

دراسة كيميائية حيائية للمركبات البروتينية من بذور نبات البازاليا *Pisum sativum* وتأثيرها في الفئران السليمة (الجزء الاول)

ناهدة سعيد حمودي الجبلي ، إيمان سعيد شمعون الجوكا
قسم الكيمياء ، كلية التربية جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

الملخص

صممت هذه الدراسة لعزل ودراسة المركبات البروتينية من المستخلص المائي بارد والمغلي لبذور نبات البازاليا *Pisum sativum* باستخدام التقنيات الحياتية المختلفة ، المتضمنة ترسيب الجزء البروتيني في كل من المستخلص المائي البارد والمغلي باستخدام الاسيتون البارد ، وباستخدام تقنية الترشيح الهلامي تم فصل مركبي A و B من الراسب البروتيني الناتج من المستخلص المائي البارد والمغلي لبذور نبات البازاليا ، وقدرت الاوزان الجزيئية التقريبية لهذه المركبات باستخدام تقنية الترشيح الهلامي بمقارنتها مع مواد بروتينية معلومة الوزن الجزيئي ، وكانت الاوزان الجزيئية التقريبية للمركبين A و B الناتجين من مادة الراسب البروتيني المعزولة من المستخلص المائي البارد هي (213353) و (859) دالتون على التوالي ، بينما كانت الاوزان الجزيئية للمركبين A و B الناتجين من مادة الراسب البروتيني المعزولة من المستخلص المائي المغلي هي (204903) و (900) دالتون على التوالي .

كما تضمنت الدراسة تأثير الرواسب البروتينية الناتجة من الترسيب بالاسيتون من المستخلص المائي البارد والمغلي والمركبات البروتينية المفصولة منها في الفئران السليمة وأشارت النتائج بعد اسبوع من المعاملة الى ان الرواسب البروتينية للمستخلص المائي البارد والمغلي وبجرع 5.9, 15.75 ملغم/ كغم وزن الجسم على التوالي ادت الى انخفاض معنوي في مستوى كل من الكلوكونز والكوليستيرول الكلي وكوليستيرول البروتين الدهني واطىء الكثافة في مصل الدم بينما احدثت ارتفاعا معنويا في مستوى كوليستيرول البروتين الدهني عالي الكثافة في المصل في حين لم تحدث أي فرق معنوي في مستوى الدهون الكلية في الفئران السليمة . ومن بين المركبات البروتينية المفصولة بتقنية الترشيح الهلامي وبجرعة 4.09 ملغم/كغم وزن الجسم اظهر المركب A المفصول من الراسب البروتيني المغلي تأثيرا خافضا في مستوى الكوليستيرول الكلي وكوليستيرول البروتين الدهني واطىء الكثافة وارتفاعا معنويا في مستوى كوليستيرول البروتين الدهني عالي الكثافة بينما ادت انخفاض غير معنوي في مستوى الدهون الكلية في الفئران السليمة . اما المركب B المفصول من الراسب البروتيني للمستخلص المائي المغلي وبجرعة 1.5 ملغم /كغم وزن الجسم اظهرت تأثيرا خافضا لمستوى الكلوكونز فقط في الفئران السليمة.

استنتجت الدراسة ان الراسب البروتيني البارد والمغلي والمركب البروتيني B المغلي لبذور نبات البازاليا يمتلك تأثيرا مخفضا للكلوكوز في الفئران السليمة.

المقدمة

البقولية Leguminosae تمت دراسة تأثير المستخلص المائي لبذور نبات *(Canavalia ensiformis)* في الجرذان المصابة بداء السكر (10) كما درست فعالية نباتي الفاصوليا *(Phaseolus vulgaris)* واللوبيا *(Vigna sinensis)* في ذكور الفئران السليمة والمصابة بداء السكر المستحدث بالالوكسان ، وقد اشارت النتائج الى احتواء الراسب البروتيني للمستخلص المائي البارد لثمرة نبات اللوبيا على مركب بروتيني لديه تأثير ملحوظ في خفض مستوى السكر في الدم والدهون الكلية في الفئران المصابة بداء السكر (11)، اضافة الى بحث عديدة تم فيها دراسة فعالية نباتات مختلفة في خفض كلوكوز الدم في الفئران السليمة وبعض متغيرات الكيموحيوية الاخرى (12-16).

والهدف من البحث عزل الاجزاء البروتينية من المستخلص المائي الخام البارد والمغلي لبذور نبات البازاليا باستخدام التقنيات الحياتية المختلفة وإيجاد الاوزان الجزيئية التقريبية للمركبات البروتينية المفصولة ودراسة تأثير المواد المعزولة اعلاه وفعاليتها في عدد من المتغيرات الكيموحيوية (الكلوكوز ، الكوليستيرول الكلي ، الدهون الكلية ، كوليستيرول البروتين الدهني عالي الكثافة وكوليستيرول البروتين الدهني واطىء الكثافة) في مصل دم ذكور الفئران السليمة اما الجزء الثاني من الدراسة اللاحقة فهو

ينتمي نبات البازاليا الى العائلة البقولية وهذه العائلة تنتمي إلى رتبة الورديات (1) . وهو محصول سنوي متسلق ، والاثمار قرنية تحتوي على البذور الكروية. (2,3) يحتوي النبات على القلويدات وكومارينات والترينويدات والفلافونيدات وستيرويدات (4) ، فضلاً عن الماء والبروتين ودهون و كاربوهيدرات ، واغلب الكاربوهيدرات الموجودة في البازاليا هي النشا (5) ، كما توجد كمية قليلة من الالياف فيها. علما ان بروتين البازاليا يحتوي على العديد من الاحماض الامينية مثل التايروسين و السيسيتين و اللايسين و التربتوفان و الثريونين والميثيونين ، اذ ان الميثيونين والسيسيتين تعد من الاحماض الامينية الرئيسية الموجودة في بروتين البازاليا (6,7) كما وجد ان حبوب البازاليا تحتوي على انزيم التربسين والكيموتربسين التي قد تستخدم موانع حمل ومضادات للفطريات وقتلاً للنطف (8) ، كما ان البازاليا لها تأثير في خفض نسبة السكر في الدم (3) . كما تستخرج من البذور صبغة تستخدم لعلاج التهاب اغشية المخ (2). كما ذكرت أسماء مجموعة من النباتات ومنها ثمار الفواكه والخضراوات التي تستخدم مواد خافضة للسكر ومنها الخس و الفطر والبازاليا والشلغم فضلاً عن عدد من انواع الفاكهة كالتفاح والليمون (9) . وفي دراسات اخرى على بعض نباتات العائلة

له وقلص حجم المستخلص المستحصل عليه كما مبين سابقا في الفقرة (1) اعلاه .

