جامعة الموصل
كلية العلوم

عزل إنزيم السايكلواوكسيجنيز-2 من دم مرضى التهاب المفاصل الرثوي ودراسة تأثير النواتج الطبيعية المعزولة من نبات العصلج على الأرانب المصابة بالتهاب المفاصل الرثوي

إطروحة تقدم بها الطالب

اسامة ميسر محمود داؤد السبعاوي

إلى

مجلس كلية العلوم في جامعة الموصل وهي جزء من متطلبات نيل

درجة دكتوراه فلسفة في اختصاص

علوم الكيمياء / الكيمياء الحياتية

بإشراف

الأستاذ مساعد الدكتور محمد بحري حسن السعدون

1438 هـ

2017 م

الخـلاصة

تضمنت الدراسة السريرية والكيموحيوية (120) مشاركاً، منهم (60) شخصاً سليماً (30 ذكراً و 30 أُنثى) بعمر يتراوح بين (25–64) سنة كمجموعة سيطرة و (60) شخصاً مصاباً بالتهاب المفاصل الرثوي (19 ذكراً و 41 أُنثى) بعمر يترواح بين(20–70) سنة كمجموعة مرضى والمراجعين لمستشفى ابن سينا التعليمي. قدرت فعالية إنزيمات السايكلواوكسيجنيز–2 (COX-2) و النايترك اوكساید سنثیز (NOS) و الكلوتاثايون بيروكسيديز(GPx) و السوبر اوكساید دسيميوتيز (SOD) و البيروكسيديز الكلي (TPx)، كما تضمنت الدراسة قياس مستوى كل من النايترك اوكساید(NO) و البيروكسي نتريت (ONOO) و الحديد و العامل الرثوي (Rf). بينت نتيجة الدراسة الإرتفاع المعنوي في فعالية إنزيمات COX-2 و NOS ومستوى كل من NO و ONOO في مجموعة المرضى بالمقارنة مع مجموعة السيطرة، من جانب آخر بينت النتائج ان هناك إنخفاضاً معنوياً في مستوى الحديد و فعالية الإنزيمات SOD و GPx و TPxعند اجراء ذات المقارنة.

كما تضمنت الدراسة عزل ودراسة خصائص إنزيم السايكلواوكسيجنيز–2 في مصل الدم, بينت نتيجة الدراسة إن إنزيم السايكلواوكسيجنيز–2 يعمل بأقصى فعالية عند الظروف التالية: إستعمال بيروكسيد الهيدروجين كمادة اساس بتركيز (7.5) ملي مولاري والاميدازول كمحلول منظم عند رقم هيدروجيني (7.2) ودرجة حرارة (40) درجة مئوية وزمن تفاعل (75) ثانية من بدء التفاعل. كما بينت الدراسة ان للإنزيم المنقى ثابت ميكيلس مقداره (2) ملي مولار والسرعة القصوى للتفاعل الانزيمي بلغت (2.5×10^{-3}) وحدة/مل وأن الوزن الجزيئي التقريبي للإنزيم بلغ (71.5) كيلو دالتون. كما تضمنت الدراسة عزل النواتج الطبيعية من مسحوق جذور نبات العصلج بإستخدام التدرج في قطبية المذيبات و دراسة تأثير هذه النواتج على فعالية إنزيم COX-2 المنقى جزئياً، إذ بينت نتيجة الدراسة إن الناتج الزيتي له تأثير سلبي على فعالية الإنزيم (r= -0.824; P=0.006)، بينما لايمتلك ناتج الفلافونويد والصابونين ذات التأثير (r= -0.565, P=0.113 ; r= -0.634, P=0.067) على التوالي.

كما تضمنت الدراسة تجارب حيوانية إذ استحدث مرض التهاب المفاصل الرثوي في الأرانب بإستخدام مادة الكولاجين نوع–2 (Collagen type II) و مساعد فرويند غير التام Freund's adjuvant incomplete وعوملت الارانب المستحدثة بالمرض بالنواتج الطبيعية المفصولة من نبات العصلج. بينت نتيجة الدراسة ان جرعة المستخلص الخام الاكثر فعالية في خفض فعالية انزيم COX-2 هي 200 ملغم/كغم, كما بينت نتائج قياس المتغيرات الكيموحيوية المقاسة في دم مجموعة الأرانب المستحدثة بالتهاب المفاصل الرثوي غير المعاملة بالنواتج الطبيعية (مجموعة سيطرة مصابة) ارتفاعاً معنوياً في مستوى فعالية الإنزيمين COX-2 و NOS ومستوى جزيئة -ONOO بالمقارنة مع

مجموعة الأرانب الغير مستحدثة بالمرض (مجموعة سيطرة سليمة) ، بينما أظهرت نتيجة الدراسة لذات المقارنة إنخفاض فعالية إنزيم GPx وعدم تأثر إنزيم SOD. كما بينت نتيجة الدراسة إن كل مجاميع الأرانب المستحدثة بمرض التهاب المفاصل الرثوي والمعاملة بالنواتج الطبيعية أظهرت إنخفاضاً معنوياً في مستوى فعالية الإنزيمين COX-2 و NOS ومستوى جزيئة ONOO بالمقارنة مع مجموعة الأرانب السيطرة المصابة، بينما أظهرت نتيجة الدراسة لذات المقارنة ارتفاع فعالية إنزيم GPx وعدم تأثر إنزيم SOD.

