تنقية جزئية ودراسة حركية لأنزيم الكلوتاثايون بيروكسيديز من دم مرضى البيتا ثلاسيميا الكبرى

محمد بحري السعدون[1] ، فائز محسن العبادي[2] ، أياد عبدالستار العباسي[2]

[1] قسم الكيمياء ، كلية العلوم ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

[2] قسم الكيمياء ، كلية العلوم ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

(تاريخ الاستلام: 28 / 4 /2013 ---- تاريخ القبول: 26 / 8 /2013)

الملخص

تضمن البحث عزل ودراسة بعض الصفات الحركية لأنزيم الكلوتاثايون بيروكسيديز (GPx) من مصل مرضىالبيتا ثلاسيميا الكبرى و أشخاص أصحاءإجراء المقارنه بينهما. إذ تم فصل حزمتين رئيسيتين من البروتينات بتقنية كروموتغرافيا التبادل الأيوني للمحلول البروتيني الناتج من الفرز الغشائي الناتج من الترسيب بكبريتات الأمونيوم بإستخدام المبادل الأيوني Diethylaminoethyl Cellulose (DEAE Cellulose) ، وأظهرت الحزمة الثانية فعالية عالية لأنزيم (GPx). قدر الوزن الجزيئي للأنزيم ووجد أنه (83907) دالتون.

وجدت الظروف المثالية لفعالية أنزيم الكلوتاثايون بيروكسيديز المنقى جزئياً من مصل دم مرضى الثلاسيميا وكانت كالأتي: إستخدام الكلوتاثايون بتركيز (0.045 mmol/L)كمادة أساس و أفضل محلول منظم هو(Citrate buffer) عند أس هيدروجيني (6.2) ودرجة حرارة (45°C) بفترة زمنية مقدارها (4) دقيقة . وبإستخدام رسم لاين ويفر – برك تم إيجاد قيمة السرعة القصوى (V_{max}) وثابت مكيلس (K_m) والتي كانت مساوية لـ (141U/L) و(0.142mmol/L) على التوالي . كذلك تمت دراسة تأثير عدد من المثبطات على فعالية الأنزيم ، إذ لوحظ أن عقار الإكسجاد أعطى نسباً تثبيطية مختلفة لفعالية الإنزيم وكان من نوع التثبيط التنافسي وعقار الديسفيرال كان من نوع التثبيط غير التنافسي.

الكلمات الدالة: عزل ، كلوتاثايون بيروكسيديز ، بيتا ثلاسيميا الكبرى ، المثبطات.

المقدمة

أنزيم الكلوتاثايون بيروكسيديز (EC 1.11.1.9) يتواجد هذا الأنزيم في سايتوبلازم ومايتوكوندريا الخلايا لأنسجة الكبد وكريات الدم الحمر والبلازما و هو عبارة عنسيلينو انزيم Selenoenzyme يتكون من أربع وحدات بروتينية فرعية Sub-units كل وحدة تمتلك ذرة واحدة من عنصر السيلينيوم وهي ترتبط مع الحامض الأميني السستين Cysteine بشكل Seleno Cysteine وهو من عائلة البيروكسيديز الذي يدخل الكلوتاثايون في تركيبه ويعتبر من الأنزيمات المهمة لحماية الخلايا من الكرب التأكسدي ان الفعالية البايوكيميائية للأنزيم هي إختزال مركبات الهايدروبيروكسيدات الدهنية الى كحولات و إختزال بيروكسيد الهيدروجين الى الماء [1,2] . يعمل الكلوتاثايون على إختزال السيلينيوم من أنزيم كلوتاثايون بيروكسديز وبعد ذلك يتفاعل الأنزيم المختزل مع بيروكسيد الهيدروجين [3]. كما موضح في التفاعلات التالية :

$$2\,GSH + H_2O_2 \xrightarrow{GPx} 2GS + 2H_2O$$

وا زالة بيروكسيدات الدهون (LOOH) او بيروكسيدات عضوية (ROOH) كما في المعادلات في ادناه :

$$2GSH + LOOH \xrightarrow{GPx} 2GS + LOH + H_2O$$

$$2GSH + ROOH \xrightarrow{GPx} 2GS + ROH + H_2O$$

إن مستوى الكلوتاثايون المختزل (GSH) في الخلايا والأنسجة يكون أعلى من الشكل المؤكسد له (GSSG) ، وبذلك فإن نسبة الكلوتاثايون المختزل الى الكلوتاثايون المؤكسد (GSH/GSSG) تكون مرتفعة و هذه النسبة ينظم من خلال آلية تعمل على إختزال الشكل المؤكسد (GSSG) ، وتحويله الى الشكل المختزل (GSH) ، ويتحكم في هذه الآلية إنزيم كلوتاثايون ريدكتيز (GRd) Glutathione reductase ، بوجود المرافق الأنزيمي النيكوتين امايد ادينين داي نيوكليوتايد فوسفات (NADPH) كما في المعادلة في أدناه :

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GRd} 2GSH + NADP^+$$

وبهذا يمثل (GPx) جزءاً من نظام حماية الخلايا ضد الأكسدة ونواتجها وبذلك يقلل من تلف الخلايا الناتج عن زيادة الجذور الحرة ويقلل ضرر الكرب التأكسدي [4,5] .

الهدف من البحث

1. فصل جزئي وتقدير فعالية أنزيم (GPx) من مصل دم مرضى البيتا ثلاسيميا الكبرى والأصحاء وتحديد الوزن الجزيئي التقريبي .
2. دراسة تأثير عقاري الديسفرال والأكسجاد على فعالية الأنزيم (GPx) .
3. دراسة الصفات الحركية لأنزيم (GPx) المنقى جزئياً من مصل دم مرضى الثلاسيميا ودراسة تأثير المثبطات ونوعية التثبيط على سرعة التفاعل الأنزيمي .

المواد وطرائق العمل

ترسيب البروتين وفصله بإستخدام كبريتات الأمونيوم

تم إستخدم مصل دم مرضى الثلاسيميا ومجموعة الأصحاء ، وأضيف اليه كبريتات الأمونيوم وبتشبع (50%) وبطريقة الترسيب بالتمليح [6] ، ثم أجريت للراسب عملية الفرز الغشائي .

