تأثير المركبات البروتينية المعزولة من الثمرة البازيدية لعيش الغراب

(فطر *Agaricus campestris*) في ذكور الفئران المصابة بداء السكر المستحدث بالالوكسان

ايمان سعيد شمعون الجوكا

قسم الكيمياء ، كلية التربية ، جامعة الموصل ، الموصل العراق

(تاريخ الاستلام: 7 / 7 / ٢٠٠٨ ، تاريخ القبول: ١ / ٣ / ٢٠٠٩)

الملخص

تم تحضير المستخلص المائي البارد لثمرة عيش الغراب(فطر *Agaricus campestris*) وعزل المركبات البروتينية بتقنية الترشيح الهلامي من الراسب البروتيني البارد ، وتحديد الاوزان الجزيئة لها ، كذلك تم دراسة تأثير المستخلصات (المائي الخام ، وغير البروتيني) والراسب البروتيني والمركبات البروتينية المفصولة منه في امتلاكها خاصية خافضة للكلوكوز ، الدهون وامكانية امتلاكها فعالية مضادة للاكسدة في الفئران المصابة بداء السكر المستحدث بالالوكسان.

تم فصل مركبي A ، B من الراسب البروتيني الناتج من المستخلص المائي لثمرة عيش الغراب باستخدام تقنية الترشيح الهلامي وكانت الاوزان الجزيئية التقريبية للمركبين A ، B هي (١٩٣١٥٢) ،(٢٢٦٦) دالتون على التوالي .

اشارت النتائج بعد اسبوع من المعاملة الى ان المستخلص المائي الخام وغير البروتيني والراسب البروتيني البارد والمركبات البروتينية (A)، (B) ادت الى انخفاض معنوي في مستوى كل من الكلوكوز، الكوليستيرول الكلي ، الكليسيريدات الثلاثية في مصل الدم ومستوى (MDA) في انسجة الكبد والكلية، بينما احدثت ارتفاعا معنويا في مستوى كوليستيرول البروتين الدهني عالي الكثافة في مصل الدم ومستوى (GSH) في انسجة الكبد والكلية لذكور الفئران المصابة بداء السكر المستحدث بالالوكسان ، يمكن الاستنتاج ان لمعظم مستخلصات ثمرة عيش الغراب تأثير مضاد للسكري ولعملية بيروكسدة الدهن في الفئران المصابة بداء السكر المستحدث بالالوكسان .

المقدمة

قد اظهرت بوضوح انواع مختلفة من مستخلصات الاعشاب والنباتات الطبية ومن ضمنها الفطر انخفاض في مستوى كلوكوز الدم لحيوانات مصابة بداء السكر التجريبي(٣،٢،١) يعرف داء السكر على انه حالة مزمنة ناتجة من تفاعل وراثي متغير وعوامل بيئية(٤) ، تتسم بفقدان الاتزان البدني للكلوكوز نتيجة خلل في افراز الانسولين هذا يؤدي الى اضعاف في أيض الكلوكوز ونقصان في الطاقة والوقود التي مصدرها الدهون والبروتينات ، وعادة مايؤدي هذا المرض بعد فترة طويلة من الاصابة به الى مضاعفات وتغيرات في الاوعية الشعرية للكبيبات الكلوية وشبكية العين Retina، كما يسبب زيادة في عملية بيروكسدة الدهن Lipid peroxidation المترافقة مع ارتفاع الدهون (Hyperlipidemic) (٥)، وقد اشارت العديد من الدراسات الى العلاقة بين داء السكر ومستويات مضادات الاكسدة في الجسم ودورهذة المضادات في التقليل من ظهورهذا المرض (٦)، اذ ان مضادات الاكسدة الانزيمية Enzymatic antioxidants (سوبر اوكساید ديسميوتيز، كلوتاثايون بيروكسيديز، كلوتاثايون ريدكتيز، الكاتاليز، اسكوربيت بيروكسيديز)ومضادات الاكسدة غيرالانزيمية Non-enzymatic antioxidants (كلوتاثايون، فيتامينات A، C، E) لها دور في حماية الخلايا من حالة الكرب التأكسدي Oxidative stress من خلال قدرتها على تدمير اصناف االاوكسجين الفعالة التي تتحرر خلال مرحلة الكرب التأكسدي (٧). يعد فطر اجاريكس كامبستريس Agaricus campestris من فطريات عيش الغراب المألوفة والصالحة للأكل وينتمي الى الفطريات البازيدية الكاملة ، يتكون عيش الغراب الناضج من عنق ، طوق، خياشيم ، قلنسوة(٨). يعتبر الفطر مادة غذائية للانسان لأحتوائه على مواد بروتينية وكاربوهدراتية ودهنية بالاضافة الى الاملاح المعدنية (٩) كما يتميز الفطر بكونه مصدرا جيدا لمضادات الاكسدة الطبيعية مثل فيتامين (A, E,C) والسيلينيوم (١٠) وكذلك يحتوي الفطر على عدد من العناصر مثل الكالسيوم والفسفور والصوديوم والمغنسيوم والحديد والزنك والنحاس (١١) ، كما يحتوي على مجموعة من الفيتامينات المتمثلة بالثايمين ، رايبوفلافين ، بايريدوكسين ، نياسين وفيتامين D (١٢). يستخدم عيش الغراب كمضاد للاورام Antitumour (١٣)، كما يعمل على خفض نسبة الكوليستيرول ، كوليستيرول البروتين الدهني واطئ الكثافة في الدم ويستخدم لمعالجة امراض القلب(١٤،١٥)، كما له دور في اخماد اكسدة الجذور الحرة بذلك فهو يمنع من حدوث الكرب التأكسدي من خلال احتوائه على السيلينيوم ومضادات الاكسدة الاخرى (١٦) .

