عزل وتوصيف انزيم اريل استيريز من جذور نبات الزنجبيل (*Zingeber*)

طارق يونس احمد **وسن خير الله علي**

قسم الكيمياء

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2008/9/1 ؛ تاريخ القبول 2008/11/10)

الملخص

تضمن البحث عزل وتوصيف انزيم اريل استيريز من المستخلص المائي لجـذورنبات الزنجبيـل (Ginger) باستخدام التقنيات الحيوية المختلفة. اظهرت نتائج تقنية الترشيح الهلامي على عمـود الفـصل الحاوي على الهلام Sephadex G-75 احتواء محلول الراسب البروتينيي الناتج من الترسيب بالاسـيتون للمستخلص المائي لنبات الزنجبيل على ثلاثة حزم بروتينية, وتبين امتلاك الحزمتين A، B فعالية متباينة لانزيم اريل استيريز, فقد اظهرت الحزمة الثانية B فعالية نوعية عالية للانزيم وبنقـاوة بلغـت (22.04) مرة في حين ان الحزمة A تمتلك فعالية نوعية اقل منها وبنقاوة بلغت (16.73) مرة. فضلا عن ذلك تـم تحديد الوزن الجزيئي التقريبي لانزيم اريل استيريز المنقى جزئيا (الحزمة البروتينية الثانية B) باستخدام تقنية الترشيح الهلامي وكان مقداره (46370) دالتون. ثم حددت بعد ذلك الظروف المثلى لعمل الانـزيم المنقى جزئيا, وبينت النتائج ان الانزيم يعمل فـي المحلـول المـنظم (Tris-HCl) وبتركيـز (9 mM) واس هيدروجيني امثل (6) ودرجة حرارة مثلى (45ºC) وتركيز امثل (3.5 mM) لمادة خـلات الفنيـل كمادة اساس. وباستخدام رسم لاينويفر– بيرك وجد ان السرعة القصوى التي يعمل بها الانـزيم تـساوي (209.3 U/ml) وان قيمة ثابت مكيليس– منتن تساوي (1.35 mM). كذلك تـم دراسـة تـاثير بعـض المركبات الكيميائية على فعالية انزيم اريل استيريز وبينت النتائج بان كلوريد الصوديوم مثبط غير تنافسي لفعالية الانزيم بتركيز (4.5 mM).

Isolation and Characterization of Arylesterase from Root of Ginger (*Zingeber*)

Tareq Y. Ahmad **Wasan Kh. Ali**

Department of Chemistry
College of Science
Mosul University

ABSTRACT

The research was concerned with the isolation of arylesterase from the aqueous extract of Ginger using different biochemical techniques. It was shown that, using gel filtration chromatography on sephadex G-75, the solution of the proteinous precipitate produced by acetone precipitation, contained three proteinous peaks. The first two peaks (A and B) possessed a variable activity of arylesterase, where maximum specific activity was obtained in the second peak(B) which showed (22.04) folds of purification while the first peak (A) showed less activity with (16.73) folds of purification. Furthermore, the comparative molecular weight of the partially purified arylesterase (peak B) using gel filtration was found to be (46370) Dalton. The research was also concerned with finding the optimum conditions of arylesterase. Maximum activity was obtained using (9 mM) Tris – HCl as a buffer at pH (6), with incubation temperature (45ºC), incubation time of (15min) and (3.5mM) of phenyl acetate as a substrate. Using linweaver –Burk plot, it was found that maximum velocity (Vmax) and Michaelis constant (Km) had the values of (209.3 U/ml) and (1.35 mM) respectively. The effect of some chemical compounds on arylesterase activity was also studied. It was found that sodium chloride showed a competitive inhibition on the activity of the enzyme at a concentration of (4.5 mM) using Tris-HCl (9 mM) as a buffer.

المقدمة

ينتمي انزيم اريل استيريز (E.C 3.1.1.2) الى عائلة الاستيريزات من الانزيمات التحلـل المـائي التي تساعد على انفلاق المركبات الحاوية لاصرة الاسـتر بوجـود المـاء (Rozenberg *et al.*, 2003; Odawara *et al.*, 1997) . كما انه يحلل الفوسفات العضوية (organophosphate) فـي العديـد مـن المركبات مثل الباروكسون (Paraoxxon) فيدعى باروكسونيز (Paraoxonase PON1). ان انزيم اريل استيريز يعمل على تحليل العديد من مواد الاسـاس منهـا مـادة خـلات الفنيـل واسـتيروجين اسـتر (John, 2006; Match, 2007; Scott *et al.*, 2007) كما يعمل على تحليل بيروكسيد الهيدروجين الـذي تنتجه خلايا الجدار الشرياني خلال تكوين التصاب العصيدي (Tomas *et al.*, 2000).

يتواجد انزيم اريل استيريز في عدة انسجة في جسم الانسان والفئران؛ اذ يوجد في الكبد والـدماغ والرئة والقلب والكلى والامعاء الدقيقة والشريان الابهر والمصل (Betteridge, 2000; Match, 2006).

اجريت مجموعة من الدراسات لعزل وتنقية ودراسة خواص انزيم اريل استيريز من محصل الدم (الربيعي، 2006) ومن نبات الشاي الاخضر وحبات العنب (Huang *et al*., 1991; Thornton, 1999), وهنالك دراسات متعددة على جذور ورايزومات الزنجبيل حيث تم استخدام الطرق الموصوفة من قبل منظمة الصحة العامة مثل الكروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة والغازية والسائلة عالية الكثافة, ولوحظ عند تحليل بروتينات الزنجبيل انها تضم العديد من الانزيمات والاحماض الامينية ومنها انزيم اريل استيريز تصل نسبتهم الى 5.8-5.9%.

