

دراسة كيموحيوية حركية للإنزيم الثايوردوكسين رديكتيز المنقى جزئياً من مصلى الإنسان السليم

لؤي عبد الهلالي ، أميرة احمد حمدون

قسم الكيمياء ، كلية العلوم ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

E-mail: Luayhelaly@yahoo.com

E-mail: Ahmadameera927@yahoo.com

المخلص

تضمن البحث فصل إنزيم الثايوردوكسين رديكتيز من مصلى دم الإنسان باستخدام التقنيات الحياتية المختلفة. إذ تم فصل قمتين بروتينية بتقنية الترشيح الهلامي نوع سيفادكس G-50 وثلاث قمم بروتينية باستخدام سيفادكس G-100 للراسب البروتيني الناتج من عملية الترسيب بكبريتات الامونيوم (65%). وقدر الوزن الجزيئي التقريبي باستخدام تقنية الترشيح الهلامي (G-100) التي كانت بحدود 925 ± 118059 دالتون. ولوحظ ان هناك حزمتين للإنزيم عند استخدام التبادل الأيوني من نوع DEAE- سلبلوز وعند استخدام تقنية الهجرة الكهربائية نوع SDS-PAGE أشارت النتائج الى وجود حزمتين متقاربتين للقيمة الناتجة من عمود الفصل نوع سيفادكس G-100 وحزمة واحدة لكل قمة ناتجة من عملية التبادل الأيوني ذات أوزان جزيئية 58231 ± 490 دالتون.

أظهرت النتائج أن الظروف المثلى للإنزيم المنقى من مصلى الدم يعمل عند تركيز 200 مايكروغرام/ مل باستخدام المحلول المنظم حامض الستريك - Na_2HPO_4 بتركيز 0.4 مول/لتر وعند أس هيدروجيني 7 وزمن تفاعل 25 دقيقة ودرجة حرارة 40 °م. وباستخدام رسم (لاين ويفر- برك) تم إيجاد قيمة السرعة القصوى (V_{max}) وثابت ميكليس (K_m) وكانت مساوية لـ 0.182 مايكرومول/دقيقة و 0.013 مول/لتر على التوالي عند استخدام مادة الأساس 5،5- ثنائي ثايو بس (2- نايترو حامض البنزويك). وأخيراً تم دراسة تأثير بعض المركبات الكيميائية والدوائية على فعالية الإنزيم، وبينت النتائج إن كواندينيوم- هايدروكلورايد مثبط لاتنافسي وبرومو حامض الخليك مثبط غير تنافسي وكبريتات الخارصين مثبط تنافسي عند تراكيز مختلفة من المثبط، ولكن الدكسانامازون يعد منشط للإنزيم.

الكلمات الدالة: فصل، إنزيم، ثايوردوكسين رديكتيز، مثبطات، منشطات.

المقدمة

منها مساهمة Trx في عملية إزالة بيروكسيد الهيدروجين من أوساط عدة وتحوله الى ماء عن طريق إنزيم الثايوردوكسين بيروكسيداز Trx peroxidase وكذلك استخدام Trx المختزل في عملية بناء الـ DNA بمساهمته في تفاعلات إنزيم رابيونوكليوتيد رديكتيز Riboneucleotide reductase فضلاً عن مساهمته مع عوامل الاستنساخ Transcription factor عند عملية استنساخ الجين Gene transcription لأداء مهام مختلفة داخل الجسم [7]. وأثبتت الدراسات بان إنزيم TrxR له دور بارز في عملية اختزال فيتامين C المؤكسد Dehydroascorbic acid وتحوله الى فيتامين C المختزل Ascorbic acid الذي يعد الأخير من مضادات الأكسدة القوية Super antioxidants لأداء وظائف مختلفة [8]. فضلاً عن ذلك فإن إنزيم TrxR يلعب دور مهم في الفسلجة المرضية Pathophysiological للأمراض المزمنة مثل الروماتيزم الرئوي Rheumatoid arthritis, العوز المناعي AIDS وبعض الأورام الخبيثة [9]، وله دور مهم في تنظيم عمليات الأكسدة والاختزال داخل الخلية، نمو الخلية موتها المبرمج [10]. يهدف هذا البحث الى فصل إنزيم TrxR من مصلى الدم باستخدام تقنيات فصل مختلفة ومن ثم دراسته من الناحية صفاته الحركية وظروف عمله المثلى وتأثير بعض المواد الكيميائية والدوائية المختلفة على فعاليته، فضلاً عن استخدام

تعود إنزيمات الثايوردوكسين رديكتيز (E.C.1.8.1.9) (TrxR) الى عائلة الفلافوبروتين-نيكولتيد-بيريدين ثنائي الكبريت وهي إنزيمات أكسدة واختزال تحفز اختزال الثايوردوكسين (Trx) Thioredoxin (ذو وزن جزيئي 12 كيلو دالتون) المعتمد على المرافق الإنزيمي NADPH، افراد هذه العائلة هي دايمرات متجانسة Homodimers كل وحدة فرعية لها مجموعة FAD كمجموعة ترقيعية Prosthetic group، موقع الارتباط الـ NADPH وموقع ثنائي الكبريت في النهاية الامينية وهو الجزء الفعال لعملية الأكسدة والاختزال [1].

شخص ونقي إنزيم TrxR لأول مرة من بكتريا *E. coli* [2] وعزل من النسيج البقري في عام 1977 من قبل الباحث Holmgren [3]، وفي عام 1996 اثبت بأن الإنزيم المنقى من الخلايا السرطانية الغدية الرئوية Lung adenocarcinoma او من خلايا T (T-cells) هو بروتين حاوي على سلفينوم [4]. يعمل إنزيم TrxR على مدى واسع من مواد الأساس [5] أهمها الثايوردوكسين Trx الذي يحافظ عليه الإنزيم بالشكل المختزل وكذلك يعمل على مادة 5،5- ثنائي ثايو بس (2- ثايونيترو حامض البنزويك) (DTNB) (2,5-dithio- nitrobenzoic acid) فضلاً عن كونه يعمل على مواد غير حاوية على الكبريت منها فيتامين C المؤكسد والسلفينيت [6].

يشترك إنزيم TrxR بوصفه مضاداً للأكسدة من خلال اختزاله Trx المؤكسد وتحوله الى الشكل المختزل الفعال ليدخل في تفاعلات عدة

الدكستران الأزرق (Blue dextran) التي حقنت في العمود لغرض تحديد صفات العمود [17] إذ تم حقن العمود بكمية 4 مل من المحلول الناتج من عملية الديليزة (الخطوة رقم 4). وقد ظهرت لدينا حزمتين (A و B) وأعطت الحزمة A أعلى فعالية نوعية للإنزيم (الشكل 1).

6. تقنية التجفيد Lyophilizer

تم تجفيد الحزمة البروتينية التي أظهرت فعالية نوعية عالية لإنزيم TrxR والناتجة من عمود الفصل نوع Sephadex G-50 الى ثلث حجمها، ثم أخذت العينة وحفظت عند درجة حرارة -20 °م حتى يتم تهيئتها للخطوة التالية.

7. كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي باستخدام سيفادكس G-100

استخدم عمود الفصل ذو الأبعاد (2.4 × 85) سم والذي يحتوي على هلام السيفادكس من نوع G-100 (Sephadex G-100). إذ بلغ ارتفاع الهلام في العمود 74 سم بحجم 375 مل، وحدد حجم الروغان للمواد القياسية التي حقنت في العمود لغرض تحديد صفات العمود وإيجاد منحنى قياسي لتحديد الوزن الجزيئي التقريبي (للحزمة البروتينية ذات الفعالية العالية الناتجة من حقن المواد في عمود الفصل والتي حددت حجوم روغانها أيضاً) من خلال رسم العلاقة الخطية بين حجوم روغانها ولوغاريتم أوزانها الجزيئية المعلومة [18].

المواد والمحاليل المستخدمة في عمود الفصل: محلول الفوسفات المنظم ذو أس هيدروجيني 7 وبتريكيرز 0.1M، المحلول البروتيني (للارسب) الناتج من الخطوة رقم 4 (تستخدم في عمود الفصل الأول)، المحلول البروتيني الناتج من الخطوة رقم 6 (تستخدم في عمود الفصل الثاني)، الحامض الأميني التريبتوفان (Trp) لحساب الحجم الداخلي للعمود (V_i)، الدكستران الأزرق Blue dextran لحساب الحجم الخارجي للعمود (V_o) ومواد قياسية مستخدمة لتحديد الوزن الجزيئي لإنزيم TrxR (إنزيم الهكسوكاينيز Hexokinase، إنزيم الفا-اميليز α-amylase، الألبومين مصل البقر Bovine serum albumin (BSA)، الألبومين البيض Egg albumin، البيسين Pepsin، والبابين Papain، الأتسولين

Insulin). حضرت المحاليل القياسية بإذابة 0.1 غرام (من المواد القياسية) في 10 مل من الماء المقطر ومن ثم أجريت عملية حقن المواد القياسية المذكورة آنفاً بحجم 3 مل في عمود الفصل وعلى جدران عمود الفصل تبعها الغسل بالمحلول المنظم pH 7 والذي استخدم أيضاً كمحلول روغان Elution solution. أجريت عملية الجمع من العمود الأول بمعدل جريان 60 مل /ساعة وبفاصل زمني مقداره ثلاث دقائق لكل جزء، أما للعمود الثاني فقد كانت عملية الجمع بمعدل جريان 45 مل/ساعة وبفاصل زمني مقداره 5 دقائق لكل جزء باستخدام جهاز جامع الأجزاء Fraction collector الذي يعمل بنظام الدقائق. تمت متابعة المحتوى البروتيني من خلال قياس الامتصاصية للأجزاء المفصولة بجهاز المطياف (UV-Vis Spectrometer-PD 303UV) عند طول موجي 280 نانومتر. فضلاً عن متابعة فعالية إنزيم TrxR في كل جزء من الأجزاء

الإنزيم المعزول كعلاج وتطبيقه على حيوانات تجارب مصابة بأمراض مختلفة مثل امراض القلب.

