مجلة جامعة بني وليد للعلوم الإنسانية والتطبيقية
Bani Waleed University Journal of Humanities and Applied Sciences
تصدر عن– جامعة بني وليد – ليبيا
Website:https://jhas-bwu.com/index.php/bwjhas/index
المجلد التاسع ـ العدد الخامس ـ 2024 ـ الصفحات ( 310-323)
ISSN3005-3900

# دراسة تأثير المستخلص الكحولي لثمرة التين الشوكي على انزيمي الليبواوكسيجنيز والليبيز المنقيان من مصل دم مرضى مصابين بتصلب الشرايين وفي مصل دم ذكور الجرذان المصابة بالتصلب المستحدث

أحمد علي الفياضي [1] *، نشوان ابراهيم اللهيبي[2]، نمير سعدالله عزت[3]
[1,2,3] قسم الكيمياء ، كلية التربية للعلوم الصرفة ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق.
ahmed.21esp1@student.uomosul.edu.iq

# Study of the effect of alcoholic extract of prickly pear fruit on the enzymes lipooxygenase and lipase purified from the blood serum of patients with atherosclerosis and in the blood serum of male rats with neo-atherosclerosis.

**Ahmed Ali Al-Fayyadi [1] *, Nashwan Ibrahim Al-Lahibi [2], Namir Saadallah Ezzat [3]**
[1,2,3] **Department of Chemistry, College of Education for Pure Sciences, University of Mosul, Mosul, Iraq.**

تاريخ الاستلام: 02-08-2024 تاريخ القبول: 29-08-2024 تاريخ النشر : 06-12-2024

**الملخص:**
الليبواوكسيجينز انزيم يحفز أكسدة الأحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة وناتج هذه الاكسدة مركبات هيدروبيروكسيدات الهيدروجين والتي لها دور كبير في حدوث الالتهابات ، اما الليبيز هو إنزيم ينظم ايض الدهون الثلاثية في الأنسجة الدهنية و الدم. تم في هذه الدراسة تنقية الليبواوكسيجنيز والليبيز من مصل دم المرضى الذين يعانون من تصلب الشرايين باستخدام عدد من التقنيات كالترسب بملح كبريتات الامونيوم المشبعة ، الفرز الغشائي ، وكروموتوغرافيا التبادل الايوني باستخدام DEAE-cellulose و CM-cellulose على التوالي للانزيمين . تم الحصول على حزمة واحدة لكلا الانزيمين. وجد ان اوزانها الجزيئية تقريبا ( 268.5 KDa) ( 91.3 KDa) لليبواوكسجينيز والليبيز على التوالي.
كانت الفعالية النوعية لانزيم الليبواوكسجينيز 0.249، 0.608، 3.329، 12.19 وحدة انزيمية/ملغم بروتين على التوالي و بعدد مرات تنقية (2.44، 13.36، 48.95) على التوالي .اما الفعالية النوعية لليبيز 1.54، 1.95، 2.89، 15.84وحدةانزيمية/ ملغم بروتين ، على التوالي وبعدد مرات تنقية (1.95، 2.89، 15.84) . كما تم عزل المستخلص الفلافونويدات من ثمرة التين الشوكي بواسطة المذيب الايثانول وتم تشخيص هذه المركبات وتقديرها بواسطة HPLC ، إجمالي مركبات الفلافونويدات ( Ferulic acid , Gallic acid , Cinnamic acid , Quercetin , Rutin , Kaempferol) 45.2 , 88.9 ,12.6, 20.7 ,50.6 ,74.6 ,80.6)) مايكروغرام / غرام على التوالي .بينت دراسة تأثير المستخلص الكحولي على فعالية الانزيمين في الجرذان المصابة بتصلب الشرايين المستحدث انخفاض في مستوى فعالية الانزيميين في الجرذان المعاملة بالمستخلص مقارنة بمجموعة السيطرة المصابة بالتصلب ، وعند دراسة نوع التثبيط على الانزيمات المنقاة أظهر المستخلص تثبيط غير تنافسي لفعالية الليبيز و والليبواوكسجسنيز بتراكيز600 و300 مايكروغرام / مايكروليتر على التوالي .
**الكلمات المفتاحية:** تصلب الشرايين ، التين الشوكي ، الليبواوكسيجنيز ، الليبيز ، الفلافونويدات.

**Abstract:**
Lipoxygenase is an enzyme that catalyzes the oxidation of polyunsaturated fatty acids, and the final product of this oxidation is hydrogen hydroperoxides, which have a major role in inflammation. Lipase is an enzyme that regulates the metabolism of triglycerides in adipose tissue and blood. In this study, lipoxygenase and lipase were purified from the blood of the atherosclerosis patients by using several techniques, such as precipitation with saturated ammonium sulfate salt, dialysis, and ion exchange chromatography using DEAE-cellulose and CM-cellulose, respectively, for the two enzymes. One peak was obtained for both enzymes .

The Molecular weight of two enzymes is approximately (268.5 KDa ) , (91.7 KDa) of the lipoxygenase and lipase respectively.

The specific activity of the lipoxygenase enzyme was 0.249, 0.608, 3.329, and 12.19 enzyme units/mg protein, respectively, with the number of purification times (2.44, 13.36, 48.95) respectively. The specific activity of lipase was 1.54, 1.95, 2.89, and 15.84 enzyme units/mg protein, respectively. Respectively and with several purification times (1.95, 2.89, 15.84). Flavonoids were also isolated from the prickly pear extract using the solvent ethanol, and these compounds were identified and estimated by HPLC. The total flavonoids (Ferulic acid, Gallic acid, Cinnamic acid, Quercetin, Rutin, and Kaempferol) were 45.2, 88.9, 12.6, 80.6, 74.6, and 50.6. (20.7) micrograms/gram, respectively. A study of the effect of the alcoholic extract on the effectiveness of the two enzymes in rats with induced atherosclerosis showed a decrease in the level of activity of the two enzymes in rats treated with the extract compared to the control group with atherosclerosis. When studying the type of inhibition on the purified enzymes, the extract showed non-inhibitory inhibition. Competitive to the effectiveness of lipase and lipooxygenase at concentrations of 600 and 300 micrograms/microliter, respectively.

**Keywords:** Atherosclerosis , Prickly pear ,Lipoxygenase , Lipase , Flavonoids

## 1. المقدمة :

تحفز إنزيمات اللايبواوكسيجينيز (LOXs) (EC. 1.13.11.12) أكسدة الأحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة لإنتاج هيدروبيروكسيدات الهيدروجين والتي لها دور كبير في حدوث الالتهابات (Pang et al., 2023) ، و هي إنزيمات لا تحتوي على الحديد الهيمي و تنتشر على نطاق واسع في البشر، والكائنات حقيقية النواة الأخرى، و البكتيريا ( Wang &Chai 2023,). يعد تصلب الشرايين من أهم المشاكل الطبية والاجتماعية في المجتمع الحديث. اذ يسبب عددًا كبيرًا من حالات العجز والوفيات، و تشير الأدلة إلى أن الالتهاب هو أحد الروابط الرئيسية التي تسبب تصلب الشرايين.(Kotlyarov ,2022) اذ يبدأ تصلب الشرايين عن طريق احتجاز وأكسدة البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة (LDL) في الطبقة تحت البطانية لجدار الشريان، مما يؤدي إلى تكوين أنواع نشطة بيولوجيًا تحفز الخلايا الوعائية لإنتاج جزيئات التهابية ( Lusis ,2000 ; Haberland, 2021) ، و أشارت الدراسات إلى انزيم اللايبواوكسجينيز له ستة اشكال و أن lipoxygenase-15/12 الذي يتم التعبير عنه بشكل كبير في البلاعم يلعب دورا أساسيا في أكسدة LDL المنتشر. كما ثبت أيضًا أن إنزيم 5-الايبواوكسيجينيز الموجود في البلاعم يولد الليكوترينات، والتي تظهر أنشطة قوية للالتهابات في أنسجة القلب والأوعية الدموية . لذلك، فإن تثبيط إنزيمات (lipoxygenase) هذه قد يكون فعالاً للوقاية من الأمراض الالتهابية وعلاجها 7، 425-431. (Takahashi et al., 2005) كما تدخل مثبطات انزيم اللايبواوكسجينيز في تطبيقات عديدة في المستحضرات الصيدلانية و مستحضرات التجميل والأغذية اذ ان لها قدرة كبيرة لعلاج العديد من الأمراض البشرية، بما في ذلك السرطان والاضطرابات المرتبطة بالالتهاب ( Wang &Chai ,2023).

