تنقية جزئية ودراسة حركية انزيم الدوز ريدكتيز في متحلل خلايا الدم لفئران مصابة بالتصلب العصيدي المستحث والتأثير التثبيطي لبعض مركبات الايزوفلافون.

ايمان سعيد الجوكا و ناهدة سعيد الجلبي

كلية التربية / قسم الكيمياء جامعة الموصل

ABSTRACT

The reseach includes isolation and study some kinetic characteristics of aldose reductase (AR_2) from blood cells hemolysate for mice–induced atherosclerosis and normal mice. Two peaks of protein were isolated using ion exchang (DEAE Cellulose) chromatography . The specific activities of AR_2 enzyme for these peaks were determined for normal and induced- atherosclerosis mice . The results showed 0.77 and 0.3 unit/mg protein for the two peaks of normal mice and 4.17 and 1.62 unit/mg protein for the two peaks induced- atherosclerosis mice. Peak I for AR_2 appeared to be a high specific activity .The optimum conditions for peak I of the partial purified AR_2 of blood cells hemolysate activity for induced- atherosclerosis mice were obtained and the results as follows : using (14 mmol /L) of glucose as a substrate , using phosphate sodiume buffer at (6.8 pH) , an optimum reaction time at (10) minutes at (25°C) with volume of enzyme extract (200µL), a concentration of 10 mM of some positive ions which were indicat that manganes ions have the lowest inhibition effect for AR_2 .

Using LineWeaver-Burk plot , the values of maximum velocity (V_{max}) and Michael 's-Menton constant (K_m) were 2U/ ml and 33.33mmol/ L respectively .

Also inhibitory effect of some isoflavone compounds(Daidzein and Gensitein)were studied on the enzyme activity ,
and their results give different inhibitory ratios for this enzyme, the type of inhibition was obtained noncompetitive in hibition for these compounds.

Key Words: Aldose reductase, Atherosclerosis , Inhibitors

* *Presented at the second conference on Chemistry, University of Mosul, college of Education, 17-18 Novamber-2013.*

الملخص

تضمن البحث عزل ودراسة بعض الصفات الحركية لأنزيم الدوز ريدكتيز AR_2 من متحلل خلايا الدم لفئران مصابة بالتصلب العصيدي وسليمة واجراء المقارنة بينهما . إذ تم فصل قمتين بروتينية I و II بتقنية كروماتوغرافيا التبادل الايوني السالب DEAE Cellulose- وكانت الفعالية النوعية للقمتين I و II لأنزيم AR_2 هي (0.77 ، 0.3) و(4.17، 1.62) (وحدة انزيمية/ ملغم بروتين) للفئران السليمة والمصابةعلى التوالي ، واظهرت القمة الاولى فعالية نوعية عالية للأنزيم .

لقد تم ايجاد الظروف المثالية لفعالية انزيم AR_2 المنقى جزئيا من متحلل خلايا الدم للفئران المصابة بالتصلب العصيدي للقمة الاولى وكانت كالاتي : استخدام الكلوكوز بتركيز (14 ملي مولار) كمادة اساس وأفضل محلول منظم هو فوسفات الصوديوم عند أس هيدروجيني (6.8 pH) ودرجة حرارة (25 م°) بفترة زمنية مقدارها (10) دقيقة وبحجم 200 مايكروليتر للمستخلص الانزيمي ، والايونات الموجبة بتركيز 10ملي مولار كان لها اقل تثبيطا للانزيم مع ايون المنغنيز.

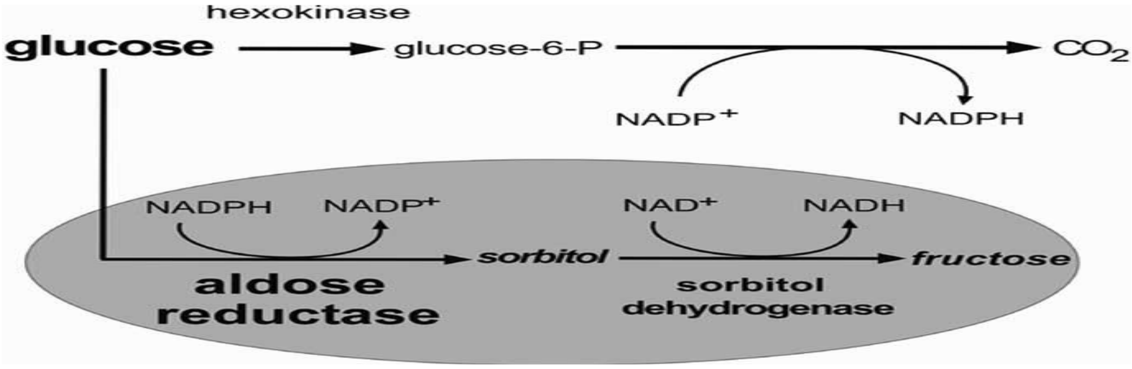
وباستخدام رسم لاينويفر- بيرك تم ايجاد قيمة السرعة القصوى(V_{max}) وثابت ميكيليس ومينتن (K_m) والتي كانت مساوية لـ 2 وحدة انزيمية / مل و33.33 ملي مول / لتر على التوالي . كذلك تمت دراسة التأثير التثبيطي لبعض مركبات الايزوفلافون (ديادزين وجنستين) على فعالية الانزيم المذكور ، اذ لوحظ ان المركبات ديادزين وجنستين اعطت نسبا تثبيطية مختلفة لفعالية الانزيم وكان التثبيط الناتج من النوع غير التنافسي .

الكلمات المفتاحية : الدوز ريدكتيز، التصلب العصيدي ، المثبطات

المقدمة

يعد مرض التصلب العصيدي احد اهم امراض الاوعية الدموية اذ يحدث بسبب تجمع وتراكم المواد الدهنية والتي تتضمن حوالي 70% كوليستيرول , (كوليستيرول البروتين الدهني الواطئ الكثافة المؤكسد ox- LDL-c) ويصاحب ذلك ايضا ترسب الكالسيوم والكاربوهيدرات المعقدة حيث تترسب كل من هذه المواد في الطبقة الداخلية والمتوسطة لجدران الشرايين مسببة زيادة سمك وخشونة الطبقة الداخلية المبطنة لجدران الشرايين , كما ان هذه الترسبات تكون بروزات في تجويف الاوعية الدموية يطلق عليها الصفيحة ، وهذه البروزات تسبب انسداد الاوعية الدموية واعاقة سريان الدم داخل الجزء المصاب من الشرايين , مما يؤدي الى خفض قدرته على التوسع والتقلص وتقل مرونته وبالتالي حدوث مايسمى الخثرة او الجلطة الدموية (Thrombus) (1) , يعتبر هذا المرض من المضاعفات الرئيسية لمرضى داء

السكر(2) . ان ارتفاع سكر الدم الحاد له تأثيرات ضارة على انسجة الاوعية القلبية حيث يعمل على تغيير الاتزان الكيموحيوي لخلايا الاوعية القلبية بوساطة تأثيره على عدد من المسارات الكيموحيوية ومنها مسار بوليول Polyol pathway, يعد انزيم الدوز ريدكتيز المفتاح الرئيسي لمسار البوليول فهو يعمل على اختزال الكلوكوز الى سوربيتول وبوجود المرافق الانزيمي NADPH ويكتمل هذا المسار بوجود انزيم ثاني هو سوربيتول ديهايدروجينيز الذي يحول السوربيتول الى فركتوز بوجود العامل المرافق NAD^+ كما موضح في المعادلة التالية (3) .