عزل البروتينات وترسيبها

تم ترسيب البروتينات كل من المستخلص المائي البارد والمغلي باستخدام الأسيتون البارد ونسبة (60:40) حجم : حجم على التوالي (19) تم الحصول على الراسب البروتيني بعد فصله بجهاز الطرد المركزي المبرد وبسرعة 6000xg ولمدة 20 دقيقة . بعد ذلك وضع الراسب البروتيني في جهاز التجفيد لعدة ساعات للحصول على المادة البروتينية بشكل مسحوق .

فصل وتنقية البروتين

نقي البروتين الخام الذي عزل بالترسيب وذلك باستخدام تقنية الترشيح الهلامي Gel Filtration (20) من خلال عمود فصل ذي أبعاد 1.8x120 سم والحاوي على مادة السيفاديكس (Sephadex G-50) بارتفاع 110 سم . وبمعدل جريان 42 مل/ساعة .

تعيين الوزن الجزيئي التقريبي للمركبات البروتينية المفصولة

استخدم نفس عمود الفصل المذكور اعلاه لتعيين الوزن الجزيئي التقريبي للمركبات البروتينية المفصولة لبذور نبات البازاليا بعد تمرير محاليل المواد القياسية المعلومة الوزن الجزيئي فيه ومحلول البروتين الخام (21).

تحديد الجرعة المؤثرة

استخدمت فئران سليمة تراوحت أوزانها (30-35) غم قسمت إلى (6) مجاميع تضم كل مجموعة (4) فئران لكل من المستخلص المائي البارد والمغلي عوملت كما يأتي :

تحديد الجرعة المؤثرة للمستخلص المائي الخام البارد والمغلي لبذور نبات البازاليا

1. المجموعة الأولى حقنت في التجويف لبريتوني (Intraperitoneally) بـ (0.5) سم³ من المحلول الملحي الفسلجي وعدت مجموعة سيطرة .
2. المجاميع من (2-6) حقنت في التجويف البريتوني بالجرع (100 و 250 و 500 و 750 و 1000 ملغم/كغم) من وزن الجسم على التوالي من المستخلص المائي الخام البارد لبذور نبات البازاليا . تكرر طريقة العمل (خطوة 1,2) اعلاه بصورة مشابهة باستخدام المستخلص المائي الخام المغلي لبذور نبات البازاليا وبعد ساعتين من إجراء عملية الحقن تم سحب الدم من الفئران من جيب محجر العين، قيس مستوى الكلوكرز في مصل الدم حالا ثم اختبرت الجرعة الأكثر تأثيرا في خفض مستوى كلوكرز الدم وعدت جرعة مؤثرة.

حقن الحيوانات السليمة

حقنت الفئران في التجويف البريتوني بجرع مقدارها (10.1 , 4.3 , 4.09 , 1.5 ملغم/كغم) من وزن الجسم بالمركبات البروتينية المفصولة بتقنية الترشيح الهلامي (22) في حين حقنت مجموعات أخرى بمواد الرواسب البروتينية الخام وبجرع مقدارها (15.75 , 5.9 ملغم/كغم) من وزن الجسم على التوالي قدرت هذه الجرعة حسابيا نسبة الى قيمة الجرعة المؤثرة في كل من المستخلص المائي البارد والمغلي لبذور نبات البازاليا التي تم الحصول عليها عمليا .

دراسة تأثير هذه المركبات في الفئران المصابة بداء السكر المستحدث بالالوكسان والمعرضة للكرب التأكسدي المستحدث ببيروكسيد لهيدروجين .

المواد وطرائق العمل

النبات المستخدم

الاسم العربي للنبات : بازاليا

الاسم الإنكليزي للنبات : Green pea

الاسم اللاتيني للنبات : *Pisum sativum*

تم الحصول على بذور نبات البازاليا من الأسواق المحلية في مدينة الموصل وذلك في الشهر الخامس من عام 2005 ، ووضعها في أكياس بلاستيكية ، وضعت بعدها في المجمدة لحين استعمالها فيما بعد ، وصنفت في كلية التربية / قسم علوم الحياة .

الحيوانات المستخدمة

استخدمت في هذه الدراسة ذكور الفئران البيض السليمة male Albino mice المجهزة من كليتي (الطب،التربية/جامعة الموصل) وتقاربت أوزانها بين (30-35 غم) وضعت في أقفاص خاصة معدة ومجهزة لهذا الغرض ، وزودت بالماء والعلف الحيواني الخاص بها باستمرار واخضعت جميع الحيوانات للظروف ذاتها من ضوء طبيعي ودرجة حرارة (25)°م

طرائق العمل

تحضير المستخلصات

1 - تحضير المستخلص المائي البارد لبذور نبات البازاليا :

وزن (500) غرام من بذور نبات البازاليا ، وسحقت باستخدام آلة الثرم (Blender) لمدة 10 دقائق ومزجت مع الماء المقطر بنسبة (1 و وزن:3 حجم) . بعدها جمدت بإضافة النتروجين المسال ثم تركت تذوب عند درجة حرارة الغرفة وكررت العملية ثلاث مرات بعد ذلك حرك الخليط لمدة ساعتين تحت تأثير المحرك الكهربائي مع مراعاة التبريد في حمام ثلجي . ورشح من خلال عدة طبقات من الشاش وفصل المستخلص بجهاز الطرد المركزي المبرد للتخلص من المواد غير الذائبة لمدة (15) دقيقة بسرعة (33520xg) للحصول على راسح رائق (17) وقيس حجم الراشح (1378) سم³ ، وقدرت كمية البروتين له بحسب طريقة لاوري المحورة (18) وقلص حجم المستخلص الخام المستحصل عليه تقريبا إلى الثلث بوساطة جهاز التجفيف بالتبريد (التجفيد) (Lyophilizer) ، وبذلك يكون المستخلص معدا لاجراء العملية التالية وهي الترسيب بالاسيتون .

