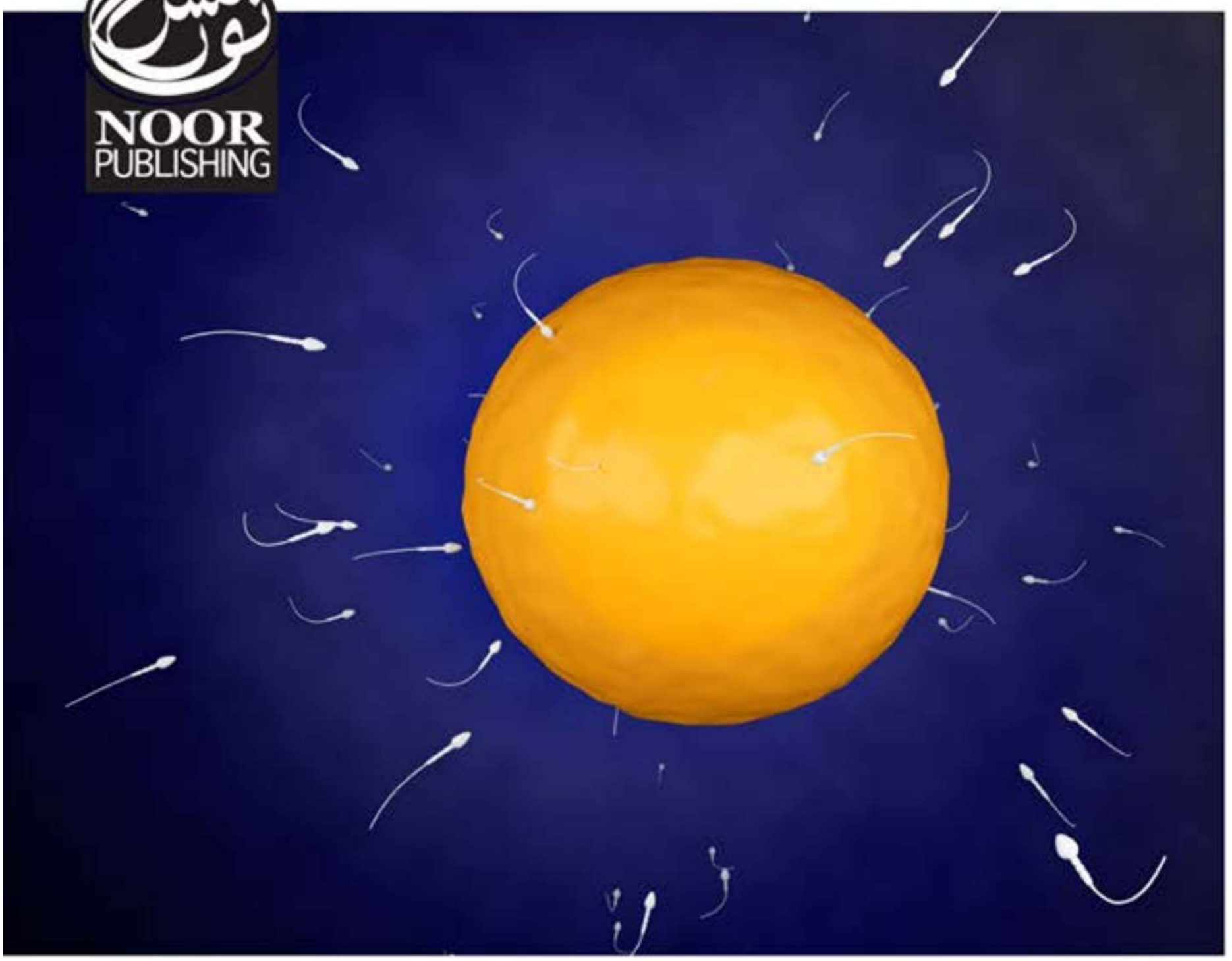


عبيدة عبد الخالق القدو
لؤي عبد علي الهلالي

الاجهاد التأكسدي والسمنة وفصل لإنزيم كلوتاثايون بيروكسديز لدى العقيمات

جامعة الموصل
كلية العلوم
قسم الكيمياء

الاجهاد التأكسدي والسمنة وفصل لإنزيم كلوتاثايون بيروكسديز لدى العقيمات

عبيدة عبد الخالق عباس القدو

الأستاذ المساعد الدكتور لؤي عبد علي الهلالي

2012

الخلاصة

تضمن الكتاب دراسة تأثير الكرب (الاجهاد) التأكسدي على العقائم (العقيمات) بنوعيها (الأولي والثانوي) من الإناث فضلا عن تأثير العمر والوزن والسكن في مدى زيادة حصول الكرب التأكسدي والعقم عن طريق قياس (17) متغيراً من متغيرات الأكسدة ومضادات الأكسدة، اذ أجريت هذه الدراسة على (223) أنموذجاً لإناث تراوحت أعمارهُنّ بين (19-45) سنة وشملت على (179) عقيماً قسمت كل منهما على مجموعتين بالاعتماد على نوعية العقم.

أشارت النتائج الى وجود انخفاض معنوي لدى العقائم من النوع الأولي عند مقارنتها مع مجموعة السيطرة للمتغيرات: فيتامين C، فيتامين E، الكلوتاثايون، البليروبين الكلي، حامض الفوليك والخارصين، وارتفاع معنوي للمتغيرات: إنزيم كلوتاثايون S-ترانسفريز، الألبومين، النحاس، الحديد، السيرولوبلازمين، المالونداياالديهايد وبيروكسي نيتريت. أما في العقائم من النوع الثانوي وجد لديهن انخفاض معنوي عند مقارنتهن مع مجموعة السيطرة للمتغيرات: فيتامين C، فيتامين E، الكلوتاثايون، البليروبين الكلي، حامض الفوليك، الخارصين والنحاس وارتفاع معنوي للمتغيرات: إنزيم كلوتاثايون بيروكسيديز، إنزيم كلوتاثايون S-ترانسفريز، السيرولوبلازمين، المالونداياالديهايد و بيروكسي نيتريت.. فضلاً على ذلك، فقد وجد ان حال الكرب التأكسدي لدى العقائم من النوع الأولي اقل شدة من العقائم في النوع الثانوي نتيجة الارتفاع المعنوي لدى النوع الأولي في مستوى مضادات الأكسدة وانخفاض في مستوى الأكسدة. كما أوضحت النتائج وجود انخفاض معنوي لدى العقائم في النوع الأولي مع تقدم العمر مقارنة مع مجموعة السيطرة للمتغيرات: فيتامين C، فيتامين E، سوبر اوكسيد ديسميوتيز، الكلوتاثايون، البليروبين الكلي، حامض الفوليك، الخارصين والنحاس وارتفاع معنوي في المتغيرات: إنزيم كلوتاثايون S- ترانسفريز، السيرولوبلازمين والمالونداياالديهايد إذ اوضحت النتائج ارتفاع حالة الكرب التأكسدي في المجموعة العمرية الاخيرة للعقيمات.

فضلا عن ذلك فقد تمت دراسة تأثير الوزن المفرط للعقائم على مستويات الأكسدة ومضادات الأكسدة إذ تبين وجود علاقة طردية بين زيادة الوزن للعقيمات وتركيزي المالونداياالديهايد ونترات البيروكسي وعلاقة عكسية مع مستويات مضادات أكسدة عدة (مثل فيتامين C، فيتامين E، إنزيم سوبر اوكسيد ديسميوتيز، البليروبين الكلي، حامض الفوليك وحامض اليوريك). فضلاً على ذلك فعند دراسة تأثير المنطقة السكنية على العقائم لوحظ أن هناك ارتفاعاً معنوياً في مستويات مضادات الأكسدة لدى العقائم داخل مركز مدينة الموصل وانخفاض مركبات الأكسدة عند مقارنتهن بالعقائم خارج مركز المدينة .

أما الجزء الثاني من الدراسة فتضمن فصلاً جزئياً لإنزيم كلوتاثايون بيروكسديز من بلازما أنثى سليمة وأنثى مصابة بالعقم من النوع الاولي ودراسة عدد من العوامل المؤثرة على فعالية الانزيم وتحديد وزنه الجزيئي .إذ تم فصل ثلاث حزم رئيسة بتقنية الترشيح الهلامي للراشح البروتيني الناتج عن الترسيب بكبريتات الامونيوم (50%) بعد عملية الفرز الغشائي (الديلزة)، وأظهرت الحزمة الأولى فعالية عالية للإنزيم. والتي قدر الوزن الجزيئي لها للإنزيم باستخدام تقنية الترشيح الهلامي و كانت بحدود 88131 دالتون.

كما تمت دراسة الظروف المثلى لقياس فعالية الإنزيم المنقى جزئياً من بلازما الدم وأظهرت النتائج ان الظروف المثلى لعمل الانزيم عند تركيز 50 مايكروغرام/مل باستخدام المحلول المنظم الفوسفات بتركيز 0.3 مول/لتر بأس هيدروجيني 6.5 وزمن التفاعل 14 دقيقة ودرجة حرارة 40°م و2.5 ملي مول/لتر من مادة الاساس كلوتاثايون (GSH) وعند استخدام رسم لاين ويفر– برك تم ايجاد قيمة السرعة القصوى (V_{max}) وثابت مكيلس (K_m) و التي كانت مساوية لـ 1.56 مايكرومول/دقيقة و 1.1 ملي مول/لتر على التوالي. كذلك تمت دراسة تأثير عدد من المثبطات على فعالية الإنزيم ودراسة تأثير عدد من الادوية على فعالية الانزيم، وبينت النتائج أن كبريتات النحاس والباراسيتامول كانا من نوع التثبيط غير التنافسي وخلات الخارصين كان من نوع التثبيط التنافسي.

بسم الله الرحمن الرحيم

﴿لِلَّهِ مُلْكُ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ يَخْلُقُ مَا يَشَاءُ يَهَبُ لِمَنْ يَشَاءُ إِنَاثًا وَيَهَبُ لِمَنْ يَشَاءُ الذُّكُورَ ۝ أَوْ يُزَوِّجُهُمْ ذُكْرَانًا وَإِنَاثًا وَيَجْعَلُ مَنْ يَشَاءُ عَقِيمًا إِنَّهُ عَلِيمٌ قَدِيرٌ﴾

صدق الله العظيم

سورة الشورى

الآيات (49-50)

شكر وتقدير

الحمد لله رافعةً اليه جل وعلا آيات الحمد والثناء والشكر والصلاة والسلام على سيد المرسلين وخاتم النبيين سيدنا محمد صلى الله عليه وعلى آله وأصحابه أجمعين

يطيب لي أن أتقدم بجزيل شكري وامتناني الى الدكتور لؤي عبد على الهلالي المشرف على اعداد الكتاب لما قدمه لي من ارشاد ودعم متواصل طيلة مدة البحث.

واتوجه بالشكر الجزيل الى الدكتور سالم محمد ذنون (كلية التربية / قسم اللغة العربية) لتقويمه الرسالة لغويا .

كما اعبر عن فائق الشكر والتقدير إلى ادارة ومنتسبي مختبرات مستشفى الخنساء لما ابدوه من مساعدة بتزويدي بالعينات .

وكما يلزمني الوفاء التوجه بالشكر والامتنان إلى عمادة كلية العلوم ورئاسة قسم الكيمياء ومنتسبي القسم وكل من ساهم في ابداء المساعدة لي.

ولا يفوتني ان اقدم جزيل الشكر والتقدير إلى زميلاتي وزملائي طلبة الدراسات العليا لما ابدوه من روح صادقة في التعاون داعية الله العلي القدير ان يوفقهم

وأخيراً اقدم خالص شكري وامتناني لعائلتي الكريمة لدعمهم وتشجيعهم طوال فترة الدراسة وشكري إلى جميع الذين اسدوا لي عوناً والى كل من شجعني في المواصلة والاستمرارية بهذه المسيرة العلمية .

