------ مجلة علوم الرافدين ، المجلد 17، العدد 4، ص56-70 ، 2006-----

عزل ودراسة كيموحيوية للمركبات البروتينية الفعالة من ثمار الكزبرة (*Coriandrum sativum* Linn.)

طارق يونس احمد **منار مظهر محمود**

قسم الكيمياء

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2006/5/12 ، تاريخ القبول 2006/9/18)

الملخص

تضمن البحث عزل المركبات البروتينية من المستخلص المائي البارد لنبات الكزبرة *Coriandrum sativum* L. إذ تم فصل مركبين رئيسين (II, I) بتقنية الترشيح الهلامي للراسب ألبروتيني الناتج من الترسيب بالأسيتون البارد وكانت الأوزان الجزيئية التقريبية للمركبين بمدى 70800 و4000 دالتون.

كما تمت دراسة فعالية المستخلص المائي الخام والمركبات البروتينية المفصولة في عدد من المتغيرات الكيموحيوية في مصل الدم ومحتوى الكلايكوجين الكبدي في ذكور الفئران السليمة والمصابة بداء السكر التجريبي المستحدث بالالوكسان.

أظهرت النتائج أن المستخلص المائي الخام البارد والمركب (II) هما اللذان يمتلكان الفاعلية الأعلى في خفض كلوكوز الدم وبنسب 54.4% و50.4% كذلك في خفض مستوى كولسترول الدم وبنسب 27.8% و30.8%. كما أدى المستخلص المائي الخام إلى رفع محتوى الكلايكوجين في الكبد وبشكل معنوي في الفئران السليمة. أما بخصوص الفئران المصابة بداء السكر التجريبي فقد أظهر المستخلص المائي الخام والمركبات (I) و(II) فاعلية في خفض مستوى سكر الدم بنسب 65.8% و74.3% و49.3% وكذلك فاعلية في خفض مستوى كولسترول الدم والدهون الكلية وبشكل معنوي. كما أدى المركب البروتيني (I) إلى ارتفاع محتوى الكلايكوجين في الكبد وبشكل معنوي.

Isolation and Biochemical Study of the Active Proteinous Compounds from *Coriandrum sativum* Linn. Fruits

Tareq Y. Ahmad **Manar M. Mahmood**
Department of Chemistry
College of Science
Mosul University

ABSTRACT

The research was an attempt to isolate and study the active protienous compounds from the cold aqueous extract of *Coriandrum sativum* L. using different biochemical techniques.Two compounds I and II were isolated using gel filtration chromatography of the precipitate produced by cold acetone precipitation.The comparative molecular weights of I and II were found to be in the range of 70800 and 4000 dalton respectively.

The work also included the study of the aqueous extract and the proteinous compounds on certain blood constituents and liver glycogen in normal and alloxan-induced diabetic mice. In normal mice, blood glucose level was lowered by concentrated aqueous extract and low molecular weight proteinous compound II to 54.4% and 50.4%. The aqueous extract and compound II also reduced the level of total cholesterol to 27.8% and 30.8%, whereas only the aqueous extract produced an increase in glycogen content in the liver of normal mice. In diabetic mice, the aqueous extract and compounds I and II lowered glucose level to 65.8%, 74.3% and 49.3% and also reduced the levels of total cholesterol and total lipids significantly. In addition, compound I showed a significant increase in glycogen content in liver of diabetic mice.

المقدمة

إن الكزبرة (*Coriandrum sativum* Linn.) هو نبات عشبي عطري (أروماتي) اماـس و يعـد حوض البحر الأبيض المتوسط الموطن الأصلي للنبات. وتنتشر زراعته في جميع المناطق المعتدلة فـي أوربا ولاسيما في روسيا (جامعة الدول العربية، 1988 ;Simon et al., 1984). تحتوي أوراق الكزبرة الخضراء على فيتامين C (250 ملغرام/100 غرام) وكـاروتين (5-200 مـايكروغرام/100 غـرام) (Chakravarty, 1976)، بينما تحتوي ثمرة الكزبرة الناضجة على: ماء ودهون ونشأ وسكر وبروتينـات وألياف ومكونات معدنية (كالسيوم ، فسفور ، حديد) وزيـوت أساسـية(Diederichsen, 1996). يـشمل الجزء الطبي من النبات الثمار المجففة (حبات الكزبرة) وزيت الكزبرة (جامعة الدول العربيـة، 1988 ؛ Fleming, 1998) . وقد استخدم نبات الكزبرة منشطا ومساعدا على الهضم وطـاردا للغـازات وفاتحـا للشهية ومدررا وضد المغص والصفراء ومدرا للطمـث (مجيـد ومحمـود ، 1988 ؛ Simon et al., 1984). أما زيت الكزبرة فقد وجد انه يحفز إفراز العصارة المعدية (gastric juice) . ويمتلك خاصـية مضادة لنمو البكتريا والفطريات (Fleming, 1998) ويعمل على خفض نسبة السكر فـي الـدم (جامعـة

الدول العربية، 1988). وتمتلك الكزبرة كذلك فعالية مضادة لنمو بكتريا *Escherichia coli* التي تسبب الإصابة بالإسهال (Ono et al., 1998). وقد قام الباحثان (Gray and Flatt, 1999) بدراسة فعالية نبات الكزبرة من خلال ملاحظة تأثير المستخلص المائي للنبات في الفئران المصابة بداء السكر التجريبي وتبين من النتائج أن هذا المستخلص يحتوي على مواد مقاومة لارتفاع سكر الدم كما يعمل على زيادة إفراز الأنسولين فضلا عن احتوائه على مادة ذات تأثير شبيه بتأثير الأنسولين وفعاليته . كما وجد الباحث (إسماعيل، 2002) إن إعطاء نبات الكزبرة مع العلف أو بشكل معلق مع الماء عن طريق الفم أدى إلى خفض معنوي في مستوى سكر الدم والكولسترول لدى الجرذان السليمة والمصابة بداء السكر المستحدث بالالوكسان فضلا عن انخفاض معنوي في الدهون الكلية وارتفاع محتوى الكلايكوجين الكبدي والعضلي للجرذان المصابة .

