IRAQI Academic Scientific Journals
Samarra Journal of Pure and Applied Science
SJPAS
www.sjpas.com
ISSN:2663-7405

عزل وتنقية أنزيم كلوتاثايون بيروكسيديز من مصل دم مرضى الهيموفيليا ودراسة تأثير بعض المركبات الايضية الثانوية لنبات الكسوب على فعاليته

قصي حازم يحيى*[1]، نزار أحمد ناجي[1]، محمد بحري حسن[2]
1- قسم الكيمياء، كلية العلوم ، جامعة تكريت، صلاح الدين، العراق (qusayaltaee78@gmail.com)
2- قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة الموصل
البحث مستل من رسالة ماجستير الباحث الاول

معلومات البحث:

تأريخ الاستلام: 2020/04/23
تأريخ القبــول: 2020/06/15

الكلمات المفتاحية:

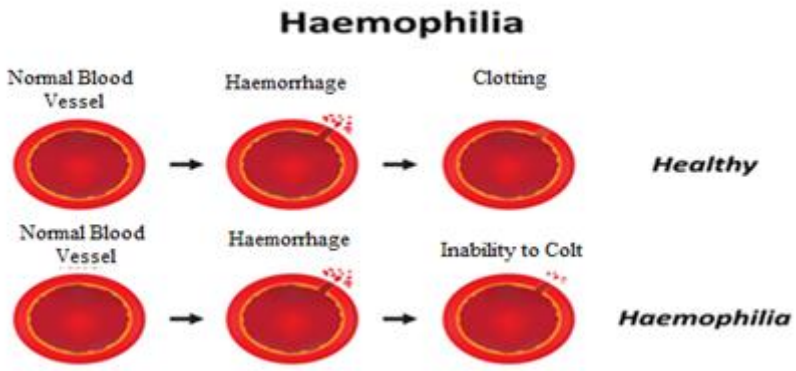
الهيموفيليا، انزيم كلوتاثايون بيروكسيديز، عزل، تنقية، الكسوب

الخلاصة:

تضمنت الدراسة عزل وتنقية أنزيم كلوتاثايون بيروكسيديز (GPx) في مصل دم مرضى الهيموفيليا، إذ شملت 48 عينة من مصل دم مرضى الهيموفيليا بكلا نوعيه (40 عينة من النوع A و 8 من النوع B)، علاوة على 50 عينة من الأشخاص الأصحاء ومن الذكور فقط. بينت نتائج الدراسة وجود انخفاض معنوي عند مستوى الاحتمالية $P \geq 0.05$ لفعالية أنزيم GPx في مصل دم مرضى الهيموفيليا بكلا نوعيه. وتم ايضا عزل وتنقية أنزيم GPx من مصل دم المصابين بالهيموفيليا من خلال الترسيب بكبريتات الامونيوم والديلزة وباستخدام تقنية كروماتوغرافيا التبادل الايوني DEAD – Cellulose حيث تم فصل حزمة بروتينية رئيسة والتي اعتمد عليها في تحديد الظروف المثلى للأنزيم المنقى جزئيا. حُددت الظروف المثلى للأنزيم المنقى جزئيا من مصل الدم وكانت أعلى فعالية لزمن التفاعل عند الدقيقة 6، دالة حامضية عند pH=8، وتركيز الانزيم 105 µg/ml، وتركيز مادة الاســـاس H_2O_2 0.6 mmol L، ودرجة حرارة 40°C وان السرعة القصوى V_{max} وثابت ميكيلس K_m كانت 0.9 µmol/min و 0.195 mmol/Liter على التوالي باستخدام رسم لاينويفر - برك. تضمنت الدراسة أيضا تأثير بعض النواتج الطبيعية من بذور نبات الكسوب (الزيت، الفلافونويدات، الكلايكوسيدات) على فعالية أنزيم GPx.

المقدمة:

الهيموفيليا Hemophilia من امراض الدم وهو اضطراب وراثي في الغالب يقلل من قابلية الجسم على تكوين خثرات دموية اثناء عملية النزيف ، وهناك ما يقدر بنحو 400000 شخص في جميع انحاء العالم مصابين بالهيموفيليا ، ولكن 25% فقط من المصابين يتلقون العلاج الكافي. صنف الهيموفيليا إلى نوعين رئيسين هما (A) و (B)، التي سببها طفرات في جينات العامل الثامن (*FVIII*) والتاسع (*FIX*) على التوالي؛ حيث يدرج ضمن الامراض الوراثية، إذ يصاب 1 من بين كل 5000 مولود بالهيموفيليا *A* بينما يصاب بالهيموفيليا *B* 1 من كل 30000 [1,2] . يوضح الشكل 1 عملية النزيف في مرضى الهيموفيليا وتخثر الدم في الاصحاء.



الشكل 1: الفرق بين عملية تخثر الدم للأشخاص الأصحاء والمصابين بالهيموفيليا [3]

كلوتاثايون بيروكسيديز (GPx) الاسم العام لأنزيم من صنف البيروكسيديز (1.11.1.9EC) تتمثل أهميته في حماية الكائن الحي من الكرب التأكسدي، يوجد هذا الأنزيم في سايتوبلازم ومايتوكوندريا الخلايا لأنسجة الكبد والدم ويعتمد نشاطه على عنصر السلينيوم [4] وهو سيلينو بروتين، يتكون من اربع وحدات بروتينية فرعية Sub-unit كل وحدة تمتلك ذرة واحدة من عنصر السيلينيوم وهي ترتبط مع الحامض الاميني السستين Cysteine بشكل Seleno Cysteine يدخل الكلوتاثايون GSH في تركيبه، الذي يعمل مع الانزيم على ازالة مركبات البيروكسيدات العضوية (ROOH)، بيروكسيدات الدهون (LOOH) وبيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) . إذ يتفاعل GSH مع كل من هذه المركبات لينتج كلوتاثايون مؤكسد (GSSG) وكما موضح في المعادلات الاتية.

