------ مجلة علوم الرافدين، المجلد16، العدد3، خاص بالكيمياء، ص29-44، 2005------

متناظرات انزيم بولي امين اوكسيديز في حليب الامهات المرضعات

خولة احمد آل فليح
قسم الكيمياء
كلية التربية
جامعة الموصل

سميرة محمد الكاتب
فرع الفسلجة
كلية الطب البيطري
جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2001/11/19 ، تاريخ القبول 2002/4/28)

الملخص

تم تنقية انزيم بولي امين اوكسيديز Polyamine oxidase (PAO) من حليب الامهات المرضعات باستخدام تقنيات الفرز الغشائي ، كروماتوكرافيا التبادل الايوني السالب ، الترشيح الهلامي والهجرة الكهربائية . وتم ولاول مرة فصل ثلاث متناظرات Ia ، Ib ، IIa لانزيم PAO من حليب الامهات الطبيعي وبفعالية نوعية مقدارها 529.6 ، 1008.0 و 520.7 وحدة انزيمية/ ملغم بروتين على التوالي وبتنقية بلغت 229 ، 436 و 225 مرة على التوالي مقارنة بالانزيم الخام .

تم دراسة بعض الخواص الحركية المثلى لاكسدة البولي امين (برمدين) بوساطة انزيم PAO ووجد هناك علاقة خطية بين فعالية كلا من المثماثلات الثلاث وتركيزها ، وان اكسدة المادة الاساس تحدث وبشكل خطي لغاية 60 ثانية ، اما الـ pH الامثل للمتناظرات Ia ، Ib ، IIa هي 8.6 ، 7.2 و 7.2 على التوالي وقيم km لكل من Ia ، Ib ، IIa هي 5.7×10^{-4} ، 3.5×10^{-4} و 5.0×10^{-4} مولار سبرمدين على التوالي .

وجد ان المثبط فينايل هايدرازين ثبط فعالية المتناظر IIa كلياً بينما اظهر تاثيرا تثبيطيا متفاوتا على فعالية كلا من Ia و Ib . كما وجد ان المثبط ايودواسيتامايد اظهرس تأثيرات تثبيطية متفاوتة على فعالية كلا من Ia و IIa في حين لم يظهر اي تاثيراً تثبيطياً على فعالية المتناظر Ib .

وجدت الاوزان الجزيئية التقريبية لمتناظرات انزيم PAO المنقاة من حليب الامهات الطبيعي انها تبلغ 60255 ، 56234 و 46773 دالتون على التوالي وذلك بوساطة تقنية الترحيل الكهربائي وباستخدام هلام متعدد الاكريلامايد مع (SDS).

Polyamine Oxidase Isoenzymes In Maternal Milk

Khawola A. Al- Flayeh
Department of Chemistry
College of Education
Mosul University

Sameria M. Al-Katib
Department of physiology
college of vet. medicine
Mosul University

ABSTRACT

Polyamine oxidase (PAO) was purified from lactating mother's milk using dialysis, anion exchange chromatography (DEAE-cellulose), gel filtration and SDS-polyacrylamide electrophoresis. Three PAO isoenzymes Ia, Ib and IIa were obtained from normal maternal milk with specific activity of 529.6, 1008.0 and 520.7 unit/ mg protein respectively and with purification fold of 229, 436 and 225 respectively, compared to crude enzyme.

The kinetic parameters of polyamine (spermidine) oxidation by PAO were studied. A linear relationship were obtained between PAO isoenzymes activity and protein concentration up to 60 sec. The optimal pH for the isoenzymes Ia, Ib and IIa were 8.6, 7.2, and 7.2 respectively. The Michaelis Menten constant (km) were 5.7×10^{-4} ، 3.5×10^{-4} and 5.0×10^{-4} M spermidine respectively.

Phenyl hydrazine was found to inhibit completely the activity of IIa, but showed different inhibitory effects on Ia and Ib activity. Iodoacetamide showed different inhibitory effects on the Ia and IIa activity but showed no inhibitory effect on Ib activity. It was found that the approximate molecular weight of the isoenzymes Ia, Ib and IIa were 60255, 56234 and 46773 dalton respectively using SDS - polyacrylamide gel electrophoresis.

المقدمة

تلعب مركبات متعدد الامينPolyamine (PA) دورا تنظيميا مهما في نمـو وتوالـد وتفاضـل الخلايا (Pegg and McCann,1982) حيث تتواجد هذه المركبات في جميع الانـسجة (Russell,1970) وتزداد تراكيزها في الغدد اللبنية وخلال فترة الارضاع (Bellagamba *et al.*, 1997) ولوحظت تراكيـز عالية من السبرمدين Spermidine (Spd)، السبرمين Spermine (Spm) والبترسين Putrescine (Put) في حليب اللبائن ومنها الانسان (Dourhout *et al.*,1996). اشارت الدراسات السابقة الى وجود تراكيـز عالية من (Spd) في انسجة الصغار حديثي الولادة وتقل مع تقـدم العمـر (Janne *et al*,1964) . كمـا اشارت الدراسات الى ان مركبات (PA) يلزم تواجدها في الغذاء لاغراض النمو والصحة (Guirad and Snell,1964; Brosnan *et al.* 1983; Brosnan, 1985; Bardocz *et al.*,1993) يعد انزيم (PAO) هو من الانزيمات التقويضية التي تؤدي دورا مهما في تنظيم المستوى الدقيق لمركبات متعدد الامين ، وبنفس الوقت يؤدي الى تكوين مركبات ايضية ذات تأثيرات ايضية مختلفة الاهمية (Mondovi *et al*, 1988) . وجدت فعالية لانزيم PAO في حليب الامهات المرضعات في مختبراتنا (Al-Katib,2000)وهذا قادنا الى تنقية هذا الانزيم ودراسة بعض خواصه الحركية للوقوف على ميزات هذا الانزيم في حليـب الامهـات المرضعات .