المواد وطرائق العمل

تم الحصول على مصل الدم من الاصحاء وكمية 100 مل من مصرف الدم المركزي في محافظة نينوى، بعد التأكد من عدم أصابته بأي أمراض تذكر عن طريق أطباء متخصصين وبعد جمع العينات تم إجراء خطوات التنقية عليه بشكل مباشر وهي كالآتي:

1. ترسيب البروتين بالإزاحة الملحية Protein precipitation by salting out

استخدمت كبريتات الامونيوم الصلبة لترسيب البروتين من المصل بالإزاحة الملحية [11] ودرجة تشبع 65%، بصورة تدرجية مع التحريك المستمر بالمحرك المغناطيسي عند درجة حرارة 4 °م، ومن ثم ترك المحلول مدة 24 ساعة في الثلاجة لتترسب جميع البروتينات.

2. فصل الراسب بالطرد المركزي المبرد Separation of the precipitated protein by cooling centrifuge

بعد الترسيب فصل الراسب عن السائل الرائق بجهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة 9000 x g ولمدة 45 دقيقة، ثم أضيف الى الراسب المفصول اقل كمية من الماء المقطر، وبعد حساب حجم محلول الراسب البروتيني والسائل الرائق الناتج قدرت كمية البروتين بطريقة لوري المحورة [12]، وقيست فعالية إنزيم TrxR في محلول الراسب البروتيني والسائل الرائق باستخدام طريقة الباحثين Holmgren و Bjornstedt [13]. ثم حفظ محلول الراسب البروتيني والسائل الرائق في درجة حرارة -20 °م لحين استخدامه في الخطوات اللاحقة.

4. الفرز الغشائي (الديليزة) Dialysis

أجريت عملية الفرز الغشائي للراسب الناتج من الخطوة (2) باستخدام محلول بيكاربونات الامونيوم (NH₄HCO₃) بتركيز 0.1 m وذلك لتجنب تأثير دونان Donnan effect [14] واستخدمت عملية الفرز الغشائي لإزالة كل البروتينات التي لها أوزان جزيئية اقل من 14000 دالتون وكذلك ايونات ملح كبريتات الامونيوم الناتج من عملية الترسيب. تمت عملية الديليزة عند درجة 4 مئوية مع التحريك بالمحرك المغناطيسي مع ضرورة تبديل محلول بيكاربونات الامونيوم لمدة ثلاث مرات واستمرت العملية لمدة 24 ساعة. وبعد الانتهاء من عملية الفرز الغشائي تم حساب الحجم النهائي للمحلول الناتج وتقدير كمية البروتين بطريقة لوري المحورة إضافة الى تقدير فعالية الإنزيم TrxR ثم حفظ المحلول في درجة -20 °م لحين الاستعمال.

5. كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي باستخدام سيفادكس G-50

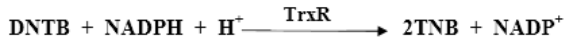
استخدم عمود الفصل ذو الأبعاد (2.4 × 85) سم [15,3] والذي يحتوي على هلام السيفادكس من نوع G-50 (Sephadex G-50) المخصص لفصل المركبات ذات الأوزان الجزيئية لغاية 30 كيلو دالتون [16]. وبلغ ارتفاع الهلام في العمود 76 سم، وحسب الحجم الداخلي للعمود (V_i) (بأستخدام التريبتوفان (Trp)) والحجم الخارجي للعمود (V_o) (بأستخدام

الفرق في الوزن الجزيئي بين المركبات البروتينية المختلفة ضمن النماذج المطبقة [18]. طبقت عملية الهجرة الكهربائية على كل من النموذج والبروتينات القياسية Marker proteins ذات الأوزان الجزيئية المعلومة كمؤشرات لتقدير الوزن الجزيئي التقريبي وبعد التعرف على بقع البروتينات المفصلة، المجهولة والقياسية، أتمت المنحنى القياسي الذي يمثل العلاقة بين لوغاريتم الوزن الجزيئي للبروتينات القياسية المستخدمة والمسافة التي يقطعها كل بروتين للتعرف على الوزن الجزيئي للنماذج المجهولة.

12. قياس فعالية إنزيم TrxR

Determination of TrxR activity

قدرت فعالية إنزيم TrxR باستخدام الطريقة المتبعة من قبل الباحثين Holmgren و Bjornstedt⁽¹³⁾ والتي تعتمد على أختزال مادة الأساس 5,5'-ثنائي ثايو بس (2-نايترو حامض البنزويك) (DTNB) 5,5'-dithio-(2-nitrobenzoic acid) بفعل إنزيم TrxR بوجود مرافق الإنزيم NADPH ليكون 5-ثايو نايترو حامض البنزويك (5-thionitrobenzoic acid) TNB الأصفر اللون والذي يقاس شدة امتصاصه عند 412 نانوميتر [19] (لاحظ المعادلة أدناه)، إذ تعرف وحدة الإنزيم TrxR بأنها عبارة عن كمية الثايورودوكسين رديكتيز التي تحول مايكرومول واحد من DNTB إلى TNB لكل دقيقة لكل مليلتر تحت الظروف المحددة للقياس.



النتائج والمناقشة

بعد نظام الثايورودوكسين (Trx, TrxR, NADPH) من انظمة مضادات الأكسدة ومنظم الأكسدة والاختزال خلال عمل الخلية [20]. عزل إنزيم TrxR من عدة أنسجة في الثدييات إضافة إلى البكتريا. تم في الدراسة الحالية عزل الإنزيم من مصلى الدم، إذ تشير النتائج الموضحة في الجدول (1) إلى الفعالية النوعية للإنزيم ارتفعت خلال عمليات التنقية للراسب الناتج من عملية الترسيب مقارنة بفعالية الإنزيم في المصل كما ارتفعت أكثر بعد عملية الفرز الغشائي وذلك بسبب إزالة المركبات البروتينية ذات الأوزان الجزيئية الصغيرة (التي تقل عن 14000 دالتون [16] وكذلك ازدادت بعد استخدام عمودين من أعمدة الفصل، الأول نوع سيفاديكس G-50 والثاني نوع سيفاديكس G-100 لفصل المركبات ذات الأوزان الجزيئية المختلفة للحصول على نقاوة عالية للإنزيم وصلت (298) مرة. إذ تم الحصول على تلك النقاوة من عملية جمع أعلى القمة للإنزيم ذات الفعالية العالية والكمية القليلة للبروتين وعند استخدام المبادل الأيوني نوع DEAE-cellulose وجد أن هناك حزميتين للإنزيم التي وصلت عدد مرات التنقية للوحدات الفرعية للإنزيم 306 مرة للقمة A و 475 مرة للقمة B.

المفصلة، ومن ثم جمعت الأجزاء البروتينية الحاوية على أعلى فعالية إنزيمية.

8. تقنية التجفيد Lyophilizer

تم تجفيد الحزمة البروتينية الناتجة ذات أعلى فعالية نوعية لإنزيم TrxR من عمود الفصل الثاني (Sephadex G-100)، وبعد الحصول على الإنزيم بهيئة صلبة، وحفظت بدرجة -20 °م لحين استخدامه في الخطوة اللاحقة. إذ تم امراره على عمود التبادل الأيوني ودراسة فعالية الإنزيم لغرض تحديد الظروف المثلى التي يعمل بها وهي تركيز الإنزيم والمحلل المنظم المستخدم ومادة الأساس والأس الهيدروجيني وزمن التفاعل ودرجة حرارة التفاعل.

9. كروماتوغرافيا التبادل الأيوني

Ion exchange chromatography

مرر الإنزيم الناتج من عمود الفصل الثاني بعد عملية التجفيد إلى المبادل الأيوني السالب إذ استخدم في هذه التقنية عمود ذو الإبعاد (3.2 × 40) سم والذي يحتوي على المبادل الأيوني السالب نوع (DEAE-Cellulose) Diethyl amino ethane - cellulose [5] والذي عومل مسبقاً بمحلول قاعدي بحيث تحمل المجاميع الفعالة فيه على أيونات الهيدروكسيل. توضع العينة أعلى الراتنج الموجود في عمود الفصل ثم يمرر المحلول المنظم الملائم خلال العمود إذ تتم عملية فصل المركبات المتباينة الشحنة على مرحلتين، الأولى حدوث عملية امتصاص Adsorption للمواد المشحونة المراد تنقيتها على مادة الفصل، والثانية فصلها وإزالتها عن مادة الفصل للتبادل الأيوني (الراتنج) اعتماداً على شحنتها وذلك عن طريق استخدام محاليل الفوسفات المنظم واس هيدروجيني pH (7) وكانت سرعة جريان المحلول Flow rate (1 مل/دقيقة) متابعة الأجزاء البروتينية المنفصلة بقياس الامتصاصية عند الطول الموجي 280 نانوميتر لمحتوى الأجزاء المترشحة في كل من أنابيب الاختبار باستخدام جهاز المطياف الضوئي (UV-Vis Spectrometer-PD 303UV) وتم الاستدلال على القمة البروتينية الحاوية على إنزيم TrxR من خلال قياس الفعالية الإنزيمية باستخدام طريقة الباحثين Holmgren و Bjornstedt [13] إذ لوحظ أن هناك حزميتين بروتينيتين ناتجتين من عملية التبادل الأيوني.

10. تقنية التجفيد Lyophilizer: بعد جمع الحزم البروتينية الناتجة (القمتين) من عملية التبادل الأيوني جفدت للحصول على الإنزيم بشكله الصلب.