الفرز الغشائي (الديلزة)

ISSN:1813 – 1662

تمت عملية الفرز الغشائي بعد اذابة الراسب البروتيني الناتج من الفقرة (1) بأقل كمية ممكنة من الماء المقطر ثم وضع هذا المحلول البروتيني في أنابيب السيلوفان وغطس في وعاء حجمي يحتوي على 2.5 لتر من الماء المقطر الحاوي على بيكاربونات الأمونيوم (NH_4HCO_3) بتركيز 0.1M و أعتماداً على طريقة الباحث [7] ، وأجريت عملية الفرز الغشائي عند درجة حرارة 4°C مع التحريك بالمحرك المغناطيسي، واستمرت عملية الفرز الغشائي لمدة (24hours) مع مراعاة تبديل محلول الفرز الغشائي ثلاث مرات خلال (3hours) الأولى وبعد الإنتهاء من عملية الفرز الغشائي تم حساب الحجم النهائي للمحلول الناتج وقدرت فعالية الأنزيم وكمية البروتين في المحلول الناتج من الفرز الغشائي [8,9] .

تقنية كروماتوغرافيا التبادل الأيوني

تعد كروموغرافيا التبادل الأيوني احدى الطرق المتبعة لفصل وتنقية الأنزيمات والتي تعتمد على مبدأ الأختلاف في الشحنات و أستخدم راتنج المبادل الأيوني السالب Diethyl amino ethyl Cellulose (DEAE Cellulose). حيث تم إمرار المحلول المديلز على العمود (40cm × 2.5) والحاوي على المبادل الأيوني السالب DEAE- Cellulose ، والتي تم معايرتها مع محلول الفوسفات المنظم (15mM) pH=7، حسب الطريقة المتبعة من قبل [10] ، ثم جمع الأجزاء المفوصلة بحجم (5ml) وكان معدل تدفق /50 ml) (60min تقريبا. وتمت متابعة المحتوى البروتيني من خلال قراءة شدة الأمتصاصية عند الطول الموجي (280 nm) بإستخدام جهاز مطياف الاشعة فوق البنفسجية والمرئية ، فضلاً عن ذلك تمت متابعة فعالية أنزيم الكلوتاثايون بيروكسيديز في الأجزاء المفصولة ، بعد ذلك جمعت الأجزاء البروتينية التي تمثل الحزمة الحاوية على فعالية انزيم الكلوتاثايون بيروكسيديز .

تقنية كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي

استخدمت هذه التقنية لتقدير الوزن الجزيئي التقريبي لأنزيم (GPx) ، أستخدم عمود الفصل ذو الأبعاد (100 × 1.6 cm) الذي يحتوي على مادة الهلام من نوع (Sephadex G-100) ثم جمع الأجزاء المفوصلة بحجم (6ml) وكان معدل تدفق (45 ml/ 60min) تقريبا. وتمت متابعة فعالية أنزيم الكلوتاثايون بيروكسيديز في الأجزاء المفصولة بإستخدام جهاز مطياف الأشعة فوق البنفسجية والمرئية [11,12] .

تقنية التجفيد Lyophilizatio (التجميد والتجفيف)

تم تجفيد الحزم البروتينية الناتجة من عملية التبادل الأيوني بإستخدام جهاز التجفيد (Lyophilizer) وتمت العملية بوضع المحلول المراد تجفيده في دورق بلاستيكي ثم وضع في المجمدة (–20°C) وبعدها تم وضعه في جهاز التجفيد .

تقدير فعالية الكلوتاثايون بيروكسيديز (GPx) في مصل الدم

قدرت فعالية (GPx) حسب طريقة [13] ، حيث تضمن خليط التفاعل (0.4 M 0.2 ml) من فوسفات الصوديم كمحلول منظم (7.0pH) و 10 mM (0.1 ml) أزيد الصوديوم و (0.2 ml) مصل الدم و 0.2 (ml من 2mM) كلوتاثايون و 0.1 ml 0.2 mM من بيرروكسيد الهيدروجين . ثم وضع الخليط في الحاضنة مدة 10 دقائق عند 37°C ثم أوقف التفاعل بأضافة 0.4 ml 10% من TCA ثم وضع في جهاز الطرد المركزي . ثم قدر الكلوتاثايون المحتوى في المحلول الرائق بإستخدام كاشف إلمان Ellman's reagent بتركيز 0.1 mM : حضر بأخذ 19.5mg من DTNB و أذيب في 100ml مل من المحلول المنظم (pH 8) الذي حضر بمزج KH_2PO_4 بتركيز 0.6 M و K_2HPO_4 بتركيز 0.08 M .

العوامل المؤثرة على فعالية أنزيم GPx المنقى جزئيا من مصل الدم

تمت دراسة بعض العوامل المؤثرة على فعالية الأنزيم لتحديد الظروف المثلى لعمل الأنزيم وتتضمن : تركيز الأنزيم وتركيز مادة الأساس وزمن التفاعل والأس الهيدروجيني ودرجة حرارة التفاعل والمثبطات .

النتائج والمناقشة

عزل وتنقية انزيم الكلوتاثايون بيروكسيديز من مصل الدم

وجدت حزمتان بروتينيتان (A,B) عند عزل الأنزيم من مصل مرضى الثلاسيميا والأصحاء بتقنية كروموتغرافيا التبادل الأيوني بإستخدام عمود الفصل الحاوي على (DEAE-Cellulose) (كما في الشكل (1) والشكل (2)) إذ كانت حجوم الروغان لقمة الحزم الأولى والثانية ، للمرضى (185ml, 115ml) وللأصحاء (85ml,155ml) على التوالي ، أن الحزمة البروتينية (B) تمتلك أعلى فعالية للأنزيم لكلا المجموعتين (المرضى والأصحاء) والتي كانت (141,151U/L) على التوالي ، وعليه عُدت الحزمة البروتينية الرئيسية والممثلة للأنزيم في الدراسة اللاحقة . وخلاصة نتائج مراحل تنقية الأنزيم من محلول مصل الدم مدرجة في الجدول (1) و(2) . ومن خلال ملاحظة (الشكل (2) و(3)) أشارت النتائج الى وجود إنخفاض في فعالية أنزيم (GPx) لدى مرضى الثلاسيميا مقارنة مع الأصحاء مع ظهور قمتين في كلا المجموعتين (المرضى والأصحاء) .

