دراســة فعالية متشابهات أنزيم الكرياتين كاينيز و بعض مضادات الاكسدة في المصل وكريات الــدم البيض في الأرانب المستحــدث فيها مرض السكري

رسالة تقدمت بها

بــان محمــد حسيــن الطـــائــي

المجلس كلية العلوم-جامعة بابل

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير

في علم الكيمياء / كيمياء حياتية

٢٠٠٦ ١٤٢٦

بسم الله الرحمن الرحيم

إقرار المشـرف

اشهد بان إعداد الرسالة قد جرى تحت إشرافي في مختبرات قسم الكيمياء / كلية العلوم / جامعة بابل كجزء من متطلبات نيل درجة الماجستير علوم في الكيمياء/ كيمياء حياتية .

التوقيـــــــع :

الاســـــــــم : د. عودة مزعل الزاملي

المرتبة العلمية : أستاذ

العنـــــــوان : جامعة بابل / كلية العلوم

التاريـــــــخ : / /

توصية رئيس قسم الكيمياء

بناءاً على التوصيات أعلاه المقدمة من قبل المشرف , أحيل هذه الرسالة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها .

التوقيـــــــع :

الاســـــــــم : د. عباس الشريفي

المرتبة العلمية : أستاذ

العنـــــــوان : جامعة بابل / كلية العلوم

التاريـــــــخ : / /

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَٰنِ الرَّحِيمِ

اقرار لجنة المناقشة

نحن أعضاء لجنة المناقشة نشهد أن الرسالة الموسومة بـ**"دراسة فعالية متشابهات أنزيم الكرياتين كاينيز وبعض مضادات الاكسدة في المصل وكريات الدم البيض في الأرانب المستحدث فيها مرض السكري"**وقد ناقشنا الطالبة **"بان محمد حسين علي الطائي"** في محتوياتها ووجدنا أنها جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير في علم الكيمياء – كيمياء حياتية.

رئيس اللجنة

التوقيع :

الأسم : أ. فاضل جواد آل طعمة

المرتبة العلمية : أستاذ

العنوان : كلية الطب / جامعة كربلاء

التاريخ : / /

عضو اللجنة

التوقيع :

الأسم :د. حسن فاضل ناجي

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان : كلية العلوم / جامعة بابل

التاريخ : / /

عضو اللجنة

التوقيع :

الأسم : د. ماجد كاظم حسين

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان : كلية العلوم / جامعة الكوفة

التاريخ : / /

عضو اللجنة(المشرف)

التوقيع :

الأسم : د. عودة مزعل ياسر

المرتبة العلمية : أستاذ

العنوان : كلية العلوم / جامعة بابل

التاريخ : / /

مصادقة عميد كلية العلوم

التوقيع :

الأسم : د. عودة مزعل ياسر

المرتبة العلمية :

التاريخ : / /

الإهداء

إلى

اللذين اغرقاني بخيرهما ودعائهما .... ووفقني الله اكراما" لهما واستجابة لدعائهما اغلى ما في الوجود

والدي .....والدتي

إلى

الينابيع الصافية التي اسقتني الحب والحنان في رحلتي

اخواتي(زهراء و حنان)

إلى

السماء الصافية التي امطرت علي من وابل خيرهاوالشمعة التي انارت طريقي

زوجي الغالي (د.نهاد)

إلى

فرحة قلبي في هذه الدنيا ..... واملي وسعادتي ما دمت حيا"

اطفالي(حسين وعلي)

اهدي ثمرة جهدي دليل المحبة والوفاء.....

بان

شكر وتقدير

يطيبُ لي وأنا انهي دراستي أن أتقدم بوافر الشكر والتقدير والاعتراف بالجميل إلى أستاذي الفاضل د . عودة مزعل الزاملي لما أبداه من جهود كبيرة في إعداد خطة البحث , فضلاً عن توجيهه وتوصياته طيلة فترة البحث , فله مني كل الامتنان والتقدير .

وأقدم شكري الجزيل إلى رئاسة جامعة بابل وعمادة كلية العلوم ورئاسة قسم الكيمياء لإتاحة الفرصة لي لإكمال دراستي .

وأتقدم بالشكر الجزيل إلى أساتذتي الكرام ومنتسبي قسم الكيمياء لتعاونهم معي مما أسهم في تذليل الكثير من الصعوبات التي واجهتني طيلة مدة البحث .

وأتوجه بالشكر والامتنان إلى العاملين في المكتبة المركزية / جامعة بابل . وأقدم وافر امتناني الى جميع زملائي طلبة الدراسات العليا .

وختاماً اهدي باقات من ورود الشكر طيبة الشذا الى كل من قدم لي المساعدة حتى ولو بنصيحة خلال فترة دراستي , وكذلك الى كل من تمنى لي التوفيق .

فأسال الله أن يجزيهم عني خير الجزاء

والله ولي التوفيق

بان

الفهرست

التسلسل	أسم الموضوع	رقم الصفحة
١.١	المقدمة	١
٢.١	الأنسولين	٢
١.٢.١	عمل هرمون الانسولين	٣
٣.١	الداء السكري	٦
١.٣.١	انواع النقل للسكر عبر جدار الخلية	٨
٤.١	تصنيف داء السكري	١٠
١.٤.١	الداء السكري المعتمد على الانسولين	١٠
٢.٤.١	الداء السكري غير المعتمد على الأنسولين	١١
٥.١	استحداث مرض السكر في الأرنب	١٢
٦.١	الألوكســـان	١٤
٧.١	الجذور الحرة	١٤
١.٧.١	أشكال الأوكسيجين الفعالة (ROS) و أشكال النـايتروجين الفعالـة (RNS)	١٥
٢.٧.١	مصادر الجذور الحرة داخل الجسم	٢١
٣.٧.١	مرض السكري والجذورالحرة	٢٤
٤.٧.١	تسكر البروتينات	٢٦
٥.٧.١	أنتـــاج الجـــذور الحـــرة بواســـطة non-enzymatic glycosylation	٢٧
٦.٧.١	أنتاج الجذور الحرة بواسطة الاكسدة الذاتية	٢٨
٧.٧.١	أنتاج الجذور الحرة بوساطة طريق متعدد الهايدروكسيد	٣٠
٨.٧.١	الجذور الحرة وأسباب مرض السكري	٣١
٩.٧.١	ميكانيكية عمل الألوكسان	٣٢
٨.١	مضادات الأكسدة	٣٤
١.٨.١	قياس جهد الأكسدة	٣٥
٩.١	أنزيم الكرياتين كاينيز	٣٦

١.٩.١	ثباتية إنزيم الكرياتين كاينيز	٣٩
٢.٩.١	أنزيم الكرياتين كاينيز والجذور الحرة	٤٠
١٠.١	الكلوتاثايون	٤١
١.١٠.١	الكلوتاثايون والجذور الحرة	٤٣
١١.١	حامض اليوريك	٤٦
١.١١.١	تفاعلات حامض اليوريك مع الجذور الحرة	٤٩
١٢.١	بيروكسيدات الدهون	٥٠
١.١٢.١	تشكيل جذرالبيروكسيد الدهني	٥١
١٣.١	أهداف البحث	٥٤
	الفصل الثاني	٥٥
١.٢	الحيوانات المختبرية	٥٧
٢.٢	استحداث داء السكر في الأرانب	٥٨
٣.٢	سحب عينات الدم	٥٨
٤.٢	طريقة عزل كريات الدم البيض	٥٩
٥.٢	قياس مستوى السكر في المصل وكريات الدم البيض	٦١
٦.٢	فصل متشابهات إنزيم الكرياتين كاينيز من المصل بطريقة كروموتكرافيا التبادل ألايوني	٦٣
٧.٢	قياس مستوى الكلوتاثايون في المصل وكريات الدم البيض	٦٧
٨.٢	قياس مستوى الكرياتين كاينيز في المصل وكريات الدم البيض	٧١
٩.٢	قياس مستوى المالون ثنائي الالدهايد (MDA) في المصل وكريات الدم البيض	٧٤
١٠.٢	قياس مستوى حامض اليوريك في المصل وكريات الدم البيض	٧٦
	الفصل الثالث	
١.٣	تأثير مرض السكري في فعالية أنزيم الكرياتين كاينيز	٧٩
٢.٣	تأثير مرض السكري في تركيز الكلوتوثايون	٨٥
٣.٣	تأثير مرض السكري في حامض اليوريك	٩١
٤.٣	تأثير مرض السكري في المالون ثنائي الالدهايد	٩٦
٥.٣	تأثير مرض السكري في الأنزيمات ومضادات الأكسدة	١٠٠

	في المصل وكريات الدم البيض	
٦.٣	الأستنتاجـــات	١٠١
٧.٣	الدراسات المستقبلية	١٠٢

الخلاصة

اجريت هذه الدراسة على ٢٢ أرنب أستحدث فيها مرض السكري بواسطة حقنها بالالوكسان تحت الجلد لمعرفة اهم التغيرات التي تحدث في فعالية انزيم الكرياتين كاينيز مع مضادات الاكسدة (حامض اليوريك والكلوتوثايون) وناتج اكسدة الدهون (المالون ثنائي الالدهايد) في كل من المصل وكريات الدم البيض ومقارنتها مع مجموعة السيطرة (٢٢ أرنب طبيعي).

أظهرت نتيجة البحث أن مرض السكري يعمل على زيادة توليد الجذور الحرة لدى الارانب فيمكن ملاحظة ذلك من خلال الزيادة المعنوية الحاصلة في المالون ثنائي الالدهايد بوحـــــدة (µmol/L) (٠.٤٢ ± ١.٦٨) للمصل و(٠.٤٣ ± ١.٥٤) لكريات الدم البيض مقارنة بقيمها في مجموعة السيطرة (٠.٢٩ ± ٠.٨٣) للمصل و(٠.٢٦ ± ٠.٧٧) لكريات الدم البيض , والانخفاض في المتغيرات (CK و GSH و UA) حيث بلغت قيمها في المصـــل (٢٢ ± ٨٠.٦ و٦.٤ ± ١٦.٣و٤٢ ± ١٤٤.٦) عند مقارنة قيمها مع مجموعة السيطـــرة (٣٨± ١٠٥.٥و١٠.٣± ٢٦.٧ و٤١± ٢٤٠.٣) على التوالي.

أما في متشابهـات انزيم الكرياتين كاينيز يكون تأثير مرض السكري على فعالية كل من المتناظر الانزيمي الـ MM-CK وMB-CK أكثر من تاثيره على الـBB-CK في كل من المصل وكريات الدم البيض حيث بلغت قيمها في المصل بوحدة IU/L (١٤±٧٤.٦)و(١.٢±٦.٣)بينما في الـBB-CK تكون الفعالية(٠.٥±٢.٦)وهي نفس القيمة في مجموعة السيطرة والمستحدث فيها مرض السكر.

وأخيرا" أظهرت الدراسة أنه لا يوجد فرق في نتائج مستوى فعالية أنزيم وتركيز كل من الـ (كرياتين كاينيز, حامض اليوريك , كلوتوثايون, المالونداألدهايد) في المصل عن تلك النتائج بكريات الدم البيض للأرانب المختبرية المستحدث فيها مرض السكريعند مقارنتها مع مجموعة السيطرة.

قائمة الأشكال

رقم الشكل	العنوان	رقم الصفحة
(١.١)	تركيب الانسولين	٢
(٢.١)	آلية عمل الهرمونات خلال cAMP	٥
(٣.١)	ارتباط الانسولين بالخلايا	١٠
(٤.١)	ميكانيكية عمل الألوكسان	٣٤
(٥.١)	DNA بوجود جذر الهايدروكسيل	١٦
(٦.١)	تكون وأزالة الجذور الحرة الاوكسجينية والنايتروجينية والأشكال الفعالة الآخرى	١٩
(٧.١)	أنتاج الجذور الحرة النايتروجينية والاوكسجينية ومضادات الاكسدة	٢٠
(٨.١)	أحتمالية حدوث التفاعل داخل الجسم	٢٥
(٩.١)	الـglycation الأنزيمي	٢٦
(١٠.١)	عملية تحطيم الناتج الأمودوري وتكوين بيروكسيد الهايدروجين	٢٧
(١١.١)	يمثل توزيع الـ Glucose Autoxidation وأنتاج جذر الهايدروكسيل من تحطيم الكلوكوز	٢٩
(١٢.١)	طريقة تخليق الجذور الحرة متعددة الهايدروكسيل	٣٠
(١٣.١)	معادلة عمل الكرياتين كاينيزفي خزن وتحرير الطاقة	٣٧
(١٤.١)	التفاعلات والأنزيمات الداخلة في العمليات الأيضية للكرياتين	٣٩
(١٥.١)	اليورك أسد كناتج نهائي لتمثيل البيورينات	٤٧
(١٦.١)	الخطوات التحليلية لمسار حامض اليوريك	٤٩
(١٧.١)	المالون ثنائي الالدهايد MDA كنواتج ثانوية لبيروكسيدات الدهون	٥٣
(١.٢)	يمثل تفاعل GSH مع DTNB	٦٧
(٢.٢)	المخطط القياسي لتركيز الكلوتاثايون	٧٠
(٣.٢)	طريقة لتقدير بيروكسيدات الدهون بوساطة الناتج مالون ثنائي الالدهايد	٧٤
(١.٣)	فعالية الـ CK للمصل وكريات الدم البيض في كلا من الارانب الطبيعية والمستحدث فيها مرض السكري	٧٩
(٢.٣)	فعالية الـ CK في متشابهات الانزيم للمصل وكريات الدم البيض في مجموعة الارانب الطبيعية	٨٣
(٣.٣)	فعالية الـ CK في متشابهات الانزيم للمصل وكريات الدم البيض في مجموعة الارانب المستحدث فيها مرض السكري	٨٤

(٤.٣)	مستوى GSH للمصل وكريات الدم البيض في كلا من الارانب الطبيعية والمستحدث فيها مرض السكري	٨٦
(٥.٣)	العلاقة بين الـ GSHوالـ CK للمصل وكريات الدم البيض لمجموعتي الارانب الطبيعية والمستحدث فيها مرض السكري	٨٨
(٦.٣)	العلاقة بين الـ GSHوالـ MDA للمصل وكريات الدم البيض لمجموعتي الارانب الطبيعية والمستحدث فيها مرض السكري	٨٩
(٧.٣)	مستوى حامض اليوريك للمصل وكريات الدم البيض في كلا من الارانب الطبيعية والمستحدث فيها مرض السكري	٩٢
(٨.٣)	تركيب نواتج نترجة حامض اليوريك	٩٣
(٩.٣)	الـ Nitrosative Stressوالـ Hyperfiltration	٩٤
(١٠.٣)	العلاقة بين الـ UA والـ CKللمصل وكريات الدم البيض لمجموعتي الارانب الطبيعية والمستحدث فيها مرض السكري	٩٥
(١١.٣)	مخطط التفاعل الاساسي لعمليات بيروكسيدات الدهون	٩٦
(١٢.٣)	مستوى MDA للمصل وكريات الدم البيض في كلا من الارانب الطبيعية والمستحدث فيها مرض السكري	٩٧

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	رقم الصفحة
(١.٢)	المواد الكيمياوية المستخدمة	٥٥
(٢.٢)	الأجهزة المستخدمة	٥٧
(١.٣)	فعالية أنزيم الكرياتين كاينير (U/L) في كلا "من المصل وكريات الدم البيض في مجموعتي الارانب الطبيعية والمستحدث*فيها* مرض السكري	٧٩
(٢.٣)	يمثل تركيز الكلوتاثايون (µmol/L) في كلا "من المصل وكريات الدم البيض في مجموعتي الارانب الطبيعية والمستحدث فيها مرض السكري	٨٦
(٣.٣)	يمثل تركيز حامض اليوريك (µmol/L) في كلا "من المصل وكريات الدم البيض في مجموعتي الارانب الطبيعية والمستحدث فيها مرض السكري	٩١
(٤.٣)	يمثل تركيز المالون ثنائي الالدهايد (µmol/L) في كلا " من المصل وكريات الدم البيض في مجموعتي الارانب الطبيعية والمستحدث فيها مرض السكري	٩٧
(٥.٣)	فعالية أنزيم الكرياتين كاينير (U/L) و تركيز الكلوتاثايون (µmol/L) و تركيز حامض اليوريك (µmol/L) و تركيز المالون ثنائي الالدهايد (µmol/L) في كلا " من المصل وكريات الدم البيض في مجموعتي الارانب الطبيعية والمستحدث فيها مرض السكري	١٠٠

المختصرات

cAMP	Cyclic adenosine monophosphate	**أول فوسفات الادينوسين الحلقي**
DM	Diabetes melltus	**الداء السكري**
pH		**الدالة الحامضية للدم**
IDDM	Insulin dependent Diabetes melltus	**الداء السكري المعتمد على الانسولين**
NIDDM	Non-Insulin dependent Diabetes melltus	**الداء السكري غير المعتمد على الأنسولين**
ROS	**Reactive Oxygen Species**	**أشكال الأوكسيجين الفعالة**
RNS	**Reactive Nitrogen Species**	**أشكال النايتروجين الفعالة**
ADP	**Adenosine diphosphate**	**أدنوسين ثنائي الفوسفات**
Arg	**Argenen**	**أرجنين**
Carn	**Carnosin**	**كارنوسين**
Cat	**Catalase**	**كتلييز**
Cit	**citrulline**	**ستروليين**
Cyte c	**cytochrome**	**سايتوكروم**
ETS	**Electron transport system**	**نظام انتقال الالكترون**
Glu	**glutamate**	**الكلوتامات**
Gly	**glysine**	**الكلايسين**
GS-SG	**Glutathion di sulffide**	**كلوتاثايون ثنائي الكبريت**
GSH	**Glutathion**	**كلوتاثايون**
GSH-p	**Glutathion - peroxidases**	**كلوتاثايون بيركسيديس**
GSH-T	**Glutathion - transfrrase**	**كلوتاثايون ردكييز**
LOH	**Lipid alcohol**	**الكحول الدهني**
$LOO^{\bullet}$	**Lipid peroxyl radical**	**جذر بيروكسيدات الدهون**
$NO^{\bullet}$	**Nitrogen oxide radical**	**جذرأوكسيد النايتروجين**
$R^{\bullet}$	**Radical alkyl**	**جذر حر**
R	**alkyl group**	**مجموعة اللكيل**
SOD	**Superoxide dismutase**	**انزيم سوبر أوكساييد دسميوتيز**
FAD	**Flavin adenine dinucleotide**	**الانزيم المساعد فلافين أدنوسين داي نيوكليوتيد**
H_2O_2	**hydrogen Peroxide**	**بيروكسيد الهايدروجين**
$L^{\bullet}$	**Lipid radical**	**الجذر الدهني**
LH	**Lipid**	**الحوامض الدهنية غير المشبعة**

الفصل الأول

المقدمة

١.١ المقدمة Introduction

حظيت الحالات المرضية و الحالات الفسيولوجية الناتجة عن الاختلال الهرموني وتأثيرها في مكونات الدم بالعديد من الدراسات , حيث تؤدي الهرمونات دورا" مهما" في التحفيز لتخليق مكونات الدم كما تؤثر في وظيفة هذه المكونات , و من الأمثلة على هذه الهرمونات الأنسولين (Insulin) , وهو احد الهرمونات ذات التأثير الكبير على مكونات الدم حيث يؤدي نقص إفرازه إلى ارتفاع مستوى السكر في الدم فإذا كان هذا الارتفاع دائمي فان هذا ينعكس على هيئة حالة مرضية تعرف بالداء السكري (Diabetes Mellitus) والذي يعد احد الأمراض المزمنة ذات الانتشار الواسع في العالم. (Roper, ١٩٩٦)

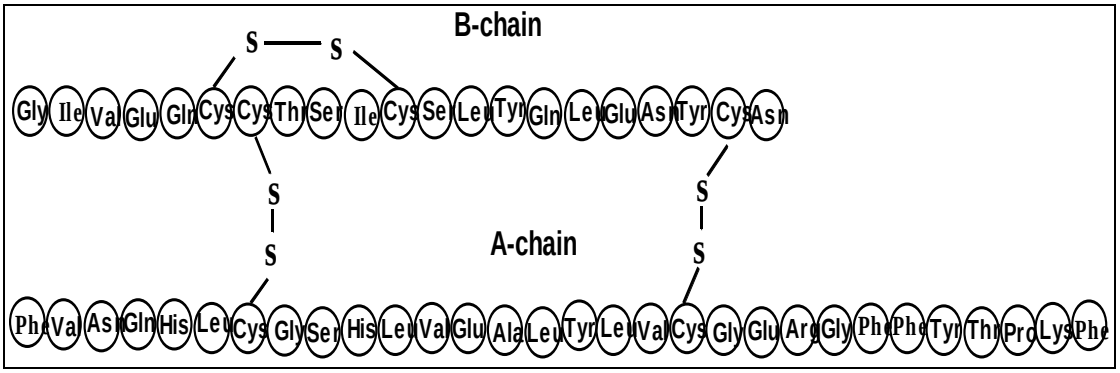
يعاني الأشخاص المصابون بالداء السكري من تغيرات كبيرة في مكونات الدم , حيث يؤدي ارتفاع مستوى السكر في الدم إلى تسكر بعض بروتينات الدم (protein glycosylation), وزيادة لزوجة الدم كما يؤثر في حركة خلايا الدم المختلفة ووظائفها. (Guyton and Hall, ١٩٩٦)

٢.١ الانسولين Insulin

وهو عبارة عن سلسلة بيبتيدية ذو وزن جزيئي واطئ ٥٨٠٨ (Guyton and Hall, ١٩٩٦) ويتكون من سلسلتين غير متفرعتين من الأحماض الامينية مرتبطتين ببعضها البعض في موقعين بآصرة ثنائي الكبريت (Disulfide Bridge) السلسلة A مؤلفة من ٣٠ حامض أميني وسلسلة B مؤلفة من ٢١ حامض أميني , حيث يفقد الأنسولين فعاليته الوظيفة عند انفصال السلسلتين المكونتين له. (Goodman, ١٩٨٠)

عزل الأنسولين لأول مرة من قبل Best, Banting عام١٩٢٢ و استخدم لعلاج المرضى الذين يعانون من نقص كبير في إفراز الأنسولين (Guyton and Hall, ١٩٩٦) يحتوي البنكرياس على جزيرات لانكرهانز وهي كتل خلوية صغيرة منتشرة في جميع البنكرياس .

تحتوي الجزيرات على ثلاثة أنواع من الخلايا و هي خلايا ألفا و بيتا و دلتا , وتكون خلايا بيتا ٦٠-٧٠٪ من خلايا هذه الجزيرات وتقع في مراكز جزيرة لانكرهانز وهي المسؤولة عن إفراز الأنسولين . (Ganong, ١٩٩٥)



الشكل(١.١) تركيب الانسولين(Ganong,١٩٩٥)

يقوم هرمون الانسولين بتنظيم عملية التمثيل الغذائي للكربوهيدرات , والحفاظ على نسبة السكر بالدم بشكل متوازن حيث يزداد إفرازه عند ارتفاع نسبة السكر بالدم بعد تناول الطعام يتحول الكلوكوز الفائض الى كلايكوجين ويقلل إفرازه الى الدم عندما تنخفض نسبة السكر بالدم عند الامتناع عن الطعام أو الصيام.(Murray *et al*.,١٩٩٦)

١.٢.١عمل هرمون الانسولين

لقد وجد في السنوات الاخيرة بان معظم الهرمونات ومنها الانسولين تؤدي مفعولها على الخلايا بواسطة مركب فوسفاتي هو اول فوسفات الادينوسين الحلقي cAMP (cyclic adenosine monophosphate) الذي يسمى ايضا" الرسول الثاني second messenger على اعتبار الهرمون نفسه الرسول الاول first messenger .

ويقوم الهرمون بالالتصاق على السطح الخارجي للغشاء البلازمي الذي يتم بنوع من التفاعل بين جزيئة الهرمون وجزيئات المستلمة receptor molecules التي توجد في تركيب الغشاء .

لقد وجد العلماء في عام ١٩٧٢ بان الهرمون بعد اتحاده مع الجزيئات المستلمة في غشاء الخلية يؤدي الى تنشيط انزيم سمي ادينيل سايكليز adenyllate cyclase المرتبط بالسطح الداخلي للغشاء , يعتقد بان لايونات الكالسيوم وللبروستاكلانديدات prostaglandins دور في ذلك . (Ganong, ١٩٩٥)

يؤدي ادينيل سايكليزالى تحويل ATP الى cAMP وكما يلي :

$$\text{ATP} \xrightarrow{\text{adenyl cyclase}} \text{cAMP} + 2\text{Pi}$$

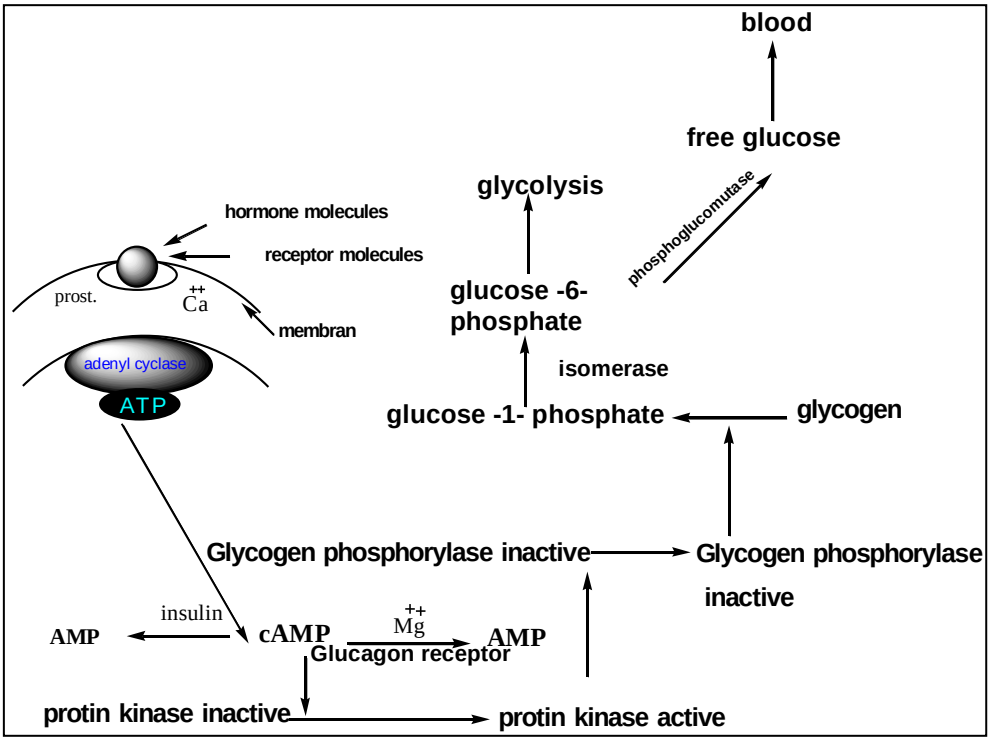
ينتشر cAMP بعد تكونه في الخلية ليعمل كرسول ثاني وبوجوده تعمل سلسلة انزيمية عن طريق تنشيط انزيم بروتين كاينيز protein kinase وهذا ينشط بدوره انزيم اخر هو الفوسفوريليز كاينيز phosphorylase kinase الضروري لتحويل انزيم الكلايكوجين فوسفوريليز من الحالة غير

الفعالة الى الحالة الفعالة وهذا الاخير ضروري لتحويل الكلايكوجين الى كلوكوز -١ فوسفات الذي يتحول الى نظيره كلوكوز – ٦ – فوسفات وهي المادة الاولية لعملية التنفس الخلوي في الخلايا العضلية .

بعد اداء العملية بتحول cAMP الى AMP ويتحول كلوكوز – ٦ – فوسفـــات(G-٦-P) بنسبة ١/٦ منه الى كلوكوز حر يطرح للدم (من الخلايا الكبدية فقط) لتنظيم نسبة السكر في الدم بواسطة هرمون الكلوكاكون حيث تعمل مجموعة انزيمية تسمى فوسفوداي استيريز phosphodiseterase الذي لا يعمل الاعند توفر ايونات المغنسيوم (Mg^{++}) والتي تؤدي الى دمج السكر الفائض لتكوين سلســـــــلة كلايكوجين (خزين جديد للسكر) كما في الشكل (٢.١) . (Murry *et al.*,١٩٩٦)

شكل(٢.١) آلية عمل الهرمونات خلال cAMP ضمن(Murry *et al.*, ١٩٩٦)

يتحول الكلايكوجين الى كلوكوز ينطلق الى الدم بواســـطة انزيم كبدي هو (G-٦-phosphatese) ولذلك فعندما يعجز البنكرياس عن إنتاج وإفراز الأنسولين بصورة كافية أو فعالة يرتفع مستوى السكر بالدم بصورة تدريجية ويستمر هذا الارتفاع ليصل إلى مستوى ١٨٠ملي غرام



/١٠٠ مليلتر .

يبدأ بعدها السكر بالتسرب عن طريق الكليتين مذابا بكميات كبيرة من الماء فيسبب كثرة التبول والعطش.(Murray *et al.*, ١٩٩٦)

وفي حالة حصول نقصان في كمية الأنسولين أو وجود خلل في المستلمات(Receptor) المحددة لهرمون الأنسولين على الخلايا، تزداد كمية الكلوكوز (السكر) في الدم، وعندها يمكن أن تظهر على المريض أعـــراض داء السكري.(Lise *et al.* , ٢٠٠١)

٣.١ الداء السكري DM (Diabetes Mellitus)

تم تعريف هذا المرض من قبل منظمة الصحة العالمية في جنيف عام ١٩٧٩م على أنه ارتفاع مزمن لمستوى (الكلوكوز) في الدم, وهذا الارتفاع قد يكون وراثياً أو بيئياً أو نتيجة لعوامل كثيرة أخرى في كثير من الحالات تؤثر هذه العوامل مجتمعة بحيث يكون الداء السكري هوالنتيجة المرضية لهذه العوامل.(Kolterman, ١٩٩٤)

يوجد قدر من السكر في دم كل إنسان بين (٨٠ -١٢٠) مليغرام /١٠٠ مليلتر لحاجة الجسم إليه كمصدر للطاقة حيث يحصل الإنسان على هذا السكر من تناوله للأغذية النشوية والسكرية (الكربوهايدرات) تهضم هذه الاغذية في القناة الهضمية , يمتص الكلوكوز في القناة الهضمية ليذهب إلى مجرى الدم ، تمتاز هذه العملية بالبطء مما يجعل كمية السكر في القناة الهضمية تمتص تدريجياً إلى الدورة الدموية، وعندما نتناول كميات كبيرة من المواد الكاربوهيدراتية فإن هذا يعني وجود كمية كبيرة من السكر في القناة الهضمية وبلأضافة الى زيادة ارتفاع مستوى السكر الممتص في الدورة الدموية بكمية تزيد كثيراً عن احتياج الإنسان للسكر كمصدر للطاقة لذلك تخزن هذه الكمية على هيئة كلايكوجين في الكبد (المخزن الرئيس) والعضلات ليتزود بها الإنسان عندما تقل كمية السكر الداخلة للجسم .

يستطيع الجسم تنظيم كمية السكر الموجودة في الدم بعناية فائقة إذ ترتفع كمية السكر في الدم بعد تناول الوجبة الغذائية تدريجياً ويخزن الزائد بسرعة وكفاءة عالية في الكبد والعضلات على شكل الكلايكوجين حتى لا يتجاوز مستوى السكر في الدم عن حد ١٢٠ مليغرام/ ١٠٠ مليلتر. (Edwards & Bouchier, ١٩٩١)

يعرف الداء السكري بأنه مرض معقد يتسبب في زيادة مستوى السكر في الدم (Hyperglycemia) نتيجة نقص في إفراز الأنسولين أو ضعف عملة أو بسبب الاثنين معاAmerican) Diabetes Association –ADA-١٩٩٩), حيث يؤدي انخفاض إفراز الأنسولين أو ضعف عملة إلى اضطرابات كبيرة في ايض الكاربوهدرات والدهون ومن نتائج زيادة تمثيل الشحوم حدوث زيادة تركيز الاجسام الكيتونية (ketone bodies) وتسمى الحالة بال(Ketosis) ,وهي مواد حامضية (α-keto acid) تؤدي الى انخفاض خطير في قيمة الدالة الحامضية للدم pH وهذا يؤدي الى خلل في فعالية الكثير من الانزيمات التي تعمل ضمن الدالة المتعادلة للدم ومنها ارتباط الاوكسجين بالهيموكلوبين (Kolterman, ١٩٩٤).

يزداد في مرض السكر معدل تهديم الاحماض الامينية ومعدل تحويلها الى كلوكوزجديد gluconeogenesis داخل الكيد .

١.٣.١انواع نقل السكر الى الخلايا

١ . النقل السهل Pasive transport .

يتم نقل الجزيئات من مناطق التركيز العالي الى مناطق التركيز الواطىء وبدون الحاجة الى طاقة ويتم عبر قنوات داخل جدار الخلية .

٢ .النقل المسهل Ficilitated transport .

يتم نقل الجزيئات من مناطق التركيز العالي الى مناطق التركيز الواطىء وبدون الحاجة الى طاقة ويتم عبرجزيئة البروتين كحامل (carrier).

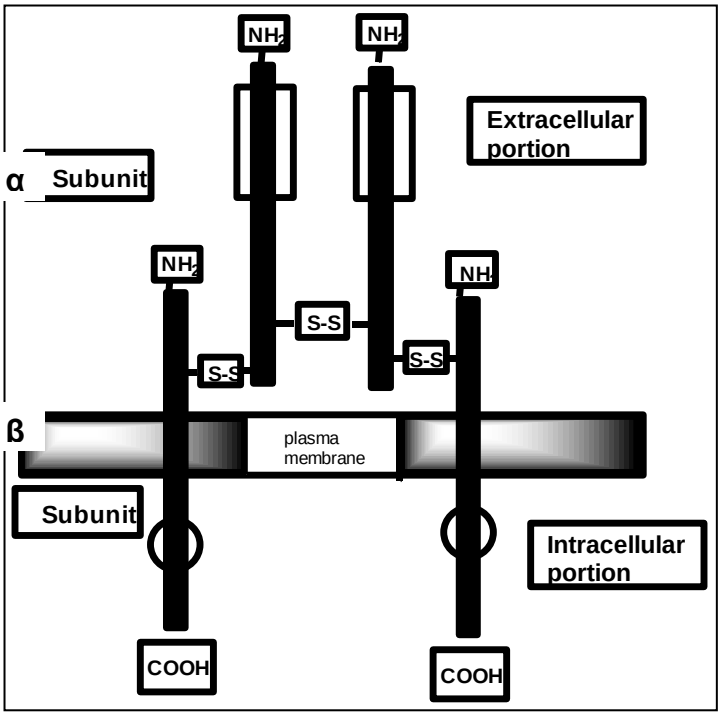
٣ .النقل الفعال Active transport .

يتم نقل الجزيئات من مناطق التركيز الواطىء الى مناطق التركيز العالي وتحتاج الى طاقة (ATP) ويتم عبرجزيئة البروتين .(Murray *et al*.,١٩٩٦)

٤ . النقل بوجود هرمون الانسولين.

يبدأ عمل الانسولين عندما يتأصر مع بروتينات سكرية خاصة موجودة على سطح الخلايا المستهدفة تعرف بالمستقبلات .

