دراسة تاثير بعض الاوكسيمات *(Acetone oxime , a-Benzoin oxime)* على فعالية انزيم *(AChE)* المثبط بواسطة البايرازولات وقواعد شيف الجديدة[+]

Studying the Effect of Some Oximes (Acetone oxime , a-Benzoin oxime) on the Activity of (AChE) Enzyme Inhibited by Some New Pyrazoles and Schiff's Bases.

بلقيــز وليد خــماس الاعظمي * رضا ابراهيم البياتي ** وفاء فاضل الطائي ***

المستخلص

تم في هذا البحث دراسة تأثير نوعين من الاوكسيمات هما اوكسيم الاسيتون واوكسيم الفا-بنزوين على فعالية أنزيم الكولين استريز المثبط بواسطة عدد من البايرازولينات وقواعد شيف المختلفة. أظهــرت النتائج أن الاوكسيمات المستخدمة لا تسبب إعادة تنشيط الأنزيم المثبط بمشتقات البايرازول بينما تــسبب إعادة التنشيط لفعالية لأنزيم المثبط نفسه بمشتقات قواعد شيف وذلك من خلال ملاحظة زيــادة الفعاليــة الأنزيمية للأنزيم المثبط بزيادة تركيز الاوكسيم وهذا الاختلاف في كلا الحالتين ربما يعود إلى الاختلاف في تراكيب المركبات المستخدمة.

Abstract

The effect of two types of oximes(Acetone oxime and α–Benzoin oxime) on the activity of the inhibited enzyme Acetyl Colinesterase by many Pyrazoles and Schiff bases was studied. Results show that various oximes couldn't activate the inhibited enzyme by pyrazoles, while they reactivated the inhibited enzymes by Schiff bases through increasing their activity with increasing the oxime concentration which may be due to the differences in structures of intended compounds.

المقدمــة

تشمل أنزيمات الكولين أستريز ("ChE" Cholinesterase) مجموعتين من الأنزيمات تختلف قليلاً عن بعضهما [1] فالمجموعة الأولى هي الإنزيمات المحللة للأستيل كولين:

[+] تاريخ استلام البحث ٢٠٠٤/٢/١٨ تاريخ قبول النشر ٢٠٠٤/١٠/٢

* كلية التربية الثانية/جامعة بغداد/بغداد -العــراق

** كلية العلوم/الجامعة المستنصرية/بغداد -العراق

*** كلية التربية الثانية/جامعة بغداد/بغداد -العراق

(Acetyl Choline acetyl hydrolase) وتسمى أيضاً بأستيل كولين أستريز (Acetyl Cholinesterase) ورقم التصنيف هو (E.C. 3.1.1.7).

والمجموعة الثانية هي الإنزيمات المحللة للأستيل كولين:

(Acetyl Choline acyl hydrolases) وتسمى أيضاً بيوتريل كولين أستريز (Butryl cholinesterase) أو الكولين أستريز الكاذب (Pseudo cholinesterase) (QChE) ورقم التصنيف (EC. 3.1.1.8).

هناك معلومات قليلة متوفرة عن مكان تخليق أنزيم (AChE) في الخلية فقد يُخلّق في الأنسجة العصبية قريباً من الشبكة الاندوبلازمية [2] ويُنقل إلى سطوح أغشية الخلايا حيث يقوم بعمله الفسيولوجي. أما الدراسات التي اعتمدت النظائر المشعة فتشير إلى أن تخليق الأنزيم في خلايا العضلات ثم يُنقل إلى غشاء البلازما [3] .

وتعد أنزيمات (AChE) ذات دور فسيولوجي فعال، فهي ذات دور أساسي في عمليات نقل الإشارات الحسية بين الأعصاب والعقد العصبية والعضلات، ونقل هذه الإشارات بين الوحدات العصبية المختلفة في الجهاز العصبي [4]. وكذلك في تنظيم نفاذية الأغشية البلازمية [5] ويعتقد أن أثر الأنزيم (AChE) حُدد في نقاط التقاء الأعصاب بالعضلات وفي الشبكة العصبية الحاوية على الألياف العصبية التي تُحدث تأثيراً مشابهاً لمفعول (Acch) وذلك بتحفيزه تحلل (Acch)المتجمع في ملتقى اقتران الأعصاب وبذلك يسهل انتقال الحافز. وكذلك اشارت الأبحاث إلى الأهمية الدوائية لهذه الانزيمات إذ أنها تعد من الأنزيمات المسؤولة عن تحلل مخدرات الأعصاب والعضلات ذات الطبيعة الاسترية، وكذلك المركبات المستخدمة في التخدير الموضعي مثل السكسنيل كولين (Succinyl choline).