المواد وطرائق العمل

عينات الحليب :جمعت عينات الحليب من الأمهات المرضعات السليمات من الأمراض ، اللاتي تراوحت اعمارهن بين (15-40) سنة من مستشفى الخنساء بالموصل صباحا ، اذ تم وضعه فـي انابيـب معقمـة وبمعدل (5-10) مل للعينة الواحدة بعد اهمال القطرات الاولى .

فصل وتنقية متناظرات PAO

فصل المادة الدهنية : فصلت المادة الدهنية من عينات الحليب بوساطة الجهاز الطرد المركـزي تحـت سرعةg ×4000 ولمدة 30 دقيقة ثم ازيلت الطبقة الدهنية العليا وعد الرائق المتبقـي محلـول انـزيم PAO .

تقدير كمية البروتين الكلي : استخدمت طريقة بايوريت لتقدير كمية البروتين الكلي في حليـب الامهـات المرضعات (Wooton,1974).

تقدير فعالية انزيم PAO :

قيست فعالية انزيم PAO بالاعتماد على الطريقة المتبعة من قبـل (Al-Katib,2000) اذ تحـوي خلية القياس للعينة على52. مل من خليط التفاعل البالغ حجمه 10 مل والحاوي علـى 2 ملـي مـولار بوتاسيوم فيري سيانيد ، 1 ملي مولار Tris-Hcl (pH = 8.6) ، 0.75 ملي مـولار سـبرمدين ثلاثـي

الهيدروكلوريد و0.74 ملي مولار كاربونات الكالسيوم . وتحوي خلية القياس للسيطرة على نفس مكونات خليط

التفاعل اعلاه ماعدا المادة الاساس سبرمدين . اضيف 100 مايكرو ليتر (1.9 ملغم بـروتين) من الانزيم بعد حضنه في درجة 35° م لمدة 10 دقائق وقيست الفعالية الانزيمية عند الطول الموجي 410 نانوميتر بمتابعة النقصان في الامتصاصية كل 5 ثوانٍ ولمدة 60 ثانية باستخدام جهاز مطياف الاشعة فوق البنفسجية والمرئية UV\Vis Spectrophotometer من نوع (Pu 8800) وحددت وحدة فعالية الانـزيم على انها كمية الانزيم اللازمة لاكسدة مايكرو مول واحد من مادة الاساس (الـسبرمدين) فـي الدقيقـة الواحدة.

الفرز الغشائي : اجريت عملية الفرز الغشائي Dialysis لعينة انزيم PAO الخام للحليب بحجم (16 مل) لمدة 5 ساعات في درجة حرارة 4° م وباستخدام 0.9 % من محلول NaCl .

داي ايثايل امينو ايثايل - سيليلوز (DEAE - Cellulose) : تم تنقية الانزيم الناتج بعد عمليـة الفـرز الغشائي بوساطة كروماتوكرافيا التبادل الايوني اذ استخدم عمود الفصل الزجـاجي (40 x 2.5 سـم) الحاوي على المبادل الايوني السالب DEAE-Cellulose والمحلول المنظم Tris - HCl بتركيز 10 ملي مولار ودالة حامضية 8.6 . وكانت سرعة جريان المحلول flow rate من عمود الفصل1 مـل/دقيقـة . وتمت متابعة القمم البروتينية المنفصلة بقياس الامتصاصية عند الطول الموجي 280 نانوميتر باسـتخدام جهاز مطياف الاشعة فـوق البنفـسجية والمرئيـة مـن نـوع Shimadzu UV-210 Double beam spectrophotometer. كما تم الاستدلال على القمة البروتينية التي تحـوي علـى فعاليـة انـزيم PAO باستخدام الطريقة القياسية لتحديد فعالية الانزيم .

الترشيح الهلامي : ان كلاً من القمة I والقمة II للأنزيم الناتجة من التنقية بوساطة DEAE-cellulose تم تركيز حجمها بوساطة التجفيد lyophilization الى 3 و2 مل على التوالي. وبعد ذلك تم امرار كل مـن هاتين القمتين على عمود الفصل (40 x 2.5 سم) الحاوي علـى هـلام $Ultrogel\ AcA_{34}$ و اسـتخدم المحلول المنظم Tris-HCl بتركيز 10 ملي مولار ودالة حامضية 8.6 لعملية الفـصل . كانـت سـرعة جريان المحلول المترشح من العمود 0.5 مل/ دقيقة . وتمت متابعة الاجزاء البروتينية المنفصلة في كـل انبوبة بقياس الامتصاصية عند الطول الموجي 280 نانوميتر كما تم الاستدلال علـى القمـة البروتينيـة الحاوية على فعالية انزيم PAO باستخدام الطريقة القياسية لتحديد فعالية الانزيم .

الترحيل الكهربائي وتقدير الوزن الجزيئي :

ان القمم الأنزيمية المستحصل عليها من التنقية بعد خطوة الترشيح الهلامي Ia ، Ib ، IIa تـم تجفيفها بوساطة التجفيد ومن ثم عرضت لتقنية الترحيل الكهربائي وباستخدام صوديوم دوديكايل سـلفات

وهلام متعدد الاكريلامايد (Brewer SDS - Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) (*et al.*,1974) ، كما استخدمت البروتينات القياسية اللايسوزايم ، التربسين ، البيروكسيديز ، البومين مصل الابقار(BSA) ، واليوريز . استغرقت عملية الترحيل الكهربائي لمتناظرات انزيم PAO والبروتينات القياسية والمطبقة على صفيحة الهلام (28 x 12) سم مدة 5 ساعات في درجة°4م.

تأثير تركيز البروتين على فعالية المتناظرات:

استخدمت حجوم مختلفة من كل من متناظرات أنزيم (PAO) Ia ، Ib وIIa المنقاة من حليب الامهات تراوحت بين (10-200) مايكروليتر والتي كانت تكافئ (0.59-11.8) مايكروغرام بروتين من Ia و (0.31-6.0) مايكروغرام بروتين من Ib و(1.79-35.8) مايكروغرام بروتين من IIa. وقيست الفعالية الانزيمية للمتناظرات كما في الطريقة القياسية.