عبيدة

قائمة المحتويات

الفقرة	العنوان	رقم الصفحة
قائمة المحتويات		I
قائمة الاشكال		V
قائمة الجداول		VII
قائمة المختصرات		VIII
الفصل الأول: المقدمة		
1.1	الأكسدة	1
2.1	الجذور الحرة	2
1.2.1	تفاعلات الجذور الحرة	3
3.1	الكرب التأكسدي	3
4.1	العقم	4
1.4.1	أسباب العقم	5
5.1	مضادات الأكسدة	5
1.5.1	تصنيف مضادات الأكسدة استنادا الى طبيعة عملها	6
6.1	الكرب التاكسدي و العقم	6
7.1	وصف لمتغيرات الأكسدة ومضادات الأكسدة المقاسة في البحث	8
1.7.1	فيتامين C	8
2.7.1	فيتامين E	9
3.7.1	حامض الفوليك	9
4.7.1	حامض اليوريك	10
5.7.1	البليروبين	11
6.7.1	الالبومين	11
7.7.1	السيرولوبلازمين	12
8.7.1	الكلوتاثايون	12
9.7.1	الخارصين	13
10.7.1	النحاس	13

الفقرة	العنوان	رقم الصفحة
11.7.1	الحديد	14
12.7.1	الكالسيوم	14
13.7.1	المالونداياالديهايد	15
14.7.1	البيروكسي نيتريت	15
15.7.1	إنزيم سوبر أوكسيد ديسميوتيز	16
16.7.1	إنزيم كلوتاثايون S-ترانسفيريز	17
17.7.1	إنزيم كلوتاثايون بيروكسيديز	18
8.1	الهدف من البحث	20
الفصل الثاني المواد وطرائق العمل		
1.2	الأجهزة المستخدمة	21
2.2	المواد المستعملة	21
3.2	النماذج المستخدمة	21
1.3.2	نماذج مصل الدم	21
1.1.3.2	مجموعة السيطرة	21
2.1.3.2	مجموعة العقم	21
4.2	جمع نماذج مصل الدم وحفظها	22
5.2	طرائق العمل	23
1.5.2	تقدير فيتامين E (ألفا-توكوفيرول) في مصل الدم	23
2.5.2	تقدير تركيز فيتامين C في مصل الدم	24
3.5.2	تقدير حامض الفوليك في مصل الدم	26
4.5.2	تقدير تركيز حامض اليوريك في مصل الدم	29
5.5.2	تقديرتركيز البليروبين الكلي في مصل الدم	30
6.5.2	تقدير تركيز الألبومين في مصل الدم	30
7.5.2	تقدير تركيز السيرولوبلازمين في مصل الدم	31
8.5.2	تقدير تركيز الكلوتاثايون في مصل الدم	32
9.5.2	تقدير تركيز عدد من العناصر في مصل الدم بتقنية الامتصاص الذري اللهبي	33

الفقرة	العنوان	رقم الصفحة
10.5.2	تقدير تركيز الخارصين في مصل الدم	33
11.5.2	تقدير تركيز النحاس في مصل الدم	34
12.5.2	تقدير تركيز الحديد في مصل الدم	35
13.5.2	تقدير تركيز الكالسيوم في مصل الدم	36
14.5.2	تقدير مستوى بيروكسيدة الدهن (المالونداياالديهايد) في مصل الدم	37
15.5.2	تقدير تركيز بيروكسي نيتريت في مصل الدم	39
16.5.2	تقدير فعالية إنزيم سوبر اوكسيد ديسميوتيز (SOD) في مصل الدم	40
17.5.2	تقدير فعالية إنزيم كلوتاثايون S- ترانسفيريز في مصل الدم	41
18.5.2	تقدير فعالية إنزيم كلوتاثايون بيروكسديز(GPx) في مصل الدم	42
6.2	تنقية جزئية لإنزيم كلوتاثايون بيروكسديز من بلازما الدم السليمة والمصابين بالعقم من النوع الاولي	43
1.6.2	الترسيب بكبريتات الامونيوم أو الإزاحة الملحية	44
2.6.2	الفرز الغشائي	44
3.6.2	كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي	45
1.3.6.2	تعبئة عمود الفصل	46
4.6.2	تقنية التجفيد بواسطة جهاز الـ Lyophilizer	47
7.2	التقدير الكمي للبروتين	47
1.7.2	تحضير الكواشف	48
2.7.2	تحضير المنحنى القياسي	48
8.2	تقدير تركيز السيلينيوم في الحزم البروتينية الحاوية على اعلى فعالية لإنزيم GPx	49
9.2	التحليل الإحصائي	51
الفصل الثالث النتائج والمناقشة		
3	النتائج والمناقشة	52
1.3	مستويات الأكسدة ومضادات الأكسدة للعقائم من النوع الأولي والثانوي مقارنة مع مجموعة السيطرة	52
2.3	مقارنة مستويات الأكسدة ومضادات الأكسدة للعقائم من النوع الأولي مع العقائم من النوع الثانوي	57

الفقرة	العنوان	رقم الصفحة
3.3	مستويات الأكسدة ومضادات الأكسدة لدى العقائم من النوع الأولي بالاعتماد على العمر	59
4.3	مستويات الأكسدة ومضادات الأكسدة لدى العقائم من النوع الأولي بالاعتماد على قيمة منسب كتلة الجسم Body mass index (BMI)	62
5.3	مستويات الأكسدة ومضادات الأكسدة لدى العقائم من النوع الأولي مقارنة حسب منطقة سكناهم داخل وخارج مركز المدينة	66
6.3	فصل إنزيم كلوتاثايون بيروكسديز	68
1.6.3	فصل البروتين بطريقة الإزاحة الملحية	68
2.6.3	الفرز الغشائي	68
3.6.3	كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي	71
1.3.6.3	تقدير الوزن الجزيئي التقريبي بتقنية الترشيح الهلامي	73
7.3	دراسة عدد من العوامل المؤثرة على فعالية إنزيم كلوتاثايون بيروكسديز المفصول من البلازما	74
1.7.3	تأثير تركيز الإنزيم	74
2.7.3	تأثير المحلول المنظم	75
1.2.7.3	تركيز المحلول المنظم	75
2.2.7.3	الأس الهيدروجيني للمحلول الفوسفات المنظم	76
3.7.3	زمن التفاعل	76
4.7.3	تأثير درجة الحرارة	77
5.7.3	تأثير تركيز مادة الأساس	78
8.3	ملخص الظروف المثلى لقياس فعالية إنزيم كلوتاثايون بيروكسديز	79
9.3	تركيز عنصر السيلينيوم في الحزم البروتينية الثلاث	79
10.3	دراسة تأثير عدد من المثبطات على فعالية إنزيم GPx	81
11.3	دراسة تأثير عدد من الأدوية (العقاقير) على فعالية إنزيم GPx	81
12.3	دراسة أنواع التثبيط لعدد من من المركبات الكيميائية والدوائية المختارة على فعالية إنزيم كلوتاثايون بيروكسديز	82
1.12.3	كبريتات النحاس	82
2.12.3	خلات الخارصين	83
3.12.3	الباراسيتامول	85
	الاستنتاجات والتوصيات	86
	الاستنتاجات	86
	التوصيات	87
	المصادر	88

قائمة الأشكال

رقم الشكل	العنوان	رقم الصفحة
1-1	تغيير المركبات الكيمياء الحياتية المختلفة بتأثرها بعوامل الأكسدة	1
2-1	العوامل المؤدية الى زيادة توليد مركبات الأكسدة المختلفة والتأثير الناتج عن هذه الجذور من تحطم الـ DNA	1
3-1	تكون جذر حر من جزيئة مستقرة بعد فقدانها إلكتروناً واحداً	2
4-1	يوضح انه عند زيادة مركبات الأكسدة عن مضادات الأكسدة المختلفة يؤدي الى حدوث الكرب التأكسدي الذي يعمل على تحطيم الخلية	4
5-1	حصول الكرب التأكسدي داخل الجهاز التناسلي للمرأة يمكن ان يؤدي الى حدوث تغيرات مختلفة داخل الرحم مما يؤدي الى العقم بأسبابها المختلفة	7
6-1	تحول حامض الاسكوربيك الى جذر الاسكوربيك	8
7-1	أشكال فيتامين E الفعالة	9
8-1	التركيب الكيميائي لحامض الفوليك	10
9-1	تقويض جزيئة الهيم وتحولها الى البليروبين ومن ثم تحول البليروبين الى البليفردين بعد ازالة ROS	11
10-1	التركيب الكيميائي للكلوتاثايون	12
11-1	التركيب الكيميائي لمركب MDA	15
12-1	تكون بيروكسي نيتريت وتفاعله مع العديد من المركبات الحيوية داخل الجسم	16
13-1	إزالة تأثير السمية للمركب بنزوبرين Benzo[a]pyren	18
1-2	تفاعل حامض الاسكوربيك ليكون مشتق ثنائي نايتروفنيل هيدرازون	24
2-2	المنحنى القياسي لفيتامين C	26
3-2	المنحنى القياسي لتقدير تركيز الخارصين	34
4-2	المنحنى القياسي لتقدير تركيز النحاس	35
5-2	عملية الفرز الغشائي	45
6-2	عملية فصل البروتينات حسب الوزن الجزيئي	46

رقم الشكل	العنوان	رقم الصفحة
7-2	المنحنى القياسي لتقدير كمية البروتين	49
8-2	المنحنى القياسي لتقدير تركيز السيلينيوم	50
1-3	المظهر الجانبي لروغان الحزم البروتينية لإنزيم كلوتاثايون بيروكسديز الناتجة من عمود الفصل بواسطة تقنية الترشيح الهلامي نوع سيفيديكس G-100 والعائدة لبلازما أنثى سليمة	72
2-3	المظهر الجانبي لروغان الحزم البروتينية لإنزيم كلوتاثايون بيروكسديز الناتجة من عمود الفصل بواسطة تقنية الترشيح الهلامي نوع سيفيديكس G-100 والعائدة لبلازما أنثى مصابة بعقم من النوع الأولي	72
3-3	المنحنى القياسي لتحديد الوزن الجزيئي بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفصل (Sephadex G-100)	74
4-3	تأثير التراكيز المختلفة من إنزيم GPx على الفعالية الإنزيمية	75
5-3	تأثير الأس الهيدروجيني للمحلول المنظم على فعالية إنزيم GPx .	76
6-3	العلاقة بين فعالية إنزيم GPx وزمن التفاعل	77
7-3	تأثير درجة حرارة التفاعل على فعالية إنزيم GPx	78
8-3	تأثير تراكيز مختلفة من مادة الأساس كلوتاثايون على فعالية الإنزيم	79
9-3	رسم لاينويفر - برك لتوضيح قيمتي ثابت ميكيلس والسرعة القصوى	79
10-3	مراحل تحفيز إنزيم GPx	80
11-3	تأثير تراكيز مختلفة لمادة كبريتات النحاس على فعالية الإنزيم	83
12-3	رسم لاينويفر- برك لتوضيح ثابت ميكيلس والسرعة القصوى عند استخدام المثبط كبريتات النحاس	83
13-3	تأثير التراكيز المختلفة لمادة خلات الخارصين على فعالية الإنزيم	84
14-3	رسم لاينويفر- برك لتوضيح ثابت ميكيلس والسرعة القصوى عند استخدام المثبط خلات الخارصين	84
15-3	تأثير التراكيز المختلفة للباراسيتامول على فعالية الإنزيم	85
16-3	رسم لاينويفر- برك لتوضيح ثابت ميكيلس والسرعة القصوى عند استخدام مثبط الباراسيتامول	85

قائمة الجداول

رقم الجدول	العنوان	رقم الصفحة
1-2	استمارة الاستبيان.	22
1-3	مستويات الأكسدة ومضادات الأكسدة للعقم الأولي من الإناث مقارنة مع مجموعة السيطرة	53
2-3	مستويات الأكسدة ومضادات الأكسدة للعقائم من النوع الثانوي مقارنة مع مجموعة السيطرة	56
3-3	مقارنة مستويات الأكسدة ومضادات الأكسدة للعقائم من النوع الأولي مع العقائم من النوع الثانوي	58
4-3	مستويات الأكسدة ومضادات الأكسدة لدى العقائم من النوع الأولي بالاعتماد على العمر وحسب اختبار أنوفا ANOVA test	61
5-3	مستويات الأكسدة ومضادات الأكسدة لمجموعة السيطرة مع العقماء للإناث بالاعتماد على قيمة منسب كتلة الجسم (BMI).	64
6-3	مستويات الأكسدة و مضادات الأكسدة للعقائم من النوع الأولي مقارنة مع مجموعة السيطرة حسب منطقة سكناهم داخل وخارج مركز مدينة الموصل	67
7-3	خطوات تنقية إنزيم كلوتاثايون بيروكسديز من بلازما سليمة غير مصابة بعقم	69
8-3	خطوات تنقية إنزيم كلوتاثايون بيروكسديز من العقيمة المصابة بالعقم من نوع الأولي	70
9-3	الاوزان الجزيئية وحجوم الروغان للمواد القياسية المستخدمة في تقنية الترشيح الهلامي باستخدام هلام السيفيدكس Sephadex G-100	73
10-3	تأثير التراكيز المختلفة للمحلول الفوسفاتي المنظم على فعالية إنزيم GPx	75
11-3	الظروف المثلى للإنزيم المنقى	80
12-3	دراسة تأثير عدد من المركبات الكيميائية على فعالية أنزيم GPx	81
13-3	تأثير الأدوية على فعالية الإنزيم GPx	82

قائمة المختصرات

العنوان	المختصر
Atomic absorption spectrophotometry	AAS
Body Mass Index	BMI
Bovine serum albumin	BSA
Bromocresol green	BCG
Ceruloplasmin	CP.
1-Chloro-2,4-dinitrobenzene	CDNB
Cytochrome P450	Cyt P450
Dehydroascorbic acid	DHAA
Deoxyribonucleic acid	DNA
2,4-dinitrophenyl hydrazine	2,4-DNPH
2,4- dinitrophenylhydrazine\thiourea\copper	DTC
5,5ٕ- dithio bis (2-nitrobenzoic acid)	DTNB
Ethylene diamine tetra acetic acid	EDTA
Extinction coefficient	ε_o
Glutathione reduced -form	GSH
Glutathione oxidized -form	GSSG
Glutathione peroxidase	GPx
Glutathione S- transferase	GST