هناك عدة مركبات لها القابلية على الارتباط بالموقع الفعال او في موقع آخر يحجب ارتباط مجموعة وظيفية في الموقع الفعال مما يؤدي الى فقدان فعالية الانزيم ، امثال هذه المركبات مركبات الفوسفور العضوية ذات التاثير التثبيطي الكبير لأنزيمات الكولين استريز بنوعيه(BuChE , AChE) ومعظم هذه المركبات تستخدم كأدوية وكمبيدات زراعية [6] ومن ثم استغلالها لتدخل ضمن تركيب الاسلحة الكيمياوية كمركبات عالية السمية وسميت بغازات الاعصاب.

ومن هنا تحدد اهمية وجود الانزيم في مصل الدم بشكل ذائب بامكانية استخدامه كتشخيص حالات التسمم التي يتعرض لها الكائن الحي بمختلف مثبطات الانزيم واهمها المبيدات الحشرية للمركبات الفوسفاتية والكاربيمات [6] يتمثل تاثير المثبط على انزيز (AchE) في خطوتين:

$$EH + Ix \underset{K_1}{\overset{K}{\rightleftharpoons}} EH.Ix \longrightarrow EI + Hx \xrightarrow[H_2O]{K_2} EH + IOH$$

إذ يشير الـ EH الى الانزيم والـ Ix الى المثبط ليكونا معقد هو (EH.IX) (Enzyme-Inhibitor).

وهنا ركز الباحثون اهتمامهم على البحث عن مركبات اخرى للحد من هذا التثبيط وباتجاهين ، الاول ايجاد مركبات ذات نيوكليوفيليه قوية للمساعدة على سحب المجموعة التي سببت التثبيط والاتجاه الثاني

ايجاد مركبات تحد من التاثير السلبي لتراكم الناقل العصبي (Ach) والتي تؤدي عـادة الـى الوفـاة. ومـن المركبات التي اثبتت فعاليتها لتحرير الانزيم من المثبط وبالتالي الحد من تراكم الناقل العصبي هي الأتـروبين (Atropine) ومركبـات الاوكـسيم (Oximes) المختلفـة مثـل المركـب Pyridine-2-aldoxime methiodide (2-PAM) يستخدم لاعادة تنشيط انزيمات الـChE ويتميز بان له القابلية على اعادة التنشيط بعد التسمم الذي يحدث بواسطة المواد المثبطة بعد فترة زمنية تتراوح بين ٢-٣ ساعات بعد تناوله عن طريق الفم [7].

الجزء العملي

تقدير الفعالية الانزيمية

تم الحصول على نماذج مصل دم الانسان (Serum) من المتطوعين بمساعدة المركز الوطني لنقل الدم في بغداد بعد تثبيت المعلومات حول العمر والجنس والحالة الصحية للمتطوع مع ابعاد النماذج الحاويـة على الهيموكلوبين.

المحاليل المستخدمة

١- **المحلول المنظم (*Buffer phosphate*)**

تم تحضير المحلول المـنظم (phosphate buffer, pH =7.3, 0.2M) وذلـك بإذابـة 2.84gm مـن (Na_2HPO_4 M.w=141.69) في ١٠٠مل من الماء المقطر ثم عُدل الـ pH بإضافة بضع قطرات من حامض الهيدروكلوريك HCl وتم استخدامه مباشرة.

٢- **الكاشف (DTNB) *Ellman's reagent***

تم تحضير الكاشف (0.001M) 5,5`–Dithiobis–2–nitrobenzoic acid وذلك بإذابة 0.01gm مـن الـ DTNB (M.W = 396.36) في ٢٥ مل من الماء المقطر مع التحريك المستمر ثم حفظ في الثلاجة في قنينة معتمة لأنه مادة حساسة للضوء. ويتم تحضير هذا المحلول مرتان في الأسبوع [8].

