# دراسة تأثير بعض معوضات الهيدرازون المحضرة على فعالية أنزيم كرياتين كاينيز

**طارق سليمان محمود الجبوري**

*قسم الكيمياء ، كلية العلوم ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق*

( تاريخ الاستلام: ١٥ / ٥ / ٢٠٠٨ ، تاريخ القبول: ١٣ / ١٢ / ٢٠١٠ )

**الملخص**

تضمنت الدراسة متابعة معوضات الهيدرازون المحضرة والمشخصة بتقنية طيف الأشعة تحت الحمراء **(I.R)** على فعالية أنزيم كرياتين كاينيز **(CK)** إذ تبين إن المركبات **(c, b, a)** تعمل على زيادة الفعالية الأنزيمية للأنزيم **(CK)** وبأعلى نسبة عند التراكيز **(50, 50, 75 mg/10 ml)** وبنسب تنشيط مئوية **(250, 202.5, 241.8)** على التوالي .

كما وجد أن المركبين **(e, d)** يعجلان على تثبيط أنزيم **(CK)** وبأعلى نسبة تثبيط **(100%)** للمركبين عند التراكيز **(150, 10 mg/10 ml)** على التوالي.

**المقدمة :**

حضيت قواعد شف **Schiff bases** باهتمام واسع من قبل الباحثين لما لها من دور هام في الاستخدامات الطبية والصيدلانية [1, 2] إضافة إلى كونها تعمل كمضادات حيوية للبكتيريا **Antibacterial** [3, 4] وللسرطان **Anticancer** [5] وللفطريات **Antifungal** [6,7]. كما استخدمت صناعياً كمثبطات للتآكل [8] وكمضادات للتأكسد **Antioxidants** [9].

الكرياتين كاينيز **Creatine Kinase (CK)** الناقل لمجموعة الفوسفات **(Ec 2.7.3.2)** [10] ، يعمل أنزيم **CK** على تحفيز النقل العكسي لمجاميع الفوسفات بين الكرياتين والأدينوسين ثنائي الفوسفات **Adenosine diphosphate (ADP)** حسب التفاعل التالي : [11]

$$\text{Creatine} + \text{ATP} \underset{}{\overset{\text{CK}}{\rightleftharpoons}} \text{Creatine Phsphate} + \text{ADP}$$

وعلى هذا الأساس فإن توليد( **ATP** ) من خلال نقل مجموعة الفوسفات لفوسفات الكرياتين **Creatine Phosphate(CP)** إلى **(ADP)** بواسطة **CK** يعتبر أعلى نسبة لـ **(ATP)** المتولد بواسطة الفسفرة التأكسدية [12, 13] وبالتالي يلعب هذا الأنزيم دورا مهما في الطاقة الخلوية لأيض اللافقريات[14] . ينتشر هذا الأنزيم في أنسجة متعددة من جسم الكائن الحي لكن مناطق تواجده بالدرجة الأساس هي العضلات **Muscles** (الهيكلية الملساء والقلبية) والدماغ **Brain** إضافة إلى وجوده في أنسجة أخرى ولكن بنسب قليلة مثل الكبد **Liver** ، الرئة **Lung** ، الكلية **Kidney** ، البروستات **Prostate** والغدة الدرقية **Thyroid gland** [15] .

يتكون أنزيم **CK** من وحدتين بنائيتين إحداهما تتولد بالدماغ **Brain** يرمز لها **(B)** والثانية بالعضلات **Muscles** يرمز لها بالرمز **(M)** مما جعل هذا الأنزيم يتكون من ثلاث متناظرات أنزيمية **(Isoenzymes)** وهي **CK – BB** (المتناظر الدماغي) ، **CK – MB** (المتناظر الهجين) ، **CK – MM** (المتناظر العضلي) [16, 17] .