الفصل الأول

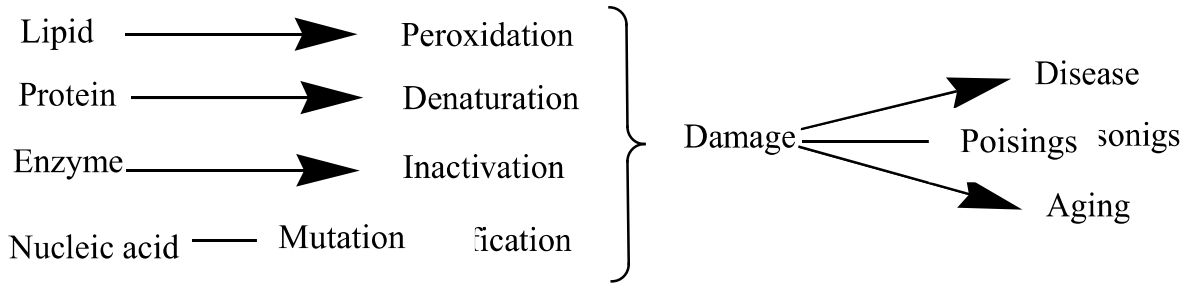
المقدمة

1. المقدمة Introduction

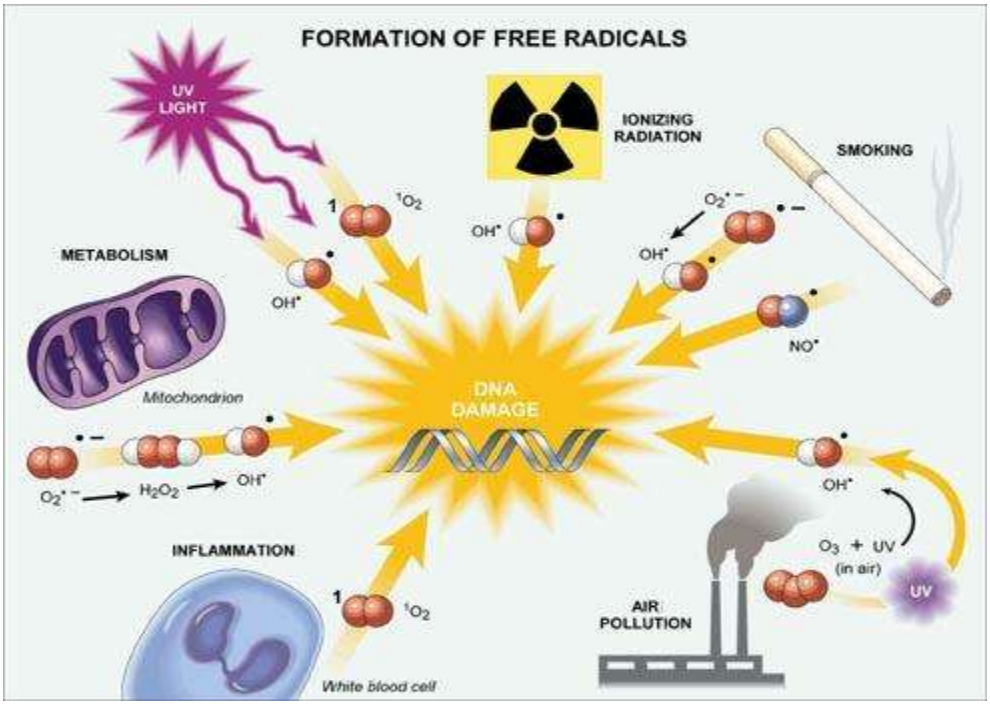
1.1. الأكسدة oxidation

عرفت أهمية الجذور الحرة منذ مدة ليست بالقصيرة عندما ذكر كل من الباحثين Gershman وGilbert في الولايات المتحدة سنة (1954) بأن الأوكسجين يمكن أن يكون له تأثير سام ومحطم عندما يكوّن جذور حرة، وقد بدأ الاهتمام بها عند اكتشاف أهمية تفاعلات الجذور في كيمياء الجسم الطبيعية وفي آلية عمل العديد من السموم .

إن العديد من العوامل (الفيزيائية والكيميائية وعدد من الأغذية والإجهاد العصبي والنفسي وعدد من الأمراض) تسبب زيادة في إنتاج أصناف الأوكسجين والنيتروجين الفعالة Reactive Oxygen and Nitrogen species (ROS and RNS) وفي الوقت نفسه تسبب قلة واستنزافاً في الأنظمة الدفاعية المضادة للأكسدة مؤدية إلى التحطيم التأكسدي لمكونات الكيمياء الحياتية المختلفة كالدهون او الأحماض النووية او البروتينات وغيرها والذي يؤدي بعد ذلك الى تحوير وتغيير في مكوناتها ومن ثم في وظائفها وبالتالي الإصابة بالإمراض المختلفة (الشكل 1-1)، وان الأذى الذي تحدثه مركبات الأكسدة تلعب دوراً مهماً في العديد من الحالات المرضية. لذلك أوجدت أجسام الكائنات الحية آليات دفاعية ضد مركبات الأكسدة المختلفة التي تسمى مضادات الأكسدة Antioxidants، إذ إن مركبات الأكسدة بأنواعها ومصادرها المختلفة (كالمصادر الداخلية) تعد بعضها ذا أهمية في جسم الإنسان باستخدامها في المناعة والعلاج الكيميائي وبناء البروستاكلاندينات ولإنتاج الطاقة (Tremellen, 2008) وهناك مصادر خارجية لمركبات الأكسدة منها تعرض الجسم إلى ملوثات كيميائية بيئية مختلفة مثل الإشعاعات(UV، X-ray) او دخان من وسائل النقل او مبيدات حشرية او الأتربة وغيرها التي تشكل تهديداً خطيراً لصحة الإنجاب حول العالم وزيادة حالات العقم بشكل مباشر او غير مباشر(Kefer *et al.*, 2009) (الشكل 1-2).



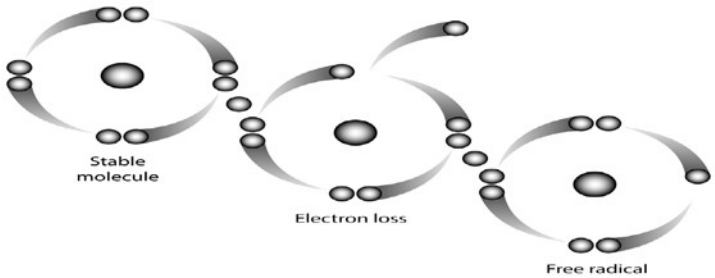
الشكل (1-1): يوضح تغييراً في تركيب مكونات الكيمياء الحياتية(دهون وبروتينات والإنزيم والأحماض النووية) التي يمكن ان تتحطم وتسبب أمراضاً او تسمماً او الشيخوخة وغيرها (Radak, 2000).



الشكل (1-2): العوامل المؤدية إلى زيادة توليد مركبات الأكسدة المختلفة والتأثير الناتج عن هذه الجذور من تحطم الـ DNA (http://www.healthfruit.com/images/freeradical02).

2.1. الجذور الحرة Free radicals

تعرف الجذور الحرة بأنها مركبات كيميائية تحتوي على إلكترون واحد او أكثر غير مزدوج في الخلية وتكون شديدة التفاعل بسبب وجود الإلكترون المنفرد لذلك تحاول الجزيئة الوصول الى حال الاستقرار في أسرع وقت ممكن (اذ تكون ذات عمر قصير نسبياً) فهي تحاول ان تهاجم الجزيئات المجاورة وتكتسب الإلكترون المطلوب من الجزيئة المستقرة والأقرب، إذ إن الجزيئة المهاجمة سوف تحرر جذراً حراً جديداً (الشكل 1-3) وعندئذ يكمن الخطر في أنه تبدأ سلسلة من التفاعلات المتسلسلة للجذور الحرة ومن ثم سوف تعرقل عمل الخلايا الطبيعية وإمكانية تحولها الى خلايا غير طبيعية مؤكسدةِ التي يُمْكِنُ أَنْ تقُودَ إلى تغييرات مختلفة في بنية ووظيفية الخلايا (Honaramooz, 2011; Agarwal *et al*., 2008; Gleeson *et al.,*2006).



الشكل (1-3): تكون جذر حر من جزيئة مستقرة بعد فقدانها إلكتروناً واحداً (Agarwal *et al*., 2008).

إن أكثر الجذور الحرة شيوعا في الخلية التي تسبب الكرب التأكسدي هي جذر سوبر أوكسيد السالب Superoxide radical وجذر الهيدروكسيل وجذر البيروكسيل Peroxyl anion radical وجذر أوكسيد النيتريك Nitric oxide .

1.2.1. تفاعلات الجذور الحرة Free radicals reactions

هناك أربعة تفاعلات رئيسة تخضع لها الجذور الحرة للوصول الى حال اكثر استقراراً وهي كالآتي (Wu and Cederbaum, 2003):

1.1.2.1. سلب ذرة هيدروجين Hydrogen abstraction

الجذر الحر يتفاعل مع جزيئة أخرى تحتوي على ذرة هيدروجين حرة (مانحة للهيدروجين) ونتيجة لذلك يتآصر الجذر الحر مع الهيدروجين و يصبح مستقراً بينما الجزيئة المانحة للهيدروجين تصبح جذراً حراً:

$$R^{\cdot} + BH \longrightarrow RH + B^{\cdot}$$

2.1.2.1. تفاعل الإضافة Addition reaction

يتم في هذا التفاعل إضافة جذر حر الى جزيئة أخرى محولا إياه الى جزيئة ذات جذر حر:

$$R^{\cdot} + \text{—B} \longrightarrow R\text{—B}^{\cdot}$$

3.1.2.1. تفاعل الانتهاء Termination reaction

هناك طرائق عدة للانتهاء منها قد يتفاعل جذر حر مع جذر حر آخر مكوناً مركباً مستقراً:

$$R^{\cdot} + R^{\cdot} \longrightarrow R\text{—}R$$

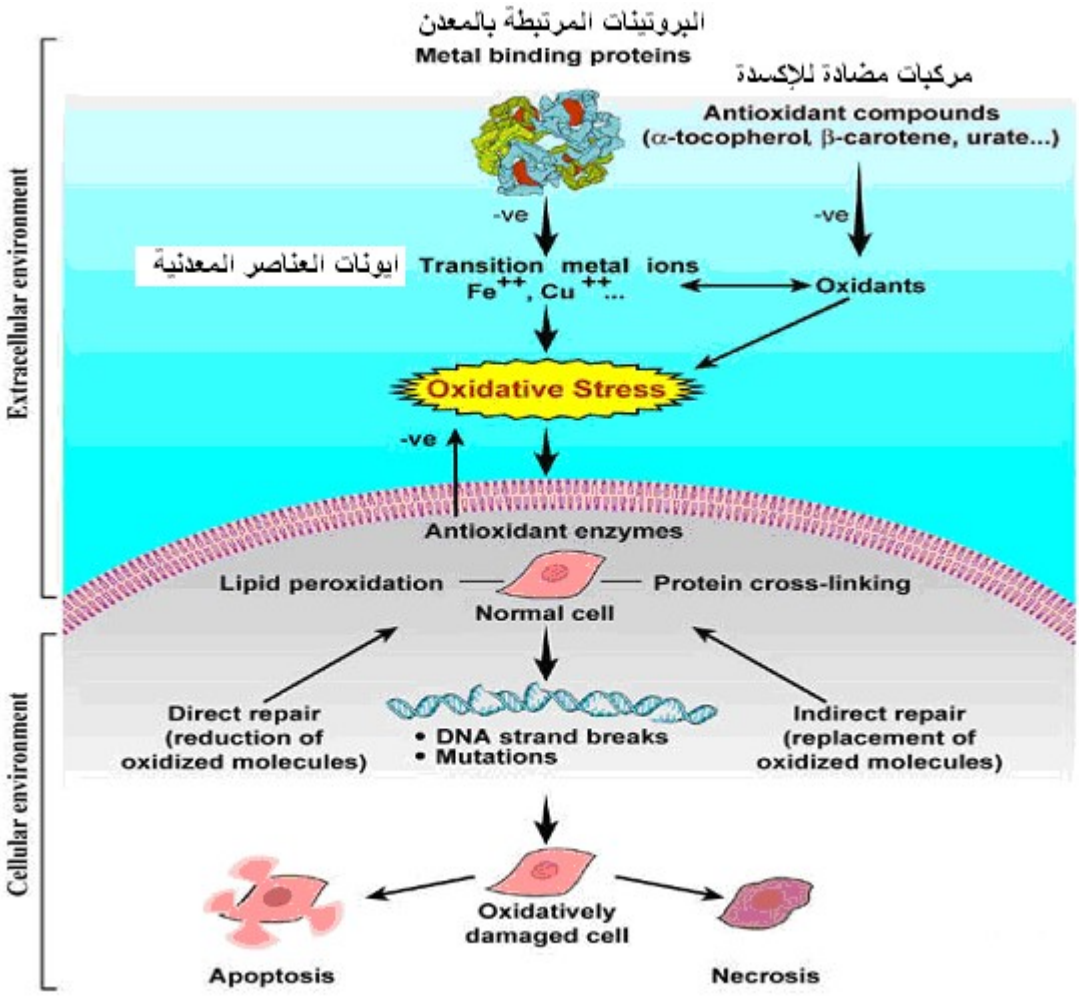
4.1.2.1. التفاعلات غير المتكافئة Disproportionation reaction

إن أي جذرين حريين يتفاعلان معا بحيث يعطي احدهما يعطي إلكتروناً الى الجذر الآخر مكوناً مركبين مستقرين ومختلفين كما في المعادلة في أدناه:

$$R^{\cdot} + R^{\cdot} \longrightarrow R^{+} + R^{-}$$

3.1. الكرب التأكسدي Oxidative stress

يعرف الكرب التأكسدي (الإجهاد التأكسدي) بأنه عدم التوازن بين المواد المؤكسدة (الجذور الحرة و نواتجها من العمليات الأيضية) ومضادات الأكسدة إذ إن الخلايا تحتوي على مواد مؤكسدة أكثر من مضادات الأكسدة وهذا بدوره يؤدي الى تدمير الجزيئات الحيوية في الجسم مثل البروتينات والدهون والأحماض النووية، اذ يحدث الكرب التأكسدي عندما يتجاوز مستوى مركبات الاكسدة قدرة مضادات الأكسدة على إزالتها (Sekhon *et al*., 2010 ; Garrido *et al*., 2004) (الشكل 1-4).