2 - تحضير المستخلص المائي المغلي لبذور نبات البازاليا:

وزن 500 غرام من بذور نبات البازاليا ، وسحقت باستخدام آلة الثرم (Blender) لمدة 10 دقائق ومزجت مع الماء المقطر بنسبة (1 و وزن:3 حجم) . بعدها جمدت باستخدام النتروجين المسال ثم تركت تذوب عند درجة حرارة الغرفة . كررت العملية ثلاث مرات بعد ذلك غلي الخليط في وعاء زجاجي لمدة ربع ساعة ثم ترك ليبرد. رشح من خلال عدة طبقات من الشاش وفصل المستخلص بجهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة (33520xg) لمدة (15) دقيقة وذلك للتخلص من المواد غير الذائبة ، وقيس حجم الراشح (1125) سم³ ، بعدها قدرت كمية البروتين

تقدير المتغيرات الكيموحيوية

قدر مستوى الكلوكوز والكوليستيرول الكلي وكوليستيرول البروتين الدهني عالي وواطئ الكثافة في مصل الدم ، باستخدام عدة التحليل Kit نوع (Syrbio,France) وهي طريقة انزيمية (23) كما قدرت كمية الدهون الكلية في مصل الدم باستخدام الطريقة اللونية (24).

التحليل الاحصائي

حللت نتائج مستويات الكلوكوز والكوليستيرول الكلي والدهون الكلية وكوليستيرول البروتين الدهني عالي الكثافة وكوليستيرول البروتين واطئ الكثافة احصائيا وذلك باستخدام تحليل التباين الاحادي One way analysis of variance كما تم تحديد الاختلافات الخاصة بين المجاميع باستخدام اختبار دنكن Duncan (25) وكان مستوى التمييز الاحصائي المقبول عند 5% ($P < 0.05$).

النتائج والمناقشة

عزل البروتينات وتنقيتها

تتضمن عملية عزل البروتينات وتنقيتها خطوات عديدة متتابعة باستخدام تقنيات حياتية مختلفة ، اذ ان عملية سحب البروتين او ازالته من موقعه الطبيعي في الخلية يعرض البروتين لمجموعة من التغيرات التي تطرأ عليه مالم يتم تحديد ظروف التجربة والسيطرة عليها مثل المحافظة على درجة الحرارة خلال مراحل العزل والتنقية المختلفة واجراء التجربة بدرجات حرارية واطئة لتجنب حدوث عملية المسخ (Denaturation) (27) .

يوضح الجدول (1) كمية البروتينات المقدره بطريقة العالم لاوري المحورة ونسبتها المئوية وكفاءة ترسيبها بالأسيتون في المستخلص المائي الخام .

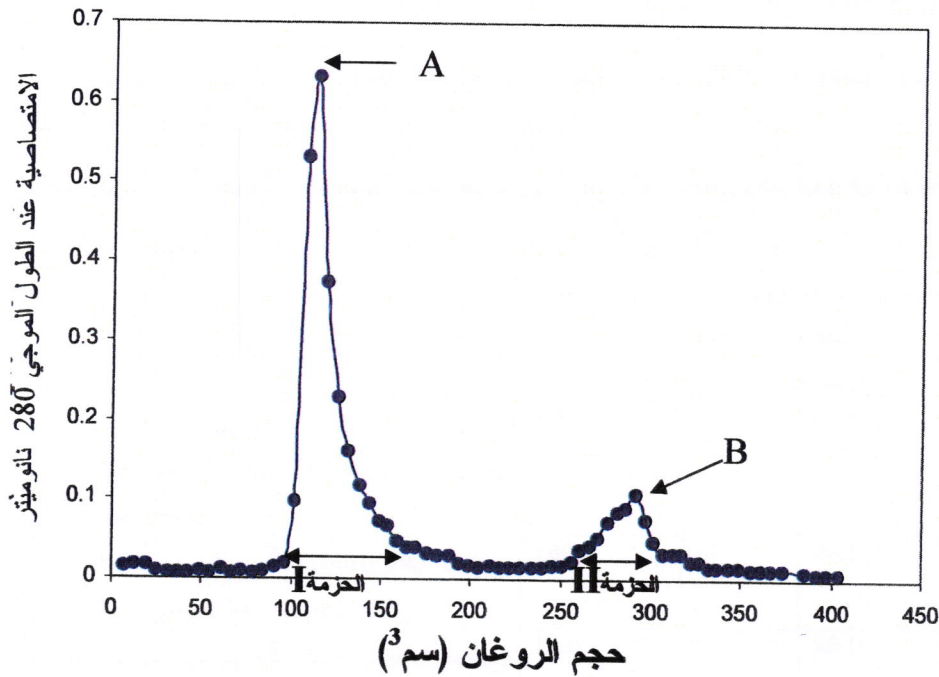
الجدول (1) كمية البروتينات ونسبتها المئوية في المستخلص المائي الخام لنبات البازاليا وكفاءة الترسيب بالأسيتون

نوع المستخلص	تركيز البروتين (ملغم/سم ³)	الحجم الكلي للمستخلص (سم ³)	كمية البروتين الكلي في المستخلص (ملغم)	نسبة البروتين في النبات (%)	وزن النبات (غم)	وزن البروتين المحصل عليه عملياً (ملغم)	كفاءة الترسيب بالأسيتون (%)
المستخلص المائي الخام البارد لنبات البازاليا	7.625	1378	10507.25	2.1	500	9200	87.55
المستخلص المائي الخام المغلي لنبات البازاليا	5.25	1125	5906.25	1.18	500	5111.1	86.53

