دراسة التأثير التثبيطي لبعض مركبات الثايويوريا على فعالية انزيم بولي امين اوكسيديز المنقى من دم المصابات بالنوع الاول من داء السكر

نشوان إبراهيم عبو	خولة احمد آل.فليح	اياد سعدي حميد
كلية التربية/قسم الكيمياء	كلية التربية للبنات	كلية العلوم/قسم الكيمياء
جامعة الموصل	جامعة الموصل	جامعة تكريت

ABSTRACT

The research included determination of polyamine oxidase (PAO) activity in normal and diabeti patients type I females. It was found that the activity of PAO in red blood cells (RBC) and plasma in patients were significantly higher than that of normal($p<0.05$).

The partial purification of PAO from RBC of diabetic and normal females were included in this study. This was achieved by using different biochemical techniques. Three proteinous peaks with PAO activities in RBC (I,II,III) from each of normal and diabetic with specific activities (U\mg protein) (0.194,0.183 and 0.098), (0.349, 0.237 and 0.176) respectively were isolated from ion exchange chromatography, with molecular weights (72588, 74512 and 69339), (141458, 100671 and 104018) Da respectively.

This study didn't show the existence of Cu^{2+} ion as a cofactor for any PAO isoenzymes, but indicated the existence of FAD as a cofactor for all PAO isoenzymes.

On the other hand the research included study the effect of some thiourea derivatives which contains semicarbazide compound , N[(Benzoylamino)]thioxymethyl-semicarbazide and N[(*p*-toluine sulfonylamino)] thioxymethyl-semicarbazide, and N[(*p*-toluine sulfonylamino)] thioxymethyl-hexylamine which contained hexylamine . Semicarbazide showed inhibitory effect on partially purified PAO activity. Thiourea derivatives from Semicarbazide showed competitive inhibition of PAO activity but with hexylamine was non- competitive.

* ***Presented at the second conference on Chemistry, University of Mosul, college of Education, 17-18 Novamber-2013.***

الملخص

تضمن البحث تحديد مستوى فعالية انزيم بولي امين اوكسيديز PAO في النساء السليمات والمصابات بالسكري من النوع الاول. وجد ارتفاع معنوي($p<0.05$) في مستوى فعالية انزيم PAO في كل من البلازما وخلايا الدم الحمر في المصابات مقارنة بالسليمات.

تناول البحث ايضا التنقية الجزئية لأنزيم PAO من خلايا الدم الحمر للسليمات والمصابات بالسكري من النوع I باستخدام التقنيات الكيموحيوية المختلفة. لوحظ وجود ثلاث قمم بروتينية في خلايا الدم الحمر تمتلك فعالية لأنزيمPAO (III, II, I) لكل من النساء السليمات والمصابات بالسكري اعلاه وبفعالية نوعية (وحدة انزيمية/ملغم بروتين) (0.194، 0.183 و0.098)، (0.349، 0.237 و0.176) باستخدام كروماتوغرافيا التبادل الايوني على التوالي، وبأوزان جزيئية (72588،74512 و69339)، (141458،100671 و104018) دالتون على التوالي.

لم تظهر الدراسة الحالية وجود ايون النحاس كعامل مرافق لاي من متماثلات PAO المشار اليها اعلاه ، بينما وجدFAD كمُرافق انزيمي ولجميع المتماثلات المنقاة اعلاه.

كما تناول البحث دراسة تاثير بعض مشتقات ثايويوريا الحاوية على المركب سيميكاربازايد، N[(بنزوايل امينو)]ثايوكسي مثيل–سيميكاربازايد وN[(بارا تولوين سلفونايل امينو)]ثايوكسي مثيل–سيميكاربازايد وحاوية على هيكسايل امين N[(بارا تولوين سلفونايل امينو)]ثايوكسي مثيل–هيكسايل امين. اظهر المركب ثايوسيميكاربازايد تاثيرا تثبيطياً لأنزيم PAO المنقى. وأظهرت مشتقات الثايويوريا الحاوية سيميكاربازايد تاثيرا تثبيطيا تنافسيا لأنزيم PAO، بينما المحضر من هيكسايل امين كان التثبيط غير تنافسي.

المقدمة

يعمل انزيم بولي امين اوكسيديز Polyamine oxidase (PAO) على اكسدة مركبات بولي امين(PA) Polyamines الحرة والمؤستلة كمواد اساس (1) كما موضح في المعادلة التالية(2).

1. $NH_2(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NH_2 \xrightarrow[O_2]{PAO} NH_2(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH_2 + NH_2CH_2CH_2CHO + H_2O_2$

Spermine سبرمين — spermidineسبرمدين — امينو بروباناالديهايد

2. $NH_2(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH_2 \xrightarrow[O_2]{PAO} NH_2(CH_2)_4NH_2 + NH_2CH_2CH_2CHO + H_2O_2$

spermidineسبرمدين — Putrescine بترسين — امينو بروباناالديهايد

ان مركبات البولي امين(PA) polyamine مثل السبرمين Spermine (spm) ،السبرمدين Spermidine (spd) والبترسين Putrescine (put) مركبات عضوية متعددة مجاميع الأمين توجد هذه المركبات في جميع الخلايا الحية، اوزانها الجزيئية واطئة

