Journal of Education and Science (ISSN 1812-125X), Vol: 30, No: 1, 2021 (58-71)

Kinetic and inhibitory study of partially purified lipoxygenase from epilepsy patient's serum

Ahmed Ali Saleh Al-Fayyadh [*1], Nashwan Ibrahem Abo Shahine [2]

[1*] Ministry of Education, Nineveh Education Directorate, Mosul, Iraq
[2] Department of Chemistry, College of Education for Pure Sciences, University of Mosul, Mosul, Iraq

E-mail: [1*] ahmedofficer88@gmail.com , [2] nashwan78ibrahem@uomosul.edu.iq

(Received July 24, 2020; Accepted August 31, 2020; Available online March 01, 2021)

DOI: 10.33899/edusj.2020.127778.1093, © 2020, College of Education for Pure Science, University of Mosul.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Abstract

This research was included partially purification of lipoxygenase (LOX) from serum of patients with epilepsy using ammonium sulfate precipitation, dialysis and ion-exchange chromatography with specific activity (0.751 U / mg), (0.935 U/mg) and (2.60 U/mg) respectively. Optimum conditions for enzyme activity were determined. The best enzyme activity was showed at 7 minutes of incubation time, 3 minutes of reaction time, pH = 7, temperature 40C° and finally substrate concentration (linoleic acid) was (1.2 mmol/L). By applying Michaelis-Menten and Lineweaver-Burk Equations, Michaelis-Menten constant (km) and Vmax values were found 0.3 (mM) and (0.9 U/ml) respectively. Also this study included the effect of some antiepileptic drugs such as valproic acid, carbamazepine and acetozolamide. Acetazolamide showed the highest inhibition of lipooxygenase activity(٪96.2), valproic acid(95.6) and Carbamazapine(٪95.1) . Inhibition type was studied and the result showed noncompetitive inhibition by using Lineweaver-Burke plot for all above drugs.

Keyword: Epilepsy, Lipoxygenase, inhibition, purification, antiepileptic drugs

دراسة حركية وتثبيطية لإنزيم الليبواوكسيجينيز المنقى جزئيا من مصل دم مرضى الصرع

احمد علي صالح الفياض *1 و نشوان ابراهيم عبو شاهين2

[*1] وزارة التربية, مديرية تربية محافظة نينوى
[2] قسم الكيمياء , كلية التربية للعلوم الصرفة, جامعة الموصل

الخلاصة

تضمنت الدراسة تنقية إنزيم الليبواوكسيجنيز جزئيا من مصل دم المرضى المصابين بالصرع باستخدام تقنية الترسيب بكبريتات الامونيوم والفرز الغشائي وكروموتوكرافيا التبادل الايوني , كانت الفعالية النوعية (0.751 U/mg) (0.935 U/mg) (2.60 U/mg) على التوالي. حددت الظروف المثلى لفعالية الانزيم واظهرت النتائج ان اعلى فعالية للانزيم عند الدقيقة السابعة من زمن الحضن , وان زمن التفاعل خلال ثلاث دقائق، الاس الهيدروجيني pH =7.4 ,درجة حرارة 40 °C وتركيز المادة الاساس (حامض اللينوليك) (1.2 ملي مول/لتر), بتطبيق معادلتي ميكيلس مينتن ولاينويفر – بيرك، ثابت ميكلس مينتون والسرعة القصوى 0.3mM و 0.9 U/ ml

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

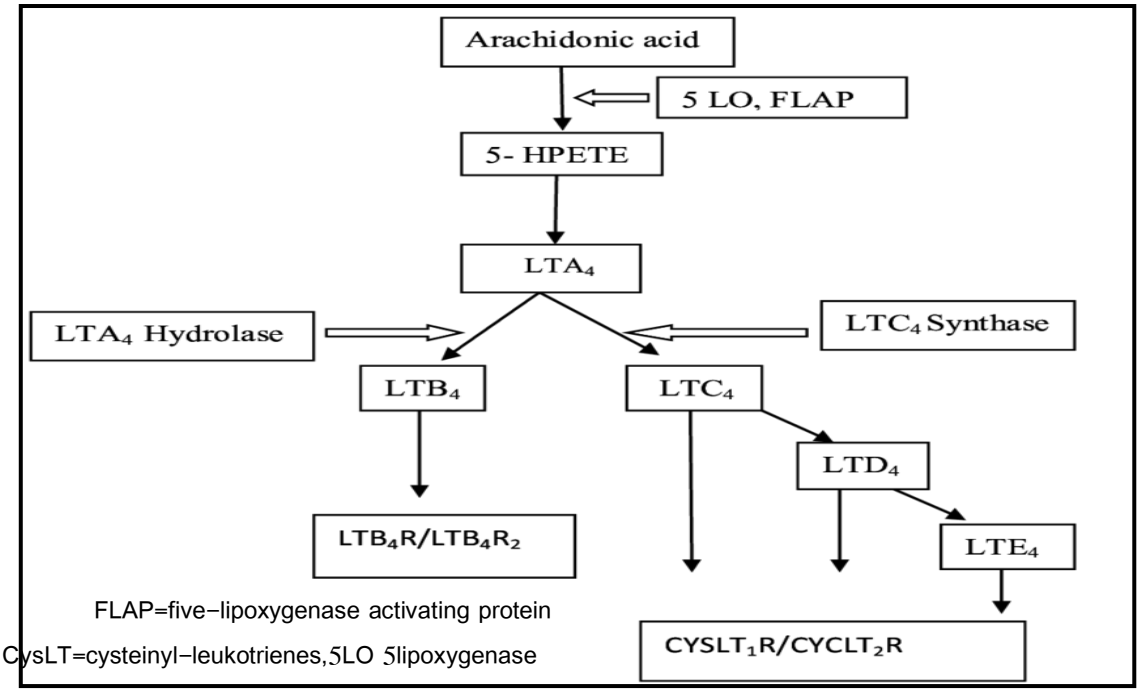
على التوالي . كذلك تضمنت الدراسة دراسة تأثير بعض العقاقير المضادة للصرع مثل حامض فالبرويك , كارامازابين , الاسيتوزولاميد. إذ اظهر عقار اسيتوزولاميد اعلى نسبة تثبيط (96.2٪) لفعالية انزيم الليبواوكسيجنيز، حامض فالبرويك (95.6٪) والكارامازابين (95.1٪). تمت دراسة نوع التثبيط وأظهرت النتائج باستخدام معادلة لينويفر- برك ان التثبيط غير تنافسي ولجميع العقاقير أعلاه.
الكلمات الدالة : الصرع , ليبواوكسيجنيز , تنقية، تثبيط، أدوية مضادة للصرع.

المقدمة Introduction

الصرع هو اضطراب شائع في الجهاز العصبي المركزي يصيب الذكور والاناث بجميع الاعمار واكثر شيوعا في الاطفار وكبار السن [1]. ويمكن تصنيف الصرع الى نوعين الصرع العام(المعمم) Generalized والصرع الجزئي (البؤري) Focal إذ تؤثر نوبات الصرع العام على مجموعة من الخلايا في كلا جانبي الدماغ , اما نوبة الصرع البؤري عادة ما تبدأ في مجموعة خلايا على جانب واحد من الدماغ , وتنشأ نوبات الصرع عن طريق الشذوذ او التزامن او الافراط في النشاط العصبي في الدماغ مما يسبب اضطراباً مؤقتاً في الطريقة التي يعمل بها الدماغ بشكل طبيعي[2] , وجد ان الصرع قد يحدث بعد نوبة واحد غير مبررة Unprovoked في حالات سريرية معينة مثل السكتة الدماغية , عدوى الجهاز العصبي المركزي , او الصدمة [3,4]. يحدث الصرع نتيجة الاصابات العصبية او العجز او تشوهات الدماغ بما في ذلك اصابة الراس وما بعد العدوى والاورام, إذ إن 20–30% هي حالات معروفة او مشتبه بها[5] في حين أن الـ 70–80% فتنشأ من حالة الغيبوبة بسبب العجز العصبي الواضح والاعاقة الذهنية واصابة الدماغ , العوامل الوراثية (الجينية) تلعب دورا رئيساً كمسبب للصرع مجهول السبب [6,7]. إن خيارات العلاج المتاحة والمتوفرة هي الادوية المضادة للصرع والنظام الغذائي الكيتوني وعلاجات التحفيز العصبي [5].

