دراسة خصائص وتثبيط أنزيم بولي أمين اوكسيديز المنقى جزئيا من ثمرة الفلفل الأخضر بعقاري الاميلورايد والميدوفير

د. وثبة ادريس علي توحلة مهيب محمد جاسم

قسم الكيمياء/كلية التربية/جامعة الموصل

ABSTRACT

The study included a detection of PAO in green pepper (*Capsicum grossum*) and its partial purification by using dialysis and anion exchange chromatography (using DEAE – cellulose) techniques . Two isoenzymes were obtained, with a specific activity of 3.9 and 2.6 unit / mg protein, and a purification fold of 21.4 and 14.3 respectively compared to crude enzyme. Copper ion in both isoenzymes was detected and found to be 0.1915 and 0.2947 mg / ml respectively.

The maximum PAOI,II isoenzyme activity were obtained at 100 microlitre of enzyme, sodium phosphate buffer at pH 8.6,7.2, temperature at 40, 37°C, and 125 , 100 mM of spermidine as substrate respectively, and have a high specificity toward the polyamine, spermidine compared with other amine compounds.

The inhibitory effect of the drugs amiloride and medovire on PAOI activity was studied and showed that increasing of inhibitor concentration led to a decrease in activity. The inhibition type was found to be competitive , and Ki were 0.88 and 1.1 mM respectively.

Spermine was detected by HPLC technique from non-proteinous extract. Basic amino acids were isolated by using Amberlite 120 H^+ and Amberlite $50NH_4^+$ successively, the results indicated that the green pepper contained 96.1 mg / g of plant.

الخلاصة

تضمن البحث الكشف عن وجود فعالية أنزيم بولي امين اوكسيديز في الفلفل الاخضر، وتنقيته جزئيا بتطبيق تقنيتي الفرز الغشائي وكروماتوغرافيا التبادل الأيوني (باستخدام DEAE – سليلوز). تم التوصل الى وجود متماثلين للانزيم بفعالية نوعية 3.9 و 2.6 وحدة انزيمية /ملغم بروتين وبعدد مرات تنقية 21.4 و14.3 مرة على التوالي مقارنةً بالأنزيم الخام. تم الكشف عن وجود ايونات النحاس في كل من المتماثلين، وبلغ 0.1915 و 0.2947 ملغم/مل على التوالي.

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

بلغت أقصى فعالية لمتماثلي إنزيم PAOI,II عند استخدام 100 مايكروليتر من الانزيم محلول الفوسفات الصوديوم المنظم عند pH 8.6 و7.2، ودرجة حرارة 40 و37°م و125 و100 ملي مولار باستخدام السبرمدين كمادة اساس.

كما انهما يمتلكان خصوصية عالية تجاه المركب متعدد الامين السبرمدين مقارنة بمركبات الامين الاخرى. درس التأثير التثبيطي لعقاري الاميلوريد و الميدوفير على فعالية المتماثل PAOI وتبين انه بزيادة تركيز المثبط تقل فعالية الانزيم، وكان نوع التثبيط تنافسيا لكل منهما ، ووجد ان قيمة ثابت التثبيط Ki تساوي 0.88 و 1.1 ملي مولار على التوالي. شخص مركب السبرمين في المستخلص غير البروتيني بتقنية HPLC، وفصلت الاحماض الامينية القاعدية من الفلفل الاخضر باستخدام المبادلين الايونين امبرلايت Amberlite H120^{+} وامبرلايت Amberlite 50 NH^{+4}على التوالي، واشارت النتائج الى احتوائه على 96.1 ملغم/غم من النبات.

المقدمة

يعد الفلفل الاخضر مصدراً غنياً بالفيتامينات والكاروتينات والفلافونويدات فضلاً عن الاحماض الامينية والبروتينات والمعادن(1). ويتميز بأحتوائه على كميات قليلة جداً من الدهون(2). تعد مركبات متعددة الامين Polyamine (PA) مثل السبرمين Spermine والسبرمدين Spermidine والبترسين Putrescine، مركبات عضوية اليفاتية متعددة الشحنة الموجبة ذات وزن جزيئي واطىء يتراوح بين (88–202 دالتون). وهي من المكونات الطبيعية لخلايا بدائية وحقيقية النواة(3)، وتوجد اما بصورة حرة او مقترنة مع مركبات اخرى مثل الالكالويدات والستيرويدات، وتؤدي دوراً اساسياً في عملية نمو وتمايز الخلايا (4،5). تبين وجود السبرمين والسبرمدين والبترسين في الفاصوليا والحنطة وبذور الخيار(6،7). كما وجد ان كلاً من الذرة والبازلاء وحب الصويا والفاصوليا والحمضيات والاجاص كانت غنية بالسبرمدين والبترسين (8،9). تشير الدراسات الى وجود PA في الرز والفستق والفطر والشاي الاخضر والمانجا(10). كذلك وجد ان كل من ثمار الليمون والجوز والطماطة تحتوي على تركيز عالي للبترسين(11،12).

يحفز انزيم بولي امين اوكسيديز Polyamine Oxidase (EC 1.5.3.3, PAO) اكسدة وحذف مجاميع الامين من المركبات متعددة الامين ومشتقاتها بالفة عالية، وله دور هام في تنظيم مستويات مركبات PA داخل وخارج الخلايا(13،14). توجد أنزيمات PAO على الاغلب في نباتات ذوات الفلقة الواحدة وبالاخص نبات الذرة (15)، والشعير (16،17) ، والفاصوليا (18). واشار Liz (19) الى وجود فعالية لانزيم PAO في أوراق الشوفان، وتمكن

من فصله وتنقيته بأستخدام كروماتوغرافيا التبادل الايوني وتوصل الى ان الوزن الجزيئي لهذا الانزيم 66 كيلو دالتون. درس Federico وجماعته (20) خواص انزيم PAO في الحمص الذي وجد ان له فعالية مميزة مع السبرمين والسبرمدين.

يعد العقار [(N-1,N-2-Bis(2,3)(butadienyl)1,4-butane-di amine)] الذي يرمز له MDL 72527 مثبط خاص لفعالية انزيم بولي امين اوكسيديز في الثدييات (21) . لوحظ تثبيط فعالية انزيم PAO الموجود في مصل الدم وكذلك الموجود في الخلايا السرطانية للقولون بواسطة عقار الكويناكرين بكفاءة عالية(22،23) . كما يعد فيتاميني E و C من المركبات المستخدمة في تثبيط انزيمات PAO لخواصهما المضادة للاكسدة، وتبين ان عقار الميتفورمين عمل على تثبيط أنزيم PAO المنقى من السائل المخي الشوكي عند الاطفال المصابين بالتهاب السحايا البكتيريا كليا (24). في حين ثبطت فعالية أنزيم PAO المنقى من ورق النيل بواسطة اوكتا مثيلين ثنائي الامين والكويناكرين، وفي الذرة بواسطة المثبطات Guazatine و1,12-diamino dodecane (25) .