11. تقدير الوزن الجزيئي بتقنية الهجرة الكهربائية

قدر الوزن الجزيئي للقمة الناتجة من سيفادكس G-100 (ذات فعالية نوعية عالية) وكذلك للقمتين الناتجتين من عمود التبادل الأيوني بتطبيق الهجرة الكهربائية نوع Slab-electrophoresis على هلام البولي أكريلاميد بوجود مادة Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) التي تعمل على إحاطة شحنات المجاميع المختلفة ضمن المركبات البروتينية مما يفسح المجال للفصل بصورة رئيسة على أساس

الجدول 1: خطوات تنقية إنزيم Trx-R من مصلى الإنسان السليم

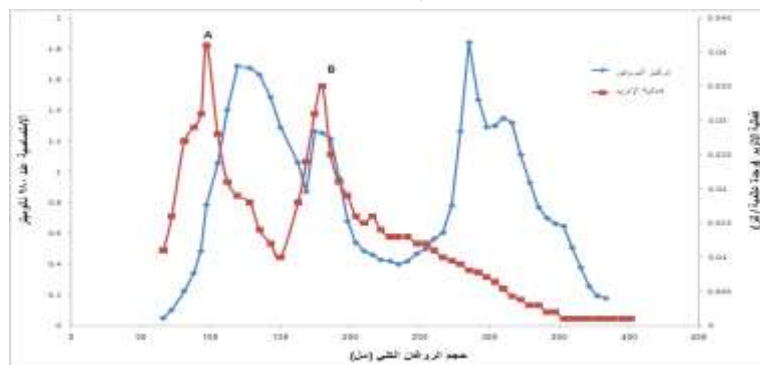
خطوات التنقية	الحجم (مل)	تركيز البروتين الكلي (ملغم/مل)	الفعالية (*وحدة إنزيم/مل) $10X$ ⁵⁻	الفعالية الكلية (وحدة إنزيم) $10X$ ⁵⁻	الفعالية النوعية (وحدة إنزيم/ملغم بروتين)	عدد مرات التنقية	الاستعادة %
مصلى الدم	100	65.17	4.15	415	0.0637	1.0	100
الترسيب بكرياتات الامونيوم 65%	35	43.34	6.89	241.15	0.1589	3	58.1
الراشح	90	6.825	0.288	25.92	0.042	1	6.2
الديلزة للراسب	38	21.93	6.21	235.98	0.283	4	56.9
القيم الناتجة من عمود الفصل الترشح الهلامي Sephadex G-50							
القيمة A	52.5	0.7157	3.40	178.5	4.75	75	43.0
القيمة B	20.8	0.96	3.30	68.64	3.17	50	16.5
القيم الناتجة من عمود الفصل الترشح الهلامي Sephadex G-100							
القيمة A	27.3	0.2214	4.2	114.66	18.97	298	27.6
القيمة B	12.3	1.086	1.6	19.68	1.473	23	4.7
القيمة C	15.3	0.2028	2.45	37.4	12.08	190	9.0
القيم الناتجة من عمود الفصل التبادل الأيوني نوع DEAE - سيليلوز							
القيمة A	25.0	0.12	2.34	58.5	19.5	306	14.1
القيمة B	26.0	0.07	2.12	55.12	30.28	475	13.3

*وحدة الإنزيم: هي عبارة عن كمية Trx-R التي تحول مايكرومول واحد من DNTB الى TNB لكل دقيقة / مليلتر تحت الظروف المحددة للقياس.

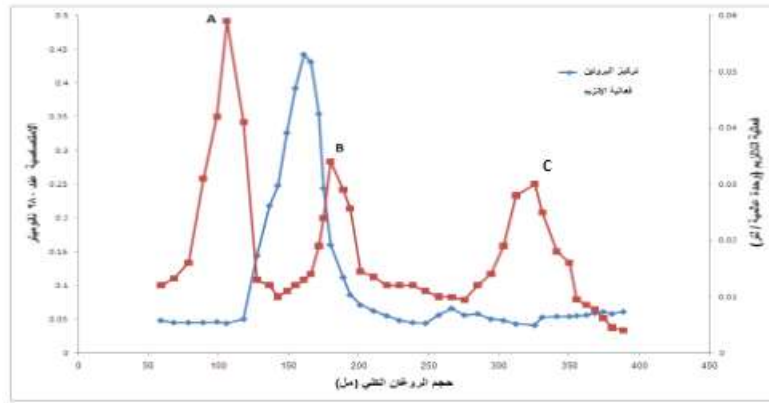
بروتينية وكان حجوم روغان كل قمة 106 مل و 180 مل و 325.5 مل ومن خلال متابعة فعالية الإنزيم وجد أنها تتركز في القمة الأولى (A) (الشكل 2) التي كانت الفعالية النوعية للإنزيم 18.97 وحدة إنزيمية /ملغم بروتين وعدد مرات التنقية 298 مرة مقارنة بالإنزيم الخام والتي استخدمت فيما بعد لتقدير الوزن الجزيئي (الجدول 3). أما الحزمة البروتينية الثانية (الشكل 2 قمة B)) قد تعود الى الوحدات الفرعية للإنزيم الناتجة من عملية التنقية والحزمة البروتينية الثالثة (قمة C) قد تعود الى زيادة فعالية الإنزيم نتيجة تواجد بقايا مادة الثايورودوكسين التي يعمل عليها الإنزيم اذ يعمل الإنزيم بشكل رئيس كنظام ثايورودوكسين Thioredoxin system (Trx, TrxR,) [20] (NADPH).

I- كروماتوغرافيا الترشح الهلامي:

استخدمت هذه التقنية في عملية فصل المركبات البروتينية التي تم الحصول عليها من الترسيب بكرياتات الامونيوم (بعد أن اجري لها عملية الفرز الغشائي). وقد استخدم فيها عمود الفصل الحاوي على هلام نوع Sephadex G-50 ثم بعد ذلك عمود الفصل الحاوي على هلام السيفادكس نوع G-100 وقد لوحظت حزمتين ذات فعالية عالية للإنزيم لعمود الفصل (نوع G-50) (الشكل 1) كان حجوم روغانها 97 مل و 180 مل ووجد ان الإنزيم أعطى أعلى فعالية نوعية تتركز في القمة الأولى (الشكل 1) التي كانت 4.75 وحدة إنزيمية /ملغم بروتين وعدد مرات التنقية 75 مرة مقارنة بالإنزيم الخام (الجدول 1) ، ثم حققت القمة الأولى في العمود الثاني المحتوي على هلام نوع سيفادكس G-100 اذ ان روغان المحاليل البروتينية أعطى ثلاث حزم



الشكل 1: حجوم روغان الحزمة البروتينية لإنزيم TrxR الناتجة من عمود الفصل Sephadex G-50 والعائدة لمصلى الإنسان السليم بواسطة تقنية الترشح الهلامي

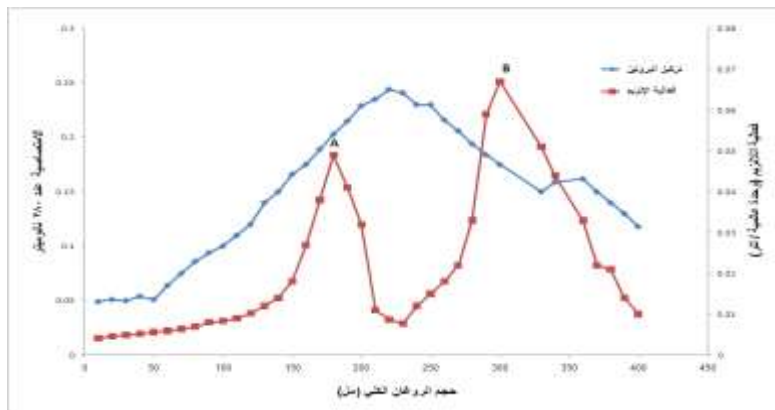


الشكل 2 : حجوم روغان الحزمة البروتينية لإنزيم TrxR الناتجة من عمود الفصل Sephadex G-100 والعائدة لمصل الانسان السليم بواسطة تقنية الترشيح الهلامي

والقمة الثانية B (30.28) وحدة إنزيمية /ملغم وعدد مرات تنقية لهما هي 306 و 475 مرة على التوالي. ان وجود قمتين عند فصل الإنزيم بهذه التقنية إشارة واضحة ان الإنزيم يحتوي على وحدتين فرعيتين كما لاحظ ذلك كل من الباحث Hirt واخرين [21]، إذ تتميز تلك الوحدتين بتقارب الوزن الجزيئي وبحسب نوعية نسيج الكائن الحي المفصول منه الإنزيم [22].

II- تقنية التبادل الأيوني Ion exchange technique :

تم الحصول على قمتين (A و B) عند عملية الفصل بتقنية كروماتوغرافيا التبادل الأيوني السالب نوع DEAE- سليولوز ومحلول الفوسفات المنظم عند اس هيدروجيني 7 عند حجوم روغان 180 مل و 301 مل للإنزيم الناتج من عمود الفصل سيفادكس G-100 إذ لوحظ ان الفعالية النوعية للقمة الاولى A (19.5) وحدة إنزيمية /ملغم



الشكل 3 : المنحنى يبين حجوم روغان الحزمة البروتينية لإنزيم TrxR الناتجة من عمود التبادل الأيوني نوع DEAE-Cellulose والعائدة لمصل الانسان السليم

التي تم إمرارها على عمود الفصل الحاوي على هلام (Sephadex G-50, G-100) مع أوزانها الجزيئية وحجوم روغانها. وعند رسم حجم الروغان لكل مادة مقابل لوغاريتم وزنها الجزيئي ظهر خط مستقيم كما في الشكل (4) والذي حدد من خلاله الوزن الجزيئي التقريبي للإنزيم الذي بلغ 118059 ± 925 دالتون وهي قريبة لما وجدته كل من الباحثين Mustacich و Powis [9] للإنزيم المستخلص من المشيمة والتي بلغت 109.2 كيلو دالتون وكذلك مع ما ذكره الباحث Maggioli واخرين [11] ان الوزن الجزيئي لـ TrxR في الثدييات تتراوح من 114-116 كيلو دالتون.

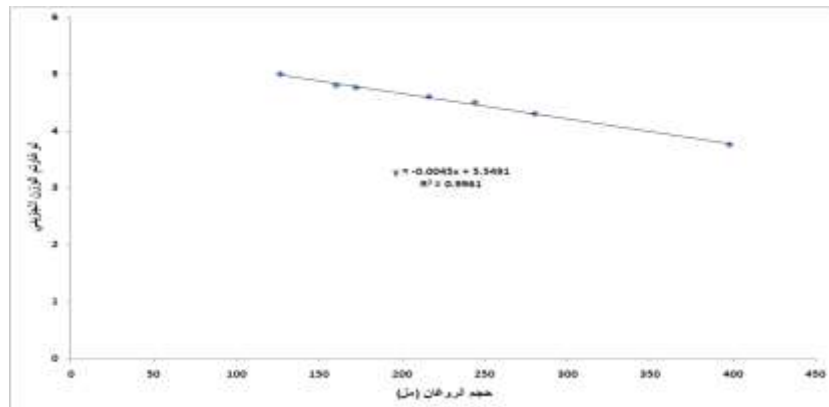
III- تقدير الوزن الجزيئي التقريبي بتقنية الترشيح الهلامي:

قدر الوزن الجزيئي التقريبي للحزمة البروتينية الناتج من عمود الفصل باستخدام تقنية الترشيح الهلامي للعمود Sephadex G-100، إذ أعطى عمود الفصل هذا أعلى فعالية للإنزيم وذات نقاوة وصلت الى (298) مرة لذلك تم استخدامها في تقدير الوزن الجزيئي للإنزيم من خلال إمرار عدد من المركبات معلومة الوزن الجزيئي والتي تتراوح أوزانها الجزيئية بين (204 - 2000000 دالتون) على عمود الفصل لغرض تعيين خواص العمود من حيث الحجم الداخلي (V_i) وكذلك الحجم الخالي أو الفارغ من الحبيبات (V_0) والجدول (3) يبين المواد

الجدول 3: الوزن الجزيئي وحجم الروغان للمواد القياسية المستخدمة في تقنية الترشيح الهلامي باستخدام هلام Sephadex G-100

أسم المادة	الوزن الجزيئي (دالتون)	حجم الروغان (مل)
الدكستران الأزرق Blue dextran (الحجم الخالي V_0)	2000000	99
هيكسو كاينيز Hexo kinase	100000	126
ألبومين مصّل البقر Bovine serum albumin	67000	160
الفا-أميليز α - amylase	58000	172
ألبومين البيض Egg albumin	45000	216
الببسين Pepsin	36000	244
البابين Papain	21000	280
الانسولين Insulin	5750	398
التربتوفان Tryptophan (الحجم الداخلي V_i)	204	437
المجهول (القمة ذات فعالية عالية A)	118059	*106

*أخذت هذه القيمة من الشكل رقم (3) الذي يظهر فيه حجم روغان القمة المفصولة للإنزيم من مصّل الدم بواسطة تقنية الترشيح الهلامي لعمود الفصل G-100.



