Studying the effect of some oximes (Acetone oxime, α-benzoin oxime) on the activity of acetyl cholinesterase enzyme inhibited by some thiotriazol compounds.

دراسة تأثير بعض الأوكسيمات (Acetone oxime, α-benzoin oxime) على فعالية انزيم الكولين أستريز المثبط بواسطة مركبات الثايوترايازول.

بلقيز وليد خماس.
كلية التربية / جامعة بغداد.

الملخص:

تضمن البحث دراسة تأثير نوعين من الأوكسيمات هما أوكسيم أسيتون وأوكسيم الفا – بنزوين على فعالية انزيم استيل كولين استريز المثبط بواسطة مركبات الثايوترايازول, أظهرت النتائج ان الأوكسيمات المستخدمة تسبب اعادة تنشيط الانزيم المثبط بمركبات الثايوترايازول وذلك من خلال ملاحظة زيادة الفعالية الانزيمية للانزيم المثبط بزيادة تركيز الأوكسيم.

Abstract:

This work involves studying effect of two types of oximes (Acetone oxime, α-benzoin oxime) on the activity of inhibited enzyme acetylcholinesterase by thiotriazol compounds reactivated the inhibited enzyme by thiotriazol compounds through increasing their activity with increasing the oxime concentration.

المقدمة:

تشمل انزيمات الكولين استريز (ChE) مجموعتين من الانزيمات تختلف عن بعضها البعض قليلاً فالمجموعة الاولى هي الانزيمات المحللة للاستيل كولين (Ach) (Acetylcholine acetylhydrolase), وتسمى ايضاً بأستيل كولين استريز والمجموعة الثانية هي الانزيمات المحللة للاسيل كولين (Acetylcholine Acylhydrolase) وتسمى ايضاً بيوتريل كولين استريز أو الكولين استريز الكاذب(1).

لانزيمات الكولين استريز (AchE) دور فسيولوجي فعال فهي ذات دور رئيسي في عمليات نقل الاشارات الحسية بين الاعصاب والعقد العصبية والعضلات, ونقل هذه الاشارات بين الوحدات المختلفة في الجهاز العصبي, وكذلك في تنظيم نفاذية الاغشية البلازمية. وايضاً اثبت ان دور انزيمات (AchE) حُدد في نقاط التقاء الاعصاب بالعضلات في الشبكة العصبية الحاوية للالياف العصبية التي تُحدث تأثيراً مشابهاً لمفعول Acetylcholine (Acch) وذلك بتحفيز تحلل (Acch) المتجمع في ملتقى اقتران الاعصاب وبذلك يسهل انتقال الحافز واشارت الابحاث ايضاً إلى الاهمية الدوائية لهذه الانزيمات, اذ انها تعد من الانزيمات المسؤولة عن تحلل مخدرات الاعصاب والعضلات ذات الطبيعة الاسترية وكذلك المركبات المستخدمة في التخدير الموضعي مثل السكسنيل كولين(Succinyl choline), حيث يُعطى السكسنيل كولين كمخدر في العمليات الجراحية عن طريق حقنة بالوريد قد يؤدي إلى تثبيط انزيم الكولين استريز وهذا يؤدي إلى ازدياد مدة استرخاء الجهاز العصبي العضلي للمريض ولعدم وجود انزيم الكولين استريز وخاصة لدى الاشخاص من صنف (Homozygous) وراثياً لذلك لايتحلل السكسنيل كولين ممايؤدي إلى صعوبة التنفس وحدوث وقف التنفس (Apnoea)(2).

