تثبيط فعالية انزيم بولي امين اوكسيديز المنقى جزئيا من مصل الاشخاص المصابين بداء السكر غير المعتمد على الانسولين

عمر يونس محمد العباسي

قسم الكيمياء ، كلية التربية ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

(تاريخ الاستلام: ١١ / ٢ / ٢٠٠٨ ، تاريخ القبول:٢٩ / ١٠ / ٢٠٠٨)

الملخص

تم دراسة وجود فعالية انزيم بولي امين اوكسيديز (PAO) في مصل الاشخاص المصابين بداء السكر غير المعتمد على الانسولين (النوع الثاني). وحددت الظروف المثلى لقياس فعالية الانزيم الخام باستخدام السبرمين كمادة اساس. وجد ان فعالية انزيم PAO تتناسب مع تقدم زمن التفاعل ولحد (٦٠) ثانية، وان اقصى فعالية للانزيم كانت عند استخدام محلول الفوسفات المنظم عند pH=5 ودرجة حرارة (٣٠) °م وفترة حضن (٥) دقائق وحجم انزيم (١٠٠) مايكروليتر. من خلال رسم لينويفر–بيرك، وجد ان السرعة القصوى التي يعمل بها الانزيم تساوي (٠,٤٤) وحدة انزيمية/مللتر، وان قيمة K_m تساوي (٢) ملي مولار باستخدام السبرمين كمادة اساس. ان ايون K^+ هو اكثر الايونات تحفيزا لفعالية انزيم PAO ، حيث ادى الى تحفيز الانزيم بمقدار (٢٠٠%). تم تنقية انزيم PAO من المصل باستخدام تقنيات الفرز الغشائي وكروماتوغرافيا التبادل الايوني السالب، وتم الحصول على المتماثلين I و II للانزيم وبفعالية نوعية مقدارها (٠,٣٩) و (٠,٤٦) وحدة انزيمية/ملغم بروتين على التوالي، وبنقاوة بلغت (١٦٩,٥) و (٢٠) مرة على التوالي.

درس تثبيط فعالية انزيم PAO المنقى جزئيا بوجود فيتامين E وعقار المتيفورمين وفيتامين E مع عقار المتيفورمين، ولوحظ ان ادنى تراكيز لهذه العقارات ادت الى اعلى تاثير تثبيطي كانت 10^{-5}، 10^{-4} و 10^{-5} مولار على التوالي. وان نوع التثبيط الحاصل للانزيم باستخدام هذه التراكيز كان تثبيطا تنافسيا. اذ كانت قيمة K_m بعدم وجود المثبط ١,٣٣ ملي مولار، بينما اصبحت قيم K_m` ٢,٥، ٥ و ٦,٦ ملي مولار بوجود المثبطات المذكورة اعلاه على التوالي. في حين بقيت قيمة V_{max} ثابتة لم تتغير وقيمتها (٠,٢٧) وحدة انزيمية/مللتر. ومن دراسة خصائص التثبيط، تبين ان قيم ثابت التثبيط K_i كانت ٠,٥٣، ٠,٢٩ و ٠,٢٠ ملي مولار لكل من المثبطات المستخدمة على التوالي. ووفقا لهذا فان هذه النتائج تشير الى ان الميتفورمين مع فيتامين E ذو تاثير تثبيطي افضل من المتيفورمين وهذا الاخير بدوره افضل من فيتامين E .

الكلمات الدالة: بولي امين، بولي امين اوكسيديز، داء السكر، فيتامين E

المقدمة

مركبات متعددة الامين (PA) Polyamine ، السبرمين والسبرمدين والبوترسين مركبات عضوية متعددة الشحنة الموجبة ذات اوزان جزيئية واطئة، وهي منتشرة في خلايا الكائن الحي كافة[١]. تلعب هذه المركبات دورا اساسيا في العمليات الحياتية بضمنها نمو وتمايز الخلايا[٢]. وتبين انها تمتلك دورا مهما في حث ووقاية نظام موت الخلية المبرمج[٣]. ولقد اوضح Ha وجماعته[٤] سنة (١٩٨٨) قدرة السبرمين على حماية الـ DNA من خلال اكتساحه للجذور الحرة. لوحظ ارتفاع مستوى مركبات PA في مصل وادرار المصابين بسرطان البنكرياس والقولون[٥]. ان الوظائف المهمة المعينة التي تلعبها مركبات PA في النسيج المعين يعتمد لحد ما على نمط الايض لهذه المركبات[٦]. ويعد انزيم بولي امين اوكسيديز Polyamine oxidase (PAO) [E.C.1.4.3.6] من الانزيمات التقويضية، اذ يحفز اكسدة وحذف مجاميع الامين من مركبات PA لينتج عن ذلك H_2O_2 واموانيا والديهايدات كنواتج للتفاعل[٧].