الشكل 4 : المنحني القياسي لتحديد الوزن الجزيئي بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفصل نوع Sephadex G-100

(SDS-PAGE) الذي كان 60000 دالتون وكذلك مع ما ذكره الباحث Gabriela واخرين [24] بأن الوزن الجزيئي للوحدات الفرعية للإنزيم TrxR في الثدييات من 56000-57000 دالتون. فلقد شخصت إنزيمات الـ TrxR من أصناف مختلفة تختلف في الحجم والتركيب والميكانيكية التحفيزية فالإنزيم من بكتريا *E. coli* [25] وفطريات خميرة الخبز *Saccharomyces cerevisiae* والنباتات [26] لها وزن جزيئي للوحدات الفرعية 35000 دالتون لكل وحدة فرعية، بينما إنزيمات الحقيفة النواة وتشمل الثدييات [4] وديدان اليرداء *Caenorhabditis elegans* [27] وطفيلي الملاريا *Plasmodium falciparum* [28] لها وزن جزيئي 55000-58000 دالتون لكل وحدة فرعية.

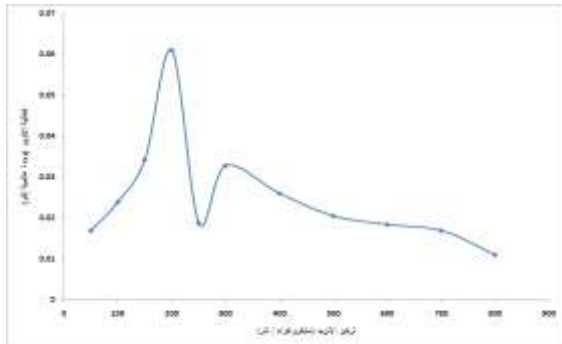
IV- تقدير الوزن الجزيئي بالهجرة الكهربائية :

كما مبين في الشكل 5 فقد تم الحصول على حزم متقاربة بتطبيق تقنية الهجرة الكهربائية وباستخدام (SDS-PAGE) وقد تم التعرف على أوزانها الجزيئية بالاستعانة بالمنحني القياسي المبين في الشكل 6. إذ أشارت نتائج التنقية الى وجود حزمتين متقاربتين لقمة A الناتجة من عمود الفصل نوع سيفادكس G-100 وحزمة واحدة للقمة A وكذلك للقمة B الناتجتين من عملية التبادل الأيوني نوع DEAE-سليولوز، ان ذلك يعطي إشارة واضحة الى أن الإنزيم المنقى من عمود الفصل سيفادكس G-100 يحتوي على وحدتين فرعيتين من النوع المتجانس Homodimers كما أشار ذلك كل من الباحث Zhong واخرين [23,21] ذات أوزان جزيئية متقاربة ولكن عند استخدام القمم الناتجة من عمود التبادل الأيوني لوحظ ان هناك حزمة واحدة فقط لكل قمة ناتجة ولكل قمة لوحظ انها ذات أوزان جزيئية تقريبية 58231 ± 490 دالتون وهذا مقارب لما وجدته الباحث Maggioli واخرين [11] للإنزيم المنقى من *Fasciola hepatica* بواسطة الهجرة الكهربائية

المؤثرة على فعالية الإنزيم المنقى جزئياً وإيجاد الظروف التي يعمل بها الإنزيم.

1. تأثير تركيز الإنزيم

تم تقدير فعالية إنزيم TrxR بوجود تراكيز مختلفة من الإنزيم المنقى جزئياً من مصل دم شخص سليم تتراوح ما بين (50- 800 مايكروغرام/مل) مع توفر المادة الأساس وبين الشكل (7) العلاقة بين فعالية الإنزيم وتركيز البروتين كمصدر للإنزيم بثبوت العوامل الأخرى، إذ يلاحظ ان سرعة التفاعل الإنزيمي تزداد بزيادة تركيز الإنزيم المنقى الى حد 200 مايكروغرام/مل ثم انخفض عند تركيز 250 مايكروغرام/مل وعليه اعتمد التركيز 200 مايكروغرام /مل من الإنزيم في جميع التجارب اللاحقة.



الشكل 7 : تأثير التراكيز المختلفة من البروتين المنقى كمصدر للإنزيم على الفعالية

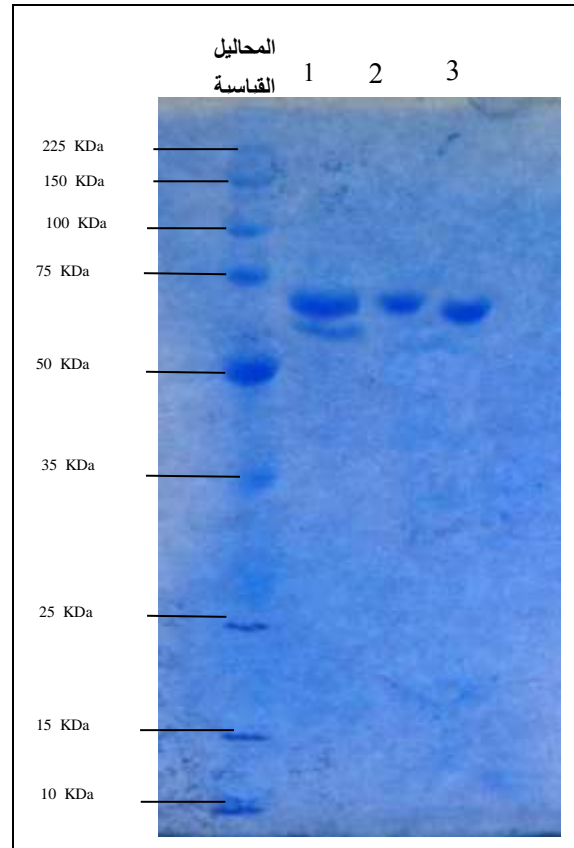
2. تأثير المحلول المنظم

1.2. اختيار نوعية المحلول المنظم: تمت دراسة تأثير المحاليل المنظمة على فعالية إنزيم TrxR بتركيز 1 مول/لتر وأس هيدروجيني 7 فقد استخدم المحاليل المنظمة المختلفة من ايميدازول-HCl وحامض الستريك- Na_2HPO_4 و Tris-HCl، والمحلول المنظم Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 و K_2HPO_4 - KH_2PO_4 إذ بينت النتائج ان أفضل محلول منظم هو محلول حامض الستريك- Na_2HPO_4 حيث أعطى أعلى فعالية للإنزيم (الجدول 4) لذلك تم استخدامه كمحلول منظم في الخطوات اللاحقة.

2. تأثير المحلول المنظم :

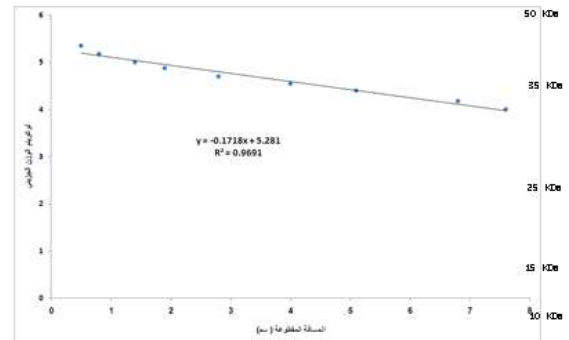
2.2. تركيز المحلول المنظم:

تمتاز المحاليل المنظمة بكونها مقاومة للتغير في تركيز ايون الهيدروجين عند اضافة كميات قليلة من حامض او قاعدة الى المحلول وتعد معرفة تركيز المحلول المنظم ضرورية لقياس فعالية الإنزيمات، وتم استخدام تراكيز مختلفة من المحلول المنظم نوع حامض الستريك - Na_2HPO_4 وبمدى (0.2- 1.6 مول /لتر) وبأس هيدروجيني 7 وبينت النتائج ان أعلى فعالية للإنزيم TrxR كانت عند تركيز (0.4 مول/لتر) من المحلول المنظم وكما مبين في الشكل (8).



الشكل 5 : يوضح عملية الهجرة الكهربية لإنزيم TrxR لعينة سليمة مقارنة مع المحاليل القياسية

عينة رقم 1: تشير الى القمة A الناتجة من عمود الفصل سيفادكس-G-100 ، عينة رقم 2: تشير الى القمة A الناتجة من عمود التبادل الأيوني ، عينة رقم 3: تشير الى القمة B الناتجة من عمود التبادل الأيوني.



