



جامعة الموصل
كلية العلوم

**عزل وتنقية إنزيم L – فيوكوز ديهيدروجينيز ودراسة المتغيرات
الكيموحيوية في مصل دم بعض المرضى المصابين بالأمراض
العصبية في مدينة الموصل**

رسالة ماجستير تقدم بها

عمر محمد حميد محمد

الى

مجلس كلية العلوم في جامعة الموصل

وهي جزء من متطلبات نيل شهادة ماجستير في اختصاص

الكيمياء / الكيمياء الحياتية

إشراف

الأستاذ الدكتور لؤي عبد علي اسماعيل الهلالي

المخلص

تضمنت الرسالة جزئين: الجزء الاول دراسة مستويات المتغيرات الكيموحيوية في مصل الدم المرضى المصابين بالامراض العصبية من الزهايمر والصرع والصداع النصفي ، عن طريق قياس (14) متغيراً شملت مستويات: الفيوكوز الكلي وإنزيم الفيوكوز ديهيدروجينيز وإنزيم كلوتاثايون S- ترانسفيريز وإنزيم المونو أمين أوكسيديز فضلاً عن مستويات عدد من المعادن السامة والأساسية التي تضمنت الرصاص والنيكل والكروم والنحاس والحديد والكالسيوم وايضا متغيرات مضادات الأكسدة والأكسدة من الكلوتاثايون والسيرولوبلازمين والمالوندايديهايد وبيروكسي نيتريت. أجريت هذه الدراسة على (172) عينة من الذكور و شملت: مجموعة المرضى الذين يعانون من الأمراض العصبية في مدينة الموصل والذين بلغ عددهم (97) (مرضى الزهايمر وعددهم (23) ومرضى الصرع وعددهم (41) ومرضى الصداع النصفي وعددهم (33))، ومجموعة السيطرة الذكور وعددهم (47) والذين تراوحت أعمارهم بين(24-68) سنة، فضلاً عن (28) عينة استخدمت لغرض عزل إنزيم الفيوكوز ديهيدروجينيز من مصل دم الأصحاء الذين تراوحت اعمارهم بين(25-35) سنة.

اشارت النتائج إلى أن هناك إنخفاضاً معنوياً في مستويات الفيوكوز الكلي مقارنة مع مجموعة السيطرة وارتفاع معنوي في فعالية الإنزيمات من إنزيم الفيوكوز ديهيدروجينيز وإنزيم كلوتاثايون S- ترانسفيريز وإنزيم المونوأمين أوكسيديز في جميع المرضى المصابين بالأمراض العصبية من الزهايمر والصرع والصداع النصفي مقارنة مع مجموعة السيطرة.

لوحظ أن هناك ارتفاعاً معنوياً للمعادن السامة خاصة لدى المرضى الزهايمر والصرع والصداع النصفي على التوالي في مستويات: الرصاص والنيكل والكروم مقارنة مع مجموعة السيطرة، فضلاً عن ارتفاع معنوي في مستوى المعدن الأساسي من النحاس لمرضى الزهايمر والصرع عند مقارنتهم مع مجموعة السيطرة وارتفاع غير معنوي لمرضى الصداع النصفي.

فضلاً عن ذلك، فقد اشارت النتائج بأن هناك انخفاضاً معنوياً في مستوى الحديد لجميع مجاميع المرضى، وانخفاضاً معنوياً في مستوى الكالسيوم لمرضى الزهايمر والصرع ولم يلاحظ أي اختلاف معنوي للكالسيوم لدى مرضى الصداع النصفي عند مقارنتهم مع مجموعة السيطرة.

وعند دراسة حالة الأكسدة ومضادات الأكسدة لدى المرضى لوحظ أن هناك انخفاضاً معنوياً في مستوى الكلوتاثايون وارتفاعاً معنوياً للمتغيرات المالوندايديهايد والبيروكسي نيتريت لدى المرضى الزهايمر والصرع والصداع النصفي عند مقارنتهم مع مجموعة السيطرة، فضلاً عن

إن هناك ارتفاعاً معنوياً لمستوى السيرولوبلازمين لدى مرضى الصرع ولم يلاحظ فيه أي اختلاف معنوي لدى مرضى الزهايمر والصداع النصفي عند مقارنته مع مجموعة السيطرة.

الجزء الثاني من الدراسة تضمن عزلاً وفصلاً لإنزيم الفيوكوز ديهيدروجينيز (FDH) Dehydrogenase من مصل دم الأصحاء، كما تمت دراسة بعض العوامل المؤثرة في فعاليته، فضلاً عن تحديد وزنه الجزيئي. إذ فُصِلت حزمة رئيسة واحدة فقط ذات فعالية عالية بتقانة الترشيح الهلامي للراسب البروتيني الناتج عن ترسيب بروتينات مصل الدم بكبريتات الأمونيوم (65%) بعد عملية الفرز الغشائي (الدليزة)، واستعملت فيما بعد الحزمة الواحدة ذات الأعلى فعالية لدراستها وتحديد الوزن الجزيئي لمكوناتها باستعمال تقانة الترشيح الهلامي من نوع سيفادكس G-100 وكانت بحدود 37826.8 دالتون، إذ وصلت عدد مرات التنقية إلى (16) مرة وبكمية استعاد لفعالية الإنزيم قدرت بـ 45.2%.

