جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة الانبار

كلية العلوم التطبيقية ـ هيت ـ

قسم الفيزياء الحياتية

(Study of the effect of a crude extract of red radish root on the inhibition of lipase enzyme)

بحث مقدم الى كلية العلوم التطبيقية قسم الفيزياء الحياتية لنيل شهادة البكالوريوس في الفيزياء الحياتية

اعداد الطلاب

شهد رياض عفتان **اسراء شاكر حمود** **عمار فائق محمود**

عمر صابر رزيك **مصطفى صبحي شهاب**

اشراف أ.م.د

مناف عبد الرحمن جمعة

2021م **1442هـ**

بِسْمِ ٱللَّهِ ٱلرَّحْمَٰنِ ٱلرَّحِيمِ

﴿ إِنَّ هَٰذَا ٱلْقُرْءَانَ يَهْدِى لِلَّتِى هِىَ أَقْوَمُ وَيُبَشِّرُ ٱلْمُؤْمِنِينَ ٱلَّذِينَ يَعْمَلُونَ ٱلصَّٰلِحَٰتِ أَنَّ لَهُمْ أَجْرًا كَبِيرًا ﴿٩﴾ وَأَنَّ ٱلَّذِينَ لَا يُؤْمِنُونَ بِٱلْءَاخِرَةِ أَعْتَدْنَا لَهُمْ عَذَابًا أَلِيمًا ﴿١٠﴾ ﴾ الإسراء: ٩ – ١٠

صدق الله العظيم

الاهداء

إلى من جرع الكأس فارغاً ليسقيني قطرة حب ...

إلى من كلت أنامله ليقدم لنا لحظة سعادة...

إلى من حصد الأشواك عن دربي ليمهد لي طريق العلم ....

إلى القلب الكبير (والدي العزيز)...

إلى رمز الحب وباسم الشفاء

إلى القلب الناصع بالبياض (والدتي الحبيبة)....

إلى القلوب الطاهرة الرقيقة والنفوس البريئة إلى ريحين حياتي (إخوتي) ....

الآن تفتح الأشرعة وترفع المرساة لتنطلق السفينة في عرض بحر واسع مظلم هو بحر الحياة وفي هذه الظلمة لا يضيء إلا قنديل الذكريات ذكريات الأخوة البعيدة

إلى الذين أحببتهم وأحبوني (أصدقائي) ...

ثم إلى كل من علمني حرفا أصبح سنا برقه يضيء الطريق أمامي ...

شكر وعرفان

الحمد للّه رب العلمين الذي امني بالنعم التي لا تحصى ووفقني واعانني على اتمام هذا البحث والذي اسال اللّه تعالى أن يتقبله مني ويجعل عملي خالصا لوجهه الكريم . اقدم شكري الأستاذي الذي

أشرف على البحث الاستاذ المساعد الدكتور مناف عبدالرحمن جمعه ، والذي تفضل بالإشراف على بحثي هذا وقدم لي النصح والارشاد ، والذي كان بمثابة الاب والمربي والمعلم الذي جعله اللّه رافدا للعلم وامد بعمره لكل خير .

كما واتقدم مسبقة الى لجنة المناقشة بالشكر والعرفان لما سيبذلونه من قراءة وتمحيص دقيق لبيان الملاحظات التي تسد ثغرات البحث ، فلهم مني خالص الشكر والاحترام .

كما لا يفوتني أن أتقدم بخالص الشكر لأساتذتي في قسم الفيزياء الحياتية ، ولجميع من ساندني ووقف معي وأرشدني

سائلا المولى تعالى ان يحفظهم ويجعلهم مفاتيح للخير مغاليق للشر.

الباحثون

الخلاصة

يتضمن هذا البحث وصف طريقة استخلاص نبات الفجل و ان المركبات الفعالة التي يحتويها الفجل لها القابلية على تثبيط انزيم الايبيز و تم ذلك بتحضير نبات الفجل ليكون جاهز للاستخلاص عن طريق تقطيعه وتجفيفه ومن ثم طحنه ، وبعدها تم نقع50 غرام من الفجل المجفف في 100مل من اثل استيت وبعدها تم وضعه في جهاز السكسليت لمدة 24 ساعه ومن ثم تم ترشيحها وتقطيرها حتى تم الحصول على مستخلص الفجل على شكل زيت الحاوي على المركبات الفعالة ، ويبين هذا البحث كيف ان للمستخلص فعالية على تثبيط انزيم الايبيز حيث اعطى نتائج ايجابيه على عدة عينات تم تجهيزها في المختبر وتم في هذا البحث دراسة ارتباط احد مكونات الفجل وهو السلفورافين (sulforaphane) مع انزيم اللايبيز البنكرياسي عند الانسان وكانت الدراسة حاسوباتيه تخيلية باستخدام موقع CB/dock حيث تم اجراء اختبار ارتباط الليگند وهو السلفورافين مع اللايبيز واظهرت الدراسة نتائج جيدة .

الفهرست

الموضوع	رقم الصفحة
الاية	أ
الاهداء	ب
شكر وعرفان	ت
الخلاصة	4
الفهرست	5
الجزء الاول	
1.1 المقدمة	8
1.1.1 المركبات الفعالة بايلوجياً في جذور نبات الفجل	8
1.2 الانزيمات	13
1.3 مثبطات الانزيمات	15
1.3.1المثبط التنافسيHarmonic damper	16
1.3.2 أنواع المثبطات العكسيةReverse inhibitors 1.3.2.1 المثبطات العكسية التنافسية ، Competitive reverse inhibitors	17
1.3.2.2 لمثبطات غير تنافسيةNoncompetitive inhibitors	17
1.3.2.3 المثبطات اللاتنافسية Uncompetitive inhibitors	17
1.3.2.4 المثبطات المختلطةVarious inhibitors:	17
1.3.3المثبط الغير تنافسي Noncompetitive damper	18
1.4 ليبازٌ بَنْكِرياسيَّة بالإنجليزية Pancreatic lipase :	22
1.4.5الموقع	23
1.4.6الوظيفة	23
1.4.7الليبازات البشرية	23
1.4.8 ما هيَ فوائد إنزيم الليباز؟	26
1.5.1المستخلص بالتوزع بين سائل وصلب 1.5.1.1.التعطينMacera.	28

1.5.1.2.النقع : Infusion	29
1.5.1.3.الطهي Decoction	30
1.5.2..الاستخلاص تحت مبرد صاعد	30
1.5.2.1.التزحيل Percolation	30
1.5.3..الاستخلاص بجهاز سوكسليه Soxhlet	31
1.5.4.الاستخلاص بالغازات السائلة	31
1.5.5.استخلاص الزيوت العطرية	31
1.5.6الاستخلاص بالتوزع بين سائلين	32
1.6.تكثيف الخالصات	32
1.6.الضغط المنخفض	33
الجزء الثاني	
2. طريقة العمل	35
2.2. المواد المستخدمة	35
2.3 الاستخلاص	36
2.3.1.كيفية قياس فعالية الانزيم enzyme assay	37
2.3.2.التثبيط	38
2.3.4 الحسابات	38
الجزء الثالث	
3.1.النتائج والمناقشة	41
3.1.1. الاستخلاص	41
3.1.2. الذوبانية	42
3.1.3. دراسة فعالية المستخلص كمثبط لانزيم اللايبيز	42
3.1.4. دراسه فيزيوحياتيه	43
3.2 مناقشة النتائج	45
3.3 الخاتمة	46
3.4 المصادر	47

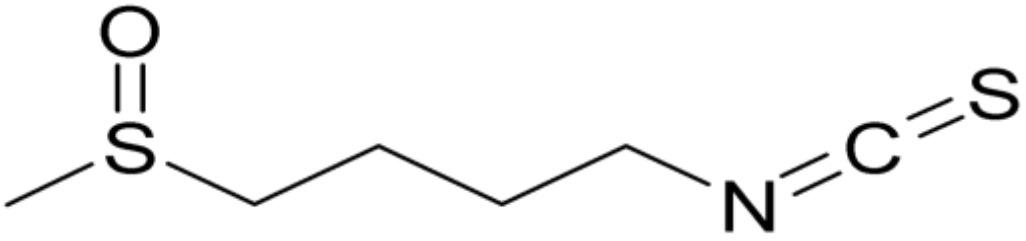
الجزء الاول

1.1. الفجل[1] (Raphanus) جنس نباتي يتبع الفصيلة الكرنبية من رتبة الكرنبيات. يضم عدة أنواع مقبولة أهمها الفجل المزروع (Raphanus raphanistrum subsp. sativus) وعدة أنواع لم يحسم أمرها بعد.[2] موطن معظمها أوروبا والقوقاز وينمو كثير منها في الوطن العربي.

1.1.1 المركبات الفعالة بايلوجياً في جذور نبات الفجل :

أظهرت دراسة سابقة على الفجل (Radish) ان الفجل يحتوي على العديد من العناصر المعدنية المهمة لصحة الانسان مثل الكالسيوم Ca والبوتاسيوم K واليود I والكبريت S والمغنيسيوم Mg والمركبات النشطة مثل القلويات والجليكوسيدات والجليكوزينولات (الجليكوزينات) ومركبات الفينول والتانينات والسلفورين ذات التأثيرات البايولوجية المتعددة مما زاد من اهميته ولفت انظار الباحثين الى دراسة تأثيراته في مجالات مختلفة [1] .

بينت دراسة اخرى اجريت في 2019 ان المركبات النشطة بايولوجياً الرافاساتين (Raphasatin) والسلفورافين (Sulforaphane-C6H11NoS2) كما موضح في الشكل رقم (1) وتتشكل اثناء التحلل المائي للفجل بواسطة انزيع الميروزيناز (Myrosinase) الداخلي (Raphasatin) غير مستقر للغاية ويتولد ويتحلل في نفس الوقت الى مركبات اقل نشاطاً اثناء التحلل المائي [2] .



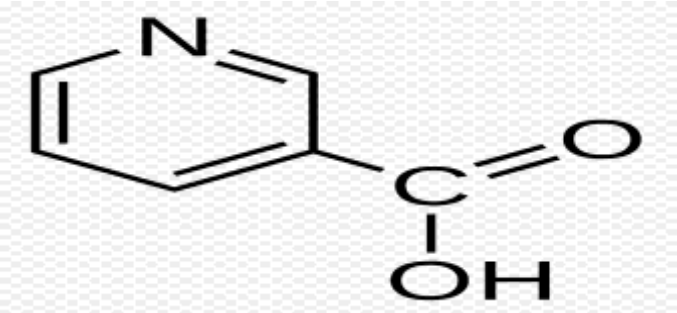
الشكل رقم (1)يوضح التركيب الكيميائي للسلفورافين

في دراسة اخرى ل Yan Wang واخرون تم عزل بروتينات (AGPs) Arabinogalac من جذور الفجل الاولية والناضجة حيث كانت تتكون اساساً من l-arabinose و d- galactose وكانت احدى السمات البارزة لجذور انها تحتوي على كميات ملحوظة من l- fucose [3] .

في دراسة اخرى اجريت سنة 2020 اظهر عصير جذور الفجل المجفف امكانيات مضادة للاكسدة قوية قد يرجع الى محتوى الفينولييين (Phenoline-C6H6O) العالي فأن قدرة الجذر المجفف من المشروبات الرائعة على تطهير الجذور الحرة وتقليل FE+ اعلى من الجذر المقشر المجفف [4]

.

اوضحت دراسة اخرى تم فيها تقسيم جذور الفجل الارجواني الى الادمة المحيطة والخشب وتم استخلاصها بشكل منفصل مع الميثانول (Methanol-CH3OH) تم تحديد 66 مركباً بما في ذالك 23 فلافونول (Flavonol) ، و1 ديهيدروفلافونول (Dihydroflavonol) ، و4 فلافونات (Flavones) ، و4 فلافون (Flavone) ، و28 انثوسيانين (Authocyanin) ، و2 ايزوفلافونويد (Isoflavonoids) ، و3 احماض فينولية (Phenol-C6H6O)، و1 هيدروكسي بنزالديهايد (Hidroksibenzaldehid-C8H8O3) التركيب الكيميائي في الشكل رقم (2) بناءً على تحليل جماعي عالي الدقة وكانة الأنثوسيانين)(Authocyanin اكثر انواع الفينولات وفرة حيث اضهرة 80 % في الادمة المحيطة بالجذور و90 % في نسيج الجذور بناءً على النتائج يمكن استخدام هذا التركيب لأدارة الامراض البشرية والحيوانية المختلفة [5] .



