------مجلة علوم الرافدين، المجلد 24، العدد 3، ص54-74، 2013------

فصل إنزيم اللايبيز من اب الفستق البري ودراسة ألفته تجاه بعض المثبطات خارج وداخل جسم الفئران

أميرة عزيز محمود الجريسي **عمر يونس محمد العباسي**

قسم الكيمياء

كلية التربية

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 30 / 9 / 2012 ؛ تاريخ القبول 7 / 1 / 2013)

الملخص

تضمنت الدراسة تنقية إنزيم اللايبيز من نبات الفستق البري باجراء الترسيب باستخدام كبريتات الأمونيوم بتركيز 70% ثم الفرز الغشائي وكروماتوغرافيا التبادل الأيوني وأخيرا الهجرة الكهربائية. تم التوصل إلى أن للإنزيم متماثلا واحدا بوزن جزيئي 43597 دالتـون وبلغت فعاليته النوعية 152×10^{-3} وحدة إنزيمية / ملغم بروتين. بلغت أقصى فعالية للإنزيم عند pH 7.5 ودرجة حرارة 40 °م. كانت السرعة القصوى V_{max} التي يعمل بها الإنزيم 0.142 وحدة إنزيمية / ملي لتر/ دقيقة، وأن قيمة K_m بلغت 0.666 ملي مولار. تم اختبار إمكانية ونوع تثبيط إنزيم اللايبيز بوجود مادتي الكويرستين روتينوسايد والميلاتونين. وقد ظهر أن نوع التثبيط هو غير تنافسي وكانت قيمة ثابت التثبيط (K_i) 1.025 و1.006 ملي مولار للمثبطين على التوالي.

أختبرت، أيضا ألفة إنزيم اللايبيز في مصل دم الفئران السليمة والفئران المستحدث فيها السكر بالألوكسان تجاه المادتين أعلاه ووجد أن معاملة الحيوانات بالكويرستين روتينوسايد بجرعة 523.3 مايكروغرام / كغم وزن الجسم أظهرت إنخفاضا معنويا في فعالية إنزيم اللايبيز في حين انخفضت فعاليته بشكل غير معنوي عند المعاملة مع الميلاتونين بجرعة 8 مايكروغرام / كغم وزن الجسم. وقد تم التوصل إلى أن معاملة الحيوانات بهاتين المادتين أدت إلى انخفاض معنوي في مستوى كل من الكلوكوز والكوليستيرول الكلي ونسبة الكوليستيرول الكلي/ كوليستيرول البروتين الدهني عالي الكثافة كما ارتفع مستوى كوليستيرول البروتين الدهني عالي الكثافة معنويا في مصل دم الفئران السليمة والفئران المستحدث فيها السكري. إن التأثير التثبيطي للكويرستين روتينوسايد والميلاتونين تجاه إنزيم اللايبيز وتأثيرهما في مستوى المتغيرات الكيموحيوية التي تناولتها الدراسة قد يساعد في اعتماد هاتين المادتين دواءاً لكونهما مثبطات طبيعية.

الكلمات الدالة: اللايبيز، الميلاتونين، كويرستين روتينوسايد، الفستق البري.

Separation of Lipase from Karnel of *Pistacia khinjuke* and Determination of it's Affinity Toward some Inhibitors in Mice *In vivo* and *In vitro*

Ameera A. Al-Joraisi **Omer Y. AL-Abbasy**

Department of Chemistry
College of Education
University of Mosul

ABSTRACT

The study included the purification of lipase from *Pistacia khinjuke* by the application of the ammonium sulfate precipitation (70%), dialysis, ion exchange chromatography and finally slab electrophoresis techniques. One isoenzyme was obtained having a molecular weight of 43597 dalton and specific activity of 152×10^{-3} unit / mg protein. The maximum lipase activity was obtained at pH 7.5, temperature 40 °C. The maximum velocity (V_{max}) was 0.142 unit/ml/min and K_m value was 0.666 mM. The type and ability inhibition of lipase was tested in presence of quercitine rutinoside and melatonine. The inhibition type was noncompetitive and the inhibition constant K_i values for the two inhibitors were 1.025 and 1.006 mM, respectively.

The lipase affinity of normal and induced diabetic mice serum toward these compounds was tested. The treatment of animals by a dose of 523.3 mg quercitine rutinoside / Kg of body weight showed a significant decrease in lipase activity, but an insignificant decrease with a dose of 8 mg melatonine / Kg of body weight. The treatment of animals by these compounds led to a significant decrease in glucose, total cholesterol and ratio of total cholesterol/HDL-C levels, but a significant increase in HDL-C in serum of normal and induced diabetic mice. The inhibitory effect of quercitine rutinoside and melatonine toward lipase and biochemical parameters' levels studied may help in using these compounds as natural inhibiting drugs.

Keywords: Lipase, melatonine, quercitine rutinoside, pistacia khinjuke.

المقدمة

بتقدم العلم والتكنولوجيا، دخلت النباتات ضمن اهتمامات منظمة الصحة العالمية WHO فأصبح بإمكان العلماء فصل المكونات الفعالة من النباتات واستخدامها بالشكل الملائم. أحد هذه النباتات هو الفستق البري المعروف محليا بالحبة الخضراء. وهو نبات زيتي يصنف إلى نوعين، الأول *Pistacia mutica* والثاني *Pistacia khinjuk* الذي يكثر وجوده في تركيا وإيران وأفغانستان وباكستان وسوريا وفلسطين فضلا عن العراق (الجواري، 2009). ولهذا النبات استخدامات تعزى إلى طعـمه اللـذيذ ومحتواه الكيميائي المتميز والخاص حيث يحتوي على عدة مركبات مثل التربينات والمركبات الفينولية (Pirbalouti and Aghaee, 2011). كما يمتلك قيمة غذائية عالية لاحتوائه على الدهون والفيتامينات

ومضادات الأكسدة والمعادن (Agar *et al*., 1995)، وتحتوي زيوته على نسبة عالية من الأحماض الدهنية الأساسية مثل حامض اللينوليك وحامض اللينولينيك (Safari and Alizadeh, 2007).

يكثر في النبـاتات الزيتية وجود الإنزيمات التـي تساهـم فـي المسارات الأيـضية للزيوت وأحماضها الدهنية. ومن هذه الإنزيمات، إنزيمات اللايبيز (التي تحمل التصنيف العالمي EC.3.1.1.3 triacylglycerol acylhydrolase) التي تعمل على تحليل الآصرة الإسترية الموجودة في الكليسيريد الثلاثي وتحويله إلى أحماض دهنية وكليسيرول (Eze and Chiaka, 2010) وتساهم هذه الإنزيمات في ما يزيد عن20 % من التحولات الحيوية Biotransformation (Gitlesen *et al*., 1997).

للإنسان العديد مـن إنزيمات اللايبـيز كاللايبيز المـعدي Gastric lipase واللايبيز البنكرياسي اللذين يساهمان فـي هضم الدهون ثـم امتصاصها (Sammour, 2005)، ولايـبيز البروتينات الدهنية Lipoprotein lipase الـذي يساهم في تمثيل كليسيريدات جسيمات البروتينات الدهنية خصوصا الكايلومايكرونات وVLDL واللايبيز الحساس للهرمون Hormon-sensetive lipase الذي يساهم في زيادة مرونة الأغشية الحيوية من خلال تحليل دهونها الصعبة التي تؤثر في دخول المواد الضرورية (كالكلوكوز) الى داخل الخلايا وخروج الفضلات منها (Taskinen, 1987). وتهتم الكثير من الدراسات في التعرف على إمكانية تثبيط إنزيم اللايبيـز لدراسة تركيبها وآلية عملها. كما أن التعرف على المثبطات يساهـم كثيرا في مجال الإهتمامات الطبية حيث تساعد مثلا، في إيجاد أدوية تعالج السمنة وحب الشباب acne (Gupta *et al*., 2004) .

تهدف هذه الدراسة إلى فصل إنزيم اللايبيز من لب ثمرة الفستق البري بتطبيق تقنيات متعددة، فضلا عن توصيفه ودراسة ألفته تجاه مادتي الميلاتونين والكويرستين روتينوسايد (كمثبطات) خارج الجسم ومقارنتها مع ألفته تجاههما داخل جسم الفئران.

المواد وطرائق العمل

1. المواد المستعملة

أ. النبات المستخدم: أستخدم في هذه الدراسة نبات الفستق البري *Pistacia khinjuke* الذي تم الحصول عليه من الأسواق المحلية في مدينة دهوك وذلك في الشهر الحادي عشر أي موسم نضجه وجنيه ثم أجريت عملية عزل القشرة عن اللب، ومن ثم تقدير وفصل الإنزيم من لب الثمرة.