الشكل (1-4): عند زيادة مركبات الأكسدة عن مضادات الأكسدة المختلفة يؤدي الى حدوث الكرب التأكسدي الذي يعمل على تحطيم الخلية (Agarwal *et al*., 2005).

4.1. العقم Infertility

يعرف العقم بأنه عدم القدرة على حدوث الاخصاب او الحمل بعد سنة واحدة من المحاولة (Asrm, 2004) او ستة اشهر، وهناك عدد من من النساء يستطعن الحمل ولكنهن غير قادراتٍ على إبقاء الحمل وهذا يمكن عدّه عقماً أيضا وهذا يحدث غالبا للنساء بأعمار 35 سنة فما فوق، اذ يشكل العقم نسبة (10-15%) من حالات الزواج في العالم ومسؤوليته مشتركة بين الزوجين اذ يسهمان كلاهما في ذلك، او يعزى لأحدهما. أوضحت منظمة الصحة العالمية ان 24% من حالات العقم تعود لأسباب كامنة في كلا الزوجين و 41% أسبابها متعلقة بالزوجة و 24% تعود الى الزوج و 11% غير معروف الأسباب (Han *et al*.,2010 ; Makker *et al*., 2009). والعقم يكون على نوعين : عقم أولي وعقم ثانوي(Primary and secondary infertility)، اذ ان العقم الأولي هو العقم الذي يصيب المرأة منذ بداية حياتها الزوجية، أما العقم الثانوي هو العقم الذي يصيب المرأة بعد إنجاب طفل أو طفلين أو بعد إجراء عملية إجهاض لها (Abida-Malik *et al*., 2006; Pyari *et al*.,2006)، وهناك العُقُم غير المفسر Unexplained infertility (Agarwal and Allamaneni, 2004) الذي يعد أكثرُ غموضاً مِنْ أي نوع آخر للعقم ويُمْكِنُ أَنْ يَنْتجَ من خلال زيادة أصناف الأوكسجين الفعالة في التجويف البريتوني Peritoneal cavity اذ وجد أن في السائلِ البريتوني Peritoneal fluid لنساء مصابات بالعقم مستويات

عالية من أصناف الأوكسجين الفعالة (Wang *et al*., 1997) وانخفاض في مستويات مضادات الأكسدة بالنسبة للعقم غير المفسر مقارنة مع مجموعة السيطرة (Polak and Koziol-Montewka, 2001).

1.4.1. أسباب العقم

هناك أسباب عدة للعقم منها: الكرب التاكسدي الذي يؤدي الى اضطرابات فسلجية و هورمونية ولكلا الجنسين، ففي الإناث يقوم **هورمون المنشط للجريبات** Follicle stimulating hormone (FSH) بتحفيز الحويصلات التي تحتوي على البويضات، اذ لوحظ أن انخفاض نشاط المبيض يكون مصحوباً دائماً بارتفاع حاد في مستوى هورمون الـ (FSH) اما **هورمون انبثاق البويضة من الجريبات** Luteinizing hormone (LH) فإنه يحفز آخر مرحلة من مراحل نضوج البويضات وانطلاقها من الحويصلة وهو ما يسمى بالتبويض. **وهورمون الإستراديول** (E2) Estradiol الذي يعد من الهورمونات المهمة لتهيئة الجدار المبطن للرحم لاستقبال الجنين و تهيئة الإفرازات المخاطية في عنق الرحم لاستقبال الحيوانات المنوية ونقلها الى تجويف الرحم. ومن ناحية أخرى فهو يعكس كفاءة التبويض في أثناء عملية التنشيط كما يفيد فى متابعة نشاط المبيض في أثناء هذه العملية بهدف منع حدوث أي نشاط زائد قد يؤدى إلى العديد من المضاعفات(Lewis, 2007; Warhaus, 2007). أما **هورمون البروجيستيرون** Progesterone فهو يقوم بالتحضير النهائي وتثبيت الطبقة المبطنة للرحم لاستقبال الجنين ووجود نسبة منخفضة من هورمون البروجيستيرون يعكس وجود مشكلة فى التبويض (Perkins and Meyers-Thompson,2007; Warhaus, 2007). **وهورمون البرولاكتين** Prolactin المسؤول عن تحفيز الثدي لإنتاج اللبن في أثناء الرضاعة، ولكن زيادة مستوى البرولاكتين عن الحد الطبيعي في حال عدم وجود رضاعة يشير إلى جود حالة مرضية أو عارض جانبي نتيجة تعاطي عدد من الأدوية الأمر الذي يؤثر على نمو البويضات وعملية التبويض بأكملها. فضلاً على ذلك فإن هورمونات الغدة الدرقية لها تأثير فزيادة أو قلة افرازها يضر بعملية التبويض. وهناك الهورمونات الذكرية التي يتم إنتاج كمية صغيرة منها **التيستوستيرون** Testosterone ولكن زيادة إنتاج هذه الهورمونات (وهو أمر قد يحدث في العديد من الحالات المرضية) يعارض تطور وتكوين الحويصلة والتبويض وتكوين السائل المخاطي (Isaacs, 2007).

5.1. مضادات الأكسدة Antioxidants

تعرف مضادات الأكسدة بأنها عبارة عن مركبات ذات تراكيب مختلفة (صغيرة او كبيرة) تعمل على تثبيط او إزالة تأثير الأكسدة التي تحدث داخل الجسم او خارجه اذ تعمل على إزالة أصناف الأوكسجين والنيتروجين الفعالة من الجسم باستمرار (Agarwal *et al*., 2008) ، إذ إن الحاجة لمضادات الأكسدة تصبح أكثر أهمية مع زيادة التعرض للجذور الحرة من الملوثات المختلفة (Al-Helaly, 2011; Ahmed and Al-Helaly, 2008) أو الأمراض التي تزيد من الكرب التأكسدي، إذ إن مضادات الأكسدة هي المواد التي تجعل الجذور الحرة غير قادرة على تحطيم الخلايا Agarwal *et al*., 2005) وتصنف مضادات الأكسدة الى تصنيفات عدة منها اعتمادا على مصادرها (الداخلية أو الخارجية) فمضادات الأكسدة الخارجية تشمل الفيتامينات والمعادن وغيرها أما الداخلية تشمل الإنزيمات والبروتينات، أو تصنف على أساس كونها إنزيمية وغير إنزيمية وفضلا عن ذلك يمكن أن تصنف مضادات الأكسدة استنادا إلى عملها وتكون كالآتي:

1.5.1. تصنيف مضادات الأكسدة استنادا الى طبيعة عملها:

1.1.5.1. مضادات الأكسدة الواقية Preventive antioxidants

تقوم هذه المضادات بمنع تكوين الجذور الحرة وهي عبارة عن بروتينات مرتبطة بالمعادن مثل: السيرولوبلازمين Ceruloplasmine والألبومين Albumin والترانسفيرين Transferrin والفيريتين Ferritin التي تعمل على منع عدد من المعادن من التفاعل لتكوين جذور حرة (Saleem, 2002; Halliwell and Gutteridge, 2000) كما في معادلة تفاعل فينتون الذي يشترك فيه الحديدوز في تكوين جذور الهيدروكسيل في أدناه:

$$Fe^{++} + H_2O_2 \longrightarrow \cdot OH + \cdot OH + Fe^{+++}$$

2.1.5.1. مضادات الأكسدة الكاسحة Scavenging antioxidants

تعمل هذه المضادات على إزالة الجذور الحرة في حال تكونها أي تمنع من عملية استمرار الانتشار للجذور الحرة وهي مركبات واهبة للإلكترون تتفاعل مع الجذور الحرة وتكون مركبات غير فعالة ليس لها القدرة على مهاجمة خلايا الجسم ويقسم هذا النوع من مضادات الأكسدة الى:

أ. الإنزيمات Enzymes

وتشمل هذه الإنزيمات: سوبر أوكسيد ديسميوتيز (SOD) Superoxide dismutase وكتاليز (CAT) Catalase وكلوتاثايون بيروكسيديز (GPx) Glutathione peroxidase وكلوتاثايون ريدكتيز Glutathione Reductase (GRd) وكلوتاثايون S- ترانسفيريز(GST)Glutathione S-transferase (Tremellen, 2008; Suleyman *et al*.,2003).

ب. جزيئات صغيرة Small molecules

من هذه الجزيئات الصغيرة حامض اليوريك Uric acid، البليروبين Billirubin ، فيتامين C Ascorbic acid، فيتامين α-Tocopherol E وبيتا-كاروتين β-Carotene (Agarwal *et al*., 2007; Siemianowicz *et al*., 2004).

3.1.5.1. مضادات الأكسدة الإصلاحية الإنزيمية Repair antioxidant enzymes

تعمل هذه الأنواع من المضادات على إصلاح التلف الناتج من الجذور الحرة ومن الأمثلة عليها: إنزيم ميثيونين سلفوكسيد ردكتيز Methionine sulfoxid reductase الذي يعمل على تصليح تلف في البروتين و إنزيمي DNA لايكيز DNA ligase وDNA بوليميريز DNA polymerase الذين يعملان على ترميم (إصلاح) تلف الـ DNA.

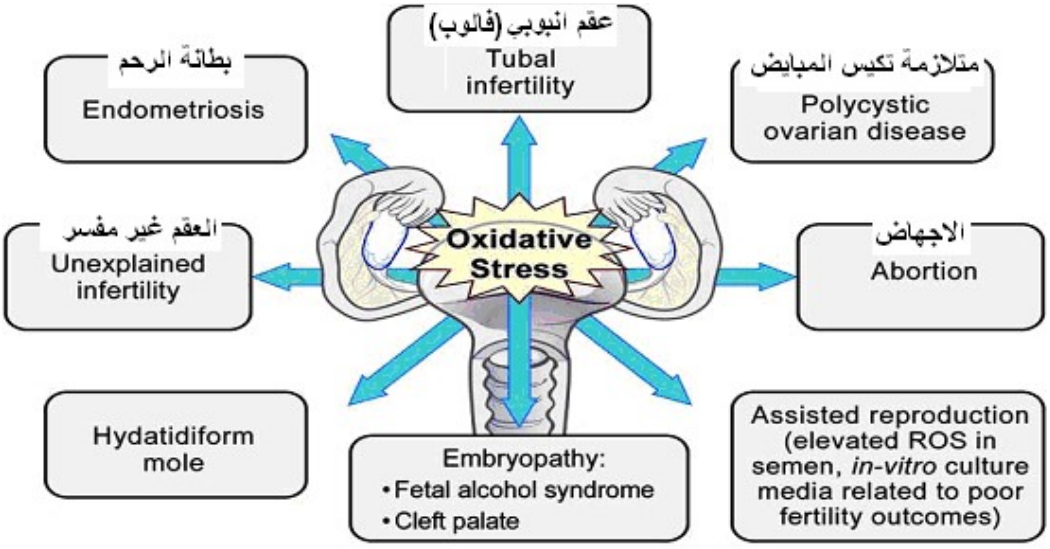
6.1. الكرب التأكسدي والعقم Oxidative stress and infertility

إن الهدف الأساس للبويضة هو الإخصاب الذي ينتج عنه الحمل الناجح، ولغرض إتمام ذلك لابد من نضج النطفة داخل القناة التناسلية الذكرية ثم انتقالها خلال الجهاز التناسلي الأنثوي واكتساب قابليتها على الإخصاب. ان الخلل في تركيب البويضة هو سبب شائع لحالات فقدان الخصوبة والعقم، وان التأثير الأكثر

وضوحاً لبيروكسدة الدهون Lipid peroxidation في جميع الخلايا هو إتلاف وتحطيم الأغشية (للخلايا والعضيات) وتحطيم تركيب الخلايا ووظائفها . فضلا عن ان مركبات الأكسدة والمركبات الناتجة عن عملية بيروكسدة الدهون يمكن أن تحطم الحامض النووي الرايبوزي منقوص الأوكسجين (DNA) والبروتينات من خلال أكسدة قواعد DNA النيوكليوتيدية او من خلال تكوين أواصر وارتباطات تساهمية مع هذه القواعد محدثة انكساراً في خيوط الـ DNA (Kothari *et al*., 2010). كذلك فإن بيروكسدة الدهون تعمل على إحداث أكسدة لمجاميع الثايول SH-groups في البروتينات التي تغير تركيب ووظيفة الحيوانات المنوية ولاسيما عند زيادة تعرضها لعمليات البلعمة الكبيرة Macrophages في حال الالتهابات المختلفة.

إن تأثير الكرب التأكسدي على الجسم يكون واضحاً من خلال تدمير الخلايا بمختلف أنواعها ومنها الخلايا الجنسية الذكرية او الأنثوية ومن ثمة فقدان الخصوبة المتواجدة فيها اذ تسبب خللاً في تركيب البويضة بالنسبة للإناث والحيوانات المنوية بالنسبة للذكور الأمر الذي يزيد حالة التأكسد هو احتواء أغشية هذه الخلايا على نسبة عالية من الأحماض الدهنية غير المشبعة وهي حساسة لمركبات الأكسدة عند توفرها في المحيط الذي يسبب الأذى من خلال عملية بيروكسدة الدهون وهذه الأكسدة يمْكِن أَن تقود إلى تغييرات هيكلية ووظيفيةِ لخلايا البويضة والحيوانات المنوية فمركبات الأكسدة المختلفة ومن ضمنها أصناف الأوكسجين الفعالة قَدْ تبدي تأثيرها على نوعية وعدد الحيوانات المنوية (Agarwal *et al*., 2008; Desai *et al*., 2010 ; Agarwal *et al*., 2005).