جدول (1) خطوات تنقية أنزيم الكلوتاثايون بيروكسيديز من مصل مرضى الثلاسيميا

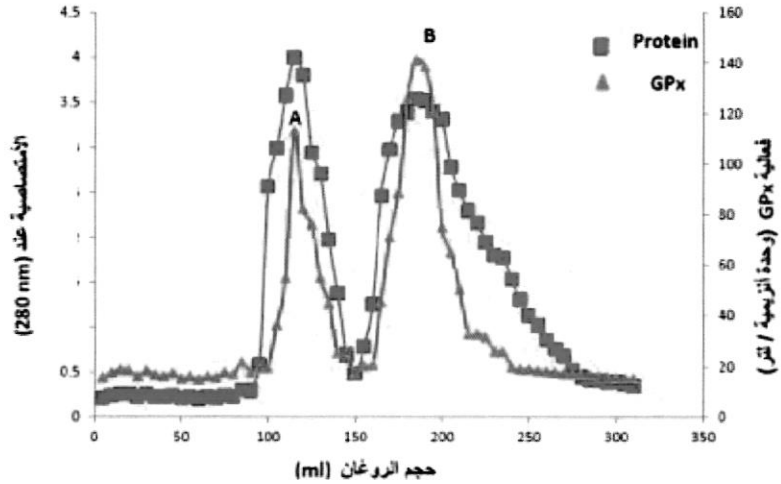
مراحل التنقية		الحجم (ml)	تركيز البروتين الكلي (mg/ml)	البروتين الكلي mg	الفعالية (U/ml)	الفعالية الكلية (U*)	الفعالية النوعية (U/mg)	عدد مرات التنقية	الاستعادة %
المصل		11	64	704	0.076	0.836	0.00118	1	100
الترسيب بكبريتات الأمونيوم % 50		5.9	24	141.6	0.092	0.54	0.0038	3.22	64.9
الديلزة		6.3	21	132.3	0.101	0.63	0.0047	3.98	75.3
كروموتغرافيا التبادل الأيوني	A	35	1.20	42	0.011	0.385	0.009	7.6	46
	B	50	1.32	66	0.0125	0.625	0.0094	7.96	74.7

*وحدة الأنزيم (U): وهي كمية الكلوتاثايون بيروكسيديز اللازمة لتحويل مايكرومول واحد من الكلوتاثايون إلى ناتج في الدقيقة الواحدة

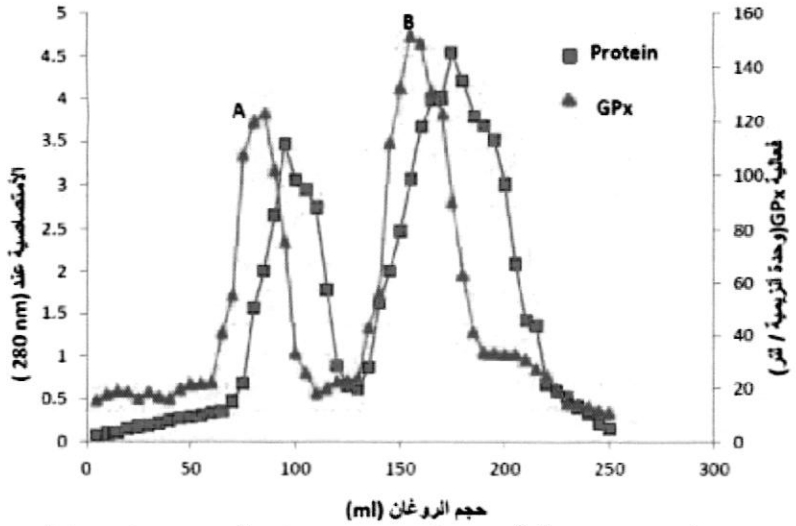
جدول (2) خطوات تنقية أنزيم الكلوتاثايون بيروكسيديز من مصل أشخاص أصحاء

مراحل التنقية		الحجم (ml)	تركيز البروتين الكلي (mg/ml)	البروتين الكلي mg	الفعالية (U/ml)	الفعالية الكلية (U*)	الفعالية النوعية (U/mg)	عدد مرات التنقية	الاستعادة %
المصل		12	78	936	0.097	1.164	0.0012	1	100
الترسيب بكبريتات الأمونيوم % 50		6.2	35	217	0.125	0.775	0.0035	2.97	66.6
الديلزة		6.6	30	198	0.15	0.99	0.005	4.1	85
كروموتغرافيا التبادل الأيوني	A	45	1.12	50.4	0.012	0.54	0.0107	8.92	46.4
	B	55	1.25	68.75	0.014	0.77	0.0112	9.3	66

*وحدة الأنزيم (U): وهي كمية الكلوتاثايون بيروكسيديز اللازمة لتحويل مايكرومول واحد من الكلوتاثايون إلى ناتج في الدقيقة الواحدة



الشكل (1): المظهر الجانبي لروغان الحزم البروتينية لأنزيم كلوتاثايون بيروكسديز الناتجة من عمود الفصل بتقنية التبادل الأيوني بإستخدام (DEAE- Cellulose) والعائدة لمصل مرضى الثلاسيميا