٣- **محلول المادة الأساس (*S- Acetyl thiocholine iodide*)**

تـم الحـصول علـى محلـول المـادة الأسـاس وذلـك بإذابـة 0.01735gm مـن (AcSchI M.W= 289.18) فـي ١ مل من الماء المقطر. إن هذا المحلول يتم تحضيره يومياً ويتم استخدامه مباشرة [8].

طريـقة الـعمل

يتم تعيين فعالية أنزيم الكولين أستريز في مصل دم الإنسان (Serum) باسـتخدام طريقـة WHO المحورة [9] وكالآتي :

١- وضع حجم ٢,٢٥٠ مل من المحلول المنظم (pH=7.3) في أنبوبة اختبار وإضافة 50µl من المحلول الكاشف DTNB و 10µl من مصل الدم. مُزجت المكونات باستخدام جهاز المزج (Mixer).

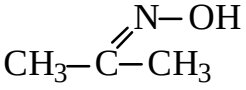
٢- تم سحب ٢مل من المزيج في (١) ووضعه في خلية القياس (3ml) ثم أضيف (34µl) من المادة الأساس (AcSchI) ثم قراءة مقدار التغير في شدة الامتصاص للأنزيم قبل وبعد إضافة المادة الأساس على طول موجي (412nm) لكل ثلاث دقائق من تفاعل الأنزيم والمادة الأساس.

تم التعبير عن فعالية الأنزيم على أساس تحلل µ mol من المادة الأساس لكل مللتر خلال ثلاثة دقائق µ mol/ml/3min .

<u>تأثير بعض مركبات الاوكسيم على فعالية انزيم الكولين استريز المثبط في مصل دم الانسان</u>

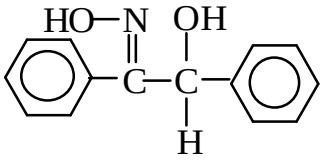
تم اختيار نوعين من مركبات الأوكسيم لاختبار تأثيرها على أنزيم الكولين أستريز المثبط ببعض المركبات العضوية المدروسة وهي :

1- Acetone oxime



M.wt =73.0 gm / mol.

2- a- **Benzoin oxime**



M.wt=227.75 gm / mol.

تمت إذابة مركبات الأوكسيم باستخدام المحلول المنظم

(phosphate Buffer Solution 0.2M , pH=7.٣)

وحضر محلول قياسي من مركبات الأوكسيم وبتركيز (0.1M) ومن ثم حضرت التراكيز التالية :

(0.5, 1, 2, 3, 4, 5) x 10^{-3}M

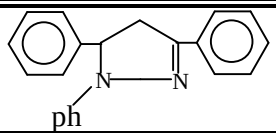
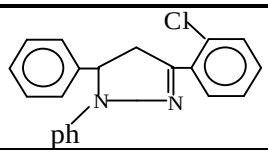
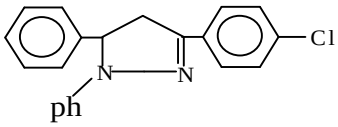
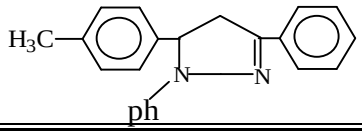
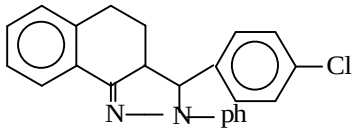
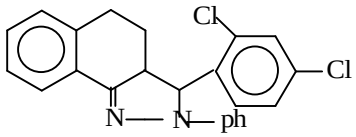
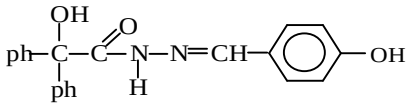
اما المشتقات التي تم اختيارها لدراسة تأثير الاوكسيم على فعالية انزيم الـ ChE في مصل دم الانسان المثبط بها فهي :

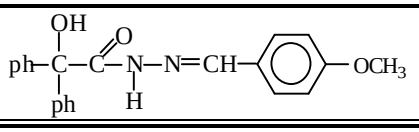
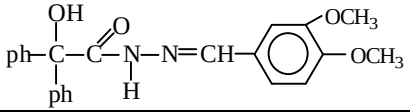
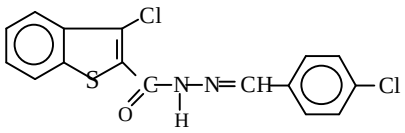
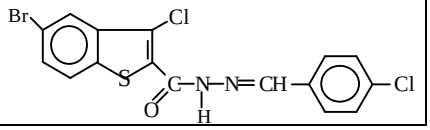
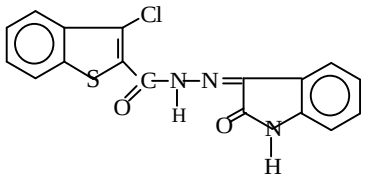
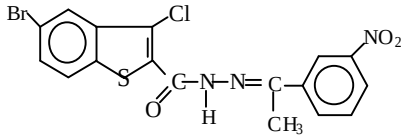
1, 3,5–Triphenyl pyrazoline