انزيمات Lipoxygenases LOXs (EC 1.13.11.12) بروتينات تضم في تركيبها الحديد غير الهيمي وجزيئة اوكسجين , تنتشر على نطاق واسع في النباتات والحيوانات. تحفز LOXs إضافة ذرتي اوكسجين الى الاحماض الدهنية المتعدد غير المشبعة التي تحتوي على cis –cis-1,4-pentadiene لإنتاج هيدروبيروكسيدات الاحماض الدهنية [8,9] , و بينت بعض الدراسات ان انزيم الليبواوكسيجنيز يلعب دورا مهما في الالتهابات من خلال توليد العديد من المركبات الوسطية الدهنية الفعالية البيولوجية تدعى الليكوترايينات Leukotriens (LTs) [10]. يعمل انزيم LOX على تحويل حامض الاراكيدونيك الى 5− hydroperoxyeicosatetraenoic acid (5-HPETE) الذي يتحول بسرعة ليكون الليكوتراين A_4 leukotriene A_4 (LTA_4) ثم يتم تحويل (LTA_4) الى leukotrieneC_4 (LTC_4) بواسطة leukotrieneC_4-synthase (LTC_4-synthase) و (LTA_4-hydrolase) leukotrieneA_4- hydrolase بواسطة (LTB_4) leukotrieneB_4 ويمكن تحويل (LTC_4) الى ابعد من ذلك حيث يتم تحويله الى leukotrieneD_4 (LTD_4) و leukotrieneE_4 (LTE_4) بواسطة انزيمات اخرى كما هو موضح في الشكل (1) [11] تم العثور على زيادة في تركيز LTD_4 ي خلل الحاجز الدموي الدماغي [12] الذي يرتبط به التهاب الاعصاب ومرض الصرع [13]. وان مثبطات مساري LOX\COX Lipoxygenase\ Cycloxygenase تشير الى انخفاض اليكوترايينات التي تلعب دورا في تقليل تكوين نوبات الصرع [14,15] .

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/



شكل (1): التخليق الحيوي لليكوترايينات [16]

الهدف من البحث Aim of the research

تنقية انزيم الليبواوكسيجينيز من مصل دم مرضى الصرع ودراسة الظروف المثلى المؤثرة على الفعالية ومن ثم الكشف عن تأثير بعض الادوية المضادة للصرع على الفعالية الانزيمية

المواد وطرائق العمل Materials and methods

1- تنقية انزيم الليبواوكسيجنيز LOX

تحضير العينة : جمعت 10 عينات لمرضى ذكور مصابين بالصرع مشخصين بإشراف طبي في وحدة الجملة العصبية لمستشفى ابن سينا التعليمي في محافظة نينوى بإعمار (25 – 45) إذ تم سحب 5 ملليتر من دم كل مصاب ومن ثم وضع في أنابيب اختبار غير حاوية على مضاد تخثر الدم، فصل مصل الدم في جهاز الطرد المركزي فائق السرعة المبرد (Ultra – cooling Centrifuge) من شركة Heraeus –christ Gmbh الألمانية. بسرعة 3000xg لمدة 10 min بعدها سحب مصل الدم بواسطة الماصة الدقيقة ووضع في أنابيب بلاستيكية جافة , ثم حفظ في بدرجات حرارة 4°م [17,18].

البروتين الكلي: قدرت كمية البروتين باتباع طريقة فولن –لاوري Folin –Lowry method المحورة من قبل الباحثين [19].

فعالية انزيم LOX:- قدرت فعالية انزيم الليبواوكسيجنيز المنقى جزئيا من مصل دم مرضى الصرع باتباع طريقة الباحث [20] باستخدام حامض اللينوليك كمادة اساس وبمتابعة الزيادة في الامتصاصية عند طول موجي 234nm الناتجة عن تكوين الدايينات.

2- خطوات التنقية:

اخذ 11 مل من مصل مجموعة من المرضى واجريت عليها خطوات التنقية الآتية :

1- الترسيب بكبريتات الامونيوم: رسب البروتين بتركيز 65% كبريتات الامونيوم المشبعة بالإضافة التدريجية بعدها ترك بدرجة حرارة 4°م 24 ساعة [21] ، فصل الراسب بجهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة 3000xg لمدة 15 min , أُهمل الراشح

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

وأُخذ الراسب و تم إذابته باقل كمية من محلول الفوسفات المنظم بتركيز 20mmol عند pH = 6.8 , بعدها قُدرت كمية البروتين وفعالية الأنزيم.

2- الفرز الغشائي: نقي محلول الراسب البروتيني باستخدام كيس الفرز الغشائي [21] ضد محلول الفوسفات المنظم عند pH = 6.8 فترة 24 ساعة في حمام ثلجي مع مراعاة تبديل المحلول المنظم كل 5 ساعات , بعدها قُدرت كمية البروتين وفعالية الأنزيم .

3- التنقية باستخدام المبادل الايوني السالب DEAE-cellulose A50 [22] : تمت التنقية باستخدام عمود الفصل بأبعاد 2.5x40 cm بإمرار محلول الفوسفات المنظم عند pH=6.8 باستمرار , ثم جمعت الاجزاء بواقع 5 مليليتر بمعدل جريان 60 مل/ساعة, بعدها قُدرت كمية البروتين وفعالية الانزيم فيه.

جمعت حزمة الانزيم بعد اجراء عملية التنقية .

4- الظروف المثلى لأنزيم الليبواوكسيجنيز LOX: دُرس تأثير كل من تركيز الانزيم، درجة الحرارة، الدالة الحامضية، زمن الحضن، زمن التفاعل وتركيز المادة الاساس على الفعالية الانزيمية لـLOX المنقى جزئيا .

5- تثبيط انزيم LOX: تمت دراسة تأثير بعض العقاقير المضادة للصرع فالبوريك ، كاربامازابين و اسيتولازاميد على فعالية LOX بتحضير تراكيز مختلفة منها (5, 10 ,20,15, 25, 30, 35) ملي مولار لتحديد التركيز التثبيطي الامثل. اضيف 100 مايكروليتر من المثبط الى عينة الانزيم [23] بعدها قيست الفعالية كما في الفقرة 1.

النتائج والمناقشة Results and discussion

1- تنقية انزيم الليبواوكسيجنيز .