(3) تتواجد مركبات PA في اغلب انسجة الفقريات، وتصنع الـ PA في الخلايا حقيقية النواة من الأرجينين Arginine (عن طريق الأورنيثين Ornithine) والمثيونين Methionine (4)، يحفز إنزيم PAO أكسدة مجموعة الأمين الثانوية لـ Spm و Spd حيث يعمل انزيم PAO في بعض انسجة الحيوان على تحويل Spm و Spd إلى Spd و Put على التوالي، فضلا عن بروبانالديهايد و H_2O_2 (5). من الوظائف الحيوية لمركبات الـPA التي وجدت في دراسات اجريت على الجرذان السليمة والمصابة بداء السكر هي تحفيز تضاعف الـDNA وانتاج هرمون الانسولين في خلايا بيتاβ البنكرياسية (6). ان مركبات PA تتواجد في اغلب الخلايا الحية حيث تتواجد كل من spm وspd بتراكيز عالية فيها، ولها دور واضح في افراز الانسولين حيث تتواجد في الحبيبات الفارزة الموجودة في سايتوبلازم خلايا -β- البنكرياسية ، ويمكن ان تستخدم كمواد اساس لأنزيمات transglutaminase التي تنظم نفاذية اغشية خلايا-β-، كما ان لها دور اساسي في السيطرة على ترجمة الجين الخاص بالانسولين (7). وقد وجد في حالة ارتفاع مستوى سكر الدم نقصان في مستوى فعالية انزيم Arginase اللازم للبناء الحياتي لمركباتPA . اشار الباحث (8) ان لـL-Arg وPA تأثير مشابه للأنسولين في تقليل تجمع الصفيحات الدموية platelet aggregation. اكدت الدراسات ان مركبات الالديهايد الناتجة من عمل انزيمات بولي امين اوكسيديز تمتلك سمية عالية تجاه الخلايا والانسجة الحيوية حيث تعتبر من مولدات الجذور الحرة التي تشترك وبشكل مباشر في إحداث الاجهاد التاكسدي حالها حال المالوندايالديهايد الناتج من الاكسدة الفوقية للدهون lipids peroxidation بالاضافة الى السمية العالية لبيروكسيد الهيدروجينH_2O_2 المعروف بتوليد الجذور الحرة وبالتالي الاشتراك بإحداث الاجهاد التاكسدي (10,9). وان هذا الاجهاد التاكسدي يلحق الاذى بخلاياβ- البنكرياسية مشاركا في اسباب حدوث داء السكر .

المواد وطرائق العمل

العينات: جمع 80 عينة دم لنساء مصابات بداء السكر النوع الاول (بعمر 30–40) من مركز الوفاء التخصصي لأمراض السكري والغدد الصم في مستشفى الموصل العام/نينوى والمشخصين بهذا المرض منذ الطفولة، كما تم جمع 100 عينة دم لنساء متطوعات سليمات (بعمر 25–45)، جمعت العينات بحجم 4–5 مليليتر من الدم في انابيب مانع تخثر الدم نوع EDTA . فصلت البلازما باستخدام الطرد المركزي المبرد بسرعة (15000g) لمدة (10) دقائق عند درجة حرارة 4°م، حللت خلايا الدم الحمر بغسلها ثلاث مرات بمحلول NaCl بتركيز 0.9% واستخدام الطرد المركزي المبرد بسرعة (15000g) لمدة (10)، ثم مزجت بـ3 مل ماء مقطر وفصلت بالطرد المركزي المبرد بسرعة (15000g) لمدة (10) دقائق، أعتبر الجزء الرائق

متحل خلايا حمر(Red Blood Cells Hemolysate (RBCH (11) وتم تقدير البروتين في البلازما وRBCH بطريقة فولن المحورة (12) وباستخدام المنحنى القياسي لتقدير البروتين حيث استخدم البومين مصل البقر باعتباره مادة قياسية.

قياس فعالية انزيم PAO في البلازما وخلايا الدم الحمر

تم قياس فعالية انزيم PAO لعينات البلازما ومتحل الخلايا الحمر في نفس اليوم باتباع الطريقة المحورة (14,13) حيث تتضمن اكسدة مادة الاساس (بولي امين spermine) بتركيز100mM بوساطة انزيم PAO وباستخدام محلول بوتاسيوم فيري سيانيد الذي يعمل كمستقبل للالكترونات بتركيز100mM وبوجود الاوكسجين باستخدام المحلول المنظم Na_2HPO_4-KH_2PO_4 عند pH=7.2. تم قياس فعالية الانزيم بمتابعة النقصان في الامتصاصية والناتج عن اختزال محلول بوتاسيوم فيري سيانيد عند الطول الموجي (410) نانوميتر لكل خمس ثواني لفترة دقيقة واحدة . تحتوي خلية القياس لعينة السيطرة على نفس مكونات التفاعل عدا المادة الاساس، وتمثل الفعالية بالوحدة الانزيمية/مل (وهي كمية الانزيم التي تؤكسد مايكرومول واحد من المادة الاساس في الدقيقة).

تنقية انزيم PAO خلايا الدم الحمر

تمت التنقية الجزئية لانزيم PAO الموجود في متحل الخلايا الحمر للمصابات بداء السكر من النوع الاول والسليمات بعد قياس الفعالية بالخطوات التالية:

1. الفرز الغشائي Dialysis : وضع 10مل من متحل الخلايا الحمر في كيس الفرز الغشائي الذي يسمح بالجزيئات ذات الاوزان الجزيئية الاقل من 10kD بالنفاذ من خلاله مقابل الماء المقطر لمدة 6 ساعات بدرجة 4°م مع التحريك باستخدام المحرك المغناطيسي، ثم قياس فعالية الانزيم وتركيز البروتين للعينة بعد عملية الفرز الغشائي (15).

2. كروماتوغرافيا التبادل الأيوني: استخدم المبادل الايوني السالب DEAE- سيليلوز اعتمادا على المصدر (16) باضافة العينة الناتجة من عملية الفرز الغشائي 10 مل من اعلى عمود الفصل المعبأ بـDEAE- سيليلوز بطول40 سم وقطر 2.5 سم، واستخدم المحلول المنظم Na_2HPO_4-KH_2PO_4 بتركيز 15mM عند pH=7.2 اجريت العملية عند درجة حرارة4م° بمعدل جريان 1.3مل/دقيقة (68 مل/ساعة) وجمعت الاجزاء الناتجة من عملية الفصل يدويا تم قياس البروتين ثم جفدت حزم الانزيم الناتجة من التبادل الايوني باستخدام جهاز المجفد lyophilizer .

