عزل ودراسة المركبات البروتينية من ثمار نبات الفاصوليا *Phaseolus Vulgaris* واللوبيا *Vigna Sinensis* في الفئران السليمة والمصابة بداء السكر المستحدث بالالوكسان

أ.د. ناهدة سعيد الجلبي
قسم الكيمياء / كلية التربية
جامعة الموصل

شهاب احمد يوسف البجاري
قسم التحليلات المرضية / معهد تقني موصل
هيئة التعليم التقني

الاستلام ٢٠١١ / ٠٢ / ٠٢
القبول ٢٠١١ / ٠٦ / ٠١

Abstract:

This study is concerned with the preparation of cold and boiled aqueous extracts from the fruits of both *Phaseolus Vulgaris and Vigna Sinensis* plants. Then isolating and studying the active proteinous compounds from these extracts using different biochemical techniques. Precipitation of the proteinous part from each extract was was a ccomplished by cold acetone precipitation method.

Two compounds (A) and (B) had been isolated from gel filtration chromatography of cold and boiled acetone precipitate of these fruits of both plants.

The comparative molecular weights of the isolated compounds were estimated using gel filtration and found to be ranged from 1887 to 33884 daltons for all the *Phaseolus Vulgaris and Vigna Sinensis*.

The work also included studyingf the effect of intraperitoneal administration of these compounds (A) and (B) on certain blood biochemical parameters (glucose, cholesterol and total lipids) using a dose of 77 mg/Kg of body weight in normal and alloxan. induced diabetic mice. The results had been compared with those injected with insulin.

The proteinous compounds (A) which had been separated from (cold and boiled) of each *Phaseolus Vulgaris* and *Vigna Sinensis* led to a decrease in the level of glucose diabetic mice and also all compounds (B) for both plants. Compound (A) from cold extract of *Vigna Sinensis* fruit is more reduced for the glucose level (67.1%) from the other compounds and it reached to a normal level in the alloxan –induced diabetic mice when compared with normal control group.

However, proteinous compounds (A) (cold and boiled) which have been separated from each *Phaseolus Vulgaris and Vigna Sinensis* fruits and also the compound B (cold and boiled of *Vigna Sinensis* fruit) have been showed a significant decrease in the biochemical parameter (cholesterol and total lipids in the blood serum of diabetic mice). These compounds have revealed an effect similar to that of insulin, but the compound A (which was separated from cold aqueous extract of *Vigna Sinensis* fruit) gave a reduction effect for the total lipids level (46.83%) more than of that for insulin and the other proteinous compounds mentioned.

In conclusion, the high molecular weight compounds might be used for the treatment of diabetes mellitus instead of insulin, furthermore it could be used it in the treatment of atherosclerosis after make sure there is no side effects.

الخلاصة:

صممت هذه الدراسة لتحضير مستخلصات مائية باردة ومغلية لكل من ثمرة نباتي الفاصوليا واللوبيا ومن ثم عزل المركبات البروتينية لهذه المستخلصات ودراستها باستخدام التقنيات الحياتية المختلفة، ومن هذه التقنيات ترسيب الجزء البروتيني في كل مستخلص باستخدام الاسيتون البارد وفصله عن الجزء غير البروتيني. باستخدام تقنية الترشيح الهلامي تم فصل مركبين B,A من كل من الرواسب البروتينية الناتجة من المستخلصات المائية الباردة والمغلية لثمرة كل من نباتي الفاصوليا واللوبيا، فضلا عن ذلك تم تعيين الاوزان الجزيئية التقريبية لهذه المركبات باستخدام تقنية الترشيح الهلامي بمقارنتها مع مواد بروتينية معلومة الوزن الجزيئي، وكانت الاوزان الجزيئية التقريبية لهذه المركبات تتراوح بين 1887 الى 33884 دالتون.

كذلك تمت دراسة فاعلية هذة المركبات البروتينية على بعض المتغيرات الكيموحيوية (كلوكوز، كوليستيرول والدهون الكلية) في ذكور الفئران الطبيعية والمصابة بداء السكر التجريبي المستحدث بالالوكسان عن طريق الحقن في الفتحة البريتونية وبجرعة مقدارها 77 ملغم/كغم من وزن الجسم. ومقارنتها مع هرمون الانسولين. وقد اشارت النتائج بعد ساعتين من الحقن الى ان المركبات البروتينية (A) المفصولة (الباردة والمغلية) لثمرة كل من نباتي الفاصوليا واللوبيا ادت الى تخفيض مستوى كلوكوز مصل الدم في الفئران المصابة وكذلك جميع المركبات (B) لكلا النباتين، الا ان المركب (A) البارد لثمرة نبات اللوبيا يعد اكثر تخفيضا في مستوى الكلوكوز (67.1%) من بقية المركبات ويصل الحد الطبيعي في الفئران المصابة بداء السكر التجريبي المستحدث بالالوكسان عند مقارنتها بمجموعة السيطرة

الطبيعية، اما فيما يتعلق بمستوى الكوليستيرول والدهون الكلية في مصل دم الفئران المصابة فقد ابدت المركبات البروتينية (A) الباردة والمغلية المفصولة من ثمرتي الفاصوليا واللوبيا وكذلك المركبات البروتينية (B) المفصولة (الباردة والمغلية) لثمرة نبات اللوبيا انخفاضا معنويا في تلك المتغيرات الكيموحيوية (الكوليستيرول والدهون الكلية) وتأثيرها مشابها للانسولين، الا أن المركب (A) البارد لثمرة نبات اللوبيا قد أبدى تأثيراً خافظاً لمستوى الدهون الكلية (46.83%) أكثر مما ابداه الانسولين والمركبات البروتينية الأخرى المذكورة.

ومن ذلك يمكن القول بان المركبات ذات الاوزان الجزيئية العالية يمكن استخدامها في معالجة داء السكر بديلا عن الانسولين فضلا عن انه يمكن استخدامها في معالجة تصلب الشرايين بعد التأكد مستقبلا من عدم وجود أعراض جانبية لها.

المقدمة:

يعرف داء السكر انه مرض مزمن يتسم باضطراب ايض الكاربوهيدرات بسبب العوز النسبي او التام لهرمون الانسولين مما يؤدي لفرط الكلوكوز في الدم، وظهور الكلوكوز في البول ويرافق المرض اضطراب في ايض كل من البروتينات والدهون (1).