أن الأهمية السريرية للأنزيم **CK** والمتمثلة بأرتفاع فعالية هذا الأنزيم تعد مؤشراً واضحاً لعدد من الحالات المرضية والتي من أهمها تلف الخلايا العضلية والاحتشاء القلبي الحاد **Acute Myocardial Infraction** [18]، أن الأنزيم **CK** من الأنزيمات التي تتأثر بالخزن حيث لوحظ أن نشاط الأنزيم يقل تدريجياً بمرور الزمن والسبب في ذلك هو أكسدة مجموعة الثايول **(Thiol) (–SH)** الموجودة ضمن الأحماض الأمينية المكونة للسلسلة الببتيدية وتكون الآصرة الكبريتية **(–S–S)** بين السلسلتين [19] .

ولأجل الحفاظ على فعالية أنزيم **CK** في مصل الدم **(Serum)** لفترة أطول يضاف أحد المركبات العضوية الحاوية على مجموعة الثايول –**(SH)** مثل **N** – أسيتايل سستين **N – Acetyl – Cystin** والمركب العضوي الداي ثايوثريتول **Dithiothreitol** إلى الأنزيم [20]. وبالنظر لعدم وجود دراسات سابقة بالأدبيات تتعلق بتأثير معوضات الهيدرازون على فعالية أنزيم **CK** لذا فقد ارتأينا في بحثنا هذا تحضير معوضات الهيدرازون ودراسة تأثيرها التنشيطي والتثبيطي على فعالية أنزيم **CK** .

**الجزء العملي :**

**الأجهزة المستخدمة :**

١– جهاز قياس طيف الأشعة تحت الحمراء **(IR)** نوع :
**FT–IR–8400S, Schimadzu–Spectrometer.**

٢– جهاز قياس درجة الانصهار :
**Digital Electro Thermal Melting Point Apparatus.**

٣– مطياف الأشعة فوق البنفسجية – المرئية نوع :
**UV – Visible Spectrophotometer (APEL – PD – 303 – LLV)**

٤– جهاز الطرد المركزي : **Centrifuge**

**تحضير معوضات الهيدرازون :**

تم تحضير معوضات الهيدرازون وفق المخطط **(1)** .

١– تحضير هيدرازايد الفنيل **Syntheses of Phenyl hydrazide** .

تم تحضير هذا المركب بإضافة **(2.5 ml 0.025 mol)** من **(99%)** من الهيدرازين المائي إلى محلول **(0.01 mol)** بنزوات المثيل في **(50 ml)** من الايثانول تم تصعيد مزيج التفاعل لمدة ساعتين وبعدها يبرد ويرشح الراسب وتعاد بلورته من الايثانول (كانت النسبة المئوية للناتج **90%** ودرجة الانصهار **°C 113 – °C 115**) .

٢– تحضير معوضات بنزالدين هيدرازيد الفنيل :
**Syntheses of substituted benzylidin phenyl hydrazid**

يصعد مزيج من الهيدرازيد **(0.01 mol, 1.5 g)** مع معوضات البنزالديهايد **(0.01 mol)** في **(50 ml)** من الايثانول المطلق لمدة ساعتين ثم يبرد المزيج ويرشح الراسب وتعاد بلورته من الايثانول . الخواص الفيزياوية للمركبات المحضرة مبينة في الجدول رقم **(1)** .

**نماذج الدم المستخدمة :**

تم الحصول على نماذج الدم من **(40)** عينة من الأشخاص الأصحاء في محافظة صلاح الدين حيث وضع الدم في أنابيب اختبار خالية من مانع

التخثر ، تركت فيه لمدة **(15)** دقيقة ثم طردت مركزياً لمدة (١٠ ) دقيقة بمعدل **(3000)** دورة / دقيقة للحصول على مصل الدم **Serum** .