الشكل رقم (2)يوضح التركيب الكيميائي هيدروكسي بنزالديهايد

بينت دراسة اخرى في سنة 2001 ان المكونات الرئيسية في زيت جميع جذور الفجل (Radish) هي حمض هيكساديكانويك (30.3-49.9 %)‘(ميثيلثيو) بوتيل ايزوثيوسيانات (Iisothiocyanate) (17.9 – 25.7 %) ‘ ميثيل لينولينات (8.5 – 21.7 %) ‘ بنتينيتريل(1.5 – 6.9 %) ‘ ثنائي ميثيل ثلاثي كبريتيد (1.1 – 3.8 %)‘ بنتيل ايزوثيوسيانات (0.5 – 2.0 %)‘بيوتينيل ايزوثيوسيانات (0.1 _ 1.5 %)[6].

اوضحت دراسة وفقاً لتحليلات HPLC فأن المركبات النشطة الرئيسية في العصير المعصور من جذور الفجل ليست الجلوكوزينات ولكن من المحتمل ان تكون نواتج التحلل الناتجة عن التحلل المائي للميروسيناز نظراً لأنهُ يمكن اكتشاف كمية كبيرة من مادة البوليفينول (Polyphenol) في العصير فقد تكون هذهِ المركبات مسؤولة عن التأثير المفيد [7] .

جائت دراسة اخرى ل Paul R Hanlon واخرون كانت تركيزات Anthocyanin من جذور الفجل الناضج اكبر بكثير من براعم الاصناف الحمراء والوردي والارجواني وكانت الانثوسيانيدينات الاولية الموجودة في اصناف الفجل الاحمر والوردي بيلارغونيدين ودلفينيدين بينما كان انثوكيانيدين الاساسي في مجموعة الفجل الارجواني كان سينانيدين (Cinanidine) [8].

في انسجة جذر الفجل وهو مادة كيميائية نشطة بايولوجياً وتم تحديده Sinapineg اكتشاف سينابين الترادفية دون معالجة العينة وتم التحقق من صحة اكتشاف DAPCI-MSمباشرةً من خلال تجارب Sinapine في جذور الفجل باستخدام طرق HPLC-UV [9].

في دراسة اخرى لسنة 2016 لوحظت اشارات لنشاط انزيم الميروزيناز myrosinase في كل من البشرة والكامبيوم الوعائي لجذر الفجل اشار قياس نشاط myrosinase في مستخلصات البروتين الى ان مستوى نشاط انزيم الميروزيناز myrosinase كان اعلى بكثير مما هو عليه في الجذر المقشر[10].

RsMYB1الذي يشفر عامل النسخ R2R3-MYB(TF) من نبات الفجل الاحمر (Raphanus Sativus L)

التي تجمع مستويات عالية من الانثوسيانين يظهر RsMYB1 تعبيراً اعلى في الفجل الاحمر منه في الفجل الابيض العادي ان RsMYB1 هو منظم ايجابي نشط للتخليق الحيوي للانثوسيانين في نبات الفجل [11]

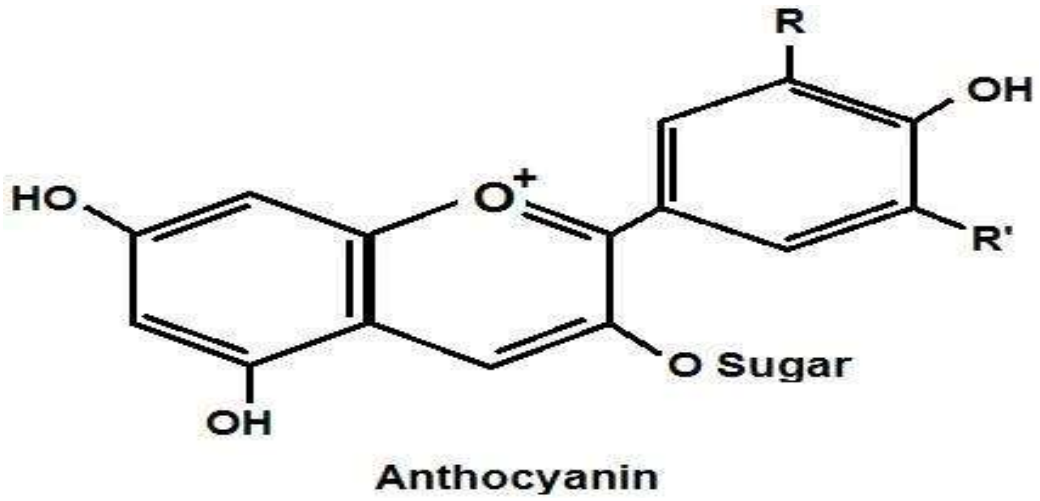
وأوضحت دراسة انه تم اجراء تحليل التنميط لجذور الفجل المعرضة لضغوط الرصاص (pb) والكادميوم (cd) باستخدام كروماتوجرافيا الغاز مقياس الطيف الكتلي اظهرت مخططات النقاط لتحليل المكون الرئيسي (PCA) والتحليل الجزئي للتمييز بين المربعات الصغرى (PLC-DA) وتميزاً واضحاً بين عينات التحكم والعينات المعالجة بالرصاص والكادميوم ان اجهاد الرصاص والكادميوم يمكن ان يسبب تغيير كبير على السكريات والاحماض الامينية والاحماض العضوية في جذور نبات الفجل وان تعرض الفجل لضغط الرصاص ادى الى تغييرات كيميائية حيوية عميقة بما في ذلك استقلاب الكاربوهيدرات والطاقة والجلوتاثيون. [12]

هدفت دراسة اخرى الى التأثيرات المائية للفجل وبشكل عام اشارة نتائج الدراسة الى وجود تأثيرات معنوية لتركيزات مستوى 10% و20 و30 و40 من المستخلصات المائية ادى اعلى تركيز (40) من المستخلص المائي لجذور الفجل الى تثبيط انبات البذور ونمو البادرات بينما كان اقل تركيز (10) اقل تأثير سلبي وتعتمد التأثيرات على تركيز حمض السرينجيك (Syringic) وحمض الفانيليك (Valic acid-C8H8O4) وحمض الفاليك (Folic-C19H19N&O6) في جذور الفجل باستخدام (HPLC)[13].

تم دراسة التأثير الكيميائي النباتي لمستخلص جذور الفجل الابيض على خاصية مضادات الميكروبات ZnO ضد Escherichia لتطبيقات التئام الجروح بشكل رئيسي تم استخدام طريقتين في تخليق الجسيمات النانوية في الطريقة الاولى تم تصنيع R-Zno NPS وفي الطريقة الثانية تم تحضير Rc-Zno NPS[14].

تم التحقيق في دراسة اخرى اجريت سنة 2015 في تأثيرات التجميد البطيء (SF) والتجميد بالغمر (IF) والتجميد بمساعدة الموجات فوق الصوتية (UAF) على الخصائص الفيزيائية والكيميائية

والمركبات المتطايرة للفجل الاحمر اظهرت النتائج انخفاضاً معنوياً في فقدان المغذيات النباتية (الأنثوسيانين (Anthocyanin) التركيب الكيميائي في الشكل رقم (3) وفيتامين C والفينولات (Phenols-C6H6O)) اظهرت انسجة الفجل بنى خلوية افضل تحت شدة الطاقة فوق الصوتية وان المظهر العطري للفجل قد تأثر ايظاً في عملية التجميد .[15]



الشكل رقم (3)يوضح التركيب الكيميائي للانثوسيانين

قامت دراسة بتحديد الكميات المطلقة mRNAs للأكوابورين (Aquaporin-AQP4) من شتلات الفجل اشارة هذه الدراسة الى ان الاكوابورينات في الجذور وخاصة مجموعة RsPIP2 قد تكون نوعاً مستجيباً للاجهاد على الاقل في مستوى البروتين[16].

لاحظت Sidra Shafiq واخرون ان نقص الماء قلل بشكل كبير من الوزن الطازج لجذور الفجل مع زيادة تراكم الكاروتينات وحمض الاسكوبيك (AsA) والمالونديالديهيد (MDA) والجليسينبيتين (GB) ومحتويات البروتينات الذائبة الكلية (TSP) الى جانب زيادة محتوى البروتينات الذائبة وانشطة انزيمات الكاتلاز (CAT) والبيروكسيداز (POD) والأوكسيد الفائق (SOD) في جذور الفجل كان وضع التطبيق الخارجي للتريهالوز فعال في تحسين الوزن الطازج للجذر ومحتويات (ASA) واجمالي توكوفيرولس وTSB بالاظافة الى انشطة SOD وCAT و POD [17]

تم اكتشاف مادة كيميائية نشطة بيولوجياً في دراسة اجريت سنة 2008 على انسجة جذر الفجل (Raphanus Sativus) باستخدام سائل امتصاص السطح بمساعدة الضغط الجوي الكيميائي وكان الانحراف المعياري النسبي النموذجي RSD للكشف عن ال Sinapine هو8.5 % وتم التحقق من صحة اكتشاف ال Sinapine من جذور الفجل باستخدام طرق HPLC-UV [18]

وفي وهناك دراسة لYoshiki Takaya واخرون تم تحديد المركبات ذات الرائحة النشطة من مستخلصات صبغة الفجل الاحمر وتم تحديدها من خلال التقييم الحسي ومقياس الطيف الكتلي اللوني للغاز وتم اختيار ثلاث سمات حسية وهي رائحة الفجل (مرغوب فيه) ورائحة الفجل الكريهة والرائحة الشبيهة بالكبريت (غير مرغوب فيها) لتمييز مستخلصات صبغة الفجل الاحمر وتم تحديد ثلاثة وثلاثين مركباً نشطاً بالرائحة مع شدة مختلفة لتكون المركبات الرائحة الرئيسية لمستخلصات صبغة الفجل الاحمر من قبل اعضاء اللجنة بشكل قاطع وتلعب ظروف استخلاص صبغة الفجل الاحمر دوراً كبيراً في خصائصه الحسية

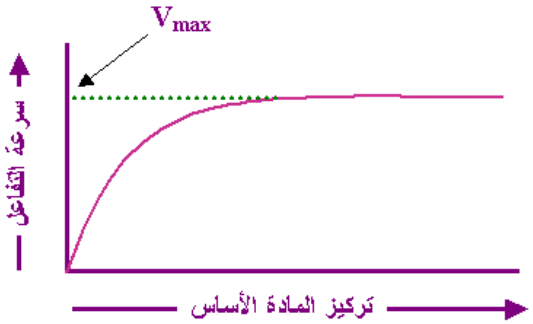
وفي دراسات عديده اثبت ان للمستخلصات النباتيه قدره على تثبيط بعض الانزيمات مثل تثبيط اليوريز بتاثير المستخلص المائي لقش الرز [62] وتثبيط انزيم الوتثبيط انزيمات المسببه لمرض السكري باستخدام المستخلصات النباتيه [63] كما اضهرت نتائج ناجحه في تثبيط الانزيم

1.2 الإنزيمات : Enzyme

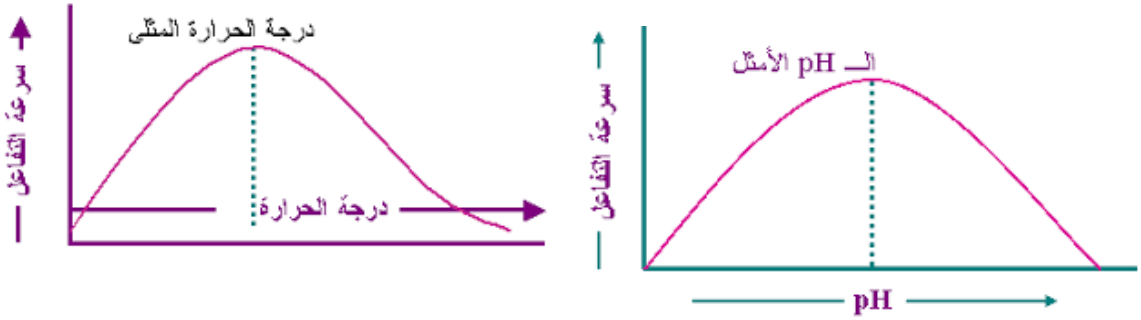
محفِّزاتٌ بيولوجية جزيئة بروتينة. تسرِّعُ التفاعلات الكيميائية. تُسمى الجزيئات التي تمارس الأنزيمات تأثيرها عليها بالركائز(pillars)، حيث يحوّل الإنزيم الركيزة إلى جزيئات تُعرف باسم النواتج. تحتاج معظم عمليات الاستقلاب (الأيض) إلى إنزيمات من أجل أن تحدث بسرعة كافية للحفاظ على الحياة[19].تحدد الإنزيمات في الخلية أي مسار استقلابي سيحدث في تلك الخلية. تُعرف دراسة الإنزيمات بالإنزيمولوجي وهناك حقل جديد فيه لتحليل "الإنزيمات الكاذبة" ينمو باستمرار، حيث يدرس هذا الحقل الإنزيمات التي فقدت قدرتها التحفيزية البيولوجية خلال التطور وهذا غالباً

يؤثر على تسلسلات الأحماض الأمينية ويعطيها خصائص تحفيزية كاذبة غير عادية[20] ، [21].إنزيم الغلوكوزيداز الذي يحوّل جزيئة سكر المالتوز إلى جزيئتي سكر غلوكوز. في الشكل يمثل اللون الأحمر الموقع النشط، بينما اللون الأسود ركيزة المالتوز بينما NAD العامل التميم باللون الأصفر.