$$2GSH + H2O2 \xrightarrow{GPx} GSSH + 2H2O \qquad (1)$$

$$2GSH + ROOH \xrightarrow{GPx} GSSG + ROH + H2O \qquad (2)$$

$$2GSH + LOOH \xrightarrow{GPx} GSSG + LOH + H2O \qquad (3)$$

يعد انزيم GPx من الانزيمات المهمة التي لها دور مهم في حماية الخلايا والانسجة من بيروكسدة الدهن، والذي يعد احد الانظمة الدفاعية داخل جسم الكائن الحي من الكرب التأكسدي، إذ يحفز هذا الأنزيم وبخصوصية عالية تخفيف الخصائص السامة لـ H_2O_2 بأكسدة الكلوتاثايون GSH. ان انزيم GPx يستخدم GSH واهبا للهيدروجين بينما يتم اكسدة الـ GSH، وإعادة توليده يحفز بوساطة كلوتاثايون ريدكتيز GRd وهذا يحدث عند تراكيز واطئة من H_2O_2، اما في حالة التراكيز العالية من H_2O_2 فان انزيم الكتاليز (Catlase) يصبح مهما في ازالته، وكذلك فان GPx يحفز اختزال بيروكسيدات الدهون بوساطة GSH وهذا يمنع الانتشار فوق اكسدة الدهون [5,6]. إذ ان الأشخاص الذين لديهم مستويات منخفضة في فعالية GPx يكونون اكثر عرضة للكرب التأكسدي وبالتالي حدوث اكسدة في الأحماض الدهنية الغشائية والبروتينات [7].

المواد وطرائق العمل

شملت هذه الدراسة على جمع 48 عينة من مرضى مصابين بالهيموفيليا من مستشفى ابن سينا التعليمي في الموصل ولكلا النوعين (A وB)، وتراوحت أعمار الأشخاص (1-59) سنة ومن الذكور فقط، وهؤلاء المرضى مشخصين سريريا من قبل الأطباء المختصيين ويراجعون المستشفى بشكل دوري. وجمعت 50 عينة من مصل دم الأشخاص الأصحاء تتراوح أعمارهم (1-59) ومن الذكور فقط. حيث أن الذكور تحتوي على زوج الكروموسومات الجنسية (xy) وفي الاناث يوجد زوج الكروموسومات (xx)، يتم انتاج مركبات عوامل تخثر الدم على كروموسوم (x)، عند وجود خلل في جينات التخثر على كروموسوم (x) الوحيد في الذكور يعني فقدان القدرة على انتاج مركبات عوامل التخثر، اما في الاناث اذا حدث خلل في جينات التخثر على كرموسوم (x) فان الكرموسوم الاخر يحتوي نسخ سليمة من الجينات القادرة على انتاج مركبات عوامل التخثر [8].

تحضير مصل الدم :

تم سحب الدم من الوريد Venous blood بحجم 5 ml للحصول على مصل الدم عن طريق وضع عينة الدم في أنبوب ذي غطاء محكم وتم تحضينها في الحمام المائي Bath water عند درجة حرارة 37 C° لمدة 10 min بعدها وضعت في جهاز الطرد المركزي Centrifuge لمدة 15 min وبسرعة 1006 xg بعدها تم سحب مصل الدم (الذي يجب أن يكون غير متحلل) بوساطة ماصة دقيقة Micropipette. وقُسم الى ثلاثة أجزاء في انابيب بلاستيكية صغيرة جافة ونظيفة وحفظ في درجة حرارة 20 ^{0}C- لحين استخدامه في قياس متغيرات الأكسدة ومضادات الأكسدة المحددة في البحث.

تقدير فعالية أنزيم كلوتاثايون بيروكسيديز في مصل الدم

قُدرت فعالية أنزيم GPx حسب الطريقة التي اتبعها الباحث [9] .إذ يعمل أنزيم GPx على أكسدة الكلوتاثايون المختزل GSH باستعمال بيروكسيد الهيدروجين وتحويله إلى الشكل المؤكسد للكلوتاثايون GSSG كما في المعادلة أدناه:

$$2\ GSH + H2O2 \rightarrow GSSG + 2\ H2O \qquad (4)$$

اما المتبقي من الكلوتاثايون المختزل (غير المتفاعل) يقاس فيما بعد . قدرت فعالية أنزيم كلوتاثايون بيروكسديز اعتمادا على المعادلة الاتية:

$$\text{Activity of GPx (U/L)} = 0.23 \times \log GSH_1/GSH_2 \qquad (5)$$

GSH_1 = تركيز الكلوتاثايون المستعمل في الطريقة قبل التفاعل

GSH_2 = كمية الكلوتاثايون المتيقي بعد التفاعل

اتبعت طريقة فولن – لاوريLowry – Folion المحورة [10] لقياس تركيز البروتين في المصل وباستعمال ألبومين مصل البقر.

عزل وتنقية الأنزيم من مصل دم مرضى الهيموفيليا النوع A

1- ترسيب البروتين وفصله بإستخدام كبريتات الأمونيوم

أُضيفت كبريتات الامونيوم بحالتها الصلبة وبصورة تدريجية الى مصل الدم وبتشبع % 65 مع تحريك المزيج بالمحرك المغناطيسي عند درجة 4 ^{o}C ولمدة 60 دقيقة ثم ترك المزيج في الثلاجة لمدة 24 ساعة بعدها فصل الراسب عن الراشح باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد لمدة 10 دقائق وبسرعة 4000xg ، بعد ذلك أُذيب الراسب بأقل كمية ممكنة من محلول الفوسفات المنظم [KH_2PO_4, K_2HPO_4 (0.4mM, pH 7.0)]، إذ قدرت كمية البروتين وفعالية الإِنزيم في محلول الراسب البروتيني الناتج ثم حفظ محلول الراسب في درجة حرارة 20^{o}C- لحين استخدامه مرة أخرى.

2- الفصل الغشائي (الديلزة)

تعد من الطرق المهمة التي تستخدم في تنقية الانزيمات ، إذ يتم في هذه الخطوة إزالة المتبقي من كبريتات الامونيوم المضافة لترسيب البروتينات والمواد ذات الأوزان الجزيئية الصغيرة باستخدام غشاء شبه ناضح يسمح بخروج الجزيئات الصغيرة ولا يسمح بمرور الجزيئات الأكبر من (14000 دالتون)[11]. بوضع المحلول البروتيني في الخطوة اعلاه في كيس الفصل الغشائي Dialysis bag بعد قياس فعالية أنزيم GPx وتركيز البروتين ، ويغمر الكيس في وعاء يحتوي على محلول الفوسفات المنظم (pH= 7.0 , 0.4mM)، واستمرت العملية 24 ساعة مع مراعاة تبديل محلول الفصل الغشائي كل 3 ساعات كذلك مراعاة التحريك بالمحرك المغناطيسي وبعد الإِنتهاء من هذه العملية حُسب الحجم النهائي للمحلول الناتج وقيست فعالية الأنزيم فضلا عن تقدير كمية البروتين بطريقة لاوري المحورة.