**قياس فعالية أنزيم** (CK) : تم تعيين فعالية أنزيم **CK** باستخدام الطقم الجاهزة **(Kit)** من شركة **(BioLABO SA, 02160, Maizy, France)** ، وحسب مبدأ التفاعل التالي : [23, 22, 21]

$$\text{Creatine Phosphte + ADP} \xrightarrow{CK} \text{Creatine + ATP}$$

$$\text{D - Glucose + ATP} \xrightarrow{\text{Hexokinase (HK)}} \text{ADP + G - 6 - Phosphate}$$

$$\text{G - G - Phosphate + NADP}^{+} \xrightarrow{\text{G6 - PDH}} \text{6 - Phosphogloconat + NADPH + H}^{-}$$

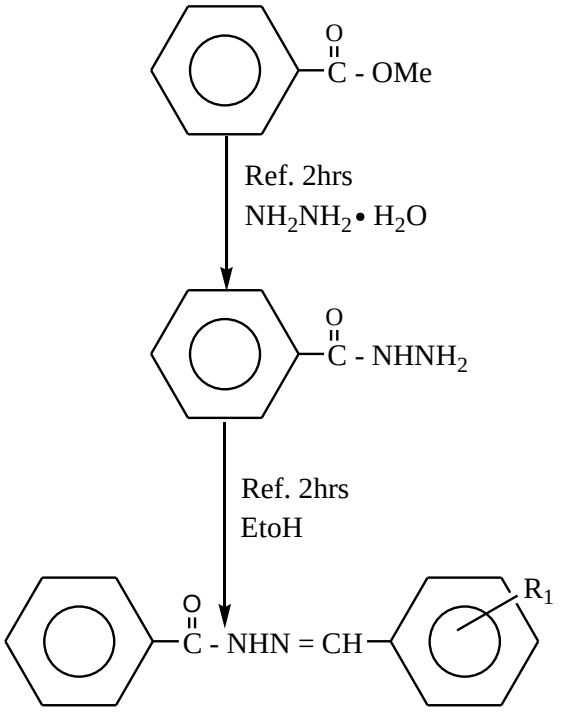
تم قياس الامتصاصية عند الطول الموجي **(340 nm)** حيث تم حساب الفعالية حسب المعادلة التالية :

**IU / L = (ΔAbs / min) * 3333**

علماً أن الدراسة الحالية اقتصرت على دراسة فعالية الأنزيم خارج جسم الكائن الحي ***In– Vitro*** بوجود وعدم وجود مركبات الهيدرازون المحضرة، حيث استخدم ثنائي مثيل سلفوكساييد **Dimethylsulfoxide (DMSO)** كمذيب لمركبات الهيدرازون المحضرة والتي حضرت بتراكيز مختلفة حيث تم إذابة وزن معين من المادة في حجم معلوم من المذيب المستخدم ثم بعد ذلك خففت المحاليل حسب قانون التخفيف للحصول على التراكيز المطلوبة ،عندها تمت دراسة تأثير هذه المحاليل على فعالية ألأنزيم إذ تمت إضافتها مع إضافة الأنزيم مباشرةً .

**النتائج والمناقشة :**

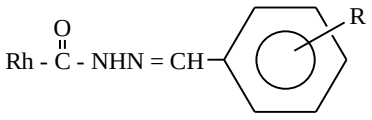
حضر هيدرازيد الفنيل **phenyl hydrazid** من تفاعل بنزوات المثيل مع الهيدرازين المائي **(99%)** [24] مخطط **(1)** وتم تشخيص الهيدرازيد الناتج باستخدام طيف الأشعة تحت الحمراء **(IR)** حيث ظهرت حزمة من الطيف عند (**1672** سم$^{-1}$) تعود لمجموعة مط كاربونيل الأميد وحزمتي مط عند الترددات (**3310** سم$^{-1}$) و (**3281** سم$^{-1}$) تعودان لمجموعة مط **(N – H)** الأمينية والأميدية .




**R=H، m – $NO_2$, P – $NO_2$, P – OH, 2, 4 – dichloro**

**مخطط رقم** (1)

أن تفاعل هيدرازيد الفنيل مع معوضات الألديهايد الأروماتية يعطي نواتج الهيدرازون **(a – e)** جدول رقم **(1)** . وقد شخصت هذه المركبات بقياس درجات الانصهار وبتحليل الأطياف ، فعند تشخيص المركبات بطيف الأشعة تحت الحمراء **(IR)** أظهرت حزم عند المدى **(1615 – 1635** سم$^{-1}$) تعود لمط مجموعة **(C = N)** الخواص الطبيعية للهيدرازون مبينة في الجدول رقم **(1)** .