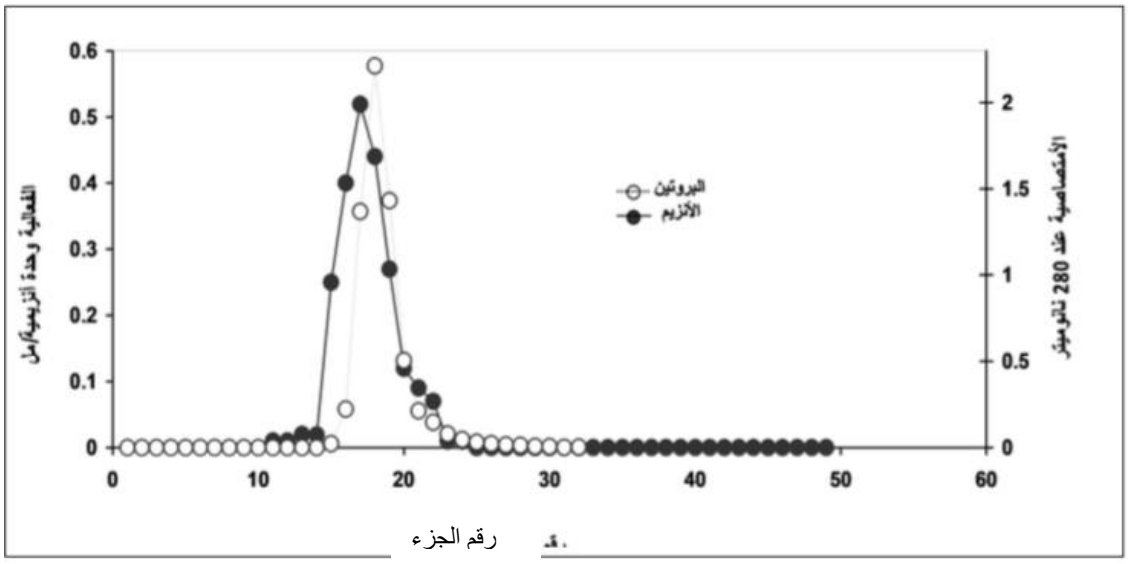
يوضح الجدول (1) نتائج تنقية انزيم الليبواوكسيجنيز جزئيا من مصل دم المرضى المصابين بالصرع واظهرت نتائج التنقية بالترسيب بكبريتات الامونيوم الصلبة عند إضافتها تدريجيا إلى محلول المستخلص الخام بدرجة تشبع 65% , ان الفعالية النوعية لإنزيم LOX ازدادت بعد الترسيب الى (0.751 U/mg) مقارنة بالفعالية النوعية للإنزيم الخام والتي كانت قبل الترسيب (0.183 U/mg) اي ان عدد مرات التنقية ازدادت بعد الترسيب بمقدار (4.1) مرة وان مقدار استرجاع الفعالية الكلية للإنزيم بلغت (156.83%) بالمقارنة مع الفعالية الكلية للإنزيم الخام. بعدها استعملت تقنية الفرز الغشائي (الديلزة) للتخلص من المتبقي من كبريتات الامونيوم وبقية المركبات ذات الاوزان الجزيئية الاقل من 10 kD لزيادة التنقية اذ لوحظ ارتفاع الفعالية النوعية لإنزيم الليبواوكسيجنيز فأصبحت (0.935 U/mg) اي انها تضاعفت بمقدار(5.1) مرة عما كانت علية قبل التنقية, اما مقدار استرجاع الفعالية الكلية للإنزيم بلغ (171.9%) مقارنة بالفعالية الكلية للإنزيم الخام. وبعدها استخدمت تقنية كروموتوغرافيا التبادل الايوني وظهرت حزمة بروتينية انزيمية واحدة كما هو موضح في الشكل (2) بفعالية نوعية (2.60 U/mg) وبحجم روغان Elution volume (15-23 ml) من هذه النتيجة تبين ان عدد مرات التنقية تضاعفت بعد عملية التبادل الايوني بمقدار (14.2) , وان مقدار استرجاع الفعالية الكلية بلغ (221.81%) مما هو عليه في المصل الخام في حين وجد في دراسة نقي فيها الانزيم ان الفعالية النوعية لإنزيم الليبواوكسيجنيز المنقى جزئيا من مصل دم مريض بالربو كانت (2.68 U/L) بعدد مرات تنقية (10.3) بعد استخدام تقنية كروموتوغرافيا التبادل الايوني [24], كما وجد [25] ان الفعالية النوعية باستخدام تقنية التبادل الايوني 1230×10^{-4} وحدة انزيمية/ ملغم بروتين , بعدد مرات تضاعف 18.08 للإنزيم المنقى من مستخلص قشرة نبات الفستق البري.

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

الجدول (1) يبين مراحل تنقية انزيم LOX من مصل مرضى الصرع

خطوات التنقيــة	الحجم الكلي (مل)	البروتين (ملغم/م ل)	البروتين الكلي (ملغم)	الفعالية U/ml	الفعالية الكلية وحدة أنزيمية*	الفعالية النوعية** وحدة أنزيمية/ملغم بروتين ×100	عدد تضاعف مرات التنقية	استرجاع الفعالية %
مصل الدم الخام	11	62.8	690.8	0.115	1.265	0.183	-	100
الترسيب بكبريتات الأمونيوم	16	16.5	264	0.124	1.984	0.751	4.1	156.83
الفرز الغشائي	15	15.5	232.5	0.145	2.175	0.935	5.1	171.9
التبادل الأيوني DEAE – سليلوز	38.4	2.8	107.5	0.073	2.806	2.60	14.2	221.81

* الوحدة الأنزيمية U : تشير إلى كمية أنزيم الليبواوكسيجنيز الذي يؤكسد مايكروموﻻً واحدا من المادة الأساس (حامض اللينوليك) في الدقيقة الواحدة . **الفعالية النوعيةU/mg: وهي عدد وحدات الانزيم الموجودة في ملغم من البروتين



الشكل (2) : نموذج الاسترداد المستحصل من تنقية أنزيم LOX لمصل دم المصابين بالصرع بواسطة كروماتوغرافيا التبادل الأيوني السالب باستخدام المبادل DEAE– سيليلوز المعبأ بعمود الفصل ذي الأبعاد (2.5×40) سم وبمعدل سريان 60 مل/ساعة حجم الجزء 5ml.

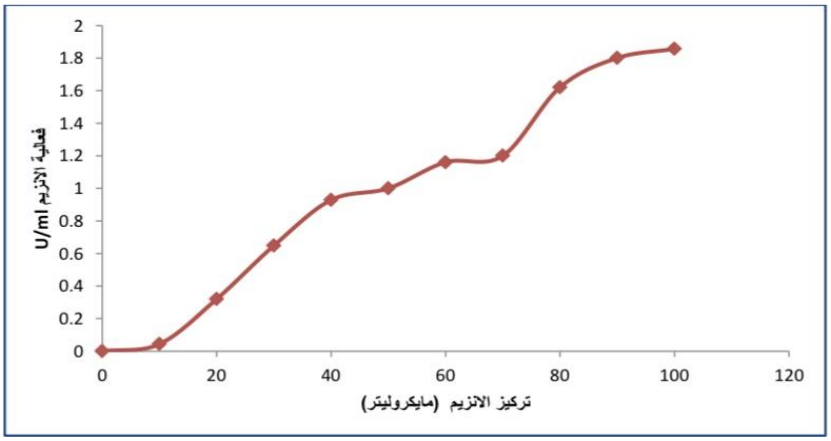
2– دراسة الظروف المثلى لفعالية انزيم الليبواوكسيجنيز

تأثير تركيز الانزيم

قيست فعالية انزيم الليبواوكسيجنيز (LOX) باستعمال تراكيز مختلفة بأخذ حجوم من الانزيم المنقى جزئيا من مصل دم مرضى الصرع تراوحت (100–0 مايكرليتر), لوحظ ان سرعة التفاعل تزداد بزيادة تركيز انزيم (LOX) وكما هو موضح في الشكل(3) , إذ يتفق مع اسس حركيات الانزيم في الادبيات [26,27] على أن سرعة التفاعل المحفز بالإنزيم تتناسب تناسبا طرديا مع تركيز الانزيم