هناك عدة مركبات لها القابلية على الارتباط بالموقع الفعال أو في أي موقع آخريحجب ارتباط مجموعة وظيفية في الموقع الفعال ممايؤدي إلى فقدان فعالية الانزيم(3), مثل هذه المركبات هي مركبات الفسفور العضوية ذات التأثير النثبيطي لانزيمات الكولين استريز ومعظم هذه المركبات تستخدم كأدوية أو كمبيدات زراعية, ومن ثم استخدامها لتدخل ضمن تركيب الاسلحة الكيمياوية كمركبات عالية السمية وسميت بغازات الاعصاب ومن هنا نحدد اهمية وجود الانزيم في مصل الدم بشكل ذائب بأمكانية استخدامه كتشخيص حالات التسمم التي يتعرض لها الكائن الحي بمختلف مثبطات الانزيم واهمها المبيدات الحشرية للمركبات الفوسفاتية والكاربيمات(4).

يتمثل تأثير المثبط على انزيم الكولين استريز في خطوتين:

$$EH + IX \underset{K1}{\overset{K}{\rightleftharpoons}} EH.IX \longrightarrow EI + HX \xrightarrow[H2O]{K2} EH + IOH$$

اذ يشير (EH) إلى الانزيم وال(IX) إلى المثبط ليكونا معقد (EH.IX) (Enzyme inhibitor).

وهنا ركز الباحثون اهتمامهم على البحث عن مركبات ذات نيوكلوفيلية قوية للمساعدة على سحب المجموعة التي سببت التثبيط والاتجاه الثاني ايجاد مركبات تحد من التأثيرالسلبي لتراكم الناقل العصبي (Acch) والتي تؤدي إلى الوفاة, ومن هذه المركبات التي

اثبتت فعاليتها لتحرير الانزيم من المثبط وبالتالي يحد من تراكم الناقل العصبي هو الاتروبين (Atropine) لكنها مادة سامة وذات تأثيرات جانبية. ومركبات الأوكسيم (oxime) المختلفة مثل (2-PAM)(Pyridine-2-aldoxime methodide) التي تستخدم لمعالجة التسمم الذي يحدث بواسطة مركبات الفسفور العضوية(5).

الجزء العملي:

تقدير الفعالية الانزيمية:

أ- المحاليل المستخدمة:

1- المحلول المنظم (Buffer phosphate):

المحلول المنظم(Buffer phosphate, pH = 7.3, 0.2M) يحضر بأذابة (2.84)غم من (Na_2HPO_4), (Mwt = 141.69) في(100)مل من الماء المقطر ثم عُدلت ال(pH) باضافة بضع قطرات من حامض الهيدروكلوريك (HCl) ويتم استخدامه مباشرةً(6).

2- الكاشف (DTNB), (Ellman's Reagent):

تم تحضيره (0.001M) من (5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid) وذلك بأذابة (0.01)غم من ال(Mwt = 396.36, DTNB) في (25)مل من الماء المقطر مع التحريك المستمر ثم وضعت في الثلاجة وفي قنينة معتمة لانه حساس للضوء.

3- محلول المادة الاساس (s-Acetyl thiocholine iodide):

تم الحصول على محلول المادة الاساس وذلك بأذابة (0.01735)غم من المادة في (1)مل من الماء المقطر. يحضر هذا المحلول يومياً ويستخدم مباشرةً.

ب- طريقة العمل:

تم تعيين فعالية انزيم الكولين استريز في مصل دم الانسان (Serum) باستخدام طريقة (WHO)(7) وكالآتي:

وضع (2.250)مل من المحلول المنظم (pH = 7.3) في انبوبة اختبار واضيف (50 µL) من محلول الكاشف (DTNB) و (10 µL) من مصل الدم. مُزجت المكونات باستخدام جهاز المزج (Mixer).

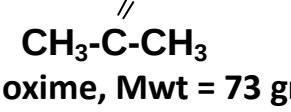
سحب (2)مل من المزيج في (1) وتم وضعها في خلية القياس حجم (3)مل ثم اضيف اليها (34 µL) من المادة الاساس ثم قرأ مقدار التغير في شدة الامتصاص للانزيم قبل وبعد اضافة المادة الاساس على طول موجي (412 nm) لكل ثلاث دقائق من تفاعل الانزيم والمادة الاساس.