استهدفت هذه الدراسة إلى إمكانية عزل المركبات البروتينية من المستخلص المائي لنبات الكزبرة باستخدام التقنيات الحياتية المختلفة وإيجاد الأوزان الجزيئية التقريبية لها ثم دراسة تأثير هذه المواد المفصولة في مستويات بعض المتغيرات الكيموحيوية في مصل دم الفئران المختبرية السليمة والمصابة بداء السكر المستحدث بالالوكسان .

المواد وطرق العمل

تم الحصول على حبوب الكزبرة الجافة من السوق المحلية في مدينة الموصل وصنف النبات بالاعتماد على الباحثين Chakravarty (1976) ; Diederichsen (1996) . استخدمت ذكور الفئران البيض المجهزة من (كليتي التربية والطب البيطري / جامعة الموصل) كحيوانات للدراسة كما استخدمت العدد الجاهزة (Standard kits) لقياس مستويات الكلوكوز والكولسترول والدهون الكلية في مصل الدم.

تحضير المستخلص المائي الخام: تم وزن (1000) غرام من حبوب الكزبرة الجافة وطحنت باستخدام آلة الطحن (blender) مدة (5) دقائق للحصول على مسحوق ناعم عرض لغاز النتروجين المسال بعدها ترك النبات مدة (30) دقيقة في درجة حرارة المختبر أعيدت العملية مرات عدة بعد ذلك مزج مسحوق النبات مع المحلول المنظم (0.1M KH2PO4) عند الرقم الهيدروجيني (pH 7) بنسبة (V/W 3:1) ثم ترك المزيج ساعتين تحت تأثير المحرك الكهربائي وباستخدام الحمام الثلجي ، رشح المزيج من خلال طبقات عدة من الشاش وفصل المستخلص المائي الخام بجهاز الطرد المركزي المبرد مدة (15) دقيقة وبسرعة (6000 xg) للتخلص من المواد العالقة وغير الذائبة وتم تقدير كمية البروتين في الراشح بطريقة لاوري المحورة (Schacterle and Pollack, 1973) .

عزل وترسيب البروتين باستخدام المذيب العضوي: تم استخدام الأسيتون البارد في عملية عزل وترسيب البروتين من المستخلص المائي الخام للكزبرة، إذ تمت إضافة الأسيتون إلى المستخلص المائي الخام بنسبة (40:60) على التوالي وببطء مع التحريك المستمر عند درجة حرارة (4) مئوية ثم تـرك المـزيج فـي الثلاجة لمدة (24) ساعة لكي يتم الترسيب على نحو كامل ، أجريت بعد ذلك عملية الفصل بجهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة (6000 xg) ولمدة (15) دقيقة بعد ذلك وضع الراسب ألبروتيني بجهاز التجفيـد (Lyophilizer) للحصول عليه بشكل مسحوق.

أذيب الراسب ألبروتيني الذي تم الحصول عليه في (100) مليلتر من المحلـول المـنظم [0.1M KH2PO4 - [pH 7] ثم قدرت كمية البروتين بطريقة لاوري المحورة وبذلك أصبح المحلـول جـاهزا لإجراء تقنية الترشيح الهلامي (Robyt and White, 1987) .

الأعمدة المستخدمة: تم استخدام عمودين من أعمدة الفصل في هذه المرحلة، الأول: عمـود الفـصل ذي الأبعاد (4.3 × 63) سم لفصل الأجزاء البروتينية والثاني عمود الفصل ذي الأبعاد (2 × 94) سم لتقدير الوزن الجزيئي التقريبي للمركبات البروتينية المفـصولة (Andrews, 1964) واسـتخدام مـادة الهـلام (Sephadex G-75) في المحلول المنظم لتعبئة الأعمدة.

حقن الحيوانات بالمادة البروتينية والمستخلص الخام: منعت الفئران من الأكل مدة (16) سـاعة قبـل اعطائها الجرعة (Neef et al., 1995) ثم حقنت عبر التجويف البريتوني (intraperitoneally) بجرعـة مقدارها (100 ملغم/كغم) من وزن الجسم بالمستخلص المائي الخام والمركبات البروتينية المفصولة بتقنية الترشيح الهلامي وبعد ساعتين من إجراء عملية الحقن تم سحب الدم من جيب محجر العين وتـم تقـدير مستوى الكلوكوز والكولسترول في اليوم نفسه .

جمع عينات الكبد: تم عزل نسيج الكبد وحفظت العينات في عبوات بلاستيكية جافـة عنـد درجـة حرارة (-20)° م لتقدير محتوى الكلايكوجين (Plummer, 1978).

استحداث داء السكر في ذكور الفئـران : تم استحداث داء السكر التجريبي في ذكور الفئـران باسـتخدام الألوكسان (Atta et al., 1983) وتم التأكد من حدوث داء السكر، وذلك بفحص الإدرار بواسطة شـرائط الفحص [PANREAC QUIMICA SA , E.U] وعدت الفئران التي ظهر فيها مستوى كلوكـوز الـدم أعلى من 300 ملغرام/100 مليلتر (16.65 ملي مول/لتر) مصابة بداء الـسكر (Miura et al., 1995). وتم إعطاء الفئران بعد حقنها بالالوكسان (5%) كلوكوز مع ماء الشرب إلى اليوم التالي وذلـك بـسبب مرورها بطور نقص السكر نتيجة لتحرر كميات كبيرة من الأنسولين. وتم توزيع الفئران المصابة إلـى ثلاث مجموعات تضم كل مجموعة أربع فئران، إذ تم وزن الفئران ومنعهـا عـن الأكـل لمـدة (16) ساعة(Ahmad and Al-Chalabi, 2002) ثم حقنت بالمستخلص المائي الخـام والمركبـات البروتينيـة

المفصولة بجرعة مقدارها (100) ملغرام/كغم من وزن الجسم، فضلاً عن مجموعة رابعة ضمت أربـع فئران مصابة بداء السكر عدت مجموعة سيطرة وحقنت بالمحلول الفسلجي فقط. وبعد مرور ساعتين تـم تخدير الفئران بالا يثر وسحب الدم من جيب محجر العين ثم عزل نسيج الكبد بعدها قدرت كمية الكلوكوز والكولسترول والدهون الكلية والكلايكوجين كما ذكر سابقا .

