مجلة القادسية للعلوم الصرفة المجلد 17 العدد 1 سنة 2012

رعد كاظم المصلح / فاتن فاضل / يسرى كريم **ISSN-1997-4290**

فصل ودراسة متناظرات انزيم الاسيتل كولين استريز الذائب في دماغ البشر السليم والمصاب بالاورام الدبقيه

رعد كاظم المصلح ،* فاتن فاضل القزاز ،يسرى كريم جابر

***الجامعة المستنصرية / كلية العلوم / قسم الكيمياء**

***E-mail: fatin .1964@yahoo.com**

الخلاصه :-

تم استخلاص انزيم الاسيتل كولين استريز AchE الذائب في دماغ البشر السليم بنسبه تقارب (21.08%) من الفعاليات الكليه للانزيم ،ثم اجريت تنقيه جزئيه للانزيم AchE الذائب المستخلص من دماغ البشر السليم بواسطة ملح كبريتات الامونيوم وبنسب تشبع متدرجه الى (80%) ،اذ تم ترسيب الانزيم بنسبة تشبع (50%-30) وبدرجة تنقيه (2.17) . استخدمت الهلام (Sepharose-6B) لفصل انزيم AchE المنقى جزئيه من المرحله السابقه . وقد تم الحصول على متناظرين انزيميين (A,B) وبدرجة تنقيه (19.0)و(24.2) على التوالي ، ثم اجريت تقنية الترحيل الكهربائيه على هلام متعدد الاكريل امايد (7.5%) لانزيم AchE الذائب المستخلص من دماغ البشر المنقى جزئيا وللانزيم الخام المستخلص من الاورام الدبقيه ، اذ انفصلت ثلاث حزم للفعاليه الانزيميه لانزيم AchE الذائب المستخلص من الدماغ السليم بينما انفصلت حزمتان للانزيم الذائب المستخلص من الاورام الدبقيه .

حددت الظروف المثلى للتفاعل والتي تضمنت تركيز الماده الاساس وقيمة الاس الهيدروجيني ودرجة الحرارة المثلى لانزيم AchE الذائب بحالتيه الخام والمنقى جزئيا والمستخلص من دماغ البشر السليم وتبين من خلال مقارنة الصفات الحركيه لمتناظرات الانزيم قبل وبعد التنقيه ان هناك اختلافا واضحا في قيم بعض الصفات الحركيه لمتناظرات الانزيم Vmax وKm والاس الهيدروجيني الامثل مع وجود تقارب في بعض الصفات الاخرى مثل تركيز الماده الاساس الامثل ودرجة الحرارة المثلى .

المقدمة :

ان انزيمات الكولين استريز Cholinestrase enzymes هي مجموعة الانزيمات التي تحلل استرات الاسيل كولين (Acylochline esterase) ويمكن تميز مجموعتين من هذه الانزيمات (1) :

1 – الاستريزات المتخصصه Specific esterase : وتضم انزيم الاسيتل كولين استريز (Acetylcholinesterase ;AchE.3.1.1.7) الذي يعرف بالكولين استريز الحقيقي ، حيث يقوم بتحفيز تحلل الاستيل كولين ; Acetylcholine Ach .

2 _الاستريزات غير المتخصصه Non –specific esterase : وتقوم بتحفيز تحلل استرات الاسيل كولين (Acylcholinesterate) وتضم انزيم البيوتيريل كولين استريز (Butyryl cholinesterase ;BchE.3.1.1.8)ويسمى ايضا بالكولين استريز الكاذب (Pseudo cholinesterase) .

ويمكن التمييز بين انزيم AchE وانزيم BuchE بواسطة الاختلاف في السرعه تفاعلهما مع المواد الاساس (Substrates) ومع المثبطات (2) .يوجد انزيم AchE بكميات كبيرة مرتبطا بالغشاء البلازمي وينتشر بصوره واسعه في مختلف الكائنات الحيه ،اذ يوجد في الجهاز العصبي المركزي والمحيطي للفقريات وانسجة اللافقريات وفي الحيوانات الثديه يوجد في الدماغ والغدة الكظريه وسائل الدماغ الشوكي (3).