يتم التعبير عن فعالية الانزيم على اساس تحلل (µ mol) من المادة الاساس لكل مللتر خلال ثلاث دقائق

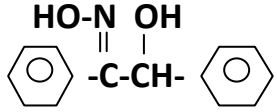
µ mol / ml / 3min

تأثير بعض مركبات الأوكسيم على فعالية انزيم الكولين استريز المثبط في مصل دم الانسان:

تم اختيار نوعين من الاوكسيمات لاختيار تأثيرها على انزيم الكولين استريز المثبط ببعض المركبات العضوية المدروسة وهي:



Acetone oxime, Mwt = 73 gm / mol



α- Benzoin oxime, Mwt = 277.75 gm / mol

تمت اذابة مركبات الأوكسيم باستخدام المحلول المنظم (Phosphate buffer solution,0.2 M, pH = 7.3) وحضر محلول قياسي من مركبات الأوكسيم وبتركيز (0.1M) ومن ثم حضرت التراكيز التالية:

$(0.5, 1, 2, 3, 4, 5)X10^{-3}$ M

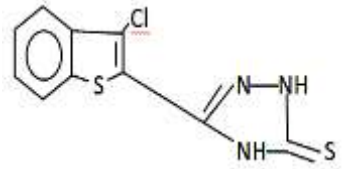
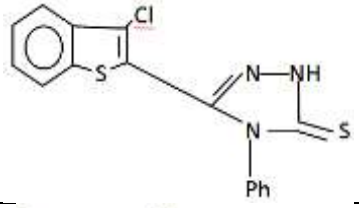
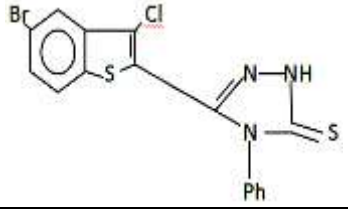
اما المشتقات التي تم اختيارها لدراسة تأثير الأوكسيم على فعالية انزيم ال (ChE) في مصل دم الانسان المثبط بها هي:

1) 3-Chloro-2-(3'-thio-4'H-1',2',4'-triazole-5'-yL) benzo [b] thiophene.
2) 3-Chloro-2-(3'-thione-4'-phenyl-2',4'-dihydro-1',2',4'-triazole-5'-yL) benzo [b] thiophene.
3) 2-Chloro-5-bromo-2-(3'-thione-4'-phenyl-2',4'-dihydro-3'H-1',2',4'-triazole-5-yL)benzo[b]thiophene.

هذه المركبات تم اذابتها في المذيب (DMSO) (Dimethyl sulphoxide) (ليس له اي تأثير على فعالية الانزيم)(8), وعمل منه محلول قياسي, مرة لكل مشتق فاختبر التركيز ($4.5\ X10^{-3}$ M) للمشتقات المذكورة اعلاه وتم تعيين فعالية الانزيم قبل وبعد اضافة المادة المثيطة باستخدام طريقة فعالية الانزيم المذكورة سابقاً وبعد ذلك تعيين فعالية الانزيم بوجود المادة المثبطة والأوكسيم

على التوالي باستخدام (1.25)مل من المحلول المنظم و(0.75)مل من محلول الأوكسيم ثم عينت الفعالية للانزيم والموضحة في الجدول التالي:

جدول رقم (1):

تسلسل المشتقات	التركيب الكيميائي	اسم المركب	نسبة التثبيط
I		3-chloro-2-(3'-thio-4'H-1',2',4'-triazole-5'-YL)benzo [b] thiophene	42.92%
II		3-chloro-2-(3'-thione-4'-2',4'-dihydro-1',2',4'-thiazole-5'-YL)benzo [b] thiophene	44.94%
III		2-chloro-5-bromo-2-(3'-thione-4'-phenyl-2',4'-dihydro-3'H-1',2',4'-triazole-5-YL)benzo [b] thiophene	78.21%

النتائج والمناقشة:

في هذا البحث تمت دراسة تأثير نوعين من الأوكسيمات على فعالية انزيم الكولين استريز في مصل دم الانسان (Serum) وهي ال(α-Benzoin oxime, Acetone oxime).

