



جامعة الموصل

كلية العلوم

فصل وتنقية جزئية لإنزيم ثايوردوكسين رذكتيز
المعزول من المصل وعلاقته مع مستويات بعض
المتغيرات الكيموحيوية لدى مرضى عجز القلب

أطروحة تقدمت بها

أميرة أحمد حمدون

الى

مجلس كلية العلوم في جامعة الموصل
وهي جزء من متطلبات نيل شهادة دكتوراه فلسفة في
الكيمياء الحياتية

بإشراف

الأستاذ المساعد

د . لؤي عبد علي الهلاي

الخلاصة

تضمنت الدراسة فصل إنزيم TrxR من مصل الإنسان السليم والمريض بعجز القلب باستخدام التقنيات الحياتية المختلفة. وفصل قمتين بروتينية بتقنية الترشيح الهلامي نوع سيفادكس (G-50) وثلاث قمم بروتينية باستخدام سيفادكس (G-100) للراسب البروتيني الناتج من عملية الترسيب بكبريتات الأمونيوم (65%). الوزن الجزيئي التقريبي للبروتين المعزول كمصدر للإنزيم من العينة السليمة باستخدام تقنية الترشيح الهلامي (G-100) كان بحدود (925 ± 118059) دالتون. تم الحصول على قمتين للإنزيم عند استخدام المبادل الأيوني السالب من نوع DEAE-سيلوز أما في تقنية الهجرة الكهربائية نوع هلام متعدد أكريل أميد-SDS PAGE-SDS أشارت النتائج إلى وجود حزمتين متقاربتين للقمة الناتجة من عمود الفصل نوع سيفادكس (G-100) وحزمة واحدة لكل قمة ناتجة من عملية التبادل الأيوني بوزن جزيئي (490 ± 58231) دالتون. إذ تم انجاز الجزء العملي للأطروحة من الشهر الثاني لعام 2013 الى 26 من الشهر الخامس لعام 2014 .

أظهرت النتائج أن الظروف المثلى للإنزيم المنقى من مصل الدم السليم يعمل عند تركيز (200 مايكروغرام/ مل) باستخدام المحلول المنظم حامض الستريك - Na_2HPO_4 بتركيز (0.4 مول/لتر) وعند أس هيدروجيني (7) وزمن تفاعل (25) دقيقة ودرجة حرارة (40) °م وباستخدام رسم (لاين ويفر-برك) كانت السرعة القصوى (V_{\max}) وثابت ميكليس (K_m) (0.182) مايكرومول/دقيقة و (0.013) مول/لتر على التوالي عند استخدام 5-5⁻ ثنائي ثايو بس (2- نايترو حامض البنزويك) كمادة أساس. وأخيراً تم دراسة تأثير بعض المركبات الكيميائية والدوائية على فعالية الإنزيم، وبينت النتائج إن كواندينوم- هايدروكلورايد مثبط لاتنافسي وبرومو حامض الخليك مثبط غير تنافسي وكبريتات الخارصين مثبط تنافسي عند تراكيز مختلفة من المثبط، ولكن الدكساميثازون يعد منشطاً للإنزيم .

تضمنت الدراسة أيضاً فصل الثايوردوكسين من مصل دم الإنسان السليم باستخدام التقنيات الحياتية المختلفة، إذ تم فصل قمة بروتينية واحدة للثايوردوكسين بتقنية الترشيح الهلامي نوع سيفادكس (G-50) للراسب البروتيني الناتج من عملية الترسيب بكبريتات الامونيوم (65%) بعد عملية الديلة. ولوحظ وجود قمتين بروتينية للثايوردوكسين المفصول عند استخدام المبادل الأيوني السالب DEAE - سيلوز للنتائج من عمود الترشيح الهلامي . الوزن الجزيئي التقريبي

للتاثيرودوكسين المعزول بواسطة الترشيح الهلامي (سيفادكس G-50) وتقنية الهجرة الكهربائية من نوع PAGE-SDS كان (190±12305) دالتون و (110±12461) دالتون على التوالي .
أوضحت الدراسة بأن التاثيرودوكسين يثبط إلى (45%) بواسطة الباراسيتامول، ديكساميثازون، داي فينهايدرامين - هايدروكلورايد الأمامي، بسيدوافيدرين، سيراميد والكافئين اللأمائي، بينما الميترونيدازول وكلورفينيرامين - ماليت لها تأثير تشيطي وصل الى (111 و 22) % على التوالي.