2-Phenyl–3–(4`–chloro phenyl)3,3a,4,5–tetra hydrobenzo [5,6]– hexacyclic (1,2–C) pyrazoline N–4–Hydroxy benzylidene benzilyl hydrazone

3–Chloro –2– [N-Isatinal hydrazinyl] benzo [b] thiophene]

تمت إذابة جميع المشتقات المدروسة في المذيب Dimethyl Sulphoxide (DMSO) (ليس لـــه أي تأثير على فعالية الانزيم [10]). وتم عمل محلول قياسي مرة لكل مشتق فاختير التركيز M 10^{-3} ×٤,٥ للمشتقات المذكورة اعلاه وتم تعيين فعالية الانزيم قبل اضافة المادة المثبطة باستخدام طريقة تعيـــين فعاليـــة الانزيم المذكورة سابقاً وبعد ذلك تم تعيين فعالية الانزيم بوجود المادة المثبطة والاوكسيم على التوالي بمـــزج ٢٥% مل من المحلول المنظم و ٠,٧٥ مل من محلول الاوكسيم ثم عينت الفعالية للانزيم والموضـــحة فـــي الجدول التالي:

تسلسل المشتقات	التركيب الكيمياوي	أسم المركب	درجة الانصهار ^{o}C	نسبة التثبيط
1		1,3,5–Triphenyl pyrazoline	(134-132)^{o}C (132-130)[153]	54.59%
2		1,5–Diphenyl–3–(2´– chloro phenyl) pyrazoline	(122-120)^{o}C	62.32%
3		1,5–Diphenyl–3– (4´– chloro phenyl) pyrazoline	(127-125)^{o}C (129-125)[153]	54.93%
4		1,3–Diphenyl –5– (4´– methyl phenyl) pyrazoline	(157-155)^{o}C	78.63%
تسلسل المشتقات	التركيب الكيمياوي	أسم المركب	درجة الانصهار ^{o}C	نسبة التثبيط
5		2-Phenyl–3–(4´–chloro phenyl) 3,3a,4,5–tetra hydrobenzo [5,6] hexacyclic (1,2–C) pyrazoline	(160-158)^{o}C (156-155)[154]	77.99%
6		2–Phenyl–3– (2´,4´–di chloro phenyl) 3,3a,4,5–tetra hydrobenzo [5,6] hexacyclic (1,2–C) pyrazoline	(130-128)^{o}C	61.62%
7		N–4– Hydroxy benzylidene benzilyl hydrazone	(255-253)^{o}C	63.18%

8		N-4- Methoxy benzylidene benzilyl hydrazone	(206-205)^{o}C	53.87%
9		N–3,4–Dimethoxy benzylidene benzilyl hydrazone	(177-175)^{o}C	87.16%
10		3–Chloro–2–[N–4´– chloro benzylidene hydrazinyl] benzo [b] thiophene	(231-229)^{o}C	44.79%
11		3–Chloro–5– bromo–2– [N-4´- chloro benzylidene hydrazinyl] benzo [b] thiophene	(225-222)^{o}C	(86.17 %
12		3–Chloro –2– [N– Isatinal hydrazinyl] benzo [b] thiophene	(249-247) ^{o}C	74.05%
13		3–Chloro –5– bromo –2– [α–methyl –N–3– nitro benzylidene hydrazinyl] benzo [b] thiophene	(236-234) ^{o}C	39.44%

النتائج والمناقشة

في هذا البحث تمت دراسة تأثير نوعين من مركبات الاوكسيم على انزيم (ChE) فـــي مـــصل دم الانسان (serum) وهي Acetone oxime وα-Benzoin oxime.