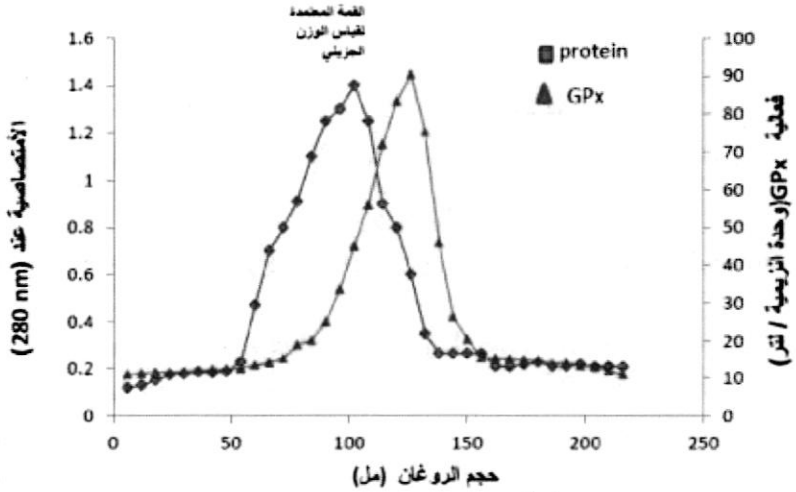


الشكل (2): المظهر الجانبي لروغان الحزم البروتينية لأنزيم كلوتاثايون بيروكسديز الناتجة من عمود الفصل بتقنية التبادل الأيوني بإستخدام (DEAE- Cellulose) والعائدة لمصل دم الأصحاء

تقدير الوزن الجزيئي التقريبي بتقنية الترشيح الهلامي

قدر الوزن الجزيئي التقريبي لأنزيم (GPx) بتقنية الترشيح الهلامي وذلك بإمرار المحلول البروتيني (الحزمة B) الناتج من كروموتغرافيا التبادل الأيوني والعائدة لمرضى الثلاسيميا على عمود الفصل الحاوي على هلام من نوع (Sephadex G-100) والتي وجدت حزمة بروتينية واحدة لأنزيم (GPx) (كما مبين بالشكل (4)) وكان حجم الروغان للقمة التي تحمل فعالية الأنزيم (125ml) وأعتمد هذا الحجم في تقدير الوزن الجزيئي التقريبي للأنزيم .

تم إمرار عدد من المركبات معلومة الوزن الجزيئي التي تتراوح أوزانها الجزيئية بين (2000000 dalton - 204) على العمود الحاوي على هلام (Sephadex G-100) لغرض تعيين خواص العمود من الحجم الداخلي ((Internal volume (Vi)) وكذلك الحجم الخالي أو الفارغ من الحبيبات ((Void volume (Vo)) والجدول (3) يبين المواد التي تم إمرارها على عمود الفصل الحاوي على هلام من نوع (Sephadex G-100) مع أوزانها الجزيئية وحجوم روغانها .

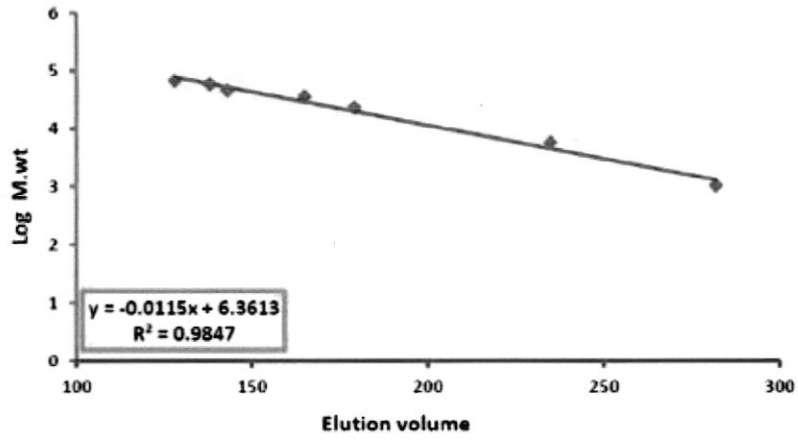


الشكل (3) المظهر الجانبي لروغان الحزم البروتينية لأنزيم كلوتاثايون بيروكسديز الناتجة من عمود الفصل بإستخدام تقنية الترشيح الهلامي نوع (Sephadex G-100) والعائدة للحزمة البروتينية (B) المفصولة بتقنية التبادل الأيوني من مصل دم مرضى الثلاسيميا

الجدول(3): الأوزان الجزيئية وحجوم الروغان للمواد القياسية المستخدمة وللحزمة البروتينية (B) لمرضى الثلاسيميا في تقنية الترشيح الهلامي بإستخدام (Sephadex G-100)

المادة	الوزن الجزيئي (دالتون)	حجم الروغان (ml)
الدكستران الازرق Blue dextran	2000000	100
البومين مصل البقر BSA	67000	128
أنزيم الفا – امايليز α – Amylase	58000	138
البومين البيض Egg albumin	45000	143
أنزيم الببسين Pepsin	36000	165
هورمون الانسولين Insulin hormone	5750	235
هورمون الأوكسيتوسين Oxytocin hormone	1051	282
التريتوفان Tryptophan	204	325
الحزمة البروتينية B لمرضى الثلاسيميا	83907	125

و عند رسم حجم الروغان لكل مادة مقابل لوغاريتم وزنها الجزيئي يظهر خط مستقيم كما في الشكل (5) الذي حدد من خلاله الوزن الجزيئي التقريبي للأنزيم (GPx) والناتج عن عمود الفصل في تقنية الترشيح الهلامي والذي أعطى بقيمة (83907) دالتون للقمة التي ظهرت فيها أعلى فعالية للأنزيم وهذه القيمة مقاربة مع الدراسات السابقة التي أجريت لهذا الأنزيم [14,15] .



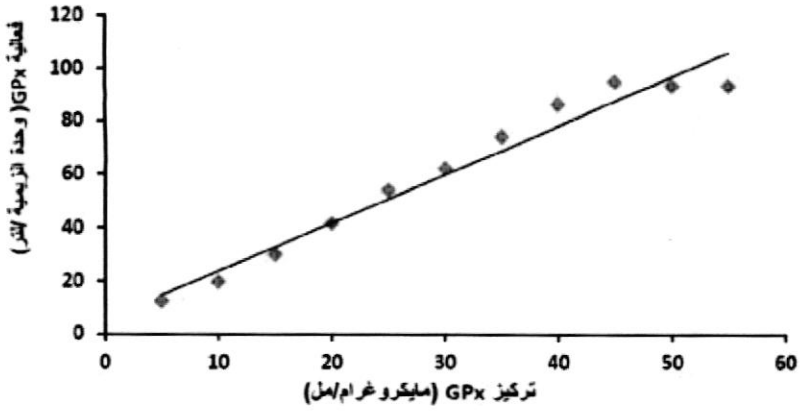
الشكل (4) المنحنى القياسي لتحديد الوزن الجزيئي بتقنية الترشيح الهلامي بإستخدام عمود الفصل (Sephadex G-100)