التحليل الإحصائي: تم تحليل البيانات باستخدام الطرق القياسية حيث تم إيجاد المعدل والخطأ القياسي. كما تم مقارنة المعاملات باستخدام اختبار تحليل التباين واختبار دنكن عند مستوى احتمالية($p \leq 0.05$) . (Steel and Torrie, 1980)

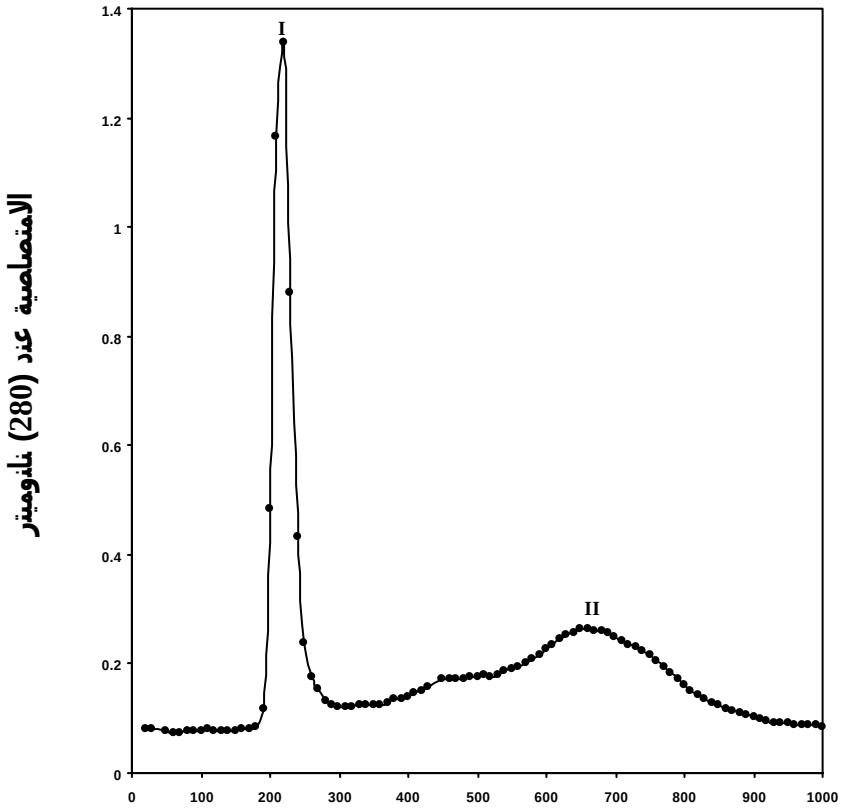
النتائج والمناقشة

يوضح الجدول (1) كمية البروتين الكلي في المستخلص المائي البارد والراسب ألبروتينـي النـاتج وكفاءة الترسيب .

الجدول 1: كمية البروتين الكلي في المستخلص المائي لنبات الكزبرة والراسب ألبروتيني وكفاءة الترسيب

كمية البروتين الكلي في المستخلص المائي الخام (غم/1 كغم كزبرة)	كمية البروتين الكلي في الراسب ألبروتيني (غم/1 كغم كزبرة)	كفاءة الترسيب (%)
24.19	22.48	93

تجزئة البروتين الكلى بتقنية الترشيح الهلامي: أعطى روغان راسب الأسيتون قمتين واضـحتين عنـد إمراره في عمود الفصل ذي الأبعاد (4.3 × 63) سم والحاوي على مـادة الهـلام (Sephadex G-75) بارتفاع (48)سم والموضحة في الشكل (1) اذ ان حجم روغان المركب ألبروتينـي (I) = 220 مليلتـر وحجم روغان المركب البروتيني (II) = 650 مليلتر.



الشكل 1: المظهر الجانبي لروغان الراسب الناتج من الترسيب بالأسيتون البارد بتقنية الترشيح الهلامـي باستخدام عمود الفصل ذي الأبعاد (4.3 × 63) سم والحاوي للهلام نوع Sephadex G-75

وبعد فصل الأجزاء البروتينية تم تقدير كمية البروتين بطريقة لاوري المحورة وكما موضـح فـي الجدول (2) .

الجدول 2: كمية البروتين الكلي والنسب المئوية للمركبات البروتينية المفصولة.

المركب ألبروتيني	كمية البروتين غم/كغم كزبرة	النسبة المئوية (%)
المركب ألبروتيني I	11.46	50.97
المركب ألبروتيني II	8.47	37.67

تقدير الوزن الجزيئي التقريبي للمركبات البروتينية باستخدام تقنية الترشيح الهلامي :

لغرض تعيين الوزن الجزيئي التقريبي للمركبات المفصولة بتقنية الترشيح الهلامـي تـم اسـتخدام عمود الفصل ذي الأبعاد (2 × 94) سم والحاوي على مادة الهلام (Sephadex G-75) وبارتفـاع (84)

سم، تم إمرار عدد من المواد ذات الأوزان الجزيئية المعلومة، تراوحت أوزانها الجزيئية بين (204-67000) دالتون وعند رسم حجم الروغان (elution volume) لكل مادة مقابل لوغاريتم الوزن الجزيئي لها تبين ظهور خط مستقيم، من خلاله تم تحديد الوزن الجزيئي التقريبي للمركبات البروتينية (II, I) المفصولة بتقنية الترشيح الهلامي وكانت بمدى (70800) و (4000) دالتون على التوالي (محمود، 2004).

اختيار الطريق الأمثل في الحقن: من خلال الدراسات السابقة التي اجريت من اجل اختيار الطريق الأمثل في اعطاء الجرعة الفعالة في خفض مستوى السكر في حيوانات التجارب باختيار وسيلتين من وسائل الحقن المذكورة آنفاً في إعطاء الجرع وهي تحت الجلد (SC) وفي التجويف البريتوني (IP)، وجد أن التجويف البريتوني هو الطريق الأمثل في إعطاء الجرع (Ahmad and Al-Chalabi, 2002).