الليبيز (ثلاثي أسيل كليسيرول أسيل هيدرولاز، E.C. 3.1.1.3) عبارة عن بروتينات أحادية لها أوزان جزيئية تتراوح بين ( 19 -60 كيلو دالتون) ، وتكون منتشرة في كل مكان ومهمة في علم الأحياء والصناعة. يحلل الليبيز الطبيعي الدهون الثلاثية إلى دهون ثنائية، ، وأحماض دهنية ،ودهون أحادية ، وكليسرول. يمكن لليبيز، أن يحلل اواصر الكربوكسيلية للاسترات (Kotlyarov ,2022 ;Taamallah ,2022). وبسبب خصائصها الواسعة وسهولة إنتاجها بكميات كبيرة، فإن الليبيز من بين الإنزيمات المهمة . لليبيز مجموعة واسعة من التطبيقات في تحضير الطعام، وتجهيز الدهون والزيت، وتصنيع الورق، وإنتاج المستحضرات الصيدلانية ومستحضرات التجميل (Lizárraga-Velázquez et al.,2020). ان الليبيز عبارة عن انزيم مستقر ويمكن الحصول عليه من الحيوانات والنباتات والكائنات الحية الدقيقة المختلفة. يُستخدم على نطاق واسع تجاريًا (Al-Naqeb et al., 2021).

استخدم نبات التين الشوكي *Opuntia ficus indica* في الطب التقليدي بسبب دوره في علاج عدد من الامراض والالتهابات (Santzouk et al.,2019) ، و هو عضو في عائلة Cactaceae يزرع أصلاً في أمريكا الجنوبية، و موجود بكثرة في أجزاء من العالم، بما في ذلك الشرق الأوسط ، تعتبر بذور التين الشوكي من الأجزاء الغنية بالمواد الدهنية، ويمكن استغلاله في استخلاص الزيوت للاستخدامات الغذائية والتجميلية والصيدلانية والطبية (Al-Naqeb et al., 2021) . ومن المعروف أن قشور الثمار وتفلها تشكل مخلفات أولية للفاكهة ذات المحتوى العالي من المركبات الفينولية ، اذ تمثل المخلفات النباتية مثل قشر التين الشوكي أهمية كبيرة مصدر منخفض التكلفة لمضادات الأكسدة (التربين، والمركبات الفينولية، والفيتوستيرول) وتدخل في تطبيقات عديدة كمنتجات صيدلانية مثل الأدوية المضادة لمرض السكر، وارتفاع ضغط الدم، خصائص مضادة للسرطان

ومضادة للبكتيريا (Colantuono et al .,2016 ;Dang et al .,2019; Panzella et al., 2020 ; Lizárraga-Velázquez et al .,2020)، و تلعب المستخلصات الناتجة من استخلاص لب وثمر التين الشوكي كمصدر لمضادات الأكسدة الطبيعية. بشكل عام، أظهرت بيانات HPLC أن التين الشوكي يحتوي على كمية عالية من المركبات النشطة بيولوجيا. يحتوي التين الشوكي على كميات عالية من مركبات الفينولات و الفلافونويدات و الكاروتينات، كما أظهرت أيضًا إمكانات قوية مضادة للأكسدة. فيما يتعلق بالفاكهة الكاملة للتين الشوكي، أظهر المستخلص المائي أعلى كميات من الروتين (7.43 ميكروغرام/غرام)، والكويرسيتين (3.41 ميكروجرام/جم)، وحمض الكاليك (84.74 ميكروغرام/غرام)، وحمض السرنجيك (23.54 ميكروغرام/غرام)، بينما أظهر المستخلص الإيثانولي. الكمية المنخفضة من الروتين (0.40 ميكروغرام/غرام)، وكويرسيتين (0.19 ميكروغرام/غرام)، وحمض الكاليك (29.22 ميكروغرام/غرام)، علاوة على ذلك، يمتلك التين الشوكي مكونات حيوية نشطة مضادة للبكتيريا ضد البكتيريا (Iftikhar et al ., 2023).

## 2. المواد وطريقة العمل :

### 1.2.تنقية الانزيمات دم المرضى

**1.1.2. تحضير العينة :** جمعت 10 عينات لمرضى ذكور مصابين بتصلب الشرايين مشخصين بإشراف طبي في وحدة الامراض القلبية لمستشفى ابن سينا التعليمي في مدينة الموصل /العراق بإعمار ( 25 - 45) إذ تم سحب 5 مليليتر من دم المصابين، ثم وضعت العينات في أنابيب اختبار غير حاوية على مضاد تخثر الدم، فصل مصل الدم في جهاز الطرد المركزي المبرد (Ultra - cooling Centrifuge) من شركة Heraeus christ Gmbh الألمانية بسرعة 3000xg لمدة 10 دقائق، بعدها سحب مصل الدم بواسطة الماصة الدقيقة ووضع في أنابيب بلاستيكية جافة، ثم حفظ في بدرجات حرارة 4 م (Wilson et al., 1972 ; Bacchus et al.,1980 ).

**2.1.2. البروتين الكلي:** قدرت كمية البروتين باتباع طريقة فولن لاوري Folin Lowry method المحورة من قبل الباحثين (Schacterle et al., 1973).

**3.1.2. فعالية انزيم الليبواوكسيجنيز :** قدرت فعالية انزيم الليبواوكسيجنيز المنقى جزئيا من مصل دم مرضى بتصلب الشرايين باتباع طريقة الباحث (Shastry &Rao , 1975)، باستعمال حامض اللينوليك كمادة اساس ، وذلك بمتابعة الزيادة في الامتصاصية عند طول موجي 234نانومتر الناتجة عن تكوين الدايينات.

**4.1.2. فعالية انزيم الليبيز** : قدرت فعالية انزيم الليبيز المنقى جزئيا من مصل دم مرضى بتصلب الشرايين باتباع طريقة الباحثين (Faiz et al., 2007 ; Lee et al ., 1999)، باستخدام بارا- نايترو فينيل بيوتريت Para-nitro phenyl butyrate كمادة اساس وبمتابعة الامتصاصية عند طول موجي 405 نانومتر .

### 2.2. خطوات التنقية

اخذ 18.5 مل من مصل مجموعة من المرضى واجريت عليها خطوات التنقية الآتية :

**1- الترسيب بكبريتات الأمونيوم** : رسب البروتين بتركيز 65% و70 % كبريتات الأمونيوم المشبعة لانزيمي الليبواوكسيجنيز والليبيز على التوالي بالإضافة التدريجية ، بعدها ترك بدرجة حرارة 4 م 24 ساعة ( Robyt & white 2001,) ، ثم فصل الراسب باستخدام الطرد المركزي المبرد بسرعة 3000 لمدة 15 دقيقة. أهمل الراشح وأخذ الراسب و تم إذابته باقل كمية من محلول الفوسفات المنظم عند دالة حامضية pH = 6.8 لانزيم الليبواوكسيجنيز ومحلول الفوسفات المنظم عند pH=7.2 لانزيم الليبيز ، بعدها قدرت كمية البروتين والفعالية لكل الأنزيم.

**2 الفرز الغشائي :** نقي محلول الراسب البروتيني باستخدام كيس الفرز الغشائي (Robyt & white ,2001) ضد محلول الفوسفات المنظم عند pH=6.8 لانزيم الليبواوكسيجنيز ومحلول الفوسفات المنظم عند pH=7.2 لانزيم الليبيز و لفترة 24 ساعة باستخدام حمام ثلجي مع تبديل المحلول المنظم كل 5 ساعات ، بعدها قدرت كمية البروتين وفعالية الأنزيم .

**3 – التنقية باستخدام كروموتوغرافيا التبادل الايوني:**

استخدم المبادل الأيوني السالب DEAE-cellulose A50 لتنقية انزيم الليبواوكسيجينيز ، اذ تمت التنقية باستخدام عمود الفصل بأبعاد 2.5 x40 سم ، بإمرار محلول الفوسفات المنظم عند pH 6.8 باستمرار، ثم جمعت الاجزاء بواقع 5 مليليتر بمعدل جريان 60 مل / ساعة ، بعدها قدرت كمية البروتين وفعالية الانزيم فيه . كما استخدم المبادل الأيوني السالب CM-cellulose A50 لتنقية انزيم الليبيز ، وتمت التنقية باستخدام عمود الفصل بأبعاد 2.5 x40 سم ، بإمرار محلول الفوسفات المنظم عند pH 7.2 باستمرار، ثم جمعت الاجزاء بواقع 5 مليليتر بمعدل جريان 60 مل / ساعة ، بعدها قدرت كمية البروتين وفعالية الانزيم فيه (Plummer , 1978) .

**4- تثبيط الانزيمات:** تمت دراسة تأثير المستخلص الكحولي الخام على فعالية الانزيمين بتحضير تراكيز مختلفة منها (100، 200، 300، 400، 500، 600، 700، 800) مايكروغرام / مايكرولتر لتحديد التركيز التثبيطي الامثل. اضيف 100 مايكروليتر من المثبط الى عينة الانزيم بعدها قيست الفعالية كما في الفقرات 1و 2.