3- كروماتوغرافيا التبادل الأيوني

إن طريقة التحليل الكروماتوغرافي بوساطة التبادل الأيوني تعتمد على الفصل الجزيئي (Partitio chromatography) والتي يستخدم فيها طوران، الطور المتحرك Mobile phase والطور الثابت Stationary phase، إذ تُفصل المركبات الحياتية مثل البروتينات بوساطة أعمدة فصل محتوية على الراتنج المعين كالمبادل الايوني السالب والذي يُعادل مسبقا بمحلول قاعدي وان المجاميع الفعالة تحتوي على أيونات (NH_3^+). توضع العينة على السطح العلوي من الراتنج ثم يمرر محلول منظم ملائم خلال عمود الفصل ويتم فصل المركبات المتباينة الشحنة على مرحلتين، الأولى يحدث إمصاص (امتزاز) Adsorption للمواد المشحونة المراد تنقيتها على مادة الفصل، والثانية فصلها وإزالتها عن مادة الفصل للتبادل الأيوني (الراتنج) اعتمادا على شحنتها وذلك عن طريق استعمال محاليل ذات دوال حامضية وقوة أيونية معينة [12]. أُستخدم في هذه الدراسة المبادل الأيوني ثنائي أثيل أمينوأثيل سيليلوز diethyl amino ethyl–cellulose (DEAD) [13].

عزل النواتج الطبيعية من نبات الكسوب

1- فصل الزيت من بذور نبات الكسوب

أستعمل جهاز الاستخلاص Soxhlet لأستخلاص الزيت من بذور نبات الكسوب إذ وضع 200 gm من بذور النبات في الجهاز لمدة يومين باستخدام المذيب الهكسان (65-70C°) ثم بخر المذيب باستخدام جهاز التبخير تحت الضغط المخلل، بعد ذلك وضعت المادة الناتجة في أنبوبة محكمة الغطاء[14].

2- فصل الفلافونويدات من بذور نبات الكسوب

تم استخلاص الفلافونويدات بأخذ المتبقي (التفل) في جهاز الاستخلاص لمدة (3-2) ايام باستعمال الميثانول كونه مذيب، بعدها بخر الميثانول باستخدام جهاز التبخير تحت الضغط المخلل، ثم وضعت المادة الناتجة في أنبوبة محكمة الغطاء لحين إجراء العملية التالية [15].

3- فصل الكلايكوسيدات من بذور نبات الكسوب

أُستخلصت الكلايكوسيدات بأخذ التفل (المتبقي) في جهاز الاستخلاص لمدة (3-2) أيام باستخدام الماء المقطر، بعد ذلك وضع المحلول في جهاز التجفيد الناتج للتخلص من الماء وللحصول على الراسب بشكل مسحوق، ووضع في أنبوبة محكمة الغطاء وحفظ في الثلاجة لحين إجراء العملية التالية [16].

التحليل الاحصائي

تم تحليل جميع نتائج الفحوصات السريرية باستخدام البرنامج الاحصائي SPSS 16 لإيجاد طرائق الاحصاء القياسي Standard statistical methods لتحديد المتوسط والانحراف القياسي، وذلك باستعمال تحليل التباين الاحادي One way analysis of variance. واستعمل اختبار Duncan لتحديد الاختلافات الخاصة بين المجاميع من خلال قيمة الاحتمالية إذ ان ($p \leq 0.05$) عُدت اختلافا معنويا.

النتائج والمناقشة

شملت الدراسة على 48 حالة مرضية لأشخاص مصابين بمرض الهيموفيليا بنوعيه ، كما شملت الدراسة على 50 عينة من مجموعة السيطرة (أشخاص أصحاء ظاهريا) بوصفهم مجموعة مقارنة وتراوحت أعمار المجموعتين بين (1- 59) سنة.

فعالية أنزيم كلوتاثايون بيروكسيديز في مصل الدم

تم قياس ومقارنة فعالية أنزيم كلوتاثايون بيروكسيديز في مصل دم الاشخاص المصابين بالهيموفيليا والاصحاء باستعمال الطريقة التي اتبعها الباحث [9]. تشير النتائج في الجدول 1 متوسط فعالية أنزيم GPx في مصل دم المصابين بالهيموفيليا لكلا النوعين A وB ومجموعة السيطرة. وبينت النتائج وجود انخفاض معنوي عند مستوى الاحتمالية ($P \leq 0.05$) للمرضى (0.354 ± 0.135) و (0.257 ± 0.098) و (1.125 ± 0.196) لكلا النوعين على التوالي مقارنة بمجموعة السيطرة، وعدم وجود فرق معنوي بين نوعي المرض.

جدول 1: فعالية انزيم كلوتاثايون بيروكسيديز عند مرضى الهيموفيليا لكلا النوعين ومجموعة السيطرة

الهيموفيليا	العدد	المعدل U/L	الانحراف القياسي
الهيموفيليا A	40	0.354	0.135
الهيموفيليا B	8	0.257	0.098
الاصحاء	50	1.125	0.196

تشير النتائج الموضحة في الجدول 1 الى وجود انخفاض معنوي في مستوى فعالية انزيم GPx لدى مرضى الهيموفيليا، وقد يعزى السبب لانخفاض تركيز عنصر السيلينيوم الذي يعد من المكونات الأساسية لأنزيم GPx والذي يكون في الموقع الفعال للأنزيم على شكل سيلينوسستين Seleno cysteine، ويتكون GPx من أربع وحدات ثانوية متماثلة كل وحدة تحتوي على ذرة سيلينيوم في الموقع الفعال[17]. ويمثل السيلينيوم المجموعة المرتبطة Prosthetic group للأنزيم ، اذ يحل السيلينيوم محل الكبريت في السستين Cysteine حيث يشكل الجزء الفعال من الانزيم الذي يعمل على اختزال البيروكسيدات العضوية وبيروكسيد الهيدروجين لينتج الكحول والماء ويحول Selenenic acid بعد تأكسده جزيئتين من الكلوتاثايون من الشكل المختزل

GSH الى الشكل GSSG [18]. فضلا عن ذلك فان سبب اِنخفاض مستوى فعالية أنزيم كلوتاثايون بيروكسيديز هو تزايد تكوين بيروكسيد الهيدروجين داخل الجسم اِذ يعد من المواد المؤكسدة والتي يقوم أنزيم GPx بإزالتها مكونا كلوتاثايون ريدكتيز إذ يعمل GPx كواهب للإلكترون . كما يوضح الجدول 2 خطوات تنقية أنزيم GPx من مصل دم مرضى الهيموفيليا.