الشكل 6 : المنحني القياسي لتحديد الوزن الجزيئي باستخدام تقنية الهجرة الكهربية SDS-PAGE

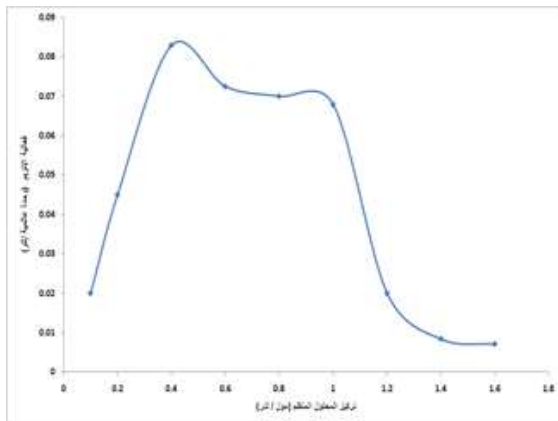
V- دراسة العوامل المؤثرة على فعالية إنزيم TrxR المفصول من مصل الانسان السليم:

تكون التفاعلات التي تحفزها الإنزيمات حساسة للظروف الخارجية مثل كل التفاعلات الكيميائية، وهكذا فان تركيز الإنزيم، المادة الأساس، درجة الحرارة والأس الهيدروجيني pH تؤثر على معدل سرعة التفاعل الإنزيمي لان جميع هذه العوامل تؤثر على الموقع الفعال للإنزيم وتؤثر على تكوين معقد الإنزيم والمادة الأساس [17] ولغرض التعرف على فعالية الإنزيم بصورة دقيقة يكون من الضروري دراسة العوامل

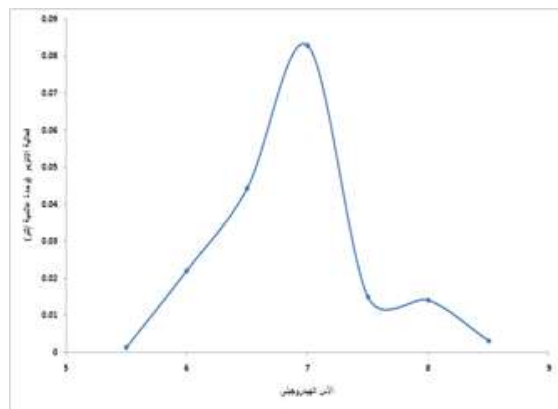
الجدول 4 : تأثير نوعية المحلول المنظم على فعالية إنزيم TrxR

ت	المحلول المنظم (بتركيز 1 مول / لتر واس هيدروجيني 7)	فعالية إنزيم TrxR (وحدة عالمية / لتر)
1	ايميدازول (كلايكلين)-هايدروكلوريك Imidazole(glyoxaline)-HCl	0.0357
2	حامض الستريك-هيدروجين فوسفات ثنائي الصوديوم Citric acid-Na ₂ HPO ₄	0.0679
3	ترس -حامض الهيدروكلوريك Tris-HCl	0.0309
4	فوسفات ثنائي واحادي البوتاسيوم K ₂ HPO ₄ -KH ₂ PO ₄	0.0353
5	فوسفات ثنائي واحادي الصوديوم Na ₂ HPO ₄ -NaH ₂ PO ₄	0.0373

والأسولين كمادة أساس كانت عند 52 و 40 °م على التوالي، وأشار الباحث Gromer واخرين [5] ان مدى درجة الحرارة المستخدم من 40 -5 °م وباستخدام مادة الأساس الثايروردوكسين المؤكسد Trx-S₂ بان إنزيم TrxR المعزول من نسيج الحبل السري البشري يفقد جزء من فعاليته عند درجة حرارة أعلى من 40 °م ويفقد فعاليته تماما عند درجة حرارة 60 °م .



الشكل 8 : تأثير التراكيز المختلفة للمحلول المنظم على فعالية TrxR



الشكل 9 : تأثير الأس الهيدروجيني على فعالية إنزيم TrxR

3.2. الأس الهيدروجيني لمحلول حامض الستريك - Na₂HPO₄ المنظم :

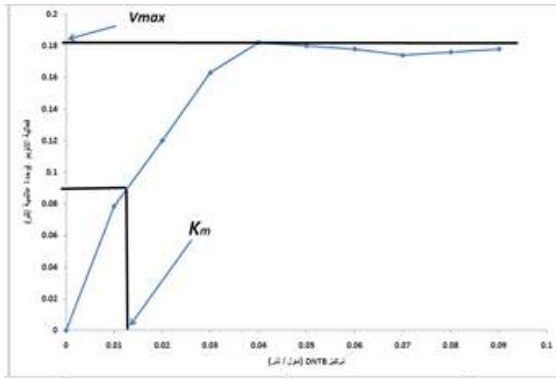
تم تقدير فعالية إنزيم TrxR في محلول حامض الستريك - Na₂HPO₄ المنظم (0.4 مول/لتر) مع تغير الأس الهيدروجيني للمحلول المنظم لغرض ايجاد فعالية الإنزيم المثلى وتشير النتائج الموضحة في الشكل (9) الى ان أعلى فعالية للإنزيم كانت عند اس هيدروجيني 7 وكانت مقاربة لما وجده الباحثين Thressa و Sergey [29] وباستخدام المحلول المنظم Potassium phosphate التي كانت قيمة الاس الهيدروجيني من 6.8-7.2 للإنزيم البشري المعزول من خلايا HeLa بينما كانت الأس الهيدروجيني للإنزيم المستخلص من المشيمة في الإنسان وباستخدام محلول الفوسفات المنظم هي 7.4 [5].

3. تأثير زمن التفاعل :

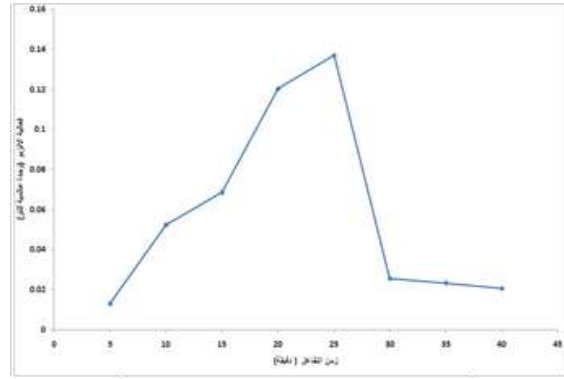
تمت دراسة زمن التفاعل لاختيار الفترة الزمنية المثلى وتشير النتائج الموضحة في الشكل (10) إن أعلى فعالية للإنزيم كانت عند 25 دقيقة بينما وجدها الباحث Xia واخرين [30] 20 دقيقة اما الباحث Larsson [31] وجد ان زمن التفاعل المثلى 30 دقيقة .

4. تأثير درجة الحرارة:

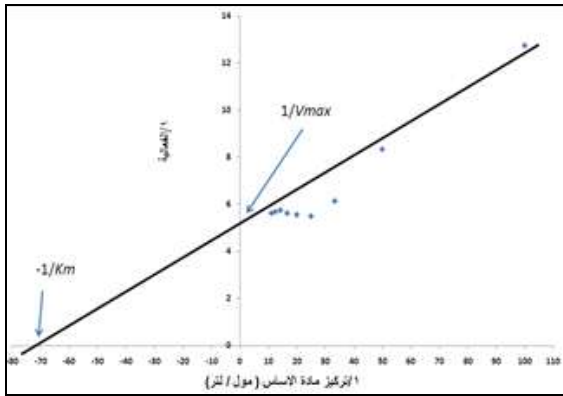
التفاعلات التي تحفزها الإنزيمات تتأثر بدرجات الحرارة ولذلك يلاحظ ازدياد معدل سرعة التفاعل المحفز بالإنزيم كلما ازدادت درجة الحرارة وعند استخدام درجات حرارة اعلى من درجة الحرارة المثلى (وهي درجة الحرارة التي يبدي عندها الإنزيم اعلى فعالية له) يحصل انخفاض في معدل سرعة التفاعل بسبب حصول مسخ في طبيعة الإنزيم نتيجة لتفكك الأواصر الهيدروجينية والقوى الأخرى المسؤولة عن المحافظة على التركيب الثلاثي للبروتين ومن ثم فقدان الفعالية [32] ولذلك تم قياس فعالية إنزيم TrxR في درجات حرارية مختلفة وكما هو موضح في الشكل (11) اذ يلاحظ من الشكل ان الارتفاع التدريجي لدرجة الحرارة يؤدي الى رفع فعالية الإنزيم تدريجيا الى حد 40 °م يحصل بعدها انخفاض في فعالية الإنزيم لذا اعتمدت هذه الدرجة كدرجة الحرارة المثلى للإنزيم في التجارب اللاحقة وهذه الدرجة مقاربة لما وجده الباحث Xia واخرين [30] وهي 37 °م بينما لاحظ الباحث Oblong واخرين [33] ان الدرجة الحرارة المثلى باستخدام DTNB



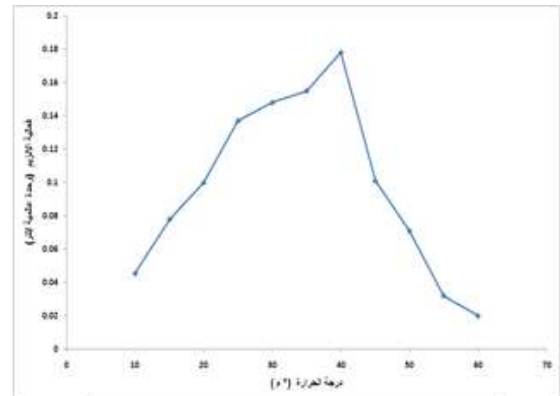
الشكل 12 : تأثير تركيز DNTB على فعالية إنزيم TrxR



الشكل 10 : تأثير زمن التفاعل على فعالية إنزيم TrxR



الشكل 13 : رسم لاينويفر - برك لتحديد قيمتي السرعة القصوى (V_{max}) وثابت ميكليس (K_m) لإنزيم TrxR



الشكل 11 : تأثير درجة الحرارة على فعالية إنزيم TrxR

5. تأثير تركيز المادة الأساس:

يطلق على أعلى سرعة للتفاعل الإنزيمي بالسرعة القصوى (V_{max}) [17] ولمعرفة العلاقة بين الإنزيم الـ TrxR وتركيز المادة الأساس تم قياس فعالية الإنزيم بوجود تراكيز مختلفة من مادة الأساس $5,5$ - dithio bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) والتي تراوحت بين (0.01-0.09 مول/لتر) والشكل (12) يبين ان سرعة التفاعل الإنزيمي تزداد بزيادة تركيز المادة الأساس حتى وصلت الى قيمة توقفت بعدها الزيادة في سرعة التفاعل الإنزيمي وبذلك يمكن تحديد تركيز المادة الأساس اللازمة للوصول الى السرعة القصوى (V_{max}) للتفاعل الإنزيمي وهذا مطابق لما اثبته العالمان مكليس ومنتن اذ أوضحا ان استخدام تراكيز واطئة من مادة الأساس يجعل المواقع الفعالة للإنزيم غير مشبعة بالمادة الأساس لكن عند زيادة تركيز مادة الأساس بشكل كبير تصبح المواقع الفعالة للإنزيم مشبعة بالمادة الأساس اي يتم التوصل الى السرعة القصوى للتفاعل بعد هذا التركيز فان سرعة التفاعل الإنزيمي تكون غير معتمدة على تركيز المادة الأساس [16] ويبين الشكل (12) ان تشبع الإنزيم بالمادة الأساس كان عند تركيز (0.04 مول/لتر) من الـ DTNB وتطبيق علاقة لاينويفر-برك (Lineweaver-Burk plot) وجد ان قيمة السرعة القصوى (V_{max}) وثابت ميكليس (K_m) لإنزيم الـ TrxR كانت مساوية لـ 0.182 مايكرومول/دقيقة و 0.013 ملي مول/لتر على التوالي وكما هو موضح في الشكل (13).