تأثير المستخلص المائي الخام والمركبات المفصولة في مستوى كلوكوز الدم: أوضحت النتائج المشار إليها في الجدول (3) إن حقن مجموعة من الفئران بالمستخلص المائي الخام لنبات الكزبرة بجرعة 100 ملغم/كغم من وزن الجسم عن طريق التجويف البريتوني (IP) قد أدى إلى حدوث انخفاض معنوي بنسبة (54.4%) في مستوى سكر الدم مقارنة بمجموعة السيطرة. وهذا يتفق مع نتائج الدراسة التي أجراها الباحثان Chithra و Leelamma عام (1999) لمعرفة تأثير نبات الكزبرة على ايض السكريات لدى الجرذان الطبيعية والتي أعطيت غذاء عالي الكولسترول وأكدت امتلاك الكزبرة تأثيراً خافضاً لسكر الدم وبشكل معنوي.

الجدول 3: تأثير المستخلص المائي لنبات الكزبرة والمركبات البروتينية في مستوى الكلوكوز والكولسترول والدهون الكلية والكلايكوجين في ذكور الفئران السليمة .

المعاملات	مستوى كلوكوز الدم (ملي مول/لتر)	مستوى كولستيرول الدم (ملي مول/ لتر)	مستوى الدهون الكلية (ملغرام/100 مليلتر)	محتوى الكلايكوجين في الكبد(ملغرام/غرام)
سيطرة	0.48 ± 6.2 b	0.44 ± 3.35 a	40.4 ± 427.7 a	0.1 ± 2.87 A
المستخلص المائي الخام لنبات الكزبرة (100 ملغم/كغم)	0.40 ± 2.83 a	0.15 ± 2.42 bc	18.0 ± 415.2 a	0.2 ± 3.49 B
المركب البروتيني (I) لنبات الكزبرة (100 ملغم/كغم)	0.50 ± 8.04 c	0.20 ± 3.18 ab	15.2 ± 367.1 a	0.03 ± 2.93 A
المركب البروتيني(II) لنبات الكزبرة (100 ملغم/كغم)	0.29 ± 3.08 a	0.16 ± 2.32 c	16.2 ± 369.9 a	0.02 ± 2.75 A

- الحروف المختلفة عمودياً تعني فرق معنوي عند مستوى احتمالية ($p \leq 0.05$)، كل مجموعة تضم 4 فئران القيم تمثل المعدل ± الخطأ القياسي .

إن التأثير الخافض للمستخلص المائي الخام لنبات الكزبرة في مستوى سكر الدم قد يعزى إلى احتوائه على مواد فعالة ذات تأثير مشابه للأنسولين (Insulin-like Action) ومواد أخرى تحفز إفراز الأنسولين من خلايا بيتا البنكرياسية (Gray and Flatt, 1999) أو زيادة تمثيل الكلوكوز عن طريق عملية تحليل السكر اللاهوائي (Glycolysis) ومسار البنتوزفوسفيت (Chithra and Leelamma, 1999) او إلى زيادة سرعة تكوين الكلايكوجين الكبدي من الكلوكوز المحيطي الدائر في الدم(Sarkar et al., 1996). ويمكن أن يعزى السبب في ذلك أيضا إلى احتواء نبات الكزبرة على التانين (Uma-Pradeep et al., 1993) الذي يعمل على تحفيز إفراز الأنسولين إذ أشارت الدراسة التي أجراها الباحثون Gray واخرون عام (2000) إلى إن مادة حامض التانيك (Tannic Acid) الموجودة في المستخلص المائي لنبات البلسان *Sambucus nigra* عملت على تحفيز إفراز الأنسولين.

تأثير المستخلص المائي الخام في محتوى الكلايكوجين في الكبد: أظهرت النتائج الموضحة في الجدول (3) إن المستخلص المائي الخام لنبات الكزبرة بجرعة (100ملغم/كغم من وزن الجسم) أدى إلى ارتفاع معنوي في محتوى الكلايكوجين مقارنة بمجموعة السيطرة .

إن السبب في ذلك قد يعود إلى قدرة المستخلص على تنشيط عملية بناء الكلايكوجين من خلال زيادة فاعلية أنزيم glycogen synthetase وتثبيط عملية تحلل الكلايكوجين (glycogeneolysis) وتكوين الكلوكوز من مصادر غير سكرية (التكوين الجديد للكلوكوز) (Chithra and Leelamma, 1999) او تحرير الأنسولين من خلايا بيتا في البنكرياس (Fernando et al., 1998) .

تأثير المستخلص المائي الخام في مستوى الكولسترول والدهون الكلية في الدم: أظهرت النتائج الموضحة في الجدول (3) إن المستخلص المائي الخام بجرعة 100ملغم/كغم من وزن الجسم أدى إلى حدوث انخفاض معنوي في مستوى كولسترول الدم بينما لم يؤد إلى انخفاض معنوي في مستوى الدهون الكلية مقارنة بمجموعة السيطرة.

إن الانخفاض بمستوى كولسترول الدم يتفق مع نتائج الدراسة التي أجراها الباحثان Chithra and Leelamma (1997) على الجرذان الطبيعية التي أعطيت غذاء عالي الكولسترول وبينت امتلاك الكزبرة تأثيراً خافضاً لمستوى كولستيرول الدم ولعل السبب في ذلك قد يعود إلى تثبيط أنزيم β-Hydroxy-β Methyl Glutaryl-CoA Reductase المسؤول عن بناء الكولسترول.

تأثير المركبات البروتينية المفصولة (I , II): يتبين من الجدول (3) إن المركب ألبروتيني (I) بجرعة (100ملغم/كغم من وزن الجسم) لم يظهر أي تأثير معنوي على محتوى الكلايكوجين في الكبد ولكنه اظهر ارتفاعاً معنوياً في مستوى سكر الدم مقارنة بمجموعة السيطرة. أما المركب ألبروتيني (II) بجرعة 100 ملغم/كغم من وزن الجسم فقد سبب انخفاضاً معنويا في مستوى سكر الكلوكوز وبنسبة (50.44%)

وقد يعزى السبب في ذلك إلى إن المركب ألبروتيني (II) له تـأثير مـشابه للأنـسولين (Insulin-like action) (Gray and Flatt, 1999) او انه قد يحتوي على تسلسل الأحماض الامينية على نحـو مـشابه للأنسولين (Insulin-like structure) إذ يرتبط بمستقبلات الأنسولين ويخفض مستوى كلوكـوز الـدم او يقوم بكليهما (Ahmad and Al-Chalabi, 2002).