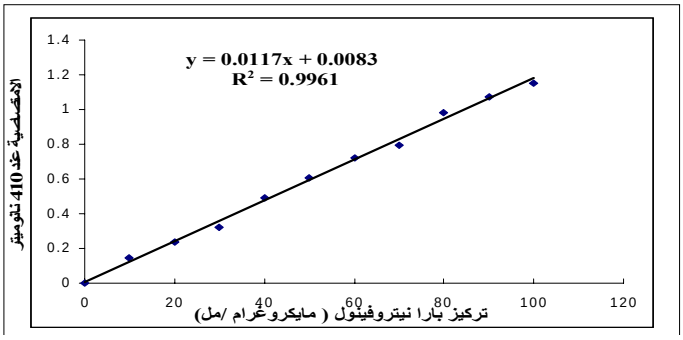
ب. الحيوانات المستخدمة: أستخدمت ذكور الفئران البيض Male Albino mice السليمة في هذه الدراسة والتي تم الحصول عليها من كلية طب الاسنان/ جامعة الموصل وعددها 90 وتراوحت أوزانها بين 30-35 غم. وزودت بالماء والعلف الخاص بها وأخضعت للظروف ذاتها من ضوء طبيعي ودرجة حرارة (25°م تقريبا).

2. طرائق العمل

تحضير المستخلص الخام من اب نبات الفستق البري: وزن 60 غم من اب الفستق البري وأضيف له الماء المقطر البارد بنسبة 2:1 وزن:حجم ثم سحق الخليط باستخدام آلة الهرس Blender لمدة عشر دقائق. بعدها جمد الخليط الناتج بإضافة النتروجين المسال ثم ترك ليذوب عند درجة حرارة الغرفة. كررت العملية ثلاث مرات. ثم رشح الخليط من خلال عدة طبقات من الشاش وفصل الجزء الرائق من الخليط باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد وبسرعة 10000 xg لمدة 15 دقيقة (Dali *et al*., 2011). جمع الجزء الرائق وعد مستخلصاً خاماً وحفظ لإجراء الإختبارات اللاحقة.

تقدير تركيز البروتين: قدر تركيز البروتين في المستخلص الخام (وفي المستخلصات الأخرى اللاحقة) باتباع طريقة لوري المعدلة (Scharcterle and Pollock, 1973) والتي تعتمد على تقدير امتصاصية المحاليل عند الطول الموجي 650 نانوميتر. وأعتمد المنحني القياسي لتراكيز مختلفة من بروتين المصل البقري تراوحت بين 0-240 مايكروغرام / ملي لتر لتقدير تركيز البروتين في المستخلصات المختلفة.

تقدير فعالية إنزيم اللايبيز: لتـقدير فعالية إنزيم اللايبيز تمت متابعة تحلل خلات البارا نيتروفنيل بتحفيز من قبل الإنزيم، إلى البارا-نيتروفينول طيـفيا حيث قيست امتصاصية المادة الناتجة من التحلل (Winkler and Stuckman, 1979). فقد أضيف 0.1 ملي لتر من المادة الأساس (خلات البارا نيترو فنيل) بتركيز1.5 ملي مولار ومحلول المستخلص الإنزيمي بحجم 0.1 ملي لتر إلى 1.8 ملي لتر من محلول الفوسفات المنظم عند pH 7.1. رج المزيج بسرعة 60xg لمدة 30 دقيقة بواسطة الهزاز الكهربائي عند درجة حرارة 37°م، ثم قيست الامتصاصية عند الطول الموجي 410 نانوميتر وباستخدام جهاز 1800 UV Spectrophotometer. حسبت الفعالية بمتابعة زيادة المادة الناتجة وبالإعتماد على المنحني القياسي للبارا-نيتروفينول الشكل (1).



الشكل 1: المنحني القياسي لتقدير البارا-نيتروفينول

$$\text{الفعالية الإنزيمية (مايكرومول / دقيقة / ملي لتر)} = \frac{10 \times [\text{بارا-نيتروفينول}]}{\text{الزمن} \times 139.11}$$

حيث: الزمن= 30 دقيقة، 10: لتحويل 0.1 ملي لتر الى 1 ملي لتر، و139.11: الوزن الجزيئي للبارا-نيتروفينول

تنقية إنزيم اللايبيز : أعتمدت عدة تقنيات في محاولة لتنقية إنزيم اللايبيز من لب الفستق البري وهي كالآتي:

1. الترسيب باستخدام كبريتات الأمونيوم: أضيفت كبريتات الأمونيوم الصلبة تدريجيا إلى محلول المستخلص الخام للب الفستق البري بدرجة تشبع 70 % مع التحريك المستمر. ترك المحلول في الثلاجة مدة 24 ساعة كي يستقر ثم فصل الراسب بجهاز الطرد المركزي المبرد وبسرعة 10000 xg لمدة 15 دقيقة، أعيدت عملية إذابة الراسب في محلول الفوسفات المنظم pH 7.1 (Dali *et al*., 2011) ثم قدر تركيز البروتين وفعالية إنزيم اللايبيز في المستخلص الناتج كما ذكر سابقا.

2. الفرز الغشائي: باستخدام انبوب السلوفان شبه النضاح (M.wt cut off = 20 KD) أجريت عملية الفرز الغشائي للمستخلص 14 مل بوضعه 500 مل في محلول الفوسفات المنظم عند pH 7.1 عند درجة 4 °م لمدة 16 ساعة مع مراعاة التحريك (بالمحرك المغناطيسي) وتغيير المحلول كل أربع ساعات. بعد ذلك قدر تركيز البروتين وفعالية إنزيم اللايبيز في المستخلص الناتج من عملية الفرز.

3. كروماتوغرافيا التبادل الأيوني: مررت عينة بحجم 7.5 ملي لتر من المستخلص الناتج من عملية الفرز الغشائي خلال عمود الفصل بالتبادل الأيوني المحضر مسبقا والذي يحتوي على الراتنج Diethyl amino ethane - cellulose (DEAE – سليلوز). ثم مرر محلول الفوسفات المنظم NaH_2PO_4- Na_2HPO_4 عند pH 7.1 بتركيز متدرج 10 - 100 ملي مولار، وجمعت الأجزاء المترشحة من نهاية العمود بمعدل 70 ملي لتر/ ساعة، بالإستعانة بمضخة الدفع المتناوب. كشف عن وجود البروتين في كل جزء بتقدير امتصاصيته عند 280 نانوميتر. كما قدرت فعالية إنزيم اللايبيز في الأجزاء التي جمعت وكما ذكر سابقا، وقد أمكن الإستدلال على القمة البروتينية التي تظهر فعالية ملموسة لإنزيم اللايبيز. ومن ثم ركزت المحاليل بتقليص حجمها بالتجفيد Lyopholizer.

4. تقدير الوزن الجزيئي بالهجرة الكهربائية: قدر الوزن الجزيئي لإنزيم اللايبيز بتطبيق الهجرة الكهربائية نوع slab electrophoresis للمستخلص البروتيني المركز الناتج من عملية التبادل الأيوني على هلام البولي أكريلامايد بوجود مادة Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) التي تعمل على إحاطة شحنات المجاميع المختلفة ضمن المركبات البروتينية مما يفسح المجال للفصل بصورة رئيسة على أساس الفرق في الوزن الجزيئي بين المركبات البروتينية المختلفة ضمن النموذج المطبق (Robyt and White, 2001).

طبقت عملية الهجرة الكهربائية على كل من النموذج والبروتينات القياسية المستخدمة. وبعد التعرف على بقع البروتينات المفصولة، المجهولة والقياسية، أعتمد المنحني القياسي الذي يمثل العلاقة بين لوغاريتم الوزن الجزيئي للبروتينات القياسية المستخدمة (اليوريز، البومين مصل الابقار، البيروكسديز، التربسين

واللايسوزايم التي لها الاوزان الجزيئية 480000، 67000، 40000، 23800 و13000 دالتون على التوالي) والمسافة التي يقطعها كل بروتين للتعرف على الوزن الجزيئي لإنزيم اللاييبيز المفصول من اب الفستق البري.

تقدير المحتوى الكاربوهيدراتي لإنزيم اللاييبيز: أجري الكشف عن وجود محتوى كاربوهيدراتي يترافق مع إنزيم اللاييبيز الناتج عن التبادل الأيوني بتطبيق كشف مولش. وقد قدرت نسبة هذا المحتوى الكاربوهيدراتي بدلالة محاليل قياسية للكلوكوز (Robyt and White, 2001).

توصيف إنزيم اللاييبيز: لتوصيف إنزيم اللاييبيز درس تأثير بعض العوامل على فعاليته كتأثير درجة الحامضية عند مدى الأس الهيدروجيني للمحلول المنظم المناسب والدرجات الحرارية المختلفة على سرعة التفاعل. فضلا عن تأثير تراكيز مختلفة للمادة الأساس (خلات البارا-نيتروفنيل) (تراوحت بين 0.125-4 ملي مولار) على سرعة التفاعل الإنزيمي.

تثبيط فعالية إنزيم اللاييبيز: أتبعت طريقة (Befani *et al*., 2001) لدراسة تثبيط فعالية إنزيم اللاييبيز بواسطة المركبين كويرستين روتينوسايد والميلاتونين. كما استخدمت تراكيز مختلفة من المادة الأساس (خلات البارا- نيتروفنيل) تراوحت بين 0.125-4 ملي مولار لدراسة نوع التثبيط .