يصنع المستقبل (receptor)من اتحاد اربع وحدات ثانوية مرتبطة مع بعضها البعض باواصر ثنائيـــــة الكبريتيد(di sulfide linkage) اثنان منها يقعان بصورة تامة خارج غشاء الخلية هما وحدتا الفا الثانوية , اما الاثنان الاخرتان فتنفذان خلال غشاء الخلية وتبرزان داخل السايتوبلازم فعندما يرتبط الانسولين مع وحدتي الفا تصبح الاقسام البارزة في السايتوبلازم المكونة من وحدتي بيتا مفسفرة ذاتيا" حيث يؤدي ذلك الى فسفرة العديد من الانزيمات داخل الخلية وتكون المحصلة النهائية تنشيط بعض الانزيمات وتعطيل البعض الاخر يؤدي ذلك الى زيادة نفاذية الغشاء للسكر.(Murray *et al*.,١٩٩٦)



شكل (٣.١) يمثل ارتباط الانسولين بالخلايـــــــــا (Murray *et al*.,١٩٩٦).

٤.١ انواع داء السكري Types of DM

١.٤.١الداء السكري المعتمد على الانسولين Type ١ (IDDM)

يشمل هذا النوع ١٥٪من مرضى داء السكري ويظهر في (Rossini *et al.*,١٩٩٣)

يؤدي تحطم خلايا β الى نقـــص كبير في انتاج هرمون الأنسولين (Manana *et al.* , ٢٠٠٣) مما يؤدي الى زيادة تمثيل الشحوم و تكون مركبات وسطية من التمثيل غير الكامل للحوامض الشحمية تدعى بالاجسام الكيتونية(Ketone bodies) وهي الاسيتون وخلات حامض الخليك وبتا هيدروكسي حـــــــامض البيوتيريك .(Murray *et al.*,١٩٩٦)

يميز هذا النوع بأنه خلل حاصل بالجزيرات حيث انه لازال الغموض واسع حول سببه الحقيقي فقد يكون السبب مناعي أو بسبب فيروسي حيث يعمل فيروس معين بالتأثير على المناعة (مناعة هذه الخلايا في جزيرات لانكرهانز المغطى بجدار بروتيني) لذلك يحتاج المصاب إلى جرعات من الأنسولين تسد النقص الحاصل به نتيجة هـذا الخلـــل . (Turner, ١٩٩٤)

وتعتمد معالجته على أعطاء المريض هرمون الأنســولين باستمرار :(Turner, ١٩٩٤ American Diabetes Association –ADA-١٩٩٩) ومن هنا جاءت التسمية Isulin dependent ويدعى بمرض السكري المعتمد على الانسولين وهو النوع الاول ١ Type.

٢.٤.١ الداء السكري غير المعتمد على الأنسولين

Type ٢ Non- Insulin dependent DM (NIDDM)

يسمى المرض بالداء السكري غير المعتمد على الأنسولين Non- Insulin dependent DM بوجود افراز تام لهرمون الانسولين من البنكرياس وهذا النوع أكثر انتشار من النوع الأول إذ يـــشمل ما يقارب ٨٥ % من مرض داء السكري (Olefsky *et al.* ,١٩٨٢)

ان السبب الرئيسي لهذا المرض للاشخاص الذين لا يعانون السمنة يـعود الى وجـــود تلف في مـــوقع المستلم (Receptor) للهرمون على جدار الخلية أما الذين يعانون من السمنة فيحصل بـــــسبب مـــقاومة الأنسوليـــــن (Insulin Resistanse) (Bogardus *et al.* ,١٩٨٥) (Fujimoto *et al.* , ١٩٨٧; Manson *et al.* , ١٩٩١)

وكذلك يحدث النوع الثاني من الداء السكري بسبب الشيخوخة أو زيادة الوزن المفرطة أن الأنسولين ينتج بصورة طبيعية على الأقل في بداية المرض لكن خلايا جسم الإنسان لا تستجيب له بسبب تطور ميكانيكية جديدة فيها مقاومة لهذا النوع من الأنسولين , وفي كل الأحوال سوف يكون مستوى الكلوكوز في الدم بمستويات مرتفعة يعود هذا الى فقدان مساهمة الانسولين في نقل السكر عبر جدار الخلايا كذلك يؤدي الى تخلخل في نفاذية الجدار له .

٥.١ استحداث مرض السكر في الأرنب

يستحدث مرض السكري في الأرانب من احداث خلل في عمل البنكرياس. Olefsky *et al.* (١٩٨٢,)

لذلك فان مستوى السكر في الدم تحدده كمية الأنسولين التي تفرز في الدم, فعندما يتضرر البنكرياس في الأرنب سوف نلاحظ انخفاض كبير في إفراز الأنسولين (hypoinsulinemia) ويرافقها انخفاض الكلايكـــوجين فــي الكبد (hyperglucagonemia). (Manson *et al.* , ١٩٩١)

نادرا" ماتكون الأرانب مصابة بالسكر بشكل طبيعـــــي, لذلك غالبا ما يستخدم في البحوث بعض العقاقير لاستحداث السكر مثل الالوكسان(Alloxan) اوالستربتوزوسين (streptozocin) حيث إن هذه العقاقير تستحدث السكري بنوعيه في الأرانب فخلال طور استحداث السكري يكون الأرنب باستطاعته إن يوازن شحة الأنسولين المنتجة من البنكرياس حيث يبدو ان الأنسولين يلعب دورا اقل أهمية عند الأرانب , او حيوانات آكلات النباتات لوجود مقارنة في حيوانات آكـــلات اللحوم (Manana *et al.* , ٢٠٠٣) متأتية من كون معظم النباتات تكون قليلة السكر عند هضمها لذلك فانها تساعد الأرنب في تنظيم السكر في الدم عند المستوى الطبيعي , حيث يلاحظ كلما زاد مستوى السكر في الدم تأخذ الأرانب بزيادة تناول النبات وبالتالي تحافظ على مستوى السكر عند الحد الطبيعي , دون لجوء البـــاحثين الى اعطاء جرعات من الأنسولين كمنـــظم خارجي للسكر و التي غالبا ما يستخدمها البشر عند الإصابة بالسكـــــري .(Mohammad *et al.* , ٢٠٠٥)

ان إعطاء جرعات إضافية من مادة الـalloxan أو streptotozotin يلاحظ حدوث أعراض السكري في الارانب والتي أهمها أن الارنب يبدأ بشرب الماء بصورة مستمرة وبزيادة تبوله بصورة ملحوظة (poly uria) (ناهدة و خالد ,٢٠٠٤) , ومن خلال فحص مستوى الكلوكوز في دم الأرنب وجد ارتفاع في السكر أعلى من ٨.٦ مليغرام /١٠٠ مليلتر المستوى الطبيعي للسكر في الارنب حيث يصل إلى ٢٥ مليغرام /١٠٠ مليلتـــر.(Olefsky *et al.* ,١٩٨٢)

٦.١ الألوكســـان ALLOXAN

الألوكســـان (٢,٤,٥,٦-tetraoxypyrimidine;٥,٦-dioxyuracil) هو مادة ناتـــــجة مـــن تفاعل nitric acid مـــــــع uric acid (cited in McLetchie *et al.* , ٢٠٠٣) مـكونا" مركب مســـتقر بلوري الشكل يذوب في الماء .(Bell and Hye, ١٩٨٣)

أكتشف هذا المركب من قبل العالم الإيطالي Wohler في عام ١٨٨٠ مبينا" في الوقت نفسه إمكانيته في لعب دور فسجلي كبير داخل جسم الكائن الحي كعامل مؤكسد قـــوي.(Bailey, ١٩٧٤)

يظهر تأثير الالوكسان على مستوى السكر في الدم بثلاث اطوار بعد الحقن ,يمتاز الطور الاول بزيادة السكر الاولـــــي initial hyperglycemic phase حيث يحدث بعد (٢ – ٤) ساعة من الحقن , و يمتاز الطور الثاني بنقص السكر hypoglycemic phase و يحدث بعد (٦ -١٢) ساعة

من الحقن واخيرا" طور زيادة السكر الدائمي Permanent hyperglycemic phase والذي يحـــــدث بعـد (٢٤) ساعــة .(Bell and Hye, ١٩٨٣)

٩.٧.١ميكانيكية عمل الألوكسان The Mechanism of Alloxan

يعطـى الألوكسـان علـى شكل جرعـات تحقن تحت الجلد لاستحداث مرض السكري , و تعتمد كمياتها على نوع الكائن الحي ووزنه (يعتبر الإنسان أكثر مقاومة من بقية الكائنات الحيوانية),تعمل هذه الجرعات على زيادة مفاجئة في فرز الأنسولين من البنكرياس بوجود وبعدم وجود الكلوكوز في مجرى الدم أي تلغي تـأثير تركيـز السكري علـى استجابة البنكريـاس حتـى وأن كـان السكر بتركيـز عـالي . (McLetchie, ٢٠٠٢)

يختزل الألوكسـان إلـى حـامض الدايلورك وهذا يعتبر منتجـا" لجذور الألوكسـان الغير مستقرة والتـي سرعان مـا تختزل هـي الأخرى إلـى الألوكسـان بواسطة دورة أختزال ينـتج عنهـا جذور السوبر أوكسايد $O^{\circ}_{٢}$التي سرعان مـا تتحول إلـى بيروكسيد الهايدروجين $H_{٢}O_{٢}$(Szkudelski, ٢٠٠١) كما في المعادلة التالية :-

$$O^{\circ}_{٢} + O^{\circ}_{٢} + ٢H^{+} \longrightarrow H_{٢}O_{٢} + O_{٢} \quad \text{----------(١)}$$

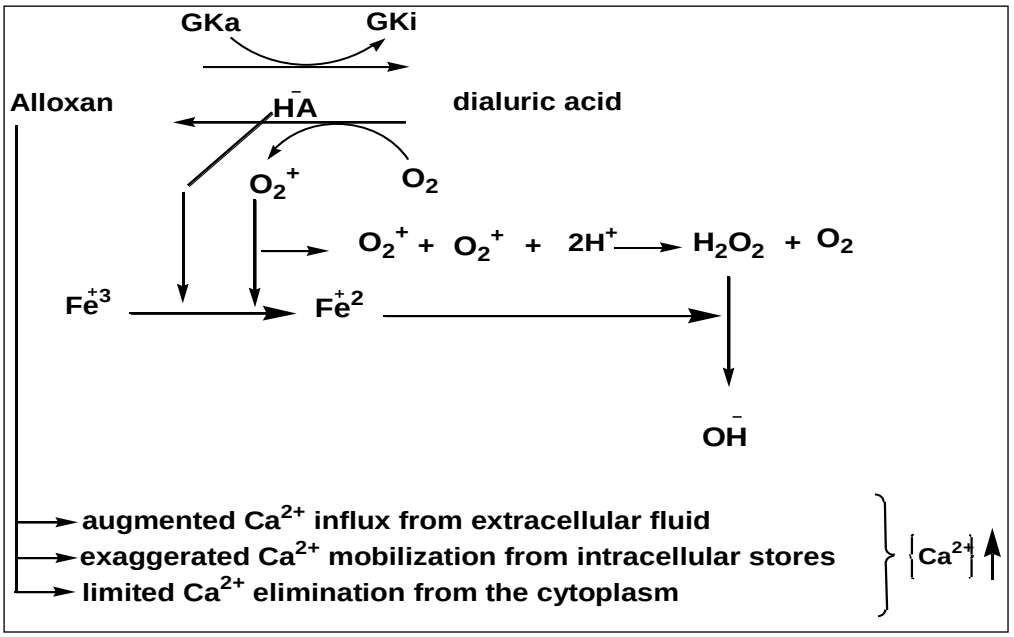
يتفاعـل بيروكسـيد الهايـدروجين $H_{٢}O_{٢}$ مـع الحديـدوز مكونـا" جـذور الهايدروكسـيد الفعالـة جدا" $OH^{-\circ}$ وهذا ما يـــعرف بتفاعل فنتون كـــــــما جاء في المعادلـة (٢)ضمن المصدر.(Cited in Muslih *et al.* , ٢٠٠٢)

$$Fe^{٢+} + H_{٢}O_{٢} \longrightarrow Fe^{٣+} + OH^{-} + OH^{-\circ} \quad \text{----------(٢)}$$

يعتبر بيروكسيد الهايدروجين $H_{٢}O_{٢}$ مولدا" لاشكال الأوكسجين الفعال , يؤدي زيادة كثافة تركيز الكالسيوم الخلوي الى سرعة كبيرة في تدمير خلايا بيتا .

بينت التجارب أن الزيادة في تركيز الكالسيوم داخل خلايا بيتا تـأتي نتيجـة عوامل عديدة أحداث وهـي تـدفق المزيـد مـن أيونـات الكالسيوم من السـائل الخلـوي الخـارجي ومـن جهـة آخـرى يتزايـد تحرير الكالسيوم من المخزون الخلوي الداخلي وثالثا" يـأتي القليل منـه من السايتوبلازم وهنـا نلاحظ بـأن جميع أيونات الكالسيوم سوف تتجمع داخل خلايا بيتا وان هذا التدفق يحدث بسبب الألوكسان الذي له القدرة على زيادة قطبية جدار خلايا بيتا, ان هذا الأستقطاب يعمل على فتح قنوات الكالسيوم المعتمدة على تباين فولتية جدار الخلية مسببة زيادة تركيزه داخل الخلية مما يتسبب فـي زيـادة توليد بيروكسيد الهايدروجين $H_{٢}O_{٢}$ وبالتالي يؤدي الى موت خلايا بيتا (Szkudelski, ٢٠٠١) كما موضح في الشكـــل (٤.١).

شـــكل (٤.١)



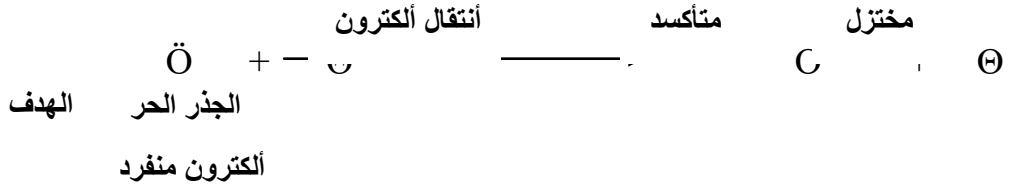
ميكانيكية عمل الألوكسان(Szkudelski, ٢٠٠١)

حيث Gka يمثل انزيم الكلوكو كاينيز الفعال وGki يمثل انزيم الكلوكو كاينيز الغير الفعال والـ HA⁻ يمثل جذر الالوكسان

٧.١ الجذور الحرة Free Radical

هي عبارة عن ذرات او جزيئات تنتج من عمليات كيميائية تحمل الكترونات منفردة (غير مزدوجة) تكون غير مستقرة كيميائيا" تنتج خلال عدة تفاعلات اكسدة بايوكيميائية تحدث في خلايا جسم الكائن الحي كجزء طبيعي من عملية الاكسدة لتحرير الطاقة (المتمثلة بجزيئة ATP) من خلال تفاعلات الفسفرة التأكسدية .(Jaber , ٢٠٠٦)

يصبح أي مركب جذر حر من خلال التأكسد (أي خلال فقدانه أواكتساب إلكترون من خلال عمليات الاكسدة و الأختزال), لذلك فالجذر الحر يكون غير مستقر وذو فعالية عالية ويقوم بعدة تفاعلات مع الجزيئات الاخرى وان تفاعله معها يؤدي الى تحويل تلك الجزيئات الى جذور حرة تكون البداية لتفاعل آخر (Halliwell & Gutteridge,١٩٩٩)



يتسبب الجذر الحر في سلسلة من التفاعلات ,تنتهي هذه السلسلة بواسطة تفاعل الجذر الحر مع جذر حر آخر أو بواسطة تفاعله مع مضادات الأكســـــــــــدة.(Oberley, ١٩٨٨)

١.٧.١أشكال الأوكسيجين الفعالة (ROS) و أشكال النايتروجين الفعالة (RNS)

A . تأثيرات الجذور الحرة Effects of Free Radicals

أن تفاعلات الجذور الحرة كما يلي:-

١. ان من أكثر التفاعلات شيوعا" وأخطرها هو بيروكسيدات الدهون الناتجة من أكسدة الجذور الحرة(Domingues *et al.* , ١٩٩٨)فالجذر الحر مثل جذر الهايدروكسيل يتفاعل مع الدهون المكونة لغشاء الخلية ليكون جذور حرة وسطية intermediate free radical وبيروكسيدات, عندها يؤدي تفاعل الجذور الحرة الى تحطيم غشاء الخليـــــــة (Halliwell & Gutteridge,١٩٩٩)

$$LH_{\text{(Membrane unsaturated lipid)}} + {}^{\bullet}OH \longrightarrow L^{\bullet}_{\text{(Lipid alkyl radical)}} + H_2O$$

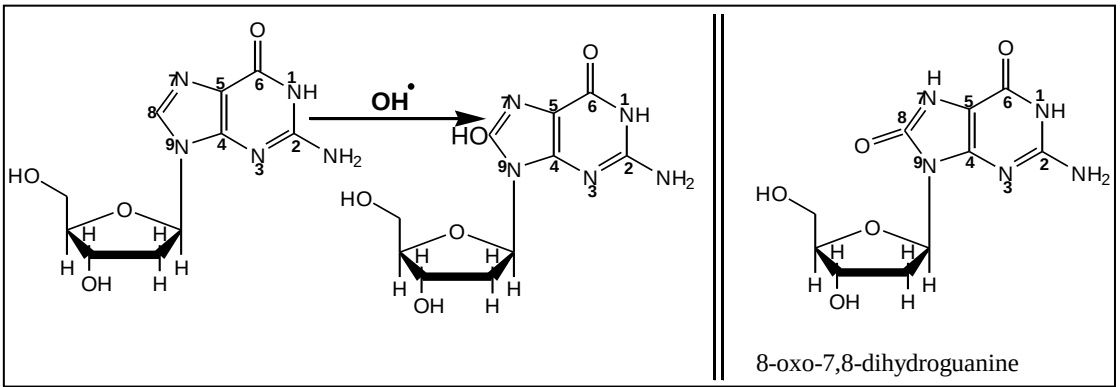
$$L^{\bullet} + O_2 \longrightarrow LOO^{\bullet}$$

$$LOO^{\bullet} + LH \longrightarrow LOOH + L^{\bullet}$$

٢. تتجزأ البروتينات من خلال تعرضها للجذور الحرة وتكون أما على شكل تقاطعات أو تجمعات وهذا يقود الى التداخل مع قنوات الأيونات interference with ion channels ويحدث فشل في مستقبلات الخلية وفشل في الأكسدة التفسفريـــــــة oxidative phosphorylation . (Cerutti, ١٩٩٤)

٣. الجذور الحرة تسبب تحطم الـDNA وهذا يسبب تغيير موقع السكر منقوص الاوكسجين deoxy ribose sugars او يحطم الشريط المفرد او المـــزدوج . (Imlay &Linn, ١٩٨٨)

ان العامل التأكسدي المحطم لـ DNA الاكثر اعتقادا" هو اما اضافة هايدروكسيل في الموقع الثامن او اكسدة الموقع الثامن على قاعدة الكوانين guanine base لتكـــوين ٨- هايدروكسي دي اوكسي كوانوسين hydroxyl deoxy guanosine – ٨ والتي تكافيء ٨ اوكزو ٨ – ٧ داي هايدروكسي (داي هايدرو كوانين)hydroguanine ٨-oxo-٧,٨-di وذلك لان هايدروجين الهايدروكسيل يزال بسهولة من الموقع السابع تاركا" اصرة مزدوجة للاوكسجين في الموقع ٨ (أي هناك حالـــة رنـــين بـــين



الصيغتين) .

الشكل (٥.١) DNA بوجود جذر الهايدروكسيل

ويعد ذلك من اهم دراسات المؤشرات الحيوية المعروفة لاكسدة DNA سوف يؤدي الى التطفر الوراثي , التسرطن , موت الخلايا وان معظم حوادث الأكسدة التي تسببهاالجذور الحرة يعتقد أنها تحدث على ٨-hydroxylation/oxidation

للـ (٨-OHdG) وهي جزيئة مكافئة لـ (٨-oxoG)٨-oxo-٧,٨-dihydroguanine وذلك لأن هايدروجين الهايدروكسيل يستطيع وبسهولة أن يتحرك الى مكان رقم ٧ تاركا"الآصرة المزدوجة للأوكسجين عند الموقع رقم ٨ (يبقى متذبذب بين هذين الموقعين).

حيث أن الـ ٨-OHdG/٨-oxoG غالبا" ما يكونا محط أهتمام في دراسة أكسدة الـDNA وأن هذا ما يؤدي الى طفرة وراثية أوسرطانات وبعدها موت الخلية .(Cerutti, ١٩٩٤)

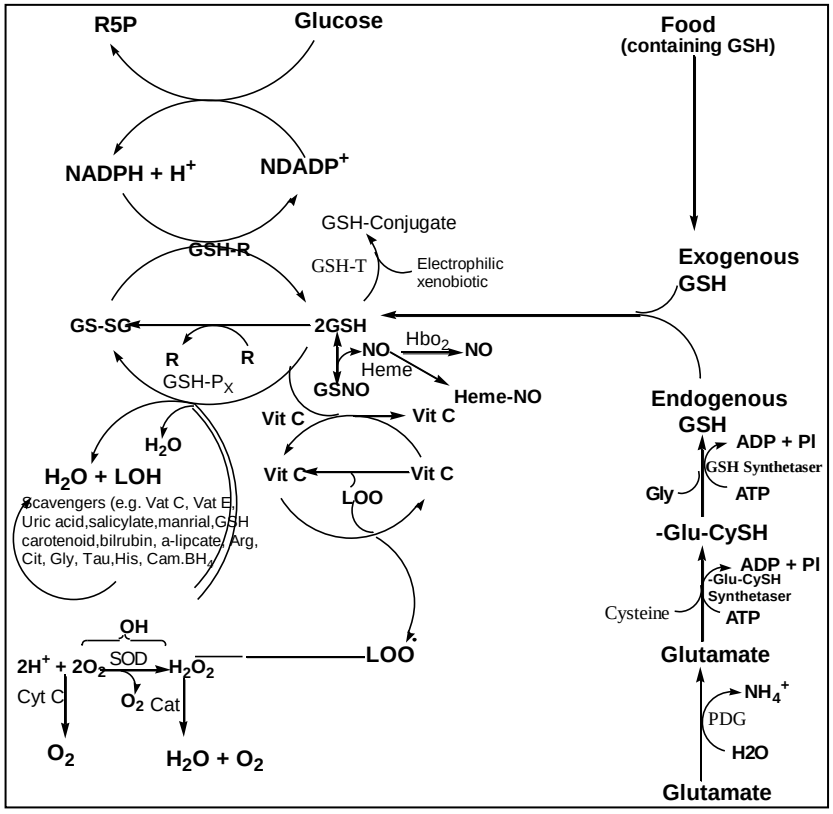
B . أشكال الأوكسيجين الفعالة Reactive Oxygen Species (ROS)

يمكن أن تصنف أشكال الأوكسجين الفعالة إلى أوكسجين متمركز الجذر Oxygen-centered radicals و أوكسجين غير متمركز الجذر Oxygen-centered nonradicals يتضمن الأوكسجين متمركز الجذر السوبر أوكسايد السالب($O^{-\circ}_{2}$)والجذر الهايدروكسيدي ($^{\circ}OH$) وجذر ألكوكسيل (RO°) وجذر البيروكسيل(ROO°).

أماالأوكسجين غير متمركز الجذر فيتضمن بيروكسيد الهايدروجين H_2O_2 والأوكسجين المنفرد ($^{1}O_2$).(Lee and Min,٢٠٠٤) (Yan and Guoyao,٢٠٠٢)

C . أشكال النايتروجين الفعالة Reactive Nitrogen Species RNS

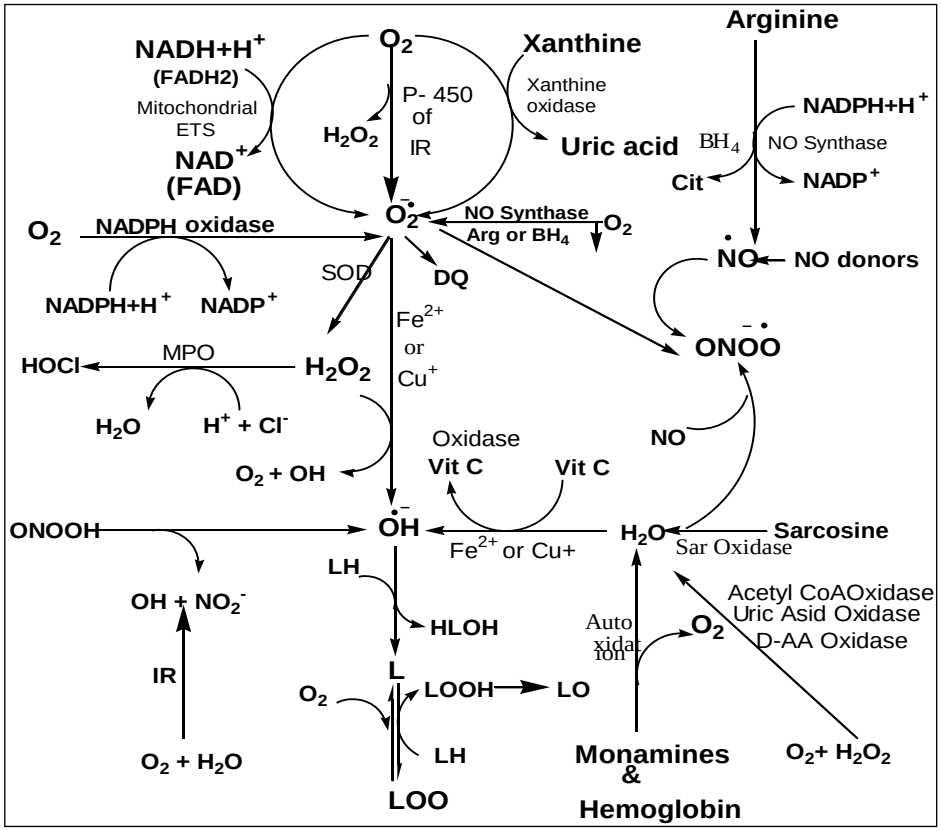
تتضمن أشكال النايتروجين الفعالة**,** الجذور الحرة أوكسيد النايتروجين (NO°) وثنائي اوكسيد النايتروجين (NO°_{2}) و بيروكسيد النايتروجين الذي لا يحتوي الجذر ($OONO^{-}$) ويمثل المخطط التالي (٦.١) تكون وازالة الجذور الحرة (Yan and Guoyao,٢٠٠٢):(Scott,١٩٩٧)



شكل (٦.١) تكون وأزالة الجذور الحرة الاوكسجينية والنايتروجينية والأشكال الفعالة الآخرى. حيث أن الـADP يمثل الـ adenosine diphosphate والـArg. يشير الى الـarginine و الـBH٤ الـ (٦R)-٥,٦,٧,٨,-tetrahydro-L-biopterin والـCarn الـ carnosine والـCat الـ catalase والـCit الـcitrulline والـCyte C الـ cytochrome c والـETS الـ electron transport system والـGlu الـL-glutamate والـGly الـglycine والـγ-Glu-CySH الـ γ-glutamyl-cysteine والـGS-SG الـ glutathione disulfide (oxidized glutathione) والـ GSH الـ glutathione (reduced form) والـGSH-Px الـ glutathione peroxidases والـGSH-R الـ glutathione reductase والـGSH-T الـ glutathione S-transfrrase والـGSNO الـ nitrosylated glutathione والـHbO٢ الـ oxyhemoglobin والـHeme-NO الـ heme-nitric oxide والـHis الـ histidine والـLOH الـ lipid alcohol والـ LOO· الـ lipid peroxyl radical والـLOOH الـ lipid hydroperoxide والـNO° الـ nitrogen oxide radical والـNO٣⁻ الـ nitrate والـO٢°⁻ الـ superoxide anion radical والـONOO- الـ peroxynitrite والـPC الـ pentose cycle والـR° الـ radicals والـR الـ non-radicals والـR٥P الـ ribulose ٥-phosphate والـSOD الـ superoxide dismutase والـTau

الـ taurine والـ Vit C الــــــ vitimin C (ascorbic acid) والـ Vit C· الـ vitimin C radicals والـ Vit E الـ vitimin E(α-tocopherol) والـ Vit E° الـ vitimin E radical

شكل (١.٧) أنتاج الجذور الحرة النايتروجينية والاوكسجينية ومضادات الاكسدة .



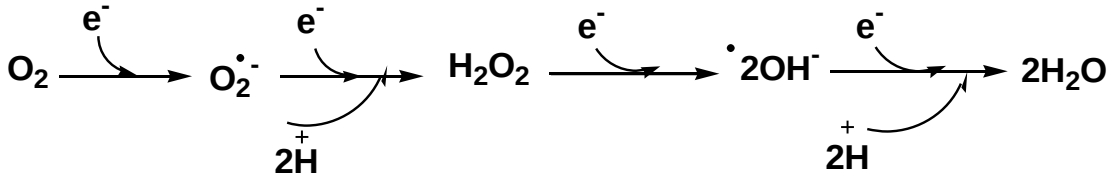
حيث أن الـAA تمثل الـ amino acid والـ.Arg يشير الى الـ arginine و الـBH٤ الـ -٥,٦,٧,٨,-(٦R)tetrahydro-L-biopterin والـCH٢O الـ formaldehyde والـCit الـ citrulline والـDQ الـ diquat والـETS الـ electron transport system والـFAD الـ flavin adenine dinucleotide (oxidize) والـFADH٢ والــــــــــ flavin adenine dinucleotide (reduced) والـGly الـ glycine والـH٢O٢ بيروكسيد الهايدروجين والـHOCl الـ hypochlorous acid والـ°LOH الـ hydroxy lipid radical والـIR الـ ionizing radiation والـ°L الـ lipid radical والـLH الـ lipid (unsaturated fatty acid) والـLOOH الـ lipid hydroperoxide والـ° LOO الـ lipid peroxyl radical والـLOOH الـ lipid hydroperoxide والـ° LO الـ lipid alkoxyl radical والـ-ONOO الـ peroxynitrite والـ٢° - O الـ superoxide anion والـ°OH الـ hydroxyl radical والـ P-٤٥٠ الــــــ cytochrome P-٤٥٠ والـPDG الـ phosphate – dependant glutaminase وsar الساركوسين و والـSOD الـ superoxide dismutase. والـــــ Vit C الــــ vitimin C (ascorbic acid) والـ° Vit C الـ vitimin C radicals والـ Vit E الـ vitimin E(α-tocopherol) والـ° Vit E الـ vitimin E radical.

٢.٧.١ مصادر الجذور الحرة داخل الجسم

تنتج الجذور الحرة في أجسامنا بصورة مستمرة نتيجة للعمليات الأيظية ويعد الجذر الحر للأوكسجين هو من أهم نواتج الفعاليات الحيوية داخل الخلايا, ويأخذ الجذر الحر للاوكسجين اشكال متعددة اضافة الى جزيئة وذرة الاوكسيجين , يكون على هيئة ثنائي اوكسيد الكاربون (carbon dioxide), وقد يتحول الى ماء في تفاعلات بايوكيميائية وفي هذه الحالة تضاف أربعة الكترونات كما في التفاعل التالي (Murray *et al.* ,١٩٩٦)(Kelly *et al.* ٢٠٠٥)

$$O_2 + 4H^+ + 4e^- \longrightarrow 2H_2O$$

واحيانا" يختزل ٥% من الأوكسجين الجذر الحر الى الماء عندما يضاف له إلكترون واحد, وفي هذه الحالة يتحول الايون السالب superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$) وبوجود ايون الهايدروجين الموجب الى بيروكسيد الهايدروجين (H_2O_2) وعند أكتسابه الكترون واحد يتحول الاخير الى جذور الهيدروكسيل ($OH^{\cdot -}$) كما في سلسلة التفاعلات التالية :-(Champe *et al.* ,١٩٩٤)



أن مصادر الجذور الحرة هي :-

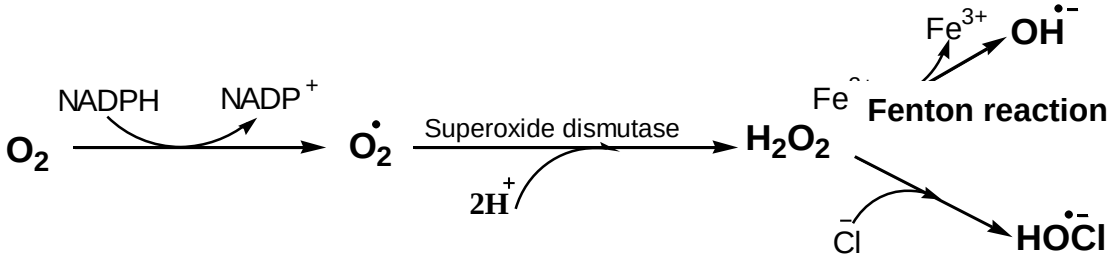
اولا":- مصادر داخلية (Bagchi & Puri , ١٩٩٨) مثل:-

١ . أنتقال الكترونات في المايتوكوندريا (ضمن السلسلة التنفسية Respiratory chain)

Reduced flavin enzyme + O_2 → Flavin-enzyme + $O^{\cdot -}_2$

٢ . الخلايا الملتهمة Phagocytes .

٣ . من تفاعلات الاكسدة والاختزال للاوكسجين مع تفاعلات فنتون وتكون جذر الهايبوكلوريد



تكون جذر الهايبوكلوريد

٤ . تفاعلات انزيمية في الخلية مثل تفاعل انزيم الزانثين اوكسيديز ينتج جذر الاوكسجين الايوني .

أ – تفاعل الزانثين اوكسيديز Xanthine oxidase

Xanthine oxidase

$$\text{Xanthine or Hypoxanthine} \xrightarrow{\text{Xanthine oxidase}} \text{Uric acid} + O_2^{\cdot-}$$

ب – تفاعل انزيم الاكسدة للانزيم المساعد NADP (نيكوتين اميد ادنين داي نيوكليوتيد فوسفيت اوكسيديز) NADP oxidase مكونا" superoxide anion .

NADP oxidase

$$NADP + 2O_2 \xrightarrow{\text{NADP oxidase}} NADP^+ + 2O_2^{\cdot-} + H^+$$

٥ . تفاعل الحوامض الدهنية مثل حامض الارجدونك Arachidonic (Tesfamarian, ١٩٩٣)

٦ . تفاعلات الاكسدة الذاتية Auto-oxidation للجزيئات البايولوجية وتحدث في تفاعلات الهيموسيستايين , السيستايين والادرينالين (adrenaline, cysteine, and homocysteine).