هناك اسباب عديدة لها علاقة باحداث داء السكر منها عوال مناعية، عوامل بيئية وتشمل الاصابة الفايروسية، الغذاء، الاضطرابات البنكرياسية والسمنة والتي تعد العامل المهم الذي يسهم في تطور النوع الثاني من داء السكر وتتصف هذه الحالة بازدياد مقاومة الانسولين. كما ان النقصان في عدد مستقبلات الانسولين الذي يحدث عند زيادة الوزن له دور مهم في قلة فعالية الانسولين، ومن المعروف ان مقاومة الانسولين تعود الى نقصان حساسيه الانسولين (3,2). ازداد الاهتمام حديثا حول استعمال النباتات الطبيه في علاج الكثير من الامراض فقد استخدمها الكثيرون من مختلف شعوب العالم في الطب الشعبي، اذ ان العديد منها وصف كمخفضات للسكر. يمكن استخدام النبات كاملا او جزءاً منه كالبذور والاوراق والثمار على هيئتها الطبيعية وبشكل منقوع اومسحوق (4). اذ اشارت مجموعة من البحوث الى وجود حوالي (1200) نبات يمتلك فعالية مهمة في خفض سكر الدم (5) وان غالبية هذه النباتات لم تقيم تحت ظروف مسيطر عليها ولا يبدو واضحا كيف تعمل ولم تشخص المادة الفعالة فيها وقد يكون بعضها مؤشرا ضد حالة متخصصة جدا كما ذكر في البحث (6) الذي اشار الى اسماء مجموعة من الأعشاب والنباتات ومنها ثمار الفواكه والخضراوات التي تستخدم موادا خافضه للسكر ومنها الخس، الفطر، البزاليا والشلغم فضلا عن عدد من انواع الفاكهة كالتفاح والليمون. اما الدراسة التي اجراها الباحث (7) فقد اشارت الى الخضراوات تعمل بوصفها موادا لها فاعلية في تخفيض مستوى السكر في الدم من خلال الزيادة المثيرة

في افراز الانسولين او من خلال التاثير في الانزيمات الخاصة بايض الكلوكـوز. ويهـدف البحث الحالي الى فصل المركبات البروتينيـة الفعالـة والاجـزاء غيـر البروتينيـة مـن المستخلصات المائية الباردة والمغلية لثمرة كل من نبات الفاصوليا واللوبيا باستخدام التقنيـات الحياتية المختلفة وايجاد الاوزان الجزيئية التقريبية لتلك المركبات البروتينية ثم دراسة تـاثير المواد المعزولة وفاعليتها في عدد من المتغيـرات الكيموحيويـة (كلوكـوز، كولـسيترول والدهون الكلية) في دم ذكور الفئران الطبيعية والمصابة بداء السكر المـستحدث بالالوكـسان ومقارنتها بالانسولين.

المواد وطرائق العمل :

المواد المستعملة :

تم الحصول على ثمرة نبات الفاصوليا ونبات اللوبيا من اماكن زراعتها فـي مدينـة الموصل، ثم تم تصنيفها من قبل الاختصاصين و بالاعتماد على تصنيف (9،8) وقد استعملت الثمرة بكاملها (القرنة والبذور) بعد تنظيفها وغسلها، ووضعها في اكياس بلاستيكية ووضعت بعدها في المجمدة الى حين الاستعمال.

الحيوانات المستخدمة في البحث :

استخدمت في هذه الدراسة ذكور الفئران البيض و تراوحت أوزانها بـين (25-35) غم. وقد وضعت في أقفاص خاصة مجهزة ومعدة لهذا الغـرض وزودت بالمـاء والعلـف الحيواني الخاص بها وأخضعت جميع الحيوانات للظروف ذاتها من ضوء معتـدل ودرجـة حرارة (25 °م).

تحضير المستخلصات:

تحضير المستخلص المائي البارد :

تم وزن 500 غرام من ثمرة كل من نبات الفاصوليا و اللوبيا وقطعـت الـى قطـع صغيرة، بعد ذلك مزجت القطع مع الماء المقطر البارد بنسبة (1 وزن : 3 حجم) وسـحقت باستخدام الة الثرم (Blender) لمدة 10 دقائق بعدها جمدت بإضافة النتروجين المـسال ثـم تركت تذوب عند درجة حرارة الغرفة. كررت العملية ثلاث مرات بعد ذلك حرك الخليط لمدة ساعتين تحت تأثير المحرك الكهربائي مع مراعاة التبريد في حمام ثلجي. ثم رشح الخليط من خلال عدة طبقات من الشاش وفصل المستخلص بجهاز الطرد المركزي المبرد للتخلص مـن

المواد غير الذائبة لمدة 15 دقيقة على سرعة 33520xg. وللحصول على راشح رائق (23) ثم قياس حجم الراشح (1600) مللتر، ثم قدرت كمية البروتين له استنادا الى طريقة لاوري المحورة (10).

تحضير المستخلص المائي المغلي :

تم وزن 400 غرام من ثمرة كل من نبات الفاصوليا واللوبيا ثم قطعت الى اجزاء صغيرة، بعدها سحقت بواسطة الة الثرم الكهربائي (Blender) مع الماء المقطر بنسبة (3:1) ولمدة (10) دقائق، ثم جمدت باضافة النتروجين المسال، وتركت لتذوب في درجة حرارة الغرفة. كررت هذه العملية ثلاث مرات، بعد ذلك تم غلي الخليط في وعاء زجاجي لمدة نصف ساعة ثم ترك ليبرد. رشح من خلال عدة طبقات من الشاش وفصل المستخلص بجهاز الطرد المركزي المبرد عند 33520xg لمدة 15 دقيقة للحصول عليه بشكل رائق ثم قياس الحجم الكلي للراشح. وتم استخدام تقنية التجفيد (Lyophilization) لغرض تقليص حجم المستخلاصات المحضرة.

عزل البروتينات وترسيبها بواسطة المذيب العضوي :

تمت اضافة الاسيتون البارد (Cold acetone) الى كل من المستخلص البارد والمغلي لنبات الفاصوليا واللوبيا بنسبة (40/60) حجم/حجم على التوالي ببطء مع التحريك المستمر عند درجة حرارة 4 °م (11) ثم ترك المزيج في الثلاجة لمدة 24 ساعة لكي يتم الترسيب بصورة تامة، أجريت بعد ذلك عملية الفصل بجهاز الطرد المركزي المبرد وبسرعة 33520xg لمدة 20 دقيقة. بعد ذلك وضع الراسب البروتيني في جهاز التجفيد (Lyophilizer) لعدة ساعات للحصول على المادة بشكل مسحوق، حفظ في انبوبة محكمة الغطاء في المجمدة لحين اجراء عملية الترشيح الهلامي والحقن في الحيوانات بوصفه راسب بروتيني خام.

فصل البروتينات بتقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي :

اجريت تقنية الترشيح الهلامي (gel filtration) لفصل وتنقية البروتينات من الراسب البارد والمغلي لكل من نبات الفاصوليا واللوبيا فقد استخدام عمود الفصل (1.8 × 120) سم والذي يحتوي على مادة الهلام من نوع 50 (Sephadex G-50) واعتمادا على حجم العمود الذي يساوي (315) مللتر (12).

