------- مجلة علوم الرافدين، المجلد 23، العدد 4، ص 137-157، 2012 -------

فصل ودراسة بعض الصفات الحركية لبروتين علامة الشيخوخة- 30 من بلازما الإنسان

لؤي عبد الهلالي **مريم عبد الخالق صالح**

قسم الكيمياء

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2012/2/8 ؛ تاريخ القبول 2012/4/9)

الملخص

تم عزل بروتين علامة الشيخوخة-30 من البلازما لشخص سليم بعمر 25 سنة، كما تمت دراسة بعض العوامل المؤثرة على فعاليته كإنزيم فضلا عن تحديد وزنه الجزيئي. إذ تم فصل حزمة رئيسة واحدة فقط ذات فعالية عالية بتقنية الترشيح الهلامي للراسب البروتيني الناتج عن ترسيب بروتينات البلازما بكبريتات الامونيوم (60%) بعد عملية الفرز الغشائي (الديازة) وفصله بالطرد المركزي المبرد، واستخدمت فيما بعد الحزمة لدراستها وتحديد الوزن الجزيئي لمكوناتها باستخدام تقنية الترشيح الهلامي وكانت بحدود 34672 دالتون.

أظهرت الدراسة ان الظروف المثلى لعمل الإنزيم (SMP-30) كانت عند تركيز (100 مايكروغرام/مل) باستخدام المحلول المنظم الفوسفات بتركيز (0.022 مول/لتر) عند أس هيدروجيني(8) وزمن التفاعل (18 دقيقة) ودرجة حرارة (49°م) بأستخدام تركيز (14 ملي مول/لتر) من مادة الأساس كلوكونولاكتون، وباستخدام رسم لاين ويفر– برك تم إيجاد قيمة السرعة القصوى (V_{max}) وثابت مكياس (K_m) وكانت مساوية لـ (0.65 مايكروموول/دقيقة) و(5.6 ملي مول/لتر) على التوالي. فضلا عن ذلك درس التأثير التثبيطي للعديد من المركبات الكيميائية والدوائية على فعالية الإنزيم، وبينت النتائج أن التأثير التثبيطي لمركبات فينايل فرين وكلوريد الزئبقيك والنيومايسين كانوا من النوع غير التنافسي والكافيين كان من النوع التنافسي اما طبيعة تثبيط ميتا زرنيخات الصوديوم فكان من نوع اللاتنافسي.

الكلمات الدالة: بروتين علامة الشيخوخة - 30، إنزيم كلوكونولاكتونيز.

Separation and Study of Some Kinetic Properties of Senescence Marker Protein -30 in Human Plasma

Luay A. Al-Helaly **Maryam A. Saleh**

Department of Chemistry
College of Science
University of Mosul

ABSTRACT

The research includes the isolation of senescence marker protein-30 (SMP-30) from human plasma of normal young male age 25 year, the factors affecting the activity of the enzyme and determination of its molecular weight. One band had been isolated by gel filtration chromatography from the proteinous supernatant produced by precipitation by ammonium sulfate (60%) after dialysis and separation by cooling centrifuge. Apparent molecular weight of the isolated enzyme using gel filtration chromatography was (34672) Dalton.

The results also showed that the optimum conditions of SMP-30 activity were obtained at (100 µg/ml) of enzyme concentration and phosphate buffer (0.022 mol/l) as a buffer at pH (8) for (18) minutes at (49°C) using (14 mmol/l) of gluconolactone (GL) as a substrate,. Using Line Weaver–Burk plot, the values of maximum velocity (V_{max}) and Michaelis constant (K_m) were (0.65 µmol/ min) and (5.6 mmol/l) respectively. Beside of, the study showed the inhibition effect of some chemicals and drugs on the enzyme activity, Phenylphrine, neomycin and mercuric chloride possessed a noncompetitive inhibition and anhydrous caffein possessed a competitive inhibition and arsenate meta sodium possessed a uncompetitive.

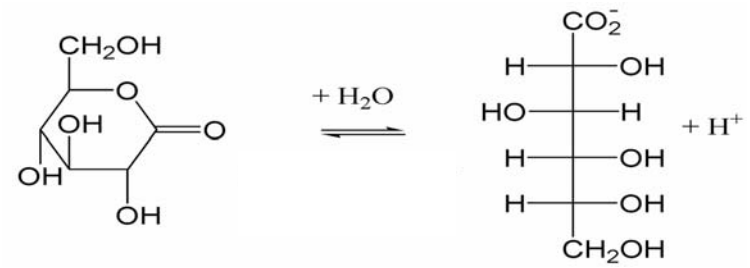
Keywords: Senescence marker protein-30(SMP-30), Gluconolactonase (GNL).

المقدمة

يمتلك بروتين علامة الشيخوخة-30 (Senescence marker protein-30(SMP-30)) وزن جزيئي بحدود 34 كيلو دالتون اذ تم التعرف عليه لأول مرة في كبد الفئران سنة 1992 م وشـخص لـه وظـائف فسيولوجية مختلفة (Maruyama *et al*., 2010)، ويعد SMP-30 من البروتينات المهمة التي لها ادوار مهمة في اتجاهات عدة، منها كونه يعمل كمضاد أكسدة لتقليل حالة الكرب التأكسدي وله دور في تصنيع حـامض الاسكوربيك، فضلا عن كونه من المركبات مزيلة للسمية الناتجة من السموم المختلفة مثـل إزالـة الـسمية لغـازات الأعـصاب (علـى سـبيل المثـال: زومـان Soman وزاريـن Sarin وتـابون Tabun) ومن الوظائف الرئيسة لـ SMP-30، (Billecke *et al*., 1999; K*ondo et al*., 2004; Arun *et al*., 2011) هي تنظيم ضخ الكالسيوم بين الغشاء البلازمي والمايتوكوندريا لمختلف أنواع الخلايا، ويعتقـد ان SMP-30

ينظم فعالية إنزيمات البروتين كاينيز Protein kinase والبروتين فوسفاتيز Protein phosphatase وبناء DNA وRNA في النواة (Yamaguchi, 2005)، أما دوره في الدماغ فانه يحميه ضد التحطم التأكسدي بدون التأثير على الإنزيمات المشاركة في الحماية ضد الأكسدة (Son *et al.*, 2006). ان لـ SMP-30 تركيب ذو ثبوتية عالية عند مختلف أنواع الحيوانات (Fujita, 1999; Fujita *et al.*,1999) ويكون موزع على مختلف الأنسجة التي تشمل: الكبد، الكلية، الدماغ، الخصية، الرئتين، الغدة الادرينالية، المعدة، المبيض، الرحم والبشرة (Feng *et al.*, 2004). ويعد SMP-30 مقياس للشيخوخة ويسمى بعامل الشيخوخة Aging factor وان له دور في حماية الخلايا من التلف Apoptosis (Ishigami *et al.*, 2002).

يمتلك SMP-30 فعالية كإنزيم كلوكونولاكتونيز Gluconolactonase (GNL) (EC 3.1.1.17) والذي يحفز تحويل الكلوكونولاكتون Gluconolactone (GL) الى الكلوكونات Gluconate بوجود الماء (Chakraborti and Bahnson, 2010) وهو من التفاعلات العكسية كما في المعادلة أدناه:



Gluconolactone **Gluconate**

يعد الإنزيم كلوكونولاكتونيز من صنف الإنزيمات المميزة ويمتلك فعالية تحليل الأواصر الاستر كاربوكسيل(Bublitz and Lehninger , 1961) ويمكن ان يشارك في العديد من المسارات الايضية مثل، مسار البنتوز فوسفات وايض حامض الاسكوربيك Ascorbic acid metabolism وتقويض كابرولاكتام Caprolactam degradation (Kondo *et al.*, 2006).

يهدف البحث الى فصل SMP-30 من بلازما الإنسان ودراسة حركيته وتحديد ظروف عمله المثلى والتأثير التثبيطي للمواد الكيميائية والدوائية المختلفة عليه، واستخدامه فيما بعد لدراسة تأثيره على الأمراض المختلفة، اذ لا توجد أي دراسة من هذا النوع تم التطرق لها من قبل الباحثين.

المواد وطرائق العمل

تم فصل وتنقية SMP-30 من بلازما رجل سليم عمره 25 سنة من ساكني مركز مدينة الموصل، مع الأخذ بنظر الاعتبار عدم تناول الأدوية بأنواعها المختلفة خلال فترة اخذ العينة من كل منهما، وأجريت خطوات التنقية الآتية :

1. ترسيب البروتين بالإزاحة الملحية Protein precipitation by salting out

استخدمت كبريتات الامونيوم وبدرجة تشبع 60% لترسيب البروتين بالإزاحة الملحية (Robyte and White, 1987)، اذ تم إضافة كبريتات الامونيوم بحالتها الصلبة إلى البلازما، وكانت الإضافة بصورة تدريجية مع التحريك المستمر بالمحرك الكهربائي لمدة 60 دقيقة عند درجة حرارة 4 °م، ومن ثم ترك المحلول مدة 24 ساعة في الثلاجة ليتم ترسيب البروتينات.