٧. تفاعلات الاكسدة في البيروكاسوم Peroxisomes في الخلية. (Wolff &Dean, ١٩٨٧)

٨. الالتهابات Inflammation التي تحدث في الجسم تطرح جذور حرة

٩. معالجة عملية الاحتشاء وانسدادات الاوعية الدموية في العضلة القلبية Ischaemia/ reperfusion

١٠.التفاعلات التي تتضمن الحديد والرصاص والمعادن الأنتقالية الآخرى transition metals كتفاعل فينتون وتفاعل هايبر/وايز ضمن .(Cited in Murray et al ., ٢٠٠٠)

(تفاعل فينتون) $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\circ} + OH^-$

$O_2^{\circ-} + Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$

(تفاعل هايبر/وايز) $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^{\circ} + OH^-$

ثانيا" : - تكون الجذور الحرة من مصادر خارج الجسم مثل:-

١.التدخين يعطي جذر اول اوكسيد الكاربون .(Kannel, ١٩٨١)

٢. التلوث البيئي يعطي جزيئات عضوية على هيئة جذر حر. (Bagchi & Puri , ١٩٩٨)

٣.الأشعاع يولد جذور حرة حسب الجزيئات المتعرضة للاشعاع .(Halliwell & Gutteridge,١٩٩٩)

٤.الأشعة فوق البنفسجية: تؤدي الاشعة فوق البنفسجية الى اثارة الكترونات الجزيئات وتحولها في الحالة الايونية (الى جذور حرة) .(Bagchi & Puri , ١٩٩٨)

٥. الأوزون يتحول بعد تفككه الى جذر اوكسجين حر .(Szkudelski, ٢٠٠١)

٦.تشعيع الماء يولد جذر الهايدروجين **H˚ .**(Halliwell & Gutteridge,١٩٩٩)

٣.٧.١ مرض السكري والجذورالحرة Diabetes Mellitus and Free Radicals

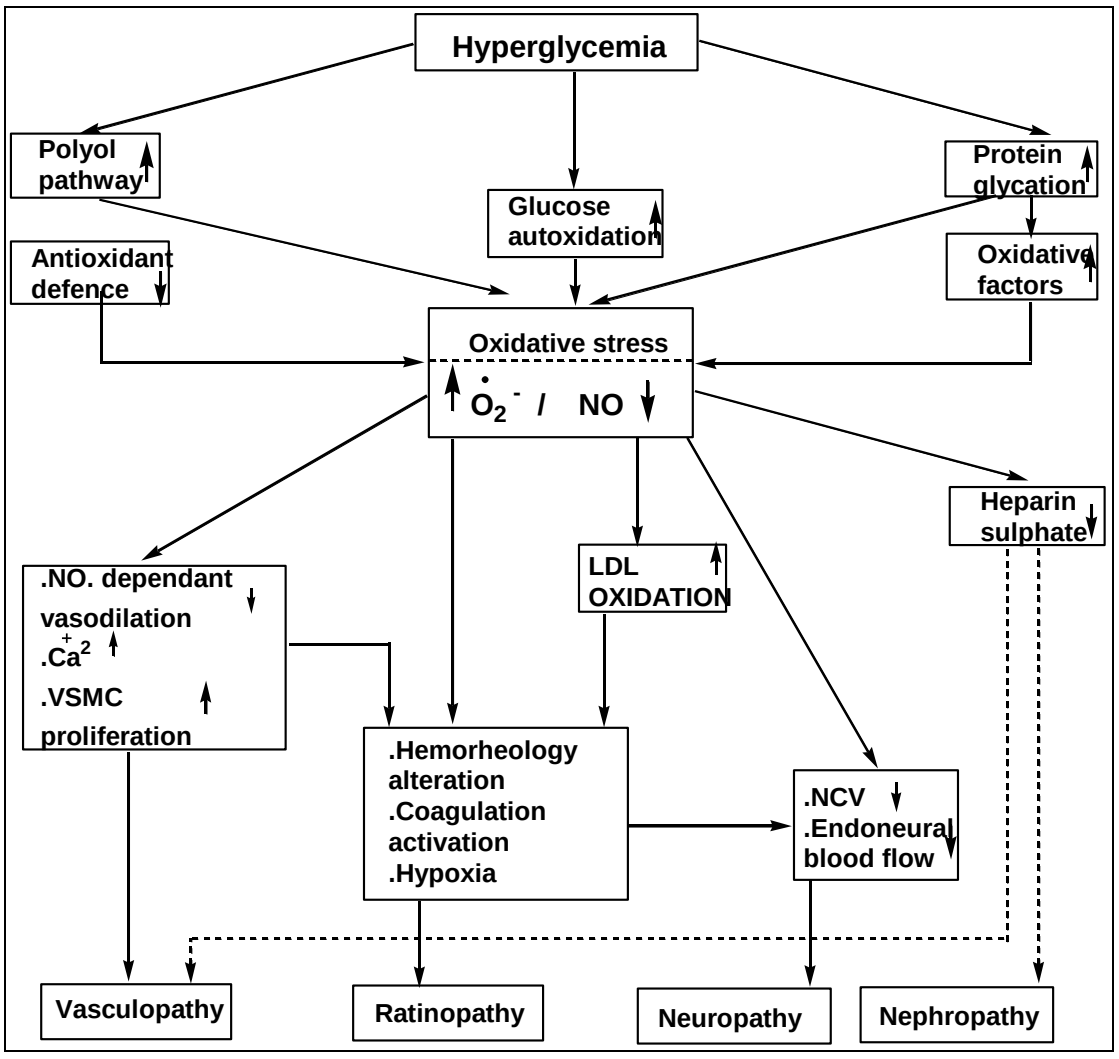
هنالك عدة نظريات تبين المسار البايوكيميائي المصاحب لارتفاع السكر في الدم والذي يظهر تأثير جهد الاكسدة للجذور الحرة في مرض السكر وهي :

١. non-enzymatic glycosylation: وهي عملية تفاعل للبروتينات بوجود الاوكسجين وعدم وجوده تؤدي الى تكون H_2O_2 وارتباط البروتينات مع جزيئات غير بروتينية .

٢. glucose autoxidation: وهو عملية تفاعل السكريات الاحادية بوجود المعادن التي تدخل الجسم عن طريق الغذاء باختزال الاوكسجين وان نواتجها(Autoxidation) يمكن ان تحطم البروتينات والدهون.

٣. polyol pathway: يعتمد على نسبة (NAD $^+$/ NADH) (in Cited Hadwan,٢٠٠٥).

حيث أن جميع هذه الطرائق تشير الى الزيادة الملحوظة في مستوى أنتاج الجذور الحرة وكما موضح بالشكل التالي.



شكل (٨.١) أحتمالية حدوث التفاعل داخل الجسم عندما يحصل أرتفاع في مستوى السكر الذي يحث جهد الأكسدة لحدوث تعقيدات لمرض السكري, فالخط الداكن للأسهم يشير الى أمكانية الحدوث المثبتة عمليا", أما الخط المنقط يمثل الميل الجيني الذي قد يحصل خلال الأختزال بواسطة مضادات الاكسدة,NCV تمثل سرعة توصيل العصب , VSMC يمثل الوعاء الدموي لخلية العضلة الملساء Vescular smooth muscle

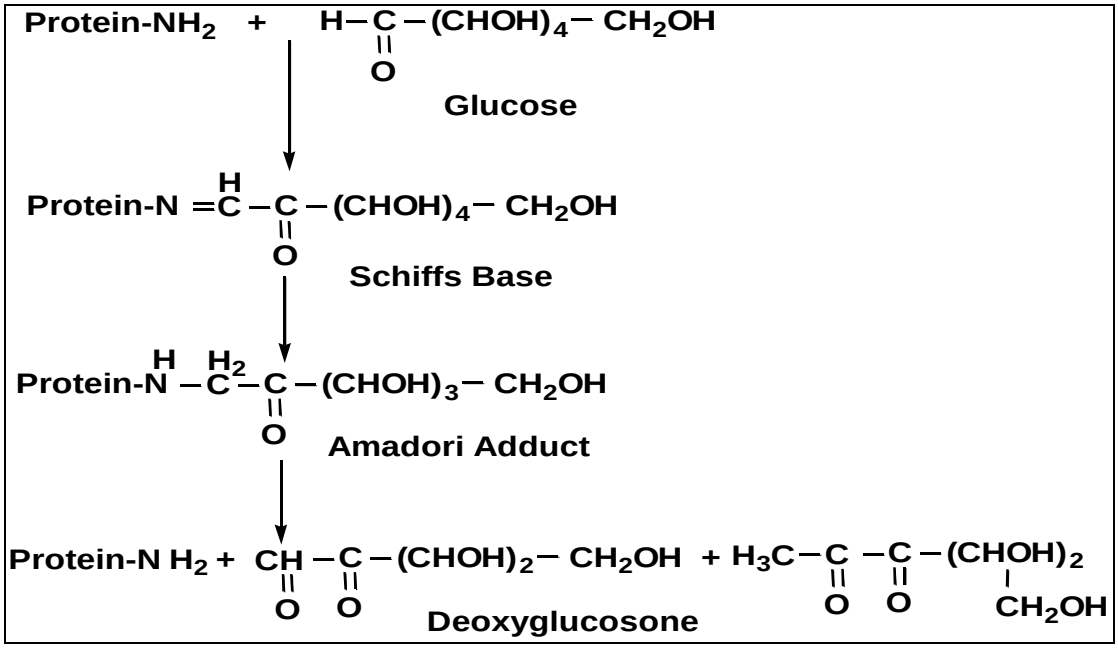
٤.٧.١ تسكر البروتينات Glycation of protein

يوضح الشكل (٨.١) (Wolff *et al*. ١٩٩١) تسكر البروتينات من خلال

تكون الهايدروجين بيروكسايد H_2O_2 نتيجة للتسكر الحاصل في البروتين ,حيث أن الكلوكوز يتفاعل مع البروتين الجزء النيوكليوفيلي منه nucleophilic مكونا" Schiff base وانketamine هو ناتج كيميائي عكسي لذلك , فهو يتكون بسبب عودة مستوى السكر في الدم الى المستوى الطبيعي وبالرغم من تكونه يستمرSchiff base

بتفاعل أميدوري .

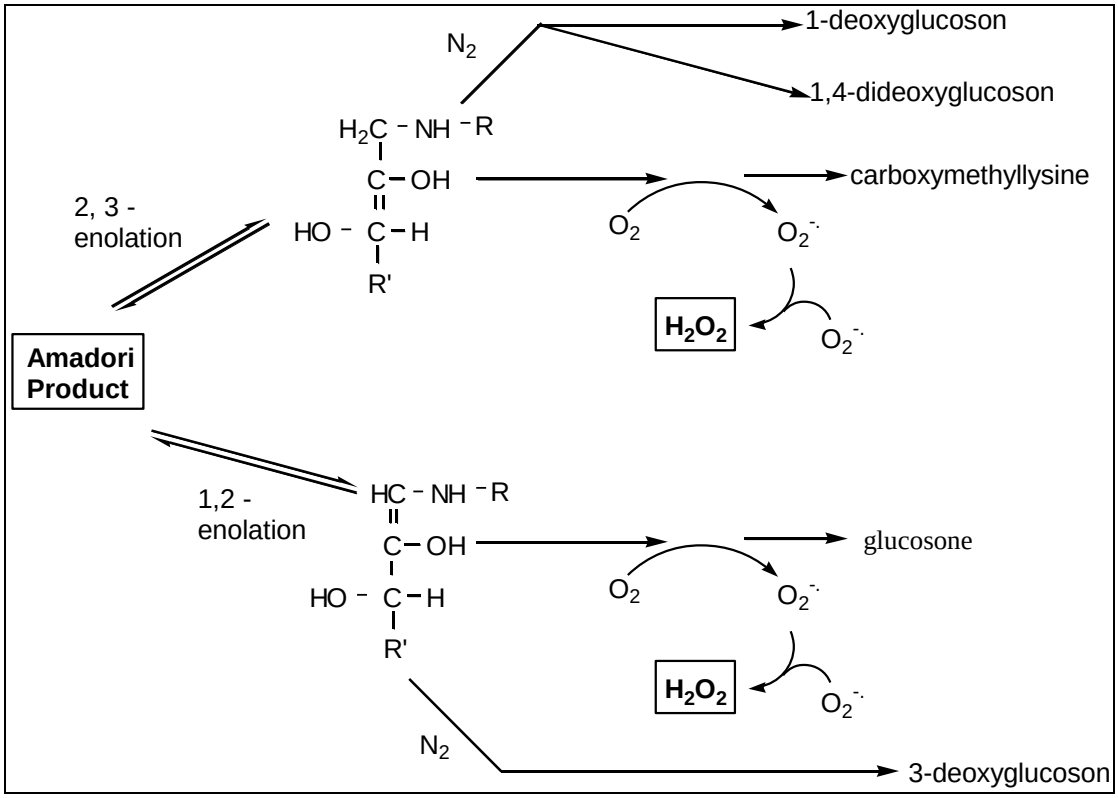
تحدث تفاعلات اضافة واعادة الترتيب وأزالة الهايدروجين و الشطر الغير عكسي للجزيئات, كل هذا ينتج مكونات ذات لون برتقالي غير ذائبة ومعقدات cross-linking تسمى بـ advanced glycosylation end-products (AGEs) كما موضح في



شكل (٩.١) الـglycation الأنزيمي(Wolff *et al*. ١٩٩١)

٥.٧.١ أنتاج الجذور الحرة بواسطة non-enzymatic glycosylation

النواتج الأميدورية (Amadori products) غالبا" ما تتناول الـــ non-enzymatic glycosylation للبروتينات, هذه المركبات تتضمن توليد بيروكسيد الهايدروجين (H_2O_2) ,حيث أن هناك مسارين لذلك كما في الشكل التـــالي:- (Simon *et al.*,١٩٩١)



شكل (١٠.١) عملية تحطيم الناتج الأمودوري وتكوين بيروكسيد الهايدروجين .(توليد بيروكسيد الهايدروجين عن طريق كلا" من ١.٢ أو ٢.٣ لـ Enolization وأكسدة Enolate Anion) .

فالمسار الأول يعرف بمسار الـ ١,٢-enolization يؤدي إلى توليد ٣-deoxyglucosone بغياب الأوكسجين (anaerobic conditions) حيث يحدث التخمر مكونا" بيروكسيد الهايدروجين (H_2O_2) والكلوكوسون (glucosone).

أما المسار الثاني يعرف بمسار الـ ٢,٣-enolization يؤدي إلى توليد ١-deoxyglacosone و١,٤-deoxyglacosone بوجود الأوكسجين (oxidative conditions).ليكون الناتج enediol ٢,٣ بالأضافة الى كل من H_2O_2 و carboxy methyllysine .

أن التفاعل الأساسي لـ non-enzymatic glycosylation هو٣-deoxyglacosone حيث يمتلك رابطه فعالة cross-linker تستجيب لبلمرة البروتين الى AGEs advanced glycation endproducts). حيث أن نهاية الناتجglycosylation المتقدم(هو ناتج تفاعل

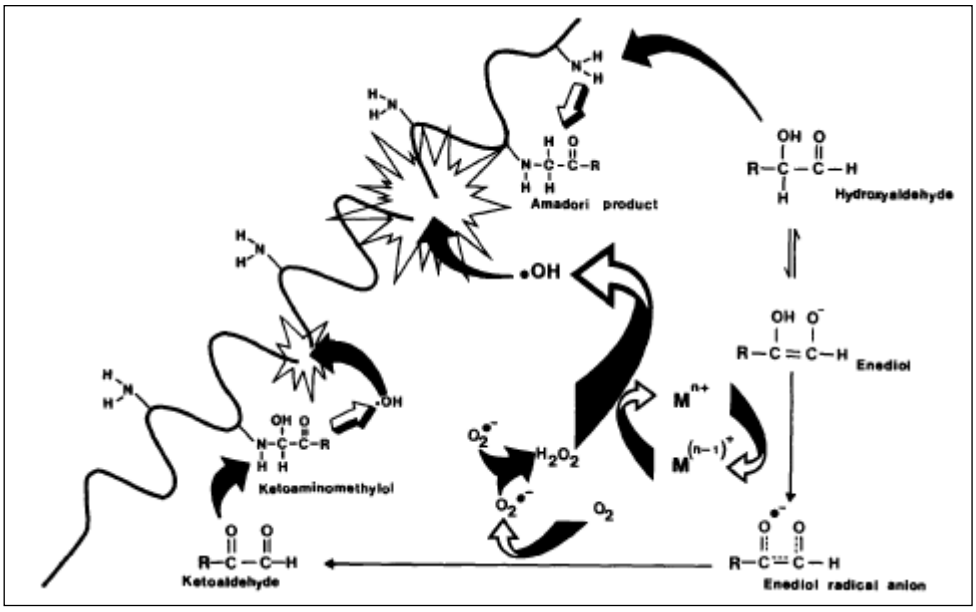
كيتوألدهايدات ketoaldehyde لبروتينات مختلفة تدعى في بعض الأحيان بنواتج ميلارد maillard products) يبقى ثابت كرابط في الجزيئات الموجودة في النسيج.

حيث أن AGEs مستقرا" على طول التجمع الجزيئي للنسيج ,أما أذا كان النسيج في حالة غير طبيعية فأنه ينتج رابطة فعالة للـAGEs للبروتينات ترتبط مع تجمع جزيئي آخر. (Simon *et al.*,١٩٩١)

٦.٧.١ أنتاج الجذور الحرة بواسطة الاكسدة الذاتية Autoxidation

بالأضافة الى حدوث تفاعل الـ glycosylation المباشر فأن السكريات الأحادية والـ Fructose يمكن أن يختزلا جزيئة الأوكسجين تحت ظروف فسلجية طبيعية.

الـ Superoxide وجذور الهايدروكسيل وبيروكسيد الهايدروجين تكون نواتج عملية أختزال الأوكسجين في تفاعل الـ Autoxidation ,جميع هذه النواتج يمكنها تحطيم البروتينات وكذلك الدهون كما موضح في الشكل التالي:- (Simon *et al.*,١٩٩١)

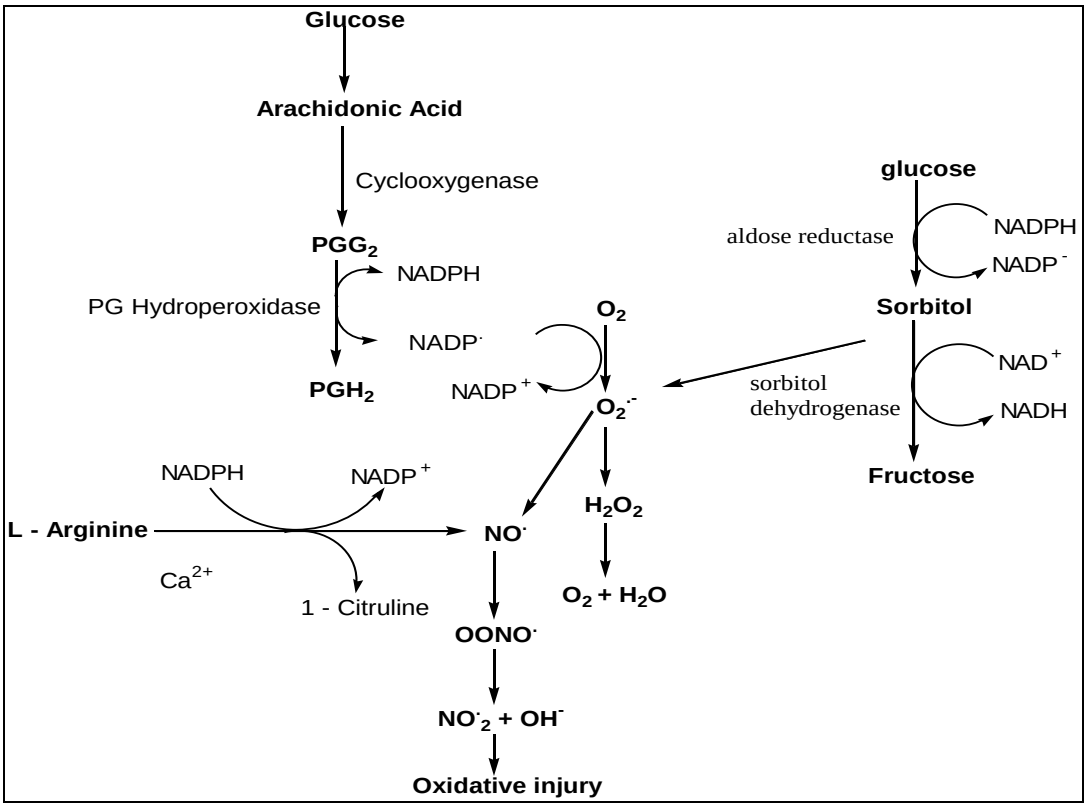


الشكل (١١.١) **توزيع الـ Glucose Autoxidation وأنتاج جذر الهايدروكسيل من تحطيم الكلوكوز. حيث يكون توزيع الجذور الحرة مابين الـ Autoxidation Ketoaldehyde-Amine والتحطيم الحاصل في الوحدات الخاصة Site-Specific.**

تعجل الجذور الحرة نواتج الـ Advanced glycosylation end وان هذه النواتج تزيد من توليد الجذور الحرة وهذه العملية تعرف بالـ Glucose Autoxidation.

٧.٧.١ أنتـاج الجـذور الحـرة بواسـطة طريـق متعـدد الهايدروكسـيد Polyol Pathway

تؤدي طريقة تكون الـ Polyol الـى أنتـاج الجذور الحرة , فـالتوازن بمستويات الكلوكوز داخل وخارج الخلايا يؤدي الـى زيـادة مقدار الـ Sorbitol و الـ Fructose ممـا يسبب حث الـ aldose reductase و زيادة فعالية الـ Sorbitol dehydrogenase كما موضح فـي الشكل التـالي :- (Baynes,١٩٩١)



الشكل (١٢.١) يمثل طريقة تخليق الـPolyol :فالـ aldose reductase يحفز عملية الأختزال فـي الكلوكوز بواسـطة الـ NADPH وتحويلـه الـى Sorbitol وبـالعكس يتحـول الـى الـFructose بواسـطة الـ(SDH) Sorbitol dehydrogenase مما يؤدي الى حدوث توازنالاكسدة والاختزال redox ويتم ملاحظته من خلال (نسبة NAD+/ NADH) ,أن الزيادة في النسبـــة (NAD+/ NADH) ترتبط بتحرير الأوكسجين عن طريق أختزال في الـPGG٢ الى البروستكلاندين ثنائي الهايدروجين PGH٢ بواسطة hydroperoxidase بأستخدام الـ NADH أو NADPH كمادة أساس مؤكســـــــــــــــــــدة .(Baynes, ١٩٩١)

٨.٧.١ الجذور الحرة وأسباب مرض السكري

ان السـبب الحقيقـي وراء حـدوث مـرض السـكري لـم يعـرف لحـد الآن وقـد تناولـت الدراسـات الحديثة موضحة أن الجذور الحرة المتولدة بكمية كبيرة تؤدي لحدوث السكري. (Colman *et. al.* , ١٩٨٩)

ففي النوع الأول لمرض السكري : تتعرض خلايا β الى التحطيم بواسطة الجذور الحرة بسبب طبيعة مضادات الأكسدة الغير فاعلة .

يعتقد ان الخلايا المناعية مثل macrophages, T-cells,nature killer cells B-cells جميعها يولد جذور حرة تعمل على تحطيم خلايا β وهنالك ميكانيكيتين لتحطيم تلك الخلايا (Zhao, ٢٠٠١) هما:-

١. يعد الـ superoxide anion($O_2^{\circ -}$) المنتج كجذر حر اولي ويتحول الى جذر حر اكثر فعالية مثل جذر الهيدروكسيل(OH°) والذي يهاجم الاغشية الخلوية ويسبب تحطم الـ DNA , أذا فشلت الخلايا في اصلاح الضرر الحاصل بالـ DNA واستمرت بالتحطيم فان فعالية الانزيمات الخاصة باصلاح DNA تخفض من مستوى الـ DNA في الخلية.

كذلك يثبط إفراز الأنسولين بسبب تشوه الـ DNA مما يجعل الخلايا أكثر حساسية للجذور الحـــــــرة . (Colman *et al.* , ١٩٨٩)

٢. تتحرر السايتوكينات Cytokines بواسطة خلايا T والخلايا البلعمية (المايكروفايج) (macrophages) وخلايا NK خلال عملية تكوين الأنسولين وتحث لتكوين جذور حرة داخلية تتسبب في تحطيم أنتقائي لخلايا بيتا. (Gerbitz, 1992)

بالأضافة الى أن(ITFע) Interferonע والـtumor necrosis factor (TNF) لتحرر المايكروفايج خلال عملية تكوين الأنسولين هذه السايتوكينات تحث الجذور الحرة الداخلية في خلايا البطانية الداخلية للنسيج الليفي لخلايا β .

هنالك ثلاث أنواع من الجذور الحرة تحث من هذه الخلايا وهي الـ$O_2^{\circ -}$ وال$OH^{\circ -}$ وجذور الـNO° . (Corbett & McDaniel, ١٩٩٥)

تحث خلايا الـ(IL-١β) Interleukin ١ أنتاج أنزيم NOSوالذي بدلا"من تكوينNO فقط سوف يحث على تكوين الـ NO° .

أقترحت العديد من الدلائل بأن نتائج الـNO تتأثر تثبيطيا" بصورة غير مباشرة بخلايا β بالمايتوكوندرية لذلك فأن الـNO° سوف يحطم خلايا β. (Gerbitz, 1992)

أما في النوع الثاني: من السكري يسببه خلل الجينات الغير طبيعية أو المؤثرات البيئية أو السمنة والتي تعمل على مقاومة الأنسولين و تعطيل وضيفة خلايا β .

كشفت بعض الدراسات بأن الخلل في هذا النوع يعود الى عدم التكافؤ بين توليد الجذور الحرة وأنزيمات مضادات الاكسدة, حيث ان فعالية الجذور الحرة في النوع الثاني من السكري تمتاز بكونها اكبر من امكانية مضادات الاكسدة في تحديد والغاء تأثير تلك الجذور .(Collier *et al.* , ١٩٩٢).

٨.١ مضادات الأكسدة Antioxidant

يمكن تعريف مضادات الأكسدة بأنها أي مادة تستطيع أن تمنع التأكسد الذي قد يحصل في المواد الفسلجية الحية الموجودة داخل الخلايا كالبروتينات والدهون والكاربوهدرات والـDNA (Lunec,١٩٩٠).

وكذلك عرفت مضادات الأكسدة من قبل (Bagchi and Puris) بأنها تلك الجزيئات المستقرة التي تمنح إلكترون إلى الجذر الحر فيصبح مشبعا" فتقلل قابليته على التفاعل.(Bagchi and puris, ١٩٩٨)

وهناك صنف اخر من مضادات الاكسدة تعمل ككاسحات Scavangers للالكترونات وخاصة المركبات التي تحتوي على نظام التبادل الالكتروني , لذلك فأن لها ميكانيكيات دفاعية ضد الجذور الحرة الـ ROS وRNS, وهذه الميكانيكيات تتضمن الأنزيمات مثل الكلوتاثايونredactase GSH(Frei,١٩٩٩) والفيتامينات مثل فيتامين C and E . (Betty *et al*, ٢٠٠١)

يتضمن عمل مضادات الأكسدة تثبيط فعالية الأوكسجين الحر أوأكتساح الـ ROS وRNS أوتثبيط تكون الـ ROS وRNSأوالارتباط مع الأيون المعدني الضروري لتحفيز توليد الـ ROSوRNS.(Halliwell & Gutteridge ,١٩٩٩)

تولد الجذور الحرة جهدا" على الجزيئات يدعى جهد الأكسدة (Oxidative stress) حيث يعتقد بأن له دور كبير في تمزق النسيج أو خلايا الجسم(Rechard,١٩٩١)التي غالبا"ما تحصل في مرض السكري وامراض الاوعية الدموية والقلب وبعض الأمراض الآخرى.(Betty *et al*, ٢٠٠١)

١.٨.١قياس جهد الأكسدة Measurement of Oxidative Stress

هناك طريقتين لقياس جهد الاكسدة : -

أ – من خلال قياس تركيز مضادات الاكسدة .

تكون مضادات الأكسدة وسيلة لمعرفة مدى زيادة تكون الجذور الحرة بصورة متصاعدة في الجسم والتي تسبب زيادة في عمليات التحطيم للجزيئات الحيوية (Asim ,٢٠٠٤), هذه الظاهرة يعبر عنها بمصطلح جهد الأكسدة (Oxidative stress) (Cited in Oda, ٢٠٠٣) يمكن تعيين تركيز نواتج مضادات الاكسدة وبالتالي تحديد مستوى جهد التأكسد .

تأثير جهد المؤكسدات على بعض الجزيئات الحيوية والانزيمات والجزيئات العضوية للجذور الحرة داخل الجسم لها عمر نصف صغير جدا" لذلك يكون من الصعب قياسها مباشرة لذلك تستخدم تقنية

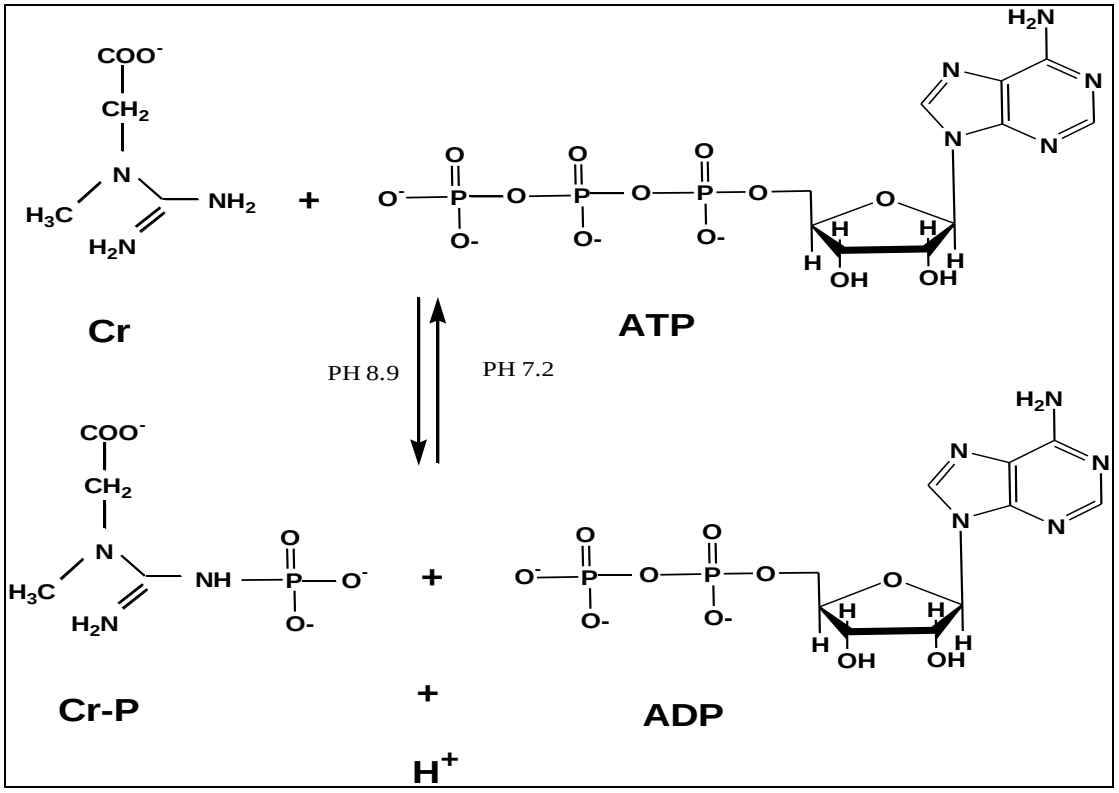
برم الإلكترون الرنيني (ESR) الذي يقيس تذبذب الالكترون وتعتمد هذه التقنية على تحويل الجذرالحرالى جزيئات أكثر استقـــــــــــرارا" (Cited in Abdulsamie, ٢٠٠٣), حتى يمكن قياسها من خلال ادخاله على بعض الجزيئات التي تقوم بوظيفة الجزيئات الكاسحة Scavang molecules وتدعى تلك الجزيئات في الكيمياء العضوية بالجزيئات القانصة Traping molecules وتمتاز باحتوائها نظام تبادل الكتروني عالي يمكنها من خلال هذا النظام احتواء الالكترون المنفرد (الحر) لفترة اطول يسهل على جهاز ESR من تحسس تذبذبه. Cedreberg, (٢٠٠١)

٩.١ أنزيم الكرياتين كاينيز

Creatine Kinase (CK, EC ٢.٧.٣.٢)

يعتبرأنزيم CK من الإنزيمات الناقلة (transferases)(Cited in Kouji *et al* , ٢٠٠٥) حيث يقوم بنقل مجموعة الفوسفات مع اعتبار مجموعة النيتروجين كمجموعة مستلمة ويسمى (Creatine kinase) او(Creatine phospho kinase)(Al-Toma and Al-, ٢٠٠١ Mudaffar)

ويقوم هذا الإنزيم بدور أساسي ومهم في عمليات انتاج الطاقة الحياتية(Christele *et al* ,١٩٩٨) فهو يقوم بنقل مجموعة الفوسفات من المركب فوسفات الكرياتينCreatine phosphate إلى ثنائي فوسفات الادينوسين (ADP) لتكوين ثلاثي فوسفات الادينوسين (ATP) والكرياتين (Creatine) وبالعكس كما هو موضح ادناه :-



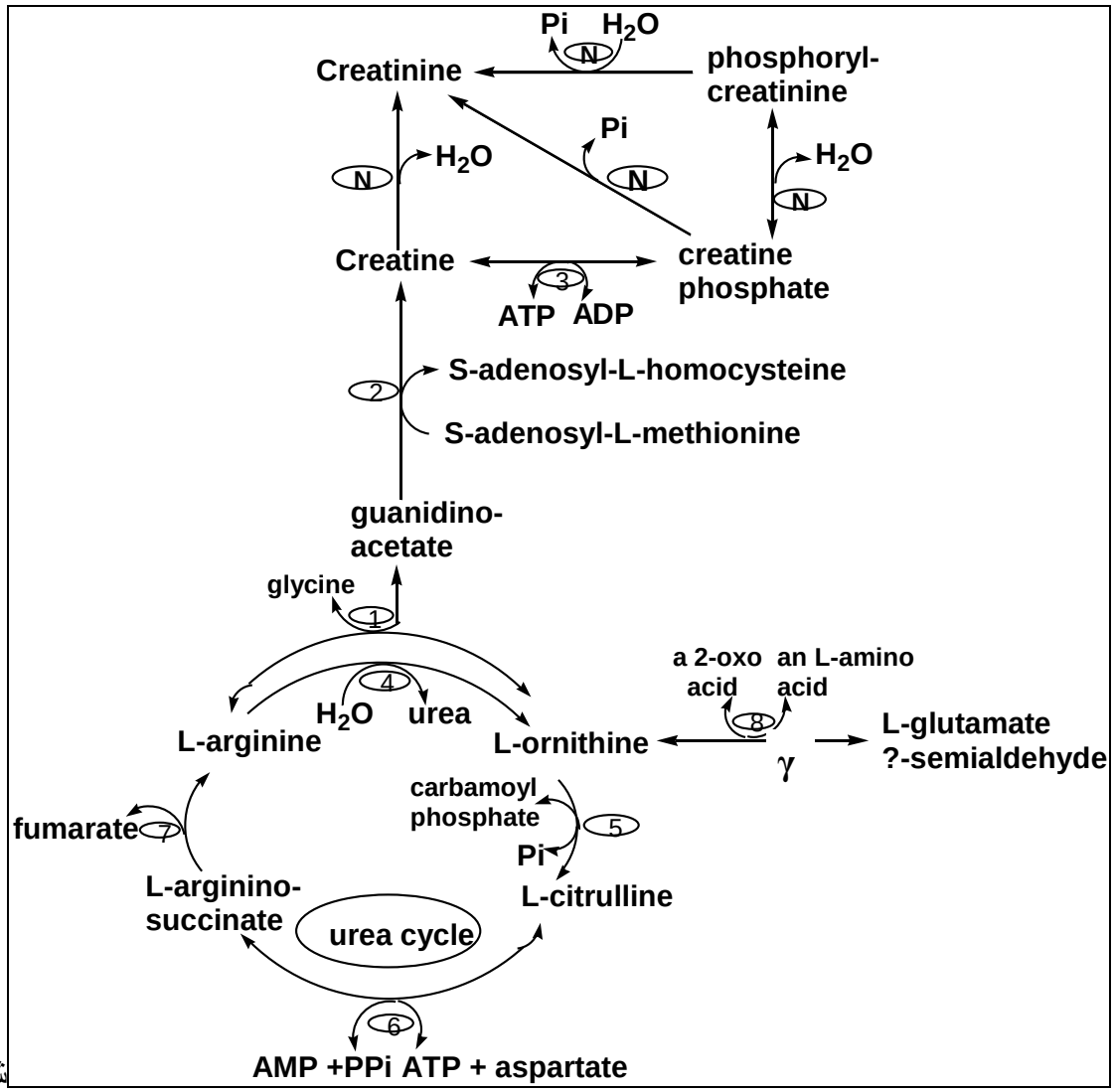
شكل (١٣.١) معادلة عمل انزيم الكرياتين كاينيزفي خزن وتحرير الطاقة .