يلعب انزيم AchE دورا اساسيا في ايقاف الايعاز العصبي عند المشبكيات المنشطه بالكولين وذلك بتحليله للناقل العصبي الاسيتل كولين Ach .الذي لو تجمع سبب رجفات متتاليه تصيب الاعضاء بالشلل (وكذلك له دور في انتقال الايونات الموجبه وقوة الاغشيه والسيطره على النقل الفعال وغير الفعال خلال العديد من اغشية الاخلايا (4).

يتكون انزيم AchE من اشكال جزيئيه متعدده تبعا للمصدر المستخلص منه الانزيم ، وتتكون هذه الاشكال من تجمع دون الوحدات مع بعضها البعض لتعطي اشكال كروي مختلفه واخرى اشكال غير متماثله ،وعلى هذا الاساس تختلف قيم الوزن الجزيئي للانزيم تبعا للتقنيه المستخدمه لتقديره ، اذ استخدمت تقنيات الترشيح الهلامي ، النبذ الفائق السرعه ، الترحيل الكهربائي على هلام متدرج التركيز والترحيل الكهربائي بوجود(Sodium dodecyl Sulfate) (SDS) لهذا الغرض .

تنشا العديد من اورام الجهاز العصبي داخل النسيج العصبي ذاته ، اي انها اورام عصبيه ظاهرة الاديم (-neuro ectodermal). تضم هذه المجموعه الاورام كافه التي تنشا من الظهاره اللبيه البدائيه وتشمل هذه الخلايا في الجهاز العصبي المركزي الدبق العصبي (الخلايا النجميه والخلايا ضئيلة التشجر وخلايا البطانه العصبيه) والخلاياالعصبيه . ان اغلب الاورام العصبيه ظاهرة الاديم هي من اصل عصبي وتعرف مجتمعه باسم الاورام الدبقيه (Gliomas) (5).ان الكميه الزائدة من انزيمات ChE في الدماغ لها صله بنمو او تكوين الاورام (6)

<u>المواد وطرائق العمل :-</u>

اولا العينات :

تمت الدراسه بجمع ستة نماذج من دماغ الانسان ثلاثة منها لذكور تراوحت اعمارهم بين (61-30) سنه كمجموعة السيطرة (Control) من معهد الطب العدلي والثلاثه الاخرين تراوحت اعمارهم بين (30-12)سنه لمصابين بالاورام الدبقيه (Gliomas)من مستشفى الجملة العصبيه نقلت النماذج الى المختبر خلال (25)دقيقه في محيط ثلجي وغسلت عدة مرات بمحلول السلاين (0.9% NaCl).

ثانيا فصل وتنقية انزيم AchE الذائب المستخلص من دماغ البشر السليم :

أ-استخلاص الانزيم :

استخدمت طريقة ;Rackonezay et al (7) لاستخلاص انزيم AchE الذائب مع تحوير بسيط (طبقت كل الخطوات تحت درجة حراره 4 مئويه) يوزن 15 غرام من الدماغ ويجانس (Homogenized) في 30 مل من محلول فوسفات الصوديوم الدارئ الملحي (P.B.S) ذو الاس الهيدروجيني 7.2بتركيز 12.5 ملي مولار والحاوي على ملح NaCl بتركيز 0.4 مولار ثم يسحق باستخدام الساحق الزجاجي (morto) اليدوي الموجود داخل حمام ثلجي لمدة 15 دقيقة . يفصل المستخلص الانزيمي باستخدام جهاز النبذ المركزي المبرد لمدة ساعه وبسرعه 800rpm يزال الراشح الذي يعد مصدر لانزيم AchE الذائب .

قياس الفعاليه الانزيميه :

استخدمت طريقه ; Ellman et al (8) لقياس فعالية انزيم AchE يوضع 3 مل من محلول فوسفات الصوديوم الدارئ (p H=8،0.1 مولار) في خلية المطياف ثم يضاف 100 مايكروليتر من محلول DTNB (0.01 مولار) ويمزج جيدا ويضاف 20 مايكروليتر من محلول الاسيتل ثايوكولين ايوديد (AschI) (0.075 مولار) ويمزج جيدا ويضاف 50 مايكروليتر من المستخلص الانزيمي ، تقاس امتصاصية المحلول عند طول موجي 412 نانوميتر على مدى 4 دقائق مقابل كفئ الكواشف (Blank solution) المحضر بنفس الخطوات السابقه عدا استبدال المستخلص الانزيمي بحجم مساو من البفر الدارئ .