2. الفصل بالطرد المركزي المبرد Cooling centrifuge separation

بعد الترسيب تم فصل الراسـب عن السائل الرائق بجهاز الطرد المركزي المبرد (التابع لقسم علوم الحياة / كلية العلوم/جامعة الموصل) بسرعة 13000 xg ولمدة 40 دقيقة، ثم أذيب الراسب الذي تم الحصـول عليه في اقل كمية من الماء المقطر، وبعد حسـاب حجم محلول الراسب البروتيني والسـائل الرائق الناتج قدرت كميـة البروتيـن بطريقـة لاوري المحـورة Modified Lowry method والمحـورة لـدى الباحثيـن (Schacterle and Pollack, 1973). وقيست فعالية SMP-30 في محلول الراسب البروتيني والسائل الرائـق قبل إجراء خطوات التنقية اللاحقة. حفظ محلول الراسب البروتيني والسائل الرائق في درجة حرارة 20°C- لحين استخدامه في الخطوات اللاحقة.

3. الفرز الغشائي (الديلزة) Dialysis

تمت عملية الفرز الغشائي في محلول الفوسفاتي المنظم عند اس هيـدروجيني 7.2 وبتركيـز 10 ملـي مول/لتر (Boyer, 2000)، وأجريت عملية الفرز الغشائي عند درجة حرارة 4°م مـع التحريـك بـالمحرك المغناطيسي، واستمرت عملية الفرز الغشائي لمدة 48 ساعة مع مراعاة تبديل محلول الفرز الغشائي كل 12 ساعة.

4. كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي Gel filtration chromatography

استخدم عمود الفصل ذو الأبعاد 93 × 2.6 سم والذي يحتوي على هلام السفيدكس من نوع G-100 (Sephadex G-100) الذي يفصل المركبات ذات الأوزان الجزئية لغاية 100 كيلودالتون. وبلغ ارتفاع الهلام في العمود 76 سم، وتم تحديد حجم الروغان للمواد القياسية التي حقنت في العمود لغرض تحديد صفات العمود وإيجاد المنحني القياسي لتحديد الوزن الجزيئي التقريبي (للحزم البروتينية الناتجة من حقن المواد في عمود الفصل والتي تم تحديد حجوم روغانها أيضاً) من خلال رسم العلاقة الخطية بين حجوم روغانها ولوغاريتم أوزانها الجزيئية المعلومة (Murray *et al*., 2009).

المواد والمحاليل المستخدمة في عمود فصل :

الماء المقطر، المحلول البروتيني (للراسب) الناتج من الخطوة رقم 3، الحامض الاميني التربتوفان (Trp.) لحساب الحجم الداخلي للعمود (Internal volume (V_i)، الدكستران الأزرق Blue dextran لحساب الحجم الخارجي للعمود (Void volume (V_o) ومواد قياسية مستخدمة لتحديد الوزن الجزيئي لـ SMP-30 (ألبومين

مصل البقر Bovine serum albumin(BSA)، ألبومين البيض Egg albumin، البيسينPepsin والبابيـن Papain). تم تحضير المحاليل للمواد القياسية باذابة 0.1 غرام (من المادة القياسية) واذابتها في 10 مل من الماء المقطر ومن ثم اجريت عملية المحاليل حقن المواد القياسية المذكورة آنفاً بحجم 5 مل في عمود الفصل وعلى جدران عمود الفصل تبعها الغسل بالماء المقطر والذي استخدم أيضاً كمحلول روغان Elution solution. تمت عملية الجمع بمعدل جريان 60 مل /ساعة وبفاصل زمني مقداره 3 دقائق لكل جزء باستخدام جهاز جامع الأجزاء Fraction collector الذي يعمل بنظام الدقائق. كما تمت متابعة المحتوى البروتيني من خلال قياس الامتصاصية للأجزاء المفصولة بجهاز المطياف الفوتومتري عند طول موجي 280 نانومتر. فضلاً عن ذلك تمت متابعة فعالية SMP-30 في كل جزء من الأجزاء المفصولة عند حقن المواد في عمود الفصل لغرض متابعة فعالية الإنزيم خلال عملية الفصل، ليتم بعد ذلك جمع الأجزاء البروتينية الحاوية على أعلى فعالية للإنزيم.

5. تقنية التجفيد Lyopholizer

تم تجفيد الحزمة البروتينية الناتجة من عمود الفصل والتي اظهرت فعالية عالية لـ SMP-30، ثم حددت الظروف المثالية لفعالية الإنزيم لغرض تحديد الظروف المثلى لعمل الإنزيم من تركيز الإنزيم وزمن التفاعل وتركيز مادة الاساس والأس الهيدروجيني للمحلول المنظم المستخدم في قياس الفعالية ودرجة حرارة التفاعل وتركيز مادة الأساس.

طريقة قياس فعالية SMP-30/GNL:

قدرت فعالية SMP-30 عن طريق قياس فعاليته كإنزيم كلوكونولاكتونيز (GNL) التي يمتلكها SMP-30 وذلك باستخدام الطريقة اللونية (Hucho and Wallenfels, 1972) والموضحة كالأتي:

1- تحضير المحلول المنظم الصوديوم الفوسفاتي عند pH 7.2 وبتركيز 10 ملي مول/لتر.
2- تحضير 0.25 ملي مول من بارانايتروفينول P-nitrophenol في 10 مل من المحلول المنظم.
3- تحضير كلوكونولاكتون Gluconolactone بتركيز 10 ملي مول في المحلول المحضر في الخطوة 2.
4- يؤخذ 0.99 مل من المحلول الناتج عن الخطوة 3 ويضاف اليه 30 مايكرولتر من النموذج الذي يحتوي على الإنزيم مع المزج عند 24 °م، ثم تقاس الامتصاصية عند الطول الموجي 405 نانومتر في الدقيقة الأولى والدقيقة العاشرة عند درجة حرارة 37 °م.

النتائج والمناقشة

تشير النتائج الموضحة في الجدول (1) إن فعالية الإنزيم ارتفعت في الراسب الناتج من عملية الترسيب مقارنة بفعاليته في البلازما كما ارتفعت أكثر بعد عملية الفرز الغشائي للراسب الناتج وذلك بسبب إزالة المركبات البروتينية ذات الأوزان الجزئية الصغيرة (التي تقل عن 14000 دالتون) (Berg *et al.*, 2007).

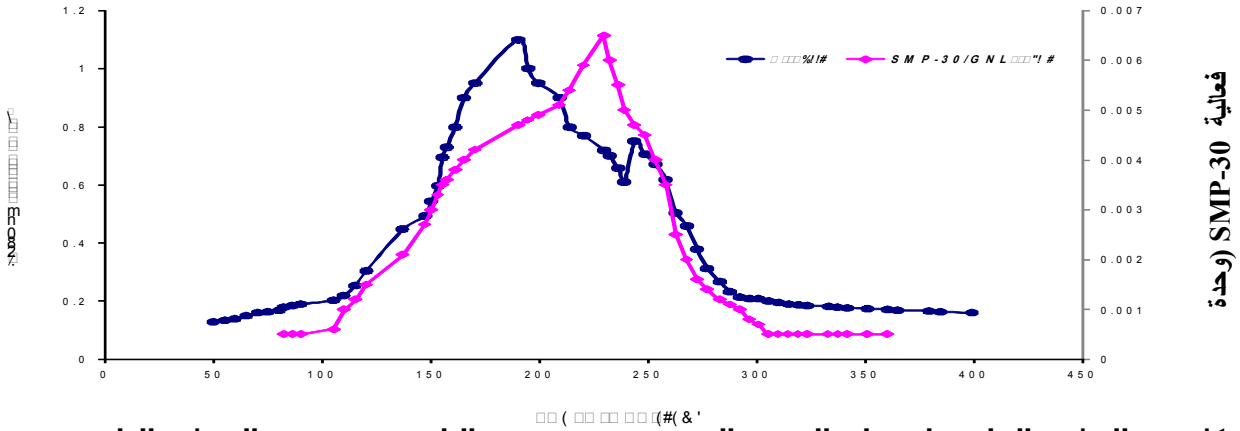
كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي:

استخدمت هذه التقنية في عملية فصل المركبات البروتينية التي تم الحصول عليها من ترسيبها بواسطة كبريتات الامونيوم (بعد أن اجري لها عملية الفرز الغشائي). وقد استخدم عمود الفصل الحاوي على هلام نوع Sephadex G-100، وقد اعطى روغان المستخلص البروتيني الناتج من عملية الفرز الغشائي حزمة واحدة الشكل (1) وكان حجم روغان القمة 229.4 مل ومن خلال متابعة فعالية SMP-30 وجد أن فعالية الإنزيم تتركز عند قمة واحدة ذات فعالية عالية كما يلاحظ في الجدول (1) والشكل(1).

الجدول 1: خطوات تنقية SMP-30 من بلازما رجل سليم بعمر 25 سنة .

