



جامعة الموصل  
كلية التربية للعلوم الصرفة

دراسة حركية وتشبثية لأنزيم الليبواوكسيجيناز المنقى جزئياً من  
مصل مرضى الصرع وعلاقة فعاليته ببعض المتغيرات الكيموحيوية

أحمد علي صالح محمود الفياض

رسالة ماجستير  
الكيمياء

بإشراف

الأستاذ المساعد

الدكتور نشوان ابراهيم عبو اللهيبي

## الخلاصة

تضمنت الدراسة تقدير بعض المتغيرات الكيموحيوية لدى مرضى الصرع ومقارنتها مع الأشخاص الأصحاء. وقد ضمت (100) ذكور وإناث ، قُسموا الى مجموعتين: المجموعة 1 (40) مريض صرع والمجموعة 2 (60) الأصحاء ، و تراوحت أعمارهم من (10- 60) سنة.

أظهرت النتائج زيادة معنوية عند مستوى الاحتمال  $p \leq 0.05$  في مرضى الصرع مقارنة بالأصحاء في مستويات فعالية الليبواوكسيجينيز ، الكلوكوز ، مالون ثنائي الالديهيد ، حامض اليوريك ، الكوليسترول الكلي و البروتين الدهني واطى الكثافة جدا . في حين كان هناك انخفاض معنوي  $p \leq 0.05$  في مستويات الكلوتاثيون ، فيتامين E ، الألبومين و البروتين الدهني عالي الكثافة مقارنة بالأصحاء ، أيضاً أظهرت النتائج زيادة غير معنوية في فعالية البولي امين أوكسيديز ، البروتين الكلي و البروتين الدهني واطى الكثافة في المرضى مقارنة مع الأصحاء . بينما أشارت النتائج إلى انخفاض غير معنوي في فيتامين C والبيروبين والكرياتينين في مرضى الصرع مقارنة مع الأصحاء .

تمت دراسة تأثير الجنس ، العمر والسمنة ، وأظهرت النتائج زيادة معنوية  $p \leq 0.05$  لفعالية الانزيم في مرضى الصرع مقارنة مع الأصحاء (الذكور والإناث) ، وكذلك زيادة معنوية عند  $p \leq 0.05$  في مستوى مالون ثنائي الالديهيد في المرضى الإناث بالمقارنة مع المرضى الذكور ، أما بالنسبة للألبومين ، في مرضى الصرع عند الإناث ، انخفض بشكل ملحوظ مقارنة مع المرضى الذكور ، فقط مستوى حامض اليوريك ارتفع في المرضى الذكور مقارنة بالمرضى الإناث.

أظهرت دراسة السمنة زيادة معنوية  $p \leq 0.05$  في فعالية الليبواوكسيجينيز و مالون ثنائي الالديهيد وفيتامين C في المرضى مقارنة بالأصحاء (البدينين وغير البدينين) ، وانخفاض كبير في مستوى البروتين الدهني عالي الكثافة لدى المرضى البدينين مقارنة بالأصحاء البدينين. بينما زاد حامض اليوريك  $p \leq 0.05$  في مرضى الصرع مقارنة مع الاصحاء (غير البدينين) ، وكانت هناك زيادة معنوية  $p \leq 0.05$  في مستوى الدهون الثلاثية في المرضى البدينين مقارنة بالمرضى غير البدينين. تم زيادة مستويات الكوليسترول الكلي ، الدهون الثلاثية ، البروتين الدهني واطى الكثافة جدا بشكل معنوي  $p \leq 0.05$  في المرضى البدينين مقارنة مع البدينين الأصحاء .

أظهر تأثير العمر زيادة معنوية  $p \leq 0.05$  في الكرياتينين ، الكلوكوز في الفئة العمرية (26-35 سنة) مقارنة مع (15-25 سنة) في المرضى ، وانخفاض كبير في مستوى الكرياتينين في المرضى (26-35 سنة) مقارنة بالأصحاء (26-35 سنة). بينما كانت هناك زيادة معنوية

بمقدار  $p \leq 0.05$  في مستوى فعالية الليبواوكسيجينز ، وفيتامين C في فئات المرضى مقارنة مع الأصحاء ، في حين كان هناك زيادة في الكوليسترول الكلي في المرضى مقارنة مع الأصحاء في نفس الفئة العمرية (15-25 سنة).

تمت دراسة الارتباط بين فعالية الليبواوكسيجينز مع المتغيرات الكيموحيوية ، أظهرت علاقة عكسية مع (الملون ثنائي الالديهيد ، فيتامين E ، البيلبيروبين وحامض اليوريك) قيمة  $r (-0.41, -0.32, -0.55, -0.35)$  على التوالي ، وعلاقة طردية بمؤشر كتلة الجسم  $(r = 0.46)$  .

تم اجراء التنقية الجزئية لانزيم الليبواوكسيجينز من مصل دم مرضى الصرع في هذه الدراسة ، تم تحقيق ذلك باستخدام الترسيب بواسطة كبريتات الأمونيوم 65% وكانت الفعالية النوعية  $(0.751 \text{ U/mg})$  ، ثم الديلزة بفعالية نوعية  $(0.935 \text{ U/mg})$  . أخيراً ، من خلال تطبيق كروماتوغرافيا التبادل الأيوني ، تم الحصول على حزمة بروتينية واحدة لفعالية لانزيم الليبواوكسيجينز مع فعالية نوعية  $(2.60 \text{ U/mg})$  .

