Journal of Education and Science
Vol. 28, No.3, 2019, pp.6-16
ISSN 1812-125X
http://edusj.mosuljournals.com

Study of the Characterization of Partial Purified Polyamine Oxidase from Sheep's Brain Tissue

Wathba Idrees Ali **Sarah Abdulelah Younis**

Chemistry department / College of Education For pure science
University of Mosul

Wathba.ali@gmail.com sarah.younis@gmail.com

DOI: 10.33899/edusj.2019.162978

Received **Accepted**
24 / 12 / 2018 **29 / 01 / 2019**

Abstract

The study included partially purified of polyamine oxidase (PAO) from sheep's brain tissue by dialysis and ion exchange chromatography using DEAE-cellulose techniques. Tow isoenzymes (I،II) were obtained with specific activities 3.876 and 2.856 units/ mg of protein and purification folds 11, 8 times respectively compared with crude enzyme.

The specific activity of PAO I was better than PAO II, thus we considered it for following studying. The optimal condition showed 100 µL volume of enzyme, pH=9, 40° C, at incubation time 10 min. Some of properties of partially purified PAO enzyme were studied and the specificity was found to be superior to the base material, where it was given the highest activity when using spermidine. Using lineweaver_ Burk plot, the values of maximum velocity (V_{max}) and Michaelis constant (K_m) were found to be 0.145 Unit/ ml and 43.4 mM respectively, and potassium ion was the most activator ion to the enzyme arrived to 233.8%. The compounds (ammonium chloride, sodium fluoride, phenyl hydrazine, sodium azide and EDTA) showed a significant inhibitory effect on the activity of the enzyme (56.1%, 49.9%, 49.9%, 37.3% and 25%) respectively.

Key words: Polyamine, Polyamine oxidase, Sheep's brain tissue

دراسة خصائص أنزيم بولي أمين أوكسيديز المنقى جزئياً من نسيج دماغ الأغنام

سارة عبدالإله يونس **وثبة إدريس علي**
قسم الكيمياء / كلية التربية للعلوم الصرفة
جامعة الموصل
sarah.younis@gmail.com Wathba.ali@gmail.com
DOI: 10.33899/edusj.2019.162978

الاستلام **القبول**
2018 / 12 / 24 **2019 / 01 / 29**

الخلاصة

تضمنت الدراسة تنقية جزئية لأنزيم بولي أمين أوكسيديز من نسيج دماغ الأغنام, باستعمال الفرز الغشائي وكروموتوغرافيا التبادل الأيوني باستعمال DEAE – سليلوز. وجد ان هناك متماثلين للأنزيم (I و II) وبفعالية نوعية 3.876 و 2.856 وحدة أنزيمية/ملغم بروتين على التوالي, وبعدد مرات تنقية 11 و 8 مرة على التوالي مقارنة بالأنزيم الخام.

نظرا للفعالية العالية للمتماثل الاول I، فقد كان محل دراستنا, ففي دراسة الظروف المثلى للأنزيم، وجد انه بالحجم الأنزيمي 100 مايكروليتر اعطى أعلى فعالية, وعند أُس هيدروجيني (pH) 9، ودرجة حرارة 40°م، وعند فترة تحضين 10 دقائق. تمت دراسة بعض خصائص أنزيم بولي أمين أوكسيديز المنقى جزئياً ووجد ان خصوصية الأنزيم تجاه مواد الأساس قد اعطت أعلى فعالية عند استعمال السبرمدين. باستعمال رسم لينويفر–بيرك، لوحظ ان السرعة القصوى (V_{max}) التي يعمل بها الانزيم وقيمة ثابت ميكيلس (K_m) بلغت 0.145 وحدة أنزيمية/مل و43.4 ملي مولار على التوالي، وان أيون البوتاسيوم هو أكثر الأيونات تحفيزا لفعالية الأنزيم, حيث ادت إلى تحفيز الأنزيم بمقدار 233.8 %. أشارت النتائج إلى ان المركبات (كلوريد الامونيوم وفلوريد الصوديوم وفينايل هيدرازين وآزيد الصوديوم و EDTA) اظهروا تأثيرا تثبيطيا واضحا على فعالية الأنزيم وبنسبة (56.1 % و49.9% و 49.9% و 37.6% و 25%) على التوالي.

الكلمات المفتاحية:– بولي أمين, بولي أمين أوكسيديز, نسيج دماغ الأغنام.

المقدمة

مركبات متعدد الأمين Polyamines (PA) هي مركبات عضوية حيوية ذات وزن جزيئي واطئ تتكون من سلسلة كاربون أليفاتية مع عدة مجموعات أمينية مثل سبرمين، سبرمدين وبوترسين وهي موجودة في جميع أنواع خلايا الثدييات والنباتات[1]. وتعد هذه المركبات مكونات طبيعية لجميع الخلايا الحية بدائية النواة وحقيقية النواة [2] أذ لها وظائف فسيولوجية مختلفة. إذ تتواجد كأيونات موجبة (Cations) عضوية صغيرة داخل الخلايا فهي مرتبطة مع أيونات سالبة (Anions) عضوية مثل الأحماض النووية DNA و RNA والبروتينات والدهون الفوسفاتية من خلال الروابط الكهروستاتيكية التي تكون مسؤولة عن الحالة الاستقرارية [3]. هذه الارتباطات تعمل على استقرار وتنظيم وظيفة الأحماض النووية DNA و RNA والاغشية وبعض البروتينات مثل الأنزيمات وكذلك تنظيم القنوات الأيونية [4].