إذ أن احد الأسباب لحدوث حالة العقم هو الكرب التأكسدي بواسطة الآليات المختلفة، فالزيادة العالية بالكرب التأكسدي في الحويصلة (الجريب) Follicle نتيجة استنزاف جميع مضادات الأكسدة للسائل الحويصلي Follicular fluid تعمل على تلف DNA البويضة مباشرةً مما يؤدي إلى عيوب في الإخصابِ، وكذلك عندما يصاب التجويف البريتوني Peritoneal cavity (البيئة الصغيرة) بالكرب التأكسدي الحادّ مع حصول الإخصاب التام فإن ذلك قد يؤدي الى موت المبرمج للخلية او تحلل الجنين Embryo fragmentation ، فشل زرعِ Implantation failure، إجهاض،الضعيف أو تلف تركيب المبايض Abortion impaired placentation، وحالات شذوذ تناسلية Congenital abnormalities (Agarwal *et al*., 2006) كما يلاحظ في الشكل الآتي:

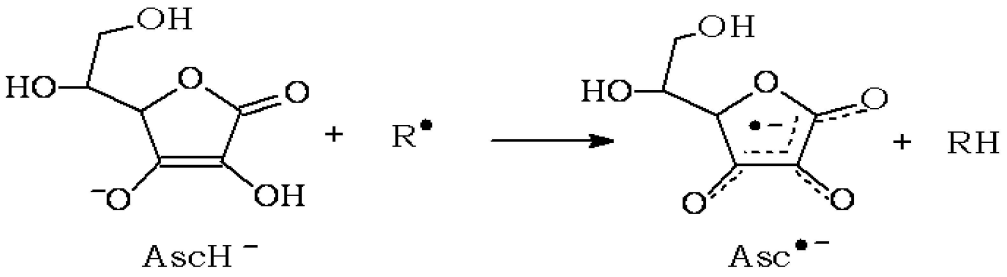


الشكل (1-5): حصول الكرب التأكسدي داخل الجهاز التناسلي للمرأة يمكن ان يؤدي الى حدوث تغيرات مختلفة داخل الرحم مما يؤدي الى العقم بأسبابها المختلفة (Sekhon *et al*., 2010).

7.1. وصف لمتغيرات الاكسدة ومضادات الاكسدة المقاسة في البحث:

1.7.1. فيتامين C Ascorbic acid

فيتامين C الذي يسمى كذلك بحامض الاسكوربيك Ascorbic acid وهو من الفيتامينات والمركبات الذائبة في الماء، ويعد فيتامين C من المركبات المانحة للالكترون لذلك فهو عامل مختزل يستطيع ان يختزل العديد من المركبات المؤكسدة الناتجة من التفاعلات التأكسدية المختلفة ومن ثمة فهو يعمل على تقليل تأثير مركبات الأكسدة بمختلف أنواعها ولاسيما الذائبة في الماء (Naidu, 2003). اذ ان فيتامين C عندما يفقد الإلكترون الذي يكون بشكل متسلسل فإنه يتحول الى جذر حر $Asc^{\cdot-}$ ويسمى سيمي ديهادرو اسكوربيك Semidehydro ascorbate او جذر اسكوربيك Ascorbyl radical الشكل(1-6) وبالمقارنة مع الجذور الحرة الأخرى يعد جذر اسكوربيك مستقراً نوعا ما اذ ان نصف العمر له يقارب 10^{-5} sec وغير تفاعلي جدا، وان هذه العملية تسمى الإخماد Quenching لذلك يعد فيتامين C من مضادات الأكسدة الجيدة بسبب خواصه الكيميائية (Padayatty *et al.*,2003).



الشكل (1-6): تحول حامض الاسكوربيك الى جذر الاسكوربيك.

فضلاً عن أن حامض الاسكوربيك يعمل على تجديد مضادات الأكسدة الأخرى مثل فيتامين E (كما في المعادلة في أدناه)، بيتا-كاروتين β-Carotene واليوريت Urate من نوعهما الجذري وتحولها الى شكلهما الفعال لإعادة استخدامهم مرة اخرى في ازالة الأكسدة (Naidu, 2003).

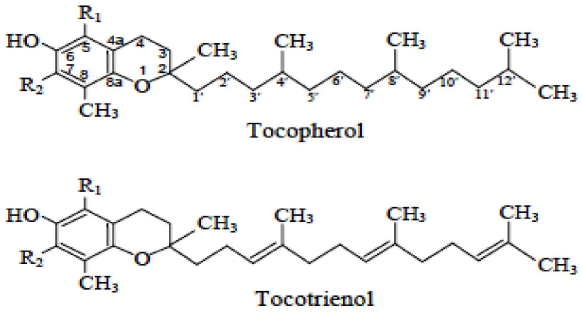
$$TO^{\bullet} + AscH^{-} \rightarrow TOH + Asc^{\bullet-}$$

يعد حامض الاسكوربيك من مضادات الأكسدة المهمة التي تعمل على إزالة أصناف الأوكسجين الفعالة من جذر السوبراوكسايد السالب $O_2^{\cdot-}$ و جذر الهيدروكسيل $OH^{\cdot}$ وبيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 وكذلك O_2^1 الأوكسجين المفرد ليكون Semi dehydroascorbate وكذلك يعمل على تجديد فيتامين E الموجود في الأغشيةِ الخلويةِ فضلا عن أن له تأثيراً وقائياً ضمن الجريب او الحويصلة فنقص فيتامين C يؤدي إلى الضمور في المبايض (Sugino *et al.*, 2000)

2.7.1. فيتامين E (α-Tocopherol)

يعد فيتامين E احد المركبات المضادة للأكسدة الذائبة في الدهون الذي يعمل على منع او إزالة الأكسدة ولاسيما في الطور الدهني وتتضمن ثمانية مركبات (Sen *et al.*, 2006) ولكن الشكل الفعال والمستخدم بشكل واسع هو نوع ألفا- توكوفيرول كما يلاحظ في الشكل (1-7). ان تركيز فيتامين E في المصل يعتمد على الكبد، فعند تناول الطعام فإن الأشكال المختلفة لفيتامين E سوف تمتص من قبل الأمعاء، اذ ان الكبد يفضل إعادة تمثيل Metabolize ألفا- توكوفيرول عن طريق الكبد الذي ينتقل عن طريق البروتين الناقل

ان الكبد سوف يؤيض ويفرز أشكال التوكوفيرول الأخرى ونتيجة لذلك سوف تكون تراكيز الأشكال الأخرى من التوكوفيرول ذات تراكيز اقل من ألفا توكوفيرول في مصل الدم (Sen *et al*., 2006).



Trivial Name	Chemical Name	R_1	R_2
α-Tocopherol/Tocotrienol	5,7,8-Trimethyltocopherol/tocotrienol	CH_3	CH_3
β-Tocopherol/Tocotrienol	5,8-Dimethyltocopherol/tocotrienol	CH_3	H
γ-Tocopherol/Tocotrienol	7,8-Dimethyltocopherol/tocotrienol	H	CH_3
δ-Tocopherol/Tocotrienol	8-Methyltocopherol/tocotrienol	H	H

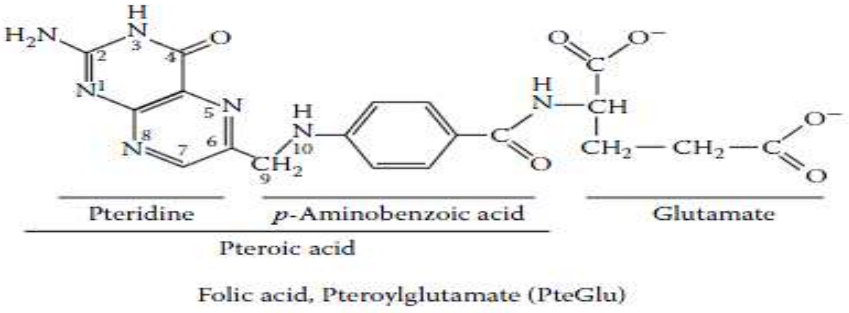
الشكل (1-7): أشكال فيتامين E الفعالة (Kim, 2007).

يمارس فيتامين E دوره بوصفه مضاداً للأكسدة في الطور الدهني (Lebold *et al*., 2011) ومن ثمة فهو يلعب دوراً مهماً في حماية جزيئات الدهون الموجودة في جدار الخلية اذ يعمل على تثبيط عملية بيروكسيد الدهن (Jilani and Iqbal, 2011; Flohe, 2009) وبذلك يحافظ على غشاء الخلية ويمنع تلفه من قبل الجذور الحرة. اذ إن فيتامين E من المركبات الفينولية Phenolic antioxidants المضادة للأكسدة لذلك يعد من الجزيئات التي تكون مستعدة لمنح ذرة الهيدروجين من مجموعة الهيدروكسيل الموجودة على الحلقة الى الجذر الحر الذي يصبح بعدها غير فعال بعد إعطائه ذرة الهيدروجين، وان المركبات الفينولية تصبح جذوراً حرة غير فعالة بسبب انتشار الإلكترون غير المزدوج الموجود على ذرة الأوكسجين على الحلقة الأروماتية ومن ثم سيعطي استقراراً للجزيئة من خلال الرزونانس Resonance (Kim, 2007).

3.7.1. حامض الفوليك Folic acid

يتكون حامض الفوليك من مركب 2-amino-4-hydroxy-pteridine مرتبطاً مع مركب بارا-امينو بنزويل كلوتاميت p-aminobenzoylglutamate عن طريق مجموعة المثيل في موقع ذرة الكاربون السادسة كما موضح في الشكل (1-8) (Ebisch *et al*., 2007). تفتقر الثدييات إلى تخليق حامض الفوليك لذلك يتم استهلاكه من النباتات ويوجد حامض الفوليك في
الحالة الطبيعية بشكله المختزل ومن ثم فإن الشكل المؤكسد للحامض هو الشكل السائد في الغذاء الطبيعي او الصناعي وذلك لكون الشكل المختزل للفوليت اقل استقرارا من الشكل المؤكسد، وان أكسدة حامض الفوليك المختزل سوف تؤدي إلى التقليل من نشاط الفيتامين في الجسم على الرغم من ان نسبة صغيرة من حامض

الفوليك سيتم تحويلها إلى الشكل المؤكسد الفعال بايولوجيا. يمكن خزن حامض الفوليك بالشكل المختزل عن طريق وضع عوامل مختزلة مثل فيتامين C (Bailey, 2010).



الشكل (1-8): التركيب الكيميائي لحامض الفوليك.

يعد حامض الفوليك من مضادات الأكسدة بسبب قدرته على إزالة الجذور الحرة بشكلها المباشر وغير المباشر اذ يعمل 5-مثيل رباعي هيدروفوليت 5-methyl-THF (احد أشكال حامض الفوليك الفعالة) على ازالة جذر السوبراوكساید وجذر الثايول Thiyl radicals (RS˙)اللذين يمكن ان يشاركاً في عملية بيروكسدة الدهن على الرغم من طبيعة حامض الفوليك الذائبة في الماء، وبذلك يستطيع حامض الفوليك أن يحمي الخلية من جانبين هما غشاء الخلية و الـ DNA من الجذور الحرة، فضلاً على ذلك فأن 5- مثيل رباعي هيدروفوليت يشارك في بناء الكلوتاثايون الذي يعد من مضادات الأكسدة المهمة لحماية الأغشية من مضادات الأكسدة المختلفة (Ebisch *et al*., 2007).

4.7.1. حامض اليوريك Uric acid

يعد حامض اليوريك الناتج الرئيس من أيض البيورين ونيوكليوتيدات الأدنين والكوانين، وان كمية البيورين النهائية التي تفرز على شكل حامض اليوريك تزداد في البول وكمية استرجاعه بوصفه نيوكليوتيد سوف تقل، اذ إن مايقارب 75 % من حامض اليوريك سوف يتم فقدانه في البول (Berg *et al*., 2007).

ان حامض اليوريك من المركبات المضادة للأكسدة (داخلية المنشأ) المتكون داخل الجسم ذات الاوزان الجزيئية الصغيرة ويسهم في إزالة الجذور الحرة في الجسم، ويعد فعالاً جدا في القضاء او إخماد جذر الهيدروكسيل والسوبر أوكسيد السالب وبيروكسي نيتريت وبيروكسيلات العضوية كما في المعادلة الآتية:

$$ROO\cdot + UH_2^- \longrightarrow ROOH + UH^{\cdot -}$$

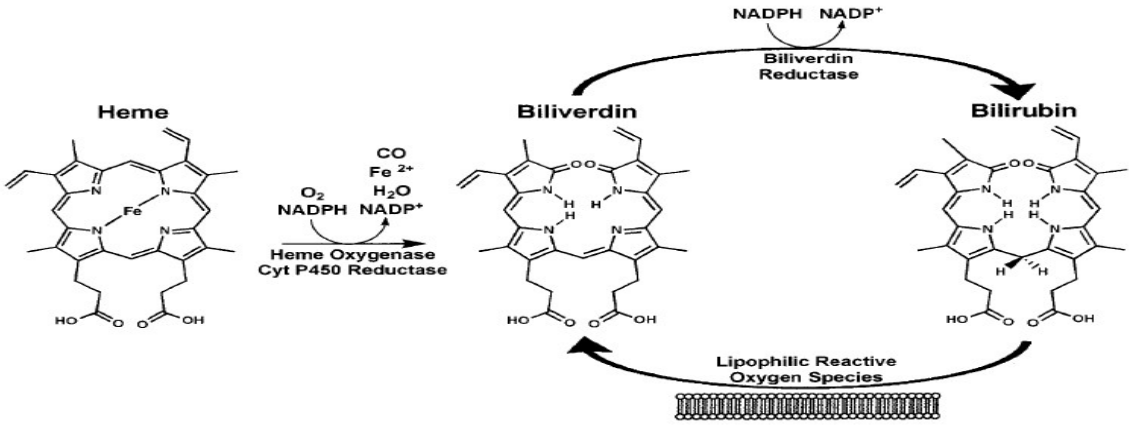
اذ ان له القابلية على تثبيط عملية بيروكسيد الدهن وذلك عن طريق ارتباطه مع الحديد او النحاس اللذين يمكن ان يشاركا في تكوين الأكسدة عن طريق تفاعل فينتون ومن ثم يثبط عملية تكوين الجذور الحرة (Halliwell and Gutteridge, 2000) اذ يمتلك الحامض خاصية مانع أكسدة وقائية من خلال كسر سلسلة تفاعلات الانتشار، ويعاد الى صيغته الأولية عن طريق حامض الاسكوربيك (Mahajan *et al*., 2009) كما في المعادلة ادناه.

$$UH^{\cdot -} + ASCH^- \longrightarrow UH^{-2} + ASC^{\cdot -}$$

ان لحامض اليوريك القابلية ايضا على تثبيط عملية بيروكسيد الدهن وذلك عن طريق ارتباطه مع الحديد او النحاس ومن ثم يثبط عملية تكوين الجذور الحرة (Halliwell and Gutteridge, 2000).