تم استخدام تراكيز ثابتة من المواد الكيميائية المدروسة المثبطة بينما تم استخدام تراكيز متغيرة مـــن مركبات الاوكسيم وكانت$M^{-3}10 \times$(0.5-5) وقد لوحظ ان كلاً من مركبي الاوكسيم لا يسببان اعادة تنـــشيط الانزيم المثبط بمشتقات البايرازول بل تبقى قيمة الفعالية الانزيمية المثبطة على ما هي من دون تغيير (ثايتـــة تقريباً) وربما يعود السبب الى الاعاقة الفراغية التي تحدث حول ذرة نتروجين حلقة البايرازول ممـــا يعيـــق ارتباط مجموعة الهيدروكسيل التالي للأوكسيم ومن ثم تحرير الانزيم من المثبط وكما هو ملاحظ في الجداول (4-1).

جدول (1):يوضح تاثيراضافة المركب Acetone oximeعلى فعالية انزيم الكولين استريز

باستخدام $M^{-3}10 \times ٤,٥$ من المشتق رقم (١) كمثبط

Inhibitor Conc. M	***Enzyme Activity m mol./ml/3min.***	***% Inhibition***	***% Recovery***

Nil	**5.770 ± 0.49**	**0.0**	**100**
	2.630 ± 0.22	**54.42**	**45.58**
0.5	**2.638 ± 0.22**	**54.29**	**45.71**
1	**2.635 ± 0.22**	**54.34**	**45.66**
2	**2.637 ± 0.22**	**54.30**	**45.70**
3	**2.638 ± 0.22**	**54.29**	**45.71**
4	**2.636± 0.22**	**54.32**	**45.68**
5	**2.637 ± 0.22**	**54.30**	**45.70**

جدول (2) : يوضح تاثيراضافة المركب α-Benzoin oxime على فعالية انزيم الكولين استريز باستخدام $4,5 \times 10^{-3}$ M من المشتق رقم (١) كمثبط

Inhibitor Conc. M	*Enzyme Activity* m *mol./ml/3min.*	*% Inhibition*	*% Recovery*
Nil	**5.108 ± 0.12**	**0.0**	**100**
	2.334 ± 0.12	**54.31**	**45.69**
0.5	**2.330 ± 0.12**	**54.39**	**45.61**
1	**2.344 ± 0.12**	**54.12**	**45.88**
2	**2.342 ± 0.12**	**54.16**	**45.84**
3	**2.339 ± 0.12**	**54.21**	**45.79**
4	**2.341± 0.12**	**54.17**	**45.83**
5	**2.340 ± 0.12**	**54.19**	**45.81**

جدول (٣): يوضح تاثيراضافة المركب Acetone oximeعلى فعالية انزيم الكولين استريز باستخدام $4,5 \times 10^{-3}$ M من المشتق رقم (٦) كمثبط

Inhibitor Conc. M	*Enzyme Activity* m *mol./ml/3min.*	*% Inhibition*	*% Recovery*
Nil	**5.258 ± 0.2**	**0.0**	**100**
	2.017 ± 0.07	**61.63**	**38.36**
0.5	**2.021 ± 0.07**	**61.63**	**38.36**

1	**2.021 ± 0.07**	**61.56**	**38.43**
2	**2.020 ± 0.07**	**61.58**	**38.41**
3	**2.018 ± 0.07**	**61.62**	**38.37**
4	**2.020± 0.07**	**61.58**	**38.41**
5	**2.018 ± 0.07**	**61.62**	**38.37**

جدول (4): يوضح تاثيراضافة المركب α-Benzoin oxime على فعالية انزيم الكولين استريز باستخدام $4,5 \times 10^{-3}$ M من المشتق رقم (٦) كمثبط

Inhibitor Conc. M	*Enzyme Activity m mol./ml/3min.*	*% Inhibition*	*% Recovery*
Nil	**5.١٧٥ ± 0.٣٤**	**0.0**	**100**
	1.987 ± 0.13	**61.61**	**38.39**
0.5	**1.987 ± 0.13**	**61.61**	**38.39**
1	**1.987 ± 0.13**	**61.61**	**38.39**
2	**1.989 ± 0.13**	**61.57**	**38.43**
3	**1.986 ± 0.13**	**61.63**	**38.37**
4	**1.987± 0.13**	**61.61**	**38.39**
5	**1.989 ± 0.13**	**61.57**	**38.43**