جرت عدة دراسات شخصت من خلالها ثلاث متناظرات (isoenzymes) للأنزيم (CK) نتيجة لاحتوائه على سلسلتين ببيتيدية(subunits) احدهما تصنع في خلايا الدماغ ويرمز لها(B subunits) والاخرى مصدرها العضلات ويرمز لها ب(M subunits).

لاحظ (Wood) ١٩٦٣ وجود أختلاف في نمط الهجرة الكهربائية لانزيم (CK) المستخلص من الدماغ (Brain) والانزيم المستخلص من الهيكل العضلي (skeletal muscle) ثم جاء Burger عام ١٩٦٤ ليؤكد وجود ثلاث متناظرات للأنزيم (CK) في مختلف أنسجة الجسم (Burger, ١٩٦٤) تتركز هذه المتناظرات في ثلاث مناطق من الجسم(Yi Liang , ٢٠٠١) في الدماغ المتناظر الإنزيمي المسمى أنزيم الدماغ ويرمز له بالرمز (CK-BB) وينشأ أصلا في الجهاز العصبي المركزي ويوجد بتركيز قليل في مناطق أخرى من الجسم ,كالمعدة, الكبد, الكليتين , الرئتين, وغدة البنكرياس , وكذلك يوجد في الغدة الدرقية, المثانة, غدة البروستات والرحم . (Tsung ,١٩٧٦)

أما في الهيكل العضلي فيوجد المتناظر الآخر المسمى أنزيم العضلة , ويرمز له بالرمز (CK-MM) , وتكون نسبة وجوده في العضلات ١٠٠% وكذلك يوجد في عضلة القلب بنسبة ٧٠% أما المتناظر الثالث ويكون هجيني(١٩٩٦, Philipp *et al*) يتكون من سلسلتين ببتيدية أحدهما من المتناظر(M subunits) والآخرى من المتناظر

(B subunits) ويسمى أنزيم القلب ويرمز له بالرمز(CK-MB) ويوجد في عضلة القلب فقط بنسبة ٣٠%.(٢٠٠٥, Pushpa et al)



شـــكل(١٤.١) التفاعلات والأنزيمات الداخلة في العمليات الأيضية الكرياتينية.حيث N هي Nonenzymatic reaction. (Pushpa ***et al*** ,٢٠٠٥)

١.٩.١ استقرارية إنزيم الكرياتين كاينيز Stability of CK

يعد إنزيم الكرياتين كاينيز من الإنزيمات غير الثابتة (Unstable) حيث يقل نشاط الإنزيم بمرور الزمن نتيجة لتأكسد مجموعة الثايول (SH–) الموجودة في بعض الحوامض الامينية المكونة للسلسلة البيبتيدية وتكوين أصرة (–S–S–)بين السلسلتين وللحفاظ على نشاط الإنزيم في مصل الدم يحفظ النموذج مع احد المركبات العضوية الحاوية على مجموعة(SH–) مثل (Cysteine,Glutathione,Mercaptoethanol) وغيرها .

وكذلك لوحظ عدم حدوث أي تغير في نشاط الإنزيم عندما يحفظ مصل الدم منجمدا ولمدة شهرين أو أكثر . (Philipp *et al* ,١٩٩٦)

٢.٩.١ تأثير الجذور الحرة على أنزيم الكرياتين كاينيز

Effect of Free Radical on CK

يلاحظ حدوث تثبيط في أنزيم الكرياتين كاينيز CK عند وجود أي شكل من أشكال الأوكسجين الفعالة (ROS) أو الجذور الحرة.

أن جهد الأكسدة oxidative stress يعمل على زيادة في طرح الحديد من البروتين المخزون.حيث أن هذا الحديد يحفز تفاعلات الجذور الحرة , ان أيون الحديدوز يقوم بتحفيز الشكل الغير فعال للانزيم للـ inactivation form CK–MM للأرنب بواسطة الـH_2O_2 أو أوكسيد الزانثين xanthine oxidase / hypoxanthine, وحينما يختزل الحديدوز بواسطة جذور ايون السوبر اوكسايد $O^{\circ-}_2$ يكون التأثير كبير على تحضير الشكل الغير فعال للانزيمCK- MM وكذلك وجد بأن الحديد يثبط مباشرا" أنزيم الكرياتين كاينيز من خلال ارتباطه مع مجموعة الثايول فان انخفاض الفعالية للانزيم متأتية من الاكسدة الحاصلة على مجموعة (SH–) sulfhydryl group الموجودة في الموقـــــــع الفعال للأنزيـم. (Pushpa et al ,٢٠٠٥)

١٠.١الكلوتاثايون Glutathione

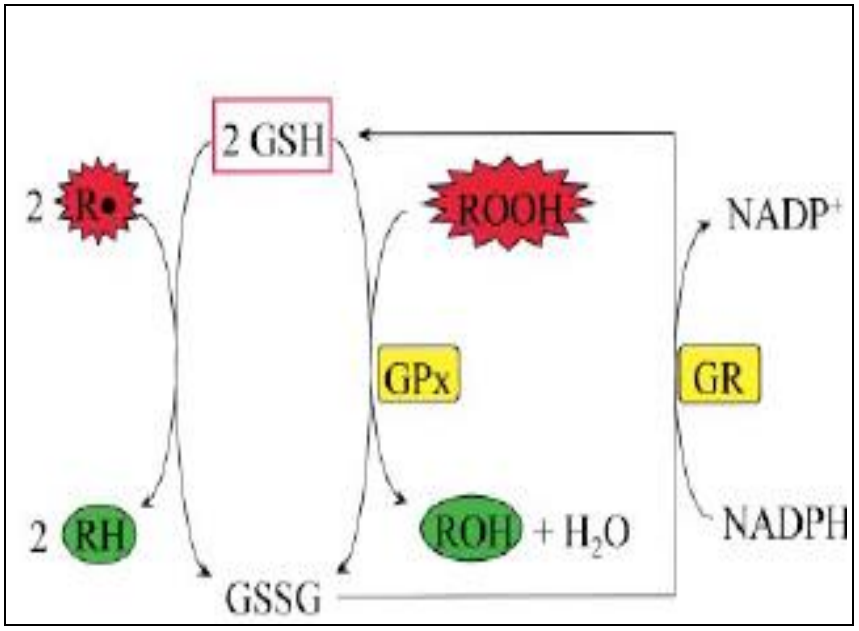
هو ببتيد ثلاثي يتكون من ثلاثة احماض امينية وهي glycine و cysteine وglutamate. ( ) Ralf Dringen, ٢٠٠٠ يدخل في عدد من العمليات البيولوجية تتضمن النقل للحوامض الامينية , الايض, الدفاع عن الجسم من السموم الداخلية والخارجية وهـــو مضاد أكســدة فعال ويتواجد فــي الأنسجة الحيوانية والنـــــباتية الحيـــــــــــــــــــــة.(Francesca Salvemini,١٩٩٩)

وان عملية الاكسدة والاختزال مبنية على التغير العكسي التي تحدث بين جزيئين من الكلوتاثايون حيث تعتمد على تحويل جذرالثايول G—SHالشكل المختزل الى G-S—S-G الشكل المؤكسد .(Douglas *et al*,٢٠٠٢)

وقد تبين بان التوازن لهذا الببتيد الثلاثي في الخلايا الحية يحدث بحيث يشكل النوع المختزل منه G-SH الجزء الأكبر(Harapin *et al*,٢٠٠٠)مع العلم أن كلا النوعين يوجد في الخلية في أي لحظة لوجود عمليات الاكسدة والاختزال المستمرة . (Yangxin,٢٠٠١)

الكلوتاثايون له أهمية خاصة في تلك الأعضاء من الجسم المتعرضة للسموم والاتية من الطعام او الشراب وهذه الأعضاء هي الكبـــد والكليتين و الرئـــتين و الأمعاء(Frank and Teresa,١٩٩٧) .

من خلال النظر الى مضادات الاكسدة نستطيع القول ان الكلوتاثايون لايقلل كمية التحطيم بالجذور الحرة فقط بل انه يمنع استنزاف مضادات الاكسدة الاخرى,كما في اعادة حيوية فيتامين C , كذلك يعتبر مـــادة اساس للكثير من انزيمات مضادات الاكسدة الحيوية.(Schulz et al,٢٠٠٠)



الشكل(١٥.١) تفاعلات الاكسدة و الاختزال للكلوتاثايون.

أهم انواع انزيمات الكلوتاثايون هو GSH-s transferase, GSHPx اللذان يعملان داخل الكبد لذلك فان صحة الكبد وبعض الاعضاء الاخرى في الجسم تعتمد على الكلوتاثايون, حيث اشارت الدراسات الطبية الى ان الكلوتاثايون يحمي الكبد ضد التاثيرات السمية للاشعاع والعلاج الكيمياوي.(Svenja *et al*, ٢٠٠٢)

الكلوتاثايون هو المكون الخلوي الاساسي للمركب sulfhydryl وكذلك فان له وظائف بيولوجية عديدة مثل المحافظة على الشكل المختزلة له وله وظائف تحفيزية, ايضية , ناقلة وحماية الخلية ضد المركبات الغريبة والجذور الحرة و(Reactive oxygen species (ROS. (Katalin *et al*) ,١٩٩٦

يقوم الكلوتاثايون كمركـــــــب فعال في التفاعلات البايوكيميائية بتحطيم H_2O_2 والبيروكسيدات الاخرى .بالاضافة الى كل هذا يعتبر الكلوتاثايون مرافق انزيميco-enzyme للعديد من الانزيمات مثل الكلوتاثايون بيروكسيديز(GSHPx) الذي يحفز الفعالية المضادة للسائل الخلوي .(John *et al* ,١٩٩٩)

أكدت الدراسات الفسلجية بان الكلوتاثايون يعمل كمضاد للأكسدة حيث بالامكان معرفة مستوى الأكسدة من خلال مستوى الكلوتاثايون غير الطبيعي(الشكل المؤكسد). (١٩٩٦, Katalin *et al*)

أن استنزاف GSH هو من أهم المؤشرات لظهور الامراض مثل عجز الكلية المزمن والسكري كذلك يتاثر مستوى GSH عند مدمني الكحول وكذلك الإمراض المعدية حيث ان هذه الإمراض تحررعوامل الأكسدة. (Ewadh and Jaber , ٢٠٠٢)

١.١٠.١ تأثير الجذور الحرة على الكلوتاثايون

Effect of Free Radical on Glutathione

يعمل Thiol redox في التفاعلات كمانح سهل لذرة الهايدروجين وان مجموعة Thiol تكون فعالة جدا نحو الجذور الحرة المؤكسدة حيث ان ذرة الهايدروجين تقوم بوظيفة عامل مضاد للاكسدة .وكما يلي :-

أولا":- تفاعلات ذات الالكترون الواحد

يتفاعل الكلوتاثايون مع الجذور الحرة لينتج الكبريت مركز للجذر الحر في الكلوتاثايون (GS˙center free radical) .

$$GSH + R^{\circ} \longrightarrow GS^{\circ} + RH \quad \text{.....(١)}$$

$$GS^{-} \longrightarrow GS^{\circ} + e^{-} \quad \text{.....(٢)}$$

$$GS^{-} + M^{+n} \longrightarrow GS^{\circ} + M^{(n-1)} \quad \text{....(٣)}$$

ثانيا":- تفاعلات ذات الالكترونين

يتفاعل الكلوتاثايونGSH كايون سالب الشحنة , حيث يتأكسد لانتاج الكلوتاثايون كايون موجب الشحنة GSOH كما في معادلة (٤)

$$\xrightarrow{GS^{-}} GSOH \quad \text{.....(٤)}$$

والاثنان يتحولان الى كلوتاثايون ثنائي الكبريت عن طريق تفاعلات الاكسدة والاختزال كما في معادلة (٥)

$$GS^{-} + GSOH \longrightarrow GSSG + OH^{-} \text{.....(٥)}$$

ثالثا":- يعد الكلوتاثايون عامل مهم في تفاعلات تحويل الدهون المتأكسدة بواسطة الجذور الحرة الى كحولات كما في معادلة (٦) (Katalin *et al* ,١٩٩٦)

GRX

$$2GSH + ROOH \xrightarrow{} GSSG + ROH + H_2O \quad \ldots\ldots(٦)$$

$$2GSH + H_2O_2 \longrightarrow GSSG + 2H_2O \quad \ldots\ldots\ldots(٧)$$

هناك نوعين من GPX الاول المعتمد على السلينيوم selenium يقوم هذا الانزيم بتحفيز تحلل كلا الدهون الهايدروبيروكساید والماء . (Kirk and mason, ١٩٨٨)

يتكونGPX من اربع وحدات صغيرة من البروتين كل واحدة تحتوي على ذرة واحدة من السيلينيوم كوحدة فعالة .

يسمى النوع الثاني بيروكسيد الدهون المفسفرة PhGx المعتمد كذلك على selenium وهذا النوع يعمل كغشاء لربط ROOH مع الكولسترول cholesterol - OOH .

رابعا":- الكلوتاثايون كمادة اساس لانزيم Reductase

يشارك الكلوتاثايون في اختزال dehydro ascorbate متحولا " الىascorbate بتفاعلات اكسدة واختزال , كما في معادلة (٨) (Katalin *et al* ,١٩٩٦)

$$\text{Dehydro ascorbate} + 2GSH \longrightarrow GSSG + \text{ascorbate} \ldots\ldots..(٨)$$

للمحافظة على التوازن بين GSH,GSSG حيث يختزلGSSG الى GSH بواسطة الانزيم المختزل الكلوتاثايونGlutathion reductase ويدخل في تفاعل (NADPH) كعامل مساعد . (Katalin *et al* ,١٩٩٦)

$$GSSG + NADPH \xrightarrow{+H^+} 2GSH + NADP^+ \quad \ldots.(٩)$$

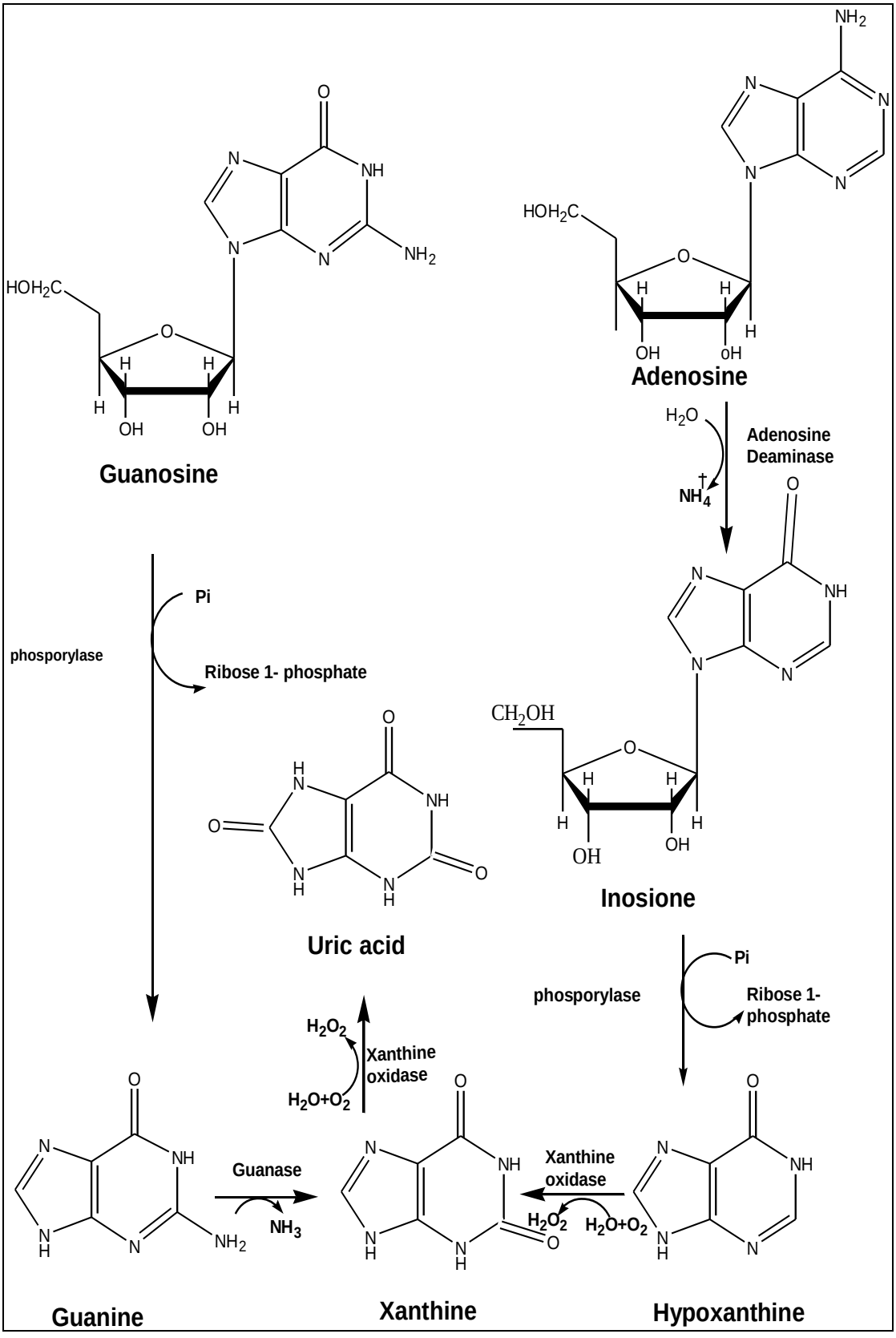
خامسا":- الكلوتاثايون ككاسح للجذور الحرة

في عام ١٩٩٣ لخص الباحث Buettner الجهود الكهربائية المختزلة كوحدة انتقائية لمضادات الاكسدة والجذور الحرة (reduction potentials of selected set of available antioxidants and free radicals حيث يعمل الكلوتاثايون كمضادات الاكسدة على اكتساح معظم الجذور الحرة مثل $HO^{\cdot}$, $O_2^{\cdot -}$ والكاربونات والاوكسجينات الاخرى والجذور الحرة ذات النايتروجين المركزي متحولا" الى $GS^{\cdot}$ مستقر نسبيا .(Cited in Hadwan, ٢٠٠٥)

١١.١ حامض اليوريك Uric Acid

يعتبر حامض اليوريك في الجسم هو الناتج النهائي لتمثيل القواعد البيورينية الاتية من الطعام والحوامض النووية .(Kirk and mason, ١٩٨٨)

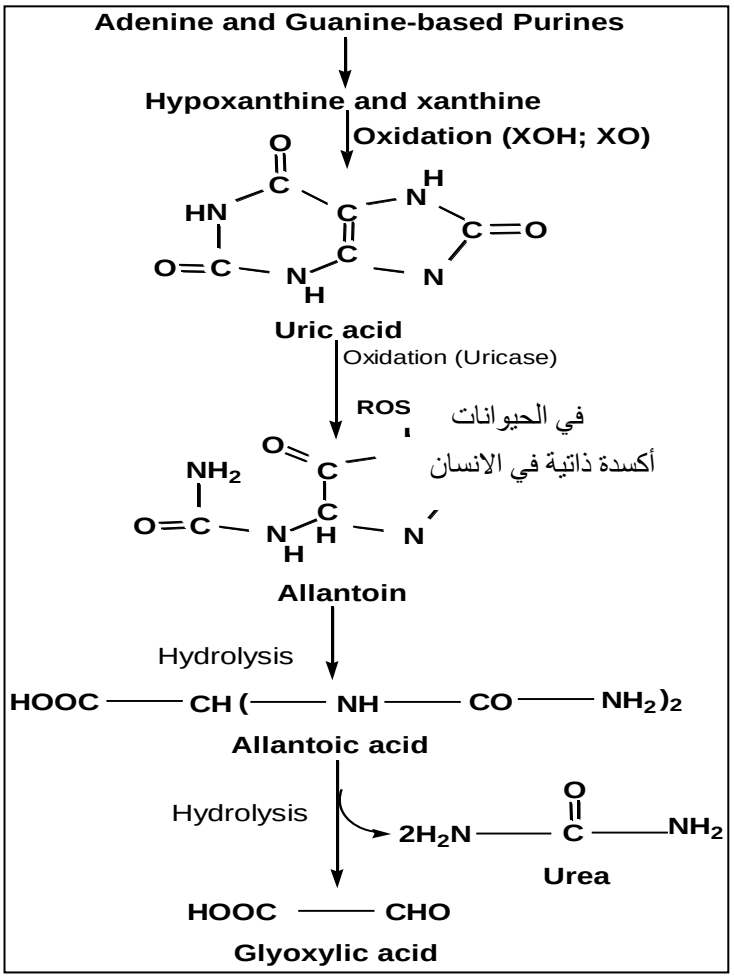
حامض اليوريك حامض ضعيف (pk_a ٥.٨) , يوجد في السائل الخارج خلوي extracellular fluid , يطرح جزء منه في البول, والباقي يفرز إلى الأمعاء ليحلل بواسطة البكتريا حيث إن زيادة نسبته تؤدي إلى تقليل كفاءة الإنزيمات(Seppo, ١٩٩٨), ويتكون بايولوجيا"حسب المخطط التالي :



شكل (١٦.١) حامض اليوريك كناتج نهائي للقواعد النايتروجينية (Seppo, ١٩٩٨)

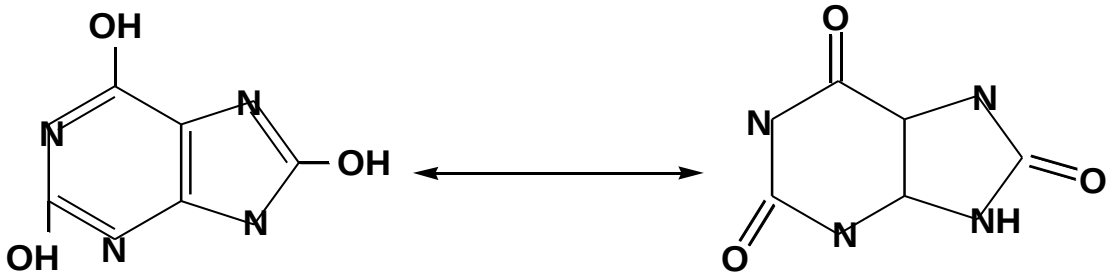
يمتلك حامض اليوريك خصائص كاسحات الجذور الحرة لاحتوائه على نظام التبادل الالكتروني ويوجد هذا المركب في البلازما بتراكيز عالية حسب الجنس وكما موضح في الشكل (١٧.١)

(Kirk and Mason, ١٩٨٨) ان زيادة تكون حامض اليوريك يؤدي الى مرض داء النقرص(داءالمفاصل) .



الشكل (١٧.١) يمثل خطوات تحلل حامض اليوريـــــك (*Zitnanova et al.* ,٢٠٠٤)

ان حامض اليوريك لـه اشكال تركيبيـة متعـددة (tautomeric structure) تسـاهم فـي زيـادة سـعة الاكتسـاح للجـذور الحـرة وهـذه التراكـــيب تعطيه صـــفة كمضاد اكسدة .(Donald *et al.* , ٢٠٠٢)

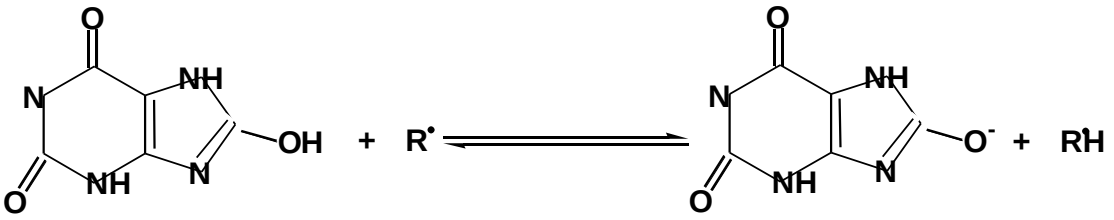


Lactim form **Lactam form**

١.١١.١تفاعلات حامض اليوريك مع الجذور الحرة

The raction of uric acid with free radicals

١. تفاعل حامض اليوريك مع جذور الالكيل كما في الشكل التالي:- (Simic & Jovanovic, ١٩٨٩).



٢. تفاعل حامض اليوريك مع جذور البيروكسي كما في المعادلة التالية:-

$$ROO^{\circ} + UH_2^{-} \longrightarrow ROO^{-} + UH^{\circ -} + H^{+}$$

٣. تفاعل حامض اليوريك مع جذر NO_2°

يتفاعل حامض اليوريك مع جذر $NO_2^{\cdot}$ حيث يعمل على تعطيل فعاليته كما في المعادلة التالية:-

$$NO_2^{\circ} + UH_2^{-} \longrightarrow NO_2^{-} + H^{+} + UH^{\circ}$$

بما أن حامض اليوريك هو كاسح جيد للجذور الحرة لذلك فهو يلعب دور كبير في حماية الأعضاء من خطر الأكسدة Oxidative damage. (Simic & Jovanovic, ١٩٨٩)

١٢.١ بيروكسيدات الدهون Lipid peroxidation

الدهون هي مجموعة من المركبات الغير متجانسة (heterogeneous) تمتلك عدة وظائف مهمة داخل جسم الإنسان باعتبارها مصدر أساسي للطاقة , وكذلك جدار الخلية والنسيج العصبي.

عندما تتأكسد الدهون بدون طرح طاقة فأنها تصبح غير مشبعة بسبب الأكسدة عند حصول تفاعل مباشرة مع جزيئه الأوكسجين , ان هذه العملية تكون بيروكسيدات الدهون.

ان بيروكسيدات الدهون هي حوامض شحمية متعددة غير مشبعة (poly unsaturated fatty acid (PUFA)) تحتوي على ذرتين اوكسجين. (Muslih *et al* ,٢٠٠٢)

١.١٢.١ تكوين جذر البيروكسيل الدهني

Formation of Lipidperoxid Radical (LOO°)

يتكون بيروكسيد الدهون عندما يزيل أحد أشكال الجذور مثل جذر الهيدروكسيل ($OH^{\cdot}$) هايدروجين الأليلي لينتج جذر الدهون ($L^{\cdot}$) Lipid radical , يتفاعل هذا الجذر مع الأوكسجين معطيا" جذر بيروكسيل الدهني ($LOO^{\cdot}$) حيث أن هذا الأخير يكون ذو خواص فعالة جدا" يمكن أن يتفاعل مع الحوامض الشحمية الغير مشبعة مكونا" كاربون متمركز الجذر الحر, بواسطة تكوين آصرة مزدوجة أو طرح ذرة الهيدروجين من الحوامض الشحمية.

$$L - H + X^{\cdot} \longrightarrow L^{\cdot} + XH$$

وبصورة آخرى تحدث عملية أعادة ترتيب جزيئية بعد تشكيل كاربون متمركز الجذرالحر.

فجذر بيروكسيد الدهون يطرح ذرة هدروجين أليلي من جزيئة شحمية آخرى ,(مثل الحوامض الشحمية الغير مشبعة (PUFA) ليتشكل بيروكسيد الهايدروجين الشحمي و الجذر الدهني الثاني $L^{\cdot}$, والذي يسلك نفس مسار تفاعل الأول ليكون بيروكسيد الهايدروجين الدهني ليكون $LOO^{\cdot}$ قادرا"على طرح ذرة هايدروجين من ذرة آخرى و التي تسبب تكوين بيروكسيد الدهون .

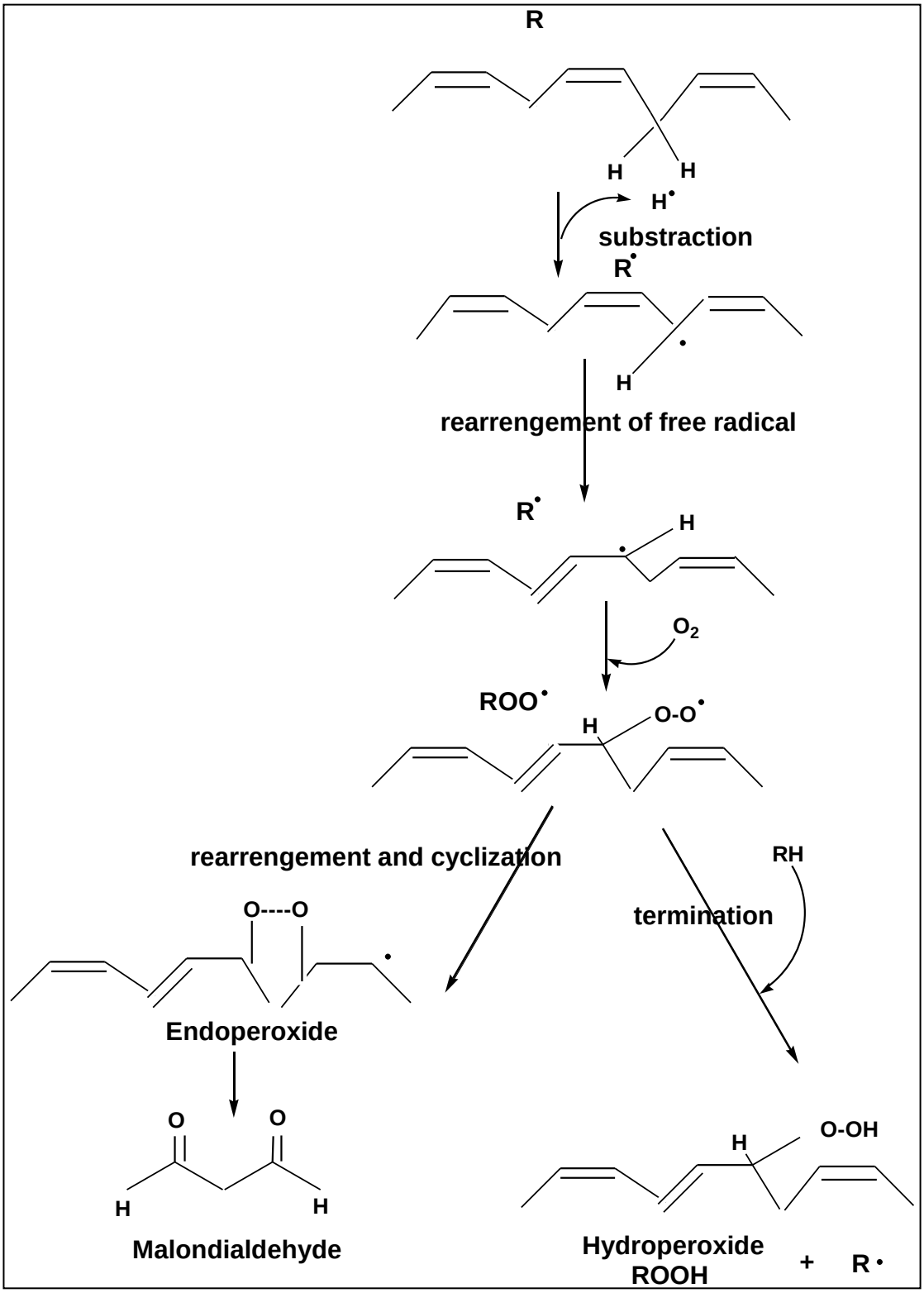
أن تشكيل جذر الكاربون يستمر بتفاعل أضافة الأوكسجين مكونا" جذر بيروكسيلي آخر لذلك فأن سلسلة التفاعل بيروكسيد الدهون سوف تستمر , ان جذر البيروكسيل المتكون سوف يرتبط مع ذرة الهايدروجين معطية بيروكسيدات الهايدروجين الشحمية لايقاف التفاعل وكما يلي (Mc Cay *et al*. ,١٩٨٤)

$$LOO^{\cdot} + L - H \longrightarrow LOOH + L^{\cdot}$$

$$L^{\cdot} + O_2 \longrightarrow LOO^{\cdot}$$

هذه السلسلة سوف تستمر وأن معدل استمرارها يعتمد على عدة عوامل وهي تركيز الأوكسجين وكمية وجود مضادات الأكسدة .(٢٠٠٢, Muslih *et al*)

بيروكسيدات الهايدروجين الشحمية هي جزيئات مستقرة يمكن أن تعاني تفكك decomposition , عند درجات الحرارة العالية أو بوساطة التعرض الى الأنتقالات الايونية (مثل أيونات الحديد أوالرصاص) ان عملية اعادة الترتيبrearrengement التي تحدث لبيروكسيدات الهايدروجين يؤدي الى توليد مركبات معقدة من نواتج بيروكسيد الدهون الثانوية كالغازات الهايدروكاربونية مثل الأثلين أو البنتين والألدهايد مثل المالون ثنائي الالدهايد MDA و-٤ hydroxynonenal.كما موضح بالشكل (١٨.١) (محتواة في المصدر ١٩٩٣ ,Buettner)



شكل (١٨.١) المالون ثنائي الالدهايد MDA كنواتج ثانوية لبيروكسيدات الـــــدهون(Buettner, ١٩٩٣)

١.١٣أهداف البحث

١.دراسة فعالية انزيم الكرياتين كاينيز وتركيز كل من حامض اليوريك , كلوتوثايون, المالون ثنائي ألدهايد MDA في كل من المصل وكريات الدم البيض للأرانب المختبرية من النوع المحلي وباعمار من ٤-٩ شهور والمستحدث فيها مرض السكري.

٢.ايجاد العلاقة بين فعالية أنزيم الكرياتين كاينيز ومضادات الأكسدة (حامض اليوريك , كلوتوثايون) وناتج اكسدة الدهون (المالون ثنائي ألدهايد) في كل من المصل وكريات الدم البيض .

٣.فصل متشابهات انزيم الكرياتين كاينيز CK isoenzymesفي المصل وكريات الدم البيض لمعرفة مستويات أي منها يتأثر بجهد التأكسد في مرض السكري المستحدث في الأرانب.