دراسة بعض العوامل المؤثرة على فعالية أنزيم الكلوتاثايون بيروكسيديز المنقى جزئيا من مصل دم مرضى الثلاسيميا

إن التفاعلات التي تحفزها الأنزيمات تكون حساسة للظروف الخارجية ، ولأن الأنزيمات ذات طبيعة بروتينية فإنها تكون حساسة بدرجة غير إعتيادية للتأثيرات المغايرة لبيئتها الذاتية ، وهكذا فإن تركيز الأنزيم وتركيز مادة الأساس ودرجة الحرارة وتركيز أيون الهيدروجين (pH) تؤثر على معدل سرعة التفاعل الأنزيمي لأن جميع هذه العوامل تؤثر على الموقع الفعال للأنزيم وتؤثر على تكوين معقد الأنزيم – المادة الأساس [16] . لغرض التعرف على فعالية الأنزيم بصورة دقيقة يكون من الواجب دراسة العوامل المؤثرة على فعالية الأنزيم إيجاد الظروف المثلى التي يعمل بها أنزيم (GPx) ، إذ أستخدمت الحزمة البروتينية الثانية (قمة B) صدراً لأنزيم (GPx) المنقى جزئياً من مصل مرضى الثلاسيميا في إيجاد الظروف المثلى له .

1- تأثير تركيز الأنزيم

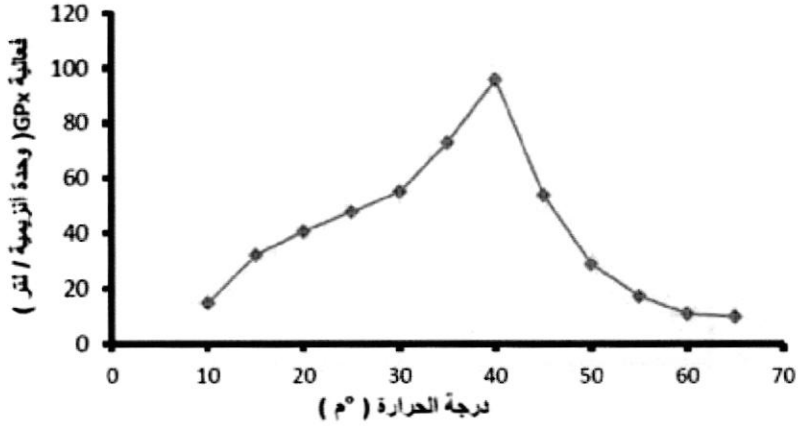
تم قياس فعالية أنزيم (GPx) بوجود تراكيز مختلفة من الأنزيم المنقى جزئياً من المصل تراوح بين (5-55µg/ml) ويبين (الشكل (6)) العلاقة بين فعالية الأنزيم وتركيز الأنزيم بثبوت العوامل الأخرى ، إذ لوحظ أن سرعة التفاعل الأنزيمي تزداد بزيادة تركيز الأنزيم، ومن ثمة فقد تم إستخدم تركيز (45 µg/ml) من الأنزيم بوصفه تركيزاً ثابتاً في جميع التجارب اللاحقة .



الشكل (5) تأثير التراكيز المختلفة من أنزيم (GPx) على الفعالية الأنزيمية

2- تأثير درجة الحرارة

يلاحظ من (الشكل (7)) أن الإرتفاع التدريجي لدرجة الحرارة يؤدي إلى رفع فعالية الأنزيم تدريجياً إلى حد (45 °م) يحصل بعدها إنخفاض واضح في فعالية الأنزيم، ولقد تم اختيار تلك الدرجة لقياس فعالية الأنزيم في جميع التجارب اللاحقة .



الشكل (6): تأثير درجة حرارة التفاعل على فعالية أنزيم (GPx)

3- تأثير المحلول المنظم

تأثير نوع المحلول المنظم

تعد معرفة نوع المحلول المنظم ضرورية لقياس فعالية الأنزيمات. وتم استخدام أنواع مختلفة من المحاليل المنظمة التالية عند تركيز (0.1mol/L) وبتثبيت الدالة الحامضية عند (pH =7.2) .

1-1Na_2HPO_4 – NaH_2PO_4 buffer .

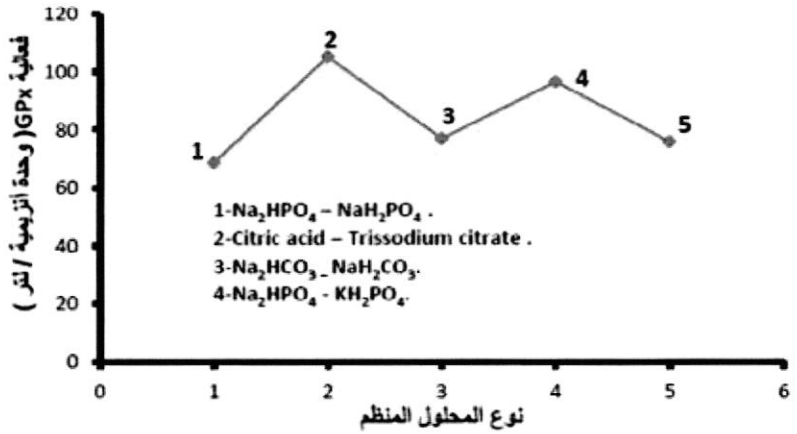
2- Citric acid – Trissodium citrate buffer .

2- Na_2HCO_3 _ NaH_2CO_3 buffer .

3- Na_2HPO_4 - KH_2PO_4 buffer .

4- Tris – HCl buffer .