تُعرف الإنزيمات بقدرتها على تحفيز أكثر من 5000 نوع من التفاعلات الكيميائية الحيوية[22]. معظم الإنزيمات بروتينات، ولكن بعضها جزيئات محفزة للرنا (RNA) تدعى ريبوزومات. تأتي نوعية الإنزيمات من بينتها ثلاثية الأبعاد المميزة. تزيد الإنزيمات كما كل المحفّزات سرعة التفاعل من خلال تخفيض طاقة التنشيط. تصل قدرة بعض الإنزيمات حتى جعل تحوّل الركيزة إلى المنتج أسرع بملايين المرات من التحول دون وجود الإنزيم. أحد الأمثلة هو إنزيم أورتيدين 5'-فوسفات ديكربوكسيلاز الذي يسمح بتفاعل من الممكن خلال ثوانٍ، بينما سيتطلب هذا التفاعل دون الإنزيم ملايين السنين كيميائياً[23] [24]، لا تُستهلك الإنزيمات في التفاعلات الكيميائية ولا تقوم بتغيير التوازن في التفاعلات الكيميائية، كما كل الحفّازات الكيميائية. تتميز الإنزيمات عن بقية الحفّازات الكيميائية بنوعيتها الشديدة. يمكن أن يتأثر النشاط الإنزيمي بجزيئات معينة كالمثبطات التي تقلل من النشاط الإنزيمي، أو المنشطات التي تنشط عمل الإنزيم. الكثير من الأدوية العلاجية والسموم هي مثبطات إنزيمية.

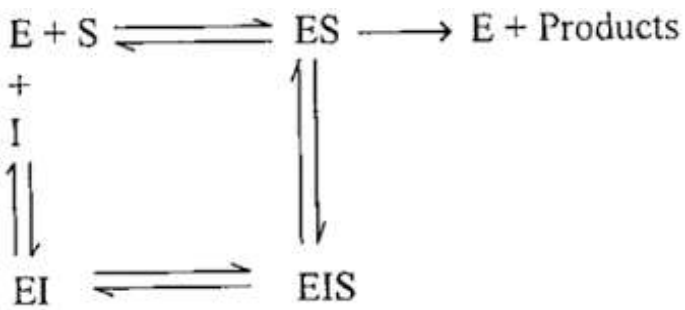


ينخفض النشاط الإنزيمي بشكل ملحوظ كذلك خارج درجة الحرارة والحموضة المثاليتين. كما في الشكلين ادناه [25]



تستخدم بعض الإنزيمات تجارياً، لتصنيع المضادات الحيوية مثلاً، حتى أن بعض المنتجات المنزلية تستخدم الإنزيمات لتسريع تفاعلات كيميائية معينة كبعض الإنزيمات الموجودة في مساحيق الغسيل الحيوية التي تحطم البروتينات أو النشا أو الدهون الموجودة الي تسبب بقع الملابس

1. 3 مثبطات الإنزيمات : Enzyme inhibitors هي جزيئات ترتبط بالإنزيمات وتقلل من نشاطها بشكل مؤقت أو دائم [26] [27] [28].ربط المثبط يمكن أن يوقف المادة الركيزة من دخول موقع الإنزيم النشط و/أو منع الإنزيم من تحفيز تفاعله. و هناك نوعين للمثبطات، اما انعكاسية أو لا انعكاسية. المثبطات اللا انعكاسية عادة تتفاعل مع الانزيم وتغييره كيميائيا (عن طريق تشكيل الروابط التساهمية). هذه المثبطات توجد لتعديل بقايا الأحماض الأمينية الرئيسية اللازمة للنشاط الأنزيمي. في المقابل، يوجد مثبطات انعكاسية التي ترتبط بروابط غير تساهمية ، وأنواع مختلفة من المثبطات تُنتج اعتمادا عما إذا كانت هذه مثبطات لربط إنزيم ما، أو مجموع الانزيم والمادة الركيزة، أو كليهما. العديد من جزيئات الدواء مثبطة للإنزيمات، لذلك فإن اكتشافها وتحسينها هو مجال نشط جدا في بحوث الكيمياء الحيوية و الصيدلة.



توضيح هذه المعادلة

وكثيرا ما يحكم على مثبط الإنزيم الطبي حسب تصنيفه (افتقاره لرابطة ببروتينات اخرى) و فاعليته (حسب ثابت التفكك الخاص به، الذي يعطي تركيزه الضروري لتثبيط الانزيم). فإذا كانت تلك الخاصتين عالية له فهذا يعني أن الدواء سيكون له آثارا جانبية قليلة، وبالتالي تكون درجة سميتة منخفضة.مثبطات الانزيم تحدث أيضا بشكل طبيعي وتشارك في تنظيم عملية الأيض . على سبيل المثال، الإنزيمات في المسار الأيضي يمكن تثبيطه بالمنتجات التي تنتج خلال سلسلة التفاعلات وتعمل على تثبيطها. هذا النوع من ردود الفعل السلبية يبطئ خط الإنتاج عندما تبدأ المنتجات في البناء وهو وسيلة هامة للحفاظ على التوازن في الخلية. مثبطات الانزيم الخلوية الأخرى هي البروتينات التي ترتبط بالانزيم وتمنع عمله. هذا يمكن أن يساعد في السيطرة على الانزيمات التي قد تكون ضارة للخلية، مثل البروتياز أو نوكليسيس. يمكن أن تستخدم مثبطات الإنزيم الطبيعية كوسيلة للحماية ضد أي جسم غريب أو مؤذي.

1.3.1 المثبط التنافسيHarmonic damper

هو عبارة عن مادة مشابهة جدا ببنيتها الكيميائية لبنية المادة الهدف (الركيزة) التي ترتبط بالانزيم مما يجعلها قابلة للارتباط بالمستقبل على الانزيم فتثبط عمله، يمكن التفوق على هذا المثبط بزيادة تركيز المادة الهدف (الركيزة). المثبطات العكسية تزيد من عملها عن طريق التفاعلات غير التساهمية مثل روابط الهيدروجين، والروابط الأيونية. روابط ضعيفة متعددة بين المثبط والموقع النشط تندمج لإنتاج روابط قوية ومحددة. على عكس المواد الركيزة والمثبطات الا عكسية، المثبطات العكسية عموما لا تخضع للتفاعلات الكيميائية عندما تكون مرتبطة بانزيم ويمكن إزالتها بسهولة مثل غسيل الكلى.[29]

1.3.2 أنواع المثبطات العكسيةReverse inhibitors :

1.3.2.1 المثبطات العكسية التنافسية، Competitive reverse inhibitors

حيث يمكن ربط المادة الركيزة والمثبط على االنزيم في نفس الوقت. هذا ينتج عادة عند وجود الفة كيميائية بين لمثبط والموقع نشط من االنزيم حيث ترتبط المادة الركيزة أيضا؛ المادة الركيزة ومثبط يتنافسان Bللوصول إلى الموقع النشط لإلنزيم. هذا النوع من تثبيط يمكن التغلب عليه عن طريق زيادة تركيز المادة الركيزة. المثبطات التنافسية غالبا ما تكون مشابهة في هيكل المادة الركيزة الحقيقية.

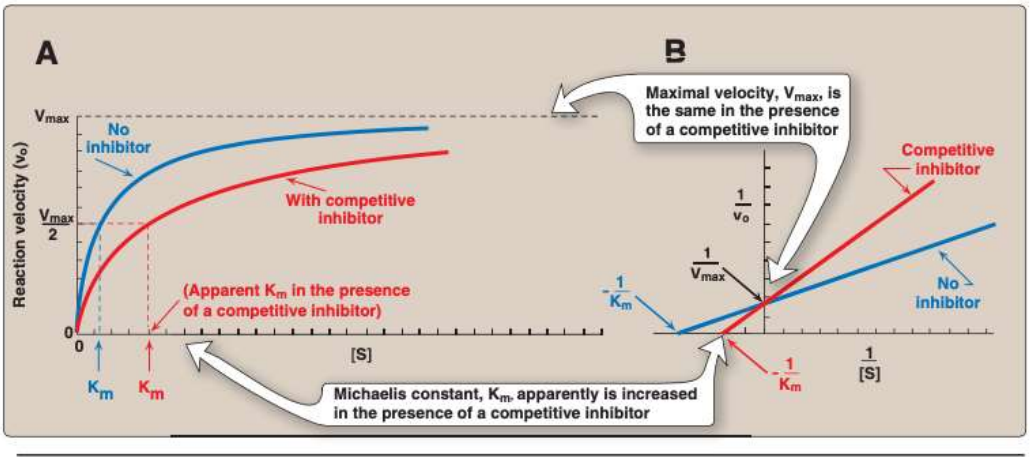


Figure 5.12
A. Effect of a competitive inhibitor on the reaction velocity (v_o) versus substrate ([S]) plot. B. Lineweaver-Burk plot of competitive inhibition of an enzyme.

1.3.2.2 لمثبطات غير تنافسيةNoncompetitive inhibitors: المثبط يرتبط فقط على مجموع جزيئات المادة الركيزة مع انزيماتها

1.3.2.3 المثبطات اللاتنافسية Uncompetitive inhibitors : ربط المثبط باإلنزيم يقلل من نشاطه ولكن ال يؤثر على ارتباطه بالمادة الركيزة. ونتيجة لذلك، فإن مدى التثبيط يعتمد فقط على تركيز المثبط.

1.3.2.4 المثبطات المختلطةVarious inhibitors: يمكن للمثبط الربط باالنزيم في نفس وقت ربط المادة الركيزة له. ومع ذلك، فإن ربط المثبط يؤثر على ربط المادة الركيزة، والعكس صحيح. هذا النوع من تثبيط يمكن تخفيضه، ال التغلب عليه، من خالل زيادة تركيز المادة الركيزة. على

الرغم من أنه من الممكن للمثبطات من هذا نوع الربط في المواقع النشطة، وهذا النوع من التثبيط عموما ينتج عن حيث المثبط على مواقع مختلفة على الإلنزيم. المثبط المرتبط بهذه المواقع ألوستيريك تتغير هيئة تشكلها بحيث تقل المادة الركيزة للموقع النشط.