الفصل الثاني

المواد وطرق العمل

الفصل الثاني

٢.١المواد الكيمياوية

جدول (١.٢) المواد الكيمياوية المستعملة ودرجة نقاوتها ومنشأها.

المواد الكيمياوية	النقاوة	الشركة
Triton x-١٠٠	٩٩.٥	Fluka
Ethylene diamine tetra acetic acid Di hydrate (EDTA).٢H٢O	٩٩.٥	Fluka
Thio barbituric acid(TBA) (٤,٦-di hydro oxy pyrimidine-٢-thiol)	٩٩.٥	Sigma chemical
Methanol (CH_3OH)	٩٩.٨	Fluka
Tris (hydroxyl methylene) Amino methane [٢-Amino-٢-(hydroxyl methyl)-١,٣-propane diol]	٩٩.٥	Fluka
Glutathione(GSH)	٩٩.٥	Biochemcal
٥,٥-Dithio bis (٢-nitro benzoic acid) (DTNB)	٩٩.٥	Sigma chemical

المواد الكيمياوية	النقاوة	المنشأ
Dextran	٩٩	BDH

Cromatst	---	Creatine kinase kit
Biolabo	---	Uric acid kit
Cromatst	---	Glucose kit
Merck	٩٩.٥	Hydrochloric acid(HCl)
Aldrich	٩٩	Sodium hydroxide(NaOH)
Sigma chemical	٩٩.٥	DEAE-cellulose
BDH	٩٩.٥	Magnesiun acetate
Hopkin and willams	٩٩	Trichloroacetic acid(TCA)(CCl_3COOH)
Sigma chemical	٩٩	Sodium chloride(NaCl)

٢.٢ الاجهزة الكيمياوية المستعملة

جدول(٢.٢) الاجهزة المستعملة في البحث .

الاجهزة	المنشأ
Water bathحمام مائي	Karlkole (Germany)

Karlkole (Germany)	جهاز هزاز Vortex mixer
Tecam (England)	حمام مائي هزاز Shaker water bath
Heraeus	جهاز الطرد المركزيCentrifuge
Molton roy (switzorland)	جهاز المطياف Spectrophotometer ٢١
Jenway (Germany)	pH meter جهاز قياس الدالة الحامضية
Hearson (England)	فرنOven
Stanton ٤٦١ (Germany)	ميزان حساس Sensitive balance

٣.٢ الحيوانات المختبرية

أخذت مجموعة من الحيوانات المختبرية وعددها(٤٤) ارنب وقسمت إلى قسمين قسم السيطرة (control) وكان يحتوي على (٢٢) أرنب وقسم الاختبار (test) وكان يحتوي على (٢٢)أرنب .

حيث تم استخدام الذكور فقط في هذا البحث و من النوع المحلي . يتراوح عمر الأرنب بين ٤ شهور- ٩ شهور وبأوزان تتراوح بين (٧٥٠ - ١٧٥٠)غرام .

٤.٢ استحداث داء السكر في الأرانب

منعت (٢٢) ارنبا" [وبأوزان تتراوح بين (٧٥٠ - ١٧٥٠) غرام] من الأكل لمدة ١٨ ساعة ثم حقنت تحت الجلد بالالوكسان المحضر آنيا وعلى مدى ثلاث ايام تمثل ثلاث مراحل لتكون الجرعة الكلية ٤٥٠مل غرام /كغم من وزن الجسم .

ثم تم إعطاء الأرانب محلول كلوكوز (٥٠٪) مع مياه الشرب وذلك بعد الحقن بالالوكسان وفي اليوم الأول فقط ثم تركت الحيوانات لتستريح وتتناول كفايتها من الطعام والشراب

ظهرت اعراض حدوث مرض السكري في الارانب موضوع الدراسة بعد ٧ أيام من الحقن من خلال كشف الكلوكوز بالإدرار بواسطة الشريط الكاشف .

كما تم التأكد من إصابة الأرانب بداء السكر من قياس نسبة السكر في الدم فالأرانب التي أظهرت مستوى كلوكوز أعلى من ٣٠٠ ملغم /١٠٠مل عدت مصابة بالسكر كما ظهرت علامات التعب الشديد وكثرة التبول في الحيوانات المصابة.

٥.٢ سحب عينات الدم

يتم تخدير الحيوانات ارانب السيطرة بواسطة الكلوروفورم (بالشم) ثم يتم سحب الدم من [الحيوانات المتعايشة في البيت الحيواني لمدة (١٠- ١٥) يوم والمتغذية على نبات الجت] بواسطة ابرة رفيعة وتكون كمية الدم المسحوبة بمعــدل (١٠-١٧) مل , كذلك يتم سحب الدم من الارانب المصابة بمرض السكري بعد مرور اسبوع على حقن الالوكسان.

٦.٢ طريقة عزل كريات الدم البيض Isolation process of leucocyte cells

المبدأ

Principle

تـرك الـدم المسـحوب بدرجـة حـرارة الغرفـة لمـدة ٣٠ -٦٠ دقيقـة , سـوف تترسـب كريـات الـدم الحمر أولا لأنها اعلى كثافة من كريات الدم البـيض , وبعـد ذلـك تـتكون طبقـة (Buffy coat) بين طبقة كريات الد م الحمر إلى الأسفل والمصل إلى الأعلى .

تنفصل كريات الدم البيضاء عند إضافة dextran بتكوين حلقة الى الأعلى مع البلازما و طـبقة (Buffy coat) .

تم فصل الجزء العلوي الذي يحتوي على كريات الدم البيضاء في انابيب جمع منفصلة لاغراض البحث , حفظت عند درجة حرارة منخفضة لحين الاستخدام . (Percy,١٩٦٨)

١.٦.٢ تحضير المحاليل Preparation of Reagents

١. محلول dextran (٠.٠١١ مولاري)

حضر المحلول بإذابة ٠.٥غرام من dextran في ١٠ مل من محلول كلوريد الصوديوم ٠.٧ غـرام ١٠٠\ مل (يحضر هذا المحلول بشكل آنى).

٢. محلول كلوريد الصوديوم (٠.١١ مولاري)

حضر المحلول بإذابة ٠.٧ غرام من NaCl في ١٠٠ مل من الماء المقطر .

٣. محلول كلوريد الصوديوم (٠.١٥ مولاري)

حضر المحلول باذابة ٠.٩غرام من NaCl في ١٠٠مل من الماء المقطر .

٤. محلول كلوريد الصوديوم (٠.٣ مولاري)

حضر المحلول باذابة ١.٨غرام من NaCl في ١٠٠مل من الماء المقطر .

٢.٦.٢طريقة العمل *لتنقية كريات الدم البيض* Procedure

اخذت ١٠ مل من الدم ووضع في انبوبة طرد مركزي centrifugeحجم ١٠مل واضيف اليه ٢ مل من محلول محضر انيا من dextran وتم مزجه جيدا بواسطة الجهاز الرجاج vortex ثم ترك لمدة ٤٥ دقيقة لتترسب الخلايا وكريات الدم الحمر .

صب الراشح في انبوبة طرد مركزي ثانية ونهمل الراسب ثم ناخذ الراشح ونضعه في جهاز الطرد المركزي centrifugeوبسرعة g x ٥٠٠ لمدة ١٠دقائق ,نعزل الراشح ونهمله .

اعيدت عملية الغسل لخلايا الدم البيض باضافة ١مل من ٠.٩ كلوريد الصوديوم و اضيف ٣ مل من الماء المقطر المثلج ومزجت جيدا بعد ذلك اضيف له ٣ مل من محلول بارد لكلوريد الصوديوم ١.٨غرام \ ١٠٠ مللتر ووضع في جهاز الطرد المركزي centrifugeوبسرعة x ٥٠٠ g لمدة ١٠دقائق ثم بعد ذلك عزل الراشح واهمل فتكون لدينا راسب ابيض من كريات الدم البيض ولزيادة النقاوة لهذه الكريات تكرر العملية من اضافة ١مل من ٠.٩من كلوريد الصوديوم الى ان نحصل على راسب ابيض ناصع من كريات الدم البيض .

٣.٦.٢ كسر كريات الدم البيض

تم كسر كريات الدم البيض بوضع محلول١٠٠-Triton x (١.٥) مل على الراسب الابيض من كريات الدم البيض مع الرج وبعد ذلك تم وضعها داخل اناء يحوي على ماء مثلج ثم ماء اعتيادي وبالتتابع لعدة مرات .

٢. ٧ قياس مستوى السكر في المصل وكريات الدم البيض

Determination of glucose level in serum &W.B.C

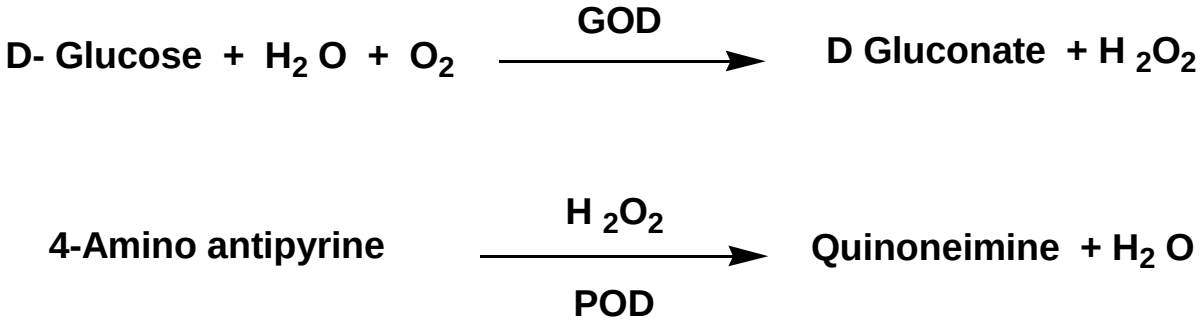
١.٧.٢ المبدأ Principle

يتأكسد بيتا دي الكلوكوز β - D Glucose ألى كلوكونيت D - Gluconate و بيرو كسيد الهيدروجين Hydrogen peroxide بتاثير انزيمglucose oxidase (GOD) حسب تفاعل Trinder.

يتم تعيين تركيز Hydrogen peroxideبواسطة (٤-AA) ٤ – aminoantipyrine وبوجود الفينول تحت تفاعل انزيم peroxidase (POD) مكونا Quinoneimineذو لون وردي .

يمتص Quinoneimine عند طول موجي (٥٠٠)نانومتر .ويبقى مستقر لمدة ساعتين وان تركيز المركب الناتج تتناسب و كمية السكر في المحلول وتتم حسب التفاعلات التالية :(kit

(Cromatst



٢.٧.٢ المحاليل **Reagents**

المحلول	مكونات المحلول	التركيز
١ .المحلول الاحادي Vial R١ ويتكون من	المحلول المنظم للفوسفيت	١٠٠مل مول \التر و٧.٥ PH
	انزيم الكلوكوز اوكسيدايز	١٠< KU \التر
	انزيم البيروكيسدايز	٢ < KU \التر
	4-Amino antipyrine	٠.٥ مل مول \التر
	فينول	٥ مل مول \التر
٢ .الكلوكوز القياسي (Glucose)	الكلوكوز	١٠٠ملغرام \ ١٠٠مللتر

٣.٧.٢ طريقة العمل لقياس مستوى السكر **Procedure**

١ . وضعت المحاليل والنماذج عند درجة حرارة الغرفة.

٢ . تم سحب المحاليل حسب الجدول ادناه وتوضع في انابيب الاختبار.

المواد	المحلول المرجع	المحلول النموذج	المحلول القياسي
Vial R١	١ml	١ml	١ml
sample	-----	١٠µl	----

standard	----	----	١٠µl
Distilled water	١٠ µl	----	-----

٣ . مزجت محتويات الانابيب بواسطة vortex وتركت لمدة١٠دقائق بدرجة حرارة الغرفة .

٤ .قرأت الامتصاصية للنموذج والمحلول القياسي عند ٥٠٠ nm وتمت مقارنتها مع المرجع .

٤.٧.٢ الحسابات **Calculation**

تركيز الكلوكوز غرام ١٠٠\مللتر = تركيز المحلول القياسي X $\frac{\text{امتصاصية النموذج}}{\text{امتصاصية المحلول}}$

خففت النماذج التي يكون تركيزها اعلى من ٥٠٠ ملغرام ١٠٠\مللتر بنسبة ١:٤بواسطة المحلول الملحي وضربت النتيجة X ٤ كمعامل تخفيف .

٨.٢ فصل متشابهات إنزيم الكرياتين كاينيز من المصل بطريقة كروموتكرافيا التبادل الايوني

Separation of CK isoenzymes from sera by ion exchange chromatography.

استخدمت طريقة Mercer's لفصل متشابهات إنزيم CK وبأستخدام الهلام EDAE-Cellulose بدل من DEAE-Sephadex-A-٥٠ في عملية الفصل وذلك بسبب حساسيته وانتقائيته العاليتين لمتشابهات انزيم الكرياتين كاينيز (Rej R. ١٩٩٨ ; Mercer ,١٩٧٤).

١ . تحضير محلول DEAE-Cellulose

محلول الهلام DEAE-Cellulose (Sigma) والذي يملك كفاءة تبادل تبلغ ٠.٩غرام \مل مول . نأخذ أي كمية من الهلام بدرجة حرارة الغرفة وبإتباع الخطوات التالية , غسل الهلام بخليط من : NaOH ٠.٥مول \لتر و ماء و تم التخلص من الزيادة بالماء الموجودة مع الهلام DEAE-Cellulose بواسطة استخدام قمع فصل وغسلت لعدة مرات بواسطة المحلول المنظم رقم ١ (PH٧.٩) استمر الغسل إلى أن حصلنا على ماء غسل متعادل (PH=٧) وحفظ بداخل المحلول المنظم إلى حين

الاستخدام .

٢ . تحضير المحاليل المنظمة buffer solution

A . المحلول المنظم ١ (pH٧.٩)

المكونات: ٠.٤ ملي مول \التر من EDTA , ٢٠ ملي مول \التر من NaCl , ٥ ملي مول \التر خلات المغنسيوم , ١٠٠ ملي مول \التر tris base .

١ .محلول NaCl (٢٠ ملي مول \ لتر)

يذاب ٠.١١٦٨ غرام من NaCl ويخفف المحلول بالماء المقطر ليصبح الحجم النهائي ٢٠ مل .

٢ . محلول خلات المغنسيوم (٥ ملي مول \ لتر)

يذاب ٠.١٠٧٢ غرام من خلات المغنسيوم و يخفف المحلول بالماء المقطر ليصبح الحجم النهائي ٢٠ مل.

٣ . محلول EDTA (٠.٤ ملي مول \ لتر)

يذاب ٠.٠١١٦ غرام منه ويخفف المحلول بالماء المقطر ليصبح الحجم النهائي ٢٠ مل .

٤ .محلول tris (١٠٠ملي مول \ لتر)

يذاب ١.٢١١٤ غرام من هذه المادة ويخفف المحلول بالماء المقطر ليصبح الحجم النهائي ٢٠مل .

٥ .حامض HCl (١٠٠ملي مول \ لتر)

يخفف ٠.٦٢٣١ مل منه بتركيز (٣٢٪ , ١.١٩ . sp.gr) بعد اضافة ١٠مل من الماء المقطر ثم يكمل الحجم إلى ٢٠مل .

تمزج جميع المحاليل أعلاه بقنينة حجميه (١٠٠) مل ويصحح الاس الهايدروجيني pH بواسطة حامض HCl (١ M) ليصبح pH = ٧ .

B . المحلول المنظم ٢ (pH= ٦.٤)

حضرت بنفس مقادير المحلول المنظم رقم واحد ولكنه يختلف في تركيز NaCl المستخدم فيه (٠.٢٣٣٧)غرام ٤٠mM يصبح الحجم النهائي لمكونات الخليط ١٠٠ مل تمثل المحلول المنظم ٢ .

C . المحلول المنظم ٣ (pH = ٦.٤)

حضرت بنفس مقادير المحلول المنظم رقم واحد ولكنه يختلف في تركيز NaCl المستخدم فيه ٢٥٠m M , اي (١.٤٦١) غرام ليكون الحجم النهائي ١٠٠ مل يمثل المحلول المحضر المحلول المنظم ٣ .

طريقة العمل لفصل متشابهات الانزيم Procedure

١ . أخذ ٢ مل من المحلول المنظم ١ وادخل الى داخل العمود لكي يتشرب به الصوف الزجاجي الموجود داخل العمود ويسهل تغلغل الهلام DEAE-Cellulose داخل الصوف .

٢. استخدمت ماصة باستور بقطر ٢٥ انكستروم لاضافة عالق الهـــلام المحضر من DEAE-Cellulose من اعلى العمود الى أن يكتمل النزول .

٣. تم وضع ٢ مل من المحلول المنظم ١ داخل العمود الى أن ينزل وتعالج الفقاعات المتكونة داخل الجل بالضرب الخفيف على العمود بواسطه انبوب مطاطي .

٤. اضفنا واحد مل من مصل الدم داخل العمود بواسطة ماصة .

٥. تم إضافة ٤ مل من المحلول المنظم ١ لفصل MM-CK تدريجيا" ويتم استلام كل ١مل من MM-CK في انبوب اختبار من العمود ليصبح لدينا ٤ انابيب اختبار في كل واحد منها ١ مل وتحسب الامتصاصية عند ٥٣٢nm .

٦. تم إضافة ٤مل من المحلول المنظم ٢ لفصل MB-CK تدريجيا" ويتم استلام حجم ١مل من MB-CK في انبوب اختبار من العمود ليصبح لدينا ٤ انابيب في كل واحد منها ١ مل وتحسب الامتصاصية عند ٥٣٢nm .

٧. تم إضافة ٤ مل من المحلول المنظم ٣ لفصل BB-CK تدريجيا" ويتم استلام حجم ١ مل في انبوب اختبار من العمود ليصبح لدينا ٤ انابيب في كل واحد منها ١ مل من BB-CK وتحسب الامتصاصية عند ٥٣٢nm .

٩.٢ قياس مستوى الكلوتاثايون في المصل وكريات الدم البيض

Detection of GSH in serum & W.B.C

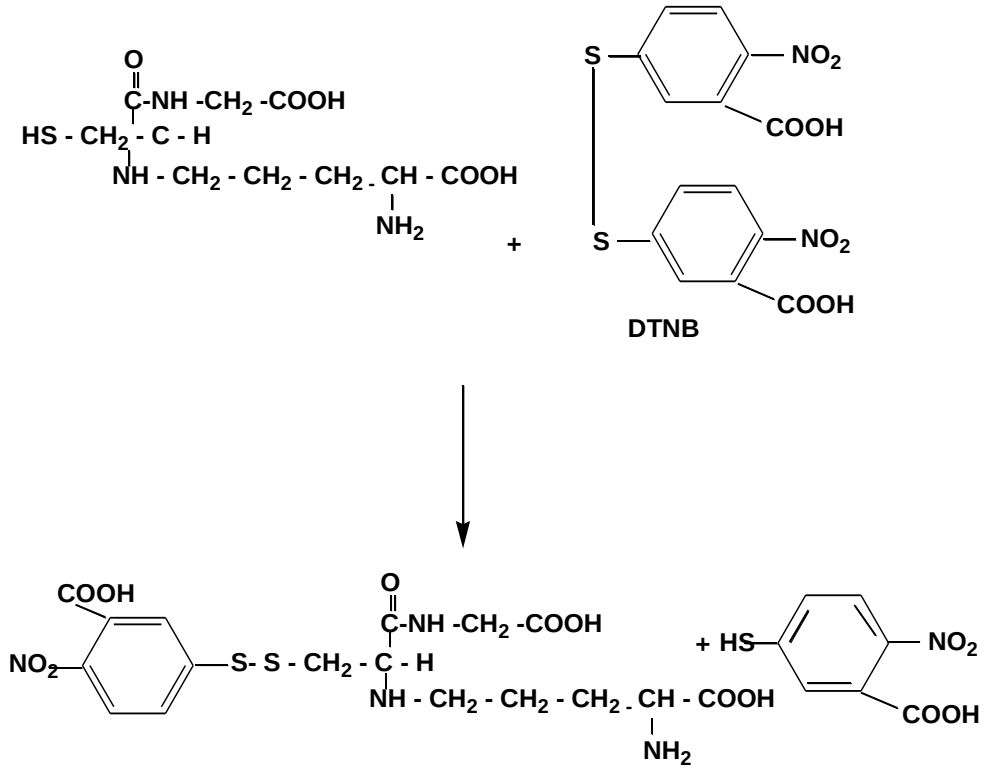
١.٩.٢ المبدأ Principle

يتفاعل (DTNB) (٢-nitrobenzoic acid) -٥,٥-Dithio- bis- وهو كروموجين ثنائي الكبريت حساس للاختزال (Burtis & Ashwood, ١٩٩٩) لذلك يحضر انيا "ويتم تفاعله من خلال اختزال مجموعة الثايول (Sulfhydryl group) في جزيئة (GSH) مكونا" لونا" اصفر , يمكن قياس

امتصاصية الكروموجين المؤكسد عند ٤١٢nm .

شـــكل (١.٢) تفاعـل GSH مـــع

. DTNB



٢.٩.٢ طريقة تحضير المحاليل GSH

Preparation of Reagents

١. محلول TCA (٥٠٪) (Burtis & Ashwood, ١٩٩٩)

اذيب ٥٠غرام من TCA في ١٠٠ مل من الماء المقطر ليصبح تركيزه (٥٠٪) .

٢. محلول Na_2EDTA (٠.٤M)

تم اخذ ١٤.٨٩غرام من Na_2EDTA اذيبت في ١٠٠ مل من الماء المقطر ليصبح تركـــيـزه (٠.٤M) .

٣. محلول Tris-EDTA (٠.٤ M) pH=٨.٩

تم اخذ ٤.٨٤ غرام من Tris-EDTA واذيبت في ٨٠ مل ماء مقطر .وبعد ذلك اضيفت ١٠ مــل من Na_2-EDTA (٠.٤M) الى ٨٠ مل من Tris-EDTAواكمل الحجم إلـى ١٠٠ مل بواسطة الماءالمقطر ليصبح تركيزه (٠.٤M).

تم ضبط الحامضية بإضافة HCl (١M) وبقي المحلول مستقر لمدة ١٠أيام عندما حفظ عند درجة حرارة منخفضة.

٤. محلول DTNB (٠.٠١M)

اذيب ٠.٠٣٩غم من DTNB في الميثانول المركز واكمل الحجم الى ١٠مل ماء ليصبح تركيزه (٠.٠١). [يكون مستقرا "لمدة ١٣ أسبوع عندما يحفظ في درجة حرارة ٤ °م].

٥. محلول GSH standerds (٠.٠٠١M)

حضر المحلول بإذابة ٠.٠٣٠٧غرام من GSH في ١٠٠مل من Na_2EDTA (٠.٤M) .

ولتحضير عدة محاليل للكلوتاثايون وبتراكيز مختلفة (٢,٥,١٠,١٥,٢٠,٣٠,٤٠,٥٠ µM) نحظر المحاليل القياسية بواسطة محلول Na_2EDTA بتركيز (٠.٤ M)(يحضر المحلول القياسي للكلوتاثايون يوميا") .

٣.٩.٢ طريقة العمل لتقدير الكلوتاثايون Procedure

استخدمت طريقة محلول المانز (Burtis & Ashwood, ١٩٩٩) ٥,٥-Di thio bis (٢-nitrobenzoic acid) (DTNB) لتقدير الكلوتاثايون في مصل الدم وكريات الدم البيض وكانت الإضافة الى انابيب الاختبار حسب الجدول الآتي :

المحاليل	المحلول النموذج	المحلول المرجع	المحلول القياسي
serum	١٠٠ µ l	---	---
standard	---	----	١٠٠ µ l
DW	٨٠٠ µ l	٩٠٠ µ l	٨٠٠ µ l
TCA	١٠٠ µ l	١٠٠ µ l	١٠٠ µ l

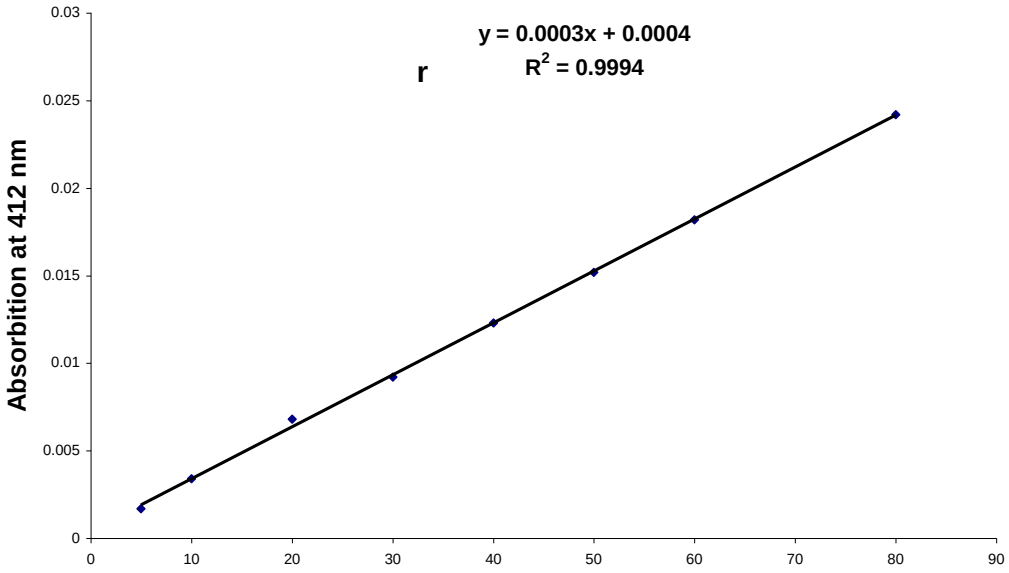
مزجت انابيب الاختبارجيدا بواسطة جهاز الرج vortex ولمدة ١٥ -١٠ دقيقة وتوضع في جهاز الطرد المركزي لمدة ١٥ دقيقة وبسرعة ٣٠٠٠ x g وبعد ذلك استخدمت المعاملة حسب الجدول التالي :

المحاليل	المحلول النموذج	المحلول المرجع	المحلول القياسي
Supernatant	٤٠٠ µ l	٤٠٠ µ l	٤٠٠ µ l
Tris-EDTA	٨٠٠ µ l	٨٠٠ µ l	٨٠٠ µ l
DTNB	٢٠ µ l	٢٠ µ l	٢٠ µ l

ترج محتويات انابيب الاختبار بواسطة جهاز الرج vortexوتم قراءة الامتصاصية بجهاز المطياف الضوئي عند ٤١٢nm للمحلول المرجع والمحلول النموذج خلال الخمس دقائق الأولى بعد إضافة محلول DTNB .

٤.٩.٢ الحسابات Calculation

لحساب تركيز GSH في مصل الدم وكريات الدم البيض يتم رسم منحني المعايرة µM للامتصاص مع التراكيز.



شكل (٢.٢) المنحني القياسي لتركيز الكلوتاثايون

٢ .١٠قياس فعالية الكرياتين كاينيز في المصل وكريات الدم البيض

Determination of CK activity in serum & W.B.C

٢.١٠.١المبدأ Principle

يحفز انزيم الكرياتين كاينيز التفاعل بين فوسفات الكرياتين (CP)والادينوسين -٥ثنائي فوسفيت (ADP) لتكوين الكرياتين (Creatine) والادينوسين -٥ثلاثي الفوسفيت (ATP) والذي يقوم بفسفرة جزيئة الكلوكوز (Glucose) لتحويله إلى كلوكوز -٦فوسفيت (G٦P)بوجود انزيم الهكسوكوينيز hexoquinase (HK) .

يتأكسد الكلوكوز – ٦فوسفيت (G٦P)إلى كلـوكونيت – ٦فوسفيت (gluconate -٦ p) بوجود الانزيم المساعد (NADP) الذي يحفز بواســطة انزيم كلوكوز - ٦ فوسفيت ديهايدروجنيز.

تقاس الامتصاصية في طول موجي مقداره ٤٠nm ويحسب معدل الزيادة او التغير في الامتصاصية الناتجة من اختزال ($NADP^+$) إلى (NADPH)التي تتكافىء مع فعالية انزيم CK الموجودة في العينة .

ان وجود -Nاستيل سيستين يسمح بتفاعل كامل للإنزيم. (Kit Cromatst)

$$CP + ADP \xrightarrow[PH=6.5]{CK} Creatine + ATP$$

$$Glucose + ATP \xrightarrow{HK} G6P + ADP$$

$$G6P + NADP^+ + H_2O \xrightarrow{G6P\text{-}DH} Gluconate\ 6\ p + NADPH + H^+$$

٢.١٠.٢ المحاليل Reagents

المحلول	المحتويات	التركيز
المحلول الاول محلول منظم R١ ويتكون من	داريء الايميدازول	١٠٠مل مول \التر
	كلوكوز	٢٠مل مول \التر
	NAC	٢٠مل مول \التر
	خلات المغنسيوم	١٠ مل مول \التر
	NADP	٢.٥ مل مول \التر
	HK	≤ ٤ KU \ L
	EDTA	٢ مل مول \التر
المحلول الثاني R٢	CP	٣٠ مل مول \التر
	AMP	٥مل مول \التر
	ADP	٢ مل مول \التر
	(Adenosine -٥)	١٠ µ مول \التر

	pentaphosphate	
L \ KU ١.٥ ≤	G٦p – DH	

٣.١٠.٢ تحضير المحاليل **Preparation of Reagents** محلول

العمل / يحضر بمزج ٤مل من R١ المحلول المنظم للكلوكوز (NAC) مع ١مل منR٢(المادة الأساس /مساعد الانزيم) يبقى لمدة ٣أسابيع عند درجة ٨-٢ ° م أو ٢ يوم عند درجة ٢٥-١٦ °م ويحفظ بعيدا"عن الضوء . (Kit Cromatst)

٤.١٠.٢طريقة العمل **Procedure**

١ . تم تحضير محلول العمل بمزج ٤ مل من R١ مع ١ مل من R٢ وتكون حرارته وحرارة النماذج عند درجة حرارة الغرفة .

٢ . تم تصفير جهاز المطياف الضوئي بواسطة الماء المقطر .

٣ .جعلت المحاليل عند درجة ٢٥ °م بواسطة حمام مائي تكون الاضافات حسب الجدول الاتي :

المحاليل	تم العمل عند درجة ٢٥ °م
Working reagent	٢.٥ ml
sample	١٠٠ µl

٤ .رجت بواسطة جهاز الرج vortexولمدة ٣ دقائق.

٥ .قرأت الامتصاصية عند ٣٤٠ نانوميتر .

٦ . اعيدت قراءة الامتصاصية بعد ١ , ٢ , ٣ دقيقة .

٧ . تم حساب معدل الامتصاصيات بالنسبة الى الوقت (A/min) .

٥.١٠.٢ الحسابات **Calculation**

لاستخراج القيمة بوحدة U/L نضرب معدل الامتصاصية المستخرج x المـعامل البالغ قيمته ٤١٢٧ وكما يلي :-

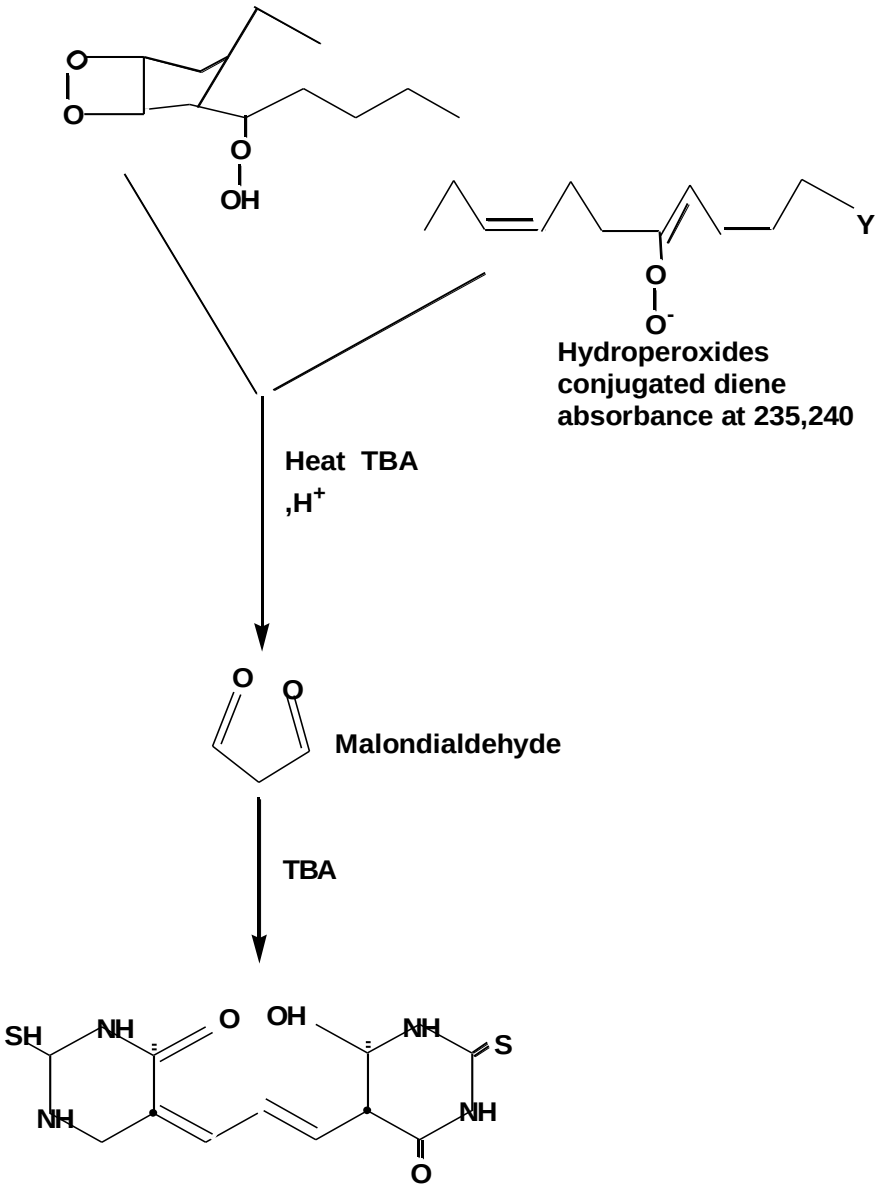
(A/min)x ٤١٢٧ = U/L

١١.٢ قياس مستوى المالون ثنائي الالدهايد (MDA)

Determination of concentration of Malondyaldehyde

١.١١.٢ المبدأ Principle

مبدأ هذه الطريقة يعتمد على قياس التغير اللوني بواسطة جهاز المطياف الضوئي وفيما يلي التفاعل الحاصل بين حامض ثايوباربيوتريك(TBA) وبين المالون ثنائي ألالدهايد وكما في الشكل (٣.٢): (Luenc J.,١٩٩٠)



شكل (٣.٢) **مخطط يوضح طريقة لتقدير بيروكسيدات الدهون بواسطة الناتج مالون ثنائي الالدهايد**

٢.١١.٢ المحاليل Reagents

١ . ٢٠% Tri chloroacetic acid (TCA) .

٢ . ٠.٦٪ Thiobarbutric acid (TBA) .

٣ .٧٠٪ Tri chloroacetic acid (TCA) .

٣.١١.٢ طريقة العمل Procedure

١ . تم اخذ ٠.١٥ مل من المصل ثم يضاف اليه ١مل من ٢٠٪ TCAوبعدها ١مل من TBA بتركيز ٠.٦٪ وتمزج جيدا" بواسطة جهاز الرج vortex .