جدول 2: خطوات تنقية أنزيم كلوتاثايون بيروكسيديز من مصل دم مرضى الهيموفيليا

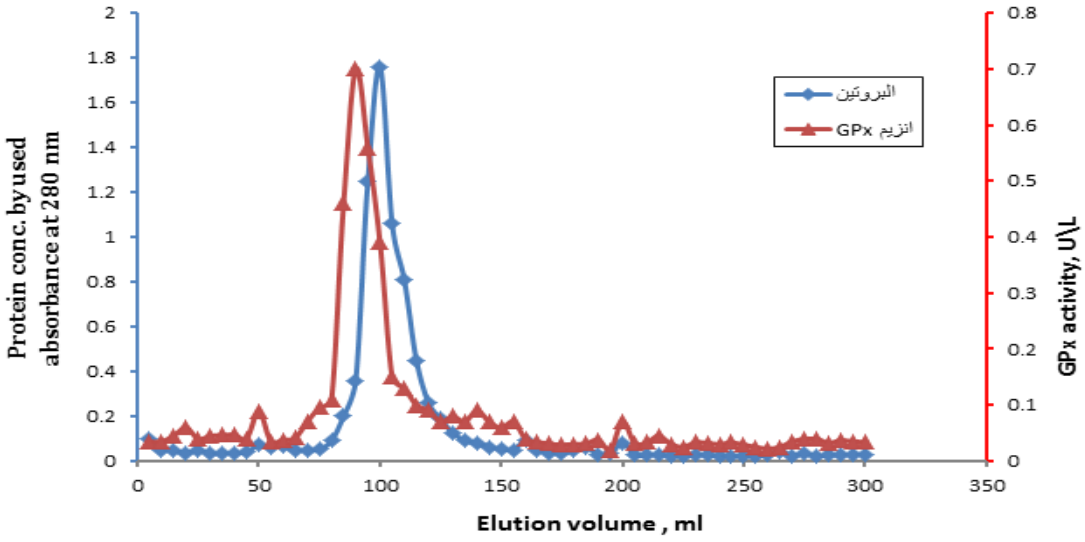
خطوات التنقية	الحجم (ml)	تركيز البروتين (mg/ml)	البروتين الكلي (mg)	الفعالية (*U/ml) x10^{-3}	الفعالية الكلية (U)	الفعالية النوعية** (U/mg)	الاستعادة %	عدد مرات التنقية
مصل الدم	16	0.827	13.23	0. 59	0.0095	0.0007	---------	1
بعد الترسيب	13	0.621	8.078	0. 63	0.0081	0.001	85.26	1.42
بعد الديلزة	17	0.465	7.905	0. 76	0.0129	0.0016	135.7	2.25
كروماتوغرافيا التبادل الأيوني	30	0.104	3.12	0. 78	0.023	0.0073	242.1	10.42

وحدة الانزيم U*: هي كمية كلوتاثايون بيروكسيديز اللازمة لتحويل مايكرومول واحد من مادة الاساس الى ناتج لكل دقيقة/مل تحت الظروف المحددة للقياس.

** الفعالية النوعية: هي عدد وحدات الانزيم الموجودة في واحد ملغم من البروتين.

التنقية بواسطة كروماتوغرافيا التبادل الايوني

استعملت تقنية كروماتوغرافيا التبادل الأيوني لتنقية الأنزيم، إذ مُرر المحلول البروتيني الناتج من عملية الفرز الغشائي على عمود الفصل الحاوي على المبادل الأيوني السالب (DEAE- cellulose)، وقد أشار المظهر الجانبي لروغان الأنزيم المنقى جزئيا الى ظهور قمة للأنزيم وكما موضح في الشكل 2 ، إذ بلغت الفعالية النوعية للحزمة البروتينية (0.0073 U/mg) وبحجم روغان (80-105 ml) Elution volume، هذا يعني أن عدد مرات التنقية تضاعفت بعد عملية التبادل الايوني بمقدار (10.42) وإن مقدار الاسترجاع للفعالية الكلية بلغ (242.1) عما هو عليه في المصل الخام .



الشكل 2: المظهر الجانبي لروغان أنزيم الكلوتاثايون بيروكسيديز المنقى جزئيا من مصل الدم بتقنية كروماتوغرافيا التبادل الأيوني وباستخدام المبادل الأيوني DEAE- Cellulose.

العوامل المؤثرة على سرعة التفاعل الأنزيمي

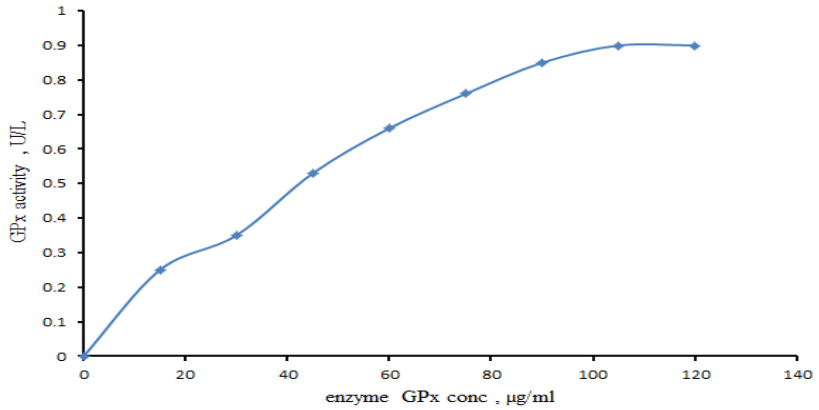
أظهرت النتائج الموضحة في الجدول 3 الظروف المثلى للأنزيم المنقى جزئيا من مصل الدم