أظهرت الدراسة أن الظروف المثلى لعمل لإنزيم الفيوكوز ديهيدروجينيز (FDH) كانت باستعمال المحلول المنظم بتركيز (150 ملي مول/لتر) عند أس هيدروجيني (10) وزمن التفاعل (20 دقيقة) ودرجة حرارة (37°م) باستعمال تركيز (150 ملي مول/ لتر) من مادة الأساس الفيوكوز، وباستعمال رسم لاين وبفر- برك تم إيجاد قيمة السرعة القصوى (V_{max}) وثابت مكيلس (K_m) وكانت مساوية لـ 19.08 (وحدة إنزيم / لتر) و 145 (ملي مول / لتر) على التوالي .

Abstract

The thesis included studying the levels of biochemical parameters in the blood serum of patients with neurological diseases such as Alzheimer's, Epilepsy and Migraine, by measuring (14) parameters that included levels of Total Fucose, Fucose dehydrogenase (FDH), Glutathione S-transferase (GST) and Monoamine oxidase (MAO), Beside of some toxic and essential metals which included: Lead, Nickel, Chromium, Copper, Iron, and Calcium. And antioxidants and oxidants parameters for Glutathione, Ceruloplasmin, Malondialdehyde, and Peroxy nitrite. As this study was conducted on 172 samples which included : a group of male patients suffering from neurological diseases in the city of Mosul, who (97) samples and included (Alzheimer's disease (23) samples, epilepsy patients (41) samples and migraine patients (33) samples), and control groups who were (47) samples and those whose ages ranged between (20-72) years, and (28) samples for the purpose of isolating the enzyme fucose dehydrogenase from the blood serum of healthy people and those whose ages ranged between (25-35) years.

The results showed that there was a significant decrease in the level of total fucose compared with control group and significant increase in activity of enzymes for fucose dehydrogenase, glutathione S-transferase and monoamine oxidase in all patients with neurological diseases (Alzheimer's, Epilepsy and Migraine) compared with control group .

Showed that there was a significant increase in the level of toxic metals especially in Alzheimer's patients, Epilepsy and Migraine in the levels of lead, nickel and chromium compared to the control group, as well as a significant increase in the level of the essential metal copper for Alzheimer's patients and Epilepsy when compared with the control group, and no significant difference for migraine patients.

In addition, the results indicated that there was a significant decrease in the level of iron for all groups of patients, and significant decrease in the level of calcium for Alzheimer's and Epilepsy patients and no significant difference in calcium was observed in migraine patients when compared with the control group.

When study of oxidant and antioxidants case for patients showed a significant decrease in the level of glutathione level and a significant increase for the parameters malondialdehyde, peroxy nitrite for Alzheimer's, Epilepsy and Migraine patients when compared with the control group, Beside of significant increase ceruloplasmin in Epilepsy patients and no significant difference in Alzheimer's and Migraine patients.

The second part of the study included isolation and separation of the enzyme fucose dehydrogenase (FDH) from the blood serum of healthy people, and some factors affecting on its activity were studied, in addition to determining its molecular weight. On the precipitation of serum proteins with ammonium sulfate (65%) after the membrane screening process (dialysis), the single most effective package was subsequently used for its study and for determining the molecular weight of its components using the Sephadex G-100 gel filtration technology, and it was in the range of 37826.8 Dalton, with fold of purification arrived to 16 fold and 45.2% recovery for the activity of enzyme.

The study showed that the optimal conditions for the work of fucose dehydrogenase (FDH) were using buffer solution at a concentration of (150 mmol / liter) at a pH (10), reaction time (20 minutes) and temperature (37 °C) using the concentration (150 mmol / liter). From the fucose substrate, and by using the Lineweaver-Burk diagram, the value of the maximum velocity (V_{max}) and the measured Michaelis constant (K_m) was found and was equal to 19.08 (U / liter) and 145 (mmol / liter), respectively.

University of Mosul
College of Science



Isolation and Purification of the L-Fucose Dehydrogenase and the Study of Biochemical Parameters in Blood Serum of Some Patients with Neurological Diseases in Mosul City

A Thesis Submitted By
Omar Mohammed Hameed Mohammed

To

The Council of the College of Science / University of Mosul In Partial
Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master's

In

Chemistry/ Biochemistry

Supervised By

Prof. Dr. Luay Abed Ali Ismail Al-Helaly

2020 A.D

1442 A.H