المواد وطرائق العمل

النبات المستخدم

الاسم العربي للنبات : عيش الغراب (الفطر)

الاسم الإنكليزي للنبات : mushroom

الاسم اللاتيني للنبات : *Agaricus campestris* (٨)

الحيولنات المستخدمة

استخدمت في هذه الدراسة ذكور الفئران البيضاء Male Albino Mice المجهزة من كلية التربية / جامعة الموصل ، تراوحت أوزانها بين (25-30)غم . وضعت في أقفاص مجهزة ومعدة لهذا الغرض ، زودت بالماء والعلف الحيواني الخاص بها وأخضعت للظروف المناسبة من ضوء طبيعي ودرجة حرارة(٢٥)°م .

طرائق العمل

تحضير المستخلص المائي البارد الخام

تم وزن (300)غم من ثمرة عيش الغراب (فطر *Agaricus campestris*) طحنت بواسطة آلة الطحن ، بعدها مزجت بالماء وبنسب (٣:١) وزن(غم)/حجم(مل) لمدة عشرة دقائق . سحقت جدران الخلايا باستخدام التجميد والتذويب (كررت عملية التجميد والتذويب اربع مرات) ثم باستخدام جهاز الأمواج فوق الصوتية sonicator لمدة (٣٠) دقيقة . ثم رشح المحلول من خلال عدة طبقات من الشاش وفصل المستخلص بجهاز الطرد المركزي المبرد للتخلص من المواد غير الذائبة ثم قلص حجم هذا المستخلص الناتج الى الثلث بواسطة جهاز التجفيد (Lyophilizer) وبذلك تم الحصول على المستخلص المائي الخام (17).

عزل البروتينات وترسيبها

تم ترسيب البروتينات من المستخلص المائي الخام باستخدام الأسيتون البارد وبنسبة (60:40) حجم : حجم على التوالي(18) ، تم الحصول على الراسب البروتيني بعد فصله بجهاز الطرد المركزي المبرد وبسرعة 6000xg ولمدة 20 دقيقة . بعد ذلك وضع الراسب البروتيني في جهاز التجفيد لعدة ساعات للحصول على المادة البروتينية بشكل مسحوق .

فصل وتنقية البروتين

نقي البروتين الخام الذي عزل بالترسيب وذلك باستخدام تقنية الترشيح الهلامي Gel Filtration (١٩) ، من خلال عمود فصل ذي أبعاد (1.8x120) سم ، والحاوي على مادة السيفاديكس (Sephadex G-50) بارتفاع 110سم . وبمعدل جريان 54 مل/ساعة .

التقدير الكمي للبروتين

قيست كمية البروتينات في المستخلص المتحصل عليه من كل خطوة باستخدام طريقة الباحث لاوري المحورة (٢٠) . استخدم البومين مصل البقر BSA بوصفه محلولاً قياسياً بتركيز 100ملغم/100سم٣ وله معامل امتصاص مولاري 0.67 عند طول موجي 280 نانوميتر (٢١).

تعيين الوزن الجزيئي التقريبي للمركبات البروتينية المفصولة

استخدم نفس عمود الفصل المذكور اعلاه لتعيين الوزن الجزيئي التقريبي للمركبات البروتينية المفصولة لثمرة عيش الغراب بعد تمرير محاليل المواد القياسية المعلومة الوزن الجزيئي فيه ومحلول البروتين الخام(22) .

تحديد الجرعة المؤثرة

استخدمت فئران سليمة تراوحت أوزانها (30-35) غم قسمت إلى مجاميع تضم كل مجموعة (4) فئران ، عوملت كما يأتي :

1. المجموعة الأولى حقنت في التجويف البريتوني بـ (0.2) مل من المحلول الملحي الفسلجي Normal Saline وعدت مجموعة سيطرة (Control) .
2. المجاميع من (2-7) حقنت في التجويف البريتوني بالجرع (5 ,100,75,50,25,10) ملغم/كغم من وزن الجسم على التوالي من المستخلص المائي الخام البارد لثمرة عيش الغراب والمذابة في المحلول الملحي الفسلجي، وبعد ساعتين من أجراء عملية الحقن تم سحب الدم من الفئران من جيب محجر العين، قيس مستوى الكلوكوز في مصل الدم، ثم اختيرت الجرعة الأكثر تأثيرا في خفض مستوى كلوكوز الدم وعدت جرعة مؤثرة.

استحداث داء السكر

استخدمت ذكورالفئران البيضMale Albino Mice والتي تراوحت أوزانها بين (30-35)غم . قسمت الى مجاميع تضم كل مجموعة (4) فئران ، وفصلاعن مجموعة سيطرة.حقنت الفئران المراد استحداث داء السكر بها بمادة الالوكسان Alloxan المحضرة انيا وبجرعة 180ملغم/كغم من وزن الجسم في التجويف البريتوني (Intraperitoneally) (23) , بعد تجويعها لمدة (24) ساعة قبل احداث داء السكر فيها . ثم التأكد من حدوث داء السكر يوميا ولمدة اسبوع وذلك بفحص الادرار بواسطة الشريط الكاشف (Tape . Lilly and Co., USA Eli , (R) .Test).

