

## عزل و تنقية انزيم اللايبواوكسيجينيز جزئيا من مصل دم مريض مصاب بالربو القصبي و دراسة تأثير النواتج الطبيعية لنبات ذنب الخيل (*Equisetum arvense.L*) على فعاليته

محمد بحري حسن\*\*

هبه رافد كمال\*

قسم الكيمياء/ كلية العلوم/ جامعة الموصل

\*E-mail: hibarafid27@gmail.com

\*\* E-mail: mohammedsadoon77@gmail.com

(أُستلم 2018/ 12 /16 ؛ قُبِل 2019/ 4 / 15)

### الملخص

تتضمن الدراسة عزل وتنقية انزيم اللايبواوكسيجينيز (LOX) Lipoxygenase من مصل دم لشخص مصاب بالربو القصبي باستخدام التقنيات المختلفة و اظهرت نتائج كروماتوغرافيا التبادل الايوني التي اجريت في عمود الفصل الحاوي على المبادل الايوني (DEAE - سيليلوز) للراسب البروتيني الناتج بعد عملية الديلازة على اثنين من الحزم البروتينية، و ان الحزمة البروتينية الاولى A اظهرت أعلى فعالية للإنزيم اذ بلغت الفعالية النوعية (2.68 U/mg) و عدد مرات التنقية (10.30) مرة، ثم حددت الظروف المثلى لفعالية الانزيم وبينت النتائج ان اعلى فعالية كانت عند الدقيقة الخامسة، دالة حامضية عند (pH8)، درجة الحرارة (40°م)، تركيز (0.5 ملي مول/ لتر) للمادة الاساس (حامض اللينوليك) و أن السرعة القصوى (Vmax) بلغت (168 وحدة / لتر) وان قيمة (Km) بتطبيق معادلة ميكليس منتن ومعادلة لاينويفر-بيرك بلغت (0.13) و (0.14) ملي مولاري على التوالي، بالإضافة الى تحديد الوزن الجزيئي التقريبي (الحزمة البروتينية الاولى A) بتقنية الهجرة الكهربائية باستخدام SDS-PAGE والذي بلغ (69000) دالتون تقريبا. كذلك تضمنت الدراسة عزل النواتج الطبيعية لنبات ذنب الخيل (الزيوت) وتشخيصها بتقنية GC (كروماتوغرافيا الغاز-سائل) و عزل (الفلافونويدات) وتشخيصها بتقنية HPLC لدراسة تأثيرها على فعالية الانزيم المنقى جزئيا، و اظهرت النتائج بان الزيوت تحتوي على حامض الاندوكانويك Undecanoic و حامض اللوريك Lauric، وتحتوي الفلافونويدات على الكاتشين Catechine، كيورسيتين Qurectine، حامض الفيروليك Ferulic acid و الروتين Rutin، اما تأثيرها على فعالية الانزيم المنقى جزئيا اظهرت بأن الفلافونويدات خفضت وثبتت انزيم اللايبواوكسيجينيز بنسبة عالية و من ثم الصابونين و تليها الزيوت.

الكلمات الدالة: الربو، لايبواوكسيجينيز، ليوكوترين، نبات ذنب الخيل، الفلافونويدات، الزيوت.

## Isolation and Purification of Lipoxygenase from the Serum of Bronchial Asthma Patient and Studying the Effect of Natural Products of Horse Tail (*Equisetum arvense.L*) Plant on it's Activity

Hiba R. Kamal

Mohammed B. Hasan

Department of Chemistry/ College of Science/ University of Mosul

### ABSTRACT

This study includes the isolation and purification of the Lipoxygenase (LOX) enzyme from the serum of an Asthma patient by using different techniques. The result showed the Ion – Exchange chromatography which occurred in the column containing the ion exchange (DEAE- cellulose) diethylamino ethyl – cellulose of the proteinous precipitateth which is produced after dialysis. Two bands of protein and the first band (A) showed the highest activity of the enzyme with the specific activity (2.68 U/mg) and the number times of the purification was (10.30) once. Then, the optimum conditions of LOX enzyme showed the highest activity which it was at the fifth minute at pH = 8 and at (40°C), substrate concentration was about (0.5 mmol/ L) and the maximum Velocity (Vmax) was (168 unit / L), the value of (Km) by using Mikael's Menten and Linwifer – Burk plot was (0.13) and (0.14) molar respectively. In addition, the determining of the approximate molecular weight of LOX enzyme (the first protein band A) by electrical migration technology (Electrophoresis) using SDS-PAGE and molecular weight and it was (69000) Dalton. Also the study includes the isolation of th the natural products of the horse tail plant (oils) and identifiacted by GC (Gas-Liquid chromatography) and the flavonoids isolated and identifiacted by (HPLC) to study their effect on the activity of the partially purified enzyme, the results showed that oils contain an Undecanoic and Lauric acid, while flavonoids contain Catechine, Qurectine, Ferulic acid and Rutin, and it's effect on the activity of partially purified enzyme showed that flavonoids reduced high-volume lipoxygenase enzyme and then sabonin followed by oils.

**Keywords:** Asthma, Leukotriene, Lipoxygenase, Equisetum arvense. L., Oils, Flavonoid, Saponin.

### المقدمة

الربو هو مرض رئوي التهابي مزمن يتميز بانسداد مجرى الهواء بشكل متكرر بسبب زيادة الاستجابة المفرطة للقصبات الهوائية لمرضى الربو تجاه أي مهيجات، يؤثر الربو على ما يقدر بنحو 330 مليون شخص في جميع أنحاء العالم (Kritasi *et al.*, 2014 ; Raftis *et al.*, 2018) و يتميز بأعراض تنفسية متغيرة و متكررة مع تشنج قصبي وانسداد في المسالك الهوائية و بالتالي تضيقها مؤديا الى ضيق النفس و الصدر و السعال مع اصدار صوت الأزيز (Papi *et al.*, 2018 ; Pathinayake *et al.*, 2018) وتعود أسباب مرض الربو نتيجة للتفاعلات المعقدة للعوامل الوراثية والبيئية كالغبار و العفن و وبغ الحيوانات والدخان (Gautier and Charpin, 2017) والتمارين الرياضية (Khan, 2010) و بعض الأدوية مثل عقاقير الالتهابات غير الستيرويدية كالأسبرين (Sakalar *et al.*, 2017)، وقد أشارت العديد من الدراسات الى أن أنزيم ألابيواوكسيجينيز (Lipoxygenase (LOX) يتميز بدوره الهام في مرض الربو و الالتهابات لأنه يؤدي الى توليد مركبات وسطية دهنية تمتاز بفعالية بيولوجية تدعى الليكوتراينينات (LTs) التي تؤدي دوراً فيزيولوجياً مهماً في مرض الربو (Busse and Kraft, 2005; Folco and Murphy, 2006; Wisatra and Dekker, 2014; Bankova and Boyce, 2018) حيث ان السستيل ليكوتراين (Cys – LTs) تعتبر المسبب الأساس لحصول الحساسية المفرطة و الربو القصبي (Cobanoglu

(Kuhn et al., 2015 ; Singh et al., 2013 ; et al., 2013 ، إذ أنها تعمل على انقباض القصبات الهوائية من خلال مستقبلاتها (Cys -LT<sub>1</sub>) و (Cys -LT<sub>2</sub>) التي يتم التعبير عنها حصراً على العضلات الملساء المحيطة بالقصبة الهوائية (Duroudier et al., 2009) فعند وجود أي مهيج ستتقلص تلك العضلات مؤديةً الى تقليل تدفق الهواء الى الحويصلات الهوائية (Bohm et al., 2005) بالإضافة إلى أنها تحفز إفراز المخاط وتغير من لزوجته (Kaliner et al., 1986) مؤدية الى نوبة ربوية حادة و مزمنة، لذلك تعتبر الليكوترائينات السبب الرئيسي في خلل وظائف الرئة (Berger et al., 1999).

ان انزيم اللايبواوكسيجينيز LOX هو من عائلة الانزيمات التي تعمل على اكسدة الاحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة (PUFAs) كحامض اللينولينيك او حامض الراكيدونيك عن طريق اضافة ذرتي أوكسجين اليها لتكون مشتقات الهيدروبيروكسي المقابلة و من ثم تحولها لمركبات فعالة وهي الليكوترائينات (Savari et al., 2014) وبمساعدة بروتين صغير ناقل يدعى (FLAP) (5-Lipoxygenase-activating protein) فهو يساعد الانزيم للارتباط بالحامض الدهني على سطح الخلية (Brash, 1999).

توجد هذه الانزيمات في الحيوانات و النباتات والفطريات و حتى البكتيريا (Joo and Oh, 2012) والمصدر الرئيس لإفراز هذه الانزيمات هي خلايا الدم البيضاء (Werz, 2002)، وأشارت الدراسات ان افضل علاج للأشخاص الذين يعانون من مرض الربو هي ادوية مضادات مستقبلات الليكوترين (Cys-LT<sub>1</sub>) او ادوية مثبطة لإنزيم 5-لايبواوكسيجينيز مثل (زيليتون Zileuton) (Berger et al., 2007 ; Bruno et al., 2018)، بالإضافة الى ادوية الربو هناك اعشاب تخفف من حدة اعراض الربو مثل نبات الأفيروا (ذنب الخيل) وهو نبات يحتوي على العديد من المعادن ومضادات الاكسدة كالأحماض الدهنية، الفلافونويدات، القلويدات و الصابونين التي لها القدرة على علاج مرض الربو لأنها تمتلك خصائص مضادة للأكسدة والميكروبات و كاسحه للجذور الحرة بالإضافة الى انها تسكن الالتهاب من خلال ارتخاء العضلات الملساء وتظهر نشاطا عاليا للحد من اعراض الربو (Antiasthmatic) (Park and Jeon, 2012 ; Al-Snafi, 2017).