حضر محلول مركز من مادة الراسب البروتينية المفصولة من المستخلص المائي البارد وكذلك المغلي لكل من ثمرة الفاصوليا واللوبيا والذي تم تقدير كمية البروتين فيه

بطريقة لاوري المحورة قبل إمراره على العمود، ثم مرر حجم (2) مللتر منه على عمود الفصل، وتبع ذلك اضافة (2) مللتر من الماء المقطر لدفع النموذج داخل العمود، بعدها تم استرداد المادة البروتينية بمعدل جريان (42 مللتر/ساعة) اي بمعدل (10) دقائق لكل جزء من جامع الاجزاء (Fraction collector) وتم متابعة المحتوى البروتيني من خلال قراءة شدة الامتصاص عند الطول الموجي (280) نانوميتر وباستخدام جهاز مطياف الاشعة فوق البنفسجية والمرئية ثم جمعت كل حزمة (ناتجة عن فصل مادة الراسب البروتينية)، على حدة حسب الرسم البياني للامتصاص مقابل حجم الروغان، بعد ذلك تم تقدير كمية البروتين في كل حزمة بطريقة العالم لاوري المحورة وقد اعيدت عملية الفصل هذه لمادة الراسب البروتينية عدة مرات لجمع كمية كافية من الاجزاء (الحزم) البروتينية المفصولة بهذه التقنية، ومن ثم يمكن الحصول على المركبات البروتينية الجافة بشكل مسحوق وذلك بجمع هذه الحزم المتشابهة وتجفيفها بجهاز التجفيد Lyophilizer ثم حفظ هذه المركبات في انابيب محكمة الغطاء في المجمدة لحين تعين الوزن الجزيئي لها او حقنها في الحيوانات.

تعيين الوزن الجزيئي التقريبي للمركبات البروتينية المفصولة بتقنية الترشيح الهلامي :

تعد تقنية الترشيح الهلامي طريقة لتقدير الوزن الجزيئي التقريبي للمواد البروتينية المجهولة وذلك من خلال تسقيط حجم الروغان للبروتين المجهول على الرسم البياني الذي يوضح العلاقة بين حجم الروغان ولوغريتم الوزن الجزيئي للمواد معلومة الوزن الجزيئي (11,13).

استخدم عمود الفصل نفسه ذو الابعاد (1.8 × 120) سم المشار اليه في الفقرة السابقة الحاوي على مادة الهلام نفسها سفدكس من نوع Sephadex G-50 لغرض تعيين الوزن الجزيئي التقريبي للمركبات البروتينية المفصولة لثمرة كل من نبات الفاصوليا واللوبيا وذلك بعد امرار المواد القياسية (الدكستران الازرق، التربتوفان، البومين مصل البقر، هرمون الانسولين، التربسين، الببسين، البومين مصل البيض، هرمون الاوكسيتوسين) كل على حده بحجم (2) مللتر، وتبع ذلك إضافة (2) مللتر من الماء المقطر لدفع النموذج داخل العمود، بعدها تم استرداد المادة البروتينية بمعدل جريان (42 مللتر/ساعة) اي بمعدل (10) دقائق لكل جزء من جامع الاجزاء وتم حساب حجم الروغان للمركبات والمواد القياسية بدقة بعدها رسم لوغاريتم الوزن الجزيئي مقابل الروغان.

النظام المستخدم في تقسيم الحيوانات :

تم وزن الفئران قبل يوم واحد من حقنها بالمركبات البروتينية المستخدمة في الدراسة الحالية ووزعت عشوائيا على (20) مجموعة طبيعية ومصابة بداء السكر المستحدث

بالالوكسان، تضم كل مجموعة (3) فئران اعطيت كل مجموعة جرعة 77 ملغم/كغم (الجرعة المؤثرة) من وزن الجسم، فضلا عن ان هنالك مجموعة لكل من الفئران الطبيعية والمصابة عدت مجموعة سيطرة (Control) حقنت بـ (1) مللتر من المحلول الملحي الفسلجي (Normal Saline) فقط (14)، ومجموعة اخرى لكل من الفئران الطبيعية والمصابة حقنت بـ (10) وحدة دولية/كغم من الانسولين. ومنعت الفئران من الاكل مدة 16 ساعة قبل اعطاء الجرعة (15). بعدها تم الحقن في التجويف البريتوني بالجرعة المؤثرة المشار اليها اعلاة من مواد الراسب والمركبات البروتينية المفصولة بتقنية الترشيح الهلامي لكل من ثمرة نبات الفاصوليا واللوبيا، ثم تركت مدة ساعتين (16) وبعد ذلك تم سحب الدم من جيب محجر العين (orbital sinus puneture) وذلك باستخدام انابيب شعرية خاصة حسب طريقة وذلك باستخدام انابيب شعرية خاصة حسب طريقةِ Atta واخرون (17). ثم جمع الدم في انابيب جافة ونظيفة بعدها تم فصل المصل وتقدير مستوى الكلوكوز، الكوليستيرول باستخدام عدة التحليل (Kit) وكمية الدهن الكلية.

التحاليل الكيميائية الحياتية :

١- تقدير مستوى الكلوكوز و الكوليستيرول في مصل الدم:

تم تقدير مستوى الكلوكوز و الكوليستيرول في مصل الدم باستخدام عدة التحليل (Kit) نوع (Syrbio, France) وهي طريقة انزيمية اذ يتفاعل الكلوكوز والكوليستيرول حسب تفاعل (18) .Trinder وتكوين ناتج ملون، وشدة اللون تتناسب مع تركيز الكلوكوز او الكوليستيرول الكلي في مصل الدم.

٢- تقدير كمية الدهون الكلية في مصل الدم:

تم استخدام الطريقة اللونية التي ادخلها الباحثان (19)، التي تتضمن تسخين مصل الدم مع حامض الكبريتيك المركز، ثم مفاعلة المزيج مع كاشف الفوسفوفانيلين phosphovaniline reagent ليعطي معقدا احمر-ارجوانيا وتتم القراءة عند طول موجي قدرة (540) نانوميتر

حقن الحيوانات المصابة بداء السكر التجريبي :

تم استحداث داء السكر في ذكور الفئران البيض (Male Albino Mice) والتي تراوحت اوزان الفئران بين (25-35) غرام قسمت عشوائيا على (10) مجموعة تضم كل مجموعة (3) فئران بجرعة (180 ملغم/كغم من وزن الجسم) من مادة الالوكسان (20). كانت الجرعة المعطاة من الالوكسان بمقدار (180 ملغم/كغم) من بعد التأكد من حدوث داء

السكر في الحيوانات وذلك بفحص الادرار بواسطة الشريط الكاشف Tes- Tape ® , Eli- lilly &Co, USA, وعدت الفئران التي اظهرت مستوى كلوكوز الدم بمقدار (180 ملغم/100 مللتر) من الدم مصابة بداء السكر، منعت عن الاكل لمدة (16) ساعة (21)، ثم حقنت بالمستخلصات المائية الخام والمواد غير البروتينية ومواد الرواسب البروتينية والمركبات البروتينية المفصولة بتقنية الترشيح الهلامي بجرعة مقدارها (77 ملغم/كغم) من وزن الجسم، فضلا عن مجموعة اخرى تضم ثلاثة فئران مصابة بداء السكر عدت مجموعة سيطرة حقنت بالمحلول الملحي الفسلجي (Normal saline) فقط. وبعد مرور ساعتين تم تخدير الفئران بالايثر وسحب الدم من جيب محجر العين بعدها قدرت كميات الكلوكوز والكوليستيرول والدهون الكلية كما ذكر سابقا.