أنزيمات بولي أمين أوكسيديز Polyamine Oxidase PAOs هي أنزيمات ذات أهمية في العمليات الحيوية، هي عبارة عن وحدات يتراوح وزنها الجزيئي من (50-60) كيلودالتون [5]. توجد هذه الأنزيمات في معظم أنسجة الفقريات واللافقريات وتقع بصورة رئيسة في مايتوكندريا الخلية [6], وتتواجد ايضا في الثدييات والنباتات والبكتريا والفطريات [7]. تمت دراسة هذه الأنزيمات في أنسجة وأعضاء مختلفة منها كبد الجرذي ودماغه ومصل دم الإنسان والأرنب [8] وبلازما الدم والأبهر في الأغنام [9]. تحفز هذه الأنزيمات أكسدة مجموعة الأمين الطرفية، الحرة أو المستبدلة, ويكون ناتج التفاعل الديهايد وبيروكسيد الهيدروجين وأيون الأمونيوم [10]. أشار الباحثون في دراسة سابقة [11] إلى وجود فعالية عالية لأنزيم PAO في مصل دم كل من المرضى المصابين بالفصام والكآبة. كما أشار الباحثون الكاتب والعباسي [12] [13] إلى وجود فعالية لأنزيم PAO في سائل النخاع الشوكي للأطفال السليمين والمصابين بالتهاب السحايا الفيروسية أو الجرثومية. لذلك ارتأينا في هذه الدراسة إلى تنقية أنزيم PAO من نسيج دماغ الأغنام ودراسة ظروفه المثلى وبعض خصائصه.

المواد وطرائق العمل

تنقية و دراسة خواص أنزيم PAO من نسيج دماغ الأغنام:

1- تحضير المستخلص الخام

أخذ 100 غم من نسيج دماغ الأغنام (ذكر سليم)، وسحقت باستعمال ألة السحق Blender لمدة 10 دقائق ومزجت مع محلول الفوسفات المنظم KH_2PO_4-Na_2HPO_4 بنسبة بتركيز 20 ملي مولار (1 وزن:1.5 حجم), وبعدها تم تجميد المستخلص بالمجمدة لمدة 24 ساعة ثم تركت تذوب عند درجة حرارة الغرفة وكررت العملية ثلاث مرات. بعد ذلك حرك الخليط لمدة ساعتين بواسطة المحرك الكهربائي مع مراعاة التبريد في حمام ثلجي[14]، ورشح الخليط عبر عدة طبقات من الشاش وفصل المستخلص بجهاز الطرد المركزي المبرد (في كلية التربية للعلوم الصرفة/ مختبرات علوم الحياة) للتخلص من المواد غير الذائبة لمدة 10 دقائق بسرعة (3000xg) للحصول على راشح رائق, وقيس حجم الراشح الذي يمثل حجم المستخلص الخام, ثم قدر تركيز البروتين الكلي بطريقة لاوري المحورة [15].

قياس فعالية الأنزيم

تم قياس فعالية أنزيم PAO باستعمال طريقة الباحث Flayeh المحورة [16] وتتضمن الطريقة أكسدة مادة الأساس (سبرمين) بوساطة أنزيم PAO وباستعمال محلول بوتاسيوم فيري سيانيد الذي يعمل كمستقبل للألكترونات, وتم تقدير فعالية الأنزيم بمتابعة النقصان في الامتصاصية الناتج عن أختزال محلول بوتاسيوم فيري سيانيد عند الطول الموجي 410 نانوميتر، ولكل خمس ثواني لمدة دقيقة واحدة علما أن معامل الامتصاصية المولارية (ε) للبوتاسيوم فيري سيانيد هي 0.096×10^3 لتر.مول$^{-1}$.سم$^{-1}$ [17]. وتم تثبيت الظروف المثلى لعمل أنزيم PAO في نسيج دماغ الأغنام في جميع التجارب اللاحقة.

2- الفرز الغشائي

تمت عملية الفرز الغشائي للمستخلص الخام الناتج من الخطوة السابقة وبحجم (12) مل لمدة 20 ساعة, وفي درجة حرارة 4°م باستعمال محلول الفوسفات المنظم نوع KH_2PO_4-Na_2HPO_4 بتركيز 20 ملي مولار وبأس هيدروجيني(pH) 7.2 مع مراعاة تغيير المحلول المنظم كل 4 ساعات [18].