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

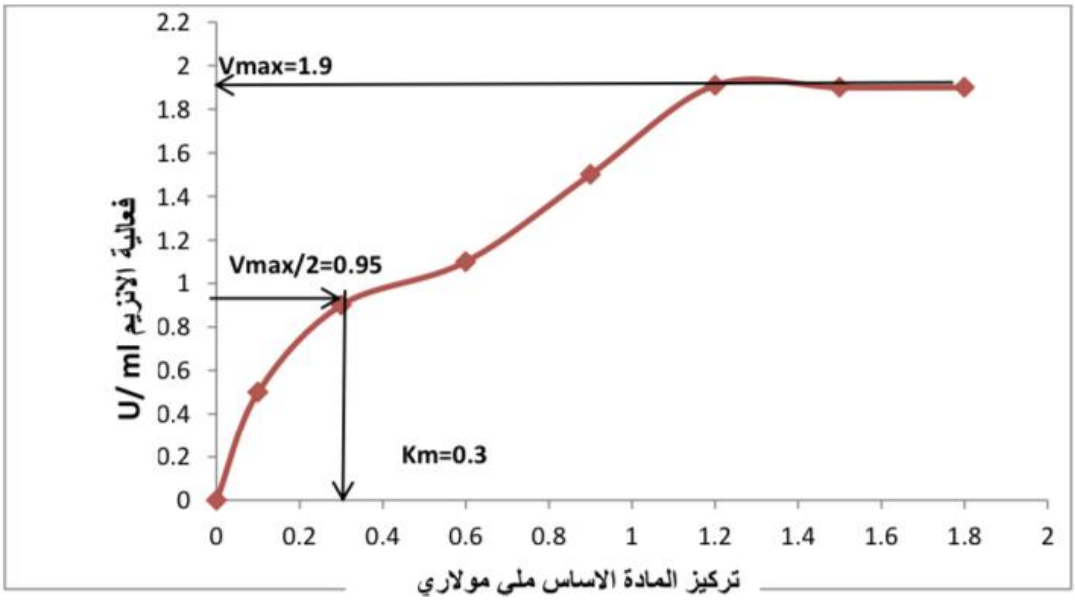
عندما تكون المادة الاساس متوفرة في وسط التفاعل, وهذا يتفق مع ما توصل إليه الباحثون [24] بالنسبة للأنزيم المنقى من مرضى الربو.



شكل (3) تأثير تركيز الأنزيم على فعالية إنزيم LOX المنقى من مرضى الصرع

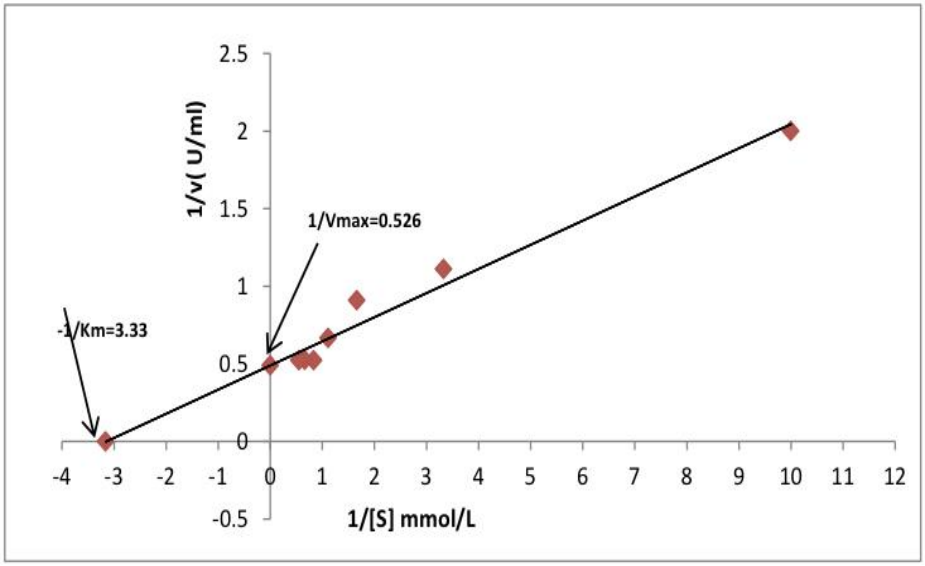
تأثير تركيز المادة الاساس .

قيست فعالية انزيم (LOX) باستعمال تراكيز مختلفة من مادة الاساس حامض اللينوليك Linolic acid تتراوح بين (2−0 ملي مولار) ، يبين الشكل (4) ان زيادة تركيز المادة الاساس ادى الى زيادة سرعة التفاعل الانزيمي وصولا الى قيمة معينة لا تحدث بعدها زيادة في سرعة التفاعل مهما زاد تركيز المادة الاساس يطلق على السرعة عند اعلى تركيز من المادة الاساس بالسرعة القصوى (Vmax) للأنزيم التي عندها يصل الانزيم للتشبع بالمادة الاساس [26]كما يبن الشكل (4) وباستخدام رسم ميكايليس−مينتون ان تركيز حامض اللينوليك كان عند تركيز 1.2 mM، وان قيمة Vmax=1.9U/ml وان ثابت مكيليس Km=0.3mM كما موضح في الشكل(5) بينما وجد في دراسة نقي فيها انزيم الليبواوكسيجنيز من قشرة نبات الفستق البري ان قيمة Km=0.166mM وان قيمة Vmax=0.0277U/ml [25]



شكل (4) :رسم ميكائيليس−مينتون يوضح تأثير تركيز حامض اللينوليك على سرعة تفاعل انزيم LOX

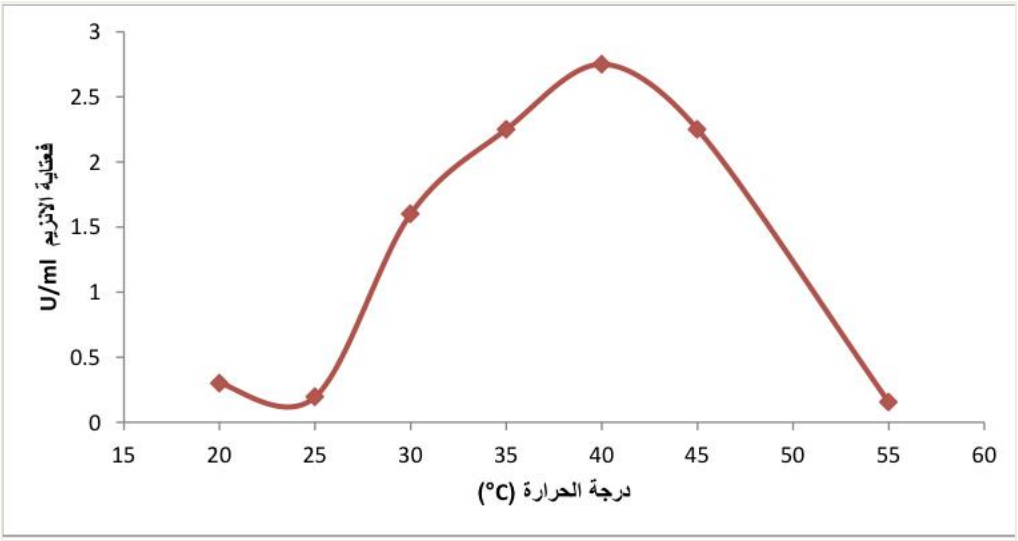
Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/



شكل (5) : رسم لاينويفر– بيرك يوضح تاثير تركيز حامض اللينوليك على سرعة تفاعل انزيم LOX

تأثير درجة الحرارة

بدرجات حرارة مختلفة قيست فعالية انزيم الليبواوكسيجنيز واظهرت النتائج المبينة في الشكل (6) ان درجة الحرارة المثلى للإنزيم هي (40°C)، انخفضت الفعالية بشكل ملحوظ بعد هذه الدرجة التي تعزى لحصول مسخ (Denaturation) في طبيعة الانزيم نتيجة تفكك الاواصر الهيدروجينية والقوى الاخرى المسؤولة عن الحفاظ على التركيب الرباعي ومن ثم فقدان فعالية الانزيم [21], وهذه النتيجة تتفق مع ما توصل اليه الباحثون [24] لأنزيم الليبواوكسيجنيز المفصول من مصل دم مرضى الربو والباحثين [28] للأنزيم المفصول من دقيق القمح , وفي دراسة بينت ان افضل درجة حرارة لفعالية انزيم الليبواوكسيجنيز المستخلص من الطماطم كانت (25°C)[29] .