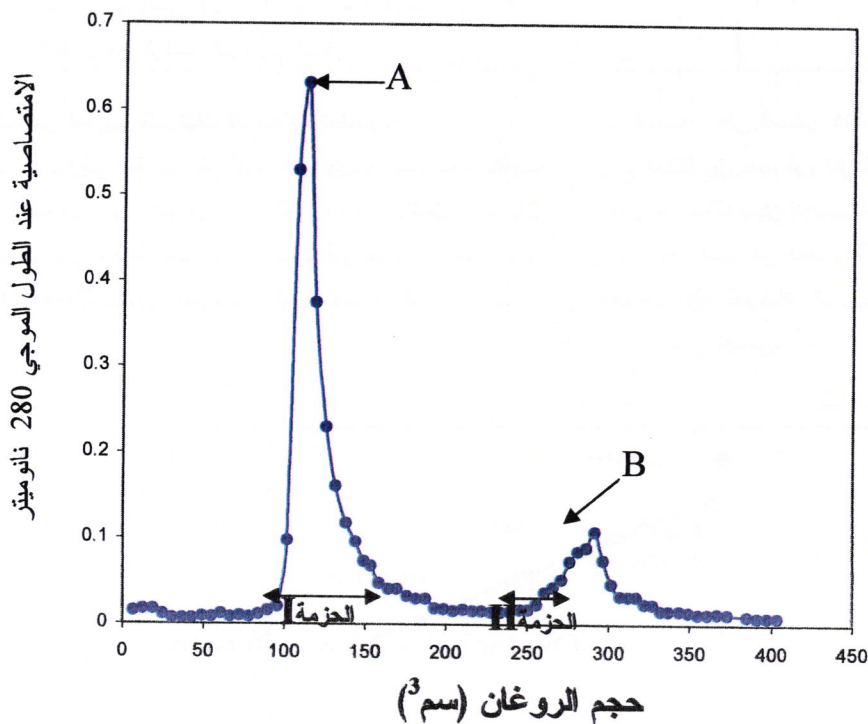
فصل مواد الرواسب البروتينية

تعد طريقة الترشيح الهلامي احدى الطرائق المتبعة عالميا لفصل المركبات اعتمادا على الاختلاف في حجم جزيئاتها فالجزيئات الكبيرة تمر أولا من خلال عمود الفصل أما الجزيئات الصغيرة فسوف تتمكن

من اختراق الهلام لذلك فانها تستغرق مدة زمنية اطول فتظهر اخيرا (29) وأعطى روغان مواد الرواسب البروتينية المعزولة من المستخلص المائي البارد والمغلي لنبات البازاليا قمتين واضحتين عند إمرار محلولها في عمود الفصل المذكور سابقا والمبينة في الشك (1,2) .



الشكل (1): المظهر الجانبي لروغان الراسب البروتيني المعزول من المستخلص المائي الخام لنبات البازاليا بتقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفصل ذي الابعاد (1.8 X120) سم والحلوي على الهلام من نوع **Sephadex G-50** الاسهم **A** و **B** تمثل حجم الروغان للقمم الاولى (113.8) سم³ والثانية (291) سم³ على التوالي للمركبات البروتينية المفصولة ، حجم كل جزء (7) مل وبمعدل جريان (42 سم³/ساعة).



الشكل (2) : المظهر الجانبي لروغان الراسب البروتيني المعزول من المستخلص المائي الخام المقلي لنبات البازاليا بتقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفصل ذي الابعاد (1.8 X120) سم والحلوي على الهلام من نوع **Sephadex G-50** الاسهم **A** و **B** تمثل حجم الروغان للقمم الاولى (115) سم³ والثانية (289.7) سم³ على التوالي للمركبات البروتينية المفصولة ، حجم كل جزء (7) مل وبمعدل جريان (42 سم³/ساعة)

بعد فصل المركبات البروتينية من المحلول المركز لمواد الرواسب قدرت كمية البروتين بطريقة العالم لاوري المحورة ، ومن ثم تم إيجاد البروتينية التي مررت في عمود الفصل كما ذكر في طريقة العمل . كفاءة الفصل في العمود المستخدم بتقنية الترشيح الهلامي والجدول (2)

يبين النتائج التي تم الحصول عليها ولمرة واحدة . بعد ذلك كررت عملية البروتينية B, A المفصولة وذلك لأختبار تأثيراتها في الفئران في الجزء الفصل هذه عدة مرات لغرض الحصول على كمية وافية من المركبات اللاحق من الدراسة.

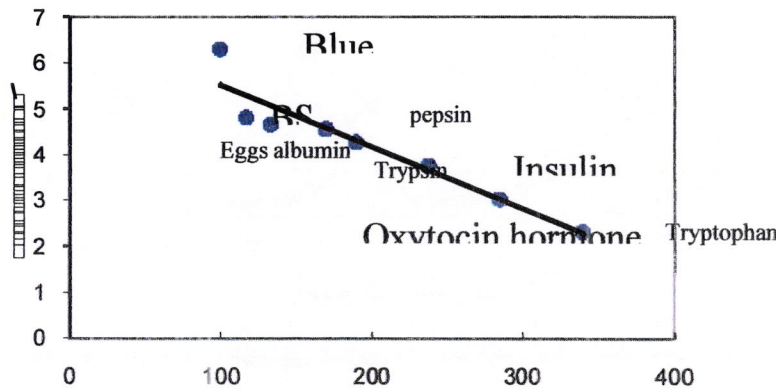
الجدول(2): كمية البروتين للمحلول المركز قبل تمريره على عمود الفصل والمركبات البروتينية الناتجة من الترشيح الهلامي