إن نسبة الانخفاض التي سببها المركب ألبروتيني (II) في مستوى سكر الدم كانت اقل من النـسبة التي أحدثها المستخلص المائي الخام وبالجرعة نفسها ويعزى السبب في ذلك إلى احتواء المستخلص الخام على مركبات أخرى تسهم في آلية خفض سكر الدم (الجدول 3). أما بالنسبة لمحتوى الكلايكـوجين فـي الكبد فلم يبدِ المركب ألبروتيني (II) أي تغيير معنوي يذكر.

إن إعطاء المركب ألبروتيني (I) بجرعة 100 ملغم/كغم من وزن الجسم لم يؤثر علـى مـستوى الكولسترول والدهون الكلية وكذلك المركب ألبروتيني (II) وبالجرعة نفسها فيما عدا انه اظهـر تـأثيراً معنوياً في خفض مستوى الكولسترول وبنسبة (30.8%) كما موضح في الجدول (3). وقد يفسر الـسبب في ذلك أن المركب ألبروتيني أدى إلى توقف بناء الكولسترول او عمل على زيادة سرعة تخلص الجـسم من الكولسترول كما أن التأثير المشابه للأنسولين للمركب ألبروتيني (II) قد يساعد في خفـض مـستوى الكولسترول (Khan et al., 2003). إن فاعلية المركب ألبروتيني (II) في خفض مـستوى سـكر الـدم والكولسترول تتشابه مع فعالية المركب Chitosan في خفض مستوى سكر الدم والكولسترول لدى الفئران الطبيعية (Miura et al., 1995).

داء السكر المستحدث بالالوكسان: لغرض اختبار تأثير المستخلص المائي الخام والمركبات البروتينيـة المعزولة من نبات الكزبرة في مستوى كلوكوز الدم في الحيوانات المصابة بداء السكر، استخدم الالوكسان لاستحداث داء السكر التجريبي في الحيوانات المختبرية، اذ يعمل الالوكسان على تحطيم كبير لخلايا بيتـا في جزر لانكرهانز مما يسبب انخفاضاً في إنتاج وإفراز الأنـسولين (Nammi et al., 2003) وبالتـالي إحداث داء السكر التجريبي ونتيجة لذلك يتوقف إدخال الكلوكوز إلى الخلايا ومـن ثـم عمليـة أيـضه (Holm, 1997) .

إن نتائج الدراسة (الجدول 4) تشير إلى ان الفئران التي حقنت بالالوكسان أظهرت زيـادة معنويـة كبيرة في مستوى سكر الدم مقارنة بالفئران السليمة بعد عشرة أيام من المعاملة بالالوكسان وهذا يتفق مع الدراسات السابقة (الخشاب ، 1999 ؛ Ahmad and Tohala 2005) فـي الفئـران و (Ayoub et al., 2000) في الجرذان .

الجدول 4: تأثير المستخلص المائي لنبات الكزبرة والمركبات البروتينية في مستوى الكلوكوز والكولسترول والدهون الكلية والكلايكوجين في ذكور الفئران المصابة بداء السكر التجريبي المستحدث بالالوكسان

المعاملات	مستوى كلوكوز الدم (ملي مول/لتر)	مستوى كولستيرول الدم (ملي مول/ لتر)	مستوى الدهون الكلية (ملغرام/100 مليلتر)	محتوى الكلايكوجين في الكبد ملغرام/غرام)
سيطرة (مصابة بداء السكر)	2.7 ± 21.10 c	0.6 ± 4.73 a	31.5 ± 535.5 c	0.3 ± 1.57 A
المستخلص المائي الخام لنبات الكزبرة (100 ملغم/كغم)	0.1 ± 7.20 ab	0.3 ± 2.70 b	10.85 ± 365.6 b	0.06 ± 1.50 A
المركب البروتيني (I) لنبات الكزبرة (100 ملغم/كغم)	0.3 ± 5.42 a	0.3 ± 2.47 b	24.7 ± 248.6 a	2.7 ± 6.65 B
المركب البروتيني (II) لنبات الكزبرة (100 ملغم/كغم)	1.7 ± 10.69 b	0.4 ± 2.05 b	28.7 ± 328.0 ab	1.3 ± 3.50 Ab

- الحروف المختلفة عمودياً تعني فرق معنوي عند مستوى احتمالية ($p \leq 0.05$)، كل مجموعة تضم 4 فئران القيم تمثل المعدل ± الخطأ القياسي .

ولوحظ كذلك أن استحداث داء السكر التجريبي أدى إلى زيادة معنوية في مستوى الكولسترول وهذا يتفق مع دراسات سابقة (الامين، 2001؛ اسماعيل، 2002 ؛ Maechler et al., 1992) وكذلك زيادة معنوية في مستوى الدهون الكلية وتتطابق هذه النتيجة مع الدراسة التي أجريت في ذكور الجرذان المصابة بداء السكر المستحدث بالالوكسان (عبد المانع، 2002 ؛ Ayoub et al., 2000) أما بالنسبة لمحتوى الكلايكوجين في الكبد فقد أدى إحداث داء السكر في الفئران إلى حدوث انخفاض معنوي في محتوى الكلايكوجين الكبدي وهذا يتفق مع دراسات سابقة (اسماعيل، 2002) في الجرذان المصابة بداء السكر التجريبي .

