

دراسة خصائص انزيم اليوريكيز Uricase المنقى جزئيا من بذور
البازاليا *Pisum sativum* وتأثيره في مستوى حامض اليوريك في
الفئران

إسراء سهل احمد آل.فليح

قسم الكيمياء / كلية التربية

جامعة الموصل

القبول

2012 / 06 / 06

الاستلام

2012 / 02 / 26

Abstract

Uricase (urate oxidase) was partially purified from *Pisum sativum* seeds by ammonium sulfate precipitation ,dialysis and anion exchange chromatography techniques. One proteinous peak was obtained containing two isomers of uricase I and II with specific activity (5.92×10^{-3} and 4.9955×10^{-3}) unit/mg protein and with purification fold(31.32and 26.43) respectively compared to crude enzyme.

The optimum conditions for the purified enzyme was determined using uric acid as a substrate. The results showed that maximum activity with glycine-NaOH buffer at pH=7, 40°C, substrate concentration 100mM $V_{max}=6.25 \times 10^{-2}$ U/mg protein and the $K_m=50$ mM, 100 μ l enzyme volume and the reaction velocity was increased with copper ion.

The active dose of uricase for reducing uric acid was determined in healthy mice 400 μ g/kg body weight, and the best treatment was obtained by the injection of enzyme with allopurinal intraperitonally.

الخلاصة

نقي انزيم اليوريكيز (يوريت اوكسيديز) من بذور نبات البازاليا باستخدام تقنيات الترسيب بكبريتات الامونيوم، الفرز الغشائي و كروماتوغرافيا التبادل الايوني السالب، وتم الحصول على قمة بروتينية واحدة تضم متماثلين للإنزيم I و II بفعالية نوعية (5.92×10^{-3}) (4.995×10^{-3}) وحدة انزيمية/ملغم بروتين وبنقاوة بلغت (31.32) (26.43) على التوالي مقارنة بالإنزيم الخام.

حددت الظروف المثلى لقياس فعالية الانزيم المنقى باستخدام حامض اليوريك كمادة اساس. وجد ان اقصى فعالية للانزيم كانت عند استخدام المحلول المنظم Glycine-NaOH عند $pH=7$ ، درجة حرارة $(40)^\circ C$ ، تركيز مادة الأساس (100) ملي مولار كانت السرعة القصوى 6.25×10^{-2} وحدة انزيمية/ملغم بروتين و $50 = Km$ ملي مولار، حجم انزيم (100) مايكروليتر كما ان زيادة تركيز ايون النحاس أدت الى زيادة في فعالية التفاعل الانزيمي. حددت الجرعة الفعالة للانزيم الأكثر تخفيضاً لحامض اليوريك في الفئران السليمة وكانت 400 مايكروغرام/كغم وزن الجسم، ان افضل معاملة كانت بحقن الانزيم مع عقار الالوبيورينول في التجويف البريتوني.

المقدمة

يعمل انزيم اليوريكيز uricase او (يوريت اوكسيداز) (E.C: Urate oxidase) على اكسدة حامض اليوريك الى المركب الانتوين Allantoin و CO_2 بوجود الاوكسجين و CO_2 محرراً بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 الذي يختزل الى الاوكسجين (في الثدييات الأقل رتبة من الانسان) (2,1) وبالتالي فهو يلعب دوراً مهماً في ايض النيتروجين (3). من خلال تقدير مستوى حامض اليوريك في الدم والادرار يمكن التعرف على مدى تقدم او الإصابة بالنقرس، كما ان لليوريكيس فائدة سريرية في تقدير حامض اليوريك من خلال اقترانه بنظام 4-Aminoantipyrin-peroxidase، وكبروتين في علاج حالات ارتفاع مستوى اليوريك (4,5). أشارت العديد من الدراسات الى عدم وجود الانزيم في الانسان وبعض ضروب القردة حيث يكون حامض اليوريك هو الناتج النهائي لأيض البيورينات(6)، بينت الدراسات الى ان الجين الخاص بتكوين هذا الانزيم موجود في هذه اللبائن لكن بشكل غير فعال Silencing اذ تم حدوث هذا التطفير اثناء مراحل تطورها، كما يمكن للباين الاقل رتبة من الانسان ان تكون هذا الانزيم اضافة للبكتريا(7). وبسبب صعوبة او عدم ذوبان حامض اليوريك يصاحب ذلك نتائج سلبية على الجسم من خلال ترسبه وبالتالي تراكمه مايؤدي بالتالي الى الإصابة بداء النقرس وحصى الكلى المتكونة من حامض اليوريك(1). اذ يتكون حامض اليوريك بفعل انزيم زانثين اوكسيداز Xanthine oxidase بشكل اساسي والذي يعتبر المسبب الرئيسي للإصابة بداء النقرس، حيث لا يوجد ما يمكن السيطرة به على هذا المرض لحد الآن سوى العلاج بالعقار Allopurinol المثبط التنافسي لهذا الانزيم(8).