تأثير تقدم زمن التفاعل الأنزيمي :

تم قياس تأثير زمن التفاعل الأنزيمي على فعالية المتناظرات Ia، Ib وIIa لغاية 120 ثانية وباستخدام الطريقة المبينة لتعيين فعالية PAO .

تأثير الدالة الحامضية (pH) وتركيز المحلول المنظم :

لدراسة تأثير الـ pH على فعالية المتناظرات استخدمت المحاليل المنظمة بتركيز 10 ملي مولار ودالة حامضية تراوحت بين (4.9 - 10) حيث استخدم المحلول المنظم حامض الستريك - NaOH (pH= 4.9) ، حامض الستريك - ثلاثي سترات الصوديوم (pH= 5.8) ، صوديوم ثنائي هيدروجين فوسفات - ثنائي صوديوم هيدروجين فوسفات (pH 7.2)، بوتاسيوم ثنائي هيدروجين فوسفات - ثنائي صوديوم هيدروجين فوسفات (pH= 7.4) ، Tris - HCl (pH= 8.6) والمحلول المنظم بيكاربونات الصوديوم - NaOH (pH= 10) . وتم قياس الفعالية الانزيمية لكل متناظر كما مبين في الطريقة القياسية ماعدا تغيير المحلول المنظم المعين . ولغرض الاستدلال على التركيز الامثل من المحلول المنظم ذو الدالة الحامضية المثلى تم استخدام المحاليل المنظمة ذو الدالات الحامضية التي اظهرت المتناظرات Ia، Ib وIIa عندها فعالية قصوى ولكن بتراكيز مختلفة تراوحت بين (2.5 - 20) ملي مولار وقيست الفعالية الانزيمية لكل متناظر كما مبين في الطريقة القياسية لتعيين فعالية PAO .

خصوصية متناظرات PAO :

في دراسة خصوصية المتناظرات Ia، Ib وIIa تجاه مادة الاساس ، استخدمت مواد الاساس الاتية بتركيز 75 ملي مولار : سبرمدين ، سبرمين ، بتريانين ، هكسايل امين ، هستامين ، 1,3 - داي امينو بروبان و بترسين . قيست الفعالية الانزيمية لكل متناظر كما مبين في الطريقة القياسية ماعدا تغيير المادة الاساس .

قيمة Km :

استخدمت تراكيز مختلفة تراوحت بين (0.125 - 3.0) ملي مولار من مادة البولي امين التـي اظهرت المتناظرات الانزيمية معها اعلى فعالية ، وتم قياس الفعالية الانزيمية وثابت Km باستخدام رسـم لينويفر- برك للمتناظرات باستخدام الطريقة القياسية .

تأثير المثبطات :

لدراسة تأثير المثبطات المختلفة على فعالية المتناظرات Ia، Ib وIIa حضنت كلا من المركبـات الاتية بتركيز نهائي 1 ملي مولار مع كل من المتناظرات الانزيمية اعلاه في درجة°35م لمدة 30 دقيقة : صوديوم فلورايد ، صوديوم ازايد ، ايودواسيتامايد ، كلوروكوين ، فينايـل هايـدرازين ، ايـسونازايد وEthylene Diamine Tetra Acetic acid (EDTA) . قيست الفعالية الانزيمية لكل متناظر باسـتخدام الطريقة القياسية ماعدا تغيير المثبط المعين .

النتائج

تنقية انزيم PAO من حليب الامهات الطبيعي :

بينت النتائج في الجدول (1) الفعالية النوعية لانزيم PAO في حليب الامهـات الطبيعـي بلغـت (2.31) وحدة انزيمية لكل ملغم بروتين ، وان فعالية الانزيم النوعية بعد عملية الفرز الغشائي اصـبحت (5.2) وحدة انزيمية لكل ملغم بروتين، وتشير النتائج اعتمادا علـى مظهـر الروغـان elution profile المستحصل من تنقية أنزيم PAO باستخدام المبادل الايوني DEAE- سيليلوز الى وجود ثلاث قمم متميزة (شكل1) ، ظهرت الفعالية الأنزيمية للقمة الاولى (peak I) عند حجم الاسترداد (30-100) مل وبفعالية نوعية مقدارها (161.1) وحدة أنزيمية/ملغم بروتين ، بينما ظهرت الفعالية الانزيمية للقمة االثانية (peak II) عند حجم روغان (210-300) مل وبفعالية نوعية مقدارها (13.02) وحدة أنزيمية/ملغم بروتين .

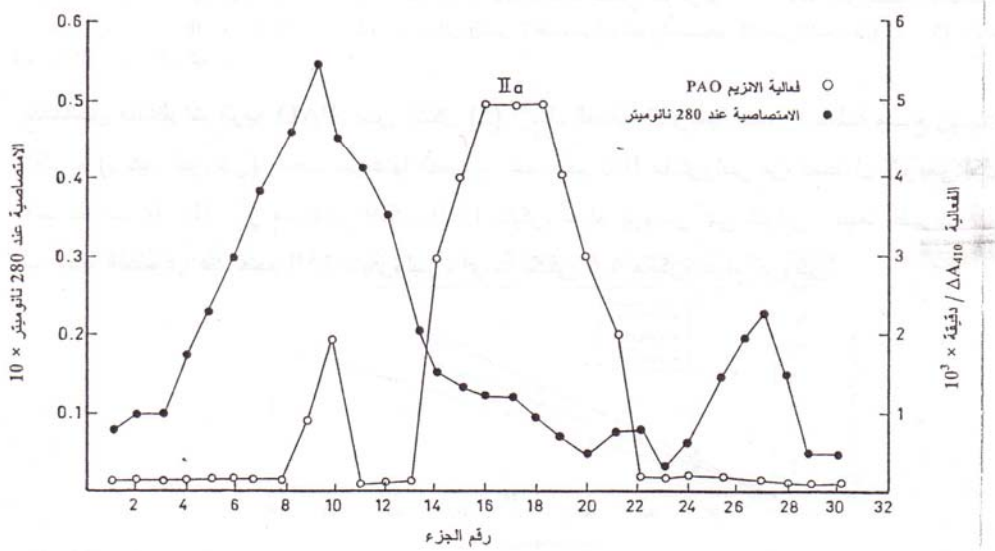
الجدول1: خطوات تنقية انزيم PAO من حليب الامهات الطبيعي .