تأثير المستخلص المائي الخام والمركبات البروتينية المفصولة في عدد من المتغيرات الكيموحيوية في الفئران المصابة بداء السكر التجريبي المستحدث بالالوكسان :

أدت معاملة الفئران المصابة بداء السكر المستحدث بالالوكسان بالمستخلص المائي الخام لنبات الكزبرة بجرعة 100 ملغم/كغم من وزن الجسم إلى حدوث انخفاض معنوي في مستوى سكر الدم كما موضح في الجدول (4). وتتفق هذه النتائج مع نتائج الدراسة التي أجراها الباحثان Gray and Flatt, (1999) والتي أشارت إلى أن معاملة الفئران المصابة بداء السكر المستحدث بالستربتوزوتوسين بالمستخلص المائي لنبات الكزبرة أدت إلى حدوث انخفاض معنوي في مستوى سكر الدم وكذلك الدراسة التي أجراها الباحثون (Swanston -Flatt et al., 1990) والتي أشارت إلى قدرة نبات الكزبرة على خفض مستوى سكر الدم في الفئران المصابة بداء السكر المستحدث بالستربتوزوتوسين مقارنة بمجموعة السيطرة المصابة. ويفسر هذا الانخفاض في مستوى سكر الدم الى احتواء المستخلص المائي الخام على مواد فعالة تعمل على زيادة إفراز هرمون الأنسولين من بقية خلايا بيتا غير المحطمة ومواد ذات تأثير شبيه بالأنسولين تعمل على زيادة أكسدة الكلوكوز وأيضه داخل الخلايا (Gray and Flatt, 1999) فمن المعروف أن الأنسولين يزيد من معدل دخول الكلوكوز إلى داخل الخلايا من خلال زيادة عدد نواقل الكلوكوز في الغشاء البلازمي وذلك بزيادة معدل تحريكها خلال الغشاء (Ashcroft and Ashcroft, 1992) أو أن المستخلص يعمل على تثبيط انزيم (β-glucosidase) في القناة الهضمية (Chen et al., 2001).

أما بخصوص محتوى الكلايكوجين في الكبد فلم يبدِ المستخلص المائي الخام لنبات الكزبرة وبالجرعة نفسها أي تغيير معنوي يذكر، في حين أظهرت الدراسة التي أجراها الباحثان Gray and Flatt (1999) زيادة تحول الكلوكوز إلى كلايكوجين لدى الفئران المصابة بداء السكر التجريبي المستحدث بالستربتوزوتوسين المعاملة بالمستخلص المائي لنبات الكزبرة مقارنة بمجموعة السيطرة المصابة المتروكة بدون معاملة وقد يعزى السبب في ذلك إلى قدرة المستخلص على زيادة استهلاك الكلوكوز المحيطي (Matti, 2001).

تأثير المستخلص المائي الخام في مستوى الكولسترول والدهون الكلية في الدم:

أدت الجرعة 100 ملغم/كغم من وزن الجسم من المستخلص المائي الخام لنبات الكزبرة إلى حدوث انخفاض معنوي في مستوى الكولسترول والدهون الكلية في الفئران المصابة بداء السكر المستحدث بالالوكسان مقارنة بمجموعة السيطرة المصابة كما موضح في الجدول (4). وهذا يتفق مع ما وجده الباحث إسماعيل (2002) من أن معاملة الجرذان المصابة بداء السكر المستحدث بالالوكسان بنبات الكزبرة ولمدة أربعة أسابيع وبالتركيزين (5غم/كغم علف) و (10غم/كغم علف) أحدثت انخفاضاً معنوياً في مستوى الكولسترول والدهون الكلية. وقد يعزى السبب في انخفاض الكولسترول إلى قدرة المستخلص المائي الخام على تثبيط أنزيم

intestinal acyl-CoA: cholesterol acyl transferase المسؤول عن امتصاص الكولسترول من الأمعاء (Maechler et al., 1992).

أما بخصوص الدهون الكلية فان التأثير الخافض للمستخلص المائي ربما يعود السبب فيه إلى رفع فعالية الأنسولين الداخلي؛ إذ كلما كان ايض الكلوكوز طبيعياً فان ايض الدهون يصبح طبيعياً أيضا (Khan et al., 2003) .

تأثير المركبات البروتينية المفصولة (I, II): أظهرت النتائج الموضحة في الجدول (4) إن المركب ألبروتيني (I) بجرعة 100 ملغم/كغم من وزن الجسم أدى إلى حدوث انخفاض معنوي كبير في مستوى سكر الدم وبنسبة (74.3%) كما انه أدى إلى حدوث ارتفاع معنوي لمحتوى الكلايكوجين في الكبد مقارنة بمجموعة السيطرة المصابة غير المعاملة.

إن التأثير الخافض لمستوى سكر الدم للمركب ألبروتيني (I) للفئران المصابة دون السليمة مشابه لما أشار إليه الباحث عبد المانع عام (2002)، إذ وجد أن الراسب ألبروتيني الناتج عن المستخلص المائي البارد لأوراق نبات السبحبح بجرعة 5 ملغم/كغم من وزن الجسم أدى حدوث انخفاض معنوي في الجرذان المصابة دون السليمة. ولعل السبب في ذلك قد يعود إلى أن فعالية المركب ألبروتيني (I) تظهر في حالة الاضطراب الايضي إذ انه بزيادة الكلوكوز في الدم فانه يعمل على خفضه بآليات مختلفة من اجل تحسين السيطرة الايضية او انه قد يعمل على تفعيل بعض خلايا بيتا المحطمة جزئياً على إفراز الأنسولين (عبد المانع، 2002). كما أدى المركب ألبروتيني (I) وبالجرعة نفسها إلى حدوث انخفاض معنوي لمستوى الكولسترول في الدم وبنسبة (47.9%) مقارنة بمجموعة السيطرة المصابة وقد يعزى هذا التأثير إلى أن المركب (I) أدى إلى تثبيط أنزيم (β-Hydroxy- β-methyl glutaryl Co A Reductase) المسؤول عن بناء الكولسترول ، كما أن المركب (I) احدث انخفاضاً معنوياً في مستوى الدهون الكلية وبنسبة (53.5%) وتفسير ذلك ان المركب (I) قد تكون له القدرة على تحلل الدهون وبشكل قوي (Khan et al., 2003). أما المركب ألبروتيني (II) بجرعة 100 ملغم/كغم من وزن الجسم فقد أدى إلى حدوث انخفاض معنوي في مستوى سكر الدم وبنسبة (49.3%) كما موضح في الجدول (4)، أما بخصوص محتوى الكلايكوجين في الكبد فلم يظهر أي تغيير معنوي يذكر. كما أدى إعطاء المركب ألبروتيني (II) وبالجرعة نفسها إلى حدوث انخفاض معنوي في مستوى كولسترول الدم بنسبة (56.7%) وكذلك الى حدوث انخفاض معنوي بنسبة (38.7%) في مستوى الدهون الكلية.

