P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703
2007 ,(1), (2) :00-00

مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة (JUAPS)

Open Access

دراسة تأثير بعض معقدات الأمينات الاستلينية على فعالية أنزيم الكولين استريز المثبط بمركبات الفسفور العضوية في مصل دم الإنسان

عمر حمد شهاب العبيدي –عبد الهادي رجب الهيتي

قسم الكيمياء-كلية التربية للبنات-جامعة الانبار

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: 2006/9/15
تاريخ القبول: 2007/5/7
تاريخ النشر: 2012 / 06/ 14
DOI: 10.37652/juaps.2007.15371

الكلمات المفتاحية:

معقدات الأمينات الاستلينية ، فعالية أنزيم الكولين استريز، مركبات الفسفور العضوية ، مصل دم الإنسان.

الخلاصة:

تضمن البحث دراسة الفعالية الحيوية لعدد من معقدات الامين الاستلينية المحضرة ودراسة تأثيرها وإمكانية استخدامها في تنشيط أو أعادة تنشيط أنزيم AChE المثبط سابقا في مصل دم الإنسان بواسطة عدد من مركبات الفسفور العضوية المستخدمة كمبيدات فتم دراسة تاثير مركبات الفسفور العضوية المبينة ادناه:

TEP=TriethoxyPhosphinoxide,
TDMAP=Tris (DiMethylAmine)Phosphenoxide

حيث درست تأثيرها كمثبطات على فعالية انزيم AChE وتم تعيين زمن حضانة وتركيز المثبط مع الانزيم لاعطاءه اعلى نسبة مئوية للتثبيط.

وقد اظهرت النتائج المستحصلة من رسم لينويفربرك ان التثبيط يكون غير تنافسي وقد اكدت نتائج حساب النسبة المئوية للتثبيط ان TriethoxyPhosphinoxide لـه قوة تثبيطيه اعلى من Tris (DiMethylAmine) Phosphenoxide.

تم دراسة تأثير معقدات (الزنك، الكادميوم والزئبق) الثنائية التكافؤ لمشتق الامين الاستليني (N-بروبارجيل ببردين) على فعالية انزيم AChE المثبط وقد تبين من خلال تجارب تركيز وزمن حضانة المعقدات مع الانزيم المثبط ان هذه المعقدات تعمل على اعادة تنشيط الانزيم AChE المثبط مسبقا بمركبات الفسفور العضوية.

المقدمة:

إنزيم استايل كولين استريز AChE ذو الرمز (EC.3.1.1.7) توجد في معظم الأنسجة السريعة التهيج سواء كانت الأعصاب أو الجهاز العصبي المركزي أو المحيطي [1] وفي كريات الدم الحمراء [2] أو المشيمة [3] ويختلف إنزيم AChE باختلاف المصدر المستخلص منه سواء كان على مستوى الكائن الحي الواحد أو الأصناف المختلفة.

* Corresponding author at: Department of Chemistry - College of Education for women - University of Anbar, Iraq;
E-mail address:

وقد أشارت الأبحاث الخاصة إلى الأهمية الدوائية للأنزيم حيث أنها تعتبر من الإنزيمات المسؤولة عن تحلل مخدرات الأعصاب والعضلات ذات الطبيعة الاستيرية وكذلك المركبات المستخدمة في التخدير الموضعي مثل السكسنيك كولين الذي يعطى كمخدر في العمليات الجراحية.

أن فعالية أنزيم AChE في الدم (البلازما) تكون بين (43–57%) في المتوسط الطبيعي [4] وهناك علاقة بين فعالية الأنزيم والعمر والجنس وبشكل عام أوضحت الدراسات بان فعالية الأنزيم عند الرجال اكثر منه عند النساء ويمكن تفسير ذلك بسبب الاختلافات الفسيولوجية ما بين الرجال والنساء وكذلك يمكن أن يعزى إلى الاختلافات في حجم العضلات وحجم السوائل خارج وداخل الخلايا عند كل من النساء والرجال [2] كما وجد أن فعالية أنزيم AChE تكون قليلة عند الأطفال حديثي الولادة وان فعالية الأنزيمات تقل خلال الأشهر الثلاث الأولى من الحمل ويستمر هذا النقص حتى إلى الولادة [3] حيث يسترجع الأنزيم المعدل الطبيعي داخل الجسم. كما أوضحت الدراسات وجود علاقة بين فعالية أنزيم AChE

في مصل الدم وبين الأمراض فمن الأمراض التي يرافقها نقصان فعالية الأنزيم:

1- أمراض الكبد: يمكن اعتباره وسيلة تشخيصية لتشمع الكبد[4].