الإختبارات الحيوانية

أ. تحديد الجرعة المؤثرة للكويرستين روتينوسايد والميلاتونين :

لتحديد جرعة التثبيط المؤثرة للكويرستين روتينوسايد والميلاتونين على فعالية اللاييبيز أعتمدت عدة مجاميع من ذكور الفئران السليمة حيث اشتملت كل مجموعة على 5 فئران وعومات فمويا بـ 0.5 مل من المحلول الفسلجي لمرة واحدة يوميا والذي يحتوي على مادة كويرستين روتينوسايد بالتراكيز 0.0 و 130.8 و261.6 و392.5 و523.3 و785 مايكروغرام /كغم وزن الجسم. كما عومات مجموعة أخرى من الحيوانات بـ 0.5 مل من المحلول الفسلجي الذي يحتوي على مادة الميلاتونين بالتراكيز 0.0، 4، 8، 12، 16 و20 مايكروغرام / كغم وزن الجسم لمدة خمسة أيام متتالية.

بعد الأيام الخمسة، سحب الدم من محجر عين الحيوان بعد تخديره بالإيثر ثم فصل مصل الدم بالطرد المركزي وقدرت فعالية إنزيم اللاييبيز فيه للتوصل إلى الجرعة الأكثر تأثيرا في خفض فعاليته.

ب. إستحداث داء السكر: استحدث داء السكر في مجموعة من الفئران السليمة والمهيأة للمعاملة بالمثبطات بحقنها بالألوكسان (بجرعة 180 ملغم/كغم من وزن الجسم مذابا بالمحلول الفسلجي) في التجويف البريتوني بعد تجويعها 24 ساعة (Miura *et al*., 1995). بعد الحقن بساعتين أعطيت ليوم واحد محلول الكلوكوز المائي بتركيز 5 % لتجنب هلاكها جراء النقص الحاد في الكلوكوز. ثم سمح لها بتناول كفايتها من العلف والماء وتم التأكد من إصابتها بالسكري بفحص الإدرار يوميا باستخدام الشريط الكاشف الخاص بذلك.

ج . معاملة الحيوانات بالجرعة المؤثرة من الكويرستين روتينوسايد والميلاتونين:

قسمت الحيوانات إلى ستة مجاميع وتضمنت كل مجموعة 5 فئران:

الأولى: الحيوانات السليمة غير المعاملة بالمثبطات.

الثانية: الحيوانات السليمة المعاملة بالجرعة الأكثر تأثيرا من الكويرستين روتينوسايد.

الثالثة: الحيوانات السليمة المعاملة بالجرعة الأكثر تأثيرا من الميلاتونين.

الرابعة: الحيوانات المستحدث فيها السكري غير المعاملة بالمثبطات.

الخامسة: الحيوانات المستحدث فيها السكري المعاملة بالجرعة الأكثر تأثيرا من الكويرستين روتينوسايد.

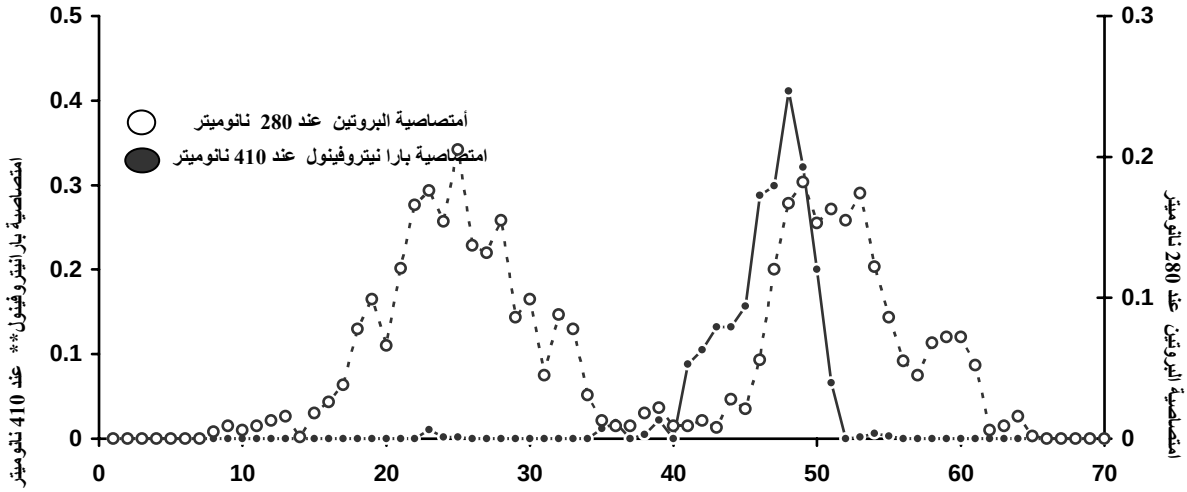
السادسة: الحيوانات المستحدث فيها السكري المعاملة بالجرعة الأكثر تأثيرا من الميلاتونين.

بعد خمسة أيام تم الحصول على مصل دم الحيوانات وقدرت فيه فعالية إنزيم اللايبيز (كما ذكر في فقرة سابقة) كما قدر مستوى كل من الكلوكوز والكوليستيرول الكلي وكوليستيرول البروتين الدهني عالي الكثافة باستخدام عدة التحليل الجاهزة Kit المجهزة من شركة Fortress الإنكليزية.

النتائج و المناقشة

كما ذكر في الجزء العملي، فقد استخدمت عدة تقنيات في محاولة لفصل وتنقية إنزيم اللايبيز في لب ثمرة الفستق البري. وتعتمد تلك الطرق على الفرق في الوزن الجزيئي والفرق في الشحنة والألفة للبروتينات التي يتضمنها المستخلص المائي للنسيج.

وكما موضح في الجدول رقم (1) فقد كانت الفعالية النوعية لإنزيم اللايبيز الخام $10^{-3}\times$ 18.5 وحدة إنزيمية / ملغم بروتين، وبعد الترسيب باستخدام كبريتات الأمونيوم ارتفعت فعاليته النوعـية إلى $10^{-3}\times$ 37.6 وحدة إنزيمية / ملغم بروتين، أي أنها تضـاعفت بمـقدار 2.032 مرة. وارتفعت الفـعالية النـوعية للإنزيم إلى10^{-3} ×61.7 وحدة إنزيمية / ملغم بروتين نتيجة لتطبيق عملية الفرز الغشائي للمستخلص الذي تم الحصول عليه من إذابة البروتين المترسب باستخدام كبريتات الأمونيوم وذلك للتخلص من كبريتات الأمونيوم التي استخدمت في الخطوة السابقة، فضلا عن التخلص من الببتيدات والأحماض الأمينية والأيونات وبعض المركبات صغيرة الوزن الجزيئي، وهذا يعني أن عملية الفرز الغشائي ضاعفت الفعالية النوعية بمقدار 3.335 مرة. ونتيجة لتطبيق كروماتوغرافيا التبادل الأيوني للمستخلص (الذي تم الحصول عليه من عملية الفرز الغشائي باستخدام عمود الفصل الحاوي على المبادل الأيوني السالب DEAE- سليلوز ومحلول الفوسفات المنظم عند pH 7.1) تم الحصول على قمة واضحة واحدة عند حجم روغان 205-255 ملي لتر كما مبين في الشكل 2 التي أظهرت فعالية نوعية لإنزيم اللايبيز مقدارها 10^{-3} × 152 وحدة إنزيمية / ملغم بروتين أي أنها تضاعفت بمقدار 8.216 مرة.



الشكل 2: المظهر الجانبي المستحصل من تنقية إنزيم اللايبيز من لب نبات الفستق البري بتقنية التبـادل الأيوني وباستخدام عمود الفصل ذي الأبعاد (2.5x40) سم والحاوي على المبـادل الأيـوني السالب DEAE-Cellulose

*** يبلغ حجم الجزء من 5-6 ملي لتر**

****بارا-نيتروفينول هي المادة التي تعكس فعالية إنزيم اللايبيز والناتجة عن تحلل خلات البارا-نيتروفنيل**

الجدول 1 : فصل إنزيم اللايبيز من لب ثمرة الفستق البري

خطـوات التنقيـــة	الحجم الكلي (مل)	البروتين الكلي (ملغم)	الفعالية الكلية وحدة إنزيمية*	الفعالية النوعية وحدة إنزيمية /ملغم بروتين	عدد تضاعف مرات التقنية	استرجاع الفعالية %
المستخلص الخام	38	364.8	6.764	18.5×10^{-3}	-	%100
الترسيب بكبريتات الامونيوم (70%)	14.1	56.54	2.13	37.6×10^{-3}	2.032	31.49
الفرز الغشائي	16.2	33.53	2.07	61.7×10^{-3}	3.335	30.60
التبادل الأيوني باستخدام DEAE سليلوز	50	11.51	1.75	152×10^{-3}	8.216	25.87

*الوحدة الإنزيمية U تشير إلى كمية إنزيم اللايبيزالتي تحرر مايكرومول واحد من بارا-نيتروفينول في الدقيقة الواحدة.

تشير الدراسات السابقة إلى وجود إنزيم اللايبيز في العديد من المصادر النباتية. فقد شخص وجوده في نخالة الرز، وتمت تنقيته بحزمة منفردة من خلال تطبيق كروماتوغرافيا التبادل الأيوني باستخدام المبادل الأيـوني DEAE - سليلوز وبفعالية نوعية قدرها 0.38 مايكرومول/ دقيقة/ ملغم بروتين، وتضاعفت فعاليته النوعيـة بمقدار 7.6 ضعف وباسترجاعية قدرها 23% (Bhardwaj *et al*., 2001). كما نقي إنزيم اللايبيز من بكتريا *Serratia marcescens* وباستخدام المبادل الأيوني كاربوكسي مثيل سـليلوز Carboxy (CM-Cellulose) methyl – Cellulose ، وكان استرجاع الفعالية 93% وعدد تضاعف مرات التنقيـة 3.06 مـرة Abdou, (2003). وارتفعت الفعالية النوعية لإنزيم اللايبيز بمقدار 17.2 مرة عند فصله بطريقـة التبـادل الأيـوني السالب باستخدام DEAE - سيفاروز من بكتريا *Antrodia cinnamomea* وبلغ استرجاع الفعالية 33.7% (Shu *et al*., 2006).