3- كروموتوغرافيا التبادل الأيوني

تم وزن 30 غم من راتنج المبادل الأيوني السالب DEAE-Cellulose وأضيف إليه المحلول المنظم KH_2PO_4-Na_2HPO_4 بتركيز 20 ملي مولار و pH 7.2، وكانت الإضافة بنسبة 20 مل/غم وزن جاف من الراتنج. وتم استعمال عمود فصل زجاجي بأبعاد 2.5 × 40 سم، وتمت تعبئة العمود بمادة الراتنج وذلك بسكبه بهدوء على جدران العمود لمنع تكون فقاعات هوائية وتركه إلى ان تترسب دقائق الراتنج، وترك العمود لمدة 12 ساعة بدرجة 4 درجة مئوية, للاستقرار. تمت متابعة القمم البروتينية المنفصلة بقياس الامتصاصية عند الطول الموجي 280 نانوميتر، وتم الاستدلال على القمم البروتينية التي تمتلك فعالية لأنزيم PAO باستعمال الطريقة المحورة للباحث Flayeh [16].

النتائج والمناقشة :

تنقية أنزيم PAO من نسيج دماغ الأغنام :

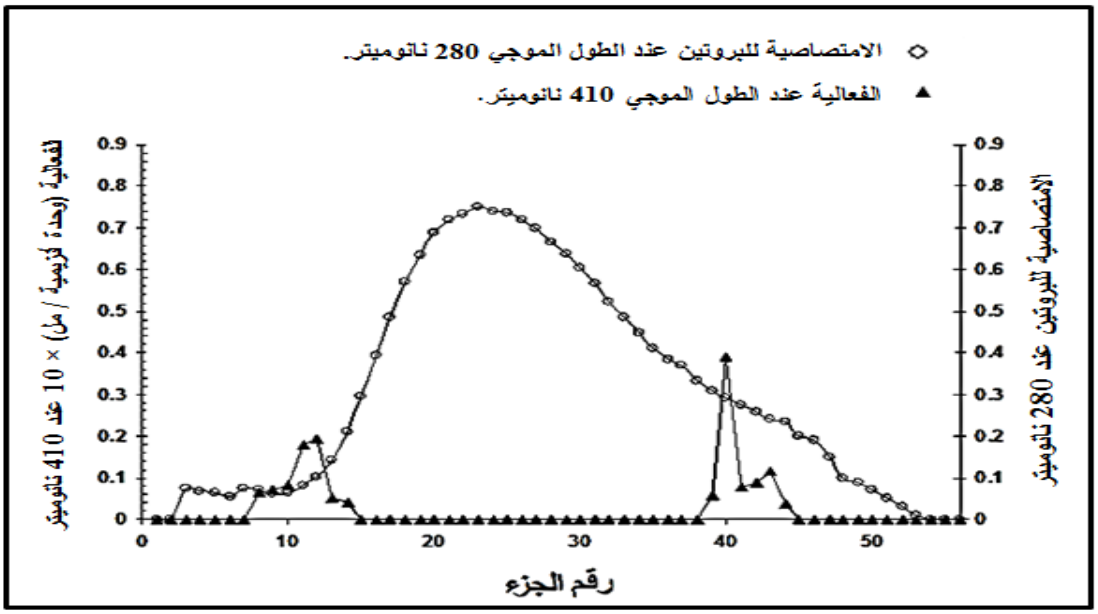
أشارت نتائج التنقية الجزئية لأنزيم PAO من نسيج دماغ الأغنام والمبينة في الجدول (1) إلى وجود فعالية لأنزيم PAO وبلغت قيمة الفعالية 0.572 وحدة أنزيمية/مل وبفعالية نوعية مقدارها 0.348 وحدة أنزيمية/ملغم بروتين. في حين وجد ان الفعالية النوعية لأنزيم PAO في كريات الدم الحمراء للنساء السليمات بلغت 0.0184 وحدة أنزيمية/ملغم بروتين [19]. كما لوحظ وجود فعالية للأنزيم في كبد الإنسان وان فعاليته كانت أعلى مما في البنكرياس [20]. كما بينت النتائج ان الفعالية النوعية لأنزيم PAO المنقى بعد عملية الفرز الغشائي اصبحت 1.977 وحدة أنزيمية/ملغم بروتين أي ان عملية الفرز الغشائي زادت من نقاوة الانزيم بمقدار 6 مرة مقارنة بالمستخلص الخام. وتتفق هذه النتيجة مع ما وجده كل من الباحثين اللهيبي وتوحله [19] [21].

أشار نموذج الروغان المستحصل عليه من تنقية أنزيم PAO باستعمال المبادل الأيوني السالب - DEAE سليلوز إلى وجود قمتين متميزتين تمتلكان فعالية لأنزيم PAO شكل (1)، أذ ظهرت القمة الأولى (Peak I) عند حجم روغان (40-75) مل وبفعالية نوعية مقدارها 3.876 وحدة أنزيمية/ملغم بروتين, في حين ظهرت القمة الثانية (Peak II) عند حجم روغان (195-225) مل وبفعالية نوعية مقدارها 2.856 وحدة أنزيمية/ملغم بروتين مما يدل على ان أنزيم PAO المنقى يحمل محصلة شحنة سالبة معاكسة لشحنة المبادل الأيوني[22]. هذه النتائج مطابقة لأنزيم PAO المنقى من حليب الأمهات حيث ظهرت قمتين تمتلك كل منها فعالية لأنزيم PAO في حين ظهرت ثلاث قمم تمتلك فعالية لأنزيم PAO المعزول من كريات الدم الحمراء [19].