5.7.1. البليروبين Bilirubin

البليروبين هو عبارة عن مركب ناتج من ايض الهيم Heme الذي يتحول الى البليفردين Biliverdin ثم البليروبين، اذ يمكن ان يستخدم بوصفه مضاداً للأكسدة لازالة الأكسدة وذلك بتحوله الى بليفردين مرة اخرى عند ازالة الأكسدة دون وجود إنزيم كما يلاحظ في الشكل (1-9) (Sedlak and Snyder, 2004)، اذ بينت البحوث ان له دوراً بوصفة مضاداً للأكسده افضل من حامض اليوريك وألفا توكوفيرول وحامض الاسكوربيك، ولكن زيادة مستويات البليروبين في الدم اعلى من الحدود الطبيعية يؤدي الى تجمعه في الانسجة المختلفة ويسبب حدوث اليرقان Jaundice (Abraham and Kappas, 2008).



الشكل (1-9): تقويض جزيئة الهيم وتحولها الى البليروبين ومن ثم تحول البليروبين الى البليفردين بعد ازالة ROS (Sedlak and Snyder, 2004).

يتفاعل البليروبين مع الجذور الحرة او النواتج السامة من تفاعلات الأوكسجين، وبشكل خاص يعد البليروبين غير المقترن ذا كفاءة عالية في كسح Scavenge الأوكسجين الفردي Singlet oxgyen، وكذلك يمكنه ان يتفاعل مع ايون السوبر أوكسيد وجذور البيروكسيل Pyroxyl radicals (Dani *et al*., 2003)، اذ يعمل البليروبين على ازالة جذور البيروكسيل بمنحها الهيدروجين لكي تكون جذر البليروبين كما موضح في المعادلات الآتية:

$$LOO^{\bullet} + Bil \rightarrow LOOH + Bil^{\bullet}$$
$$Bil^{\bullet} + LOO^{\bullet} \rightarrow Bil\text{-}OOL$$
$$Bil^{\bullet} + O_2 \leftrightarrow Bil\text{-}OO^{\bullet}$$
$$LOO^{\bullet} + BV \rightarrow LOO\text{-}BV^{\bullet}$$

Bil = Bilirubin, $LOO^{\cdot}$= Lipid peroxyl radical, BV=Biliverdin

6.7.1. الألبومين Albumin

يتكون الألبومين من سلسلة منفردة من متعدد الببتيد حيث آن من الوظائف الحيوية المهمة له نقل عدد من مكونات الدم مثل الأحماض الدهنية الحرة والبليروبين والكالسيوم وعدد من الهورمونات والمحافظة على الضغط الازموزي للدم وعلى استقراريته وكذلك يعدّ مصدراً للأحماض الامينية داخل الجسم Berg *et al*., 2007). وتشير البحوث الى أن التركيز العالي للألبومين هو نتيجة التأثير الوقائي لجزيئة الألبومين

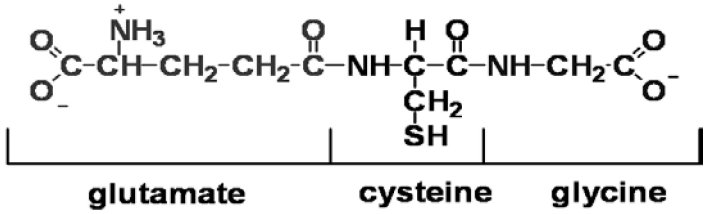
ولاحتوائه على الصفة الأيونية والكارهة للماء Hydrophobic تعطي هذه الصفة المميزة لجزيئة الألبومين بوصفة مضاداً للأكسدة وذلك عن طريق ارتباطه بالعناصر المعدنية التي تكون مشحونة بالشحنة الموجبة والتي تشارك في حدوث الأكسدة بتفاعلاتها المختلفة عندما تكون بشكلها الحر، وبسبب كونه منتشراً داخل بلازما الدم الذي يكون معرضاً للإجهاد التأكسدي المستمر لذلك فإن التأثير الكمي لجزيئة الألبومين قد يلعب دوره في كونه مانع أكسدة جيد(Bourdon *et al*., 1999) ومن ثمة يحمي جدار الخلايا من الأضرار الناتجة عن مركبات الأكسدة (Twigg *et al*., 1998) .

7.7.1. السيرولوبلازمين (Cp.) Ceruloplasmin

السيرولوبلازمين من البروتينات المرتبطة بالمعادن وهو عبارة عن بروتين يحتوي على ما يقارب 25 % من مجموع النحاس الكلي الموجود في مصل الدم، اذ ينقل النحاس Cu من الكبد الى العديد من أنسجة الجسم و يعكس مستوى الـCp بشكل كبير مستوى تركيز النحاس في المصل (Burtis and Ashwood, 1999). يعد الـCp من مضادات الأكسدة الداخلية التي يلعب دوراً في مسك الايون المعدني (النحاس) ومنعه من المشاركة في الأكسدة وكذلك عمله كأنزيم فيروكسديز Feroxidase اذ يؤكسد الحديدوز Fe^{+2} الى الشكل غير السام الحديديك Fe^{+3} ، وتتم الأكسدة عن طريق اختزال ذرة النحاس المرتبطة بالسيرولوبلازمين، ولهذا فإن النحاس سوف يتداخل مع أيض الحديد اذ ان نقصان النحاس سوف ينتج عنه تراكم الحديد في الأمعاء والكبد ومن ثم يقل مستوى الحديد الذي ينقل الى الأنسجة (Groff and Gropper, 2000) اذ ان تراكم الحديد بشكله الحر يؤدي الى تكون مركبات الأكسدة بكميات عالية.

8.7.1. الكلوتاثايون Glutathione (GSH)

الكلوتاثايون عبارة عن ببتيد ثلاثي Tripeptide يوجد بتراكيز قليلة ويمكن بناؤه داخل الجسم (Ristoff and Larsson, 2003) اذ يعد من أنظمة الحماية التي تدخل في حماية الخلايا من الجذور الحرة الناتجة من الكرب التأكسدي (Bounous and Molson, 2003) وان وجود مجموعة الثايول الحرة في الكلوتاثايون توفر حماية رئيسة ضد حالات الأكسدة الشديدة ، اذ تعمل مجموعة الثايول على إزالة الجذور الحرة وتتأكسد مجموعة SH مكونة مركب ثنائي الاصرة الكبريتية GSSG ولذلك يمتلك الكلوتاثايون شكلين الشكل المختزل GSH والشكل المؤكسد GSSG في معظم خلايا الإنسان تكون نسبة GSSG/GSH هي 1/10 (Banerjee *et al*., 2008) وتركيبه الكيميائي موضح في الشكل (1-10):



Glutathione (GSH)

الشكل (1-10): التركيب الكيميائي للكلوتاثايون.

عندما تبدأ المايتوكوندريا وظيفتها في إنتاج الطاقة عبر سلسلة نقل الإلكترونات السلسلة التنفسية يمكن ان يتم تسرب لجزيئة الأوكسجين لينتج في النهاية جذر السوبر أوكسيد والذي يزال عن طريق مضادات أكسدة

التي تقع بالقرب من المايتوكوندريا اذ يقع من قربها الكلوتاثايون الذي يمكنه إزالة بيروكسيد الهيدروجين او جذر الهيدروكسيل (Bounous and Molson, 2003) كما في المعادلة الآتية:

$$2\,GSH + H_2O_2 \longrightarrow GSSG + 2H_2O$$
$$GSH + \cdot OH \longrightarrow GS\cdot + H_2O$$

كذلك يمكن ان يشارك الكلوتاثايون بوصفه مضاداً للاكسدة عن طريق استخدامه مادة أساس لعدد من الإنزيمات المضادة للأكسدة ومنها كلوتاثايون S– ترانسفيريز Glutathione S –transferase, وكلوتاثايون بيروكسيديز(GPx) Glutathion Peroxidase (Banerjee *et al*., 2008).

9.7.1. الخارصين Zinc

الخارصين من العناصر الغذائية الضئيلة الموجودة في الأغذية البحرية واللحوم، اذ يعد الخارصين عاملاً مساعداً لأكثر من 80 إنزيماً معدنياً تتضمن إنزيمات بناء البروتين واستنساخ الـ DNA فضلاً عن كونه من مضادات الأكسدة، وهناك آليتان في تفسير عمل الخارصين بوصفه مضاداً للأكسدة (Ebisch *et al*., 2007):

1- يمكن للخارصين ان يمنع عملية الأكسدة للبروتينات عن طريق ارتباطه بمجموعة الثايول التي تحويها.

2- يحل محل الحديد والنحاس في المواقع المرتبطة في الدهون والبروتينات والـ DNA.

ان عنصر الخارصين ضروري كذلك لإصلاح الخلايا والأغشية الخلوية ولاسيما الناتجة عن مركبات الاكسدة، إذ يعمل الخارصين على حماية مجموعة الثايول (-SH) من الأكسدة أو عن طريق منع تكوين الجذور الحرة $\cdot OH$ ، $O_2^{\cdot -}$ التي تنتج بواسطة العناصر الانتقالية وبذلك يثبط العمليات التي تعتمد على وجود الجذور الحرة مثل بيروكسدة الدهن (Sharon, 2003; Karpinska and Jakoniuk, 2001).

يدخل الخارصين بوصفه جزءاً فعالاً ومهماً في عمل إنزيم (سوبر أوكساید ديسميوتيز) الذي يعمل كأنزيم مضاد للجذور السوبر اوكساید ويحولها إلى بيروكسيد الهيدروجين والذي يحمي الأغشية الحساسة من التلف بالأكسدة (Hawk *et al*., 1998).

10.7.1. النحاس Copper

يعد النحاس من العناصر النادرة Trace element والضرورية للجسم اذ يدخل في عدد من التفاعلات الحيوية مثل العمليات الفيزيائية وتوازن الحديد في الجسم كذلك يرتبط النحاس مع العديد من الإنزيمات والبروتينات التي تلعب دوراً حيوياً في الخلايا ويشارك النحاس الحر في تفاعلات الأكسدة التي تحرر الجذور الحرة والتي تعكس سلبيا على أداء ووظيفة الخلية والتي قد تؤثر على توازن النحاس داخل الخلية، ويعد النحاس مركباً مفيداً للإنسان من خلال عمله بوصفه مضاداً للأكسدة عن طريق ارتباطه بإنزيم السوبر أوكسيد ديسميوتيز Cu-ZnSOD والبروتينات المعدنية Metalloproteins (Koury *et al*., 2007)، وتؤكد الدراسات التي قام بها الباحثون ان قلة فعالية إنزيم الـSOD في الفئران قد تعود الى قلة تركيز ايون النحاس ومن ناحية أخرى فإن النحاس الحر سوف يسهم في عملية الأكسدة على

الخلايا في تفاعل فينتون Fenton reactions وتفاعلات هابر- ويس Haber-Weiss reactions(Karpinska and Jakoniuk,2001) اوالموضح في المعادلات الآتية:

$$O_2^{\cdot -} + Cu^{+2} \longrightarrow O_2 + Cu^{+1}$$

$$Cu^{+1} + H_2O_2 \longrightarrow Cu^{+2} + {\cdot}OH + OH^-$$

لوحظ ان النحاس الداخلي (الموجود في تراكيب الـSOD) يكون حساساً للتراكيز الواطئة في حين إن النحاس الخارجي (الموجود في السيرولوبلازمين) يكون حساساً الى التراكيز العالية وهكذا يتم الحفاظ على التوازن بين النحاس الخارجي والداخلي ضمن المستوى المطلوب، لذلك من الضروري ان يوجد ايون النحاس بتراكيز مناسبة داخل وخارج الخلية وان أي نقص أو زيادة سوف يؤدي ذلك الى حدوث خلل في الوظائف الحيوية للخلايا داخل الجسم (Koury *et al*., 2007).

11.7.1. الحديد Iron

الحديد عنصر ضروري للعمليات الأيضية داخل جسم الإنسان اذ يحتوي جسم الإنسان السليم على (2.5-4) غم من الحديد وتتوزع هذه الكمية بنسب مختلفة اذ يتواجد الحديد بنسبة 60% في هيموكلوبين الدم و15% في المايوكلوبين العضلات وإنزيمات الجسم المختلفة مثل البيروكسيديز والكتاليز، والنسبة المتبقية 25% تخزن بشكل بروتينات فلزية مثل فريتين Ferritin وهيموسدرين Haemosiderin في الكبد والطحال وهو مهم للعديد من الوظائف الحيوية مثل النمو والإنتاج وغيرها (Sanders and Emery, 2003).