حقن الحيوانات المصابة بداء السكر التجريبي

بعد التأكد من حدوث داء السكر في الحيوانات وزعت الفئران المصابة بداء السكر عشوائيا الى (5) مجاميع تضم كل مجموعة (4) فئران . ثم حقنت في التجويف البريتوني يوميا ولمدة اسبوع بكل من المستخلص المائي الخام ، غير البروتيني ، الراسب البروتيني والمركبات البروتينية المفصولة منه بجرع مقدارها (10, 9.87 , 0.064,0.126, , 0.038) ملغم / كغم من وزن الجسم على التوالي فضلا عن مجموعتين تضم كل منها (4) فئران وكما يأتي :.

أ–مجموعة سيطرة سليمة حقنت في التجويف البريتوني بـ(0.2) مل من المحلول الملحي الفسلجي (Normal saline) ولمدة اسبوع .

ب–مجموعة مصابة بداء السكر المستحدث بالالوكسان متروكة من غير معاملة

تقدير المتغيرات

قدر مستوى الكلوكوز والكوليستيرول الكلي والكليسيريدات الثلاثية وكوليستيرول البروتين الدهني العالي الكثافة في مصل الدم ، باستخدام عدة التحليل Kit نوع(Syrbio,France) وهي طريقة انزيمية . كما قدر مستوى الكلوتاثايون في انسجة الكبد والكلية بطريقة المان (24) . في حين قدر مستوى المالونداياليديهايد في الانسجة المدروسة بالطريقة المتبعة من قبل الباحثين Volken وآخرون(25) .

التحليل الاحصائي

حللت نتائج مستوى الكلوكوز،الكولسيستيرول الكلي ، الكليسيريدات الثلاثية، الكوليستيرول البروتين الدهني العالي الكثافة ، الكلوتاثايون والمالونداياليديهايد إحصائيا وذلك باستخدام تحليل التباين الأحادي (One way analysis of variance)، كما تم تحديد الاختلافات الخاصة بين المجاميع باستخدام اختبار دنكن(Duncan) (٢٦). وكان مستوى التميز الإحصائي المقبول 5 % (P<0.05) .

النتائج والمناقشة

ايجاد كمية البروتينات الكلية ونسبها المئوية وكفاءة الترسيب بالاسيتون في المستخلص المائي البارد لثمرة عيش الغراب

يوضح الجدول(١) كمية البروتينات المتقدرة بطريقة العالم لاوري المحورة ونسبتها المئوية وكفاءة الترسيب بالاسيتون في المستخلص المائي الخام .

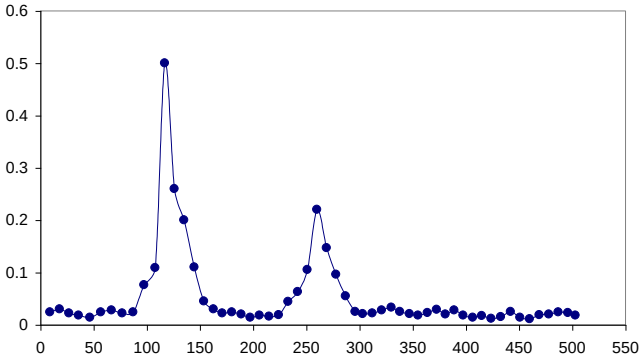
الجدول (1) كمية البروتينات ونسبتها المئوية في المستخلص المائي الخام البارد لثمرة عيش الغراب وكفاءة الترسيب بالأسيتون

نوع المستخلص	تركيز البروتين (ملغم/مل)	الحجم الكلي (مل)	كمية البروتين الكلي في المستخلص (ملغم)	وزن النبات (غم)	نسبة البروتين في النبات (%)	كمية البروتين المتحصل عليها عمليا (ملغم)	كفاءة الترسيب (%)
المستخلص المائي الخام لثمرة نبات الفطر الابيض	4.5	840	3780	300	1.26	3100	82.01

فصل مادة الراسب البروتين

تعد طريقة الترشيح الهلامي احدى الطرائق المتبعة عالميا لفصل المركبات اعتمادا على الاختلاف في حجم جزيئاتها ، فالجزيئات الكبيرة تمر أولا من خلال عمود الفصل أما الجزيئات الصغيرة فسوف تتمكن من اختراق الهلام لذلك فانها تستغرق مدة زمنية اطول فتظهر اخيرا(27) .

وأعطى روغان مادة الراسب البروتينية المعزولة من المستخلص المائي لثمرة عيش الغراب قمتين واضحتين عند إمرار محلولها في عمود الفصل المذكور سابقا والمبينة في الشكل (١).



الشكل (1) : المظهر الجانبي لروغان الراسب البروتيني المعزول من المستخلص المائي الخام البارد لثمرة عيش الغراب بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفصل (120 ×1.8) سم والحاوي على الهلام من نوع Sephadex G. 50 الاسهم B,A تمثل حجم الروغان للقمم الاولى(١١٧) مل والثانية (٢٦٠) مل على التوالي للمركبات البروتينية المفصولة ، حجم كل جزء (9) مل وبمعدل جريان(54 مل/ ساعة.