خطوات التنقية	الحجم الكلي (مل)	البروتين الكلي (ملغم)	الفعالية الكلية* (وحدة انزيمية)**	الفعالية النوعية وحدة انزيمية/ ملغم بروتين	عدد مرات التنقية	استرجاع الفعالية%
الانزيم الخام	16	288	666.72	2.31	-	100
الفرز الغشائي Dialysis	15	150	781.2	5.20	2.25	117
DEAE -سيليلوز						
Peak I	90	7.2	125	17.36	7.50	18.7
Peak II	100	4.8	62.5	13.02	5.60	9.3
الترشيح الهلامي Ultrogel AcA_{34}						
Peak Ia	30	1.77	937.5	529.66	229	140.0
Peak Ib	30	0.93	937.5	1008.0	436	140.0
Peak Iia	40	2.20	1145.6	520.70	225	171.8

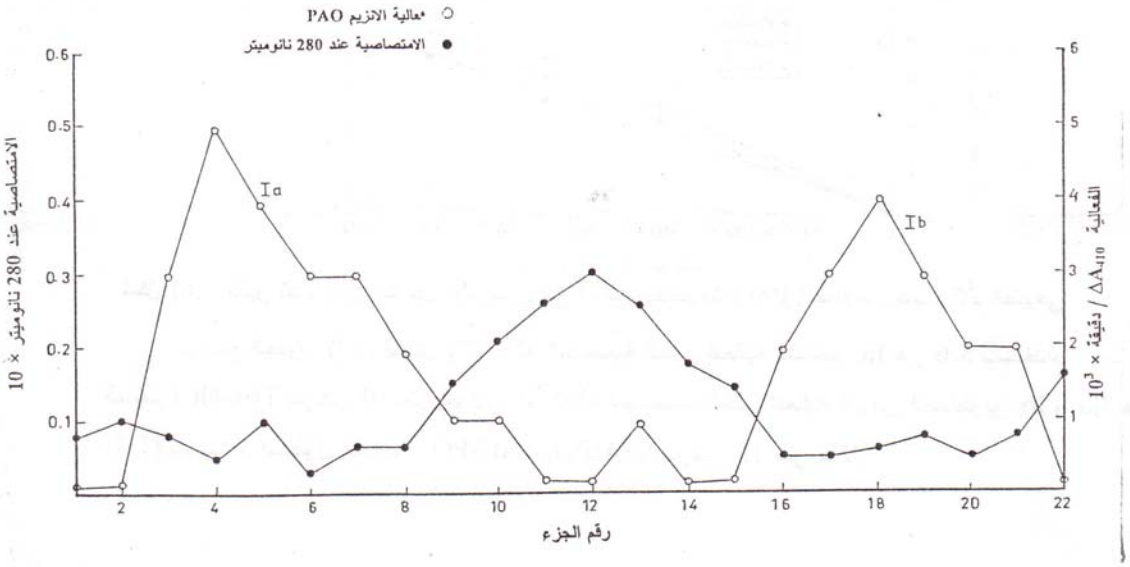
* قيست الفعالية كما مبين في الطريقة القياسية . ** الوحدة الانزيمية u تشير الى كمية الانزيم اللازمة لأكسدة مايكرومول واحد من المادة الاساس (السبرمدين) في الدقيقة الواحدة.

وأشارت النتائج اعتمادا على مظهر الروغان المستحصل من عملية تنقية القمة (I) لأنزيم PAO بوساطة الترشيح الهلامي الى وجود قمتين ، (الشكل2) ظهرت الفعالية الانزيمية للقمة الاولى (Ia) عند حجم استرداد (15-40) مل وبفعالية نوعية (529.66) وحدة أنزيمية/ملغم بروتين ، اما الفعالية الأنزيمية للقمة الثانية Ib فقد ظهرت عند حجم استرداد (80-105) مل وبفعالية نوعية مقدارها (1008.0) وحدة أنزيمية/ملغم بروتين ،كما أشار مظهر الروغان المستحصل عليه من امرار القمة II لأنزيم PAO على هلام AcA_{34} الى وجود قمتين متميزتين، يبين الشكل (3) القمة الأولى عند حجم استرداد (20-65) مل ولكن بفعالية لأنزيم PAO واطئة جدا ، بينما ظهرت القمة IIa عند حجم استرداد (70-105) مل وبفعالية نوعية مقدارها (520.7) وحدة أنزيمية/ملغم بروتين .

الشكل 1 : مظهرالروغان المستحصل من تنقية انزيم PAO في حليب الأمهات الطبيعي بوساطة التبادل الأيوني باستخدام DEAE-Cellulose وعمود الفصل (40 × 2.5 سم) وسرعة جريان 10 مل / 10 دقائق.



شكل (3) : مظهر الروغان المستحصل من تنقية peak II في حليب الامهات الطبيعي بوساطة الترشيح الهلامي باستخدام الـــهلام AcA_{34} وعمود الفصل (40 × 2.5 سم) وسرعة جريان 5 مل / 10 دقائق .