الجدول 3 : الظروف المثلى لأنزيم GPx المنقى جزئيا من مصل الدم

تركيز مادة الاساس (mmol/L)	تركيز الانزيم (µg/ml)	درجة الحرارة °C	الاس الهيدروجيني	زمن التفاعل (min)	السرعة القصوى V_{max} (µmol/min)	ثابت ميكليس K_m (mmol/L)
0.6	105	40	8	6	0.9	0.195

تأثير تركيز الانزيم

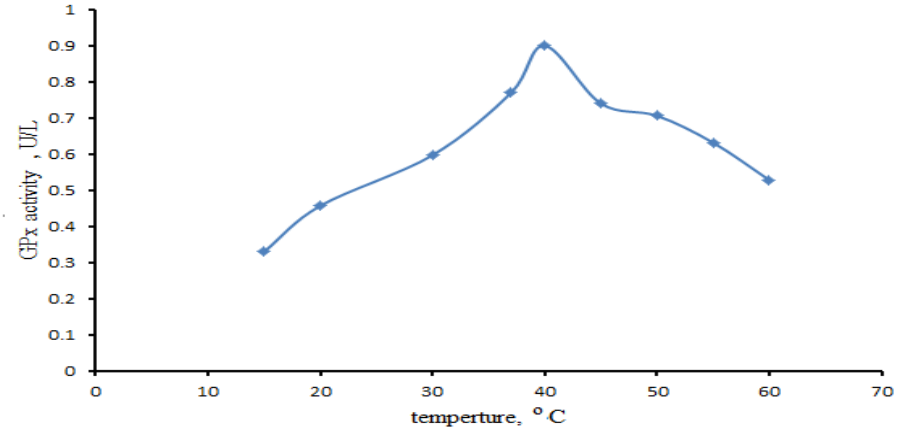
قيست فعالية أنزيم GPx باستعمال تراكيز مختلفة من الانزيم المنقى جزئيا من مصل دم المرضى تراوحت (10-120 µg/ml) من محلول الحزمة البروتينية، إذ لوحظ بان سرعة التفاعل الانزيمي تزداد بزيادة تركيز الانزيم وكما موضح في الشكل 3، أي ان سرعة التفاعل المحفز بالأنزيم تتناسب طردياً مع تركيز الانزيم عندما تكون مادة الاساس متوافرة في المحيط [19].



الشكل 3 : تأثير تركيز الأنزيم على سرعة التفاعل الانزيمي.

تأثير درجة الحرارة

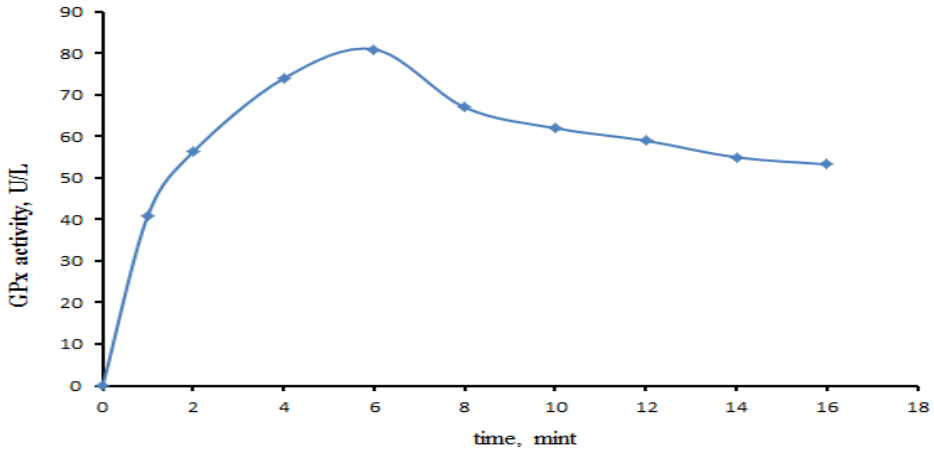
تم قياس فعالية الانزيم عند درجات حرارية مختلفة ولوحظ في الشكل 4 ان الارتفاع التدريجي لدرجة الحرارة يؤدي الى زيادة سرعة التفاعل الأنزيمي، اذ اظهرت النتائج بان درجة الحرارة المثلى (^{0}C40) وبعدها انخفضت فعالية الأنزيم بشكل ملحوظ لأن الأنزيمات لها طبيعة بروتينية وتكون حساسة للتغيرات الحرارية فيحدث مسخ (Denaturation) للأنزيم بسبب تكسر الاواصر الهيدروجينية والقوى الاخرى المسؤولة عن الحفاظ على الشكل الثالثي للبروتين وبالتالي فقدان الأنزيم لفعاليته[20].



الشكل 4: تأثير درجة حرارة التفاعل على سرعة التفاعل الأنزيمي

تأثير زمن التفاعل

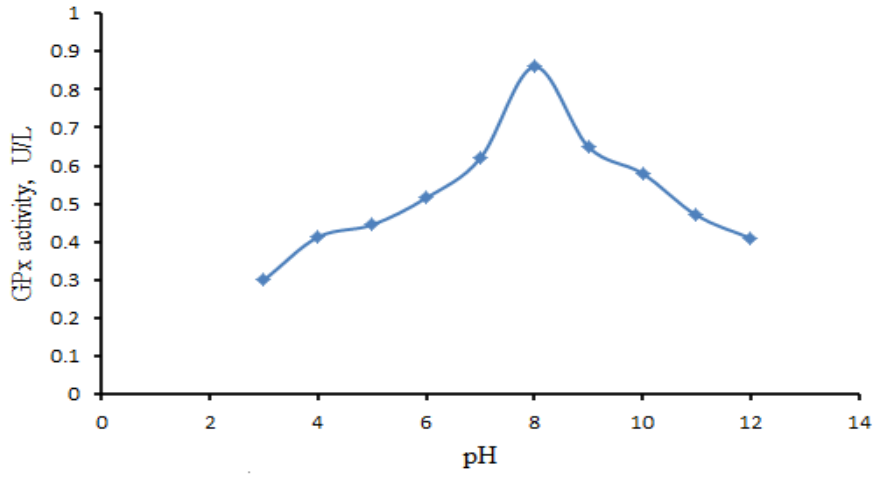
قيست فعالية الانزيم بأوقات مختلفة من بدء التفاعل لاختيار المدة الزمنية المثلى وتشير النتائج الموضحة في الشكل 5 إلى ان أفضل فعالية لأنزيم GPx كانت عند الدقيقة 6 ثم تبدأ الفعالية بالانخفاض ويعزى سبب ذلك إلى انخفاض تركيز المادة الاساس أو تشبع الموقع الفعال بمادة الأساس [19].