أيجاد كمية البروتين الكلي في مادة الراسب البروتينية للمستخلص المائي الخام البارد لثمرة عيش الغراب قبل التمرير في عمود الفصل و الحزم (المركبات) البروتينية الناتجة عن تقنية الترشيح الهلامي

بعد فصل المركبات البروتينية من المحلول المركز لمادة الراسب البروتينية التي مررت في عمود الفصل كما ذكر في طريقة العمل . قدرت كمية البروتين بطريقة العالم لاوري المحورة ، ومن ثم تم ايجاد كفاءة الفصل في العمود المستخدم بتقنية الترشيح الهلامي ، والجدول (2) يبين النتائج التي تم الحصول عليها.

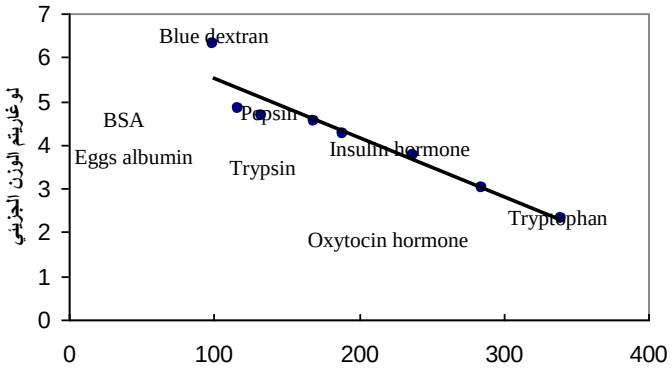
الجدول(٢): كمية البروتين للمحلول المركز قبل تمريره على عمود الفصل والمركبات البروتينية الناتجة من الترشيح الهلامي في عمود الفصل ذو الابعاد (120 1.8x) سم الحاوي على الهلام من نوع Sephadex G.50

نوع البروتين	تركيز البروتين (ملغم/سم٣)	الحجم الكلي (سم٣)	كمية البروتين الكلي (ملغم)	النسبة المئوية (%)	كفاءة الفصل (%)
الراسب البروتيني الناتج من المستخلص المائي الخام لثمرة عيش الغراب قبل التمرير في عمود الفصل	3	2	6	100	82.5
المركب البروتيني A المفصول بتقنية الترشيح الهلامي من الراسب البروتيني	0.05	63	3.15	52	
المركب البروتيني B المفصول بتقنية الترشيح الهلامي من الراسب البروتيني	0.025	72	1.8	30	

الاوزان الجزيئية التقريبية للمركبات البروتينية المفصولة

لتعيين الاوزان الجزيئية التقريبية للمركبات البروتينية المفصولة بتقنية الترشيح الهلامي ، مرر عدد من المواد المعلومة الوزن الجزيئي خلال عمود الفصل الذي استخدم سابقا ، تراوحت أوزانها الجزيئية بين (204-2000000) دالتون ، بعد ذلك عين حجوم الروغان لهذه المواد ، وعند رسم حجم الروغان (Elution volume) لكل مادة مقابل لوغارتم

الوزن الجزيئي تم الحصول على المنحني القياسي لتقدير الوزن الجزيئي كم التقريبي للمركبات المفصولة.
هو مبين في الشكل (2) والذي من خلاله يمكن تحديد الوزن الجزيئي



حجم الروغان (مل)

الشكل (٢) المنحني القياسي لتقدير الوزن الجزيئي التقريبي للبروتين

ومن خلال إسقاط حجوم الروغان للمركبات البروتينية المفصولة بتقنية الجزيئية التقريبية كما مبين في الجدول (3) .
الترشيح الهلامي على المنحني القياسي (الشكل2) تم تقدير الأوزان

الجدول (3) : الأوزان الجزيئية التقريبية للمركبات البروتينية المفصولة بتقنية الترشيح الهلامي.

المركب البروتيني	حجم الروغان (مل)	الوزن الجزيئي (دالتون)
المركب البروتيني A المفصول من الراسب البروتيني للمستخلص المائي الخام لثمرة عيش الغراب	١١٧	١٩٣١٥٢
المركب البروتيني B المفصول من الراسب البروتيني للمستخلص المائي الخام لثمرة عيش الغراب	260	2266

تحديد الجرعة المؤثرة للمستخلص المائي الخام البارد

يوضح الجدول (4) تحديد الجرع الأكثر تأثيرا في خفض مستوى الكلوكوز في مصل الدم لذكور الفئران البيض السليمة للمستخلص المائي الخام لثمرة عيش الغراب . وقد تبين من خلال الجدول إن قيمة الجرعة المؤثرة هي 10ملغم/كغم من وزن الجسم.

الجدول (4) تحديد الجرعة المؤثرة للمستخلص المائي البارد لثمرة عيش الغراب

تركيز الكلوكوز ملي مول/لتر	السيطرة	جرعة المستخلص المائي الخام البارد ملغم/كغم وزن الجسم					
		5	١٠	٢٥	٥٠	٧٥	١٠٠
	6.22±0.33 e	3.09±0.07 a	*2.99±0.1 a	4.38±0.12 b	4.76±0.07 c	4.4±0.19 b	5.38±0.1 d

تأثير المستخلص المائي الخام وغير البروتيني والراسب البروتيني والمركبات البروتينية المفصولة منه لثمرة عيش الغراب على مستوى بعض المتغيرات الكيموحيوية في ذكور الفئران المصابة بداء السكر المستحدث بالالوكسان .