ومن المواد الاساس التي يعمل عليها الانزيم وبشكل كفوء في الانسان هي الكلوكوز , حيث ان ارتباط المادة الاساس بالموقع الفعال للانزيم AR_2 يحدث بسبب التجاذب الهيدروفوبي وهو افضل من التاصر الهيدروجيني كما هو الحال في ارتباط اغلب الكاربوهيدرات والبروتينات , فضلا عن الكلوكوز كمادة اساس يبدي AR_2 خصوصية واسعة نحو الديهايدات متنوعة كمادة اساس متضمنا الالديهايدات التي تنشا من ايض كاتيكول امين فضلا عن مواد اساس اخرى وهي2-مثيل بينتانالpentanal 2-Methy , كليسير الديهايد Glyceraldehyde , ريتينود Retinods . وقد وجد ان اعلى الفة للانزيم تكون اتجاه المادة الاساس D- كلوكوز مقارنة ببقية المواد الاساس الاخرى(3) . ويعتقد ان وظيفة انزيم AR_2 هي كمحول وقود يحول الكلوكوز الفائض بعيدا عن مسارات ايض الطاقة , كما انه ربما يؤيض الستيرويدات والكاتيكول امين ويزيل سمية الالديهايدات او مشتقاتها للكلوتاثيون Glutathionylated , كذلك يعمل كانزيم مدافع ضد الاكسدة , كما ان الانزيم من خلال مسار البوليول يجهز سكر الفركتوز الذي يزود الحيامن بالطاقة الضرورية و كذلك يعمل انزيم الدوزريدكيتيز ايضا في اللب الداخلي للكلية على بناء السوربيتول مابين الخلايا وربما يساعد هذا في حماية الخلايا من القوى الازموزية العالية المصاحبة لتناول مضادات التدرر (4).

المواد وطرائق العمل Material and Methods

الحيوانات المستخدمة Animals used

استخدمت في هذه الدراسة اناث الفئران البيض السليمة Femal albino mice المجهزة من كليتي التربية والطب /جامعة الموصل والتي تقاربت اوزانها بين30-35غم ووضعت في اقفاص خاصة معدة ومجهزة لهذا الغرض ، وزودت بالماء والعلف الحيواني الخاص لها باستمرار.

استحداث التصلب العصيدي Induction of atherosclerosis

قسمت الحيوانات الى مجموعتين تضم كل مجموعة 20 فأرة .

1- مجموعة السيطرة تركت تتناول العلف والماء دون معاملة لمدة 60 يوما

2- مجموعة عرضت للتصلب العصيدي بأعطائها بيروكسيد الهيدروجين 1% مع ماء الشرب ولمدة 60 يوما (5) .

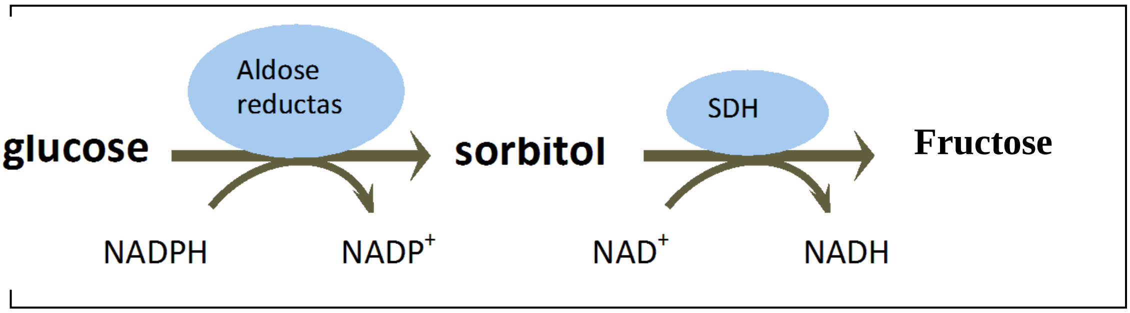
وبعد مرور 60 يوم خدرت الحيوانات بالايثر لبضع ثوانٍ ثم سحب الدم من جيب محجر العين وذلك باستخدام انابيب شعرية خاصة بعد ذلك وضع الدم في انابيب بلاستيكية Plan tube نظيفة وجافة ومعقمة ، بعدها فصل المصل عن الجزء المتخثر من الدم باستعمال جهاز الطرد المركزي بسرعة 1008xg ولمدة 10 دقائق ثم سحب المصل بوساطة الماصة الدقيقة وحفظ المصل الرائق بالمجمدة عند – 18°م. بعد ذلك تم تحضير متحلل خلايا الدم وحسب طريقة الباحث Rapoport وجماعته(6). اذ تم اخذ خلايا الدم المعزولة بعد فصل المصل وتم غسلها ثلاث مرات بمحلول (0.9%) NaCl مع استخدام جهاز الطرد المركزي المبرد بدرجة 4 °م وبسرعة 1008xg لمدة 5 دقائق . بعد ذلك اخذ الراسب المتضمن خلايا الدم بعد الغسل وتم تحلله بأضافة ضعف حجمه ماء مقطر . ثم وضعت الانابيب الحاوية على متحلل الخلايا في المجمدة عند – 18°م ، فصل الرائق المتحلل من خلايا الدم باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد بدرجة 4°م وبسرعة 1008xg لمدة 30 دقيقة ثم اخذ محلول متحلل خلايا الدم وأجريت عليه التجارب اللاحقة مباشرة لاجل فصل انزيم AR_2 ، كما تم تقدير البروتين في متحلل خلايا الدم Blood Cells Hemolysate (BCH) بطريقة لاوري المحورة (7) وباستخدام المنحني القياسي لتقدير البروتينات حيث استخدم البومين مصل البقر بأعتباره مادة قياسية .

بعد الانتهاء من سحب الدم تم قتل الحيوانات واخذ الشريان الابهر ووضع في مادة المثبت وهي الفورمالين المتعادل 10% Neutral formaline ولمدة 72ساعة ، وللتاكد من حدوث التصلب العصيدي تم اخذ مقاطع نسجية من الشريان الابهر وصبغها بصبغة الهيماتوكسيلين والايوسين(8) واتبعت طريقة الحاج (9) في تلوين المقاطع النسجية .

قياس فعالية انزيم الدوز ريديكتيز في متحلل خلايا الدم

تم تقدير فعالية إنزيم AR_2 حسب الطريقة المتبعة من قبل الباحث Jagt وجماعته (10) والتي تعتمد على متابعة النقصان في تركيز NADPH عند طول موجي 340 نانوميتر.