الشكل 5: تأثير زمن التفاعل على سرعة التفاعل الانزيمي

تأثير الاس الهيدروجيني

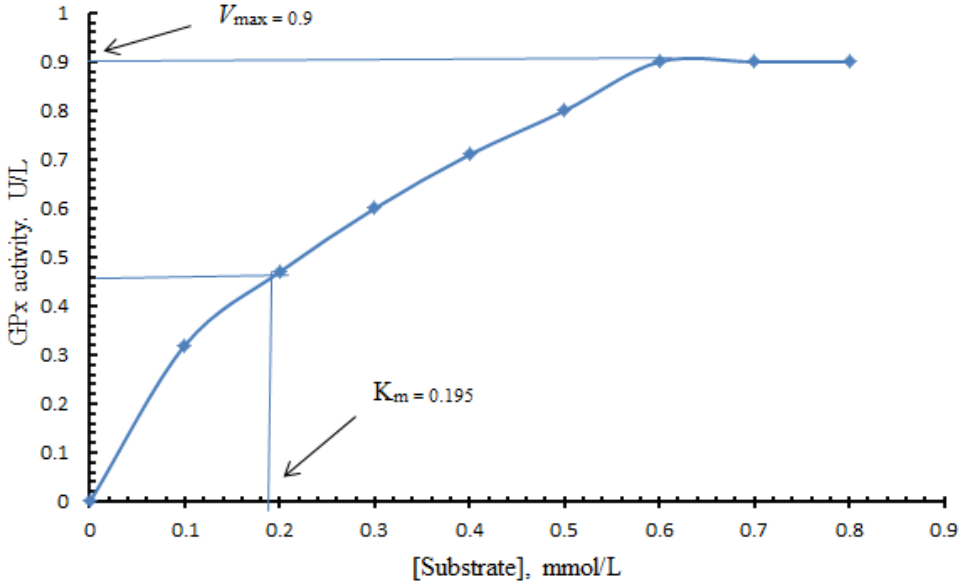
تم قياس فعالية انزيم مع تغيير الاس الهيدروجيني لمحلول الفوسفات المنظم ذي تركيز 0.4 mM وتشير النتائج الموضحة في الشكل 6 إلى أن أعلى فعالية للأنزيم كانت عند الأس الهيدروجيني 8 ، حيث أن لكل أنزيم لديه دالة حامضية يظهر عنده الانزيم أعلى فعالية تسمى الأس الهيدروجيني الامثل (Optimum pH) وان استخدام اس هيدروجيني عالٍ او واطئ جداً سيؤدي إلى فقدان فعالية الأنزيم نتيجة حدوث مسخ أو تشوهات في طبيعة الانزيم.



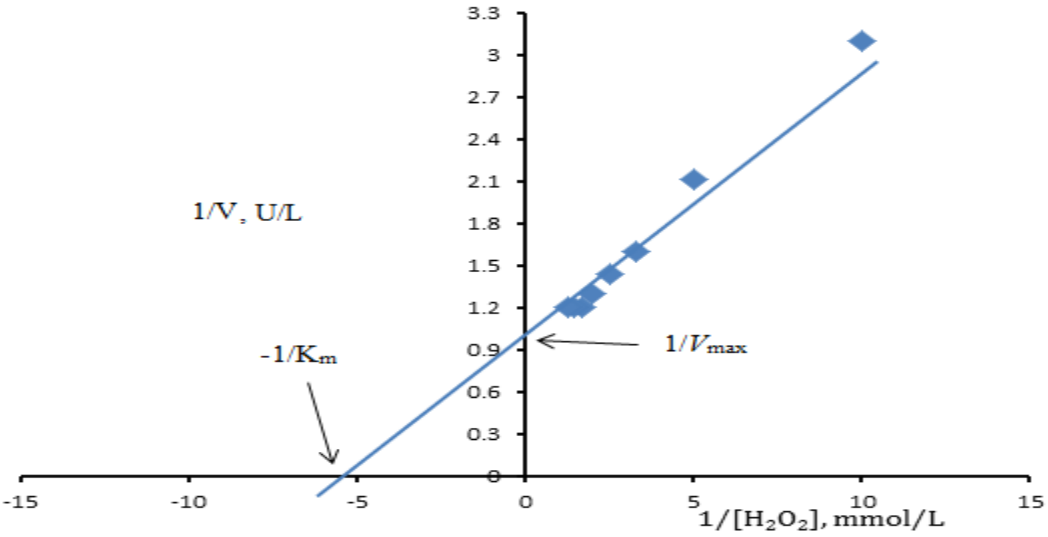
الشكل 6: تأثير الأس الهيدروجيني على سرعة التفاعل الانزيمي

تأثير تركيز مادة الاساس

قيست فعالية انزيم GPx باستعمال تراكيز مختلفة من مادة الاساس بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) تتراوح بين (0 -1.0 mmol/L) وبينت النتائج في الشكل 7 ان زيادة تركيز المادة الاساس يؤدي إلى زيادة سرعة التفاعل الأنزيمي ، إلى أن يصل قيمة ثابتة لا تحدث بعدها زيادة في معدل سرعة التفاعل الانزيمي بزيادة تركيز المادة الاساس ويطلق على السرعة عند أعلى تركيز للمادة الاساس بالسرعة القصوى V_{max} للأنزيم ، كما بين الشكل 7، ان تشبع أنزيم الكلوتاثايون بيروكسيديز بمادة الاساس بيروكسيد الهيدروجين كان عند تركيز(0.6 mmol/L)، وباستخدام رسم لاينويفر – برك (Line Weaver – Burk plot) وجد ان قيمة السرعة القصوى V_{max} عند (0.9 U/L) وثابت ميكيلس (K_m 0.195 mmol/L) كما موضح في الشكل [8].