خطوات التنقية	الحجم (مل)	تركيز البروتين الكلي (ملغم/مل)	الفعالية (*وحدة إنزيم/مل)	الفعالية الكلية (وحدة إنزيم)	الفعالية النوعية (وحدة إنزيم/ملغم بروتين)	عدد مرات التنقية	الاستعادة %
البلازما	100	87.0	0.154	15.4	0.00177	1.0	100
الترسيب بكبريتات الامونيوم 60%	57	81.0	0.168	9.58	0.00207	1.2	62.2
الراشح	48	69.0	0.04	1.92	0.00058	0.3	12.5
الديازة للراسب	67	57.0	0.177	11.86	0.0031	1.8	77
القمة الناتجة من عمود الفصل	65	7.8	0.11	7.15	0. 0141	8.0	46.4

*وحدة الإنزيم: هي عبارة عن كمية SMP-30 التي تحول مايكرومول واحد من كلوكونولاكتون الى ناتج لكل دقيقة / مليلتر تحت الظروف المحددة للقياس.



الشكل 1 : المظهر الجانبي لروغان الحزمة البروتينية SMP-30 الناتجة من عمود الفصل والعائدة لبلازما رجل سليم بوساطة تقنية الترشيح الهلامي.

تقدير الوزن الجزيئي التقريبي بتقنية الترشيح الهلامي :

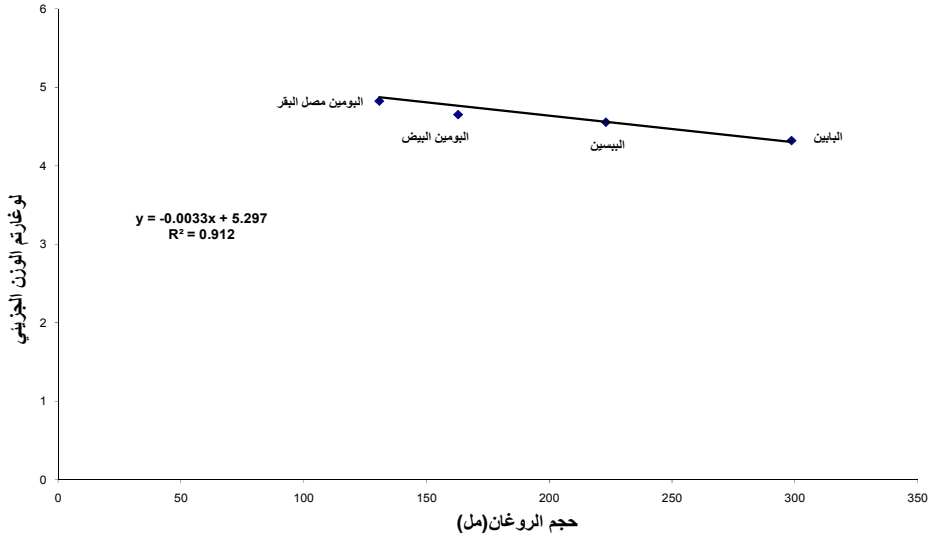
تم تقدير الوزن الجزيئي التقريبي للحزمة البروتينية الناتجة من عمود الفصل باستخدام تقنية الترشيح الهلامي، إذ تم إمرار عدد من المركبات معلومة الوزن الجزيئي والتي تتراوح أوزانها الجزيئية بين (204 - 2000000 دالتون) في عمود الفصل الأول لغرض تعيين خواص العمود من حيث الحجم الداخلي (V_i) وكذلك الحجم الخالي أو الفارغ من الحبيبات (V_o) والجدول (2) يبين المواد التي تم إمرارها على عمود الفصل الحاوي على هلام (Sephadex G-100) مع أوزانها الجزيئية وحجوم روغانها.

الجدول 2: الوزن الجزيئي وحجم الروغان للمواد القياسية المستخدمة في تقنية الترشيح الهلامي باستخدام هلام السيفيدكس Sephadex G-100.

أسم المادة	الوزن الجزيئي (دالتون)	حجم الروغان (مل)
الدكستران الازرق Blue dextran (الحجم الخالي V_o)	2000000	127.3
ألبومين مصل البقرBovine serum albumin	67000	130.8
ألبومين البيض Egg albumin	45000	162.9
الببسين Pepsin	36000	223.1
البابين Papain	21000	298.7
التربتوفان Tryptophan (الحجم الداخلي V_i)	204	409.2
المجهول (القمة الناتجة من عمود الفصل)	**34672**	***229.4**

* أخذت هذه القيمة من الشكل (1) الذي يظهر فيه حجم روغان القمة المفصولة بوساطة تقنية الترشيح الهلامي.

عند رسم حجم الروغان لكل مادة مقابل لوغاريتم وزنها الجزيئي يظهر خط مستقيم كما في الشكل (2) الذي يحدد من خلاله الوزن الجزيئي التقريبي لبروتين علامة الشيخوخة-30 والناتج من عمود الفصل في تقنية الترشيح الهلامي والذي أعطى بقيمة 34672 دالتون وهي مقاربة لنتائج الباحثين (Kondo *et al*., 2006; Fujita *et al*.,1992) الذين فصلوا SMP-30 من أنسجة وكائنات مختلفة.



الشكل 2 : المنحني القياسي لتحديد الوزن الجزيئي بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفصل.

دراسة العوامل المؤثرة على فعالية SMP-30 المفصول من البلازما:

تكون التفاعلات التي تحفزها الإنزيمات حساسة للظروف الخارجية مثل جميع التفاعلات الكيميائية، وهكذا فان تركيز الإنزيم وتركيز المادة الأساس ودرجة الحرارة والأس الهيدروجيني(الدالة الحامضية)(pH) تؤثر على معدل سرعة التفاعل الإنزيمي لان جميع هذه العوامل تؤثر على الموقع الفعال للإنزيم وتؤثر على تكوين معقد الإنزيم والمادة الأساس (Murray *et al*., 2009). ولغرض التعرف على فعالية الإنزيم بصورة دقيقة يكون من الواجب دراسة العوامل المؤثرة على فعالية الإنزيم للحزمة البروتينية التي ظهرت وإيجاد الظروف المثلى التي يعمل بها الإنزيم.

1. تأثير تركيز الإنزيم:

تم تقدير فعالية SMP-30 بوجود تراكيز مختلفة من الإنزيم المنقى جزئيا من البلازما تتراوح بين (20-120 مايكروغرام/مل) مع ثبوت تركيز مادة الأساس التي يعمل عليها الإنزيم ويبين الشكل (3) العلاقة بين فعالية الإنزيم وتركيز الإنزيم بثبوت العوامل الأخرى، إذ يلاحظ أن سرعة التفاعل الإنزيمي تزداد بزيادة تركيز الإنزيم. وقد اعتمد التركيز 100 مايكروغرام/مل من الإنزيم في جميع التجارب اللاحقة .

2. تأثير المحلول المنظم :

1.2. تركيز المحلول المنظم :

تمتاز المحاليل المنظمة بكونها مقاومة لتغير تركيز ايون الهيدروجين عند إضافة كميات قليلة من حامض أو قاعدة إلى المحلول، وتعد معرفة تركيز المحلول المنظم ضرورية لقياس فعالية الإنزيمات. وقد استخدمت

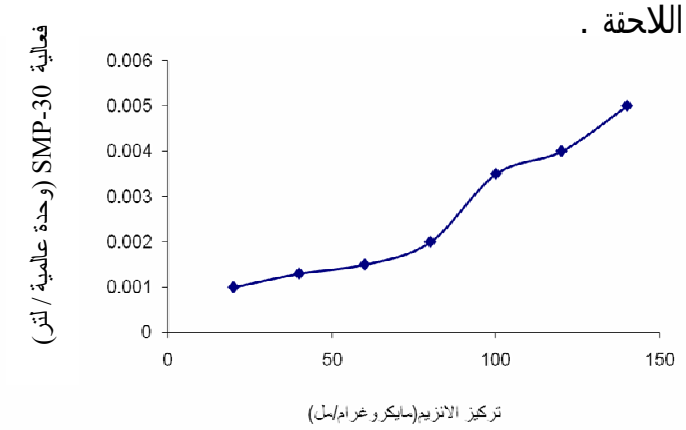
تراكيز مختلفة من المحلول الفوسفاتي المنظم وبمدى (0.002-0.03 مول/لتر) وبأس هيدروجيني مقداره 7.2، وبينت النتائج أن أعلى فعالية للإنزيم كانت عند تركيز (0.022 مول/لتر) كما هو مبين في الشكل (4).