### 3.2. الحصول على النبات :

تم الحصول فاكهة التين الشوكي من السوق المحلية لمدينة الموصل/ في العراق. بعد تنظيفها وغسلها بالماء المقطر تمتزج بالماء المقطر في خلاط 600 واط بنسبة 4: 1. ثم تم تجميدها واذابتها ثلاث مرات ، بعد ذلك توضع في جهاز الموجات فوق الصوتية لمدة 60 دقيقة ، وأخيراً تخزينها عند 4 درجات مئوية لجعل العينة عبارة عن (هريس طازج) ، هناك حاجة إلى حوالي 1000 غرام من الفاكهة. تم تجفيف الهريس في فرن الهواء عند 37 درجة مئوية وللحصول على مسحوق الفصل . يتم استخراج المواد الخام عن طريق تصفية الخليط (معالجة ما بعد الميكروويف) ثم تجفيفه باستخدام Lyophilizer. ولاستخراج البوليفينول من المواد المتبقية باستخدام نظام الاستخلاص المستمر Soxhlet مع الإيثانول 90% كمذيب عند 70 درجة مئوية لمدة 12 ساعة، حتى أصبح لون المذيب واضحا شفاف (Sridhar et al., 2021). تم الحصول على الفلافونويد والتي تم تشخيصها باستخدام HPLC.

**2.4.حيوانات التجارب**

تم تربية خمسة عشر جرذان من نوع ألبينو (Albino) من الذكور في المختبر من عمر 2 إلى 3 أشهر. و تم إيواء الحيوانات في أقفاص منتظمة مع دورة ضوئية مظلمة لمدة 12 ساعة و 12 ساعة عند درجة حرارة مسيطر عليها تبلغ 25 درجة مئوية. تم التصريح بروتوكول الدراسة من قبل لجنة أخلاقيات الحيوان في كلية الطب البيطري/ جامعة الموصل.

**1.4.2.استحداث تصلب الشرايين**

تم الاستحداث باستخدام الكولستيرول الذي تم الحصول عليه من شركة Sigma Aldrich. تم اذابته في زيت جوز الهند ، وتم تحديد الجرعات وفقًا لوزن الجسم للحيوانات عند 500 ملغ/كغ . تم قياس تركيز ملف تعريف الدهون بعد 25 يومًا من اعطاء جرعة الكولسترول(Ram et al., 2014).

**2.4.2. تقسيم الحيوانات في مجاميع**

تم توزيع الحيوانات على ثلاث مجموعات. تتألف كل مجموعة من خمسة جرذان. جرعت الحيوانات عن طريق الفم المجموعة 1 بـ 500 ملغ/كغ من الكوليسترول (السيطرة الموجبة). كانت الحيوانات في المجموعة 2 (السيطرة السالبة سليمة). أعطيت الحيوانات في المجموعة 3 المستخلص الكحولي بتركيز 39.78 ملغ/كغ من وزن الجسم لمدة 30 يوما.

**3.4.2. جمع عينة الدم**

في نهاية اليوم 30 تم تخدير جميع الحيوانات بالأيثر ، وتم أخذ الدم من محجر العين. ثم تم الطرد المركزي لعينات الدم عند 4000 دورة في الدقيقة عند 4 درجات مئوية لمدة 10 دقائق مباشرة بعد التجميع. تم تجميد المصل للتحليل اللاحق.

## 3. النتائج والمناقشة :

### 1.3. تشخيص وتقدير الفينولات والفلافونويدات في المستخلص الكحولي لثمرة التين الشوكي بتقنية HPLC

تم الحصول على الاشكال التحليلية لتشخيص المركبات الفينولية لمستخلص ثمرة التين الشوكي قيد الدراسة بواسطة تقنية كروموتوغرافيا السائل عالي الاداء (HPLC) ، اذ شخصت 7 مركبات فينولية وذلك عن طريق مقارنة زمن احتجاز القمة المباشرة للفينولات مع زمن احتجاز محلول القياسي لها. وكما موضح في الجدول (1).

**جدول (1) :المركبات الفينولية القياسية والمركبات الفينولية التي تم تشخيصها في المستخلص الكحولي الخام**

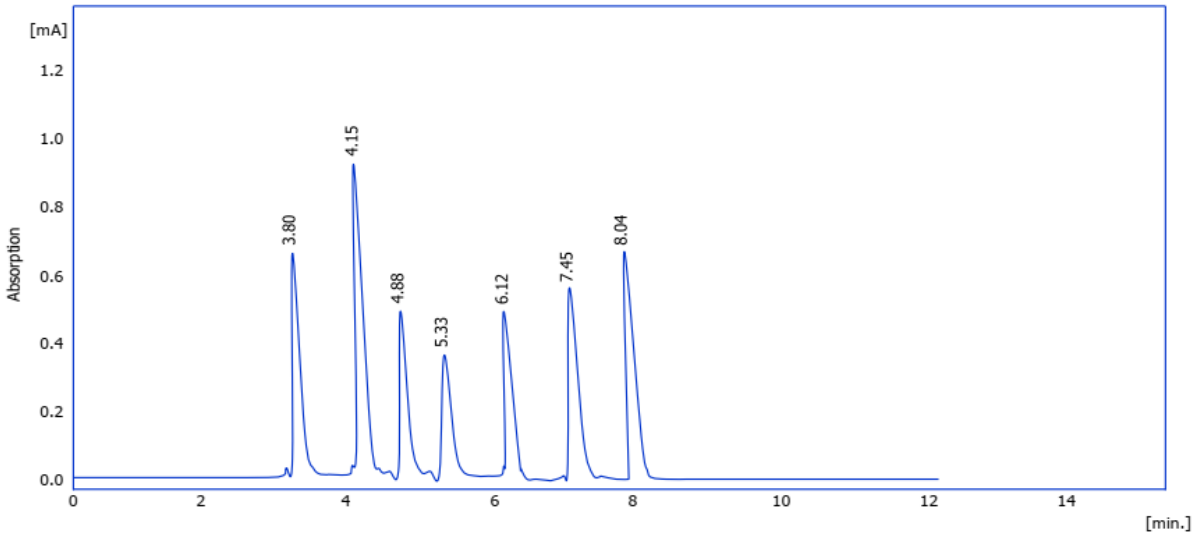
| No | زمن احتجاز المواد القياسية (دقيقة) | زمن احتجاز المستخلص (دقيقة) | تشخيص القمة | Conc. ( µg/gm ) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 3.80 | 3.80 | Ferulic acid | 45.2 |
| 2 | 4.15 | 4.15 | Gallic acid | 88.9 |
| 3 | 4.88 | 4.88 | Cinnamic acid | 12.6 |
| 4 | 5.33 | 5.33 | Quercetin | 80.6 |
| 5 | 6.09 | 6.12 | Rutin | 74.6 |
| 6 | 7.35 | 7.45 | Kaempferol | 50.6 |
| 7 | 008. | 8.04 | Tannic acid | 20.7 |

كما هو معروف ان المركبات المشخصة في الدراسة الحالية تختلف بأوزانها الجزيئية واهميتها فمثلا Ferulic acid ينتشر بصورة واسعة في عدد من الاعشاب والنباتات ، فهو يعمل على حماية القلب والاوعية الدموية من ضرر الجذور الحرة ، وذلك من خلال تثبيط فعالية انزيم ( NADPH-Oxidase) اذ يعمل على زيادة جذر السوبر اوكسايد السالب $O_2^{\cdot-}$، كما يعتبر احد اخطر اصناف الاوكسجين الفعالة ، بالإضافة الى انه يعمل على زيادة نسبة HDL-C/ T.C في الدم ، وبالتالي يعمل على