يعمل انزيم AR_2 على تحويل الكلوكوز الى سوربيتول وهي الخطوة الاولى في مسار بوليول



polyol pathway كما موضح في المعادلة الاتية:

محلول العمل Working solution

يتكون هذا المحلول من 1مل من المحلول المنظم صوديوم فوسفات الحاوي على محلول NADPH ومحلول الكلوكوز . والذي يتم تحضيره من محلول صوديوم– فوسفات المنظم بتركيز 0.1 مول/ لتر (pH 7) ، محلول NADPH بتركيز 0.1 ملي مولار، محلول كلوكوز بتركيز 10ملي مولار.

طريقة العمل

اعتمدت طريقة العمل لتقدير فعالية إنزيم الدوز ريدكتيز كما مبين في الجدول الآتي:

	Sample	**Blank**
Blood cells hemolysate	100مايكروليتر	
Distilled water		100مايكروليتر
Working Solution	1 مل	1 مل

رجت المحاليل ثم قرأت الامتصاصية بعد الدقيقة الأولى والدقيقة العاشرة عند طول موجي 340 نانوميتر.

الحسابات Calculations

حسب فعالية إنزيم الدوز ريديكتيز اعتمادا على المعادلة الآتية :

$$\text{Activity of } AR_2\ (\mu mol/L) = \frac{\Delta A \times V_t \times 1000}{E_o \times V_s \times d}$$

ΔA = الفرق في الامتصاصية بين الدقيقة الاولى والدقيقة العاشرة

Vt = الحجم الكلي

E_o = معامل الامتصاص المولاري 6.27 ملي مولار $^{-1}$

d = طول المسار الضوئي 1 سم

Vs = حجم العينة

تنقية انزيم الدوز ريدكتيز من متحلل خلايا الدم

تمت التنقية الجزئية لانزيم الدوز ريدكتيز الموجود في متحلل خلايا الدم للفئران المصابة بالتصلب العصيدي المحدث والسليمة بعد قياس فعالية الانزيم باتباع الخطوات الاتية :

1. الفرز الغشائي (الديلزة) Dialysis : وضع 10مل من متحلل خلايا الدم في كيس الفرز الغشائي ثم سدت النهاية الثانية للكيس باحكام وغطس الكيس في وعاء زجاجي يحوي على محلول الفوسفات المنظم $KH_2PO_4-Na_2HPO_4$ بتركيز 0.1 مول/ لتر عند pH =7 . استمرت العملية لمدة 24 ساعة بدرجة 4°م مع التحريك باستخدام المحرك المغناطيسي وتغيير المحلول المنظم كل ثلاث ساعات تقريبا، ثم قياس فعالية الانزيم وتركيز البروتين للعينة بعد عملية الفرز الغشائي .

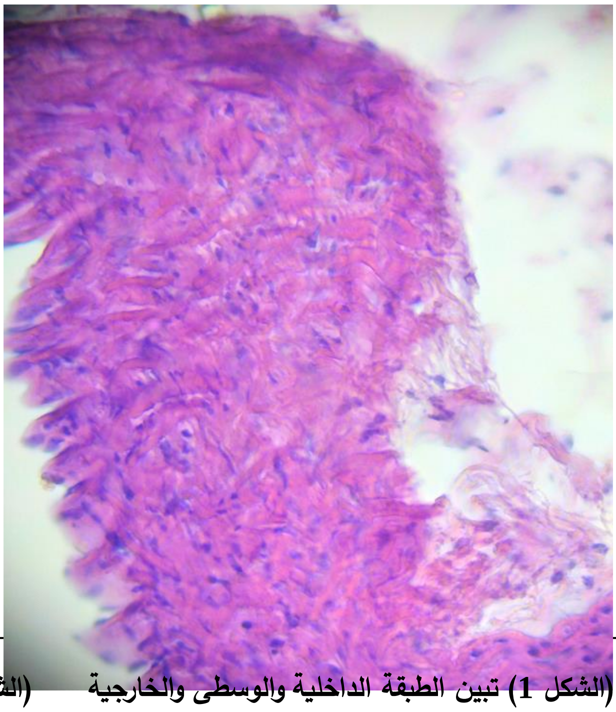
2. كروماتوغرافيا التبادل الأيوني: استخدم المبادل الايوني السالب DEAE- سيليلوز اعتمادا على المصدر (11) لتنقية الانزيم جزئيا وذلك باضافة العينة الناتجة من عملية الفرز الغشائي في اعلى عمود الفصل المستخدم والمعبأ بـ DEAE.- سيليلوز ذا الطول 40 سم والقطر 2.5 سم، واستخدام المحلول المنظم $KH_2PO_4-Na_2HPO_4$ بتركيز 0.1 مول / لتر عند pH =7 لازاحة العينة من عمود الفصل وقد اجريت عملية الفصل عند درجة حرارة 4 م° بمعدل جريان 1.2مل/دقيقة (72 مل/ساعة) وجمعت الاجزاء الناتجة من عملية الفصل يدويا ثم تقدير تركيز البروتين بطريقة لاوري المحورة وبعد الرسم البياني وتحديد القمم البروتينية الناتجة للانزيم جمعت الاجزاء لكل قمة وجفدت القمم المستحصل عليها من عملية الفصل بكروماتوغرافيا التبادل الايوني باستخدام جهاز التجفيد lyophilizer للحصول على مادة جافة للانزيم بشكل مسحوق لاجراء التجارب اللاحقة .

النتائج والمناقشة

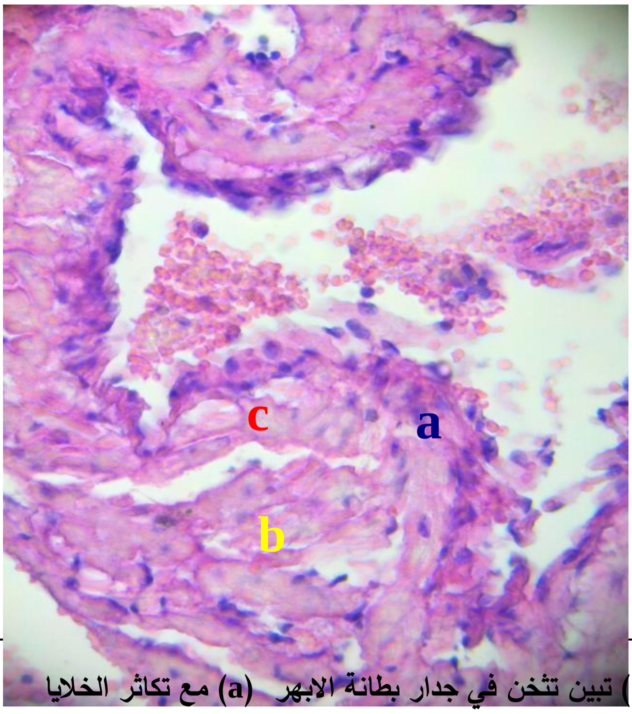
اظهرت المقاطع النسجية لابهر إناث الفئران الناضجة غير المعاملة (السيطرة) وجود ثلاث طبقات لجدار الشريان الابهر تتمثل بالطبقة الداخلية والوسطى والخارجية والخالية من الخلايا الرغوية (الشكل1) ، في حين اظهرت المقاطع النسجية لابهر إناث الفئران المعاملة ببيروكسيد الهيدروجين 1% في ماء الشرب تغيرات مرضية نسجية تمثلت بتثخن في جدار بطانة الابهر مع

تكاثر الخلايا العضلية الملساء الوعائية مع وجود الخلايا الرغوية (الشكل2)، والذي يعد مؤشر لحدوث الاذى في بطانة الوعاء الدموي بفعل الكرب التأكسدي المستحدث ببيروكسيد الهيدروجين الذي يسهم في انتاج بيروكسيدات الدهون اذ تعمل على تغير نفاذية الاغشية الخلوية مسببة الضرر البطاني

من خلال مشاركتها في اكسدة البروتين الدهني الواطئ الكثافة ox- LDL وبالتالي نشوء التصلب العصيدي (12).