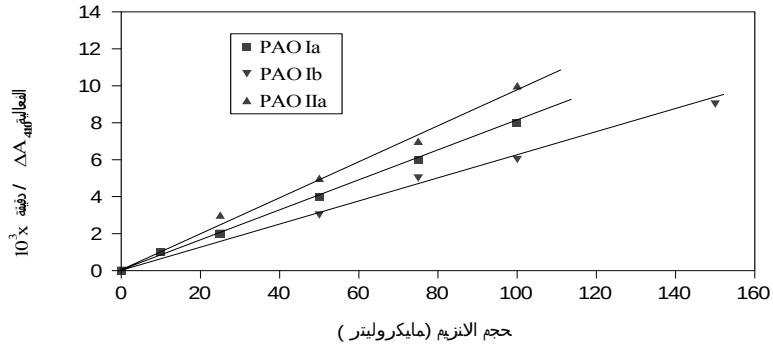
شكل (2) : مظهر الروغان المستحصل من تنقية peak I في حليب الامهات الطبيعي بوساطة الترشيح الهلامي باســـتخدام الـــهلام AcA_{34} وعمود الفصل (40 × 2.5 سم) وسرعة جريان 5 مل / 10 دقائق .

الترحيل الكهربائي : أظهر الشكل (4) وجود حزمة رئيسة واحدة وحزمة ثانوية لكل من القمة Ia والقمـة Ib في حين ظهـرت حزمـة رئيـسة واحـدة للقمـة IIa . وتبـين ان سـرعة الترحيـل الكهربـائي

electrophoretic mobility للمتناظرات الأنزيمية Ia، Ib وIIa نحو القطب الموجب هي 0.62 ، 0.64 و 0.70 سم/ساعة على التوالي .

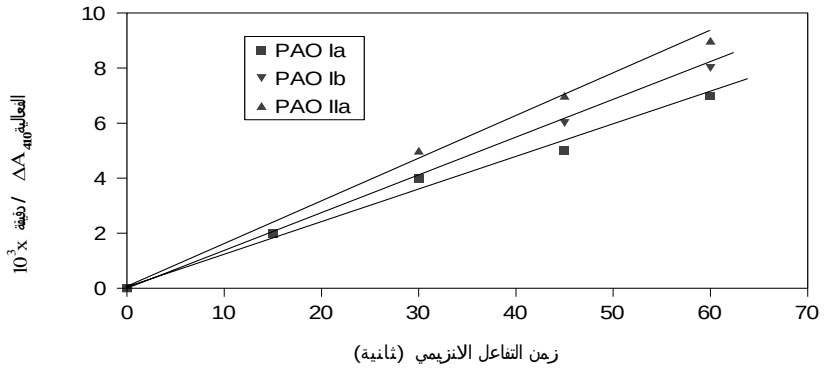
الشكل 4 :الترحيل الكهربائي باستخدام SDS-هلام متعدد الاكريلامايد لمتناظرات انزيم PAO المنقـاة من حليب الامهات الطبيعي. 1 : IIa ، 2 : Ib ، 3 :Ia ، 12: التربسين (إلى الاعلى) ، البيروكسيديز (إلى الاسفل) ، 13 : اللايسوزايم 14 : BSA ، 15 : اليوريز.

خصائص متناظرات انزيم PAO: يبين الشكل (5) ازدياد الفعالية الانزيمية بصورة خطية مع زيادة حجم الانزيم (تركيز البروتين) وبلغت سرعتها القصوى عند حجم 100 مايكروليتر من المحلول لانزيمي لكل من المتناظرات IIa, Ia ، أي ما يكافئ 5.9 ، 17.9 مايكروغرام بروتين على التوالي . بينما أظهـرت القمة Ib سرعتها القصوى عند حجم 150 مايكروليتر، أي ما يكافئ 4.6 مايكروغرام بروتين.



الشكل 5 : تأثير تركيز الانزيم على فعالية متناظرات PAO المنقاة من حليب الأم الطبيعي.

ويبين الشكل (6) ازدياد الفعالية الأنزيمية بصورة خطية مع زيادة زمن التفاعل الأنزيمي وبلغت سرعتها القصوى عند زمن 60 ثانية من بدء التفاعل لكل من Ia ، Ib وIIa



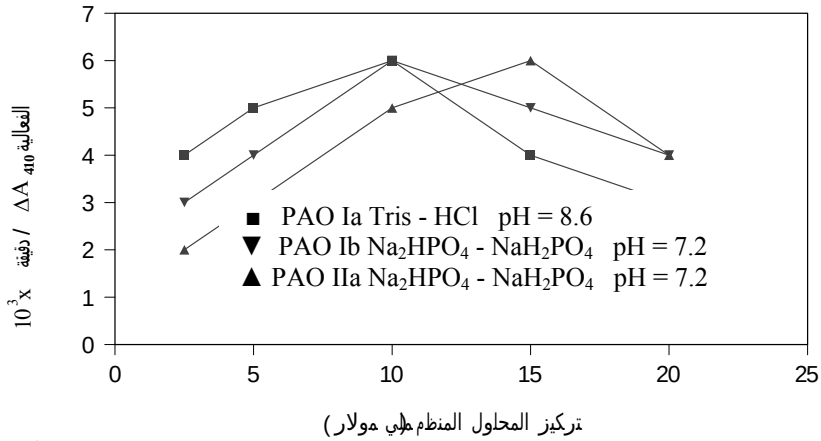
الشكل 6 **:** تأثير تقدم زمن التفاعل الانزيمي على فعالية متناظرات PAO المنقاة من حليب الأم الطبيعي .

يوضح الجدول (2) والشكل (7) الدالة الحامضية المثلى لفعالية المتناظر Ia هـي 8.6 باسـتخدام المحلول المنظم Tris-HCl بتركيز 10 ملي مولار، أما الدالة الحامضية المثلى لفعالية كل من المتناظرين Ib و IIa هي (7.2) باستخدام المحلول المنظم Na_2HPO_4-NaH_2PO_4 بتركيز 15 ملي مولار.

الجدول 2 : تأثير الدالة الحامضية على فعالية متناظرات PAO المنقاة من حليب الام الطبيعي .