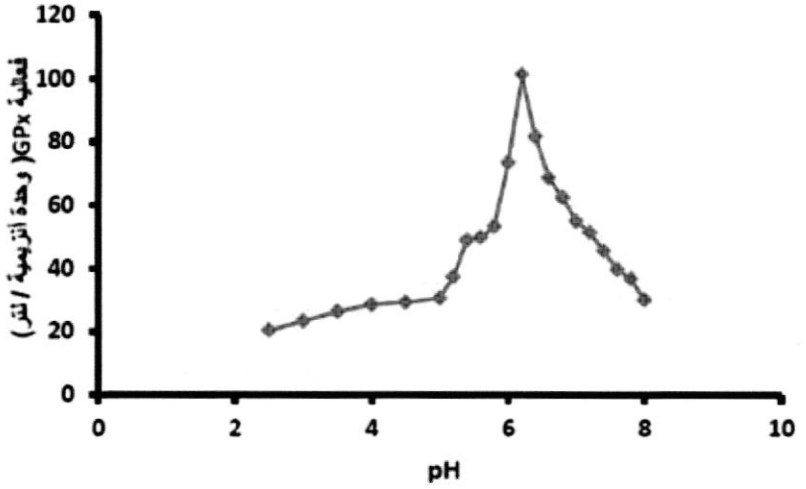
إذ بينت النتائج إن أعلى فعالية للأنزيم كانت عند محلول المسترات المنظم وكانت قيمة الفعالية (105.12U/L) كما هو مبين في الشكل (8) .



الشكل (7): تأثير نوع المحلول المنظم على فعالية أنزيم (GPx)

تأثير الأس الهيدروجيني لمحلول السترات المنظم

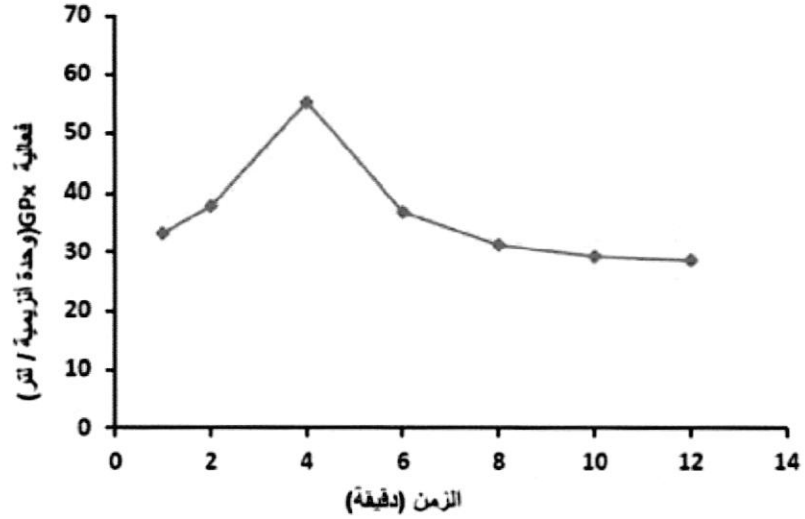
تم قياس فعالية أنزيم (GPx) في محلول السترات المنظم ذو تركيز (0.1mol/L) مع تغير الأس الهيدروجيني للمحلول المنظم وتراوحت بين (8- pH=2.5) لغرض إيجاد أعلى فعالية للأنزيم، وتشير النتائج الموضحة في الشكل (9) إلى أن أعلى فعالية للأنزيم كانت عند أس الهيدروجيني (6.2) .



الشكل (8): تأثير الأس الهيدروجيني للمحلول المنظم على فعالية أنزيم (GPx)

تأثير زمن التفاعل

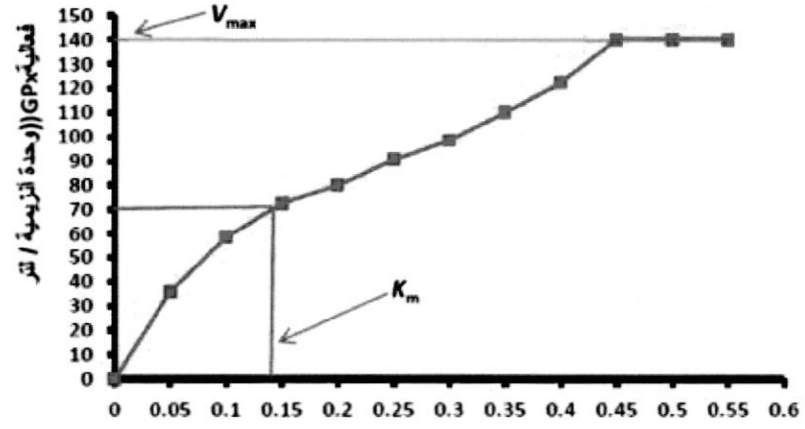
تمت دراسة زمن التفاعل لأختيار المدة الزمنية المثلى وتشير النتائج الموضحة في الشكل (10) إلى أن أعلى فعالية للأنزيم كانت عند الدقيقة (4) ثم الإنخفاض بعد الدقيقة الرابعة وربما يعود السبب إلى أنخفاض تركيز مادة الأساس .



الشكل (9): العلاقة بين فعالية أنزيم (GPx) وزمن التفاعل

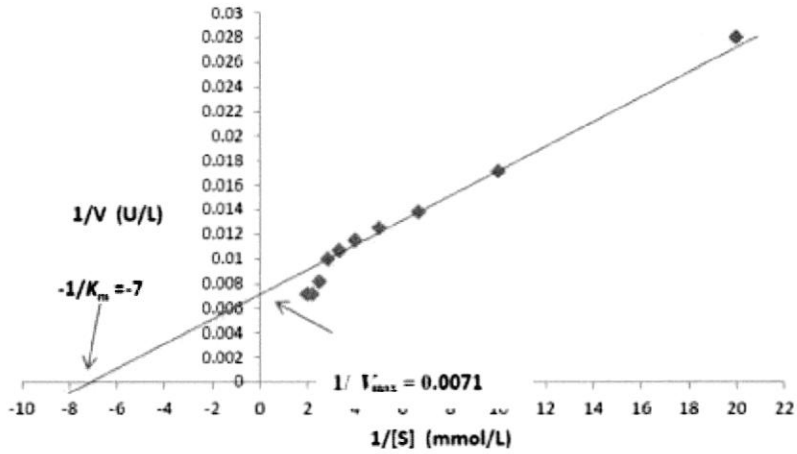
تأثير تركيز مادة الأساس

لمعرفة العلاقة بين فعالية أنزيم (GPx) وتركيز مادة الأساس الكلوتاثايون تم قياس فعالية الأنزيم بوجود تراكيز مختلفة من مادة الأساس وتركيز ثابت من الأنزيم (45 µg/ml) ، كما مبين في الشكل (11) .