نوع البروتين	تركيز البروتين (ملغم/سم ³)	الحجم الكلي (سم ³)	كمية البروتين الكلي (ملغم)	النسبة المئوية (%)	كفاءة الفصل (%)
الراسب البروتيني الناتج من المستخلص المائي الخام البارد لبذور نبات البازاليا قبل التمرير في عمود الفصل	1.5	2	3.05	100	91.8
المركب البروتيني A المفصول بتقنية الترشيح الهلامي من الراسب البروتيني البارد	0.065	30	1.96	64.26	
المركب البروتيني B المفصول بتقنية الترشيح الهلامي من الراسب البروتيني البارد	0.02	42	0.84	27.54	
الراسب البروتيني الناتج من المستخلص المائي الخام المغلي لبذور نبات البازاليا قبل التمرير في عمود الفصل	1.35	2	2.71	100	93.35
المركب البروتيني A المفصول بتقنية الترشيح الهلامي من الراسب البروتيني المغلي	0.062	30	1.87	69	
المركب البروتيني B المفصول بتقنية الترشيح الهلامي من الراسب البروتيني المغلي	0.015	44	0.66	24.35	

وتم الحصول على المنحني القياسي الشكل (3) لتقدير الوزن الجزيئي من رسم العلاقة بين حجم الروغان لكل مادة ولوغاريتم الوزن الجزيئي والذي من خلاله يمكن تحديد الوزن الجزيئي التقريبي للمركبات المفصولة والمبينة في الجدول(3) من خلال إسقاط حجم الروغان الذي تم الحصول عليه للمركبات البروتينية المفصولة بتقنية الترشيح الهلامي على المنحني القياسي.

الوزن الجزيئي التقريبي للمركبات البروتينية المفصولة

لتعين الوزن الجزيئي التقريبي للمركبات البروتينية المفصولة بتقنية الترشيح الهلامي مرر عدد من المواد المعلومة الوزن الجزيئي خلال عمود الفصل الذي استخدم سابقا تراوحت أوزانها الجزيئية بين (204-2000000) دالتون ، بعد ذلك تم تعيين حجوم الروغان لهذه المواد .



حجم الروغان سم³

الشكل(3): المنحني القياسي لتقدير الوزن الجزيئي التقريبي للبروتينات

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

المادة	حجم الروغان (سم ³)	الوزن الجزيئي التقريبي (دالتون)
المركب البروتيني A المفصول من الراسب البروتيني للمستخلص المائي الخام البارد لبذور نبات البازاليا	113.8	213353.61
المركب البروتيني B المفصول من الراسب البروتيني للمستخلص المائي الخام البارد لبذور نبات البازاليا	291	859.40
المركب البروتيني A المفصول من الراسب البروتيني للمستخلص المائي الخام المغلي لبذور نبات البازاليا	115	204903.79
المركب البروتيني B المفصول من الراسب البروتيني للمستخلص المائي الخام المغلي لبذور نبات البازاليا	289.7	900.43

الجدولين ان قيمة الجرعة المؤثرة هي (750) ملغم/غم من وزن الجسم للمستخلص المائي الخام البارد و(500) ملغم/كغم من وزن الجسم للمستخلص المائي الخام المغلي لبذور نبات البازاليا .

تحديد الجرعة المؤثرة في خفض مستوى الكلوكوز في الدم يوضح الجدولان (5,4) تحديد الجرعة الاكثر تأثيرا في خفض مستوى الكلوكوز في ذكور الفئران البيض السليمة لكل من المستخلص المائي الخام البارد والمغلي لبذور نبات البازاليا. وقد تبين من خلال هذين

الجدول(4): تحديد الجرعة المؤثرة للمستخلص المائي الخام البارد لبذور نبات البازاليا في خفض مستوى الكلوكوز في دم ذكور الفئران

السيطرة	جرعة المستخلص المائي الخام البارد ملغم/كغم وزن الجسم					تركيز الكلوكوز ملي مول/لتر
	1000	750	500	250	100	
	0.74±9.12	0.6±4.04*	0.61±6.56	0.36±5.28	0.22±4.91	0.60±5.55

تشير قيم الكلوكوز الى المعدل ± الانحراف القياسي
* تشير الى الجرعة المؤثرة

الجدول(5) : تحديد الجرعة المؤثرة للمستخلص المائي الخام المغلي لبذور نبات البازاليا في خفض مستوى

الكلوكوز في دم ذكور الفئران

السيطرة	جرعة المستخلص المائي الخام المغلي ملغم/كغم وزن الجسم					تركيز الكلوكوز ملي مول/لتر
	1000	750	500	250	100	
	0.56±9.44	0.84±6.05	0.13±4.43*	0.31±4.77	0.1±5.24	0.39±6.23

تشير قيم الكلوكوز الى المعدل ± الانحراف القياسي .

● تشير الى الجرعة المؤثرة

الى تثبيط امتصاص الكلوكوز من القناة الهضمية ولهذا فان امكانية تأخير امتصاص الكلوكوز من الامعاء قد تكون مسؤولة جزئياً عن تثبيط ارتفاع مستوى الكلوكوز في الفئران (30) كما يمكن ان يعزى هذا الانخفاض الى تثبيط فعالية أنزيم كلوكوز 6 فوسفاتيز (31) .

بينما احدثت المعاملة بالراسب البروتيني للمستخلص المائي البارد والمغلي والمركب A المفصول منهما بالتجفيف البريتوني وبالجرع المبينة في الجدول (8) في الفئران السليمة انخفاضاً معنوياً في مستوى الكوليستيرول الكلي عند المقارنة مع مجموعة السيطرة C ، ان

تأثير الراسب البروتيني المعزول من المستخلص المائي البارد والمغلي والمركبات البروتينية المفصولة بتقنية الترشيح الهلامي على بعض المتغيرات الكيموحيوية في مصل الفئران السليمة

أدت المعاملة بالراسب البروتيني للمستخلص المائي البارد والمغلي والمركب البروتيني B المفصول من الراسب البروتيني للمستخلص المائي المغلي بالتجفيف البريتوني بالجرع المشار اليها في الجدول (8) انخفاضاً معنوياً في مستوى الكلوكوز في الفئران السليمة عند المقارنة مع مجاميع السيطرة C ، وربما يعزى هذا الانخفاض في مستوى الكلوكوز

A على رفع مستوى كوليستيرون البروتين الدهني عالي الكثافة الى زيادة تحفيز خلايا الكبد على تكوين apoA-I الذي يكون ضروريا في تكوين جزيئات البروتين الدهني عالي الكثافة (37)، في حين أدت المعاملة بالمركب البروتيني B المفصول من الراسب البروتيني للمستخلص المائي البارد وبالجرعة 4.3 ملغم / كغم انخفاضاً معنوياً في مستوى كوليستيرون البروتين الدهني عالي الكثافة ، بينما لم يؤد المركب البروتيني B المفصول من الراسب البروتيني للمستخلص المائي المغلي فرقاً معنوياً في مستوى هذا المتغير في الفئران السليمة عند المقارنة مع مجموعة السيطرة C.