تحديد الجرعة المؤثرة :

استخدمت فئران طبيعية تراوحت اوزانها من (25-35) غم قسمت الى مجاميع تضم كل مجموعة (3) فئران، اذ منعت من الاكل لمدة (16) ساعة وعوملت كما يلي:

١- المجموعة الاولى حقنت في التجويف البريتوني بـ (1) مللتر من المحلول الفسلجي وعدت مجموعة سيطرة (control).

٢- المجاميع من (2-4) حقنت في التجويف البريتوني بالجرع (50، 77، 100) ملغم/كغم من وزن الجسم على التوالي من المركب البروتيني B المفصول من مادة الراسب البروتيني المعزول من المستخلص المائي الخام البارد لثمرة نبات اللوبيا.

وبعد ساعتين من الحقن هذا المركب البروتيني في التجويف البريتوني قيس مستوى كلوكوز الدم، ثم اختيرت الجرعة الأكثر تأثيراً في خفض مستوى كلوكوز الدم وعدت جرعة مؤثرة.

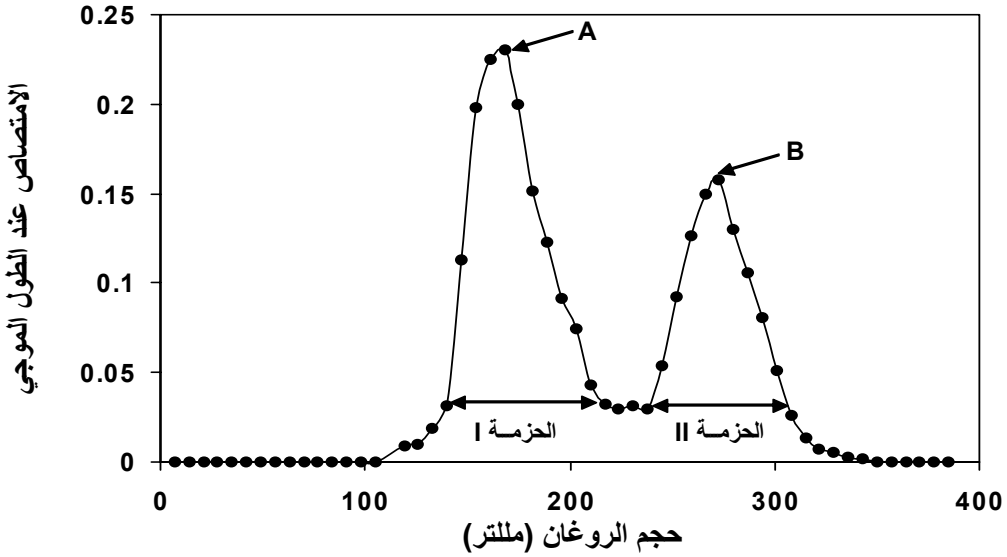
التحليل الإحصائي:

تم تحليل نتائج مستويات الكلوكوز، الكوليسترول والدهون الكلية احصائيا وذلك باستخدام One way analysis of variance كما تم تحديد الاختلافات الخاصة بين المجاميع باستخدام اختبار دنكن Duncan (22) وكان مستوى التميز الاحصائي المقبول $(P< 0.05)$%5.

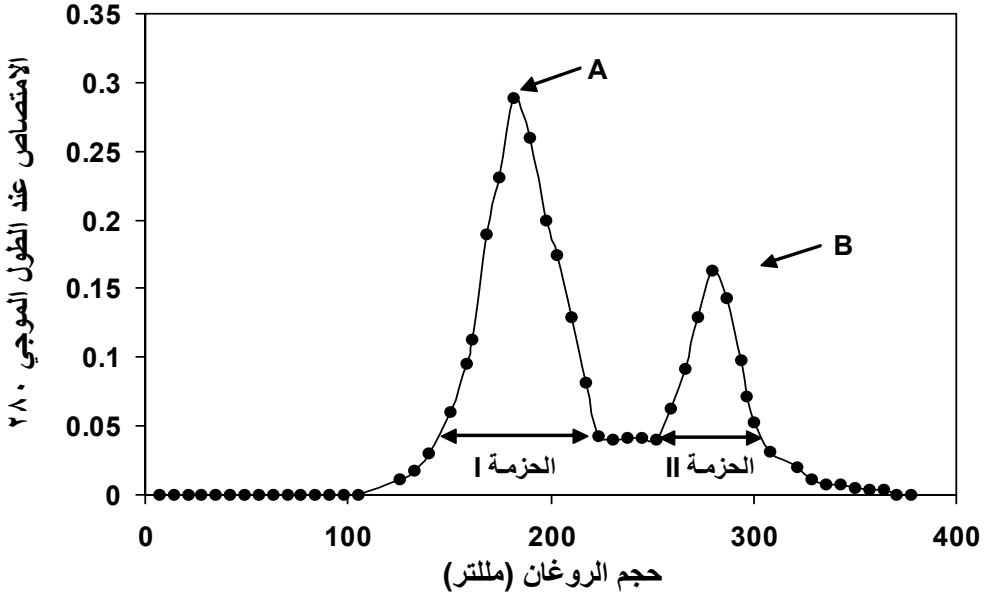
النتائج والمناقشة

فصل المواد البروتينية بتقنية الترشيح الهلامي:

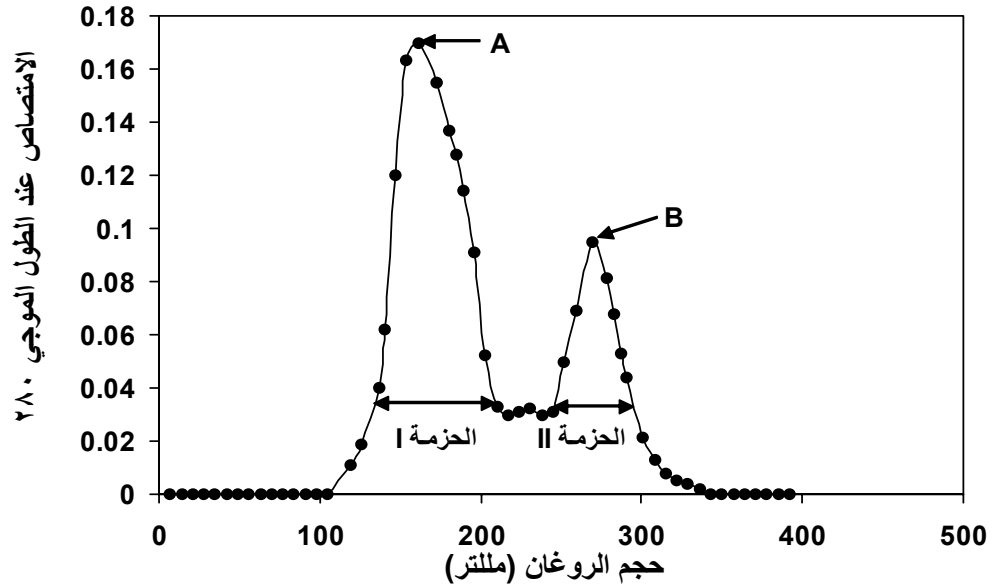
اعطى روغان مادة الراسب البروتيني المعزول من المستخلص المائي البارد والمغلي لثمرة كل من نبات اللوبيا والفاصوليا قمتين واضحتين عند امرار محلولها في عمود الفصل المبينة في الشكل (1-4).