(Ross, 1983; Lawrence and Reynolds , 1984; Fischer *et al*., 1991; Phillips *et al*., 1993; Schmid *et al*. , 1994 ;Newal *et al*., 1996)

يهدف البحث الحالي الى استخدام الزنجبيل كمصدر نباتي متوفر (بدلا من مصادر اخرى) لعزل انزيم اريل استيريز ودراسة خواصه للاستفادة منه في مجالات وتطبيقات علمية متعددة ولاسيما كمعوض عن الانزيم لدى النساء بعد سن الياس لانخفاض مستوى فعاليته لديهن نتيجة لانخفاض مستوى هرمون الاستيروجين في هذه المرحلة اذ ان احدى مواد الاساس التي يعمل عليها الانزيم هي مادة استيروجين استر.

المواد المستعملة وطرائق العمل

النبات المستعمل:

تم الحصول على جذور نبات الزنجبيل من الاسواق المحلية في مدينة الموصل.

تحضير المستخلص الخام للانزيم:

تم اخذ نصف كيلوغرام من جذور نبات الزنجبيل , وبعد غسلها بالماء قطعت الى قطع صغيرة ومزجت مع الماء المقطر بنسبة (V:W 2:1) ثم سحق المزيج بالة الثرم مدة (10) دقائق مع التبريد, وحرك المزيج بعد ذلك بواسطة المحرك الكهربائي مع مراعاة التبريد باستخدام حمام ثلجي ثم رشح المزيج خلال عدة طبقات من الشاش وفصل المستخلص بجهاز الطرد المركزي المبرد مدة (15) دقيقة عند سرعة (4000× g) للتخلص من المواد غير الذائبة وكان حجم المحلول للمستخلص الخام (1000 ml) وحجم المستخلص الرائق (750ml), ثم قيست فعالية الانزيم في المستخلص المائي المحضر اعتمادا على طريقة الباحث (الربيعي، 2006), وكما قدر البروتين اعتمادا على طريقة لاوري المحورة (Schacterle and Pollack, 1973) وقاص حجم المستخلص الرائق بعد ذلك الى الثلث باستخدام جهاز التجفيد Lyophilizer ثم استخدم المستخلص الناتج في عملية فصل البروتين الكلي.

فصل البروتين الكلي:

تم فصل البروتين الكلي بوساطة الترسيب بالاسيتون بنسبة (40:60) وكانت اضافة الاسيتون تدريجيا مع التحريك بالمحرك الكهربائي عند (4ºC) مدة (60) دقيقة وترك المحلول 24 ساعة في الثلاجة ثم فصل الراسب عن الراشح بجهاز الطرد المركزي المبرد مدة (15) دقيقة وبسرعة (6000×g) عند (4ºC) بعد ذلك جففت العينة باستخدام جهاز التجفيد اذ تم الحصول على مسحوق بروتيني حفظ في درجة (-20ºC) الى حين استعماله, علما ان فعالية الانزيم وتركيز البروتين قد قيست قبل وبعد التجفيد.

تجزئة البروتين الكلي:

تم تجزئة البروتين الكلي الناتج من الخطوة السابقة باستخدام كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي Gel-Filtration chromatography باستعمال عمود فصل ذي الابعاد (71×2.5) سم والحاوي على الهلام من نوع Sephadex G-75 على ارتفاع (67) سم وباستخدام الماء المقطر بوصفه محلول روغان. تم تقليص حجم المستخلص الناتج باستخدام جهاز التجفيد Lyophilizer.

الوزن الجزيئي:

تم ايجاد الوزن الجزيئي التقريبي لانزيم اريل استيريز المنقى جزئيا من جذور نبات الزنجبيل باستخدام تقنية الترشيح الهلامي اعتمادا على طريقة الباحث (Anderws, 1965) وباستخدام عمود الفصل نفسه المستخدم في تجزئة البروتين والحاوي للهلام من نوع Sephadex G -75 اذ قورن حجم استرداد الانزيم مع حجوم استرداد مركبات اخرى معلومة الوزن الجزيئي.

قياس فعالية الأنزيم:

تم قياس فعالية الانزيم اريل استيريز اعتمادا على طريقة الباحث (الربيعي, 2006) والتي تعتمد على استخدام خلات الفنيل كمادة اساس في المحلول المنظم (Tris-HCl 9 mM) ومحلول مادة الاساس (5 mM) من خلات الفنيل اذ تضمنت طريقة العمل اضافة (5 µl) من المستخلص الى (1.5 ml) من المحلول المنظم ومزجت جيدا ثم اضيف 0.5 ml من محلول مادة الاساس هذا في محلول الاختبار مقابل محلول الكفء الذي تضمن اضافة (5 µl) من الماء المقطر الى (1.5 ml) من المحلول المنظم ومزجت جيدا ثم اضيف (0.5 ml) من محلول مادة الاساس. وبعد 5 دقائق قرأت الامتصاصية عند الطول الموجي (270 nm) لمحلول الاختبار مقابل الكفء لمادة الفينول الناتجة وقدرت الفعالية: على انها عدد وحدات الانزيم الموجودة في مليليتر من المستخلص؛ اذ ان الوحدة الانزيمية: هي كمية الانزيم التي تعمل على تحويل مايكرومول واحد من مادة الاساس الى الناتجة (الفينول) في الدقيقة الواحدة

$$\text{Phenyl acetate} + H_2O \xrightarrow{\text{Arylesterase}} \text{Phenol} + \text{Acetic acid}$$

تقدير كمية البروتين:

استخدمت طريقة الباحث لاوري المحورة (Schacterle and Pollak, 1973) لتقدير تركيز البروتين.