البقوليات من النباتات المنتجة لحامض اليوريك والناقلة له بالاعتماد على مركبات النيتروجين المنقولة من العقيدات nodules الى الاغصان والبراعم shoot والحاوية على الانزيمات الثلاثة المهمة في ايض البيورينات Allantoinas, Uricase, Xanthine oxidase

ان الاسم العلمي للنبات هو *Pisum sativum*، اما الاسماء الشائعة الاخرى فانها تختلف باختلاف اللغات والبلدان اذ انها تعرف في اغلب المناطق العربية (العراق، سوريا، مصر وغيرها) باسم (البازاليا) (10) من هنا جاءت فكرة البحث بعزل الانزيم من ثمرة البازاليا المتوفرة في الاسواق المحلية والحاوية على تراكيز عالية منه، وامكانية خفض مستوى حامض اليوريك باعتباره إنزيم تخصصي.

المواد وطرائق العمل

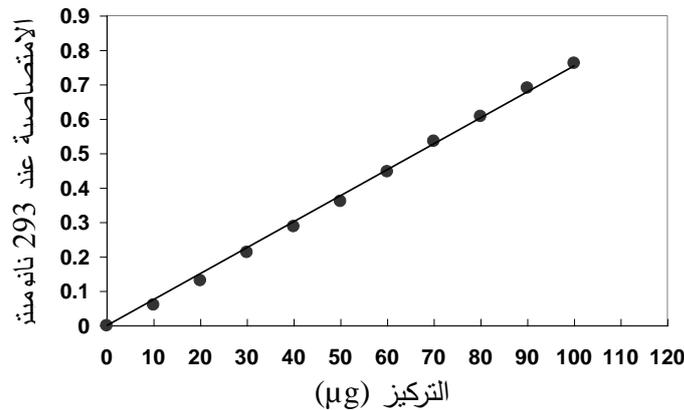
النبات المستخدم: بذور نبات البازاليا *Pisum sativum* من الأسواق المحلية لمحافظة نينوى.

الحيوانات المستخدمة:

استخدمت في هذه الدراسة إناث الفئران البيض Female Albino Mice المجهزة من كلية التربية/جامعة الموصل، تراوحت أوزانها بين (25-30)غم. وضعت في أقفاص مجهزة ومعدة لهذا الغرض، زودت بالماء والعلف الحيواني الخاص بها وأخضعت للظروف المناسبة من ضوء طبيعي ودرجة حرارة (25)°م.

قياس فعالية انزيم اليوريكيز:

قيس فعالية انزيم اليوريكيز باستخدام طريقة Adamek (11) في البحث، وتتضمن الطريقة أكسدة المادة الاساس uric acid الى allantoin، حيث تعتمد الطريقة على متابعة النقصان في الامتصاصية عند الطول الموجي 293nm. حسب تركيز حامض اليوريك المتبقي من التفاعل الانزيمي باستخدام المنحنى القياسي شكل(1) والمحضر بتراكيز بين (10-100µg)



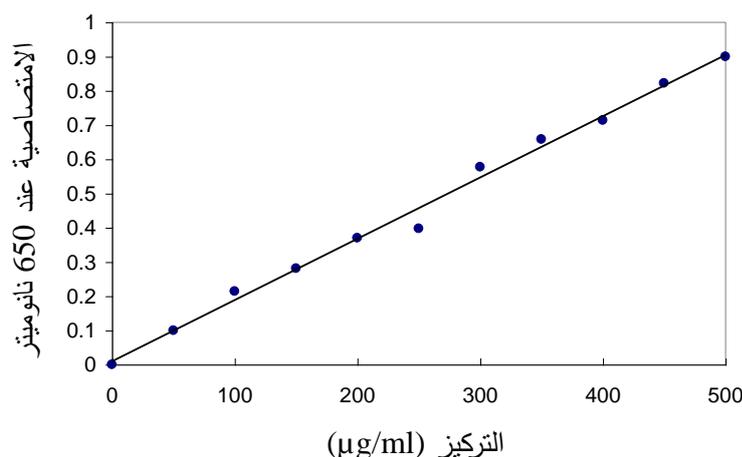
شكل (1): المنحنى القياسي لتقدير حامض اليوريك