قياس تركيز البروتين :

تم قياس التركيز البروتيني لمستخلص انزيم AchE الذائب للدماغ البشري السليم باستخدام طريقة لوري المحوره (9).

ب- التجزئه بكبريتات الامونيوم :

استخدمت طريقة (Garfin10)للتجزئه . تطبق كل الخطوات تحت درجة حرارة 4 درجة مئويه ،حيث ياخذ 30مل من المستخلص الانزيمي ويشبع الى 10% باضافة 1.65غم من كبريتات الامونيوم الصلب اضافه بطيئه ويحرك المزيج تحريكا بسيطا لمدة 30 دقيقيه ، بعدها يترك المزيج ليستقر لمدة 30 دقيقه ثم يفصل بستخدام جهاز النبذ المركزي المبرد بسرعة 700rpm لمدة 15دقيقه . يذاب الراسب في 3مل من محلول فوسفات الصوديوم الدارئ (7.2= ،Mm 12.5) ويعدل الاس الهيدروجيني للراشح الى 7.2 باضافة قطرات من محلول هيدروكسيد الامونيوم (0.5M) مع

التحريك البطيئ ويستخدم الراشح لخطوت الترسيب اللاحقه ذات التركيز الاعلى . تعاد هذه العمليه بستخدام نسب التشبع (80-70-60-50-40-30-20)% يتم جمع الاجزاء ذات الفعاليه الانزيميه العاليه وازالة كبريتات الامونيوم منها بواسطة الديلزه Dialysis .

ج- التنقيه بستخدام كروماتوغرافياp H الترشيح الهلامي (11) :

استخدم هلام Sepharose -6B لتنقية AchE الذائب بطريقه كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي ، حيث يضاف 2مل من مستخلص الانزيم الذي تم الحصول عليه من الخطوة السابقه الى سطح العمود (1.2*45cm)بهدوء ويسترد الانزيم بواسطة محلول فوسفات الصوديوم الدارئ (pH=7.2، 2.5 ملي مول) وذلك بجمع الاجزاء المتدفقه من العمود بحجم مقداره 1مل لكل جزء وبسرعه ثابته مقدارها (0.25)مل/دقيقه .تمت متابعه التركيز البروتيني في الاجزاء المسترده باستخدام طريقة لوري المحوره ثم قدرت الفعاليه الانزيميه في الاجزاء المنفصله . فصلت نظائر الانزيم (A,B) وجمعت الاجزاء ذات الفعاليه الانزيميه العاليه سويه واجريت لها عملية الديلزه ومن ثم التجفيف Lyophilization .

د- الترحيل الكهربائي باستخدام هلام متعدد الاكريل امايد (7.5%)(12):

استخدمت هذه الطريقه للاستدلال على مدى نقاوت الانزيم والتعرف على متناظرات انزيم AchE الذائب المستخلص من دماغ البشر السليم ومن دماغ البشر المصاب بالاورام الدبقيه . بعد تحضير الهلام وتثبيته على جهاز الترحيل الكهربائي من نوع LKB2117-Multiple system اجريت عملية الترحيل الكهربائي الاوليه باستخدام الظروف المثبته من قبل الشركه LKB بتسليط جهد مقداره (15) فولت/سم وتيار (50)ملي امبير لمدة 30 دقيقه ، ثم وضع (10)مايكروليتر من محلول الانزيم في كل شق على صفيحه الهلام وسلط جهد مقداره (15)فولت/سم وتيار (20)ملي امبير لمدة (10) دقائق ثم نظم التيار على(50)ملي امبير لمدة ثلاث ساعات .بعد انتهاء عملية الترحيل الكهربائي قطع الهلام الى جزئين لتصبيغ الجزء الاول بصبغه الفعاليه الانزيميه وتصبيغ الجزء الثاني بصبغة البروتين (10).