(الشكل 1) تبين الطبقة الداخلية والوسطى والخارجية في جدار الابهر لفأرة سليمة والخالية من الخلايا الرغوية



(الشكل 2) تبين تثخن في جدار بطانة الابهر (a) مع تكاثر الخلايا العضلية الملساء الوعائية(b) مع وجود الخلايا الرغوية(c)

خطوات تنقية انزيم AR_2 Aldose reductase purification steps

1. التنقية بوساطة الفرز الغشائي Purification by dialysis

اشارت النتائج الموضحة في الجدولين (1) و (2) ان الفعالية النوعية لانزيم AR_2 في متحلل خلايا الدم للفئران السليمة أصبحت بعد عملية الفرز الغشائي 0.28 وحدة انزيمية / ملغم بروتين أي انها ازدادت بمقدار 2.1 مرة عما كانت عليه قبل عملية الفرز الغشائي حيث كانت 0.133 وحدة انزيمية/ملغم بروتين أي ان مقدار استرجاع الفعالية الكلية للانزيم بلغت 172.6% مقارنة بالفعالية الكلية للانزيم الخام (جدول 1)، وان الفعالية النوعية لانزيم AR_2 في متحلل خلايا الدم للفئران المصابة بالتصلب العصيدي اصبحت بعد عملية الفرز الغشائي 0.944 وحدة انزيمية/ملغم بروتين أي انها ازدادت بمقدار 2.37 مرة عما كانت عليه قبل عملية الفرز الغشائي حيث كانت 0.398 وحدة انزيمية/ملغم بروتين أي ان مقدار استرجاع الفعالية الكلية

للانزيم بلغت 191.78% مقارنة بالفعالية الكلية للانزيم الخام(جدول2) . وان الزيادة في مقدار الفعالية النوعية بعد عملية الديلزة نتج عن النقصان الواضح في تركيز البروتين الكلي بعد عملية الفرز الغشائي وقد يعود السبب الى التخلص من بعض الايونات والمثبطات(13) .

2. التنقية بكروماتوغرافيا التبادل الايوني:

Purification by Ion –Exchange chromatography

اشارت النتائج المبينة في الشكل(3) الى وجود قمتين I ,II (Peak I,II) في متحلل خلايا الدم للفئران السليمة كما موضحة في الجدول (1) ، بفعالية نوعية مقدارها 0.77 ،0.3 وحدة انزيمية / ملغم بروتين على التوالي حيث ازدادت عدد مرات التنقية لهذا الانزيم بمقدار 5.78 ، 2.25 مرة بالنسبة للانزيم الخام على التوالي وبلغت نسبة استرجاع فعالية الانزيم فيها 81.5%،51.87 % على التوالي مقارنة بالفعالية الكلية للانزيم الخام. واشارت النتائج المبينة في الشكل (4) الى وجود قمتين ايضا تمتلكا فعالية كلية لانزيم AR_2 في متحلل خلايا الدم للفئران المصابة بالتصلب العصيدي كما موضحة في الجدول (2) ، وبفعالية نوعية مقدارها 4.17، 1.62 وحدة انزيمية/ملغم بروتين على التوالي أي انها ازدادت بمقدار 10.47 ،4.07 مرة بالنسبة للانزيم الخام على التوالي وبلغت نسبة الاسترجاع 119.58%، 56.98% مقارنة بالفعالية الكلية للانزيم الخام وعلى التوالي ، وهذه النتائج تتفق مع ما اوجده البجاري (14) حيث تم فصل قمتين للأنزيم من مصل دم مرضى داء السكر من النوع الثاني.

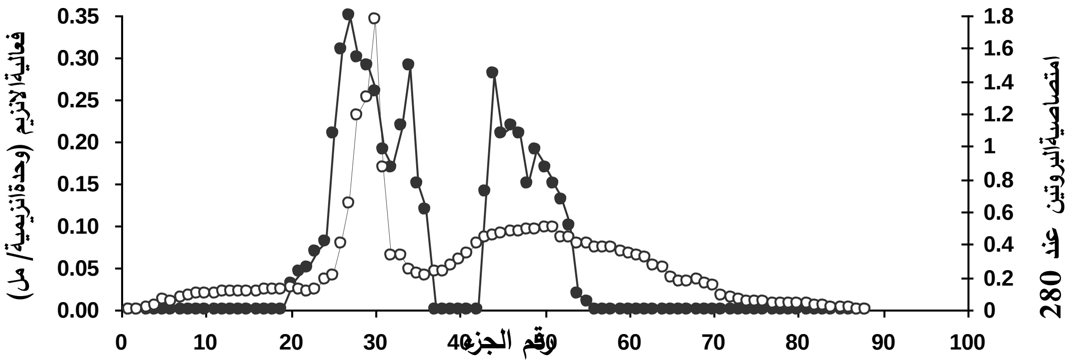
الجدول (1) خطوات تنقية انزيم الدوز ريدكتيز من متحلل خلايا الدم لفئران سليمة غير معاملة.

خطوات التنقية		الحجم الكلي مل	البروتين الكلي ملغم	الفعالية* وحدة انزيمية/ مل	الفعالية الكلية وحدة انزيمية	الفعالية النوعية وحدة انزيمية/ملغم بروتين	عدد مرات التنقية	الاسترجاع للفعالية الكلية%
الانزيم الخام		10	163.7	2.19	21.9	0.133	1	100
الفرز الغشائي Dialysis		9	133.83	4.2	37.8	0.28	2.1	172.6
كروماتوغرافيا التبادل الايونيDEAE سيليلوز	I peak	102	23.1	0.175	17.85	0.77	5.78	81.5
	I I peak	**72**	**37.5**	**0.157**	**11.36**	**0.3**	**2.25**	**51.87**

