جامعة الموصل
كلية العلوم

عزل وتنقية هرمون الكوبيبتين ودراسة بعض المتغيرات الكيموحيوية لدى مرض القلب

نوري محمد عزيز فياض

أطروحة دكتوراه

علوم كيمياء / الكيمياء الحياتية

بإشراف

الأستاذة الدكتورة ذكرى علي علوش

1436هـ 2015م

I

الخلاصة

تضمن البحث دراسة كيموحيوية لهرمون الكوبيبتين في الدم إذ قسمت الدراسة إلى قسمين:

تضمن القسم الأول: دراسة سريرية لهرمون الكوبيبتين في مصل دم الأصحاء والأشخاص المصابين بأمراض القلب, إذ ظهر أن المعدل لتركيز الكوبيبتين في مصل الدم كان (7.2بيكومول/ لتر) بما يعادل (1.7±36.2 بيكوغرام/مل) في مجموعة السيطرة ولكلا الجنسين ولفئات عمرية (37–70) سنة ,ووجد ارتفاع معنوي في تركيز الكوبيبتين في مجموعة المرضى (21.3 بيكومول/لتر) أي (2.2 ± 106.8 بيكوغرام /مل) مقارنة مع مجموعة السيطرة .

بينت النتائج عدم تأثر تركيز الكوبيبتين بالعمر والجنس ومؤشر كتلة الجسم والتدخين في مجموعتي السيطرة والمرضى , وعدم تأثر تركيز الكوبيبتين في مجموعة المرضى بارتفاع ضغط الدم وداء السكر وتعاطي الستاتين.

أوضحت النتائج وجود ارتفاع معنوي في فعالية الأنزيمات (كرياتين كاينيز , البيروكسيديز , اسبارتيت امينوترانسفيريز , الانين امينوترانسفيريز , لاكتيت ديهيدروجنيز , لاكتو بيروكسيديز) وتركيز كل من المالونالديهايد والكولسترول والكليسيريدات الثلاثية والبروتين الدهني واطئ الكثافة والبروتين الدهني واطئ الكثافة جدا والكلوكوز والكرياتينين وبروتين سي الفعال والنحاس) في مجموعة المرضى مقارنة مع مجموعة السيطرة. كذلك لوحظ وجود انخفاض معنوي في فعالية كل من كلوتاثايون اس ترانسفيريز , كلوتاثايون بيروكسيديز وتركيز البروتين الدهني عالي الكثافة والكلوتاثايون و الخارصين والسلينيوم في مجموعة المرضى مقارنة مع مجموعة السيطرة.

وتمت دراسة معامل الارتباط الخطي بين تركيز الكوبيبتين والمتغيرات السريرية المقاسة في مجموعتي السيطرة و المرضى وتبين مايأتي: وجود ارتباط معنوي إيجابي بين تركيز الكوبيبتين وفعالية أنزيم البيروكسيديز وتركيز المالونالديهايد لكل من مجموعتي السيطرة والمرضى وبروتين سي الفعال (مجموعة المرضى فقط) . كما وجد ارتباط معنوي سلبي بين تركيز الكوبيبتين وكل من فعالية أنزيم كلوتاثايون بيروكسديز, كلوتاثايون إس ترانسفيريز, تركيز الكلوتاثايون والسلينيوم في مجموعتي السيطرة والمرضى. ولم تكن هناك اي علاقة ايجابية او سلبية معنوية بين المتغيرات الاخرى وتركيز الكوبيبتين.

لوحظ وجود ارتفاع معنوي في النسبة المئوية لكل من حامض الفثاليك و 1–ديكين في مجموعة المرضى مقارنة بمجموعة السيطرة , ولم يكن هناك فرق معنوي بين المجاميع المدروسة في تركيز البنزالديهايد والتي تم تقديرها باستخدام تقنية كروماتوغرافيا الغاز- مطيافية الكتلة (GC-MS)

تضمن القسم الثاني :عزل هرمون الكوبيبتين وتنقيته من مصل دم أشخاص مصابين بأمراض القلب باستخدام تقنيات حيوية مختلفة فقد وجد حزمتين بروتينية فصلت بواسطة كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي (سيفادكس G-50) من الراسب الناتج بواسطة الترسيب بالأسيتون البارد ولقد وجد أن أعلى تركيز لهرمون الكوبيبتين كان في القمة الثانية (الحزمة B) .