3.الهجرة الكهربائية: تم التعرف على الاوزان الجزيئية ومدى نقاوة متماثلات انزيم PAO الناتجة من عملية كروماتوغرافيا التبادل الايوني بتقنية الهجرة الكهربائية sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (15) باستخدام جهاز الهجرة الكهربائية Gel.T. 15.10-midi-plus Enduro من شركة Labnet International Inc. الامريكية ، تم تقدير الوزن الجزيئي للمتماثلات بالمقارنة مع مركبات بروتينية قياسية ذات الاوزان الجزيئية التالية :اليوريز 480000 ، البومين مصل الابقار 67000 ، البيروكسديز 40000 ، التربسين 23800 والسايتوكروم اوكسيديز 13000 دالتون .

الكشف عن المرافق الانزيمي لمتماثلات PAO المنقاة من خلايا الدم الحمر

استخدم جهاز مطياف الامتصاص الذري Atomic absorption من الشركة الاسترالية نوع SENSAA-GBC Scintific Equipment . للكشف عن وجود ايون النحاس في القمم الانزيمية الثلاث، وجهاز مطياف الاشعة فوق البنفسجية- المرئية نوع Spectrophotometer , Double Beam (Shemadzo) من شركة Shemadzo اليابانية للكشف عن المرافق الانزيمي FAD (17).

تاثير بعض مركبات الثايويوريا على فعالية انزيمPAO

درس التاثير التثبيطي لمركب الثايوسيميكاربازايد ومركبات الثايويوريا المحضرة منه والمحضر من الهيكسايل امين (18) على المتماثل المنقى ذي الفعالية النوعية الأعلى للأنزيم باخذ التراكيز التالية(25، 50، 75، 100، 125، 150، 175) ملي مولار وقيست الفعالية بوجود المادة الاساس Spm.

النتائج والمناقشة

فعالية انزيم بولي امين اوكسيديز

اشارت نتائج قياس فعالية انزيم PAO في الـRBCH الجدول (1) الى ارتفاع معنوي في مستوى الفعالية الانزيمية عند مستوى احتمالية ($P<0.05$) لدى المصابات بالسكر النوع الأول (200 ± 22.5) وحدة انزيمية/مل مقارنة بفعالية الانزيم في النساء السليمات (103.32 ± 17.75) وحدة انزيمية/مل كما اشارت النتائج في نفس الجدول الى وجود ارتفاع معنوي أيضا في مستوى فعالية انزيم PAO في بلازما الدم عند مستوى احتمالية ($P<0.05$) في المصابات بالسكر النوع الاول (15.0 ± 4.9) مقارنة بفعالية الانزيم في النساء السليمات (6.18 ± 0.55) .

الجدول 1: يوضح فعالية انزيم PAO في خلايا الدم الحمر وبلازما الدم

الحالة		فعالية أنزيمPAO Unit/ml(×10^2) Mean±SD	البروتين mg/ml	الفعالية النوعية PAO Unit/mg protein(×10^2) Mean ±SD
خلايا الدم الحمر	السليمات	a 103.32±17.75	a 28.53±11.85	a 3.62±0.35
	مصابات بالسكري النوع الاول	c 200±22.5	ab 32.13±3.85	c 6.18±0.55
بلازما الدم	السليمات	c 9.4±4.5	a 73.47±3.57	b 0.128±0.05
	مصابات بالسكري النوع الاول	b 15.0±4.9	d 100.39±3.85	c 0.15±0.06

الحروف المختلفة عمودياً تشير الى اختلاف معنوي عند مستوى احتمالية $p<0.05$

وجد الباحث العباسي(19) في السائل المخي الشوكي للأطفال زيادة معنوية بمستوى فعالية الانزيم مقارنة بالاصحاء. وفي دراسة الباحث (20) وجدت زيادة بمستوى الفعالية فيRBC وبلازما الاشخاص المصابين بالفصام. وجد ايضا ان الفعالية الانزيمية في خلايا الدم الحمر في الدراسة الحالية اكبر من تلك في البلازما في السليمات والمصابات بداء السكر وهذا يطابق النتائج التي وجدها (20) والذي يؤكد ان الـRBC مركز ايض الـPA(21).

تنقية انزيم PAO من خلايا الدم الحمر

1. التنقية بوساطة الفرز الغشائي

اشارت النتائج ان الفعالية النوعية لانزيم PAO في دم النساء السليمات أصبحت بعد عملية الفرز الغشائي (0.0578) وحدة انزيمية / ملغم بروتين أي انها ازدادت بمقدار (3.141) مرة عما كانت عليه قبل عملية الفرز الغشائي (0.0184) وحدة انزيمية/ملغم بروتين وان مقدار استرجاع الفعالية الكلية للانزيم بلغت (274.46%) مقارنة بالفعالية الكلية للانزيم الخام جدول (2)، وان الفعالية النوعية لانزيم PAO في دم النساء المصابات بالسكر النوع الاول اصبحت بعد عملية الفرز الغشائي (0.074) وحدة انزيمية/ملغم بروتين أي انها ازدادت بمقدار (2.24) مرة عما كانت عليه قبل عملية الفرز الغشائي (0.033) وحدة انزيمية/ملغم بروتين وان مقدار استرجاع الفعالية الكلية للانزيم بلغت (199.79%) مقارنة بالفعالية الكلية للانزيم الخام جدول(3) . وان الزيادة في مقدار الفعالية النوعية بعد عملية الديلزة نتج عن النقصان الواضح

في تركيز الكلي البروتين بعد عملية الفرز الغشائي وقد يعود الى التخلص من بعض الايونات والمثبطات(15) .