من النتائج المشار إليها يتبين انه قد يكون للمركب ألبروتيني (II) خواص مشابهة للأنسولين نفسه (Jachak, 2002) فقد أدى إلى خفض مستوى سكر الدم (21.09 ← 10.68 ملي مول/لتر) عن طريق زيادة دخول الكلوكوز إلى داخل الخلايا وتسريع أيضه عن طريق التأثير في الأنزيمات الخاصة (Platel and Srinivasan, 1997) فضلاً عن كون إعطاء الجرعة عن طريق البريتون أدى إلى وصولها كاملة

ومن دون نقص ولكنه قد يحتاج إلى أكثر من ساعتين بعد الحقن لإرجاع مستوى السكر إلى الحد الطبيعي. أما بخصوص مستوى الكولسترول في الدم فقد يعزى الانخفاض فيه بعد المعاملة بالمركب (II) إلى احتمالية تثبيط المركب ألبروتيني (II) إلى أنزيم Intestinal Acyl-CoA: Cholesterol Acyl Transferase الذي يثبط بالأنسولين أيضا (Maechler et al., 1992) وكذلك الانخفاض بمستوى الدهون الكلية قد يعزى إلى زيادة نشاط فعالية انزيم لايبوبروتين لايبيز (Lipoprotein Lipase) المسؤول عن إزالة الكليسريدات الثلاثية الذي ينشط بوجود الأنسولين (Ashcroft and Ashcroft, 1992).

ان نتائج الدراسة التي تم الحصول عليها مشابهة لنتائج دراسات عدة تناولت عزل مركبات فعالة مشابهة للأنسولين من النباتات فقد قام الباحثون Collier واخرون عام (1987)، بعزل وتنقية مركب شبيه بالأنسولين من نبات السبانخ Spinach ونبات عدس الماء *Lemna gibba* يمتلك كلاهما وزن جزيئي تقريبي (6) كيلو دالتون وخواص مشابهة للأنسولين. ومن ناحية أخرى أكد الباحثون Xavier-Filho et al., (2003) وجود مركبات بروتينية تمتلك تسلسل الاحماض الامينية نفسها فضلاً عن امتلاكها النفس الصفات الكروماتوغرافية لجزيئة الانسولين البقري في ثلاث نباتات من صنف البقوليات هي *Vigna unguiculata* و *Canavalia ensiformis* و *Bauhinia variegata* .

وأخيرا فان جميع تلك المركبات الفعالة المعزولة من النباتات تمثل عوامل غذائية مساعدة لمعالجة داء السكر ومصدراً آخر لاكتشاف أدوية فعالة فموية لمعالجة داء السكر في المستقبل (Gray et al., 2000).

المصادر العربية

إسماعيل، مطاع عبد المطلب عبد، 2002. تأثير نبات الكزبرة على بعض الجوانب الكيميائية الحياتية في الجرذان السليمة والمصابة بداء السكر المستحدث بالالوكسان. رسالة ماجستير، كلية الطب البيطري ، جامعة الموصل.

الامين، صفاء عبد العزيز، 2001. عزل ودراسة المركبات البروتينية الفعالة من نبات القرع. رسالة ماجستير كلية العلوم، جامعة الموصل.

الخشاب، الهام محمد، 1999. تأثير المستخلصات المائية لأوراق حبة الخضراء في مستوى كلوكوز الدم في ذكور الفئران السليمة وعزل المركب الفعال. رسالة ماجستير، كلية العلوم، جامعة الموصل.

جامعة الدول العربية، المنظمة العربية للتنمية الزراعية، 1988. النباتات الطبية والعطرية والسامة في الوطن العربي. دار مصر للطباعة، الخرطوم – السودان. ص250-251.

عبد المانع، خالد صالح عمر، 2002. عزل ودراسة البروتينات والأجزاء غير البروتينية من نباتي السبحبح وخس الزيت. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل.

محمود، منار مظهر، 2004. عزل ودراسة المركبات البروتينية الفعالة من ثمار الكزبرة وتأثيرها على عدد من المتغيرات الكيموحيوية في الفئران. رسالة ماجستير، كلية العلوم - جامعة الموصل.

مجيد، سامي هاشم ومحمود، مهند جميل، 1988. النباتات والأعشاب العراقية بين الطب الشعبي والبحث العلمي. دار الثورة للطباعة والنشر، بغداد، العراق، 33 صفحة.

المصادر الأجنبية

Ahmad, T.Y., and Al-Chalabi, N.S., 2002. Hypoglycemic Effect of the Proteinous Compounds Isolated from Some Hypoglycemic Plants. Part II. Raf. Jour. Sci.13 (1): pp.43-55. Chemistry Special Issue.

Ahmad, T.Y. and Tohala, L.M., 2005. The Effect of Cold Aqueous Extract and Some Proteinous Compounds from *Cyperus rotundus L*. Tubers in the Level of Glucose and Cholesterol in Mice. Raf. Jour. Sci. 16 (3): pp.66-79. Chemistry Special Issue.

Andrews, P., 1964. The Gel Filtration Behavior of Proteins Related to their Molecular Weight Over a Wide Rang. J. Biol. Chem., 96: pp.595-600.

Ashcroft, F.M. and Ashroft, S.H., (Eds)., 1992. Insulin: Molecular Biology to Pathology. IRL press. pp.155-174.

Atta, A.H., Shalaby, M.A.M., Shokry, I.M. and Ahmed, A.A., 1983. Interaction Between Oral Hypoglycemics and Antibiotics on Blood Glucose Level of Normal Fasted and Alloxan-Diabetic Rats. Vet. Med. J. 31(1): pp.11-12.

Ayoub, R.S., Yousif, W.H. and Aziz, B.N., 2000. Serum Glucose, Cholesterol and Total Lipids Levels and Tissue Lipid Peroxidation in Alloxan-Diabetic Rats Treated with Aqueous Extract of Nigella Sativa Seeds. Iraqi J. Vet. Sci. 13(1): pp.43-49.

Chakravarty, H.L., 1976. Plant Wealth of Iraq. A Dictionary of Economic Plants.Vol.1, Baghdad. pp.160-162.