$$PA + O_2 + H_2O \longrightarrow H_2O_2 + NH_3 + \text{aldehyde (s)}$$

ان انزيم PAO يعمل على التنظيم الدقيق لمستويات PA داخل وخارج الخلايا[٨]. وجدت فعالية لانزيم PAO في مصل الانسان الطبيعي، وان له الفة عالية تجاه السبرمدين[٩]. كما لوحظ وجود مستوى عالي لفعالية انزيم PAO في مصل كل من المرضى المصابين بالكآبة والفصام[١٠]. وقد تبين ان هناك زيادة في فعالية انزيم امين اوكسيديز •Amine oxidase في بلازما مرضى الفشل الكلوي وداء السكر[١١]. كما اشارت الدراسات الى ارتفاع فعالية انزيم Semicarbazide Sensitive Amine Oxidase (SSAO) لبلازما بعض الامراض المزمنة التي تصيب الانسان مثل داء السكر، وان هذا الارتفاع كان مؤشرا على مضاعفات المرض[١٢]. مما قادنا الى تحديد الظروف المثلى لفعالية انزيم PAO في مصل المرضى المصابين بداء السكر غير المعتمد على الانسولين (النوع الثاني)، ومن ثم تنقيته تحت هذه الظروف ودراسة تثبيطه بواسطة احد مضادات الاكسدة واحد العقارات المستخدمة لعلاج داء السكر.

المواد وطرائق العمل

جمع العينات:

جمعت العينات من الاشخاص المصابين بداء السكر غير المعتمد على الانسولين والذين تراوحت اعمارهم من (٣٥ سنة فما فوق) من مركز الوفاء لعلاج السكري في مدينة الموصل، وبمعدل (٠,٥–٢) مللتر للعينة الواحدة.

فصل مصل الدم:

فصل المصل بوضع انابيب عينات الدم في حمام مائي عند درجة حرارة (٣٧) °م ولمدة (١٠) دقائق. عزل المصل عن الجزء المتخثر باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد وبسرعة (٣٠٠٠) دورة/دقيقة ولمدة (١٠) دقائق، ثم سحب مصل الدم الرائق ليحفظ في التجميد[١٣].

تقدير كمية البروتين:

استخدمت طريق بايوريت لتقدير كمية البروتين[١٤].

قياس فعالية انزيم PAO :

• ان انزيمي PAO و SSAO هما من مجموعة (صنف) انزيمات Amino oxidase .

قيست فعالية انزيم PAO اساسا بالاعتماد على الطريقة المبدئية للباحثين[١٥] Flayed and Al-Katib (2004) لتحديد الظروف المثلى لفعالية الانزيم. تعتمد الطريقة على متابعة مقدار النقصان في الامتصاصية عند ٤١٠ نانوميتر لمحلول البوتاسيوم فيري سيانيد الذي يعمل كمستقبل للاليكترونات، وحددت وحدة فعالية الانزيم على انها كمية الانزيم اللازمة لاكسدة مايكرومول واحد من المادة الاساس (سبرمين) في الدقيقة الواحدة. علما ان الامتصاصية المولارية للبوتاسيوم فيري سيانيد[١٦] (٩٦٠) لتر.مول$^{-١}$.سم$^{-١}$.

الفرز الغشائي:

اجريت عملية الفرز الغشائي لعينة المصل لتنقية انزيم PAO بحجم (٥,٥) مللتر ولمدة (٥) ساعات، في درجة حرارة (٤) °م وباستخدام محلول الفوسفات المنظم Na_2HPO_4-KH_2PO_4 بتركيز (٢٠) ملي مولار و pH 6.8 = مع مراعاة تغيير المحلول كل ساعة. وتم الحصول على (٥) مللتر بعد اجراء العملية.

التبادل الايوني:

تم تنقية انزيم PAO الناتج من عملية الفرز الغشائي بواسطة كروماتوغرافيا التبادل الايوني، اذ استخدم عمود الفصل الزجاجي ذو الابعاد (٤٠ × ٢,٥) سم، الحاوي على المبادل الايوني السالب DEAE-Cellulose A50 ، وباستخدام محلول الفوسفات المنظم Na_2HPO_4-KH_2PO_4 بتركيز متدرج gradient تراوح بين (٧٥-١٥) ملي مولار و pH = ٦,٨ . كانت سرعة جريان المحلول flow rate من عمود الفصل بمعدل ٤٢ مللتر/ساعة وبحجم ٧مللتر لكل جزء. تمت متابعة القمم البروتينية المنفصلة بقياس الامتصاصية عند الطول الموجي (٢٨٠) نانوميتر، وتم الاستدلال على القمة البروتينية الحاوية على فعالية انزيم PAO باستخدام الطريقة المثالية المثبتة لتحديد فعالية الانزيم.

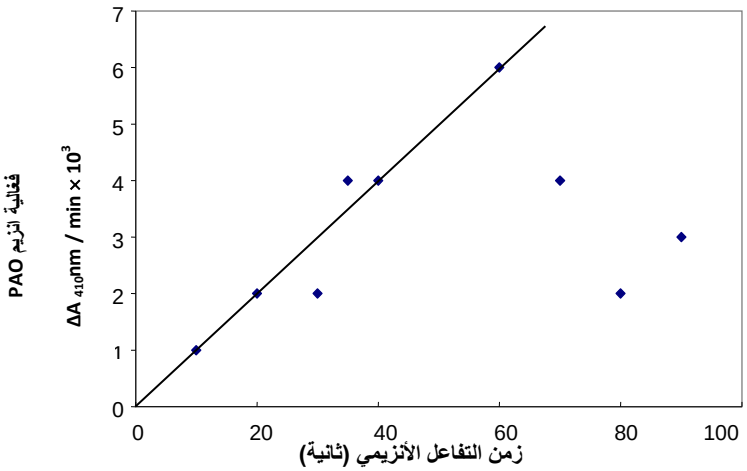
تثبيط فعالية انزيم PAO :

اتبعت طريقة Befani (2001) وجماعته[١٧] لدراسة تثبيط فعالية انزيم PAO. قيست فعالية الانزيم باستخدام الطريقة المثالية المثبتة لتحديد فعالية الانزيم.