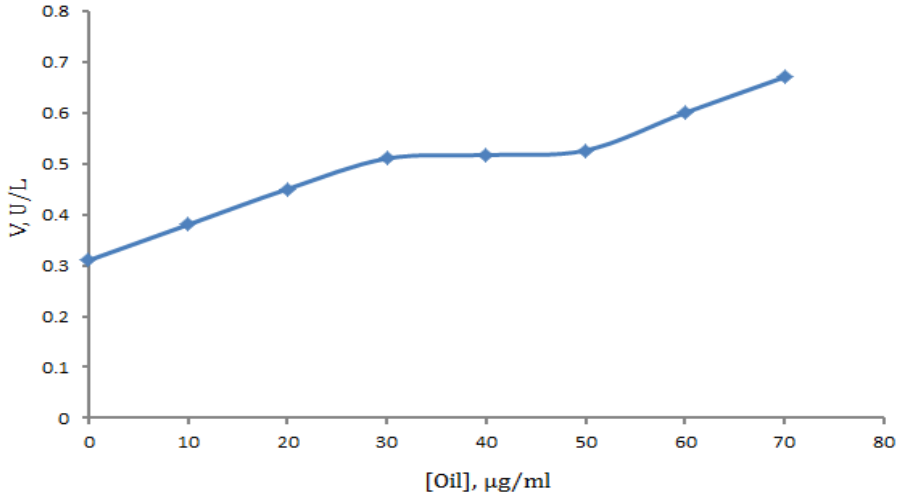
الشكل 7: تأثير تراكيز مختلفة من مادة الأساس على سرعة التفاعل الأنزيمي.



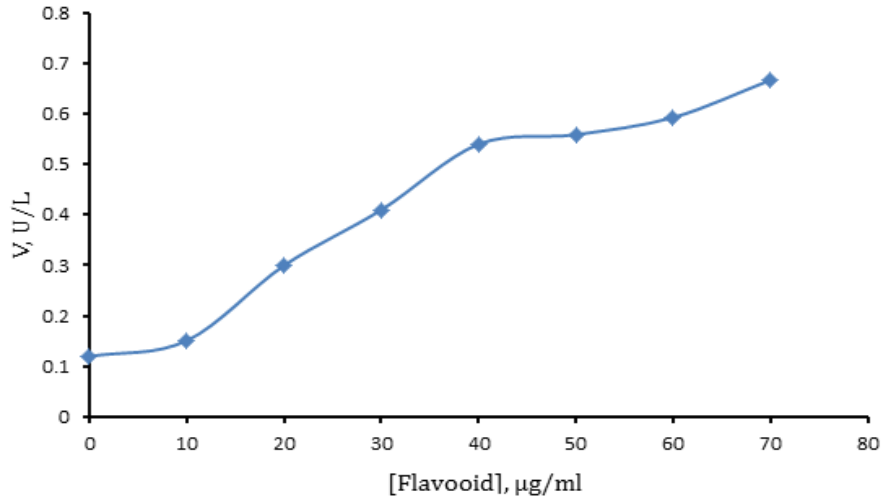
الشكل 8 : رسم لاينويفر – برك لتوضيح قيمتي ثابت ميكيلس والسرعة القصوى لأنزيمي

دراسة تأثير بعض النواتج الطبيعية المعزولة من نبات الكسوب على فعالية أنزيم GPx

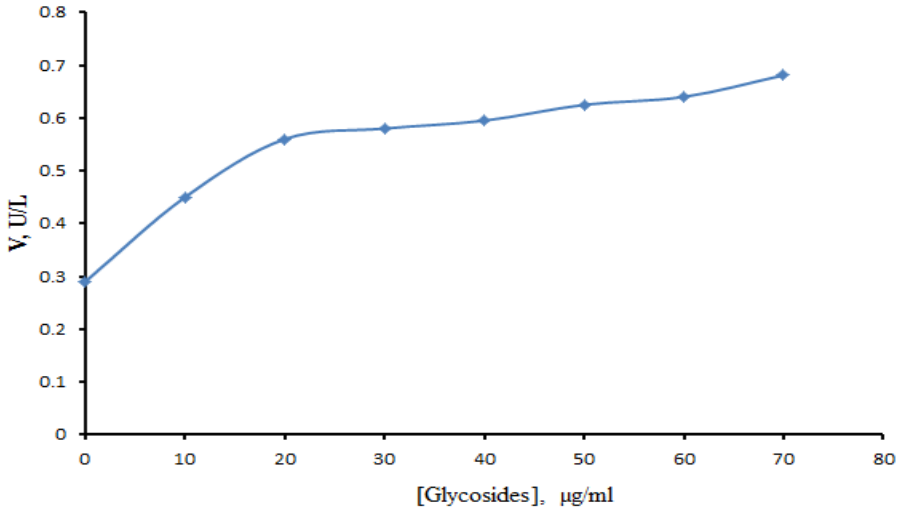
دُرس تأثير النواتج الطبيعية المعزولة من بذور أزهار نبات الكسوب على سرعة التفاعل الأنزيمي *GPx* إذ حُضرت تراكيز مختلفة من الزيت و الفلافونويدات والكلايكوسدات (10-70 µg/ml) ، وبينت النتائج الموضحة في الاشكال 9 و 10 و 11 زيادة سرعة التفاعل الانزيمي *GPx* المنقى جزئيا من مصل الدم عند معاملة هذه النواتج مع محلول التفاعل الانزيمي، وقد يعزى سبب ذلك إلى دور هذه النواتج الطبيعية في تسهيل ارتباط مادة الأساس بالموقع الفعال للأنزيم من خلال زيادة سرعة الارتباط بالموقع الفعال وبالتالي يؤدي إلى زيادة سرعة التفاعل الأنزيمي ومما يشير إلى أن هذه النواتج تعمل مضادات للأكسدة[21] .