2. التنقية بكروماتوغرافيا التبادل الايوني:

اشارت النتائج المبينة في الشكل(1) الى وجود ثلاث قمم peak I,II,III تمتلك فعالية لانزيم PAO الجدول (2) ، بفعالية نوعية (0.194) ،(0.183) و(0.0985) وحدة انزيمية / ملغم بروتين على التوالي وانها ازدادت بمقدار (10.543) ، (9.945) و(5.353) مرة بالنسبة للانزيم الخام على التوالي وبلغت نسبة الاسترجاع (82.18%)،(74.13%) و(35.25%) على التوالي مقارنة بالفعالية الكلية للانزيم الخام.

واشارت النتائج المبينة في الشكل (2) الى وجود ثلاث قمم ايضا تمتلك فعالية لانزيم PAO في دم النساء المصابات بالسكري I الجدول (3) ، وبفعالية نوعية (0.215)، (0.237) و(0.176) وحدة انزيمية/ملغم بروتين على التوالي أي انها ازدادت بمقدار (6.51) ،(7.19) و(5.36) مرة بالنسبة للانزيم الخام على التوالي وبلغت نسبة الاسترجاع (46.56%)، (22.84%) و (33.53%) مقارنة بالفعالية الكلية للانزيم الخام وعلى التوالي ، في حين وجد (20) ثلاث حزم للأنزيم في متحلل دم الاشخاص السليمين واربعة في المصابين بالفصام ووجدت الباحثة (22) ثلاث قمم في السائل المخي الشوكي للأطفال السليمين والمصابين بالتهاب السحايا الفيروسية.

الجدول 2: خطوات تنقية انزيم PAO من خلايا الدم الحمر للنساء السليمات

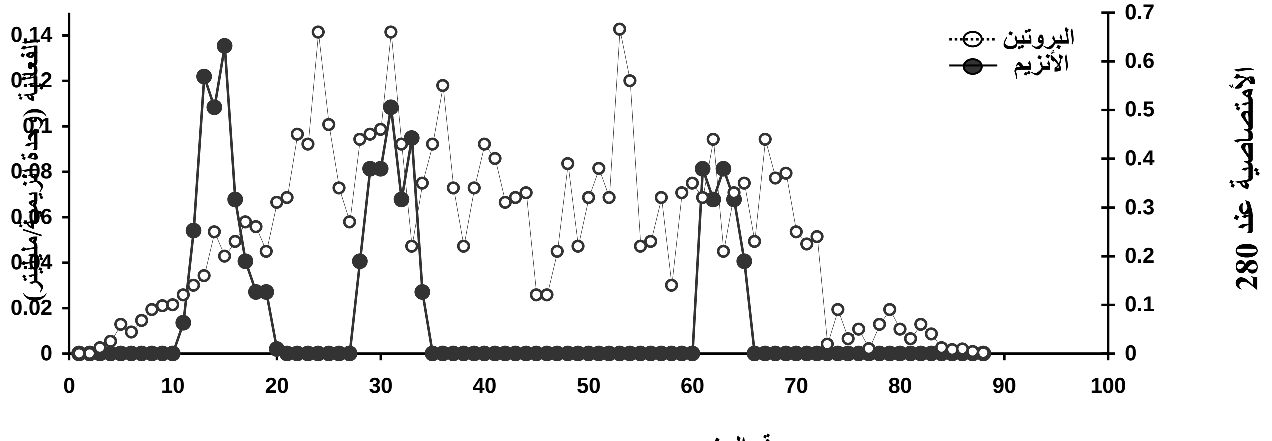
خطوات التنقية		الحجم الكلي	البروتين الكلي ملغم	الفعالية* Unit\ml	الفعالية الكلية Unit\ml	الفعالية النوعية Unitl\mg protein	عدد مرات التنقية	الاسترجاع للفعالية الكلية%
الانزيم الخام		10	429.75	0.795	7.95	0.0184	1	100
الفرز الغشائيDialysis		10.5	377.25	2.079	21.82	0.0578	3.141	274.46
كروماتوغرافيا التبادل الايوني DEAE-سيليولوز	Peak I	60.5	33.56	0.108	6.534	0.194	10.543	82.18
	Peak II	48.3	32.07	0.121	5.886	0.183	9.945	74.13
	Peak III	34.5	28.45	0.081	2.803	0.0985	5.353	35.25

* الوحدة الأنزيمية U تشير إلى كمية الأنزيم الذي يؤكسد مايكرومولاً واحداً من المادة الأساس في الدقيقة الواحدة

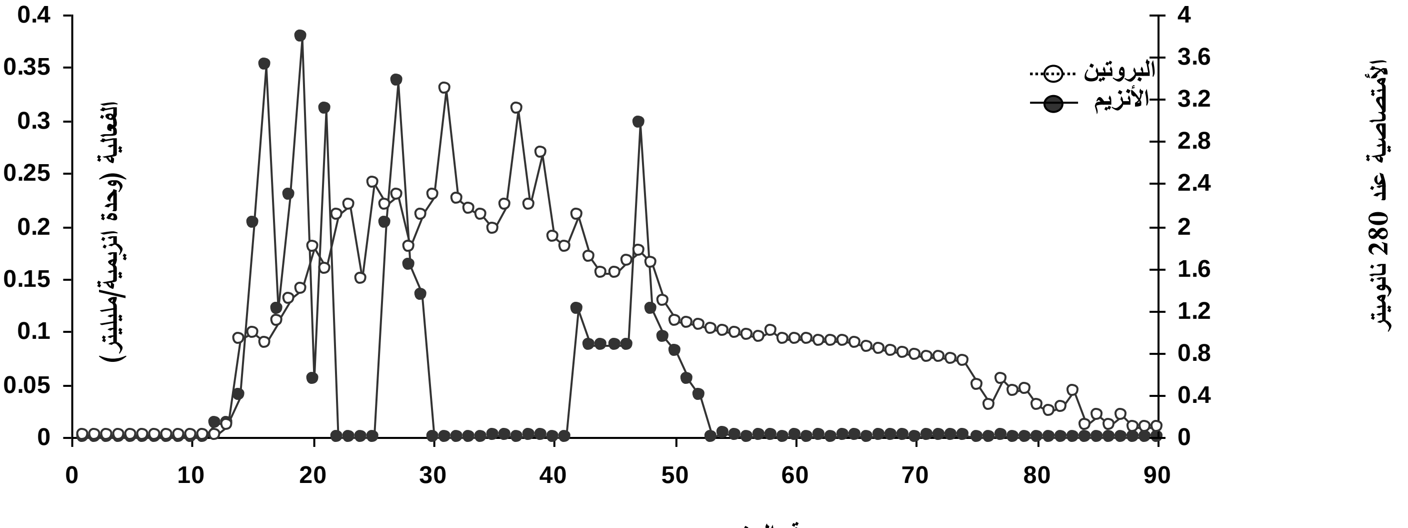
الجدول 3: خطوات تنقية انزيم PAO من خلايا الدم الحمر للنساء المصابات بالسكر Type-I