تهدف الدراسة الى تنقية انزيم PAO من ثمرة نبات الفلفل الاخضر، وتثبيطه بعقاري الاميلورايد والميدوفير، فضلا عن تشخيص مركبات PA وتقدير الاحماض الامينية القاعدية.

المواد وطرائق العمل

1. **النبات المستخدم:**

الاسم العربي: الفلفل الاخضر
الاسم الانكليزي: Green pepper
الاسم العلمي: *Capsicum grossum* (1)

2. تحضير المستخلص الخام: وزن 50 غم من نبات الفلفل الأخضر الطازج، وسحق بأستخدام ألة الثرم Blender لمدة 10 دقائق ومزجت مع الماء المقطر بنسبة (3:1) وزن:حجم وبعدها جمد المستخلص بإضافة النتروجين المسال ثم ترك يذوب عند درجة حرارة الغرفة. كررت العملية ثلاث مرات بعد ذلك حرك الخليط لمدة ساعتين بواسطة المحرك الكهربائي مع مراعاة التبريد في حمام ثلجي. بعد ذلك رشح الخليط من خلال عدة طبقات من الشاش وفصل الجزء الرائق من الخليط باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد وبسرعة 3000xg لمدة 5 دقائق. جمع الجزء الرائق واعتبر كمستخلص خام وحفظ لإجراء الاختبارات اللاحقة.

تقدير تركيز البروتين: لقد قدر تركيز البروتين في مراحل التنقية باتباع طريقة لوري المعدلة (25) والتي تعتمد على تقدير امتصاصية المحاليل عند الطول الموجي 650 نانوميتر. وأعتمد المنحني

القياسي لتراكيز مختلفة من بروتين المصل البقري تراوحت بين 0–240 مايكروغرام/مل لتقدير تركيز البروتين في المستخلصات المختلفة.

قياس فعالية انزيم PAO :

قيست فعالية انزيم PAO باتباع الطر يقة المحورة(22،27) حيث تتضمن أكسدة مادة الاساس، سبرمدين بتركيز 100mM بوساطة انزيم PAO وباستخدام محلول بوتاسيوم فيري سيانيد الذي يعمل كمستقبل للالكترونات بتركيز 100mM 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:

تمت التنقية الجزئية لانزيم PAO من ثمرة نبات الفلفل الأخضر بعد قياس الفعالية بالخطوات التالية:

1. الفرز الغشائي Dialysis : وضع 10مل من المستخلص الخام في كيس الفرز الغشائي الذي يسمح بالجزيئات ذات الاوزان الجزيئية الاقل من 10kD بالنفاذ من خلاله مقابل المحلول المنظم pH7.2 لمدة 12 ساعة بدرجة 4 م° مع التحريك باستخدام المحرك المغناطيسي وتغيير المحلول كل ثلاثة ساعات. قيست فعالية الانزيم وتركيز البروتين للعينة بعد عملية الفرز الغشائي (28).

2. كروماتوغرافيا التبادل الأيوني: استخدم المبادل الايوني السالب DEAE– سيليلوز في تنقية الانزيم (23) باضافة العينة الناتجة من عملية الفرز الغشائي 10 مل من اعلى عمود الفصل المعبأ بـ DEAE– سيليلوز بطول40 سم وقطر 2.5 سم، واستخدم المحلول المنظم Na_2HPO_4-KH_2PO_4 بتركيز 20 mM عند pH=7.2 اجريت العملية عند درجة حرارة4م° بمعدل جريان1مل/دقيقة وجمعت الأجزاء الناتجة من عملية الفصل يدوياً. تم قياس البروتين والاستدلال على القمة البروتينية الحاوية على فعالية انزيم PAO من خلال قياس فعالية الانزيم. جفدت حزم الانزيم الناتجة من التبادل الايوني باستخدام جهاز التجفيد lyophilizer .

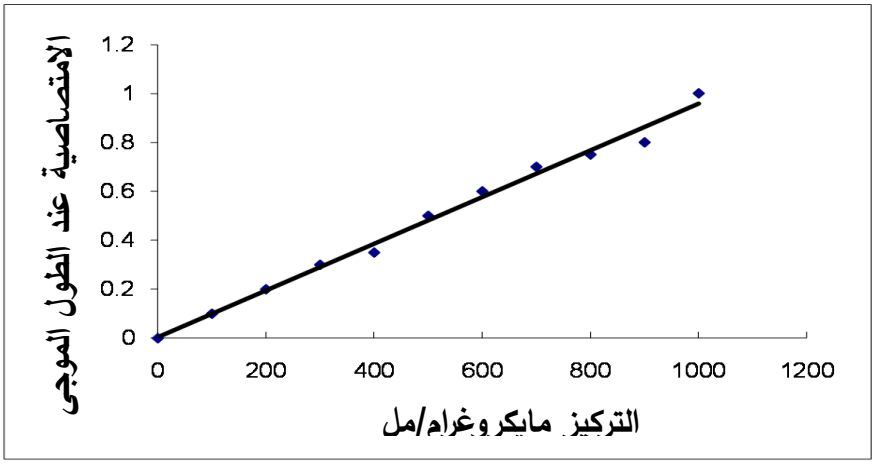
الخصائص الحركية لأنزيم PAO المنقى: درس تأثير بعض العوامل على فعالية الأنزيم، كتأثير تركيز الأنزيم، درجة الحامضية، ودرجات الحرارة المختلفة، فضلا عن تأثير تراكيز مختلفة للمادة الأساس،خصوصية الأنزيم تجاه مركبات أمين مختلفة وتأثير بعض المركبات على الفعالية الانزيمية.

تقدير النحاس بأستخدام جهاز مطياف الأمتصاص الذري: قدر النحاس الذي يترافق مع الانزيم المنقى والمجفد، باستخدام جهاز مطياف الامتصاص الذري عند طول موجي 324.8 نانوميتر.

تثبيط فعالية إنزيم PAO: اتبعت طريقة Befani وجماعته (29) لدراسة تثبيط فعالية إنزيم PAO بواسطة العقارين الأميلوراید والميدوفير. استخدمت تراكيز مختلفة من المادة الاساس (السبرمدين) لدراسة نوع التثبيط .

فصل وتقدير الاحماض الامينية القاعدية

فصلت الأحماض الأمينية القاعدية من مستخلص الخام للفلفل الأخضر باستخدام طريقة الباحث Kakimoto وجماعته(30) باستخدام المبادلات الايونية Amberlit IR -120 H^+(100-200)mesh و Amberlit IR-50 NH^+_4 (100-200) mesh، اتبعت طريقة الباحثين Greenstein & Wintiz (31) في التقدير الكمي للأحماض الامينية القاعدية المفصولة بتحضير المنحنى القياسي باستخدام الحامض الاميني الارجنين كمادة قياسية شكل (1).



تشخيص مركبات متعددة الامين في الفلفل الأخضر باستخدام تقنية كروماتوغرافيا السائل عالي القدرة

حضرت العينة والمركبات القياسية للتحليل بجهاز HPLC وذلك باستخدام عمود فصل بقطر 4.6 ملم وارتفاع 25 سم والمحشو بسليكا CH_3 Si $(CH_3)_{17}$ الذي يعرف بعمود الفصل (C_{18}) كما جاء في المصدر (32).