المحلول المنظم (10 mM)	**الدالة الحامضية**	**الفعالية النوعية* (وحدة انزيمية**/ملغم بروتين)**		
		Ia	**Ib**	**IIa**
Citric acid – NaOH	4.9	353.10	504	349.14
Citric acid – Trisod Citrate	5.8	441.38	672	349.14
Na_2HPO_4-NaH_2PO_4	7.2	617.93	1167	698.30
Na_2HPO_4-KH2PO_4	7.4	441.38	1008	611.0
Tris – HCl	8.6	706.21	840	436.44
$NaHCO_3$-NaOH	10	353.10	672	480.10

* قيست الفعالية كما مبين في الطريقة القياسية . ** الوحدة الانزيمية u تشير الى كمية الانزيم اللازمة لأكسدة مايكروموول واحـد مـن المادة الاساس (السبرمدين) في الدقيقة الواحدة .



الشكل 7 : تأثير تركيز المحلول المنظم على فعالية متناظرات PAO المنقاة من حليب الأم الطبيعي .

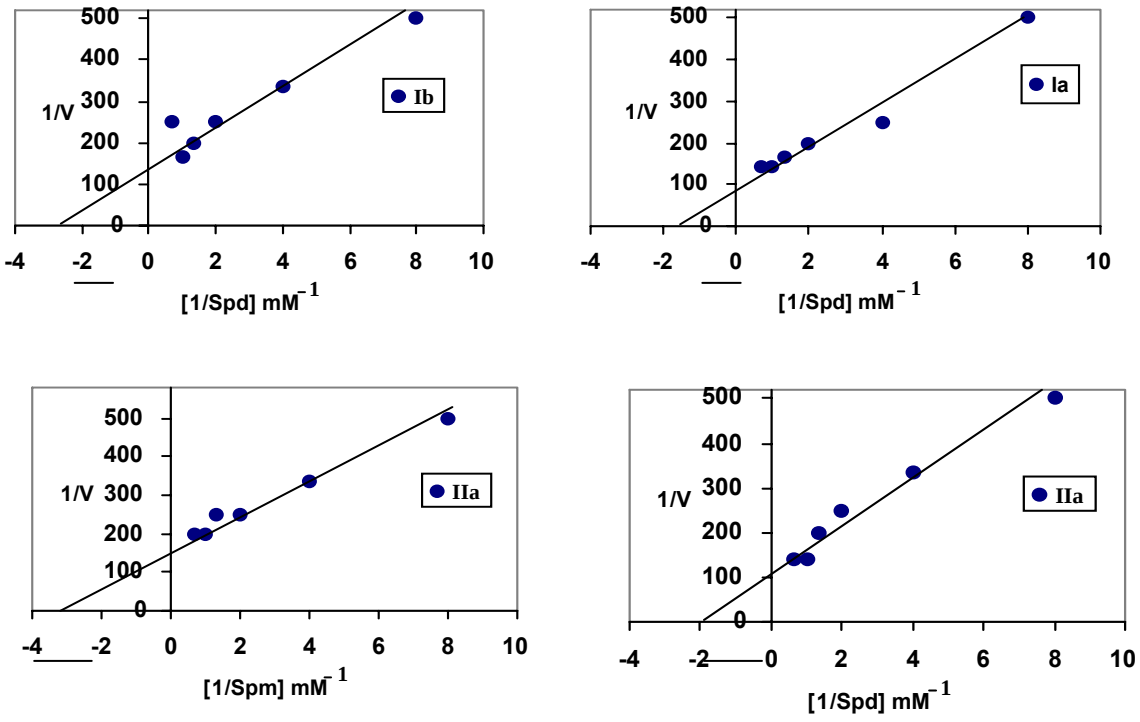
ويوضح الجدول (3) ان كلا من Ia و Ib أظهر أعلى فعالية باستخدام المادة الأساس السبرمدين مقارنة بالمواد الأساس الاخرى ، في حين أظهر IIa أعلى فعالية مع كل من الـسبرمدين والـسبرمين مقارنة بالمواد الأساس الاخرى .

الجدول 3 : خصوصية متناظرات انزيم PAO المنقاة من حليب الأم الطبيعي نحو مواد الاساس .

المادة الأساس	الفعالية النوعية* (وحدة انزيمية/ملغم بروتين)**					
	Ia	الفعالية النسبية %	Ib	الفعالية النسبية %	IIa	الفعالية النسبية %
سبرمدين	529.66	100	840	100	523.74	100
سبرمين	441.38	83	672	80	523.74	100
بتريانين	353.10	67	672	80	436.44	83
هكسايل أمين	88.27	17	504	60	249.14	47
هستامين	176.55	33	336	40	174.57	33
1 ، 3-داي أمينو بروبان	140.4	26.5	380	45	87.27	17
بترسين	264.83	50	420	50	0	0

* قيست الفعالية كما مبين في الطريقة القياسية . ** الوحدة الانزيمية u تشير الى كمية الانزيم اللازمة لأكسدة مـايكروموول واحد من المادة الاساس في الدقيقة الواحدة .

واشارت النتائج الموضحة في الشكل (8) ان قيمة ثابت مايكيلس منتن (Km) للمـادة الأسـاس السبرمدين (0.57، 0.35، 0.50) ملي مولار لكل من المتناظرات Ia، Ib و IIa على التـوالي، بينمـا وجد ان قيمة Km للمادة الأساس السبرمين هي (0.33) ملي مولار للمتناظر الأنزيمي IIa.