خطوات التنقية		الحجم الكلي	البروتين الكلي ملغم	الفعالية * Unit\ml	الفعالية الكلية Unit\10ml	الفعالية النوعية Unitl\mg protein	عدد مرات التنقية	الاسترجاع للفعالية الكلية%
الانزيم الخام		10	714.75	2.416	24.16	0.033	1	100
الفرز الغشائيDialysis		10.3	651.21	4.687	48.27	0.074	2.24	199.79
كروماتوغرافيا التبادل الايوني DEAE- سليولوز	Peak I	54.5	52.17	0.206	11.25	0.215	6.51	46.56
	Peak II	27.2	23.249	0.203	5.52	0.237	7.19	22.84
	Peak III	74.8	45.8	0.108	8.103	0.176	5.36	33.53

* الوحدة الأنزيمية U تشير إلى كمية الأنزيم الذي يؤكسد مايكرومولاً واحداً من المادة الأساس في الدقيقة الواحدة



الشكل 1: نموذج الاسترداد المستحصل من تنقية انزيم PAO لخلايا الدم الحمر للسليمات بواسطة كروماتوغرافيا التبادل الايوني السالب باستخدام المبادلDEAE- سيليلوز المعبا بعمود الفصل ذي الابعاد 40×2.5 سم



الشكل 2: نموذج الاسترداد المستحصل من تنقية انزيم PAO لخلايا الدم الحمر للمصابات بالسكرI بواسطة كروماتوغرافيا التبادل الايوني السالب باستخدام المبادلDEAE- سيليلوز المعبأ بعمود الفصل ذي الابعاد 40×2.5 سم

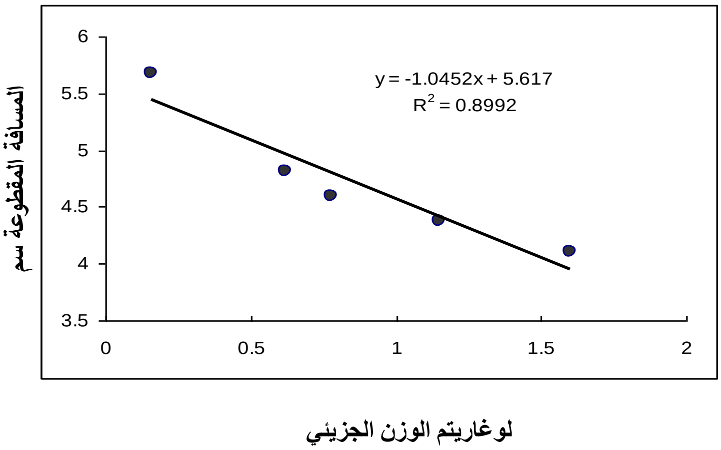
وجود ونوع المرافق الانزيمي :

دلت نتائج القياس بجهاز الامتصاص الذري عدم وجود ايون النحاس مع متماثلات انزيم PAO المنقاة من الـRBCH في حين اكدت نتائج طيف الاشعة فوق البنفسجية- مرئية وجود حزمتين متميزة λmax بين360-415 تعود لامتصاصFAD كما موضح في الجدول (4)، حيث اشارت الدراسات ان انزيم مونو امين اوكسيديز Monoamine Oxidase يرافقه Cu^{2+} ويسمى (CuAO) بينما انزيم PAO يرافقه FAD ويطلق عليه Flavo-enzyme ويتواجد كلا الانزيمين في النباتات والانسجة الحيوانية(23) حيث توجد حزم امتصاص مميزة عند الطول الموجي المقارب 360-450 تدل على وجود الـFAD (17).

الجدول 4: يوضح الاطوال الموجية لـFAD لمتماثلات الانزيم بين 200-600 نانوميتر

متماثل PAOالمنقى من دم النساء المصابات بالسكري من النوع الاول		متماثل PAOالمنقى من دم النساء السليمات		المتماثل الانزيمي
λmax	الامتصاصية	λmax	الامتصاصية	
434	0.548	426	0.063	Peak I
354	0.059	367	0.035	
414	0.844	447	0.759	PeakII
307	0.11	310	0.557	
414	0.353	436	0.394	peakIII
361	0.032	367	0.366	