جدول رقم (1): خطوات تنقية أنزيم PAO من نسيج دماغ الأغنام.

خطوات التنقية	الحجم الكلي (مليليتر)	تركيز البروتين الكلي (ملغم)	فعالية الأنزيم (وحدة أنزيمية*/مل)	الفعالية الكلية (وحدة أنزيمية)	الفعالية النوعية (وحدة انزيمية/ ملغم بروتين)	عدد مرات التنقية	استرجاع الفعالية (%)
المستخلص الخام	90	148.05	0.572	51.48	0.348	1	100
الفرز الغشائي	12	17.076	2.813	33.756	1.977	6	65.57
التبادل الأيوني							
القمة I	35	4.235	0.469	16.415	3.876	11	31.89
القمة II	30	4.38	0.417	12.51	2.856	8	24.30

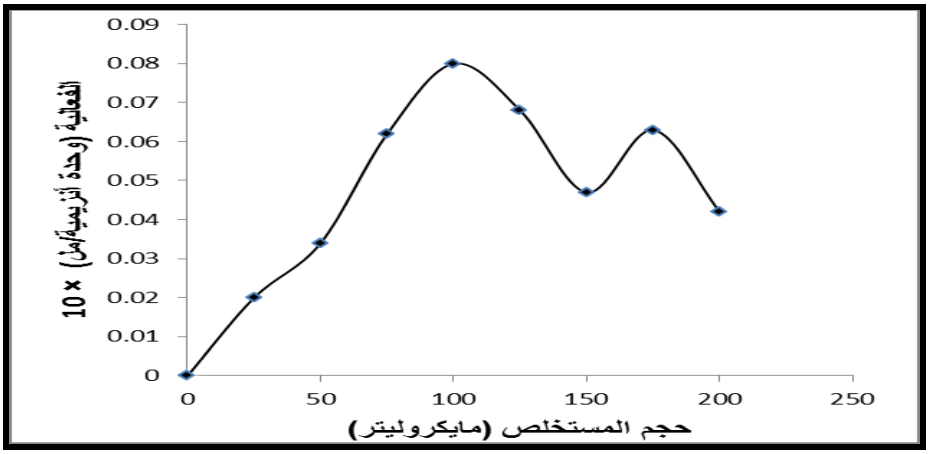
* الوحدة الأنزيمية تشير إلى كمية الأنزيم اللازمة لأكسدة مايكرومول واحد من المادة الأساس (السبرمين) في الدقيقة الواحدة تحت الظروف المحددة للقياس.



الشكل (1): نموذج الروغان المستحصل من تنقية أنزيم PAO من نسيج دماغ الأغنام بتقنية كروموتوغرافيا التبادل الأيوني (حجم كل جزء المستحصل من الروغان هو 5 مل)

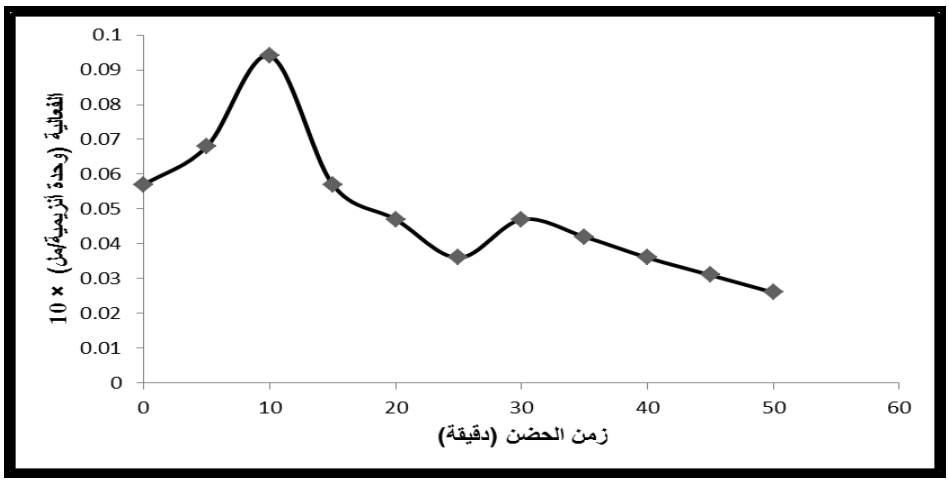
دراسة الظروف المثلى للقمة I التابعة لأنزيم PAO المنقى من نسيج دماغ الأغنام