اظهرت نتائج حقن المستخلص المائي الخام والمستخلص غير البروتيني والراسب البروتيني والمركبات البروتينية المفصولة وبجرع (0.038 , 0.064, 0.126, 9.87, 10) ملغم/ كغم من وزن الجسم على التوالي في التجويف البريتوني انخفاضا معنويا ($p<0.05$) في مستوى كلوكوز الدم بالمقارنة مع مجموعة السيطرة المصابة بداء السكر ، وكانت اعلى نسبة انخفاض عند حقن الراسب البروتيني ، كما مبين في الجدول (5) قد يعزى السبب في هذا الانخفاض الى قدرته على تحفيز خلايا بيتا المتبقية (غير متحطمة) في البنكرياس على افراز الانسولين او قد يعزى الى زيادة استفادة الكلوكوز من المحيط الخارجي (٢٨) او ربما تعمل هذه المستخلصات على تثبيط امتصاص الكلوكوز من قبل الامعاء(٢٩).اما فيما يخص الراسب البروتيني فقد يعود التأثير الخافض له الى احتوائه على تسلسل للاحماض الامينية مشابه لتلك التي في الانسولين اذ يرتبط مع مستقبلات الانسولين ويخفض مستوى الكلوكوز في الدم(٣٠)، وفي الوقت نفسه ادى حقن نفس المستخلصات المذكورة انفا وبنفس الجرع الى انخفاض معنوي ($p< 0.05$) وبنسب متفاوتة في مستوى الكوليستيرول الكلي والكليسيريدات الثلاثية ، بينما ارتفع معنويا ($p< 0.05$) كولستيرول البروتين الدهني العالي الكثافة ، كما هو موضح في الجدول (5) ، وتتفق هذة النتائج مع نتائج (٥) ، ويمكن ان يعزى هذا التأثير الخافض لهذة المستخلصات الى احتواء الفطر على الكالسيوم والالياف (٣١) اللذان يساعدان على التخلص من املاح الصفراء اذ تعمل كل من الالياف والكالسيوم على الارتباط باملاح الصفراء في الامعاء ويساعدان على ازالتها من الجسم ، وبازالة الالياف لأملاح الصفراء فان الجسم يقوم بتحويل الكوليستيرول ليصنع املاح صفراء جديدة ، وهذة العملية تساعد على خفض مستوى الكوليستيرول العالي في المصل (٣٢) ، او انها تؤدي الى خفض فعالية الانزيم المسؤول عن التكوين الحيوي للكوليستيرول وتثبيط عملية تحلل الدهون Lipolysis من خلال تثبيط فعالية انزيم اللايبيز الحساس للهرمون الواقع تحت سيطرة الانسولين (٣٣) .

اما فيما يخص ارتفاع مستوى كوليستيرول البروتين الدهني عالي الكثافة في مصل دم ذكور الفئران المصابة بداء السكر عند معاملتها بالمستخلصات المذكورة انفا يعود سببه الى قدرة هذة المستخلصات على تنشيط انزيم لايبوبروتين لايبيز الذي يجهز جزيئات البروتين الدهني عالي الكثافة بالدهون الفوسفاتية و apoA-I اثناء سحب الكليسيريدات الثلاثية من الكايلومايكرونات والبروتين الدهني واطئ الكثافة جدا (V LDL)(٤ 3).

الجدول (5) تأثير المستخلص المائي الخام والمستخلص غير البروتيني والراسب البروتيني والمركبات البروتينية المفصولة منه لثمرة عيش الغراب على مستوى المتغيرات الكيموحيوية في مصل دم ذكور الفئران المصابة بداء السكر المستحدث بالالوكسان .

المعاملات	الكلوكوز (ملي مول / لتر)	الكوليستيرول الكلي (ملي مول/ لتر)	الكليسيريدات الثلاثية (ملي مول /لتر)	كوليستيرول البروتين الدهني عالي الكثافة (ملي مول/لتر)
فئران سليمة معاملة بالمحلول الملحي الفسلجي	5.89±0.28 bc	2.08±0.11 c	0.5±0.04 b	0.61±0.04 c
فئران مصابة بداء السكر المتروكة من دون معاملة	16.66±1.46 d	3.94±0.13 d	0.98±0.11 d	0.3±0.03 a
المستخلص المائي الخام البارد لثمرة عيش الغراب	5.08±0.57 ab	1.04±0.11 a	0.57±0.07 bc	0.46 ±0.05 b
المستخلص غير البروتيني البارد لثمرة عيش الغراب	4.71±0.22 a	1.16 ±0.03 a	0.67±0.1 c	0.41±0.01 b
الراسب البروتيني للمستخلص المائي البارد لثمرة عيش الغراب	4.57±0.09 a	1.41±0.12 b	0.32±0.03 a	0.66±0.03 c
المركب البروتيني A المفصول من الراسب البروتيني المعزول من المستخلص المائي الخام لثمرة عيش الغراب	6.37±0.42 c	1.4 ±0.08 b	0.24±0.02 a	0.64±0.05 c
المركب البروتيني B المفصول من الراسب البروتيني المعزول من المستخلص المائي الخام لثمرة عيش الغراب	6.77±0.23 c	1.37±0.09 b	0.27±0.01 a	0.83±0.03 d

الأحرف المختلفة عموديا تعني وجود فرق معنوي عند مستوى احتمالية (0.05).