النتائج والمناقشة

اظهرت النتائج احتواء المستخلص الرائق لجذورنبات الزنجبيل على فعالية عالية لانزيم اريل استيريز ومقدارها (83.16 U) وعليه فقد اختيرجذور نبات الزنجبيل بوصفه مصدرا لعزل الانزيم وتنقيته وتحديد صفاته في البحث.

عزل انزيم اريل استيريز من نبات الزنجبيل وتنقيته

ان نتائج التنقية الجزيئية لانزيم اريل استيريز من الزنجبيل موضحة في الجدول (1) اذ يلاحظ ان الفعالية النوعية للانزيم زادت بمقدار (3.13) بعد الترسيب بالاسيتون.

اظهرت نتائج تجزئة البروتين الكلي بتقنية الترشيح الهلامي للراسب الناتج من الأسيتون باستخدام الهلام من نوع Sepadex G-75 على ثلاثة حزم بروتينية رئيسية (A, B, C) وكما موضحة في الشكل (1). وتبين من خلال قياس فعالية انزيم اريل استيريز ان الحزمتين (A، B) تمتلكان فعالية متباينة اذ تمتلك الحزمة الاولى (A) فعالية نوعية اقل من الحزمة الثانية (B) كما موضح في الجدول (1), وبذلك عدت الحزمة الثانية (B) الحزمة الرئيسية الفعالة والمحتملة لانزيم اريل استيريز في الدراسات اللاحقة في هذا البحث, كما يوضح الجدول (1) ان الفعالية النوعية للانزيم في الحزمة البروتينية الثانية اكثر بمقدار (22.06) عن الفعالية النوعية للانزيم في المستخلص الخام.

تحديد الوزن الجزيئي:

من خلال استخدام تقنية الترشيح الهلامي على عمود الفصل ذي الابعاد (2.5×71) سم والحاوي على الهلام من نوع Sephadex G-75, تم تحديد الوزن الجزيئي التقريبي لانزيم اريل استيريز المنقى جزئيا من جذور نبات الزنجبيل (الحزمة الثانية) حيث وجد ان وزنه الجزيئي (46370 دالتون) وهذا مقارب لحد بعيد لما وجده الباحث (الربيعي, 2006) حيث وجد ان الوزن الجزيئي لانزيم اريل استيريز المعزول من مصل الدم كان مقداره (48123 دالتون) وان الوزن الجزيئي لانزيم اريل استيريز (الحزمة الاولى) هو (83900) وهذا يتفق مع ما وجده (Huany *et al.*,1991) حيث وجد ان الوزن الجزيئي

لانزيم اريل استيريز المعزول من نبات الـشاي الاخـضر هـو (87750 دالتـون) فـي حـين وجـد (Thornton, 1999) ان الوزن الجزيئي للانزيم المعزول من حبات العنب مقداره (85110 دالتـون). ان هذه النتائج تشير الى احتمالية وجود انزيم اريل استيريز فـي الحزمـة الاولـى علـى شـكل وحـدتين (dimmer) وفي الحزمة الثانية على شكل وحـدة واحـدة (monomer) وهـذا يتفـق مـع البـاحثيين (Denis *et al.*,2002). ويوضح الشكل (2) المنحني القياسي لتقدير الوزن الجزيئي للانزيم بتقنية الترشيح الهلامي وباستخدام بروتينات قياسية معروفة الوزن الجزيئي.

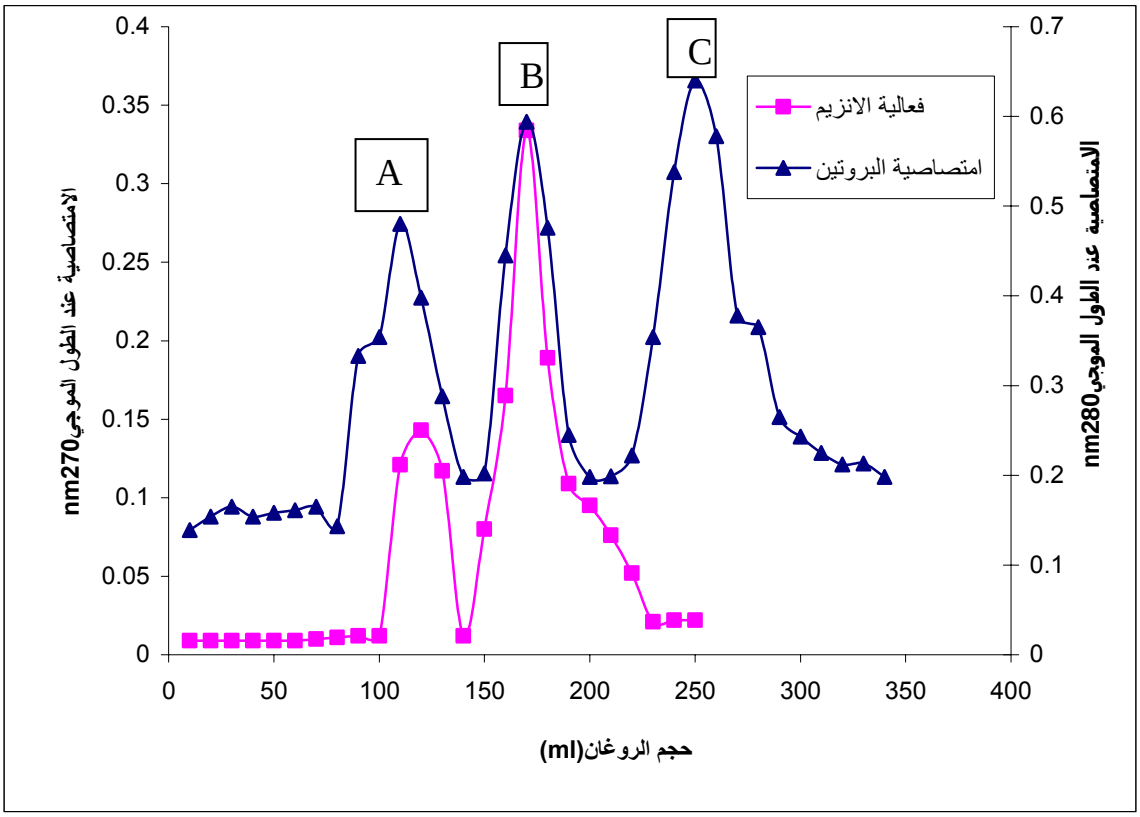
الجدول 1: خلاصة نتائج مراحل تنقية انزيم اريل استيريز من نبات الزنجبيل