النتائج والمناقشة

قدرت فعالية انزيم PAO في مستخلص خام الفلفل، وتبين وجود فعالية لهذا الأنزيم مقدارها 0.14 وحدة أنزيمية/مل، وفعالية نوعية قدرها 0.20 وحدة أنزيمية/ملغم بروتين، وقد لاحظ الباحث Percivel (33) أن معدل الفعالية النوعية لهذا الأنزيم في المستخلص الخام للخيار كانت 0.33 وحدة انزيمية/ ملغم بروتين، كما وجد أن الفعالية النوعية لانزيم PAO في خام نبات Water hyacinth كانت 0.08 وحدة أنزيمية/ملغم بروتين (34).

تنقية انزيم PAO

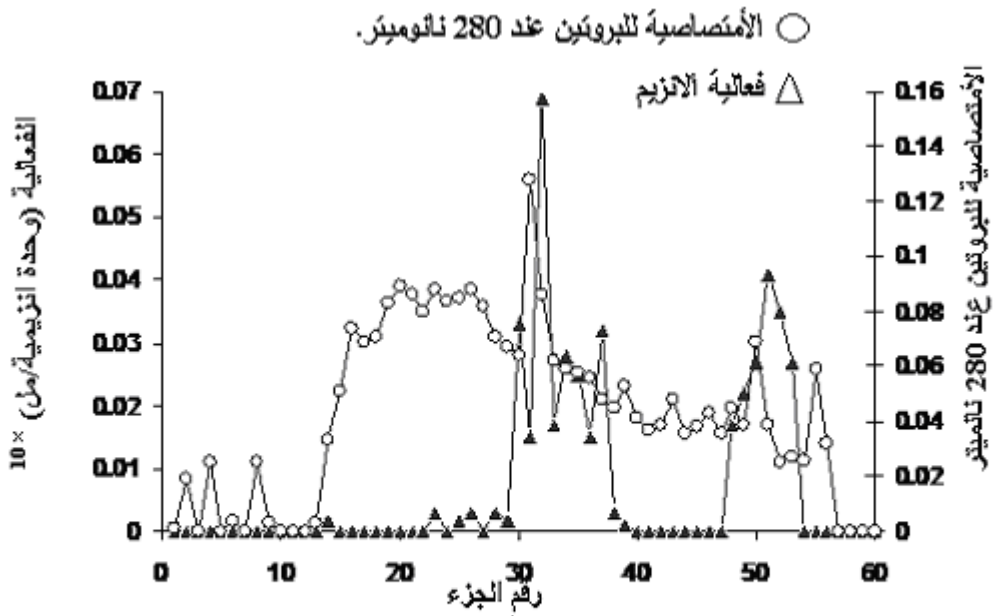
اشارت النتائج المبينة في الجدول(1) ان الفعالية النوعية لانزيم PAO بعد عملية الفرز الغشائي أصبحت 0.32 وحدة أنزيمية/ملغم بروتين. أي ان عملية الفرز الغشائي زادت من نقاوة الانزيم بمقدار 2.5 مرة مقارنةً بالمستخلص الخام، وقد تعود زيادة الفعالية النوعية للأنزيم PAO الى التخلص من المركبات صغيرة الوزن الجزيئي مثل بعض الاحماض الأمينية والببتيدات والايونات والتي يمكن ان تحيط بالموقع الفعال فتؤثر على فعالية الانزيم.

أشار نموذج الروغان المستحصل بواسطة كروماتوغرافيا التبادل الايوني الى وجود قمتين متميزتين تمتلكان فعالية لانزيم PAO (شكل2). ظهرت القمة الأولى (peak1) عند حجم روغان 150–185 مل وبفعالية نوعية مقدارها 3.9 وحدة انزيمية/ملغم بروتين، أي انها تضاعفت بمقدار 21.4 مرة مقارنةً بالفعالية الكلية للأنزيم الخام. ظهرت القمة الثانية (peakII) عند حجم روغان 245–265 مل وبفعالية نوعية مقدارها 2.6 وحدة انزيمية/ملغم بروتين أي أنها تضاعفت بمقدار 14.3 مرة مقارنةً بالفعالية الكلية للأنزيم الخام. ان هذه النتائج تتفق مع ماوجده الباحث (33)، اذ لاحظ ان هناك قمتين متميزتين لأنزيم PAO بعد تنقية خام الخيار بتطبيق كروماتوغرافيا التبادل الايوني. كما تتفق مع نتائج الباحث Cervelli وجماعته (35) اذ لاحظوا وجود متماثلين من انزيم PAO في الشعير. من الجدير بالذكر أن الباحث Kitashiba (36) لاحظ وجود قمتين متميزتين لهذا الانزيم في التفاح تمتلك كل منها فعالية عالية نسبياً.

جدول (1) خطوات تنقية أنزيم PAO من الفلفل الأخضر

خطوات التنقية	الحجم الكلي (ملي لتر)	البروتين الكلي (ملي غرام)	الفعالية الانزيمية الكلية (وحدة انزيمية*)	الفعالية النوعية (وحدة أنزيمية/ملي غرام بروتين).	عدد مرات التنقية	أسترجاع الفعالية %
الأنزيم الخام	10	9.7	1.4	0.186	-	100
الفرز الغشائي	12	7.4	2.4	0.32	1.73	162.1
التبادل الايوني						
PeakI	40	3.3	13.5	3.9	21.4	912
PeakII	30	2.8	7.7	2.6	14.3	520

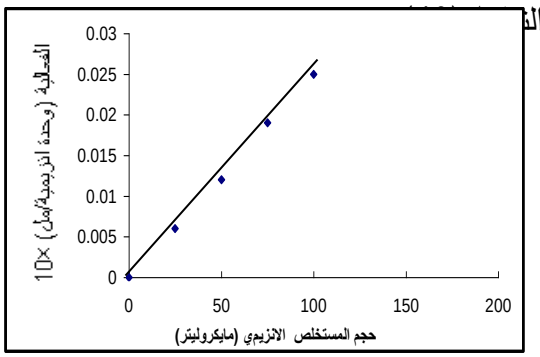
***الوحدة الأنزيمية U تشير الى كمية الأنزيم التي تؤكسد مايكرومول واحد من المادة الاساس (السبرمدين) في الدقيقة الواحدة .**



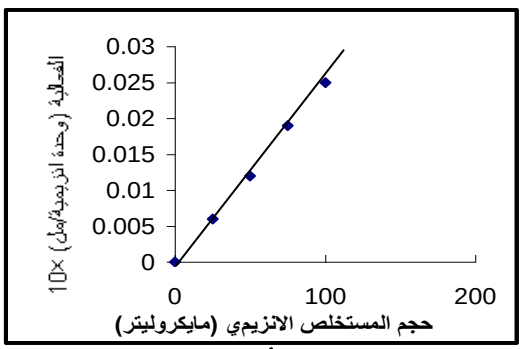
شكل (2) : نموذج الروغان المستحصل من تنقية أنزيم PAO من الفلفل الأخضر بوساطة التبادل الأيوني.