الوقاية من امراض القلب والاوعية الدموية (Samavat et al., 2016). ظهر هذا المركب عند زمن متقارب للمادة القياسية (Ferulic acid). حسبت كمية حامض الفيريولك في 100 غرام من وزن النبات الجاف اذ بلغت 4.52 ملغرام /100 غرام .
كما يتميز المركب الفينولي Gallic acid بخصائص عديدة منها يعد من المركبات المهمة التي تتواجد في الكثير من النباتات ، ولهذا الحامض صفة مهمة فهو يعتبر مضاد للأكسدة ، كما انه يقلل من مستوى الدهون وخاصة الكوليسترول ، كذلك يكون مضاد للالتهاب (Rakshit et al., 2020) . ويعمل حامض الكاليك على التقليل من الاجهاد التاكسدي الذي ينتج من المعادن الثقيلة فهو يرتبط بشكل مخلبي معها ويمنع الاجهاد الناتج من الاوعية الدموية ، اذ يعمل على تعديل الاشارات المختلفة لمضادات الاكسدة الانزيمية وغير الانزيمية والسيتوكينات الالتهابية داخل الخلية ، بالإضافة الى انه يعمل على خفض مستوى الدهون المتعادلة والكلوكوز داخل الجسم (Velderrain-Rodríguez et al.,2018; Xu et al.,2021) ظهر هذا المركب عند زمن متقارب للمادة القياسية (Gallic acid). حسبت كميته في 100 غرام من وزن النبات الجاف اذ بلغت 8.89 ملغرام /100 غرام .
Cinnamic acid ومشتقاته لها خصائص مضادة للأكسدة ، تُعرف هذه المركبات بتأثيراتها المضادة للالتهابات والمضادة للميكروبات ومكافحة السرطان وحماية الأعصاب والمضادة لمرض السكري . يعمل حامض السيناميك ومشتقاته على كبح الاجهاد التأكسدي وتنظيم العمليات الخلوية المختلفة. وتساهم مجموعة هيدروكسيل الفينولية الموجودة في تركيبهم بقدرتها القوية على مكافحة الجذور الحرة (Nouni et al., 2023; Ruwizhi et al ., 2020) . ظهر هذا المركب عند زمن متقارب للمادة القياسية كما حسبت كميته في 100 غرام من وزن النبات الجاف اذ بلغت 1.26ملغرام /100 غرام .
يعد الكويرستين Qurcetine من المركبات المهمة المتواجدة في العديد من الفواكه والنباتات والاعشاب والزهور والطحالب ، ان للكويرستين فعالية حيوية مميزة لأمراض القلب والاوعية الدموية ، مضادات الاكسدة وخافضة للكوليسترول البروتين عالي واطئ الكثافة والكوليسترول ، كما يعمل على زيادة فعالية كل من انزمي LCAT و LPL وخفض فعالية انزيم (HMG-CoA- reductase (Bryan- Thomas , 2016)كما انه يعمل على تحفيز بعض من المسارات الحيوية ، ويدخل في العديد من الصناعات من ضمنها صناعة الادوية مثل (Digoxin ,Estrogen). تم حساب كميته في 100 غرام من وزن النبات الجاف اذ بلغت 8.60 ملغرام /100 غرام .
ان التركيب الاروماتي للروتين Rutin يلعب دورا مهما في اقتناص الجذور الحرة ، التي تعد السبب الرئيسي للعديد من الامراض وخاصة امراض القلب والاوعية الدموية ، عن طريق زيادة فعالية انزيم LCAT وخفض تركيز الكولسترول الكلي ، كما يعمل على زيادة تركيز الكولسترول البروتين الدهني العالي الكثافة وكذلك تقليل الكولسترول البروتين الدهني واطئ الكثافة (Micucci et al ., 2016). كما يتميز بخصائص عدة فهو يعمل على خفض مستوى الكلوكوز بالدم ، مهدئ للأعصاب ، وموسع للأوعية الدموية ومضاد للأكسدة (Boonsong et al .,2016). ظهر هذا المركب عند زمن متقارب للمادة القياسية كما تم حساب كميته في 100 غرام من وزن النبات الجاف اذ بلغت 7.46ملغرام /100 غرام .
يعد الكامفيرول Kaempferol من مضادات الاكسدة ، كما ان له دور في منع الاصابة بأمراض القلب والاوعية الدموية (Shiroma et al., 2017 ) من خلال تثبيط فعالية انزيم مايلوبيروكسيديز وانزيم من خلال تثبيط فعالية انزيم مايلوبيروكسيديز وانزيم HMG CoA reductase ، كما انه يعمل على خفض فعالية انزيم α- glycosidase Zeka et (al., 2017) . ظهر هذا المركب عند زمن متقارب للمادة القياسية كما تم حساب كميته في 100 غرام من وزن النبات الجاف اذ بلغت 5.06 ملغرام /100 غرام .
وقد تبين أن حامض التانيك Tannic acid يقلل من الالتهاب كمضادات الأكسدة ، ويعمل بمثابة مضاد حيوي في البكتيريا المسببة للأمراض الشائعة ، ويحفز موت المبرمج للخلايا في العديد من أنواع السرطان. وقد أظهر حامض التانيك أيضا نشاط مضاد للفيروسات ومضاد للفطريات. ولا يزال ادخال الدواء مباشرة إلى القلب أمرًا صعبًا. وفقًا لدراسة جديدة ، فإن تعديل البروتينات مع حمض التانيك يمكن أن يحسن قدرتها على استهداف الأنسجة القلبية على وجه التحديد ، بسبب تقارب الجزيئات الكبيرة مثل الكولاجين والإيلاستين ، والتي تكون متوفرة بشكل كبير في أنسجة القلب .( Shin et al.,2018; Baldwin & Booth ,2022 ) . ظهر هذا المركب عند زمن متقارب للمادة القياسية كما تم حساب كمية حامض التانيك في 100 غرام من وزن النبات الجاف اذ بلغت 2.07 ملغرام /100 غرام ، وكما موضح في الجدول(1).

Sample Info:

| | | | |
|---|---|---|---|
| Sample ID | : sample | Amount | 0 |
| Sample | : sample | ISTD Amount | 0 |
| Inj. Volume [mL] | : 0.1 | Dilution | 1 |
| Autostop | : 20.00 min | External Start | : Start - Restart, Down |
| Detector 1 | : Detector 3 | Range 1 | : Bipolar, 2000 mAU, 10 Samp. per Sec. |
| Subtraction Chromatogram | : (None) | Matching | : No Change |




Result chromatography Table (Uncal - F:\ sample )

| No | Reten. Time [min] | Area [mAU.s] | Height [mAU] | Area [%] | Height [%] | W05 [min] | Compound Name |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 3.80 | 254123.66 | 641.58 | 17.00 | 17.00 | 0.10 | |
| 2 | 4.15 | 365987.49 | 895.42 | 20.00 | 20.00 | 0.15 | |
| 3 | 4.88 | 135662.14 | 530.24 | 11.00 | 11.00 | 0.05 | |
| 4 | 5.33 | 114203.05 | 388.49 | 10.00 | 10.00 | 0.02 | |
| 5 | 6.12 | 121452.16 | 450.14 | 12.00 | 12.00 | 0.05 | |
| 6 | 7.45 | 144528.97 | 560.32 | 14.00 | 14.00 | 0.05 | |
| 7 | 8.04 | 152642.65 | 620.11 | 16.00 | 16.00 | 0.10 | |
| | Total | 1288600.12 | 4086.15 | 100.00 | 100.00 | | |

**شكل (1): كروموتوغرام HPLC الخاص بناتج المركبات الفينولية المفصولة من ثمرة التين الشوكي**

### 2.3. دراسة تأثير المستخلص الكحولي الخام على فعالية الليبواوكسيجنيز والليبيز في مصل دم الجرذان المصابة بتصلب الشرايين المستحدث.

تشير النتائج في الجدول(2) الى وجود ارتفاع معنوي $p\leq0.05$ في مستوى LOX في مجموعة السيطرة المصابة بتصلب الشرايين مقارنة بالسيطرة السليمة ، من الممكن ان يكون سبب الارتفاع في مستوى انزيم LOX في مصل الدم الى حدوث الالتهابات ، وبالتالي زيادة استجابة الجهاز المناعي من خلال تنشيط الخلايا المناعية ، والتي تؤدي الى اطلاق حامض الاراكيدونيك و الاحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة ، فهي تعد مواد اساس لانزيم الليبواوكسيجينيز ( Siesjö et al., 1989). كما اظهر المستخلص الكحولي في الحيوانات المعاملة انخفاض غير معنوي مقارنة بالسيطرة المصابة بالتصلب . قد يعزى السبب في ذلك الى دور البولي فينولات المستخلصة من نبات التين الشوكي في تثبيط انزيم الليبواوكسيجنيز ( Atyia et al., 2023). بينت النتائج في الجدول(2) الى وجود ارتفاع غير معنوي في مستوى انزيم الليبيز في مجموعة السيطرة المصابة مقارنة بالسيطرة السليمة ، قد يكون سبب هذا الارتفاع هو دور الانزيم في ايض للدهون ، اذ يلعب لايبوبروتين ليبيز (LPL) دور حاسم في تحلل الـ T.G. في البروتينات الدهنية مثل (VLDL) والكايلومايكرونات ، الذي يحولها الى احماض دهنية حرة وكلسيرين والتي تستخدم للحزن كدهون او للطاقة من قبل الانسجة .وفي حال وجود خلل في دور هذا الانزيم يؤدي الى تراكم البروتينات الدهنية الحاوية على T.G. في مجرى الدم (Kumari et al., 2021). اشارت النتائج المبينة في الجدول الى وجود انخفاض غير معنوي في مستوى انزيم الليبيز في مصل دم الحيوانات المعاملة بالمستخلصات النباتية المستخلصة من الثمرة التين الشوكي مقارنة مع مجموعة السيطرة المصابة بالتصلب ، يعزى سبب انخفاض مستويات انزيم الليبيز الى ان البولفينولات الموجودة في نبات التين الشوكي تعمل على تثبيط نشاط الليبيز (Padilla-Camberos et al., 2015)

**جدول (2): مستوى الليبواوكسيجنيز والليبيز في مصل دم الحيوانات المعالجة بمستخلص الكحولي لثمرة التين الشوكي**

| Groups No=6 | LOX U/ml Mean±SD | Parameters Lipase U/ml Mean±SD |
|---|---|---|
| **Control + ve** | 0.17±0.06 a,c | 0.051±0.0007 a,b,c |
| **Control - ve** | 0.09±0.07 b | 0.049±0.0001 b,a |
| **Alcohol Extract** | 0.15±0.027 c,a | 0.053±0.0007 c,a |

1. *تشير الاحرف المختلفة عموديا الى وجود اختلاف معنوي عند مستوى احتمالية $P \leq 0.05$.