**جدول رقم** (1) **الخصائص الطيفية** (IR) **والفيزياوية للمركبات**

| Comp. No. a-e | R | M.P °C | Yield | Solvent of recrystallization | O C - NH H. Str. | NH K. Str | C – H Arom. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **a** | **Paranitrophenyl** | **228 – 230** | **94** | **5% E to H** | **1655** | **3280** | **3080** |
| **b** | **Metanitrophenyl** | **196 – 198** | **91** | **5% E to H** | **1650** | **3280** | **3080** |
| **c** | **Parahydroxyphenyl** | **238 – 240** | **90** | **5% E to H** | **1645** | **3300** | **3030** |
| **d** | **2, 4-dichlorophenyl** | **245 – 247** | **93** | **5% ACOH** | **1630** | **3280** | **3050** |
| **e** | **Phenyl** | **209 – 210** | **93** | **5% E to H** | **1640** | **3310** | **3030** |

تم قياس فعالية أنزيم **CK** بوجود وعدم وجود المركبات العضوية المحضرة حيث استخدمت تراكيز مختلفة لكل مذيب عضوي واستخدم المذيب ثنائي مثيل سلفوكساييد **Dimethylsulfoxide (DMSO)** لإذابة المركبات العضوية المحضرة بعد التأكد من عدم تأثيره على فعالية الأنزيم من خلال إجراء تجربة ضابطة ، وكانت نتائج الدراسة الحالية فيما يخص المركبات العضوية المحضرة على فعالية أنزيم **CK** كالآتي :

١- تأثير المركب **Paranitrophenyl hydrazon (a)** على فعالية أنزيم **CK** : تم قياس فعالية أنزيم **CK** بوجود وعدم وجود المركب **(a)** وكانت النتائج كما موضح في الجدول **(2)** :

**جدول رقم** (2)

| Com. Conc. mg/10ml | CK. Activity U/L | % Activation |
|---|---|---|
| **Test** | **99** | **100** |
| **Solvent only** | **96** | **---** |
| **1** | **108** | **116.12** |
| **10** | **126** | **135.4** |
| **25** | **197** | **211** |
| **50** | **233** | **250** |

حيث يلاحظ من الجدول أعلاه ارتفاع فعالية الأنزيم بحدود الضعف بتراكيز المركب **(a) (25, 50 mg/10 ml)**

٢- تأثير المركب **Metanitrophenyl hydrazon (b)** على فعالية أنزيم **CK** : تم قياس فعالية أنزيم **CK** بوجود المركب **(b)** وعدم وجوده وكانت النتائج كما موضح في جدول **(3)** :

**جدول رقم** (3)

| Com. Conc. mg/10ml | CK. Activity U/L | % Activation |
|---|---|---|
| **Test** | **117** | **100** |
| **Solvent only** | **115** | **---** |
| **1** | ١١٩ | **.7١٠١** |
| **10** | ١٣١ | **111.9** |
| **25** | ١٤٨ | **126.4** |
| **50** | ٢٣٧ | **202.5** |

يتضح من الجدول أعلاه ارتفاع فعالية الأنزيم الى الضعف بوجود المركب **( b )** عند التركيز **(50 mg/10ml)** .

٣- تأثير المركب **Parahydroxyphenyl hydrazon (c)** على فعالية أنزيم **CK**: تم قياس فعالية أنزيم **CK** بوجود المركب **(c)** وعدم وجوده وكانت النتائج كما موضح في جدول **(4)** :

**جدول رقم** (4)

| Com. Conc. mg/10ml | CK. Activity U/L | % Activation |
|---|---|---|
| **Test** | **122** | **100** |
| **Solvent only** | **121** | **---** |
| **1** | **124** | **101.6** |
| **10** | **128** | **104.9** |
| **25** | **133** | **109.01** |
| **50** | **197** | **161.4** |
| **75** | **295** | **241.8** |

يتضح من الجدول أعلاه زيادة فعالية أنزيم **CK** عند التركيز **(75 mg/10 ml)** للمركب **(c)** .