2- الأورام: معدل النقص بالأنزيم حسب حجم العقد الخبيثة [5] خصوصا اللمف والمعدة والجهاز البولي.

3- سوء التغذية: نقصان الفعالية هنا اقل مما في الأورام السرطانية[6].

4- أمراض القلب [7].

5- أمراض الكلية: خصوصا الفشل الكلوي [8].

6- الحروق: نقصان الفعالية يعزى في الأنزيم بسبب زيادة نفاذية بطانة جدران.

7- الانسجة المحطمة بسبب الحروق [9].

أما الأمراض التي يرافقها زيادة الفعالية لأنزيم AChE: الغدة الدرقية[10]، أمراض الكلية المزمنة [11]، السمنة[12]، (أمراض التأخر العقلي ، الكآبة ، انفصام الشخصية ومدمني الكحول) [13].

كما توجد عدد من المركبات التي لها القدرة على الارتباط مع أنزيمات الAChE بصورة عكسية وغير عكسية وبذلك تحجب التحفيز بالأنزيم وتسمى المثبطات ومنها Physostigmine , Neostigmine , Procaine hydrochloride كأمثلة للمثبطات العكسية [14] أما الغير عكسية فهي مركبات الفسفور العضوية والتي تعتبر ذات تأثير تثبيطي كبير ومعظم هذه المركبات يكون استخدامها كمبيدات للآفات الزراعية أو كأدوية [15] . أن العامل الأكثر سمية لمركبات الفسفور العضوية هو استخدامها كأسلحة حرب إذ أن مقدرة مركبات الفسفور العضوية في تثبيط أنزيم AChE يعود إلى إضافة أو إدخال مجموعة فسفور في الموقع النشط لحامض السيرين عند الإنسان BuChE [13]

وتشترك بالتركيب العام المبين بالشكل رقم (1) ومن أمثلتها Di Isopropyl Fluorophosphates و Sarine والتي تنتمي إلى ما يسمى بغازات الاعصاب المستخدمة في الحروب الكيميائية [16] والشكل (2) يوضح آلية تثبيط الأنزيم المثبط بالسارين وإعادة تنشيطه ب 2-PAM (Pyridine-2-aldoxine Methoidix)

طريقة العمل:

1- تم إذابة مركبات الفسفور تحت الدراسة TEP (Mwt=182.16)، TDMAP (Mwt=179.20) في محلول منظم صوديوم فوسفيت وتم تحضير المحلول القياسي لكل مركب وتعيين فعالية أنزيم الكولين استريز في مصل دم الإنسان باستخدام طريقة (WHO) المحورة [5] وكما يلي:

تم وضع (2.25) مل من المحلول المنظم (PH=7.2-7.4) في أنبوبة اختبار وإضافة (50) µL من محلول DTNB و 10 µL من مصل الدم مزجت ثم سحب 2 مل من المزيج أعلاه ووضع في خلية ثم أضيف 34 µL من المادة الأساس ASCHI تم قراءة التغيير في شدة الامتصاص للأنزيم قبل وبعد إضافة المادة الأساس عند طول موجي (430 nm) لكل ثلاث دقائق.

2-لم يتم دراسة تأثير المركبات (TDMAP،TEP) سابقا على الأنزيم في مصل دم الإنسان لذا تم دراسته هنا بالتفصيل ودراسة تأثير المثبطات على أنزيم AChE لمعرفة التركيز الامثل ($2x\ 10^{-5}M$) للتثبيط واستعمل هذا التركيز لمعرفة فترة الحضن المثلى للمثبط وكانت (25 min).