تمت دراسة الظروف المثلى للقمة الاولى للأنزيم المنقى، أذ أشارت النتائج الموضحة في الشكل (2) إلى تأثير حجم الأنزيم (تركيز البروتين) على فعالية الأنزيم إذ اعطى أعلى فعالية عند حجم 100 مايكروليتر, أذ ادى إلى زيادة سرعة التفاعل الأنزيمي وبشكل خطي وبعدها لوحظ انخفاض في الفعالية. أن هذه النتائج تتفق مع ما وجده العباسي [23] لأنزيم PAO من مصل الأشخاص المصابين بالسكري النوع الثاني, ومع ما وجده الباحث الكاتب [12] لأنزيم PAO المنقى من حليب الأمهات، وكذلك للأنزيم المنقى من كريات الدم الحمراء [19]. هذا يدل على ان سرعة التفاعل الأنزيمي بوجه عام تتناسب مع كمية الأنزيم المضافة خصوصا خلال الفترات الاولى للتفاعل، إذ تكون كمية مادة الأساس كبيرة نسبيا, وبتقدم التفاعل ينخفض تركيز مادة الأساس بينما تزداد نواتج هذا التفاعل ولذلك لن تستمر سرعة التفاعل إلا إذا تمت المحافظة على وجود مادة أساس أكثر من تركيز الأنزيم، ويمكن القول أن سرعة التفاعل الأنزيمي تتناسب طرديا مع تركيز الأنزيم [24].



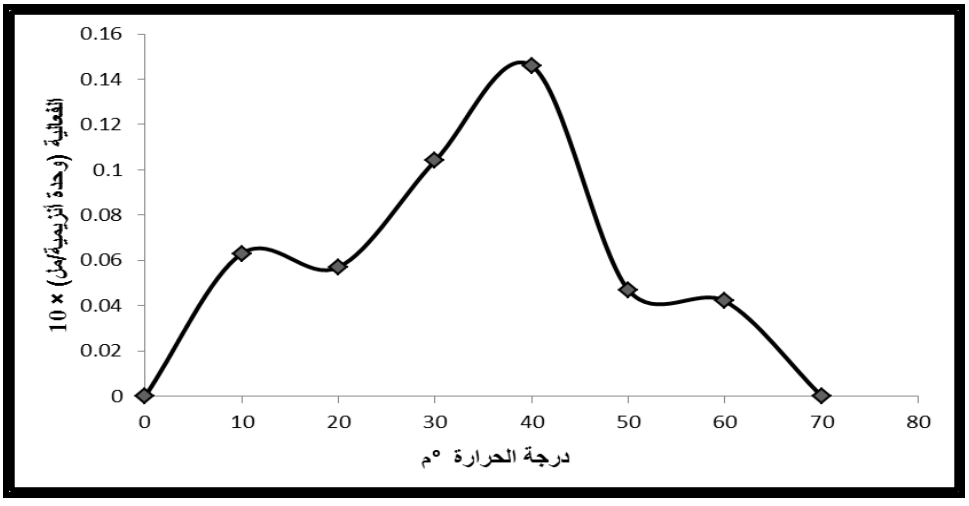
شكل (2): تأثير حجم الأنزيم على سرعة التفاعل الانزيمي

وأشارت النتائج ألموضحة في الشكل (3) ان الفعالية الأنزيمية بلغت سرعتها القصوى عند زمن حضن 10 دقائق بعدها اخذت الفعالية بالانخفاض تدريجيا بزيادة زمن فترة الحضن, وهذه النتائج مطابقة لأنزيم PAO في حليب الأمهات وخلايا الدم إذ بلغت 10 دقائق [23] [29], في حين لوحظ ان الفترة الزمنية لحضن الأنزيم المنقى من مصل الأشخاص المصابين بالسكر النوع الثاني و الفلفل الأخضر كانت بحدود 5 دقائق [23] [25].



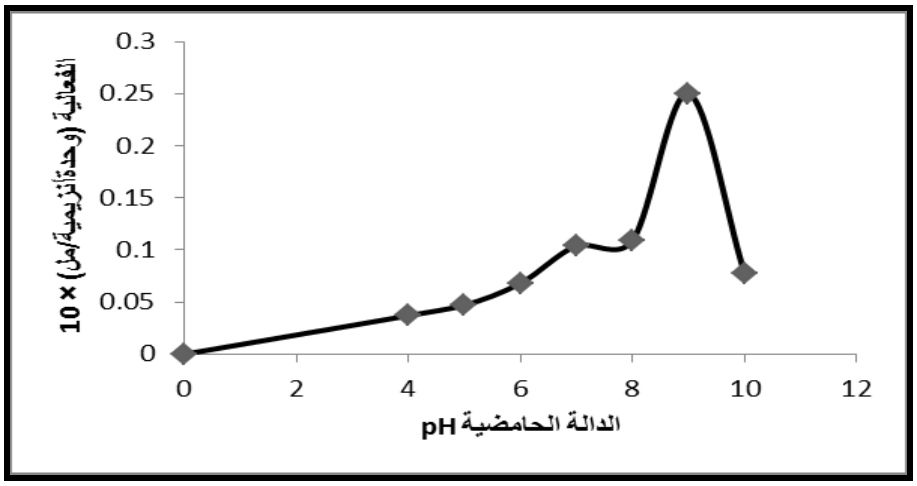
شكل (3): تأثير زمن الحضن على سرعة التفاعل الأنزيمي

