دراسة عدد من المستخلصات والمركبات البروتينية المفصولة من ثمارالتفاح في الفئران المعرضة للكرب التأكسدي

محمد بحري السعدون

قسم الكيمياء

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2007/2/5 ، تاريخ القبول 2007/6/6)

الملخص

اجريت هذه الدراسة لتحضير مستخلص مائي بارد ومغلي لثمرة التفاح *Pyrus malus* وتم عـزل مستخلص القلويدات والفلافونويدات والكلايكوسيدات من هذه الثمار، كما تم عـزل ودراسـة المركبـات البروتينية. وباستخدام تقنية الترشيح الهلامي تم فصل مركبين A (166226) دالتون و B (2925) دالتون من الراسب البروتيني البارد ومركبين A (34609) دالتون وB(719) دالتون مـن الراسـب البروتينـي المغلي.

كما تضمنت الدراسة تاثير المستخلصات والمركبات المذكورة سـابقا فـي مـستويات الكلوكـوز والكوليستيرول الكلي والدهون الكلية وكوليستيرول البروتين الدهني عالي الكثافة وكوليستيرول البـروتين الدهني واطئ الكثافة في مصل الدم، وكذلك مستويات الكلوتاثايون والمالوندايالديهايد فـي انـسجة الكبـد والكلية والقلب في ذكور الفئران المعرضة للكرب التأكسدي عن طريق الحقن بالتجويف البريتوني.

واشارت النتائج بعد اسبوع من المعاملة الى أن المستخلص المائي الخام وغير البروتينـي البـارد والمغلي ومستخلص القلويدات والفلافونويدات والراسب البروتيني والمركب البروتيني B البارد والمغلـي وبجرع (500، 500، 490.35، 491.66، 0.52، 0.31، 9.65، 8.34، 5.07، 3.836) ملغـم/كغـم وزن الجسم قد أدت الى انخفاض معنوي ($p<0.05$) في مستوى الكلوكوز والكوليستيرول الكلي والـدهون الكلية وكوليستيرول البروتين الدهني واطئ الكثافة في مصل الدم ومستوى المالونداياالديهايد فـي انـسجة الكبد والكلية والقلب. بينما احدثت ارتفاع معنوي($p<0.05$) في مستوى كوليستيرول البروتين الدهني عالي الكثافة في مصل الدم ومستوى الكلوتاثايون في انسجة الكبد والكلية والقلب لـذكور الفئـران المعرضـة للكرب التأكسدي. يمكن الاستنتاج ان لمعظم مستخلصات ثمار التفاح وخاصة لمـستخلص الفلافونويـدات تأثير مضاد للأكسدة في الفئران المعرضة للكرب التاكسي.

Studying Some of the Extracts and Isolated Proteinous Compounds From Apple (*Pyrus malus*) in Mice Exposed to Oxidative Stress

Mohammed B. Al-Saadon
Department of Biology
College of Science
Mosul University

ABSTRACT

This study was conducted to prepare cold and boiled aqueous extracts of *Pyrus malus* fruits, and thens to isolate extracts of alkaloid, flavonoids and glycosides for this plant. The study also comprised the sisolation and study the proteinous compounds, one of the techniques used to isolation was the gel filtration technique which was isolated two compounds A (166226) Dalton, B (2925) Dalton from the cold proteinous precipitate and two compounds A (34609) Dalton, B (719) Dalton from the boiled proteinous precipitate. The effects of these extracts and compounds previously mentioned above were studied on serum glucose, total cholesterol, total lipids, low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) and high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) levels, also glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) levels in liver, kidney and heart tissues in mice exposed to oxidative stress. These extracts were administrated intraperitoneally.

After one week from the treatment the results were indicated that the cold and boiled crude aqueous, non proteinous extracts, proteinous precipitate and proteinouse compounds (B) which were isolated from it at the doses of 500,500,490.35, 491.66, 9.65,8.34,5.07,3.836) mg/kg body weights ,also the alkaloids, flavonoids at the doses of (0.52,0.31) mg/kg body weights were caused a significant decrease ($p<0.05$) in serum glucose, total cholesterol, total lipids, LDL-C levels and MDA level in liver, kidney and heart tissues, with an associated significant increase ($p<0.05$) in serum HDL-C level and GSH level in liver, kidney and heart tissues in mice exposed to oxidative stress. Finally we suggested most of extracted isolated from fruits of apple (especially the extract of flavonoids) have antioxidant in mice exposed to oxidative stress.

المقدمة

التفاح ثمرة لحمية قاسية ويمكن الاحتفاض بها مدة طويلة, وهي ثمـرة جميلـة ذات مـذاق شـهي ورائحة طيبة ذات شكل كروي في الغالب، وتعود الى فصيلة الورديات (Rosacees).الاسم العلمي للنبات *Pyrus malus* ويسمى في العربية تفاح، وتعرف بالفارسية بسيب, أما في الإنكليزية فتعـرف ب apple (عبيد، 2000).

يستعمل التفاح في علاج حالات المغص, ومقوي للأعصاب ويفيد فـي التهـاب الحنجـرة ومفيـد لالتهاب الأوعية الدموية والغدد اللمفاوية, وتصلب الشرايين وضغط الدم، كما يستعمل لعلاج الـدزنتري, ومنظم لعمل الكبد والكلية (Chen et al., 2000)، كما يستعمل في علاج داء السكر (Day,1995).

أظهرت العديد من الدراسات التأثير الوقائي للمركبات التي تعمل على إزالة الجذور الحرة في الحيوانات، فمثلا تعد مركبات الفلافونويدات مضادة للأكسدة ضد الجذور الحرة (Honglei et al., 2001) وان اضعاف الآليات الدفاعية ضد الجذور الحرة في انسجة الكبد والبنكرياس والكلية والقلب يعزز من احتمالات إصابة هذه الأنسجة بوساطة الكرب التاكسي الناجم عن زيادة بيروكسدة الدهون وانخفاض مضادات الأكسدة (Koya et al., 2003).

المواد المستعملة وطرائق العمل

جمع النبات المستعمل:

جمعت ثمار التفاح الصفراء الناضجة من الأسواق المحلية في مدينة الموصل، وتم تصنيفه في كلية العلوم، قسم علوم الحياة.

تحضير المستخلصات:

تحضير المستخلص المائي البارد:

وزن 500 غراما من ثمرة التفاح، وقطعت الى قطع صغيرة، بعد ذلك مزجت القطع مع الماء المقطر البارد نسبة (1 وزن : 3 حجم) وسحقت باستخدام آلة الثرم لمدة 15 دقيقة بعدها جمدت بإضافة النتروجين المسال ثم تركت تذوب عند درجة حرارة الغرفة، كررت هذه العملية ثلاث مرات. بعد ذلك حرك الخليط لمدة ساعتين تحت تأثير المحرك الكهربائي مع مراعاة التبريد للمزيج في الحمام الثلجي، ثم رشح من خلال عدة طبقات من الشاش وفصل المستخلص بجهاز الطرد المركزي المبرد للتخلص من المواد غير الذائبة لمدة 20 دقيقة على سرعة 6000 xg والحصول على راشح بشكل رائق (Ahmed et al., 2002) ، ثم قدرت كمية البروتين له بحسب طريقة لاوري المحورة (Schacterle and Pollack, 1973).