3-تم اختيار ثلاث معقدات بعناية لمعرفة قدرتها على تنشيط وإعادة تنشيط الأنزيم المثبط مسبقا حيث تم إذابة المعقدات (I,II,III) في مذيب DMSO وتم عمل محلول قياسي لكل مركب وإضافة مختلف الأحجام لهذه المحاليل المحضرة إلى المزيج القياسي تم تعيين الفعالية كما في الفقرة (1) أعلاه واستعملDMSO كمحلول سيطرة وقد جرى تعيين ثلاث مكررات لكل تركيز أعلاه

النتائج والمناقشة:

ويذكر أن هناك دراسات عديدة افترضت لسنوات [17,16] أهمية العناصر الانتقالية في تثبيط أو أعادة تنشيط أنزيم AChE . تم قياس الفعالية الأنزيمية لأنزيم AChE الموجود في مصل دم الإنسان serm مختبريا (in vitro) لنماذج مختلفة في الرجال والنساء وقد تراوحت الفعالية بين (1.04 ± 8 -0.16 ±4.41) (µMol /3Min/Ml) وهذه القيم معدل الفعالية لانزيم AChE في مصل دم الإنسان للرجال والنساء في العراق [6] كما تم تعيين الفعالية النوعية لأنزيم AChE وتم اختبار المركبات التالية TDAP،TEP والمبينة في الشكل رقم (3) . وتم دراسة تأثيرها على أنزيم AChE الموجود في مصل دم الإنسان وأظهرت تأثيرا مثبطا على الأنزيم وكانت النسبة المئوية للمثبط عند

استخدام تركيز ($3x10^{-3}M$) لهذه المركبات وكما موضح في الجدول (1) حيث زاد من النسبة المئوية للتثبيط (96–98%).

كما تم دراسة نوع التثبيط باستخدام تركيزين من المادة المثبطة للمركبين المذكورة أنفا إما تركيز المادة الأساس فتتراوح بين (0.1-0.01 M) من رسم لينويفربرك والذي بين أن المادة المثبطة للأنزيم هو غير تنافسي (Non-Competitive) وكما موضح في الشكل (4) وتم تثبيت قيم Vmap, Ki في الرسوم البيانية وقيمها في الجدول (2).

ولإعادة تنشيط الإنزيم AChE تم استخدام ثلاث من معقدات الامينات الاستلينية والمبينة ادناه في الشكل رقم (5)

لإعادة تنشيط أنزيم AChE المثبط بمركبات الفسفور العضوية (TDAP،TEP) المدروسة أعلاه وتم أجراء جميع التجارب في الشروط المثالية وتم حساب الوقت المثالي للحضن والتركيز المثالي لإعادة التنشيط بعد تثبيط أنزيم AChE لنماذج السيرم لمركبات الفسفور العضوية المشار إليها والمبين نسبها في الجدول (2) ، ثم أعادة حضن الأنزيم المثبط مع المركبات (I,II,III) لفترات مختلفة وبتركيز ($1x10^{-}$ ^{3}M) وبوقت مثالي (25Min) كما مبين في الجدول (3) ، أعطت هذه المركبات إعادة تنشيط تصل نسبها (94.3%,94.86%,98.2%) على التوالي كما في الجدول (4) .

أن عمل هذه المعقدات كمصدر لإعادة التنشيط بصورة رئيسية إلى قابلية المعقدات هذه على زيادة العدد ألتناسقي لها بتكوين أواصر تناسقية جديدة مع جزيئات المثبط بعد كسر الآصرة الهيدروجينية بين الجزيئات والأنزيم في معقد (أنزيم–المثبط) ثم يتحرر الأنزيم طبقا للميكانيكية المقترحة في الشكل رقم(6).

REFERENCES:

[1]D. Nachmansohn, J. Biochem., 137, 877(1966).

[2]B.Mendel, H.Rudney, J. Biochem., 37,59(1943).

[3]M.G.Ord,R.H.Thompson, J. Biochem., 46,346 (1950).

[4] S.Callawau,D.R.Davies and J.P.Rutland,British Med.Journal,11,812(1951).

[5]P.Kaniaris,A.Fassoulki,K.Liarmakopolou and I. Dermitzaks Ansthesia. and Analgesia, 58, 84 (1979).

[6] Umeki, J. Nerv.and Mental Dieseas, 176,503 (1993).

[7] M. Feber, Acta. Med., 114, 59(1943).