دراسة الخصائص الحركية لأنزيم PAO بعد التنقية الجزئية

درس تأثير تركيز الأنزيم (PAOI و PAOII) على سرعة التفاعل باستخدام حجوم مختلفة من المتماثلات المجفدة تراوحت بين 25–200 مايكروليتر (تركيز البروتين بين 0.2–0.3 ملغم/مل)، وأشارت النتائج الموضحة في الشكلين 3 و4 ان زيادة حجم الأنزيم لحد 100 مايكروليتر ادى الى زيادة سرعة التفاعل الأنزيمي وبشكل خطي، وأن هذه النتيجة مماثلة لما وجد عليه أنزيم PAO في خام حليب الأمهات (37)، وفي خلايا الدم الحمراء للأشخاص المصابين بالفصام (38)، وكذلك للانزيم المفصول من الشاي الاخضر (39). وبذلك يمكن القول ان معدل سرعة التفاعل المحفز بالانزيم تتناسب طردياً مع تركيز الانزيم عندما تكون المادة الاساس موجود بوفرة في محيط

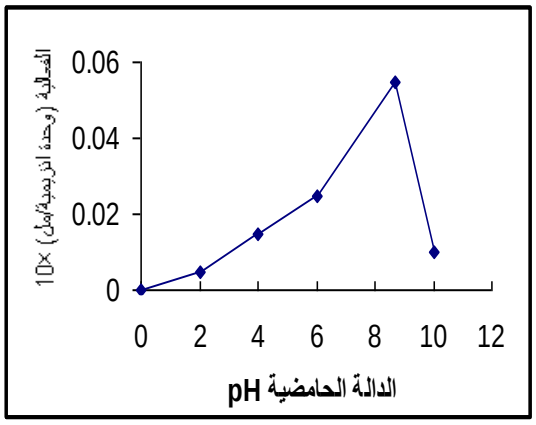


الشكل (3) : تأثير حجم المتماثل PAOI على سرعة التفاعل

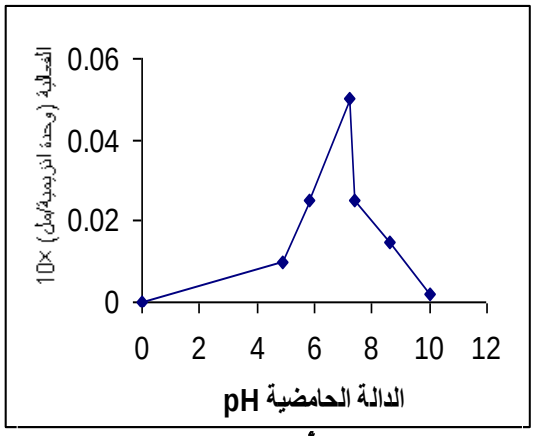


الشكل (4) : تأثير حجم المتماثل PAOII على سرعة التفاعل

كما درس تأثير الدالة الحامضية على فعالية كلا المتماثلين PAOII, PAOI باستخدام محلول فوسفات الصوديوم المنظم بتركيز 20 ملي مولار وبمدى حامضية 4.9–10 ، ويبين الشكل 5 ان أفضل دالة حامضية للمتماثل الأنزيمي PAOI هي 8.6. ان هذه الدالة الحامضية مقاربة للدالة الحامضية المثلى للمتماثل الأنزيمي PAOI المفصول من الخيار وكانت 8.7 (33)، أما المتماثل الأنزيمي PAOII فكانت الدالة الحامضية المثلى له 7.2 الشكل6، وهذه القيمة تتفق مع قيمة الدالة الحامضية المثلى لانزيم PAO في الخيار pH7.0 بأستخدام ذات المحلول المنظم (33) ، في حين وجد ان الدالة الحامضية المثلى لأنزيم PAO المنقى من نبات Water Hyacinth كانت 6.5 (34) وفي نبات العدس كانت 7.9 (41) .



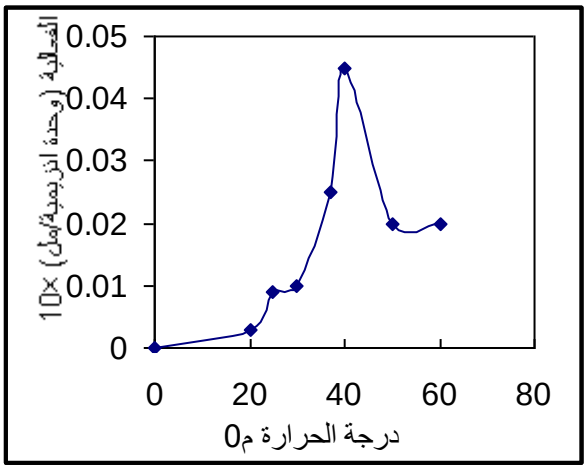
الشكل (5) : تأثير الدالة الحامضية على فعالية المتماثلPAOI



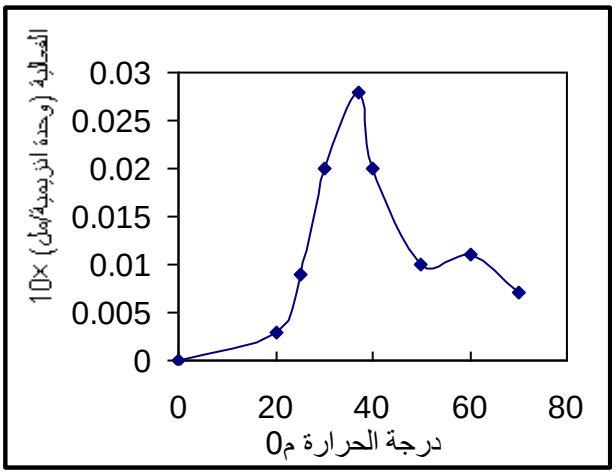
الشكل (6) : تأثير الدالة الحامضية على فعالية المتماثلPAOII

قد تكون هناك شحنات كهربائية لمجاميع R المتأينة بالقرب من الموقع الفعال للأنزيم عند قيم pH عالية أو واطئة مما يؤدي الى وجود اواصر أيونية أو تجاذب أو تنافر كهربائي من شأنه ان يعمل على زيادة او تقليل او منع اقتران المادة الاساس بالانزيم وبهذا فأن لكل انزيم رقم هيدروجيني معين يدعى الرقم الهيدروجيني الامثل (42)

درس تأثير درجة الحرارة على فعالية انزيم PAO المفصول من الفلفل الاخضر وأشارت النتائج المبينة في الشكل 7 ان زيادة درجة الحرارة أدت الى زيادة واضحة في فعالية المتماثل PAOI بلغت اقصاها عند درجة 40 م° بينما أظهر المتماثل الأنزيمي PAOII أعلى فعالية عند درجة 37 م° الشكل 8 وهي بذلك أعلى من الدرجة الحرارية المثلى لأنزيم PAO المفصول من الشاي الاخضر البالغة 30 م°(39)، واقل من درجة الحرارة المثلى لانزيم PAO المفصول من الشعير والتي تراوحت بين50-60 م° (43).