تحضير المستخلص المائي الخام:

وزن (250)غم من بذور نبات البازاليا، سحقته بواسطة جهاز الترم Blender، بعدها

مزجت بالماء وينسب (3:1) وزن/حجم لمدة عشرة دقائق. سحقت جدران الخلايا باستخدام جهاز الموجات فوق الصوتية. ثم رشح المحلول من خلال عدة طبقات من الشاش وفصل المستخلص بجهاز الطرد المركزي المبرد مدة (15) دقيقة بسرعة (33520xg) للتخلص من المواد غير الذائبة، اخذ الرائق وقلص الحجم إلى الثلث بواسطة جهاز التجفيد (Lyophilizer) (12) وبذلك تم الحصول على المستخلص المائي الخام بحجم نهائي (655) مل.

تقدير كمية البروتين: قيست كمية البروتين باستخدام طريقة لوري المحورة (13).



شكل (2): المنحنى القياسي لتقدير البروتين

الترسيب بكبريتات الامونيوم المشبعة:

رُسب الإنزيم من المستخلص المائي الخام بالإضافة التدريجية لكبريتات الامونيوم ويتشبع 70% (14) مع التحريك في حمام ثلجي، ترك المحلول في الثلاجة إلى اليوم التالي. فصل الراسب عن الراشح باستخدام الطرد المركزي المبرد (12). أذيب الراسب الناتج بالماء المقطر.

الفرز الغشائي Dialysis

أجريت عليه عملية الديليزة باستخدام المحلول المنظم بورات الصوديوم بتركيز 25mM ودالة حامضية pH=8.6 لمدة ست ساعات مع مراعاة ابدال المحلول المنظم كل ساعتين (15).

كروماتوغرافيا التبادل الايوني

استخدم المبادل الايوني السالب DEAE-cellulose 50A في تنقية الانزيم، تم امرار المحلول المنظم بورات الصوديوم بتركيز 25mM ودالة حامضية pH=8.6 بعد حقن الانزيم الناتج من عملية الفرز الغشائي واستخدمت مضخة الدفع المتناوب في جمع الأجزاء المترشحة

من نهاية العمود بواقع (5) مل، وتمت متابعة الأجزاء البروتينية المترشحة بقياس الامتصاصية عند طول موجي (280) نانوميتر، تم الاستدلال على القمة البروتينية الحاوية على فعالية انزيم اليوريكيز عن طريق قياس فعالية الانزيم. قلص حجم الانزيم الناتج بالتجفيد Lyophilizer الى الثلث.

الجرعة الفعالة للأنزيم

قسمت الفئران المستخدمة في التجارب إلى مجاميع تضم كل مجموعة (5) فئران، عوملت كما يأتي:

1. المجموعة الأولى تركت من دون معاملة وعدت مجموعة سيطرة (Control).
2. المجاميع من (2-6) حقنت في التجويد البريتوني بالجرع (1000،800،600،400،200) مايكروغرام/كغم من وزن الجسم على التوالي من من متماثل الانزيم الثاني II ، وبعد 3 ساعات من إجراء عملية الحقن في التجويد البريتوني Intraperitoneally تم سحب الدم من الفئران من جيب محجر العين Orbital sinus puncture باستخدام انابيب شعرية خاصة (16) قيس مستوى حامض اليوريك في مصل الدم باستخدام عدة تحليل جاهزة Kit مجهزة من شركة Biolabo-France. ثم اختيرت الجرعة الأكثر تخفيضاً لمستوى الحامض وعدت جرعة مؤثرة.

معاملة الحيوانات

عوملت الحيوانات بحقن متماثل الانزيم II في التجويد البريتوني بالجرعة الفعالة وعقار Allopurinol بجرعة 1.53 ملغ/كغم من وزن الجسم معا وكذلك عن طريق الحقن في التجويد البريتوني مرة والتجريع الفموي مرة اخرى.

التحليل الإحصائي:

حللت نتائج مستوى حامض اليوريك إحصائياً وذلك باستخدام تحليل التباين الأحادي (One way analysis of variance)، كما تم تحديد الاختلافات الخاصة بين المجاميع باستخدام اختبار دنكن (Duncan) (17). وكان مستوى التمييز الإحصائي المقبول 5% (P<0.05).