**3.3. فصل وتنقية انزيم الليبواوكسيجنيز من مصل الدم مرضى مصابين بتصلب الشرايين :**

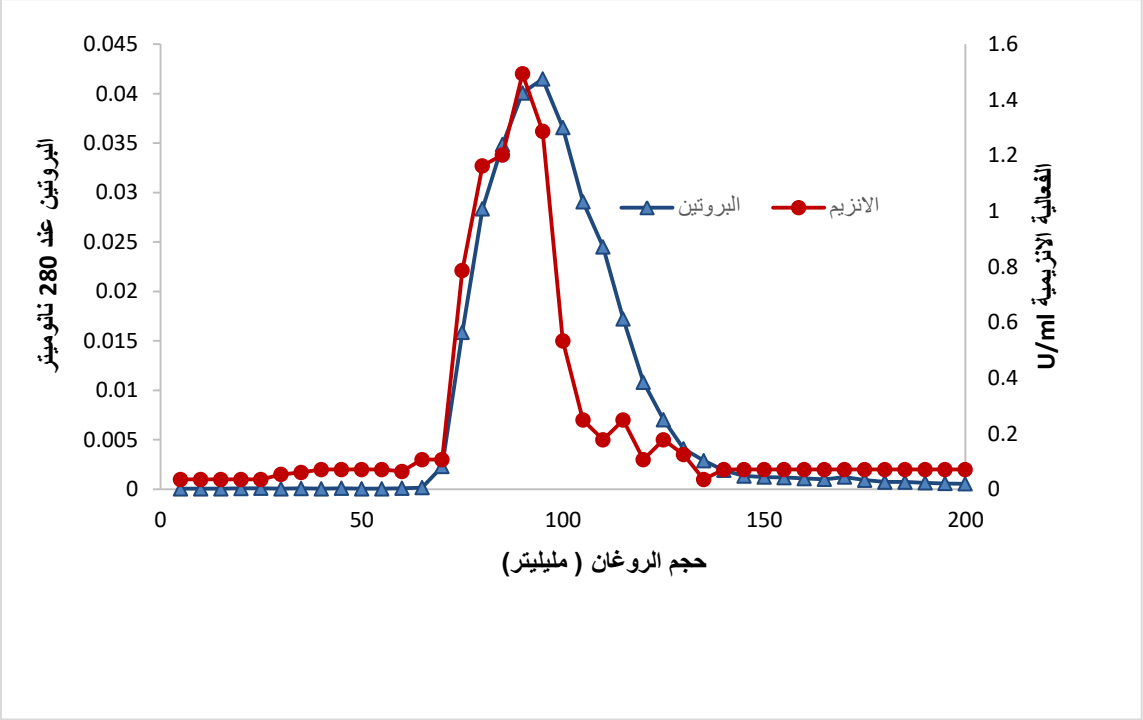
تشير النتائج الموضحة في الجدول 3 إلى أن فعالية الليبواوكسيجنيز بعد عملية الترسيب كان 0.608 مجم/وحدة من البروتين. بلغت كمية استعادة النشاط الكلي للإنزيم 152٪ بالمقارنة مع المستخلص الخام. بعد عملية الترسيب، تم تطبيق تقنية تنقية الديلزة كخطوة ثانية في تنقية الإنزيم لإزالة كبريتات الأمونيوم المستخدمة في الخطوة السابقة، وكذلك الببتيدات والأحماض الأمينية والأيونات وبعض المركبات ذات الوزن الجزيئي الصغيرة. تشير النتائج الموضحة إلى أن النشاط النوعي لإنزيم الليبواوكسيجنيز بعد هذه العملية هو 3.329 وحدة/مجم من البروتين مقارنة بالنشاط في المستخلص الخام. بعد تجاوز محلول البروتين، الذي تم إنتاجه من الديلزة، من خلال العمود الذي يحتوي على مبادل DEAE-cellulose، حصلنا حزمة واحدة للانزيم (الشكل 2) بقيمة فعالية تبلغ 12.19U/mg بروتين، (الجدول 3).

**الجدول (3) : خطوات تنقية أنزيم الليبواوكسيجنيز من مصل دم المصابين بتصلب الشرايين.**

| خطوات التنقية | الحجم الكلي(ml) | البروتين (mg/ml) | البروتين الكلي(mg) | الفعالية (U/ml) | الفعالية الكلية U | الفعالية النوعية $(U/mg)\times 10^3$ | عدد مرات التنقية | استرجاع الفعالية% |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| المصل | 9.5 | 75.88 | 720.86 | 0.019 | 0.180 | 0.249 | 1 | 100 |
| الترسيب بـ كبريتات الامونيوم | 11 | 41.06 | 451.66 | 0.025 | 0.275 | 0.608 | 2.44 | 152 |
| الفرز الغشائي | 16 | 9.01 | 144.16 | 0.030 | 0.480 | 3.329 | 13.36 | 266 |
| التبادل الايوني باستخدام DEAE-cellulose | 30 | 6.97 | 209.1 | 0.085 | 2.55 | 12.19 | 48.95 | 1416 |

* الوحدة الأنزيمية U : تشير إلى كمية أنزيم اللايبواوكسيجنيز الذي يؤكسد مايكرومولاً واحدا من المادة الأساس (حامض اللينوليك) في الدقيقة الواحدة .

**الفعالية النوعية U/mg: وهي عدد وحدات الانزيم الموجودة في ملغم من البروتين .




**الشكل( 2 ) نموذج الاسترداد المستحصل من تنقية أنزيم الليبواوكسيجينيز من مصل دم مرضى مصابين بتصلب الشرايين باستخدام راتنج المبادل الايوني DEAE- cellulose**

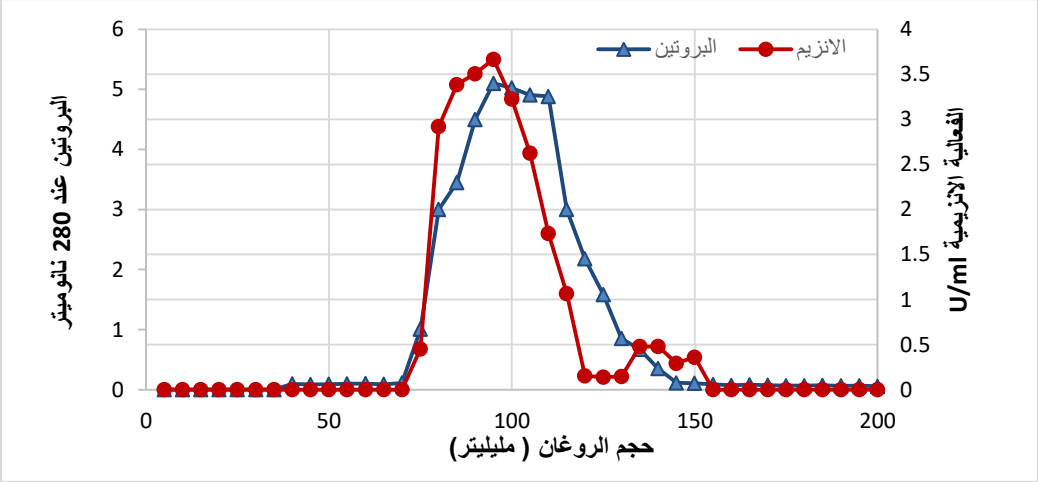
**4.3. فصل وتنقية انزيم الليبيز من مصل الدم مرضى مصابين بتصلب الشرايين :**

تشير النتائج الموضحة في الجدول 4 إلى أن فعالية الليبيز بعد عملية الترسيب كان 1.95 وحدة/مجم من البروتين. بلغت كمية استعادة النشاط الكلي للإنزيم 143٪ مقارنة بالمستخلص الخام. بعد عملية الترسيب، تم تطبيق تقنية الديلزة كخطوة ثانية في تنقية الإنزيم لإزالة كبريتات الأمونيوم المستخدمة في الخطوة السابقة، وكذلك الببتيدات والأحماض الأمينية والأيونات وبعض مركبات ذات الوزن الجزيئي الصغيرة. تشير النتائج الموضحة إلى أن النشاط النوعي الليبيز بعد هذه العملية هو 2.89 وحدة/مجم من البروتين مقارنة بالنشاط في المستخلص الخام. بعد اجتياز محلول البروتين، الذي تم إنتاجه من الديلزة ، من خلال العمود الذي يحتوي على مبادل CM-cellulose ، حصلنا حزمة واحدة للانزيم (الشكل 3) بقيم فعالية تبلغ 10.28 U/mg بروتين، (الجدول 4).