النتائج والمناقشة

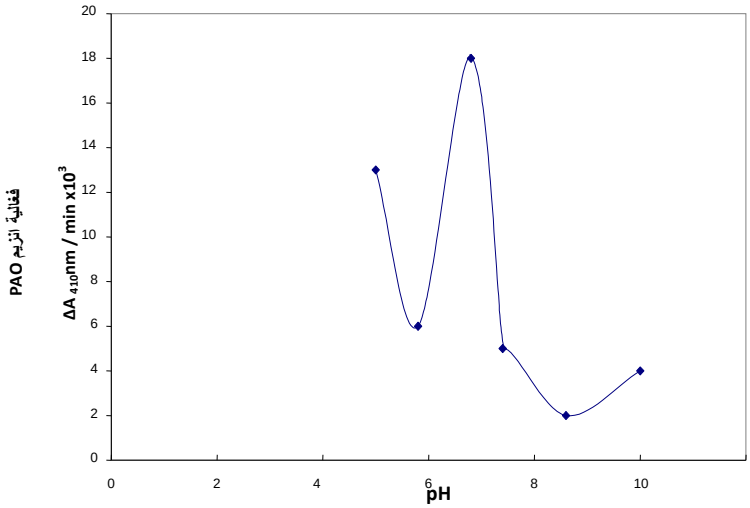
تحديد الظروف المثلى لفعالية انزيم PAO الخام

حددت الظروف المثلى لفعالية انزيم PAO الخام في مصل المرضى المصابين بداء السكر غير المعتمد على الانسولين، ووجد ان سرعة التفاعل الانزيمي تزداد طرديا مع تقدم زمن التفاعل ولغاية (٦٠) ثانية (شكل ١)



شكل رقم(١):تأثير الزمن على سرعة تفاعل انزيم PAO الخام

وهذا يتفق مع ما وجد عليه انزيم PAO الخام في السائل المخي الشوكي[١٨] وخلايا الدم الحمر للاشخاص المصابين بالفصام[١٩]. وقد لوحظ انخفاض الفعالية الانزيمية في اغلب الاحيان بعد (٦٠) ثانية من بداية التفاعل الانزيمي، وربما يعود السبب الى حدوث تثبيط للانزيم لاسباب مختلفة، منها تكون مركبات تعمل على تثبيط الفعالية الانزيمية. كما اظهرت النتائج ان اعلى فعالية للانزيم كانت عند استخدام محلول الفوسفات المنظم Na_2HPO_4-KH_2PO_4 بتركيز (٢٠) ملي مولار و pH 6.8 = (شكل ٢)

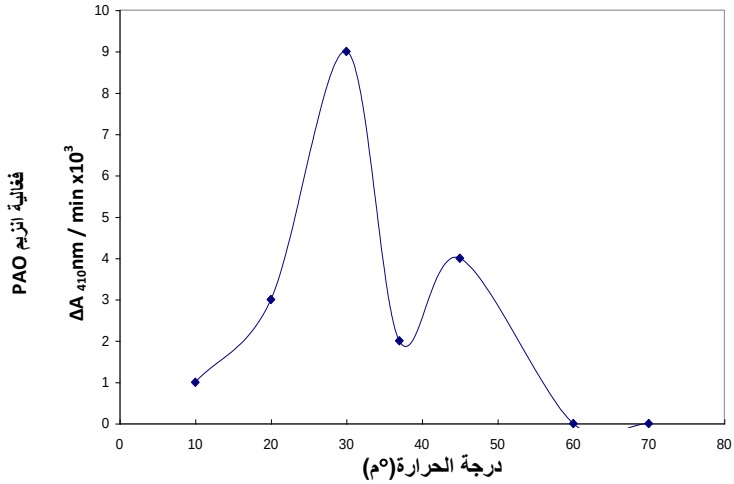


شكل رقم (٢): تأثير الدالة الحامضية على فعالية انزيم PAO الخام

Citric acid- NaOH pH=5
Citric acid –Trisodium citrate pH=5.8
Na_2HPO_4-KH_2PO_4 pH=6.8
Na_2HPO_4-NaH_2PO_4 pH=7.4
Tris –HCl pH=8.6
$NaHCO_3$-NaOH pH=10

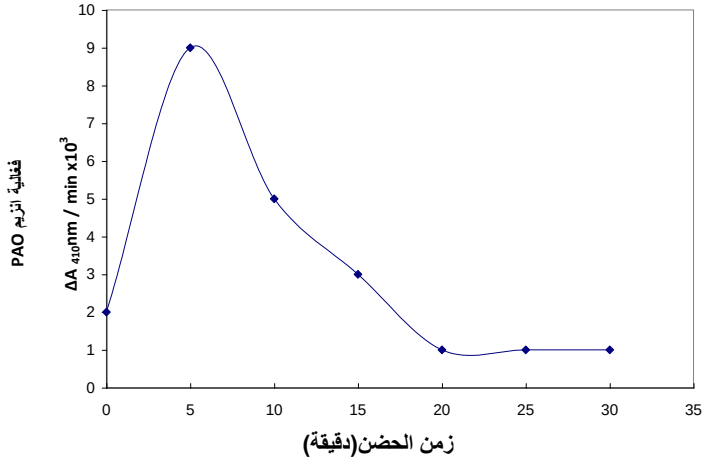
وهذا مقارب لما وجد عليه انزيم PAO في مصل الانسان[٢٠] والاغنام[٢١]، اذ كانت pH المثلى لها تساوي (٧,٢)، ولكنها اقل من تلك لانزيم PAO الخلايا السرطانية للقولون والتي وجدت فيه pH المثلى تساوي (٩)[٢٢].