مراحل التنقية		تركيز البروتين mg/ml	الفعالية*	الفعالية النوعية**	الاستعادة %	عدد مرات التنقية
المستخلص الخام		2.93	979.4	334.27	100	1
المستخلص الرائق		2.5	846.12	338.45	86.49	1.012
الترسيب بالاسيتون (40:60)		1.3	1376	1059	83.4	3.13
الترشيح الهلامي باستخدام الهلام Sephadex G-75	**الحزمة البروتينية الاولى**	0.075	1328.8	17717	42.8	16.73
	الحزمة البروتينية الثانية	0.093	2170.6	23340	69.99	22.04

* الفعالية**:** عدد وحدات الانزيم الموجودة في ميليلتر من المحلول البروتيني.

وحدة الانزيم: هي كمية الانزيم التي تعمل على تحويل مايكرومول واحد من مادة الاساس الى المادة الناتجة (phenol) في الدقيقة الواحدة.

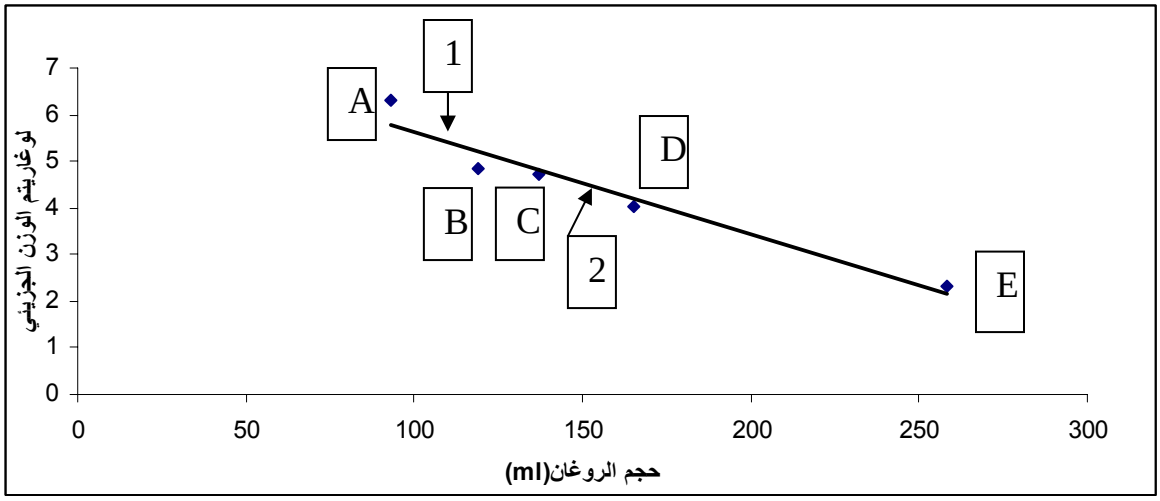
** الفعالية النوعية: مايكرومول من المادة النتجة (phenol) لكل دقيقة لكل ملغرام بروتين.



الشكل 1: المظهر الجانبي لروغان المحلول البروتيني بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفصل ذي الابعاد (71×2.5) سم والحاوي لمادة Sephadex G-75 على ارتفاع (67) سم (A,B,C) تمثل قمم الحزم البروتينية الاولى والثانية والثالثة على التوالي, سرعة الجريان (53 مليليتر/ساعة).

الجدول 2: يوضح حجم الروغان و الاوزان الجزيئية لبعض المركبات بتقنية الترشيح الهلامي.

المركبات الكيميائية	الوزن الجزيئي(دالتون)	حجم الروغان(ml)
الدكستران الازرق	2000000	93
البومين مصل البقر	67000	119
الفا- اميليز	58000	137
البومين البيض	45000	165
التربتوفان	204	257
الحزمة الاولى (A)	83900	113
الحزمة الثانية (B)	46370	153