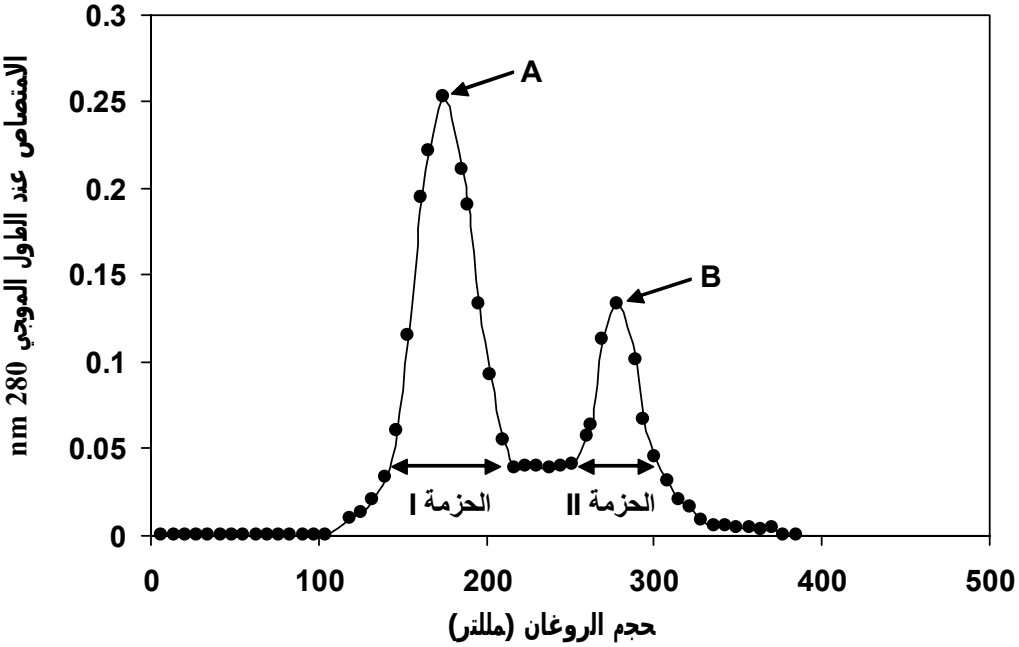
الشكل (1): المظهر الجانبي لروغان المادة البروتينية المعزولة من المستخلص المائي الخام لنبات اللوبيا البارد بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفصل ذي الابعاد (120 × 1.8) سم الحاوي على الهلام سفدكس من نوع Sephadex G-50 الاسهم A و B تمثل حجم الروغان للقمم: الاولى (168) مللتر والثانية (273) مللتر على التوالي للمركبات البروتينية المفصولة، حجم كل جزء (7) مللتر وبمعدل جريان (42 مللتر/ساعة).



الشكل (2): المظهر الجانبي لروغان المادة البروتينية المعزولة من المستخلص المائي الخام لنبات اللوبيا المغلي بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفصل ذي الابعاد (120 × 1.8) سم الحاوي على الهلام سفدكس من نوع Sephadex G-50 الاسهم A و B تمثل حجم الروغان للقمم: الاولى (182) مللتر والثانية (280) مللتر على التوالي للمركبات البروتينية المفصولة، حجم كل جزء (7) مللتر وبمعدل جريان (42 مللتر/ساعة).



الشكل (3): المظهر الجانبي لروغان المادة البروتينية المعزولة من المستخلص المائي الخام لنبات الفاصوليا البارد بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفصل ذي الابعاد (120 × 1.8) سم الحاوي على الهلام سفدكس من نوع Sephadex G-50 الاسهم A و B تمثل حجم الروغان للقمم: الاولى (161) مللتر والثانية (270) مللتر على التوالي للمركبات البروتينية المفصولة، حجم كل جزء (7) مللتر وبمعدل جريان (42 مللتر/ساعة).



الشكل (4): المظهر الجانبي لروغان المادة البروتينية المعزولة من المستخلص المائي الخام لنبات الفاصوليا المغلي بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفصل ذي الابعاد (120 × 1.8) سم الحاوي على الهلام سفدكس من نوع Sephadex G-50 الاسهم A و B تمثل حجم الروغان للقمم: الاولى (175) مللتر والثانية (278) مللتر على التوالي للمركبات البروتينية المفصولة، حجم كل جزء (7) مللتر وبمعدل جريان (42 مللتر/ساعة).

بعد فصل المركبات (الحزم) البروتينية من المحلول المركز لمواد الرواسب البروتينيـة التـي مررت في عمود الفصل، تم تقدير كمية البروتين بطريقة العالم لاوري المحورة، ومـن ثـم ايجاد كفاءة الفصل في العمود المستخدم بتقنية الترشيح الهلامي والجدول (1) يبين النتائج.

جدول (1): كمية البروتين الكلية والنسب المئوية للمركبات البروتينية المفصولة وكفاءة الفصل بتقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي

نوع المادة	تركيز البروتين (ملغم/ملتر)	الحجم الكلي (ملتر)	كمية البروتين الكلي (ملغم)	النسبة المئوية (%)	كفاءة الفصل (%)
مادة الراسب البروتيني الناتج من المستخلص المائي البارد لثمرة نبات اللوبيا قبل التمرير على عمود الفصل	6.99	2	13.98	100	72.6
المركب البروتيني A المفصول بتقنية الترشيح الهلامي من مادة الراسب البروتيني	0.064	85	5.44	38.9	
المركب البروتيني B المفصول بتقنية الترشيح الهلامي من مادة الراسب البروتيني	0.059	80	4.72	33.7	
مادة الراسب البروتيني الناتج من المستخلص المائي المغلي لثمرة نبات اللوبيا قبل التمرير على عمود الفصل	5.27	2	10.54	100	88.3
المركب البروتيني A المفصول بتقنية الترشيح الهلامي من مادة الراسب البروتيني	0.056	90	5.04	47.8	
المركب البروتيني B المفصول بتقنية الترشيح الهلامي من مادة الراسب البروتيني	0.061	70	4.27	40.5	
مادة الراسب البروتيني الناتج من المستخلص المائي البارد لثمرة نبات الفاصوليا قبل التمرير على عمود الفصل	5.53	2	11.06	100	86.3
المركب البروتيني A المفصول بتقنية الترشيح الهلامي من مادة الراسب البروتيني	0.061	84	5.12	46.33	
المركب البروتيني B المفصول بتقنية الترشيح الهلامي من مادة الراسب البروتيني	0.068	65	4.42	39.96	
مادة الراسب البروتيني الناتج من المستخلص المائي الخام المغلي لثمرة نبات الفاصوليا قبل التمرير على عمود الفصل	5.22	2	10.44	100	88.5
المركب البروتيني A المفصول بتقنية الترشيح الهلامي من مادة الراسب البروتيني	0.063	80	5.04	48.28	
المركب البروتيني B المفصول بتقنية الترشيح الهلامي من مادة الراسب البروتيني	0.060	70	4.2	40.23	

الأوزان الجزيئية التقريبية للمركبات البروتينية المفصولة:

لغرض تعيين الاوزان الجزيئية التقريبية للمركبات البروتينية المفصولة بتقنية الترشيح الهلامي استخدم عمود الفصل ذي الابعاد (1.8× 120) سم، الذي وصف سابقا في طرائق العمل. اذ تم امرار عدد من المواد المعلومة الوزن الجزيئي، تراوحت اوزانها الجزيئية بين (204–2000,000) دالتون، بعد ذلك تم تعيين حجوم الروغان لهذه المواد كما هو مبين في الجدول (2).