### المواد و طرائق العمل

#### 1. عزل وتنقية انزيم اللايبواوكسيجينيز

##### تحضير مصل الدم:

تم سحب عينة دم بحجم 30 مل من متبرع يبلغ من العمر 35 سنة مصاب بمرض الربو القصبي منذ حوالي 27 عاماً، تم اختياره ليكون نموذج الدراسة وفق ارشادات المشرف الميداني و الطبيب الاختصاصي لأمراض الحساسية و الربو في استشارية مستشفى السلام التعليمي (وحدة الحساسية و الربو) في مدينة الموصل. و ذلك بعد الرخصة الاخلاقية من المريض و المطابقة لضوابط دائرة صحة نينوى. اذ تم سحب الدم من الوريد بعد تعقيم المنطقة، باستخدام حقنة بحجم (5ml) ثم وضع الدم في أنابيب بلاستيكية نظيفة و معقمة ذات غطاء أصفر مصنوعة من البولي ستايرين، ثم وضعت في حمام مائي بدرجة حرارة 37°م لمدة (15 min) بعدها وضعت في جهاز الطرد المركزي بسرعة (6000 xg) لمدة (12 min) من اجل فصل الجزء المتخثر من أدم، وأخيراً سحب المصل الرائق serum بواسطة ألماصة الدقيقة و الذي يجب أن يكون غير متحلل (Wilson et al., 1972 ; Bacchus et al., 1980)، و قسم إلى أربع أجزاء في أنابيب بلاستيكية صغيرة و جافة ثم حفظ بدرجة حرارة (20-°م) و بعد الفصل و الحصول على مصل الدم قدر تركيز البروتين فيه بطريقة لاوري المحورة بالإضافة الى تقدير فعالية انزيم اللايبواوكسيجينيز LOX ثم اخذ مصل الدم ليخضع الى سلسلة من عمليات التنقية اللازمة لفصل و دراسة خصائص الانزيم. كما سيوضح لاحقاً.

### الترسيب بواسطة كبريتات الامونيوم:

اضيفت كبريتات الامونيوم بحالتها الصلبة تدريجيا (Robyte and White, 1987) وبدرجة تشبع تراوحت بين (0-65%) الى 21 مل من مصّل الدم لترسيب البروتينات مع مراعاة التحريك بالمحرك المغناطيسي و المحافظة على درجة حرارة المحلول عند 4°م لمدة ساعتين ثم ترك في الثلاجة ليستقر ليوم كامل، بعدها تم وضع المحلول في جهاز الطرد المركزي المبرد لمدة عشرين دقيقة و بسرعة (6000 xg)، ثم أهمل الراشح واخذ الراسب وأذيب بأقل كمية من محلول الفوسفات المنظم بتركيز 20mM و دالة حامضيه pH=6.8 (محيسن و آخرون، 2008) ثم قدرت كمية البروتين و فعالية الأنزيم فيه.

### الفرز الغشائي (الديليزة):

أجريت عملية الفرز الغشائي للمحلول الناتج من الخطوة السابقة للتخلص من كبريتات الامونيوم باستخدام كيس الديليزة (غشاء نصف ناضج) (Robyte and White, 1987)، حيث وضع (18 مل) المحلول بداخل الكيس وعلق من الأعلى و الأسفل بإحكام مع غمره في محلول الفوسفات المنظم بتركيز 20mM و دالة حامضيه pH6.8 مع مراعاة التحريك بالمحرك المغناطيسي لمدة 24 ساعة وبدرجة حرارة (4°م) مع استبدال المحلول المنظم كل 4 ساعات و بعد الانتهاء حسب الحجم النهائي للمحلول الناتج ثم قدرت كمية البروتين و فعالية الأنزيم فيه.

### كروموتوكرافيا التبادل الأيوني:

اخذ (10 مل من المحلول الناتج في الخطوة السابقة و حقن بهدوء في اعلى عمود الفصل الزجاجي و الذي كان بطول (40 سم) و عرض (2.5 سم) و يحتوي على راتنج التبادل الايوني (DEAE; A-50 - سيليلوز) و هو من المبادلات الايونية السالبة الشحنة الضعيفة (Plummer, 1978). مع إمرار محلول الفوسفات المنظم باستمرار، ثم تم جمع العينات بأنابيب اختبار من الجزء السفلي للعمود و بمعدل جريان 60 مل / ساعة اي بواقع (1 مل / 1 دقيقة) ثم قدرت كمية البروتين و فعالية الأنزيم فيه.

### التجفيد:

جفف محلول كل حزمه من الحزم البروتينية الناتجة من عمل التبادل الايوني تحت التبريد باستخدام جهاز التجفيد للحصول على الحزم بشكل مسحوق جاف (Nireesha et al., 2013) وحفظ بالمجمدة لحين استخدامه بالخطوات اللاحقة.

### تقدير البروتين:

قدرت كمية البروتين باستخدام طريقة Folin - Lowry method المحورة و المستخدمة من قبل الباحثين (Schacterle and Pollack, 1973).

### تقدير فعالية انزيم اللايبواوكسيجيناز (LOX):

قدرت الفعالية الانزيمية لإنزيم LOX المنقى جزئيا من مصّل الدم من خلال متابعة الزيادة في الامتصاصية عند الطول الموجي 234 نانوميتر باستخدام الطريقة التي وصفها Shastry و Rao (Shastry and Rao, 1975).

### 2. تحديد الظروف المثلى لعمل انزيم اللايبواوكسيجيناز

تم إجراء العديد من التجارب لتحديد الظروف المثلى لإنزيم LOX مثل تأثير تركيز المادة الاساس ، تركيز الانزيم ، وقت التفاعل، درجة الحرارة و الاس الهيدروجيني ( الدالة الحامضية).

### 3. تحديد الوزن الجزيئي لانزيم اللايبواوكسيجينيز المنقى جزئياً من مصّل الدم بتقنية الهجرة الكهربية (Electrophoresis) باستخدام PAGE-SDS

تم استخدام طريقة الباحث (Laemmli, 1970) في عملية الفصل باستخدام تقنية الهجرة الكهربية باستخدام البولي اكريلاميد Polyacrylamide في المادة المطهرة (SDS) كبرينات دوديسيل الصوديوم  $[-Na^+[CH_3(CH_2)_{10}CH_2OSO_3^-]$  وهذه التقنية سريعة و غالباً ما يتم استخدامها لتقدير الاوزان الجزيئية من البروتينات (Voet and Voet, 1990).

### 4. عزل النواتج الطبيعية من نبات ذنب الخيل

#### عزل الزيوت:

عزلت الاحماض الدهنية و الزيوت من نبات ذنب الخيل بوضع 150 غم منه في جهاز الاستخلاص Soxhelt لمدة 72 ساعة باستخدام مذيب الايثر البترولي (Petroluem ether) (60-80) °م بعد ان تم نقع النبات بالمذيب مدة يوم كامل، ثم بخر المذيب باستخدام جهاز التبخير الدوار (Rotary evaporator)، و وضع الزيت في انبوبة محكمة الغطاء لغرض اجراء عملية التشخيص للاحماض الدهنية و الزيوت الطيارة التي تكون موجودة ضمن الزيت بتقنية (GC) (Sayyar et al., 2013).

#### عزل الفلافونويدات:

عزلت الفلافونويدات بأخذ المتبقي (النقل) الناتج بعد عزل الزيت في جهاز الاستخلاص حوالي لمدة 3 ايام بعد ان جف من اثر الايثر البترولي و نقعها بالايثانول لمدة يوم كامل في الظلام. ثم بخر الايثانول باستخدام جهاز التبخير الدوار (Rotary evaporator) ثم وضعت المادة الناتجة في أنبوب محكم الغطاء لغرض التشخيص بتقنية (HPLC) (Kato et al., 2010).

#### عزل الصابونين:

عزل الصابونين من النبات و ذلك بأخذ (النقل الناتج بعد عزل الفلافونويدات) و وضعه بجهاز الاستخلاص Soxhelt لمدة 72 ساعة بعد ان جفت من أثر الايثانول و نقعها بالماء المقطر مدة يوم كامل، ثم وضع المحلول الناتج في جهاز التجفيد و تم الحصول على الراسب بشكل مسحوق ثم حفظ بالمجمدة بأنبوبة محكمة الغطاء لغرض معرفة تأثيرها على فعالية الانزيم المنقى جزئياً من مصّل الدم. (Sezgin and Artk, 2010).

