جامعة الموصل
كلية التربية للعلوم الصرفة

توصيف أنزيم بولي أمين أوكسيديز المنقى جزئياً من دماغ الأغنام ودراسة أمكانية تثبيطه بعقار الكاربامازيبين

سارة عبدالإله يونس محمد الدباغ

رسالة ماجستير
الكيمياء

بإشراف
الأستاذ المساعد
الدكتورة وثبة إدريس توحلة

1440هـ 2019م

الخلاصة

تضمنت الدراسة الكشف عن وجود فعالية لأنزيم بولي أمين أوكسيديز Polyamine oxidase (PAO) في مستخلص نسيج دماغ الأغنام وتنقيته جزئيا باستخدام تقنيتي الفرز الغشائي وكروموتوغرافيا التبادل الأيوني باستخدام راتنج المبادل الأيوني السالب (DEAE – سليلوز). تم الكشف عن وجود متماثلين لأنزيم PAO هما (I و II) وبفعالية نوعية 3.876 و 2.856 وحدة أنزيمية/ملغم بروتين على التوالي, وبعدد مرات تنقية 11 و8 مرة على التوالي مقارنة بالأنزيم في المستخلص الخام.

نظرا للفعالية العالية للمتماثل الأول PAO I , لذا تم اختياره للدراسة. وعند دراسة الظروف المثلى للأنزيم, أظهرت النتائج إن أفضل فعالية تم الحصول عليها في خليط التفاعل كانت عند 20 ملي مولار من محلول فوسفات الصوديوم–البوتاسيوم المنظم بدالة حامضية 9 و100 ملي مولار من محلول كلوريد البوتاسيوم KCl. وكان حجم المستخلص الأنزيمي 100 مايكروليتر, وحضن الأنزيم بدرجة حرارة 40°م ولمدة 10 دقائق, وعند اختبار خصوصية الأنزيم تجاه المواد الأساس وجد أن أعلى فعالية كانت عند استخدام السبرمدين كمادة أساس أذ بلغت قيمة السرعة القصوى V_{max} 0.145 وحدة أنزيمية/ مل وقيمة ثابت ميكاليس–منتن K_m 43.4 ملي مولار. وأظهرت النتائج وجود أيون النحاس بتركيز 0.1437 ملغم/ مل في المتماثل PAO I باستخدام جهاز الامتصاص الذري. كما تم الكشف عن وجود المرافق الأنزيمي فلافين أدنين ثنائي النيوكلوتيد Flavin Adenine Dinucleotide (FAD) في المتماثل الأول PAO I باستخدام تقنية الأشعة فوق البنفسجة وتبين ظهور حزمتين عند الأطوال الموجية من (325– 430) نانوميتر.

درس التأثير التثبيطي لعقار الكاربامازيبين على فعالية المتماثل PAO I وتبين حصول انخفاض في فعالية الأنزيم عند التراكيز المختلفة للمثبط. كما تم دراسة نوع التثبيط للعقار, وتبين أنه من النوع اللاتنافسي , وإن قيمة ثابت التثبيط Ki بلغت 1.8 ملي مولار.

وقد تم تشخيص مركبات متعدد الأمين في المستخلص الخام بتقنية كروموتوغرافيا السائل عالي الأداء HPLC , وأشارت نتائج التحليل إلى وجود (السبرمين والسبرمدين والكادافارين وثنائي أمين بروبان وهكسايل أمين) فضلاً عن وجود مركبات متعدد أمين أخرى.

Abstract

The study included the detection of the prescence of polyamine oxidase PAO in sheep's brain extract and partially purifying it using dialysis and ion exchang chromatography (using DEAE-cellulose) techniques. Tow isoenzymes (I ,II) were obtained with specific activities: 3.876 and 2.856 enzyme unit/ ml of protein and with purification folds: 11 and 8 times respectively.

Due to high activity of PAO I, so it was chosen for present study. In the study of optimal conditions of the enzyme, the results showed that the best activities were obtained in the reaction mixture of 20 mM of sodium—potassium phosphate solution pH=9 and 100 mM of potassium chloride solution. The size of enzymatic extract was 100µl, and incubation time was 10 min. at 40°c. The specificity of enzyme towards spermidine was higher than that of other polyamines with V_{max} value 0.145 enzyme unit/ ml and K_m value 43.4 mM. The results also showed the presence of copper ion in PAO I at a concentration of 0.1437 mg/ ml using atomic absorption. The presence of Flavin adenine dinucleotide (FAD) as a cofactor been detected using UV. Technology and showed two bands at wavelengths of (325-430) nm.

The inhibitory effect of carbamazepine on PAO I activity was studied. It was found that the enzyme activity decreased with inhibitory concentration increased. The inhibition type of this drug was noncompetitive with Ki= 1.8 mM.

polyamine compounds in the crude extract. Were identified by HPLC technique. The results of the analysis indicated of Spermine , Spermidine , Cadavarine , Diamine propane and Hexaylamine and other polyamines

University of Mosul

College of Education For Pure Science

Characterization of Partially Purified Polyamine Oxidase from sheep's Brain and study of the Probability of its Inhibition by Carbamazepine drug

Sarah Abdul Elah Younis Mohammed AL-Dabbagh

M.Sc. Thesis

Chemistry

Supervised By

Asst. Prof.

Dr. Wathba Idrees Touhala

1440 A.H. **2019A.D.**