الشكل 2: المنحني القياسي لتعيين الوزن الجزيئي بتقنية الترشيح الهلامي

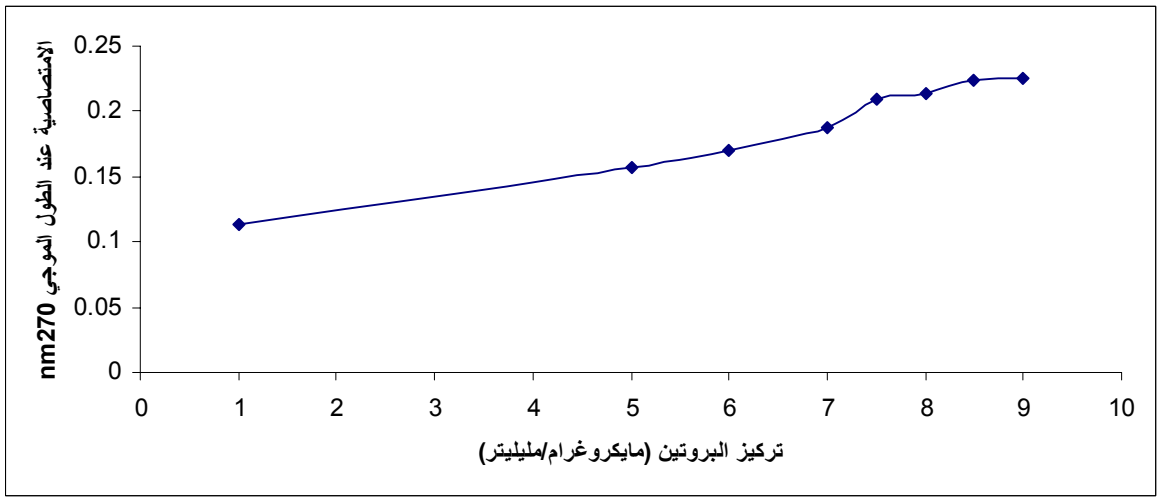
A=الدكستران الازرق, B=البومين مصل البقر, C= الفا اميليز, D= البومين البيض, E= التربتوفان, 1= الحزمة الاولى, 2= الحزمة الثانية

تحديد الظروف المثلى لعمل الانزيم

لغرض تحديد الظروف المثلى لعمل انزيم اريل استيريز المنقى جزئيا من نبات الزنجبيل اجريت التجارب الاتية:-

تأثير تركيز الانزيم على فعالية انزيم اريل استيريز

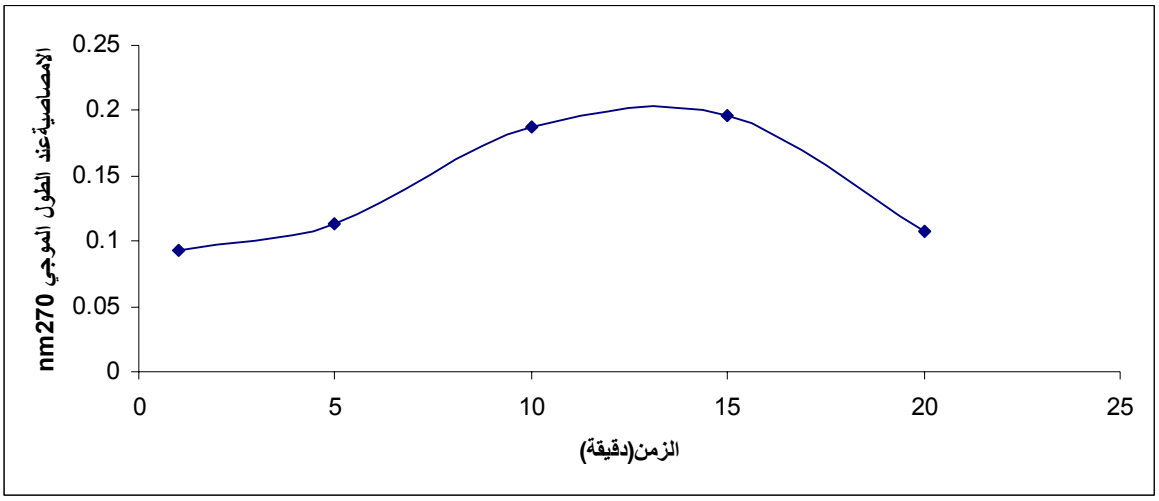
يبين الشكل (3) ان اعلى فعالية لانزيم اريل استيريز تم الحصول عليها عند (8.5 µg/ml) وهذا يتفق مع نتائج الباحث (الربيعي, 2006) وقد اعتمد هذا التركيز في التجارب اللاحقة.



الشكل 3: تأثير تركيز البروتين (بوصفه مصدر للانزيم) في فعالية انزيم اريل استيريز.

زمن التفاعل

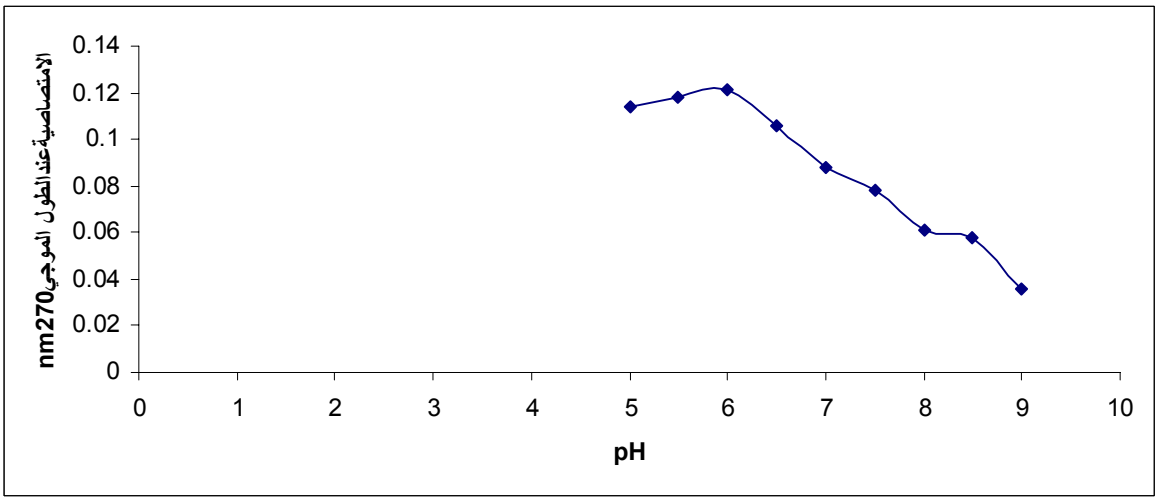
تزداد فعالية انزيم اريل استيريز تدريجيا الى ان تظهر اعلى فعالية للانزيم بعد (15) دقيقة من زمن التفاعل وكما مبين في الشكل (4) وهذا يتفق مع نتائج الباحثين في الادبيات (الربيعي, 2006 ؛ Thornton, 1999).