لوحظ ان درجة الحرارة المثلى لفعالية انزيم PAO كانت عند (٣٠) °م (شكل ٣)



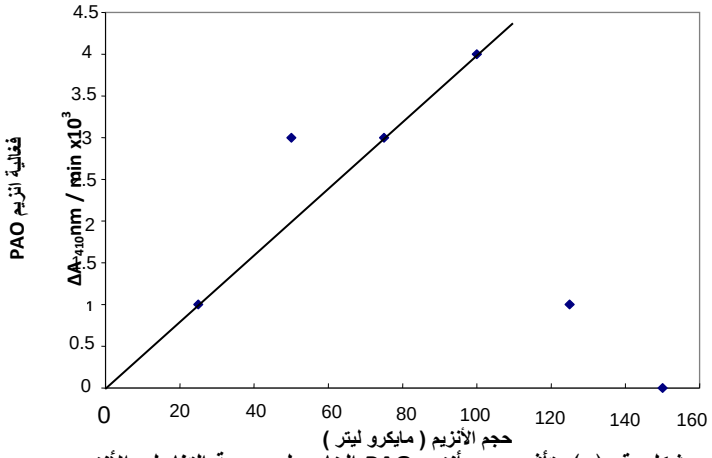
شكل رقم (3): تأثير درجة الحرارة على فعالية انزيم PAO الخام

وان اقصى فعالية ظهرت عند زمن حضن (٥) دقائق (شكل ٤).



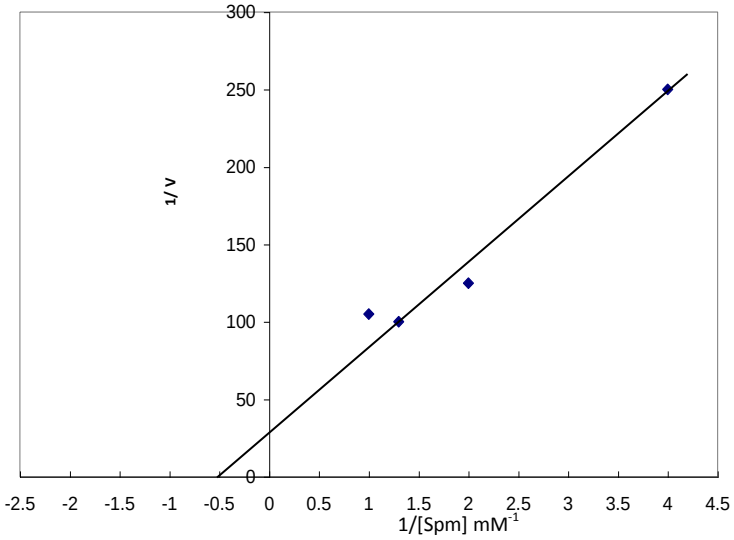
شكل رقم (4): تأثير زمن الحضن على فعالية انزيم PAO الخام

في حين بلغت درجة الحرارة المثلى للانزيم الخام (٣٧) °م في الحليب[١٥] وخلايا الدم الحمر للاشخاص المصابين بالفصام[١٩]. كما انها اقل بكثير من تلك في مصل الامهات الحوامل والتي كانت (٥٥) °م[٢٣].يبين الشكل (٥) ازدياد الفعالية الانزيمية بزيادة حجم الانزيم (تركيز البروتين)، اذ بلغت سرعتها القصوى لحد حجم (١٠٠) مايكروليتر من المحلول الانزيمي الخام، وهذا مشابه لانزيم PAO الخام في الحليب[١٥] وخلايا الدم الحمر[١٩].



شكل رقم (٥): تأثير حجم أنزيم PAO الخام على سرعة التفاعل الأنزيمي

اظهر رسم لينويفر–بيرك (شكل ٦) ان قيمة V_{max} و K_m للانزيم كانتا (٠,٤٤) وحدة انزيمية/مللتر و (٢) ملي مولار على التوالي باستخدام السبرمين كمادة اساس. وقد بينت الدراسات السابقة ان قيمة K_m للانزيم الخام في الحليب كانت (١,٢٥) ملي مولار[١٥]. في حين بلغت قيمة K_m لانزيم PAO المنقى من السائل المخي الشوكي (٠,٣٧) ملي مولار[٢٤]. وفي طفيلي الاسكارس (٠,٦٦) ملي مولار[٢٥] باستخدام السبرمين كمادة اساس.



شكل رقم (٦) : رسم لينويفر– بيرك لأنزيم PAO الخام

يشير الجدول (١) الى تاثير الايونات المختلفة على فعالية انزيم PAO الخام، وان ايون البوتاسيوم يمتلك اعلى تاثير حيث ادى الى تحفيز الانزيم بمقدار (٢٠٠%) مقارنة بالسيطرة، وهذا يتفق مع انزيم PAO الخام في السائل المخي الشوكي، والذي ازدادت فعاليته بنسبة (٢١٥,٥%) باستخدام نفس الايون مقارنة بالسيطرة[١٨].