تحضير المستخلص المائي المغلي:

وزن 500 غراما من ثمرة التفاح وأجريت عليه الخطوات السابقة نفسها في تحضير المستخلص المائي البارد ماعدا اجراء عملية الغليان لمدة نصف ساعة قبل اجراء عملية الترشيح.

تحضير مستخلص الفلافونويدات:

استخلصت الفلافونويدات من ثمرة التفاح بوضع النبات في جهاز الاستخلاص (Soxhlet) لمدة (3-4) أيام باستخدام الايثانول، بعد ذلك بخر الايثانول باستخدام جهاز التبخير تحت الضغط المخلخل، واضيف بعد ذلك حوالي (50) سم^3 من الميثانول الساخن (40-50) ^{o}م مع الرج السريع حيث تترسب في إثناء الإضافة مادة صلبة بنية اللون (Harborne, 1973).

تحضير مستخلص الكلايكوسيدات:

استخلصت الكلايكوسيدات من ثمرة التفاح بنقع النبات لمدة ثلاثة أيام في لتر واحد من الماء المقطر، ورشحت ثم ركزت الطبقة المائية باستخدام جهاز التقطير تحت الضغط المخلخل وباستخدام حمام لا تتجاوز حرارته (50) °م لتعطي المستخلص المائي المركز، وأضيف هذا المستخلص على شكل قطرات الى (50) سم^3 من الميثانول مع الرج السريع حيث تترسب مادة بيضاء اللون (Harbone, 1973)

تحضير مستخلص القلويدات:

استخلصت القلويدات من ثمرة التفاح بالخطوات آلاتية:

1. ثرم النبات، ثم أضيف حامض الهيدروكلوريك (5N) مع النقع لمدة نصف يوم. بعد ذلك رشح المستخلص الذي يسمى بالمستخلص المائي للقلويدات.
2. أضيف الى المستخلص المائي للقلويدات محلول الامونيا مع الرج السريع، وفصلت الأخيرة بإضافة الايثر حيث تذوب فيه القلويدات.
3. فصلت الطبقة العضوية واضيف اليها حامض HCl المخفف مع الرج السريع، بعدها اضيف الايثانول (95%) مع الرج الشديد.
4. سحبت طبقة الكحول المحتوية على القلويدات، وجففت باستخدام جهاز التقطير تحت الضغط المخلخل وباستخدام حمام مائي لا تتجاوز حرارته (40-50) °م للحصول على الراسب المحتوي على القلويدات (نصر، 1986).

تحضير المستخلص البروتيني وغير البروتيني:

اضيف الاسيتون البارد الى كل من المستخلص المائي البارد والمغلي بنسبة (40: 60) حجم/حجم على التوالي ببطء مع التحريك المستمر (Robyt and White, 1987) عند درجة حرارة 4 °م، ثم ترك المزيج في الثلاجة لمدة 24 ساعة. فصل البروتين المترسب بجهاز الطرد المركزي المبرد لمدة 20 دقيقة عند (6000 xg). فالراسب يمثل المستخلص البروتيني والجزء الرائق يمثل المستخلص غير البروتيني، بعدها جفف كل منهما باستخدام جهاز التجفيد بالتبريد للحصول على المادة بشكل مسحوق.

فصل وتنقية وتعيين الاوزان الجزيئية للمركبات البروتينية:

تم تنقية البروتين الخام المتحصل عليه وتقدير الاوزان الجزيئية للمركبات البروتينية باستخدام عمود فصل ذي ابعاد (120 × 1.8) سم والحاوي على مادة السيفادكس نوع- 75 (Sephadex G-75) وبمعدل جريان 42 مل/ساعة.

الحيوانات المستخدمة:

استخدم في هذا البحث الفأر الابيض Albino Male Mouse وبعمر ثلاثة اشـهر تقريبـا واوزان تراوحت (25-30) غم وضعت في اقفاص معدة ومهيأة لهذا الغرض وزودت بالماء والعلـف الحيـواني الخاص بها.

تحديد الجرعة المؤثرة:

استخدمت فئران سليمة تراوحت أوزانها من (25-30) غم قسمت الى مجاميع تضم كل مجموعـة (5) فئران، وعوملت كالاتي:

تحديد الجرعة المؤثرة للمستخلص المائي الخام البارد والمغلي:

1. المجموعة الاولى حقنت في التجويف البريتوني بـ (0.1) سـم^3 بـالمحلول الملحـي الفـسلجي (Normal saline) وعدت كمجموعة سيطرة.
2. المجاميع من (2-6) حقنت في التجويف البريتـوني بـالجرع (100، 200، 300، 400، 500) ملغم/كغم من وزن الجسم على التوالي بالمستخلص المائي الخام البارد. وبنفس الطريقة تم تحديد الجرعة المؤثرة للمستخلص المائي الخام المغلي.

وبعد ساعتين من الحقن في التجويف البريتوني قدر مستوى الكلوكوز في الدم، ثم اختيرت الجرعة الاكثر تاثيرا في خفض مستوى كلوكوز الدم.

حقن الحيوانات المعرضة للكرب التأكسدي المستحدث ببيروكسيد الهيدروجين:

قسمت ذكور الفئران البيض عشوائيا بعد وزنها الى (16) تضم كل مجموعة (5) فئـران وكمـا ياتي:

1. مجموعة السيطرة، تركت تتناول العلف والماء دون معاملة لمدة 15 يوما.
2. مجموعة عرضت للكرب التأكسدي باعطائها بيروكسيد الهيدروجين بنسبة (0.5%) مع ماء الـشرب ولمدة (15) يوما.
3. مجموعة عرضت للكرب التأكسدي المستحدث ببيروكسيد الهيدروجين (0.5%) مع الحقـن اليـومي للانسولين تحت الجلد بجرعة (10) وحدة/كغم.
4. المجاميع من (4-16) عرضت للكرب التأكسدي المستحدث ببيروكسيد الهيـدروجين (0.5%) لمـدة (15) يوما، مع حقنها في اليوم السابع ولمدة اسبوع بالتجويف البريتوني بالمستخلصات التي تم ذكرها انفا.