6. تأثير المواد الكيميائية والدوائية المختلفة على فعالية إنزيم TrxR:

يوجد عدد من المركبات التي تعمل على التأثير على فعالية إنزيم TrxR إما أن تقلل من سرعة التفاعل الإنزيمي كما ان لبعضها الآخر لها اثر تشبيطي على الإنزيم من خلال زيادة سرعة التفاعل الإنزيمي وقد تم استخدام عدد من المركبات الكيميائية والعضوية والدوائية لمعرفة تأثيرها على فعالية الإنزيم.

1.6. تأثير المواد الكيميائية :

تم استخدام عدد من المواد الكيميائية المختلفة بتراكيز (0.03, 0.04, 0.05 مول/لتر) لدراسة تأثيرها على فعالية إنزيم TrxR اذ لوحظ ان لكل مادة اثر على فعالية الإنزيم (الجدول 5) وينسب مختلفة حيث لوحظ ان لهذه الأملاح تأثير تشبيطي على فعالية الإنزيم ويمكن تفسير ذلك بان إنزيم TrxR الثدييات يحتوي على مخلفات Residues من الأحماض الامينية السستين والسلينيوسستين في النهاية الكاربوكسيلية في الموقع الفعال للأكسدة والاختزال حيث ان مجموعة الثايول والسيلينيوم تكون بسهولة معقدات مع ايونات المعادن الثقيلة منها Zn^{+2} , Co^{+2} , Mn^{+2} , Hg^{+2} , Cu^{+2} [34] فنقلل من سرعة التفاعل الإنزيمي، اما بالنسبة للسيلينيوم فهو عنصر أساس لفعالية إنزيم TrxR حيث أوضحت الدراسات ان اضافة $1 \mu M$ من السيلينيوم الى وسط خلايا زرعية تزداد فعالية الإنزيم 40 مرة [9] بينما دراسة أخرى على نظام الثايوردوكسين بينت التأثيرات التنشيطية للتركيز العالية من

السلينيوم حيث أوضحت الميكانيكية المحتملة لقلّة الفعالية بان إنزيمات السلينيوم Selenium enzymes تتطلب تكوين صيغة Diselenide المقاومة للاختزال [35].

الجدول 5 : تأثير بعض المركبات الكيميائية على فعالية إنزيم TrxR المفصول من مصّل الدم

النسبة المئوية* للتثبيط (-)	فعالية الإنزيم TrxR (وحدة عالمية/لتر)	تركيز المواد (مول/لتر)	المركبات الكيميائية
-74.83	0.0458	0.03	كبريتات النحاس المائية $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
-75.82	0.044	0.04	
-76.92	0.042	0.05	
-75.55	0.0445	0.03	كلوريد الكوبلت المائي $CoCl_2 \cdot 6H_2O$
-82.41	0.032	0.04	
-83.5	0.03	0.05	
-68.24	0.0578	0.03	كلوريد الكالسيوم اللامائي $CaCl_2$
-68.68	0.057	0.04	
-69.23	0.056	0.05	
-45.6	0.099	0.03	كبريتات الخارصين المائية $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$
-36.26	0.116	0.04	
-27.47	0.132	0.05	
-68.24	0.0578	0.03	سيلينات الصوديوم Na_2SeO_3
-69.23	0.056	0.04	
-63.19	0.067	0.05	
-75.27	0.045	0.03	ميتا زرنيخات الصوديوم $NaAsO_2$
-69.45	0.0556	0.04	
-70.65	0.0534	0.05	

* علما ان الفعالية القياسية للإنزيم قبل التثبيط هي 0.182 وحدة عالمية /لتر .

2.6. تأثير المركبات العضوية:

Nitroso compounds ومركبات الذهب والبلاتين العضوية اذ تؤثر هذه المثبطات على مخلفات الأوكسدة والاختزال الفعالة (السستين، السلنيوسستين) التي تقع في النهاية الكاربوكسيلية [36]. وفي جانب آخر أشار الباحث Oblong واخرين [33] بأنه يمكن ان يحصل مسخ للإنزيم بواسطة الحرارة وكذلك استخدام مادة الكواندينوم HCl- .

تم استخدام عدد من المركبات العضوية بتركيز مختلفة (0.03, 0.04, 0.05 مول/لتر) لدراسة تأثيرها على فعالية إنزيم TrxR حيث لوحظ ان لكل مادة اثر على فعالية الإنزيم (الجدول 6) وينسب مختلفة، حيث بينت الدراسات بان الإنزيم TrxR يثبط تثبيط غير عكسي عند استخدام المواد العضوية الباحثة عن الالكترونات ومنها

جدول 6 : تأثير بعض المركبات العضوية على فعالية إنزيم TrxR المفصول من مصل الدم

المركبات العضوية	تركيز المواد (مول/لتر)	فعالية الإنزيم TrxR (وحدة عالمية/لتر)	*النسبة المئوية للتثبيط (-)
كواندينيوم-هايدروكلورايد Gunidinium-HCl	0.03	0.099	-45.6
	0.04	0.0993	-45.43
	0.05	0.101	-44.5
بارا كلورونايترو بنزين p-chloronitro benzene	0.03	0.0498	-72.63
	0.04	0.0604	-66.81
	0.05	0.0578	-68.24
برومو حامض الخليك Bromoacetic acid	0.03	0.0896	-50.77
	0.04	0.094	-48.35
	0.05	0.0973	-46.53
1_نايتروزو-2- نفثول 1-Nitroso-2-Naphthol	0.03	0.0423	-76.75
	0.04	0.0366	-79.89
	0.05	0.0286	-84.28

* علما بان قيمة الفعالية القياسية للإنزيم قبل التثبيط هي 0.182 وحدة عالمية/لتر .

3.6. تأثير الأدوية (العقاقير) :

وثايوفلين اللامائي Theophyllin anhydrous الذي يعتبر من مجموعة الـ Xanthes ويثبط الناقلات العصبية ويستعمل في علاج الربو [39] والـ Chlorpheniramine-maleate وهو مضاد الهستامين يستعمل لحالات تحسس الجهاز التنفسي العلوي التي تتضمن الجيوب الانفية [40] والـ Diphenhydramine-HCl الذي يستعمل لعلاج التهاب البنكرياس [41] والـ Metoclopramide-HCl يستخدم في الاضطرابات الهضمية لتخفيف ومنع الغثيان والاقياء بعد العمليات الجراحية [42]، كما تم دراسة الدكساميثازون بوصفه منشط للإنزيم وهو دواء ينتمي الى فئة الادوية الهرمونية الستيرويدية وهو مضاد للالتهابات [43] .

تم استخدام عدد من الأدوية النقية التي استحصلت من الشركة العامة لصناعة الادوية، ومن شركة الحكماء لصناعة الادوية والمستلزمات الطبية في محافظة نينوى لمعرفة تأثيرها على فعالية إنزيم TrxR اذ يوضح الجدول النتائج التي تم الحصول عليها باستخدام تراكيز مختلفة من الأدوية (0.03 , 0.04 , 0.05 مول/لتر) مما أعطى نسبا مختلفة لفعالية الإنزيم اذ ان لكل دواء مستخدم له تأثيرات علاجية مختلفة على الجسم فعلى سبيل المثال هناك أدوية تستخدم كمضادات حيوية مثل (السيراميد Ceramide, فلاجيل Flagyl) [37] او منشط للنظام العصبي المركزي ومنشط ابضي مثل الكافانين [38] او مسكن للآلام المختلفة مثل الباراسيتامول وبسيديو فيريدين Psedophedrine [37]

الجدول 7 : تأثير بعض المركبات الدوائية على فعالية إنزيم TrxR المفصول من مصد الدم

الأدوية	تركيز المواد (مول/لتر)	فعالية الإنزيم TrxR (وحدة عالمية/لتر)	*النسبة المئوية للتثبيط (-) او التنشيط (+)
ميترونيدازول Metronidazole	0.03	0.1134	-37.69
	0.04	0.0732	-59.8
	0.05	0.0789	-56.64
ديكساميثازون Dexamethasone	0.03	0.282	+54.9
	0.04	0.297	+63.18
	0.05	0.341	+87.36
باراسيتامول Paracetamol	0.03	0.0564	-69.01
	0.04	0.0538	-70.44
	0.05	0.0524	-71.21
كلورفينيرامين ماليت Chlorpheniramine Malate	0.03	0.179	-1.65
	0.04	0.171	-6.04
	0.05	0.159	-12.64
داي فينهايدرامين - هايدروكلورايد Diphenhydramine-HCl	0.03	0.162	-10.99
	0.04	0.1204	-33.84
	0.05	0.1275	-29.94
الكافئين اللامائي Caffeine anhydrous	0.03	0.1173	-35.55
	0.04	0.1107	-39.17
	0.05	0.1028	-43.51
ثيوفيلين اللامائي Theophylline anhydrous	0.03	0.1125	-38.186
	0.04	0.0785	-56.87
	0.05	0.0622	-65.82
بيسيدوفيدرين Pseudoephedrine	0.03	0.0873	-52.03
	0.04	0.0683	-62.47
	0.05	0.06615	-63.65
سيراميد Ceramide	0.03	0.1142	-37.25
	0.04	0.0781	-57.14
	0.05	0.0622	-65.82

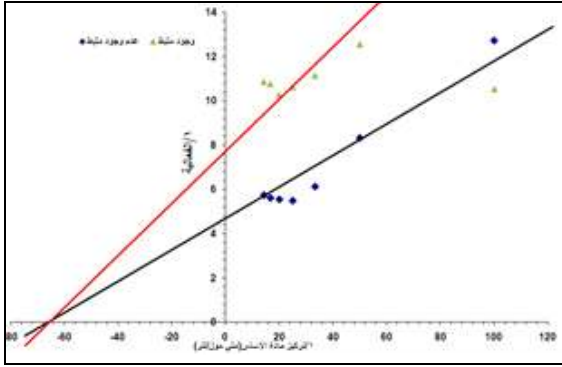
*علا ان قيمة الفعالية القياسية للإنزيم قبل التثبيط هي 0.182 وحدة عالمية/لتر .

inhibitor، ويتميز هذا النوع من التثبيط في إن تركيب المثبط لا يشابه تركيب المادة الأساس ولا يتنافس المثبط مع مادة الأساس للإتحاد مع الموقع الفعال [17]، إذ يرتبط المثبط في هذه الحالة مع المعقد المكون من الإنزيم ومادة الأساس وعند قياس كل من V_{max} و K_m لوحظ انخفاضهما الى قيمتي 0.118 مايكرومول/دقيقة و 0.0095 مول/لتر على التوالي كما موضح في الشكل 15.