2.2. الأس الهيدروجيني لمحلول الفوسفات المنظم:

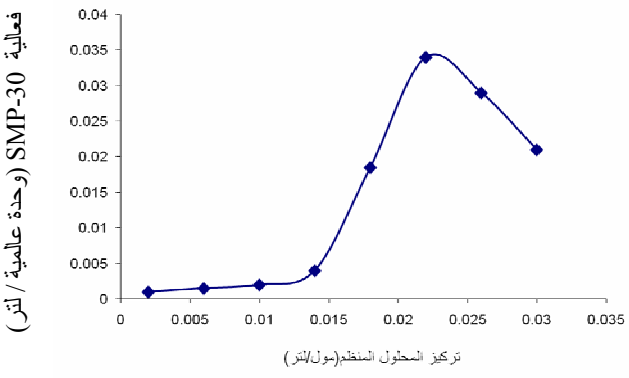
إن لكل إنزيم أس هيدروجيني (pH) معين يبدي عنده الإنزيم أعلى فعالية يسمى هذا بالأس الهيدروجيني الأمثل Optimum pH. ولقد لوحظ أن استخدام أس هيدروجيني متطرف يؤدي إلى حدوث تشوه في طبيعة الإنزيم مما يسبب ذلك فقدان فعاليته وتم تقدير فعالية SMP-30 في المحلول المنظم 0.022 مول/لتر مع تغير الأس الهيدروجيني للمحلول المنظم لغرض أيجاد أعلى فعالية للإنزيم، وتشير النتائج الموضحة في الشكل (5) إلى أن أعلى فعالية للإنزيم كانت عند أس الهيدروجيني 8.

3. تأثير زمن التفاعل :

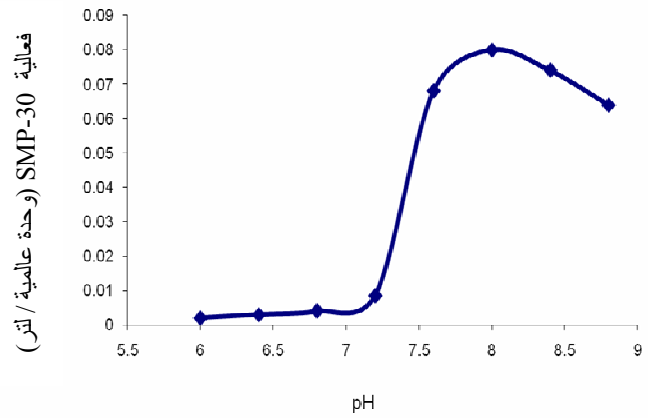
تمت دراسة زمن التفاعل لايجاد المدة الزمنية المثلى. تشير النتائج الموضحة في الشكل (6) الى أن أعلى فعالية للإنزيم كانت عند الدقيقة الثامنة عشر، ولذلك تم اختيارها لقياس فعالية الإنزيم في جميع التجارب اللاحقة .



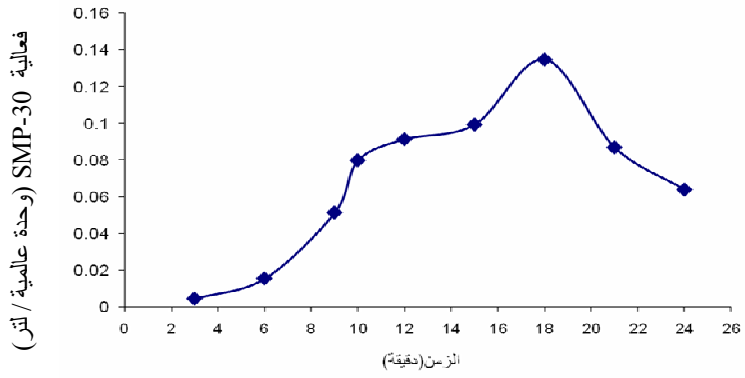
الشكل 3 : تاثير التراكيز المختلفة من SMP-30 على الفعالية الإنزيمية.



الشكل 4 : تأثير التراكيز المختلفة للمحلول المنظم على فعالية SMP-30.



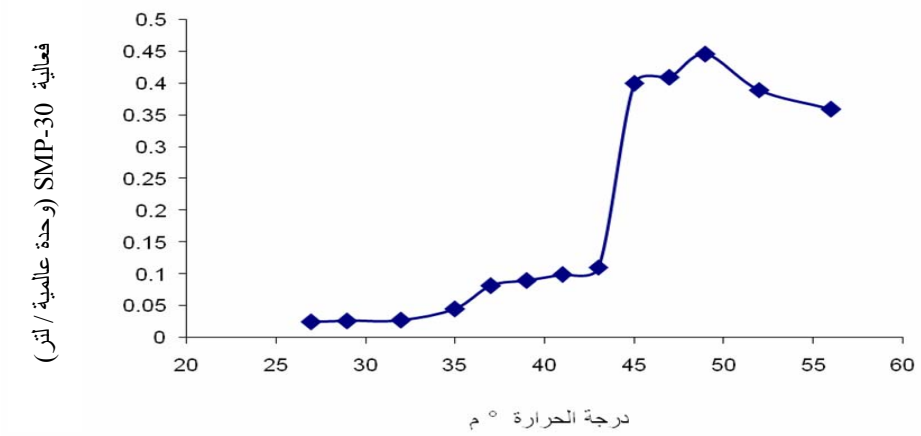
الشكل 5: تاثير الأس الهيدروجيني للمحلول المنظم على فعالية SMP-30.



الشكل 6 : العلاقة بين فعالية SMP-30 وزمن التفاعل.

4. تأثير درجة الحرارة:

ان التفاعلات التي تحفزها الإنزيمات تتأثر بدرجة الحرارة كما هو الحال مع كل التفاعلات الكيميائية، لكن بسبب الحساسية العالية للإنزيمات نحو التغيرات الحرارية لطبيعتها البروتينية تتحدد درجة نشاط الإنزيمات في مجال ضيق من درجات الحرارة، ولذلك يلاحظ ازدياد معدل سرعة التفاعل المحفز بالإنزيم كلما ازدادت درجة الحرارة وعند استخدام درجات حرارة أعلى من درجة الحرارة المثلى Optimum temperature (وهي الدرجة الحرارية التي يبدي عندها الإنزيم أقصى فعاليه) يحصل انخفاض في معدل سرعة التفاعل بسبب حصول مسخ Denaturation للإنزيم نتيجةً لتفكك الأواصر الهيدروجينية والقوى الأخرى المسؤولة عن المحافظة على التركيب الثلاثي للبروتين ومن ثم فقدان الإنزيم لفعاليته (Boyer, 2000) ولذلك تم إجراء قياس فعالية SMP-30 في درجات حرارية مختلفة وكما هو موضح في الشكل (7). إذ يلاحظ من الشكل أن الارتفاع التدريجي لدرجة الحرارة يؤدي إلى رفع فعالية الإنزيم تدريجياً إلى حد 49°م يحصل بعدها انخفاض واضح في فعالية الإنزيم، لذا اعتمدت الدرجة هذه درجة حرارية مثلى للإنزيم في التجارب اللاحقة.

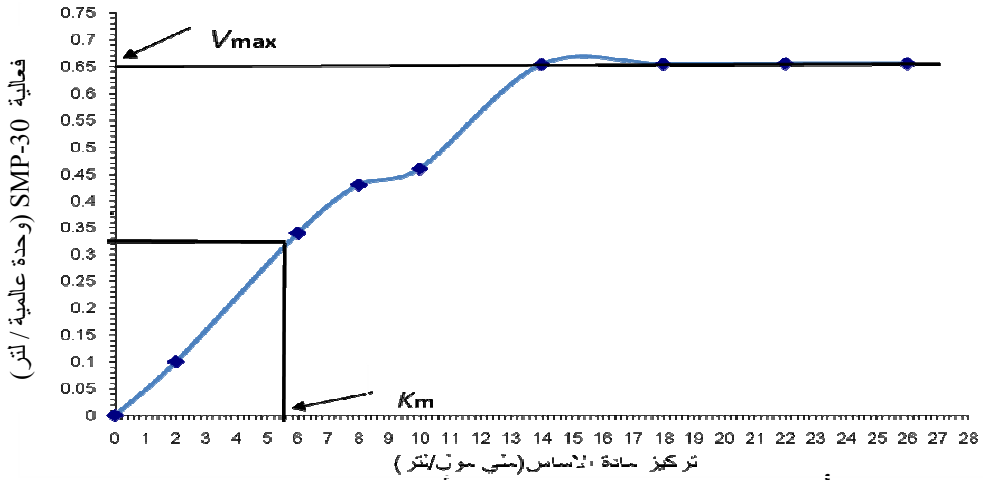


الشكل 7 : تأثير درجة حرارة التفاعل على فعالية SMP-30.