النتائج

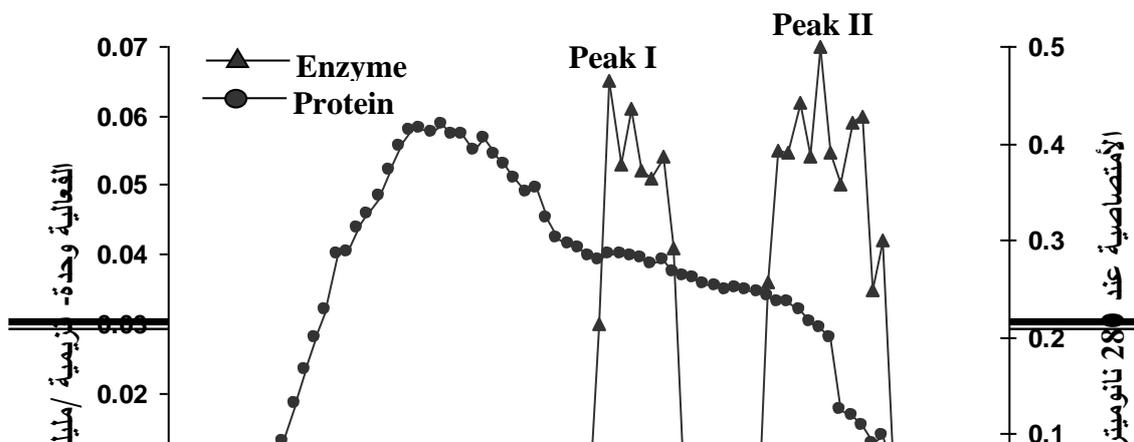
مراحل تنقية انزيم اليوريكيز:

يوضح الجدول (1) نتائج مراحل تنقية انزيم اليوريكيز، لوحظ ان الفعالية النوعية للانزيم الخام (0.189×10^{-3}) وحدة انزيمية/ملغم بروتين، أصبحت بعد الترسيب (2.3×10^{-3})، اما بعد إجراء عملية الفرز الغشائي اصبحت (3.588×10^{-3}) وحدة انزيمية/ملغم بروتين. تشير النتائج اعتمادا على مظهر الروغان elution profile المستحصل من تنقية الانزيم باستخدام المبادل الايوني السالب DEAE-cellulose الى وجود قمتين متميزتين للانزيم شكل (3). ظهرت الفعالية الانزيمية للقمة الاولى والثانية عند حجم الروغان (205-240) و (285-340) ملتر وفعالية نوعية مقدارها (5.92×10^{-3}) و (4.995×10^{-3}) وحدة انزيمية/ملغم بروتين على التوالي. بينما وجد الباحث (14) انه هناك ثلاث قمم بروتينية ضمت القمة البروتينية الثانية قمة انزيمية واحدة لليوريكيز المنقى من فطر *gliomastix gueg* بفعالية نوعية بلغت 428.7 وحدة انزيمية/ملغم في حين كانت هناك ثلاثة متماثلات لانزيم اليوريكيز المنقى بالترشيح الهلامي sephadex (G-100) من الـ Fungal flora (18)، ووجد الباحث (19) وجود حزمة انزيمية واحدة لانزيم اليوريكيز المنقى بـ DEAE-cellulose من بذور فول الصوليا Soybean.