تشير القيم إلى المعدل ± الخطأ القياسي

تأثير المستخلص المائي الخام و غير البروتيني والراسب البروتيني والمركبات البروتينية المفصولة منه لثمرة عيش الغراب على مستويات الكلوتاثايون والمالونداياليديهايد في ذكور الفئران المصابة بداء السكر المستحث بالالوكسان .

يوضح الجدول (6) ان مستوى الكلوتاثايون في انسجة الكبد والكلية قد انخفض معنويا ($p<0.05$) في ذكور الفئران المصابة بداء السكر عند المقارنة مع مجموعة السيطرة السليمة ، قد يعزى سبب الانخفاض هذا الى نقص الانسولين في حالة داء السكر مما يؤدي ذلك الى ضعف الاستفادة من الكلوكوز هذا بدوره يسبب زيادة في توليد جذور الاوكسجين الحرة التي تعمل على خفض مستوى كلوتاثايون (٣٥) .

بالنسبة للمستخلصات فقد ادى المعاملة بالمستخلص المائي الخام وغير البروتيني عن طريق الحقن في التجويف البريتوني وبالجرع (9.87, 10) ملغم /كغم من وزن الجسم على التوالي ، الى ارتفاع معنوي ($p< 0.05$) في مستوى الكلوتاثايون عند المقارنة مع مجموعة السيطرة المصابة بداء السكر وقد يكون السبب الى احتواء هذة المستخلصات على عنصر السيلينيوم (٣٦) اذ ان السيلينيوم يعتبر المكون الاساسي لانزيم كلوتاثايون بيروكسيديز (٣٥) الذي يمثل جزءا من نظام حماية الخلايا في الجسم ضد الاكسدة ، كما ادت المعاملة بالراسب البروتيني والمركبات البروتينية المفصولة منه وبالجرع (0.126, 0.064 ,0.038)ملغم /كغم من وزن الجسم على التوالي ، الى زيادة معنوية في مستوى الكلوتاثايون في انسجة الكبد والكلية وقد يعزى ذلك الى امتلاكهم تأثير خافض للكلوكوز في مصل الدم من خلال زيادة التقاط الكلوكوز من قبل الخلايا وان هذة الزيادة في مستوى الكلوكوز تكون عن طريق مسار هيكسوز احادي الفوسفات الذي بدوره يؤدي الى انتاج زيادة من NADPH , H^+ وبناء على ذلك فان الكلوتاثايون المختزل يزداد (٣٦) ، او ان هذا الراسب والمركبات البروتينية المفصولة منه يعملان على زيادة فعالية انزيم كلوتاثايون ريدكتيز الذي يعمل على اختزال الكلوتاثايون الموكسد الى الشكل المختزل باستخدام NADPH عاملا(٣٧) .

اما فيما يخص المالونداياليديهايد فقد ادى استحداث داء السكر في الحيوانات إلى ارتفاع معنوي ($p<0.05$) في مستواه في انسجة الكبد والكلية عند المقارنة مع مجموعة السيطرة السليمة ، قد يكون السبب في ذلك هو ان نقص الانسولين يؤدي الى زيادة فعالية انزيم Fatty acyl coenzyme A oxidase الذي يبدأ باكسدة بيتا للاحماض الدهنية الحرة نتيجة لذلك تحدث عملية بيروكسدة الدهن ، في حين ادى الحقن بلمستخلصات المذكورة سابقا وبنفس الجرع الى انخفاض معنوي ($p< 0.05$) في مستواه في انسجة الكبد والكلية عند المقارنة مع مجموعة السيطرة المصابة بداء السكر ، وربما يعزى الانخفاض في مستوى المالونداياليديهايد الى ان هذة المستخلصات تمارس فعالية مضادات الاكسدة وتحمي الانسجة من بيروكسدة الدهن(٣٥) ، لكون النبات يحتوي على مجموعة من الفيتامينات (C, A , E) التي تعمل كمضادات للاكسدة(٣١) كما احدث الراسب البروتيني والمركبات المفصولة منه انخفاض معنوي بمستواه في الأنسجة المدروسة ، قد يعود السبب الى قدرتها على تنشيط او تحفيز الآليات المضادة لبيروكسدة الدهن او تثبيطها لعدد من تفاعلات الجذور الحرة المولدة لبيروكسدة الدهن (٣٥)

الجدول (6) تأثير المستخلص المائي الخام والمستخلص غير البروتيني والراسب البروتيني والمركبات البروتينية المفصولة منه لثمرة عيش الغراب على مستوى الكلوتاثايون والمالونداياليديهايد في أنسجة الكبد والكلية لذكور الفئران المصابة بداء السكر المستحدث بالالوكسان .