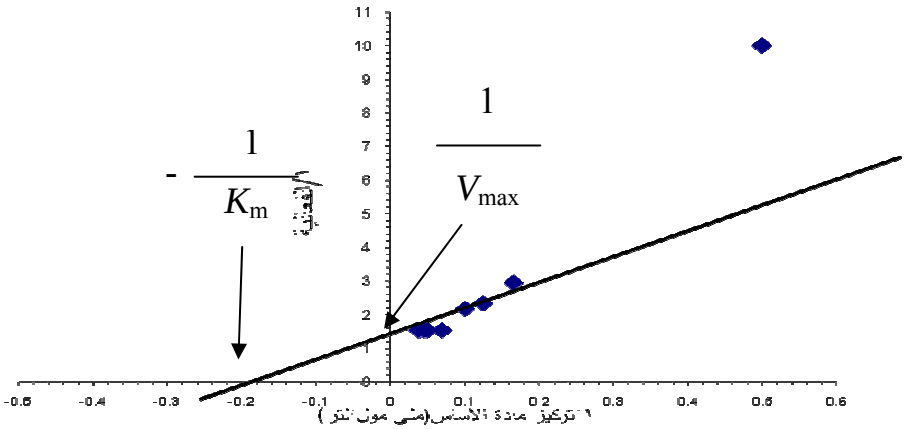
5. تأثير تركيز مادة الأساس:

يطلق على أعلى سرعة للتفاعل الانزيمي بالسرعة القصوى (V_{max}) (Berg *et al.*,2007). ولمعرفة العلاقة بين إنزيم كلوكونولاكتونيز وتركيز المادة الأساس كلوكونولاكتون (GL) تم قياس فعالية الإنزيم بوجود تراكيز مختلفة من مادة الأساس تتراوح بين 2 - 26 ملي مول/لتر والشكل (8) يبين أن سرعة التفاعل الإنزيمي تزداد بزيادة تركيز المادة الاساس لحين الوصول إلى قيمة تتوقف بعدها الزيادة في سرعة التفاعل الإنزيمي وبذلك يمكن تحديد تركيز المادة الأساس اللازمة للوصول الى السرعة القصوى (V_{max}) للتفاعل الانزيمي، وهذا مطابق لما أثبته العالمان ميكيلس ومنتن إذ أوضحا أن استخدام تراكيز واطئة من مادة الأساس يجعل المواقع الفعالة للإنزيم غير مشبعه بالمادة الأساس، لكن عند زيادة تركيز مادة الأساس بشكل

كبير تصبح المواقع الفعالة للإنزيم مشبعة بالمادة الأساس أي يتم التوصل الى السرعة القصوى للتفاعل بعد هذا التركيز فان سرعة التفاعل الإنزيمي لا تعتمد على تركيز المادة الأساس (Murray *et al*., 2009) ويتبين من الشكل (8) أن تشبع الإنزيم بالمادة الأساس يكون عند التركيز 14 ملي مول/لتر من GL، وبتطبيق علاقة لاينويفر- برك (Line Weaver-Burk plot) وجد أن قيمة السرعة القصوى(V_{max}) وثابت ميكيلس (K_m) لـ SMP-30 هي 0.65 مايكرومول/دقيقة و5.6 ملي مول/لتر على التوالي كما موضح في الشكل(9):



الشكل 8 : تأثير تراكيز مختلفة من المادة الأساس (GL) على فعالية الإنزيم.



الشكل 9 : رسم لاينويفر- برك لتحديد قيمتي السرعة القصوى(V_{max}) وثابت ميكيلس (K_m).

6. دراسة تأثير تراكيز مختلفة من المواد الكيميائية والدوائية المختلفة على فعالية SMP-30:

هناك العديد من المركبات التي تعمل على تثبيط فعالية SMP-30 وتقليل من سرعة التفاعل الإنزيمي وقد تم استخدام عدد من المركبات الكيميائية والدوائية التي لها تأثير تثبيطي على الإنزيم.

1.6. دراسة تأثير المواد الكيميائية:

استخدام عدد من المواد الكيميائية وبتراكيز مختلفة (12، 14، 16 ملي مول/لتر) لدراسة تأثيرها على فعالية SMP-30. لوحظ ان لكل مادة أثر تثبيطي بنسب مختلفة على فعالية الإنزيم الجدول(3). وقد

كانت أعلى نسبة تثبيطية عند استخدام للأثيلين ثنائي الامين رباعي حامض الخليك ثنائي الصوديوم Na_2-EDTA وكلوريد الزئبقيك $HgCl_2$ وكبريتات النحاس $CuSO_4$ فيما توزع تأثير بقية المواد الكيميائية بنسب مئوية اقل. وقد اختير فيما بعد كل من كلوريد الزئبقيك وميتا زرنيخات الصوديوم $NaAsO_2$ لدراسة التأثير التثبيطي لهما (الفقرة 7).

الجدول 3 : تأثيرالمركبات الكيميائية على فعالية SMP-30.

المثبطات	تراكيز المثبطات(ملي مول/لتر)	فعالية SMP-30	*النسبة المئوية للتثبيط
كبريتات النحاس $CuSO_4$	12	0.129	80.2
	14	0.112	82.7
	16	0.099	84.8
سيانيد الصوديوم NaCN	12	0.251	61.6
	14	0.192	70.6
	16	0.179	72.6
فلوريد الصوديوم NaF	12	0.279	57.3
	14	0.206	68.5
	16	0.19	70.9
كبريتات المغنيسيوم $MgSO_4$	12	0.377	42.3
	14	0.361	44.8
	16	0.345	47.2
سيانيد البوتاسيوم KCN	12	0.156	76.1
	14	0.14	78.6
	16	0.131	79.9
أثيلين ثنائي الامين رباعي حامض الخليك Na_2-EDTA	12	0.025	96.1
	14	0.021	96.8
	16	0.009	98.6
كبريتات الخارصين $ZnSO_4$	12	0.26	60.2
	14	0.25	61.7
	16	0.196	70.03
كلوريد الزئبقيك $HgCl_2$	12	0.083	87.2
	14	0.082	87.4
	16	0.08	87.7
ميتا زرنيخات الصوديوم $NaAsO_2$	12	0.222	65.8
	14	0.178	72.6
	16	0.109	83.2
كلوريد النيكل $NiCl_2$	12	0.133	79.6
	14	0.121	81.5
	16	0.116	82.2
كلوريد الكوبلت المائي $CoCl_2.6H_2O$	12	0.336	48.3
	14	0.21	67.7
	16	0.113	82.6
كلوريد البوتاسيوم KCl	12	0.173	73.4
	14	0.098	84.9
	16	0.09	86.1
كلوريد الصوديوم NaCl	12	0.298	54.1
	14	0.17	73.8
	16	0.1	84.6

*علما إن قيمة الفعالية القياسية للإنزيم هي (0.65) وحدة/لتر.

2.6. دراسة تأثير الأدوية (العقاقير):

استخدام عدد من الأدوية النقية، المستحصلة من الشركة العامة لصناعة الأدوية في محافظة نينوى، لمعرفة تأثيرها على فعالية إنزيم SMP-30 المنقى جزئياً. اذ يوضح الجدول (4) النتائج التأثير التثبيطي لتراكيز مختلفة (12، 14، 16 ملي مول/لتر) من المادة الدوائية. حيث ظهرت نسباً تثبيطية مختلفة لفعالية الإنزيم. وكما هو معلوم، فأن لكل دواء تأثيرات علاجية مختلفة على الجسم. فعلى سبيل المثال، هناك أدوية تستخدم كمضادات حيوية مثل (السيراميد Ceramide، الكلورامفينيكول Chloramphenicol، فلاجيل Flagyl والنيومايسين Neomycin) (Horak *et al*., 2009; Falagas *et al*., 2008)، وهنك أدوية تستخدم لعلاج داء النقرس مثل الوبيورينول Allopurinol (Pacher *et al*., 2006)، او منشطة للنظام العصبي المركزي ومنشطات أيضية مثل الكافيين (Nehlig *et al*., 1992) وكذلك مضادة للتقئ مثل ميتوكلوبراميد Metoclopramide (Jenner and Marsden, 1979)، او مسكن للآلام المختلفة مثل الباراسيتامول Paracetamol، وهنك أدوية مستخدمة لعلاج الأمراض التنفسية (مثل فينايل فرين Phenylphrine (Horak *et al*., 2009) والبسيدوفيردين Psedoephedrine اللذان يستعملان لازالة احتقان الانف (Brunton, 2006) والثايوفلين اللامائي Theophylline anhydrous المستعمل في علاج الأمراض التنفسية المختلفة (Yoshikawa, 2007). وقد أظهرت الأدوية تأثيرات مختلفة على فعالية الإنزيم وقد كانت أعلى نسبة تثبيطية للنيومايسين والفلاجيل والفينايل فرين واختير الكافايين وفينايل فرين والنيومايسين فيما بعد لدراسة نوعية التأثير التثبيطي لهم (الفقرة 7).

أشارت النتائج التي تم الحصول عليها الجدول (4) أن استخدام أنواع مختلفة من الأدوية وبتراكيز متباينة يؤدي الى انخفاض فعالية SMP-30 للشخص بعمر 25 سنة وبالتالي عدم أداء وظائفه المختلفة بشكل كامل، عليه فأن تعاطي مثل هذه الأدوية من قبل المسنين سيزيد من حدة أعراض الشيخوخة لديهم.

الجدول 4 : تأثير بعض المركبات الدوائية على فعالية SMP-30.