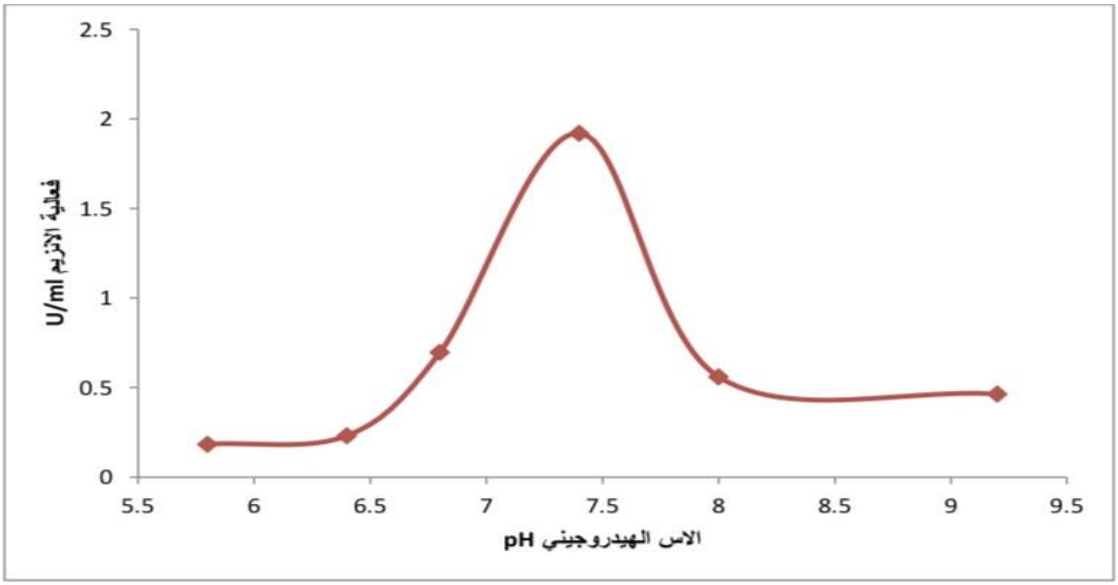
شكل (6) :تأثير درجة الحرارة على فعالية إنزيم LOX المنقى جزئيا من مصل الدم

تأثير الدالة الحامضية pH

قيست فعالية انزيم (LOX) في بيئات حامضية مختلفة لمحلول الفوسفات المنظم حيث يوضح الشكل (7) الى ان اعلى فعالية لإنزيم (LOX) كانت عند الدالة الحامضية pH=7.4 , إذ ان كل انزيم لديه دالة حامضية معينة يظهر عنده اعلى فعالية تسمى الدالة الحامضية المثلى Optimum pH [30] وعند استخدام اس هيدروجيني عالي او واطئ جدا يؤدي الى فقدان فعالية الانزيم

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

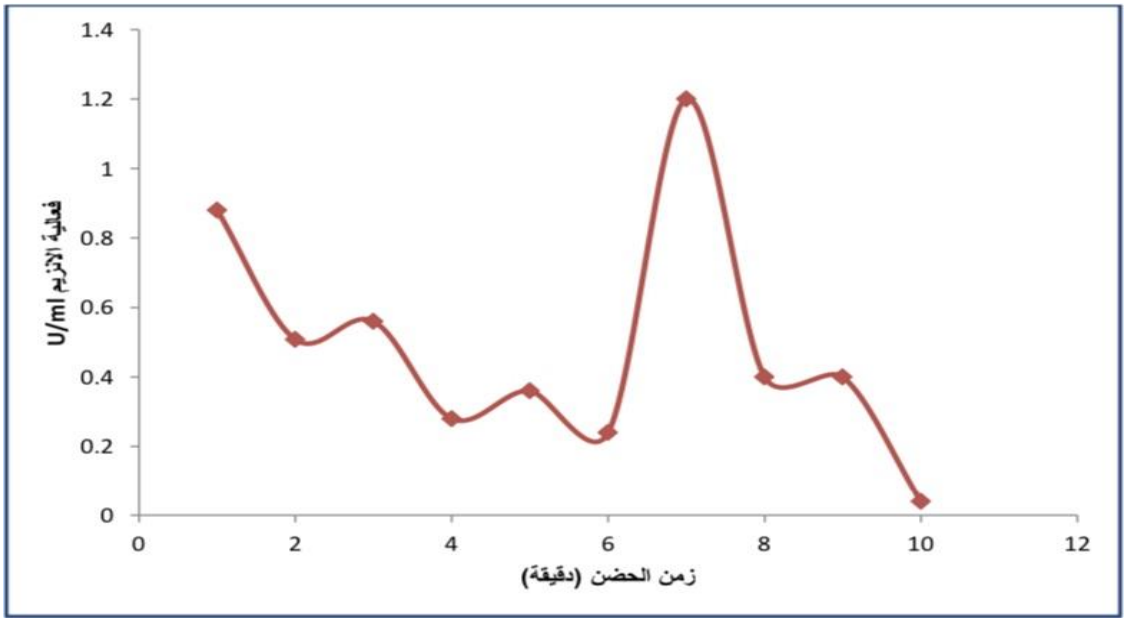
اما بسبب حدوث مسخ او تشوهات لطبيعة الانزيم. كما اشار الباحثون [24] الى ان الدالة الحامضية المثلى لانزيم الليبواوكسيجنيز المعزول من مصل دم مرضى الربو pH=8 بينما كانت للأنزيم المنقى من الفول السوداني تتراوح بين 8 و8.5 [31],أما الأنزيم المعزول من الكبيبة الكلوية للإنسان أظهر أعلى فعالية عند pH=9 والجرذان عند pH=7.5 [32]



شكل (7) :تأثير الاس الهيدروجيني على فعالية إنزيم LOX

تأثير زمن الحضن :

قيست فعالية انزيم (LOX) بفترات حضن مختلفة واشارت النتائج الموضحة في الشكل (8) , الى ان افضل فعالية لإنزيم (LOX) كانت عند الدقيقة السابعة من فترة الحضن. وتبين في دراسة نُقي فيها انزيم الليبواوكسيجنيز من لب نبات الفستق البري ان افضل زمن حضن للأنزيم كان عند الدقيقة الخامسة [25].