الشكل (10)تأثير تر اكيز مختلفة من مادة الأساس الكلوتاثايون على فعالية (GPx)

إن أعلى فعالية لأنزيم (GPx) لمادة الأساس الكلوتاثايون كانت عند تركيز (0.45mmol/L) ، وبإستخدام رسم لاينويفر- برك (Line Weaver-Burk plot) وجد أن قيمة السرعة القصوى(V_{max}) وثابت ميكيلس (K_m) لأنزيم GPx هي (141U/L) و(0.142 mmol/L) على التوالي وكما موضح في الشكل(12) .



الشكل (11): رسم لاينويفر – برك لتوضيح قيمتي ثابت ميكيلس والسرعة القصوى

ملخص الظروف المثلى لقياس فعالية أنزيم (GPx)

إن ملخص الظروف المثلى لقياس فعالية أنزيم (GPx) المنقى من مصل مرضى الثلاسيميا الكبرى موضحة في الجدول (4) وهذه الظروف مقاربة لما نشر في الادبيات حول الأنزيم [18] .

الجدول (4): الظروف المثلى للأنزيم المنقى

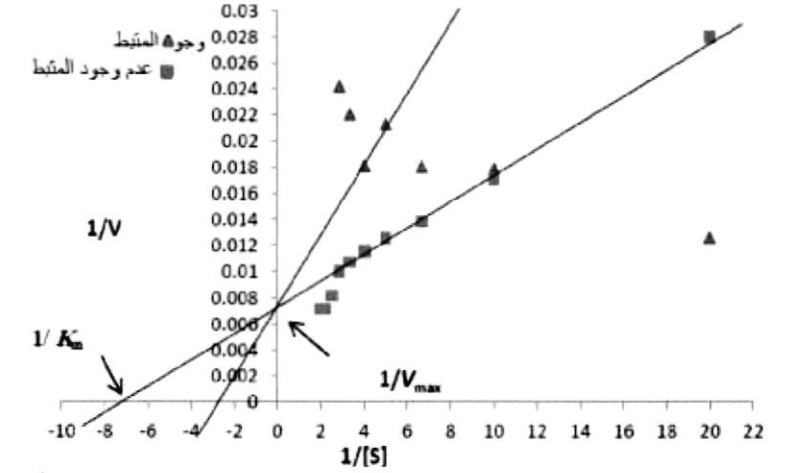
تركيز الأنزيم مايكرو غرام/مل	زمن التفاعل (دقيقة)	الأس الهدروجيني	نوع المحلول المنظم	درجة الحرارة (°م)	تركيز مادة الأساس (ملي مول/ لتر)
45	4	6.2	محلول السترات المنظم	45	0.45

دراسة تأثير عدد من الأدوية (العقاقير) على فعالية أنزيم (GPx)

تم إستخدام بعض الأدوية المستخدمة في علاج مرضى الثلاسيميا والمستمرين عليها لمعرفة تأثيرها على فعالية أنزيم (GPx) المنقى جزئياً .

عقار الأكسجاد Exjade

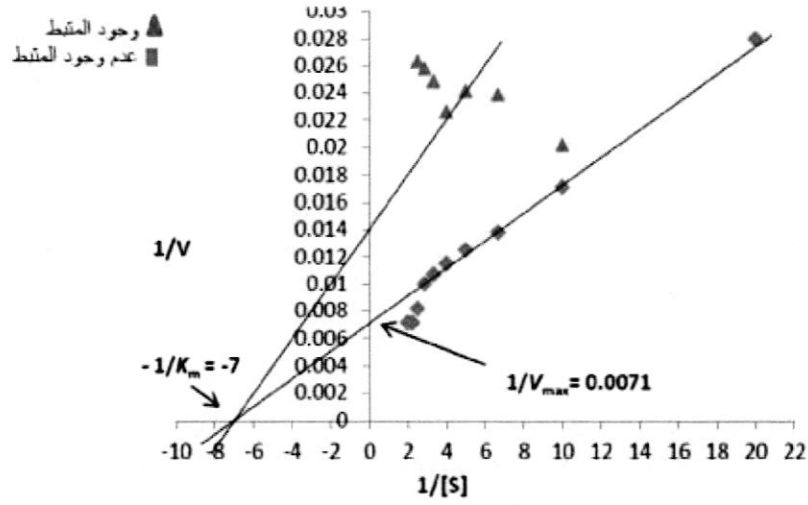
درس تأثير الأكسجاد بوصفة مثبطاً للأنزيم (GPx) ووجد انه يتفاعل مع الأنزيم ويؤدي الى التقليل من فعالية الأنزيم بزيادة تركيزه . وعند إستخدام رسم لاينو يفر – برك لإيجاد نوعية عمل المثبط الأكسجاد بينت النتائج أن التثبيط من النوع التنافسي Competitive inhibitor (كما موضح في الشكل (12)) ، إذ تبقى السرعة القصوى (V_{max}) للأنزيم ثابتة ولكن تزداد فيه قيمة (K_m) ، ويعتمد هذا التثبيط التنافسي العكسي على تركيز المثبط والمادة الأساس والألفة النسبية بين المثبط والمادة الأساس[17] .



الشكل(12): رسم لاينويفر – برك لتوضيح ثابت ميكيلس والسرعة القصوى عند إستخدام المثبط الأكسجاد

عقار الديسفيرال Desferal

بإستخدام تراكيز مختلفة لعقار الديسفيرال بوصفة مثبطاً للأنزيم وجد انه يتفاعل مع الأنزيم ويؤدي الى التقليل من فعالية الأنزيم كلما زاد تركيزه . وعند إستخدام رسم لاينو يفر – برك لإيجاد نوعية عمل المثبط ديسفيرال بينت النتائج إن التثبيط من النوع غير التنافسي inhibitor Uncompetitive تنخفض في هذا النوع من التثبيط السرعة القصوى (V_{max}) وتبقى قيمة (K_m) ثابتة [17] (كما موضح في الشكل (13)) .