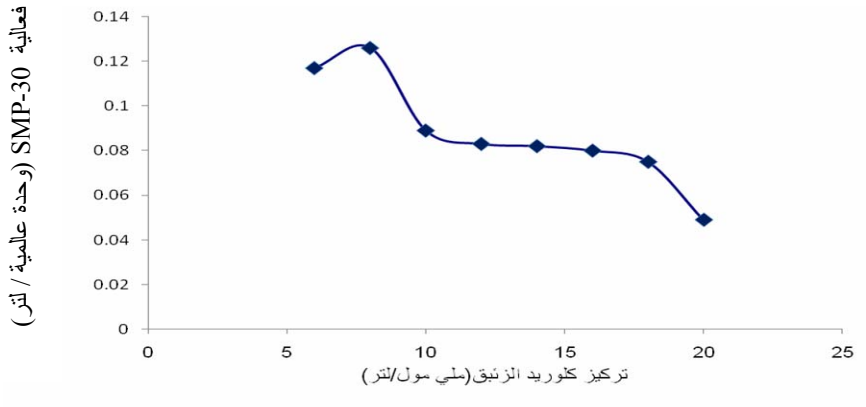
الأدوية	التراكيز (ملي مول/لتر)	فعالية SMP-30	*النسبة المئوية للتثبيط
ميتوكلوبراميد Metoclopramide	12	0.377	42.3
	14	0.364	44.3
	16	0.331	49.4
الكلورامفينكول Chloramphnicol	12	0.419	35.9
	14	0.397	39.3
	16	0.302	53.8
الباراسيتامول Paracetamol	12	0.378	42.2
	14	0.272	58.4
	16	0.164	74.9
الثايوفيلين اللامائي Anhydrous theophylline	12	0.237	63.7
	14	0.232	64.5
	16	0.226	65.4
الكافيين اللامائي Anhydrous caffeine	12	0.198	69.5
	14	0.294	54.77
	16	0.324	50.1
الفينايل فرين Phenylphrine	12	0.199	69.6
	14	0.186	71.4
	16	0.162	75.2
فلاجيل Flagyl	12	0.168	74.3
	14	0.149	77.2
	16	0.065	90.06
السيراميد Ceramide	12	0.29	55.6
	14	0.27	58.7
	16	0.222	66.05
البسيدوفيدرين Psedeuphidrine	12	0.298	54.4
	14	0.261	60.09
	16	0.23	64.8
النيومايسين Neomycin	12	0.082	87.4
	14	0.078	88
	16	0.055	91.5
الالوبيورينول Allopurinol	12	0.309	52.7
	14	0.281	57.03
	16	0.277	57.6

*علما ان قيمة الفعالية القياسية للإنزيم هي (0.65) وحدة/لتر.

7. دراسة أنواع التثبيط لعدد من المركبات الكيميائية والدوائية المختارة على فعالية SMP-30 :

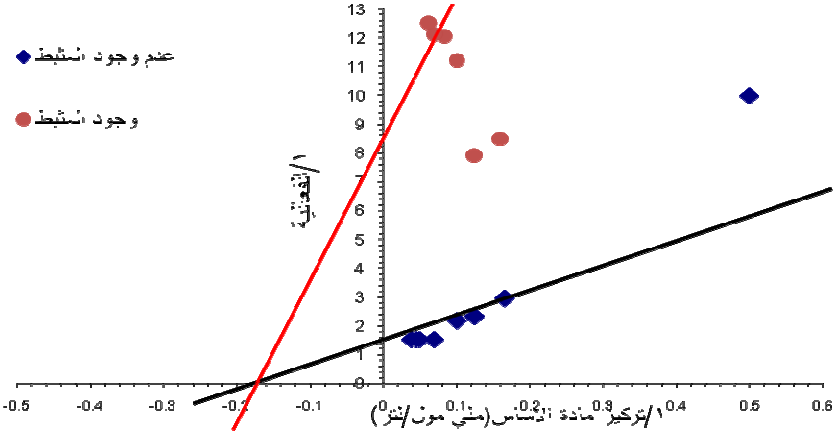
1.7. كلوريد الزئبقيك:

باستخدام تراكيز مختلفة من كلوريد الزئبقيك بوصفة مثبطاً للإنزيم وجد انه يؤدي الى تقليل فعالية الإنزيم عند زياده تركيزه خاصة بعد تركيز8 ملي مول /لتر كما هو موضح في الشكل (10).



الشكل 10 : تأثير تركيز مادة كلوريد الزئبقيك على فعالية SMP-30.

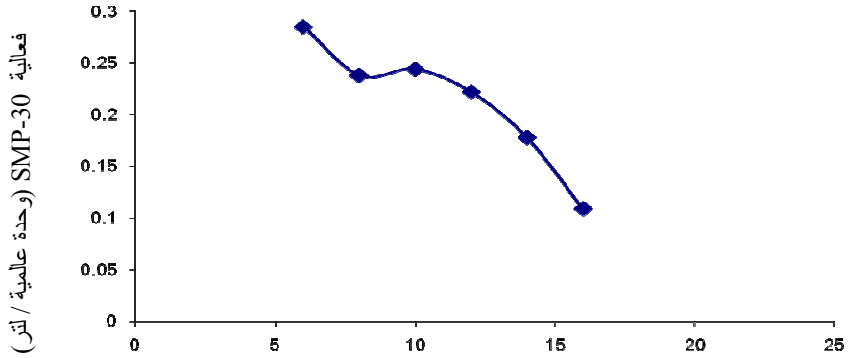
وعند استخدام رسم لاينو يفر– برك لإيجاد نوعية التأثير التثبيطي لكلوريد الزئبقيك بينت النتائج انه من النوع غير التنافسي Noncompetitive. ومن مميزات هذا النوع من التثبيط أن تركيب المثبط لا يـشابه تركيب المادة الأساس وان المثبط غير التنافسي يرتبط عادةً مع الإنزيم في موقع آخر يختلف عـن الموقـع الفعال أي ليس هناك أي تنافس بين المثبط والمادة الأساس على الاتحاد مع الموقع الفعال للإنزيم، لـذا فـإن زيادة تركيز المادة الأساس لا يلغي تأثير عمل هذا المثبط وتنخفض في هذا النـوع مـن التثبـيط الـسرعة القصوى V_{max} وتبقى قيمة K_m ثابتة (Murray *et al.*, 2009) كما موضح في الشكل (11).



الشكل 11 : رسم لاينويفر- برك عند استخدام المثبط كلوريد الزئبقيك.

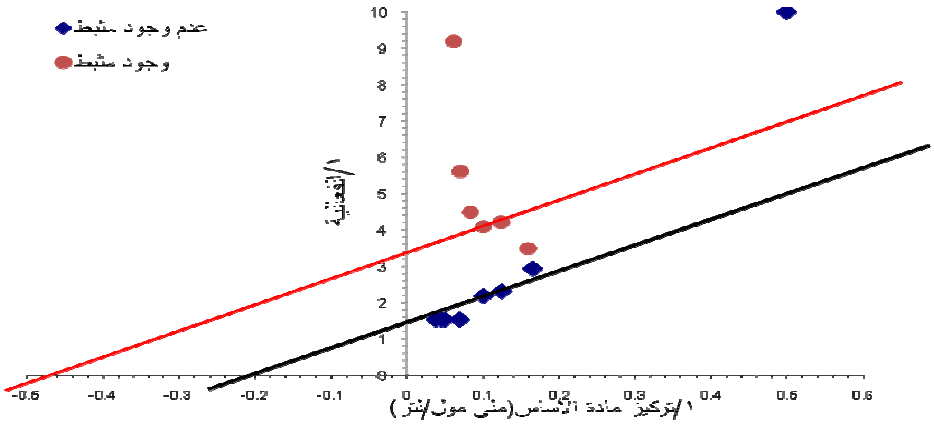
2.7. ميتا زرنيخات الصوديوم:

باستخدام تراكيز مختلفة من مادة ميتا زرنيخات الصوديوم بوصفة مثبطاً للإنزيم وجد انه يتفاعل مع الإنزيم ويؤدي الى التقليل من فعالية الإنزيم كلما زاد تركيزه كما هو موضح في الشكل (12).



الشكل 12 : تأثير تركيز مادة ميتا زرنيخات الصوديوم على فعالية SMP-30.