هناك العديد من الدراسات التي تمت في داخل الجسم *In vivo* وخارج الجسم *In vitro* بينت انه في حال قلة او زيادة عنصر الحديد على المستوى المطلوب سوف يؤدي ذلك الى إنتاج الجذور الحرة، ففي حال نقص الحديد سوف تقل فعالية الإنزيمات المعتمدة على وجود الحديد في تركيبها (مثل إنزيم الكتاليز) ومن ثم ستؤدي الى اضطراب الأيض فضلا عن تكوين الجذور الحرة (Denisov and Afanas'ev, 2005)، وفي حال زيادة الحديد سيؤدي ذلك الى حدوث الكرب التأكسدي في الغشاء المخاطي المعوي والكبد والطحال وغيرها من الأنسجة، فعند توفر كمية عالية من الحديد فإن الغشاء المعوي سوف يحتفظ به على شكل بروتين الفرتين Ferritin ومن ثم يقلل من التأثير الزائد للحديد ولكن سيؤدي الى حدوث عمليات الكرب التأكسدي حتى لو كانت الكمية صغيرة جدا (Casanueva and Viteri, 2003).

12.7.1. الكالسيوم Calcium

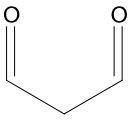
يوجد 98% من الكالسيوم بشكل صلب Crystalline في الجهاز الهيكلي والأسنان (Carroll and Schade, 2003)، اما المتبقي الذي يشكل 2% فيقسم الى نصفين الأول يكون حراً في الدم Ionized والنصف الثاني يكون مرتبطاً بالألبومين والكلوبيولين وجزيئات
لاعضوية أخرى ويبلغ وزن الكالسيوم 1.8% من وزن الجسم الكلي (Sherwood, 2004)، ولأيون الكالسيوم تأثير بايولوجي مهم اذ يعمل بوصفه عاملا مساعدا ضمن الإنزيمات داخل الخلايا (Carroll and Schade, 2003)، كما يعمل مرسلاً ثانوياً في معظم وظائف الخلايا (Sherwood, 2004).

يدخل الكالسيوم في عدد من التفاعلات الموجودة في الجسم اذ يحفز عدداً من الإنزيمات او بارتباطه بالبروتين الذي يحتاج الى ايون الكالسيوم بوصفه عاملاً مساعداً ويحرر ويساعد في استقبال الهورمونات (Gillham *et al.*, 2000).

إن جذر النيتريك اوكسايد Nitric oxide (الذي يعد احد أصناف النيتروجين الفعالة RNS) يلعب دوراً مهماً في دخول وخروج ايونات الكالسيوم في الخلية ومن ثمة فهو يشارك في زيادة انبساط خلايا العضلة الملساء من خلال زيادة اتساع الأوعية الدموية Vasodilation (Pacher *et al.*, 2007; Dessy and Ferron, 2004).

13.7.1. المالوندايالديهايد Malondialdehyde (MDA)

تعد الدهون أكثر الأصناف التي تتضمن الجزيئات الحيوية عرضة للإجهاد التأكسدي، اذ ينتج العديد من النواتج الثانوية في أثناء أكسدة الدهن ويعد المالوندايالديهايد MDA الناتج الرئيس الذي يتكون من عملية بيروكسدة الدهن Lipid peroxidation (الشكل 1-11). تعد جزيئة MDA سامة ويجب ان يؤخذ بنظر الاعتبار على أنها ليست علامة على بيروكسدة الدهن فقط بل يمكنها ان تتفاعل مع البروتينات و DNA مما يسبب حدوث طفرة (Rioa *et al.*, 2005; Buddi *et al.*, 2002).



الشكل (1-11): التركيب الكيميائي لمركب MDA.

اذ يَحتوي غشاء الخلايا الجنسية كمياتَ كبيرة من الأحماض الدهنية غير المشبعة التي تكون معرضة لأصناف الأكسدة المختلفة والتي من الممكن ان تحدث فيها عمليات بيروكسدة الدهون بكميات عالية (Tremellen, 2008; Fraczek *et al.*, 2001) وبسبب هذه العملية تؤدي الى فقدان سيولة أغشية الخلايا الحيوانات المنوية والبويضة ومن ثمة تخفض من فعالية الإنزيمات الموجودة في هذه الأغشية (Shang, 2004; Sharma and Agarwal ,1996) فضلاً عن ذلك، ان نواتج البيروكسيدات الدهون السامة تسبب عاهات مختلفة في جميع الخلايا من ضمنها الخلايا الجنسية (Tavilani *et al.*, 2008).

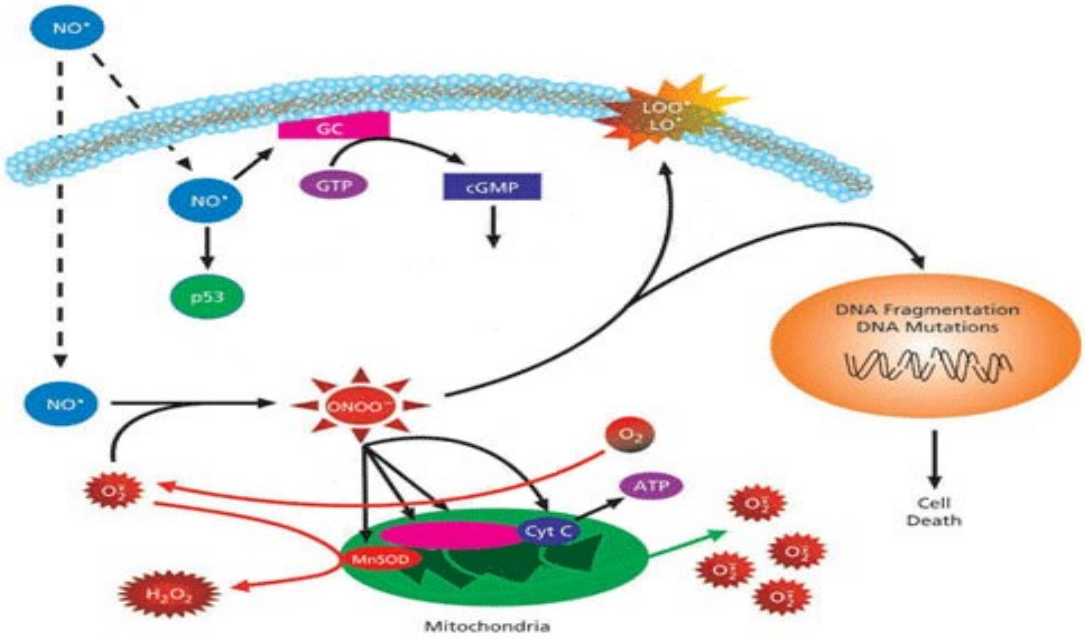
14.7.1. البيروكسي نيتريت Peroxynitrite

يعد البيروكسي نيتريت من المركبات النيتروجينية الفعالة المشتقة من جذر أوكسيد النايترك $NO^{\cdot}$ عند تفاعله مع $O_2^{\cdot -}$ (كما في المعادلة في أدناه) ويحدث التفاعل بصورة سريعة جدا عند وجود تراكيز عالية من جذر السوبر اوكسايد السالب ولايتفكك ولكن يتم بنسب محدودة (Pacher *et al.*, 2007).

$$NO^{\cdot} + O_2^{\cdot -} \longrightarrow ONOO^-$$

ان من مضار البيروكسي نيتريت من خلال تقليله عدداً من مضادات الأكسدة في الجسم وقدرته على أكسدة حامض الاسكوربيك وحامض اليوريك ومجاميع الثايول (SH-) في البلازما فضلاً عن أكسدته لمكونات الجسم الكيميائية مثل للـ DNA والدهون المفسفرة المكونة لأغشية الخلايا مكونتا جذور البيروكسي $LOO^{\cdot}$ و جذر الكوكسي $LO^{\cdot}$ وحدوث طفرات وانقسام لحلزون الـ DNA (Pacher *et al.*,

2007) (الشكل 1-12) ويتم تثبيط هذا المركب بواسطة الكلوتاثايون GSH اذ يكون التفاعل بصورة سريعة ويمنع من نيترة التايروسين (Denisov and Afanas'ev, 2005).



الشكل (1-12): تكون بيروكسي نيتريت وتفاعله مع مكونات الخلية من الجدار والنواة والمايتوكوندريا التي يمكن بعد ذلك أن تؤدي الى موت الخلية (Baskin and Salem, 1997).

15.7.1. إنزيم سوبر أوكسيد ديسميوتيز(Superoxide dismutase (SOD

اكتشف إنزيم سوبر أوكسيد ديسميوتيز (EC 1.15.1.1) لأول مرة من قبل الباحثين McCord وFridovish في عام 1969 وهو من الإنزيمات المضادة للاكسدة التي يعمل على ازالة جزيئتين من $O_2^{\cdot -}$ الناتجة من مصادر مختلفة (كما في المعادلة في أدناه) (Radak, 2000) فتحوله الى بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 الذي سوف يزال فيما بعد بواسطة انزيم الكتاليز Catalase او انزيم كلوتاثايون بيروكسيديز GPx.

$$O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

وبذلك فإن إنزيم سوبر اوكساید ديسميوتيز يعد من مضادات الأكسدة المهمة التي تعمل على تقليل الكرب التأكسدي والمحافظة على الغشاء الخلوي من التلف الناتج عن وجود جذر السوبر اوكساید (Heinrich *et al.*, 2006)، ويوجد إنزيم SOD بأصناف مختلفة اعتمادا على تواجدها في نوعية او مكون الخلية فمثلا Fe-SOD يتواجد في الخلايا بدائية النواة (Prokaryotes) وMn-SOD يتوجد في السايتوبلازم فضلا عن المايتوكوندريا لخلايا حقيقية النواة (Eukaryotes) اما Cu/Zn-SOD فهو يتوجد في سايتوبلازم الخلايا حقيقية النواة (Eukaryotes) (Denisov and Afanas'ev, 2005) فضلا عن أن نوعية Ni-SOD يتواجد في عدد من أنواع البكتيريا مثل الستربتومايس Streptomyces (Banerjee *et al.*, 2008).

ان إنزيم سوبر اوكساید ديسميوتيز يعد من مضادات الأكسدة الإنزيمية التي يعمل على حماية الخلايا البطانة الداخلية للحويصلة ومن ثمة فهي تحمي البويضة مِنْ أصناف الأوكسجين الفعالة في أثناء نضوجِها(Sugino *et al*., 2000) .

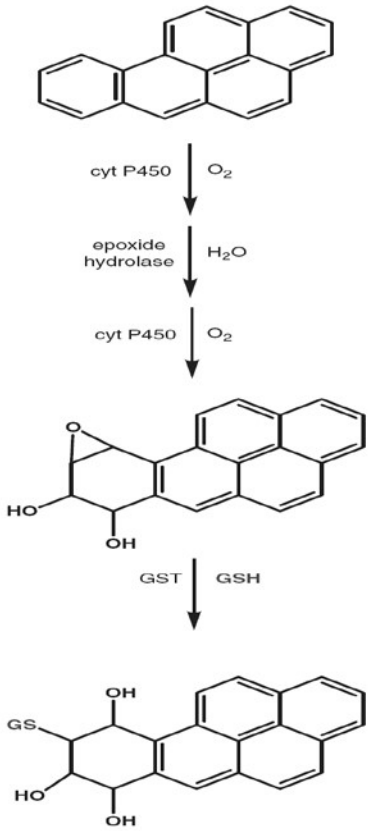
16.7.1. إنزيم كلوتاثايون S-ترانسفيريز Glutathione S-transferase (GST)

كلوتاثايون S- ترانسفيريز (EC2.5.1.18) عبارة عن إنزيم او بروتين ثنائي الوحدات يوجد في السايتوبلازم ويوجد بأربعة ايزومرات مثماثلة الاصل Isoenzymes(Zusterzeel *et al*., 1999)، ويعمل على أيض العديد من مركبات الغريبة Xenobiotics من ضمنها المركبات السرطانية (Habdous *et al*., 2002; Jurczuk *et al*., 2006) اذ يلعب دوراً أساسياً في عمليات إزالة التسمم (Raijmakers *et al*., 2001) ويعد ناقلاً حيوياً لعدد من مركبات المحبة للدهون Lipophilic (Zusterzeel *et al*., 1999).

يحفز إنزيم الـGST الاضافة النيوكلوفيلية لكلوتاثايون على المركبات الكتروفيلية (Zusterzeel *et al*., 1999) اذ تعد مجموعة الثايول Sulfhydryl group هي المجموعة الفعالة لـGSH التي تسمح بالهجوم النيوكلوفيلي لكلوتاثايون.على المركبات الكتروفيلية R-X (كما في المعادلة في ادناه) والمراكز الالكتروفيلية يمكن ان تكون كاربوناً او نيتروجيناً او كبريتاً(Stipanuk, 2000).