ثالثا دراسة الخواص الحركيه للانزيم AchE الذائب ونظائره :

أ-تعيين التركيز الامثل من المادة الاساس :

تم تعيين التركيز الامثل من المادة الاساس لانزيم AchE الذائب بحالتيه الخام والمنقى جزئيا باستخدام تراكيز مخلتفه من الاستيل ثايوكولين ايوديد AschI (10-150) ملي مولار.

ب- تعين الاس الهيدروجيني الامثل :

تم تعيين الاس الهيدروجيني الامثل بقياس فعالية الانزيميه لانزيم AchE الذائب بحالتيه الخام والمنقى جزئيا بستخدام سلسله مخلتفه من الاس الهيدروجيني تراوحت بين (6.6-8.6) بفترة فاصله مقدارها (0.2)وبستخدام التركيز الامثل للمادة الاساس (AschI).

ج- تعيين درجة الحرارة المثلى :

لغرض ايجاد درجة الحراره المثلى لتفاعل الانزيم AchE الذائب بحالتيه الخام والمنقى جزئيا تقاس الفعاليه الانزيميه باستخدام درجات حراريه مختلفه تقع ضمن المدى (5-50)درجه مئويه ويستخدم تركيز المادة الاساس الامثل والاس الهيدروجيني الامثل .

د- تعيين قيمة ثابت ميكالس –منتن (Kmax)والسرعة القصوى (Vmax):

تم حساب قيمة ثابت ميكالس –منتن (Kmax)والسرعة القصوى (Vmax) باستخدام منحني لينويفر –بيرك باستخدام تركيز مختلفه من الاسيتل ثايوكولين تتراوح بين (20-90) ملي مولار وباستخدام الكفئ المناسب في كل مرة .

النتائج والمناقشه :-

استخلاص انزيم AchE الذائب :

تم استخلاص انزيم AchE الذائب من دماغ البشر السليم والمصاب بالاورام الدبقيه بطريقة Rakonzay et.al (7). ان نسبة استرداد وفعالية انزيم AchE الذائب المستخلص من الدماغ البشري السليم كانت (21.08%) من الفعاليه الكليه للانزيم وهي قريبه من نسبة استرداد الانزيم من دماغ الارنب (26.32%)و(18.2%)(13,14).

جدول رقم (1)استخلاص وتنقية انزيم AchE الذائب من دماغ البشر السليم

الخطوات	الحجم (ml)	الفعاليه (U*/ml)	الفعاليه الكليه (U*)	تركيز البروتين (mg/ml)	البروتين الكلي (mg)	الفعاليه النوعيه (U/mg)	عدد مرات التنقيه	الاسترجاعيه %
المتجانس	39	344	13416	62.6	2441.4	5.50	1	100
الانزيم الذائب AchE (الخام)	28	101	2828	17.8	498.4	5.67	1.03	21.08
P.P.1*	5	78	390	6.55	32.75	11.91	2.17	2.91
P.P2A*	3	24	72	0.23	0.69	104.35	19	0.54
P.P.2B*	2	24	48	0.18	0.36	133.33	24.2	0.36

(P.P1) (P.P.2A) (P.P.2B)* الانزيم الذائب المنقى جزئيا ب(3)مراحل

التجزئه بواسطة كبريتات الامونيوم :

تشير النتائج التي تم الحصول عليها الى ان انزيم AchE الذائب يترسب عند نسبه تشبع (30-50%) (شكل 1) معطيا فعاليه نوعيه مقداره (11.91U/mg) بدرجة نقاوه (2.17)التي حصل عليها Abdul rasoul (13)، في حين حصلت AL-Garawi (14) على درجة نقاوة (6.71) لانزيم AchE الذائب من دماغ الارنب .

فصل الانزيمات المناظرة لانزيم AchE الذائب من دماغ البشري السليم وتنقيته جزئيا باستخدام تقنية الترشيح الهلامي :

استخدم عمود ترشيح هلامي من نوع Sepharose-6B بابعاد (1.2*36) سم والموازن حيال المحلول الدارئ فوسفات الصوديوم بتركيز (25) ملي مول واس هيدروجيني (7.2) .يظهر شكل(2) انفصال متناظرين انزيميين A,B اذ تنطبق القمه البروتينيه الاولى مع القمه الاولى للفعاليه الانزيميه وبدرجة نقاوة (19) كما تنطبق القمه البروتينيه الثانيه مع القمه الثانيه للفعاليه الانزيميه وبدرجة نقاوة (24.2) .