الجدول(1): خطوات تنقية انزيم اليوريكيز من بذور البازاليا

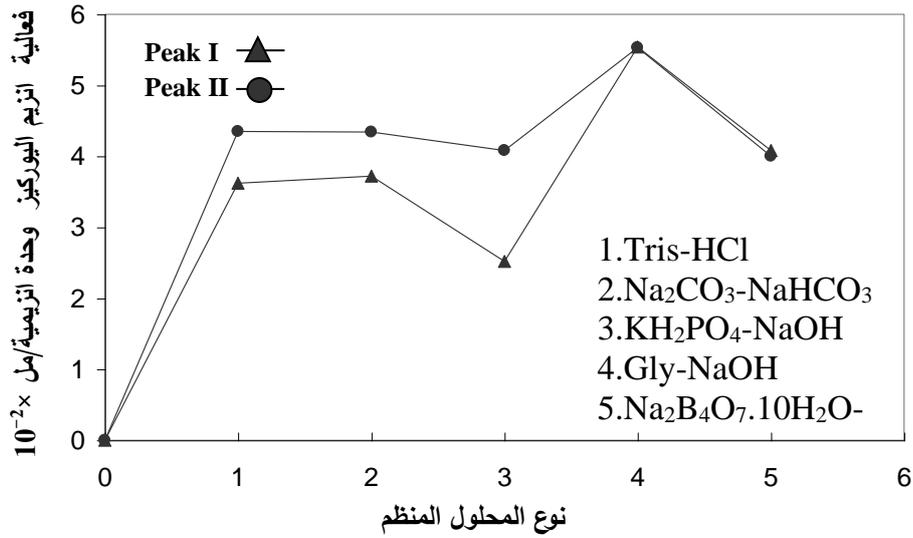
الاسترجاع للفعالية الكلية %	عدد مرات التنقية	الفعالية النوعية وحدة انزيمية/ملغم بروتين (10^{-3})	الفعالية الكلية وحدة إنزيمية*	الفعالية وحدة إنزيمية/مل	البروتين الكلي ملغم	الحجم الكلي	خطوات التنقية
100	1	0.189	0.13369	0.00133	705.6	100	الانزيم الخام
269.2	12.169	2.3	0.3599	0.024	155.84	15	الترسيب بكبريتات الامونيوم تشبع 70%
354.55	18.98	3.588	0.474	0.04017	132.1	11.8	الفرز الغشائي Dialysis
158.40	31.32	92.5	0.21177	0.00543	35.77	39	Peak I كروماتوغرافيا
249.59	26.43	995.4	0.33368	0.00547	66.795	61	Peak II التبادل الايوني

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



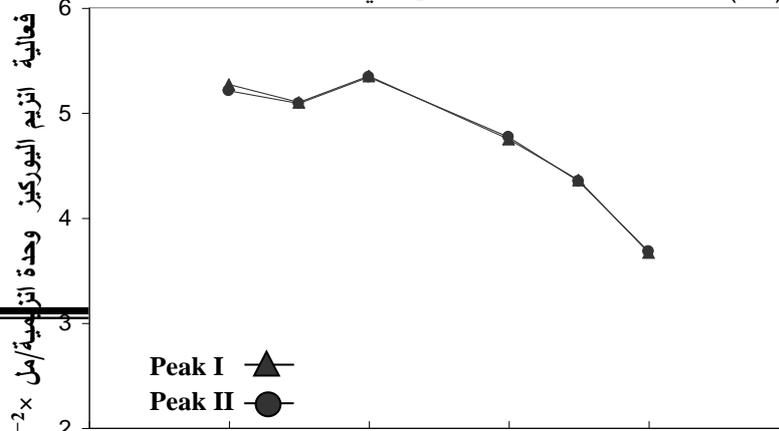
دراسة الظروف المثالية لفعالية الانزيم:-

بينت النتائج ان محلول Gly-NaOH المنظم كان الأفضل للمتماثلين كما موضح في الشكل (4) في حين كان المحلول المنظم الافضل هو صوديوم بورات للأنزيم الناتج من *gliomastix gueg* (14).

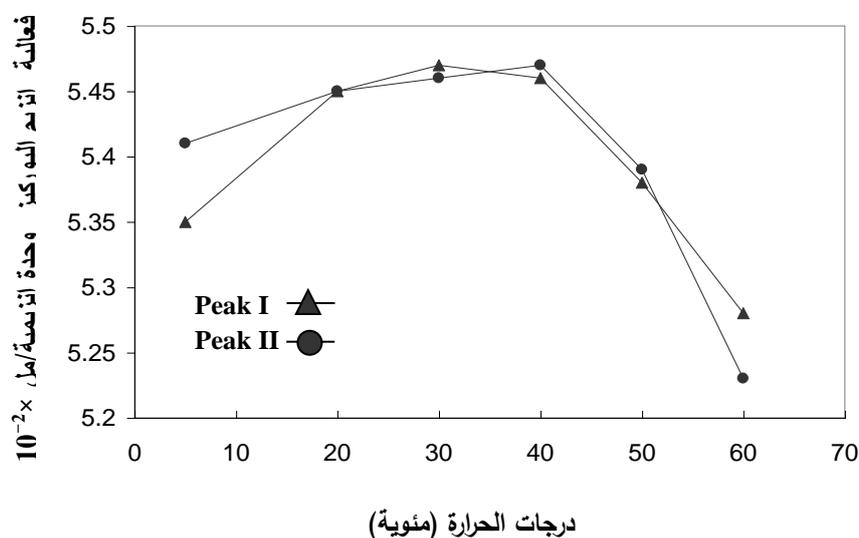


الشكل(4): تأثير المحلول المنظم على سرعة التفاعل الانزيمي

كما بينت النتائج ان اعلى فعالية تم الحصول عليها عند الدالة الحامضية pH=7 للمحلول المنظم Gly-NaOH للمتماثلين والموضحة في الشكل(5) في حين وجد الباحث Saeed (20) ان الدالة الحامضية المثلى هي 9 و 8.5 بالنسبة للمحلول المنظم.