المعاملات	الكلوتاثايون(نانومول/غم)		المالونداياليديهايد(نانومول/غم)	
	كبد	كلية	كبد	كلية
فئران سليمة معاملة بالمحلول الملحي الفسلجي	5801.77±332.16 b	2047.92±126.18 a	479.97±31.48 b	*583.03±24.7 d*
فئران مصابة بداء السكر متروكة من غير معاملة	3145.92±126.755 a	1411.63±117.1 a	708.47±30.57 c	*880.43±55.89 e*
المستخلص المائي الخام البارد لثمرة عيش الغراب	22115.79±206.52 e	7440.70±351.16 b	287.39±54.23 a	*591.87±75.95 d*
المستخلص غير البروتيني البارد لثمرة عيش الغراب	11742.37±707.73 c	8896.29 ±621.28 c	505.03±31.7 b	*474.53±12.91 c*
الراسب البروتيني للمستخلص المائي لثمرة عيش الغراب	16214.02±518.99 d	13665.28±869.21 d	487.17±83.51 b	*425.18±64.85 bc*
المركب البروتيني A المفصول من الراسب البروتيني المعزول من المستخلص المائي الخام لثمرة عيش الغراب	17348.37±404.56 d	13564.56±314.81 d	315.89±11.19 a	*398.32±27.75 b*
المركب البروتيني B المفصول من الراسب البروتيني المعزول من المتخلص المائي الخام لثمرة عيش الغراب	*17693.45±260.98 d*	*16289.38±335.7 e*	*301.28±44.87 a*	*205.12±25.64 a*

الأحرف المختلفة عموديا تعني وجود فرق معنوي عند مستوى احتمالية (0.05).

تشير القيم إلى المعدل ± الخطأ القياسي.

المصادر

1-Saravanan R.and Pari L., Antihyperlipidemic and antiperoxidative effect of Diasulin, apolyherbal Complementary and Alternative Medicine., 5(14): 1-8, (2005).

2-Gidado A., Ameh D.A. and Atawodi S.E., Effect of *Nauclea latifolia* leaves aqueous extracts on blood glucose levels of normal and alloxan-induced diabetic rats. African J . Biotechnology , 4(1) : 91-93,(2005) .

3-Cheng N., Anderson R.A., Chen Y.I.,Stoecker B.J. and Zhany X., Hypoglycemic effects of *Cinnamon* and *Heshouwu* in type diabetes mellitus. FASEB J., 16(4): 647-654, (2002).

4- Kim S. j., Bong J., Choi W.C. and Ki C.S., Hypoglycemic and Antihyperlipidemic effect of four Korean Medicianl plants in alloxan induced diabetic rats American Journal of Biochemistry and Biotechnology., 2(4): 154-160, (2006).

5-Vinuthan K. M., kumar G.V. and Narayanaswamy M., Lipid lowering effect of aqueous leaves extract of *Murraya koenigii*(Curry leaf)on alloxan – induced male diabetic rats. Phcogmag ., 3:973- 1296, (2007) .

6- Armstrong M.A., Chestnutt J.E. and Youmg I.S., The effect of dietary treatment on lipid peroxidation and antioxidant status in newly diagnosed non insulin dependent diabetes". Free radical. Biol. Med., 21(5): 19-26 , (1996).

7- Luis A., Oxygen,free radicals and oxidative stress in plants . Journal free radical research., 31:1-256 , (1999).

٨- ابو هيلة ، عبد الله بن ناصر ، اساسيات علم الفطريات. عمادة شوؤن المكتبات. جامعة الملك سعود للنشر ، المملكة العربية السعودية ، ص ٣٢٦، ٣٣٠،٣٢٨ (١٩٨٧).

9- Borchers A.T., Stern J.S., Hackman R.M., Keen C. L.and Gershwin M.E., Minireview Mushrooms,tumors and immunity. Proc. Soc Exp Biol Med.,221,281-293, (1999).

10- Filipek. J., The effect of the mushroom Pleurotus ostreatus on the lipid peroxidation of phosphatidylcholine liposomes. Pharmazie., 47: 393, (1992).

11- Harsha D.W., Sacks F.M., Obarzanek E., Svetkey L.P.,Lin P.H., Bray G.A., Aickin M., Conlin PR, Miller E.R. and Appel L.J., Effect of dietary sodium intake on blood lipids: results from the DASH-sodium trial. Hypertension., 43: 393-8,(2004).

12- Beelman R.B., Int. J. of Medicinal **Mushrooms**.,5: 321-337, (2005) .

13- Wasser S.P., Medicinal **mushrooms** as a source of antitumor and immunomodulating olysaccharides. Appl Microbiol Biotechnol., 60: 258-274,(2002) .

14-Cheung P.C.K., Dietary fiber content and composition of some edible fungi determined bytwo