الأمثلة على هذا النوع من التثبيط إنزيم سكسينات ديهيدروجينيزو Succinate dehydrogenase) enzems (هو أحد أنزيمات دورة كربس الذي يؤكسد السكسينات (Succinate)الى فيوماريت Fumarate

و يمكن لكل من المالونات و المالات و الأوكسالواسيتات أن ترتبط مع الأنزيم فتثبط أكسدة السكسينات.في حالة وجود مثبط تنافسي فإن ذلك :لا يؤثر على السرعة القصوى للإنزيم Vmaxولكنه يؤثر على Km ، فيزيد من قيمتها أي في وجود مثبط تنافسي فإننا نحتاج إلى المزيد من المادة الأساسي حتى نصل لـ2/1 Vmax

1.3.3 المثبط الغير تنافسي Noncompetitive damper

هو مثبط يرتبط موقع خاص به على الانزيم مما يسبب بتغير البنية الفراغية للمستقبل على الانزيم فلا تستطيع المادة الهدف (الركيزة) الارتباط بالمستقبل الخاص بها على الانزيم، فيُثبَّط عمل الانزيم.المثبطات الاعكسية في العادة تعادل الانزيم تساهميا، بالتالي لا يمكن للتثبيط الانعكاس. المثبطات الانعكاسية غالبا ما تحتوي على مجموعات وظيفية نشطة مثل خردل النيتروجين ، الألدهيدات، هالوالكينات، ألكينات، أو فلوروفوسفوناتس .هذه المجموعات المحبة اللالكترونات تتفاعل مع سلاسل الجانبية للأحماض الأمينية لتشكيل روابط ادوكتس التشاركيه والتساهمية. المواد المعدلة هي تلك التي تحتوي على سلاسل جانبية تحتوي على نوكلوفيلز مثل مجموعات الهيدروكسيل أو السلفهيدريل؛ وتشمل هذه الأحماض الأمينية سيرين، السيستين، ثريونين، أو التيروزين. المثبطات الانعكاسية محددة لفئة واحدة من الانزيمات ولا تعطل نشاط جميع البروتينات، حيث انها لا تعمل عن طريق تدمير بنية البروتين بل عن طريق تغيير الموقع النشط لهدفها. على سبيل المثال، الزيادة في درجة الحموضة أو درجة الحرارة عادة ما يسبب في تحطم

كل بنية البروتين، ولكن هذا التأثير غير محدد. وبالمثل، فإن بعض العلاجات الكيميائية غير المحددة تدمر بنية البروتين: على سبيل المثال، ارتفاع الحرارة في حمض الهيدروكلوريك المركز سوف يقوم بتحطيم وتكسير روابط الببتيدات مما يسبب في تكسر البروتينات، إلى ان تصبح الاحماض الامينية حرة .الغير تنافسية لا تمنع من ارتباط المادة الأساس بالأنزيم . وبالتالي الأنزيم يعطي نفس الـ Km سواء في غياب أو وجود المثبط الغير تنافسي kmالتثبيط الغير التنافسي لا يمكن التغلب عليه بزيادة تركيز المادة الأساس وبالتالي الغير تنافسية تقلل من السرعة القصوى (Vmax) للتفاعل الاختلاف الرئسي بين التنافسي والتثبيط غير التنافسي في أنه في التثبيط التنافسي ، يمنع ارتباط المثبط ارتباط الجزيء المستهدف بالموقع النشط للإنزيم ، بينما في حالة التثبيط غير التنافسي ، يقلل المثبط من نشاط الإنزيم [30].

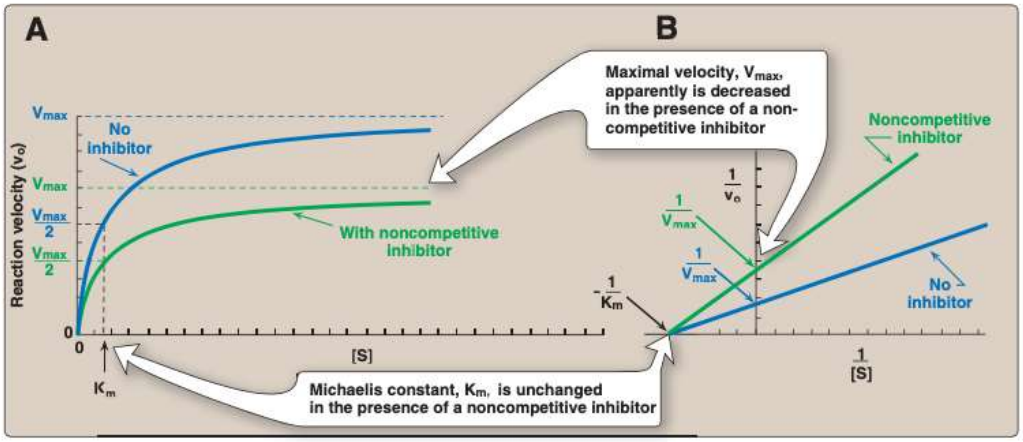


Figure 5.14
A. Effect of a noncompetitive inhibitor on the reaction velocity (v_0) versus substrate ([S]) plot. B. Lineweaver-Burk plot of noncompetitive inhibition of an enzyme.

إنزيمات البيروكسيداز أو مختزلة البيروكسيد هي مجموعة واسعة من الإنزيمات التي تدخل في عدد كبير من العمليات الحيوية التي تتضمن تفاعلات أكسدة-اختزال. سميت هذه الإنزيمات بهذا الاسم نسبة إلى مركبات البيروكسيد التي تتكسر في العملية .

ويوجل ويوجد هذا الانزيم في نبات الفجل الأحمر أجريت عدة خطوات تنقية للأنزيم المستخلص من جذور الفجل الاحمر شملت هذه الخطوات تركيز المستخلص الخام للأ نزيم بوساطة أملاح كبريتات الأمونيوم أعقبتها خطوة تبادل أيوني بالمبادل Cellulose-DEAE

ثم خطــوة ترشيــح هلامي بهلام G Sephadex-100 .و تعتبـر عمليـة الترسيب بالأملاح المتعادلة من العمليات الـضرورية فـي تنقية الأنزيمات للتخلص من البروتينات غير المرغوب فيها والمتواجدة مع الأنزيم وتقليص حجـم المـستخلص الخـام والحصول على الأنزيم بدرجة مـن النقاوة ،فهناك العديـد من الأملاح تكون فعالة في ترسيب البروتينـات وأكثرهـا استخداما كبريتات الأمونيوم بسبب ذائبيتها العالية فضلاً عن إنعدام تاثيرها علـى البروتينـات (7) فيحـدث الترسـيب بالأملاح بفعل معادلة الـشحنات المتواجـدة علـى سـطح البروتين والأخلال بطبقة الماء المحيطة بجزيئات البـروتين مما يؤدي ذلك الى أنخفاض ذائبيتها وترسبها وتسمى هـذه العملية out Salting .أسـتخدمت كبريتـات الأمونيـوم وبنسبة اشباع (30-90 %(لتركيز أنزيم البيروكسيديز فقـد حققت هذه الخطوة تنقية جزئية للأنزيم بلغـت 55.2 مـرة وبحصيلة أنزيمية مقدارها 3.78 %مـع ارتفـاع الفعاليـة النوعية لتصل (787 وحدة/ملغم بروتين) كما مبـين فـي جدول (1).

خطوات التنقية	الحجم (مللتر)	الفعالية الحجمية (وحدة/مل)	تركيز البروتين (ملغم/مل)	الفعالية النوعية (وحدة /ملغم)	الفعالية الكلية (وحدة)	عدد مرات التنقية	الحصيلة %
المستخلص الخام Crud extraction	132	109.0	0.43	253.4	14388	1	100
الترسيب بكبريتات الأمونيوم بنسبة إشباع(30-90)%	8	1409.4	1.79	787	11278	3.10	78.3
التبادل الأيوني بعمود DEAE- cellulose الغسل (Wash)	22	288.0	0.16	1800	6336	7.10	44.03
الترشيح الهلامي في عمود SephadexG-100	9	300.0	0.10	3000	2700	11.83	18.76

الجدول(1) تنقية انزيم البيروكسيديز من جذور الفجل الاحمر

أظهرت النتائج المبينة في الشكل (1) التي تم الحصول عليها من خطوة الغسل (Wash)ظهور قمة واحدة من لبروتين والفعالية الأنزيمية و بشكل متطابق تقريباً مما يدل على أن هذه الفعالية قد تركزت في أجزاء الغسل وأن الأنزيم يحمل محصلة شحنة موجبة مشابهة لشحنة المبادل الأيوني

ضمن الظروف المستخدمة قيد التجربة جعلته لايرتبط بالمبادل وقد تم الحصول بهذه الخطوة على عدد مرات تنقية 10.7 وبحصيلة أنزيمية 03.44 %مع أرتفاع في الفعالية النوعية فكانت مساوية لـ (1800 وحدة/ملغم بروتين) وكما هو موضح في الجدول (1)أما خطوة الأسترداد فقد لوحظ ظهور ثلاث قمم للبروتين بعد أستردادها بالتدرج الملحي الخطي وأن قيم الفعالية النوعية للأجزاء المستردة كانت منخفضة جدا قدرت بـ (63.1وحدة/ملغم بروتين) لذلك تم أهمالها ولم تستكمل الدراسة عليها .تلت خطوة التبادل الأيوني أمرار المحلول الأنزيمي الناتج من الخطوة السابقة على عمود الترشيح الهلامي G Sephadex-100 . قيست الأمتصاصية الضوئية على طول موجي 280 نانوميتر بعدها جمعت الأجزاء الفعالة وقدرت الفعالية النوعية لها فكانت مساوية 3000(وحدة/ملغم) بعدد مرات تنقية 83.11 مرة وبحصيلة أنزيمية76.18 %كما في جدول رقم (1) لقد ظهرت قمة البروتين للترشيح الهلامي مطابقة ت ماما لقمة الفعالية الأنزيمية (إذ تعد هذه الخطوة دليلاً على نقاوة الأنزيم ، ثم جرى ديلزة الأنزيم وتركيزه ووزع في قناني صغيرة Vail وحفظ تحت التبريد لحين تجفيده وتحويله الى صلب للحفاظ عليه اطول فترة ممكنة للمركبات البيولوجية Biological compounds :هو تعبير يصف قدرة مواد معينة على إحداث العديد من الاستجابات البيولوجية المميزة[31].

النشاط الحيوي أو النشاط البيولوجي : biological activity) هو وصف لتأثير نافع أو أثر ضائر لدواء أو عقار على كائن حي[32] ، عندما يتناول الشخص دواء يحتوي على خليط من المركبات الكيميائية، فإن الفعالية تأتي من مكون فعال أو حامل الخاصة الدوائية لكن يمكن تغييرها بمكونات أخرى. توجد مواد كيميائية كثيرة ذات خواص مختلفة ولديها نشاط حيوي أو دوائي ولها دور مهم وتستعمل استعمالات طبية. كما أن هنالك مواد كيميائية أخرى تمتلك نفس الخواص، لكن تأثيراتها الضائرة أو تأثيراتها السمية تمنع استعمالها في الطب. من الناحية العامة، فإن النشاط الحيوي يعتمد على الجرعة، وهذا يعني أن التأثير يتراوح من التاثير المفيد إلى الضرر اعتمادا على الجرعة من

الجرعة الأدنى إلى الأعلى، وهذا ما يمكن التعبير عنه في علم الأدوية بمعطيات إيه دي إم إي. لا يكفي للدواء أن يكون له تأثيرا حيويا على هدف معين، بل

يجب أن تكون له خواص إي (وهي امتصاص وتوزيع واستقلاب وإخراج)[33].

1.4 ليباز ٌ بَنْكِرياسيَّة بالإنجليزية Pancreatic lipase : ويعرف أيضًا باسم **الدهون الثلاثية لليباز البنكرياس**بالإنجليزية pancreatic triacylglycerol lipase : ، ويفرزمن البنكرياس، هو مركب من الانزيمات

التالية: ليباز(Lipase) ، اميلاز (Amylase) وبروتياز (Protease)

التي تحلل الدهون، النشا ((Starchوالبروتينات (على التوالي). يتم إنتاج هذه الانزيمات في البنكرياس، وتساعد إضافتها - في الحالات التي يكون افرازها غير كاف - على تحليل الطعام.