### 5. تشخيص النواتج الطبيعية المعزولة من نبات ذنب الخيل

#### تشخيص الأحماض الدهنية في الزيت:

تم تشخيص الأحماض الدهنية في الزيت المعزول من نبات ذنب الخيل باستخدام تقنية (GC) كروماتوغرافيا الغاز ذي الأعمدة الشعرية Capillary gas chromatography في مختبرات وزارة العلوم و التكنولوجيا / دائرة البيئة و المياه في بغداد، اذ تم استخدام كاشف اللهب المتأين (FID) مع عمود فصل شعري من نوع (SE-30) بطول 30 متراً. حيث بلغت درجة حرارة عمود الفصل بين (120-280°م) مع ارتفاع درجة الحرارة تدريجياً و بمعدل 8 درجات مئوية مع استخدام غاز حامل (النيتروجين) كغاز ناقل.

#### تشخيص الفلافونويدات:

شخصت الفلافونويدات المعزولة من نبات ذنب الخيل باستخدام تقنية (HPLC) كروماتوغرافيا السائل العالي الاداء في مختبرات وزارة العلوم و التكنولوجيا / دائرة البيئة و المياه في بغداد و كانت ظروف القياس كما مدرج أدناه:

نوع الجهاز : SYKAM,Germany

اسم العمود : C18-ODS

ابعاد العمود : (4.6 ملم × 25 سم )  
سرعة التدفق : 1 مل/ دقيقة

اذ تم تحضير نموذج القياس Sample بتركيز (2000 ppm) عن طريق وزن (0.01 gm) من مستخلص الفلافونويدات المركز و إذابتها في 10 مل من الطور المتحرك، ثم رشح مرتين باستخدام ورق الترشيح (Whatman (No.42). ثم حقن النموذج في عمود HPLC. و شخصت المركبات بمقارنة زمن الاحتجاز للقمم العائدة للفلافونويدات مع زمن الاحتجاز للمحلول القياسي والذي حضر بتركيز مختلفة تراوحت بين (10 – 40) جزء لكل مليون ثم حقنت في عمود الـ HPLC (Gupta et al., 2012).

## 6. تأثير النواتج الطبيعية على فعالية انزيم اللايبواوكسيجيناز LOX

حضرت تراكيز مختلفة من النواتج الطبيعية المعزولة من نبات ذنب الخيل و بمدى يتراوح من (9000-1000 ppm) اذ تم وزن (0.01 غم الى 0.09 غم) من جميع النواتج الطبيعية الثلاثة المعزولة من نبات ذنب الخيل و تمت إذابتها في 10 مل من المادة التي تم استخلاصها فيها. ثم اضيف (20µl) من المحلول الأنزيمي الى (20µl) من محلول الاختبار لمدة 30 دقيقة (Befani et al., 2001) بعد ذلك قدرت الفعالية الانزيمية باستخدام تركيز ثابت من المادة الأساس حسب الطريقة التي وصفها (Shastri and Rao, 1975).

## النتائج و المناقشة

### 1. عزل و تنقية انزيم اللايبواوكسيجيناز

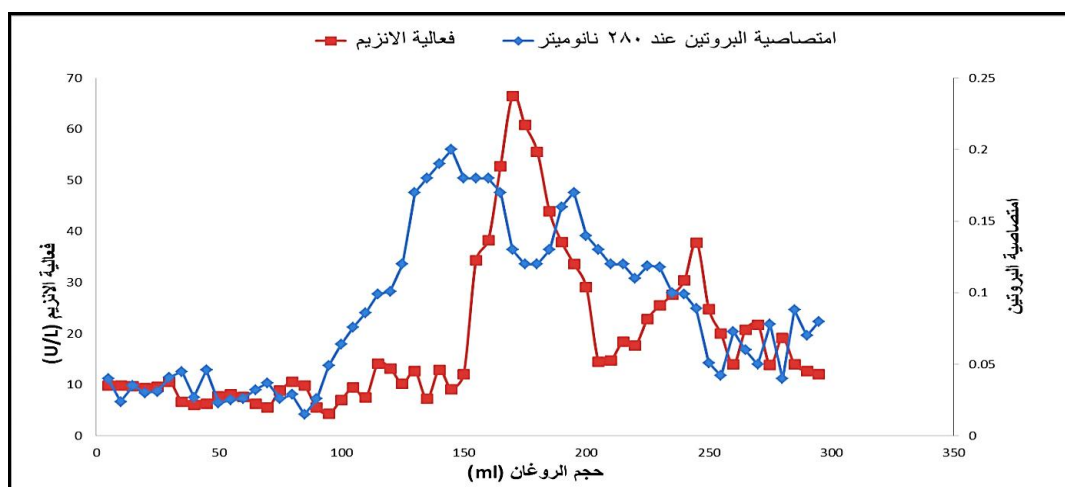
الجدول (1) يوضح خلاصة ونتائج مراحل التنقية الجزئية لإنزيم اللايبواوكسيجيناز (LOX) Lipoxygenase وعزله من مصل دم شخص مصاب بالربو القصبي، وأظهرت النتائج أن الفعالية النوعية في مصل الدم بعد الترسيب بكبريتات الامونيوم هي (0.46 U/mg) مقارنة بالفعالية النوعية للإنزيم في مصل الدم قبل الترسيب والتي كانت (0.26 U/mg) اما مقدار الاسترجاع فيبلغ (118.93 %) و عدد مرات التنقية كانت (1.76 مرة)، اما الفعالية النوعية لانزيم LOX المنقى جزئيا من حبوب الأرز بعد الترسيب بكبريتات الامونيوم (% 37-60) كانت (0.549 U/mg) و مقدار الاسترجاع بلغ 57.7 % و عدد مرات التنقية كانت (5.8 مرة) (Hiroyuki et al., 1986). ثم تم تطبيق عملية الفرز الغشائي للمزيد من التنقية من اجل التخلص من كبريتات الامونيوم والشوائب و هذه العملية أدت لارتفاع ملحوظ في الفعالية النوعية والتي أصبحت (0.76 U/mg) اي تضاعفت التنقية بمقدار (3.84) مرة عما كانت عليه في المصل الخام. و بعد تطبيق تقنية كروموتوغرافيا التبادل الأيوني على المحلول الذي تم الحصول عليه بعد عملية الديليزة (الفرز الغشائي) ظهرت لدينا حزمتان كما موضح في الشكل (1)، اذ بلغت الفعالية النوعية للحزمة البروتينية الأولى (A) (U/mg) (2.68) وبحجم روغان من (145-205 مل) هذا يعني ان عدد مرات التنقية تضاعفت بعد عملية التبادل الأيوني بمقدار (10.30) مرة أما الحزمة الثانية (B) فأظهرت فعالية نوعية اقل من الحزمة الأولى (A) اذ بلغت (1.38 U/mg) و بحجم روغان من (215-260 مل) اما عدد مرات التنقية فازداد بمقدار (5.38) مرة) عما هو عليه في المصل الخام.

الجدول 1: خلاصة نتائج مراحل تنقية انزيم اللايبواوكسيجيناز من مصل دم مريض بالربو القصبي

خطوات التنقية	الحجم (ml)	الفعالية الكلية (*U)	البروتين الكلي (mg)	الفعالية النوعية ** (U/mg)	الاستعادة %	عدد مرات التنقية
مصل الدم	21	2.43	9.23	0.26	—	1
بعد الترسيب	18	2.89	6.23	0.46	118.93	1.76
بعد الدليزة	17	3.23	3.2	1.00	132.92	3.84
التبادل الأيوني: الحزمة A	65	4.75	1.77	2.68	195.47	10.30
الحزمة B	45	1.43	1.08	1.38	58.85	5.38

\* (U) : هي كمية الانزيم التي تعمل على تحرير مايكرومول واحد من حامض اللينوليك في الدقيقة الواحدة.

\*\* الفعالية النوعية : هي عدد وحدات الانزيم الموجودة في واحد ملغم من البروتين.

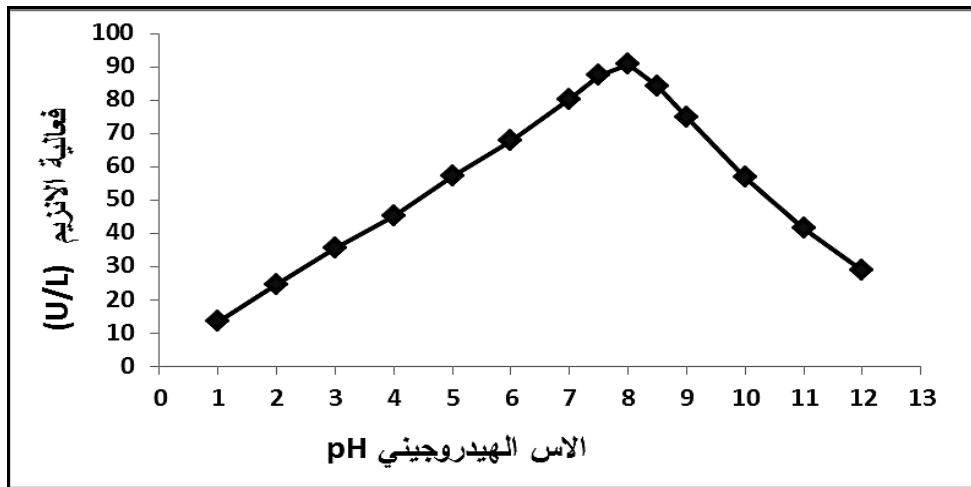


الشكل 1: المظهر الجانبي لروغان انزيم اللايبواوكسيجينيز المنقى جزئياً من مصال الدم بتقنية كروماتوغرافيا التبادل الأيوني حيث ان (A) و (B) تمثل الحزم البروتينية