أشارت النتائج المبينة في الشكل (4) إلى ارتفاع تدريجي في قيم فعالية الأنزيم بارتفاع درجة الحرارة إذ بلغت اقصاها عند درجة حرارة 40°م ثم أخذت بالانخفاض التدريجي بارتفاع درجة الحرارة عن هذا الحد, وهذه النتيجة مقاربة لأنزيم PAO المنقى من كريات الدم الحمراء للنساء السليمات والمصابات بالسكري والتي وجدت 37°م [19], وهي أكبر من تلك لأنزيم PAO لمصل الأشخاص المصابين بالسكري النوع الثاني والتي بلغت 30°م [23]. ان ارتفاع درجة الحرارة تزيد الطاقة الحركية للأنزيم فتزيد من تقارب الأنزيم مع المادة الأساس مما يسبب زيادة في سرعة التفاعل وعند الاستمرار في زيادة درجة الحرارة ذلك يؤدي إلى مسخ البروتين وتوقفه عن العمل.



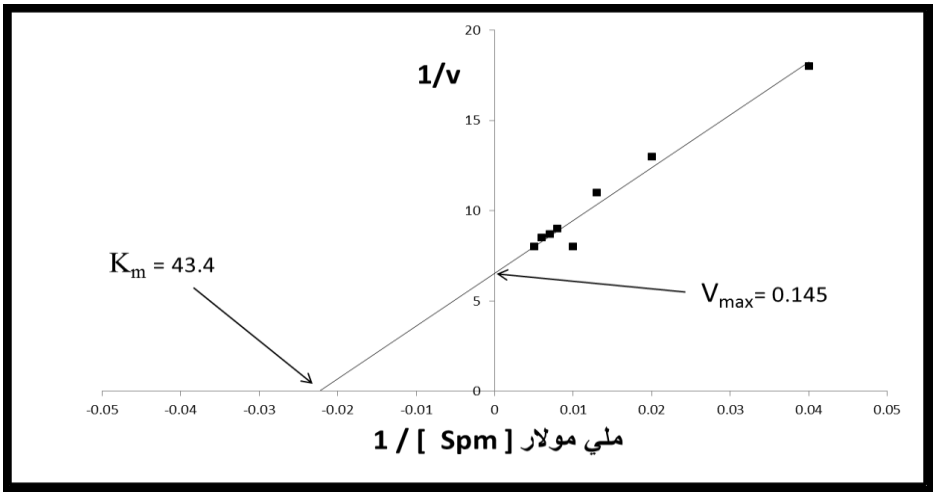
شكل (4): تأثير درجة الحرارة على سرعة التفاعل الأنزيمي

وأشارت النتائج إلى ان أعلى فعالية للأنزيم وجدت عند الأس الهيدروجيني (9) كما في الشكل (5) وباستخدام محلول الفوسفات المنظم KH_2PO_4-Na_2HPO_4. وهذه النتيجة تتفق مع أنزيم PAO في الخلايا السرطانية للقولون أذ وجدت ان قيمة pH المثلى لها 9 [26], وكذلك مقاربة لأنزيم PAO المنقى من حليب الأمهات اذ وجدت قيمة الأس الهيدروجيني 8.6 [12] . ان لكل أنزيم قيمة مثلى لأيون الهيدروجين يبلغ تأثيره عند حدها الاقصى لذلك فإن التغيير في قيم pH للأنزيم يمكن ان يحدث تغييراً في التركيب الثانوي والثالثي لجزيئة الأنزيم أو للموقع الفعال مما يؤثر على سرعة التفاعل الأنزيمي.



شكل(5): تأثير الدالة الحامضية على سرعة التفاعل الأنزيمي

بينت النتائج كما موضح بالشكل (6), ومن خلال معادلة لينويفير– بيرك Linewaver – Burk ان قيمة ثابت ميكايليس _ منتن K_m بلغت 43.4 ملي مولار وبلغت قيمة السرعة القصوى V_{max} بحدود 0.145 وحدة أنزيمية/مل باستعمال السبرمين كمادة أساس، ان قيمة K_m هذه تتفق مع قيم K_m لمتماثلات أنزيم PAO من كريات الدم الحمراء باستعمال السبرمين كمادة أساس [19] وأكبر من قيمة K_m لأنزيم PAO المتواجد في كبد الإنسان والبالغة 1.5 مايكرومولار [20] وكذلك في كبد الجرذي والبالغة 0.6 مايكرومولار [27].



شكل (6): رسم لينويفر– بيرك لأنزيم PAO المنقى من نسيج دماغ الأغنام.

خصائص أنزيم PAO I المنقى:

أشارت النتائج في الجدول (2) إلى خصوصية أنزيم PAO I المنقى جزئيا من نسيج دماغ الأغنام تجاه مواد أساس مختلفة, ولوحظ ان أعلى فعالية لأنزيم PAO ظهرت باستعمال المادة الأساس السبرمدين تليها السبرمين ومن ثم الكادافارين، وهذه النتائج مطابقة لما وجدته الكاتب [12] لأنزيم PAO المنقى جزئيا من حليب الأمهات, بينما الأنزيم المنقى جزئيا من كريات الدم الحمراء للنساء السليمات اظهر أعلى فعالية للسبرمين ومن ثم السبرمدين [19].