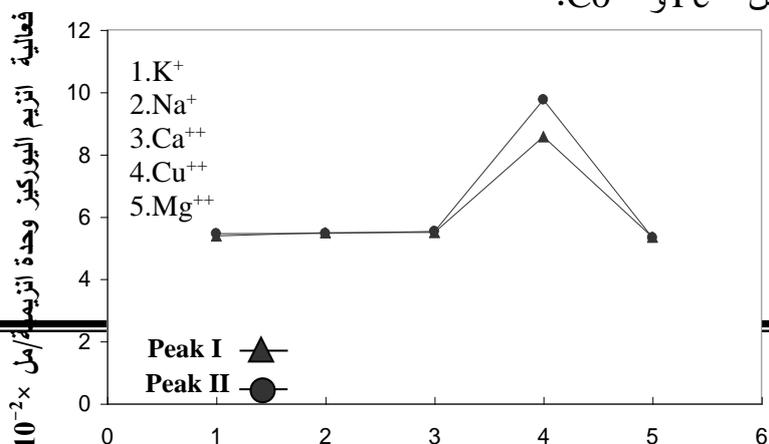


وعند حضن الانزيم في درجات حرارية مختلفة كانت درجة الحرارة 40°م هي الدرجة الحرارية المثلى للانزيم حيث كانت للمتماثلين الشكل التالي (6).



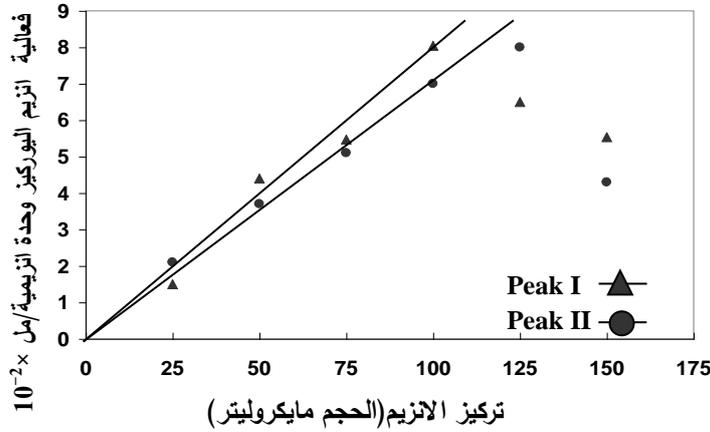
الشكل(6): تأثير درجة الحرارة على سرعة التفاعل الانزيمي

في حين وجد الباحث (18) ان درجة الحرارة المثلى كانت 35°م للانزيم المنقى من الـ **Fungal Floral**. وكان لأيون Cu^{2+} شكل (7) تاثير مميز في تنشيط التفاعل الانزيمي للمتماثلين بينما أشار (17) ان ايون الـ Ca^{2+} كان اكثر تنشيطا بين الايونات التي درست وكانت $(Co^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+}, K^{1+})$ حيث يمكن ان يكون لأيون النحاس الاسهام الاكبر في ثباتية الحالة الانتقالية للانزيم اثناء التفاعل الانزيمي(21)، بينما بين (20) انه تم تثبيط الانزيم عند اضافة ايونات مثل Fe^{2+} و Co^{2+} .



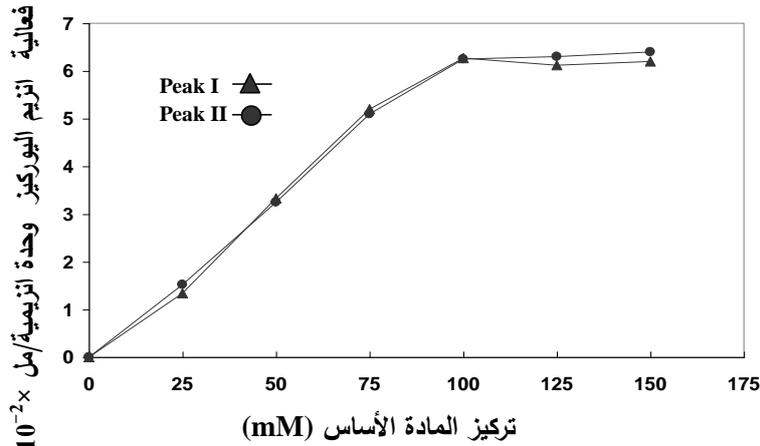
الشكل(7): تأثير الايون الموجب على سرعة التفاعل الانزيمي