الشكل 4: العلاقة بين فعالية انزيم اريل استيريز المنقى جزئيا من جذور نبات الزنجبيل وزمن التفاعل

تأثير تركيز المحلول المنظم والاس الهيدروجيني

اظهرت النتائج ان اعلى فعالية لانزيم اريل استيريز كانت عند اس هيدروجيني مقداره (6) كما في الشكل (5) في المحلول المنظم Tris-HCl ذي التركيز (9 mM).

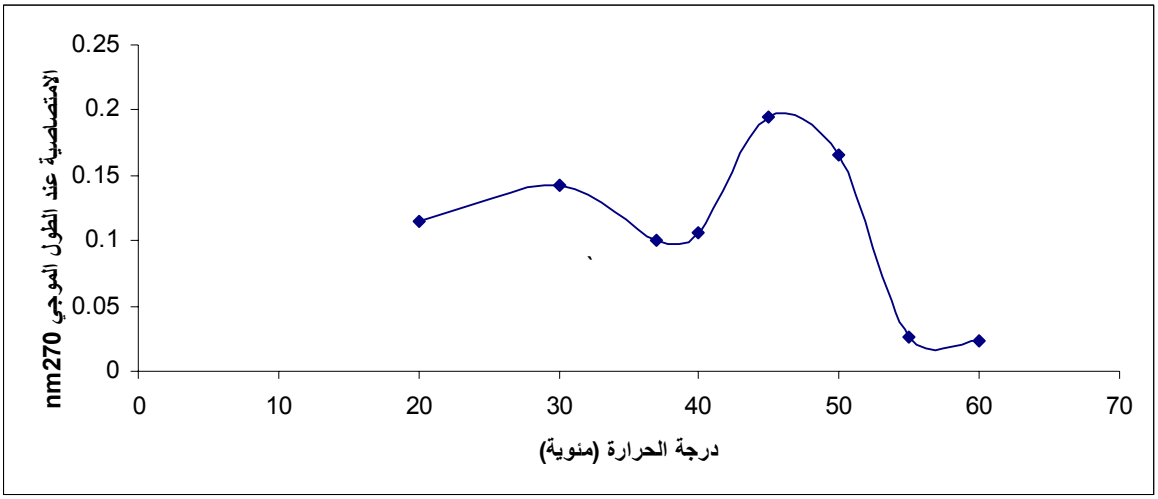


الشكل 5: تأثير الاس الهيدروجيني pH على فعالية انزيم اريل استيريز المنقى جزئيا من نبات الزنجبيل في الملحول المنظم (Tris-HCl 9mM).

تشير الدراسات السابقة الى ان الـ pH الامثل لانزيم اريل استيريز يساوي (7.6,6.5) المستخلص من مصل الدم ومن نبات الشاي الاخضرعلى التوالي (الربيعي, 2006 ؛ Huany *et al.*, 1991).

تأثير درجة الحرارة في فعالية انزيم اريل استيريز

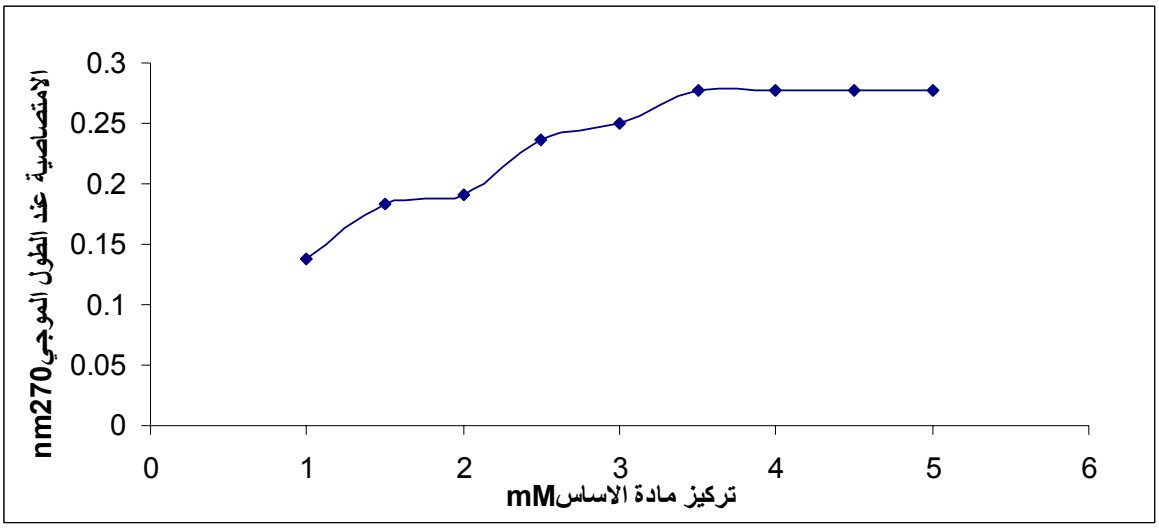
وجد ان درجة الحرارة المثلى للانزيم تساوي (45ºC) وكما موضح في الشكل (6) وتبين الدراسات السابقة ان درجة الحرارة المثلى للانزيم تساوي (30ºC, 35ºC) المستخلص من مـصل الـدم والـشاي الاخضر على التوالي (الربيعي, 2006 ؛ Huany *et al.*, 1991).



الشكل 6: تاثير درجة حرارة التفاعل في فعالية انزيم اريل استيريز المنقى جزئيا من نبات الزنجبيل.