جدول (2): المواد التي استخدمت في عمود الفصل ذي الابعاد (1.8× 120) سم الحاوي لمادة الهلام من نوع (Sephadex G-50) واوزانها الجزيئية وحجوم الروغان

المادة	الوزن الجزيئي (دالتون)	حجم الروغان (مللتر)
الدكستران الازرق Blue dextran	2000000	110
البومين مصل البقر Bovine serum albumin (B SA)	67000	129
الفا-اماليليز amylase-	58000	133
البومين البيض Eggs albumin	45000	140
ببسين Pepsin	36000	168
تربسين Trypsin	23000	206
هرمون الانسولين Insulin Hormone	5750	235
هرمون الاوكسيتوسين Oxytocin Hormone	1051	304
التربتوفان Tryptophan	204	364

وعند رسم حجم الروغان (Elution volume) لكل مادة مقابل لوغارتم الوزن الجزيئي تم الحصول على المنحني القياسي تقدير الوزن الجزيئي والذي من خلاله يمكن تحديد الوزن الجزيئي التقريبي للمركبات المفصولة كما مبين في الجدول (3).

جدول (3): الاوزان الجزيئية التقريبية للمركبات البروتينية المفصولة بتقنية الترشيح الهلامي

المركب البروتيني	حجم الروغان	الوزن الجزيئي
المركب البروتيني A المفصول من مادة الراسب البروتينية للمستخلص المائي الخام البارد لثمرة نبات اللوبيا	168	28840
المركب البروتيني B المفصول من مادة الراسب البروتينية للمستخلص المائي الخام البارد لثمرة نبات اللوبيا	273	2238
المركب البروتيني A المفصول من مادة الراسب البروتينية للمستخلص المائي الخام المغلي لثمرة نبات اللوبيا	182	20844

المركب البروتيني B المفصول من مادة الراسب البروتينية للمستخلص المائي الخام المغلي لثمرة نبات اللوبيا	280	1887
المركب البروتيني A المفصول من مادة الراسب البروتينية للمستخلص المائي الخام البارد لثمرة نبات الفاصوليا	161	33884
المركب البروتيني B المفصول من مادة الراسب البروتينية للمستخلص المائي الخام البارد لثمرة نبات الفاصوليا	270	2454
المركب البروتيني A المفصول من مادة الراسب البروتينية للمستخلص المائي الخام المغلي لثمرة نبات الفاصوليا	175	24547
المركب البروتيني B المفصول من مادة الراسب البروتينية للمستخلص المائي الخام المغلي لثمرة نبات الفاصوليا	278	1949

تحديد الجرعة المؤثرة:

يوضح الجدول (4) تحديد الجرعة الأكثر تأثيرا في خفض مستوى الكلوكوز في ذكور الفئران البيض الطبيعية للمركب البروتيني B المفصول بتقنية الترشيح الهلامي من مادة الراسب البروتينية المعزولة من المستخلص المائي الخام البارد لثمرة نبات اللوبيا. وقد تبين من خلال هذه الجداول المذكورة أعلاه ان قيمة الجرعة المؤثرة هي (77) ملغم/كغم من وزن الجسم.

جدول (4): تحديد الجرعة المؤثرة للمركب البروتيني B المفصول بتقنية الترشيح الهلامي من مادة الراسب البروتينية الناتجة من المستخلص المائي البارد لثمرة نبات اللوبيا التي اعتمدت لبقية المركبات البروتينية المفصولة من النباتين

	السيطرة	جرع المركب البروتيني B لثمرة نبات اللوبيا بالملغم/كغم وزن الجسم		
		50	77	100
تركيز الكلوكوز ملي مول/لتر	0.51±5.43	0.4±4.35	0.16± 3.06	0.21 ± 4.82
نسبة التغيير %	-	-19.88	-43.6	-11.2

تشير قيم الكلوكوز الى المعدل ± الخطأ القياسي.

تأثير الانسولين على مستويات الكلوكوز والكوليستيرول والدهون الكلية في الفئران الطبيعية والمصابة:

*** الكلوكوز**

أدت المعاملة بالانسولين وبجرعة (10) وحدات دولية/كغم من وزن الجسم تحت الجلد في ذكور الفئران الطبيعية الى انخفاض معنوي حاد في مستوى الكلوكوز بالمقارنة مع

السيطرة الطبيعية كما مشار اليها في الجدول(5). ان نتائج هذه الدراسة الحالية حول عمل الانسولين في خفض مستوى الكلوكوز في الدم تتفق مع نتائج (20) في الفئران و (23) في الجرذان. كما ادت المعاملة بالانسولين الى انخفاض معنوي في مستوى الكلوكوز في ذكور الفئران المصابة بداء السكر المستحدث بالالوكسان بالمقارنة مع السيطرة المصابة وهذه تتفق مع نتائج (24) في الارانب و (23) في الجرذان، وقد يعزى السبب الى ان الانسولين يزيد من معدل دخول الكلوكوز الى داخل الخلايا من خلال زيادة عدد نواقل الكلوكوز في الغشاء البلازمي (25). كما يعمل الانسولين على زيادة تكوين الانزيمات المسؤولة عن عملية حل الكلوكوز وهي بـايروفيت كـاينيز pyruvate kinase وفوسفوفركتوكـاينيز phosphofructo kinase فضلا عن تثبيطـه للانزيمات المسؤولة عن تكوين الكلوكوز وهي بايروفيت كاربوكسيليز وفركتوز-6،1- ثنائي فوسفاتيز-fructose-1,6 diphosphatase وكلوكوز-6-فوسفاتيز (37)، وقد يؤثر الانسولين من خلال إعادة ترميم (تجديد) قسم من خلايا بيتا البنكرياسية(26).