ان سبب الانخفاض الحاصل في مستوى كوليستيرون البروتين الدهني عالي الكثافة عند المعاملة بالمركب البروتيني B البارد قد يعزى الى انخفاض فعالية انزيم لايبوبروتين لايباز (38) .

اما بالنسبة للانخفاض المعنوي الحاصل في مستوى كوليستيرون البروتين الدهني واطئ الكثافة في الفئران ، نتيجة المعاملة بالراسب البروتيني للمستخلص المائي البارد والمغلي والمركب البروتيني A المفصول منهما ، قد يعزى هذا الانخفاض الى ان هذه الرواسب والمركب البروتيني المفصول منهما تعمل على زيادة عدد مستقبلات البروتينات الدهنية واطئة الكثافة (39) .

كذلك أدت المعاملة بالمركب البروتيني B المفصول من الراسب البروتيني للمستخلص المائي المغلي ارتفاعاً غيرمعنوياً في مستوى كوليستيرون البروتين الدهني واطئ الكثافة ، في حين احدثت المعاملة بالمركب البروتيني B المفصول من الراسب البروتيني للمستخلص المائي البارد ارتفاعاً معنوياً في مستوى هذا المتغير في الفئران السليمة عند المقارنة مع مجموعة السيطرة C وربما يعزى التأثير الراجع لمستوى كوليستيرون البروتين الدهني واطئ الكثافة الى زيادة تحطم apo B-100 receptor اوقلة انتاجها من قبل الكبد(40) .

التأثير الخافض للرواسب والمركب البروتيني المذكور سابقاً ، يتفق مع التأثير الخافض للمركبين البروتينيين A , B المفصولين من نبات البريبين في الفئران السليمة (32)، وقد يعزى السبب الى ان لبروتين نبات البازاليا تأثيراً في الحد من امتصاص الكوليستيرون من الامعاء وذلك من خلال تثبيط الانزيم Intestinal acyl CoA : cholesterol acyl transferase (33) علاوة على قابليته على زيادة كفاءة عمل مستقبلات البروتينات الدهنية ذات الكثافة الواطئة التي تقوم بنقل الكوليستيرون الى الانسجة (34) ، بينما أدت المعاملة بالمركب البروتيني B المفصول من الراسب البروتيني البارد والمغلي ارتفاعاً معنوياً في مستوى الكوليستيرون الكلي في الفئران السليمة ، وربما قد يعزى سبب ذلك الى قدرة المركب البروتيني B على تثبيط هرمون الغدة الدرقية الثايروكسين مما يؤدي زيادة الكوليستيرون في الدم(35).

أدت المعاملة بالراسب البروتيني للمستخلص المائي البارد والمغلي والمركبين البروتينيين A , B المفصولين من الراسب البروتيني للمستخلص المائي المغلي الى انخفاض غيرمعنوي في مستوى الدهون الكلية في الفئران السليمة عند المقارنة مع مجموعة السيطرة C ، في حين أدت المعاملة بالمركب البروتيني B المفصول من الراسب البروتيني للمستخلص المائي البارد ارتفاعاً معنوياً في مستوى الدهون الكلية ربما يعزى التأثير الراجع لمستوى الدهون الكلية للمركب البروتيني B الى امتلاكه تأثيراً مشابهاً للكلوكاكون او الاينفرين ، او انه قد يعمل على تحفيز خلايا الفا على افراز كمية اضافية من الكلوكاكون(36).

كذلك أدت المعاملة بالراسب البروتيني للمستخلص المائي البارد والمغلي والمركب البروتيني A المفصول منهما في التجويف البريتوني لذكور الفئران السليمة وبالجرع (4.09, 10.1, 5.9, 15.75) ملغم /كغم على التوالي الى ارتفاع معنوي في مستوى كوليستيرون البروتين الدهني عالي الكثافة عند المقارنة مع مجموعة السيطرة C كما موضح في نفس الجدول ، وقد يعزى السبب في قدرة هذه الرواسب والمركب البروتيني

جدول (6): تأثير الرواسب البروتينية والمركبات البروتينية المفصولة منها لبذور نبات البازاليا في مستويات الكلوكوز والكوليستيرول الكلي والدهون الكلية وكوليستيرول البروتين الدهني عالي الكثافة وكوليستيرول البروتين الدهني واطئ الكثافة في مصل ذكور الفئران