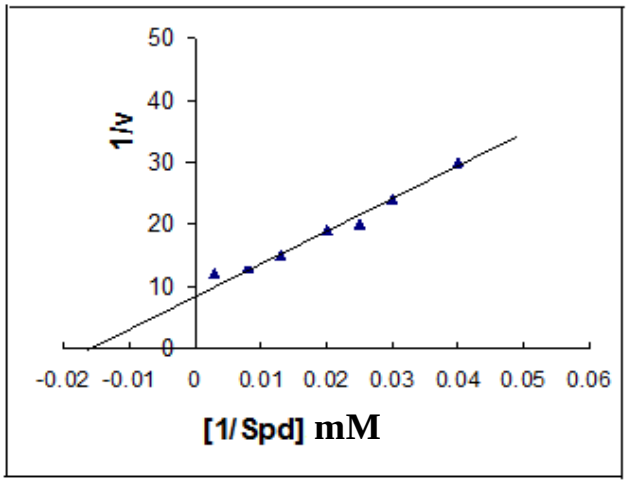
الشكل(7) تأثير درجة الحرارة على فعالية المتماثل PAOI



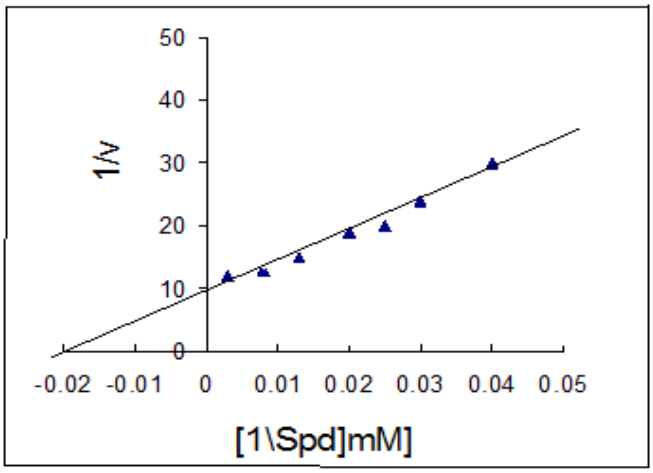
الشكل(8) تأثير درجة الحرارة على فعالية المتماثل PAOII

ان ارتفاع درجة الحرارة تزيد الطاقة الحركية للانزيم فتزيد من تقارب الانزيم مع المادة الاساس مما يسبب زيادة سرعة التفاعل ، ولكن عند تعرض الانزيم لدرجات حرارية عالية أعلى من القصوى والتي تكون غالباً أكثر من 50 م° فان ذلك يمكن ان يؤدي الى مسخ البروتين من خلال تفكك الأواصر الهيدروجينية وبعض القوى الأخرى المسؤولة عن ثباتية الأنزيم مؤدياً الى فقدان فعاليتها وانخفاضها تدريجياً (40).

وفي دراسة تاثير تركيز المادة الاساس السبرمدين على سرعة تفاعل متماثلي الانزيم PAOI وPAOII وجد انها موافقة لمعادلة ميكايليس منتن. ومن خلال معادلة لينويفير – بيرك Linewaver- Burk وجد ان قيمة ثابت مايكيلس_منتن Km 58.8 ملي مولار و 50 ملي مولار، في حين كانت قيمتي السرعة القصوى Vmax 0.12 و0.1 وحدة انزيمية/مل للمتماثلين على التوالي الشكل 9 و 10.



شكل (9) تاثير تركيز المادة الاساس على فعالية المتماثل PAOI



شكل (10) تاثير تركيز المادة الاساس على فعالية المتماثل PAOII

لقد وجد ان قيمة Km لانزيم PAO الشعير 0.003 ملي مولار باستخدام السبرمدين كمادة اساس(35)، بينما لوحظ ان قيمة Km لانزيم PAO تساوي 28 مايكرومولار بوجود السبرمدين كمادة اساس (34) كما وجد ان قيمة Km لانزيم PAO الشاي الاخضر 2 ملي مولارعند استخدام السبرمين (39).

كما درست خصوصية المتماثلين PAOI و PAOII بوجود مواد اساس مختلفة (السبرمدين والسبرمين والتربتامين والكادافرين والبيوتايل امين والبنزايل امين والهكسايل امين)، وتبين أن المتماثل الانزيمي PAOI قد أظهر أعلى فعالية بوجود السبرمدين، يليه الكادافرين ثم السبرمين ، اما المتماثل الانزيمي PAOII فقد اظهر اعلى فعالية بوجود السبرمدين يليه التربتامين والسبرمين. وقد لاحظ Federico وجماعته (20) أن أعلى فعالية لأنزيم PAO المستخلص من بذور الحمص كانت مع السبرمدين والسبرمين و كما تبين أن أنزيم PAO المنقى من حبوب الشعير يمتلك خصوصية تجاه السبرمدين والسبرمين كمادة أساس (35) .

التأثير التثبيطي لبعض المركبات على فعالية الأنزيم

درس تأثير المثبطات الموضحة في الجدول 2 على متماثل انزيم PAOI وPAOII والتي عرفت بأنها تكون معقدات مع الأيون(44). اشارت النتائج الموضحة في الجدول 2 ان هذه المركبات أظهرت تأثيراً متفاوتاً، اذ اظهر EDTA تأثيراً تثبيطياً وبنسبة93.3% للمتماثل PAOI و 92.3% للمتماثل PAOII، في حين وجد الباحث العباسي وجماعته (39) ان المركب EDTA بتركيز 1 ملي مولار ادى الى تثبيط كلي بنسبة 100% لانزيم PAO المنقى من الشاي الأخضر وهذا عكس ما لوحظ لانزيم PAO في نبات ورد النيل Water hyacinth من عدم تأثير فعاليته بالمركب EDTA بتركيز 10 ملي مولار (34).

جدول (2) : تأثير بعض المثبطات على فعالية المتماثلين PAOI وPAOII

المثبط 1ملي مولار	الفعالية الانزيمية وحدة أنزيمية/مل	التأثير التثبيطي %	الفعالية الانزيمية وحدة أنزيمية/مل	التأثيرالتثبيطي %
–	PAOI	PAOI	PAOII	PAOII
السيطرة	8.6	0.00	5.2	0.00
فنيل هيدرازين	0.00	100	0.00	100
EDTA	0.54	93.7	0.4	92.3
ازيد الصوديوم	4.8	44.1	4.0	23.0
فلوريد الصوديوم	3.7	56.9	1.2	76.9
أيودواسيتاميد	3.2	62.7	1.2	76.9

ادى المركب فنيل هيدرازين phNH2-NH2 الى تثبيط كلي للمتماثلين PAOI و PAOII وبمقدار 100 % وهذه مقاربة لانزيم PAO في مستخلصات البكتريا حيث تم تثبيطه بمقدار 80 % بوساطة المثبط فنيل هيدرازين(45) ، وهذا عكس ماوجد لأنزيم PAO المستخلص من نبات ورد النيل Water hyacinth اذ لم تتأثر فعاليته بالمثبط فنيل هيدرازين (34).