٤- تأثير المركب **2, 4-dichlorophenyl hydrazon (d)** على فعالية أنزيم **CK** : تم قياس فعالية أنزيم **CK** بوجود وعدم وجود المركب **(d)** وكانت النتائج وكما موضح في جدول **(5)**:

**جدول رقم** (5)

| Com. Conc. mg/10ml | CK. Activity U/L | % Inhibition |
|---|---|---|
| **Test** | **93** | **---** |
| **Solvent only** | **92** | **---** |
| **0.001** | **90** | **3** |
| **0.01** | **93** | **0** |
| **1** | **53** | **43** |
| **5** | **27** | **71** |
| **10** | **Zero** | **100** |

يتبين من الجدول أعلاه انخفاض الفعالية الأنزيمية لأنزيم **CK** وبأعلى نسبة عند التركيز **(10 mg / 10 ml)** وتتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه الباحث **Szasz** [24] من تأثير تثبيطي للمركبات البرومايد والكلورايد على فعالية أنزيم **CK** .

٥- تأثير المركب **(e) phenyl hydrazon** على فعالية أنزيم **CK** :

تم قياس فعالية أنزيم **CK** بوجود وعدم وجود المركب **(e)** وكانت النتائج كما موضح في جدول **(6)** :

**جدول رقم** (6)

| Com. Conc. mg/10ml | CK. Activity U/L | % Inhibition |
|---|---|---|
| **Test** | **99** | --- |
| **Solvent only** | **98** | --- |
| **50** | **95** | **4** |
| **75** | **97** | **2** |
| **100** | **96** | **3** |
| **125** | **56** | **44** |
| **150** | **Zero** | **100** |

يلاحظ من الجدول أعلاه انخفاض الفعالية الأنزيمية لأنزيم **CK** وبأعلى نسبة عند التركيز **(150 mg / 10 ml)** المركب **(e)** .

إن وجود مجاميع **(Sulfhydryl) (SH –)** وباعتبارها جزء من الموقع الفعال للأنزيم والموجودة ضمن الحامض الأميني السستائين الذي هو جزء من السلسلة الببتيدية المكونة للأنزيم لذا فهي تلعب دوراً هاماً في فعالية هذا الأنزيم وبالتالي فإن أكسدة هذه المجموعة يؤدي إلى تثبيط الأنزيم [25] فالحديد مثلاً يثبط أنزيم **CK** من خلال ارتباطه مع مجموعة الثايول والانخفاض الناتج في فعالية الأنزيم متأتي من الأكسدة الحاصلة على مجموعة **(SH –)** الموجودة في الموقع الفعال [26] ، وكذلك فأن المعادن الثقيلة لها ألفة عالية تجاه مجاميع **(Sulfhydryl)** حيث لوحظ أن الزئبق والكادميوم كلاهما يعمل على تثبيط الأنزيم **CK** تثبيطاً تنافسياً وغير تنافسي وبتراكيز قليلة جداً والزئبق أكثر فعالية تثبيطية من الكادميوم [27] .