جدول (2): خصوصية أنزيم PAO I المنقى من نسيج دماغ الأغنام تجاه مواد أساس مختلفة

مادة أساس (100 ملي مولار)	الفعالية النسبية (%)
سبرمين	100
سبرمدين	187.6
كادافارين	82.0
هكسايل أمين	76.4
بيوتايل أمين	58.4
ثنائي أمين بروبان	47.2
بنزايل أمين	40.44

وأشارت النتائج المبينة في الجدول (3) إلى تأثير التنشيطي لبعض الأيونات على فعالية أنزيم PAO المنقى, ولوحظ ان جميع الأيونات المستعملة كانت محفزة للأنزيم ولكن بدرجات متفاوتة ولوحظت ان أعلى فعالية للأنزيم كانت عند استعمال أيون البوتاسيوم K^+ حيث اصبحت الفعالية الأنزيمية أكثر مقارنة بنموذج السيطرة الخالي من إضافة الأملاح, وهذه النتيجة مطابقة لما وجده اللهيبي [19] لأنزيم PAO في كريات الدم الحمراء للنساء إذ كانت أفضل فعالية للأنزيم عند استعمال أيون K^+ وبتركيز 10 ملي مولار, وكذلك مطابقة لأنزيم PAO من مصل الأشخاص المصابين بالسكر غير المعتمد على الأنسولين [23], بينما لوحظ ان أعلى فعالية لأنزيم PAO في حليب الأمهات كانت بوجود أيون الكالسيوم Ca^{+2} وبتركيز 10 ملي مولار [12], وقد يعزى التأثير الملاحظ لهذه الأيونات على الفعالية الأنزيمية إلى الدور الذي تحدثه في الحفاظ على البيئة الفراغية الملائمة لإحداث التأثير التحفيزي للأنزيم, ويمكن تفسير الزيادة في الفعالية في ان الأيون المضاف يعمل على زيادة استقرار الحالة الانتقالية بين الأنزيم والمادة الأساس [28].

جدول(3): التأثير التنشيطي لبعض الأيونات المختلفة على فعالية أنزيم PAO I المنقى من نسيج دماغ الأغنام

ملح الأيون المضاف (10 ملي مولار)	الفعالية النسبية %
محلول السيطرة	100
كلوريد البوتاسيوم	233.8
كلوريد الكالسيوم	209.4
كلوريد الصوديوم	178
كلوريد المغنيسيوم	166.9
كبريتات الألمنيوم	133.5

أشارت النتائج الموضحة في الجدول (4) إلى التأثير التثبيطي لبعض المركبات على فعالية أنزيم PAO I المنقى، إلى أن حضن المركب كلوريد الأمونيوم NH_4Cl مع الأنزيم ادى إلى تثبيط واضح لفعالية أنزيم PAO I بمقدار (56.1%) وهذا يدل على أن أيون NH_4^+ قد يؤدي إلى معادلة الشحنة السالبة لمتخلفات الأحماض الأمينية والتي قد تؤدي دورا مهما في فعالية أنزيم PAO [29]. بينما أظهرت المركبات فلوريد الصوديوم وآزيد الصوديوم وفينايل هيدرازين تأثيرات مختلفة, والتي عرفت بأنها تكون معقدات مع الأيونات المعدنية [30], إذ اظهر كلا من فلوريد الصوديوم وفينايل هيدرازين تثبيطا واضحا لفعالية أنزيم PAO I وبنسبة (49.9%) لكل منهما, مما يدل على مشاركة مجاميع الكاربونيل للفنينايل هيدرازين في فعالية الأنزيم [31], بينما ادى المركب هيدروكسي للفينايل هيدرازين إلى تثبيط بنسبة (50%) من فعالية أنزيم PAO المتواجد في الشعير [32]. بينما وجدت الكاتب [12] تأثيراً تثبيطياً واضحاً لأنزيم PAO في حليب الأمهات لكل من فلوريد الصوديوم وفينايل هيدرازين وبنسبة (77.7%) و (66.6%) على التوالي. وهذا عكس ما لوحظ لأنزيم PAO في مصل الأغنام من عدم تأثر فاعليته بالمركب فلوريد الصوديوم [33], غير أن التأثير التثبيطي للمركب EDTA على فعالية أنزيم PAO I بلغ (25%) وهذا مماثل لما وجد عليه أنزيم PAO في حليب الأمهات [23]، وأنزيم PAO في مصل الأغنام [33]، وأنزيم PAO في مصل الإنسان الطبيعي [27], ويرجع التأثير التثبيطي لبعض المركبات على فعالية الأنزيم إلى أن المثبط يعمل على الأدمصاص أو التجمع السطحي للمواد المثبطة على المراكز الفعالة بالأنزيم أو يرجع لتفاعل المثبطات مع مادة الأساس أو للتأثير السام للمثبطات على بروتينات الأنزيم [24].