كما بينت نتيجة الدراسة لمستوى فعالية إنزيم السبارتيت ترانس امينييز AST الذي قيس في مجانس خلايا الكبد والقلب والكلى لكل مجاميع الارانب بعد تشريحها انخفاض فعالية الانزيم في مجانس نسيج الكبد والقلب وارتفاع مستواه في نسيج الكلى لدى مجموعة السيطرة المصابة بالمقارنة مع مجموعة السيطرة السليمة كما بينت نتيجة الدراسة ان مجموعتي الارانب المستحدثة والمعاملة بناتجي الخام والفلافونويد على التوالي نجحت في رفع فعالية ذات الانزيم في نسيج الكبد وخفض مستواه في نسيج الكلى و نجحت المجموعتين المعاملتين بناتجي الزيت والفلافونويد على التوالي في رفع مستوى فعالية الانزيم في نسيج القلب بالمقارنة مع مجموعة السيطرة المصابة.

كما بينت نتيجة الدراسة لمستوى فعالية إنزيم الانين ترانس امينييز ALT الذي قيس في مجانس خلايا الكبد والقلب والكلى لمجاميع الارانب بعد تشريحها انخفاض فعالية الانزيم في مجانس نسيج الكبد والكلى وعدم تأثر مستواه في نسيج القلب لدى مجموعة السيطرة المصابة بالمقارنة مع مجموعة السيطرة السليمة, كما بينت نتيجة الدراسة ان مجاميع الارانب المستحدثة بالمرض والمعاملة بنواتج الخام والفلافونويد والصابونين على التوالي نجحت في رفع فعالية ذات الانزيم في نسيج الكبد والكلى بالمقارنة مع مجموعة السيطرة المصابة.

University of Mosul
College of Science

Isolation of a Cyclooxygenase-2 from the Blood of Patients Suffering from Rheumatoid Arthritis and Studying the Effect of Natural Products of the *Soapwort* on the Rabbits Suffering from Rheumatoid Arthritis

Ph. D. Thesis Submitted By

Osama Moyassar Mahmood Al-Sabaawy

To
Council of the College of Science University of Mosul
In Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Doctor of Philosophy
In

Chemistry / Biochemistry

Supervised by

Assist. Prof. Dr. Mohammed Bahry Hasan Al-Saadoon

1438 A.H 2017 A.D

Summary

The biochemical and clinical study included a number of (120) volunteers. Out of the (120) subjects, (60) apparently healthy adults (30 male and 30 female) were enrolled as a control group (aged 25-64 years) (control group). The remaining (60) rheumatoid arthritis (RA) patients visiting Ibn-Sina hospital in Mosul City (aged 20-70 years) (patients group). About (5) mL of blood sample was obtained from each subject in both groups and the serum used in assessing the activity of cyclooxygenase-2 (COX-2), glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), Nitric oxide synthase (NOS) and Total peroxidase (TPx). The study also included a measurement of the level of Nitric oxide (NO), Proxy nitrite (ONOO), Iron and Rheumatoid factor (Rf). All parameters were compared between control and patients groups. ONOO levels, NO levels, NOS and COX-2 activity were significantly higher in the patients in comparing with the control group. Conversely, Iron level, SOD activity, TPx and GPx activity were significantly lower in the patients in comparing with the control.

The current study also included isolate and study the properties of the cyclooxygenase-2 enzyme in blood of patient suffers rheumatoid arthritis. The result of study indicated that the enzyme work in maximum activity in blood at the following condition: using (7.5mM) of hydrogen peroxide as a substrate, the best buffer solution is imidazole (glyoxalline) at pH: (7.2) and at (40) °C, best period of time for the work of the enzyme is (75) seconds after the reaction began. The purified enzyme has a Km of (2) mM and maximum velocity ($2.5*10^{-3}$) U/ml. approximate molecular weight of the enzyme is (71.5) kDa. .

The study also includes isolating the natural products of *Soapwort* plant and studying the effect of isolated natural products on the activity of the purified enzyme. The result of the study indicates that the extracted oil of the *Soapwort* has a negative impact on the activity of the enzyme (r= -0.824; P=0.006), while flavonoids and Saponin have no such impact (r= -0.565; P=0.113; r= -0.634; P=0.067 respectively).

The current study also included induction of RA in rabbits by using type II collagen with incomplete Freund's adjuvant, then the induction (patients) rabbits treated with natural products of the *soapwort* plant. The results showed that the effective dose of crude extract was 200 mg / kg of body weight. The results of the measurement of biochemical

changes in the blood showed that untreated patients group exhibit a rise in the activity of COX-2, NOS and in the level of ONOO in comparing with healthy control group, while a result of the same comparative showed a decrease in the activity of GPx but not SOD. Also the study indicated that all treated groups of rabbits showed a significant decrease in the activity of COX-2, NOS and in the level of ONOO in comparing with untreated patients group, while the result of same comparative exhibits a high activity of GPx but not SOD.

The result of the present study also showed decrease in the activity of aspartate transaminase (AST) that measured in homogenizethed cell of liver and heart of groups of rabbits that infected with RA but untreated, inversly the homogenizethed cell of kidney showed increase in the activity of enzyme in the same comparative. After treating, groups of rabbits that infected with RA and treated with crude, oil and flavonoids respectively, exhibit significant increase in activity of AST in liver and heart tissues in comparing with untreated patients group, while exhibiting significant lower activity of enzyme in kidney tissue in the same comparative.

The result of the present study also showed decrease in the activity of alanie transaminase (ALT) that measured in homogenizethed cell of liver and kidney of groups of rabbits that infected with RA but untreated. After treating, Groups of rabbits that infected with RA and treated with crude, flavonoids and saponin respectively, exhibit significant increase in activity of ALT in liver and kidney tissues in comparing with untreated patients group.