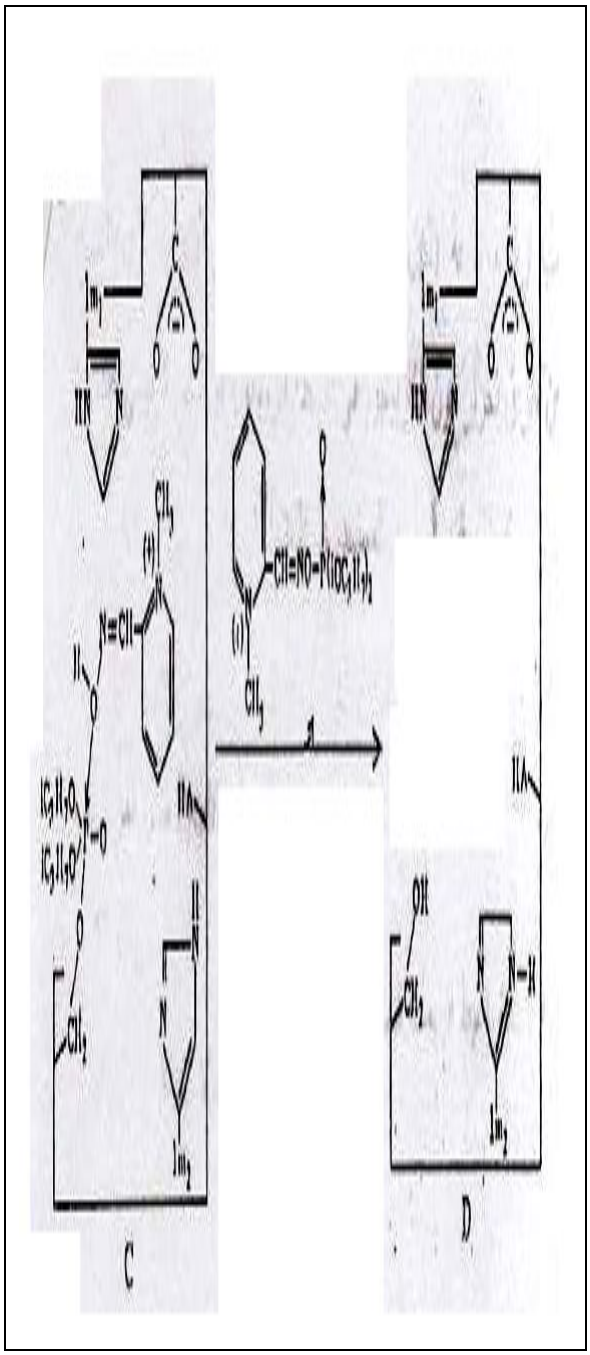
[8] B.J. Phillipsand .M. Hunter, British J. of Anaesthsia ,68, 492 (1997).

[9]J. Mogensen, H.K. Hanel, F. Hansen, B. Sorensen and J. Graae, Acta Anaesthesiologica, 69,195 (1975).

[10] J.C. Thompson, M. Whittaker, J.of Clinical Pathalogy,18,811(1966).

[11] H.G. Kunkes, S.m. Ward, J.of Expermental Medicine, 86,325(1947).

[12] M. Cucuianu, Clinical Chemica Acta, 22,151 (1965).



شكل رقم (2): يوضح آلية تثبيط الأنزيم المثبط بالسارين وإعادة تنشيطه بـ2-PAM (Pyridine-2-aldoxine (Methoidix

[13] L. Rose, D.A. Daries and H. Lehmann, Lancet, 229,563 (1965).

[14] D.F. Doerge, Wilson and Gisvoids "Text Book of Organic Medical and Pharmaceutical Chemistry" 8thed, J.B. Lippincott. Company, London, pp,433-467 (1982).

[15]L.S. Goodman, A.G. Gliman, "The Pharmcological Basisof Therapeutics", 7thed, Macmilla. 4b. Comp., Newyork. p.p, 130 (1985).

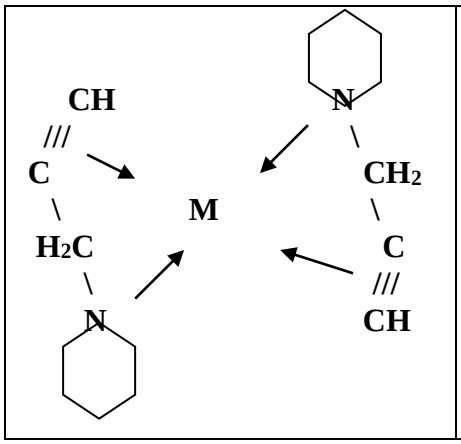
[16] J.K. Marquis, Ph.D. Dissertation, Burlington, VT (1973).