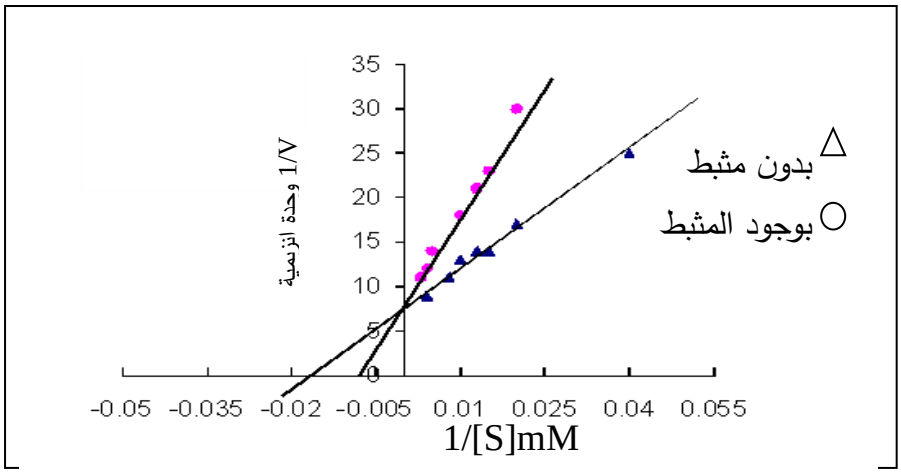
تقدير النحاس بأستخدام جهاز مطياف الأمتصاص الذري :

أشارت النتائج التي تم الحصول عليها باستخدام جهاز مطياف الامتصاص الذري لمتماثلي انزيم PAO الى وجود ايونات النحاس في كليهما، وبتركيز 0.1915 و 0.2947 ملغم/مل على التوالي، ما يشير أن أيون Cu^{+2} يلعب دوراً في فعالية الانزيم. ويعد ايون النحاس مرافق لانزيم MAO وPAO (46،47). ان احدى ألليات العامل المساعد بواسطة المعادن هو ان الشحنة الموجبة في المعدن تعمل على أستقرارية الحالة الأنتقالية بفعل التجاذب الألكتروستاتيكي وبالتالي تمكن الأيونات من المساهمة في عمل الأنزيم بطرائق مختلفة منها أن الأيونات تعمل على تقريب الأنزيم والمادة الأساس من بعض بوساطة الأواصر التناسقية أو أنها تعمل على استقرارية التركيب الفعال للأنزيم (40) .

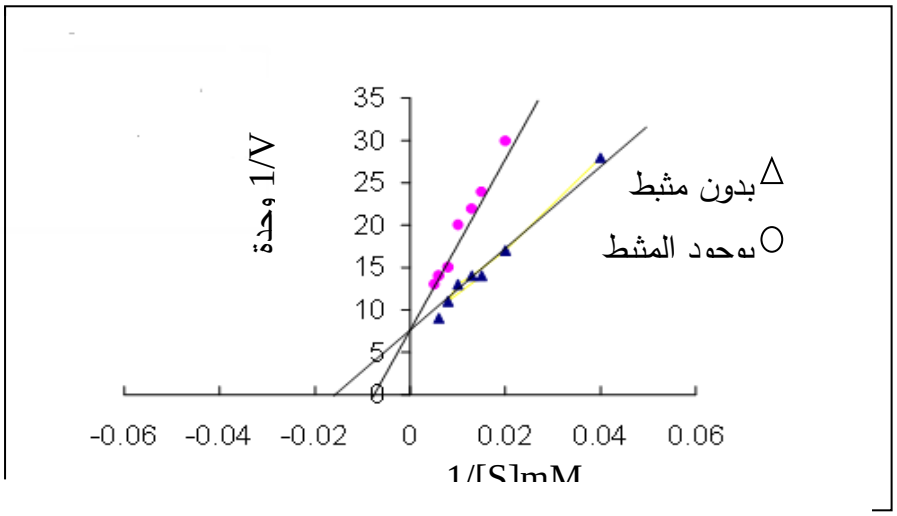
تأثير عقاري الاميلورايد والميدوفير على فعالية انزيم PAO المنقى جزئيا:

درس تأثير العقارين الأميلورايد والميدوفير على فعالية المتماثل الانزيمي الاول PAO I ، ووجد ان لهذين العقارين تاثير تثبيطي للفعالية الانزيمية، ظهرت الفعالية بنصف قيمتها القصوى تقريبا عند التركيز 0.6 و 1 ملي مولار للعقارين اعلاه على التوالي. لذا يمكن القول ان التأثير التثبيطي لهذين المركبين تجاه انزيمات بولي أمين أوكسيديز قد يأتي من صيغتها التركيبية التي من المحتمل ان تعمل على أشغال الموقع الفعال أو جزء منه، كما وقد يعزى السبب الى وجود مجاميع الامين التي يعمل عليها أنزيم PAO والتي تكون موجودة في تركيب المادة الاساس التي يعمل عليها الانزيم.

تبين من خلال رسم لينويفر–بيرك ان نوع التثبيط كان تنافسيا باستخدام هذين العقارين. حيث تغيرت قيم ثابت ميكايلس–مينتون Km من 58.8 ملي مولار الى 100 ملي مولار والتي تمثل القيمة الظاهرية Km' في حين بقيت قيمة Vmax ثابتة لم تتغير وقيمتها0.121 وحدة انزيمية / مل كما مبين لكلا العقارين اعلاه. كما وجد ان قيمة ثابت التثبيط Ki 0.88 و1.1 ملي مولار للعقارين على التوالي الشكلين 11 و12.



الشكل (11) رسم لينويفير – بيرك موضحاً تأثير الاميلورايد بتركيز 0.6 ملي مولار على فعالية المتماثل الأنزيمي PAOI



الشكل (12) رسم لينويفير – بيرك موضحاً تأثير الاميلورايد بتركيز 0.6 ملي مولار على فعالية المتماثل الأنزيمي PAOI