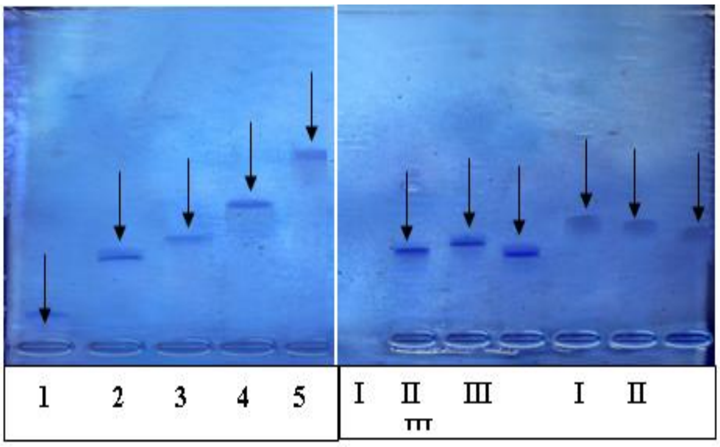
كما وجد ان الاوزان الجزيئية لمتماثلات الانزيم PAO المنقاة من دم النساء السليمات اوطأ من المصابات بالسكري نوع I بتقنية الترحيل الكهربائي باستخدام الوسط SDS-PAGE جدول(5) والتي تم ايجادها من رسم العلاقة بين لوغاريتم الوزن الجزيئي للبروتينات القياسية وبين المسافة التي قطعتها هذه البروتينات نحو القطب الموجب كما هو موضح في الشكل (3) .



الشكل (3) المنحنى القياسي لتقدير الوزن الجزيئي لمتماثلات انزيم PAO باستخدام SDS-PAGE

الجدول(5) الاوزان الجزيئية لمتماثلات انزيم PAO

الحالة	المتماثل	الوزن الجزيئي (دالتون)
انزيم PAO المنقى من دم النساء السليمات	Peak I	74512
	Peak II	72588
	peakIII	69339
انـزيم PAO المنقـى مـن دم النسـاء المصـابات بالسكر نوع I	Peak I	100671
	Peak II	141458
	peakIII	104018



1-يوريز، 2-BSA، 3-بيروكسيديز، 4-تربسين، 5-سايتوكروم اوكسيديز.
A. متماثلات انزيم PAO المنقاة من دم النساء السليمات.
B. متماثلات انزيم PAO المنقاة من دم النساء المصابات بالسكري نوع I

الصورة(1) توضح الهجرة الكهربائية باستخدامSDS-PAGE لمتماثلات انزيمPAO مع البروتينات القياسية

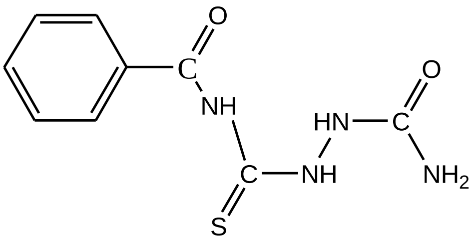
تاثير مركبات الثايويوريا على فعالية متماثلات PAO

درس تاثير مركب سيميكاربازايد على فعالية انزيم PAO المنقى ذي الفعالية النوعية الأعلى ووجد ان له تاثيرا تثبيطيا كان الامثل عند التركيز 100ملي مولار وكما مبين في الجدول(6)، يمكن ان يكون لهذا المركب تاثيرا تثبيطيا لوجود مجموعة الكاربونيل الفعالة، حيث ان لهذه المجموعة قابلية التداخل مع الموقع الفعال للأنزيم وبالتالي تعمل على تثبيط الفعالية الانزيمية لأنزيم PAO (24).

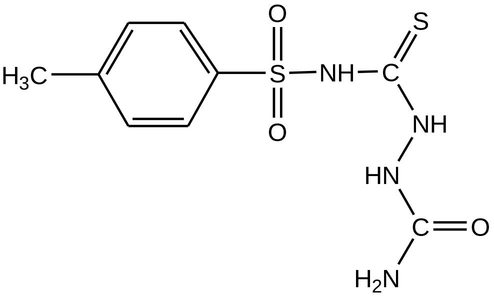
الجدول(6) التركيز التثبيطي لمركب سيميكاربازايد على فعالية انزيم PAO المنقى من دم النساء السليمات والمصابات بالسكري نوع I

	متماثلPAOالمنقى من دم النساء السليمات		متماثلPAO المنقى من دم النساء المصابات بالسكري نوع I	
التركيز (ملي مولار)	الفعالية (وحدة انزيمية/مل) ×100	النسبة المئوية للتثبيط%	الفعالية (وحدة انزيمية/مل) ×100	النسبة المئوية للتثبيط%
سيطرة بدون مثبط	10.8	%0	13.54	%0
25	10.8	0	9.4	30.57
50	10.8	0	9.4	30.57
75	9.47	12.5	6.7	50.5
100	**5.41**	**50**	**4.06**	**70**
125	6.77	37.5	9.4	30.57
150	6.77	37.5	9.4	30.57
175	6.77	37.5	9.4	30.57

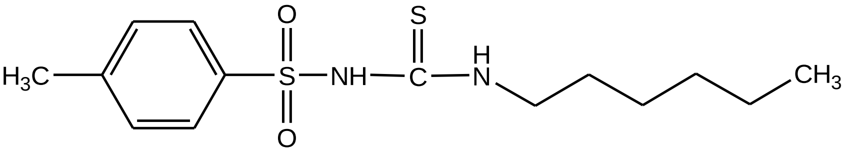
درس تاثير مشتقات الثايويوريا التالية (A, B, C) المحضرة(18) على فعالية انزيم PAO المنقى ذي الفعالية النوعية الاعلى :



N[(Benzoyl amino)]thioxymethyl-semicarbazide (A)



N[(*p*-toluine sulfonylamino)]thioxymethyl-semicarbazide (B)



