المقطر)	152.**8**± 0.11[a]	84.86± 0.05[a]	70.18± 0.04[b]	57.18 ± 0.05[b]
1.0	152.**81**±0.08[b]	84.84 ± 0.05[a]	70.18 ± 0.04[a]	57.19 ± 0.00[b]
5.0	152.**82**± 0.08[b]	84.83± 0.04[a]	70.19± 0.06[a]	57.19± 0.13[a]
25.0	152.824±0.04[a]	84.83 ± 0.06[a]	70.19± 0.05[a]	57.19± 0.12[ab]

***الحروف المتشابهة بين الاعمدة تعني عدم وجود فرق معنوي عند مستوى (P<0.05).**

مستوى فعالية أنزيم GST في كريات الدم الحمراء

يتضح الجدولين (5و6) تقدير فعالية انزيم GST لمدة 2 و4 أسبوع في مصل دم الحيوانات المختبرية بانه لا توجد فروقات معنوية تذكر للانزيم GST في مصل دم الحيوانات التي تم معاملتها مع تراكيز مختلفة من المستخلص الكحولي و لمدة طويلة للتركيبة مقارنة مع السيطرة الموجبة ($p<0.05$)، يتضح من النتائج أعلاه بأن التركيبة لها القابلية على تعزيز قوة المادة المزيلة للأكسدة إذ تقلل من الجذور الحرة و تتحدد معها ومن ثم تثبط تكوين الأجسام الغريبة Xenobioles التي تكون المادة الأساس لعمل انزيم GST أو تحول عدم حدوث سرطان بوساطة تحفيز فعالية الأشكال المتساوية من انزيم كليتوثايونين-S- الانتقالي في جميع حالات سرطان الكبد. تشيرالعديد من البحوث و الدراسات إلى تأثير أنواع مختلفة من أمراض السرطان منها سرطان المريء و العصارات المعوية أي سرطان المعدة و تأثيره في فعالية انزيم GST والمحافظة على توازن معدل وجود انزيم GST وعلى محتويات أو مكونات انزيم GST (16).

الجدول (5): تأثير معاملة مستخلص التركيبة الدوائية في انزيم GST في الحيوانات المختبرية لمدة أسبوعين.

معاملة / الانزيم	السيطرة	0.1مليليتر/1ملغم	0.1مليليتر/5ملغم	0.1 مليليتر/25 ملغم
GST وحدة/ لتر	0.97 ±.005[a]	0.971 ±0.003[b]	0.972± 0.009[c]	0.972 ± 0.01[d]

***الحروف المتشابهة بين الاعمدة تعني عدم وجود فرق معنوي عند مستوى (P<0.05).**

الجدول (6) :تأثير معاملة مستخلص التركيبة الدوائية في انزيم GST في الحيوانات المختبرية لمدة 4 أسبوع.

معاملة / الانزيم	السيطرة	0.1 مليليتر/1ملغم	0.1 مليليتر/5ملغم	0.1 مليليتر/25 ملغم
GST وحدة/ لتر	0.97 ±0.005[a]	0.971 ±0.003[b]	0.972± 0.009[c]	0.972 ± 0.01[d]

***الحروف المتشابهة بين الاعمدة تعني عدم وجود فرق معنوي عند مستوى (P<0.05).**

يتضح من نتائج الدراسة بأنه لا توجد فروقات معنوية خلال مدة التجريع بين التراكيز العالية للمستخلصات الكحولية لنباتات التركيبة الدوائية مما يدل بأنها خالية من التأثيرات السميه بالجرع المستعملة وهذا ما أستنبط من نتائج معاملة كل من انزيم ALP وكذلك انزيمي GPT وGOT في مستخلص الكبد وألانزيم GST في مصل دم الحيوان.

المصادر

1- Tyler, B.(1998). Pharmacognosy, 9th Editors, Lea and Febiger.

2- Gentler, E. (1999) The role of antioxidants in the prevention of tumors. *Brazils Leek Lusty,* 96 : 199- 209.

3- Kavaratskhella, M.; Winkles, C.; Naldrett, M.T. (2004). A novel high activity cationic ascorbate peroxides from tea (camellia sine sis) – a Class 111 peroxides with unusual substrate specificity. *J. of Plant Physiology,* 154: 273-282.

4- Singh, S. v.; Creadon, G.; Das, M.; Mukhtar, H. and Awasthi, Y.C. (1987).Glutathione- S-transferases of mouse lung selective binding of benzo (a) pyrene metabolites by the subunit which are preferentially by t-butylated hydroxyanisole. *Biochem. J.,* 243: 351-358.

5- Boyd, J.W.(1988).Serum enzyme in the diagnosis of disease in man and animals. *J. Comp. path.* 98 : 381-400.

6- Gupta, S.; Hastak, K.; Ahmad, N.; Lewin, J. and Mukhtar, H. (2001). Inhibition of prostate carcinogenesis in TRAMP mice by oral infusion of green tea polyphenols. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A,* 98: 10350-10355.

7- Nakamura, Y.; Fsuji, S. and Tonogav, Y.(2003). Analysis of proathocyanidins in grape seed oils. *Journal of Health Science,* 49 (1) : 45-54.

8- Xue, H.; Aziz, R.; Sun, N.; Cassady, J.; Kamend ulis, L.; Yu,Y.; Stoner, G. and Klauoring, J. (2001). Inhibition of cellular transformation by berry extracts. *J.Carcinogenesis*, 22(2): 351-356.

9- Morton, K. (1954). The purification of alkaline phosphates of animal tissues, *J. Biochem.,* 57: 595- 603.

10- Reitaman, S. and Franker, S. (1957). A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetatic and glutamic pyruvic transaminases.. *J. Clin. Path.*18: 8-9

11- Kind, P. R. N. and King, E. G.(1954). Estimation of plasma phosphatases by determination of hydrolysed phenol with aminoactipyrine. *J.Clin. Path.* 7: 322-326.

12- Francoise, C.; Pierre, M. Jacqueline, R. and Henri, J. (1989).*Chemical Clinical Acta* ; 209-217.

13- Song, H.B.(2001). Study on green tea extraction technology.*J. of Chines Institute of Food Sci and Tech.* 1(1): 19-23.

14- Tenneco, K. H.; Arundathits, S. J.; Asovriya, P. K. and Karunamayake,E.H.(2003). Possible hepatoxicity of *Nigella sativa* seeds and *Dregea voluble* leave. *J. Ethno*, 31: 283-289.

15- Khan, B. A.; Abraham, A. and Leclanma, S. (2003). Hematological and histological studies after curry leaf (*Murraya koenig* L.) and mustered (*Brasses jounce*) feeding in rats, Indian. *J. Med. Res.*, 102: 184-186.

16- Paula, D. C.F. and Andreas, K., (2005). Combined used of serum enzyme levels as tumor marker in cervical carcinoma patients. *Tumor. Biol.*, 9: 1773-1778.

17- Bergmeyer, H.U. (1983). Methods of enzymatic analysis,Vol. 3, 3rd ed., Verlag Chemises, Weinhein. Cited by Boyd, JW(1988).