## 2. تحديد الظروف المثلى لعمل انزيم اللايبواوكسيجينيز

### تأثير الدالة الحامضية على فعالية انزيم اللايبواوكسيجينيز:

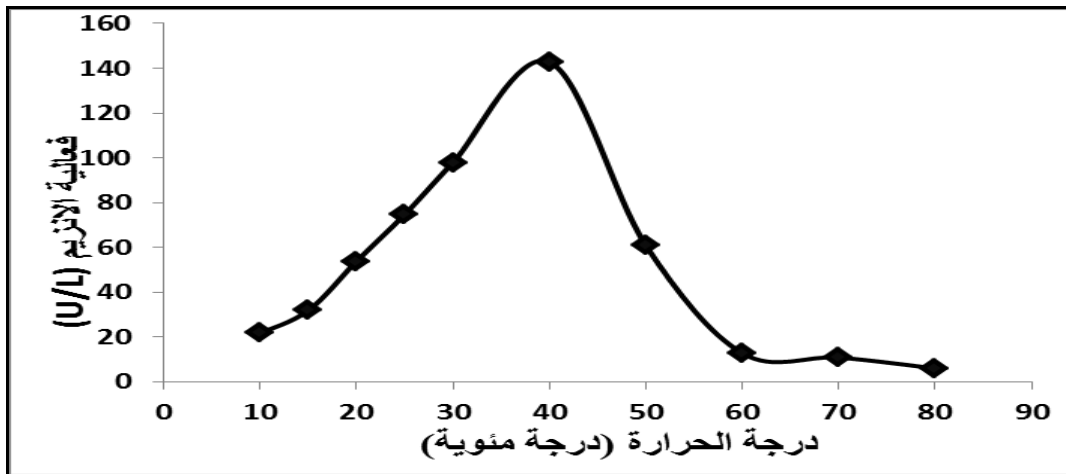
قيست فعالية الانزيم باستخدام عدة قيم مختلفة للدالة الحامضية التابعة لمحلول بورات الصوديوم المستخدمة في قياس فعالية انزيم اللايبواوكسيجينيز عند 234 نانومتر الأساس، و لوحظ بان أقصى فعالية للأنزيم المنقى ظهرت عندما تكون (pH 8) و كما موضح في الشكل (2)، حيث إن كل انزيم لديه pH معينة يظهر عندها أعلى فعالية كما أشار الباحثين Lagarde *et al.*, (1984) ان الدالة الحامضية المثلى لإنزيم LOX المعزول من الصفائح الدموية للإنسان هي 7، اما الانزيم المعزول من نسيج الكبيبة الكلوية للإنسان أظهر أعلى فعالية عند pH9 و للجرذان فبلغ pH7.5 (Sraer, 1983) كذلك ظهرت أعلى فعالية للأنزيم المعزول من متحلل خلايا الدم عند pH 8 (Rashed and Mahmood, 2013).



الشكل 2: تأثير الاس الهيدروجيني على فعالية انزيم اللابيوواوكسيجينيز المنقى جزئيا من مصد الدم

#### تأثير درجة الحرارة على فعالية الانزيم:

قيست فعالية الإنزيم عند درجات حرارية مختلفة و ظهر بأن الدرجة الحرارية المثلى التي يعمل فيها الإنزيم بأقصى فعالية كانت عند الدرجة (40 °م) و بعد هذه الدرجة انخفضت الفعالية بسبب اضمحلال الأواصر الهيدروجينية و القوى الأخرى المسؤولة عن الفعالية الحيوية و التركيب الفراغي للإنزيم وبالتالي مسخ جزئيه الانزيم (Robyrto and White, 1987) و هذه النتيجة تتفق مع ما توصل اليه كل من الباحثين (محيسن و آخرون، 2008) للإنزيم LOX المفصول من الفول السوداني و الباحثين (Robyrto *et al.*, 1999) لإنزيم LOX المفصول من دقيق القمح وكما موضح في الشكل (3).

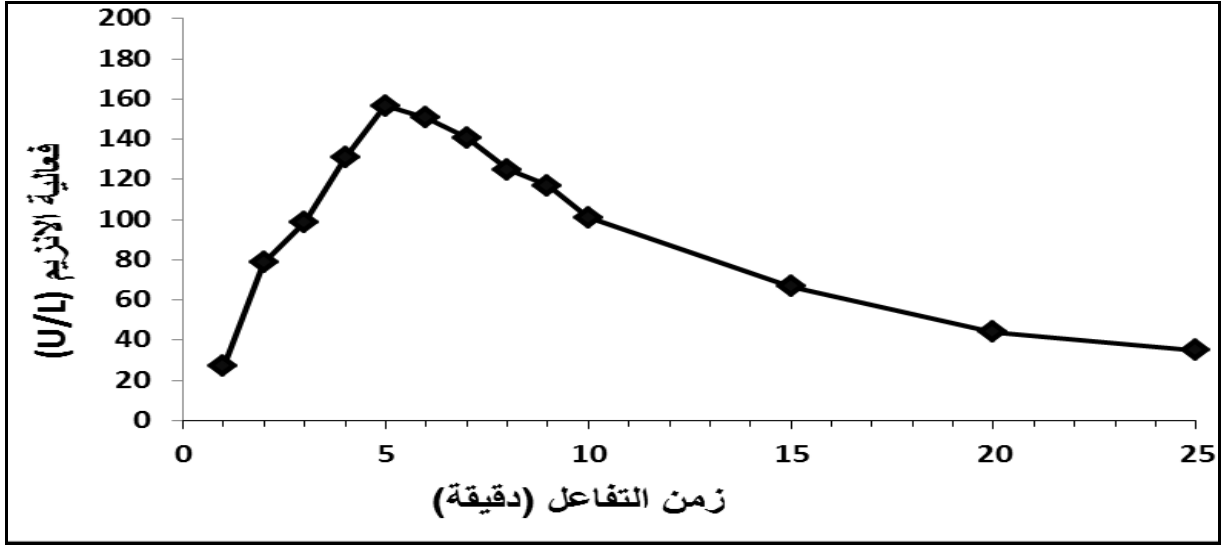


الشكل 3: تأثير درجة الحرارة على فعالية انزيم اللابيوواوكسيجينيز المنقى جزئيا من مصد الدم

#### تأثير زمن التفاعل على فعالية انزيم اللابيوواوكسيجينيز:

تم قياس فعالية الإنزيم بأوقات مختلفة من بدء التفاعل وأظهرت النتائج بأن أفضل فعالية للإنزيم ظهرت عند الدقيقة الخامسة بعد بدء التفاعل وكما موضح في الشكل (4) و بعد الدقيقة الخامسة تبدأ الفعالية بالانخفاض ثم تثبت إلى حد معين.

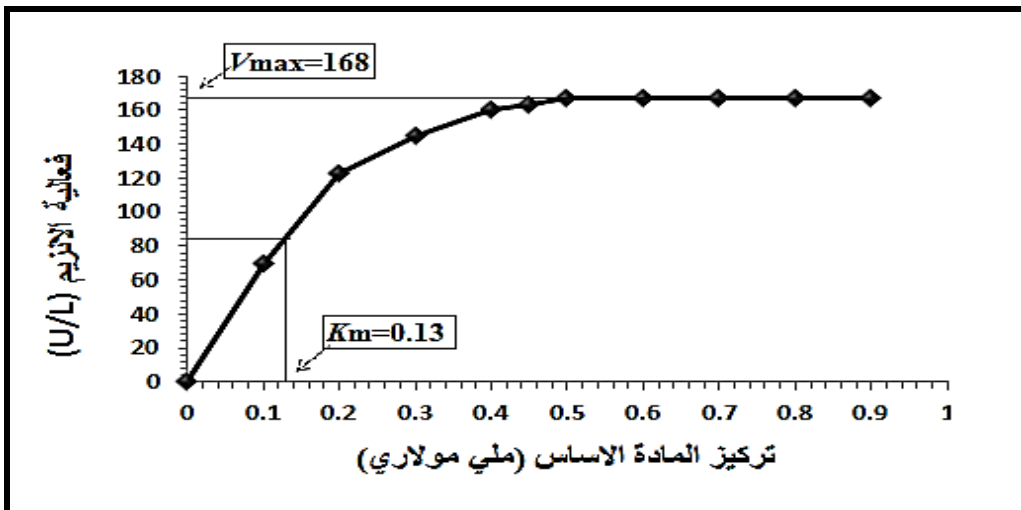




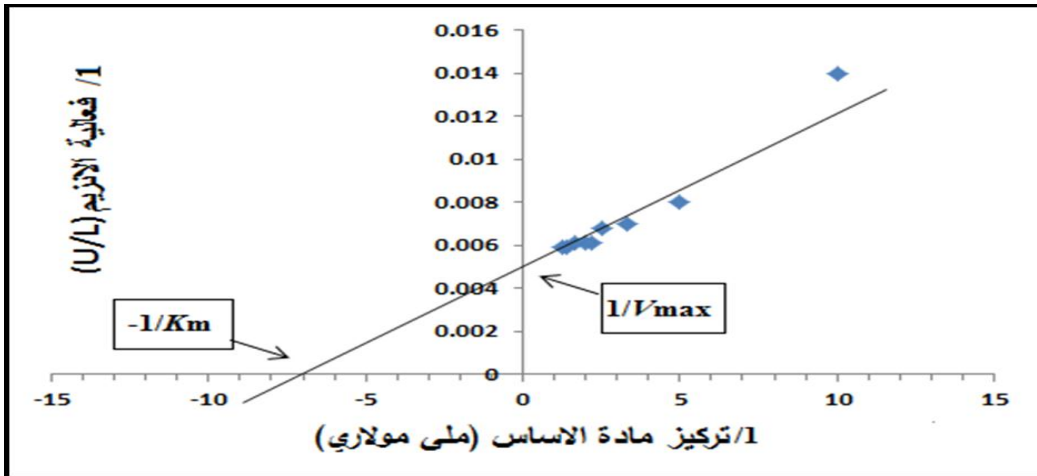
الشكل 4: تأثير زمن التفاعل على فعالية انزيم اللايبواوكسيجينيز المنقى جزئيا من مصلى الدم

