جامعة الموصل
كلية العلوم

تأثير النواتج الطبيعية لنبات ذنب الخيل على أنزيم اللايبوأوكسيجينيز المنقى جزئياً من مريض ربو ودراسة بعض المتغيرات الكيموحيوية

هبة رافد كمال جميل الأعظمي

رسالة ماجستير
في الكيمياء الحياتية

بإشراف
الأستاذ المساعد
الدكتور محمد بحري حسن عبد السعدون

١٤٤٠هـ ٢٠١٩ م

المستخلص

تضمنت هذه الرسالة عزل و تنقية إنزيم اللايبواوكسيجينيز من مصل الدم لشخص مصاب بالربو القصبي و دراسة عدد من العوامل المؤثرة على فعاليته فضلاً عن تحديد وزنه الجزيئي ثم درس تأثير النواتج الطبيعية التي تم عزلها من نبات ذنب الخيل على فعالية الإنزيم المنقى جزئياً من مصل الدم. حيث عزل الإنزيم باستخدام تقنيات عديدة مختلفة و تم الحصول على اثنتين من الحزم باستخدام تقنية كروموتوكرافيا التبادل الأيوني, وأظهرت الحزمة الأولى A فعالية عالية للإنزيم , إذ بلغت الفعالية النوعية (٢,٦٨ U/mg) و عدد مرات التنقية كانت (١٠,٣٠) مرة أما الحزمة الثانية B فكانت الفعالية النوعية (١,٣٨ U/mg) و عدد مرات التنقية (٥.٣٨) مرة و تم الاعتماد على الحزمة الأولى A في تحديد الوزن الجزيئي للإنزيم بتقنية الهجرة الكهربائية باستخدام SDS-PAGE والذي بلغ (٦٩٠٠٠) دالتون تقريبا.

ثم درست الظروف المثلى لفعالية الإنزيم المنقى جزئيا , و أظهرت النتائج إن اعلى فعالية كانت عند الدقيقة الخامسة , دالة حامضية عند (pH = 8) , درجة الحرارة (٤٠°م) , تركيز (٠,٥ ملي مول/ لتر) للمادة الأساس (حامض اللينوليك)و أن السرعة القصوى(V_{max}) بلغ (١٦٨ وحدة / لتر) وان قيمة (K_m) بتطبيق معادلة ميكيلس منتن ومعادلة لاينويفر_بيرك بلغت (٠,١٣) و(٠,١٤) ملي مولاري على التوالي. أما تركيز الإنزيم فأظهرت النتائج بأنه كلما يزداد حجم الانزيم تزداد فعالية الإنزيم, و كذلك تضمنت الدراسة تأثير الأدوية المضادة للالتهابات الخاصة بمرض الربو على فعالية الإنزيم و ظهرت النتائج أن دواء المونتيلوكاست ثبط إنزيم اللايبواوكسيجينيز تثبيطا غير تنافسيا و أيضا اظهر اعلى نسبة تثبيط للإنزيم, أما دواء الامينوفيللين فثبط إنزيم Liopoxygenase اقل من دواء المونتيلوكاست و كان التثبيط تنافسيا في حين دواء السالبوتامول فثبط إنزيم اللايبواوكسيجينيز تثبيطا لا تنافسيا. كما تضمنت الدراسة عزل النواتج الطبيعية من نبات ذنب الخيل (الفلافونويدات و الزيوت) بواسطة جهاز السكسوليت باستخدام مذيبات مختلفة, ثم شخصت الزيوت بتقنية كروموتوكرافيا الغازGC و شخصت الفلافونويدات بتقنية كروموتوكرافيا السائل العالي الأداء HPLC. و أظهرت النتائج بوجود حزمتان تعود لحامض الاندوكانويك و حامض اللوريك في حين كرموتوغرام HPLC تميز بوجود أربعة حزم تعود لـ(كاتشين ، كيورستين ، حامض الفيروليك و الروتين) ثم درس تأثير هذه النواتج (الفلافونويدات – الزيوت) فضلا عن الصابونين على فعالية الإنزيم المنقى جزئياً من مصل الدم حيث اذ الفلافونويدات نسبة تثبيط اعلى , تليها الصابونين و من ثم الزيوت, فعند تركيز (7000 ppm) من مستخلص الفلافونويد يؤدي إلى حصول تثبيط تام لإنزيم.