طبقت تقنيه الترشيح الهلامي من قبل الكثير من الباحثين لتنقية انزيم AchE المستخلص من مصادر مختلفه اذ استخدم Abdul Rasoul (13) هلام Sepharose-4B لتنقية انزيم AchE بشكليه الذائب والمرتبط بالغشاء المستخلص من دماغ الارنب واستخدم Abdul Rehman (15) هلام Sephacryl S-300 في تنقية انزيم AchE المستخلص من طفيليات اللشمانيه دونوفاني حيث انفصل متناظرين انزيمين وبدرجة نقاوه (24.6,13).

الترحيل الكهربائي :

تم اجراء عملية الرحلان الكهربائي للمستخلص الانزيمي لانزيم AchE الذائب (المنقى جزئيا) المنقى من الدماغ البشري السليم ومن الاورام الدبقيه (Gliamsa) بشكله الخام . وقد استخدمت هذه الطريقه في هذا البحث للاغراض التاليه :

1-التعرف على مدى نقاوة الانزيم وعلى عدد المتناظرات الانزيميه لانزيم AchE الذائب المستخلص من الدماغ البشري السليم .

2-دراسة متناظرات انزيم AchE المستخلص من الاورام الدبقيه من خلال مقارنتها مع تلك الموجود في دماغ الانسان السليم .

عند تحليل محتويات انزيم AchE الذائب المنقى جزئيا بواسطة الترشيح الهلامي وكما توضحه صبغة ال Coomassie Brilliant Blue R-20 يلاحظ ان الانزيم انفصل الى اربعة حزم بروتينيه في حين اظهرت صبغة الفعاليه الانزيميه انفصال ثلاث حزم عائدة للانزيم وهذا يدل على وجود ثلاث متناظرات انزيميه شكل (2)، في حين كانت النتائج التي تم الحصول عليها من تقنية الترشيح الهلامي تدل على وجود متناظرين انزيمين (A,B) فقط، ان هذا الاختلاف بعدد الحزم قد يعزى الى ظاهرة التجمع (Aggregation) التي تحدث للانزيم اثناء الخزن بدرجة حراره (20-) درجة مئويه . كما ان عملية التجميد والاذابه المتتاليه للانزيم تؤدي الى ظهور حزم تدعى بحزم الخزن (Storage bands) في عملية الترحيل الكهربائي (1).

تم اجراء عملية اترحيل الكهربائي على المستخلص الانزيمي لانزيم AchE الذائب (الخام) المستخلص من الاورام الدبقيه على هلام متعدد الاكريل امايد بتركيز (7.5%) ولوحظ وجود ثلاث حزم بروتينيه وحزمتين للفعاليه الانزيميه وعند مقارنة هذه النتائج مع تلك التي تم الحصول عليها لانزيم AchE الذائب المستخلص من الدماغ البشري السليم يلاحظ اختفاء احد المتناظرات الانزيميه لانزيم AchE في حالة الاورام الدبقيه .

دراسة الخواص الحركيه لانزيم AchE الذائب المستخلص من الدماغ البشري السليم :

تم دراسة الخواص الحركيه للانزيم بتعيين قيمة التركيز الامثل للمادة الاساس والاس الهيدروجيني الامثل ودرجة الحراره المثلى وحساب قيمة ثابت ميكاليس –منتن والسرعه القصوى من منحني لاينويفر-بيرك (2

جدول (2) الخواص الحركيه لانزيم AchE الذائب الخام والمنقى جزئيا المستخلص من دماغ البشر السليم

الانزيم الذائب	التركيز الامثل من (Mm)[S]	الداله الحامضيه المثلى pH	درجة الحرارة المثلى Ċ	ثابت ميكاليس (Mm)	السرعه القصوى (U*/ml)
Crude	75	7.0,8.2	37	16.54	108.70
*P.P.1	60	7.0,8.0	37	23.24	42.02
*P.P.2A	60	7.6,8.0	37	61.32	14.71
*P.P.2B	40	7.6,8.0	_	22.99	11.57