تقدير المتغيرات:

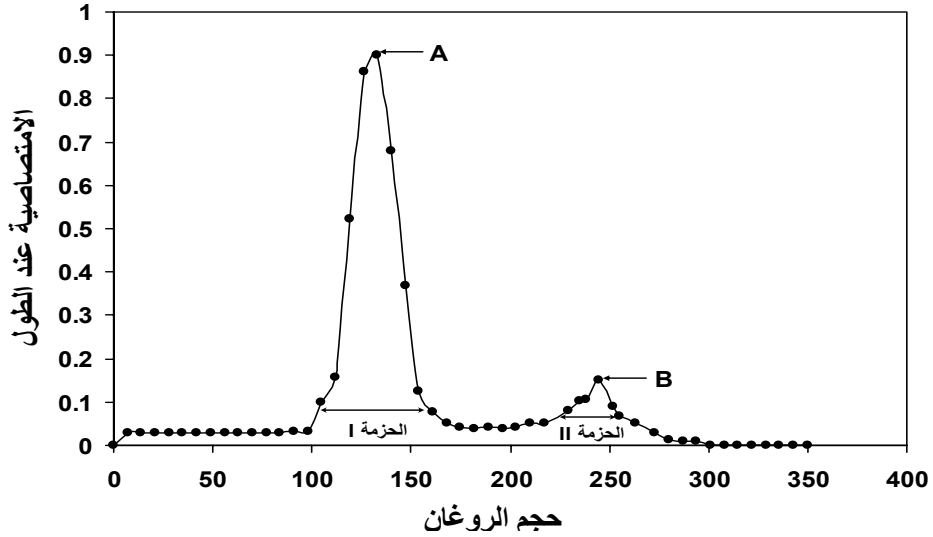
قدر مستوى الكلوكوز والكوليستيرول الكلي وكوليستيرول البروتين الدهني عالي وواطئ الكثافة باستخدام عدة التحليل (Kit) وهي طريقة انزيمية نوع (Syrbio, France) . قدرت الدهون الكلية بطريقة (Toro and Ackermann, 1975). قدر الكلوتاثايون في انسجة الكبد والكلية والقلب بطريقة المان المحورة (James et al., 1982)، في حين قدر المالونداليالديهايد في الأنسجة المدروسة بالطريقة المتبعة من قبل الباحثين (Volken et al., 2001).

النتائج والمناقشة

فصل الرواسب البروتينية من المستخلص المائي البارد والمغلي لثمارالتفاح:

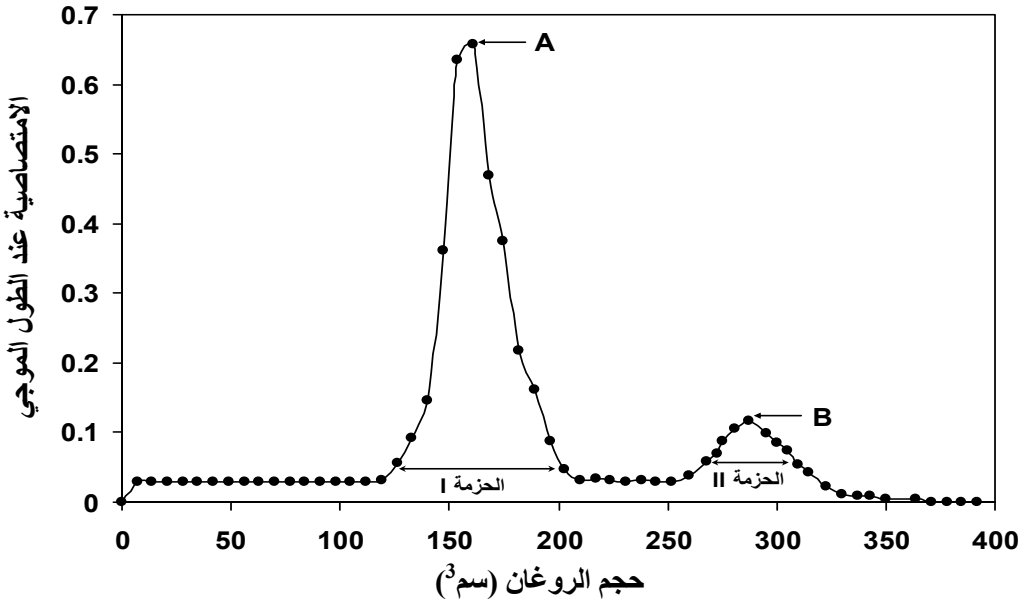
فصلت الرواسب البروتينية بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفـصل ذي الأبعـاد (120 × 1.8) سم والحاوي على الهلام من نوع Sephadex G-75 (Plummer,1978) .

يوضح الشكل (1) فصل المحلول المركز للراسب البروتيني المعزول من المستخلص المائي البارد لثمار التفاح، إذ أظهرت نتيجة الفصل وجود قمتين الأولى A وبحجم روغان (124) سم^3 والثانية B بحجم روغان (245) سم^3.



الشكل 1: المظهر الجانبي لروغان الراسب البروتيني المعزول من المستخلص المائي الخام لثمار التفـاح البارد بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفصل ذو الابعاد (120 × 1.8) سـم والحـاوي على الهلام من نوع Sephadex G-75 الأسهم A و B تمثل حجم الروغان للقمم الأولى (124) سم^3 والثانية (245) سم^3 على التوالي للمركبات البروتينية المفصولة، حجم كل جزء (7) سـم^3 وبمعدل جريان (42 سم^3/ساعة)

كما يوضح الشكل (2) فصل المحلول المركز للراسب البروتيني المعزول من المستخلص المـائي المغلي لثمرة التفاح، اذ اظهرت نتيجة الفصل وجود قمتين أيضاً A وبحجم روغان (171) سم^3 والثانية B بحجم روغان (287) سم^3.

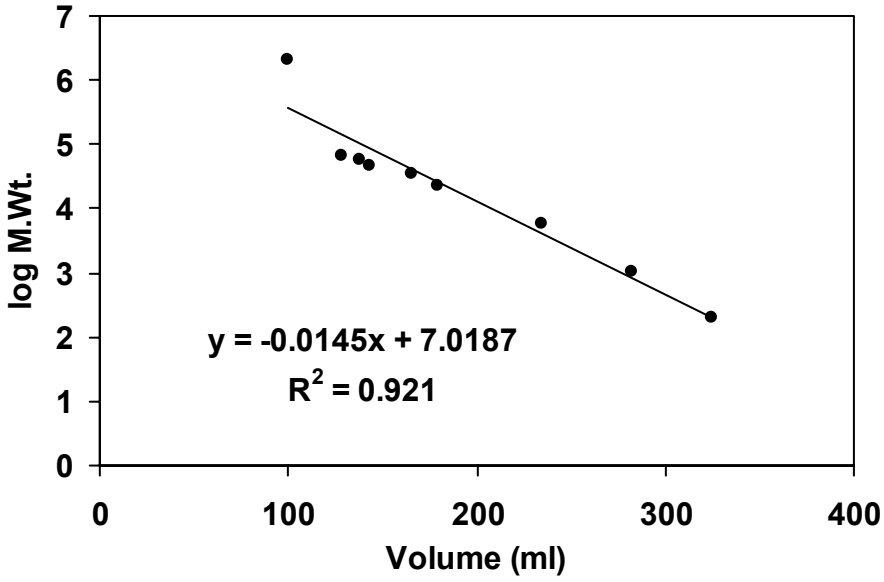


الشكل 2: المظهر الجانبي لروغان الراسب البروتيني المعزول من المستخلص المائي الخام لثمرة التفـاح المغلي بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفصل ذو الابعاد (120 × 1.8) سم والحـاوي على الهلام من نوع Sephadex G-75 الأسهم A و B تمثل حجم الروغان للقمم الاولى (171) سم^3 والثانية (287) سم^3 على التوالي للمركبات البروتينية المفصولة، حجم كل جزء (7) سـم^3 وبمعدل جريان (42 سم^3/ساعة)