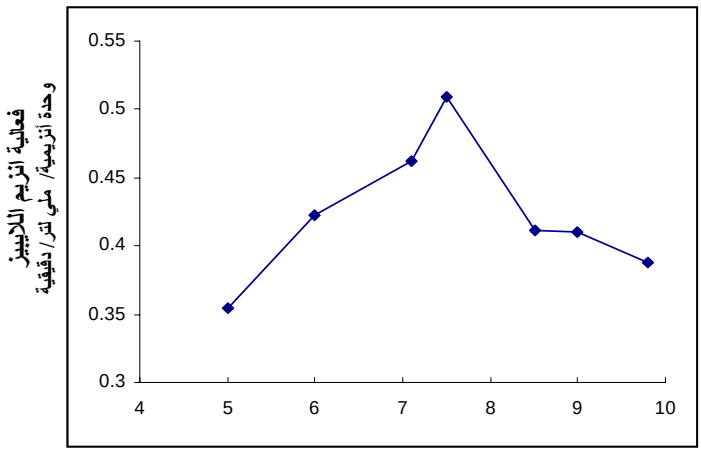
المحتوى الكاربوهيدراتي لأنزيم اللايبيز

تم الكشف عن طبيعة البروتين وتبين أنه بروتين سكري وأن نسبة المحتوى الكاربوهيدراتي المتواجد مع جزيئة إنزيم اللايبيز المنقى من لب الفستق البري بلغت 2.70%. وهذا يتوافق مع ما توصل إليه الباحث Antonian وجماعته (1988) بالنسبة لإنزيم اللايبيز المنقى من أنسجة الخنزير حيث بلغت نسبة المحتوى الكاربوهيدراتي فيه 3.84%. واختلفت النسبة بشكل واضح عند المقارنة مع المحتوى الكاربوهيدراتي لإنزيم اللايبيز المفصول من الفطر *Geotrichum candidum* وفطر *Rhizopus arrhizus* حيث كانت 7% و13-14% على التوالي (Tsujisaka *et al*., 1973; Petersen *et al*., 2001).

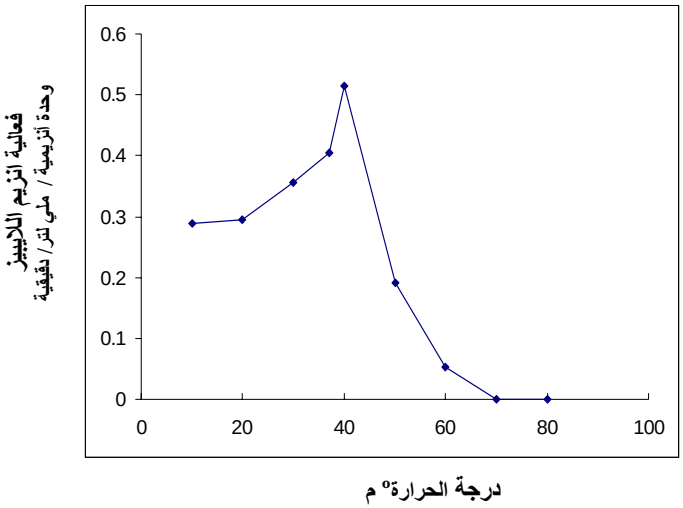
توصيف إنزيم اللايبيز:

إهتمت الدراسة بتوصيف إنزيم اللايبيز الذي ظهر في محلول روغان الحزمة المفصولة في التبادل الأيوني. وحدد الأس الهيدروجيني الأمثل الذي كان عند pH 7.5 كما مبين في الشكل 3. تشير المصادر إلى أن التـركيب ثلاثي الأبعاد للموقع الفعال للإنزيم هو المسؤول عن فعاليته. وهناك عدة عوامل تؤثر على هذا التركيب أهمها الأس الهيدروجيني، فهو المسؤول عن تكوين التركيب ثلاثي الأبعاد بطريقة خاصة لكل إنزيم أو الحفاظ عليه أو تشويهه وبالتالي التحكم بفعالية الإنزيم (McKee and McKee, 2001)، حيث أن لكل إنزيم pH خاصة به يظهر عندها أعلى فعالية وليس بالضرورة أن تكون قيمة pH خارج الجسم الحي هي ذات القيمة الفسيولوجية (Christenson *et al*., 2001).

ويبين الشكل 4 تأثير درجة الحرارة على فعالية إنزيم اللايبيز. فكما هو واضح من الشكل فإن درجة الحرارة المثلى للإنزيم كانت 40 ^{o} م، إذ أظهر الإنزيم عندها أعلى فعالية. فارتفاع درجة الحرارة يزيد من فعالية الإنزيم إلى حد معين ومن ثم تنخفض الفعالية حيث يؤدي الإرتفاع في درجة الحرارة إلى المسخ الحراري لجزيئة الإنزيم البروتينية.

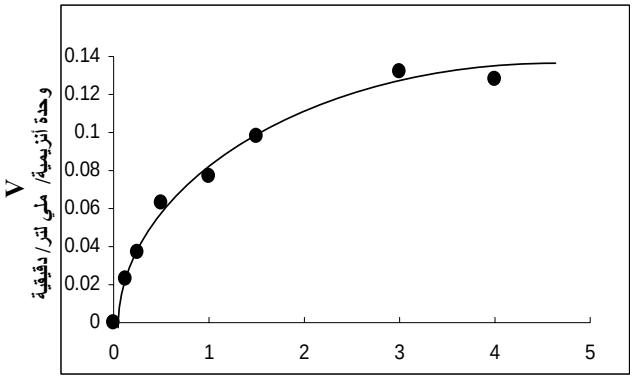


الشكل 3: تأثير الأس الهيدروجيني على فعالية إنزيم اللايبيز المنقى من اب الفستق البري باستخدام المحلول المنظم فوسفات الصوديوم

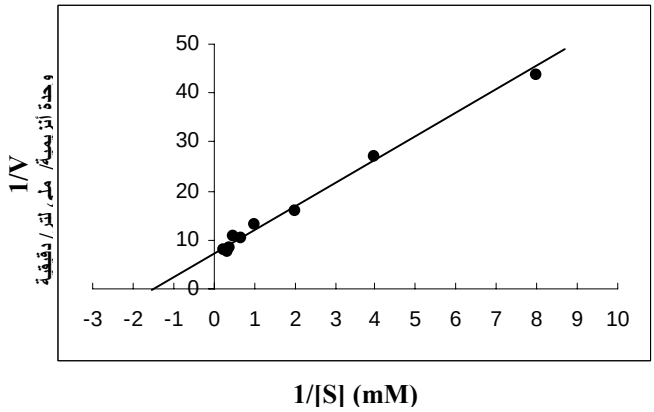


الشكل 4: تأثير درجة الحرارة على فعالية إنزيم اللايبيز المنقى من اب الفستق البري

كذلك تناولت الدراسة متابعة تأثير تركيز المادة الأساس (خلات البارا-نيتروفنيل) على فعالية إنزيم اللايبيز وذلك باستخدام تراكيز مختلفة من هذه المادة تراوحت بين 0.125-4 ملي مولار، وتبين أن قيمة K_m كانت 0.666 ملي مولار وقيمة V_{max} كانت 0.142 وحدة إنزيمية/ ملي لتر/ دقيقة للإنزيم المنقى من اللاب (الشكلين 5 و6). وقد كان الباحث Abdou (2003) قد توصل إلى أن قيمة K_m لإنزيم اللايبيز المنقى من بكتريا *Serratia marcescens* كانت 0.135 ملي مولار في حين كانت قيمة K_m لإنزيم اللايبيز المنقى من البكتريا *Bacillu stearothermophilus* 0.33 ملي مولار باستخدام بالميتات البارا-نيتروفنيل كمادة أساس (Kambourova *et al*., 2003). وهذا يعني أن قيمة K_m لإنزيم اللايبيز المعزول من اب الفستق البري عالية مقارنة بقيمة K_m للإنزيمات المعزولة من مصادر أخرى. إن القيمة العالية لـ K_m تشير إلى أن للإنزيم ألفة ضعيفة للمادة الاساس مقارنة بالإنزيم المستخلص من المصادر الأخرى إذ أن العلاقة عكسية بين قيمة K_m وألفة الإنزيم (آل فليح، 2006).