**الجدول (4) : خطوات تنقية أنزيم الليبيز من مصل دم المصابين بتصلب الشرايين.**

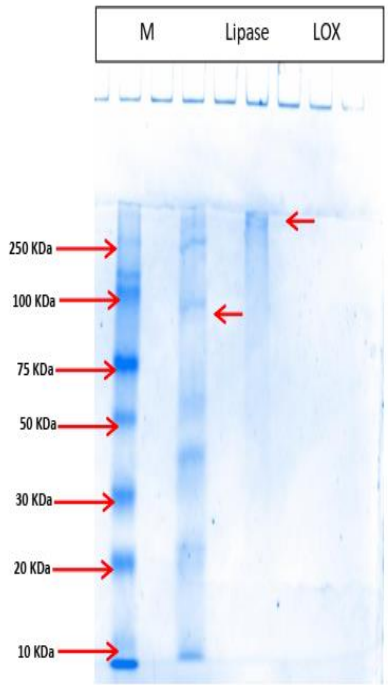
| خطوات التنقية | الحجم الكلي (ml) | البروتين (mg/ml) | البروتين الكلي (mg) | الفعالية (U/ml) | الفعالية الكلية U | الفعالية النوعية $10^3$×(U/mg) | عدد مرات التنقية | استرجاع الفعالية % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **الخام** | 9 | 24.45 | 220.05 | 0.0379 | 0.341 | 1.54 | 1 | 100 |
| **الترسيب بكبريتات الامونيوم** | 12 | 20.84 | 250.08 | 0.0407 | 0.488 | 1.95 | 1.26 | 143 |
| **الفرز الغشائي** | 14 | 15.8 | 221.2 | 0.0457 | 0.640 | 2.89 | 1.87 | 187 |
| **التبادل الايوني باستخدام CM-cellulose** | 45 | 3.71 | 166.95 | 0.0588 | 2.646 | 15.84 | 10.28 | 775 |

* الوحدة الأنزيمية U : تشير إلى كمية أنزيم الليبيز الذي يؤكسد مايكرومولاً واحدا من المادة الأساس في الدقيقة الواحدة .
**الفعالية النوعية U/mg: وهي عدد وحدات الانزيم الموجودة في ملغم من البروتين .



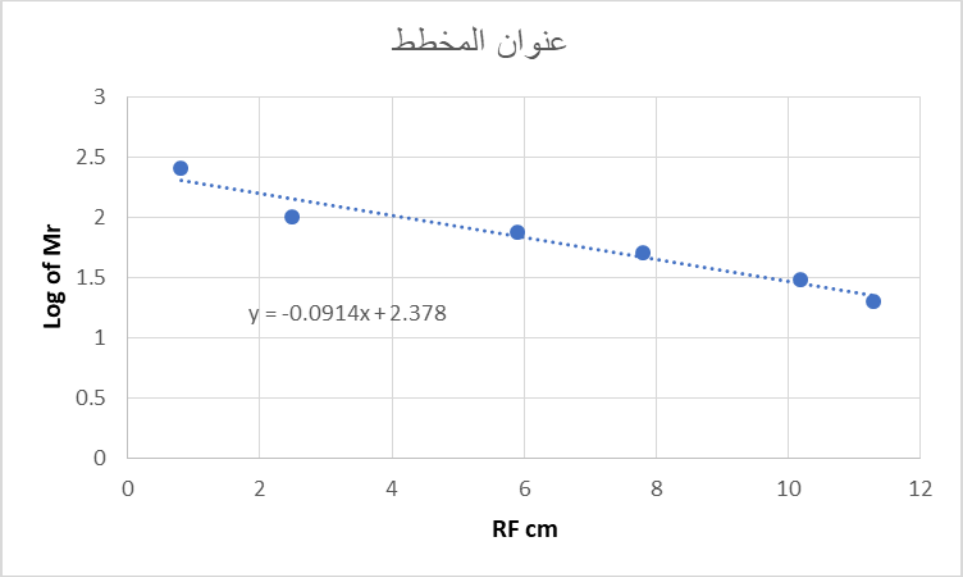

**الشكل (3) نموذج الاسترداد المستحصل من تنقية أنزيم اللايبيز من مصل دم مرضى مصابين بتصلب الشرايين باستخدام راتنج المبادل الايوني CM- cellulose**

عندما تم تحديد الأوزان الجزيئية لليبواوكسيجنيز ولليبيز باستخدام SDS-PAGE ، مقارنة بعض مركبات البروتين القياسية التي تم توضيحها في الشكل (4) أدناه




**الشكل 4: المسافة التي تم ترحيلها من الليبواوكسيجنيز ، الليبيز والبروتينات القياسية بواسطة SDS-PAGE**

لقد ثبت أن الوزن الجزيئي حوالي 270، 94 كيلودالتون لليبواوكسيجنيز والليبيز على التوالي ، وذلك من خلال رسم الوزن الجزيئي مقابل RF للمركبات البروتين القياسية (5).




**شكل (5): منحنى قياسي لتحديد الوزن الجزيئي الليبواوكسيجنيز والليبيز بواسطة SDS-PAGE**

**5.3. دراسة تأثير المستخلص الكحولي المفصول من ثمرة نبات التين الشوكي على فعالية انزيم الليبواوكسيجنيز والليبيز**

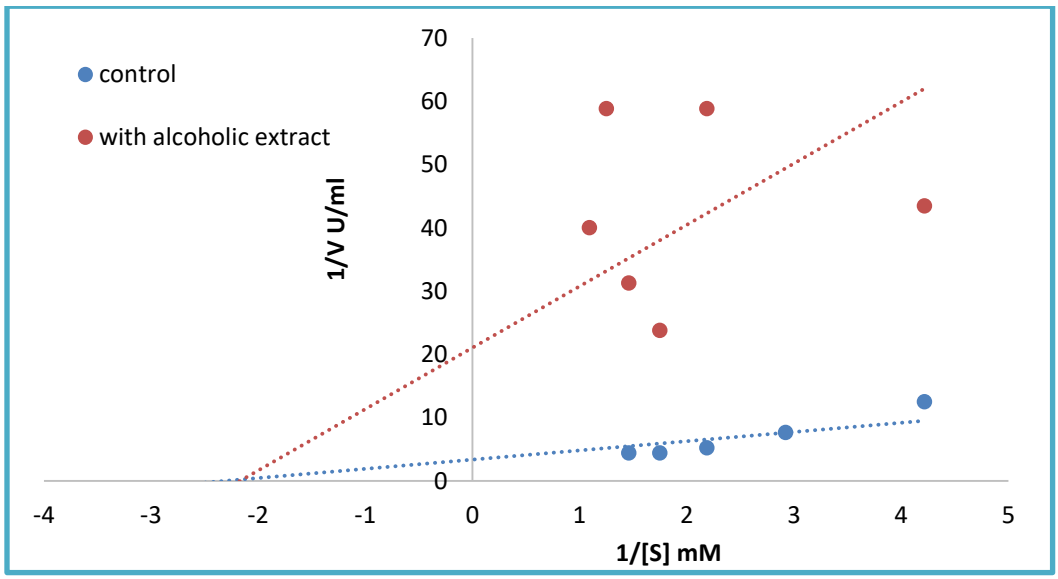
تم دراسة التأثير التثبيطي لمستخلص الكحولي لثمرة التين الشوكي بتراكيز مختلفة تراوحت بين (100-800) ملغم / مايكرولتر ، كما مبين في الجدول (5) والذي يشير الى دور هذه المستخلص الذي ادى الى خفض فعالية انزيم الانزيمين بالمقارنة مع فعاليته في غياب المثبط .