الاوزان الجزيئية التقريبية للمركبات البروتينية المفصولة:

لغرض تعيين الأوزان الجزيئية التقريبية المفصولة بتقنية الترشيح الهلامي، استخدم عمود الفـصل ذي الابعاد (120 × 1.8) سم، اذ تم امرار عدد من المواد المعلومة الوزن الجزيئي، تراوحـت اوزانهـا الجزيئية بين(204-2000000) دالتون، بعد ذلك تم تعيين حجم الروغان لهذه المواد كما مبين في الجـدول (2).

وعند رسم حجم الروغان لكل مادة مقابل لوغاريتم الوزن الجزيئي تم الحـصول علـى المنحنـي القياسي لتقدير الوزن الجزيئي كما هو مبين في الشكل (3) والذي من خلاله يمكن تحديد الاوزان الجزيئية التقريبية للمركبات المفصولة.



الشكل 3: المنحني القياسي لتقدير الوزن الجزيئي التقريبي للبروتين

الجدول 1: حجوم الروغان للمواد المعلومة الوزن الجزيئي والتي مررت على عمود الفصل ذي الابعاد (1.8 × 120) سم والحاوي على الهلام Sephadex G-75

المادة	الوزن الجزيئي	حجم الروغان ($سم^3$)
الدكستران الازرق Blue dextran	2000000	100
البومين مصل البقر Bovine serum albumin (B SA)	67000	128
الفا-اماليز α-amylase	58000	138
البومين البيض Eggs albumin	45000	143
ببسين Pepsin	36000	165
تربسين Trypsin	23000	179
هرمون الانسولين Insulin Hormone	5750	235
هرمون الاوكسيتوسين Oxytocin Hormone	1051	282
التربتوفان Tryptophan	200	325

ومن خلال اسقاط حجوم الروغان التي تم الحصول عليها للمركبات البروتينية المفـصولة بتقنيـة الترشيح الهلامي، على المنحني القياسي (3) تم إيجاد الأوزان الجزيئية التقريبية للمركبات البروتينة لثمرة التفاح.

الجدول 2: الأوزان الجزيئية التقريبية للمركبات البروتينية المفصولة بتقنية الترشيح الهلامي

المادة	حجم الروغان ($سم^3$)	الوزن الجزيئي التقريبي (دالتون)
المركب البروتيني A البارد	124	166226
المركب البروتيني B البارد	245	2925
المركب البروتيني A المغلي	171	34609
المركب البروتيني B المغلي	287	719

تحديد الجرعة المؤثرة:

يوضح الجدولان (3 و 4) تحديد الجرعة الأكثر تأثيرا في خفض مستوى الكلوكـوز فـي ذكـور الفئران السليمة لكل من المستخلص المائي الخام البارد والمغلي. وقد تبين من خلال هذين الجـدولين ان قيمة الجرعة المؤثرة هي (500) ملغم/كغم من وزن الجسم.

الجدول 3: تحديد الجرعة المؤثرة للمستخلص المائي الخام البارد لثمرة التفاح في خفض مستوى الكلوكوز في مصل دم ذكور الفئران.

	جرعة المستخلص المائي الخام البارد ملغم/كغم وزن الجسم					
تركيز الكلوكوز ملي مول/لتر	السيطرة	100	200	300	400	500
	± 5.17 0.09	± 5.27 0.14	± 5.34 0.09	± 5.00 0.03	± 5.28 0.13	± 4.28 0.16

تشير قيم الكلوكوز الى المعدل ± الانحراف القياسي

الجدول 4: تحديد الجرعة المؤثرة للمستخلص المائي الخام المغلي لثمرة التفاح في خفض مستوى الكلوكوز في مصل دم ذكور الفئران.

	جرعة المستخلص المائي الخام المغلي ملغم/كغم وزن الجسم					
تركيز الكلوكوز ملي مول/لتر	السيطرة	100	200	300	400	500
	± 5.13 0.10	± 5.00 0.10	± 5.53 0.16	± 5.01 0.12	± 5.32 0.09	± 4.36 0.09

تشير قيم الكلوكوز الى المعدل ± الانحراف القياسي

تاثير الانسولين:

أدت المعاملة بالانسولين (10) وحدات دولية/كغم وزن الجسم تحت الجلد الى حدوث انخفاض معنوي ($p < 0.05$) في مستويات الكلوكوز والكوليستيرول الكلي والدهون الكلية وكوليستيرول البروتين الدهني واطئ الكثافة عند المقارنة مع الفئران المعرضة للكرب التأكسدي المستحدث ببيروكسيد الهيدروجين مع ماء الشرب فقط، بينما ارتفع معنويا ($p < 0.05$) مستوى كوليستيرول البروتين عالي الكثافة، كما موضح في الجدول (5).

وقد يعزى السبب الى ان الانسولين يزيد من معدل دخول الكلوكوز الى داخل الخلية من خلال زيادة عدد نواقل الكلوكوز (Asheroft and Asheeroft, 1992)، اما سبب انخفاض الكوليستيرول الكلي قد يعزى الى تثبيط الانسولين لانزيم Intestinal acyl-CoA cholesterol transferase المسؤول عن امتصاص الكوليستيرول من الأمعاء (Maechler et al., 1993)، في حين الانخفاض المعنوي في مستوى الدهون الكلية قد يعزى الى تثبيط فعالية انزيم اللايبيز الحساس للهرمون (Guyton and Hall, 2000). ويعزى سبب انخفاض مستوى كوليستيرول البروتين الدهني واطئ الكثافة الى ان الانسولين قد يزيد من قابلية خلايا الكبد على إنتاج مستقبلات البروتين الدهني واطئ الكثافة apo B-100 receptors الذي بدوره يزيد من امتصاص البروتينات الدهنية واطئة الكثافة الاضافية (Guyton and Hall, 2000). اما الارتفاع المعنوي الحاصل في مستوى كوليستيرول البروتين الدهني عالي الكثافة نتيجة المعاملة بالانسولين قد يعزى الى تحفيز خلايا الكبد والأمعاء على تكوين جزيئات البروتين الدهني عالي الكثافة، او قد يعزى الى ان الانسولين يحفز انزيم لايبوبروتين لايبيز (Murray et al., 2000).