#### تأثير تركيز المادة الأساس على فعالية الإنزيم:

قيست فعالية الانزيم باستخدام تراكيز مختلفة من المادة الأساس تتراوح بين (0.1 - 1 ملي مولاري)، و بينت النتائج بأن الفعالية الانزيمية تزداد إلى أن تصبح قيمة ثابتة عند التركيز (0.5 ملي مولاري) بسبب تشبع الموقع الفعال للإنزيم بالمادة الأساس حامض اللينوليك، و باستخدام مخطط لاينويفر-بيرك ظهرت قيمة السرعة القصوى ( $V_{max}$ ) عند (168 وحدة / لتر) اما قيمة  $K_m$  لمعادلة ميكليس - منتن ومعادلة لاينويفر-بيرك فكانت (0.13) و (0.14) ملي مولاري على التوالي وكما موضح في الشكلين (5,6)، هذا يعني ان للإنزيم الفة عالية للارتباط بمادة الأساس حامض اللينوليك، حيث أن قيمة  $K_m$  للإنزيمات عادة ما تكون قيمتها بين (100 - 0.1) ملي مولاري (آل فليج، 2000).



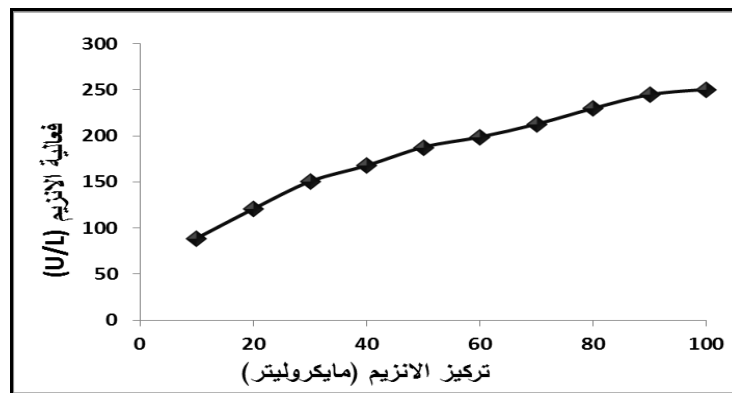
الشكل 5: تأثير تركيز مادة الأساس على فعالية انزيم اللايبواوكسيجينيز المنقى جزئيا من مصلى الدم



الشكل 6: رسم لاينويفر - بيرك لتوضيح قيمة ثابت ميكليس - منتن والسرعة القصوى لإنزيم اللايبواوكسيجينيز المنقى جزئيا من مصلى الدم

#### تأثير تركيز الانزيم على فعالية LOX:

قيست فعالية الانزيم باستخدام تراكيز مختلفة من الانزيم تراوحت بين (10 - 100 مايكروليتر) من محلول الحزمة المفصولة A و وجد بأن فعالية الانزيم تزداد بازدياد التركيز كما موضح في الشكل (7) و هذا يتفق مع ان سرعة التفاعل المحفز بالإنزيم تتناسب طرديا مع تركيز الإنزيم عندما تكون مادة الأساس بوفرة في المحيط بثبوت العوامل الأخرى (أل فليج، 2000 ; Murray et al., 2012).

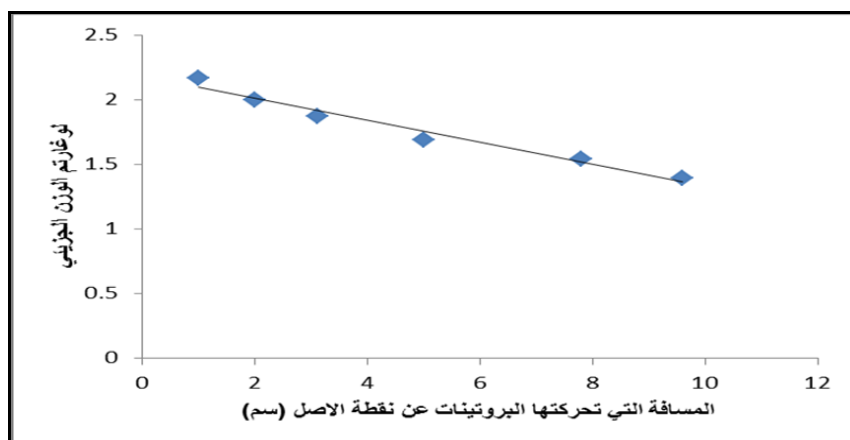


الشكل 7: تأثير تركيز الانزيم على فعالية انزيم اللايبواوكسيجينيز المنقى جزئيا من مصلى الدم

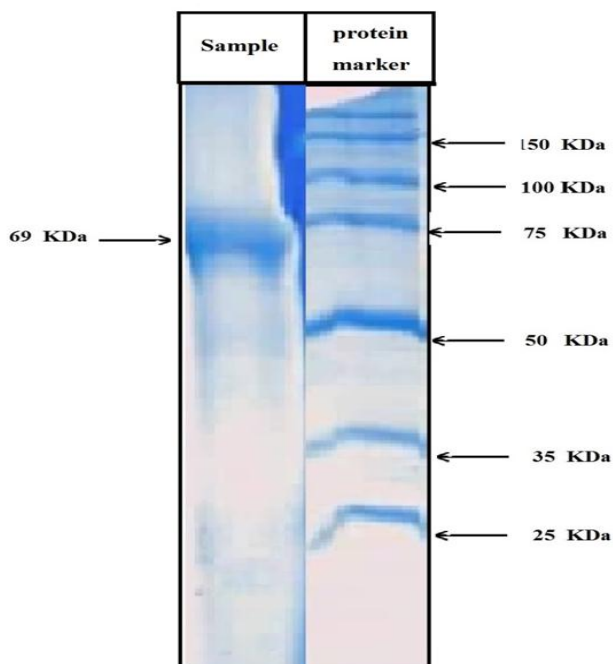
#### 3 . تحديد الوزن الجزيئي لانزيم اللايبواوكسيجينيز المنقى جزئيا من مصلى الدم بتقنية الهجرة الكهربائية (Electrophoresis) باستخدام PAGE-SDS:

حسبت المسافة التي قطعتها البروتينات (protein marker) نحو القطب الموجب و التي وجدت حزمة بروتينية مميزة على بعد (3.2) سم من نقطة الأصل تابعة للانزيم و كما مبين في الشكل (9) و اعتمدت هذا المسافة في تقدير الوزن الجزيئي التقريبي للانزيم والمساوي الى (69000 دالتون) تقريبا وذلك بالاستفادة من المنحنى القياسي المبين في الشكل (8). هذه النتيجة قريبة على ما جاء به الباحثون (Shibata and Axelrod, 1995 ; Brash, 1999) بان الوزن الجزيئي لانزيم اللايبواوكسيجينيز LOX في الثدييات يبلغ (75-81) كيلو دالتون اما في النباتات فيتراوح الوزن الجزيئي للانزيم بين (94 - 110) كيلو دالتون و بينت دراسات سابقة

بأن الوزن الجزيئي لإنزيم LOX المعزول من حبوب الأرز بتقنية الهجرة الكهربائية تقريبا حوالي (93000 دالتون) (Hiroyuki *et al.*, 1986) اما الانزيم المعزول من فطر المحار *Plerwotus Sapidus* فبلغ وزنه الجزيئي (72500 دالتون) (Plagemann *et al.*, 2014).