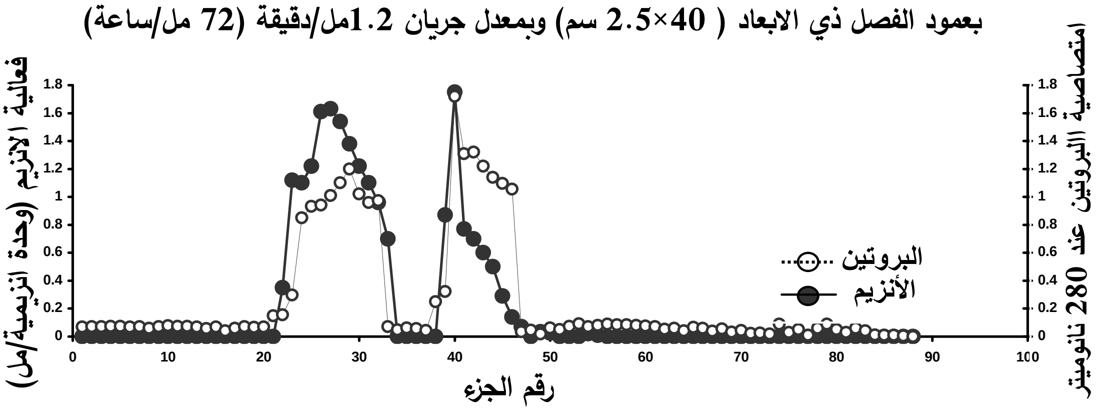
الجدول (2) خطوات تنقية انزيم الدوز ريدكتيز من متحلل خلايا الدم لفئران مصابة بالتصلب العصيدي.

خطوات التنقية		ا لحجم الكلي مل	البروتين الكلي ملغم	الفعالية* وحدة انزيمية/مل	الفعالية الكلية وحدة انزيمية	الفعالية النوعية وحدة انزيمية/ملغم بروتين	عدد مرات التنقية	الاسترجاع للفعالية الكلية %
الانزيم الخام		10	145	5.78	57.8	0.398	1	100
الفرز الغشائي Dialysis		9.3	117.36	11.92	110.85	0.944	2.37	191.78
كروماتوغرافيا التبادل الايونيDEAE سيليلوز	I peak	72	16.56	0.96	69.12	4	10.47	119.58
	I I peak	54	20.25	0.61	32.94	1.62	4.07	56.98

* الوحدة الانزيمية U تشير الى كمية الانزيم الذي يؤكسد ما يكرومول واحد من المادة الاساس في الدقيقة الواحدة .



الشكل 3: نموذج الاسترداد المستحصل من تنقية انزيم AR_2 من متحلل خلايا الدم للفئرا ن السليمة غير المعاملة بـ H_2O_2 بواسطة كروماتوغرافيا التبادل الايوني السالب باستخدام المبادلDEAE– سيليلوز المعبأ بعمود الفصل ذي الابعاد (40×2.5 سم) وبمعدل جريان 1.2مل/دقيقة (72 مل/ساعة)



الشكل 4: نموذج الاسترداد المستحصل من تنقية انزيم AR_2 من متحلل خلايا الدم للفئران المصابة بالتصلب العصيدي المستحدث بـ H_2O_2 بواسطة كروماتوغرافيا التبادل الايوني السالب باستخدام المبادلDEAE– سيليلوز المعبأ بعمود الفصل ذي الابعاد (40×2.5 سم) بمعدل جريان 1.2 مل / دقيقة (72مل/ ساعة)

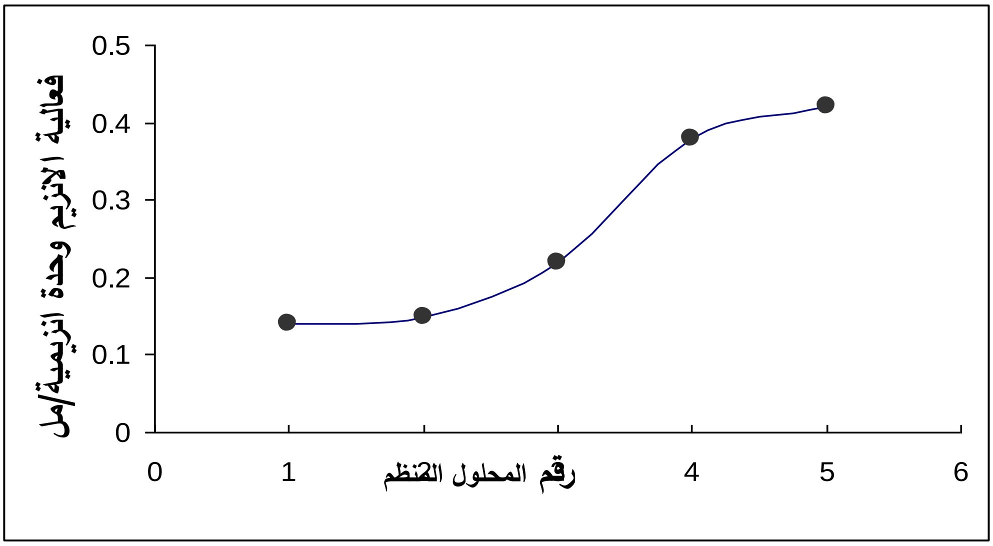
الخصائص الحركية للأنزيم Kinetic properties of the enzyme

تم اخذ المتماثل الاول (peak I) ذات الفعالية النوعية الاعلى لدراسة جميع الخصائص الحركية للانزيم AR_2 ، ثم اتباع الطريقة الموضحة في فقرة طريقة العمل لقياس فعالية الانزيم لجميع الظروف المدروسة ادناه .

عند دراسة تأثير نوع المحلول المنظم على فعالية الانزيم تبين ان افضل فعالية انزيمية تم الحصول عليها للمتماثلI الذي تمت تنقيته من الانزيم AR_2 كانت مع المحلول المنظم Na,Na-phosphate buffer كما موضح في الشكل (5) في حين وجد الباحث (14) ان افضل فعالية له كانت مع وجود المحلول المنظم Tris(HCl)buffer.

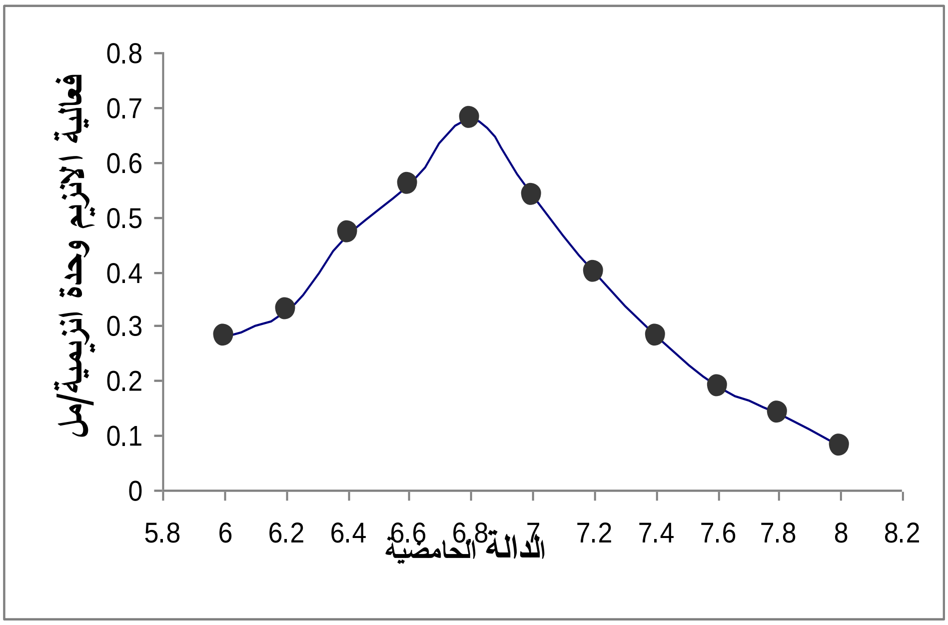
تم استخدام أنواع مختلفة من المحاليل المنظمة التالية عند تركيز (0.1mol/L) وبتثبيت الأس الهيدروجيني عند (pH =7.2)