اما تأثير مركبي الاوكسيم علىفعالية انزيم الكولين استريز المثبط بمشتقات قواعد شيف فقد لـــوحظ انهما يسببان اعادة تنشيط الانزيم وذلك من خلال ملاحظة زيادة الفعالية الانزيمية للانزيم المثبط بزيادة تركيز الاوكسيم وهذا موضح في الجداول (٥-٨):

جدول (5) : يوضح تاثيراضافة المركب α-Benzoin oxime على فعالية انزيم الكولين استريز باستخدام $4,5 \times 10^{-3}$ M من المشتق رقم (٧) كمثبط

Inhibitor Conc. M	*Enzyme Activity mmol./ml/3min.*	*% Inhibition*	*% Recovery*
Nil	**6.08 ± 0.11**	**0.0**	**100**
	2.33 ± 0.15	**61.67**	**38.32**
0.5	**2.46 ± 0.14**	**59.54**	**40.46**

1	**2.77 ± 0.15**	**54.44**	**45.55**
2	**2.95 ± 0.16**	**51.48**	**48.51**
3	**3.03 ± 0.18**	**50.16**	**49.83**
4	**3.31± 0.16**	**45.56**	**54.44**
5	**3.54 ± 0.16**	**41.77**	**58.22**

جدول (٦): يوضح تاثيراضافة المركب Acetone oximeعلى فعالية انزيم الكولين استريز
باستخدام $٤,٥ \times 10^{-٣}$ M من المشتق رقم (٧) كمثبط

Inhibitor Conc. M	***Enzyme Activity*** *m* ***mol./ml/3min.***	***% Inhibition***	***% Recovery***
Nil	**5.40 ± 0.48**	**0.0**	**100**
	2.12 ± 0.19	**60.75**	**39.25**
0.5	**2.29 ± 0.21**	**57.59**	**42.41**
1	**2.44± 0.22**	**54.75**	**45.25**
2	**2.72 ± 0.23**	**49.56**	**50.44**
3	**2.97 ± 0.26**	**44.87**	**55.12**
4	**3.05± 0.27**	**43.40**	**56.60**
5	**3.20± 0.30**	**40.75**	**59.25**

جدول (٧) : يوضح تاثيراضافة المركب α-Benzoin oxime على فعالية انزيم الكولين استريز
باستخدام $٤,٥ \times 10^{-٣}$ M من المشتق رقم (١٢) كمثبط.

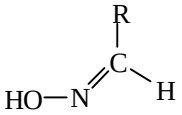
Inhibitor Conc. M	***Enzyme Activity*** *m****mol./ml/3min.***	***% Inhibition***	***% Recovery***
Nil	**5.38 ± 0.46**	**0.0**	**100**
	1.44 ± 0.12	**73.24**	**26.76**
0.5	**1.93 ± 0.16**	**64.07**	**35.93**
1	**2.25 ± 0.19**	**58.18**	**41.82**
2	**2.47 ± 0.21**	**54.09**	**45.91**
3	**3.0١ ± 0.٢٦**	**44.06**	**55.94**
4	**3.٤٩± 0.٣٠**	**35.14**	**64.86**