الوظيفة\ يتم عمل الليباز البنكرياسية في الجهاز الهضمي (لا يتم امتصاصه) ويتعلق بدرجة الحموضة (pH) في المعدة، بشكل فردي. تحتوي عدة مستحضرات على كرات مكروية (Microspheres) مع تغليف معوي لمنع المحايدة (Neutralization) التي تمر بها الانزيمات في البيئة الحامضية للمعدة، وبذلك ستم نقل كمية أكبر من الانزيمات إلى الإثني عشر (Duodenum)، وهناك يتم تشغيلها في بيئة قاعدية. الدهون الثلاثية + 2 \\ H 2 O 2 + rightleftharpoons 2-monoacylglycerol الأنيونات الأحماض الدهنية .

1.4.2 ميكانيكيات عمل المركبات الفعالة بيولوجيا على تثبيط انزيمات الليبز

1.4.3 ليباز أو اليباسيس (بالإنجليزية: Lipase) هو انزيم يحفز انهيار أو تحلل الدهون[34]. يباسيس هي فئة فرعية من الاسترات . ينتجه البنكرياس ويختلط بالغذاء في الإثنا عشر.GPL). اليباز يقوم بأداء أدوار أساسية في عملية الهضم والنقل ومعالجة الدهون الغذائية (مثل الدهون الثلاثية، الدهون، الزيوت) في معظم الكائنات الحية. وجينات ترميز اليباز، موجودة في بعض الفيروسات أيضا .[35] [36] ويعتبر الليباز إنزيمات من نوع الإستراز التي تحلمه الجليسريدات إلى أحماض دهنية وجليسرول، أو أسترات عضوية أخرى إلى الكحول .

1.4.5الموقع

انزيم الليباز ينتج في البنكرياس وغدد الأمعاء الدقيقةو لا توجد الليباز فقط في الإفراز الخارجي للمعثكلة، ولكنها موزعة بكثرة في خلايا حيوانية مختلفة، حيث تحرر أحماضا دهنية للتنفس من جليسردات مخزنة، ويوجد الليباز بكثرة في الأحياء الدقيقة والنباتات.

1.4.6 الوظيفة

يقوم هذا الانزيم بتحلل الدهون من الغذاء إلى غليسيرول (Glycerol) والحموض الدهنية (Fatty acids) في عملية الهضم. يؤدي العوز بهذا الانزيم إلى انتقال الدهون الغير مهضومة في الامعاء، ولغائط دهني.

1.4.7 الليبازات البشرية

والليباز الرئيسي للإنسان والذي يكون في الجهاز الهضمي يسمى الليباز البنكرياس والبنكرياس والذي هو ذات الصلة ب 2 (PLRP2)، والتي يفرزها البنكرياس . البشر لديهم أيضا العديد من الأنزيمات الأخرى ذات الصلة، بما في ذلك الليباز الكبدي هتش (HL)، و ليباز البطانة ، و ليباز البروتين الدهني . ليس كل من هذه يباسيس تعمل في القناة الهضمية (انظر الجدول).

الاسم	الجين	الموقع	الوصف	الاضطرابات
الملح الصفراوية تعتمد الليباز	؟	البنكرياس، حليب الثدي	يساعد في هضم الدهون	
بنكرياس الليباز	PNLIP	عصارة هضمية	من أجل عرض الأمثل انزيم النشاط في التجويف القناة الهضمية، يتطلب HPL بروتين آخر، colipase، الذي يفرز أيضا من البنكرياس[37].	

ليباز الليزوزومية	LIPA	المساحة الداخلية من عضية : يح لول	كما يشار إلى الليزوزومية حمض الليباز LAL) أو (LIPA أو حامض الكوليسترول استر هيدرولاز	الكوليسترول استر مرض تخزين و (CESD) مرض ولمان على حد سوا التي تسببها طفرات في جين ترميز الليباز الليزوزومية.[38]
ليباز كبدي	LIPC	البطانة	كبدي الليباز الأفعال على ما تبقى من الدهون التي تقوم على البروتينات الدهنية في الدم لتجديد) LDL البروتين الدهني منخفض الكثافة(	
ليباز البروتين الشحمي	LPL أو "LIPD "	البطانة	الليباز البروتين الدهني ظائف في الدم للعمل على triacylglycerolsالتي تقوم على) VLDL منخفض جدا كثافة البروتين الدهني) بحيث الخلايا يمكن أن يستغرق فترة تصل المحررة الأحماض الدهنية	نقص الليباز البروتين الدهني ينجم عن طفرات في الجين الترميز ليباز البروتين الشحمي .[39 40]
هرمون الليباز الحساس	LIPE	داخل الخلايا		
ليباز المعدة	LIPF	عصارة هضمية	وظائف في الرضع في درجة الحموضة شبه محايد للمساعدة في هضم الدهون	

ليباز البطانة	LIPG	البطانة		
بروتين بنكرياس الليباز ذات الصلة 2	PNLIPRP2 أو "PLRP2"	عصارة هضمية		
بروتين بنكرياس الليباز ذات الصلة1	PNLIPRP1 أو "PLRP1"	عصارة هضمية	بروتين بنكرياس الليباز ذات الصلة1 هي مشابهة جدا ل) PLRP2وربما نشأت عن الجينات الثلاثة عبر الازدواجية الجينات من البنكرياس سلفي واحد الليباز الجينات). ومع ذلك، فان PLRP1 يخلو من نشاط الليباز وتبقى وظيفته غير معروفة، على الرغم من أنه يتم حفظه في عدد من الثدييات [41]. [42]	
ليباز اللسان	؟	عصارة هضمية	نشط في مستويات الحموضة في المعدة pH .المثالية هي حوالي Screted 6-3.5 .من قبل النكفية والغدد إيبنر في الجزء الخلفي من اللسان.	

في هذا الفحص يتم قياس مستوى أنزيم الليباز (LIPASE) في الدم، وهو أنزيم يتم إنتاجه في البنكرياس يُساعد على هضم الدهون في الأمعاء الدقيقة، وعندما تتضرر أنسجة البنكرياس عند الإصابة في التهاب البنكرياس يرتفع مستوى الأنزيم ويبقى مستوى الليباز مرتفعًا حوالي 10 - 14 يومًا بعد ظهور الالتهاب.

1.4.8 ما هيَ فوائد إنزيم الليباز؟

1- هضم الدهون

عند تناول الأطعمة الغنيّة بالدهون فإن الدهون تبقى غير مهضومة حتى تصل إلى المعدة والأمعاء الدقيقة، حينها يُفرز الجسم إنزيم الليباز من البنكرياس الذي بدوره يهضم الدهون، و بمساعدة العُصارة الصفراوية التي تنتجها المرارة فإنها تساعد على تجزئة الدهون إلى أجزاء أصغر تسمى بالأحماض الدهنية والجليسرول؛ وهيَ مواد بمقدورها العبور عبر جدران الأمعاء والانتقال عبر مجرى الدم إلى باقي أجزاء الجسم[43].

لذا فإن الأشخاص الذين يتناولون وجبات قليلة الدهون قد نلاحظ لديهم تراكم العصارة الصفراوية بسبب عدم وجود دهون لتعمل على تجزئتها، كما يجب التنويه بأنّ الأشخاص الذين تم استئصال المرارة لديهم ينُصحوا بتناول الليبيز كدواء متوافر في الصيدليات.[44]

2- نقل الكوليسترول

إلى جانب الوظيفة الأساسية لإنزيم الليباز وهي تحطيم الدهون، فإن له دور مهم في نقل الكوليسترول عبر مجرى الدم بوساطة إنزيم خاص يُسمى ب (LCAT - lecithin cholesterol acyltransferase)، وهو إنزيم يرتبط بالكوليسترول الضار(LDL) والكولسترول النافع (HDL) ويقوم بنقلهم عبر مجرى الدم إلى باقي أجزاء الجسم.[45]

3- تكسير الخلايا الدهنية التي تعيق عمل الخلايا العصبية.

ومن أهم فوائد الليباز المتوافر على شكل دواء في الصيدليات:اضطرابات الجهاز الهضمي الناجمة عن اضطرابات البنكرياس.عُسر الهضم.مرض كرون.حرقة المعدة.حساسية الغلوتين خاصة في منتجات القمح.[46]

مثبطات اللايبيز هي المواد المستخدمة للحد من نشاط بروتينات اللايبيز الموجودة في الأمعاء. يفرز البنكرياس اللايبيز عند وجود الدهون . الدور الأساسي لمثبطات اللايبيزهو تقليل امتصاص الدهون المعدية المعوية. ثم تميل الدهون إلى الإفراز في البراز بدلاً من امتصاصها لاستخدامها كمصدر للطاقة الحرارية، وهذا يمكن أن يؤدي إلى فقدان الوزن لدى الأفراد. يمكن استخدام هذه المثبطات لعلاج السمنة، مما قد يؤدي لاحقًا إلى الإصابة بالسكري من النوع الثاني وأمراض القلب والأوعية الدموية إذا لم تتم إدارتها. مثال على مثبط للايبيزهو أورليستات .r [47] آلية العمل قد تؤثر مثبطات اللايبيزعلى كمية الدهون التي يتم امتصاصها، إلا أنها لا تمنع امتصاص نوع معين من الدهون. وبالمثل، لا يتم امتصاص مثبطات اللايبيز في مجرى الدم. ترتبط مثبطات اللايبيز بإنزيمات الليباز في الأمعاء،[48] وبالتالي تمنع التحلل المائي للدهون الثلاثية من الدهون إلى أحادي الجلسريد والأحماض الدهنية.[49] هذا يقلل من امتصاص الدهون الغذائية. مثبطات اللايبيز ترتبط برابطه تساهمية في موقع سيرين نشط على اللايبيز. هذه الرابطة التساهمية قوية، مما يعني أن مثبط اللايبيز يميل إلى البقاء مرتبطًا باللايبيز.[50] وقد أظهرت الدراسات أن مثبطات اللايبيز تعمل على النحو الأمثل عندما يتم الحصول على 40% من السعرات الحرارية اليومية للفرد من الدهون. (توضيح) أورليستات يميل إلى منع امتصاص 30% من إجمالي استهلاك الدهون من الوجبة، كما يمر أورليستات من الجهاز الهضمي أسرع من الدهون.يمكن العثور على مثبطات اللايبيز بشكل طبيعي في النباتات ويمكن أيضًا إنتاجها كمركبات دوائية. تم إيجاد بعض مثبطات اللايبيز في جينسنغ باناكس.[51]

يحتوي الفجل على المعادن ، السكريات ، ، والقلويدات ، والمركبات النيتروجينية ، وكذلك مجموعة كبيرة ومتنوعة من المواد الكيميائية النباتية ، وهي الجلوكوزينات (GLs) والفينولات [52] الجلوكوزينات الأولية في الفجل عبارة عن جلوكورافاساتين والجلوكورافينين هذه المركبات ليس لديها أي أنشطة بيولوجية مباشرة ، ولكن مشتقاتها- Atives ، أي إيزوثيوسيانات (ITCs) ، رافاساتين (4-ميثيل Thio-3-butenyl ITC) و (4-methyl sulfin Yl-3--sulforaphene butenyl ITC) قد يكون لها فوائد صحية محتملة. Raphasatin [53] هو أحد مضادات الأكسدة وهو محفز قوي[54] [55]. ، السلفورافين يحتوي على مضادات الاكسدة ومضادة للفيروسات ،جلوكورافاساتين وجلوكورافينين في جذور الفجل الخام يتم تحويلها إلى رافاساتين وسلفورافين في الماء عن طريق إنزيم myrosinase السلفورافين [56] قابل للذوبان بشكل طفيف في الماء ، وبالتالي فهو قابل للذوبان أنتجت واستقرت أثناء التحلل المائي للإشعاعشيس في وسط مائي. ومع ذلك ، فإن الرافاساتين هي- رهاب الكحول ، غير مستقر للغاية في بيئة مائية ، ويتغير تلقائيًا إلى مركبات أقل نشاطًا أثناء التحلل المائي للفجل في الماء لذلك ، هناك حاجة لتحسين المعالجة طريقة لتعظيم التكوين وتقليل تحلل الرافاستاتين والسلفورافين بواسطة إن-إنزيم الفجل الدقان [57] ، فإن دراسة منهجية التحلل الأنزيمي العنيد مع الفجل تحت المتغيرات لم يتم الإبلاغ عن حالات انحلال الإنزيم.