(P.P1) (P.P.2A) (P.P.2B)* الانزيم الذائب المنقى جزئيا ب(3)مراحل

لقد اشارت الادبيات الى ان التركيز الامثل للمادة الاساس لانزيم AchE الذائب المستخلص من دماغ الارنب بحالتيه الخام والمنقى جزئيا بوساطة كبريتات الامونيوم كان (75.100) ملي مولار على التوالي (14) وهي قريبه من النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسه .في حين كان التركيز الامثل للمادة الاساس لانزيم AchE الذائب والمستخلص من دماغ الارنب (13) بحالتيه الخام والمنقى جزئيا بوساطة كبريتات الامونيوم وكروماتوغرافيا التبادل الايوني (0.6,0.7,0.7) ملي مولار على التوالي وهو مناقض لما تم التوصل اليه في هذا البحث وكذلك النتائج التي تم الوصول اليها من قبل AL-Garawi(14) على الرغم من ان الانزيم تم استخلاصه من المصدر نفسه وهو دماغ الارنب.يسبب تغير الاس

الهيدروجيني تغير في الحاله الايونيه للمركز الفعال في الانزيم او المجاميع التي تشترك في ادامة الهيئه او التركيب الثلاثي الابعاد للانزيم، كما يؤثر على الحاله الايونيه للمادة الاساس(16).

وقد تمت دراسة قيمة الاس الهيدروجيني من (6.6-8.6) على الفعاليه الانزيميه عند تثبيت الظروف المثلى من تركيز المادة الاساس ودرجة الحراره وعينت قيمة الاس الهيدروجيني الامثل للانزيم الخام والمنقى جزئيا جدول رقم (2). اشارت الادبيات الى ان قيمة الاس الهيدروجيني المثلى لانزيم AchE تراوحت مابين (8.0-9.0)(17). ويعتقد ان تاثير الpHيكون على الحاله الايونيه للمجاميع الجانبيه الموجوده في المقر الالوستيري لانزيم AchEوهي الاميدوزول للحامض الاميني الهستدين (PKa=6.5)ومجموعة الهيدروكسيل (OH)للحامض الاميني السيرين (pKb=10.5)(18).

ان وجود قمتين للاس الهيدروجيني الامثل ممكن ان يدل على وجود اكثر من مجموعه ايونيه للمركز الفعال يكون فيها الانزيم نشطا للتاصر مع الماده الاساس (19)

تمت دراسه تاثير درجات حراريه مختلفه من(5-50) درجه مئويه على فعالية انزيم AchE الذائب بحالتيه الخام والمنقى جزئيا بتثبيت الظروف المثلى من الاس الهيدروجيني وتركيز المادة الاساس . لوحظ ان الفعاليه تزداد بزيادة درجة الحراره الى (37) درجه مئويه ، اذ تصل الفعاليه الى اقصى قيمه ، بعدها تبدا الفعاليه بالانخفاض . ان زيادة درجة الحراره تزيد من الطاقه الحركيه للجزيئات المتفاعله نتيجة زيادة عدد التصادمات بين جزيئات المادة الاساس والانزيم ويظهر الانزيم اقصى فعاليه عندما يسمى بالدرجه الحراريه المثلى حيث يكون التركيب الثلاثي قريبا من الحد الادنى للثبات والاستقراريه . ان امتصاص كميه كبيرة من الطاقه من قبل الجزيئات يؤدي الى تحطيم الاواصر عير التساهميه الضعيفه وبالتالي تحطيم التركيب الثلاثي للانزيم وفقدان الفعاليه الانزيميه (19).

تم تعيين قيمة Kmو Vmaxلانزيم AchE الذائب المستخلص من الدماغ البشري السليم باتباع طريقه لاينويفر-بيرك . تطابقت قيمة Km لانزيم AchE الذائب الخام والبالغه (16.5) ملي مولار جدول (2) ، وذكرت بحوث اخرى اجريت على الانزيم المستخلص من دماغ الجرذان ودماغ الارنب ان قيمة Km تبلغ(0.278،0.16) ملي مولار على التوالي (20).