الجدول (١): تاثير الايونات المختلفة على فعالية انزيم PAO الخام في مصل الاشخاص المصابين بداء السكر غير المعتمد على الانسولين

الايون (٥) ملي مولار	الفعالية (وحدة انزيمية/مللتر)*	الفعالية النسبية (%)
control	٠,١٢	١٠٠
KCl	٠,٢٤	٢٠٠
$CaCO_3$	٠,٢١	١٧٥
$MgCl_2$	٠,١٩	١٥٨,٣
Li_2SO_4	٠,١٢	١٠٠
NaCl	٠,١٢	١٠٠

* الوحدة الانزيمية U تشير الى كمية الانزيم التي تؤكسد مايكرومول واحد من المادة الاساس (سبرمين) في الدقيقة الواحدة.

وبهذا تم تثبيت الظروف المثلى لفعالية انزيم PAO الخام في مصل الاشخاص المصابين بداء السكر غير المعتمد على الانسولين في جميع التجارب اللاحقة.

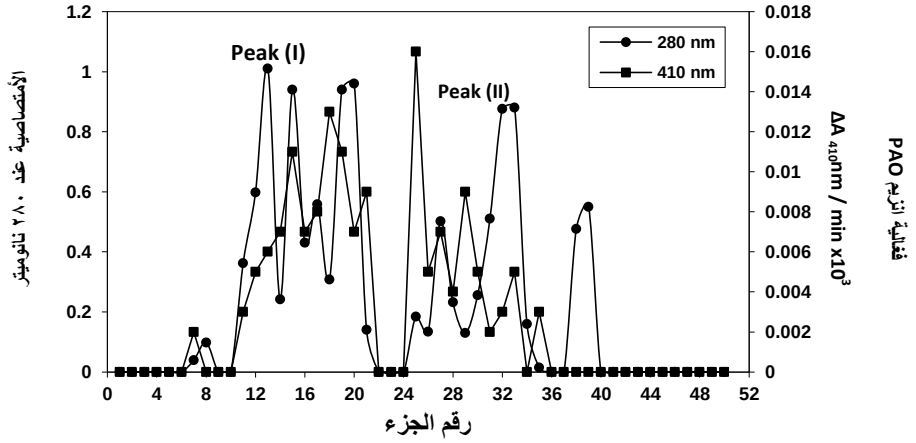
الجدول (٢): خطوات تنقية انزيم PAO في مصل الاشخاص المصابين بداء السكر غير المعتمد على الانسولين

خطوات التنقية	الحجم (مللتر)	تركيز البروتين (ملغم/مللتر)	البروتين الكلي (ملغم)	الفعالية (وحدة انزيمية/مللتر)	الفعالية الكلية (وحدة انزيمية* U)	الفعالية النوعية (وحدة انزيمية/ ملغم بروتين)	الاسترجاع	عدد مرات التنقية
الخام	٦	٧٣,٥	٤٤١	٠,١٧	١,٠٢	٠,٠٠٢٣	١٠٠	١
الفرز الغشائي	٥	٦٦	٣٣٠	٠,٢٥	١,٢٥	٠,٠٠٣٧	١١٩,٠٤	١,٦
التبادل الايوني								
I	٥٥	٠,٩١	٥٠,٠٥	٠,٣٦	١٩,٨	٠,٣٩	١٩٤١,١٧	١٦٩,٥٦
II	٤٥	٠,٧٥	٣٣,٧٥	٠,٣٥	١٥,٧٥	٠,٤٦	١٥٤٤,١	٢٠

* الوحدة الانزيمية U تشير الى كمية الانزيم التي تؤكسد مايكرومول واحد من المادة الاساس (السبرمين) في الدقيقة الواحدة.

تنقية انزيم PAO

يوضح الجدول (٢) نتائج تنقية انزيم PAO من مصل الاشخاص المصابين بداء السكر غير المعتمد على الانسولين. لوحظ ان الفعالية النوعية للانزيم الخام (٠,٠٠٢٣) وحدة انزيمية/ملغم بروتين، وان الفعالية النوعية بعد اجراء عملية الفرز الغشائي اصبحت (٠,٠٠٣٧) وحدة انزيمية/ملغم بروتين. تشير النتائج اعتمادا على مظهر الروغان elution profile المستحصل من تنقية انزيم PAO باستخدام المبادل الايوني السالب DEAE-cellulose A50 الى وجود قمتين متميزتين (شكل ٧). ظهرت الفعالية الانزيمية للقمة الاولى (Peak I) عند حجم روغان (٥٥-١٠٥) مللتر وبفعالية نوعية مقدارها (٠,٣٩) وحدة انزيمية/ملغم بروتين. بينما ظهرت الفعالية الانزيمية للقمة الثانية (Peak II) عند حجم روغان (١٢٥-١٦٥) مللتر وبفعالية نوعية مقدارها (٠,٤٦) وحدة انزيمية/ملغم بروتين.