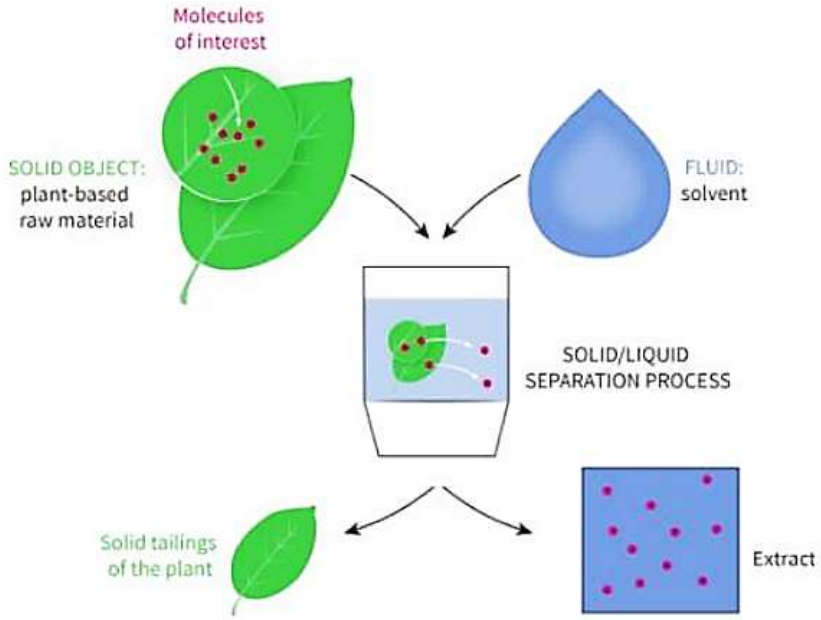
1.5 طرائق الاستخلاص العامة

الاستخلاص Extraction :هو معالجة النسج النباتية بمحل مناسب، يتم من خلاله حل المكونات الفعالة . بينما تبقى معظم المواد الخاملة المتبقية غير منحلة.

1.5.1 المستخلص بالتوزع بين سائل وصلب:

1.5.1.1..التعطين.Macera :

يُوضع العقار في وعاء ثم يُضاف المحل ويُغلق الوعاء بشكل محكم، ويترك بدرجة حرارة الغرفة فترة زمنية قد تصل إلى (10-20 يوم وسطياً أسبوع). نقوم خلال هذه المدة بتحريك الوعاء عدة مرات . يمكن تكرار هذه العملية من أجل زيادة المردود . بعدها نقوم بعملية ترشيح من أجل فصل العقار عن سائل المستخلص الحاوي على المواد الفعالة الت يم استخلاصها. كما في الشكل رقم (1)



شكل رقم 1 عملية التعطين

-

1.5.1.2.النقع : Infusion

تشبه طريقة التعطين لكنها تتم بوقت أقصر (حوالي نصف ساعة) وباستخدام سائل استخلاص مناسب . يمكن في هذه الطريقة أن يكون سائل الاستخلاص بارد اً أو حارا .

1.5.1.3.الطهى Decoction

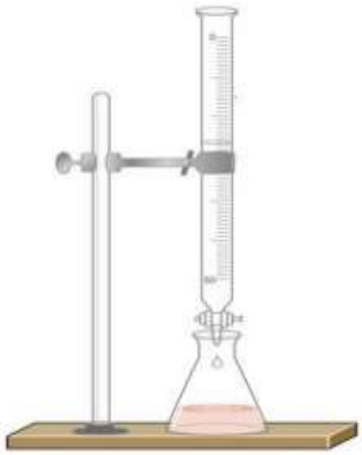
يغطى العقار في حجم محدد من سائل الاستخلاص ولمدة معينة . [58]

1.5.2..الاستخلاص تحت مبرد صاعد:

يهدف استخدام المبرد الصاعد في عمليات الاستخلاص إلى الحفاظ على كمية السائل المستخدم خاصة الطيار منها .

1.5.2.1.التزحيل Percolation :

هو عملية استخلاص مستمرة بسائل متجدد وبدرجة حرارة الغرفة. يُوضع مسحوق العقار داخل عمود التزحيل المزحلة (Percolator) ويُضاف فوقه سائل الاستخلاص . يُفتح الصنبور وننتظر حتى خروج أول قطرة من سائل الاستخلاص ، ثم يغلق مّرة أخرى بعد التأكد من تبليل كامل مسحوق العقار. ترك لمدة 12 ساعة، ثم يُفتح الصنبور ويُترك السائل ليخرج ببطء (قطرة فقطرة) ليخرج بشكل كامل . يُعاد تعبئة كمية جديدة من سائل الاستخلاص ، ونكرر العلمية السابقة عدة مرات . نستمر بتكرار العملية حتى التأكد التام من أننا استخلصنا كامل كمية المادة الفعالة (وذلك بالتحري بواسطة تقنية الـ TLC) كما في الشكل رقم (2)



شكل رقم 2 جهاز التزحيل

1.5.3..الاستخلاص بجهاز سوكسليه Soxhlet :

هي عملية استخلاص مستمرة ولكنها تتم بدرجة حرارة مرتفعة وباستخدام جهاز خاص (طريقةُ مطّورة عن التزحيل) كما

شكل رقم 3 جهاز Soxhlet

1.5.4.الاستخلاص بالغازات السائلة :

C 3.13 o يمكن استخلاص المواد الدسمة من العقار باستخدام غاز CO2 وبدرجة حرارة وضغط يزيد عن 73 بار. عند رفع الضغط إلى 200 بار فإن الغاز يتحول إلى سائل والذي يستخدم استخلاص هذه المواد الدسمة. السائل إلى الحالة الغازية تاركاً ثم وبإعادة الضغط إلى الضغط النظامي يعود CO2 المواد الدسمة التي تم استخلاصها.

1.5.5.استخلاص الزيوت العطرية:

يتم استخلاص الزيوت العطرية بطريقتين:

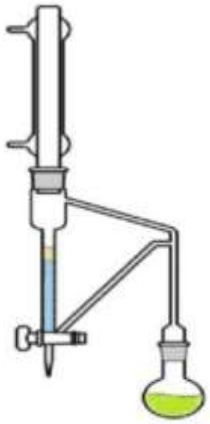
1.5.5.1.التقطير ببخار الماء:

يتم فيها وضع العقار ضمن الماء ورفع درجة الحرارة إلى درجة غليان الماء، حيث يقوم بخار الماء الناتج بحمل الزيت العطري. وبالمرور ضمن المبرد الصاعد يتكاثف بخار الماء الحامل

للزيت العطري، ثم ينفصلان حسب اختلاف الكثافة بينهما. (تستخدم لاستخلاص الزيوت العطرية من العقاقير المتحمل لدرجات الحرارة المرتفعة) .

1.5.5.2.الجرف ببخار الماء:

اختلاف موضع العقار الذي يكون بعيداً تتم بنفس الطريقة مع عن مصدر الحرارة.(تستخدم لاستخلاص الزيوت العطرية من العقاقير الحساسة لدرجات الحرارة المرتفعة). كما في الشكل رقم (4) [60]



شكل رقم 4 جهاز بخار الماء

1.5.6الاستخلاص بالتوزع بين سائلين:

نستخدم هذه الطريقة عند وجود المادة المراد استخلاصها في طور سائل. تتم في حبابة الابانة (قمع الفصل).

شروطها :

- أن يكون السائلين غير مزوجين (مختلفين بالكثافة)، وبالتالي إمكانية حدوث توزع للمادة بينهما.
- أن يكون السائلين مختلفين بالقطبية من أجل إمكانية استخلاص المادة المطلوبة.

1.6.تكثيف الخالصات:

يتم باستخدام جهاز المبخّر الدّوار، والذي يعمل تحت ضغط منخفض.

1.6.1.الضغط المنخفض: يسهل طرد سائل الاستخلاص إضافة إلى تخفيف درجة الحرارة اللازمة للتبخير وبالتالي يقلل تخرب المواد المستخلصة. كما في الشكل رقم (5) [61]

شكل رقم 5 جهاز المبخر الدوار

الجزء الثاني

2.1.طريقة العمل

2.2. المواد المستخدمة

1.جهاز مطيافspectrometer

2. جهاز السكسليت sexlite device

3.جهاز التقطير

4.جهاز الحمام المائي

5. جهاز الحلضنة الكهربائي

6.نبات فجل الفجل من السوق

7.kit lipase enzyme من شركة AGGappE

8. الاثيل استيت Ethyl acetate

9.الايثانولethanol

10.زجاجيات ومواد أخرى

2.3 الاستخلاص

تم شراء kg2 من الفجل الاحمر(red Radish) من اسواق مدينة هيت وثم اخذ الجذور بمقدار kg1 وتقطيعها قطع صغيره بالسكين(knife)وبعد ذلك تم وضعها بآلة الخلاط المنزلي(home bleder) وتم خلطها حتى اصبح خليط متجانس وبعد ذلك تم وضع الخليط في اناء مفتوح مقاوم لدرجة الحرارة في الفرن(oven) بدرجة حراره C60° لمدة 8 ساعات مع مراقبة الخليط كل نص ساعه حتى جف من الماء تماما

بعدها تم وضع الفجل المجفف في الهاون اليدوي(manual mortar) وتم طحنه الى ان تم الحصول على دقائق مطحونه بعد ذلك أُخذ من الفجل المطحون (الباودر) g50 تم وزنه بميزان المختبر الإلكتروني ووضعت كمية الفجل المطحون (الباودر) في قارورة(flask) حجم ml100

(توضع الصوره طريقة طحن نبات الفجل المجفف)

وتم اضافة اثيل استيد C2H5OOCCH3 وبعد اضافة الاثيل استيد تم رج المحلول بوضع االقارورة بشكل عامودي وتحريكها بشكل دائري لمدة ربع ساعه وبعدها ترك المحلول للنقع لمدة 24 ساعة وثم وضع على جهاز سكسوليت (Soxhlet extractor) بدرجة C77° لمدة 3 ساعات بعدها تم

ترشيح المحلول بورق الترشيح ومن ثم تم تقطيره بجهاز التقطير بدرجة 77 °C لمدة نصف ساعة وبعد ذلك تم الحصول على 97ml على شكل زيت من مستخلص الفجل

2.3.1.كيفية قياس فعالية الانزيم enzyme assay :

تم اجراء فحص انزيم الايبيز lipase enzyme المحضر صناعياً من شركة AGAPPE الذي يحتوي طريقة عمل المثبته كالاتي:

طريقة عمل اللاييبيز

تحتوي علبة محاليل انزيم اللاييبيز على محلول R1و R2 ومحلول الانزيم كما في الجدول

Reagent/component	Product Code:5147001	Description
Lipase(S.L) R1	2 x 10 mL	Goods puffer pH(pH8.0) 40mmol/L Taurodeoxycholate 3.4mmol/L Deoxycholate 5.6mmol/L Calcium chloride 12mmol/L Colipase 1.7mg/dL
Lipase(S.L) R2	1 x 5 mL	Tartrate Buffer (pH 4.0) 1.5 mmol / L Taurodeoxycholate 3.4 mmol / L Color substrate 0.13 mmol / L
Lipase Calibrator	1 x 3 mL	Calibrator concentration is stated on the vial . label

اخذ uL500 من R1 وS12 من R2واضافة uL10 من كل تركيز محضر من انزيم اللايبيز ثم تم حضنه بال incubator لمدة دقيقتين بدرجة C37 وبعدها يتم إخراجها من الحاضنه وبعد ذلك يخرج ويضاف uL500 من الانزيم وحضنه لمدة دقيقتين بدرجة حراره C37 واخراجه واضافة uL125

2.3.2.التثبيط:

يتم إضافة uL10 من كل محلول محضر في الجدول لتراكيز مختلفه من المثبط (المستخلص) بعد قراءة الامتصاصية الانزيم بدقيقة واحدهثم يمزج المحلول والمثبط واخذت القراءة الثانية بعد دقيقة واحدة ايضاً حيث لوحظ انخفاض من قيمة الامتصاصية(O.D(opticl density

2.3.4 الحسابات:

تحضير تراكيز عالية من اللايبيز

u/l	Lipase in 30 µL	dw
30	30	0
28	28	2
26	26	4
24	24	6
22	22	8
20	20	10
18	18	12
16	16	14
14	14	16
12	12	18
10	10	20
	220	190-

%in 10 µL	Final in 635 µL
0	0
%10	0.0016
%20	0.0032
%30	0.0048
%40	0.0064
%50	0.008
%60	0.0096
%70	0.0112
%80	0.0128
%90	0.0144
%100	0.016

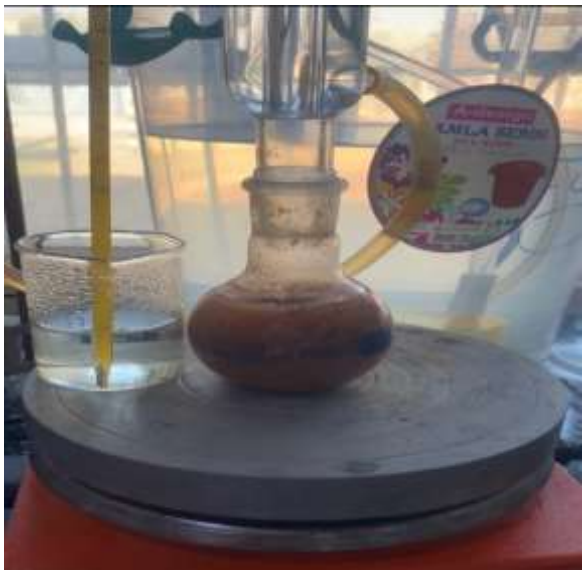
%	volume to get % in30 µL	solven 20% DMSOt
0	0	20
10	2	18
20	4	16
30	6	14
40	8	12
50	10	10
60	12	8
70	14	6
80	16	4
90	18	2
100	20	0
	110	80-

الجزء الثالث

3.1.النتائج والمناقشة:

3.1.1. الاستخلاص

تم في هذا البحث استخلاص نباة الفجل حيث تم اخذ 50 غم من النبات واستخلاصه في جهاز السكسليت كما موضح في الشكل باستخدام مذيب الاثل استيت)



(جهاز السكسليت)

وبعدها تم ترشيح المستخلص بورقة الترشيح كما موضح في الشكل ادناه

(صورة توضح ترشيح المستخلص بورقة الترشيح)

ثم تم تقطير المستخلص للحصول على 3 مل Grode الخام لنبات الفجل كما في الشكل

تقطير المستخلص

تم حساب راشح المستخلص من 50 غم الى 3 مل زيت خام

3.1.2. الذوبانية

تم اذابة المستخلص بالمحاليل ادناه وأعطى النتائج التاليه:

1.الماء (غير ذائب)

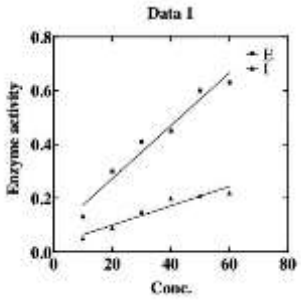
2.الايثانول مركز ومخفف (لايذوب)

3. 25٪ DMSO (يذوب)

4. 10٪ DMSO (سخيخ الذوبان)

3.1.3. دراسة فعالية المستخلص كمثبط لانزيم اللايبيز

تم دراسة الفعاليه بمختلف التراكيز حيث أظهرت النتائج تثبيط وأوضح انه تثبيط غير تناسقي كما المخطط ادناه



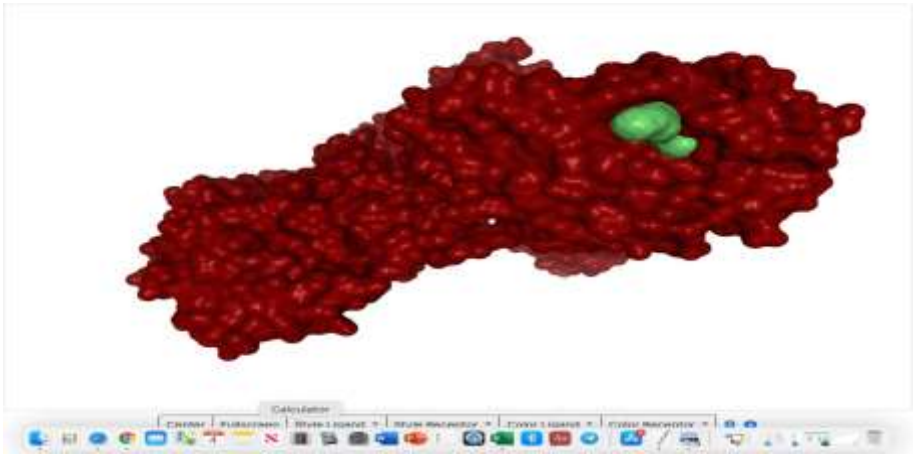
(الشكل يوضح فعالية المستخلص الخام على تثبيط انزيم اللايبيز)

كما تم احتساب Vmax والKm وذلك فقط لمعرفة فيما اذا كان للمستخلص تثبيط او لا

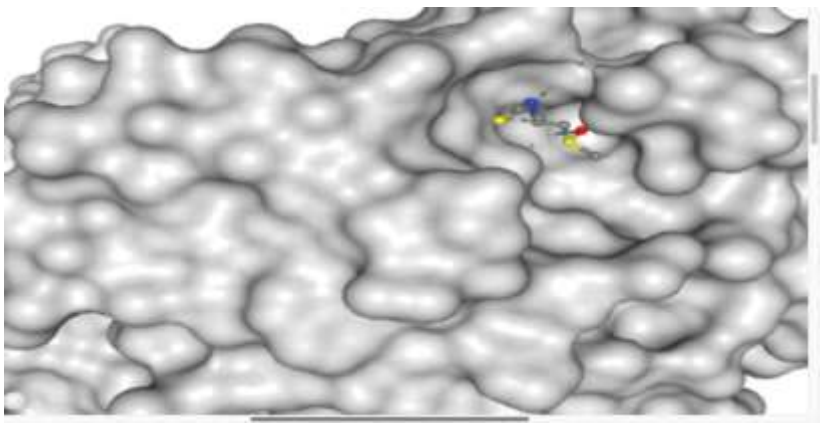
3.1.4. دراسه فيزيوحياتيه : لتحديد باستخدام ال Docking لتحديد احد مكونات مستخلص الفجل على انزيم اللايبيز lipez enzyme

تم في هذا البحث دراسه حاسوباتية حيث اضهرت النتائج الحاسوبيه مكان ارتباط المركب الفعال من نبات الفجل في انزيم اللايبيز

اظهرت النتائج مكان ارتباط السولفورافرين sulforaphrane في انزيم الايبيز حسب ما موجود في الشكل ادناه

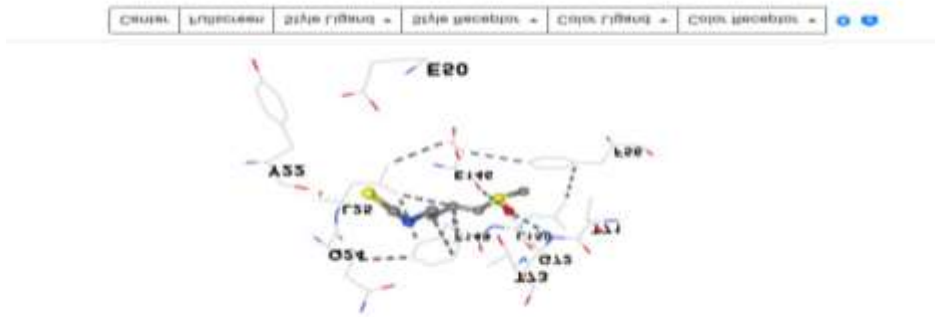


(يوضح مكان ارتباط السولفورافين بالانزيم)



(يبين شكل الانزيم الايبيز في توزيع الهايدروفوبستي)

وأوضحت الطاقة الحرة ارقام سالبة تدل على ان الـDocking كان تفاعل كيميائي عند التوازن



CB-Dock

Cavity-detection guided Blind Docking

Home Dock Results Manual Contact Register Login

Select a result to display(Only retain the latest running)

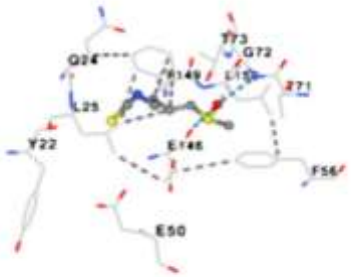
20210704135237 : PubChem_compound_test_Sulforaphene_records -- 2oxe Delete

Binding Modes Download all

Vina score	Cavity size	Center			Size		
		x	y	z	x	y	z
-3.5	1350	5	11	29	20	20	20
-3.5	357	25	-26	53	20	20	20
-3.2	567	15	0	35	20	20	20
-3.2	384	39	6	26	20	20	20
-3.2	322	11	34	18	20	20	20

الكيميائي وهذا يدل على ان المركب يرتبط ويمكن ان يصنع ك عقار لتثبيط انزيم اللايبيز

واوضح الشكل ادناه مركب السولفورفرين sulforuphrane وهو الليگند ارتباط الاخماض الامينية Glutamine Q24 و Leucine L25 و Tryptophan y22 و aspartic acid E146 E50 و Phenylalanine F149 و Tyrosine T71 T73 و Glycine G72 و Leucine L150 مواقع ارتباط الليگند السولفورافرين المركب تحت الدراسه المعتقد استخدامه كدواء لانزيم الايبيز بمواقع الارتباط



3.2 مناقشة النتائج:-

كما أوضحت الدراسة الحاليه يأتي المستخلص غير ذائب في الماء (ذائب في المذيب العضوي) كما مع الترتباط بانزيم اللايبيز من موقع او اكثر ليثبط فعالية وبما ان التثبيط غير تنافسي لذلك فان اثباط المركبات الفعاليه بيولوجيا في المستخلص يتوقع ارتباطها . المثبط ومادة الأساس وهي الدهون ليس من مواقع مختلفه على الانزيم لذلك فانا نقترح دراسه انزيمية مستفيظه على المركب وأخرى على الفحل لمعرفة أيها اكثر تثبيطا لتستخدم فيما بعد ادويه لتخفيف السمنه حيث ان انزيم اللايبيز اذا لم يتم تحطيم الدهون فيه فان الدهون سوف تخرج من غير ان تمتص في الأمعاء . تم تسليط النقاط مقابل التركيزللانزيم اولاً وللمثبط ثانيا ظهرت بشكل خط مستقيم لكل واحد منها ثم بعد ذلك تم حساب Km وال Vmax للمثبط والانزيم

وتم في هذا البحث دراسة ارتباط احد مكونات الفجل وهو السلفورافين (sulforaphane) مع انزيم اللايبيز البنكرياسي عند الانسان وكانت الدراسه حاسوباتيه تخيلية باستخدام موقع CB/dock حيث تم اجراء اختبار ارتباط الليگند وهو السلفورافين مع اللايبيز واظهرت الدراسة نتائج جيدة كما اظهرت النتائج مكان ارتباط السولفورافرين sulforaphrane في انزيم الايبيز

3.3 الخاتمة

في نهاية هذا البحث تم التعرف على كيفية استخلاص نبات الفجل وكيف ان للمركبات الفعاله التي يحتويها نبات الفجل قابلية على تثبيط انزيم اللايبيز ، وتم استخلاص نباة الفحل وذلك بنقع50 غرام من الفجل المجفف في 100مل من اثل استيت وبعدها تم وضعه في جهاز السكسليت لمدة 24 ساعه ومن ثم تم ترشيحها وتقطيرها حتى تم الحصول على مستخلص الفجل على شكل زيت الحاوي على المركبات الفعاله ، ويبين هذا البحث كيف ان للمستخلص فعاليه على تثبيط انزيم الايبيز حيث اعطى نتائج ايجابيه على عدة عينات تم تجهيزها في المختبر

ولكن لم نتمكن من تحديد نوع المركب الفعال المسؤول عن تثبيط انزيم اللايبيز حيث ان نبات الفجل يحتوي على عديد من المركبات الفعاله وذلك بسبب عدم توفر الجهاز الخاص لفصل المركبات في المختبر