الشكل 8: المنحنى القياسي لتعيين الوزن الجزيئي التقريبي بتقنية الهجرة الكهربائية Electrophoresis باستخدام PAGE-SDS

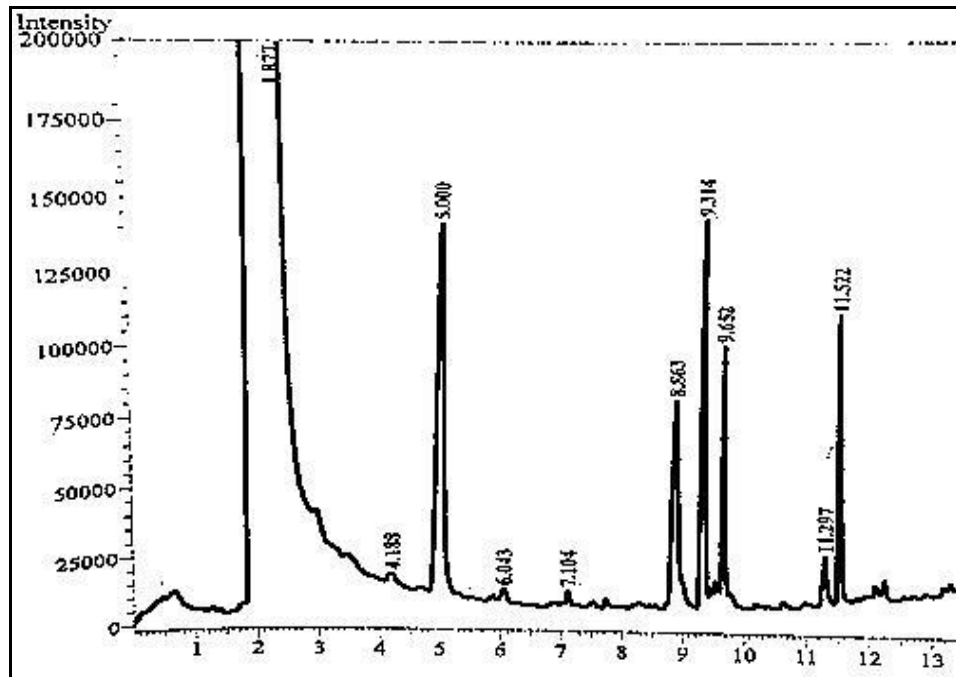


الشكل 9: صور الهجرة الكهربائية الحاوية على PAGE-SDS

#### 4. تشخيص النواتج الطبيعية لنبات ذنب الخيل

##### تشخيص الزيوت:

أظهرت نتائج تحليل الأحماض الدهنية ضمن الزيوت المعزولة من نبات ذنب الخيل بتقنية كروماتوغرافيا الغاز - سائل (GC) بوجود العديد من القمم، و كما موضح في الشكل (10).



الشكل 10: كروماتوغرام GC للزيوت المعزولة من نبات ذنب الخيل

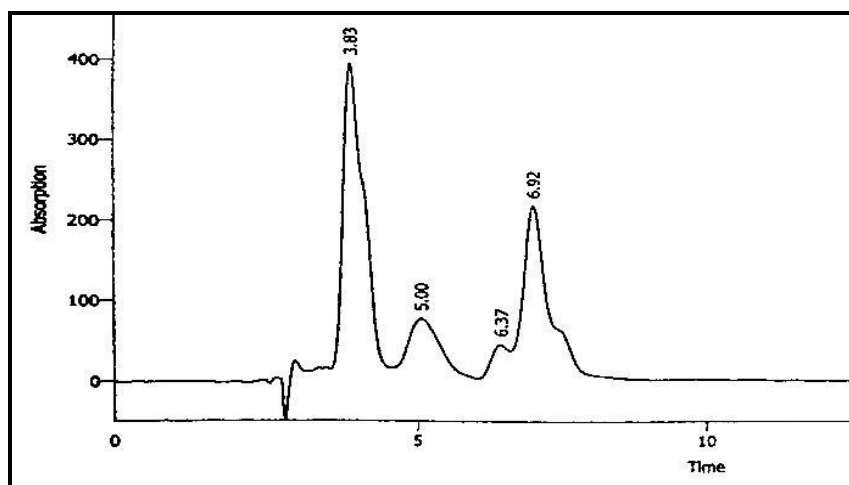
و من خلال مقارنة زمن الاحتجاز (Rt) للقمم الناتجة مع زمن الاحتجاز (Rt) التابع لكروماتوغرام GC، تبين انه تم تشخيص اثنتين من القمم و هي تابعة لـ (حامض اللوريك Lauric و حامض اللوريك Undecanoic) وكما تم توضيحه في (الجدول 2) اما القمم الأخرى فلم يتم تشخيصها.

الجدول 2: قيم زمن الاحتجاز لكروماتوغرام ناتج الزيوت ومقارنتها مع الكروماتوغرام القياسي لنبات ذنب الخيل

القمم	زمن الاحتجاز (Rt)	زمن الاحتجاز القريب منه	تشخيص القمم
1	6.043	6.47	Undecanoic acid
2	11.297	10.81	Lauric acid

#### تشخيص الفلافونويدات:

أظهرت نتائج تحليل الفلافونويدات المعزولة من نبات ذنب الخيل بتقنية كروماتوغرافيا السائل العالي الأداء HPLC، وجود أربع قمم كما موضح في الشكل (11).



الشكل 11: الكروماتوغرام الخاص بناتج الفلافونويدات المعزولة من نبات ذنب الخيل

اذ تم تشخيص هذه القمم عن طريق المقارنة بين زمن الاحتجاز (Rt) للقمم العائدة للفلافونويدات المعزولة من النبات مع زمن الاحتجاز (Rt) للكروماتوغرام القياسي و كانت نتيجة المقارنة كما موضح في (الجدول 3) بان نبات ذنب الخيل يحتوي على الكاتشين Catechine، كيورستين Qurectine، حامض الفيروليك Ferulic acid و روتين Rutin و هذا يتفق مع جاء به الباحثون (Pallag *et al.*, 2016) بان نبات ذنب الخيل غني بالفلافونويدات والاحماض الفينولية.

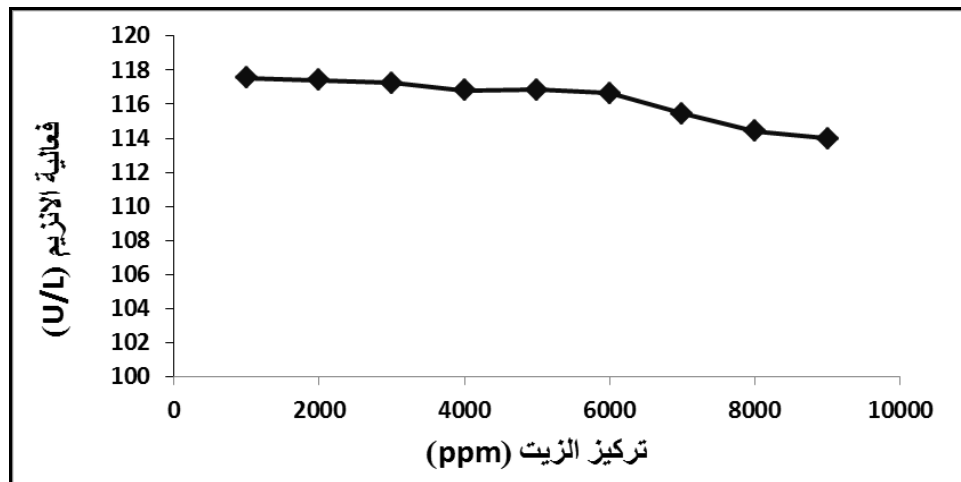
الجدول 3: قيم زمن الاحتجاز لكروماتوغرام ناتج الفلافونويدات ومقارنتها مع الكروماتوغرام القياسي لنبات ذنب الخيل

القمم	زمن الاحتجاز (Rt)	زمن الاحتجاز القريب منه	تشخيص القمم
1	3.83	4.12	Catechine
2	6.37	6.56	Qurectine
3	5.0	5.18	Ferulic acid
4	6.92	7.25	Rutin

##### 5. دراسة تأثير النواتج الطبيعية على فعالية انزيم LOX المنقى جزئياً من مصلى الدم

###### تأثير الناتج الزيتي:

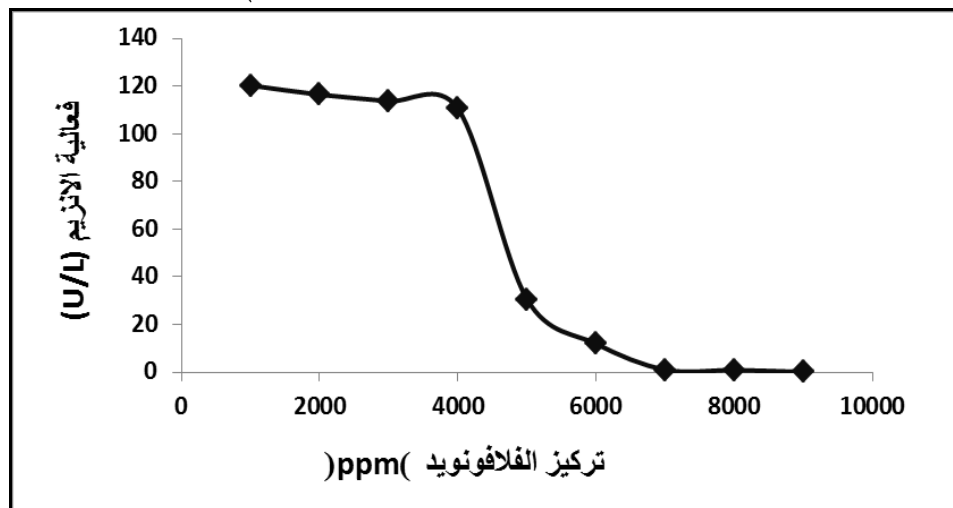
أظهرت النتائج ان الناتج الزيتي المعزول من نبات ذنب الخيل قلل من فعالية الانزيم كما في الشكل (12)، اذ تزداد نسبة تثبيط الانزيم مع زيادة تركيز الزيت كما موضح في (الجدول 4)، حيث أن النبات يحتوي على حامض الاندوكانويك و حامض اللوريك والتي أشار إليها الباحثون (Vijayendar *et al.*, 2016) بأنها أحماض لها العديد من الأنشطة البيولوجية كالمضادات الحيوية و مضادات الجراثيم حيث يظهر حامض الانديكانويك نشاطاً مضاداً للفيروسات ومضاد أكسده والتي لها القابلية على التقليل من الالتهاب وتقليل تكوين الليكوترينات الناتجة من مسار انزيم اللابيوواوكسيجينيز .