## References


1. D. Sriram, T.R. Bal, P. Yogeeswari, J. Pharm. Sci. 8 (3) 567 – 77, 2005.
2. H.S. Seleem, B.A. El – Shetark, S.M.E. Kjalil and M. Shebi, J. Serb. Chem. Soc., 68 (10) 729 – 748, 2003.
3. Y.K. Vaghasiya, R. Nair, M. Soni, Baluja and S. Charda, J. Serb. Chem. Soc., 69 (12) 991 – 998, 2004.
4. A. Iqbal, H.L. Siddiqui, C.M. Ashraf, M. Ahmed and G.W. Wearer, Molecules, 12, 245 – 254, 2007.
5. S.K. Charaborti and B.K. DE, J. Indian Chem. Soc., L, 137, 1973.
6. B. Dash, Mahapatra, D.K. Mahapatra, D. Panda and (Mrs.) J. M. Pattnaik, J. Indian Chem. Soc., Vol. LX1, Pp. 1061 – 1064, 1984.
7. R.K. Agawal, D. Sharma, L. Sing and H. Agarwal, Bioinorg. Chem. Appl., 29, 234, 2006.
8. I.H. Omar, F. Zucchi and G. Trabanlli, Surface coatings and technology, 29, 141 – 151, 1986.
9. G.Sonia,*et al.*Acta pharm.58.119-129,2008.
10. M.J. Clemens, (1979)." Translation of eukaryotic messenger RNA in Cell free extracts". transcription and translation: A Practical approach (231 – 270) Oxford: IRL – Press.
11. M.Bishop, J. Duben and Fodge. (2005) " Clinical Chemistry: Principles procedures and correlations " 4th ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
12. R. Ventura – Clpier, V. Vekslet, J.A. Hoerter, Mol. Coll. Biochem.; 133 : 125 – 144, 1994.
13. J.F.Clark, Mol. Coll. Biochem.; 133 : 221 – 232, 1994.
14. T.Wallimann, M. Dolder, U. Schlattner, M. Fnder, T.Hornemann, E. O' Gorman, A.Ruck, Brdicz, Biofactors; 8: 229 – 234, 1998.
15. Tietz (1999). " Textbook of Clinical Chemistry ", 3rd ed., Philadelphia W.B. Saunders Co., P . 1239 – 1250.
16. A.R Burger., R. Richterich and Aebih., Biochem. Z.; 334: 305 – 311, 1964.
17. R.G.Irvin, F.R.Cobb and C.R.Roe, Arch intern Med., 140: 329 – 334, 1980.
18. D.W.Martin, P.A. Mays, V.W.Rodwell and D.K. Granner, (1985) " Harpers review of biochemistry ", 20th ed., lange medical publications, California, Pp; 62: 232 – 256.
19. N.W.TeitZ, (1979) "Fundamental of clinical chemistry ", 2nd ed., W.B. Sanders company. U.S.A.
20. S.Genet, R.K.Kale and N.Z.Baquer, Mol – Cell. Biochem; 210 (1 – 2): 23 – 8, 2000.
21. I.T.Oliver, Biochem. J., 61, P. 116 – 122, 1955.
22. S.B.Rosalki, J. Lab. Clin. Med., 69, P. 696 – 705, 1967.
23. Z.G.Szas, W.Gruber and E.Bernt, Clin. Chem. 22, P. 650 – 656, 1976.
24. G. Szasz, W. Gerhardt and W. Gruber, Clinical Chemistry, Vol., 23, 1888 – 1892, 1977.
25. M.Toshlaki, M.Sanae and Yukiof., Biochemical Pharmacology; Vol. 60, Issue 1, P. 95 – 99, 2000.
26. B.Pushpe, M. Chandra and M.K. Misra, Guvrent Science, Vol. 89, No 1: 10, 2005.
27. G.M.N. Araujo, C.B. Silva and A. Hassonvoloch, The Inter. J. of Biochem.&cell Bio., Vol. 28, Issue 4, P: 491 – 497, 1996.

# A study of the effect of some of synthesized hydrazone substitution on the activity of creatine kinase

**Tariq S. M. Algobury**
*Chemistry Department, Science College, Tikrit University, Tikrit, Iraq*
( Received 15 / 5 / 2008 , Accepted 13 / 12 /2010 )

**Abstract:**
The study includes the following of the effect some substitutions of synthesized hydrazone identified by using (IR),on the activity of creatine kinace(CK). It is revealed that the compounds (a, b, c) causing increase of activity of (CK), with the high rate at concentrations (75, 50, 50 mg/10 ml) and with the percentage rates of activation (241.8, 202.5, 250) respectively.
It is also revealed that the two compounds (d, e) causing inhabitation of (CK) activity with the high rate (100%), at the concentrations (10, 150 mg/10 ml) respectively.