وتم في هذا البحث دراسة ارتباط احد مكونات الفجل وهو السلفورافين (sulforaphane)مع انزيم اللايبيز البنكرياسي عند الانسان وكانت الدراسه حاسوباتيه تخيلية باستخدام موقع CB/dockحيث تم اجراء اختبار ارتباط الليگند وهو السلفورافين مع اللايبيز واظهرت الدراسة نتائج جيدة

3.4 المصادر

[1]Nidhal Abdulhdi Jaafar,abduljbar S Ahmed,Dhulfiqar L AL-Sandooq , 2020

[2] Abdel wahab M Mahmoud,Suzy M Abderziz,Mohamed M El Moqy,Emad Abdelhameed, 2019

[3] Yan Wang,Yan pan,Zhe Liu, Xianwen Zhu,Lulu Zhai,Liang Xu R uqanq Yu,Yiqin Gonq, 2013

[4] E Enkhtuya,M Tsend, 2020

[5] Tannay Kumar Koley,Zareen Khan,Dasharath Oulkar,BK Sinqh,Arti Maurva,B Sinqh , 2020

[6] Ivica Blazevic,Josip Mastelic,2009

[7] Matthew S Krause,Laurence V Madden,Harry AJ Hoitink,2001

[8] Paul R Hanlon,David M Barnes,2011

[9] Yoshiki Takaya,Yoshihito Kondo,Tadashi Surukawa,Masatake Niwa,2003

[10] Masakazu Hara,Hideo Eto,Toru Kuboi,2001

[11] Sun-Hyung Lim,Ji-Hye Song,Da-Hye Kim,Jae Kwanq Kim,Jonq-Yeol Lee,Younq-Mi Kim,2016

[12] Yan wang,Liaug Xu,Hong Sheh,Juanjuan Wanq,Xei Liu,Xianwen Zhu,Ronghua Wanq,2015

[13] Saman A Rasul,Kawa A Ali,

[14] ABV Kiran Kumar,Edugulla Sre Saila,Prachi Naranq,Mallelakari Aishwarya,Rebha Raina, 2019

[15] Bai-Gui Xu,Min Zhang,Bhesh Bhandari,Xin-Feng,Md Nahidul Islam, 2015

[16] Sidra Shafiq,Nudrat Aisha Akram,Muhammad Ashraf,2015

[17] Rajeev Gopal,Aqeel Hasan Rizvi,2018

[18] Peter Schopfer,Claudia Plachy,Gitta Frahry,2001

[19] y5 الطبعة) th). San Francisco: W.H. Freeman. 2002. ISBN 0-7167-4955-6.2020 ديسمبر 25 مؤرشف من الأصل في .

[20]. Murphy JM, Farhan H and Eyers PA (2017) Bio-Zombie: the rise of pseudoenzymes in biology.Biochem Soc Trans. 45:537-544

[21] A robust methodology to subclassify pseudokinases based on their nucleotide-binding properties". Biochemical Journal. 457 (2): 323–334. 2014. doi:10.1042/BJ20131174. PMID 24107129.

[22]" BRENDA in 2013: integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: new options and contents in BRENDA". Nucleic Acids Research. 41 (Database issue): D764–72. January 2013. doi:10.1093/nar/gks1049. PMC 3531171. PMID 23203881

[23] A proficient enzyme". Science. 267 (5194): 90–931. January 1995. Bibcode:1995Sci...267...90R. doi:10.1126/science.7809611. PMID 7809611.

[24]" OMP decarboxylase—An enigma persists". Bioorganic Chemistry. 35 (6): 465–9. December 2007. doi:10.1016/j.bioorg.2007.07.004. PMID 17889251.

[25] Adam, GC; Cravatt, BF; Sorensen, EJ (2001). "Profiling the specific reactivity of the proteome with non-directed activity-based probes". Chemistry & Biology. 8 (1): 81–95.

[26] Biochemistry. W. H. Freeman and Company .(6-4955-7167-0 (ردمك ، نسخة محفوظة 26 سبتمبر 2009 على موقع واي باك مشين.

[27] Smyth, TP (2004). "Substrate variants versus transition state analogues as noncovalent reversible enzyme inhibitors". Bioorganic & Medicinal Chemistry. 12 (15): 4081–8. doi:10.1016/j.bmc.2004.05.041. PMID 15246086.

[28] https://csci.tu.edu.iq/cd/images.فراس_طاهر/الانزيمات_الجزء_الثاني/pdf

[29] García-Dorado, David; Rodríguez-Sinovas, Antonio; Fuertes-Agudo, Marina; Ruiz-Meana, Marisol; Alburquerque-Béjar, Juan José; Miró-Casas, Elisabet; Barba, Ignasi; Valls-Lacalle, Laura (2016-03-01). "Succinate dehydrogenase inhibition with malonate during reperfusion reduces infarct size by preventing mitochondrial permeability transition". Cardiovascular Research .384–374 :(3) 109 .(باللغة الإنجليزية) doi:10.1093/cvr/cvv279. ISSN 0008-6363 مؤرشف من الأصل في 04 يوليو . 2019

[30] Inhibitors - Chemistry Encyclopedia - structure, reaction, uses, examples, Uses of Inhibitors". www.chemistryexplained.com مؤرشف من . الأصل في 7 سبتمبر 2018. اطلع عليه بتاريخ 04 يوليو 2019.

[31] Etymology: Gk, bios, life; L, activus, with energy, Mosby's Medical Dictionary, 8th edition. © 2009, Elsevier

[32] موسوعة وقاموس ميلر كين للطب والتمريض ومجالات الصحة، Seventh Edition. © 2003 by Saunders, an imprint of Elsevier, Inc.

[33] A.Jagan Mohan Reddy, Manas Ranjan Barik,Gajendra L. Muli and Parthasarathy.T (2012). "Computational Approach for Designing and Development of Potent Inhibitor for Hepatitis - B Virus X- Associated

Protein through Molecular Docking Studies". Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 4 (1): 265–271.

[34] Svendsen A (2000). "Lipase protein engineering". Biochim Biophys Acta. 1543 (2): 223–228. Doi:10.1016/S0167-4838(00)00239-9. PMID 11150608.

[35] Afonso C, Tulman E, Lu Z, Oma E, Kutish G, Rock D (1999). "The Genome of Melanoplus sanguinipes Entomologists". J Virol. 73 (1): 533–52. PMC 103860. PMID 9847359.

[36] Girod A, Wobus C, Zádori Z, Ried M, Leike K, Tijssen P, Kleinschmidt J, Hallek M (2002). "The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity". J Gen Virol. 83 (Pt 5): 973–8. PMID 11961250.

[37] Hube B, Stehr F, Bossenz M, Mazur A, Kretschmar M, Schafer W (2000). "Secreted lipases of Candida albicans: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members". Arch. Microbiol. 174 (5): 362–374. Doi:10.1007/s002030000218. ببمد .11131027

[38] NCBI – WWW Error Blocked Diagnostic 05 نسخة محفوظة [وصلة مكسورة] مارس 2010 على موقع واي باك مشين.

[39] Familial lipoprotein lipase deficiency – Genetics Home Reference نسخة محفوظة 18 نوفمبر 2004 على موقع واي باك مشين.

[40] Gilbert B, Rouis M, Griglio S, de Lumley L, Laplaud P (2001). "Lipoprotein lipase (LPL) deficiency: a new patient homozygote for the preponderant mutation Gly188Glu in the human LPL gene and review of reported mutations: 75 % are clustered in exons 5 and 6". Ann Genet. 44 (1): 25–32. Doi:10.1016/S0003-3995(01)01037-1. PMID 11334614.

[41] Crenon I, Foglizzo E, Kerfelec B, Verine A, Pignol D, Hermoso J, Bonicel J, Chapus C (1998). "Pancreatic lipase-related protein type I: a specialized lipase or an inactive enzyme". Protein Eng. 11 (2): 135–42. Doi:10.1093/protein/11.2.135. PMID 9605548.

[42] De Caro J, Carriere F, Barboni P, Giller T, Verger R, De Caro A (1998). "Pancreatic lipase-related protein 1 (PLRP1) is present in the pancreatic juice of several species". Biochim Biophys Acta. 1387 (1–2): 331–41. Doi:10.1016/S0167-4838(98)00143-5. PMID 9748646.

[43] https://www.webmd.com/vitamins/ai/ingredientmono-203/lipase

[44] KIRSTIN HENDRICKSON, What Are the Functions of Lipase Enzymes ،؟

[45] www.livestrong.com, retrieved in 11-1-2019, From :

[46] https://www.livestrong.com/article/410168-what-are-the-functions-of-lipase-enzymes/

[47] Koop H (1984). "Serum levels of pancreatic enzymes and their clinical significance". Clin Gastroenterol. 13 (3): 739–61. PMID 6207965.

[48] Aronne, Louis. "Treating Obesity:Drug Treatment for Obesity". Treating Obesity. Medscape News. 2011. مؤرشف من الأصل في 6 أغسطس 2011. اطلع عليه بتاريخ 22 مارس 2012.

[49] Franson, K.; Rossner (2000). "Fat intake and food choices during weight reduction with diet, behavioural modification and a lipase inhibitor". Journal of Internal Medicine. 247 (5): 607–614. Doi:10.1046/j.1365-2796.2000.t01-1-00666.x. مؤرشف من الأصل في 28 يناير 2020. اطلع عليه بتاريخ 19 مارس 2012.

[50] Yun, W. (2010). "Possible Anti-Obesity therapeutics from nature – A review". Phytochemistry. 71: 1625–1641. Doi:10.1016/j.phytochem.2010.07.011. PMID 20732701. مؤرشف من الأصل في 24 سبتمبر 2015. اطلع عليه بتاريخ 22 مارس 2012.

[51] Birari, Rahul B.; Bhutani, Kamlesh K. (October 2007). "Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential". Drug Discovery Today. 12 (19–20): 879–889. Doi:10.1016/j.drudis.2007.07.024. PMID 17933690.

[52] Gutiérrez RMP, Perez RL. 2004. Raphanus sativus (radish): Their chemistry and biology. Sci World J 4: 811-837.

[53] Hanlon PR, Barnes DM. 2011. Phytochemical composition And biological activity of 8 varieties of radish (Raphanus Sativus L.) sprouts and mature taproots. J Food Sci 76: C185- C192.

[54] Papi A, Orlandi M, Bartolini G, Barillari J, Iori R, Paolini M, Ferroni F, Grazia Fumo M, Pedulli GF, Valgimigli L. 2008. Cytotoxic and antioxidant activity of 4-methylthio-3-butenyl Isothiocyanate from Raphanus sativus L. (kaiware daikon) Sprouts. J Agric Food Chem 56: 875-883.

[55] Yuan G, Wang X, Guo R, Wang Q. 2010. Effect of salt stress On phenolic compounds, glucosinolates, myrosinase and an- Tioxidant activity in radish sprouts. Food Chem 121: 1014- 1019.

[56] Abdull Razis AF, De Nicola GR, Pagnotta E, Iori R, Ioannides C. 2012. 4-Methylsulfanyl-3-butenyl isothiocyanate derived From glucoraphasatin is a potent inducer of rat hepatic phase II enzymes and a potential chemopreventive agent. Arch Toxicol 86: 183-194.

[57] Hanlon PR, Webber DM, Barnes DM. 2007. Aqueous extract From spanish black radish (Raphanus sativus L. var. niger) Induces detoxification enzymes in the HepG2 human Hepatoma cell line. J Agric Food Chem 55: 6439-6446.

[58] نوطة كيمياء العقاقير2 ، القسم العملي ، جامعة الشام الخاصة ،ميس حازم ، ص4

[59] نوطة كيمياء العقاقير2 ، القسم العملي ، جامعة الشام الخاصة ،ميس حازم ، ص5

[60] نوطة كيمياء العقاقير2 ، القسم العملي ، جامعة الشام الخاصة ،ميس حازم ، ص6

[61] نوطة كيمياء العقاقير2 ، القسم العملي ، جامعة الشام الخاصة ،ميس حازم ، ص7

62https://search.emarefa.net/ar/detail/BIM-316922--تأثير-المستخلص-المائي-لقش-الرز-في-تثبيط-إنزيم-اليوريز-و-امتص