1. $C_4H_{11}NO_3$-HCl
2. $C_6H_8O_7$-$C_6H_5O_7Na_3$
3. Na_2HCO_3-Na_2CO_3
4. Na_2HPO_4-KH_2PO_4
5. Na_2HPO_4-NaH_2PO_4



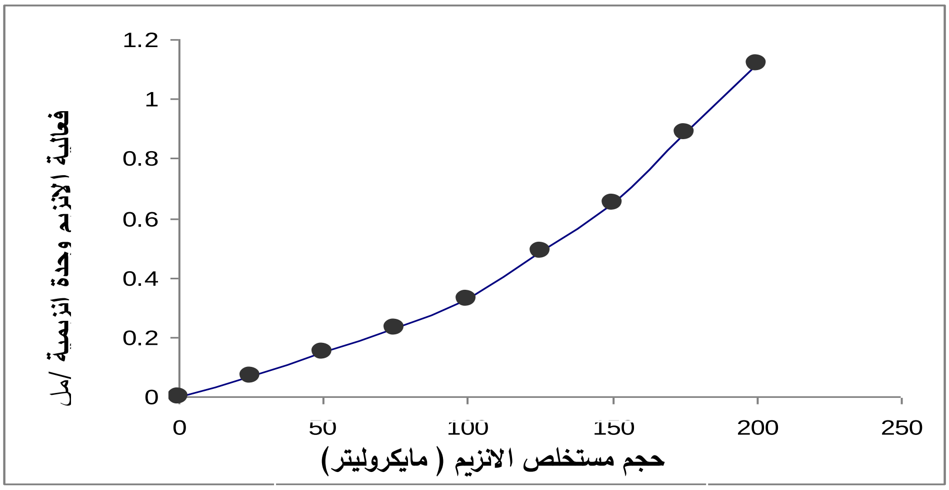
الشكل(5) تأثير المحلول المنظم على فعالية أنزيم AR_2

كما بينت النتائج ان اعلى فعالية تم الحصول عليها عند الدالة الحامضية (pH=6.8) للمحلول المنظم Na,Na-phosphate buffer والموضحة في الشكل(6)، في حين وجد الباحث Hara وجماعته (15) ان الدالة الحامضية المثلى لانزيم AR_2 المنقى من كلى الدجاج كانت pH=6 (ذات حامضية عالية).



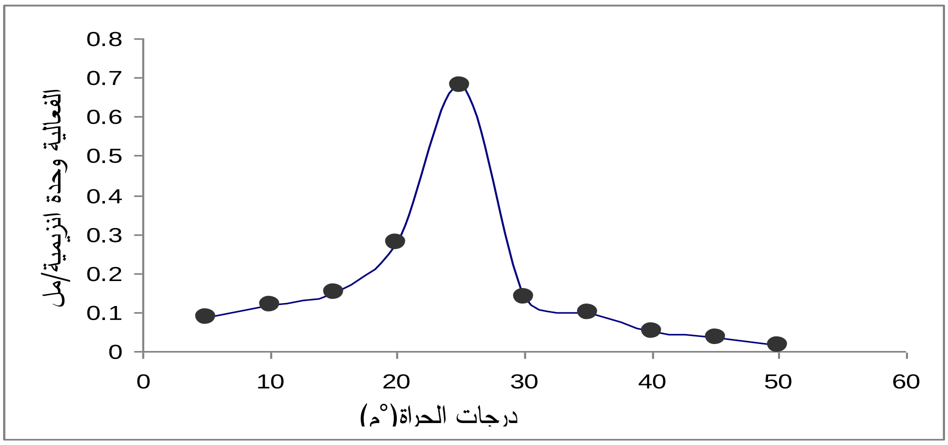
الشكل(6) تأثير الدالة الحامضية على فعالية أنزيم AR_2

كما تم قياس فعالية إنزيم AR_2 بوجود حجوم مختلفة من مستخلص الإنزيم المنقى جزئيا التي تراوحت بين (25–200 مايكروليتر) ويبين الشكل (7) العلاقة بين فعالية الإنزيم وحجوم الإنزيم بثبوت العوامل الأخرى، اذ يلاحظ أن سرعة التفاعل الإنزيمي تزداد بزيادة حجم الإنزيم وبلغت الزيادة اقصاها عند حجم 200 مايكروليتر .



الشكل (7) تأثير حجم

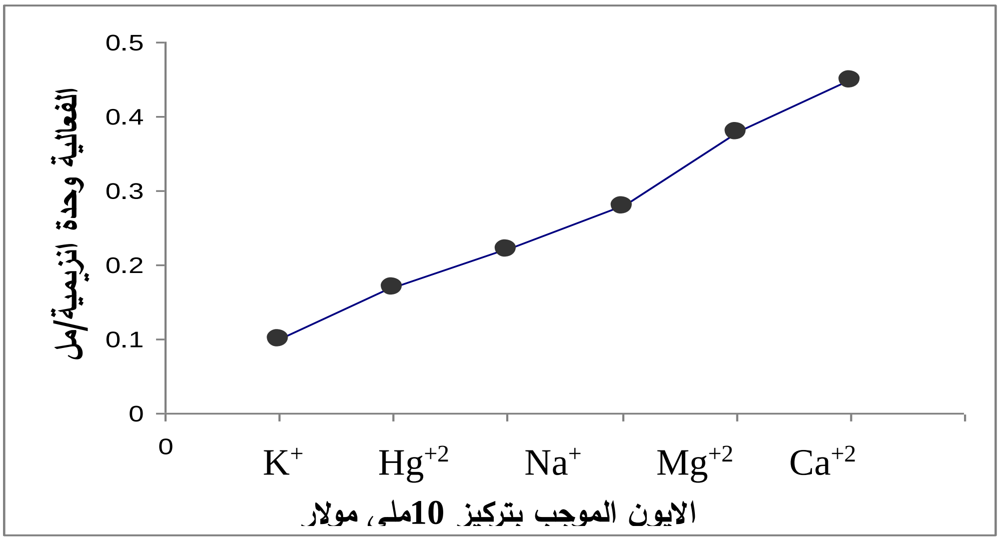
المستخلص الانزيمي على فعالية الانزيمAR_2