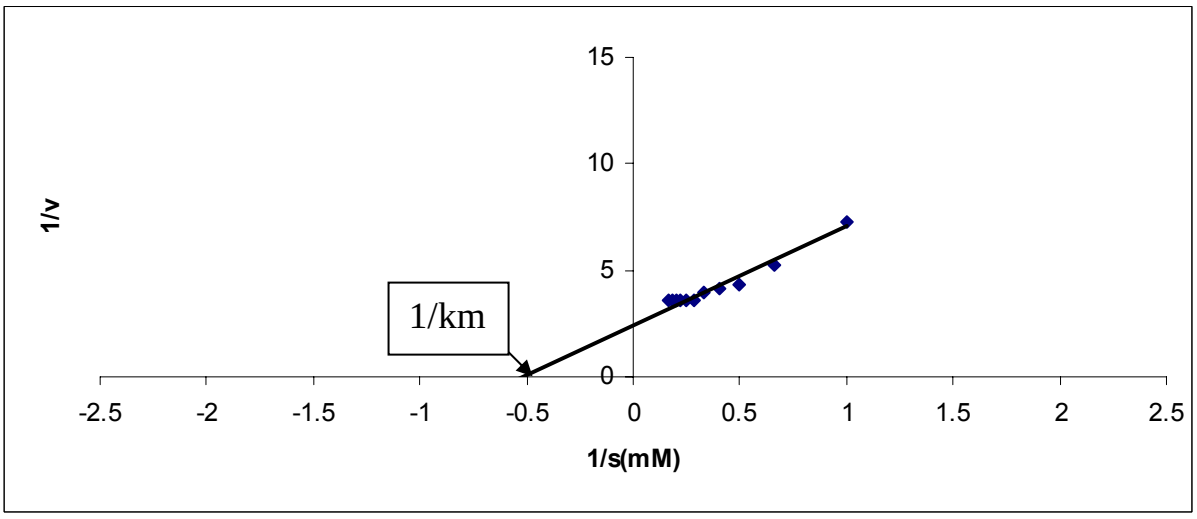
تأثير تركيز مادة الاساس في فعالية انزيم اريل استيريز

درس تأثير تركيز مادة الاساس على فعالية الانزيم, ويوضح الشكل (7) ان تشبع الانزيم بمادة الاساس خلات الفنيل حصل عند استخدام تركيز (3.5 mM) من مادة الاساس.



الشكل 7: تاثير تركيز مادة الاساس خلات الفنيل في فعالية انزيم اريل استيريزالمنقى جزئيـا مـن جذور نبات الزنجبيل .

واظهر رسم لاينويفر- بيرك الشكل (8) ان قيمتي Vmax وKm علـى التـوالي (209.3 U/ml) و(1.35 mM).



الشكل 8: رسم لاينويفر – بيرك لتوضيح قيمة Km,Vmax.

وتشير الدراسات السابقة الى ان قيمة Km لانزيم اريل استيريز المستخلص من محصل الدم والشاي الاخضر هي على التوالي (3.26 و2.70) ملي مولار.

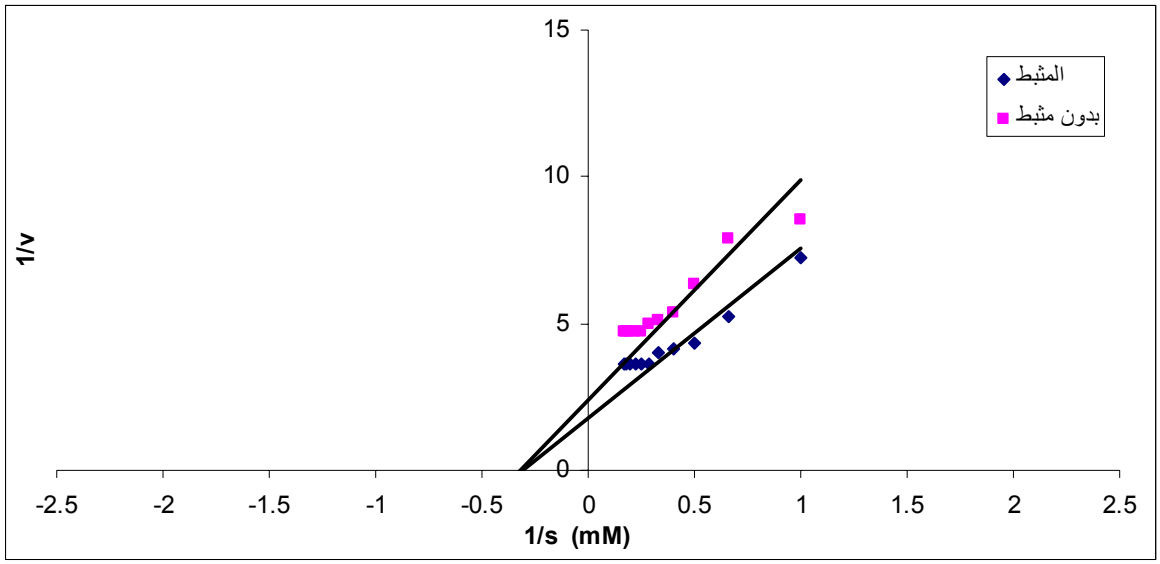
تاثير بعض المركبات الكيميائية على فعالية انزيم اريل استيريز

تم دراسة تاثير بعض المركبات الكيميائية على فعالية انزيم اريل استيريز كما موضح بالجدول (3) والشكل (9).