**جدول (5 ): تأثير المستخلص الكحولي المفصول من ثمرة نبات التين الشوكي على فعالية انزيم الليبواوكسيجنيز والليبيز**

| Alcoholic Extract | Lipase | | LOX | |
|---|---|---|---|---|
| التركيز ملغم /مايكرولتر | الفعالية وحدة أنزيمية/مل | النسبة المئوية للتثبيط % | الفعالية وحدة أنزيمية/مل | النسبة المئوية للتثبيط% |
| **سيطرة بدون مثبط** | 0.0215 | - | 0.263 | - |
| **100** | 0.0129 | 40 | 0.053 | 79.84 |
| **200** | 0.0108 | 49.76 | 0.065 | 75.28 |
| **300** | 0.0107 | 50.23 | 0.025 | 90.49 |
| **400** | 0.0098 | 54.41 | 0.086 | 67.3 |
| **500** | 0.0094 | 56.27 | 0.146 | 44.48 |
| **600** | 0.0074 | 65.58 | 0.037 | 85.93 |
| **700** | 0.0078 | 63.72 | 0.035 | 86.69 |
| **800** | 0.0116 | 46.04 | 0.042 | 84.03 |

**1.5.3. تأثير المستخلص الكحولي على فعالية انزيم الليبواوكسيجنيز**

يوضح الجدول (5) ان التركيز (300)ملغم / مايكرولتر كان الافضل تاثيرا تثبيطيا بنسبة تثبيط بلغت 90.49 %، حيث تم دراسة نوع هذا التثبيط بأخذ تراكيز متزايدة من المادة الاساس تراوحت بين (0.237-0.914) ملي مولار و يوضح الشكل (6) لرسم لينوفر – بيرك ان التثبيط كان غير تنافسي ، اذ انخفضت السرعة القصوى Vmax لانزيم LOX من 0.31 وحدة انزيمية / مل الى 0.05 وحدة انزيمية / مل بوجود المستخلص الكحولي المعزول مع بقاء قيمة ثابت ميكيلس ( Km=0.43 mM) ثابتة وكما موضح في الجدول (6) . من الممكن ان يكون سبب هذا التثبيط هو تداخل مجاميع الهيدروكسيل ($OH^-$) الموجودة في المركبات الكرستين والكامفيرول مع الموقع الفعال للانزيم ، وهذا يؤدي الى تقيد او تغير الموقع الفعال لانزيم LOX ، وبالتالي يكون اقل ارتباط بالمادة الاساس ويصبح اقل فعالية .




**شكل (6) : التأثير التثبيطي للمستخلص الكحولي على فعالية انزيم الليبواوكسيجنيز**

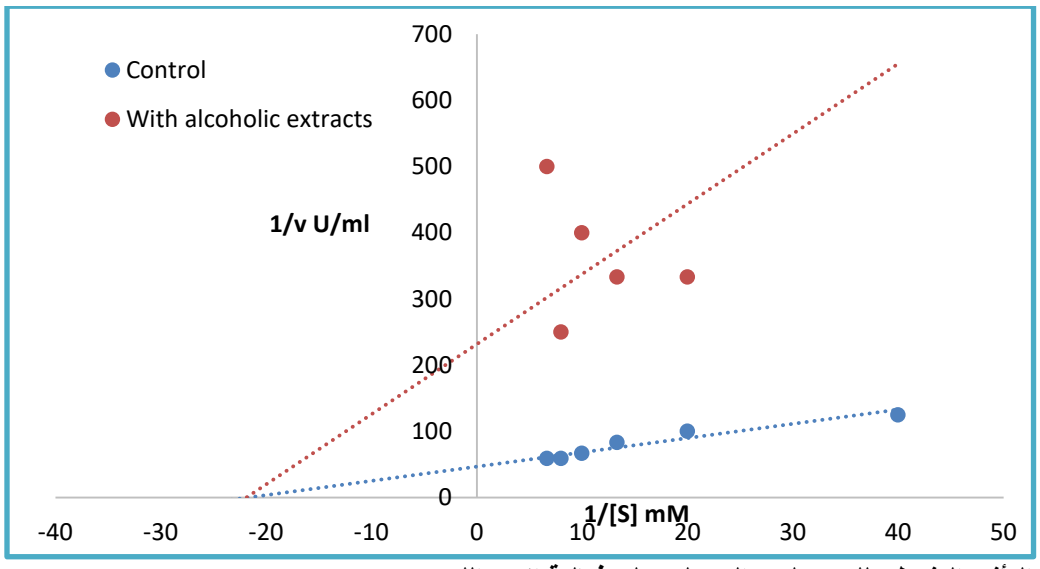
**جدول (6): المتغيرات الحركية ونوع التثبيط للمستخلصات المفصولة من ثمرة التين الشوكي المستخدمة في تثبيط انزيم LOX المنقى من دم المصابين بتصلب الشرايين**

| (التركيز الأمثل للتثبيط ملغم/مايكرولتر) | Km (mM) لفعاليـــــــة LOX بدون المثبط | K′m (mM) لفعالية LOX بوجود المثبط | Vmax (unit/ml) لفعاليـــــة LOX بدون المثبط | V′max (unit/ml) لفعاليـــــة LOX بوجود المثبط | نوع التثبيط |
|---|---|---|---|---|---|
| Alcohol 300 ملغم/مايكرولتر | 0.43 | 0.43 | 0.31 | 0.05 | غير تنافسي |

* Km ثابت ميكليس مينتن /K'm ثابت ميكليس مينتن الظاهري/ Vmax السرعة القصوى / V'max السرعة القصوى الظاهرية.

### 2.5.3. تأثير المستخلص الكحولي على فعالية انزيم الليبيز

يوضح الجدول (5) ان التركيز (600) ملغم / مايكرولتر كان الافضل تأثيرا تثبيطيا بنسبة تثبيط بلغت 65.58 %، ، حيث تم دراسة نوع هذا التثبيط بأخذ تراكيز متزايدة من المادة الاساس تراوحت بين (0.025-0.200) ملي مولار و يوضح الشكل (7) لرسم لينوفر – بيرك ان التثبيط كان غير تنافسي ، اذ انخفضت السرعة القصوى Vmax لانزيم Lipase من 0.020 وحدة انزيمية / مل الى 0.004 وحدة انزيمية / مل بوجود المستخلص الكحولي المعزول مع بقاء قيمة ثابت ميكيلس ( Km=0.045 mM) ثابتة كما موضح في الجدول (6)، ان سبب هذا التثبيط قد يعزى الى دور مجاميع الكاربوكسيل التي تتفاعل مع الاحماض الامينية بمختلف المواقع ، وهذه المجموعة متواجدة في حامض الكاليك او حامض الفريوليك والتي ترتبط بموقع مختلف على الانزيم (غير الموقع الفعال) وبالتالي تغير من شكل الانزيم ، مما يقلل من قدرته على تحفيز التفاعل حتى عندما تكون المادة الاساس مرتبطة به .




**شكل (7) : التأثير التثبيطي للمستخلص الكحولي على فعالية انزيم الليبيز**

**جدول (6): المتغيرات الحركية ونوع التثبيط للمستخلصات المفصولة من ثمرة التين الشوكي المستخدمة في تثبيط انزيم LOX المنقى من دم المصابين بتصلب الشرايين**

| (التركيز الأمثل للتثبيط ملغم/مايكرولتر) | Km (mM) لفعالية Lipase بدون المثبط | K′m (mM) لفعالية Lipase بوجود المثبط | Vmax (unit/ml) لفعالية Lipase بدون المثبط | V′max (unit/ml) لفعالية Lipase بوجود المثبط | نوع التثبيط |
|---|---|---|---|---|---|
| Alcohol 600 ملغم/مايكرولتر | 0.045 | 0.045 | 0.020 | 0.004 | تثبيط غير تنافسي |

* Km ثابت ميكليس مينتن /K'm ثابت ميكليس مينتن الظاهري/ Vmax السرعة القصوى / V'max السرعة القصوى الظاهرية.

**4. الخلاصة**

أظهرت الدراسة أن مركبات الفلافونويدات هي تركيزات جيدة متوفرة حيوية في ثمرة التين الشوكي . وجد ان المستخلص الكحولي الخام قد خفض من مستويات الليبواوكسيجنيز و الليبيز ، بالاضافة الى انه لهذا المستخلص دور في تثبط الانزيمين باستخدام تراكيز عديدة ، حيث كان أفضل تراكيز 300 و 600 مايكروغرام / مايكرولتر ، ونوع تثبيط كان غير تنافسي على التوالي .

**5. المصادر:**


Al-Naqeb, G., Fiori, L., Ciolli, M., & Aprea, E. (2021). Prickly pear seed oil extraction, chemical characterization and potential health benefits. *Molecules*, *26*(16), 5018.

Atiya, A., Majrashi, T. A., Begum, M. Y., Abdul Qadir, S. F., Alqahtani, A. S., Ali Alosman, A. S., ... & Alshahrani, R. R. M. (2023). Influence of solvent selection and extraction methods on the determination of polyphenols, antioxidant, lipoxygenase and tyrosinase inhibition activities of Opuntia ficus-indica fruits peel and pulp collected from the Kingdom of Saudi Arabia (KSA). *Natural Product Research*, *37*(3), 514-521.

Bacchus, R., Kilshaw, B. H., Madkour, M., Bassam, S. A., & Farhan, B. A. (1980). Preliminary studies on a reference range for Saudi Arabian males: 1. Serum uric acid. *Saudi Medical Journal*, *1*(3), 160-163.