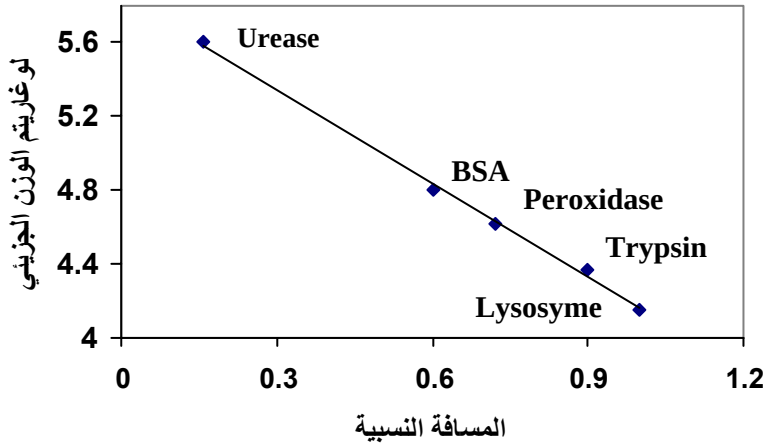
الشكل 8 : رسم لينويفر - بيرك لمتناظرات انزيم PAO المنقاة من حليب الأم الطبيعي .

وبينت نتائج دراسة تأثير بعض المثبطات على الفعالية الانزيمية والموضحة في الجدول (4) الى ان المثبطات صوديوم فلورايد (NaF) وصوديوم أزايد (NaN_3) وكلوروكوين وايـسونازايد وEDTA اظهرت تأثيرا تثبيطيا متفاوتا على فعالية المتناظرات Ib, Ia و IIa . غير ان المثبط ايودواسـيتامايد لـم يؤثر على الفعالية الانزيمية للمتناظر Ib بينما اظهر تأثيرا تثبيطيا واضحا على فعالية كلا مـن Ia و IIa وكذلك وجد ان المثبط فينايل هايدرازين ثبط تماما على وجه التقريب فعالية كلا من Ia و IIa ، بينما لـم يظهر له تأثيرا تثبيطيا على فعالية المتناظر Ib .

الجدول 4 : تأثير بعض المثبطات على فعالية متناظرات أنـزيم PAO المنقـاة مـن حليـب الأم الطبيعي .

المثبط (1 mM)	التأثير التثبيطي %		
	Ia	Ib	IIa
صوديوم فلورايد	71.44	50.00	71.44
صوديوم ازايد	57.14	33.35	71.44
ايودو اسيتامايد	71.44	0.00	57.14
كلوروكوين	71.44	57.14	85.73
فينايل هايدرازين	85.73	33.34	100.00
أيسونازايد	42.83	50.00	42.83
EDTA	42.83	33.34	57.14

الوزن الجزيئي لمتناظرات أنزيم PAO : يبين الشكل (9) المسافة النسبية التـي قطعتهـا المتنـاظرات الانزيمية Ia، Ib و IIa هي 0.62، 0.64 و 0.70 على التوالي وان الوزن الجزيئي التقريبي لمتناظرات أنزيم PAO الثلاثة Ia، Ib و IIa بلغ 60255 ، 56234 ، 46773 دالتون على التوالي مقارنة بالاوزان الجزيئية للبروتينات القياسية المستخدمة تحت نفس الظروف .



الشكل 9: المنحني القياسي لتقدير الوزن الجزيئي لمتناظرات انزيم PAO باستخدام SDS-PAGE.

المناقشة

نظراً لوجود فعالية لانزيم PAO في حليب الأمهات الطبيعي (Al-Katib, 2000) فقـد اشـارت خطوات الفصل والتنقية للدراسة الحالية الى ان هذا الانزيم يتواجد باشكال متناظرات ثلاث على الاقـل . ان استخدام تقنية الترحيل الكهربائي SDS-PAGE بينت ان كلاً من المتناظرين Ia وIb له حزمة واحدة رئيسة وحزمة ثانوية اخرى ، ويعزى الى ان كلاً منهما قد يحوي اثنان مـن المتنـاظرات او الوحـدات البروتينيـة ،

او قد تحوي حزمة بروتينية واحدة رئيسة وان الحزمة الثانوية يمكن ان تشير الى حدوث تبلمـر للوحدة الرئيسة (الشكل 4) غير ان المتناظر IIa ظهر بشكل حزمة واحدة مما يشير الى انه يتـالف مـن وحدة بروتينية واحدة. ان وجود انزيم PAO بشكل متناظرات مشابه لانزيم PAO في الخلايا الـسرطانية للقولون الذي وجد انه يتألف من متناظرين(Libby & Porter, 1987)،كما انه مشابه لانـزيم مونـوامين اوكسيديزMAO حيث امكن تمييز اربع متناظرات لهذا الأنزيم في كل من مصل ودماغ الإنسان Nancy (Collins *et al*.,1970 ; & Rauch1973) .

تمت دراسة بعض الخواص الحركية لفعالية هذه المتناظرات الثلاث ولوحظ ان كلا منهـا تميـز بالالفة العالية لاكسدة البولي امين سبرمدين وهذا مشابه لما وجد عليه انزيم PAO فـي مـصل الانـسان (Flayeh *et al*.,1994) .غير ان المتناظر Ia اظهر قابلية على الأكسدة لحدما للبترسين ، وبهذا فان هـذا المتناظر يشبه أنزيم PAO المنقى من مصل الأمهات الحوامل(Gahl *et al*.,1982). وقد تميز المتنـاظر IIa بعدم قابليته على أكسدة مركبات ثنائي واحادي الأمين وبهذا يكون هذا المتناظر يـشبه أنـزيم PAO مصل الإنسان (Flayeh,1988) وفي طفيلي الاسكارس (Muller &Walter,1992). ان المتناظر Ib اكثر الفة نحو المادة الاساس سبرمدين من المتناظرات الاخرى بينما تكون الفـة المتنـاظر IIa نحـو المـادة الاساس سبرمين اكثر مما هي نحو سبرمدين (الشكل 8) ان قيم Km هذه مقاربة لقيم Km لانزيم PAO المنقى من طفيلي الاسكارس والبالغة 0.35 ملي مولار سبرمدين و 0.66 ملي مولار سـبرمين (Tabor &Kellogg ,1970) . ويبين الجدول (4) ان المتناظرات الانزيمية Ia ، Ib وIIa ثبطت فعاليتها بوضوح بوجود المثبط صوديوم فلورايد والمثبط كلوروكوين وهذا يعزى الى مـشاركة Mg^{+2} ومـساعد الانـزيم الفلافين أدنين ثنائي النيوكليوتيد (FAD) في الفعالية وهذا مشابه لأنزيم PAO المنقى من كبد الجـرذي (Holtta,1977) وانزيم PAO المنقى من بكتيريـا *S. marcescens* (Tabor &Kellogg ,1970) كمـا لوحظ ان فعالية كلا من Ia و IIa ثبطت بالصوديوم ازايد وايودواسيتامايد وفينايل هايدرازين ممـا يـدل على ان Fe^{+2} و مجاميع السلفاهيدرل ومجاميع الكاربونيل ضرورية لفعالية هذه المتماثلات وهذا مـشابه لأنزيم PAO المنقى من طفيلي الاسكارس (Muller &Walter,1992). غير انه لم تتـأثر فعاليـة هـذه المتناظرات بوجود المثبط ايسونازايد EDTA مما يدل على عدم ضرورة مشاركة المرافـق الأنزيمـي بايريدوكسال فوسفات وCu^{+2} في الفعالية ولم تشر الدراسات الى وجود متناظرات لأنـزيم PAO مـن مصادره المختلفة للمقارنة ولكن المصادر اشارت الى ان الوزن الجزيئي لأنزيم PAO فـي بكتيريـا *S. marcescens* هو 76000 دالتون(Tabor &Kellogg ,1970) ولأنزيم PAO في طفيلـي الاسـكارس 66000 دالتون(Muller &Walter,1992).