[17].K. Marquis, J. Neurchem., 27,329 (1976).

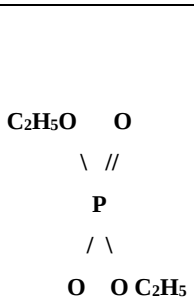
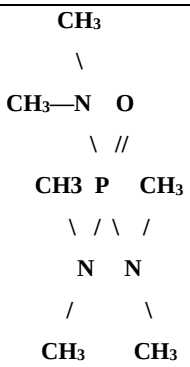
R—O O \ // P / \ R□′—O X	R—O O \ // P / \ R□′ X
X=F,CN R□′,R = مجاميع الكيل	

شكل رقم (1): التركيب العام لمركبات الفسفور العضوي

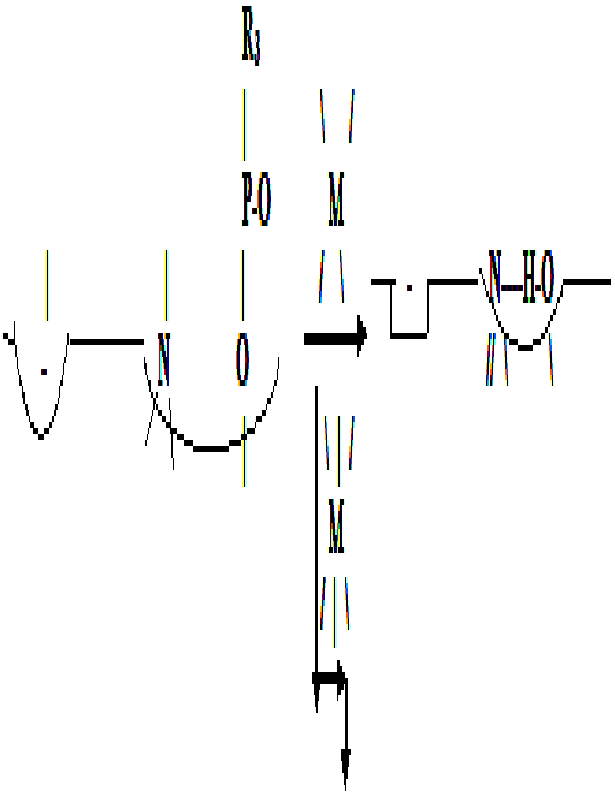
P- ISSN 1991-8941 , E-ISSN 2706-6703 (*JUAPS*) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2007 ,(1), (2) :110-117

	M =[(Zn =I) (Cd =II) , (Hg =III)]

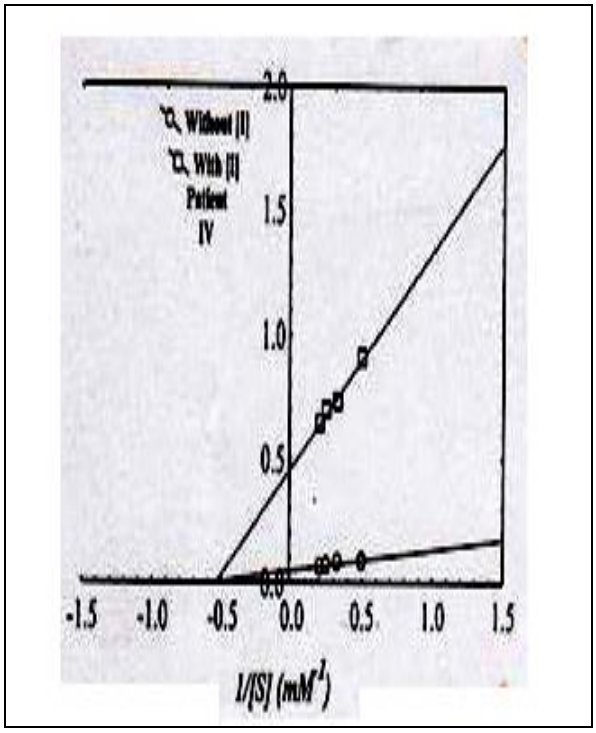
شكل رقم (5): معقدات الامينات الاستلينية

	
TEP=TriEthoxyPhosphinoxide $(C_2H_5O)_3PO$	TDMAP=Tris(DiMethyl Amine)Phosphenoxide