*** الكوليستيرول**

ادت المعاملة بالانسولين وبجرعة (10) وحدات دولية تحت الجلد في ذكور الفئـران الطبيعية الى خفض معنوي في مستوى الكوليستيرول بالمقارنة مع السيطرة الطبيعية ونتـائج هذه الدراسة تتفق مع نتائج (27) في الفئران الطبيعية اذ ادى الحقن في التجويف البريتـوني للفئران وبجرعة (6.64) وحدة دولية لكل كغم من وزن الجسم في الفئـران الطبيعيـة الـى انخفاض معنوي في مستوى الكوليستيرول مقارنة مع السيطرة الطبيعية ولا تتفق مع دراسات اخرى اشارت الى ان الانسولين يؤدي الى زيادة معنوية فـي مـستوى الكولـيـستيرول فـي الحيوانات الطبيعية ومنها (28، 29) كما ادت المعاملة بالانسولين في الفئران المصابة بـداء السكر الى انخفاض معنوي في مستوى الكوليستيرول وهذه تتفق مع نتائج (24) و(29) فـي ذكور الجرذان. ويعـزى ذلـك الـى تثبـيط الانـسولين لانـزيم Intestinal acyl-CoA cholesterol acyl transferase المسؤول عن امتصاص الكوليستيرول من الامعـاء (30) او قد ينتج التأثير أيضاً من خلال زيادة مستوى ApoE mRNA من قبـل الانـسولين (31) ومن ثم خفض مستوى كوليستيرول الدم، او باحداث تغيرات في فلورا الامعـاء Intestinal flora التي بدورها تزيد من الاحماض الصفراوية الطريحة Bile acid output فضلا عن خفض مستوى الكوليستيرول (32).

*** الدهون الكلية**

ادت المعاملة بالانسولين بجرعة (10) وحدات دولية/كغم وزن الجسم تحت الجلد الى حدوث خفض معنوي في مستوى الدهون الكلية في الفئران الطبيعية بالمقارنة مـع الـسيطرة

الطبيعية، كما ادت المعاملة بالانسولين في الفئران المصابة بداء السكر المستحدث بالالوكسان الى خفض معنوي في مستوى الدهون الكلية بالمقارنة مع السيطرة المـصابة. وتتفـق هـذه الدراسة الحالية لخفض الدهون الكلية في الفئران المصابة مع دراسة (33) و (34)، وقد يعود السبب الى ان الانسولين يؤدي الى انخفاض في معدل امتصاص الاحماض الدهنية من الامعاء (34) او انه يثبط من الهرمونات المحللة للدهون Lipolytic hormones في الانسجة الدهنية (35).

تأثير المركبات البروتينية المفصولة من مواد الرواسب البروتينية لثمرة كـل مـن نبـاتي اللوبيا والفاصوليا على مستوى الكلوكوز والكوليستيرول والـدهون الكليـة فـي الفئـران الطبيعية والمصابة بداء السكر التجريبي المستحدث بالالوكسان:

*** الكلوكوز**

ادت المعاملة بـ (77) ملغم/كغم وزن الجسم من المركب A مـن مـادة الراسـب البروتينية للمستخلص المائي البارد والمغلي لثمرة نبات اللوبيا في التجويف البريتوني لـذكور الفئران الطبيعية والمصابة بداء السكر المستحدث بالالوكسان الى انخفاض معنوي حـاد فـي مستوى الكلوكوز بالمقارنة مع مستواه في السيطرة الطبيعية والمصابة علـى التـوالي وكمـا ذكرت في الجداول (5) و (6). في حين ان المركب B المفصول من مادة الراسب البروتينية للمستخلص البارد والمغلي لثمرة نبات اللوبيا اظهر ارتفاعا غير معنوي في مستوى الكلوكوز في الفئران الطبيعية، بينما في الفئران المصابة ادى الى انخفاض معنوي في مستوى الكلوكوز في الفئران الطبيعية، بينما في الفئران المصابة ادى الى انخفاض معنوي في مستوى الكلوكوز ان التأثير الخافض للمركب A والمذكور أعلاه في الفئران الطبيعية وكذلك المـصابة ربمـا يعزى الى ان هذا الجزء البروتيني قد يحتوي على تسلسل للاحماض الامينية مشابه لتلك التي في الانسولين اذ يرتبط مع مستقبلات الانسولين ويخفض من مستوى السكر في الدم (20).

المركب A العائد للمستخلص المغلي لثمرة نبات الفاصوليا فقد أدت الـى انخفـاض معنوي في مستوى الكلوكوز وذلك بالمقارنة مع مستواه في السيطرة الطبيعية والمصابة. وقد يعزى السبب في هذا التباين الى ان هذا المركب يمكن ان يحصل تحوير فـي تركيبـه عنـد ارتفاع درجة الحرارة، وان له تأثيراً خافضا في الفئران المصابة دون الطبيعية اذ قـد يكـون السبب في ذلك ان هذا المركب يكون فعال في المستويات العالية للكلوكوز.

*** الكوليستيرول**

ادت المعاملة بالمركبات_A و B المشار اليها في الجداول (5) و (6) المفصولة مـن مواد الرواسب البروتينية المعزولة من المستخلصات الباردة والمغلية لثمـرة نبـات اللوبيـا

وبجرعة (77) ملغم/كغم وزن الجسم في التجويف البريتوني لذكور الفئران الطبيعية والمصابة بالمقارنة مع السيطرة الطبيعية والمصابة على التوالي الى انخفاض معنوي في مستوى الكوليستيرول. التأثير الخافض لهذه المركبات يمكن ان يعزى الى ان هذه المركبات مشابهة للانسولين Insulin like action، اذ قد يثبط انزيم HMG-CoA reductase الذي يعد انزيما منظما لبناء الكوليستيرول والذي يحول HMG-CoA الى ميفالونيت (33)، او انه يحفز الغدة الدرقية على افراز هورمون الثيروكسين الذي يؤدي الى خفض الكوليستيرول في الدم (36).

*** الدهون الكلية**

لم تؤدي المعاملة بالمركب A البروتيني المفصول من مادة الراسب البروتينية المعزولة من المستخلصات المائية الباردة والمغلية لثمرة اللوبيا، وكذلك المركب B المفصول من مادة الراسب البروتيني البارد والمغلي لثمرة اللوبيا وبجرعة (77) ملغم/كغم وزن الجسم في التجويف البريتوني في الفئران الطبيعية الى تغير (ارتفاع) معنوي في مستوى الدهون الكلية بالمقارنة مع السيطرة الطبيعية. اما في المجاميع المصابة فقد ادى حقن المركبات A و B البروتينية العائدة للمستخلصات الباردة والمغلية لثمرة اللوبيا وبالجرعة نفسها الى انخفاض معنوي في مستوى الدهون الكلية بالمقارنة مع السيطرة المصابة.

ان هذا التاثير الخافض لمستوى الدهون الكلية في الفئران المصابة عند معاملتها بالمركب A و B المشار اليها في الجدول (6) ربما يعزى لامتلاك هذه المركبات تاثيرا مشابها للانسولين فتثبط من فعل الهورمونات المحللة للدهون Lipolytic hormones في الانسجة الدهنية، او انها تزيد من بناء الدهون Lipogenesis (37).

واخيرا فان جميع تلك المركبات الفعالة المعزولة من النباتات تمثل عوامل غذائية مساعدة لمعالجة داء السكر ومصدرا اخرا لاكتشاف ادوية فموية لمعالجة داء السكر في المستقبل.

المصادر

١) مصيقر، عبد الرحمن (1999). "الغذاء والتغذيـة". اكاديميـا، بيـروت، لبنـان، ص557-699.