كذلك تضمنت الدراسة تأثير الكرب التأكسدي على مرضى الربو ومقارنته بالأصحاء من خلال قياس (١٣) متغيراً من متغيرات الأكسدة و مضادات الأكسدة و كذلك قياس فعالية الإنزيم والتي أجريت على (60) نموذجاً من المرضى و الاصحاء , و أظهرت النتائج وجود ارتفاع معنوي عند مستوى الاحتمالية ($p \leq 0.05$) في (فعالية إنزيم LOX ، المالون ديالديهايد ، سكر الكلوكوز ، حامض اليوريك) مقارنة مع الأشخاص الأصحاء. كما أوضحت النتائج وجود انخفاض معنوي لدى مرضى الربو في جميع مضادات الأكسدة (فيتامين A – فيتامين C – فيتامين E –البيليروبين – الألبومين – البروتين الكلي – الكلوبيولين – الكلوثايون – الحديد) مقارنة مع الأصحاء نتيجة زيادة الكرب التأكسدي .فضلاً عن ذلك فقد تمت دراسة تأثير الجنس ، العمر ، السمنة و فصيلة الدم على المتغيرات الكيموحيوية المقاسة و أظهرت النتائج وجود ارتفاع معنوي في تركيز فعالية إنزيم Liopoxygenaseو المالون ديالديهايد في الإناث المرضى و السيطرة مقارنة بذكور المرضى و الأصحاء . وكذلك انخفاض جميع مضادات الأكسدة في إناث و ذكور المرضى مقارنة مع الأشخاص الأصحاء. وأظهرت النتائج أيضا انه لم يكن هناك فرق معنوي في إناث المرضى مقارنة بذكور المرضى في كل من (البروتين الكلي ، الألبومين ، الكلوبيولين ، فيتامين A ، البيليروبين) , أما فيتامين C , فيتامين E , الكلوثايون فهي مرتفعة قليلا في الإناث المرضى اكثر مما هي عليه في الذكور المرضى . أما سكر الكلوكوز ، الحديد ، و المالون ديالديهايد, فقد ظهرت اقل في الإناث المرضى مقارنة بالذكور المرضى. أما دراسة تأثير العمر فأظهرت النتائج أيضا وجود علاقة عكسية بين العمر و مضادات الأكسدة اذ انخفضت مضادات الأكسدة مع زيادة العمر و كذلك زادت فعالية إنزيم LOX و المالون ديالديهايد و سكر الكلوكوز و حامض اليوريك بالنسبة للمرضى مقارنة بالأصحاء , وكذلك بالنسبة للمرضى ذو الفئات العمرية الأكثر مقارنه بالفئات العمرية الأقل .أما تأثير السمنة فقد بينت النتائج بأن لها تأثيرا واضحا على مرضى الربو اذ ازدادت فعالية إنزيم LOX ، سكر الكلوكوز ، حامض اليوريك ، المالون ديالديهايد في المرضى البدينين ذو(BMI ≥٣٠) مع انخفاض معنوي في جميع مضادات الأكسدة مقارنة بالأشخاص الأصحاء .أما فصيلة الدم فأظهرت النتائج إلى ان اكثر الأشخاص المصابين بمرض الربو تكون فصيلة دمهم من النوع O+ ثم تليها A+ ، AB+ ثم B+.

University of Mosul
College of Science

Effect of Natural Products of *Equisetum arvense*.L Plant on the Partially Purified Lipoxygenase From Asthma Patient and Study Some Biochemical Parameters

Hiba Rafid Kamal Jameel AL-Aathammy

M.Sc. Thesis in
Biochemistry

Supervised by

Assistant Professor

Dr. Mohammed Bahry Hassan Abed Al-Saadon

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

Summary

This research included isolating and purifying the lipoxygenase from the serum of a person with bronchial asthma and studying a number of factor affecting on its activity as well as determining it's molecular weight . then studied the effect of natural products isolated from horse tail plant on the activity of the partially purified enzyme from the serum .