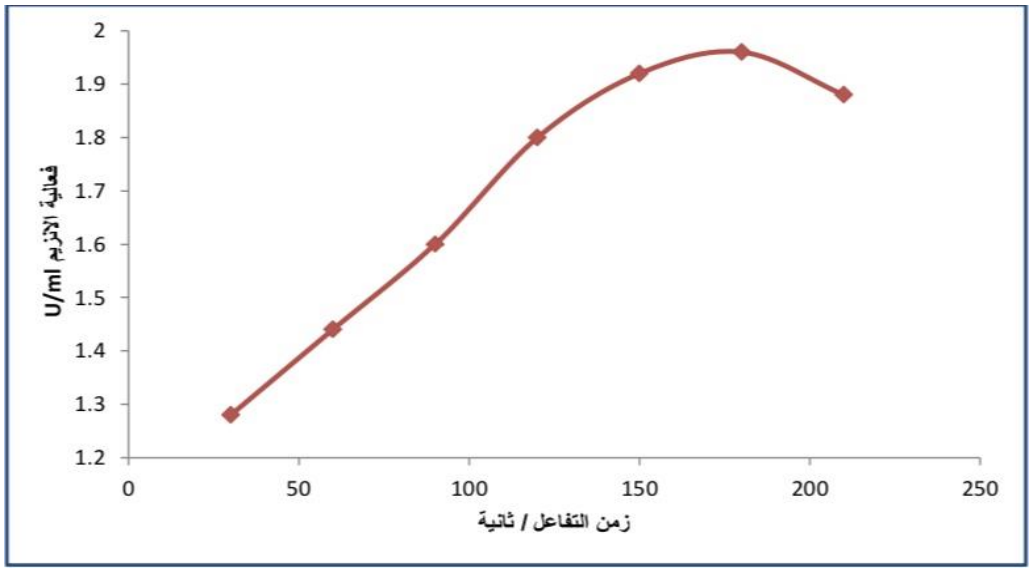


شكل(8): تأثير زمن الحضن على فعالية انزيم LOX

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

تأثير زمن التفاعل

درس تأثير زمن التفاعل لأنزيم (LOX) بأوقات مختلفة من بدء لتحديد المدة الزمنية المثلى للتفاعل, اشارت النتائج الموضحة في الشكل (9) ان افضل فعالية لإنزيم (LOX) كانت عند الدقيقة الثالثة من بدء التفاعل ثم تبدأ بعدها بالانخفاض وفي دراسة نقي فيها الانزيم من مريض مصاب بالربو كان زمن التفاعل الامثل عند الدقيقة الخامسة[24] .



شكل (9) : تأثير زمن التفاعل على فعالية انزيم الليبواوكسيجنيز

3 – دراسة تأثير الادوية المضادة للصرع على فعالية انزيم الليبواوكسيجنيز المنقى جزئيا من مصل دم مرضى الصرع

دُرس تأثير بعض الادوية المضادة للصرع (Anti-Epilepticdrugs (AEDs على فعالية انزيم الليبواوكسيجنيز LOX المنقى جزئيا من مصل دم مرضى الصرع، يوضح الجدول (2) النتائج التي تم الحصول عليها باستخدام تراكيز مختلفة من الادوية التي شملت حامض الفالبرويك (الديباكين) والكاربامازابين (التكريتول) و اسيتوزولاميد (دياموكس), واعطت هذه الادوية نسب تثبيطية مختلفة لفعالية انزيم الايبواوكسيجنيز LOX ,اذ اعطى الاسيتوزولاميد عند تركيز 10mM اعلى نسبة تثبيطية (96.2%) لفعالية الانزيم مقارنة بالكاربامازين والفالبرويك 95.1 و95.6 على التوالي .

جدول (2) يوضح نسب تثبيط الادوية المضادة للصرع لفعالية انزيم الليبواوكسيجينيز

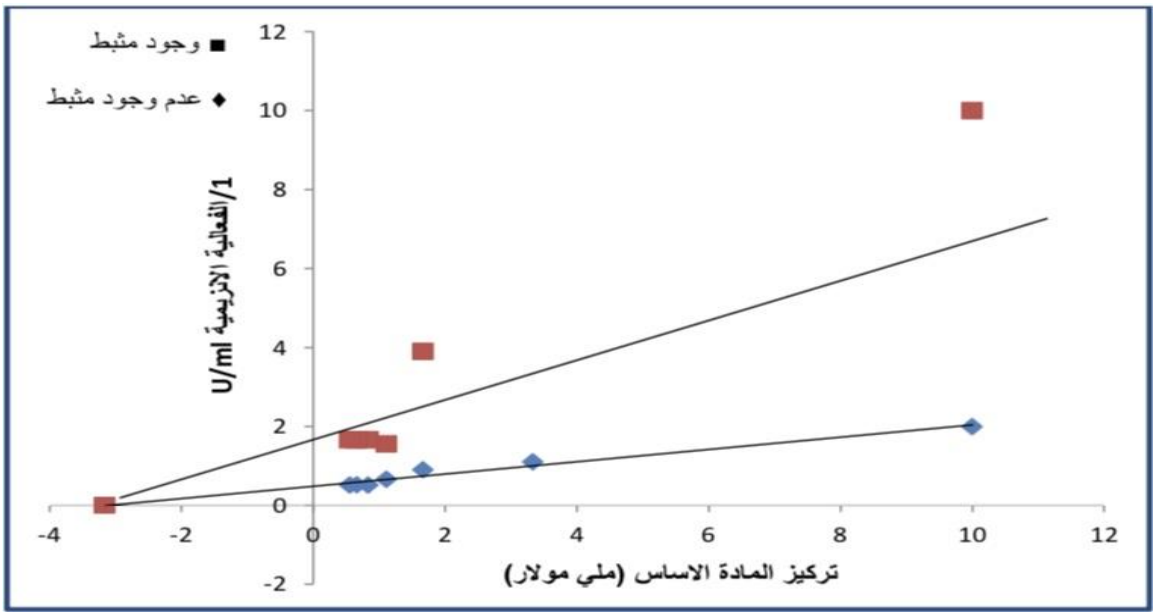
Valproic acid		Carbamazepine		Acetozolamid		
النسبة المئوية للتثبيط%	الفعالية وحدة أنزيمية/مل	النسبة المئوية للتثبيط%	الفعالية وحدة أنزيمية/مل	النسبة المئوية للتثبيط%	الفعالية وحدة أنزيمية/مل	التركيز ملي مولار
0	0.185	0	0.185	0	0.185	سيطرة بدون مثبط
89.1	0.02	5.9	0.174	91.9	0.015	5
95.1	0.009	92	0.0139	96.2	0.007	10
92.4	0.014	89	0.0197	81.1	0.034	15
95.6	0.008	89	0.0197	90	0.018	20
74.5	0.047	92.4	0.0139	68.6	0.058	25
91.3	0.016	78.9	0.039	-0.06	0.179	30
87.0	0.024	95.1	0.009	91.9	0.0154	35

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

4- دراسة نوع التثبيط للأدوية المضادة للصرع على فعالية انزيم الليبواوكسيجنيز.

A- حامض الفالبرويك

دُرس نوع التثبيط لحامض الفالبرويك (Valproic acid) على فعالية انزيم الليبواوكسيجنيز المنقى جزئيا, بأخذ التركيز الامثل 20mM للتثبيط كما في جدول(2) وباستخدام رسم لينويفر- بيرك وكانت قيمة Km ثابتة بدون مثبط وبوجوده 0.3 mM بينما وجدت قيمة Vmax بدون المثبط تساوي 1.9 U/ml وبوجود المثبط V'max =1.75 U/ml وقيمة ثابت التثبيط بلغت 2.1mM كما في الجدول (3) وان نوع التثبيط غير التنافسي. قد يعزى السبب في تثبيط الانزيم بواسطة حامض الفالبرويك الى امتلاكه لمجاميع فعالة من شأنها ان تتداخل مع المواقع الفعالة بشكل غير مباشر ذلك من خلال ارتباطها او تأثيرها على الحديد الموجود ضمن محور عمل الانزيم كعامل مرافق Co- factoer للأنزيم [33] وبالتالي سيؤثر على فعالية الانزيم و ايضاً سيقلل من السرعة القصوى للأنزيم ولا يؤثر على ثابت ميكائليس-مينتون إذ ليس لحامض الفالبرويك شكل او تركيب كيمياوي مشابهة للمادة الاساس [34].