Chen, H., Feng, R., Guo, Y., Sun, L. and Jiang, J., 2001. Hypoglycemic Effects of Aqueous Extract of Rhizoma *Polygonati odorati* in Mice and Rats. J. Ethnopharmacol. 74(3): pp.225-229.

Chithra, V. and Leelamma, S., 1997. Hypolipidemic Effect for Coriander Seeds Mechanism of Action. Plant Foods Hum. Nutr. 51(2): pp.167-172.

Chithra, V. and Leelamma, S., 1999. *Coriandrum sativum*: Mechanism of Hypoglycemic Action. Food Chem. 67(3): pp.229-231.

Collier, E., Watkinson, A., Cleland, C.F. and Roth, J., 1987. Partial Purification and Characterization of an Insulin-like Material from Spanish and *Lemna gibba* G3. J. Biol. Chem. 262(13): pp.6238-6247.

Diederichsen, A., 1996. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) Promoting the Conservation and Use of Underutilized and Neglected Crops. 3, IPGRI, Rome, Italy. pp.8-32.

Fernando, M.R., Wickramasinghe, S.M.D.N. and Thabrew M.I., 1998. Extra Pancreatic Actions of *Hygrophila longifolia*. Pharm. Biol. (36)5: pp.352-356.

Fleming, T., (Chief edr.)., 1998. PDR for Herbal Medicines. 1st ed. Medical Economic Company Inc., Montvale. pp.775-776.

Gray, A.M. and Flatt, P.R., 1999. Insulin-Releasing and Insulin-Like Activity of the Traditional Anti-Diabetic Plant *Coriandrum sativum* . Br. J. Nutr. 81: pp.203-209.

Gray, A.M., Yasser, H.A.A. and Flatt, P.R., 2000. The Traditional Plant Treatment, Sambucus Nigra (Elder), Exhibits Insulin-Like and Insulin-Releasing Actions *In Vitro*. J. Nutr. 130(1): pp.15-20.

Holm, B., 1997. Diabetes Mellitus in the Dog (Part 1). Eur. J. Comp. Anim. Pract. 7: pp.61-66.

Jachak, S.M., 2002. Herbal Drugs as Antidiabetics: An Overview. CRIPS 3(2): pp.9-13.

Khan, A., Safdar, M. and Khan, M.M.A., 2003. Effect of Various Doses of Cinnamon on Lipid Profile in Diabetic Individuals. Pakistan J. Nutr. 2(5): pp.312-319.

Maechler, P., Wollheim, C.B., Bentzen, C.L. and Niesor, E., 1992. Role of the Intestinal Acyl-CoA: Cholesterol Acyl Transferase Activity in the Hyperresponse of Diabetic Rats to Dietary Cholesterol. J. Lipid Res. 33: pp.1475-1484.

Matti, M.G., 2001. Some Biochemical Effects of Neem seed Oil on Normal and Alloxan Induced-Diabetic Mice. J. Edu. Sci. (50): pp.55-61.

Miura, T., Usami, M., Tsuura, Y., Ishida, H. and Seino, Y., 1995. Hypoglycemic and Hypolipidemic Effect of Chitosan in Normal and Neonatal Streptozotocin-Induced Diabetic mice. Biol. Pharm. Bull. 18(11): pp.1623-1625.

Nammi, S., Boini, M.K., Lodagala, S.D. and Behara, R.B.S., 2003. The Juice of Fresh Leaves of *Catharanthus roseus* Linn. Reduces Blood Glucose in Normal and Alloxan Diabetic Rabbits. BMC Complementary and Alternative Medicine 3(4): pp.1-4.

Neef, H., Declercq, P. and Laekeman, G., 1995. Hypoglycemic Activity of Selected European plants. Phytother. Res. 9: pp.45-48.

Ono, H., Tesaki, S., Tanabe, S. and Watanabe, M., 1998. 6-Methylsulfinylhexyl Isothiocyanate and its Homologues as Food-Originated Compounds with Anti-Bacterial Activity Against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 62(2): pp.363-365.

Platel, K. and Srinivasan, K., 1997. Plant Foods in the Management of Diabetes Mellitus: Vegetable as Potential Hypoglycemic Agents. Nahrung 41(2): pp.68-74.

Plummer, D.T., 1978. An Introduction to Practical Biochemistry. 2nd ed., McGraw-Hill company, U.K.

Robyt, J.F. and White, B.J., 1987. Biochemical Techniques. Theory and Practice. Books/ Cole publishing company, California, USA.

Sarkar, S., Pranava, M. and Marita, R., 1996. Demonstration of the Hypoglycemic Action of Momordica Charantia in a Validated Animal Model of Diabetes. Pharmacol. Res. 33 (1): pp.1-4.

Schacterle, G.R. and Pollack, R.L., 1973. A Simplified Method for the Quantitative Assay of Small Amount of Protein in Biologic Materials. Anal. Biochem. 51: pp.654-655.

Simon, J.E., Chadwick, A.F. and Craker, L.E. (Eds.)., 1984. Herbs: An Index Bibliography. 1971-1980. Archon Books, Hamden, C.T. U.S.A. 770p.

Steel, R.G. and Torrie, J.H., 1980. Principles and Procedures of Statistics a Biometrical Approach. 2nd ed., McGraw-Hill, Singapore. 183p.

Swanston-Flatt, S.K., Day, C., Bailey, C.J. and Flatt, P.R., 1990. Traditional Plant Treatments for Diabetes Studies in Normal and Streptozotocin Diabetic Mice. Diabetologia 33(8): pp.462-464.

Uma-Pradeep, K, Geervani, P. and Eggum, B.O., 1993. Common Indian Spices: Nutrient Composition, Consumption and Contribution to Dietary Value. Plant Foods Hum. Nutr. 44(2): pp.137-148.

Xavier-Filho, J., Oliveira, A.E.A., Silva, L.B., Azevedo, C.R., Venâncio, T.M., Machado, O.L.T., Oliva, M.L., Fernandes, K.V.S. and Xavier-Neto, J., 2003. Plant Insulin or Glucokinin: A Conflicting Issue. Braz. J. Plant Physiol. 15(1): pp.67-78.