7. دراسة نوعية التثبيط لبعض المركبات الكيميائية والدوائية المختارة على فعالية إنزيم TrxR .

1.7. تأثير مادة الكواندينوم-هيدروكلورايد-:

استخدمت تراكيز مختلفة من مادة الكواندينوم-HCl بوصفه مثبط للإنزيم، وجد انه يتفاعل مع الإنزيم ويؤدي الى التقليل من فعالية الإنزيم كلما زاد تركيزه (الشكل 14). وبتطبيق علاقة لاينويفر-برك وجد ان التثبيط هو من النوع اللاتنافسي Uncompetitive



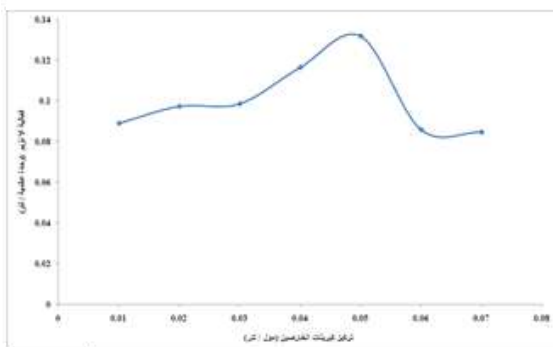
الشكل 17 : رسم لاينويفر- برك عند استخدام مثبط برومو حامض الخليك

3.7. كبريتات الخارصين :

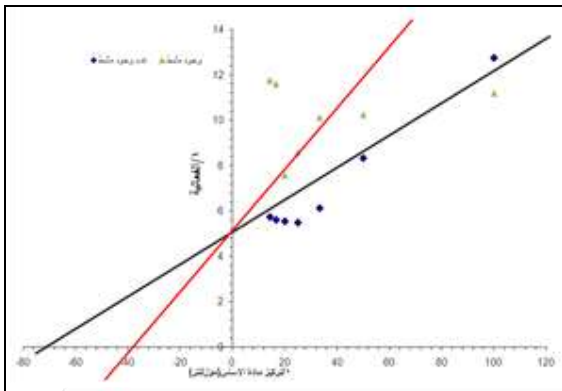
عند استخدام تراكيز مختلفة من كبريتات الخارصين بوصفة مثبطاً للإنزيم وجد انه يتفاعل مع الإنزيم ويؤدي الى تقليل فعاليته وخاصة بعد تركيز 0.05 مول/لتر كلما زاد تركيزه وصولاً الى أعلى انخفاض عند تركيز 0.07 مول/لتر كما هو موضح في الشكل (18).

وباستخدام رسم لاينويفر- برك لإيجاد نوعية عمل التثبيط لكبريتات الخارصين ، أظهرت النتائج ان التثبيط من النوع التنافسي Competitive، ومن مميزات هذا النوع من التثبيط تزداد قيمة K_m التي بلغت 0.026 مول/لتر وبينما تبقى قيمة السرعة القصوى V_{max} ثابتة [16] كما موضح في الشكل 19.

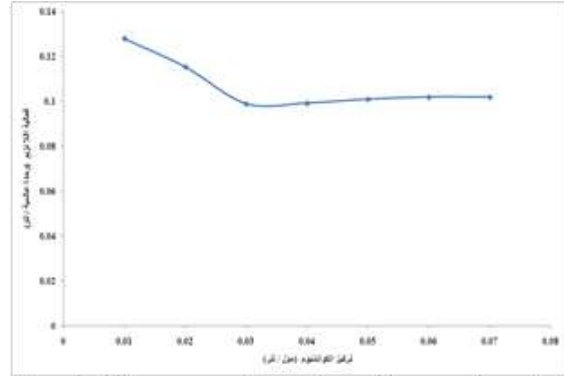
3.7. دكساتامازون:



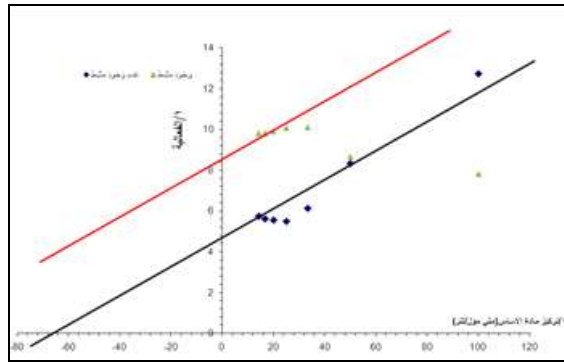
الشكل 18: تأثير تراكيز كبريتات الخارصين على فعالية إنزيم TrxR



الشكل 19 : رسم لاينويفر- برك عند استخدام مثبط كبريتات الخارصين



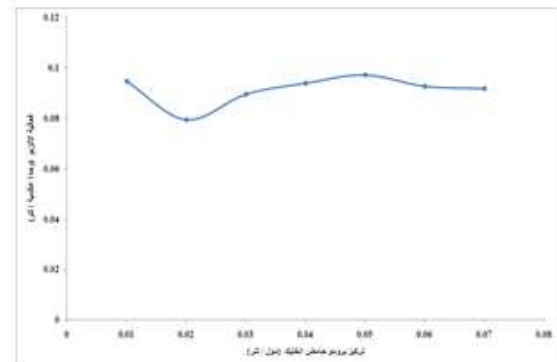
الشكل 14 : تأثير تراكيز كواندينيوم-HCl على فعالية إنزيم TrxR



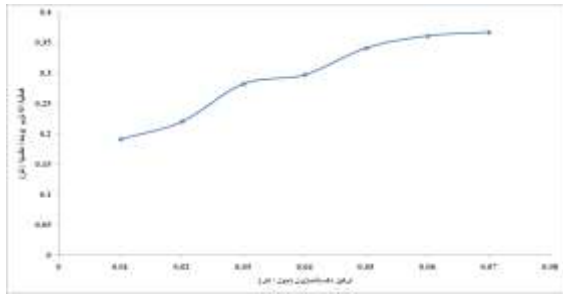
الشكل 15 : رسم لاينويفر- برك عند استخدام مثبط كواندينيوم-HCl

2.7. مادة برومو حامض الخليك :

باستخدام تراكيز مختلفة من مادة برومو حامض الخليك بوصفها مثبطة للإنزيم، وجد انها تتفاعل مع الإنزيم مؤدية الى التقليل من فعالية الإنزيم بزيادة تركيزها (الشكل 16). وعند استخدام رسم لاينويفر- برك لإيجاد نوعية عمل المثبط برومو حامض الخليك وجد ان التثبيط من النوع غير التنافسي Noncompetitive inhibitor، إذ من مميزات هذا النوع من التثبيط بان تركيب المثبط لا يشابه تركيب المادة الأساس وان المثبط يرتبط عادةً مع الإنزيم في موقع آخر غير الموقع الفعال، أي لا يوجد منافسة بين المثبط والمادة الأساس للاتحاد مع الموقع الفعال للإنزيم، لذا فإن زيادة تركيز المادة الأساس لا يلغي تأثير عمل هذا المثبط واذا يلاحظ انخفاض السرعة القصوى V_{max} في هذا النوع من التثبيط والتي بلغت (0.13 مايكرومول/دقيقة) مع بقاء قيمة K_m ثابتة [17] كما هو واضح في الشكل 17.



الشكل 16 : تأثير تراكيز برومو حامض الخليك على فعالية إنزيم TrxR



الشكل 20 : تأثير تراكيز دكسانامازون على فعالية إنزيم TrxR.

لوحظ ان عملية أنتاج الإنزيم TrxR في الجسم تتحفز من خلال تعرض الجسم الى الأشعة فوق البنفسجية وتركيز بيروكسيد الهيدروجين وخلال عملية تحفيز انقسامات الخلية والتي تعطي كميات عالية للإنزيم من اجل الدفاع ضد حالات الكرب التأكسدي التي يمكن ان تظهر وكذلك من اجل تنظيم عمليات نمو الخلايا وموتها Cell growth and cell death [44].

باستخدام تراكيز مختلفة من دكسانامازون لإيجاد تأثيره على فعالية إنزيم TrxR وجد ان لهما تأثيراً منشطاً على فعالية الإنزيم (الشكل 20) فعند زيادة تركيزه يظهر زيادة في فعالية الإنزيم TrxR من خلال تنشيطه للتفاعل بين DNTB والمرافق الإنزيمي NADPH. إذ المنشطات Activators هي جزيئات صغيرة (أما أيونات لاعضوية او مركبات عضوية) تحتاجها بعض الإنزيمات لتحفيزها للعمل وزيادة نشاطها من خلال خفض طاقة تنشيط التفاعل ومن ثم يسهل في إعطاء الناتج النهائي فهذه المنشطات تتحد عادة مع الإنزيم أو مع المادة الأساس لتكون المعقد المنشط - المادة الأساس [17].