الشكل(8) تأثير درجات الحرارة على فعالية أنزيم AR_2

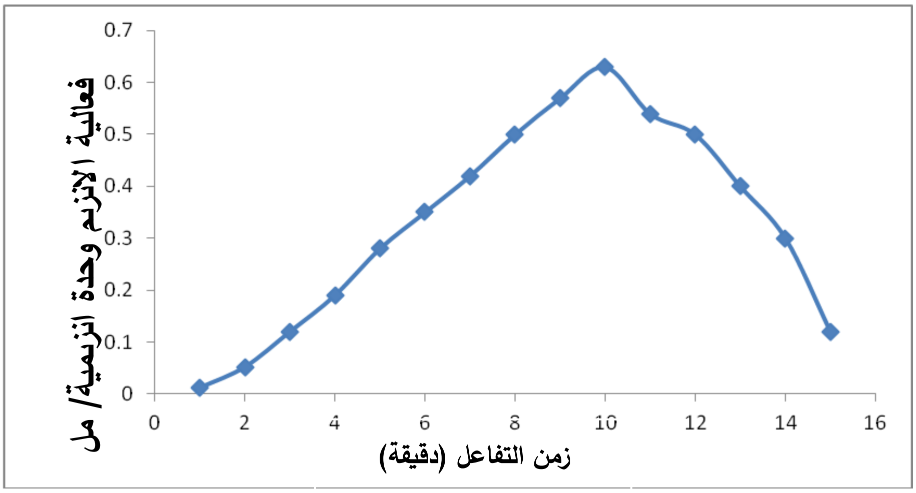
يلاحظ من الشكل (8) ان الارتفاع التدريجي لدرجة الحرارة يؤدي الى رفع فعالية الانزيم تدريجيا الى حد (25°م) يحصل بعدها إنخفاض واضح في فعالية الانزيم .

تبين من الشكل (9) ان جميع الايونات الموجبة لاملاح الكلوريد لها تأثير تثبيطي على فعالية الانزيم وان اقل نسبة تثبيط ظهرت عند اضافة ايون المنغنيز مقارنة بفعالية الانزيم (0.63 U/ مل) بدون وجود الايون الموجب وهذة النتيجة مطابقة مع ماتوصل اليه الباحث Hara وجماعته (15) لدراسة تأثير الايونات الموجبة للاملاح على فعالية الانزيم المنقى من كلى الدجاج .



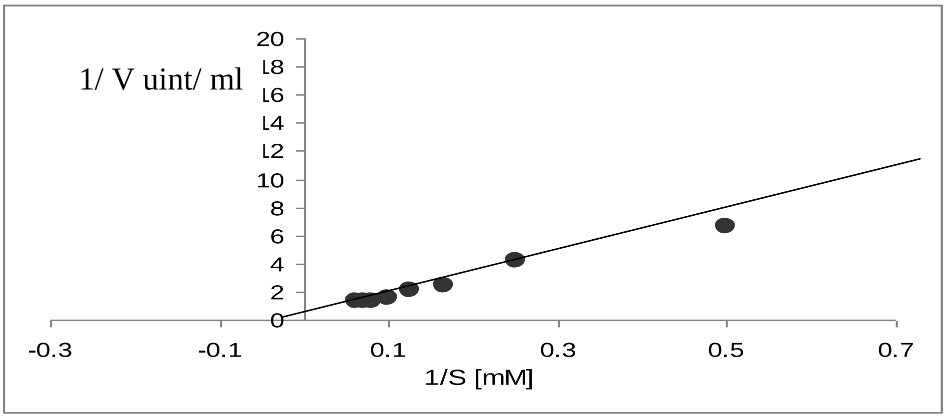
الشكل (9) تأثير الايونات الموجبة على فعالية أنزيم AR_2

كذلك تمت دراسة زمن التفاعل لاختيار المدة الزمنية المثلى وتشير النتائج الموضحة في الشكل (10) الى ان اعلى فعالية للانزيم كانت عند الدقيقة (10) ثم انخفاض سير التفاعل بعد الدقيقة العاشرة وربما يعود السبب الى انخفاض تركيز مادة الاساس (16).



الشكل (10) زمن التفاعل لانزيم AR_2

ولمعرفة العلاقة بين فعالية انزيم AR_2 وتركيز مادة الاساس الكلوكوز بوجود تراكيز مختلفة من مادة الاساس وتركيز ثابت من الانزيم ، حيث وجد ان اعلى فعالية لأنزيم AR_2 لمادة الاساس الكلوكوز كانت عند تركيز 14ملي مولار ، وباستخدام رسم لينويفر– بيرك وجد ان قيمة السرعة القصوى (V_{max}) وثابت ميكيليس _ منيتن (K_m) لانزيم AR_2 هي 2U/ml و33.33 mmol/L على التوالي وكما موضح في الشكل (11).



الشكل**(11) تأثير تركيز المادة الأساس حسب رسم لينويفر–بيرك على فعالية أنزيم AR2**

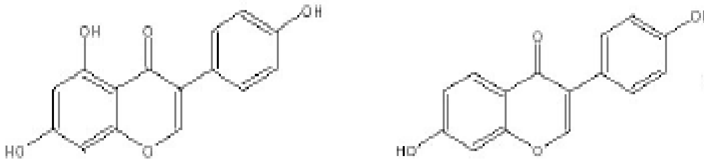
درس التاثير التثبيطي لمركبات الايزوفلافون ديادزين وجينستين الموضحة تراكيبها الكيميائية في الشكل (12) على المتماثل الانزيمي ذي الفعالية الاعلى والمنقى من متحلل خلايا الدم للفئران المصابة بالتصلب العصيدي كما مبين في الجدول (3) وجد ان التركيز 37.03 مايكرومولار للمركب جنستين (GE) Gensitein والتركيز 19.66 مايكرومولار للمركب ديادزين (DA) Daidzein كان التركيز الامثل لتثبيط فعالية انزيم AR_2.

الجدول (3) التركيز التثبيطي الامثل للمركبين ديدازين و جينستين على فعالية انزيم الدوز ريدكتيز المنقى من متحلل خلايا الدم للفئران المصابة بالتصلب العصيدي.

تركيز جينستين (مايكرو مولار)	الفعالية (وحدة انزيمية/مل) × 100	النسبة المئوية للتثبيط %	تركيز ديادزين (مايكرو مولار)	الفعالية (وحدة انزيمية/مل) × 100	النسبة المئوية للتثبيط %
0.0	43	%0	**0.0**	47.36	%0
18.51	33.33	24	**19.66**	**7.01**	**85.18**
37.03	**12.28**	**72**	39.37	10.52	77.7
55.55	17.54	60	59.05	17.54	62.9
74.07	14.03	68	78.74	14.03	70.3
92.59	26.31	40	98.42	12.28	74
111.11	36.84	16	118.4	12.28	74

يمكن ان يعزى سبب تثبيط انزيم AR_2 بالمركبين الى ارتباطهما مع الموقع الفعال للانزيم ،من خلال التأصر هيدروجيني بين ذرة الهيدروجين على المجموعة الوظيفية للمثبط وذرة الاوكسجين والنتروجين للتايروسين 48 وللهستدين 110 ضمن جزئية الانزيم ، وكما يعمل تداخلات الكتروستاتيكية اضافية مع $NADP^+$(17).