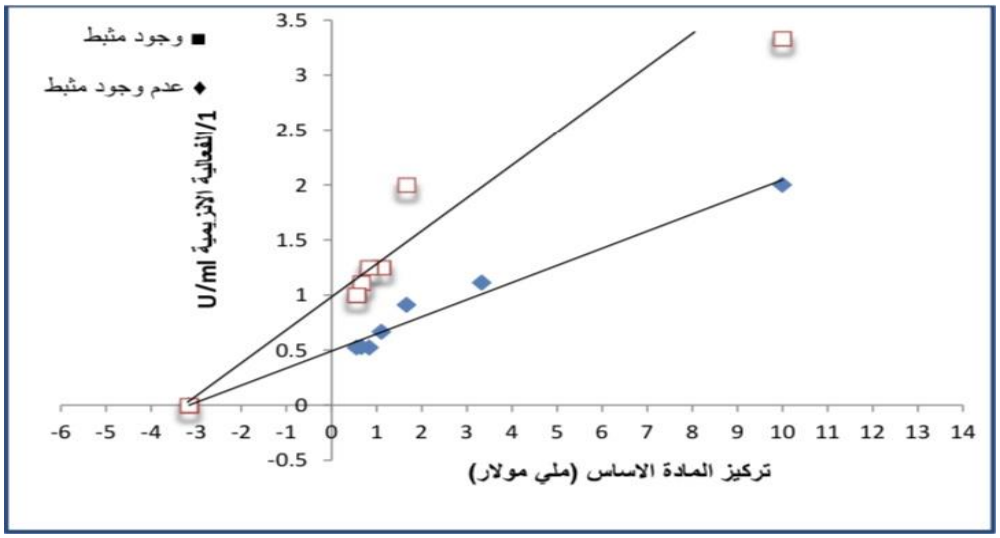


شكل(10): رسم لينويفر- بيرك عند استخدام مثبط حامض الفالبرويك

B- الكاربامازابين

اشارت دراسة تأثير الكاربامازابين على فعالية انزيم الليبواوكسيجنيز المنقى جزئيا باعتماد التركيز الامثل للتثبيط 35mM جدول(2) . بينت النتائج باستخدام رسم لينويفر- بيرك لدراسة نوع التثبيط والمبين في الشكل (11) أن التثبيط من النوع غير التنافسي حيث كانت قيمة Km ثابتة بقيمة 0.3mM بوجود وغياب المثبط وكانت قيمة Vmax بدون المثبط تساوي 1.9U/ml وبوجود المثبط V'max = 0.95U/ml ثابت التثبيط 3.6mM كما هو في الجدول (3) . قد يعزى السبب في تثبيط الانزيم بواسطة الكاربامازابين الى وجود مجاميع فعالة يمكنها التداخل مع المواقع الفعالة بشكل او من خلال ارتباطها او تأثيرها على الحديد الموجود ضمن محور عمل الانزيم كعامل مرافق Co- factoer للأنزيم [33] وبالتالي سيؤثر على فعالية الانزيم وايضاً سيقلل من السرعة القصوى للأنزيم ولا يؤثر على ثابت ميكائليس-مينتون إذ ليس للكاربامازابين شكل او تركيب كيمياوي مشابهة للمادة الاساس[34] .

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

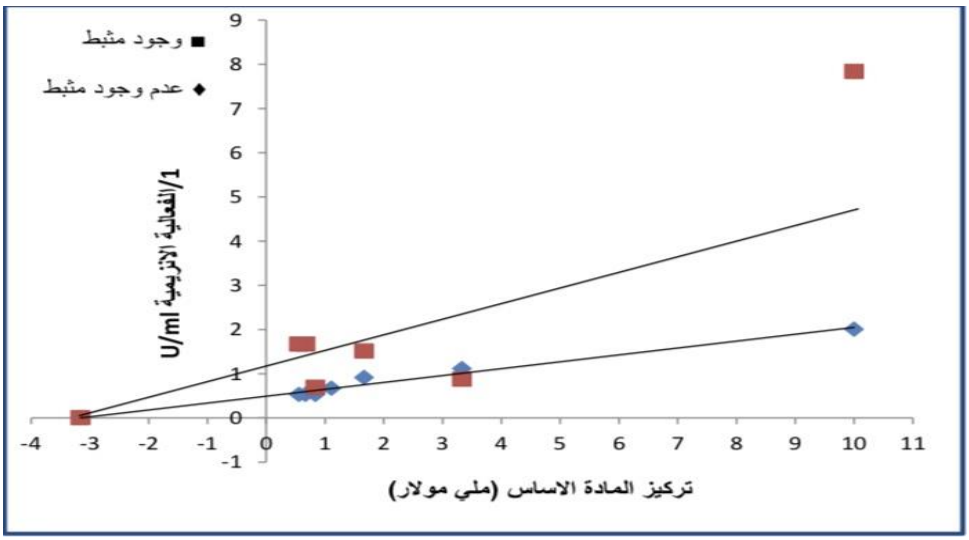


شكل(11): رسم لينويفر– بيرك عند استخدام مثبط الكاربامازابين

C– الاسيتوزولاميد

دُرس تأثير دواء الاسيتوزولاميد بوصفه مثبط لفعالية انزيم الليبواوكسيجنيز وباستخدام رسم لينويفر–بيرك لبيان نوع التثبيط بأخذ التركيز الامثل للتثبيط 10Mm جدول(2). بينت النتائج ان التثبيط من نوع غير التنافسي كما هو موضح في الشكل (10) وكانت قيمة Km بوجود وعدم وجود المثبط 0.3mM في حين كانت قيمة Vmax بدون المثبط تساوي 1.9U/ml وبوجود المثبط V'max =1.3U/ml وقيمة ثابت التثبيط Ki 1.1mM كما في الجدول (3)

قد يعزى السبب في تثبيط الانزيم بواسطة الاسيتوزولاميد احتواء الدواء مجموعة مجاميع فعالة لها القابلية على التداخل مع المواقع الفعالة بشكل غير مباشر او من خلال ارتباطها او تأثيرها على الحديد الموجود ضمن محور عمل الانزيم كعامل مرافق Co- factoer للأنزيم [33] وبالتالي سيؤثر على فعالية الانزيم وايضاً سيقلل من السرعة القصوى للأنزيم ولا يؤثر على ثابت ميكائليس–مينتون إذ ليس للأسيتوزولاميد اشكل او تركيب كيمياوي مشابهة للمادة الاساس. قد يعزى سبب نسبة التثبيط العالية لهذا الدواء لوجود اكثر من مجموعة وظيفية فعالة واحدة في هذا المركب عند مقارنته بمحتوى الادوية الاخرى [35].



شكل(12): رسم لينويفر– بيرك عند استخدام مثبط (اسيتوزولاميد)

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

ويبين الجدول(3) المتغيرات الحركية الانزيم بوجود وعدم وجود المثبطات.

جدول (3) : المتغيرات الحركية و نوع التأثير التثبيطي للعقاقير المستخدمة في تثبيط أنزيم LOX المنقى من دم المصابين بالصرع

العقاقير المستخدمة (التركيز الأمثل للتثبيط ملي مولار)	(mM) Km بدون المثبط	K′m (mM) بوجود المثبط	Vmax (unit/ml) بدون المثبط	V′max (unit/ml) بوجود المثبط	(mM) Ki	نوع التثبيط
Acetolazamide -10mM	0.3	0.3	1.9	1.3	1.1	غير تنافسي
Carbamazepin -35mM	0.3	0.3	1.9	0.95	3.6	غير تنافسي
Valproic acid -20mM	0.3	0.3	1.9	1.75	2.1	غير تنافسي

Km ثابت ميكليس مينتون /K'm ثابت ميكليس مينتن الظاهري/ Vmax السرعة القصوى / V'max السرعة القصوى الظاهرية / Ki ثابت التثبيط

الاستنتاجات Conclusions

تم الحصول على حزمة بروتينية واحدة باستخدام تقنية كروموتوغرافيا التبادل الايوني . وبينت النتائج أن أعلى فعالية للإنزيم كانت عند درجة حرارة 40°C وزمن حضن عن الدقيقة السابعة ودالة حامضية pH=7.4 وزمن تفاعل عند الدقيقة الثالثة و كان تركيز المادة الاساس (حامض اللينوليك) الامثل 1.2 mM , وباستخدام معادلة لينويفر–بيرك وميكليس مينتون اظهرت قيمة السرعة القصوى Vmax = 1.9 U/ml وان ثابت ميكليس مينتن Km =0.3 mM .