المصادر

Al-Katib , S.M., 2000.Occurrence and Properties of Polyamine Oxidase Isoenzymes in the Milk and Cerebrospinal Fluid . Ph. D. Thesis submitted to the college of Education, University of Mosul, Mosul, Iraq.

Bardocz, S., Grang,G.,Brown,D.S.,Ralph,A.,Pusztaii,A., 1993.Polyamines in foods-implication for growth and helth. J.Nutr.Bioche.,.4:66-71.

Bellagamba F., Moretti V.M., Mentasti T., Albertini A., Luzzana U. and Valfre F., 1997. High performance liquid chromatographic determination of polyamines in milk as their 9-fluorenylmethoxy carboxyl derivatives using a column switching technique. J. Chromatogr., Dec. 12: 791(1-2): 79-48.

Brewer J.M., Pesce A.J. and Ashworth, R.B., 1974. Experimental Techniques in Biochemistry, p. 2, Prentice Hall, Inc., New Jersy.

Brosnan M.E. 1985. Synthesis and function of polyamines in mammary gland during lactation, "In : Recent progress in polyamine research" Selmaci L., Brosnan M.E., Seiler N., Eds. Akademiai Kiado, Budapast.

Brosnan M.E., Farrell R., Wilansky H. and Williamson D.H., 1983. Effect of stravation and refeeding on polyamine concentration and ornithine decarboxylase in mammary gland of lactating rats. Biochem. J. 212: 149.

Collins G.G.S., Sandler M., Williams E.D., Youdim M.B.H., 1970. Multiple forms of human brain mitochondrial monoamine oxidase. Nature, Vol. 225: 28.
column switching technique. J. Chromatogr., Dec. 12: 791(1-2): 79-48.

Dourhout B., Van-Beusekom C.M., Huisman M., Kinhma A.W., de Hoog E., Boersma E.R. and Muskiet F.A., 1996. Estimation of 24-hour polyamines intake from mature human milk. J. Pediatr. Gastroenterol Nutr. Oct., 23(3): 298-302.

Flayeh K.A., 1988. Spermidine oxidase activity in serum of normal and schizophrenic subjects. Clin. Chem., 34/2, 401-403.

Flayeh K.A., al-Saffar N.M. and Ismail M.K., 1994. Characteristics od spermidine oxidase from sera of schizophrenic and normal subjects. The Arab J. of Psychiatry, 5: 23-30.

Gahl W.A., Vale A.M. and Pitot H.C., 1982. Spermidine oxidase in human pregnancy serum. Biochem. J. 201: 161-166.

Guirard B.M., Snell E.E., 1964. Effect of polyamine structure on growth stimulation and spermine and spermidine content of lactic acid bacteria. J. Bacteriol. 88, 72.

Holtta E., 1977. Oxidation of spermidine and spermine in rat liver : purification and properties of polyamine oxidase. Biochemistry, 16: 91.

Janne J., Raina A. and Siimes M., 1964. Spermidine and spermine in rat tissues at different ages. Acta Physiol. Scand. 62: 352-358.

Libby, P.P & Porter, C.W., 1987. Separation of two isoenzymes of ployamine oxidase from murine L 1210 Leukemia cells, Biochem. Biophs. Res.

Commum. , 144:528-535.
Mondovi H., Riccio, P. and Agostinell E., 1988. The biological functions of amine oxidase and their reaction products : An overview. In : Progress in polyamine research, Zappra, V., Pegg A.E. (Eds.) Pienum press, New York.
Muller S. and Walter R.D., 1992. Purification and characterization of polyamine oxidase from Ascaris summ. Biochem. J. London. The biochemical society. Apr. 1: 283 (1); 75-80.
Nancy R. and Rauch R.J., 1973. Isoenzymes of amine oxidase in human plasma and other tissues. Experientia, 29(2): 215-217.
Pegg A.E., McCann P.P., 1982. Polyamine metabolism and functions : A brief review. Am. J. Physiol., 243: 212-221.
Russell D.H., 1970. Discussion : puterscine and spermidine biosyntheis in growth and development. Ann. NY Acad Sci., 171: 772-782.
Tabor C.W. and Kellogg P.D., 1970. Identification of flavin adenine dinucleotide and heme in a homogenous spermidine dehydrogenase from serratia marcescens. J. Biol. Chem., 245, (20): 5424-5433.
Wootton I.D.P., 1974. Microanalysis in Medical Biochemisty, 5th ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 156-159.