٢ .وضعت محتويات الانابيب بحمام مائي لمدة ١٥ دقيقة ثم تبرد بعدها اضيف اليه حجم ١مل من TCAبتركيز ٧٠٪مزجت وتركت عند درجة حرارة الغرفة لمدة ٢٠دقيقة .

٣ .وضعت جميع الانابيب في جهاز الطرد المركزي C.F ثم يؤخذ الراشح وتقرأ الامتصاصية له بطول موجي مقداره ٥٣٢nm .

٤.١١.٢الحسابات Calculation

$$\text{تركيز المالوندالدهايد} = \frac{\text{الامتصاصية عند ٥٣٢nm}}{L_{o} \times E_{o}} \times D$$

L=bath length ١cm.

E_{o} = extinction coefficient = ١.٥٦ x١٠$^{-٥}$ $M^{-١}$ $cm^{-١}$.

D.F= dilution factor = ٤ .

١٢.٢ قياس تركيز حامض اليوريك في المصل وكريات الدم البيض

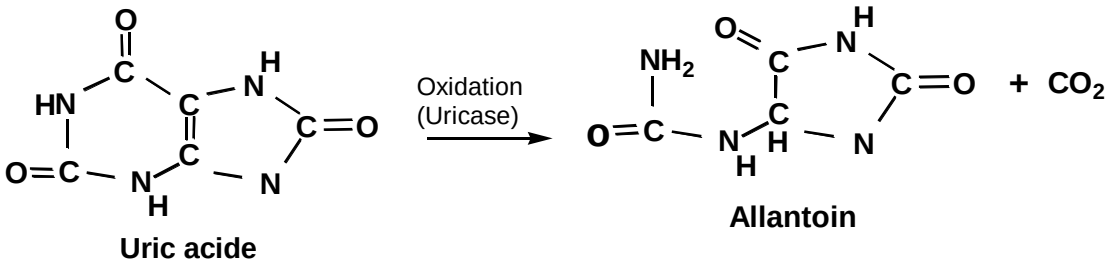
Determenation of U.A concentration in serum &W.B.C

تم قياس مستوى تركيز حامض اليوريك في المصل وكريات الدم البيض بواسطة استخدام عدة التحليل kit (Biolabo) .

١.١٢.٢ المبدأ Principle

يتحول حامض اليوريك Uric acid الى الالنتوين allantoin وثاني اوكسيد الكاربون CO_2 وبيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 بمساعدة إنزيم اليوريكيز Uricase .

يتفاعل بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 مع الكرومـوجين (amino – chromogen antipyrine and di chloro-hydroxybenzen) بوجود البيروكساید ليعطي كوينون ايماين Quanimine الذي يكون بلون احمر .



Uric acide

Allantoin

قرأت الامتصاصية لـه عند الطول الموجي nm ٥٢٠ من nm (٥٣٠-٤٩٠) وتتناسب مع تركيز حامض اليوريك في العينة .

المحاليل Reagents

المحلول	المحتويات	التركيز
الانزيم (R١ Vial) ويتكون من :	Potassium hexacyanoferrate(II)	٤٢µ mol /L
	Peroxidase	≤ ٤٥٠ U \ L
	Amino-antipyrine	٠.١٥٠ m mol \ L
	uricase	≤ ١٢٠ u / l
المحلول المنظم ويتكون من	Dichlorohydroxybenzen sufonate	٢ mm / l

	PH =٨ Tris	mm / l ٥٠
المحلول القياسي (v ial R٣) ويتكون من:	حامض اليوريك	١٠ dl / mg او (µ mol / L ٥٩٥)

٢.١٢.٢ تحضير المحاليل Preparation of Reagents

اضيفت من محتويات الإنزيم (vial R١) إلى المحلول المنظم (vial R٢) ومزجت بواسطة جهاز الرجvortex جيدا قبل الاستعمال .

٣.١٢.٢ طريقة العمل Procedure

وضعت المواد والنماذج عند درجة حرارة الغرفة

المحلول النموذج	المحلول القياسي	المحلول المرجع	المواد
١ ml	١ ml	١ ml	Working reagent
٢٥ µl	-----	----	sample
----	٢٥ µl	----	standard
----	-----	٢٥ µl	Distlled water

مزجت جيدا وتترك لمدة ٥دقائق وبدرجة حرارة c° ٢٥نسجل الامتصاصية عند الطول الموجي nm ٥٢٠وبالمقارنة مع المرجع .يبقى اللون ثابتا" لمدة ٣٠دقيقة.

٤.١٢.٢ الحسابات Calculation

لحساب حامض اليوريك بالنسبة للمصل وكريات الدم البيض تكون كالآتي

$$\text{حامض اليوريك} = \frac{\text{امتصاصية النموذج}}{\text{امتصاصية المحلول القياسي}} \times \text{تركيز المحلول القياسي}$$

الفصل الثالث

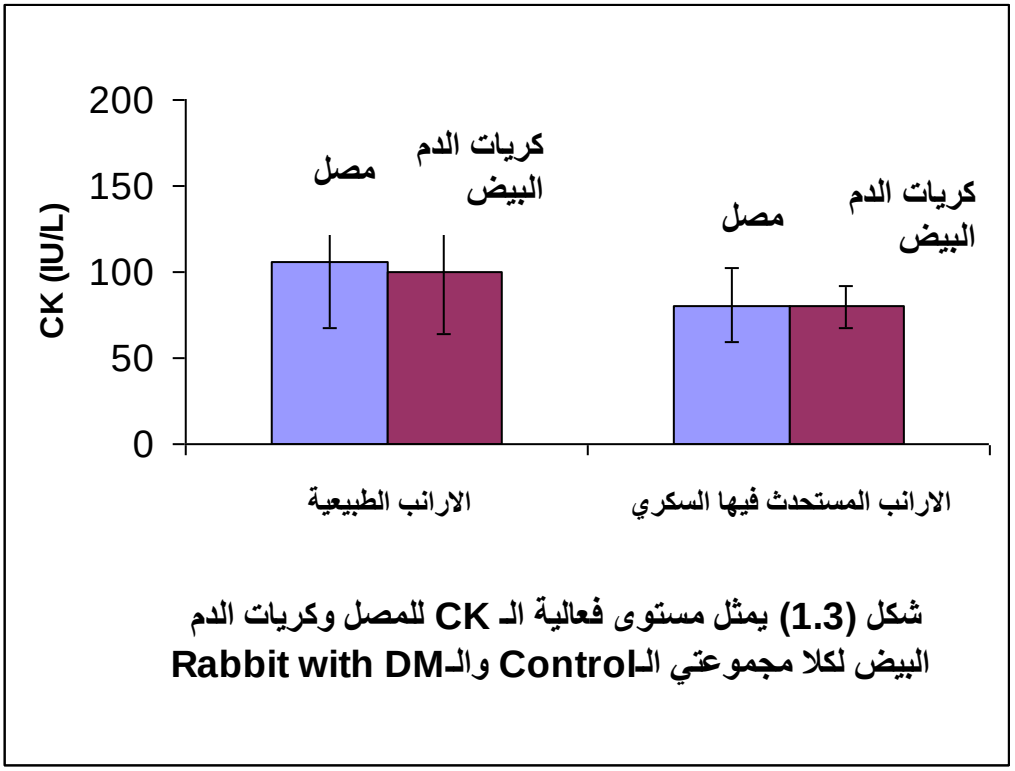
النتائج والمناقشة

١.٣تأثير مرض السكري على فعالية أنزيم الكرياتين كاينيز

تكون فعالية أنزيم الكرياتين كاينيز في كلا"من المصل وكريات الدم البيض لمجموعـــــــــة الارانب المستحدث فيها السكر(Rabbit with DM) تكون أقل مما هو عليه في مجموعة السيطرة Control (تمثل مجموعة الأرانب الطبيعية) وكما هو موضح في جدول (١.٣) والشكل (١.٣).

جدول (١.٣) فعالية أنزيم الكرياتين كاينير (U/L) في كلا "من المصل وكريات الدم البيض في مجموعتي السيطرة Control والمستحدث فيها مرض السكري (Rabbit with DM) .

		Mean	SD	CK U/L		SE	٩٥٪ C.I.		P	Sign
				Upper	Lower		Upper	Lower		
Control (٢٢)	Serum	١٠٥.٥	٣٨	١٦٩	٥٤	٨.١	------	------	------	------
	WBC	١٠٠	٣٦.٧	١٧٦.٤	٦٦	٧.٨	------	------	------	------
Rabbit with DM (٢٢)	Serum	٨٠.٦	٢٢	١٢٠	٥٤	٤.٧	٤٣.٧	٦.٢	٠.٠٠١	Sign
	WBC	٧٩	١٢	١٠٧.٧	٦٦	٢.٧	٣٦	٤.٧	٠.٠٠١	Sign



شكل (1.3) يمثل مستوى فعالية الـ CK للمصل وكريات الدم البيض لكلا مجموعتي الـControl والـRabbit with DM

يمكن ملاحظة وجود فترات كبيرة بينذ القيم لنفس المتغير تؤدي الى زيادة في الانحراف المعياري (وصل الى ٣٦.٧) يعود سببه الى الأرتباك الحاصل في الارنب نتيجة التخدير او عند غرز الابرة عند سحب الدم . (Murray *et al.*,١٩٩٦)

تعتبر فعالية CK في المصل مؤشرا "مهما "غالبا "ما يستخدم لتشخيص الخلل الحاصل في العضلات الهيكلية والعضلات القلبية(Gunst *et al.*, ١٩٩٨) .

اشارت عدة دراسات الى ان مستويات انزيم الكرياتين كاينيز CK تنخفض في مصل المرضى بالسكري بسبب تداعيات مضاعفات مرض العضلة القلبية ;Popovich *et. al.* , ١٩٨٩ فهذا الانخفاض في الفعالية لانزيم (Popovich *et. al.* ١٩٩١, Hadwan *et. al* , ٢٠٠٥) , الكرياتين كاينيز ناتج عن التفاعل الحاصل بين الانزيم و اشكال الاوكسجين الفعالة(ROS) . (Genet *et. al.*, ٢٠٠٠)

الزيادة الحاصلة بجذور الاوكسجين الحرة نتيجة لحدوث مختلف العمليات الباثولوجية في المرضى الذين يعانون من السكري تتسبب في انخفاض فعالية انزيم الكرياتين كاينيز CK في كلا "من المصل وكريات الدم البيض (Genet *et al.*,٢٠٠٠:Burstein M.,١٩٧٠) . Reddy et al.,٢٠٠٠)حيث ان :-

١. تتفاعل الجذور الحرة مع الانزيم والجزيئات الحياتية الاخرى وتؤثر على تركيبها ووظيفتها مما يؤدي الى اختلاف في الشروط الباثولوجية لهم, حيث أن الوحدات الفعالة في انزيم الكرياتين كاينيز تحتوي على السيستين والذي هو اساس فعالية الانزيم والرابط بالمادة الاساس (Liu Z.J. & Zhou j. ,٢٠٠٢).

يعتبر السيستين هدف لجذور الاوكسجين الحرة والتي تتكون لدى مرضى السكري بسبب تعرضهم الى hyperglycemia تتسبب في تحوير مجموعة الثايول (المجموعة الفعالة) وتعمل على اكسدتها وهذا هو السبب في تعطيل فعالية الانزيم , فالتأثير التثبيطي لجذر superoxide ($O^{\bullet-}_2$) وجذر hydroxyl ($OH^{\bullet}$) على الانزيم يكون عكسي عندما يكون التأثير التثبيطي لجذر البيروكسي نايتريت غير عكسي (Arstall *et al.* ,١٩٩٨ ; Gross *et al.* ,١٩٩٦ ;Konorev *et al.* ١٩٩٨).

أضافة الـ (superoxide dismutase) SOD يكون له تأثير معاكس تماما "لعمل جذر superoxide ($O^{\bullet-}_2$) وجذر hydroxyl ($OH^{\bullet}$), حيث يقوم باكتساحها وتحويلها الى H_2O_2 وبالتالي تعتبر نوع من انواع حماية لفعالية انزيم الكرياتين كاينيز CK (Genet *et al.* ,٢٠٠٠)

تاتي هذه الحماية لسببين اولا "ان هذا المركب يختزل مجموعة (SH--) للانزيم عند المجموعة الفعالة المؤكسدة مباشرة مع الجذور الاوكسجين الحرة ثانيا "يمكن ان يتفاعل مباشرة مع جذور الاوكسجين الحرة مما يعني حماية المجموعة الفعالة للانزيم من مهاجمة الجذور الحرة للاوكسجين . (Mekhfi *et al* .,١٩٩٦)(Genet *et al.* ,٢٠٠٠)

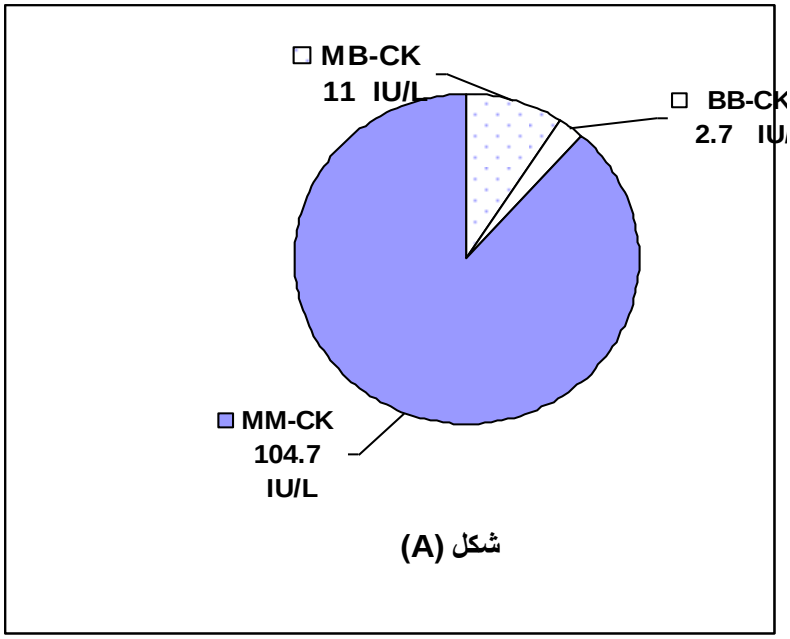
٢. كما مر بنا سابقا" في الفصل الاول فان الالوكسان والستربتوزوتين يستخدمان بصورة واسعة في استحداث السكري في الحيوانات وذلك بتفاعل اوكسيد النايتريك مع خلايا بيتا حيث اوضحا الـ (Hoeldtke *et al.* ,٢٠٠٢) و (Chiarelli *et al.* ,٢٠٠٠) ازدياد RNS عند مرضى السكري بزيادة اوكسيد النتريك يعمل ضد عمل الـ CK حيث أن الـ $NO^{\bullet}$ تقلل فعالية CK بواسطة nitrosylationلمواقع (-- SH) وذلك لان الكرياتين كاينيز يمتلك ثمان مواقع لمجموعة (SH --) . (Mathews *et al.* ,٢٠٠٤)

٣. MM-CK يحتضن (hypo (xanthine بالاضافة الى xanthine oxidase اللذان يعملان على تثبيط الفعالية الى اقل قيمة لذلك فان اضافة GSH سوف تمنع هذا التأثير (Banerjee *et. al.* ,١٩٩١) .

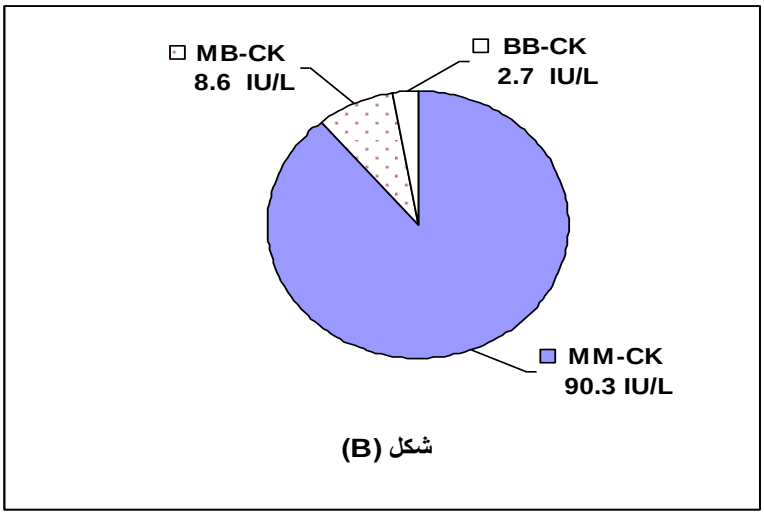
٤. اوضح حسن مكافي وجماعته ان الكرياتين كاينيز يعتبر هدف اساسي لتفاعل اشكال الاوكسجين الفعالة في العضلة القلبية (Mekhfi *et al.* ,١٩٩٦).

كل هذه الملاحظات تؤكد انخفاض نسبة فعالية CK بسبب تأثير الجذور الحرة على مجموعة الثايول , ولكون الانزيم عبارة عن بروتين فان كميته تبقى ثابتة لكن فعاليته تقل .

وأكدت دراستنا أنخفاض فعالية CK-MM-RNA بمقدار ٦١.١٪ مقارنة مع Control هذا سببه تقليل في الوحدات subunit CK-MM (أي كمية البروتين تقل , Popovich *et al.*) . (١٩٨٩) وتكون قيمة BB-CK ثابتة .كما موضح في الشكلين (٢.٣) و (٣.٣).

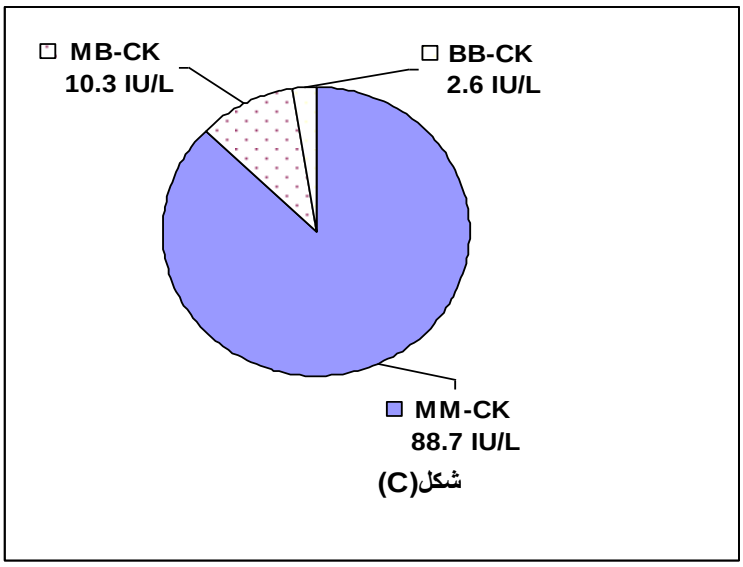


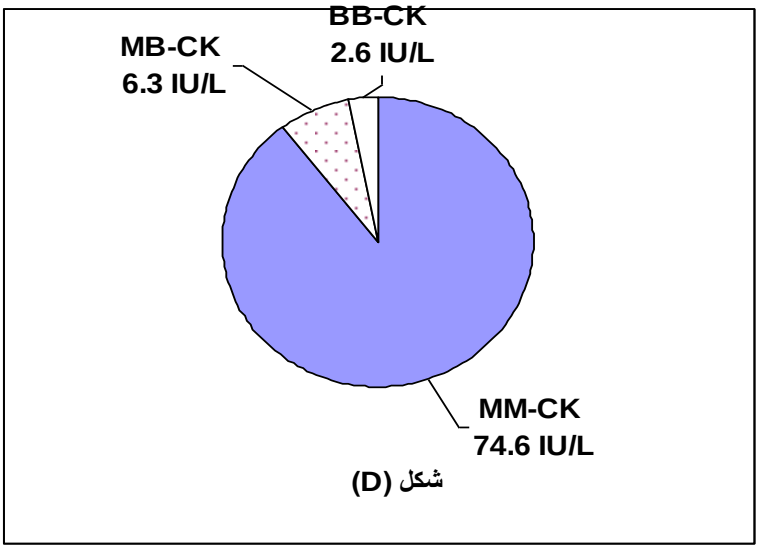
شكل (A)



شكل (B)

شكل (٢.٣) (A) مستوى متشابهات انزيم الـ CK في المصل للارانب مجموعة السيطرة و (B) مستوى متشابهات انزيم الـ CK في المصل للارانب المستحدث فيهـــا مرض السكري .





شكل (٣.٣) (C) مستوى متشابهات انزيم CK في كريات الدم البيض في الارانب مجموعة السيطرة(D)مستوى متشابهات انزيم CK في كريات الدم البيض في الارانب المستحدث فيها مرض السكري.

٢.٣ تأثير مرض السكري على مستوى الكلوتوثايون

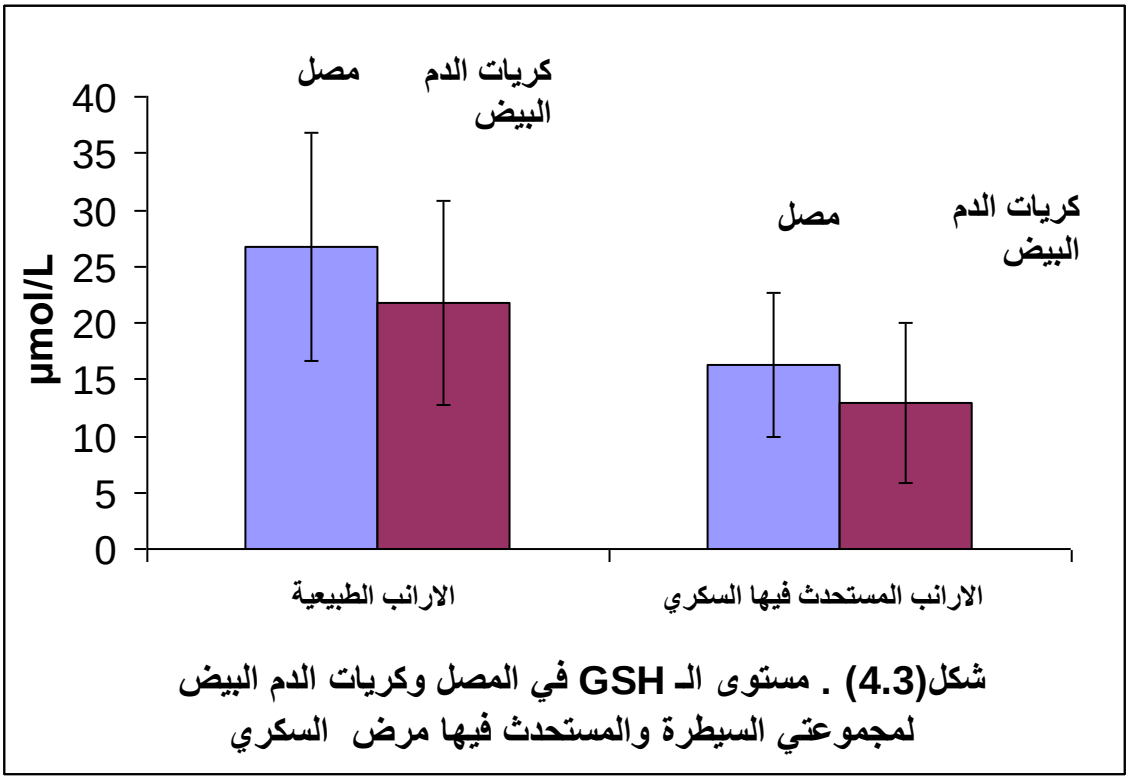
يتكون الكلوتاثايون من حامض الكلوتاميك والسيستين و الكلايسين وهي التي تشكل مركبات الثايول غير البروتينية (NPSH) والتي يكون الـ GSH ٩٠٪ منها . (Jocelyn ,١٩٥٨) حيث أن GSH له دورا اساسي في دفاعات مضادات الاكسدة كما انه يزيل سموم ROS مثل H_2O_2 وبيروكسيدات الدهون بصورة مباشرة او عن طريق GSH-PX. Wood

(Ward ,١٩٣٥) أي ان الكلوتاثايون يلعب دورا "كبيرا "في الدفاع ضد الامراض المختلفة وهذه الوظيفة تؤدي الى detoxification للمسرطنات والجذور الـــحرة والبيروكسيد وتنظيم الوظيفة المناعية والمحافظة علـــــــــى تركيب البروتين. (Murray *et. al.* ٢٠٠٠)

يكون تركيز الكلوتاثايون في كلا "من المصل وكريات الدم البيض لمجموعـــة Rabbit with DM (الارانب المستحدث فيها مرض الســكر) تكون أقل مما هو عليه في مجموعة السيطرة Control(التي تمثل مجموعة الأرانب الطبيعية) وكما هو موضح في جدول (٢.٣) والشكل (٤.٣).

جدول (٢.٣) تركيز الكلوتاثايون (µmol/L) في كلا "من المصل وكريات الدم البيض في مجموعتي السيطرة Controlوالمستحدث فيها مرض السكري(Rabbit with DM)

		Mean	SD	GSH µmol/L		SE	٩٥٪ C.I.		P	Sign
				Upper	Lower		Upper	Lower		
Control (٢٢)	**Serum**	٢٦.٧	١٠.٣	٣٧.١	٧	٢.٢	------	------	------	------
	WBC	٢١.٧	٩.٣	٣٦	٦	١.٩٧	------	------	------	------
Rabbit with DM (٢٢)	**Serum**	١٦.٣	٦.٤	٢٥	٧	١.٤	١٤.٩٨	٥.٧٦	٠.٠٠١	**Sign**
	WBC	١٢.٨	٧.١	٣٥	٥	١.٥	١٤.٥٨	٣.١	٠.٠٠١	**Sign**



شكل(4.3) . مستوى الـ GSH في المصل وكريات الدم البيض لمجموعتي السيطرة والمستحدث فيها مرض السكري

ففي الدراسات السابقة وجد ايضا" انخفاض الـ GSH في مرضى عجز الكلية , فشل الكبد , استنزاف فيتامين B١٢, وفشل الاعضاء المتعددة , وكذلك في مـــرضى السكري ٢٠٠٥, Jaber).

)

ان الانخفاض في تركيز الـ GSH يعود الى ما يأتي -:

١. زيادة معدل انتاج الجذور الحرة في السكري حيث ان الـ GSH يعمل ككاسح للجذور الحرة مما يؤدي الى استنزافه وتقليل مستواه (فمثلا " الالوكسان يدمر خلايا β عن طريق الجذور الحرة لذلك فان الجرعات المنفردة من GSH تثبط عمل الالوكسان) .

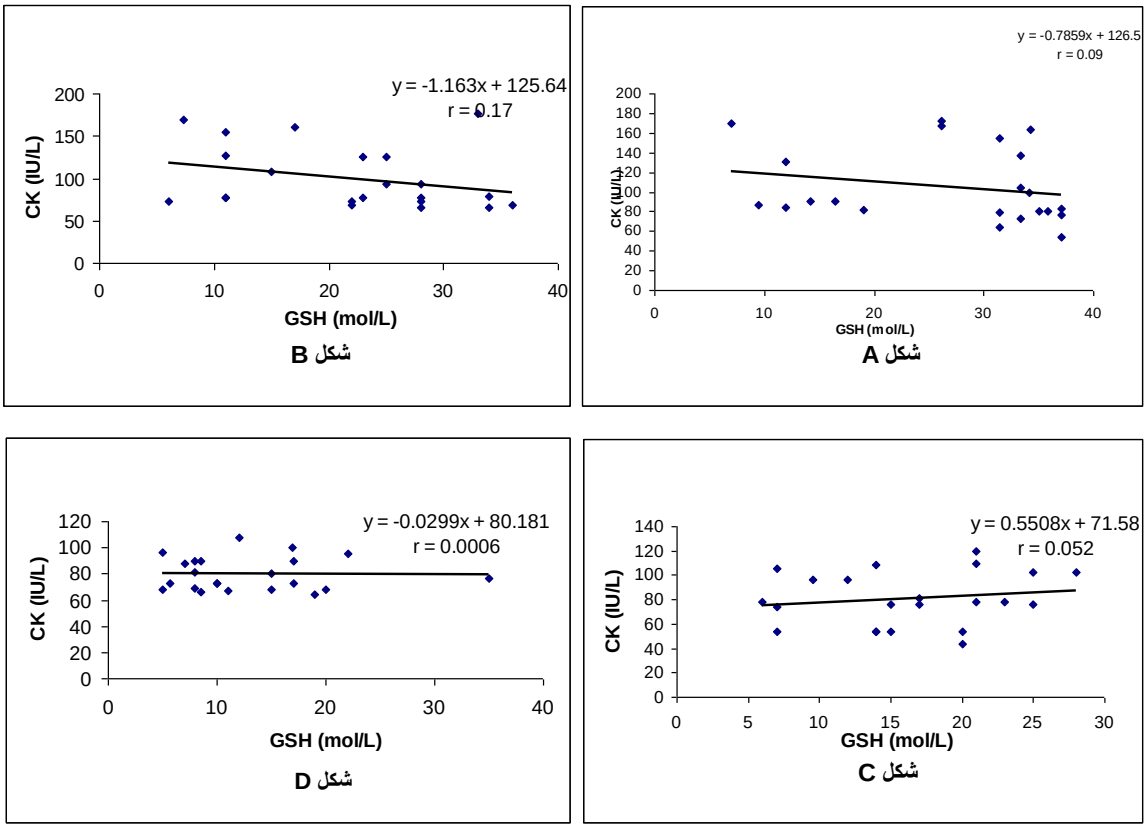
٢. الكلوتاثايون الموجود داخل الخلية الحية له دور دفاعي ضد التحطيم بواسطة التاكسد نتيجة عمل الـ GSH-peroxidaseالذي يحفز التفاعل التالي :

$$H_2O_2 + 2GSH \longrightarrow GSSG + 2H_2O$$

٣. بين Eldjarn وجماعته (١٩٥٧) أن هناك توازن بين SS/SH وهو ضروري أكثر مما لو كان هناك أختلاف في التوازن بينهما ,حيث يؤدي ذلك الى امكانية حدوث تفاعل آخر بين الـ GSH و البروتين ثنائي الكبريت لانتاج مركبات ثنائية الكبريت غير بروتينية وكما في المعادلة التالية :

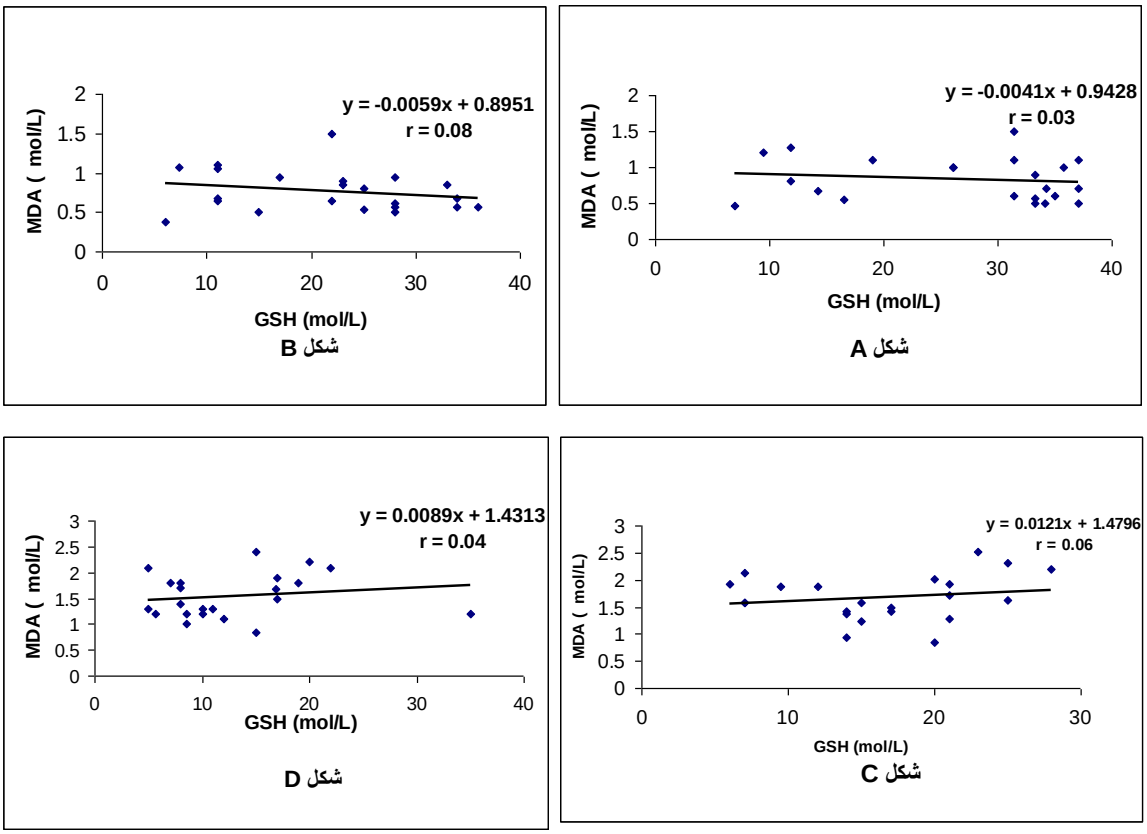
$$GSH + Protein\text{-}s\text{-}s\text{-}Protein \longrightarrow Protein\text{-}S\text{-}H + G\text{-}S\text{-}S\text{-}Protein$$

ان استنزاف مستويات GSH في هذه الدراسة لمجموعة الارانب المستحدث فيها السكر بالمقارنة مع مجموعة السيطرة هوعامل حماية ضد تطورات مرض السكري .



شكل (٥.٣) (A) العلاقة بين الـ GSHوالـ CK للمصل لمجموعة السيطرة و(B) العلاقة بين الـ GSHوالـ CK في كريات الدم البيض لمجموعة السيطرة و(C) العلاقة بين الـ GSHوالـ CKللمصل لمجموعة الارانب المستحدث فيها مرض السكر و(D) العلاقة بين الـ GSHوالـ CK في كريات الدم البيض لمجموعة الارانب المستحدث فيها مرض السكري .

الشكل التالي يمثل العلاقة الارتباطية ما بين تركيز الـ GSH و MDA للمصل وكريات الدم البيض في كلا" من مجموعتي المستحدث فيها مرض السكري ومجموعة السيطرة (التي تمثل مجموعة الأرانب الطبيعية)



شكل(٣. ٦)   العلاقة بين الـ GSHوالـ MDA للمصل لمجموعة السيطرة وB   العلاقة بين الـ GSHوالـ MDA في كريات الدم البيض لمجموعة السيطرة و C   العلاقة بين الـ GSHوالـ MDAللمصل لمجموعة الارانب المستحدث فيها مرض السكر وD   العلاقة بين الـ GSH والـ MDA في كريات الدم البيض لمجموعة الارانب المستحدث فيها مرض السكري .