أعطى الاسيتوزولاميد عند 10mM أعلى نسبة تثبيطية(96.2%) لفعالية الانزيم مقارنة بالأدوية الاخرى واعطى دواء حامض الفالبرويك نسبة تثبيطية (95.6%)عند تركيز 20mM و اعطى الكاربامازابين نسبة تثبيطية (95.1%) عند تركيز 35mM لفعالية الانزيم LOX وكان ثابت التثبيط لهما Ki=1.1mM, Ki =2.1mM و Ki=3.6mM على التوالي, وأظهرت النتائج انه كان التثبيط غير تنافسي لجميع الأدوية المستخدمة.

الشكر والامتنان Acknowledgements

اتقدم بالشكر الجزيل الى قسم الكيمياء/ كلية التربية للعلوم الصرفة/جامعة الموصل بتوفير المختبرات البحثية والمستلزمات الضرورية لأجراء هذا البحث

المصادر References

1- Mac, T. L., Tran, D. S., Quet, F., Odermatt, P., Preux, P. M., & Tan, C. T. (2007). Epidemiology, aetiology, and clinical management of epilepsy in Asia: a systematic review. *The Lancet Neurology*, *6*(6), 533-543.

2- Hesdorffer, D. C., Benn, E. K., Cascino, G. D., & Hauser, W. A. (2009). Is a first acute symptomatic seizure epilepsy? Mortality and risk for recurrent seizure. *Epilepsia*, *50*(5), 1102-1108.

3-Daroff, R.B.; Jankovic, J.; Mazziotta, J.C.; Pomeroy, S.L. (2016) *Bradley's Neurology in Clinical Practice E-Book*; Elsevier Health Sciences; ISBN 9780323287838.

4-Ray, A., Tao, J. X., Hawes-Ebersole, S. M., & Ebersole, J. S. (2007). Localizing value of scalp EEG spikes: a simultaneous scalp and intracranial study. *Clinical neurophysiology*, *118*(1), 69-79.

5- Granata, T., Marchi, N., Carlton, E., Ghosh, C., Gonzalez-Martinez, J., Alexopoulos, A. V., & Janigro, D. (2009). Management of the patient with medically refractory epilepsy. *Expert review of neurotherapeutics*, *9*(12), 1791-1802.

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

6- Helbig, I., Scheffer, I. E., Mulley, J. C., & Berkovic, S. F. (2008). Navigating the channels and beyond: unravelling the genetics of the epilepsies. *The Lancet Neurology*, *7*(3), 231-245.

7- Kjeldsen, M. J., Corey, L. A., Christensen, K., & Friis, M. L. (2003). Epileptic seizures and syndromes in twins: the importance of genetic factors. *Epilepsy research*, *55*(1-2), 137-146.

8- Siedow, J. N. (1991). Plant lipoxygenase: structure and function. *Annual review of plant biology*, *42*(1), 145-188.

9- Porta, H., & Rocha-Sosa, M. (2002). Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant physiology*, *130*(1), 15-21.

10- Bankova, L. G., & Boyce, J. A. (2018). A new spin on mast cells and cysteinyl leukotrienes: Leukotriene E4 activates mast cells in vivo. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *142*(4), 1056-1057.

11- Drazen, J. M., Israel, E., & O'Byrne, P. M. (1999). Treatment of asthma with drugs modifying the leukotriene pathway. *New England Journal of Medicine*, *340*(3), 197-206.

12- Lenz, Q. F., Arroyo, D. S., Temp, F. R., Poersch, A. B., Masson, C. J., Jesse, A. C., ... & Mello, C. F. (2014). Cysteinyl leukotriene receptor (CysLT) antagonists decrease pentylenetetrazol-induced seizures and blood–brain barrier dysfunction. *Neuroscience*, *277*, 859-871.

13- Gorter, J. A., Aronica, E., & Van Vliet, E. A. (2019). The Roof is Leaking and a Storm is Raging: Repairing the Blood–Brain Barrier in the Fight Against Epilepsy. *Epilepsy currents*, *19*(3), 177-181.

14- Simmet, T., & Tippler, B. (1990). Cysteinyl-leukotriene production during limbic seizures triggered by kainic acid. *Brain research*, *515*(1-2), 79-86.

15- Kim, H. C., Jhoo, W. K., Bing, G., Shin, E. J., Wie, M. B., Kim, W. K., & Ko, K. H. (2000). Phenidone prevents kainate-induced neurotoxicity via antioxidant mechanisms. *Brain research*, *874*(1), 15-23.

16-Samiappan, R. (2013). Insertion of transmembrane 5-lipoxygenase activating protein (FLAP) into nanodiscs towards structure function studies of complex formation with soluble proteins.

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

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

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

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

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

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

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/

23- Befani, O., Grippa, E., Saso, L., Turini, P., & Mondovi, B. (2001). Inhibition of monoamine oxidase by metronidazole. *Inflammation Research*, *50*(2), 136-137.

24- Kamal, H. R., & Hasan, M. B. (2019). 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. *Rafidain Journal of Science*, *28*(4), 76-93.

25-Al-Abbasi, Omar Yunus Muhammed (2013). " Isolation and Purification of Lipase and Lipoxygenase from *Pistacia khinjuke* and Investigation their Affinity toward certain Inhibitors in Mice with Induced Diabetes. PhD thesis, College of Education, University of Mosul

26-Flayeh, Khawla Ahmed. (2006). An Introduction to Biochemistry, Second Edition, Dar Al-Kutub for Printing and Publishing, University of Mosul, pp. 156-159

27- Murray, K., Rodwell, V., Bender, D., Botham, K. M., Weil, P. A., & Kennelly, P. J. (2009). *Harper's illustrated biochemistry*. *28* (p. 588). New York: McGraw-Hill.

28-Barone, R., Briante, R., D'Auria, S., Febbraio, F., Vaccaro, C., Del Giudice, L., ... & Nucci, R. (1999). Purification and characterization of a lipoxygenase enzyme from durum wheat semolina. *Journal of agricultural and food chemistry*, *47*(5), 1924-1931.

29- Yilmaz E.(2001)."Kinetic Studies With Crude Tomato Lipoxygenase". Turk. J. Agric. For., 25 : 291-296.

30-Lagarde, M., Croset, M., Authi, K. S., & Crawford, N. (1984). Subcellular localization and some properties of lipoxygenase activity in human blood platelets. *Biochemical Journal*, *222*(2), 495-500.

31-Muhaisen, Ibtisam Karim, Yahya, Iyad Nafi ', Al-Araji, Sanad Baqer. (2008). Characterization of purified extracted lipoxygenase from Arachis hypogaea L. peanut seeds. Damascus University Journal for Basic Sciences, 24 (2): 135-162

32- Sraer, J., Rigaud, M., Bens, M., Rabinovitch, H., & Ardaillou, R. (1983). Metabolism of arachidonic acid via the lipoxygenase pathway in human and murine glomeruli. *Journal of Biological Chemistry*, *258*(7), 4325-4330.

33- Gilbert, N. C., Bartlett, S. G., Waight, M. T., Neau, D. B., Boeglin, W. E., Brash, A. R., & Newcomer, M. E. (2011). The structure of human 5-lipoxygenase. *Science*, *331*(6014), 217-219.

34- Elghoul, H. H. M. (2016). *Comparative Study of Carbamazepine (CBZ) Versus Valproic Acid (VPA) Effect on Liver Function and Lipid Profile in Epileptic Children (Gaza Strip)* (Doctoral dissertation, Al-Azhar University).

35- Chiaramonte, N., Romanelli, M. N., Teodori, E., & Supuran, C. T. (2018). Amino acids as building blocks for carbonic anhydrase inhibitors. *Metabolites*, *8*(2), 36

Downloaded from https://edusj.mosuljournals.com/