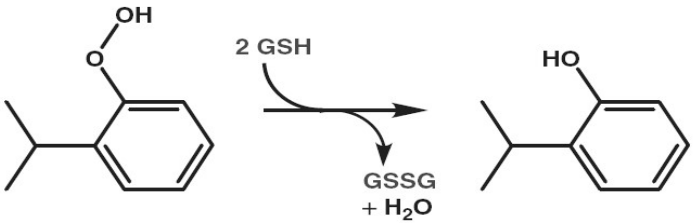
$$GSH + RX \xrightarrow{GST} GSR + HX$$

ففي المثال الآتي يلاحظ كيفية مشاركة إنزيم GST في إزالة السمية المركبات في تفاعلات الطور الثاني اذ عند إزالة تأثير سمية المركب بنزوبايرين Benzo[a]pyren الذي يعد احد المركبات المسرطنة الناتجة عن عملية حرق المواد العضوية فبعد إجراء تفاعلات الهيدروكسليشن بإضافة جزيئة الأوكسجين وبفعل إنزيمي سايتوكروم P450 (Cytochrome P450) ثم يأتي دور إنزيم GST مع الببتيد الثلاثي الكلوتاثايون ليكون مركباً قابلاً للذوبان في الماء ثم طرحه خارج الجسم عن طريق الادرار، كما موضح في الشكل الآتي (Blahova *et al*., 2007 ;Shimada, 2006):



الشكل (1-13): إزالة تأثير السمية للمركب بنزوبرين Benzo[a]pyren .

وهناك إثباتات تبين دور α-GST ضد الكرب التأكسدي عن طريق تثبيط وإزالة سمية النواتج الفعالة الناتجة عن بيروكسدة الدهن (Singhal *et al*., 1992). فعلى سبيل المثال يلاحظ أن للإنزيم دوراً مضاداً للأكسدة من خلال اختزال البيروكسيدات ليكون الكحول والماء وكلوتاثايون مؤكسداً كما في المعادلة الآتية:



مشتق البيروكسيد **مشتق الكحول (الفينول)**

2- Iso proptl phenol hydro peroxide 2- Iso propyl phenol

17.7.1. إنزيم كلوتاثايون بيروكسيديز Glutathione peroxidase (GPx)

الكلوتاثايون بيروكسديز (EC 1.11.1.9) هو سيلينوبروتين Selenoprotein يتواجد في سايتوبلازم ومايتوكوندريا الخلايا لأنسجة الكبد وكريات الدم الحمر والبلازما والنطف، اذ يتواجد الإنزيم في اروماتات النطف Spermatids على شكل بيروكسيديز ذائب Soluble peroxidse اما في النطف الناضجة فهو موجود بشكل جسم غير فعال إنزيمياً (بروتين غير ذائب) في القطعة الوسطية Mid piece للنطفة الناضجة

على شكل قالب يشبه الكيراتين مطمور في حلزون او لولب المايتوكوندريا Mitochondrial helix اذ يعمل على حماية حركة الحيونات المنوية (Ursini *et al*., 1999).

يلعب الكلوتاثايون بيروكسديز دوراً مهما في تنظيم مستوى البيروكسيدات المختلفة عن طريق تسريع تحول الكلوتاثايون المختزل Reduced glutathione (GSH) الى الكلوتاثايون المؤكسد Oxidized glutathione (GSSG) بعد إزالة البيروكسيدات المختلفة (مثل بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 او بيروكسيدات الدهون LOOH او بيروكسيدات عضوية ROOH) (كما في المعادلات في أدناه)، اذ يمثل GPx جزءاً من نظام حماية الخلايا ضد الأكسدة ونواتجها وبذلك يقلل من تلف الخلايا الناتج عن زيادة الجذور الحرة (الكرب التأكسدي).

$$2GSH + H_2O_2 \xrightarrow{GPx} GSSG + 2H_2O$$

$$2GSH + LOOH \xrightarrow{GPx} GSSG + LOH + H_2O$$

$$2GSH + ROOH \xrightarrow{GPx} GSSG + ROH + H_2O$$

يتكون إنزيم الكلوتاثايون بيروكسديز من اربع وحدات بروتينية فرعية Sub-units كل وحدة تمتلك ذرة واحدة من عنصر السيلينيوم وهي ترتبط مع الحامض الاميني السستاين Cysteine بشكل Seleno Cysteine ، يعمل الكلوتاثايون على اختزال السيلينيوم من انزيم كلوتاثايون بيروكسديز وبعد ذلك يتفاعل الانزيم المختزل مع بيروكسيد الهيدروجين (Banerjee *et al*., 2008) . ان مستوى الشكل المختزل من الكلوتاثايون GSH في الخلايا والأنسجة يكون أعلى من الشكل المؤكسد له GSSG ، وبذلك فإن نسبة الكلوتاثايون المختزل

الى الكلوتاثايون المؤكسد GSH/GSSG تكون مرتفعة ويتم المحافظة على هذه النسبة من خلال آلية تعمل على اختزال الشكل المؤكسد GSSG ، وتحويله الى الشكل المختزل GSH، ويتحكم في هذه الآلية إنزيم كلوتاثايون ريدكتيز GRd، وتحتاج هذه الآلية الى المرافق الإنزيمي النيكوتين امايد ادينين داي نيوكليوتايد فوسفات NADPH كما في المعادلة في أدناه:

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GRd} 2GSH + NADP^+$$

وبالتالي فان إنزيم كلوتاثايون بيروكسديز يلعب دوراً في حماية الخلايا والأنسجة ضد بيروكسدة الدهون Lipid peroxidation من خلال ازالة بيروكسيد الهيدروجين وكذلك تقليل من تكوين جذر الهيدروكسيل وبذلك يتم منع إحدى طرق بدء بيروكسدة الدهون التي يمكن ان تحدث في الأحماض الدهنية غير المشبعة في الجهاز التناسلي (Halliwell and Gutteridge, 2000).

ترتبط فعالية إنزيم GPx مع تركيز السيلينيوم في الدم والأنسجة المختلفة الاخرى وان نقصان تركيز السيلينيوم يؤدي الى نقصان فعالية إنزيم GPx (Banerjee *et al*., 2008) اذ يعد السيلينيوم من العناصر النادرة التي يحتاجها الجسم بكميات قليلة جداً بحدود (0.03-1) جزءاً بالمليون، وعند زيادة كمية السيلينيوم في الغذاء سوف تظهر علامات التسمم عند الكائن الحي، اذ ان الجرعة السامة Toxic dose للسيلينيوم تعمل على زيادة وتسريع عملية بيروكسدة الدهون بدلاً من دوره بوصفه مضاداً للأكسدة في الجرعة السامة

(Hartikainen *et al*., 2000). فضلا عن ذلك يعد السيلينيوم من العناصر الضرورية للإنسان؛ اذ يلعب دوراً مهماً في كثير من العمليات الفسيولوجية بوصفه مكوناً أساسياً للأنزيمات التي تعمل مضادات للأكسدة وكذلك يعمل على صيانة خلايا العضلات وخلايا كريات الدم الحمر ونقل الطاقة، كما يلعب دورا مهما في إنتاج خلايا المني وتكوين الأجسام المضادة (Sanders and Emery, 2003).

8.1. الهدف من البحث The aim of the research

يعد العقم وفقدان الخصوبة من المشاكل المهمة التي تواجه المجتمع، وعلى ضوء الدراسات السابقة يعد الخلل في وظيفة المبيض والحيوانات المنوية بواسطة مركبات الأكسدة المختلفة احد الأسباب الأكثر شيوعاً لحالة فقدان الخصوبة، لذلك تم اتخاذه كموضوع للدراسة إذ حددت أهداف البحث الأساسية كالآتي:

1. دراسة حالة الكرب التأكسدي للعقائم من خلال تقدير مستويات الأكسدة ومضادات الأكسدة للإناث.
2. دراسة تأثير نوعية العقم (العقم الأولي والعقم الثانوي) على مستويات الأكسدة ومضادات الأكسدة لمعرفة حالة الكرب التأكسدي لكل منهما وأيهما ذو تأثير اكبر.
3. دراسة تأثير العمر والوزن (للأشخاص ذوي الأوزان العالية) والسكن على مستويات الأكسدة ومضادات الأكسدة للعقماء من النوع الأولي لمعرفة مدى تأثيرها في حدوث الكرب التأكسدي.
4. فصل جزئي لإنزيم كلوتاثايون بيروكسيديز GPx من بلازما انثى سليمة وعقيمة من النوع الأولي وايجاد الظروف المثلى وتأثير المثبطات ونوعية التثبيط .

Summary

The book included a study of oxidative stress in infertility female (Primary and secondary) in Ninava governorate. Other parameters were studied such as body mass index(BMI), age and place living. The studien included measuring (17) oxidants and antioxidants parameters. The study was carried out on (223) sample of women (age 19 – 45 year). The infertility (179) divided into two groups (depending on types of infertility). Non infertility (44) were included in the study as control with similar age and sex.

The group of primary infertility showed significant decrease concentrations of vitamin C, vitamin E, glutathione(GSH),total bilirubin, folic acid and zinc when compared with control group, while there was a significant increase of glutathione S-transferase (GST), albumin, copper, iron, ceruloplasmin(CP.). Malondialdehyde (MDA) and peroxynitraye.The secondary infertility showed significant decrease concentrations of vitamin C, vitamin E, glutathione(GSH),total bilirubin, folic acid, zinc and copper and a significant increase of : glutathione peroxidase (GPx), GST, CP., MDA and peroxynitrate. Moreover, the oxidative stress showed increased in primary infertility compared with secondary infertility.

The research also included a study the effect of age on the oxidants and antioxidants levels for primary infertility female. The results showed significant decrease with increasing of age in vitamin C, vitamin E, SOD, GSH, total bilirubin, folic acid, zinc and copper while a significant increase of GST, copper, ceruloplasmin, and MDA. The results also showed that the level of oxidative stress was high with aging.

The research also included a study the effect of BMI on the oxidants and antioxidants levels for primary infertility. The results revealed that there were direct correlation between BMI increase with the concentrations of malondialdehyde, peroxynitrite and inverse correlation with the concentrations of antioxidants (For example vitamin C, vitamin E, SOD, total bilirubin, folic acid and uric acid).

Moreover, the effect of living region on the oxidants and antioxidants levels showed a significant increase of antioxidants levels and a decrease oxidants for infertility living inside Mosul city center and decreased in outside Mosul city center.

The second part of the research included the isolation of glutathione peroxidase from the plasma of non-infertility female. Three proteinous components had been isolated by gel filtration chromatography from the plasma precipitate produced by ammonium sulfate (50%) after dialyasis. It was found that the first peak has higher activity them the other two. The apparent molecular weight of the isolated partially purified enzyme using gel filtration chromatography was (88131) Dalton.

The results also showed that the optimum conditions of glutathione peroxidase were obtained at (50µg/ml) of enzyme concentration using (2.5 mmol/l) of glutathione (GSH) as a substrate, phosphate buffer (0.3 mol/l) as a buffer at pH (6.5) for (14) minutes at (40°C). Using Line Weaver–Burk plot, the values of maximum velocity (V_{max}) and Michaelis constant (K_m) were (1.56 µmol/ min) and (1.1 mmol/l) respectively. The study showed the effect of some inhibitors on the enzyme activity. Paracetamol and copper sulfate possessed a noncompetitive inhibition while zinc acetate showed a competitive inhibition .

University of Mosul
College of science
Department of Chemistry

Oxidative Stress, Obisty and Separation of Glutathione Peroxidase for Infertility

Obeda A.A.Al-Obaidi
Assist. Prof. Dr. Luay A.A. Al-Helaly

2012

الاجهاد التأكسدي والسمنة وفصل لإنزيم كلوتاثايون بيروكسديز لدى العقيمات

تضمن الكتاب دراسة تأثير الكرب (الاجهاد) التأكسدي على العقائم (العقيمات) بنوعيها (الأولي والثانوي) من الإناث فضلا عن تأثير العمر والوزن والسكن في مدى زيادة حصول الكرب التأكسدي والعقم لدى النساء عن طريق قياس (17) متغيراً من متغيرات الاكسدة ومضادات الاكسدة المختلفة، اذ أجريت هذه الدراسة على (223) أنموذجا لإناث تراوحت أعمارهُنَّ بين (19-45) سنة وشملت على (179) عقيماً قسمت كل منهما على مجموعتين بالاعتماد على نوعية العقم. اذ لوحظ ان هناك حالة الاجهاد التأكسدي لدى العقيمات من النوع الثانوي اكبر من العقائم النوع الاولي، من خلال ملاحظتنا المستويات العالية للاكسدة لديهم. وكذلك زيادة عالية للأكسدة وانخفاض مضادات الأكسدة للعقائم من النوع الاولي مع تقدم العمر مما يزيد من حالة الاجهاد التأكسدي وزيادة حدة العقم لديهن. وايضا مما يزيد من حدة العقم ايضا بزيادة وزن الجسم نتيجة زيادة الكرب التأكسدي مع الوزن . ما الجزء الثاني من الكتاب فتضمن فصلاً لإنزيم كلوتاثايون بيروكسديز من بلازما أنثى سليمة وأنثى مصابة بالعقم من النوع الاولي ودراسة عدد من العوامل المؤثرة على فعالية الانزيم وتحديد وزنه الجزيئي . ودراسة تأثير عدد من الادوية على فعالية الانزيم.

المؤلف الاول: عبيدة عبد الخالق عباس القدو ماجستير كيمياء حياتية 2012 من كليةالعلوم/ جامعة الموصل لديه بحثان تدريسي في قسم تقنيات التحليلات المرضية/كلية النورالجامعية
:المؤلف الثاني د.لؤي عبد علي الهلالي دكتوراه كيمياء حياتية 2006 من كليةالعلوم/جامعة الموصل لديه اكثر من 42 بحث قام بتأليف 5 كتب استاذ مساعد في قسم الكيمياء/كلية العلوم/ جامعة الموصل

NOOR
PUBLISHING

978-620-2-35079-2