تاثير المستخلص المائي الخام وغير البروتيني البارد والمغلي ومستخلص القلويـدات والفلافونويـدات والكلايكوسيدات لثمار التفاح:

من خلال المعاملة بالمستخلصات المذكورة انفا وبجرع (500، 500، 490.35، 491.66، 0.52، 0.31، 0.4) ملغم/كغم وزن الجسم على التوالي في التجويف البريتوني تبين ان المستخلص المائي الخـام وغير البروتيني البارد والمغلي ومستخلص القلويدات والفلافونويدات ادت الى انخفـاض معنـوي ($p < 0.05$) في مستويات الكلوكوز والكوليستيرول الكلي والدهون الكلية وكوليستيرول البروتين الدهني واطئ الكثافة، بينما احدثت ارتفاعا معنويا ($p < 0.05$) في مستوى كوليستيرول البروتين الدهني عالي الكثافـة عند المقارنة مع الفئران المعاملة ببيروكسيد الهيدروجين مع ماء الشرب فقط، في حين لم يؤد مـستخلص الكلايكوسيدات الى فرق معنوي ($p > 0.05$) في المتغيرات التي تم دراستها، كما هو مـشار اليـه فـي الجدول (5).

إن الانخفاض المعنوي الحاصل في مستوى الكلوكوز عند المعاملة بالمستخلصات المذكورة اعـلاه قـد يعـود الـى قـدرة هـذه المستخلـصات علـى زيـادة افـراز الانـسولين مـن خلايـا بيتـا

(Chavez-Miranla et al., 2002) ، أما الانخفاض الحاصل في مستوى الكوليسترول الكلي وكوليستيرول البروتين الدهني واطئ الكثافة قد يعزى الى قدرة هذه المستخلصات على تثبيط انزيم بيتا-هيدروكسي مثيل كلوتاريل مساعد الانزيم A ريدكتيز المسؤول عن بناء الكوليستيرول (محمد، 1998)، او تقلل من كمية البروتين الدهني المتوسط الكثافة المتحول الى البروتين الدهني الواطئ الكثافة (Muarry et al., 2000)، ويعزى التاثير الخافض للدهون الكلية الى تحفيز افراز الانسولين الذي بدوره يثبط انزيم اللايبيز الحساس للهرمون وبالتالي يمنع تحلل الدهون في الانسجة الدهنية (Muarry et al., 2000) . في حين يعزى الارتفاع المعنوي الحاصل في مستوى كوليستيرول البروتين الدهني عالي الكثافة نتيجة المعاملة بالمستخلصات المذكورة انفا، الى قدرة هذه المستخلصات على تنشيط انزيم لايبوبروتين لايبيز الذي يجهز جزيئات البروتين الدهني عالي الكثافة بالدهون الفوسفاتية و apo A-I اثناء سحب الكليسيريدات الثلاثية من الكيلومايكرونات والبروتين الدهني واطئ الكثافة جدا (VLDL) ، او تحفز خلايا الكبد والامعاء على انتاج البروتين الدهني عالي الكثافة في الدم (Henriksen et al., 1999).

تاثير الرواسب البروتينية والمركبات البروتينية المفصولة منها لثمار التفاح:

ادت المعاملة بالراسب البروتيني البارد والمغلي والمركب B البارد والمغلي وبجرع (9.65، 8.34، 5.07، 3.836) ملغم/كغم وزن الجسم الى حدوث انخفاض معنوي ($p < 0.05$) في مستويات الكلوكوز والكوليستيرول الكلي، ماعدا المركب البروتيني A البارد والمغلي لم يحدثا فرق معنوي ($p > 0.05$) في مستوى الكلوكوز والكوليستيرول الكلي عند المقارنة مع الفئران المعاملة ببيروكسيد الهيدروجين مع ماء الشرب فقط وبجرع مقدارها (4.57، 4.14) ملغم/كغم، وقد يعزى ذلك الى ان هذه المواد البروتينية تعمل على زيادة تكوين الكلايكوجين من الكلوكوز الزائد في الدم (Kato and Miura, 1993).

ووجد ان المعاملة بالراسب البروتيني البارد والمغلي والمركب B المغلي ادت الى انخفاض معنوي ($p < 0.05$) في مستوى الدهون الكلية. في حين ادى المركب البروتيني A البارد والمغلي الى ارتفاع معنوي ($p < 0.05$) في مستوى الدهون الكلية عند المقارنة مع الفئران المعاملة ببيروكسيد الهيدروجين مع ماء الشرب فقط. ان التاثير الخافض لمستوى الدهون الكلية للرواسب والمركبات المذكورة سابقا قد يعزى الى تثبيط انزيم اللايبيز الحساس للهرمون ومن ثم تثبيط تحلل الدهون في الانسجة الدهنية (Guyton and Hill, 2000).

وقد أدى الراسب البروتيني والمركب البروتيني B البارد والمغلي الى انخفاض معنوي ($p < 0.05$) في مستوى كوليستيرول البروتين الدهني واطئ الكثافة، بينما لم يؤد الى فرق معنوي ($p > 0.05$) في مستوى كوليستيرول البروتين الدهني عالي الكثافة. ان الانخفاض المعنوي الحاصل في مستوى كوليستيرول البروتين الدهني واطئ الكثافة قد يعزى الى قدرة هذه الرواسب والمركبات البروتينية على

تحفيز خلايا الكبد على زيادة انتاج مستقبلات apo B-100 receptors ، او يقلل من إنتاج الكبد لهذا البروتين الدهني واطئ الكثافة (Muarry et al., 2000). إن المعاملة بالمركب البروتيني A البارد والمغلي لم يؤد الى فرق معنوي ($p > 0.05$) في مستوى كوليستيرول البروتين الدهني عالي وواطئ الكثافة وكما مشار اليه في الجدول (6).