كما درس تأثير تركيز الانزيم على سرعة التفاعل، اخذ حجوم مختلفة من الإنزيم المركز بالتجفيد حيث كان تركيز الانزيم 2.24 و 2.86 ملغم/مل للمتماثلين على التوالي. يبين الشكل (8) ان 100 و 125 مايكروليتر من الانزيم عندها كانت سرعة التفاعل اعلى للمتماثلين على التوالي.



الشكل(8): تأثير تركيز الانزيم على سرعة التفاعل الانزيمي

من خلال رسم ميكائيليس-مينتون شكل (9) بينت النتائج خضوع كلا المتماثلين للمعادلة وكانت الفعالية القصوى V_{max} عند التركيز 100 مايكرومولار هي (6.25×10^{-2}) وحدة انزيمية/مل ومعامل ميكائيليس مينتون $(K_m=50)$ مل مولار للمتماثلين.



الشكل(9): - الجرعة الفعالة: تأثير تركيز المادة الأساس على سرعة التفاعل الانزيمي

يبين الجدول (2) ان الجرعة الفعالة للأنزيم 400 مايكروغرام/كيلوغرام وزن الجسم حيث كانت الأكثر تخفيضاً لمستوى حامض اليوريك وهذا يشير إلى إمكانية عمل الإنزيم في جسم الفئران. حيث تشير النتائج في جدول (2) إلى المعدل \pm الانحراف القياسي.

جدول(2): تحديد الجرعة الانزيمية الفعالة لخفض مستوى حامض اليوريك في مصل دم الفئران

المجموعة السادسة	المجموعة الخامسة	المجموعة الرابعة	المجموعة الثالثة	المجموعة الثانية	المجموعة الأولى	المجموعة (5) فئران
1000 Mean \pm SD	800 Mean \pm SD	600 Mean \pm SD	400 Mean \pm SD	200 Mean \pm SD	سيطرة غير معاملة Mean \pm SD	جرعة الانزيم μ g/kg من وزن الجسم
d 450.05 \pm 17.9	c 338.3 \pm 20.1	b 250 \pm 13.61	a 163.2 \pm 15.1	a 181.015 \pm 20	c 322.14 \pm 10.14	تركيز حامض اليوريك (مليمول/ليتر)

الحروف المختلفة افقياً تشير الى الاختلاف المعنوي عند مستوى احتمالية $p \leq 0.05$

حقن الحيوانات:

تمت معاملة الحيوانات بمتماثل الانزيم II بالجرعة الفعالة في الجدول (2) (عن طريق الحقن في التجويف البريتوني) بالإضافة الى العقار Allopurinol (بجرعة 1.53 ملغ/كغم من وزن الجسم).

جدول (3): أنظمة معاملة الفئران بالإنزيم المنقى وعقار الألوپيورينول

المجموعة الخامسة	المجموعة الرابعة	المجموعة الثالثة	المجموعة الثانية	المجموعة الأولى	المجموعة (5) فئران
حقن كل من الانزيم والعقار Mean \pm SD	حقن الانزيم وتجريب العقار Mean \pm SD	تجريب العقار فمويًا Mean \pm SD	حقن الانزيم Mean \pm SD	سيطرة غير معاملة Mean \pm SD	المعاملة بالأنزيم والعقار
d 143.27 \pm 13.71	c 198.99 \pm 2.91	b 241.95 \pm 17.0 6	b 294.19 \pm 30.65	a 383.53 \pm 23.09	تركيز حامض اليوريك (مليمول/ ليتر)

الحروف المختلفة افقياً تشير الى الاختلاف المعنوي عند مستوى احتمالية $p \leq 0.05$