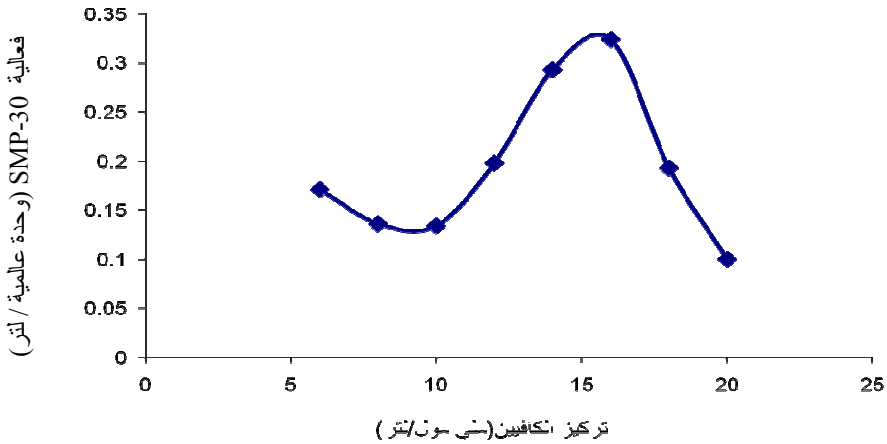
وبتطبيق علاقة لاينو يفر– برك لإيجاد طبيعة تأثير المثبط ميتا زرنيخات الصوديوم أظهرت النتـائج ان التثبيط من النوع اللاتنافسي Uncompetitive، ومن مميزات هذا النوع من التثبيط إن تركيب المثـبط لا يشابه تركيب المادة الأساس ولايتنافس المثبط مع مادة الأساس على الإتحاد مع الموقع الفعال إذ يرتبط بموقع يختلف عن موقع ارتباط مادة الأساس وتنخفض في هذا النوع من التثبيط قيمة K_m وقيمة السرعة القـصوى V_{max} (Murray *et al.*, 2009) كما موضح في الشكل (13).



الشكل 13 : رسم لاينويفر- برك عند استخدام المثبط ميتا زرنيخات الصوديوم.

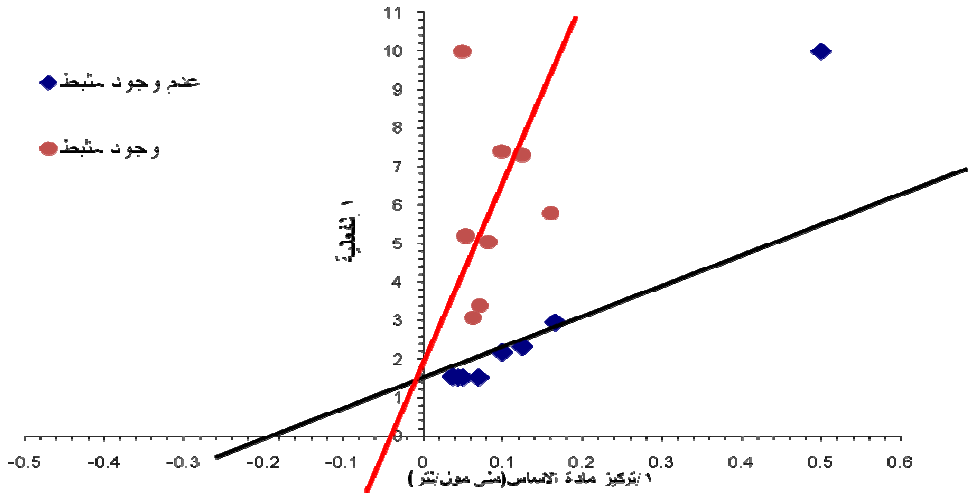
3.7. الكافيين اللامائي :

عند استخدام تراكيز مختلفة من الكافيين اللامائي بوصفة مثبطاً للإنزيم وجد انه يتفاعل مع الإنزيم ويؤدي الى تقليل فعاليته وخاصة بعد تركيز 16 ملي مول/لتر كلما زاد تركيزه وصولا الى أعلى انخفاض عند تركيز 20 ملي مول كما هو موضح في الشكل (14).



الشكل 14 : تأثير تركيز مادة الكافيين على فعالية SMP-30.

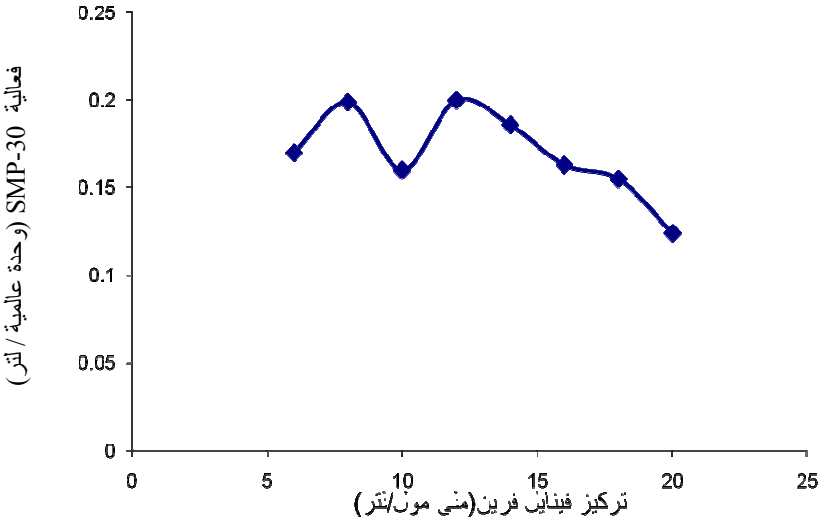
وباستخدام رسم لاينو ويفر– بيرك لإيجاد نوعية عمل التثبيطي للكافيين، أظهرت النتائج ان التثبيط من النوع التنافسي Competitive، ومن مميزات هذا النوع من التثبيط ان تركيب الكافيين يشابه تركيب المادة الأساس بأحتوائه على حلقة اللاكتون في تركيبه والذي من الممكن ان يتنافس مع مادة الأساس(GL) على الإتحاد مع الموقع الفعال وفي هذا النوع من التثبيط تزداد قيمة K_m وبينما تبقى قيمة السرعة القصوى V_{max} ثابتة (Murray *et al.*, 2009) كما موضح في الشكل (15).



الشكل 15 : رسم لاينويفر- بيرك لتوضيح ثابت ميكيلس والسرعة القصوى عند استخدام الكافيين بصفة مثبط.

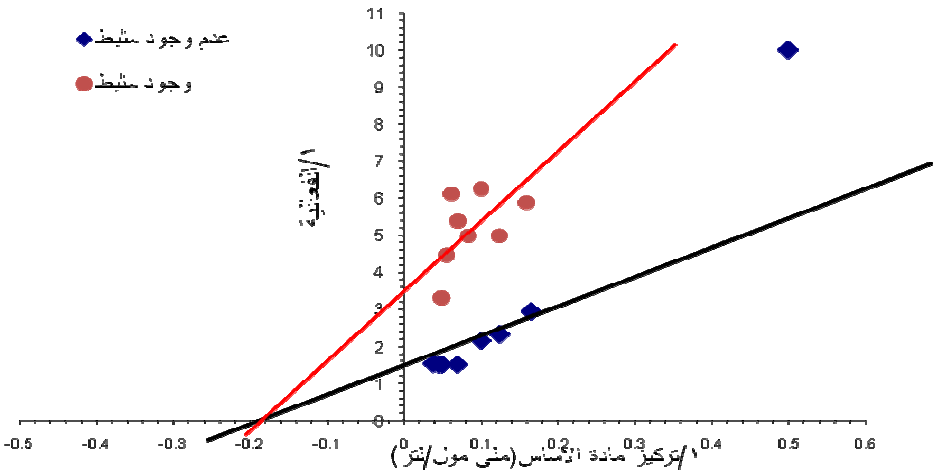
4.7. فينايل فرين :

عند استخدام تراكيز مختلفة من الفينايل فرين بوصفه مثبطاً للإنزيم وجد انه يتفاعل مع الإنزيم ويؤدي الى تقليل فعالية الإنزيم عند زياده تركيزه وبخاصة بعد تركيز (12 ملي مول/لتر) الشكل(16).



الشكل 16 : تأثير تركيز مادة فينايل فرين على فعالية SMP-30.

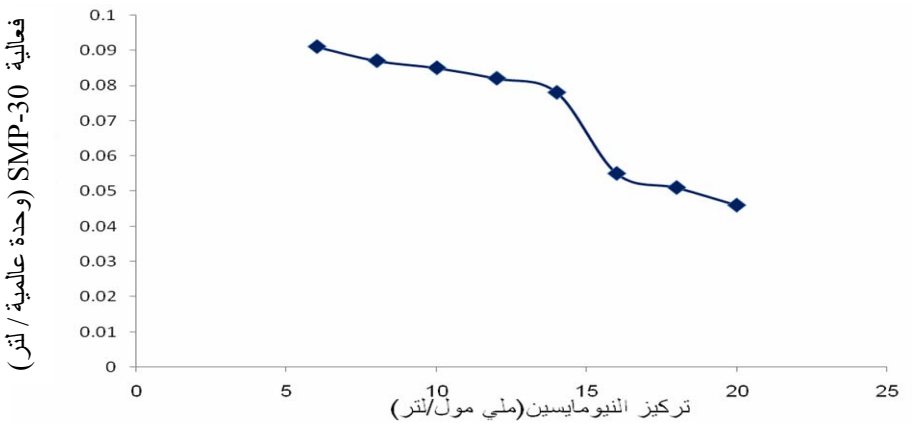
وعند استخدام رسم لاينو يفر– برك لإيجاد نوعية العمل التثبيطي للفينايل فـرين بينـت النتـائج ان التثبيط من النوع غير التنافسي Noncompetitive. إذ من مميزات هذا النوع من التثبيط ان فيه تنخفض قيمة السرعة القصوى V_{max} وتبقى قيمة K_m ثابتة كما موضح في الشكل(17).