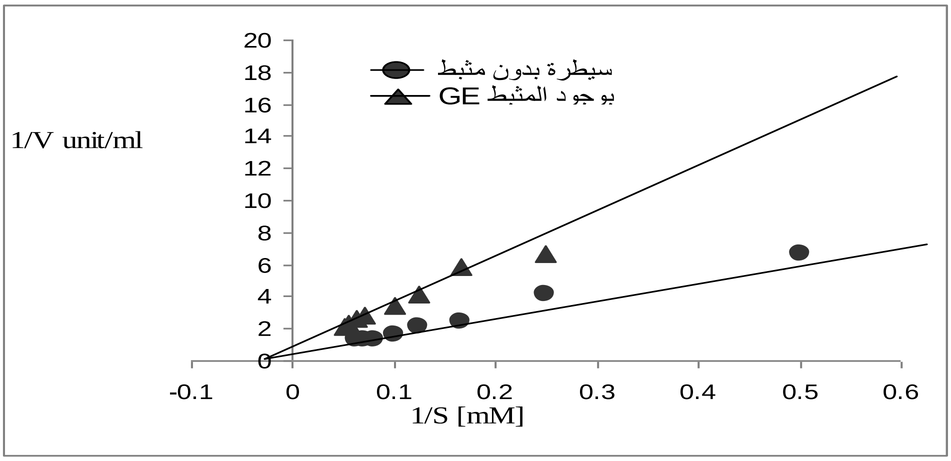
Genistein



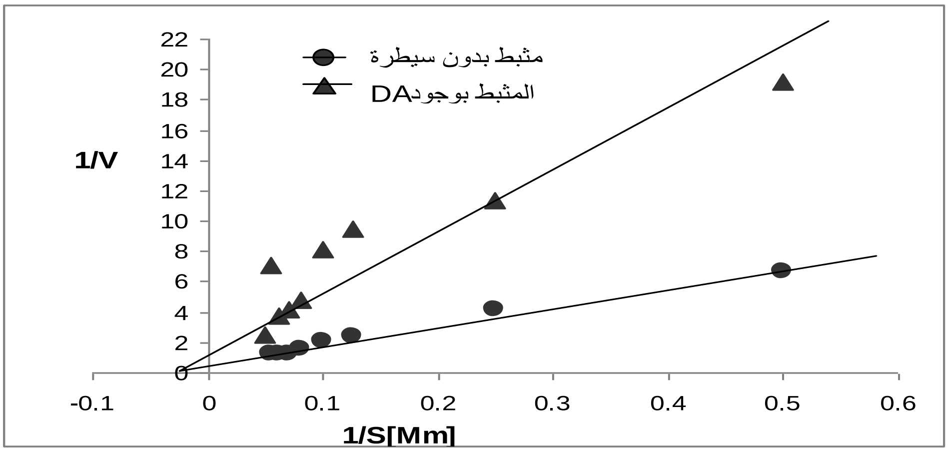
Daidzein

الشكل(12) التركيب الكيميائي لمركبات الايزوفلافون المستخدمة لتثبيط انزيم AR_2

وعند دراسة نوع تثبيط هذه المركبات لأنزيم AR_2 باستخدام التركيز الامثل للجنستين والديدازين (37.03)(19.66) مايكرومولار على التوالي جدول(3) وجد انه من النوع غير تنافسي حسب رسم لينويفر–بيرك كما موضح في الاشكال التالية.



الشكل 13: تثبيط انزيم AR_2 المنقى من متحلل خلايا الدم للفئران المصابة بالتصلب العصيدي بالمركب GE.



الشكل 14 : تثبيط انزيم AR_2 المنقى من متحلل خلايا الدم للفئران المصابة بالتصلب العصيدي بالمركب DA.

الجدول 4: نوع التثبيط لأنزيم AR_2 المنقى من متحلل خلايا الدم للفئران المصابة بالتصلب العصيدي .

(التركيز الامثل مايكرومولار)	Km (مايكرومولار) لفعالية AR_2 بدون المثبط	K′m (مايكرومولار) لفعاليةAR_2 بوجود المثبط	Vmax لفعالية AR_2 (وحدة انزيمية /مل) بدون المثبط	V′max لفعالية AR_2(وحدة انزيمية /مل) بوجود المثبط	Ki (مايكرومولار)	نوع التثبيط
(GE) 37.03	33330	33330	2	1.33	37	غيرتنافسي
(DA) 19.66	33330	33330	2	0.71	19.6	غيرتنافسي

Km ثابت ميكيليس- مينتن / K′m ثابت ميكايليس- مينتن الظاهري / Vmaxالسرعة القصوى / V′max السرعة القصوى الظاهرية / Ki ثابت التثبيط .

المصادر

1) Rene R., Packard S. and Libby P. ,Clinical Chemistry .,54(1):24-38 (2008).

2) Virmani R.,Burke A.P. and Kolodgie F., Can J cardiol., 22(suppl B):81B-84(2006) .

3) Ramasamy R. and Goldberg J.I. ,Circ Res.,106:1449-1458 (2010).

4) Oyama T., Miyashita Y., Watanabe H. Shirai K., Diabetes Res.Clin. Pract ., 73:227-234(2006).

5) AL-Khfaf E.E.Y., ph.D. Thesis, College of Science, University of Mosul(2005).

6) Rapoport S.M., Schewe T., Wiesner R., Halangk W. and Ludwig P. ,Eur. J. Biochem., **99**: 545-561(1979).

7) Schacterle G.R.;Pollack J.K., *Biochem* ., 51: 654-655(1973).

8) Culling, C. F. A.; Allison, R. T. and Barr, W. T. Cellular Pathology Technique. 4th edit. Butter worth and Co. Ltd, P641 (1985).

9) الحاج، حميد احمد. التحضيرات المجهرية الضوئية النظرية والتطبيقات. دار المسيرة للنشر والتوزيع والطباعة الطبعة الاولى، عمان-الاردن(2010).

10) Jagt D. V., Robinson B., Taylor K. K. and Hunsaker L. A., Inc., 265(34): 20982-20987(1990).

11) Srivastava K.S.,Hair A.G. and Das B., Pro.Natl .Acad .Sci .,82:7222-7226 (1985) .

12) Devasagayam T., Tilak J.C., Boloor K.K., Sane S.K., Ghaskadbi S.S. and Lele R., JAPI., 52: 794-802(2004) .

13) Robyt F.J.;White J.B. "Biochemical Techniques". Theory and Practice. *Brookes/Cloe Publishing Company, Monterey, California*, pp. 115-118,135-143 (1987).

14) AL-Bajari SH.A.Y., ph.D. Thesis, College of Education,University of Mosul (2013).

15) Hara A., Deyashiki Y., Nakayama T. and Sawada H., Eur.J.Biochem ., 133: 207-214 (1983).

16) AL-Katb S.M.E., ., ph.D. Thesis, College of Education,University of Mosul (2000).

17) Yawadio R., Tanimori S. and Morita N., Food Chemistry., 101:1616-1625 (2007).