الشكل 12: تأثير الناتج الزيتي لنبات ذنب الخيل على فعالية LOX المنقى جزئيا من مصد الدم

#### تأثير الفلافونويد:

أظهرت النتائج ان الفلافونويدات ادت الى تقليل فعالية الإنزيم أكثر من الزيوت والصابونين كما موضح في الشكل (13) و (الجدول 4) حيث تزداد نسبة التثبيط مع زيادة تركيز الفلافونويد الى ان يصبح التثبيط كلي عند التركيز (7000 ppm) و هذا يتفق مع ما جاء به الباحث (Dukic, 2008) بان المستخلصات الكحولية (الفلافونويدات والاحماض الفينولية) تمتلك نشاطا عالٍ جدا ضد الجذور الحرة و إزالتها مع تثبيط انزيم اللايبواكسيجيناز مما يقلل من أعراض الربو عن طريق تقليل الالتهاب و ارتخاء العضلات الملساء. بالإضافة إلى أن الكاتشين متعدد الفينول و الكيورستين و الروتين فهذا النوع من المركبات يمتلك ألفة للتأصر الهيدروجيني مع البروتينات مما يؤدي إلى تغيير في الترتيب الفراغي للبروتين وبالتالي يفقد فعاليته الحيوية و عليه سيظهر نشاط عالي لتثبيط انزيم اللايبواكسيجيناز ولهذا تدخل في تركيب العديد من الأدوية المثبطة لهذا الانزيم من اجل تقليل الالتهاب antilipoxygenase activity (Borbulevych *et al.*, 2004 ; AL-Abbasy and Al-Joraisi, 2013).

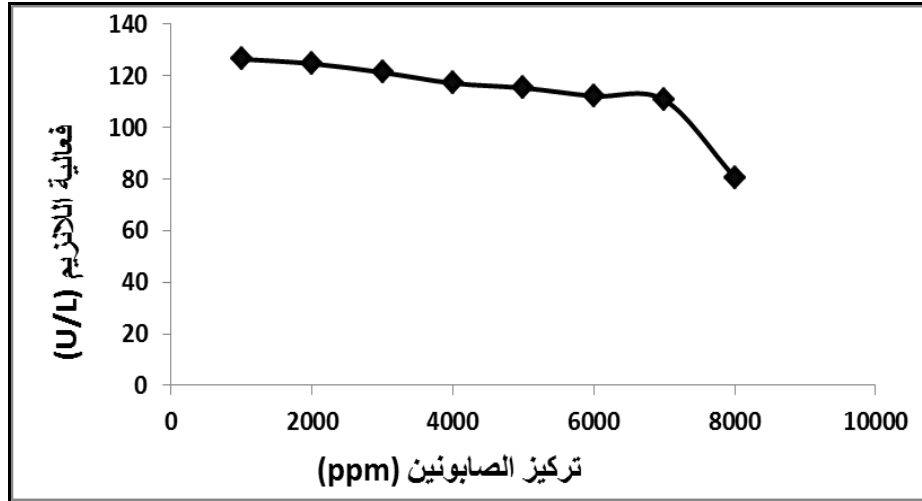


الشكل 13: العلاقة بين التراكيز المختلفة للفلافونويدات و فعالية إنزيم LOX المنقى جزئيا من مصد الدم

#### تأثير الصابونين:

أظهرت النتائج ان زيادة تركيز الصابونين يقلل من فعالية انزيم LOX كما في الشكل (14)، اذ انه عند التراكيز العالية حوالي (9000 ppm) تكون نسبة التثبيط أكثر مما عليه في الزيوت و اقل من الفلافونويدات و كما موضح في (الجدول 4) حيث يحتوي

الصابونين على مركبات مضادة للالتهاب تقلل من النشاط المفرط لجهاز المناعة لدى مرضى الحساسية و الربو (Rhen and Cidlowski, 2005 ; Agnihorti *et al.*, 2010).



الشكل 14: العلاقة بين التراكيز المختلفة للصابونين و فعالية انزيم LOX المنقى جزئيا من مصلى الدم

الجدول 4: تأثير النواتج الطبيعية على فعالية انزيم LOX المنقى جزئيا من مصلى الدم

النواتج الطبيعية	التركيز ppm	الفعالية (U/L)	نسبة التنشيط % *
oils	1000	117.536	7.48
	2000	117.412	7.54
	3000	117.24	7.68
	4000	116.805	8.02
	5000	116.845	7.99
	6000	116.652	8.14
	7000	115.451	9.09
	8000	114.422	9.90
	9000	114.078	10.17
Flavonoids	1000	117.78	5.3
	2000	116.43	8.32
	3000	113.69	10.48
	4000	110.56	12.95
	5000	30.565	76.37
	6000	11.88	90.7
	7000	11.01	99.2
	8000	0.88	99.3
	9000	.50	99.99
Saponin	1000	126.4	0.78
	2000	124.65	1.85
	3000	121.23	4.54
	4000	117.08	7.81
	5000	115.23	9.26
	6000	112.08	11.74
	7000	0.568	36.56
	8000	67.62	46.75
	9000	50.01	60.62

$$* \% = \frac{\text{فعالية الانزيم قبل التنشيط} - \text{فعالية الانزيم بعد التنشيط}}{\text{فعالية الانزيم قبل التنشيط}} * 100$$

علما انه قيمة الفعالية القياسية للإنزيم هي (127 U/L)

#### المصادر العربية

محيسن، ابتسام كريم؛ يحيى، أياد نافع؛ الأعرجي، سند باقر (2008). توصيف أنزيم اللابياؤوكسيجينيز Lipoxygenase المستخلص و المنقى من بذور الفول السوداني. مجلة جامعة دمشق للعلوم السياسية، المجلد 24 ، العدد 2 ، ص 135-162.

آل فليح، خولة احمد (2000). "مدخل الى الكيمياء الحياتية". الطبعة الثانية، دار الكتب للطباعة و النشر، جامعة الموصل. ص 156-159 .

#### المصادر الأجنبية

- Agnihorti, S.; Wakode, S.; Agnihort, A. (2010). An overview on anti-inflammatory properties and chemo-profiles of plant used in traditional medicine. *Indian J. Nat. Pro. Resour.*, **1**(2), 150-167.
- Al-Joraisi, A.A.; AL-Abbasy, O.Y. (2013). Separation of Lipase from Karnel of Pistacia khinjuke and determination of it's affinity toward some inhibitors in mice In vivo and In vitro. *Raf. J. Sci.*, **24**(3), 54-74.
- Al-Snafi, A.E. (2017). The pharmacology of equisetum arvense- a review. *IOSR J. Pharmacy.*, **7**(2), 31-42.
- Bacchus, R.; Kilshaw, B.H.; Madkour, M.; Al-Bassam, M.S.; Al-Farha, C.B. (1980). Preliminary student in a reference rang for Saudi Arabian males: (1) serum uric acid. *Saudi Med. J.*, **1**(3), 160-162.
- Bankova, L.G.; Boyce, J.A. (2018). A new spin on mast cells and cysteinyl leukotrienes : leukotriene E4 activates mast cells in vivo. *The J. All. and Imm.*, **142**(4), 1056-1057.
- Befani, O.; Grippa, E.; Saso, L.; Turini, P.; Mondovi, B. (2001). Inhibition of monoamine oxidase by metronidazole. *Inflamm. Res.*, **50**, 136-137.
- Berger, W.; De Chandt, M.T.M.; Cairns, C.B. (2007). Zileuton: clinical implications of 5-Lipoxygenase inhibition in severe airway disease. *International J. Clin. Practice*, **61**, 663-676.
- Berger, A. (1999). Science commentary: what are leukotrienes and how do they work in asthma?. *BMJ.*, **319**(7202). 90.
- Bohm, I.; Speck, U.; Schild, H. (2005). A possible role for cysteinyl-leukotrienes in non-ionic contrast media induced adverse reactions. *Eur. J. Radiol.*, **55**(3), 431-6.
- Borbulevych, O.Y.; Jankun, J.; Selman, S.H.; Skrzypczak- Jankun, E. (2004). Lipoxygenase interactions with natural flavonoid, quercetin, reveal a complex with protocatechuic acid in its X-ray structure at 2.1A resolution. *Proteins: Structure. Function and Genetics*, **54**, 13-19.
- Brash, A.R. (1999). Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J. Biol. Chem.*, **274**(34), 23679-82.
- Bruno, F.; Spziano, G.; Liarulo, A.; Roviezzo, F.; Nabavi, S.M.; Sureda, A.; Filosa, R.; D'Agostina, B. (2018). Recent advances in the search for novel 5-lipoxygenase inhibitors for the treatment of asthma. *Eur. J. Med. Che.*, **153**, 65-72.
- Busse, W.; Kraft, M. (2005). Cysteinyl leukotrienes in allergic inflammation: Strategic target for therapy. *Chest*, **127**, 1312-1326.