فضلا عن ذلك تم الكشف عن نقاوة هرمون الكوبيبتين المعزول والحزمة (B) بواسطة تقنيات (كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء –الطور المعكوس و الهجرة الكهربائية) ولقد بينت النتائج التي تم الحصول عليها بتقنية كروماتوغرافيا السائل عالي الاداء–الطور المعكوس RP-HPLC كان التطابق فيها جيدا في زمن الاحتباس بين المحلول القياسي للكوبيبتين ومحلول النموذج الذي تم الحصول عليه في تقنية الترشيح الهلامي (الحزمة B) .

كما تم إيجاد الوزن الجزيئي التقريبي لهرمون الكوبيبتين المنقى جزئيا الحزمة (B) باستخدام كروماتوغافيا الترشيح الهلامي سيفادكس (G-50) والهجرة الكهربائية باستخدام الصوديوم دوديسيل سلفيت كان (400±4654 دالتون , 400±4513 دالتون)على التوالي , وتمت دراسة التركيب الثانوي (ألفا–الحلزوني) لهرمون الكوبيبتين بواسطة تقنية (Circular Dichroesim) ووجد أن النسبة المئوية (ألفا–الحلزوني) بين المحلول القياسي للكوبيبتين ومحلول النموذج الذي تم الحصول عليه بتقنية الترشيح الهلامي (الحزمة B) كان بينهما تطابق جيد.

University of Mosul

College of Sciences

Isolation and purification of copeptin hormone and study of some biochemical parameters of heart patients

Noori Mohammed Aziz Fayadh

PhD. Thesis

Biochemistry

Supervisor by
Professor Dr. Thikra Ali Allwsh

2015 A.D. **1436A.H.**

I

Summary

The research included biochemical study of copeptin hormone in serum which was divided into two parts:

The first part included a clinical study of copeptin in serum of healthy subjects and patients with heart disease . The results indicated that the normal average of copeptin in serum was (7.2 pmol/L) equal (36.2±1.1 pg/mL) in control group for both sex , with the age range between (37 − 71 years) . At the same time , the results demonstrated a significant increase in copeptin concentration in patients (21.3 pmol/L) equal (106.8 ±2.1 pg/mL) compared with control group. The results also showed that the concentration of copeptin was not affected by sex , age, body mass index and smoking , in both control and patients group . The study showed that there were no significant differences in the concentration of copeptin in patients Hypertension , Diabetes mellitus and statin in patients group.

The results revealed a significant increase in the activity of (Creatin kinase , Peroxidase , Glutamate oxaloacetate transferase, Glutamate pyruvate transferase , Lactate dehydrogenase , Lactoperoxidase) and concentration of Malondialdehyde , Cholesterol , Triglyceride , Low density lipoprotein , Very low density lipoprotein , Glucose , Creatinine , C-reactive protein and Copper in patients group . There was a significant decrease in the Glutathione s-transferase activity , Glutathione peroxidase activity and concentration of High density lipoprotein , Glutathione , Zinc and Selenium.

Study of correlation coefficients between the concentration of copeptin and some clinical parameters in control and patients group showed the following: The copeptin has a positive significant correlation with Peroxidase activity , Malondialdehyde in control and patients group and C-reactive protein (in patients group only). The copeptin has a negative significant correlation with Glutathione peroxidase, Glutathione s-transferase , Glutathione and Selenium in control and patients group.

There were a significant increase in percentage of phthalic acid and 1-decene in patients group compared with control group and no significant differences between the study groups in benzaldehyde percentage (using gas chromatography – mass spectroscopy).

The second part concerned with an attempts to isolate and purify copepin from serum of heart disease patients using different biochemical techniques . The study showed two proteinous peaks isolated by gel filtration using (Sephadex G-50) from the precipitation by cold acetone , the results predicted that (peak B) has a high concentration of copepin . Furthermore, the purity of the isolated copeptin (peak B) had been identified by SDS-poly acryl amide gel electrophoresis and the reverse phase high performance liquid chromatography and , the results obtained by the RP-HPLC showed that there was good identity in retention time between the standard and the isolated copeptin (peak B) .

The approximate molecular weight of partially purified copeptin peak (B) was (4654±400 Dalton , 4513±400 Dalton) using gel filtration chromatography (Sephadex G-50) and (SDS-poly acryl amide gel electrophoresis) technique respectively .

The study of secondary structure (α-helix) to copeptin hormone by the (Circular Dichroesim) showed the percentage of the (α-helix) between the standard solution of copeptin and sample solution (peak B) was good match.