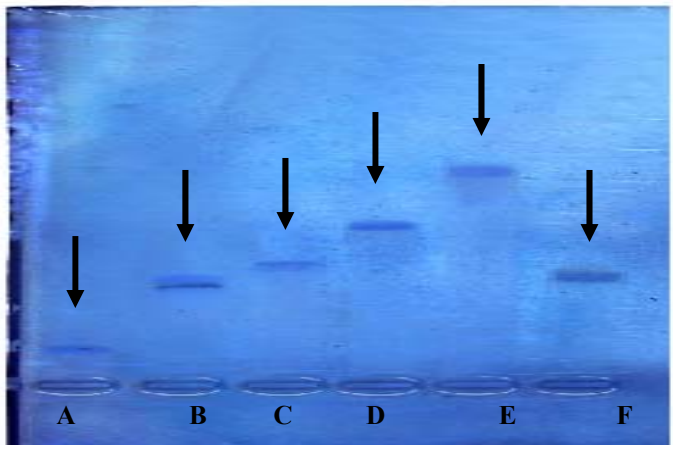
الشكل 5: تأثير تركيز المادة الأساس على فعالية إنزيم اللايبيز المنقى من اللاب بتطبيق علاقة ميكاليليس



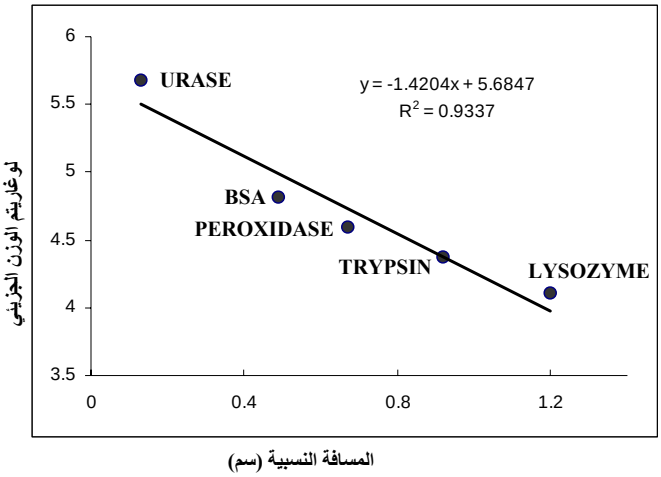
الشكل 6: تأثير تركيز المادة الأساس على فعالية أنزيم اللايبيز المنقى من اللاب بتطبيق علاقة لينويفر-بيرك

تقدير الوزن الجزيئي بالهجرة الكهربائية

كما مـبين في الشكل 7 فقد تـم الحصول على حزمة منـفردة لإنزيم اللايبيز (الموجود ضمن الحزمة المفصولة بالتبادل الأيوني) بتطبيق تقنية الهجرة الكهربائية باستخدام SDS-PAGE. وهذا يشيـر إلى أن للإنزيم متماثل واحد فقط. وقد تم التـعرف على وزنه الجزيئي بالإستعانة بالمنحني القياسي المبين في الشكل 8 ووجـد أنه يسـاوي43597 دالتون تقريبا. وبهـذا فـهو مـقارب للـوزن الجزيئـي لإنزيم اللايـبيز المنـقى مـن فطر *Rhizopus japonicus* حيث كان 42000 دالتـون (Aisaka and Terada, 1981). وقد شخص قبل ذلك متماثلين لإنزيم اللايبيز من نخالة الرز بأوزان جزيئية مختلفة بلغت 40000 دالتـون للمتماثل الاول و32000 دالتـون للمتماثل الثـاني (Aizono *et al*., 1976). كما فصل متماثلين لإنزيم اللايبيز من بكتريا *Bacillus* و*Pseudomonas* بتطبيق الهجرة الكهربائية باستخدام SDS-PAGE وقد بلغ وزنه الجزيئي 52000 و 60000 دالتون على التوالي (Shivareddy *et al*., 2010).



الشكل 7 : الهجرة الكهربائية باستخدام SDS-PAGE لأنزيم اللايبيز المنقى من أ ـ ب الفستق البرى مع البروتينات القياسية



الشكل 8 : المنحني القياسي لتقدير الوزن الجزيئي باستخدام SDS-PAGE

A : يوريز، B: البومين المصل البقري، C: بيروكسيديز، D : تريسين، E: لايسوزايم، F: إنزيم اللايبيز المنقى من اللاب.

تأثير مادة الكويرستين روتينوسايد والميلاتونين على فعالية إنزيم اللايبيز

درس التأثير التثبيطي لكل من الكويرستين روتينوسايد والميلاتونين بتراكيز مختلفة (تراوحت بين 0-150 و0-10 مايكرومولار على التوالي) على فعالية اللايبيز الموجود ضمن محلول الروغان للحزمة المفصولة بالتبادل الأيوني. فكما مبين في (الجدول 2)، بلغت نسبة التثبيط للإنزيم 59.4% عندما يكون تركيز مادة الكويرستين روتينوسايد 75 مايكرومولار والتي أدت إلى انخفاض فعالية الإنزيم إلى النصف تقريبا وهذا التركيز يمثل Inhibitor Concentration 50 (IC50). وقد تعزى القابلية التثبيطية هذه إلى كونه مركب متعدد الفينول وأن هذا النوع من المركبات يمتلك ألفة للتآصر الهيدروجيني مع البروتينات مما يؤدي إلى تغيير في الترتيب الفراغي للبروتين وبالتالي يفقد فعاليته الحيوية (Birari and Bhutani, 2007). إذ ان هناك العديد من الفلافونويدات التي تعمل على تثبيط الإنزيمات. وقد توصل الباحث Fawzy وجماعته (1988) إلى أن الكويرستين Quercitine والروتين Rutin يعملان كمثبطات كفؤة لإنزيم اللايبيز المعتمد على الكالسيوم للسائل الغضروفي Synovial fluid للإنسان. كما توصل الباحثان Lindahl و Tagesson (1997) إلى أن للكويرستين تأثيرا فعالا في تثبيط الفوسفولايبيز.

أما بالنسبة للميلاتونين، فعلى الرغم من أن تركيزه 10 مايكرومولار الا انه أعطى أعلى نسبة تثبيط 77.77% كما مبين في الجدول 2، غير أن التركيز 6 مايكرومولار، الذي أدى إلى نسبة تثبيط أقل والتي بلغت 58.58%، أعتمد في الدراسة وهو يمثل IC50 وهذا ما يعتمد في مثل هذه الدراسات. وقد أكد الباحث Kumar وجماعته (2010) تأثير مستخلص بذور نبات البليلة *Terminalia bellerica* على اللايبيز

البنكرياسي للدجاج، وأن هذا المستخلص يحوي نسبة عالية من القلويدات والتربينات. كما أكد الباحث Gholamhoseinian *et al.*, (2010) التأثير التثبيطي لمستخلصات نباتات أخرى غنية بالقلويدات (مثل بلوط العفص *Quercus infectoria* واليوكالبتوس *Eucalyptus galbie* والجنبد *Rosa damascene* والليقوسطيقون *Levisticum officinale*) على إنزيم اللايبيز البنكرياسي بنسب عالية بـلغت 85 و64 و57 و55% على التوالي.

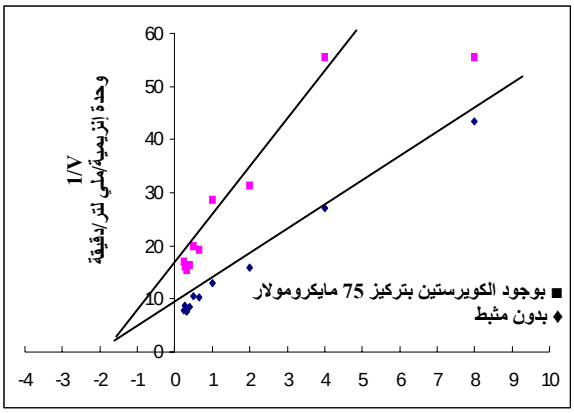
الجدول 2: تأثير مادة الكويرستين ريتينوسايد والميلاتونين في تثبيط إنزيم اللايبيز المنقى من لب الفستق البري

تركيز المثبط كويرستين روتينوسايد (مايكرومولار)	فعالية اللايبيز وحدة إنزيمية / مل	التاثير التثبيطي %		تركيز المثبط الميلاتونين (مايكرومولار)	فعالية اللايبيز وحدة إنزيمية/ مل	التاثير التثبيطي %
0	0.101	-		0	0.099	-
15	0.090	10.89		2	0.074	25.25
25	0.086	14.85		4	0.062	37.37
50	0.065	35.64		6	0.041	58.58
75	0.041	59.4		8	0.059	40.40
100	0.064	36.63		10	0.022	77.77
125	0.061	39.60				
150	0.079	21.78				