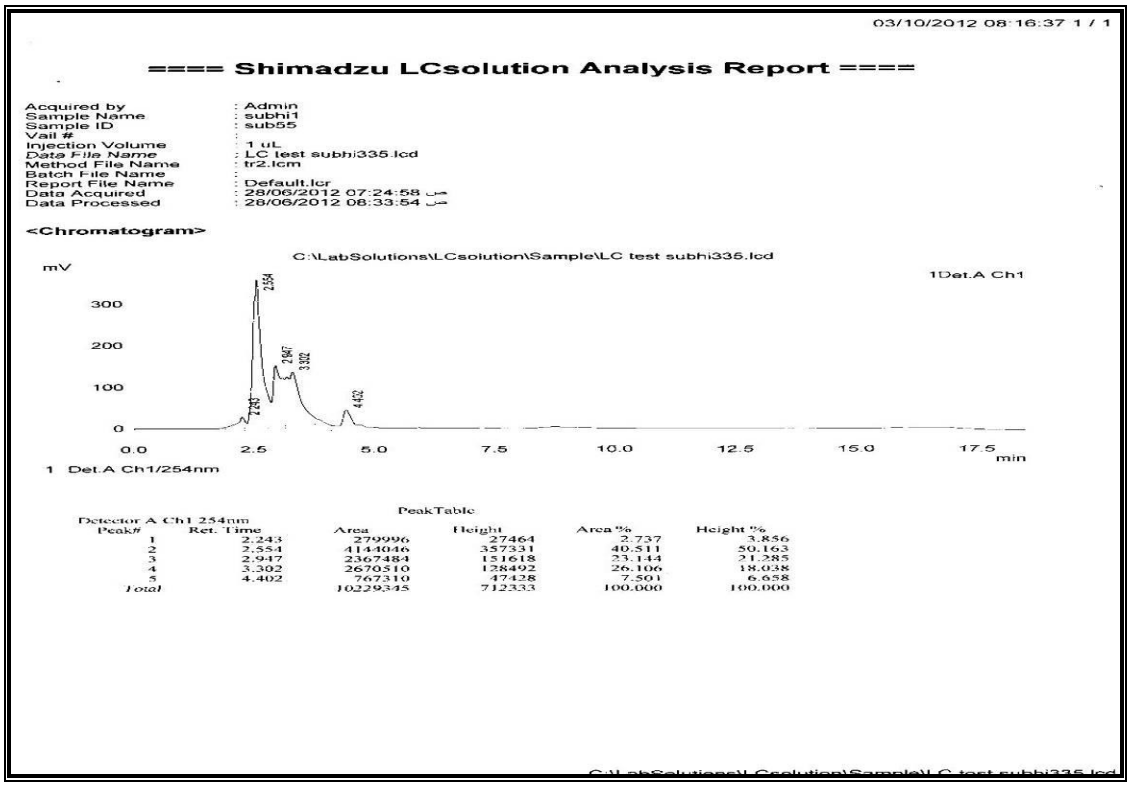
وقد وجد ان نوع التثبيط لفعالية انزيم PAO المنقى جزئيا من مصل دم المصابين بالنوع الثاني من داء السكر باستخدام فيتامين E وعقار الميتفورمين تنافسيا وان قيمة ثابت التثبيط Ki بلغت 3.66 و 3.25 ملي مولار. في حين بقيت قيمة السرعة القصوى 0.020 وحدة انزيمية / مل ثابتة لم تتغير (48). من دراسة خصائص التثبيط لكل من عقاري الاميلورايد والميدوفير في الدراسة الحالية تبين ان قيمة Ki عند استخدام المثبط الاميلورايد اقل من تلك للمثبط الميدوفير. وهذا يشير الى ان الاميلورايد ذو تاثير تثبيطي اكبر على فعالية انزيم PAO مقارنة بالميدوفير.

فصل وتقدير الاحماض الامينية القاعدية :

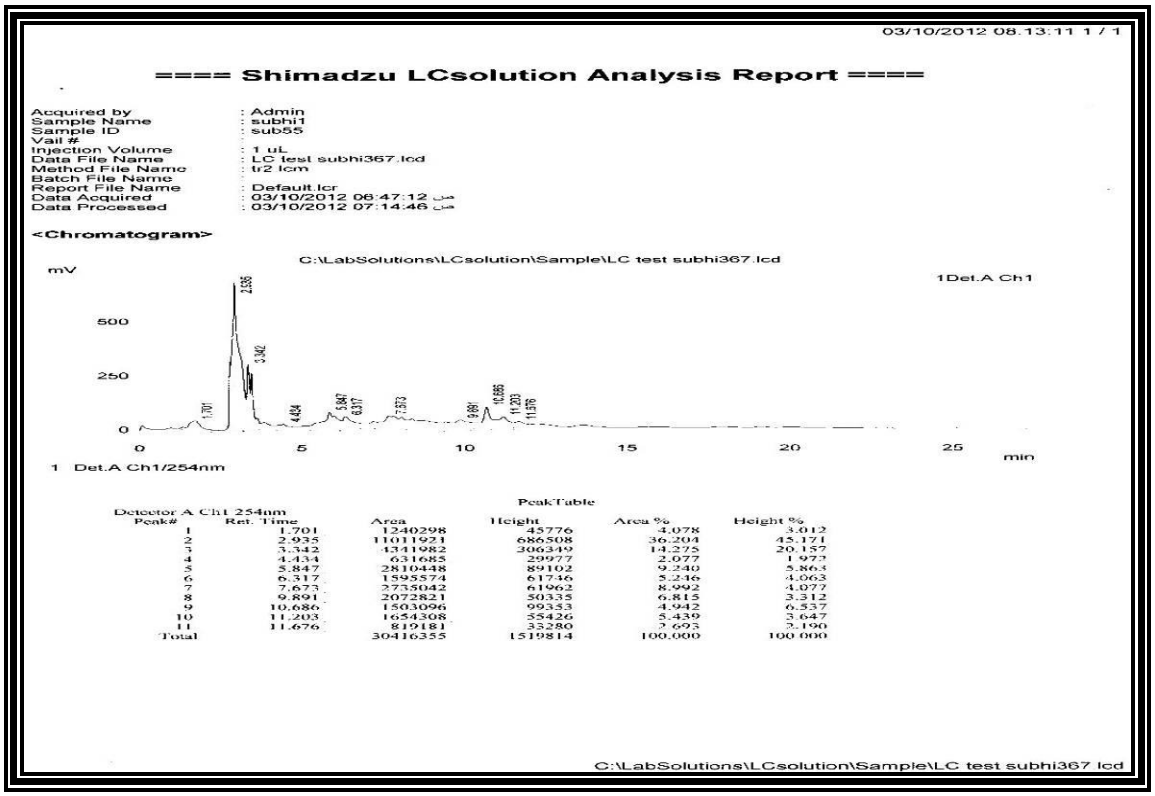
اشارت النتائج الى ان محتوى النبات من الأحماض الأمينية القاعدية هو96.1 ملغم/غم من النبات، وقد تمكن الباحث اللهيبي وجماعته (49) من فصل الحامض الاميني القاعدي Arginine من بذور العدس، اذ تبين ان تركيز الاحماض الامينية القاعدية المفصول من بذور العدس هي 56.5 ملغم / غم من النبات.

تشخيص الـ Spm في ثمرة نبات الفلفل الاخضر بتقنية الـHPLC

تشير النتائج المبينة في الشكل 13 الى ظهور حزمتين رئيسيتين عند زمن احتباس 2.5 و2.9 دقيقة بالنسبة للمادة القياسية Spm، وبينت نتائج تحليل نموذج نبات الفلفل الاخضر الموضح في الشكل 14 وجود حزمة اساسية تعود لمركب Spm، كما يلاحظ في الشكل ذاته ظهور عدة حزم يمكن ان يعزى ظهورها الى وجود مركبات متعددة أمين اخرى .