شكل رقم (٧): نموذج الروغان المستحصل من تنقية انزيم PAO بتقنية التبادل الأيوني وباستخدام عمود الفصل ذي الأبعاد (2.5x40)سم والحاوي على المبادل الأيوني السالب DEAE-Cellulose

تثبيط فعالية انزيم PAO (Peak II) المنقى جزئيا من مصل الاشخاص المصابين بداء السكر غير المعتمد على الانسولين

يبين الجول رقم (٣) التاثير التثبيطي لفيتامين E ، عقار المتيفورمين وفيتامين E مع عقار المتيفورمين على التوالي، وبتراكيز تراوحت من (10^{-1}-10^{-7}) مولار على فعالية انزيم PAO (Peak II) المنقى جزئيا. ولوحظ ان لهذه العقارات القابلية على تثبيط الانزيم، وان اقل تراكيز لهذه المركبات ادت الى افضل تاثير تثبيطي كانت (10^{-5}، 10^{-4}، 10^{-5}) مولار لكل منهم على التوالي. اذ ثبط الانزيم كليا عند هذه التراكيز. وقد بينت دراسات سابقة ان كلا من عقار الميتفورمين وفيتامين E كان لهما تاثير تثبيطيا على فعالية انزيم PAO المنقى جزئيا من السائل المخي الشوكي للاطفال المصابين بالتهاب السحايا البكتيرية، وان العلاقة بين فعالية الانزيم وتراكيز المثبطين كانت علاقة عكسية[٢٤]. كما ان العقار MDL 72527 يعمل كمثبط خصوصي لفعالية انزيم PAO[٢٦]. وقد تبين ايضا ان فعالية انزيم PAO في مصل الانسان ثبطت بمقدار ٨٠% بواسطة عقار الكلوروكوين[٩]، وان هذا العقار ثبط فعالية الانزيم للخلايا السرطانية للقولون في الانسان بنسبة ٨٢%[٢٢]. وقد اقترح مؤخرا ان تثبيط انزيم SSAO يعمل على التقليل من تقدم داء السكر[٢٧].

ان اختيار عقار المتيفورمين، يعود الى انه يستخدم لعلاج مرضى داء السكر (النوع الثاني)، وفي الوقت نفسه يمتلك تركيبا كيمياويا مشابها للمركبات متعددة الامين. وهو بهذا يمكن ان يعمل كمثبط لفعالية انزيم PAO . اما فيتامين E (الفا-توكوفيرول)، فهو احد المركبات المضادة للاكسدة في الوسط الدهني، وان التاثير التثبيطي له قد يعزى الى ان الخلية الحية تستخدم الجزيئات المضادة للاكسدة لحماية نفسها من تاثيرات الجذور الحرة. فضلا عن انه يحتوي في تركيبه على مجموعة مشابهة في الحيز الفراغي للمركبات متعددة الامين، يمكنها ان تعمل على اشغال او اعاقة الموقع الفعال او جزء منه للانزيم المذكور.

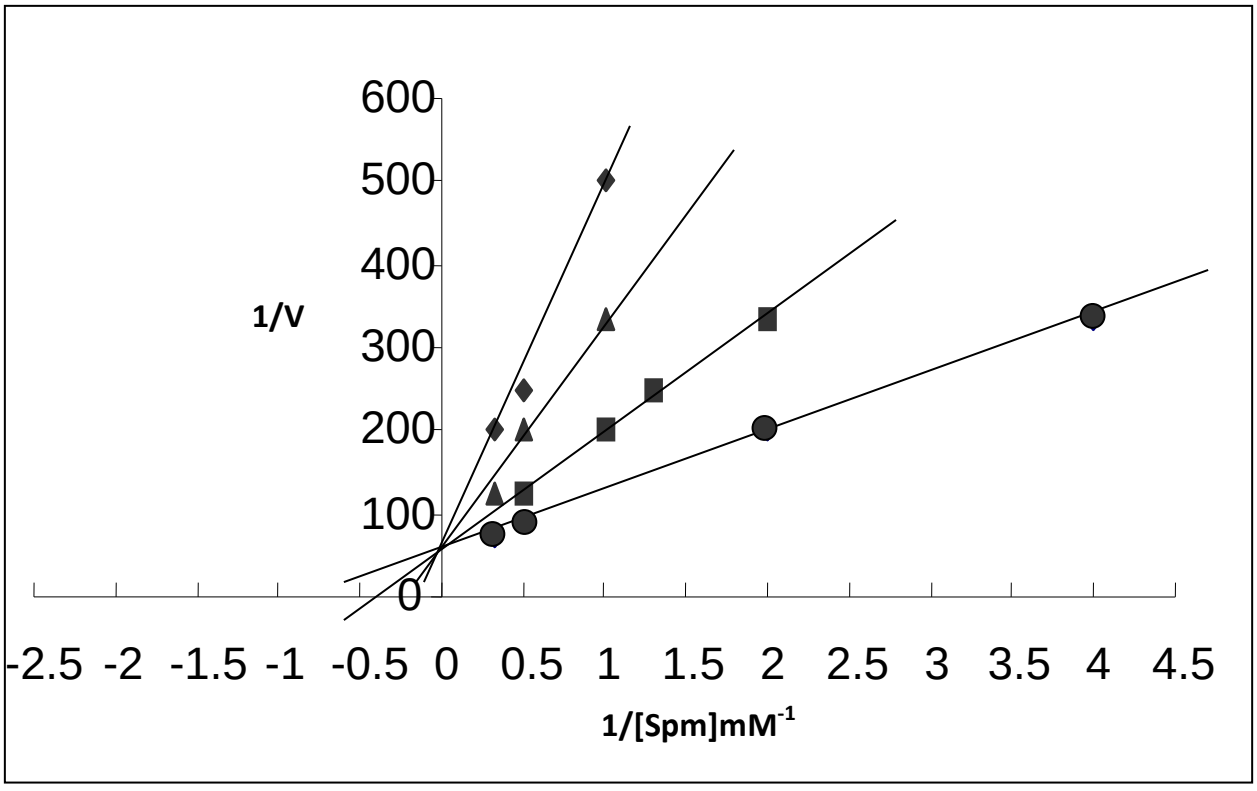
يتبين من رسم لينويفر-بيرك (شكل ٨) ان التثبيط الحاصل للانزيم كان من النوع التنافسي، عند استخدام المثبطات فيتامين E وعقار الميتفورمين وفيتامين E مع عقار الميتفورمين بتركيز 10^{-5}، 10^{-4}، 10^{-5} مولار على التوالي، اذ لوحظ انه بعدم وجود هذه المثبطات كانت قيمة K_m (١,٣٣) ملي مولار، في حين اصبحت قيم K_m` (الظاهرية)، (٢,٥، ٥، ٦,٦) ملي مولار بوجود المثبطات المذكورة اعلاه على التوالي. بينما بقيت قيمة V_{max} ثابتة وقيمتها (٠,٢٧) وحدة انزيمية/مللتر. وهذا مشابه لانزيم PAO المنقى جزئيا من السائل المخي الشوكي للاطفال المصابين بالتهاب السحايا البكتيرية، حيث كان نوع التثبيط تنافسي باستخدام كلا من فيتامين E وعقار المتيفورمين[٢٤]. كما ان نوع التثبيط لانزيم PAO المنقى من طفيلي الاسكارس، تنافسيا ايضا بوجود عقار MDL 72527[٢٥].