يوضح الجدول (3) ان المعاملة بالانزيم والعقار ادت الى انخفاض معنوي في مستوى حامض اليوريك في مصل دم الفئران مقارنة مع مجموعة السيطرة، وعند مقارنة أنظمة معاملة الحيوانات يبين الجدول (3) انه عند حقن كل من الانزيم وعقار Allopurinol المعروف في علاج داء النقرس الذي يتسم بارتفاع مستوى حامض اليوريك (22) كان له التأثير الأكبر في خفض مستوى حامض اليوريك ويدل ذلك ان الحقن في التجويف البريتوني أفضل من التجريب الفموي وله تأثير مباشر على اكسدة حامض اليوريك باستخدام انزيم اليوريكيز والعقار معاً والذي يعمل على تثبيط أنزيم الزانثين اوكسيديز المنتج لليوريك (23). كما يوضح الجدول انه للأنزيم تأثير مشابه للعقار من حيث السيطرة على مستوى اليوريك بالمعاملة بهما كل على حدة، لكن الأفضلية كانت عند معاملة الحيوانات بنظام مزدوج للعقار والأنزيم معاً حيث كان التقارب في التأثير واضح لكلا النظامين.

References

- 1) Yong C., Yan-fa M., Jin-bao T., Tong-yi S., Feng-xiang S. and Shu-juan L. African J.Biotech. Vol. 9(30), pp. 4788-4795. (2010).
- 2) Su-Hua H. and Tung-Kung W.. Eur. J. Biochem. 271, 517–523. 2004.
- 3) Nelson D.L., Cox M.M., “Lehninger’s principles of biochemistry”, 4th ed. Freeman, New York, USA.(2004).
- 4) Gochman N. and Schmtz M.T.,Clin-Chem.,17:1154-1159. (1971).
- 5) Bomaki J.S. and Clark M.A. Curr.Rheumal. Reports G:210-217. (2004).
- 6) Susan J. Kelly, Marielle D, Michael I. Oliverio L. David W., *et al.* J Am Soc Nephrol 12: 1001–1009. (2001).
- 7) Wu X., Lee C.C., Muzny D.M., Caskey C.T., Proc Natl Acad Sci USA 86: 9412–9416. (1989).
- 8) Roubenoff R., *Rheum Dis Clin North Am* 16: 539–550. (1990).
- 9) Schubert K.R., Boland M.J., The Ureides. In PK Stumpf, EE Conn,eds, The Biochemistry of Plants, Vol. 16. Academic Press, New York, pp 197-282. (1990).
- 10) Duke J.A., Hand book of legumes of world economic importance. Plenum press, New York , p. 199-202.(1981).
- 11) Adamek V., kralova B., Suchova M., Valentova O. and Demnerova k. Journal of Chromatography. 497: 268- 275.(1989).
- 12) الجوكا، ايمان سعيد شمعون. فصل ودراسة المركبات الفعالة من بذور البازاليا *Pisum sativum* في الفئران المصابة بداء السكر و المعرضة للكرب التأكسدي. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل، (2007).
- 13) Schacterle G. R. and Pollack J.K., Anal., Biochem., Vol. 51: pp 654- 655. (1973).
- 14) Atalla, M.M., Eman R.H., Farag M. M. and Nehad E.Ahmed., Gate2.Biotech., 2(11)1-13.(2010).
- 15) Robyt F.J. and White J.B. "Biochemical techniques, theory and practice" Brookes/Cole publishing company, Monterey, California, pp. 115-118. (1987).
- 16) Atta A.H., Shalaby M.A., Shokry I.M. and Ahmad A.A "Interaction between oral hypoglycemic and antibiotics on blood glucose level of normal fasted and alloxan-diabetic rats". Vet. Med., J. 31(1):11-18.1983.
- 17) Steel R.G. and Torrie J.H., "Principles and procedures of statistics biometrical approach". 2nd ed., Mc Graw. Hill Inc., Singapore, p.183. (1984).
- 18) Neveen S. Geweely and Lubna S. Nawar. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 5(10): 220-230(2011). ISSN 1991-817.
- 19) Montalbin P., Redondo J., Caballero JL., Cañardenas J. and Pineda M. Planta 202: 277±283. (1997).
- 20) Saeed M.H., Abdel-Fatah Y., Gohar M.and Elbaz A.M., Polish J. Microbiol.53 (1): 45-52. 2004.
- 21) Murray R.K., Bender D.A., Bothman K.M., Kennelly P.J., Rodwell V.W. and Weil P.A. "Harpers' Biochemistry". 28th ed., McGraw Hill Lange,. P. 82. (2009).
- 22) Hershfield MS. "Gout and uric acid metabolism". In: *Cecil Textbook of Medicine*, 21st Ed., edited by Goldman L, Bennett JC, Philadelphia, WB Saunders, pp 1541–1548. (1999).
- 23) Roubenoff R: Gout and hyperuricemia. *Rheum Dis Clin NorthAm* 16: 263. 1987.