5	**3.٨١± 0.٣٣**	**29.19**	**70.81**

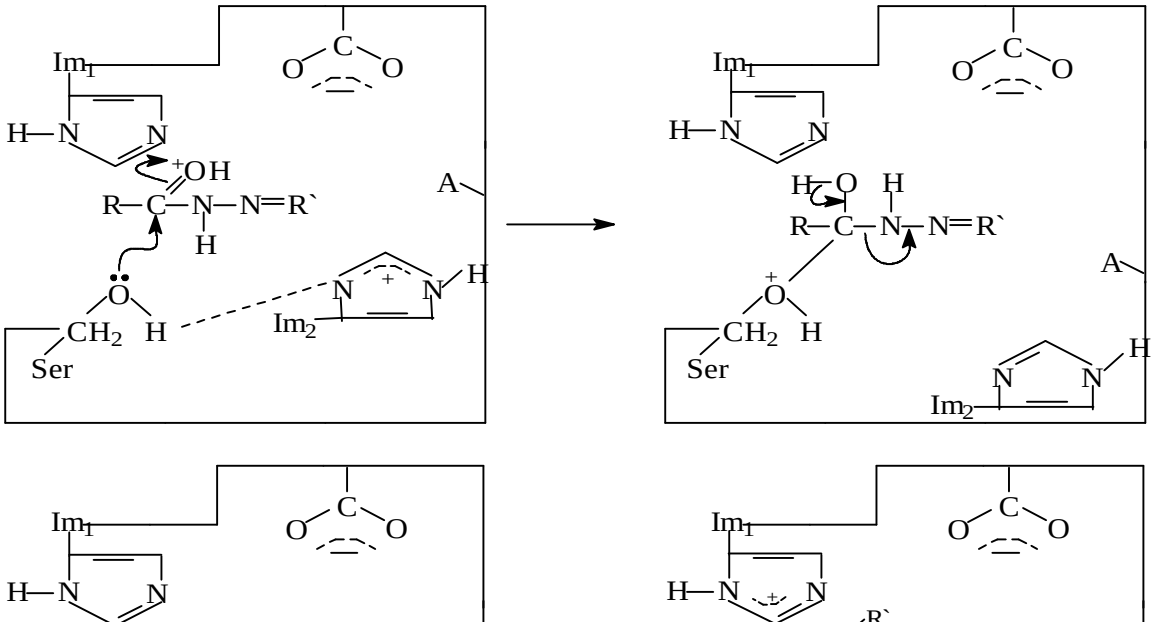
جدول (٨): يوضح تاثير اضافة المركب Acetoneoximeعلى فعالية انزيم الكولين استريز
باستخدام M ٣-10 ×٤,٥ من المشتق رقم (١٢) كمثبط

Inhibitor Conc. M	***Enzyme Activity m mol./ml/3min.***	***% Inhibition***	***% Recovery***
Nil	**5.73 ± 0.46**	**0.0**	**100**
	1.59 ± 0.12	**72.26**	**27.74**
0.5	**2.12 ± 0.17**	**63.01**	**36.99**
1	**2.57 ± 0.20**	**55.15**	**44.85**
2	**2.80 ± 0.21**	**51.14**	**48.86**
3	**3.38 ± 0.27**	**41.02**	**58.98**
4	**3.٨٤± 0.٣٣**	**32.99**	**67.01**
5	**3.٩٥± 0.٣٢**	**31.07**	**58.93**

ان قابلية مركبات الاوكسيم في اعادة تنشيط انزيم الـ(ChE) في مصل دم الانسان ربما تعود الى التفاعل ما بين مركب الاوكسيم والمادة المثبطة بشكل يمنع المركبات المثبطة من ان تحدث أي تعطيل في ميكانيكية تحلل انزيم الـ(ChE). ويمكن توضيح ذلك : بأن تركيب مشتقات قواعد شيف مشابهة الى تركيب استر الكولين والتي تحتوي على مجموعة كاربونيل ، تقوم مجموعة الهيدروكسيل في مركبات الاوكسيم بالهجوم على مجموعة



الكاربونيل (C=O) لمشتقات قواعد شيف بدلاً من هجوم الهيدروكسيل لحامض السيرين ويمكن توضيح ذلك حسب المخطط المقترح التالي:



المخطط المقترح

References

1- Alles, G.A., Hawes, R.C.; J. Biol. Chem., Vol.133, 375, 1940.
2- Koenig, E., Koelle, G.B.; J. Neurochen, Vol. 8, 169, 1961.
3- Rolundo, R.I., Fambrough, D.M. Cell, Vol. 22, 583, 1980.
4- Silver, A.; Int. Rev. Neurobiol-, Vol.10, 57, 1967.
5- Nachmannsohn, D.; J. Gen. Physiol , Vol. 54,1875, 1969.
6- Ballantyn, B., Marrs, T.C., *Clinical and Experimental Toxicology of Organophosphate and Carbamates* , Butter Worth-Heinemaann, Oxford, pp.251-282, 1992.
7- Doerge, R.F., Wilson and Gisvold's, *Text Book of Organic Medional and Pharmaceutical Chemistry,* 8th ed.; J.B. Lippincott Company, London , pp433-467, 1982.
8- AL-Rawi, I.A., Hebeeb, R.M., and Rabbfat, H.R., Bulletin of Health Research Vol. 28, pp.73, 1987.
9- Vandekar, M., WHO/VBS Vol. 78, 692, 1978.
10- Jaffer, H.J., Mohad, M.J. and Al-Azzawi, M.J., J. Biol. Sci. Res., Vol.19, 793 1988.