وتم استخدام تراكيز ثابتة من المواد الكيميائية المدروسة المثبطة بينما تم استخدام تراكيز متغيرة من مركبات الأوكسيم وكانت تتراوح بين ($0.5\text{-}5]X10^{-3}$ M) وقد لوحظ ان كل من مركبات الأوكسيم يسببان اعادة تنشيط الانزيم المثبط بمشتقات الثايو ترايازول وذلك من خلال ملاحظة زيادة الفعالية الانزيمية للانزيم المثبطبزيادة تركيز الأوكسيم وكما موضح في الجداول التالية:

جدول رقم (2): يوضح تأثير اضافة (Acetone oxime) على فعالية انزيم الكولين استريز باستخدام تركيز ($4.5X10^{-3}$ M) من المشتق (I) كمثبط.

Inhibitor Conc. $X10^{-3}$ M	Enzyme activity µmol/ml/3min	% Inhibition	% Recovery
Nil	5.88±0.24	0.00	100
	3.40±0.11	42.17	57.82
0.5	3.43±0.17	41.66	58.33
1	3.49±0.11	40.64	59.35
2	3.50±0.22	39.47	59.52
3	3.53±0.11	39.96	60.03
4	3.58±0.11	39.11	60.88
5	3.60±0.13	38.77	61.22

جدول رقم (3): يوضح تأثير (α-benzoin oxime) على فعالية انزيم الكولين استريز باستخدام ($4.5X10^{-3}$ M) من المشتق (I) كمثبط.

Inhibitor Conc. $X10^{-3}$ M	Enzyme activity µmol/ml/3min	% Inhibition	% Recovery
Nil	5.25±0.56	0.00	100
	3.05±0.22	41.90	58.09
0.5	3.09±0.25	41.14	58.85
1	3.12±0.18	40.57	59.42
2	3.15±0.21	40.00	60.00
3	3.20±0.28	39.04	60.95
4	3.25±0.22	38.09	61.90
5	3.30±0.21	37.14	62.85

جدول رقم (4): يوضح تأثير اضافة (Acetone oxime) على فعالية انزيم الكولين استريز باستخدام ($4.5X10^{-3}$ M) من المشتق (II) كمثبط.

Inhibitor Conc. $X10^{-3}$ M	Enzyme activity µmol/ml/3min	% Inhibition	% Recovery
Nil	5.78±0.44	o.oo	100
	3.20±0.11	44.64	55.36
0.5	3.28±0.12	43.35	56.74
1	3.31±0.11	42.73	57.26
2	3.35±0.17	42.04	57.95
3	3.39±0.16	41.34	58.65
4	3.40±0.17	41.17	58.82
5	3.70±0.11	35.98	64.01

جدول رقم (5): يوضح تأثير اضافة (α-benzoin oxime) على فعالية انزيم الكولين استريز باستخدام ($4.5X10^{-3}$ M) من المشتق (II) كمثبط.

Inhibitor Conc. $X10^{-3}$ M	Enzyme activity µmol/ml/3min	% Inhibition	% Recovery
Nil	6.25±0.55	o.oo	100
	3.45±0.16	44.80	55.20
0.5	3.48±0.21	44.32	55.68
1	3.51±0.18	43.84	56.16
2	3.58±0.15	42.72	57.28
3	3.60±0.41	42.40	56.60
4	3.65±0.20	41.60	58.40
5	3.96±0.23	36.64	63.36

جدول رقم (6): يوضح تأثير اضافة (Acetone oxime) على فعالية انزيم الكولين استريز باستخدام ($4.5X10^{-3}$ M) من المشتق (III) كمثبط.