The enzyme was isolated by using several different techniques , and two of bands were obtained using ion exchange chromatography technique in which the DEAE-Cellulose ion exchanger was used for the protein leachate that produced by the filtration of ammonium sulfate (0-65)% after dialysis process . The first band A showed a high activity of the enzyme with a specific activity (2.68 U/mg) and the number of purification times was (10.30) times , the second band B showed a specific activity (1.38 U/mg) and the number of purification was (5.38) times .

The first band (A) was used to determine the molecular weight of the enzyme by migration technology using SDS-PAGE which was approximately 69,000 dalton. Then the optimum condition of the activity of partially purified enzyme were studied and the results showed that the highest activity was at the fifth minute, pH=8, temperature (40°C), (0.5 mmol/L) concentration of substrate (Lenolic acid) and maximum velocity (*V*max) was (168 U/L), and the value of (*K*m) by applying Michales – Menton equation and Lineweaver-Burk plot was (0.13 , 0.١٤) mM respectively and the concentration of the enzyme showed that the higher enzyme concentration will increased the activity of enzyme . Also the study included the effect of some anti-inflammatory drugs on LOX activity and the results showed that the montilucast inhibited LOX enzyme and the inhibited was not competitive and also showed the highest inhibited rate of the enzyme . Aminophylline inhibited LOX enzyme less than montilucast and the inhibited was competitive while salbutamol inhibited the LOX enzyme by non-competitive .

The study also included isolating of natural products from horse tail plant (flavonoids and oils) by using soxhlet with different solvents, then oils diagnosed with (GC) gas chromatography and the flavonoids were diagnosed with high-performance liquid chromatography and the results showed that there were several bands in GC chromatography, two of them was for endocanoic acid and lauric acid, where as HPLC was characterized by four bands of (catechin , quercetin , ferulic acid and rutin) . The effect of these products (oils , flavonoids) in addition to saponin on the activity of partially purified enzyme from serum , where the flavonoids showed a higher inhibition rate on LOX followed by saponin then oils , where at the concentration of 7000 ppm of the flavonoids extract leads to complete inhibition of the enzyme LOX .

In addition , the study also included the effect of oxidative stress on asthmatic patients and their comparison with healthy peoples by measuring (13) variables of antioxidant as well as measuring the activity of LOX enzyme , wich was conducted on (60) subjects of patients and healthy peoples between the ages of (10-60) years . The results showed a significant increase in the probability level ($p \leq 0.05$) in the (LOX activity , MDA ,glucose , and uric acid) in patients compared to healthy subjects . the results also showed a significant decrease in asthma patients in all antioxidants (vitamin A , vitamin C , vitamin E , Albumin , bilirubin , total protein, glutathione, globulin, iron) compared with healthy as a result of increased oxidative stress .

In addition , the effect of sex , age , obesity and blood group on the measured biochemical variables was studied .The results showed a there is a significant increase in the activity of LOX enzyme and MDA in female patients and control compared to male healthy and patients as well as the reduction of all antioxidants in female and male patients compared to healthy people. The results also showed that there was no significant difference in female patients compared to male patients in

(total protein , Albumin , globulin , vitamin A and bilirubin) but vitamin C , vitamin E , glutathione were slightly higher in female patients compared with male patients. Glucose , Iron and MDA were lower in female patients compared with male . The effect of age was also shown there was an inverse relation between age and antioxidants will decrease with age and the different was signification at the probability ($p \leq 0.05$) . LOX activity , MDA , glucose , MDA and uric acid were increase for patients compared with healthy as well as for patients with the highest age groups compared to lower age groups .The effect of obesity showed that it had a clear effect on asthmatic patients (LOX activity , glucose , MDA and uric acid in patients with (BMI ≥ 30) compared with healthy. also there was a significant decrease in all antioxidants obese patients compared with obese healthy also for the obese patients compared to non-obese patients .

As for the blood group , the results showed that the most people with asthma were their blood group of type O+ followed by A+ , AB+ and B+ .