Baldwin, A., & Booth, B. W. (2022). Biomedical applications of tannic acid. *Journal of Biomaterials Applications*, *36*(8), 1503-1523.

Boonsong, S., Klaypradit, W., & Wilaipun, P. (2016). Antioxidant activities of extracts from five edible mushrooms using different extractants. *Agriculture and Natural Resources*, *50*(2), 89-97.

Bryan-Thomas, J. (2016). A comparative study of the antioxidant activity (DPPH), total flavonoid, total tannin, total polyphenol levels in plant extracts of the Annona muricata, Ribes nigrum and Manilkara zapota. *International Journal of Scientific and Research Publications*, *6*(9), 490-494.

Colantuono, A., Ferracane, R., & Vitaglione, P. (2016). In vitro bioaccessibility and functional properties of polyphenols from pomegranate peels and pomegranate peels-enriched cookies. *Food & function*, *7*(10), 4247-4258.

Dang, Y., Zhou, T., Hao, L., Cao, J., Sun, Y., & Pan, D. (2019). In vitro and in vivo studies on the angiotensin-converting enzyme inhibitory activity peptides isolated from broccoli protein hydrolysate. *Journal of agricultural and food chemistry*, *67*(24), 6757-6764.

Faiz, O., Colak, A., Saglam, N., Çanakçi, S., & Belduz, A. O. (2007). Determination and characterization of thermostable esterolytic activity from a novel thermophilic bacterium Anoxybacillus gonensis A4. *BMB Reports*, *40*(4), 588-594.

Haberland, M. E., Mottino, G., Le, M., & Frank, J. S. (2001). Sequestration of aggregated LDL by macrophages studied with freeze-etch electron microscopy. *Journal of Lipid Research*, *42*(4), 605-619.

Iftikhar, K., Siddique, F., Ameer, K., Arshad, M., Kharal, S., Mohamed Ahmed, I. A., ... & Aziz, N. (2023). Phytochemical profiling, antimicrobial, and antioxidant activities of hydroethanolic extracts of prickly pear (Opuntia ficus indica) fruit and pulp. *Food Science & Nutrition*, *11*(4), 1916-1930.

Kotlyarov, S. (2022). Genetic and Epigenetic Regulation of Lipoxygenase Pathways and Reverse Cholesterol Transport in Atherogenesis. *Genes*, *13*(8), 1474.

Kumari, A., Kristensen, K. K., Ploug, M., & Winther, A. M. L. (2021). The importance of lipoprotein lipase regulation in atherosclerosis. *Biomedicines*, *9*(7), 782.

Lee, D. W., Koh, Y. S., Kim, K. J., Kim, B. C., Choi, H. J., Kim, D. S., ... & Pyun, Y. R. (1999). Isolation and characterization of a thermophilic lipase from Bacillus thermoleovorans ID-1. *FEMS Microbiology Letters*, *179*(2), 393-400.

Lizárraga-Velázquez, C. E., Leyva-López, N., Hernández, C., Gutiérrez-Grijalva, E. P., Salazar-Leyva, J. A., Osuna-Ruíz, I., ... & Ávalos-Soriano, A. (2020). Antioxidant molecules from plant waste: Extraction techniques and biological properties. *Processes*, *8*(12), 1566.

Lusis, A. J. (2000). Atherosclerosis. *NATURE-LONDON-*, 233-241.

Micucci, M., Angeletti, A., Cont, M., Corazza, I., Aldini, R., Donadio, E., ... & Budriesi, R. (2016). Hibiscus Sabdariffa L. flowers and Olea Europea L. leaves extract-based formulation for hypertension care: In vitro efficacy and toxicological profile. *Journal of medicinal food*, *19*(5), 504-512.

Nouni, C., Theodosis-Nobelos, P., & Rekka, E. A. (2023). Antioxidant and Hypolipidemic Activities of Cinnamic Acid Derivatives. *Molecules*, *28*(18), 6732.

Padilla-Camberos, E., Flores-Fernandez, J. M., Fernandez-Flores, O., Gutierrez-Mercado, Y., Carmona-de la Luz, J., Sandoval-Salas, F., ... & Allen, K. (2015). Hypocholesterolemic effect and in vitro pancreatic lipase inhibitory activity of an Opuntia ficus-indica extract. *BioMed research international*, *2015*(1), 837452.

Pang, C., Liu, S., Zhang, G., Zhou, J., Du, G., & Li, J. (2023). Improving the catalytic efficiency of Pseudomonas aeruginosa lipoxygenase by semi-rational design. *Enzyme and Microbial Technology*, *162*, 110120.

Panzella, L., Moccia, F., Nasti, R., Marzorati, S., Verotta, L., & Napolitano, A. (2020). Bioactive phenolic compounds from agri-food wastes: An update on green and sustainable extraction methodologies. *Frontiers in nutrition*, *7*, 60.

Plummer, T.D. (1978)."An Introduction of Practical Biochemistry". 2nd ed., McGraw-Hill Book Co., U.K., pp : 48, 53, 174, 270, 274.1

Rakshit, S., Nirala, S. K., & Bhadauria, M. (2020). Gallic acid protects from acute multiorgan injury induced by lipopolysaccharide and D-galactosamine. Current Pharmaceutical Biotechnology, 21(14), 1489-1504.

Ram, H., Jatwa, R., & Purohit, A. (2014). Antiatherosclerotic and cardioprotective potential of acacia senegal seeds in diet-induced atherosclerosis in rabbits. Biochemistry research international, 2014.

Robyt F.J. & White J. B. (2001). "Biochemical techniques ,theory and Practice " . Brookes/Cole publishing company , Monterey , California.

Ruwizhi, N., & Aderibigbe, B. A. (2020). Cinnamic acid derivatives and their biological efficacy. International journal of molecular sciences, 21(16), 5712.

Santzouk, G., Santzouk, S., Gerodimou, I., Tsaoulidis, D., & Dormousoglou, M. (2019). Opuntia ficus indica (Prickly pear): Extraction and characterization of products with anti-age and antioxidant activity. *Bulg. Chem. Commun*, *51*, 052-055.

Schacterle, G. P., GP, S., & RL, P. (1973). A simplified method for the quantitative assay of small amounts of proteins in biologic material.

Shastry, B. S., & Rao, M. R. (1975). Studies on lipoxygenase from rice bran. *Cereal Chemistry*, *52*(5), 597-603.

Shin, M., Lee, H. A., Lee, M., Shin, Y., Song, J. J., Kang, S. W., ... & Lee, H. (2018). Targeting protein and peptide therapeutics to the heart via tannic acid modification. Nature biomedical engineering, 2(5), 304-317.

Shiroma, E. J., Cook, N. R., Manson, J. E., Moorthy, M. V., Buring, J. E., Rimm, E. B., & Lee, I. M. (2017). Strength training and the risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Medicine and science in sports and exercise*, *49*(1), 40.

Siesjö, B. K., AGARDH, C. D., Bengtsson, F., & SMITH, M. L. (1989). Arachidonic acid metabolism in seizures. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *559*(1), 323-339.

Sridhar, A., Ponnuchamy, M., Kumar, P. S., Kapoor, A., Vo, D. V. N., & Prabhakar, S. (2021). Techniques and modeling of polyphenol extraction from food: A review. Environmental Chemistry Letters, 19, 3409-3443.

Taamallah, M. (2022). *AMBROSIA sustainable reuse of prickly pear seeds to extract oil with compound of high interest* (Doctoral dissertation).

Takahashi, Y., Zhu, H., & Yoshimoto, T. (2005). Essential roles of lipoxygenases in LDL oxidation and development of atherosclerosis. *Antioxidants & redox signaling*, *7*(3-4), 425-431.

Velderrain-Rodríguez, G. R., Torres-Moreno, H., Villegas-Ochoa, M. A., Ayala-Zavala, J. F., Robles-Zepeda, R. E., Wall-Medrano, A., & González-Aguilar, G. A. (2018). Gallic acid content and an antioxidant mechanism are responsible for the antiproliferative activity of 'Ataulfo'mango peel on LS180 cells. Molecules, 23(3), 695.

Wilson, S. S., Guillan, R. A., & Hocker, E. V. (1972). Studies of the stability of 18 chemical constituents of human serum. *Clinical chemistry*, *18*(12), 1498-1503.

Wong, F. C., & Chai, T. T. (2023). Bioactive peptides and protein hydrolysates as lipoxygenase inhibitors. *Biology*, *12*(7), 917.

Xu, Y., Tang, G., Zhang, C., Wang, N., & Feng, Y. (2021). Gallic acid and diabetes mellitus: its association with oxidative stress. *Molecules*, *26*(23), 7115.

Zeka, K., Ruparelia, K., Arroo, R. R., Budriesi, R., & Micucci, M. (2017). Flavonoids and their metabolites: prevention in cardiovascular diseases and diabetes. *Diseases*, *5*(3), 19.