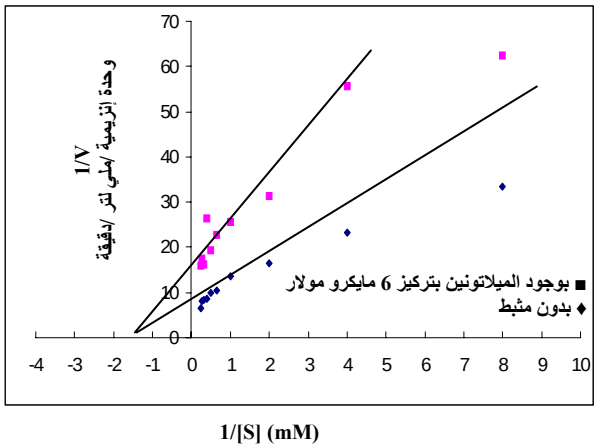
نوع التثبيط لإنزيم اللايبيز

يبين الشكلين 9 و10 أن تثبيط إنزيم اللايبيز كان من النوع غير التنافسي عند استخدام كل من المثـبط الكويرستين روتينوسايد (بتركيز75 مايكرومولار) والمثبط الميلاتـونين (بتركيـز 6 مـايكرومولار) علـى التوالي. ففي حالة استخدام الكويرستين روتينوسايد لوحظ عدم تغير قيمة K_m حيث بلغت 0.666 ملي مولار والتي تمثل القيمة الظاهرية *Km′* أيضا. في حين انخفضت قيمة V_{max} من 0.142 وحـدة إنزيمية / ملي لتر/ دقيقة بغياب المثبط إلى 0.071 وحدة إنزيمية / ملي لتر/ دقيقة بوجود المثبط. وبلغت قيمة ثابت التثبـيط K_i 1.025 ملي مولار. وعند استخدام الميلاتونين للتثبيط كانت قيمـة K_m والقيمـة الظاهريـة *Km′* للإنـزيم هي 0.714 ملي مولار، في حين انخفضت قيمة V_{max} من 0.125 وحدة إنزيمية / ملي لتر/ دقيقـة بغيـاب المثبط إلى 0.071 وحدة إنزيمية / ملي لتر/ دقيقة بوجود المثبط. وبلغت قيمة ثابت التثبيط K_i 1.006 ملـي

مولار. إن عدم تغير قيمة K_m وانخفاض V_{max} بوجود كلا من المثبطين يؤكد أن نـوع تثبيطهمـا لإنـزيم اللايبيز غير تنافسي (الدلالي، 1986).



الشكل 9: تأثير الكويرستين روتينوساييد على فعالية إنزيم اللايبيز المنقى من اب الفستق البري بتطبيق علاقة لينويفر- بيرك



الشكل 10: تأثير الميلاتونين على فعالية إنزيم اللايبيز المنقى من اب الفستق البري بتطبيق علاقة لينويفر- بيرك

من دراسة خصائص التثبيط لكل من كويرستين روتينوساييد والميلاتونين تبين أن قيمة ثابت التثبيط K_i عند استخدام المثبط الميلاتونين أقل من تلك التي للمثبط كويرستين روتينوساييد. وهذا يشير إلى أن الميلاتونين ذو تأثير تثبيطي أكبر على فعالية إنزيم اللايبيز مقارنة بالتأثير التثبيطي للكويرستين روتينوساييد.

الإختبارات الحيوانية

أ. تحديد الجرعة المؤثرة من الكويرستين روتينوساييد والميلاتونين في خفض فعالية اللايبيز في المصل:

يوضح الجدول (3) تأثير الجرع المختلفة من الكويرستين روتينوساييد والميلاتونين في خفض مستوى فعالية إنزيم اللايبيز في مصل دم ذكور الفئران السليمة. ويبين الجدول أن الجرعة الأكثر تأثيرا كانت عند تركيز 523.3 مايكروغرام كويرستين روتينوساييد و8 مايكروغرام من الميلاتونين لكل كغم وزن جسم الحيوان.

الجدول 3: تحديد الجرعة المؤثرة للكويرستين روتينوسايد والميلاتونين في خفض فعالية اللايبيز في مصل ذكور الفئران

	المعدل± الانحراف القياسي					
جرعة كويرستين مايكروغرام/كغم وزن الجسم	**0**	**130.8**	**261.6**	**392.5**	**523.3**	**785**
فعالية إنزيم اللايبيز وحدة إنزيمية/ملي لتر	d 0.17±3.80	C 0.11±3.49	d 0.18±3.95	b 0.13±2.93	a 0.07±2.24*	B 0.08±3.14
جرعة ميلاتونين مايكروغرام/كغم وزن الجسم	0	4	8	12	16	20
فعالية إنزيم اللايبيز وحدة إنزيمية/ملي لتر	d 0.17±3.80	Bc 0.07±2.92	a 0.11±2.51*	bc 0.18±2.89	c 0.12±3.13	Ab 0.10±2.70

*تشير إلى الجرعة الموثرة الحروف المختلفة أفقيا تعني وجود فرق معنوي عند مستوى لاحتمالية ≤ 0.05

ب. تأثير الكويرستين روتينوسايد والميلاتونين على المتغيرات الكيموحيوية في مصل الفئران السليمة والفئران المستحدث فيها السكري

تمت دراسة الجرعة الأكثر تأثيرا (لكل من الكويرستين روتينوسايد والميلاتونين) في مستوى كل من الكلوكوز والكوليستيرول الكلي وكوليستيرول البروتين الدهني عالي الكثافة في مصل الفئران السليمة، فضلا عن تأثيرها في مستوى اللايبيز كما مبين في (الجدول 4). وقد أعيد هذا الجزء من الدراسة على الفئران بعد استحداث داء السكري فيها حيث تشير النتائج المبينة في (الجدول 5) إلى أن حقن ذكور الفئران السليمة بالجرعة 180 ملغم/كغم من وزن الجسم من الألوكسان يؤدي إلى رفع مستوى الكلوكوز في المصل إرتفاعا معنويا ($p<0.05$)، ويعود ذلك إلى أن الألوكسان يعمل على انحلال خلايا جزر لانكرهانز البنكرياسية المنتجة للإنسولين بسبب زيادة الجذور الحرة مما يؤثر في خفض مستوى الإنسولين وهو الهرمون الذي يساعد في دخول الكلوكوز إلى داخل الخلايا وبالتالي تتحقق الإصابة بالسكري (Saravanan and Pari, 2005). كما تودي الإصابة المستحدثة بالسكري إلى زيادة معنوية ($p<0.05$) في مستوى الكوليستيرول الكلي (كما مبين في الجدول 5) الذي قد يعزى إلى ارتفاع مستوى الأحماض الدهنية الحرة الناتجة عن التحلل العشوائي للكليسيريدات الثلاثية بهدف توفير مصادر للطاقة بديلة عن الكلوكوز. وأن تراكم الأحماض الدهنية، وخصوصا المشبعة منها، يؤدي إلى تنشيط الإنزيم المنظم لبناء الكوليستيرول Hydroxy-ß-methyl glutaryl CoA reductase ß (De-Man *et al*., 1996). فضلا عن ذلك، فإن الجذور الحرة التي تتراكم بفعل الألوكسان تؤدي إلى إنتاج الأوكسي ستيرول في الدهون البروتينية واطئة الكثافة (الحامل الرئيسي للكوليستيرول) والتي بدورها تثبط فعالية المستقبلات الخاصة بهذه الجسيمات في الكبد وبالتالي

ارتفاع مستوياتها ومستوى الكوليستيرول الضار الذي تحمله (Jialal *et al*., 1991). على صعيد آخر، أدت الإصابة المستحدثة بالسكري إلى خفض مستوى كولسيتيرول البروتين الدهني عالي الكثافة HDL-C وقد يعزى ذلك إلى أن الإصابة بالسكري يصاحبها خلل في عملية تمثيل الدهون، حيث تزداد عملية انتقال أستر الكوليستيرول وكذلك البروتين الناقل لأستر الكوليستيرول Cholesterol ester transfer protein من جسيمات HDL إلى جسيمات VLDL وبالتالي تصبح جسيمات HDL مكتنزة بالكليسيريدات الثلاثية وصغيرة الحجم مما يؤدي إلى سهولة وسرعة هدمها وبالتالي فقدان بروتين apoA I (المكون المهم لتخليق جسيمات HDL) مع الادرار. ونقصان هذا البروتين يؤدي إلى انخفاض مستوى هذه الجسيمات والكوليستيرول الذي تحمله (Picto-Pictkewic *et al*., 2005). وللوقوف عند مؤشر الخطورة Risk factor الحقيقي للإصابة بالسكري، تعتمد نسبة الكوليستيرول الكلي/كوليستيرول البروتين الدهني عالي الكثافة وليس القيم المطلقة لكل منهما (Kumar *et al*., 2009) وإن ارتفاع هذه النسبة لدى الحيوانات المستحدث فيها السكري يعكس مؤشر خطورة الاصابة.

إن إستحداث السكري أدى إلى خفض مستوى إنزيم اللايبيز بشكل معنوي وكما مبين في الجدول(5). وهذا يتفق مع ما أشار إليه الباحث Taskinen (1987) عن علاقة الإنسولين بمستوى هذا الانزيم. فقد لاحظ انخفاضه لدى مرضى السكري الذين يعانون من نقص في الإنسولين. وعند المعالجة بالأنسولين ارتفع الأنزيم إلى مستواه الطبيعي. ولهذا فان للانزيم دور مهم في تمثيل دهون جسيمات الدهون البروتينية خصوصا جسيمات VLDL وجسيمات HDL. فانخفاض مستواه يؤدي إلى اضطراب في تمثيل الدهون في الجسم. كما يساهم هذا الإنزيم في تحليل الدهون الصعبة للاغشية الحيوية وبذلك تزيد من مرونتها مما يساعد في دخول المغذيات (ومنها الكلوكوز) إلى داخل الخلايا وخروج الفضلات منها (Ding *et al*., 2010).