الجدول 3: تاثير بعض المركبات الكيميائية على فعالية الانزيم

المركبات الكيميائية		فعالية الانزيم	% للفعالية
المحلول الفياسي		869	100
NaCl	3.5 mM	438	50.4
	4 mM	648	74.5
$CuCl_2$	3.5 mM	754	86.7
	4 mM	726	83.5
$CaCl_2$	3.5 mM	842	96.8
	4 mM	863	99.3
$MgCl_2$	3.5 mM	793	91.2
	4 mM	784	90.2

لوحظ من الجدول السابق انخفاض فعالية الانزيم عند اضافة مـادة كلوريـد الـصوديوم بتركيـز (3.5 mM) بشكل كبير, لذلك اعتمد هذا التركيز لمعرفة نوع التثبيط. ويوضح الشكل (9) ان التثبيط كان غير تنافسي.



الشكل 9: رسم لاينويفر –بيرك يوضح تاثير المثبط NaCl وبتركيز (3.5mM) على فعالية الانزيم

أن القيم المدرجة في الجدول (4) تمثل الظروف المثلى لقياس فعالية أنزيم اريل اسـتيريز المنقـى جزئيا من جذور نبات الزنجبيل.

الجدول 4: الظروف المثلى لقياس فعالية انزيم اريل استيريز المنقى جزئيا من جذور نبات الزنجبيل

تركيز الانزيم (µg/ml)	زمن التفاعل min	الاس الهيدروجيني للمحاول المنظم	درجة الحرارة ºC	تركيز مادة الاساس (mM)
8.5	15	6	45	3.5

وقد وجد ان فعالية انزيم اريل استيريز تزداد بمقدار (2.8 %) باستخدام الظروف المثلى مقارنة مع الظروف التمهيدية.

المصادر العربية

الربيعي, رنا فاضل، 2006. عزل ودراسة انزيم اريل استيريز في مصل الدم وعلاقته بمرض تـصلب الشرايين في مدينة الموصل. رسالة ماجستير, قسم الكيمياء, كلية العلوم, جامعة الموصل.

المصادر الأجنبية

Andrews, D., 1965. The Gel Filtration Behavior of Proteins Related to their Molecular Weight Over a Wide Range. J. Biol. Chem. 96: 595p.

Betteridge, P., 2000. Stage at Diagnosis and Treatment Patterns A 35-Years Old Women with Breast Cancer. Jama Middle East., 9 (5): pp. 56-63.

Denis, J.; Christine, E.; David, S.; Alice, F.; Aude, E., and Patrich, M., 2002. Oligomeric States of the Detergent – Solubilized Human Paraoxonase (PON 1). J. Biol. Chem. 277(36): pp.33386 – 97.

Fischer, R.W.; Cooil, B., and Royle, P., 1991. Ginger Treatment of Hyper Emesis Gravidarum. Eur. J. Obst. Gynical. R.E. Bid., 38, pp.19-24.

Huany, Q.R.; Rogers, M.A.M., and Khan, S.A., 1991. The Effect of Arylestrease is Isolated From Green Tea on Hypotheremia and Diarrhea. Chemical and Pharmaceutical Bull 39, pp.397-399.

John, F., 2006. Estrogen Esters as Substrates for Human Paraoxonases. Archives of Biochemistry and Biophysics, 461 (1): pp.24-29.

Lawrence, B.M., and Reynolds, R.J., 1984. Major Tropical Spices: Ginger (Zingib Officinal Rocs.) J. Clin. 9, pp.1-10.

Match, S., 2007. Serum Arylestrease/ Diazoxonase Activity and Genetic Polymorphisms in Patients with Low Bone Mineral Density. J. Clin. 67 (4): pp.713-5.

Match, S., 2006. Paraoxonase-1 Activity as Amarker of Atherosclerosis is not Associated with low Bone Mineral Density in Healthy Postmenopausal Women. J. Clin. 7 (5): pp.9-13.

Newal, C.A.; Klein, M.W., and Prabha, K., 1996. Herbal Medicines Aguide for Health Care Professional. The Pharmaceuolcal Press. London, pp.135-136.

Odawara, K.; Klein, M.W., and Prabha, k ., 1997. Arylesterase with Oxidation Stress in Smoker and Non – Smoker. Inhal, Toxicol. 19(9): pp.767–9.

Phillips, S.; Obndo, J.A.; Khan, S.A., and King, M.N., 1993. *Zingeber officinal* (GINGER), an Antiemetic for Day Case Surgery. Antaesthesia, 48, pp.715-717.

Ross, T.G., 1983. Oxidativ Status and Serum PON1activity in Postmenopausal Women. Clin. Biochem. 7: 135p.

Rozenberg, O.; Shin, D.M., and Aviran, M., 2003. Human Serum Paraoxonase 1 decrease Macrophage Cholesterol Biosynthesis. Arterioscler. Throm. Vasc. Bio. 23: 462p.

Schacterle, G.R., and Pollack, R.L., 1973. Asimplified Method for the Quantitative Assay of Small Amount of Protein Inbiological Material. Anal. Biochem., 51: pp.654-655.

Schmid, R.; Dunn, B.K.; Wolman, K.N., and Fisher, B., 1994. Comparison of Seven Commonly Used Agents for Prophylaxis of Sea Sickness. J. Trael. Med. 1, pp.203-206.

Scott, S.; Teiber, K., and Billecke, H.E., 2007. Impacts of Carbamate Pesticides on. Olfactory Neurophysiology and Arylestrease Activity in Cohc Salmon (*oncorhynchus kisutch*). Circulationt. 69 (2): pp.133-148.

Thornton, J., 1999. Do You Need Flavonoids. Health Nats.Cooking Light, 15 (4): pp.96-101.

Tomas, M.; Senti, M.; Greia-Faria, F.; Vila, J., and Marruggut, J., 2000. Effect of Simvastain Therapy on Paraoxonase Activity and Related Lipoprotein in Familial Hypercholesterol Patiens. Arterioscles. Throm. Vasc. Biol. 20: 2113p.