الجدول 5: تاثير المستخلص المائي الخام وغير البروتيني البارد والمغلي ومستخلص القلويدات والفلافونويدات والكلايكوسيدات لثمار التفاح في مستويات الكلوكوز والكوليستيرول الكلي والدهون الكلية وكوليستيرول البروتين الدهني عالي وواطئ الكثافة في مصل دم ذكور الفئران المعرضة للكرب التأكسدي بوساطة بيروكسيد الهيدروجين

المعاملات	الكلوكوز (ملي مول/لتر)	الكوليستيرول الكلي (ملي مول/لتر)	الدهون الكلية (ملغم/100 سم^3)	كوليستيرول البروتين الدهني عالي الكثافة (ملي مول/لتر)	كوليستيرول البروتين الدهني واطئ الكثافة (ملي مول/لتر)
السيطرة (المحلول الملحي الفسلجي)	i 0.9 ± 6.01	b 0.1 ± 2.56	d 2.5 ± 400.67	f 0.81 ± 0.60	g 0.31 ± 1.60
فئران معاملة ببيروكسيد الهيدروجين (0.5%) مع ماء الشرب فقط	l 0.3 ± 8.13	f 0.9 ± 4.03	f 0.2 ± 605.31	g 0.12 ± 0.49	i 0.52 ± 2.53
الانسولين	a 0.12 ±4.31	c 0.11 ± 3.25	d 0.31 ± 473.5	d 0.31 ± 0.81	f 0.31 ± 1.46
المستخلص المائي الخام البارد	h 0.9 ± 6.2	c 0.91 ± 3.18	c 0.32 ± 310.62	d 0.24 ± 0.83	b 0.82 ± 0.86
المستخلص المائي الخام المغلي	b 1.1 ± 5.9	b 0.52 ± 2.91	c 0.45 ± 305.15	bc 0.10 ± 1.02	c 0.34 ± 0.87
المستخلص غير البروتيني البارد	g 0.10 ±5.68	d 0.41 ± 3.51	b 0.89 ± 301.82	d 0.34 ± 0.81	e 0.52 ± 1.30
المستخلص غير البروتيني المغلي	f 0.31 ±5.00	a 0.4 ± 2.93	a 0.59 ± 295.4	ab 0.54 ± 1.09	d 0.34 ± 0.94
مستخلص القلويدات	e 0.8 ± 5.30	b 0.15 ± 2.84	a 0.18 ± 278.54	bc 0.32 ± 1.04	f 0.59 ± 1.49
مستخلص الفلافونويدات	ce 0.10 ±4.81	b 0.16 ± 2.83	a 0.80 ± 285.31	abc 0.52 ± 1.07	c 0.10 ± 0.89
مستخلص الكلايكوسيدات	l 0.30 ±8.00	f 0.8 ± 4.08	f 0.31 ± 600.13	g 0.12 ± 0.48	i 0.62 ± 2.50

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

تشير القيم اعلاه الى المعدل ± الانحراف القياسي.

الجدول 6: تاثير الرواسب البروتينية والمركبات البروتينية المفصولة منها لثمارالتفاح في مستويات الكلوكوز والكوليستيرول الكلي والدهون الكلية وكوليستيرول البروتين الدهني عالي وواطئ الكثافة في مصل دم ذكور الفئران المعرضة للكرب التأكسدي بوساطة بيروكسيد الهيدروجين

المعاملات	الكلوكوز (ملي مول/لتر)	الكوليستيرول الكلي (ملي مول/لتر)	الدهون الكلية (ملغم/100 سم^3)	كوليستيرول البروتين الدهني عالي الكثافة (ملي مول/لتر)	كوليستيرول البروتين الدهني واطئ الكثافة (ملي مول/لتر)
السيطرة (المحلول الملحي الفسلجي)	i 0.9 ± 6.01	b 0.1 ± 8.56	d 2.51 ± 400.67	f 0.81 ± 0.60	g 0.31 ± 1.60
فئران معاملة ببيروكسيد الهيدروجين (0.5%) مع ماء الشرب فقط	l 0.3 ± 8.13	f 0.9 ± 4.03	f 0.2 ± 605.31	g 0.12 ± 0.49	i 0.52 ± 2.53
الانسولين	a 0.12 ±4.31	c 0.11 ± 3.25	d 0.31 ± 473.52	d 0.31 ± 0.81	f 0.31 ± 1.46
الراسب البروتيني البارد	j 0.9 ± 7.13	e 0.44 ± 3.95	e 2.91 ± 592.34	g 0.15 ± 0.48	h 0.11 ± 2.19
الراسب البروتيني المغلي	d 0.9 ± 5.08	b 0.51 ± 2.88	e 2.41 ± 580.54	g 0.14 ± 0.49	0.21 ± 1.12
المركب البروتيني A البارد	l 0.20 ±8.16	f 0.52 ± 4.02	h 5.61 ± 620.53	g 0.25 ± 0.46	i 0.14 ± 2.52
المركب البروتيني B البارد	k 0.13 ±7.79	d 0.32 ± 3.91	f 10.12 ± 600.1	g 0.24 ± 0.50	g 0.12 ± 2.00
المركب البروتيني A المغلي	l 0.90 ±8.10	f 0.62 ± 4.00	g 10.2 ± 630.61	g 0.21 ± 0.47	i 0.12 ± 2.51
المركب البروتيني B المغلي	b 0.20 ±4.44	a 0.52 ± 2.79	b 2.10 ± 300.52	g 0.11 ± 0.47	e 0.11 ± 1.21

الاحرف المختلفة عموديا تعني وجود فرق معنوي عند مستوى (0.05).
تشير القيم اعلاه الى المعدل ± الانحراف القياسي.

تاثير الانسولين في مستويات الكلوتاثايون والمالوندايالديهايد:

أدت المعاملة بالانسولين وبجرع (10) وحدات دولية/كغم تحت الجلد في الفئـران المعرضـة للكرب التأكسدي المستحدث ببيروكسيد الهيدروجين الـى ارتفـاع معنـوي ($p < 0.05$) فـي مـستوى الكلوتاثايون في أنسجة الكبد والكلية والقلب، بينما انخفض معنويا ($p < 0.05$) مستوى المالوندايالديهايد في أنسجة الكبد والكلية والقلب عند المقارنة مع الفئران المعاملة ببيروكسيد الهيدروجين مع ماء الشرب فقط، وكما موضح في الجدول (7). وهذا يتفق مع نتائج دراسة (Cho et al., 2002) ، وقد يعزى السبب الـى ارتفاع مستويات مضادات الأكسدة بعد المعالجة بالأنسولين (Hartnett et al., 2000) .

تأثير المستخلص المائي الخام وغير البروتيني البارد والمغلي ومستخلص القلويـدات والفلافونويـدات والكلايكوسيدات لثمار التفاح في مستويات الكلوتاثايون والمالوندايالديهايد :

أدت المعاملة بالمستخلصات المـذكورة انفـا وبجـرع (500، 500، 490.35، 491.66، 0.52، 0.31، 0.4) ملغم/كغم وزن الجسم في ذكور الفئران المعرضة للكرب التأكسدي ببيروكسيد الهيـدروجين الى ارتفاع معنوي ($p < 0.05$) في مستوى الكلوتاثايون في انسجة الكبد والكلية والقلب، في حين انخفض معنويا ($p < 0.05$) مستوى المالوندايالديهايد في الانسجة المدروسة عند المقارنة مـع الفئـران المعاملـة ببيروكسيد الهيدروجين مع ماء الشرب فقط، وكما هو موضح في الجدول (7).