تشير النتائج المبينة في الجدولين(4 و5) أن المعاملة بكل من الكويرستين روتينوسايد (بجرعة 523.3 مايكروغرام / كغم من وزن الجسم) والميلاتونين (بجرعة 8 مايكروغرام / كغم من وزن الجسم) تؤدي إلى تثبيط إنزيم اللايبيز والتأثير في مستويات المتغيرات الكيموحيوية الأخرى (التي تناولتها هذه الدراسة) في مصل دم الفئران السليمة والفئران المستحدث فيها السكري. وقد يعزى ذلك إلى ألفة المركبات متعددة الفينول للتآصر الهيدروجيني مع الأحماض الأمينية الموجودة ضمن جزيئة الإنزيم خصوصا المتواجدة ضمن موقعه الفعال مما يؤثر في فعاليته وبالتالي تثبيطه (Birari and Bhutani, 2007).

إن التأثير التثبيطي للكويرستين روتينوسايد والميلاتونين تجاه إنزيم اللايبيز له وجهان. فتثبيطهما إنزيم اللايبيز لا يعكس وجود علاقة ايجابية تجاه مرض السكري لإن ذلك سيؤثر في تمثيل الدهون في جسيمات الدهون البروتينية (Ding *et al*., 2010) ومن ثم فإن تثبيط إنزيم اللايبيز المعدي او البنكرياسي سيساعد في علاج السمنة وهو يساهم ايضا بشكل غير مباشر في علاج السكري خصوصا النوع الثاني منه ولذلك تستخدم مثبطات هذا الإنزيم مثل Orlistat في علاج السمنة

والسكري حـيث تعمل هذه المـادة المثبـطة ومثيلاتها عـلى تثـبيط تحلـل الكليسيريـدات الثلاثية في الجهاز الهضمي وبذلك تعيق امتصاصها مما يساهم ذلك في عدم تراكم الدهون داخل الجسم التي تعد من الأسباب الرئيسية للإصابة بالسمنة والإصابة بداء السـكري (Sharp *et al*., 2007). وقد توصل Tsujita وجماعته (2003) إلى قابلية الـ Polylysine في خفض مستوى الكليسيريدات الثلاثية في الدم من خلال تثبيطه للايبيز البنكرياسي.

تشير النتائج إلى أن المعاملة بمادتي الكويرستين روتينوسايد والميلاتونين أدت إلى خفض مستوى الكلوكوز معنويا في مصل دم الفئران السليمة والمستحدث فيها السكري. يمكن ان يعزى ذلك إلى أن هاتين المادتين هما من المركبات المضادة للأكسدة (Middleton and Kandaswami, 1993; Chen *et al*., 2003) اللتان تعملان على زيادة تقويض الكلوكوز بمسار الكلايكوليسز Glycolysis أو تثبيط مسار تخليق الكلوكوز الجديد Gluconeogenesis (Shibib *et al*., 1993)، كما يمكن أن يكون هناك تأثير في زيادة دخول الكلوكوز إلى الكبد للمساهمة في بناء الكلايكوجين (Sharkar *et al*., 1996). علما أن هذه العملية لا تحتاج إلى الإنسولين (Mckee and Mckee, 2001).

إن الكوليستيرول الكلي في مصل الحيوانات المستحدث فيها السكري قد تأثر بالمعاملة بالكويرستين روتينوسايد والميلاتونين إذ انخفض مستواه بشكل معنوي (كما مبين في الجدول 5). ويمكن أن يعزى ذلك إلى أن للمادتين تأثير في خفض مستوى الأحماض الدهنية الحرة التي تنتج عن الهدم العشوائي للكليسيريدات الثلاثية في هذه الحيوانات لأنها ساهمت في خفض الكلوكوز مما يؤدي الى دخول الكلوكوز إلى داخل الخلايا لتوفير الطاقة، وهذا يحد من إنتاج الأحماض الدهنية الحرة التي تحفز الإنزيم (HMG-CoA reductase) المنظم لتخليق الكوليستيرول (De-Man *et al*., 1996; Chang *et al*., 2004). ويمكن أن يكون لطبيعة الفلافونويدات المضادة للأكسدة دور في تحويل الكوليستيرول إلى مشتقاته وبذلك ينخفض مستواه في الدم (Panda, 2004). من ناحية أخرى أدت معاملة الحيوانات بمادتي الكويرستين روتينوسايد والميلاتونين إلى رفع مستويات كوليستيرول البروتين الدهني عالي الكثافة في مصل الحيوانات السليمة والمستحدث فيها السكري (كما مبين في الجدولين 4 و5). وقد يعزى ذلك إلى طبيعة هاتين المادتين المضادة للاكسدة حيث العلاقة ايجابية بين مستواها ومستوى كوليستيرول البروتين الدهني عالي الكثافة إذ تعمل الفلافونويدات والقلويدات على زيادة تكوين جسيمات HDL من قبل خلايا الكبد والأمعاء الدقيقة (Murray *et al*., 2009). كما أن تأثير المعاملة بهاتين المادتين الذي أدى إلى انخفاض مستوى الكوليستيرول الكلي من ناحية وارتفاع مستوى كوليستيرول البروتين الدهني عالي الكثافة يعد مؤشرا صحيا تجاه الإصابة بالسكري حيث انخفضت قيمة النسبة بين مستوى الكوليستيرول الكلي/ كوليستيرول البروتين الدهني عالي الكثافة (Kumar *et al*., 2009).

الجدول 4 : تأثير الكويرستين روتينوسايد والميلاتونين في مستويات المتغيرات الكيموحيوية في مـصل دم الفئران السليمة

المعاملات	الكلوكوز (ملي مول/لتر)	الكوليستيرول الكلي (ملي مول/لتر)	كوليستيرول البروتين الدهني عالي الكثافة (ملي مول/لتر)	الكوليستيرول الكلي / كوليستيرول البروتين الدهني عالي الكثافة	اللايبيز وحدة إنزيمية / ملي لتر
	المعدل± الانحراف القياسي				
فئران سليمة معاملة بالمحلول الملحي الفسلجي	c 0.46±6.66	A 0.11±2.42	A 0.05±0.85	c 0.30±2.82	B 0.10±3.56
فئران سليمة معاملة بالكويرستين بجرعة 523.3 مايكروغرام/كغم وزن الجسم	b 0.12±4.13	A 0.22±2.39	B 0.07± 1.15	b 0.34± 2.09	A 0.06±2.58
فئران سليمة معاملة بالميلاتونين بجرعة 8 مايكروغرام/كغم وزن الجسم	a 0.13±2.19	A 0.19±2.21	C 0.16±1.5	A 0.10±1.47	A 0.11±2.43

الجدول 5 : تأثير الكويرستين روتينوسايد والميلاتونين في مستويات المتغيرات الكيموحيوية في مـصل دم الفئران المستحدث فيها السكري

المعاملات	الكلوكوز (ملي مول/لتر)	الكولسترول الكلي (ملي مول/لتر)	كوليستيرول البروتين الدهني عالي الكثافة (ملي مول/لتر)	الكولسترول الكلي/ كولسترول البروتين الدهني عالي الكثافة	اللايبيز وحدة إنزيمية / ملي لتر
	المعدل± الانحراف القياسي				
فئران سليمة معاملة بالمحلول الملحي الفسلجي	c 0.69±6.15	Ab 0.17±2.90	B 0.05±0.9	c 0.36±3.22	C 0.08±3.47
فئران مصابة بداء السكر المتروكة من دون معاملة	d 0. 31±11.25	C 0.25±3.84	A 0.05±0.57	d 0.16± 6.55	b 0.11±2.53
فئران مصابة بداء السكر معاملة بالكويرستين بجرعة 523.3 مايكروغرام/كغم وزن الجسم	b 0.20±4.85	B 0.19±3.28	C 0.1±1.55	b 0.15±2.11	a 0.14±2.09
فئران مصابة بداء السكر معاملة بالميلاتونين بجرعة 8 مايكروغرام/كغم وزن الجسم	a 0.04±4.02	A 0.18±2.69	C 0.17±1.68	a 0.06± 1.60	b 0.19±2.42

الحروف المختلفة عموديا تعني وجود فرق معنوي عند مستوى احتمالية ≤ 0.05

المصادر العربية

آل فليح، خولة أحمد (2006). "مدخل إلى الكيمياء الحياتية". دار ابن الأثير للطباعة والنشر، الطبعة الثالثة، جامعة الموصل. ص 158.

الدلالي، باسل كامل (1986). "أساسيات الكيمياء الحيوية". مطبعة جامعة الموصل، الطبعة الأولى، ص 231 – 232.

الجواري، هايس محمد صالح (2009). "دراسة تشخيصية مقارنة للصفات المظهرية والكيميائية لأصناف الفستق *Pistacia vera* L. في محافظة نينوى". رسالة ماجستير، كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل. ص 3.

المصادر الأجنبية

Abdou, A.M. (2003). Purification and partial characterization of psychrotrophic *Serratia marcescens* Lipase. *J. Dairy Sci.*, **86**,127–132.

Agar, I.T.; Kaska, N.; Kafkas, S. (1995). Characterization of lipids in *Pistacia* species grown in Turkey. *Acta. Horticulturae.*, **419**, 417–422.

Aisaka, K.; Terada, O. (1981). Purification and properties of lipase from *Rhizopus japonicus*. *Agric. Biol. Chem*., **44**, 799–805.

Aizono, Y.; Funatsu, M.; Fuziki, Y.; Watanabe, M. (1976). Purification and characterization of rice bran lipase II. *Agric. Biol. Chem*., **40**, 317–324.