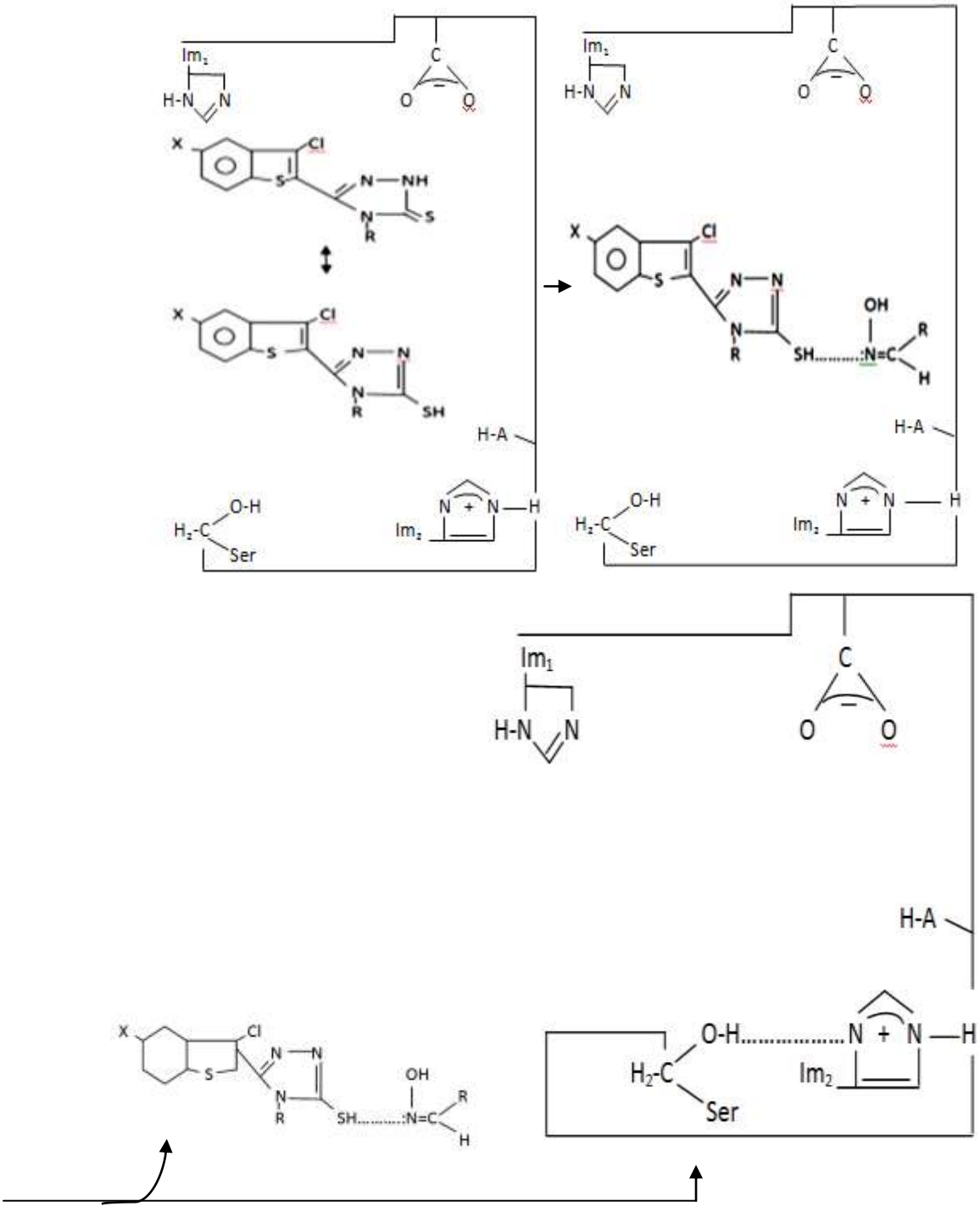
Inhibitor Conc. $X10^{-3}$ M	Enzyme activity µmol/ml/3min	% Inhibition	% Recovery
Nil	5.43±0.33	o.oo	100
	1.20±0.14	77.40	22.09
0.5	1.22±0.18	77.53	22.96
1	1.27±0.15	76.61	23.38
2	1.30±0.26	76.05	23.94
3	1.38±0.24	74.58	25.41
4	2.00±0.18	63.16	36.83
5	2.51±0.27	53.77	46.22