2) Olefsky J.M. (1980). “The insulin receptor”. Physiology and pathophysiology, Denver, The Upjohn Company, pp. 5-40.

3) Svayney P.B. (1995). “Science desk reference”. Astoenesong Press Book Macmilan, USA, p. 198.

٤) جامعة الدول العربية، المنظمة العربية للتنمية الزراعية (1988). "النباتـات الطبيـة والعطرية والسامة في الوطن العربي". دار مصر للطباعـة، الخرطـوم، الـسودان، ص290-296.

5) Ling-Hua Z. and Pei-Gen X. (1993). “Recent advances in studies of antihyperlipidemic and antihyperglycemic compounds from Chinese traditional and herbal medicines”. Phytother Res., 7: 217-226.

6) Day C. (1995). “Hypoglycemic plant compounds”. Pract. Diab. Int., 12(6), 269-271.

7) Platel K. and Srinivasan K. (1997). “Plant foods in the management of diabetes mellitus. Vegetables as potential hypoglycemic agents”. Nahrung., 41(2): 68-74.

8) Lawrence H.M. (1951). “Taxonomy of Vascular Plant”. The Macmillan Company, p. 82.

٩) الكاتب، يوسف منصور (2000). "تصنيف النباتات البذرية". الطبعة الثانيـة، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي، جامعة بغداد، ص 503-507.

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

11) Robyt F.J. and White J.B. (1987). “Biochemical techniques, theory and practice”. Brookes/Cloe Publishing Company, Monterey, California, pp. 115-118.

12) Morris C.J. and Morris P. (1976). “Separation method in biochemistry”. 2nd ed., Pitman Publishing , p.442.

13) Andrews P. (1965). “The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weight over a wide range”. Biochem. J., 96: 595-606.

14) Eno A.E. and Item E.H. (1996). “Hypoglycemic agents leaves of Elaeophorbia drupifera”. Phytother. Res., 10, 680-682.

15) Neef H., Declereq P. and Laekeman G.(1995)" Hypoglycemic activity of selected European plants " Phytother. Res., 9:45-48.

16) Ahmad T.Y., Al-Khayat I. and Mahmood S. (1994). "Hypoglycemic activity of Olea europaea leaves". J. Edu. Sci., 15: 54-61.

17) Atta A.H., Shalaby M.A., Shokry I.M. and Ahmad A. A. (1983). "Interaction between oral hypoglycemic and antibiotics on blood glucose level of normal fasted and alloxan–diabetic rats". Vet. Med. J., 31(1): 11-18.

18) Burtis C.A. and Ashwood E.R. (1999). "Tietz textbook of clinical chemistry". 3rd ed., W.B. Saunders Company, London, pp. 840-841.

19) Toro G. and Ackermann P.G. (1975). "Practical clinical chemistry". Little, Brown and Company, Boston, p. 354.

20) Hamoodi N.S. (1999). "Biochemical studies of the proteinous compounds Isolated from some hypoglycemic plants". Ph.D. Thesis, College of Science, Mosul University.

21) Al-Chalabi N.S. (2002). "Biochemical study of the proteinaceous compounds isolated from aqueous extract of Trigonella foenum-graecum L. seeds". Raf. J. Sci., 13(3), 46-55.

22) Steel R.G. and Torrie J.H. (1984). "Principles and procedures of statistics biometrical approach". 2nd ed., McGraw-Hill Inc., Singapore, p. 183.

٢٣) عبد المانع، خالد صالح عمر (2002). "عزل البروتينات والاجزاء غير البروتينية من نباتي السبحبح وخس الزيت ودراسة تاثيرها على مستوى السكر في الـدم". رسـالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل.

٢٤) الكاكي، إسماعيل صالح ويوسف، وليد حميد (2003). "تأثير المستخلـصات المائيـة لبذور حبة السوداء في مستويات المالوندياالديهايد والكلوتاثايون في بعض انسجة ذكور الارانب". المجلة العراقية للعلوم البيطرية، المجلد ١٧، العدد ١، ص١٥-٢٣.

25) Ashcroft F.M. and Ashcroft S.H. (1992). "Insulin molecular biology to pathology". IRL. Press., pp. 155, 177.

26) Movassat J., Saulnier C. and Portha B. (1997). "Insulin administration enhances growth of -cell mass in streptozotocin-treated newborn rat". Diabetes 46: 1445-1452. the

27) Ahmad T.Y., Al-Chlabi N. S. and Al-Jarah A. (2002). "Hypoglycemic activity of proteinous and non-proteinous fractions from aqueous Brassica campestris linn. var. rapa root extract". Raf. J. Sci., 13(40): 27-37.

٢٨) عبد الرحمن، صائب يونس (١٩٩٥). "تأثير الجوع وداء الـسكر التجريبـي علـى مستويات الكلوتاثايون وزناخة الدهن في انسجة الجرذان "اطروحة دكتـوراه. كليـة الطب البيطري، جامعة الموصل.

٢٩) محمد، اسماعيل حـسن (1998). "تـأثير الانـسولين والباراسـيتامول والاوكـسي تتراسايكلين على بعض الجوانب الكيميائية الحياتية في الجرذان الـسليمة والمـصابة بالسكري المحدث بالالوكسان. رسالة ماجـستير، كليـة الطـب البيطـري، جامعـة الموصل.

30) Maechler P., Wollheim C.B. Bentzen C.L. and Niesors 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: 199-209.

31) Lenich C.M., Chobanian A.V., Brecher P and Zannis V.I., (1991). "Effect of dietary cholesterol and alloxan diabetes on tissue cholesterol and apolipoprotein E mRNA levels in the rabbit" J. lipids Res.,32(3):432-438.

32) Paolettl R. and Fumagalli R.(1971). "Drugs acting on blood lipids. In: Fundamentals of biochemical pharmacology". Bacq. Z.M., (Ed.), 1st ed., Pergamon Press Ltd., Oxford, pp. 557-570.

33) Al-Chalabi N.S., Ahmad T.Y. and Al-Jarah I. (2004). "Effect of proteineous compounds isolated from hypoglycemic plants on certain biochemical aspects in normal and alloxan induced diabetic mice". National J. Chem., 14(2).

٣٤) عزيز، بسام نجيب (1999). "بعض التغيرات الكيمياوية الحياتية في حالات الجـوع والكرب التاكسدي وداء السكر التجريبي في الجرذان: تأثير بعض النباتـات الطبيـة والهورمونات الجنسية الانثوية". اطروحة دكتوراه، كلية الطـب البيطـري، جامعـة الموصل.

35) Goodman L.S. and Gillman A. (1985). "The pharmacological basis of therapeutics". 7th ed. Macmillan Co., New York, pp.1490-1510.

٣٦) زعقوق، سمير عطية محمد (1999). "التحاليل المعلميـة وتفـسيراتـها". مطبعـة الاهرام التجارية، قيلوب، مصر، ص 175، ٢٤٩-٢٥٠.

37) Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A. and Rodwell V.W. (1996). "Harper's biochemistry". 24th ed., Appleton and Lange, USA., pp. 262, 584, 586.