جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة الموصل / كلية العلوم
قسم الكيمياء

تنقية جزئية لانزيم الزانثين اوكسيديز وعلاقته ببعض المتغيرات الكيموحيوية في مصل دم المرضى المصابين بارتفاع حامض اليوريك في مدينة الموصل

رنا فلاح جميل قاسم العبادي

رسالة ماجستير
علوم الكيمياء/ الكيمياء الحياتية

إشراف
الأُستاذ المساعد الدكتورة ليلى عبد الله مصطفى

1444 هـ 2023 م

الخلاصة

شملت الدراسة جزأين، الأول:

تقدير تركيز حامض اليوريك وقياس فعاليَّة إنزيم الزانثين أُوكسيديز في مصل دم المرضى المصابين بارتفاع حامض اليوريك وعلاقتهما ببعض المتغيرات الكيموحيوية المقاسة الَّتي تضمنت الفوسفاتيز القاعدي وحامض السياليك والمالونداياالديهايد والكلوتاثايون وفيتامينات كل من D_3، C، E والألَّبومين واليوريا والكرياتنين والكالسيوم والفسفور.

جمعت 96 عينة دم من الذكور والإناث بنسبة (1:1) 48 منهم كانت لأشخاص اصحاء ظاهرياً و48 منهم كانت لمرضى مصابين بارتفاع حامض اليوريك في الدم وكانت أعمارهم من (25 -80) سنة في المُدَّة الزمنية من شهر أيلول لغاية كانون الأَوَّل لسنة 2021 بعد تشخيصهم من أطباء متخصصين في مستشفى السلام التعليمي وقسم من المختبرات الأَهليَّة في مدينة الموصل.

أظهرت النتائج ارتفاعاً معنوياً في مستوى كل من حامض اليوريك، فعاليَّة إنزيم الزانثين أُوكسيديز وحامض السياليك والمالونداياالديهايد واليوريا والكرياتنين وفيتامين C والفسفور، بينما أظهرت انخفاضاً معنوياً في مستوى كل من الكلوتاثايون وفيتامين D_3 وفيتامين E، في حين لم يظهر أي فرق معنوي في بقية المتغيرات.

دُرِست علاقة حامض اليوريك مع المتغيرات الكيموحيوية المقاسة في مصل دم المرضى المصابين بارتفاع حامض اليوريك إذ تُبيِّن وجود علاقة طردية معنوية بين تركيز حامض اليوريك وفعاليَّة إنزيم الزانثين أُوكسيديز ومستوى كل من حامض السياليك والمالونداياالديهايد. كذلك دُرِست العلاقة بين فعاليَّة إنزيم الزانثين أُوكسيديز والمتغيرات الكيموحيوية الأُخرى وتُبيِّن وجود علاقة طردية معنوية بين فعاليَّة الإنزيم ومستوى كل من حامض اليوريك والمالونداياالديهايد والفسفور.

فضلاً عن ذلك دُرِس تأثير الجنس على المتغيرات المقاسة في مصل دم المرضى المصابين بارتفاع حامض اليوريك إذ تُبيِّن وجود ارتفاع معنوي في كل من فعاليَّة إنزيم الزانثين أُوكسيديز ومستوى المالونداياالديهايد والكرياتنين في مصل دم المرضى الذكور مقارنة بالإناث، بينما ظهر انخفاضًا معنوياً في تركيز فيتامين D_3 مصل دم المرضى الذكور مقارنة بالإناث.

شمل الجزء الثاني من الدراسة:

عزل وتنقية جزئية لإنزيم الزانثين أُوكسيديز من مصل دم المرضى المصابين بارتفاع حامض اليوريك باستخدام مختلف التقنيات الحياتية والمتضمنة الترسيب بكبريتات الأمونيوم، الديلزة، الترشيح الهلامي باستخدام السيفادكس نوع (G-200) للراسب البروتيني فظهرت حزمة بروتينية واحدة وقدر الوزن الجزيئي باستخدام الترشيح الهلامي والهجرة الكهربائية وكان بحدود (218) دالتون و (221) دالتون على التوالي.