جدول (4): التأثير التثبيطي لبعض المركبات على فعالية أنزيم PAO I المنقى من نسيج دماغ الأغنام

المركبات (1 ملي مولار)	التأثير التثبيطي %
محلول السيطرة	0.00
كلوريد الأمونيوم	56.1
فلوريد الصوديوم	49.9
فينايل هيدرازين	49.9
آزيد الصوديوم	37.5
أثيلين ثنائي الأمين رباعي حامض الخليك EDTA	25

المصادر: **References**

1) Pal M. Janda T. Journal Plant Sce Phytopathol, 1: 95-100.(2017).
2) Poodeh S.H. Ph. D . Thesis, Science college university of Oulu P. 30. (2016).
3) Eom S.H., Lee J.K., Kim H., Jang K., Ryu H. and Hyun T.K. Acta Bot. Croat, 77(1): 97-101 (2018).
4) Del Duca S., Serafini-Fracassini D. and Cai G. Plant Polyamines in Stress and Development, 98 (2014).
5) Angelini R., Cona A., Federico R., Fincato P., Tavladoraki P. and Tisi A. An update. Plant Physiology and Biochemistry 48: 560-564 (2010).
6) Blaschko H. Pharmacol. Rev. 4, 415-458 (1952).
7) Elovaara H., Huusko T.,Maksimow M.,Elima K., Yegutkin G.G., Skurnik M., Dobrindt U., Siitonen A., Mcpherson M.J., Salmi M. and Jalkanen S.PLoS ONE, 10(11): 142367 (2015).
8) Mcewen Ch.M. Journal Biol Chem. Vol. 240-2011 (1965).
9) Elliott J., Callingham B.A. and Sharman D.F. Comp. Pharmacol. Toxicol., 102(1): 83-89 (1992).
10) Subramanyam S., Sardesai N., Minoch S.C., Zheng C., Shukle R.H. and Williams C.E. BMC Plant Biology, 15-3 (2015).
11) Dahel K., Flayeh K.A. and Al-Saffar N.M. Neueochem. Res., 26(4): 415-418 (2001).
12) Al-Kateb S.M.Y., Ph.D. Thesis, College of Education For Pure Science, University of Mosul (2000).(In Arabic).
13) Al-Abbasy O.Y.M., M.Sc. Thesis, College of Education For Pure Science, University of Mosul (2003). (In Arabic).
14) Schacterle G.R. and Pollack J.K. Anal. Biochem., 51: 654-655 (1973).
15) Lowrey O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. J.Biol.Chem., 193: 265-275 (1951).
16) Flayeh K.A. Clin. Chem., 34: 2401-2403 (1988).
17) Tabor C.W. and Kellogg P.D. J.Biol.Chem., 245(20): 5424-5433 (1970).

18) Hames B.D. and Hooper N.M. "Instant notes on biochemistry", 2nd Ed. Bio.Scientific publishers Limited (2000).
19) Al-Lehebe N.I.A., Ph.D. Thesis, College of Education, University oh Tikrit (2013). (In Arabic).
20) Suzuki O., Matsumoto T. and Katsumata K. Experientia, 40: 838-839 (1983).
21) Touhala W.I.A., Ph.D. Thesis, College of Education For Pure Science, University of Mosul (2006). (In Arabic).
22) Cervelli M., Cona A., Angelini R., Pdticelli F., Federico R. and Mariottini P. Eur. J. Biochem., 268 (13): 3816-3830. (2001).
23) Al-Abbasy O.Y.M., J. Tikrit for pure Scie., 15:3 (2008).
24) Ahmad T.Y.,"Biochemistry, Part One". 1nd Ed. Al_Hilali L.A.A. Company. Dar Ibn Al_Atheer, University of Mosul Page 278 and 187. (2010). .
25) Al-Rubaie M.J.M., M.Sc. Thesis, College of Education For Pure Science, University of Mosul (2013). (In Arabic).
26) Gahl W.A., Vale A.M. and Pitot H.C. Biochem. J., 202-603 (1980).
27) Seiler N., Bolkenius F.N., Knodgen B. and Mamond P. Biochem. Biophys. Actav., 615-418 (1980).
28) Rodwell V.W., "Harpers Biochemistry". 22th Ed. A Lange Medical Book Appleton and Lange, Chapter 10, P. 82.(1990).
29) Holtta E. J. Exp. Med. 97: 327-344 (1977).
30) Stephen H.F., Keith L.M., George I.H.H. and Frank R.N.G. Biochemistry 19, 3039-3047 (1980).
31) Zeller E.A., "In the enzymes: Chemistry and mechanism of action" 2nd Ed. Sumner J.B. and Myrback K., New York, Academic press, Inc.(1950).
32) Yangisawa H., Kato A., Hoshiai S., Kamiya A. and Torri N. Plant Physiol., 85: 906-909 (1987).
33) Hirsch J.G. J. Exp. Med., 97: 327-344 (1953).