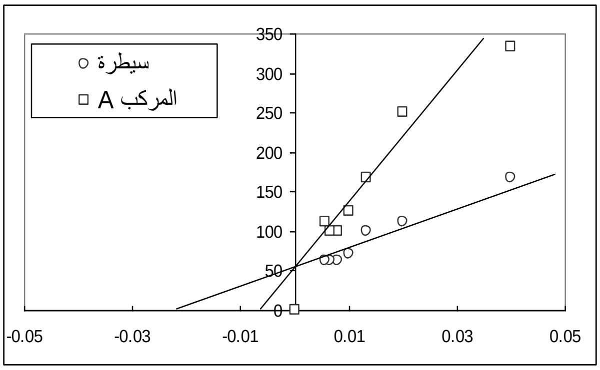
N[(*p*-toluine sulfonylamino)]thioxymethyl-hexylamine (C)

الجدول7: التركيز التثبيطي الامثل للمركب A و B وCعلى فعالية انزيم PAO المنقى من دم النساء السليمات والمصابات بالسكري نوع I

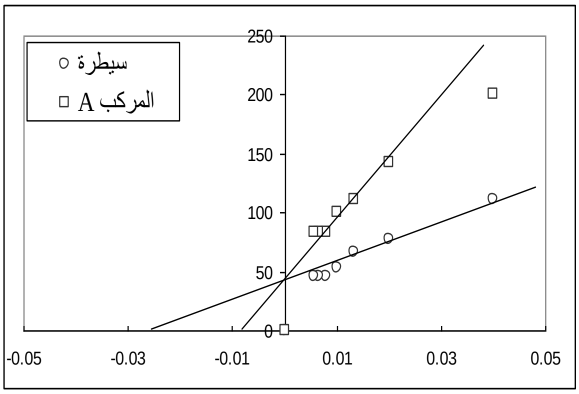
	المركب A		المركب B		المركب C	
التركيز mM	**25 مليمولار**		**50 مليمولار**		**50 مليمولار**	
	الفعالية وحدة أنزيمية/مل ×100	**النسبة المئوية للتثبيط%**	**الفعالية وحدة أنزيمية/مل ×100**	**النسبة المئوية للتثبيط%**	**الفعالية وحدة أنزيمية/مل ×100**	**النسبة المئوية للتثبيط%**
متماثل انزيم PAO المنقى من دم السليمات	**5.41**	**41.32**	**4.06**	**57.44**	**4.06**	**55.48**
متماثل انزيم PAO المنقى من دم المصابات بالسكر نوع I	**5.41**	**63.6**	**4.06**	**66.6**	**4.06**	**72.7**

يمكن ان يعزى سبب التثبيط هذا الى توسيع الهيكل الجزيئي الذي مكن المركب من التداخل بشكل افضل مع المواقع الفعالة للأنزيم كما يمكن ان يكون بسبب مجموعة الكربونيل التي لها صفة تثبيطية مشابهة لمركب السيميكاربازايد(24) ويمكن ان يكون التاثير الاضافي لوجود مجموعة C=S والتي بقت بشكلها الفعال بعد تحضير مشتقة الثايويوريا .

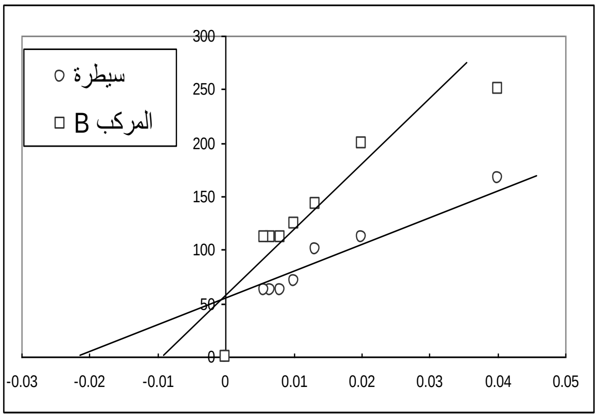
وعند دراسة نوع التثبيط لأنزيم PAO بهذه المركبات باستخدام التركيز الامثل جدول(7) وجد انه من النوع التنافسي حسب رسم لينوفر–بيرك بالنسبة للمركبين A و B كما موضح في الاشكال التالية.



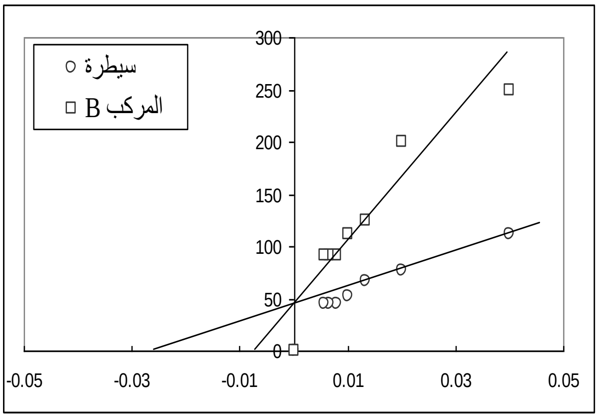
الشكل (4) نوع تثبيط أنزيم PAO المنقى من
دم النساء السليمات بالمركب A



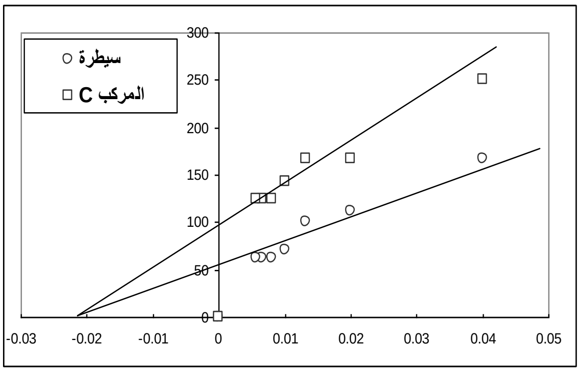
الشكل (5) نوع تثبيط أنزيم PAO المنقى من
دم النساء المصابات بالسكر I بالمركب A