إن قدرة هذه المستخلصات في رفع مستوى الكلوتاثايون قد يعزى الى تثبيط فعالية انـزيم كامـا-كلوتاميل ترانس ببتايديز (Larsson and Anderson, 2001)، وان قدرة هذه المستخلصات فـي خفـض مستوى المالوندايالديهايد قد تعزى الى قدرتها في إزالة الجذور الحرة، أو تمتلك آلية مضادة للأكـسدة أو إنها تعمل على تنشيط مضادات الأكسدة الأنزيمية الكاسحة للجذور الحرة.

تاثير الرواسب البروتينية والمركبات البروتينية المفصولة منها لثمارالتفاح في مستويات الكلوتاثـايون والمالوندايالديهايد :

أدى حقن الراسب البروتيني البارد والمغلي والمركبان A البارد والمغلي والمركب B المغلي فـي التجويف البريتوني لذكور الفئران المعرضة للكرب التأكسدي المستحدث ببيروكـسيد الهيـدروجين الـى ارتفاع معنوي ($p < 0.05$) في مستوى الكلوتاثايون في أنسجة الكبد والكلية والقلب، في حـين انخفـض معنويا ($p < 0.05$) مستوى المالوندايالديهايد في أنسجة الكبد والكلية والقلب عند المقارنـة مـع الفئـران المعاملة ببيروكسيد الهيدروجين مع ماء الشرب فقط ولم تؤد المعاملة بالمركب البروتيني B البـارد الـى فرق معنوي ($p > 0.05$) في مستوى الكلوتاثايون والمالوندايالديهايد في أنسجة الكبد والكلية والقلب عنـد المقارنة مع الفئران المعاملة ببيروكسيد الهيدروجين مع ماء الشرب فقط، وكما موضح في الجدول (8).

إن الانخفاض الحاصل في مستوى الكلوتاثايون قد يعزى الى قـدرة هـذه الرواسـب والمركبـات البروتينية على تنشيط آلية بناء الكلوتاثايون مـن خـلال زيـادة فعاليـة انـزيم كلوتاثـايون سـينثيتيز (Hartnett et al., 2000)، أما الانخفاض الحاصل في مستوى المالوندايالديهايد قد يعـزى الـى ان هـذه الرواسب لها آلية مضادة لعملية بيروكسدة الدهون، او تعمل على تنشيط مضادات الأكـسدة مثـل أنـزيم سوبر اوكسايد ديسموتيز SOD ، او أنزيم الكاتاليز CAT (Kesavulu et al., 2000).

الجدول 7: تاثير المستخلص المائي الخام وغير البروتيني البارد والمغلي ومستخلص القلويدات والفلافونويدات والكلايكوسيدات لثمار التفاح في مستويات الكلوتاثايون والمالوندايالديهايد في أنسجة الكبد والكلية والقلب في ذكور الفئران المعرضة للكرب التأكسدي بوساطة بيروكسيد الهيدروجين

المعاملات	الكلوتاثايون (نانومول/غم)			المالوندايالديهايد (نانومول/غم)		
	الكبد	الكلية	القلب	الكبد	الكلية	القلب
السيطرة (المحلول الملحي الفسلجي)	e 22.94 ±5276.34	d 20.1 ±2080.98	bc 33.51 ±2077.51	de 13.4 ±630.51	a 11.51 ±446.53	b 11.51 ±345.31
فئران معاملة ببيروكسيد الهيدروجين (0.5%) مع ماء الشرب فقط	a 35.81±4777.33	a 30.51 ±1800.51	a 42.51 ±1788.51	f 11.60 ±738.51	h 21.51 ±740.51	i 13.11 ±650.51
الانسولين	cd 20.51 ±5253.68	cd 45.61 ±2080.51	cd 61.35 ±2105.56	ab 12.3 ±600.51	a 12.31 ±419.51	ab 14.12 ±330.51
المستخلص المائي الخام البارد	b 30.58 ±5232.51	bc 20.51 ±2021.51	bc 40.51 ±2058.51	e 11.5 ±640.51	f 11.01 ±658.51	h 15.11 ±652.51
المستخلص المائي الخام المغلي	bc 31.51 ±5230.51	bc 42.51 ±2028.51	b 50.11 ±2042.51	cde 13.1 ±620.51	fg 14.51 ±639.58	h 11.31 ±630.52
المستخلص غير البروتيني البارد	bc 41.01 ±5221.57	bc 20.51 ±2035.51	bc 41.51 ±2056.61	cde 11.3 ±625.61	fg 12.51 ±630.51	g 14.51 ±660.41
المستخلص غير البروتيني المغلي	bc 29.01 ±5230.61	bc 43.51 ±2033.51	bc 33.51 ±2033.51	bcd 13.21 ±609.51	e 3.51 ±600.51	g 21.52 ±540.51
مستخلص القلويدات	de 30.71 ±5281.52	de 32.1 ±2080.51	e 41.51 ±2135.61	cde 10.57 ±623.22	cd 13.41 ±529.32	de 11.31 ±439.51
مستخلص الفلافونويدات	f 20.51 ±5330.52	cd 41.51 ±2020.51	de 22.41 ±2127.51	a 21.4 ±569.11	a 20.31 ±408.31	a 10.11 ±401.52
مستخلص الكلايكوسيدات	e 30.41 ±5220.41	e 22.11 ±2120.54	e 11.51 ±2128.61	ab 10.11 ±579.41	b 10.11 ±449.31	ab 30.41 ±338.41

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

تشير القيم اعلاه الى المعدل ± الانحراف القياسي.

الجدول 8: تاثير الرواسب البروتينية والمركبات المفصولة منها لثمارالتفاح في مستويات الكلوتاثايون والمالوندايالديهايد في انسجة الكبد والكلية والقلب لذكور الفئران المعرضة للكرب التأكسدي بوساطة بيروكسيد الهيدروجين