الشكل(13): رسم لاينويفر – برك لتوضيح ثابت ميكيلس والسرعة القصوى عند إستخدام المثبط ديسفيرال

ويوضح الجدول (5) النتائج التي تم الحصول عليها بإستخدام تراكيز مختلفة من عقار الديسفيرال والأكسجاد مما أعطى نسباً تثبيطية مختلفة لفعالية الأنزيم (GPx) .

الجدول (5) تأثير الأدوية على فعالية الإنزيم (GPx)

الأدوية	التركيز (ملي مول /لتر)	الفعالية (وحدة أنزيم /لتر)	*النسبة المئوية للتثبيط %
الأكسجاد	0.025	139.5	1.06
	0.075	65.86	53.29
	0.125	65.3	53.68
الديسفيرال	0.025	136.14	3.44
	0.075	59.45	57.83
	0.125	51.43	63.52

*أعتبرت الفعالية القياسية للأنزيم هي (141) وحدة أنزيمية /لتر

المصادر

1- Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing , J. and Flohe, L. (1999). Dual function of the selenoprotein GSH-PX during sperm maturation. Science, 27;285: 1393-1397.

2- Bhabak, K. P.; Mugesh, G. (2010) Functional Mimics of Glutathione Peroxidase: Bioinspired Synthetic Antioxidants. Acc. Chem . Res., 43, 1408–1419.

3- Banerjee, R., Becker, D.; Dickman, M., Gladyshev, V., Ragsdale, S.(2008). "Redox Biochemistry". John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. Canada.pp.201-209.

4- Hussein, H.K.; Elnaggar, M.H.; Al-Dailamy J.M.(2012). Protective role of Vitamin C against hepatorenal toxicity of fenvalerate in male rats, Global Advanced Research Journal of Environmental Science and Toxicology Vol. 1(4) pp. 600-605.

5- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.(2000). Free radicals and antioxidant in the year 2000 : A Historical look to the future . Ann. NY. Acad. Sci.. 899:136-147.

6- Robyt, F. J. and White, J. B. (1987). "Biochemical Techniques Theory and Practice". Books Cole Publishing Co., U.S.A., 14, 235–236, 246, 263, 269.

7- Plummer, T.D. (1978). "An Introdaction of Practical Biochemistry". 2nd ed ., McGraw – Hill Book ; Co . V. K., 48, 52, 174, 270, 274 .

8- Stryer , L. (2005) . "Biochemistry" . 5th ed .; W. H. Freeman and Co.; New York .USA : 151 – 158 .

9- Chisti, Y., Moo-Young, M. (1991) .Fermantation technology bioprocessing scale-up and manufacture .In: moses V and cape RE (eds), Biotechnology : The science and the Business. Harwood Academic Publishers. New York. PP. 167-209.

10- Whitaker, J.R. and Bernhard, R.A. (1972). Experiments for : An introduction to enzymology , TheWhiber Press. Davis .
11- Mikkelsen, S.R. (2004) ."Bioanalytical Chemistry". John wiley and sons Inc. Hoboken , New Jersey in the United states of America.P.26.
12- Andrews, P. (1965) . The gel filtration behavior of proteins related to their molecular weight over awide rang . J. Biol. Chem. 96, 595.
13- Rotruck, J.T., Pope, A.L., Gaanther, H.E, Swanson, A.B. (1984). Selenium biochemical roles as a component of glutathione peroxidase. Science 17:588-590.
14- Borglund, M. ; Akesson, A.; and Akesson B. (1988) . Distribution of selenium and glutathione peroxidase in plasma compared in healthy subjects and rheumatoid arthritis patients. Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation, Vol. 48 (1) : P: 27-32.
15- Buettner,G.R; Oberley,L.W.(2003) Free Radical and Radiation Biology Program B-180 Med Labs , Free Radicals in Biology and Medicine. 77:222 .
16- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L. (2007) . "Biochemistry". W. H. Freeman and Company. New York, USA. pp.138, 139, 145, 146.
17-
Murray,R.K.;Bender,A.B.;Botham,K.M.;Kennelly, P.J.;Rodwell, V.W .;and, Weil,P.A.,(2009)." Harper's illustrated Biochemistry", 28th ed ., The McGraw-Hill Companies,China. P:156 .
18- Shulgin, K.K., Popova, T. N., Rakhmanova T.I. 2008. Isolation and purification of glutathione peroxidase. Biomedical and Life Sciences. 44(3):247-250.

Partial Purification and Kinetic studies of Glutathione Peroxidase in the blood of β- thalassemia major patients

Mohammed B.Al-Sadoun[1], Faiz M. Al- Abadi[2] , Ayad A.Al-Abbasi[2]
[1]Department of Chemistry , College of Science , Mosul University , Mosul , Iraq
[2]Department of Chemistry , College of Science , Tikrit University , Tikrit , Iraq

(Received: 28 / 4 / 2013 ---- Accepted: 26 / 8 / 2013)

Abstract

The present research includes isolation and kinetic study of characteristics of glutathione peroxidase (GPx) from patients serum beta β-thalassemia major patients. Two proteinous components had been isolated by ion-exchange chromatography from the precipitate produced by ammonium sulfate using Diethylaminoethyl Cellulose (DEAE Cellulose) It was found that the second peak has a high activity for (GPx) . The apparent molecular weight of the isolated GPx was (83907) Dalton .

The results also showed that the maximum activity of (GPx) were obtained using (0.045mmol/L) of glutathione as a substrate, using (Citrate buffer) at (6.2pH) and (45°C). Using Line Weaver–Burk plot, the values of maximum velocity (V_{max}) and Michaelis constant (K_m) were (141U/L) and (0.142 mmol/L) respectively. The study showed the effect of some inhibitors on the enzyme activity. Exjade drug possessed a competitive inhibition while Disferal showed a uncompetitiv- einhibition .

Key words: Isolation, Glutathione peroxidase, Beta thalassemia major, Inhibitors .