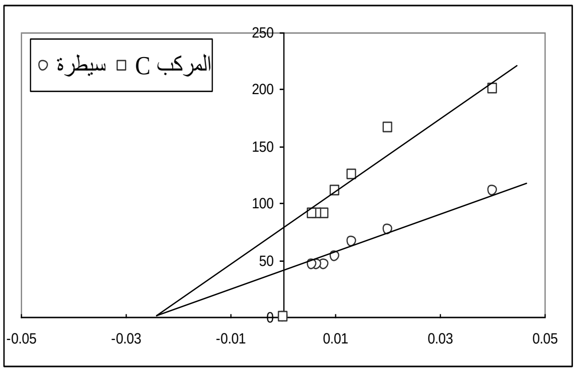
الشكل (6) نوع تثبيط أنزيم PAO المنقى من
دم النساء السليمات بالمركب B



الشكل (7) نوع تثبيط أنزيم PAO المنقى من
دم النساء المصابات بالسكر I بالمركب B



الشكل (5) نوع تثبيط أنزيم PAO المنقى من
دم النساء المصابات بالسكر I بالمركب C



الشكل (5) نوع تثبيط أنزيم PAO المنقى من
دم النساء المصابات بالسكر I بالمركب C

الجدول 8: نوع تثبيط أنزيم PAO المنقى من دم النساء السليمات والمصابات بالسكري نوع I بوجود وعدم وجود مركبات الثايويوريا B,A و C

مركب الثايويوريا المحضر (التركيز الامثل ملي مولار)	(mM) Km لفعالية PAO بدون المثبط	K′m (mM) لفعالية PAO بوجود المثبط	Vmax لفعالية PAO (unit/ml) بدون المثبط	V′max لفعالية PAO (unit/ml) بوجود المثبط	(mM) Ki	نوع التثبيط
المتغيرات الحركية لأنزيم PAO المنقى من دم النساء السليمات						
A (25 ملي مولار)	45.45	200	0.02	0.02	5.90	تنافسي
B(50 ملي مولار)	45.45	100	0.02	0.02	23.17	تنافسي
C(50 ملي مولار)	45.45	45.45	0.02	0.011	51	غير تنافسي
المتغيرات الحركية لأنزيم PAO المنقى من دم النساء المصابات بالسكر نوعI						
A (50 ملي مولار)	41.66	142.85	0.025	0.025	7.571	تنافسي
B(100 ملي مولار)	41.66	166.6	0.025	0.025	12.73	تنافسي
c(50 ملي مولار)	41.66	41.66	0.025	0.0133	51	غير تنافسي

Km ثابت ميكيليس مينتن / K′m ثابت ميكايليس مينتن الظاهري / Vmaxالسرعة القصوى / V′max السرعة القصوى الظاهرية / Ki ثابت التثبيط

المصادر

1) Mendez J.D. and Zarzozo E. *Bioche. and Molecular Biol International*, **43**, 2:311-318. (1997).
2) Seiler, N. *Can. J. Physiol Pharmacol* ., **65**, 2024-2035. (1987).
3) Wallace H.M.; Fraser A.V.; Hughes A. *Biochem. J*., **376**: 1-14. (2003).
4) Amendola R. Cervelli M., fratini E., Polticelli F., Sallustio D.E. and Mariottini P. *Current Cancer Drug targets*, 9: 118-130. (2009).
5) Seiler N. *Prog. Brain Res*., **106**: 333-344. (1995).
6) Sjoholm A.; Arkhammar P.; Berggren P.; Andersson A A. ages. *Am.J.Physiol.Cell Physiol*. **280**: C317-C323. (2001).
7) Gimenez M.C.(2010). *Ph.D.Thesis, University of Eastern Finland*.
8) Méndez D.; Aguilar M.;Méndez-Valenzue V. *World Applied.Sci. J*. **2** (3), 184-189. (2007).
9) Murray-Stewart, T.; Wang Y.; Devereux W.; Casero R. A.J. *Biochem J*. **368**: 673-677. (2002).
10) Murray R.K.; Granner C.K.; Mayes P.A.; Rodwell V.W.(2009).Harpers' Biochemistry. *28th ed ., Appleton and Lange ,USA*,PP.155-156, 254-265, 332.
11) Rapoport S.M., Schewe T., Wiesner R., Halangk W. and Ludwig P. Eur. J. Biochem., **99**: 545-561. (1979).
12) Schacterle G.R.;Pollack J.K. *Anal . Biochem* ., **51**: 654-655. (1973).

13) Flayeh K. A. *Clin. Chem*. **412**:401-403. (1988).
14) Dahel K.; Flayeh K.A.; Al-Saffar N. M. *Neurochem. Res*., **26**(4),415-418. (2001).
15) Robyt F.J.;White J.B.(1987). "Biochemical Techniques". Theory and Practice. *Brookes/Cloe Publishing Company, Monterey, California*, pp. 115-118,135-143.
16) Flayeh K. A.; Wullace H. M. *Biochem. Sco. Thans*., **18**:1225. (1991).
17) Matcheroulx P. *Methods in molecul. biol*. **131**: 1-7. (1999).
18) اللهيبي، نشوان ابراهيم عبو(2013). اطروحة دكتوراه، كلية التربية، جامعة تكريت.
19) العباسي ، عمر يونس محمد (2003). رسالة ماجستير ، كلية التربية ، جامعة الموصل.
20) الجبوري ، طارق سليمان محمود علي (2002).رسالة ماجستير ، كلية التربية ، جامعة الموصل.
21) Cohen L.F., Lundgren D.W. and Farrel P.M. **48**:469-475. (1976).
22) ميخا ، لنا عبد منصور (2002). رسالة ماجستير ، كلية التربية ، جامعة الموصل.
23) Cona A., Rea G., Angelini A., Federico R. and Tavladoraki P. *TRENDS in Plant Science*. **11**(2),81-88.
24) Jalkanen, S.; Salmi, M. *EMBO. J*. **20**: 3893-901. (2001).