واستخدم في هذه الدراسة 24 ذكرا من ذكور الجرذان البالغة من نوع Albino male rats
وبعمر 4 أشهر و بأوزان تراوحت بين 200-350 غم وزعت الى 4 مجاميع وبواقع 6 حيوانات لكل مجموعة وعوملت لمدة 15 يوما وكما يأتي : المجموعة الأولى تم اعطاؤها ماء الشرب الاعتيادي وعدت مجموعة سيطرة ,المجموعة الثانية تم اعطاؤها ماء الشرب الحاوي علي بيروكسيد الهيدروجين (1%) ,المجموعة الثالثة تم اعطاؤها ماء الشرب الحاوي على بيروكسيد الهيدروجين وحقت بالأنزيم TrxR المنقى جزئيا في الغشاء البريتوني بجرعة 2 ملغم /كغم من وزن الجرذان ,المجموعة الرابعة تم اعطاؤها ماء الشرب الحاوي على بيروكسيد الهيدروجين وحقت بالأنزيم TrxR في الغشاء البريتوني بجرعة 4 ملغم /كغم من وزن الجرذان .أدت المعاملة ببيروكسيد الهيدروجين إلى ارتفاعا معنويا في: انزيم TrxR وإنزيم الكرياتين كائيز ,إنزيم اسبارتيت امينوترانسفيريز والبليروبين الكلي مقارنة بمجموعة السيطرة, بينما كان هناك انخفاض معنوي في : الألبومين وحامض اليوريك ولم يكن هناك فرق معنوي لإنزيم الانين أمينوترانسفيريز مقارنة مع مجموعة السيطرة، فضلا عن أن استخدام الإنزيم المعزول (TrxR) بجرع مختلفة (2 و 4 ملغم/كغم من وزن الجرذان) مع بيروكسيد الهيدروجين (1 %) حسنت في مستوى المتغيرات المقاسة من خلال تقليل حالة الاكسدة والكرب التأكسدي الناتجة لدى الجرذان .

تضمنت الدراسة أيضا العلاقة لبعض المتغيرات الكيموحيوية لدى مرضى عجز القلب الاطفال بأعداد 30 عينة وبأعمار ما بين 3 أشهر و 9 سنوات و 27 عينة من الأطفال الأصحاء وبنفس الفئة العمرية, اذ أوضحت النتائج أن هناك ارتفاعا معنويا لإنزيم TrxR وإنزيم أسبارتيت أمينوترانسفيريز وإنزيم الانين أمينوترانسفيريز والبليروبين الكلي وانخفاضا معنويا للمتغيرات ,انزيم كرياتين كائيز والألبومين وحامض اليوريك مقارنة مع مجموعة السيطرة.

**University of Mosul
College of science**



Separation and Partial Purification of Thioredoxine Reductase Isolated from Serum and it's Relationship with Level of Some Biochemical Parameters for Heart Failure

A Thesis Submitted By

Ameera Ahmad Hamdoon

To

*The Council of the College of Science / University of Mosul
In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Doctor of Philosophy In Biochemistry*

Supervised By

***Assistant Prof.
Dr. Luay A.A. Al-Helaly***

2017 A.D

1438 A.H

Summary

The research included the partially purified thioredoxin reductase (TrxR) from blood serum of normal and heart failure human using different biochemical techniques. Two proteinous peaks had been isolated by gel filtration using sephadex (G-50) and three proteinous peaks isolated from sephadex (G-100) for precipitate that produced from ammonium sulphate precipitation (65%) . The approximately molecular weight of the isolated protein as a source of enzyme for normal using gel filtration (G-100) was (118059 ± 925) Dalton. Two peaks of enzyme were obtained by using DEAE-cellulose ion exchanger, but in SDA-PAGE electrophoresis techniques indicated the presence of two bands from peak of separation column type sephadex (G-100) and one band of each peak, resulting from the ion exchange process with molecular weights of (58231 ± 490) Dalton. The part of experimental occurred from February of 2013 to 25 June 2014.

The results showed that the optimum conditions of partially purified enzyme from blood serum were at $(200\mu\text{g/ml})$ of protein as a source of the enzyme using (0.4 mol/l) citric acid – Na_2HPO_4 buffer solution at $\text{pH}(7)$ act for (25) minutes at $(40)^\circ\text{C}$. By using Lineweaver-Burk plot, the value of maximum velocity (V_{max}) and Michaelis constant (K_m) were found to be $(0.182\mu\text{mol/min})$ and (0.013 mol/L) respectively using 5,5'-dithio bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) as a substrate.

Finally, the effect of some chemicals and drugs on enzyme activity was studied. The results showed that guanidium-HCl, bromoacetic acid and zinc sulphate are uncompetitive, noncompetitive and competitive inhibitors respectively at different concentrations. However, dexamethasone an activator to the enzyme.

The research included the separation of thioredoxin (Trx) from normal human blood serum using different biochemical techniques. One proteinous peak had been isolated by sephadex (G-50) that produced from ammonium sulphate precipitation (65%) after dialysis. It was observed that there are two peaks of Trx when using DEAE-cellulose ion exchanger for the product of gel filtration column. The approximately molecular weight of the isolated Trx by sephadex (G-50) and SDS-PAGE electrophoresis techniques were (12305 ± 190) and (12461 ± 110) Dalton respectively.

The study showed that Trx working was inhibited to (44.59%) by paracetamol, dexamethasone, diphenhydramine-HCl, theophylline anhydrous, pseudoephedrine, ceramide and caffeine anhydrous, while metronidazole and chlorpheniramine- malate have activated effect to (110.8%) and (21.62%) respectively.

Treatment experimental animals by (1%) hydrogen peroxide led to a significant increase in : TrxR, creatine kinase, aspartate aminotransferase and total bilirubin compared to control group, while a significant decrease in: albumin and uric acid, but non significant in alanine aminotransferase. Beside of, a different dose (2 and 4mg/Kg of rat body weight) of isolated TrxR with (1%) hydrogen peroxide improved parameter levels through decrease oxidative stress that producing for rat.

Some biochemical parameters for 30 heart failure children (3 months - 9 years) were clinically studied. The results showed a significant increase in: TrxR, aspartate aminotrasferase, alanine aminotransferase and total bilirubin, while a significant decrease in: creatine kinase, albumin and uric acid compared to control group.