الشكل 9 : يوضح تأثير تركيز الزيت على سرعة التفاعل الانزيمي



الشكل 10 : يوضح تأثير تركيز الفلافونويدات على سرعة التفاعل الانزيمي



الشكل 11 : يوضح تأثير تركيز الكلايكوسيدات على سرعة التفاعل الانزيمي

References

1. Sharifa, A. M.(2016). Hemophilia A Genetic Disorder: Diagnosis, Treatment And Prognosis, PP 85-89.
2. Peyvandi, F., Garagiola, I., & Biguzzi, E. (2016). Advances in the treatment of bleeding disorders. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *14*(11), 2095-2106.
3. Melchiorre, D., Linari, S., Manetti, M., Romano, E., Sofi, F., Matucci-Cerinic, M., ... & Castaman, G. (2016). Clinical, instrumental, serological and histological findings suggest that hemophilia B may be less severe than hemophilia A. *Haematologica*, *101*(2), 219-225.
4. Aghvami, T., Djalali, M., Keshavarz, A., Sadeghi, M. R., Zeraati, H., Yeganeh, H. S., & Negahdar, M. (2006). Plasma antioxidant vitamins levels and lipid peroxidation in breast cancer patients. *Iranian Journal of Public Health*, 42-47.
5. Vina, J., Borras, C., Abdelaziz, K. M., Garcia-Valles, R., & Gomez-Cabrera, M. C. (2013). The free radical theory of aging revisited: the cell signaling disruption theory of aging. *Antioxidants & redox signaling*, *19*(8), 779-787.
6. Pizzorno, J. (2014). Glutathione!. *Integrative Medicine: A Clinician's Journal*, *13*(1), 8.
7. Dayal, S., Baumbach, G. L., Arning, E., Bottiglieri, T., Faraci, F. M., & Lentz, S. R. (2017). Deficiency of superoxide dismutase promotes cerebral vascular hypertrophy and vascular dysfunction in hyperhomocysteinemia. *PloS one*, *12*(4).
8. Al-Allaf, F. A., Taher, M. M., Abduljaleel, Z., Bouazzaoui, A., Athar, M., Bogari, N. M., ... & Owaidah, T. M. (2017). Molecular analysis of factor VIII and factor IX genes in hemophilia patients: identification of novel mutations and molecular dynamics studies. *Journal of clinical medicine research*, *9*(4), 317.
9. Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Swanson, A. B., Hafeman, D. G., & Hoekstra, W. G. (1980). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Nutrition Reviews*, *38*(8), 280-283.
10. Annino, J.S. and Gies, R.W.; (1976). Clinical Chemistry. 4thed ., Brown and Co., Boston.
11. Belfield, A., & Goldberg, D. M. (1971). Revised assay for serum phenyl phosphatase activity using 4-amino-antipyrine. *Enzyme*, *12*, 561-573.
12. Clark, J.M.and Switzer,R.L.(1976)."Experimental Biochemistry", 2nd ed .; W.H. Freeman and Company San Francisco.
13. Plummer,T.D. (1978). "An Introdaction of Practical Biochemistry". 2nd ed .; Mcgraw – Hill Book. ; Co . V. K.pp: 48, 52, 174, 270, 274.
14. Zeković, Z. P., Lepojević, Z. D., & Mujić, I. O. (2009). Laurel extracts obtained by steam distillation, supercritical fluid and solvent extraction. *J. Nat. Prod*, *2*, 104-109.
15. Kato, H., Li, W., Koike, M., Wang, Y., & Koike, K. (2010). Phenolic glycosides from Agrimonia pilosa. *Phytochemistry*, *71*(16), 1925-1929.
16. Gülçin, İ., Huyut, Z., Elmastaş, M., & Aboul-Enein, H. Y. (2010). Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry*, *3*(1), 43-53.
17. Abdul-Abass, A., Abud, B. K., & Dawod, M. S. (2005). LIVER DISEASES AND HEPATITIS–B MARKERS IN IRAQI HEMOPHILIC PATIENTS. *AL-TAQANI*, *18*(1), 34-37.
18. Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.and Stryer, L. (2007). "Biochemistry". W.H. *Freeman and Company. New York, USA.pp*: 138, 139, 145, 146.

19. احمد، طارق يونس و الهلالي، لؤي عبد، (2010). "الكيمياء الحياتية" الجزء الأول دار ابن الأثير للطباعة والنشر، موصل/العراق . ص118,224,138,222,179.

20. Robyt, J. F., & White, B. J. (1987). Biochemical techniques, Theory and practice. Wadsworth. *Inc., Belmont, California, USA*.

21. Kajaria, D. K., Gangwar, M., Sharma, A. K., Tripathi, Y. B., Tripathi, J. S., & Tiwari, S. (2012). In vitro antioxidant potential and radical scavenging activity of polyherbal drug Shirishadi. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science*, *1*(3), 225-229

IRAQI Academic Scientific Journals

Samarra Journal of Pure and Applied Science

SJPAS

www.sjpas.com

ISSN:2663-7405

Isolation and purification of glutathione peroxidase from hemophilia patients serum and study effect of some *Carthamus tinctorius* L. (carthamus) secondary metabolites on enzyme activity

Qussay Hazime Yahiya[1*], Nazar Ahmed Najy[1], Mohammed Bahry Hassin[2]

1- Department of Chemistry, College of Science, University of Tikrit , Iraq (qusayaltaee78@gmail.com)

2- Department of Chemistry , College of Science, University of Mosul, Iraq

Article Information

Received: 23/04/2020
Accepted: 15/06/2020

Keywords:

Hemophilia, glutathione peroxidase (GPx), isolation, purification

Abstract

The study was performed measuring the level effectiveness of the Glutathione peroxidase in the serum of Hemophilia patients as well as the separation and purification of this enzyme, as it included 48 samples of serum hemophilia patients of both types (40 samples of type A and 8 of type B), in addition to 50 samples of healthy people only male. The results of this study showed a significant decrease at the probability level P≤ 0.05 of the effectiveness of the Glutathione peroxidase in the serum of hemophilia patients of both types. The Glutathione peroxidase was also separated and purified from the serum of those with hemophilia by precipitation of ammonium sulfate and dialysis, and by using the DEAD - Cellulose exchange chromatography technique where a major protein bundle was relied upon which was used to determine the optimal conditions for the partially purified enzyme. The optimum conditions were determined for the partially purified enzyme from the blood serum and were maximum activity of (GPx) at minute (6), acidic function at pH = 8, enzyme concentration 105 µg/ml, concentration of substrate H_2O_2 0.6 mmol/L temperature(40°C) and that the maximum speed (V_{max}) and the Michaelis constant (K_m) were equal to 0.9µmol/min and 0.195 mmol/Liter, respectively, using a line –weaver plot diagram.