methods of analysis. J. Sci. Food Agric., 72:255–260, (1996).
15- Endo A., Chemistry, biochemistry and pharmacology of HMG CoA reductase inhibitors. Klin. Wochenschr. 66: 421–427,(1988).
16-van den Brandt P.A., Zeegers M. P.A., Bode P.and Goldbohm, R. A., Toenail selenium levels and the subsequent risk of prostate cancer. Cancer Epidemiol Biomark & Prev., 12 : 866-871, (2003).
١٧- حميد، حمزة نامق، عزل بعض المركبات البروتينية الفعالة من بذور فول الصويا ودراسة تاثيراتها في الفئران المصابة والمعرضة للكرب التاكسدي المستحدث، رسالة ماجستير ، كلية التربية ، جامعة الموصل ، (٢٠٠٨).
١٨-Robyt F.J. and White J.B." Biochemical techniques, theory and practice ". Brookes/Cole publishing company, Monterey, California , P268, (1987).
١٩- Stanton P., Gel filtration chromatograophy., 251: 55-74 .(2003).
20- Schacterle G.R. and Pollack J.K., Asimplified method for the quantitative assay of small amount of protein in biological materials. Anal. Biochem., 51: 654-655,(1973).
21 -Holme D.J. and Peck H., Analytical biochemistry . John Wiley and Sons, Inc, New York, pp .86-88, (1988) .
22- Clark j.M. and Switzer R L., Experimental biochemistry. San Francisco, USA , PP73-77 ,(1977).
23- kako M., Miura T., U Sami M., kato A. AND kodowaki S., Hypoglycemic effect of the rhizomes of *Ophiopoganis tuber* in normal and diabetic mice. Biol.pharm . Bull ., 18 (5) : 785-787, (1995).
24-James R.C., Goodman D.R. and Harbison R.D., Hepatic glutathione and Hepatotoxicity, changes induced by selected marcortics. J. Pharmacol. Therapy., 221: 708-714, (1982).
25- Volken E., Nurperi G. and Ahmet B., N-acetyl cystine reduces cerebral lipid peroxidation in a rat model of infanttile hydrocephalus. J. Neurol. Sci., Issue 1302-1310, (2001).
26-Steel R.G. and Torrie J.H ., Principles and procedures of statistics biometrical approach. 2nd ed., Mc Graw .Hill Inc ., Singapore , p 183, (1984).
27- Plummer D.T., An Introduction of Practical Biochemistry.2nd ed .,Mc Graw-Hill Book Company,UK . p 61, (1978).
28- Chude M. A., Orisakwe O. E., Afonne O. j., Gamaniel K.S., Vongtau O. H. and Obl E., Hypoglycemic effect of the aqueous extract of *Boerhavia diffusa* leaves. Indian Journal of pharmacology ., 33:215-216 , (2001).
29- Sethi J., Sood S., Seth S. and Talwar A., Evaluation of hypoglycemic and anti-oxidant effect of *Ocimum sanctum*. Indian journal of Clinical Biochemistry., 19 (2): 152-155 , (2004).
30-Hamoodi N. S., Biochemical studies of proteinous compounds isolated from some hypoglycemic plants. Ph. D. College of science , Mosul university , (1999) .
31- Clarke J., Chemical composition Mushroom. Indian Journal of clinical Biochemistry . 18(2):54-63 , (2003).
32- Zoladz P., Raudenbush B. and Lilleys .(2004)." Cinnamon parks, Cinnamon for cholesterol, health benefits". Paper presented at the annual meeting of the association for chemoreception sciences. (http: /www . newsletter for wellness industry-Cinnamon.htm.) .
33-Mallick C., Maiti R. and Ghosh D., Comparative study on antihyperglycemic and antihyperlipidemic effects of separate and composite extract of seed of *Eugenia jambolana* and root of *Musa paradisiaca* in streptozotocin – induced diabetic male albino rat . Iranian journal pharmacology and therapeutics., 5:27-33, (2006).
34- Henriksen A.V., Lotte N.K. and Capristo E.(1999)." Triglyceride – induced diabetes associated with familial lipoprotein lipase deficiency". Diabetes., 48: 1258-1263 .
35-Soon Y.Y.and Tan B. K. H., Evaluation of the hypoglycemic and antioxidant activities of *Morinda officinalis* in streptozotocin--induced diabetic rats. Singapore Med J ., 43(2):77-85 ,(2002).
36- Rayman M., Selenium in cancer review of the evidence . Proc. Nutr. Soc., 64:527-542 , (2005).
37- Arora A., Sairam R. K. and Srivastava G. C., Oxidative stress and antioxidative system in plants . Current Science., 82(10):1227-1238, (2002).
38- Lands L.C., Grey V.L. and Smountas A.A., Effect of supplementation with a cysteine donar on muscular performance. J. Appl. physiol., 87: 1381-1385, (1999).

Effect of isolated proteinous compounds from the basidia fruit of the fungus *Agaricus campestris* in alloxan – induced male diabetic mice

Eman Saeed Shamoon AL-Choka
Chem. Dept. , College of Education , University of Mosul , Mosul , Iraq
(Received 7 / 7 / 2008 , Accepted 1 / 3 / 2009)

Abstrat

The study included preparing a cold aqueous extract of Mushroom fruit Gel filtration technique were used for the isolation of proteinous precipitate in to compounds and the determination of their molecular weight approximately. Also were studied the effect of cold crud aqueous extract , non proteious extract ,proteinous precipitate, and their compounds Aand B which were isolated from it on haveing hypoglycemic, hypolipidemic, and anti-oxidant properties for alloxan –induced diabetic mice.two compounds (A and B) were isolated from the proteinous precipitate using gel filtration technique and their approximate molecular weight were for A(193152) and for B were (2266) Dalton respectively.

The results were indicated After one week of treatment intraperitoneally of diabetic mice with the cold crud aqueous, non proteinous extracts, proteinous precipitate and protenious compounds (A)and (B) asignificant decrease in the level of blood serum glucose, of malondialdehyde in liver and kidneys tissues, whereas significant increase in the level of high density lipoproteins – cholesterol in blood serum and the level of glutathione of liver and kidneys tissues of alloxan – induced diabetic male mice. From these results conclude that some extracts of Mushroom fruits have anti-diabetic and antioxidant effect in alloxan- induced diabetic mice .