تم تحديد الظروف المثلى لفعالية انزيم الليبواوكسيجينز ، كانت أعلى فعالية للإنزيم عند  $C^{40}$  ، و زمن حضان عند 7 دقائق ، ودالة حامضية = 7.4 ، و زمن تفاعل عند 3 دقائق والتركيز الأمثل للمادة الاساس (حامض اللينوليك) كان  $1.2 \text{ mM}$  ، باستخدام معادلة لينوفير-بيرك و ميكليس-منتون. كانت قيمة السرعة القصوى وثابت ميكليس-منتون  $1.9 \text{ U/ml}$  و  $0.3 \text{ mM}$  على التوالي .

تمت دراسة تأثير بعض الأدوية المضادة للصرع على فعالية إنزيم الليبواوكسيجينز ، إذ أعطى الأستيتوزولاميد أعلى نسبة تثبيط  $(96.2\%)$  لفعالية الإنزيم بتركيز 10 ملي مولار مقارنة بالعقاقير الأخرى. وأعطى حامض الفالبرويك نسبة تثبيط  $(95.6\%)$  بتركيز 20 ملي مولار والكاربامازيبين نسبة تثبيط  $(95.1\%)$  عند 35 ملي مولار . أظهرت النتائج ان التثبيط غير تنافسي لجميع الأدوية ، وان ثابت التثبيط  $K_i$  كان 11 و 21 و 36 ملي مولار على التوالي.

## Summary

The study was included determination of some biochemical parameters in epilepsy patients and compared with healthy people. It was included of (100) males and females, they were divided into two groups: Group 1 (40) epilepsy patients and group 2 (60) healthy group, Their ages ranged from (10 to 60) years .

The results showed a significant increase at probability level  $p \leq 0.05$  in epilepsy patients compared with healthy in lipoxigenase (LOX) activity, glucose, malonedialdehyde, uric acid, total cholesterol and VLDL-C levels, while a significant decrease  $p \leq 0.05$  of glutathione, Vitamin E, Albumin and HDL-C levels compared with healthy. Also, the results showed non-significant increase in Polyamine oxidase activity, Total protein and LDL-C in patients compared with healthy. While the results indicated non-significant decrease in Vitamin C, Bilirubin and Creatinine in epilepsy patients compared with the healthy.

The effect of sex, age and obese were studied and the results showed a significant increase  $p \leq 0.05$  of LOX activity in epilepsy patients compared with healthy (male, female), also a significant increase  $p \leq 0.05$  in the level of malonedialdehyde in female patients compared with males patients, As for as albumin, in female epilepsy patients, a significant decreased compared with male patients, only uric acid level was increased in male patients compared to female patients.

The effect of obese showed a significant increase  $p \leq 0.05$  of LOX activity, malonedialdehyde and vitamin C in patients compared to healthy (obese, non-obese), and a significant decrease in HDL-C level in obese patients compared to obese healthy. While, uric acid increased  $p \leq 0.05$  in epilepsy patients compared with non-obese patients, and there was a significant increase  $p \leq 0.05$  in the level of triglycerides in obese patients compared to non-obese patients. The levels of total cholesterol, triglycerides, VLDL-C, were increased significantly  $p \leq 0.05$  in obese patients compared with obese healthy.

The effect of age was showed a significant increase  $p \leq 0.05$  of creatinine, glucose in the age category (35-26 years) compared with (25-15 years) in patients, a significant decrease in creatinine level in patients (35-26 years) compared to the healthy (35-26 years). while there was a significant increase  $p \leq 0.05$  in the level of LOX activity, vitamin C in patient groups compared with healthy, whereas the total cholesterol was increased in patients compared with healthy in the same age category (25- 15 years).

The correlation between LOX activity with biochemical parameters was studied and indicated an indirect relationship with (MDA, vitamin E, bilirubin and uric acid) value R (-0.35, - 0.55, - 0.32, -0.41) respectively and it was direct (R = 0.46) with BMI.

Partial purification of LOX from the serum of epilepsy patients was included in this study. This achieved by using precipitation using ammonium sulfate 65% and the specific activity was (0.751U / mg) then by dialysis with specific activity (0.935 U/mg) . Finally, by applying ion-exchange chromatography, one proteinous peak of LOX activity with specific activity (2.60 U / mg) was obtained.

The optimal conditions for LOX activity were determined. The best enzyme activity was at 40 ° C, incubation time 7 min, pH = 7.4, time reaction at 3 min and the optimum concentration of substrate (linoleic acid) was 1.2 mM. By using Lineweaver-Burk and Michales- Menten equation, the value of Vmax and Km were 1.9 U/ml and 0.3 mM respectively.

The effect of some antiepileptic drugs on lipooxygenase activity was studied. Acetosolamide was given the highest inhibition ratio in about (96.2%) of enzyme activity at a concentration of 10mM compared to other drugs. Valproic acid gave (95.6%) inhibition at 20mM and Carbamazepine gave (95.1%) inhibition at 35 mM. The results showed non-competitive in inhibition for all drugs. And the inhibition constant Ki was 11, 21 and 36mM respectively.

**University of Mosul  
College of Education  
For Pure Science**



**Kinetic and Inhibition Study of Partially  
Purified Lipoxygenase From serum of Epilepsy  
patients and the relation of activity with some  
biochemical parameters**

**Ahmed Ali Saleh Mohmmmod Al-Fayyad**

**M.Sc. Thesis  
Chemistry**

**Supervised by  
Assis. Prof.**

**Dr. Nashwan Ibrahim Abo AL-Lehebe**

**2020 A.D.**

**1442 A.H.**