أخيراً حددت الظروف المثلى لإنزيم الزانثين أُوكسيديز المنقى جزئيًا من مصل دم المرضى وكانت الفعاليَّة القصوى باستخدام (150) مايكروغرام من مسحوق الإنزيم وبأس هيدروجيني (8.2) وزمن تفاعل خمس دقائق وبدرجة حرارة (40) درجة مئوية وبتركيز (0.3) ملي مولاري من الزانثين كمادة أساس، وباستخدام رسم لاين ويفر برك كانت السرعة القصوى(V_{max}) وقيمة ثابت مكيلس منتن(K_m) (41.6) وحدة/لتر و (0.0952) ملي مولاري على التوالي.

Summary

The study included two parts, the first:

Estimating uric acid concentration and measuring the activity of xanthine oxidase in blood serum of patients with hyperuricemia and their relationship to some measured biochemical variables, which included (alkaline phosphatase, sialic acid, malondialdehyde, glutathione, vitamins D_3, C, E, albumin, urea, creatinine, calcium and phosphorus).

Ninety sex blood samples were collected from males and females at a ratio of (1:1), 48 of them were as a control group and 48 of them were for patients with hyperuricemia, their ages were (25 years and over) in the time period from September to December 2021 after their diagnosis by specialized doctors at Al-Salam Teaching Hospital and from some private laboratories Mosul city.

The results showed a significant increase in the level of each of uric acid, the activity of the enzyme xanthine oxidase, sialic acid, malondialdehyde, urea, creatinine, vitamin C, and phosphorus, while it showed a significant decrease in the level of each of glutathione, vitamin D_3, vitamin E, while no significant difference was shown in the level of albumin, phosphorus, and activity of alkaline phosphatase.

The relationship of uric acid with the biochemical variables measured in the blood serum of patients with hyperuricemia was studied, as it was found that there was a direct significant relationship between the concentration of uric acid, activity of xanthine oxidase, and the level of both sialic acid and malondialdehyde. The relationship between the activity of the enzyme xanthine oxidase and other biochemical variables was also studied, and it was found that there was a direct

significant relationship between the activity of the enzyme and the level of uric acid, malondialdehyde and phosphorous.

In addition, the effect of gender on the variables measured in serum of patients with hyperuricemia was studied, as it was found that there was a significant increase in each of activity of xanthine oxidase and level of malondialdehyde and creatinine in serum of male patients compared to females, while a significant decrease appeared in the concentration of vitamin D_3 in serum male patients compared to females.

The second part of the study included:

Isolation and partial purification of xanthine oxidase from serum of patients with hyperuricemia using various biotechnology including ammonium sulfate precipitation, dialysis, gel filtration using Sephadex type (G-200) for the protein precipitate, one protein band, the molecular weight was estimated approximately using gel filtration chromatography and the electrophoresis techniques and it was in the range of (218977) Daltons and (221513) Daltons, respectively.

Finally, the optimal conditions for the partially purified xanthine oxidase enzyme were determined from the patients' blood serum, and the maximum activity was determined by using (150 μg) of the enzyme, with a pH = 8.2, and a reaction time of five minutes, at a temperature of 40 degrees Celsius, and a concentration of (0.35) mM of xanthine as a substrate. Moreover, by using Line weaver-Burk plot, the maximum velocity (V_{max}) and Michaelis-Menton constant ($K_{m)}$ were (41.6) U/L and (0.0952) mM, respectively.

The Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
and Scientific Research
University of Mosul / College of Science
Department of Chemistry

Partial purification of xanthine oxidase and its relationship to some biochemical variables in the blood serum of patients with hyperuricemia in Mosul city

Rana Falah Jameel Qasim Al-Obady

M.Sc. Thesis
Chemistry Science / Biochemistry

Supervised by
Assistant Professor Dr. Layla Abdullah Mustafa

1444 A.H **2023 A.D**