السليمة

المعاملات	الكلوكوز (ملي مول/لتر)	الكوليستيرول ل الكلي (ملي مول/ لتر)	الدهون الكلية (ملغم/100سم ³)	كوليستيرول البروتين الدهني عالي الكثافة (ملي مول/لتر)	كوليستيرول البروتين الدهني واطئ الكثافة (ملي مول/لتر)
فئران سليمة معاملة بالمحلول الملحي الفلسجي (سيطرة سليمة C)	ef 0.84±6.32	d ±2.77 0.11	bcd ±349.78 24.94	b 0.03±0.64	g 0.1±2.61
فئران سليمة + الانسولين (10 وحدات دولية/كغم)	a 0.14±2.05	ab ±1.47 0.16	a ±258.84 43.91	f 0.07±1.58	abc 0.03±1.39
فئران سليمة + الراسب البروتيني للمستخلص المائي البارد (15.75 ملغم/كغم)	bcd 0.64±4.81	bc ±1.83 0.11	ab ±304.52 7.13	d 0.11±1.11	cdef 0.1±1.71
فئران سليمة + الراسب البروتيني للمستخلص المائي المغلي (5.9 ملغم/كغم)	bcd 0.28±4.98	a ±1.42 0.06	ab ±292.17 23.36	f 0.09±1.52	ab 0.14±1.37
فئران سليمة + المركب البروتيني A المفصول من الراسب البروتيني للمستخلص المائي البارد (10.1 ملغم/كغم)	cde 0.01±5.43	abc ±1.68 0.15	cde ±401.23 12.3	e 0.05±1.38	bcde 0.08±1.58
فئران سليمة + المركب البروتيني B المفصول من الراسب البروتيني للمستخلص المائي البارد (4.3 ملغم/كغم)	de 0.19±5.6	f ±3.76 0.43	e ±448.55 49.51	a 0.01±0.35	h 0.45±3.58
فئران سليمة + المركب البروتيني A المفصول من الراسب البروتيني للمستخلص المائي المغلي (4.09 ملغم/كغم)	f 0.76±6.95	a ±1.37 0.37	abc ±325.09 71.54	g 0.1±1.84	a 0.13±1.19
فئران سليمة + المركب البروتيني B المفصول من الراسب البروتيني للمستخلص المائي المغلي (1.5 ملغم/كغم)	b 0.43±4.34	e ±3.24 0.23	abc ±327.15 16.3	b 0.1±0.51	gh 0.21±3.06

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

تشير القيم اعلاه الى المعدل ± الانحراف القياسي

المصادر

- 16- Ahmad T.Y., AL -chalabi N.S. and AL -Jarah I.A. , Hypoglycemic activity of proteinous and non proteinous fractions from aqueous *Brassica campestris* Linn var. *rapa* root extract . Raf. Jour.Sci., 13(4):27-37, (2002).
- 17 - عبد المانع ، خالد صالح عمر ، عزل البروتينات والأجزاء غير البروتينية من نباتي السبحيح وخس الزيت ودراسة تأثيرها على مستوى السكر في الدم . رسالة ماجستير ، كلية التربية ، جامعة الموصل (2002).
- 18-Schacterle G.R. and Pollack J.K., A simplified method for the quantitative assay of small amount of protein in biological materials. Anal . Biochem ., 51: 654-655 ,(1973) .
- 19-Roby F.J. and White J.B., Biochemical techniques , theory and practice. Brookes/Cole publishing company , Monterey , California, P268, (1987).
- 20-Stanton P., Gell filtration chromatography . human a press., 251:55-74,(2003).
- 21- Clark j.M. and Switzer R.L., Experimental biochemistry . San Francisco , USA , PP.73-77 , (1977).
- 22-Ahmad T.Y., Al-Chalabi N.S., Hypoglycemic effect of the proteinous compounds isolated from some hypoglycemic plants , part II . Raf . J . Sci ., 13(3) : 1-15 ,(2002b).
- 23-Burtis C.A. and ashwood E.R. ,Tietz text book of clinical chemistry. 3rd ed .,W.B . Saunders company, London , pp. 840 – 841,(1999).
- 24-Toro G. and Ackerman P.G. , Practical clinical chemistry. Little, Brown and company , Boston , p. 354 ,(1975).
- 25-Steel R.G. and Torrie J.H , Principles and procedures of statistics biometrical pproach. 2nd ed., Mc Graw .Hill Inc ., Singapore , p. 183,(1984).
- 26-Kreader C., Weber S., and Song K. ,One-tube preparation and PCR amplification of DNA from plant tissue with extract -N- Amp . Life Sci ., 2 : 1-3,(2004).
- 27-Zubay G., Biochemistry. 3rd ed., Oxford WNC . Brawn Publishers, Vol.1., PP. 730-731,(1993).
- 28 - آل فليح ، خولة احمد، مدخل الى الكيمياء الحياتية. دار الكتب للطباعة والنشر ، الطبعة الثانية ، جامعة الموصل ، ص 467 (2000)
- 29- Plummer D.T., An Introduction of Practical Biochemistry.2nd ed .,McGraw-Hill Book Company,UK.p 61, (1978).
- 30-Parkasam A ., Sethupathy S. and Pugalendi K.V., Effect of *Casearia esculenta* root extract on blood glucose and plasma antioxidant status in streptozotocin diabetic rats . Pol. J. Pharmacol ., 55 : 43-49,(2003).
- 31-Gupta R.K., Kesari A.N., Watal G., Murthy P.S., Chandra R., Maithal K. and Tandon V., Hypoglycemic and antidiabetic effect of aqueous extract of leaves of *Annona squamosa* (L.) in experimental animal. Current Science. , 88(8):1244-1254,(2005).
- 32 - الجلي، ناهدة سعيد حمودي ، عبد المانع ، خالد صالح عمر ، تأثير البروتينات المفصولة من نباتي السبحيح وخس الزيت في الجرذان السليمة والمصابة بداء السكر المستحدث بالالوكسان.(الجزء الثاني) المجلة القطرية للكيمياء 16، ص 465-484 (2004).
- 1 - الكاتب ، يوسف منصور . تصنيف النباتات البذرية . الطبعة الثانية ، مديرية دار الكتب للطباعة والنشر ، جامعة الموصل ، ص 504 505 (200).
- 2-جامعة الدول العربية ، المنظمة العربية للتنمية الزراعية ، النباتات الطبية والعطرية والسامة في الوطن العربي . دار مصر للطباعة ، الخرطوم ، السودان ، ص 222-223 295 967 (1988).
- 3-Hussein F.T.K., Medicinal Plants in Libya .Arab encyclopedia house, Tripoli-Libya , p.666, (1985).
- 4-Panda H., Medicinal plants cultivation and their uses. National Institute of industrial research , new Delhi , India , p. 3,(2004).
- 5-Stanek M., Zdunczyk Z., Purwin C. and Florek S., Chemical composition and nutritive value of seeds of selected pea varieties. Veterinarija IR Zootechnik A.T ., 28(50) : 1392-2130,(2004).
- 6-Huisman J. and Vanderpoel A.F.B., Aspects of the nutritional quality and use of cool season food legumes in animal feed . F Klumer Academic Publishers. Dordrecht, The nether lands, pp.53-56 ,(1994).
- 7-Bressani R. and Elias L.G. ,Seed quality and nutritional goals in pea, Lentil,Faba bean and chick pea breeding. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The nether lands , p.381,(1988).
- 8-Duke J.A., H and book of legumes of world economic importance . Plenum press , New York , p . 199-202,(1981).
- 9-Day C., Hypoglycemic plant compounds . Pract . Diab . Int ., 12(16) : 269-271,(1995).
- 10-Nimenibo-Uadia R., *Ficus exasperate* : effects on diabetes mellitus in an experimental rat model.Global Journal of pure and Applied Sciences ., 9(4) : 529-532 ,(2003).
- 11 - البجاري شهاب احمد يوسف. عزل البروتينات والأجزاء غير البروتينية من ثمري الفاصوليا *Phaseolus vulgaris* واللوبيا *Vigna sinensis* ودراسة تأثيراتها في الفئران. رسالة ماجستير كلية التربية جامعة الموصل ، (2004).
- 12- Ahmad T.Y.,AL -chalabi N.S. and Yacoob M.P., Serum cholesterol ,total lipids, triglycerides levels and liver glycogen ntent in mice treated with proteinous compounds isolated from differenthypoglycemic plants.J.Edu.&Sci., 14(2):36-53,(2002).
- 13- AL -chalabi N.S., Ahmad T.Y. and AL -Jarah I.A. ,Effect of proteinous compounds isolated from hypoglycemic plants on certain biochemical aspects in normal and alloxan induced diabetic mice. Nat. J.of chemistry ., 14: 256-268,(2002).
- 14- AL -chalabi N.S., Biochemical study of the proteinous compounds isolated from aqueous extract of *trigonella foenum – graecum*L.Raf. Jour.Sci., 13(3):46-55,(2002)