تم تعيين قيم Vmax لانزيم AchE الذائب الخام ومتناظراته المستخلص من دماغ البشري السليم وتراوحت مابين (11.57-108.7)نانومول /مل/دقيقه ،ولقد ذكرت المصادر ان قيم Vmax لمتناظرات الانزيم الثمان المستخلص من دماغ الابقار تراوحت مابين (66.67-427.35) نانومول /مل/دقيقه(21).

المصادر :-

1- John-A. and Paul-L.; "Clinical Enzymonogy".; (1985); pp 1-26; Fied Rich and Associates, Inc., NewYork.

2-Toutant, J. P., Massoulié, J. and Bon, S. (1985), Polymorphism of Pseudocholinesterase in *Torpedo marmorata* Tissues: Comparative Study of the Catalytic and Molecular Properties of this Enzyme with Acetylcholinesterase.J. Neurochemistry., (1985) 44(2). pp . 580-592 Article first published online: 5 OCT 2006

3- Khan-W.A, Dechkovskaia- A.M., and Jones-K.H. .; Toxicolsci.; (2000) pp.112-120.

4- Giberman-E.; Silman-I. And Edery-H.; Effect of cholinesterase inhibitors on active potassium influx in monkey erythrocytes. Biochem. Pharmacol; (1973) ;22;pp. 271-277.

5- كتاب ميورز في علم الامراض الجزء الثالث الطبعه 11(1987) هيئة تحرير الكتاب ح . س .الديوه جي وا. الدباغ وم.ن –العقاد وض.ف.ن- العقاد وض.ف.الموسوي .وزارة التعليم والبحث العلمي ،جامعة بغداد.

/6- Small-D.; Michaelson-S. and Sberna-G.; Non-classical actions of cholinesterases: role in cellular differentiation, tumorigenesis and Alzheimer's disease..Neurochem.- Int.; (1996)May-Jun; 28(5-6);pp. 453-483.

7- Rakonczay- Z., Vincendon-G. and Zanetta-P.; J. Neurochem.; (1981)37; pp. 662-669.

8- Ellman-G., Courtney-K., Anders-V. and Featherstone-R. .; Biochem Pharmacol.; (1961);7; pp. 88-95.

9- Hartree- E.F.;Determination of protein .A modification of the lowry method that gives a linear photometric response.; Analytical. Biochem.; (1972); 48; pp. 422-410- Garfin-D.; "Methods in Enzymology"; (1990); 182; pp. 425-441- Academic press. Inc., NewYork..

11- Jan- C.J. and Lars-R.; "Protein Purification, Principles"", High Resolution, Methods, and Applications. 2"d ed.; (1998); pp.79-142 AJOHN WILEY and SONS, Inc., PUBLICATION; NewYork Singapore.،.

12- David- J.H. and Caroline- H.; Gel electrophoresis of aminotic fluid acetyl cholinesterase Clinica Chimica Acta; (1980); 108; pp .135-141

13- AL- Abdul Rasoul-T.; Ph. D. thesis; (1999); College of Science; AL- Mustansiriya University.

14- AL-Garawi-Z.; M. Sc. Thesis; (1997); College of Science; AL- Mustansiriya University.

15- Abdul-Rehman-S.; M.Sc. Thesis; (1992); College of Science University of Baghdad.

16-Thomas M.Devline(2011).Textbook of biochemistry with clinical correlation;7th.,ed.John Wiley &Sons,Inc.U.S.A.part2 ch.10

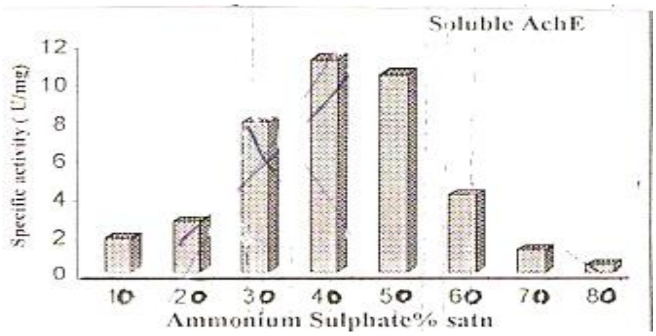
17- Wilson-I.B. and Bergmann-F.;Studies on choline esterase(V11).The active surface derived from effects of pH on inhibitors J.Biol. chem.; (1950); 185; pp. 479 -489.