جدول رقم(٣) يبين التاثير التثبيطي للمثبطات فيتامين E ، الميتفورمين والميتفورمين مع فيتامين E

تركيز المثبط(مولاري)	% للتثبيط		
	فيتامين E	ميتفورمين	ميتفورمين مع فيتامين E
10^{-1}	١٠٠	٩٢,٣	١٠٠
10^{-2}	١٠٠	٤٦,١	٧٦,٩
10^{-3}	٤٦,١	١٠٠	٦٩,٢
10^{-4}	٣٠,٧	١٠٠	٣٠,٧
10^{-5}	١٠٠	٥٣,٨	١٠٠
10^{-6}	٧,٦	١٥,٣	٤٦,١
10^{-7}	٧,٦	٥٣,٨	٦٩,٢

كما تبين من خلال خصائص التثبيط، ان قيم ثابت التثبيط K_i كانت (٠,٥٣، ٠,٢٩، ٠,٢٠) ملي مولار لكل من المثبطات المستخدمة على التوالي. ووفقا لهذه النتائج فان هذه القيم تشير الى ان الميتفورمين مع فيتامين E ذو تاثير تثبيطي افضل من الميتفورمين، وهذا الاخير بدوره افضل من فيتامين E . من هنا نقترح ان ميكانيكية عمل عقار الميتفورمين وفيتامين E في داء السكر قد يعزى الى امتلاكهما الية تثبيط فعالية انزيم PAO من خلال تقليل احد اصناف الاوكسجين الفعالة (H_2O_2) الناتج من عملية اكسدة انزيم PAO لمركبات PA ، حيث ان خلايا بيتا البنكرياسية قد تكون غير متضررة بشكل كامل في داء السكر من النوع الثاني، وان زيادة فعالية هذا الانزيم يؤدي الى زيادة اصناف الاوكسجين الفعالة التي تهاجم خلايا بيتا مما يزيد سوء الحالة المرضية[٢٨].

ان زيادة فعالية انزيم PAO سوف تؤكسد مركبات PA بصورة اكبر ويقل تركيزها، وهي مركبات كاسحة للجذور الحرة[٤]، وفي الوقت نفسه يزداد تركيز H_2O_2 مؤثرا بذلك على انسجة الجسم، حيث ان زيادة تكوين اصناف الاوكسجين الفعالة تؤدي الى حدوث تغيرات كبيرة في المكونات الخلوية وبالتالي حدوث حالة الكرب التاكسدي Oxidative stress الذي يؤدي الى الاصابة بالعديد من الامراض التي تصيب الانسان ومنها داء السكر[٢٩].



شكل رقم(٨) : رسم لينويفر – بيرك موضحا نوع التثبيط على فعالية انزيم PAO المنقى جزئيا

فينامينEبتركيز 10^{-5}(M)

الميتفورمين بتركيز 10^{-4}(M)

الميتفورمين+فيتامين E بتركيز 10^{-5}(M)