جدول رقم (7): يوضح تأثير اضافة (α-benzoin oxime) على فعالية انزيم الكولين استريز باستخدام ($4.5X10^{-3}$ M) من المشتق (III) كمثبط.

Inhibitor Conc. $X10^{-3}$ M	Enzyme activity µmol/ml/3min	% Inhibition	% Recovery
Nil	6.09±0.55	o.oo	100
	1.38±0.15	77.33	22.67
0.5	1.41±0.19	76.84	23.15
1	1.49±0.23	75.53	24.46
2	1.58±0.18	74.05	25.94
3	1.61±0.19	73.56	26.43
4	1.69±0.24	72.24	27.75
5	2.15±0.32	64.96	35.30

ان قدرة مركبات الأوكسيم في اعادة تنشيط انزيم (ChE) في مصل دم الانسان قد يعود إلى التفاعل بين مركب الأوكسيم والمادة المثبطة بشكل يمنع المركبات المثبطة من ان تُحدث أي تعطيل في ميكانيكية تحلل انزيم ال(ChE) ويمكن توضيح ذلك:
ان التركيب العام لمركبات الأوكسيم

حيث تحتوي مركبات الأوكسيم على ذرة نتروجين والتي تكون قوة قاعديتها قوية قريبة من قاعدية حلقة ال(Im) لذلك فان المركبات الموضحة في الجداول (2-7) تحتوي على مجموعة الثايول (حالة الثايول لها) للمركبات لذلك فان ذرة النتروجين لمركبات الأوكسيم قد ترتبط بذرة الهيدروجين الحامضية للمادة المثبطة مما يحرر جزيئة ال(Im_2) وعند ذلك يحدث التآصر الهيدروجيني مابين مجموعة الكاربونيل لحامض السيرين وبين حلقة (Im_2) لحدوث الهجوم النيوكلوفيلي لمجموعة الهيدروكسيل لحامض السيرين على كربون مجموعة الكربونيل (>C=O) لاستر الكولين ويمكن توضيح ذلك في المخطط المقترح التالي:



المصادر

1- Liang, D. , Perrier, N. ,Noureddine, H., "Old and New questions about Cholinesterase" Chem. Biol. Interact 175(1-3) 2008.
2- Jann, M.W. , Shirley, K.L. , Small, G.W. , Clinical Pharmacokinetic and Pharmacodynamics of Cholinesterase inhibitors, Clin. Pharmacokinet. , 41 (719-739) 2002 .
3- Stepankova, K. , Komers, K., Cholinesterase and Cholinesterase inhibitors, Department of Biological and Biochemical Science, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice 4(4) (160-171) 2008.
4- Komersova, A. , Masopustova, M. , Komers, K. Cogan, A. , InVitro inhibition of Cholinesterase by Carbamates – Kinetics Study, .Z. Naturforsch, 62c (305-307) 2007.
5- Eddleston, M. , Buckley, S. , Organophosphorous poising (acute) , Clin. Evid. , 13 (1744-55) 2005.
6- Alexander, J. , Ninfa, David, P. Ballou Marrilee, "Biochemistry and Biotechnology" 2nd ed. (257-267) 2010.
7- WHO "Spectrophotometer Kit for measuring cholinesterase activity" WHO / VBS, 78, 692 (1978).
8- H. J. Jaffer, M. J. Mahmod, M. J. Al-Azzawi; Effect of some (2-mercapto-1,3,4-oxadiazole) derivatives on human serum cholinesterase activity, J. Bio. Sci. Res. 19, 793 (1988).