الشكل 17 : رسم لاينويفر- برك لتوضيح ثابت ميكيلس والسرعة القصوى عند استخدام فينايل فرين بصفه مثبط.

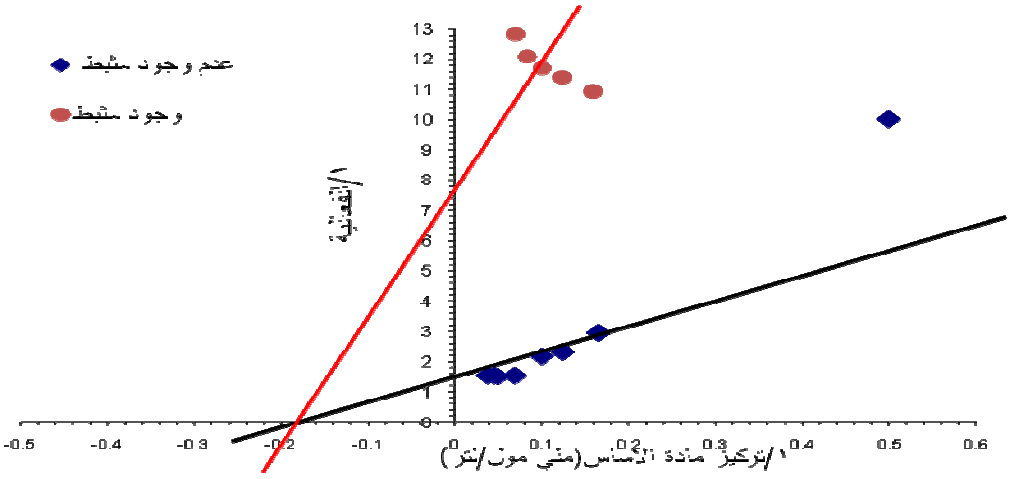
5.7. النيومايسين :

عند استخدام تراكيز مختلفة من النيومايسين بوصفه مثبطاً للإنزيم وجد انه يتفاعل مع الإنزيم ويؤدي الى تقليل فعالية الإنزيم عند زياده تركيزه كما هو موضح في الشكل (18).



الشكل 18 : تأثير تراكيز مادة النيومايسين على فعالية SMP-30.

وعند استخدام رسم لاينو يفر– برك لإيجاد نوعية عمل المثبط النيومايسين بينت النتائج ان التثبيط من النوع غير التنافسي Noncompetitive، الذي تنخفض فيه قيمة السرعة القصوى V_{max} وتبقى قيمة K_m ثابتة (Murray *et al*., 2009) كما موضح في الشكل(19).



الشكل 19 : رسم لاينويفر- برك لتوضيح ثابت ميكيلس والسرعة القصوى عند استخدام النيومايسين مثبطاً.

8. ملخص الظروف المثلى لقياس فعالية SMP-30:

إن الظروف المثلى لقياس فعالية SMP-30 المنقى من بلازما الانسان السليم موضحة في الجدول (5) أدناه:

الجدول 5 : الظروف المثلى لإنزيم المنقى.

تركيز مادة الأساس (ملي مول/لتر)	درجة الحرارة (°م)	التركيز للمحلول المنظم الفوسفاتي (مول/لتر)	الأس الهدروجيني	زمن التفاعل (دقيقة)	تركيز الإنزيم (مايكروغرام/مل)
14	49	0.022	8	18	100

المصادر

Arun, P.; Aleti, V.; Parikh, K.; Manne, V.; Chilukuri, N. (2011).Senescence marker protein 30 (SMP30) expression in eukaryotic cells:existence of multiple species and membrane localization. *PLoS ONE*. **6**(2), 16545.

Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. (2007). "Biochemistry" W. H. Freeman and Company". New York, USA. pp.138,139,145,146,149, 687.

Billecke, S.S.; Primo-Parmo, S.L.; Dunlop, C.S.; Doorn, J.A.; La Du, B.N.(1999). Characterization of a soluble mouse liver enzyme capable of hydrolyzing di iso propyl phosphorofluoridate .*Chem. Biol. Interact*. **19**(120), 251-256.

Boye,r R.(2000). "Modern Experimental Biochemistry". 3rd ed. Addison Wesley Longman, USA.pp.52,71.

Brunton, L. L.(2006)."Goodman and Gilman's .The Pharmacological Basis of Therapeutics". (11th ed.). New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division.

Bublitz, C.; Lehninger, A.L. (1961). The role of aldonolactonase in the conversion of L-gulonate to L-ascorbate. *Biochim. Biophys. Acta* **47**, 288–297.

Chakraborti, S.; Bahnson, B. J. (2010). Crystal structure of human senescence marker protein 30; insights linking structural, anzymatic and physiological functions. *Biochemistry*. **49**(16), 3436-3444.

Falagas, M. E.; Grammatikos, A. P.; Michalopoulos, A. (2008). Potential of old-generation antibiotics to address current need for new antibiotics. Expert Review of *Anti Infective Therapy*, **6** (5), 593–600.

Feng, D.; Kondo, Y.; Ishigami, A.; Kuramoto, M.; Machida, T. (2004). Senescence marker protein-30 as a novel anti aging molecule. *Ann. N. Y. Acad Sci* . **1019**,360-364.

Fujita, T. (1999).Senescence marker protein-30(SMP-30) :Structure and biological function. *Bio chem. Bi phys. Res. Commun*. **254**, 1-4.

Fujita, T.; Shirasawa, T.; Maruyama, N. (1999). Expression and structure of senescene marker protein-30(SMP-30) and its biological significance. *Mech. Aging Dev*. **107**, 271-280 .

Fujita, T.; Uchida, K.; Maruyama, N.(1992). Purification of senescence marker protein-30 (SMP30) and its androgen-independent decrease with age in the rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* **1116**, 122-128.

Horak, F.; Zieglmayer, P.; Zieglmayer, R.; Lemell, P.; Yao, R.; Staudinger, H.; Danzig, M. (2009). A placebo-controlled study of the nasal decongestant effect of phenylephrine and pseudoephedrine in the Vienna Challenge Chamber. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. **102** (2), 116.

Hucho, F. ; Wallenfels, K. (1972). Glucono-d-lactonase from *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys/ Acta* **276**, 176–179.

Ishigami, A.; Fujita, T.; Handa, S.; Shirasawa, T.; Koseki, H.; Kitamura, T.(2002). Senescence marker protein-30 knockout mouse liver is highly susceptible to tumor necrosis factor-alpha- and Fas-mediated apoptosis. *Am. J. Pathol.* **161**, 1273–1281

Jenner, P. ; Marsden, C.D. (1979). The substituted benzamides: a novel class of dopamine antagonists. *Life Sci*. **25** (4), 79-85.

Kondo, Y.; Inai, Y.; Sato, Y.; Hando, S.; Kubo, S., (2006). Senscence marker protein 30 funaction as glucono lactonase in L-ascorbic acid biosynthesis,and its knock out mice are prone to scurvy. *Proc. Natl. Acad. Sci*.**103**, 5723-5728.

Kondo, Y.; Ishigami, A.; Kubo, S.; Hando, S.; Gomi, K.(2004).Scenscence marker protein -30 is aunique enzyme that hydrolyzes di iso propyl phosphorofluoridate in the liver. *FEBS Lett*. **570**, 57-62.

Maruyama, N.; Ishigami, A.; Kondo, Y. (2010).Pathophysiological significance of senescence marker protein-30. *Geriatr Gerontol Int* .**10**(1), S88-S98.

Murray, R. K.; Bender, D. A., Botham, K. M.; Kennelly, P. J.; Rodwell, V. W. (2009). "Harper's Illustrated Biochemistry". 28 ed. The McGraw-Hill Companies, Chapter 8.

Nehlig, A.; Daval, J. L.; Debry, G. (1992). Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Research Reviews*. **17** (2), 139 –170.

Pacher, P.; Nivorozhkin, A; Szabó, C. (2006). Therapeutic Effects of Xanthine Oxidase Inhibitors: Renaissance Half a Century after the Discovery of Allopurinol. *Pharmacological Reviews*. **58** (1), 87–114.

Robyt, F. J.; White, J. B. (1987). "Biochemical Techniques Theory and Practice". Books / Cole Publishing Com., USA.p.33.

Schacterle, G. R.; Pollack, R. L. (1973). A simplified method for the quantitative assay of small amount of protein in biological material. *Anal. Biochem*. **51**, 654-655.

Son, T.G.; Zou, Y.; Jung, K.J.; Yu, B.P.; Ishigami, A., (2006). SMP-30 deficiency causes increased oxidative stress in brain .*Mech. Aging Dev*.**127**, 451-457.

Yamaguchi, M. (2005). Role of regucalcin in maintaining cell homeostasis and function (review).*Int. J. Mol. Med*.**15**, 371-389.

Yoshikawa, H. (2007). First-line therapy for theophylline-associated seizures. *Acta Neurol. Scand*. **115** (4 Suppl), 57–61.