في هذه الدراسة يظهر ارتباط سالب مختلف لكنه غير واضح الدلالـــة (not sign)على مستوى احصائي p≤٠.٠٥ بين مستويات GSH و MDA

وهذه النتيجة يمكن ان تفسر كما يلي :-

١. استنزاف مستويات GSH سببه التجمع التراكمي الدمـــوي للسيستين homo cysteine داخل الخلية الذي بدوره يختزل الخلايا البطانية ويحطمها ويزيد من احتمالية حدوث امراض القلب لدى مرضى السكري , ان هذه النتائج متوافقة مع دراســــة . (Ewadh and jaber , ٢٠٠٢)

٢. يلعب GSH دورا مهم في حماية الخلايا من الجروح الناتجة من التأكـــسد (peroxidation injury) لذلك فان انخفاض درجة بيروكسيدات الدهون وناتجه النهائي MDA في مرضى الســـكري هذه النتيجـــــــــةمتوافقة مع .(Domingues *et al.* ١٩٩٨ ; Delmas *et al.* ١٩٩٦)

٣. زيادة مستويات GSH يؤثر بصورة معاكسة لانخفاض الفعالية لانزيم CK خلال ميكانيكية S- glutathionylation التالية حيث يساهم GSH في زيادة فعالية انزيم CKمـــــــــن خلال الارتباط

بمجموعـةGS الـ S-glutathionylated للـــ CK وتكوين GSSG التي يتحقق فيـها مستوى GSH (الشكل المختزل للكلوتاثايون) كما في التفاعل الاتــي :-(Reddy *et al.* ٢٠٠٠)

$$\text{CK-SG} + \text{GSH} \rightleftharpoons \text{CK} + \text{GSSG}$$

٣.٣ تأثير مرض السكر على تركيز حامض اليوريك

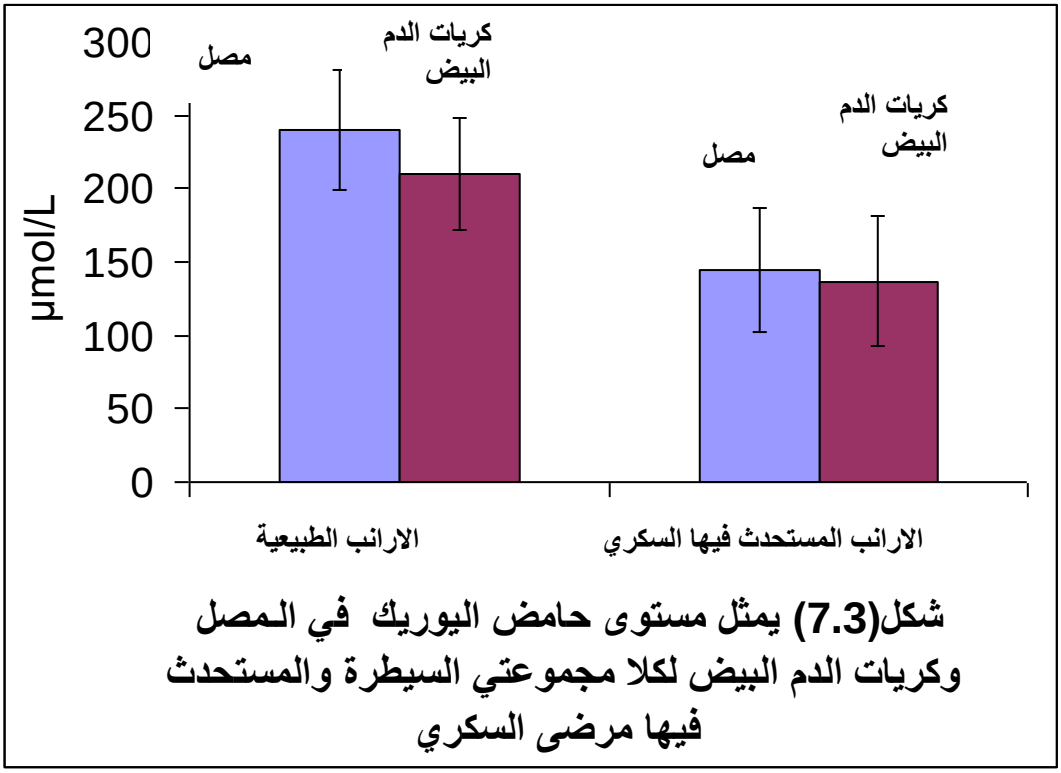
يتكون حامض اليوريك من خلال عمليات الاكسدة التي تعاني منها البورينات purines, فهو يمتلك خاصية أكتساح الجذور الحرة وزيادة سعة مضادات الاكسدة الموجودة في مصل الدم وكريات الدم البيض (Zitnanova *et al.* , ٢٠٠٤)

وجد في الدراسات السابقة (Mikami *et al.* , ٢٠٠٠) ان هناك علاقة عكسية مميزة بين تركيز حامض اليوريك و جهد التأكسد , (oxidative stress) حيث ان حامض اليوريك يتفاعل مع الاوكسيجين المشتق من الجذور الحرة ويصبح مؤكسد في العضلات الهيكليـــة وكما موضح سابقا" شكل (١٦.١). (Roch & Guisan , ١٩٩٩).

يكون تركيز حامض اليوريك في كلا "من المصل وكريات الدم البيض لمجموعـــــــــة الـ Rabbit with DM التي تمثل مجموعة الأرانب المستحدث فيها مرض السكري تكون أقل مما هو عليه في مجموعة السيطرة Control التي تمثل مجموعة الأرانب الطبيعية وكما هو موضح في جدول (٣.٣)والشكل .(٣.٣)

جدول (٣.٣) تركيز حامض اليوريك (µmol/L) في كلا "من المصل وكريات الدم البيض في مجموعتي السيطرة والمستحدث فيها مرض السكـــــري .

		Mean	SD	UA(µmol/L)		SE	٩٥٪ C.I.		P	Sign
				Upper	Lower		Upper	Lower		
Control (٢٢)	Serum	٢٤٠.٣	٤١	٣٥٢	١٩٩.٦	٨.٧	------	------	------	------
	WBC	٢٠٩.٩	٣٨.٦	٣٢٨	١٠٥.٥	٨.٢	------	------	------	------
Rabbit with DM (٢٢)	Serum	١٤٤.٦	٤٢	٢٢٥.٦	٧٥.٣	٨.٩٩	١٢٢.١	٦٩.٣	٠.٠٠١	Sign
	WBC	١٣٦.٨	٤٤.٨	٢٣٨	٥٩.٥	٩.٦	٩٩.٨	٤٦.٤	٠.٠٠١	Sign

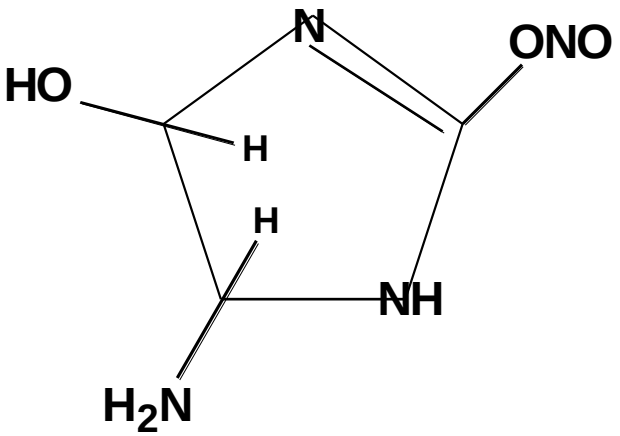


شكل(7.3) يمثل مستوى حامض اليوريك في المصل وكريات الدم البيض لكلا مجموعتي السيطرة والمستحدث فيها مرضى السكري

الدراسات السابقة بينت انخفاض حامض اليوريك في المرضى الذين يعانون السكري سببـــه -:

١. حامض اليوريك يعمل ككاسح للبيروكسي نايتريـــــــــــت (Skinner *et al.* , ١٩٩٨) ويزداد هذا الجذر في مرضى السكـــــري

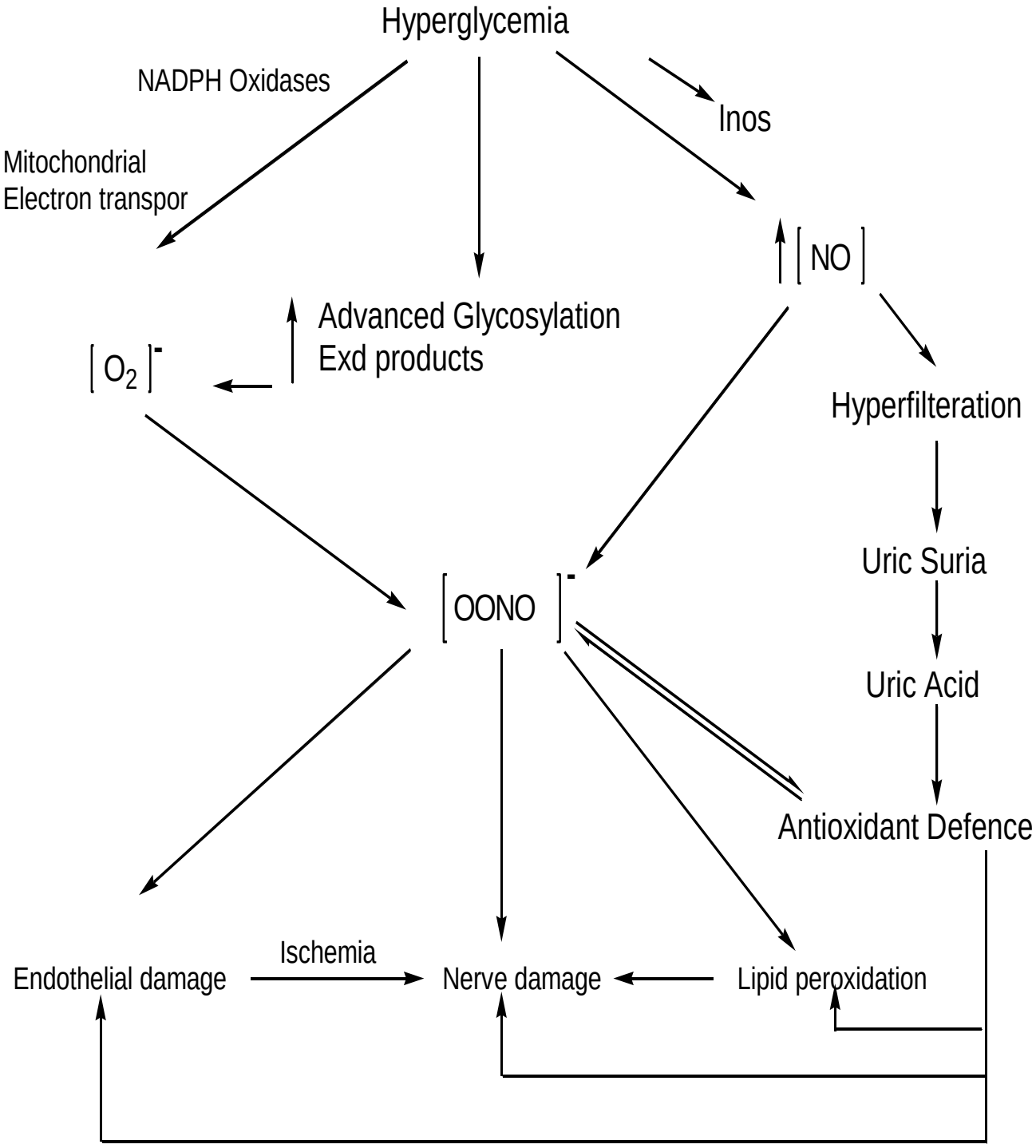
(Szudelski , ٢٠٠١ ; Chiarelli *et al.* ,٢٠٠٠) لنترجة حامض اليوريك .كما موضح بالشكل التالي -:



شكل (٨.٣) تركيب نواتج نترجة حامض اليوريـك Nitrated Uric Acid Product
(Skinner *et al.* , ١٩٩٨)

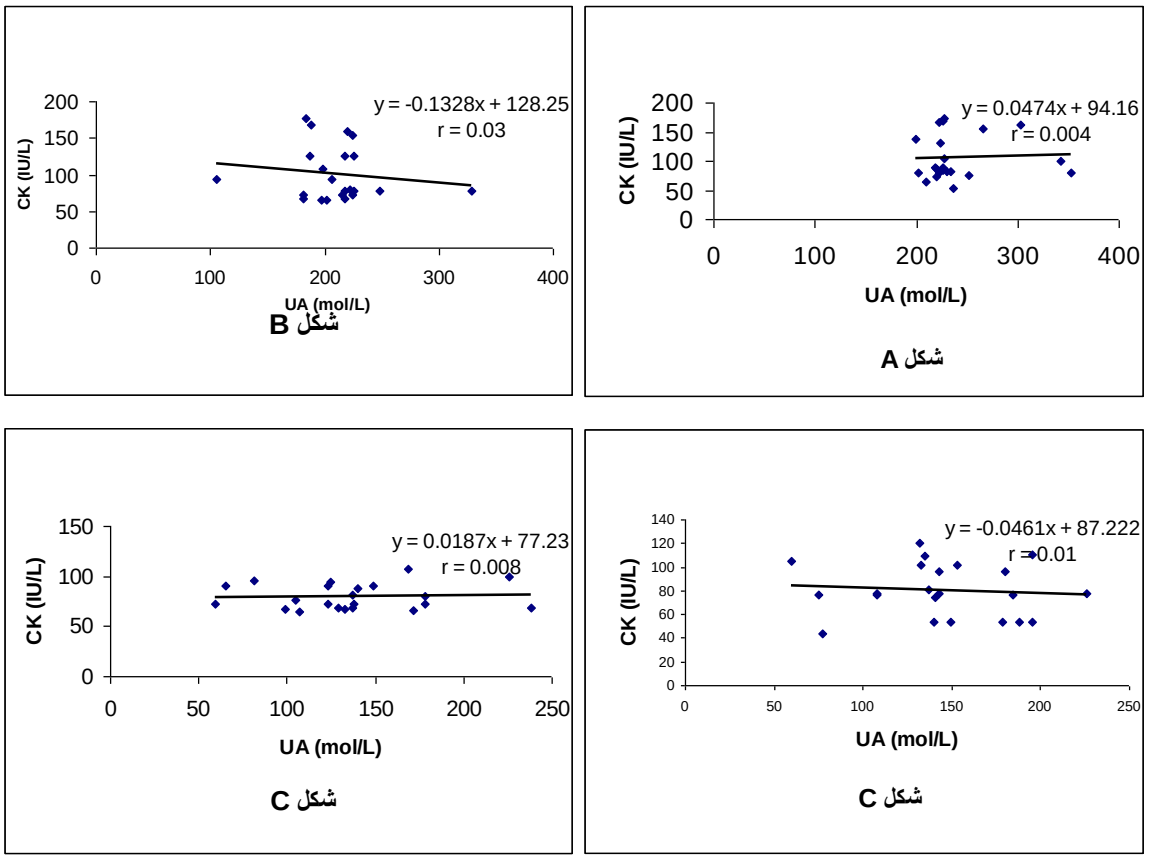
٢. ثنائي اوكسيد النايتروجين يستنزف حامض اليوريـــــــــــك (Kelly & Teletly , ١٩٩٧) حيث يوجد هذا المركب بكثرة في مرضى السكـــــــري. كما موضح سابقا" في تفاعلات حامض اليوريك (Szudelski , ٢٠٠١ ; Chiarelli *et al.* ,٢٠٠٠)

٣. Chiarelley *et al* اقترح ميكانيكية تحدث بسبب زيادة اوكسيد النايتروجين والنايتروجين بيروكسي نايتريت (Chiarelli *et al.* ,٢٠٠٠)هذه الميكانيكية ينتج عنها انخفاض نسبة حامض اليوريك في المصل وزيادته في البول كما موضح في الشكل التالي-:



شكل (٩.٣) الـ Nitrosative Stressوالـ Hyperfiltration مقتبس من (Hoeldtke et al. ٢٠٠٢)

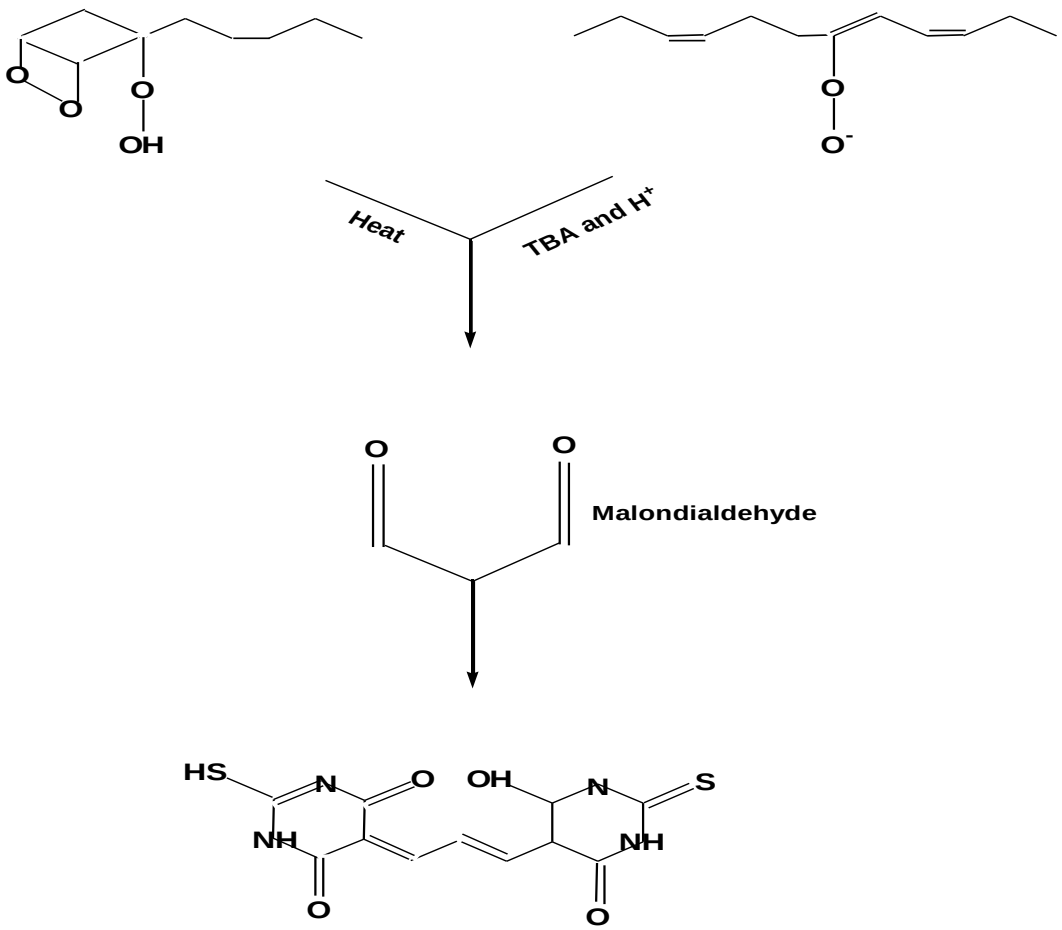
الشكل التالي يمثل العلاقة الارتباطية ما بين فعالية الـ CK وحامض اليوريك للمصل وكريات الدم البيض في كلا المجموعتين التي تمثل مجموعة الأرانب المستحدث فيها مرض السكري و مجموعة السيطرة وهي نتيجة تتوافق مع الدراسات السابقة التي تعتبر مؤشر على عجز في عدة اعضـــــــاء مثل الكليتين والقلب .(Popovich *et al.* , ١٩٨٩)



شكل (١٠.٣) العلاقة بين الـ UA والـ CK للمصل لمجموعة السيطرة وB العلاقة بين الـ UAوالـ CK في كريات الدم البيض لمجموعة السيطرة و C العلاقة بين الـ UA والـ CK للمصل لمجموعة الارانب المستحدث فيها مرض السكر وD العلاقة بين الـ UA والـ CK في كريات الدم البيض لمجموعة الارانب المستحدث فيها مرض السكري .

٤.٣ تأثير مرض السكر على المالون ثنائي الالدهايد

يعتبر تحديد المالونداالدهايد MDA مؤشرا "جيدا "لعمليات بيروكسيدات الـــدهون , Lunce) (١٩٩٠ كما هو موضح بالشكل التالي-:



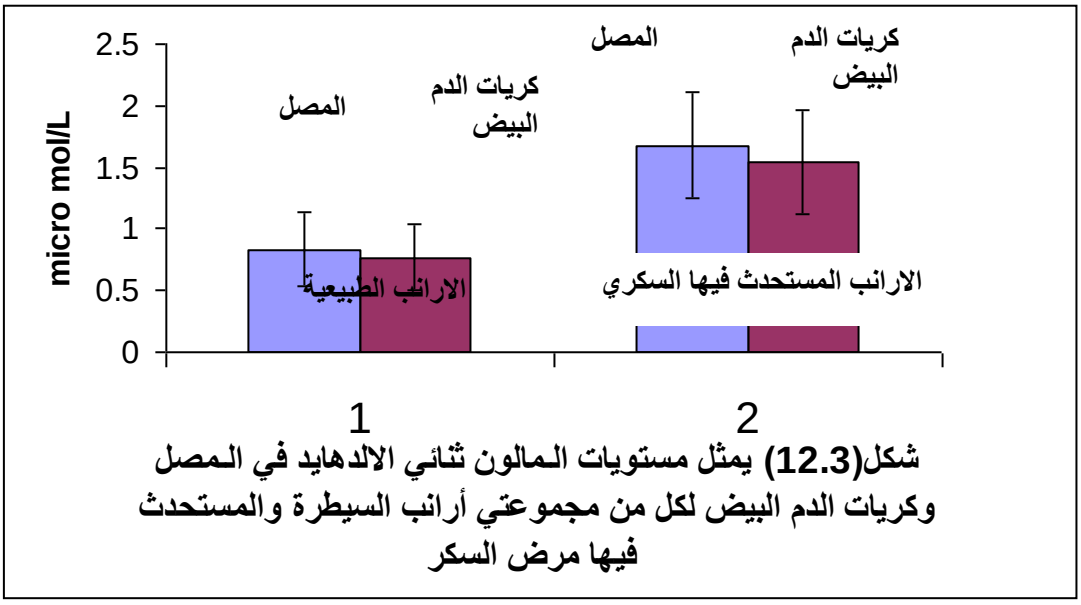
TBA Chromogen (absorbance 532 nm)

شكل (١١.٣) مخطط التفاعل الاساسي لعمليات بيروكسيدات الدهون

يكون مستوى المالون ثنائي الالدهايد في كلا "من المصل وكريات الدم البيض في مجموعة الأرانب المستحدث فيها مرض السكري تكون أكثر مما هو عليه في مجموعة السيطرة وكما هو موضح في جدول (٤.٣) والشكل (٣.٣) .

جدول (٤.٣) تركيز المالون ثنائي الالدهايد (µmol/L) في كلا "من المصل وكريات الدم البيض في مجموعتي السيطرة والمستحدث فيها مرض السكـــــري .

		Mean	SD	MDA(µ mol/L)		SE	٩٥٪ C.I.		P	Sign
				Upper	Lower		Upper	Lower		
Control (٢٢)	**Serum**	٠.٨٣	٠.٢٩	١.٥	٠.٤٧	٠.٠٦	------	------	------	------
	WBC	٠.٧٧	٠.٢٦	١.٥	٠.٣٨	٠.٠٥	------	------	------	------
Rabbit with DM (٢٢)	**Serum**	١.٦٨	٠.٤٢	٢.٥٣	٠.٩٤	٠.٠٩	١.٠٢	٠.٦٦	٠.٠٠١	**Sign**
	WBC	١.٥٤	٠.٤٣	٢.٤	٠.٨٥	٠.٠٩	٠.٩٦	٠.٥٩	٠.٠٠١	**Sign**

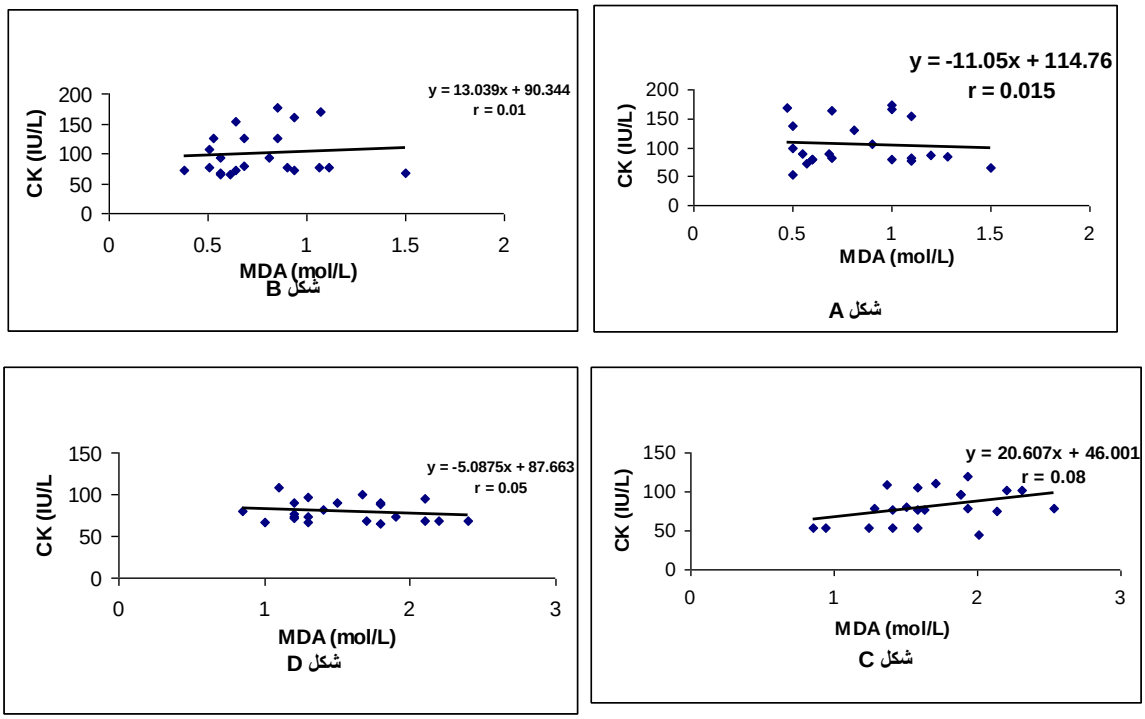


شكل(12.3) يمثل مستويات المالون ثنائي الالدهايد في المصل وكريات الدم البيض لكل من مجموعتي أرانب السيطرة والمستحدث فيها مرض السكر

الـ

شـــــكل

التالي يمثل العلاقة الارتباطية ما بين فعالية اضلـ CK و المالون ثنائي الالدهايد للمصل وكريات الدم البيضاء في كلا المجموعتين الأرانب المستحدث فيها مرض السكري و مجموعة السيطرة وهي نتيجة تتوافق مع الدراسات السابقة التي تعتبر مؤشر على عجز في عدة اعضـــــــاء مثل الكليتين والقلب . (Popovich et. al. , ١٩٨٩)



شكل (١١.٣) العلاقة بين الـ MDA والـ CK للمصل لمجموعة السيطرة وB العلاقة بين الـ MDAوالـ CK في كريات الدم البيض لمجموعة السيطرة و C العلاقة بين الـ MDA والـ CK

للمصل لمجموعة الارانب المستحدث فيها مرض السكر وD العلاقة بين الـ MDA والـ CK في كريات الدم البيض لمجموعة الارانب المستحدث فيها مرض السكري .

ان ارتفاع مستوى المالونداالدهايد MDA يحدث نتيجة لاستنزاف عدة صيغ من كاسحات بيروكسيدات الدهون والتي تتشكل عبر ميكانيكية تتكون من ثلاث خطوات :

(Rubert *et al*. ١٩٩٠ ; Vanlent *et al*. ٢٠٠٥)

١. الخطوة الابتدائية تنطلق بواسطة انتزاع الهايدروجين لتشكيل جذر الالكيل الدهني .

٢. خطوة الانتشار بواسطة تسريع جزيئة الاوكسجين ليشكل جذر بيروكسيد الدهن .

٣. تعتبر الخطوة النهائية لتكوين بيروكسيد الدهن المهدرج بواسطة انتزاع الهايدروجين من اصرة الاليل .

أن الزيادة المميزة في بيروكسيدات الدهون يسبب مضاعفات الجذور الحرة وقلة مضادات الاكسدة ,حيث ترتبط الجذور الحرة بالدهون وتؤدي الى حدوث تحطم النسيـــج (Cross , ١٩٨٧) ..

يتولد جذر الهايدروكسيل •OH نتيجة تفاعل فنتون الذي يتفاعل فيه بيروكسيد الهايدروجين مع ايون الحديدوز $Fe^{+٢}$ او ايون النحاس $Cu^{+٢}$ كما في المعادلة التالية -:

$$H_2O_2 + Fe^{+2} \longrightarrow 2\dot{O}H + Fe^{+3}$$

(Muslih *et al.* ٢٠٠٢)

كذلك يتولد جذر الهايدروكسيل • OH بسبب تفاعل هايبر وايز ففي هذا التفاعل يختزل الحديد $Fe^{+٣}$الى الحديد $Fe^{+٢}$ بواسطة الايون السالب للسوبر أوكسايد • $O_٢^-$وكما في المعادلة :

$$H_2O_2 + Fe^{+2} \longrightarrow \bar{O}H + Fe^{+3} + \dot{O}H$$

٥.٣ تأثير مرض السكري على الأنزيمات ومضادات الأكسدة في كل من المصل وكريات الدم البيض

يبين الجدول التالي المقارنات الرقمية والمعنوية مابين المصل وكريات الدم البيض في كل المتغيرات قيد البحث , للوقوف على ماهية هذه الاختلافات نلاحظ جدول (٥.٣)

جدول (٥.٣) يمثل فعالية أنزيم الكرياتين كاينير (U/L) و تركيز الكلوتاثايون (µmol/L) و تركيز حامض اليوريك (µmol/L) و تركيـــز المالون ثنائي الالدهايد (µmol/L) في كلا "من المصل وكريات الدم البيض في مجموعتي السيطرة والمستحدث فيها مرض السكري الـ حيث أن الـ % I تمثل الفرق العددي بين المصل وكريات الدم البيضاء لكل مجموعة على حده والـ r تمثل الارتباط المعنوي ما بين المصل وكريات الدم البيض لكل مجموعة ايضا"

Parameters		Control		Rabbit with DM	
		Serum	WBC	Serum	WBC
CK (IU/L)	Mean	١٠٥.٥	١٠٠	٨٠.٦	٧٩
	SD	٣٨	٣٦.٧	٢٢	١٢
	I %	٥.٢		١.٩	

	r	NS		NS	
GSH (µmol/L)	Mean	٢٦.٧	٢١.٧	١٦.٣	١٢.٨
	SD	١٠.٣	٩.٣	٦.٤	٧.١
	I %	١٨.٧		٢١.٤	
	r	NS		NS	
UA (µmol/L)	Mean	٢٤٠.٣	٢٠٩.٩	١٤٤.٦	١٣٦.٨
	SD	٤١	٣٨.٦	٤٢	٤٤.٨
	I %	١٢.٦		٥.٣	
	r	NS		NS	
MDA (µmol/L)	Mean	٠.٨٣	٠.٧٧	١.٦٨	١.٥٤
	SD	٠.٢٩	٠.٢٦	٠.٤٢	٠.٤٣
	I %	٧.٢		٩.٥	
	r	NS		NS	

من الجدول (٥.٣) يمكن ملاحظة أنه لا يوجد فروقات رقمية ومعنوية بين مستويات المصل وكريات الدم البيض لكل مجموعة ولجميع المتغيرات المدروسة وهي نتيجة متوافقة مع الدراسات السابقة (Muslih *et al.* ٢٠٠٢)والسبب يعود الى ان الانزيمات ومضادات الكسدة تعاني نفس التغيرات بسبب الامراض التي يتعرض لها الجسم في المصل وكريات الدم البيض.

٦.٣ الأستنتاجـــات Conclusions

١.لا يوجد فرق في دراسة مستويات الـ (كرياتين كاينيز, حامض اليوريك , كلوتوثايون و المالون ثنائي ألالدهايد) في المصل او في دراستها بكريات الدم البيض للأرانب المختبرية المستحدث فيها مرض السكري مقارنة مع مجموعة السيطرة.

٢. يعمل مرض السكري على زيادة توليد الجذور الحرة لدى الارانب فيمكن ملاحظة ذلك من خلال الزيادة الحاصلة في MDA والانخفاض في المتغيرات (CK و GSH و UA) .

٣. يمكن استخدام التغيرات الحاصلة في الـ(كرياتين كاينيز, حامض اليوريك, كلوتوثايون, المالون ثنائي ألالدهايد) لأستنتاج مقدار تأثيرات مرض السكري على الارانب.

٤.يكون تاثير مرض السكري في متشابهات انزيم الكرياتين كاينيز للـ MM-CK والـMB-CK أكثر من تاثيره على الـBB-CK .

٧.٣ الدراسات المستقبلية

١ . دراسة العلاقة بين فعالية انزيم الكرياتين كاينيز و بعض العناصر الانتقالية مثل Zn, Fe في كريات الدم البيض للارانب المستحدث فيها مرض السكر ومقارنتها مع الطبيعية .

٢ . دراسة تأثير بعض الاغذية او العقاقير التي تجرع للارانب المستحدث فيها مرض السكر على مضادات الاكسدة .

٣ .اختيارحيوانات مختبرية اخرى لايجاد العلاقة بين فعالية انزيم الكرياتين كاينيز وبعض مضادات الاكسدة .

المصادر

Akkus, I.; Kalak, S.; Vural, H.,;Caglayan, .;Menekse,E.;Can,G., and Durmus, B. ,(١٩٩٦): Leukocyte Lipid Peroxidation, Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxide, and Serum and Leeukocyte Vitamin C Levels of Patients with Type II Diabetes Mellitus.Clinica Chimica Acta.;٢٤٤:٢٢١-٢٢٧.

Abdulsamie H. Alta' ee,Oda M. Al-Zamely,Mufeed J. Ewadh and Fadhil M. A., ,(٢٠٠٣):Oxidative Stress Measurement via Trace Elements Levels in Sera of Patients with Cancer. Nat. J. Chem. ;١٢ ,٥٦٠ -٥٧٠ .

American Diabetes Association (ADA) (١٩٩٩). the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care; ٢٢:٥-١٩ .

Arstall M. A., Bailey C., Gross W. L., Bak M., Balligand J-L, and Kelly R. A., J. (١٩٩٨): Moll.Cell. Cariol;٣٠:٩٧٩-٩٨٥.

Aruna P., (٢٠٠١); Antioxidant activity .Analytical progress , ; ١٩ ٢١٣-٢٢١.

Asim A. Abdul- Hassain (٢٠٠٤):Serum Markers of Oxidative Stress and Complications of Diabetes Mellitus.NationalJ. of Chem.; ١٦,٥٦٦ ٥٧٢.

Atalay, M.;and Laaksones, D.E. (٢٠٠٢)Diabetes,Oxidative Stress and Physical Exercise.J. Sports Science and Medicine,;١:١-١٤.

Atkinson, M. A.; Maclaren , N. K. & Winter, W. F. (١٩٩٤). The pathogensis of insulin dependent diabetes. Engl. J. Med.,٣٣١:١٤٢٨ – ١٤٦٣ .

Bagchi, K.; and Puri , S. (١٩٩٨).Free Radical and Antioxidant in Healthy and Disease . Estran Mediterrean Health Journal, ;٤:٣٥٠-٣٦٠.