شكل رقم (3)



شكل رقم (6) ميكانيكية المقترحة لمركبات الفسفور العضوية المستخدمة لتثبيط أنزيم AChE (TDAP،TEP)



شكل رقم (4): رسم لينويفربرك (Linweaver -Burk) والذي بين أن المادة المثبطة للأنزيم هو غير تنافسي (Non-Competitive) .

Table (1): the effect of different concentrations of TEP and TDAMP on the activity of ACHE.

Inhibitor Concentration M	Activity of inhibited Enz. U/ml	Inh.%	Activity Recovery%
TEP			
0	0.732	0	100
$1x10^{-4}$	0.201	97.25	2.74
$5x10^{-4}$	0.192	97.37	2.622
$1x10^{-3}$	0.173	98.3	1.7
TDAMP			
0	0.56	0	100
$1x10^{-4}$	0.211	96.3	3.7
$5x10^{-4}$	0.182	96.5	3.5
$1x10^{-3}$	0.169	97.3	2.7

Table (3): effect of Incubation of TEP and TDAMP on the activity of ACHE.

Incubation Time (min.)	Activity Free Enz. Act. U/ml	Inhibition			
		TEP		TDAMP	
		Activation Inh. U/ml	Inh.%	Activation Inh. U/ml	Inh.%
10	5.20	0.522	89.96	0.534	89.73
15	5.02	0.51	90.03	0.512	90.15
20	4.98	0.492	90.12	0.499	89.97
25	4.03	0.31	90.57	0.39	90.32
30	4.61	0.51	88.93	0.49	89.37

Table(2): Kinetic Parameter of the Inhibited ACHE using Line weaver-Burk Plot

Type of Inhibition	Vmapp (U/ml)	Ki (M)
TEP	0.463	2.05x10-5
TDAMP	0.512	3.17x10-5

Table (4): effect of Reactivation Concentration on the activity of ACHE inhibited by TEP.

No.	Free Enz.	Inh. By 10^{-3}M TEP	$1x10^{-2}$		$8x10^{-3}$		$5x10^{-3}$		$1x10^{-3}$		$1x10^{-4}$	
			V	Reac. %	V	Reac. %	V	Reac. %	V	Reac. %	V	Reac. %
I	4.49	0.422	4.41	98.21	4.1	92.97	3.96	88.19	3.62	80.62	3.43	76.39
II	5.26	0.486	4.99	94.86	4.86	92.39	4.6	87.45	4.32	82.12	4.11	78.13
III	5.44	0.504	5.13	94.3	4.9	90.07	4.56	84.37	4.28	78.87	4.05	74.44

STUDY THE EFFECT OF SOME ACETYLIC AMINE COMPLEXES ON ACETYLCHOLINE esterase Inhibited by ORGAN PHOSPHOROUS COMPOUND IN BLOOD SERUM

OMAR H. SHEHAB AL- OBAIDI, ABDEL HADI R.AL-HITI

ABSTRACT:

In this research , the biological activity for some of new prepared Acetlynic Amine complexes have been study through effect of these complexes to used as activation and reactivation AChE enzyme inhibited by organophosphorous compound which used in herbicide or chemical war in blood serum.The inhibition of AChE by some organophosphorous compounds:

TEP=TriethoxyPhosphinoxide,

TDMAP=Tris(DiMethylAmine)Phosphenoxide

Has been studied for the first time.

From the degree of inhibition obtained, the time of incubation and inhibitor concentration for the highest inhibition have been determined.

The results obtained from (Linweaver –Burk) plot indicates that the inhibition is Non-Competitive.The inhibition percentages obtained confirmed that TEP has a higher inhibition than TDMAP. The fect of (zinc, cadmium and mercury) (II) of acetlynic amine (N-Propargyl pipredine) complexes on the activity of the inhibited enzyme has been studied.The resuls obtained from the incubation time and concentration experiments of the above complexes with inhibited enzyme, showed that all the complexes behave as re-activators.