18- Krupka-R. M.; Chemical structure & function of the active center of acetyl cholinesterase .;Biochem.; (1966); No.5; pp. 1988-1998.

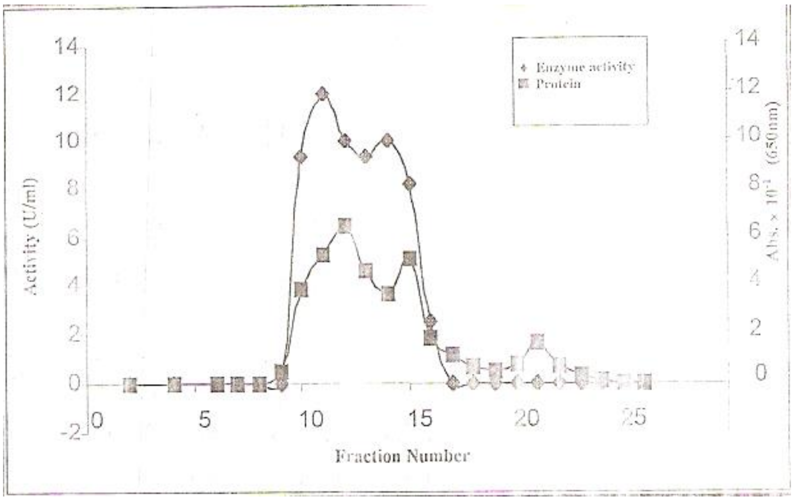
19- essential /Richard A.Harvey &Pamela C.Champe(2008);Biochemistry 4th,ed.,Lippincott Williams &Willikins ,New York,ch.5.

20- Mintz-K. and Brimijoin-S.;Monoclonal antibodies to rabbait brain acetyl cholinesterase .selective enzyme inhibition ,differential affinity for enzyme forms ,and cross –reactivity with other mammalian cholin esterase .J.Neurochem.; (1985) July 45(1) pp. 284-292.

21-J J Oliveira-Silva;S R Alves;A F Inacio;A Meyer;P de N Sarcinelli;R de C Mattos ;M de FA Ferreira;J C Cunha ;J C Moreira (2000) ,Cholinesterase activities determination in frozen blood samples: an improvement to the occupational monitoring in developing countries (Hum Exp Toxicol) March 2000 vol. 19 no. 3 173-177



شكل (1)التجزئه بواسطة كبريتات الامونيوم لانزيم AchE الذائب



شكل (2) تنقية انزيم AchE الذائب المستخلص من دماغ البشري السليم بوساطة الترشيح الهلامي على هلام Sepharose-6B

Separation and Study Isoenzymes of Soluble Acetyl Cholineesterase in Normal Human Brain and Gliomas Tumors

Raad K. M.;* Fatin F. AL-Kazzaz; Yasera K.J.

Al-Mustansiryia Univ.-Collage of Science-Chemistry Dep.

Email: fatin .1964@yahoo.com

Abstract:-

Soluble AchE had extracted from human brain (control)and Gliomas with a percent(21.08)of the total enzyme activity.Ammonium sulphate fractionation of solublel AchE extract from the human brain precipitated at (30-50)%saturattion with fold purification of (2.17).The enzyme was partially purified by Gel filtration chromatography on Sepharose-6Bgel where two peaks was obtained (named A,B) with fold purification(19.00and(24.1)respectively.Polyacrylamide gel(7.5%) electrophoresis revealed three bands of enzymatic activity for partially purified soluble AchE(control human brain),while two bands were separated from crude soluble AchE (Gliomas).The optimum reaction condtions: [s],pH and temperature had been estimated for both individual isoenzymes exhibited significantdifferece in some kinetic prprties including Vmax ,Kmand pH optima, while optimum substrate and temperature were examined without finding any significant difference between the formsbefore and after purification.