Bailey C.C. (١٩٧٤) . The Treatment of Diabetes.٨th ed, Marblean Febiger,Philadelphia,٣٤:١٧٨-١٨٠.

Banerjee A., Grosso M.A., Brown J.M., Rogers K. B., and Whitman G.J.R., Am.J. (١٩٩١)Physiology. National J of Chem.; ٢٦١ ; ٥٩٠-٥٩٨.

Bannai S., and T ateishi N.,J. (١٩٨٦) Membrane Biology., Phiiladelphia, Lippincott Williams & Wilkins Company ٨٩,١١٥-١٢٢.

Barbara K. , Jarosaw D. , Katarzyna W. , Andrzej S. , Ewa S. and Alojzy D. ; (٢٠٠٠) : Antioxidant defense in centenarians (a preliminary study). ٤٧ ;٢٨١–٢٩٢ .

Baynes J.W., (١٩٩١):Diabetes,; Phiiladelphia, Lippincott Williams& Wilkins Company ٤٠;٤٠٥-٤١٥.

Bell, R.H. and Hye,R.J. (١٩٨٣).Current research review-animal models of diabetes mellitus; Physiology and Pathology.J.Surg.Res.٣٥:٤٣٣-٤٦١.

Betty A.M.,Wendy S.,John C.L.,Amy L.G.,Irangb D.G. and Jaoseph L.E. ,(٢٠٠١):Protection Against Oxidative StressInduced Insulin Resistance in Rat in Muscle Cell by Micromolar Concentrations of Lipoic Acid, Amer.J.Physiol Diabetes,٥٠,٤٠٤-٤٢٤.

Bihairi L G. , Anju P. and Najma Z Baquer,(٢٠٠٤).Protective effects of sodium orthovanadate in diabetic reticulocytes and ageing red blood cells of wistar rats;J. Biosci. ٢٩.١-٥٠.

Bogardus, C.; Mott,D.M. & Reaven, G.(١٩٨٥). Relationship between degree of obesity & *in vivo* insulin action in man.Amer.J.Physiol.,٢٤٨:١٨٦ -٢٩١ .

Bonnefont R. , Bastard M., Jaudon and Delattre,(١٩٩٤) ; Consequences Of The Diabetic Status On The Biochem; Amer.J.Physiol ٣٤;٥٤٤-٥٧٦

Buettner G. R.,(١٩٩٣)Arch.Biochem.Biophys. Physiology and Pathology.J.Surg.Res,٦٥;٥١٠:٥٣٥.

Burger,A.R., Richterich and Aebi,H. (١٩٦٤),Biochem. J. Biosci. ٣٠;٣٣٩,٣٠٥

Burstein M., (١٩٧٠):Lipid Res., Saunders Company, Tokyo, ١١:٥٨٣-٦٠١.

Burtis,C.A., and Ashwood,E.R. (١٩٩٩) " Tietz Textbook of Clinical Chemistry," ٣rd ed.,W.B.Saunders Company, Tokyo, , pp.:١٠٣٤-١٠٥٤.

Cedeberg, J. (٢٠٠١) :Oxidative Stress, Antioxidative Defense and Outcome of Gestation in Experimental Diabetic Pregnancy," (Thesis),Ph.D., Sweden, Up Psala University,.

Cerutti,P.A.(١٩٩٤). Oxy-Radicals and Cancer. Lancet,;٣٤٤:٨٦٢-٨٦٣.

Champe, P.C., and Harvey, R.A. (١٩٩٤): Lippincott's Illustrated Reviews:Biochemistry. ٢nd. Ed. Phiiladelphia, Lippincott Williams& Wilkins Company,:٢٩٥-٣٠٢.

Chiarelli F., Cipollone F., Romano F., Tumini S., Costantin F., Ricco L.D., P omilio M., Pierdomenico S. D., Marini M., Cuccurullo F., and Mezzetti A., (٢٠٠٠):Diabetes, Saunders Company, Tokyo,; ٤٩: ١٢٥٨-١٢٦٨.

Christele S., Francoise F., Maurice L., Elisabeth L.,Christian C., and Jacky C. (١٩٩٨) ; The Use of Phosphocreatine Plus ADP as Energy Source for Motility of Membrane-Deprived Trout Spermatozoa. Cell Motility and the Cytoskeleton ٤١:٩١–١٠٦.

Collier, A.; Rumley, A.; Rumley, A.G.; Paterson, J.R.; Leach,J.P.;Lowe,G.D.O,and Small, M. (١٩٩٢);FreeRadical Activity and Homostatic Factors in NIDDM Patients with and without Microalbuminuria.Diabetes, ٤١:٩٠٩-٩٢١ .

Colman, P.G.; Wang, L.I., and Lafferty , K.J(١٩٨٩). Molecular Biology and Autoimmunity of Type ١ Diabetes Mellitus,; In: Drazini,B.;Melmed, S.; Lepoith, D., eds. Molecular and Cellular Biology of Diabetes Mellitus.Insulin Secretion.New York, Alan R.Liss Inc., pp.:١٢٥-١٣٧.

Corbett, J.A.. and McDaniel, M.L١٩٩٥. Intraislet Release of Interleukin ١ Inhibits B-Cell Expression of Inducible Nitric Oxide Synthesis.J.Exp.Med.,;١٨١:٥٥٩-٥٦٨.

Cross C.E., (١٩٨٧): Ann. Intern. Med. Saunders Company, Tokyo,; ١٠٧:٥٢٦-٥٣٣.

Delmas-Beanvieux, M.C.; Peuchant, E.; Couchouron, A.; Constans, J.;

Sergeant, C.; Simonoff, M.; Pellegrin,J.L.;Leng,B.; Corni, C.,and Clerc, M. (١٩٩٦): The Enzymatic Antioxidant System in Blood and Glutathione Status in Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Infected Patients: Effects of Supplementation with Selenium or Beta –Carotene.Am.J. Clin. Nutr.,;٦٤:١٠١ -١٠٧ .

Domingues, C.; Ruiz, E.; Gussinye, M., and Carrascosa, A. (١٩٩٨) Oxidative Stress at Onset and Early Stages of Type ١ Diabetes in Children and Adolescents.Diabetes Care,;١٢:١٧٣٦-١٧٤٢ .

Donald V., Judith v., Charlotte P. W.,(٢٠٠٢): Fundamentals of biochemistry, new york,٤٥;١٢٣-١٤٣.

Douglas R. , Anna-Liisa L. , Young-Mi G., Rakesh P., Dale A.,Henry J. and Victor M. (٢٠٠٢) ; Induction of glutathione synthesis by oxidized low-density lipoprotein and١-palmitoyl-٢-arachidonyl phosphatidylcholine : protection against quinone-mediated oxidative stress . .Insulin Secretion.New York, Alan R.Liss Inc.٣٩;٥١٢-٥٣٣.

Edwards, C.R.W., and Bouchier, J.A.D.(١٩٩١).“ Disease of Liver and Biliary System: Principles and Practice of Medicine” Eds. Churchill Press. Livingstone.,pp.٤٩١-٤٩٢.

Eldjarn L., Pihl, J.(١٩٥٧);Biol. Chem., .Insulin Secretion.New York, Alan R.Liss Inc pp٢٢٥-٢٥٥.

Elgawish, A.; Glomb, M.; Friendlander, M. , and Monnier,, V.M. (١٩٩٥):Involvement of Hydrogen Peroxide in Collagen Cross-linking by Glucose In Vitro and In Vivo. J. Bio. Chem.;٢٧١:١٢٩٦٤-١٢٩٧١.

Esther, G.; (٢٠٠٦) Diabetes in Rabbit ; . Clinical Science; ٩١;٥٧٥-٥٨٢.

Ewadh, M.J., and Jabir, F.A. (٢٠٠٢):Homocystine Induce Endothelial Cells Damage Due to Glutathione Level Depletion. Journal of AL-Qadisiya, Pure Sciences,.

Fadhil J.Al-Toma and Sami A. Al- Mudhaffar, (٢٠٠١): Creatine Kinase Isoenzymes In Sera of Acute Myocardial Infarction. Nat. J. Chem.٤;٥٨٨-٥٩٤.

Fadhil J.Al-Toma.(١٩٩٨): Elevated Serum CK-BB Isoenzyme Activity levels in patients infected with Acute viral hepatitis. National J. Chem,:٣٢٣;١٢٦٥-١٢٧٣.

Feirong K. and Jagdish S.(١٩٩٧) , Preparation, *In Vitro* Release, *In Vivo* Absorption and Biocompatibility Studies; Journal Of Biological Chemistry,٨٦,٤٨٨-٤٩٣.

Ferenc P., Peter G., Katalin B., and Andras P.; (٢٠٠٠): Stimulation of the pentose phosphate pathway and glutathione levels by dehydroascorbate, the oxidized form of vitamin C. College of Medicine, Syracuse, New York ١٣٢١٠, USA:٦٧;١٢٤-١٥٦ .

Francesca S., Annamaria F., Angela I., Stefania F., Salvatore S., and Matilde V. ; (١٩٩٩) Enhanced Glutathione Levels and Oxidoresistance Mediated by Increased Glucose-٦-phosphate Dehydrogenase Expression . The Journal Of Biological Chemistry ٢٧٤;٢٧٥٠–٢٧٥٧,.

Frank J. and Teresa D.; (١٩٩٧) Nitrogen dioxide depletes uric acid and ascorbic acid but not glutathione from lung lining fluid . Biochem. J. ٣٢٥, ٩٥ - ٩٩ .

Frei B. (١٩٩٩):Molecular and biological mechanisms of antioxidant action, FASEB J.,١٣;٩٦٣-٩٨٤.

Fujimoto,W. Y.; Leontti, D.L.; Kinyoun, J.l.; Shuman, W.P. & Wahl,P.W.(١٩٨٧). Prevalence of complication among scondgeneration Japanes – American men with diabetes,impaired glucose tolerance or normal glucose tolerance. Diabetel., ٣٦:٧٣٠ – ٧٣٩.

Ganong, W.F(١٩٩٥). Review of Medical Physiology;١٨th ed.Hall International Com. USA., ,pp. ٣١٣-٣١٧.

Genet S., Kale R.K., Baquer N.Z. (٢٠٠٠);, Mol.cell Biochem., ٢٤;٢١٠-٢٣٧.

Gerbitz, K.D. (١٩٩٢); Dose the Mitochondrial DNA Play a Role in the Pathogenesis of Diabetes ,Diabetologia;٣٥:١١٨١-١١٨٦.

Giugliano, D.; Ceriello, A., and Paolisso, G. (١٩٩٥): Diabetes Mellitus,Hypertension, and Cardiovasular

Disease:Which Role for Oxidative Stress.Metabolism,;٤٤:٣٦٣-٣٦٨.

Goodman, H. M.(١٩٨٠). The pancrease & regulation of metabolism In : Medical physiology. Vol.٢ ١٤th edn., The C.V. Mosby Co., St. Lows. London,pp٢٣٦-٢٦٤.

Gross W.L., Bak M. I., Ingwall J. S., Arstall M. A., Smith T. W., Balligand J-L., and Kelly R. A.,(١٩٩٦); Biochem. Proc. Nati. Acad. Sci.; ٩٣:٥٦٠٤-٥٦٣٤.

Gunst, J.J.; Langlois, M.R. and Delanghe, J.R. (١٩٩٨):Serum Creatine Kinase Activity is not a Reliable Marker for Muscle Damage in Conditions Associated with Low Extracellular Glutathione Concentration. Clinical Chemistry; ٤٤:٩٣٩-٩٤٣.

Guyton A.C. and Hall,J.E. (١٩٩٦) .Textbook of medical physiology. ٩th.ed., Saunders co. London.england.

Hadwan, M.H. (٢٠٠٥) ;Diabetes Correlation between Creatine Kinase Activity and Antioxidants in Diabetes Mellitus Type ١ & Type٢; M.Sc.Thesis, Iraq,Babylon University,.

Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C.,(١٩٩٩). Free Radicals in Biology and Medicine;٣rd ed .,Oxford University Press. UK;.٧٥,٨٦٧-٨٧٤.

Halliwell, B., and Aruoma. O.I.(١٩٩١): DNA Damage by Oxygen-Derived Species. Its Mechanism and

Measurement in Mammalian System.FEBS Lett.,;٢٨:٩-٩١.

Hanifi, P.;deknijf, B.O.; Roep, B.; Naipal ,F.; Gorus, F.& Schuit, M.J.(١٩٩٨). Genetic structure of IDDM. Diabetes, ٤٧: ٢٦٣ – ٢٦٨.

Hanninen, Amesterdam and,Elsevier, (١٩٩٤); Oxford University Press. UK. pp.٨٩-١٢٦.

Harapin M. ,Bau R., L. B Drica, and, Potoânjak ; (٢٠٠٠):Correlation Between Glutathione Peroxidase Activity And The Quantity Of Selenium In The Whole Blood Of Beef Calves . Clinic for Internal Di ea e of Dome tic Animal ; ACTA VET. BRNO , ٦٩: ٨٧–٩٢ .

Hoeldtke R. D., Bryner K. D., Mc Neill D. R., Hobbs G.R., Riggs J. E., Warehime S. S., Christic I., Gancer G., and Dyke K. V.,(٢٠٠٢):Diabetes,;٥١:٢٨١٧- ٢٨٣٣.

Imlay. J.A., and Linn, S.(١٩٨٨): DNA Damage and Oxygen Radical: Oxford University Press;٣٢;٢٣٥-٢٥٤

Ingrid Z., Peter K. , Okezie I.,Maria S.,IvetaGaraiova, Jana M., Terezia K.,Siegfried P. , Zden ka D. ; (٢٠٠٤) : Uric acid and allantoin levels in Down syndrome:antioxidant and oxidative stress mechanisms. Clinica Chimica Acta ٣٤١ :١٣٩–١٤٦ .

Ismail C. and Esref Y. ; (٢٠٠٢) Effect of Experimental Diabetes Mellitus on Plasma Lactate Dehydrogenase and Glutamic Oxaloacetic Transaminase Levels in Rabbits .Turk J Biol ٢٦ ; ١٥١-١٥٤.

Jaber,Ferdous Abbas; (٢٠٠٦): Evaluation the Oxidative Stress in Patients with Diabetes Mellitus Using Some Enzymatic Activities : PhD. Thesis ,University of Babylon.

Jocelyn P.C.,(١٩٥٨):Clinical Chemica Acta,; Oxford University Press. UK. ٣: ٤٠١-٤٣٠.

John A.,Morrison,Donald W.,Jacobsen, Dennis L.,Killian R,Philip K.,and, Stephen R. (١٩٩٩) : Serum Glutathione in Adolescent Males Predicts Parental Coronary Heart Disease . Circulation. ;١٠٠:٢٢٤٤-٢٢٤٧ .

Jorg B., Jorg L., Jan Seyfried and Johannes Dichgans ; (٢٠٠٠): Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration . J. Biochem. ٢٦٧, ٤٩٠٤ -٤٩١١.

Kannel, W.B. (١٩٨١):Cigarettes Coronary Occlusion and Myocardial Infrction.J.AMA.;٢٤٦:٨٧١-٨٨٢.

Katalin B., Eliza H., Emanuela C., Nick J., and Andras P.; (١٩٩٦):Glutathione Levels and Sensitivity to Apoptosis Are Regulated by Changes in Transaldolase Expression. Vol. ٧١, No. ٥١, pp. ٣٢٩٩٤–٣٣٠٠١.

Kelly, S.A.;Havrilla, C.H.M.;Brady,T.C.; Abramo, K.H.,and Levin, E.D. ,(٢٠٠٥): Oxidative Stress in Toxicology:

Established Mammalian and Emerging Piscine Model Systems Review. Environmental Health Perspective; ٧;١١٣-١٢١.

Kirk R. and Ronald P. (١٩٨٨); Free Radical Metabolite of Uric Acid. The Journal Of Biolocical Chemistry.. Printed in U.S.A. ٢٦٣, pp. ١٧٠٩-١٧١٢

Kolterman, O. G. (١٩٩٤).O verview of type Idiabetes: Two day international conference on diabetes. IBC Technical.services Ltd١٩ th ,pp ١٣٠-١٤٤.

Konorev E., A.,Kalyanarman B.and, Febs L.,(١٩٩٨); Saunders co. London.england.٤٢٧: ١٧١-١٧٩.

Kouji U., Kumiko T., Xavier B., Franck Z.,and, Tomohiko S. (٢٠٠٥); Phosphagen kinase of the giant tubeworm Riftia pachyptilaCloning and expression of cytoplasmic and mitochondrial New York,Alan,R.Liss Inc.٤٥;٧١٣-٧٤٣.

Leahy, J.L., and Weir, G.C. (١٩٨٩): Non-Insulin-Dependant DiabetesMellitus:Current Concepts of Pathogenesis In: Molecular and Cellular Biology of Diabetes Mellitus.Insulin Secretion.New York,Alan,R.Liss Inc.,;pp.:١٤٩-١٥٨.

Lee J., Koo N. and Min D.B. (٢٠٠٤): Reactive Species,Aging,and antioxidative Nutraceuticals,

Comprehensive Reviews in food Science and food safety,٣;٢١-٢٧.

Lise L. K., Barbara M.K., Elizabeth M. W., Johannes D. V., Marty S., Susan S. M.,Dongchang Y., Pierre L.,and Peter C. B. (٢٠٠١); Decrease in β-Cell Mass Leads to Impaired Pulsatile Insulin Secretion, Reduced Postprandial Hepatic Insulin Clearance, and Relative Hyperglucagonemia in the Minipig;Diabetes section,٢٣;٣٧٨-٣٨٥.

Liu Z.J.and, Zhou J.(١٩٩٥), Biochem. Biophys. Acta. The Journal Of Biolocical Chemistry.. Printed in U.S.A.,٦٧٢;١٢٥٣-١٢٦٣.

Lomaestro B., and Malome M.(١٩٩٨), Pharma Issues.Ann.Pharmacother. ,٢٩,١٢٦٣-١٢٨٧

Lunec J. (١٩٩٠),Review Article, Ann. Clin. Biochem., , ٢٧,١٧٣- ١٨٢.

Manana E., Irakli C., Maia G., Marina M., Ivane D., (٢٠٠٣): The Investigation of Pharmacological Peculiarities of Bludiabin on Experimental Model of Insulin – depended Diabetes Mellitus. Institute of Medeical Bio.,٥٧;٥٣٤-٥٦٥.

Manson, J.E.; Rimm, E.B.; Stampfer,M.J.; Colditz, G.A. & Speizer, F.E.(١٩٩١). Physical activity & incidence of non – insulin – dependent diabetes mellitus in woman . Lancent, ٣٣٨: ٧٧٤-٧٧٨.

Maiorino M., Gregolin C.,and, Ursini G. (١٩٩٠), Meth. Enzymol ., ; ١٨٦:٤٤٨-٤٥٧.

Mathews C.E., Baglley R., and Leiter E.H.,(٢٠٠٤):Diabetes, ,٥٣:١٢٥-٢٠٧.

Mc Cay P.B.,Lai E.K., Poyer J.L., Du Bosc C.M.,and, Janzen E.J., (١٩٨٤);Bio. Chem., ٢٥٩:٢١٣٥-٢١٤١.

McLetchie, (٢٠٠٢): Retired Pathologist, Gilford, New Hampshire, US, ALLOXAN DIABETES . J R Coll Physicians Edinb; ٣٢:١٣٤–١٤٢ .

Meierjohan S.,W, AND Műller S., (٢٠٠٢): diabetes mellitus Biochem.J,٣٦٣,٨٣٣-٨٤٧.

Meister A., J. (١٩٩٤): Bio. Chem., Institute of Medeical Bio.٢٦٩,٩٣-٩٧.

Meister, A. (١٩٩٥): Glutathione Metabolism. Methods in Enzymology, Diabetes section;٢٥١:٣-٧.

Mekhfi, H.; Veksler, V.; Mateo, P.; Maupoil, V.; Rochette, L., and Ventura-Clapier, R. (١٩٩٦): Creatine Kinase is the Main Target of Reactive Oxygen Species in Cardiac Myofibrils. Circulation Research,;٧٨:١٠١٦-١٠٢٧.

Mercer, (١٩٧٤): Clin. Chem. Diabetes section.;٢٠:٣٦-٤١.

Mikami T., Yoshino Y.,and Ito T., (٢٠٠٠): Free Radical Res., J. Bio.sci; ٣٢; ٣١-٤٢.

Mohammad Riz. S., Asia T., K Moorthy,Mohd. E. H., S.F. Basir and Najma Z.(٢٠٠٥). Amelioration of altered antioxidant status and membrane linked functions by vanadium and Trigonella in alloxan diabetic rat brains.J. Bio.sci.٣٠, ٤٨٣ – ٤٩٠ .

Mufeed J.,Ewadh, Talib F.A. and Haider K.Al-saadi(٢٠٠٣);Effect of Prostaglandin $F_{٢\alpha}$ on The Serum Glutathion Levels in Male Albino Mice.National J.of Chem,:١١,٤٥٢-٤٥٧.

Murray, R.K.; Garnner, D.K.; Mayes, P.A.,and Rodwell, V.W. (١٩٩٦) “Harpers Biochemistry” ٢٥th ed. Appleton & Lange Press,Lebanon,;٦٤٠-٦٤١.

Muslih R. K., Al-Nimer M.S., Al- Zamely O. M.,(٢٠٠٢): National Journal of Chemistry;: ١٣٩;٢٤٠-٢٥١.

Myers, M.A.; Rabin, D.M.& Rowley, M.J.(١٩٩٥). Pancereatic islet cell cytoplasmic antibody in proteinuria ٧ smoking in

type I diabetes mellitus.Acta. Diabetol., ٣٠ :١٠٥-١٠٧ .

Oberley, L.W. (١٩٨٨): Free Radical and Diabetes. Free Radical Bio. Med.,;٥:١١٣-١٢٤.

Oda M., Y. Al- Zamely , (٢٠٠٣);Oxidative Stress Measurement in Patients with Hodgkin and non-Hodgkin Lymphoma.National Journal of Chem., ١٢:٥٤٦-٥٦١.

Olefsky, J.m.; Kolterman, O.C.& Searlett, J.A.(١٩٨٢) Insulin action & resistance in obesity & non insulin dependent type I diabetes mellitus, Am. J. physiol.,٢٤٣: ١٥ -٣٠.

Orrenius S., and Moldeus P. (١٩٨٤),TIPS,٩,٦٣. Oxidant/Antioxidant Balance Diabetes& Metabolism;٢٦, ١٦٣-١٧٦ .

Paolisso, G.; Tagliamonte, M.R.; Barbieri, M.;Zito, G.A.; Gambardella,A.; Varricchio, G.; Ragno, M., and Varricchio, M.(٢٠٠٠):Chronic Vitamin E Administration Improves brachial Reactivity and Increases Intracellular Magnesium Concentration in Type II Diabetic Patients. J ournal of Clinical Endocrinology and Metabolism,;٨٥:١-١٧.

Percy A. K. and Brady R.O. (١٩٦٨);Metachromatic leukodystrophy: diagnosis with samples of venous blood Science, ١٦١,٥٩٤-٥٩٩.

Philipp K.,Martin S., Markus W., Else Z., Barbara R. R., Thomas V.and Theo W. , (١٩٩٦): Indetification of

two distinctly localized mitochondrial creatine kinase isoenzymes in spermatozoa.journal of Scie.:١٠٩:٢٠٧٩-٢٠٨٨.

Popovich, B.K.; Boheler, K.R., and Dillmann, W.H.١٩٨٩)Diabetes Decreases Creatine Kinase Enzyme Activity and mRNA Level in the Rat Heart . Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., ;٢٥٧:٥٧٣-٥٧٧.

Popovich, B.K.; Sayen, M.R., and Dillmann, W.H.Insulin(١٩٩١) Responsiveness of CK-M and CK-BmRNA in the Diabetic Rat Heart. Am.J. Physiol. Endocrinol. Metab.,;٢٦١:٣٧٧-٣٨١.

Pushpa B., Chandra and Misra M.; (٢٠٠٥); Level of free radical scavengers and antioxidants in post – reperfused patients of myocardial infarction . Current Science, ٨٩,. ١-١٠.

Raad K., Muslih, Marwan S.Al-Nimer and Oda M.Y. Al-Zamely. (٢٠٠٢)The Level of Malondialdehyde after activation with ($H_٢O_٢$ and $CuSO_٤$) and inhibition by Desferoxamine and Molsidomine in the Serum of Patients with acute Myocardial Infarction.Natio. J. of Chem. ,:٥,١٣٩ -١٤٨.

Ralf D., Jan M. and Johannes H.; (٢٠٠٠) ;Glutathione metabolism in brain Metabolic interaction between astrocytes and

neurons in the defense against reactive oxygen species . J. Biochem. ٢٦٧, ٤٩١٢ - ٤٩١٦.

Reddy, S.; Jones, A.D.; Cross, C.E.; Wong, P.S-X. , and Van d., (٢٠٠٠);Inactivation of Creatine Kinase by S-Glutathionylation of the Active –Site Cysteine Residue .Biochem.J.;٣٤٧:٨٢١-٨٢٧.

Rej R., (١٩٩٨);clin. Chem., J. Bio.sci;٤٤:١١-٤٩.

Rechard G. , (١٩٩١):Antioxidant and aging ١,٢ . American Society for Clinical Nutrition :٥٣:٣٧٣٥-٣٧٣٩.

Robert D., Kimberly D., Daniel R., Gerald R., Jack E.,Sarah S., Ian C., Gary G., and Knox V.; (٢٠٠٢):Nitrosative Stress, Uric Acid, and Peripheral Nerve Function in Early Type ١ Diabetes . Diabetes ٥١:٢٨١٧–٢٨٢٥, .

Roch –Ramel F. and, Guisan B. (١٩٩٩), Biochem ;News Physiol. Sci.,; ١٤;٣٤٢-٣٤٩.

Roper N. (١٩٩٦): Mans Anatomy, Physiology, Health and Environment ::Churchill Livingstone Edinburgh London& New York pp١٥٣ – ١٥٥.

Rose S. and Wilson J.W. (١٩٩٩) : Foundation of Anatomy and Physiology ::Churchill Livingstone Edinburgh London& New York pp١٤١-١٥٣.

Rossini ,A. A.; Greiner, D. L.; Friedman, H.P.& Mordes, J.P.(١٩٩٣) . Immunopathogenesis of diabetes mellitus . Diabetes Reviews, ١:٤٣ – ٧٣ .

Rubert M. J., Young T. S.,Trenton T.G.,and Lancet, (١٩٩٠); Diabetes; Biochem.J., ٣٣٦;١٤٣-١٥٥.

Salman, A.M.H. “Clinical Biochemical Study of Oxidation and Antioxidants in Patients with Non-Insulin-Dependant Diabetes Mellitus ” (Thesis) ,Ph.D., Iraq, Baghdad University,٢٠٠١.

Scapinello C. , Michelan A. C., Furlan A. C., Moreira I.,Martins E. Schulz J.B., Lindenau J.,Seyfried J., and Dichgans J. (٢٠٠٠), Eur.J. Biochem. ,٢٦٧,٤٩٠٤-٤٩١٥ .

Scott W. (١٩٩٧): The role of oxidative stress and antioxidantsin preeclampsia. Contemporary OB/ GYn Archive. May ٣٥;٧٥٤-٧٦١.

Sen, C.K., and Hanninen, O.(٢٠٠١),Physiological Antioxidants In: Exercise and Oxygen Toxicity. Ed. Sen, C.K.; Packer, L.; ٦٢;٦٥٢-٦٧١.

Seppo L.; Leo N.; Tapani R.;Markku L., (١٩٩٨);Serum Uric Acid Is a Strong Predictor of Stroke in Patients With Non- Insulin – dependent Diabetes Mellitus.;٢٩ :٦٣٥-٦٣٩ .

Simic M.G.,and Jovanovic S. V. (١٩٨٩), activation of Creatine Kinase J.Am. Chem.S ١٥;١١١-١٢٥.

Simon P., Wol ZrmN Y., and James V.; (١٩٩١): Protein Glycation And Oxidative Stress In Diabetes Mellitus And Ageing . Free Radical Biology & Medicine, ١٠, ٣٣٩-٣٥٢.

Skinner K. A.,White C.K., Patel R., Tan S., Kirks M.,Dorley-Usmar V., and Parks D. A., (١٩٩٨). Biol.Chem., ٢٧٣:٢٤-٤٩.

Stryer L. (٢٠٠٠),Biochemistry,٤th ed., New York, W.H.Freeman and Company.pp ٦٣٤-٦٤٧.

Svenja M., Rolf D. and Sylke M. . (٢٠٠٢): Glutathione synthetase from Plasmodium falciparum. Biochem. J. ٣٦٣, ٨٣٣ – ٨٣٨ .

Szkudelski T.,(٢٠٠١): activation of Creatine Kinase Physiol.Res.;٥٠:٥٣٦-٥٤٨.

Tesfamarian, B.(١٩٩٣):Free Radicals in Diabetic Endothelial Cell Dysfunction.Free Radical Biology and Medicine;١٦:٣٨٣-٣٩١.

Thornalley, P.J.; McLellan, A.C.;Lo, T.W.; Benn,J., and Sonksen, P.H.(١٩٩٦): Negative Association between Erythrocyte Reduced Glutathione Concentration and Diabetic Complication . Clinical Science ; ٩١:٥٧٥-٥٨٢.

Tsung,S. H. (١٩٧٦), Glutathione, Clinical Chem. ٢٢, ١٧٣-١٨٤.

Turner, R.C.(١٩٩٤),Clinical overview of non – insulin dependent diabetes mellitus in two day international conference on diabetes .١٨th Technical.services Ltd.pp٢٨٧-٣٠٥.

Vanlent F., Waltzky J. A.,and, Eu.J. (٢٠٠٥),Clin. Chem. Clin. of Insulin-loaded Microspheres in Rabbits. AAPS PharmSciTech; ٦ ٣-٢٣
.

Wolff S. P., Jiang Z. Y., Hunt J. U., (١٩٩١):Free Radical Biology and Medicine;١٠:٣٣٩-٣٤٣.

Wolff, S.P., and dean, R.T.(١٩٨٧): Glucose Autoxidation and Protein Modification. The Potential Role of Autoxidative Glycosylation in Diabetes. Biochem. J.;٢٤٥:٢٤٣-٢٥٠.
Wood ward G. E., (١٩٦٣):Bio. Chem.,١٣;٣٥-٤١.

Yan Z. F., Sheng Y. and Guoyao W. (٢٠٠٢): Free radicals, antioxidants, and nutrition, Nutrition,١٨,٨٧٢-٨٨٤,.

Yangxin FU, Jesus M. and Xin Gen L. ; (٢٠٠١): Comparative impacts of glutathione peroxidase-١ gene knockout on oxidative stress induced by reactive oxygen and nitrogen speciesin mouse hepatocytes . Biochem. J. ٣٥٩, ٦٨٧- ٦٩٥ .

Yi Liang ,Guo –Chang H., Jie C. and Jun M.Z., (٢٠٠٠): Microcalorimetric studies on the creatine kinase –catalyzed reaction in the presence of

guanidine hydrochloride. Thermochimica Acta ٣٤٨ ٤١- ٤٧
.

Yi Liang ,Guo –Chang H., Jie C. and Jun M.Z. (٢٠٠١): Microcalorimetric studies on the unfolding of creatine kinase induced by guanidine hydrochloride.Thermochimica acta;:٣٧٦:١٢٣- ١٣١.

Yoon, J. W.; Jun, H. S.& Santamavia, P.(١٩٩٨). Cellular & molecular mechanisms for the intiation & progression of beta cell destruction resulting from the collaboration between microphages& Tcell. Autoimmunity,٢٧: ١٠٩-١٢٢.

Zitnanova, Peter K., Okezie I., Ma´ria S., Iveta G., Jana M., Terezia K., Siegfried P.I (٢٠٠٤); Uric acid and allantoin levels in Down syndrome: antioxidant and oxidative stress mechanisms Institute of Medical Chemistry, Biochemistry and Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Comenius University, Sasinkova Bratislava, Slovak Republic,٢, ٨١٣-٨ ٧٢

Zhao, L. (٢٠٠١): Effects of Free Radicals in Diabetes:Offered by the Free Radicals and Radiation Biology Graduate Program, Iowa University,Iowa,;٧٧:٢٢٢-٢٢٩.

المصادر العربية

ناهدة سعيد حمودي الجلبي و خالد صالح عمر عبد المانع ٢٠٠٤; تاثير البروتينات المفصولة من نبات السبحبح *Melia azedarach* وخس الزيت *Lactuca serriol*a في الجرذان السليمة والمصابة بداء السكر المستدث بالالوكسان .المجلة القطرية للكيمياء .: ٤٨٤١٦-٤٦٥ , .

الراوي ,خاشع محمود ١٩٨٤,المدخل الى الاحصاء,كلية الزراعة والغابات-جامعة الموصل ص ٣٠٩-٣٥١.

SUMMARY

This study was included ٢٢ rabbits induced diabetes mellitus (DM) in which inserted the alloxan under skin, and then evaluation the activity of creatine kinase with antioxidants of blood serum and white blood cells (WBCs),(glutathione and, uric acid) with lipid peroxidants (malondialdehyde). Isoenzyme of creatine kinase (MM-CK, BB-CK and MB-CK) were separated by coloumn of DEAE-cellules gel on serum of ٢٢ normal rabbits and the same number with induced DM.

The study showed that the activity of MM-CK and MB-CK were influenced with DM. The BB-CK was resistance the changes in concentrations with the control group.

Before starting the evaluation, it was prepared the (WBCs) from the rabbits (٢٢ control and ٢٢ patients).

In isoenzyme of creatine kinase (MM-CK, BB-CK and MB-CK) was illustrated the diabetes mellitus as more effective on MM-CK and MB-CK(٧٤.٦±١٤)and,(٦.٣±١.٢) ,respectively, than BB-CK (٢.٦±٠.٥).

The results of the study showed that there are significantly increased in level of MDA (µmol/L) in serum of rabbits with DM **(**١.٦٨ ٠.٤٢ ±), (١.٥٤± ٠.٤٣) for (WBCs) compared with controls (٠.٨٣ **±**٠.٢٩), (٠.٧٧ **±** ٠.٢٦) in both serum and (WBCs), respectively) and significantly decreased in level of activity of creatine kinase in patients (for serum ٨٠.٦±٢٢) IU/L compared with controls(١٠٥.٥±٣٨)IU/L(P ≤ ٠.٠١) in both serum and, (WBCs) also significantly decreased in level of the glutathione and uric acid in patients (١٦.٣ ± ٦.٤, ١٤٤.٦ ± ٤٢) µmol/L

compared with controls(٢٦.٧± ١٠.٣, ٢٤٠.٣ ± ٤١) µmol/L , (P ≤ ٠.٠١) in both serum and, (WBCs).

Finally, this study was illustrating that there are not significant differences between the levels of serum and (WBCs) in each groups for all the parameters studied (creatine kinase, glutathione, uric acid and malondialdehyde)

Evaluation Of Creatine Kinase Activity And ANTIOXIDANTS IN

Serum AND WHITE BLOOD CELLS IN INDUCED DiabetIC Rabbits

A Thesis

Submitted to the College of Science

University of Babylon

In Partial Fulfillment of the Requirements for the Award

of the Degree of Master of Science in

Biochemistry

By

Ban Mohamad Hsain Altaee

١٤٢٦ ٢٠٠٦