Antonian, E. (1988). Recent advances in the purification, characterization and structure determination of lipases. *Lipids*, **23**,1101-1106.

Befani, O.; Grippa, E.; Saso, L.; Turini, P.; Mondovi, B. (2001). Inhibition of monoamine oxidase by metronidazole. *Inflamm. Res*., **50**, 136-137.

Bhardwaj, K.; Raju, A.; Rajasekharan, R. (2001). Identification, purification, and characterization of a thermally stable lipase from rice bran. A new member of the (phospho) lipase family. *Plant Physiology*, **127**,1728–1738.

Birari, R.B.; Bhutani, K.K. (2007). Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: Unexplored potential. *Drug Discovery Today*, **12**, 879-889.

Chang, J.J.; Chen, T.H.; Chem, Y.T. (2004). Inhibitory effect of tanui derivatives on HMG–CoA reductase in vitro cells. *Pharmacol.*, **62**(4), 224-228.

Chen, G.; Huo, Y.; Tan, D., Liang, Z.; Zhang, W.; Zhang Y. (2003). Melatonin in Chinese medicinal herbs. *Life Sci.*, **73**,19-26.

Christenson, R.H.; Gregory, L.C.; Johnson, L.J. (2001). "Appelton and Langes Outline Review Clinical Chemistry". McGraw–Hill companies, Medical Publishing Division, Now York, 57 p.

Dali, S.; Patong, R.; Jalaluddin, M.N.; Pirman, D.; Hamzah, B. (2011). Immobilization of isolated lipase from moldy copra (*Aspergillus Oryzae). J. Chem.*, **8**(2), 896-902.

De-Man, F.H.; Cabezas, M.C.; Van-Barlingen, H.H.; Erkelens, D.W.; Debruin, T.W. (1996). Triglycerides rich lipoprotein sin non insulin dependant diabetes mellitus post-prandial metabolism and relation to premature atherosclerosis. *Eur. J. Clin. Invest.*, **26**, 89-108.

Ding, Y.L.; Wang, Y.H.; Huang, W.; Liu, G.; Ross, C.; Hayden, M.R.; Yang, J.K. (2010). Glucose intolerance and decreased early insulin response in mise with severe hypertriglyceridemia. *Exp. Biol. Med.*, **235**(1), 40-46.

Eze, S.O.; Chilaka, F.C. (2010). Lipolytic activities in some species of germinating *Cucubitaceae: Cucumeropsis Manii Naud, Colocynthis Vulgaris L. and Cucubita Moschata Schrad*. *World Appl. Sci. J.*, **10** (10), 1225-1231.

Fawzy, A. A.; Vishwanath, B. S.; Franson, R. C. (1988). Inhibition of human non-pancreatic phospholipases A_2 by retinoids and flavonoids. Mechanism of action. *Inflammation Research*, **25**(3-4), 394-400.

Gholamhoseinian, A.; Shahouzehi, B.; Sharifi-far, F. (2010). Inhibitor effect of some extracts on pancreatic lipase. *International J. Pharma.*, **6**(1), 18-24.

Gitlesen, T.; Bauer, M.; Adlercreutz, P. (1997). Adsorption of lipase on polypropylene powder. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1345**, 188-196.

Gupta, R.; Gupta, N.; Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., **64**, 763–781.

Jialal, I.; Freeman, D. A.; Grundy, S. M. (1991). Varying Susceptibility of different low density Lipoprotein to oxidative modification. *Arteisoel Thrombi*, **11**, 482 – 488.

Kambourova, M.; Kirilova, N.; Mandeva, R.; Derekova, A. (2003). Synthesis, testing and pharmacological applications of inhibitors of lipolytic enzymes: purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7. *J. Molecular Catalysis*, **22**(5-6), 307-313.

Kumar, A.; Nagtilak, S.; Sivakanesan, R.; Gunasekera, S. (2009). Cardiovascular risk factors in elderly normolipidemic acute myocardial infarct patients – acase controlled study from India. *J. Trop. Med. Public-Health*, **40**(3), 581-592.

Kumar, HS.; Bopanna, M. M.; Thimme, G.S.; Raphael, J.R.; Somanna S.H. (2010). Anti-lipase activity of ethyl acetate extract of *Terminalia bellerica Roxb*. Seeds. *Biomed. Biotech.*,**1**(1), 60-63.

Lindahl, M.; Tagesson, Ch. (1997). flavonoids as phospholipase A_2 inhibitors: Importance of their structure for selective inhibition of group II phospholipase A_2. *Inflammation*, **21**(3), 347-356 .

Mckee, T.; Mckee, J.R. (2001). "Biochemistry: An Introduction". The McGraw-Hill Companies, Inc. Wm. C. Brown Pulishers, Boston, USA, 184 p.

Middleton, E.; Kandaswami, C. (1993). "The Impact of Plant Flavonoids on Mammalian Biology": Implications for immunity, inflammation and cancer, in the flavonoids, Advances in Research Science (Ed.) Harborne, I.R., Chapman and Hall, London, pp. 619-645.

Miura, T.; Usami, M.; Tsuura, Y.; Ishida, H.; Seino, Y. (1995). Hypoglycemic and hypolipidemic effect of chitosan in normal and neonatal streptozotocin induced diabetes mice. *Biol. Pharm. Bull* ., **8**(1), 1623-1625.

Murray, R.K.; Bender, D.A.; Botham, K.M.; Kennelly, P.J.; Rodwell, V.W. ; Weil, P.A. (2009). " Harper's Illustrated Biochemistry". 28th ed., McGraw-Hill Companies, Inc., USA.

Panda, H. (2004). "Medicinal Plants Cultivation and their Uses". National Institute of industrial research, new Delhi, India, 3 p.

Petersen, M.; Fojan, P.; Petersen, S.B. (2001). How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. *J. Biotechnol.*, **85**(2),115-147.

Pikto-Pietkiewicz, W.; Wolkowska, K.; Pasierski, T. (2005). Treatment of dysliprdemia in patients diabetes mellitus. *Pharmacological Reports*, **57**, 10-19.

Pirbalouti, A.G.; Aghaee, K. (2011). Chemical composition of essential oil of *Pistacia khinjuk* stocks grown in Bakhtiari Zagross mountains, Iran. *Electronic J. Biology*, **7**(4), 67- 69.

Robyt, F.J.; White, J. B. (2001). "Biochemical Techniques, Theory and Practice". Brookes/Cole publishing company, Monterey, California.

Safari, M.; Alizadeh, H. (2007). Oil composition of Iranian major nuts. *J. Agric. Sci. Technol*., **9**, 251-256.

Sammour, R. H. (2005). Purification and partial characterization of an acid lipase in germinating lipid body linseed lings. *Turk. J. Bot*., **29**,177-184

Saravanan, R.; Pari, L. (2005). Antihyperlipidemic and antiperoxidative effect of *Disulin*, apolyherba formulation in alloxan induced hyperglycemic rats. BMC. *Complementary and Alternative Medicine.*, **5**(14), 1-8.

Scharcterle, G.R.; Pollack, R.L. (1973). Simplified method quantitative assay for small amounts of proteins in biological materials. *Anal. Biochem.*, **51**, 645-655.

Sharkar, S.; Pranava, M.; Marita, R. (1996). Demonstration of the hypoglycemic action *Momordica charantia* in a validated animals of diabetes. *Pharmacol. Res.*, **33**(1), 1- 4.

Sharp, H.; Hollinsheada, J.; Bartholomew, B.B.; Obenb, J.; Watson, A.; Nash, R.J. (2007). Inhibitory effects of Cissus quadrangular is L. derived components on lipase, amylase and glycosidase activity in vitro. *Natural Product Communications*, **2**(8), 817-822.

Shibib, B.A.; Khan, L.A.; Rahman, R. (1993). Hypoglycemic activity of *Coccina indicia* and *Momordica charantia* in diabetic rats: depression of the hepatic gluconeogenic enzymes (glu-6-ase) and (fruc-1,6-Dpas) and elevation of both liver and red cells shunt enzyme glucose-6-p dehydrogenase. *Biochem. J*., **15**, 267-270 .

Shivareddy, D.M.; Ksheerasagar, R.L.; Abhilash, M. (2010). Isolation, optimization, production and molecular characterization of lipase from *Bacillus* and *Pseudomonas* species and protein profiling. *RJPBCS*, **1**(1), 27-38.

Shu, Ch. H.; Xu, Ch. J.; Lin, G. Ch. (2006). Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. *Process Biochem.*, **41**,734–738.

Taskinen, M.R. (1987). Criteria for metabolic control and intervention in diabetes. *Diabetes*, **45**(3), 120 – 122.

Tsujisaka, Y.; Iwai, M.; Tominasa, Y. (1973). Purification, crystallization and some properties of lipase from *Geotrichum candidum* link. *Agricultural and Biol. Chem.*, **37**, 1457-1464.

Tsujita, T.; Sumiyoshi, M.; Takaku, T.; Momsen, W. E.; Lowe, M. E.; Brockman, H. L. (2003). Inhibition of lipases by polylysine. *J. Lipid Res*., **44**, 2278–2286.

Winkler, U. K.; Stuckmam, M. (1979). Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens. J. Bacteriol.*, **138**, 663-670.