المصادر

- 1- Williams, J.S.. "Chemistry and Biochemistry of Flavonezymes" (Muller, F., ed). CRC Press. Baco Raton. 1995; Pp.121,211.
- 2- Orr, M.D. and Vitols, E..A thioredoxin-Thioredoxin reductase system from rat tumor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*,1967; 29, 264-268.
- 3- Holmgren, A. Bovine thioredoxin system. Purification of thioredoxin reductase from calf liver and thymus and studies of its function in disulfide reduction. *J. Biol. Chem.*,1977; 252, 4600-4606.
- 4- Gladyshev, V.N.; Jeang, K.T. and Stadtman, T.C. Selenocysteine, identified as the penultimate C-terminal residue in human T-cell thioredoxin reductase, corresponds to TGA in the human placental gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.*,1996; 93, 6146-6151.
- 5- Gromer, S.; Arcsott, L.D.; Williams, C.H.J. and Schirmer, R.H. Human placenta thioredoxin Reductase. Isolation of the selenoenzymes, steady state kinetics and inhibition by therapeutic gold compounds. *J. Biol. Chem.*, 1998; 273, 20096-20101.
- 6- Gromer, S. and Gross, J.H. Methylseleninate is a substrate rather than an inhibitor of mammalian thioredoxin reductase implication for antitumor effects of selenium. *J. Biol. Chem.*,2002; 277: 9701.
- 7- Hashemy, S.; Ungerstedt, J.; Zahedi Avval, F. and Holmgren, A. Motexafin gadolinium, a tumor-selective drug targeting thioredoxin reductase and ribonucleotide reductase. *J. Biol. Chem.* . 2006; 281 (16): 10691-7.
- 8-Traber, M. G. and Stevens, J. F. Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radic. Biol. Med.*2011; 51(5), 1000-1013.
- 9- Mustacich, D. and Powis, G.Thioredoxin reductase. *Biochem.* 2000;267, 6102.
- 10- Arner, E.S. and Holmgren, A. The thioredoxin system in cancer. *Semin Caner Biol.* 2006; 16(6), 420-6.
- 11- Maggioli, G.;Piacenza,L.; Carambula, B. and Carmona, C. Purification characterization and immunolo calization of a thioredoxin reductase from adult *Fasciola Hepatica*. *J .Paraitol.*,2004; 90(2), 205-211.
- 12- Schacterle, G. R. and Pollack, R. L. A simplified method for the quantitative assay of small amount of protein in biological material. *Anal. Biochem.*1973; 51, 654-655.
- 13- Holmgren, A. and Bjornstedt, M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol.*1995; 252, 199-208.
- 14- Plummer, T.D. An introduction to practical biochemistry. 2nd. Ed., McGraw-Hill Book Comp., 1978; U.K.
- 15- Luthman, M. and Holmgren, A. Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase. Purification and characterization. *Biochemistry*,1982; 21, 6628.
- 16- Murray, R. K.; Bender, D. A.; Botham, K. M.; Kennelly, P. J. and Rodwell, V. W." Harper's Illustrated Biochemistry". 28 ed. The McGraw-Hill Companies,2009; Chapter 8.
- 17- Burtis, C. A.; Ashwood, E. R. and Bruns, D.E. "Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics". By Saunders, an imprint of Elsevier Inc. USA. 2012; pp.356, 368.
- 18- Robyt, F.J. and White, J.B. "Biochemical Techniques, Theory and Practice", books/cole publishing company, Monterey, California;2001.
- 19- Arne'r, E. S.; Zhong, L. A. and Lester, P. Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol.*1999; 300, 226-239.
- 20- Rackham, O.; Sheanwood, A. M.; Thyer,R.;Mc Namara, E.;Davies,SM.; Callus,BA. and Miranda-Vizuete, A. Substrate and inhibitor specificities differ between human cytosolic and mitochondrial thioredoxin reductase : Implication for development

- of specific inhibitors. *Radic .Biol. Med.*2011; 50(6), 689-99.
- 21- Hirt, R.P.; Müller, S. and Embley, T.M. The diversity and evolution of thioredoxin reductase: new perspectives. *Trends Parasitol.*2002;18 (7), 302.
- 22- Bauer, H.; Massey, V.; Arscott, L.D.; Schirmer, R.H. and Ballou, D.P. The mechanism of high Mr thioredoxin reductase from *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.*,2003; 278, 33020.
- 23- Zhong, L.; Elias S. J. A., and Holmgren, A. Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: The active site is a redox-active selenolthiolyselenenylsulfide formed from the conserved cysteine - selenocysteine sequence. *PNAS*, 2000; 97 (11), 5854–5859.
- 24- Gabriela, M.; Lucía, P.; Beatriz C. and Carlos, C. Purification, characterization, and immunolocalization of thioredoxin reductase from adult *fasciola hepatica*. *J. of Parasitolo.*2004; 90(2), 205-211.
- 25- Russel, M. and Model, P. Sequence of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. Relation to other flavoprotein disulfide oxidoreductase, *J. Biol. Chem.*,1988; 263, 9015-9019.
- 26- Chae, H.Z.; Chung, S.J. and Rhee, S.G. Thioredoxin – dependent peroxide reductase from yeast. *J. Biol. Chem*,1994; 269(44), 27670-8.
- 27- Buettner, C.; Harney, J.W. and Berry, M.J. The *caenorhabditis elegans* homologue of thioredoxin reductase contains a selenocysteine insertion sequence (SECIS) element that differ from mammalian SECIS elements but directs selenocysteine incorporation. *J. Biol. Chem.*,1999; 274, 21598-21602.
- 28- Krnajski, Z.; Gilberger, T.W.; Walter, R.D. and Muller, S. The malaria parasite *plasmodium flaciparum* possesses a functional thioredoxin system. *Molecular and Biochemical parasitology.*2001;112 (2), 219-228.
- 29- Sergey, N.G. and Thressa, C.S. Human thioredoxin reductase from HeLa cells: selective alkylation of selenocysteine in the protein inhibits enzyme activity and reduction with NADPH influences affinity to heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci.*,1998; 95, 8520-8525.
- 30- Xia, L.; Nordman, T.; Olsson, J.M. and Damdimopoulos, A. The Mammalian Cytosolic Selenoenzyme Thioredoxin reductase reduce Ubiquinone. *J. Biol. Chem.*, 2003;278(4), 2141-2146.
- 31- Larsson, A. Thioredoxin reductase from rat liver. *Eur. J. Biochem.*,1973; 35, 346.
- 32- Harvey, R. A. and Ferrier, D. R. " Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry" 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins, a Wolters Kluwer business, 2014; China. P.20,
- 33- Oblong, J.E.; Gasdaska, P.Y.; Sherrill, K. and Powis, G. Purification of human thioredoxin reductase: properties and characterization by absorption and circular dichroism spectroscopy. *Biochem.*1993; 32, 7271-7277.
- 34- Tandogan, B. and Ulusu, N.N. Thioredoxin Reductase. *J. Biol and Chem.*,2011;39(1),87-92.
- 35- Ganther, H. Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis.*,1999; 20(9), 1657-1666.
- 36- Nguyen, P.; Awwad, R.T.; Smart, D.D. and Spitz, D.R. Thioredoxin reductase as anovel molecular target for cancer therapy . *Cancer Lett.*2006; 236, 164-174.
- 37- Horak, F.; Zieglmayer, P.; Zieglmayer, R.; Lemell, P.; Yao, R.; Staudinger, H. and Danzig, M. A placebo-controlled study of the nasal decongestant effect of phenylephrine and pseudoephedrine in the Vienna Challenge Chamber". *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* ,2009;102 (2), 116.
- 38- Nehlig, A.; Daval, J. L. and Debry, G. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Research Reviews.*1992; 17 (2), 139 – 170.
- 39- Barnes, P.J. and Pauwels, R.A . Theophylline in the management of a sthma: time for reappraisal. *Eur. Respir J.* 1994; 7,579-591.
- 40- Sagara, I.M.; Ozak, T.; Morioka, E.; Wada, K.; Hondia, K.; Hori, A. and Matsuya, Y. Induced of prolonged continous slow wave sleep by blocking cerebral H1-histamine receptors in rats. *Br. J. Pharmacol.* 2012; 165(1), 167-182.
- 41- You, N.; Tao, K.; Zhao, W.; Bao, P.; Li, R.; You, H. and Zhang, M. Diphenhydramine modulates cytokins and induced apoptosis in experimental acute pancreatitis. *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.* 2010; 32(5), 3011-8.
- 42- Aloorkar, N.H. and Bhatia, M.S. Rapidly disintegrating tabletes of metoclopramide-HCl using novel chemically modified cellulose. *Ars. Pharm.* 2011; 52(3), 26-34.
- 43- Luster, I.; Friedland, I. R.; Jafri, H.S.; Wubbel, L.; Ahmad, A.; Trujillo, M.; McCoig, C.C., and McCracken, G.H. Factors influencing the anti-inflammatory effects of Dexamethasone therapy in experimental pneumococcal meningitis. *J.Antimicrob. Chemotherapy.*,2003; 52, 651-655.
- 44- Nakamura, H.; Nakamura, K. and Yodoi, J. Redox regulation of cellular activation. *Annu. Rev. Immunol.*1997; 15, 351–369.

Biochemical and Kinetic Study for the Partial Purified Thioredoxin Reductase from Healthy Human Serum

Luay A. Al-Helaly , Amera A. Hamdon

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

Abstract

The research included the separation of thioredoxin reductase (TrxR) from human blood serum using different biochemical techniques. Two proteinous peaks had been isolated by gel filtration using sephadex(G-50) and three proteinous peaks isolated from sephadex (G-100) that produced by ammonium sulphate precipitation (65%). The approximately molecular weight of the isolated protein as a source of enzyme using gel filtration chromatography (G-100) was (118059 ± 925) Dalton.

The results showed two peaks of enzyme when using ion exchange-type DEAE-cellulose and when using electrophoresis technique type SDS-PAGE indicated the presence of two bands from peak of separation column type sephadex G-100 and one band of each peak, resulting from the ion exchange process with molecular weights of 58231 ± 490 Dalton.

The results showed that the optimum conditions of purified enzyme from human serum was at $(200 \mu\text{g/ml})$ of protein as a source of the enzyme using (0.4 mol/l) citric acid- Na_2HPO_4 buffer solution at pH (7) act for (25) minutes at (40°C) . Using Line Weaver-Burk plot, the values of maximum velocity (V_{max}) and Michaelis constant (K_m) were found to be $(0.182 \mu\text{mol/ min})$ and (0.013 mol/l) respectively using 5,5'- dithio bis (2-nitrobenzoic acid) (DNTB) as a substrate. Finally, this was, also, involved the study of the effect of some chemicals and drugs on the enzyme activity. The results showed that gundinium - HCl is uncompetitive inhibitor, while bromoacetic acid is noncompetitive inhibitor and zinc sulphate is a competitive inhibitor for the enzyme at different concentrations of inhibitors, but dexathamazone was an activator to the enzyme.

Keywords: Separation, Enzyme, Thioredoxin reductase, Inhibitors, Activators.