الشكل (13) : كروماتوغرام المادة القياسية السبرمين



الشكل (14): كروماتوغرام مركبات متعددة الامين المفصولة من الفلفل الاخضر

Study of Characterization and inhibition of partially purified Polyamine Oxidase from Green Pepper by Amiloride and Medovire drugs

Dr. Wathbaa E.A **Moheeb J.M**
Chem. Dept., College of Education, Mosul university

المصادر

1) خليفة ، حسن. " جنة الاعشاب ". دار الاسراء للنشر والتوزيع – المملكة الاردنية الهاشمية . الطبعة الثانية ص 233 (2011).
2) Bosland P.W. and E.J.Votava."Peppers; Vegetable and spice capsicums".CAB1 Publishing , Oxn , Uk and New York.p204 (2000).
3) Igarashi K. and Kashiwagi K., J.Bio.,139:11-16(2006).
4) Wallace I.M., Fraser A.V. and Hughes A ., Biochemistry,376(3):1-14 (2003).
5) Wang C.J., Delcrose J.G., Cannon L., Konate F., Carias H., Bioggerstaff J., Gardner R.A . and Phanstiel O., J.Chem. Med., 46:5129- 5138 (2003).
6) Haggag W.M., Ach.V. J.Plant Prot., 42(1): 16-31 (2009).
7) Zhang W ., Jian B., Li W ., Song H ., Yu Y.and Chen J., Scientia Horticulturae,122:202-208 (2009).

8) Larque E ., Sabater - Molina A . and Zamor S., Nutrition, 23:87-95 (2009).
9) Binh P.N., Soda T., Maruyama C.,Kawakami M., Health., 2:1327-1334 (2010).
10) Nishimurea K., Kashiwagi S.K. and Igarashi K., J. Bioche., 139:81-90 (2006).
11) Szepessi A .,Gemes K ., Orosz G., Peto A .,Takacs Z. and Vorak G., Acat Biologica Szeqediensis,55(1):165-166 (2011).
12) Kalac P . and Krausova P., Food chemistry, 90:219-230 (2005).
13) Binda C., Coda A., Angelini R., Federico R., Ascenzi P. and Mattevi A., Acta-crystallogr-D-Biol. Crystallogr., 54(2): 1429-1431 (1998).
14) Murrau-Stewart B., Wang Y., Devereux W. and Casero R.A., Biochem. J ., 368 : 673-677 (2002).
15) Cona A., Cenci F., Cervelli M., Federico R., Mariottini P., Moreno S. and Angelini R., Plant Physiol.,131:803-813 (2003).
16) Liu J . and Liu Y.L., J. Plant Physiol.Mol.Biol., 30:141-146(2004).
17) Cervelli M., Bianch M., Cona A., Crosatti C., Stanca M., Angelini R., Fedreico R. and Mariottini P., FEBS J., 273:3990-4002(2006).
18) Luhova L., Lebeda A., Hedererova D. and Pec P., Plant Soil Environ., 49 (4) : 151-157(2003).
19) Liz C., Phytochemistry, 34(3): 611-612 (1993).
20) Federico R., Angelini R., Cona A. and Niglio A., Phytochemistry, 31 (89) 2955- 2975 (1992) .
21) Majumder S. and Kierszenbaum F., Mol. Biochem. Parasitol., 60(2) 231-240(1993).
22) Flayeh K.A., Clin. Chem., 34:2401-2403(1988).
23) Flayeh K.A. and Wallace H.M., Biochem.Sco.Trans.,18:1225 (1991).
24) Al-Abbasy O.Y., M.Sc. Thesis, College of Education, University of Mosul, (2003). (In Arabic).
25) Xue B., Zhang A., and Jiang M., J . Integr. Plant Biol. , 10:111.(2-10) (2008).
26) Scharcterle G.R. and Pollack R.L. (1973)., Anal. Biochem., 51: 645-655.
27) Dahel K., Flayeh K.A . and Al- Saffar N.M. Neurochem. Res., 26(4):415-418. (2001).
28) Robyt F.J. and White J. B. "Biochemical techniques ,theory and Practice". Brookes/Cole publishing company, Monterey, California. (2001).

29) Befani O ., Grippa E ., Sasol M ., Turini P. and Mondovi B., Inflamm . Res., .50 : 136-137. (2001).
30) Kakimoto Y., J. Biol. Chem., 244: 6003-6007. (1969)
31) Greenstein J . and Winitz M . "The chemistry of amino acid colorimetric method photometric ninhydrin ". John Wiley and sonslus,2:1309- 1310. (1961).
32) Liu J ., Fu H. Bei Q . and Luan S. Plant Physiol.,124:1315-1325. .(2000).
33) Percival F.W.and Purves W.k. Plant Physiol . 54: 601-607. (1974).
34) Yangisawa H., Kato A., Hoshiai S., Kamiya A. and Torii N. Plant Physiol., 85:906-909.(1987).
35) Cervelli M., Cona A., Angelini R ., Polticelli F., Federico R . and Mariottini P. Eur. J. Biochem., 268(13) : 3816-3830. (2001).
36) Kitashiba H., Honda C., and Moriguchi T.Plant Biotechnology, 23:425-429. (2006).
37) AL-Katib, S.M., PhD. Thesis. College of Education, University of Mosul, (2000). (In Arabic).
38) AL-Jobury T.Y., M.Sc. Thesis. College of Education, University of Mosul, (2002). (In Arabic).
39) العباسي ، عمر يونس محمد، السعدون، محمد بحري حسن، البجاري، شهاب أحمد يوسف . مجلة تكريت للعلوم الصرفة ،مجلد 14 عدد2 (2007).
40) احمد، طارق يونس و الهلالي ، لؤي عبد علي . " الكيمياء الحياتية " . الجزء الأول ، دار ابن الأثير للطباعة والنشر ، الموصل ، ص278 (2010).
41) Cogoni A.,Padiglia A., Medda R., Segni P.and Floris G. Plant Physiol ., 95: 477-479 .(1990).
42) أل فليح ، خولة احمد . . " مدخل الى الكيمياء الحياتية ". دار ابن الأثير للطباعة والنشر الطبعة الثالثة ، جامعة الموصل ص 241 (2006).
43) Smith T .A., Endeavoure.,31:22-28.(1972).
44) Stephen H.F, Keith L.M., Georg I.H.H.and Frank R.N.G. .Biochemistry.19:3039-3047(1980).
45) Tabor C.W. and Kellogg P.D., J. Biol. Chem., 245: (20)., 5424-5433 (1970).
46) Tisi A ., Angelini R.and Cona A., Plant Sig. Beh.3(3):204-206 (2008).
47) Belleli A ., Morpurgo L., Mondovi B . and Agostinelli E. Eur .J.Biochem., 267:3264-3269. (2000)
48) العباسي ،عمر يونس محمد. مجلة تكريت للعلوم الصرفة .15(3):88- 95 (2010).
49) اللهيبي ، نشوان ابراهيم عبو.، توحلة ، وثبة ادريس علي.،الطائي ، اسراء سهل احمد. مجلة تكريت للعلوم الصرفة . مجلد 15 عدد (2) (2009).