المعاملات	الكلوتاثايون (نانومول/غم)			المالوندايالديهايد (نانومول/غم)		
	الكبد	الكلية	القلب	الكبد	الكلية	القلب
السيطرة (المحلول الملحي الفسلجي)	e 22.94 ±5276.34	d 20.1 ±2080.98	bc 33.51 ±2077.51	de 13.4 ±630.51	a 11.51 ±446.53	b 11.51 ±345.31
فئران معاملة ببيروكسيد الهيدروجين (0.5%) مع ماء الشرب فقط	a 35.81±4777.33	a 30.51 ±1800.51	a 42.51 ±1788.51	f 11.60 ±738.51	h 21.51 ±740.51	i 13.11 ±650.51
الانسولين	cd 20.51 ±5253.68	cd 45.61 ±2080.51	cd 61.35 ±2105.56	ab 12.3 ±600.51	a 12.31 ±419.51	ab 14.12 ±330.51
الراسب البروتيني البارد	b 31.81 ±5220.52	b 11.51 ±2010.51	b 31.51 ±2039.51	bcd 10.51 ±609.54	d 20.11 ±569.31	f 20.31 ±400.51
الراسب البروتيني المغلي	bcde 41.5 ±5250.62	cd 21.31 ±2060.51	bcd 11.51 ±2041.51	abc 15.31 ±595.32	c 11.31 ±514.31	cd 20.52 ±420.40
المركب البروتيني A البارد	b 22.51 ±4215.31	b 12.31 ±2080.51	b 10.5 ±2040.5	bc 20.31 ±600.53	f 30.33 ±623.11	e 30.11 ±450.32
المركب البروتيني B البارد	a 31.52 ±4778.51	a 43.3 ±1805.21	a 30.51 ±1780.51	f 40.3 ±716.54	h 39.31 ±719.31	i 32.11 ±746.31
المركب البروتيني A المغلي	cde 32.74 ±5270.22	cd 40.11 ±2069.51	de 10.51 ±2125.41	ab 20.11 ±580.31	e 20.11 ±594.11	c 20.11 ±400.51
المركب البروتيني B المغلي	bcde 43.11 ±5260.57	cd 10.11 ±2058.11	bcd 41.5 ±2039.51	abc 19.31 ±590.31	c 30.31 ±510.32	cd 31.11 ±418.11

الاحرف المختلفة عموديا تعني وجود فرق معنوي عند مستوى (0.05)

تشير القيم اعلاه الى المعدل ± الانحراف القياسي.

المصادر العربية

جامعة الدول العربية، المنظمة العربية للتنمية الزراعية 1988. النباتات الطبية والعطرية والـسامة فـي الوطن العربي. دار مصر للطباعة، الخرطوم، السودان.

عبيد، البشير بن عبد الرحمن 2000. النباتات والثمار غذاء ودواء. دار اليوسف للطباعة والنشر, بيروت, لبنان, 3.

محمد، اسماعيل حسن 1998. تاثير الانسولين والباراسيتامول والاوكسي تتراسايكلين على بعض الجوانب الكيميائية الحياتية في الجرذان السليمة والمصابة بالسكري المحدث بالالوكسان. رسالة ماجستير، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل.

نصر، شحات 1986. النباتات والاعشاب الطبية"، منشأة المعارف، القاهرة، مصر، 130.

هاشم، سامي وجميل، مهند 1988. النباتات والاعشاب العراقية بين الطب الشعبي والبحث العلمي، الطبعة الاولى، مطابع دار الثورة، بغداد، 3.

REFERENCES

Ahmed, T.Y.; Al-Chalabi, N.S. and Al-Jarah, I.S., 2002. Hypoglycemic activity of proteinous and non proteinous fractions from aqueous *Brassica campestris linn var. repa* root extract, Raf. J. Sci., 13(4): pp.27-37.

Ashcroft, F.M. and Ashcroft, S.J.H., 1992. Insuline Molecular Biology to Pathology, IR1 Press, pp. 155-174.

Chavez-Miranla, A.A.; Garcia-Vega, L.M. and Flores-Saenz, T.L., 2002. Studies on hypoglycemic activity of Mexican medical plants, Proc. West. Pharmacol. Soc., 45: pp.118-124.

Chen, J.H.; Chen, H.I. and Tsai, S.J., 2000. Chronic consumption of raw but not boiled weish apple juice platelet function, J. Nutr., 130: pp.34-37.

Cho, S.Y.; Park, E.M.; Choi, M.S. and Park, T.B., 2002. Alternation of hepatic antioxidant enzyme activities and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats by supplementation of dandelion water extract, Clin. Chim. Acta, 317: pp.109-117.

Day, C., 1995. Hypoglycemic plant compounds , Pract. Diab. Internat., 12: pp.269-271.

Guyton, A.C. and Hall, J.E., 2000. Textbook of Medical Physiology, 10th ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA, pp. 1141-1183.

Harbone, J.B., 1973. Phytochemical Methods, 1st ed., COX and Wayman Ltd., London, 192 p, 519 p.

Hartnett, E.M.; Stratton, B.R. and Armstrong, R.D., 2000. Serum markers of oxidative stress and severity of diabetic netinopathy, Diabet. Care, 23: pp.234-240.

Henriksen, A.V.; Lotte, N.K. and Capristo, E., 1999. Triglyceride-induced diabetes associated with familial lipoprotein lipase deficiency, Diabetes, 48: 1258-1236.

Honglei, S.; Engelen, W.; Vortommen, J. and Leeuw, I., 2000. Long-term pharmacologic doses of vitamin E only moderately affect the erythrocytes of patients with type I diabetes mellitus. J. Nutr., 131: pp.1723-1730.

James, R.C.; Goodman, D.R. and Harbison, R.D., 1982. Hepatic glutathione and hepatotoxicity, changes induced by selected marcortics, J. Pharmaco. Therap., 221: pp.708-714.

Kato, A. and Miura, T., 1993. Hypoglycemic activity of polyganti rhizome in normal and diabetic mice, Biol. Pharm. Bull., 16: pp.1118-1120.

Kesavulu, M.M.; Giri, R. and Apparao, C., 2000. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in type 2 diabetic with microvascular complications, Diabet. Metabol., 26: pp.387-392.

Koya, D.; Hayashi, K. and Haneda, M., 2003. Effects of antioxidant in diabetes-induced oxidative stress in the glomeruli of diabetic rats. J. Am. Soc. Nephrol., 14: pp.S250-S253.

Larsson, A. and Anderson, M., 2001. Glutathione Synthetase Deficiency and other Disorders of the Gamma-Glutamyl Cycle, 8th ed. McGraw-Hill, New York,. 257 p.

Machler, P.; Wollheim, C.B., Bentzen, C.I. and Niesor, E., 1993. Importance of exogenous cholesterol in diabetic rats: Effect of treatment with insulin or with an acyl CoA: Cholesterol acyl transferase inhibitor, Ann. Nutr. Metab., 37: pp.199-209.

Murray, R.K.; Granner, D.K.; Mayes, P.A. and Rodwell, V.W., 2000. Harper's Biochemistry, 25th ed., Appleton and Lange, USA, pp. 155-156.

Plummer, D.T., 1978. An Introduction of Practical Biochemistyr, 2nd ed., McGraw-Hill Book Company, UK, 61 p..

Robyt, F.J. and White, J.B., 1987. Biochemical Techniques, Theory and Practice, Brookes / Cloe Publishing Company, Monterey, California.

Schacterle, G.R. and Pollack, 1973. A simplified method for the quantitative assay of small amount of protein in biological materials. Anal. Biochem., 51: pp.654-655.

Toro, G. and Ackermann, P.G., 1975. Practical Clinical Chemistry, Little, Borwnand Company, Boston, 354 p..

Volken, E.; Nurperi, G. and Ahmet, B., 2001. N-acetyl cystine reduces cerebral lipid peroxidation in a rat model of infantile hydrocephalus, J. Neurol. Sci., pp.1302-1310.