36-Guyton A.C. and Hall J.E., Text book of medical physiology. 10th ed ., W.B. Saunders Company Philadelphia , pp.1141-1183,(2000).
37-Ginsbery H.N., Basic mechanisms underlying the common hypertriglyceridemia and low HDL cholesterol levels . Diabetes , 45(3) :S27-S30 ,(1996).
38-Williams G. and Pickup J., Handbook of diabetes Blackwell science , Inc ., PP. 1 , 95-96 ,(1998).
39-Song T. Leed S.O., Murphy P.A. and Hendrich S., Soyprotein with or without isoflavones , Soy germ and Soy germ extract , and Diadzein Lesssen plasma cholesterol levels in golden Syrian hamsters. Exp . Biol . Med ., 228(9) : 1063-1068,(2003).
40-Taskinen M.R., Criteria for metabolic control and intervention in diabetes . Diabetes , 45(suppl .3) : S120 – S122 ,(1996).

المجلة القطرية للكيمياء ، المجلد السادس عشر ، ص 484 - 465 (2004).
33- Maechler P., Wolheim C.B., Bentzen C.L. and Niesor E., of exogenous cholesterol indiabetic rats : Effect of treatment with insulin or with an acyl-CoA : cholesterol acyl transferase inhibition . Ann . Nutr , Metab ., 37(4) : 199-209,(1992).
34-Wergedahal H., Liaset B., Gudbrandsen O.A., Lied E., Espe M., Muna Z., Mark S. and Berge R.K. Fish protein hydrolysate reduces plasma total cholesterol increases the proportion of HDL cholesterol , and lower acyl-CoA cholesterol acyltransferase activity in liver zucker rats. J . Nutr ., 134(6) : 1320-1327,(2004).
35- العمري ، محمد رمزي، الكيمياء السريرية العملي . الطبعة الاولى ، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، مؤسسة المعاهد الفنية ، دار التقني للطباعة والنشر، ص 115 (1986).

Biochemical studies of the proteinous compounds from *Pisum sativum* seeds and their effects in normal mice.(part I)

Nahida Saieed Hamoodi Al-Chalabi , Eman Saieed Shamoon AL-Choka
Chem. Dept. , College of Education , University of Mosul , Mosul , Iraq

Abstract

This study was designed isolation and studying proteinous compounds from cold and boiled aqueous extract of *Pisum satvium* plant seeds using different biochemical techniques, with including precipitation of the proteinous part in each of the cold boiled aqueous extract using cold acetone. Using gel filtration technique, two compounds (A and B) from the proteinous precipitate of the cold and boiled aqueous extract of *Pisum satvium* plant seeds were isolated . The approximate molecular weights for these compounds were determined using gel filtration technique and compared with proteinous compounds with known molecular weights.

The approximate molecular weight for A and B of proteinous precipitate from cold aqueous extract were (213353) and (859) respectively .Whereas the molecular weights for compounds A&B which were isolated from boiled aqueous extract were (204903) and (900) dalton respectively.

The effect of proteinous precipitate obtained by acetone precipitation from cold , boiled aqueous extract and its isolated proteinous compounds , were studied in normal mice. After one week of treatment the results indicated that proteinous precipitated at the doses of 15.75 , 5.9 mg/Kg body weight respectively caused a significant decrease in serum glucose , total cholesterol and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels, a significant increase in serum high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) level ,at the same time shows not significant changes in the level of total lipids in normal mice. Among the isolated compounds from gel filtration, the proteinous compound A which was isolated from boiled precipitate at the dose 4.09 mg/Kg of body weight showed a decreasing effect in serum total cholesterol, LDL-C levels, No change in the levels of total lipids for normal mice was detected .But compound B from the same precipitate at a dose 1.5 mg/Kg body weight showed a decreasing effect in serum glucose level in normal mice.

It was concluded that the proteinous precipitate cold and boiled and proteinous compound B boiled have glucose - lowering effect in normal mice