- Cobanoglu, B.; Toskala, E.; Ural, A.; Cingi, C. (2013). Role of leukotriene antagonists and antihistamines in the treatment of allergic rhinitis. *Cur. all. and asthma Rep.*, **13**,203–208.
- Dukic, N.M.; Simin, N.; Cvejic, J.; Jovina, E.; Orcic, J.; Bozin, B. (2008). Phenolic compounds in field horsetail (equisetum aevense L.) as natural antioxidant. *Molecules*, **13**(7), 1455-1464.
- Duroudier, N.P.; Tulah, A.S.; Sayers, I. (2009). Leukotriene pathway genetics and pharmacogenetics in allergy. *Allergy*, **64**, 823–839.
- Folco, G.; Murphy, R.C. (2006). Eicosanoid transcellular biosynthesis: from cell-cell interactions to in vivo tissue responses. *Pharmacol. Rev.*, **58**, 1–14.
- Gautier, C.; Charpin, D. (2017). Environmental triggers and avoidance in the management of asthma. *J. Asthma All.*, **10**, 47-56.
- Gupta, M.; Sasmal, S.; Mukherjee, A.; Majumdar, S. (2012). HPLC profiles standard phenolic compounds present in medicinal plants. *International J. Pharmaco. and Phytochemi. Resrearch.*, **4**(3), 162-167.
- Hiroyuki, O.; Shoji, I.; Bunzo, M.; Yuhei, M. (1986). Purification and characterization of rice lipoxygenase component 3 from embryos. *Agri. Biol. Chem.* **50**(12), 3165-3171.
- Joo, Y-C.; Oh, D-K. (2012). Lipoxygenases: potential starting biocatalysts for the synthesis of signaling compounds. *Bio. Advances*, **30**(6), 1524-1.
- Kaliner, M.; Shelhamer, J.H.; Borson, B.; Nadel, J.; Patow, C.; Marom, Z. (1986). Human respiratory mucus. *The Ame. Rev. Res. Dis.*, **134**, 612–621.
- Kato, H., Li, W., Koike, M.; Koike, K. (2010). Phenolic glycosides from Agrimonia Pilosa. *Phytochem. J. Phytochem.*, **71**(16), 1925-1929.
- Khan, D.A. (2010). Exercise-induced bronchoconstriction: burden and prevalence. *Allergy and Asthma Proceedings.* **33**(1), 1-6.
- Kritasi, S.K.; Sagginp, A.; Cerullp, G.; Spezialp, A.; Caraffa, A.; Antinolfi, P.; Pantalomp, A.; Rosati, M.; Tep, M.; Sagginp, R.; Contp, P. (2014). Asthma and mast cell biology. *Eur. J. Inf.*, **12**(2), 261-265.
- Kuhn, H.; Banthiya, S.; Leyen, K.V. (2015). Mammalian lipoxygenases and their biological relevance. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1851**(4), 308–330.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature.* **227**, 680.
- Lagarde, M.; Croset, M.; Authi, K.S.; Crawford, N. (1984). Sub cellular localization and some properties of lipoxygenase activity in human blood platelets. *Biochemical J.*, **222**(2), 495-500.
- Murray, R.K.; Bender, D.A.; Bothan, K.M.; Kennelly, P.J.; Rodwell, V.W.; Weil, P.A. (2012). "Harbor Illustrated Biochemistry". 30<sup>th</sup> ed., The Mcgraw-hill Companies, China. Chapter 8. pp.192- 209.
- Nireesha, GR., Divya, L.; Sowmya, C.; Venkateshan, N.V.; Niranjana, M.; Lavakumar, V. (2013). Lyophilization/ freeze drying - an review. *I. J. N. TIN. P. S.*, **3**(4), 87-98.
- Pallag, A.; Jurca, T.; Pasca, B.; Sirbu, V.; Honiges, A.; Costuleanu, M. (2016). Analysis of phenolic compounds composition by HPLC and assessment of antioxidant capacity in equisetum arvense. *Rev. Chim.(Bucharest)*, **67**(8),1-5.
- Papi, A.; Kritas, S.K.; Brightling, C.H.; Pedersen, S.E. (2018). Asthma. *The lacent*, **391**(10122), 783 - 800.
- Park, E.Y.; Jeon, H. (2008). Antioxidant and anti-inflammatory activities of equisetum hyemale. *Nat. Pro. Sci.*, **14**(4), 239-243.
- Pathinayake, P.S.; Hsu, A.C.Y.; Waters, D.W.; Hansbro, P.M.; Wood, L.G.; Wark, P.A.B. (2018). Understanding the unfolded protein response in the pathogenesis of asthma. *Front. Immunol.*, **9**, 175.

- Plagemann, I.; Krings, U.; Berger, R.G. (2014). Isolation and characterization of wild-type Lipoxygenase LOXP sa1 from *plurrotus sapidus*. *Z. Naturforsch.* 149-154
- Plummer, T.D. (1978). "An Introduction of Practical Biochemistry". 2<sup>nd</sup> ed., McGraw-Hill Book Co., U.K., pp: 48, 53, 174, 270, 274.1
- Raftis, E.J.; Delday, M.I.; Cowie, P.; McCluskey, S.M.; Singh, M.D.; Ettore, A.; Mulder, I.E. (2018). Bifidobacterium breve MRx0004 protects against airway inflammation in a severe asthma model by suppressing both neutrophil and eosinophil lung infiltration. *Sci. Rep.*, **8**, 12024 .
- Rashed, R.N.; Mahmood, A.A. (2013). Separation of Lipoxygenase and estimation of its level in blood of males with cardiovascular disease. *Raf. J. Sci.*, **24**(2), 65-81.
- Rhen, T.; Cidlowski, J.A. (2005). Anti inflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs. *N. Engl. J. Med.*, **353**(16), 1711-23.
- Robeyrto, B.; Raffaella, B.; Saba, D.; Ferdinando, F.; Carlo, V. (1999). Purification and characterization of lipoxygenase of enzyme from durum wheat semolina. *J. Agric. Food Chemistry USA.*, **47**(5), 606-609.
- Robyt, J.F.; White, B.J. (1987). "Biochemical Techniques, Theory and Practice". Wads Worth Inc., Monterey, California, USA., pp. 235-236, 263, 269.
- Sakalar, E.G.; Muluk, N.B.; Kar, M.; Cingi, C. (2017). Aspirin - exacerbated respiratory disease and current treatment modalities. *Eur. Arch. Oto-Rhino.*, **274**(3), 1291-1300.
- Savari, S.K.; Vinnakota, Y.; Zhang, A.S. (2014). Cysteinyl leukotrienes and their receptors: bridging inflammation and colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.*, **20**(4), 968-977.
- Sayyar, S., Abidin, Z. Z.; Yunus, R. (2013). Optimization of solid liquid extraction of jatropha oil using petroleum ether. *Asia-Pacific J. Chem. Eng.*, **8**, 331–338.
- Schacterle, G.R.; Pollack, R.L. (1973). A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biological material. *Anal. Biochem.*, **51**, 654-655
- Sezgin, A.E.; Artk. (2010). Determination of saponin content in Turkish tahini halvah by using HPLC. *Adv. J. Food Sci. Technol.*, **2**(2), 109-115.
- Shastri, B.S.; Rao, M.A.R. (1975). Studies on lipoxygenase from rice bran. *Cereal Chem.*, **52**(5), 597-603.
- Shibata, D.; Axelrod, B. (1995). Plant lipoxygenases. *J. Lipid Mediat. Cell Signal.*, **12**, 213-28.
- Singh, R.K.; Tandon, R.; Dastidar, S.G.; Ray, A.A. (2013). Review on leukotrienes and their receptors with reference to asthma. *The J. Asthma: Official J. the Association for the Care of Asthma*, **50**, 922–931.
- Sraer, J.; Rigaud, M.; Bens, M.; Rabinovitch, H.; Ardaillou, R. (1983). Metabolism of arachidonic acid via the lipoxygenase pathway in human and murine glomeruli. *J. Biol. Chem. USA.*, **258**(7) , 4325-4330.
- Vijayendar, V.; Prasad, R.B.N.; Poornachandra, Y.; Kumar, C.G.; Kaki, S.S.; Jala, R.CH.R. (2016). Synthesis, antimicrobial, biofilm inhibition and antioxidant activities of some novel undecenoic acid-based substituted benzaldehyde oxime ester derivatives. *Indo American J. Pharmaceut. Research*, 2231-6876.
- Voet, D.; Voet, J.G. (1990). "Biochemistry". John Wiley and Sons, New York. 1223 p.
- Werz, O. (2002). 5-lipoxygenase: cellular biology and molecular pharmacology. *Cur. Drug Targets Inflamm. All.*, **1**(1), 23-44.
- Wilson, S.S.; Guillan, R.A.; Hocker, E.V. (1972). Studies of the stability of 18 chemical constituents of human serum. *Clin. Chem.*, **18**(12), 1498-1503
- Wisastra, R.; Dekker, F.J. (2014). Inflammation, cancer and oxidative lipoxygenase activity are intimately linked. *Cancers*, **6**, 1500-1521.