المصادر

1. H.M. Wallace, A.V. Fraser and A. Hughes, Biochem. J., 376 (2003) 1-14.
2. C. Valentim, F.G. Mell, W. Desouza and M.A. Uannier-Santos, Acta Microscopica, 12 (2003) 229-230.
3. T. Thomas and T.J. Thomas, Ceil. Mol. Life Sci., 58 (2001) 244-258.
4. C.H. Ha, N.S. Sirisoma, P. Kuppusamy, L. Zweier, P.M. Walter and Jr.R.A. Casero, Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 95(19) (1998) 11140-11145.
5. C. Loser, U.R. Flosch, C. Paprotny and W. Creutzfeldt, Cancer, 56(4) (1990) 958-966.
6. A. Sessa and A. Perin, Clin. Exp. Res., 21(2) (1997) 318-325.
7. E. Agostinelle, G. Arancia, L. Della Uedova, F. Bell, M. Marra, M. Salvi and A. Toninello, Amino Acids J., 27 (2004) 347-358.
8. C. Binda, A. Coda, R. Angelini, P. Ascenzi and A. Mattevi, Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr., 54(2) (1998) 1429-1431.
9. K.A. Flayeh, Clin. Chem., 34(2) 1988 401-403.
10. K. Dahel, K.A. Flayeh. and N.M. Al-Saffar, Neutrochem. Res., 26(4) (2001) 415-418.
11. K. Sakata, K. Kashiwagi, S. Sharmis, S. Ueda and K. Igarashi, Biochem. Soc. Trans., 31 (2000) 371-374.
12. F. Boomsma, F.H. Derkx, A.H. Vanden Maracken, A.J. Manin't Veld and M.A. Sckalekamp, Clin. Sci., 88 (1995) 675-679.
13. D.J. Zhang, R.K. Elswick, G. Miller and J.L. Baily, Clin. Chem., 44 (1998) 1325-1333.
14. I.D.P. Wootton, Microanalysis in Medical Biochemistry, 5th ed., Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 156-159, 1974.
15. K.A. Flayeh and S.M. Al-Katib, Raf. J. Sci., 15(2) (2004) 154-164.
16. C.W. Tabor and P.D. Kellogg, J. Biol. Chem., 245(20) (1970) 5424-5433.
17. O. Befani, E. Grippa, L. Saso, P. Turini and B. Mondovi, Inflamm. Res., 50 (2001) 136-137.

١٨. الكاتب، سميرة محمد يحيى، اطروحة دكتوراه، كلية التربية، جامعة الموصل، الموصل، العراق، ٢٠٠٠.

١٩. الجبوري، طارق سليمان محمود، رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل، الموصل، العراق، ٢٠٠٢.

٢٠. دحل، خير الدين محمد سليمان، رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل، الموصل، العراق، ١٩٩٥.

21. J.G. Hirsh, J. Exp. Med., 997 (1953) 345-355.
22. K.A. Flayeh, Raf. J. Sci., 9(2) (1998) 25-33.
23. W.A. Gahl, A.M. Uale H.C. and Pitot, Biochem., 201 (1982) 161-166.

٢٤. العباسي، عمر يونس محمد، رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة الموصل، الموصل، العراق، ٢٠٠٣.

25. S. Muller and R.D. Walter, Biochem., 283(1) (1992) 75-80.
26. S. Majumder and F. Kierszenbaum, Mol. Biochem. Parsitol., 60(2) (1993) 231-240.
27. C. Gokturk, H. Garpenstrand, J. Nilsson, J. Nordquist, L. Oreland and K. Forsberg-Nilson, Biochem. Biophys. Acta, 1647 (2001) 88-91.
28. R.K. Murray, D.K. Granner, P.A. Mages and U.W. Rodwell, Harper's Biochemistry, 5th ed., Appleton and Lange, USA, pp. 155-156, 2000.
29. G. Vandemiale, Int. J. Clin. Lab. Res., 29(2) (1999)

Inhibition of Partially Purified Polyamine Oxidase Activity from Serum of Non-insulin-dependent Diabetes Mellitus Patients

Omar Younis Mohammed Al-Abbasy

Department of Chemistry , College of Education , University of Mosul , Mosul , Iraq

(Received 11 / 2 / 2008 , Accepted 29 / 10 / 2008)

Abstract

The research included the detection of polyamine oxidase [E.C.1.4.3.6] activity in serum of non-insulin-dependent diabetes patients (Type II). Optimal conditions for crude PAO activity were determined in serum using spermine as substrate. PAO activity was found to be proportional with time of reaction up to (60) sec. The maximum activity was obtained by using phosphate buffer at pH = 5, temperature (30) °C, incubation time (5) min. and (100) µl of enzyme volume.

By using Linweaver-Burk plot, it was found that V_{max} to be (0.44) enzyme unit/ml and K_m value to be (2) mM with spermine as substrate. K^+ was the most potent activator for PAO activity. It activated the enzyme by (200%). PAO was purified from serum by dialysis and anion exchange chromatography techniques. Two PAO isoenzymes I and II were obtained, with specific activity of (0.39) and (0.46) respectively, and with purification fold of (169.5) and (20) respectively compared to crude enzyme. Inhibition of partially purified PAO was studied by Vitamin E, Metformine drug and Metformine with Vitamin E. The higher inhibitory effects obtained at the lower concentrations of inhibitors 10^{-5}, 10^{-4} and 10^{-5} M respectively.

The inhibition type of PAO by using these concentrations was competitive. Km value without inhibitors was (1.33) mM, then became K_m` (2.5, 5 and 6.6) mM with inhibitors respectively. However V_{max} value remained (0.27) enzyme unit/ml. The inhibition properties shown, the inhibition constant K_i values were (0.53, 0.29 and 0.20) mM for each inhibitor respectively. Accordingly, these results indicate that inhibitory effect of Melformine with Vitamin E was a better than Metformine and this was a best of Vitamin E.

Key words: Polyamine, polyamine oxidase, diabetes mellitus, Vitamin E