الارتقاء بالبحوث العلمية طريقنا لخدمة المجتمع

تحضير بعض قواعد شف المشتقة من الأدوية الامينية ودراسة تأثيرها على فعالية أنزيمLDH

زينب هاشم محمد[1] ، أياد سعدي حميد[2] ، فراح غالي الصالحي[3]

[1]قسم الكيمياء التطبيقية ، كلية العلوم التطبيقية ، جامعة سامراء ، سامراء ، العراق

[2]قسم الكيمياء ، كلية العلوم ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

[3]قسم الكيمياء ، كلية التربية للبنات ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

معلومات البحث

الكلمات المفتاحية:

الاسم: زينب هاشم محمد

البريد الاليكتروني:

رقم الهاتف:

الملخص

تم تحضير وتشخيص وتقييم الفعالية الانزيمية لبعض قواعد شف المشتقة من الادوية الامينية فقد حضرت قواعد شف (1–12) مركب وبنسبة منتوج جيدة عن طريق تفاعل التكاثف لبعض الادوية الفعالة بايولوجيا وهي(الامبسلين، الاسبارتام ،السيفالكسين) مع اربعة الديهايدات اروماتية وهي(4–N،N– ثنائي مثيل بنزالديهايد، 4–ميثوكسي–3–هيدروكسي بنزالديهايد و 3– نايتروبنزلديهايد و بنزالديهايد) على التوالي ومن خلال طيف (IR, H^1-NMR) تم اقتراح الصيغة التركيبية للمركبات المحضرة. اما في الدراسة الانزيمية فقد تم فصل وتنقية متناظرات انزيم LDH من امصال دم الاشخاص الاصحاء باستخدام تقنية الترشيح الهلامي باستخدام هلام(Sephadex G–200)وتقنية كروموتوغرافيا التبادل الايوني باستخدام المبادل الايوني (DEAE- cellulose A –50) ، وكذلك تمت دراسة حركية لمتناظرات انزيم LDH باستخدام تراكيز مختلفة من المادة الاساس (بايروفات الصوديوم) واستخراج ثابت ميكايلس منتن Km ، وتمت دراسة التأثير التثبيطي للمركب المحضر (مركب رقم 3) على المتناظرين LDH1 و LDH2 حيث تبين انه يسبب تثبيطا لاتنافسيا.

المقدمة

تعد قواعد شف مركبات عضوية مهمة تحتوي على مجموعة وظيفية تكون عبارة عن رابطة ثنائية بين النتروجين والكاربون تسمى (azomethine group)[1] وهي من المركبات الوسطية المهمة في تحضير بعض المركبات الفعالة بايولوجيا[2] واستعملت كمضادات للبكتريا[3] والفطريات[4] والسرطان[5] وتعزى الفعالية البايولوجية لهذه المركبات الى تكوين كليتات مستقرة مع الايونات الفلزية الموجودة في الخلية وان وجود مجموعة الآزوميثين في هذه الجزيئات يكون عاملا فعالا وملائما لتكوين معقدات مستقرة مع الايونات الفلزية[6] لذلك تم تحضير عدد كبير من قواعد شف وجرى دراسة فعاليتها البيولوجية [7].

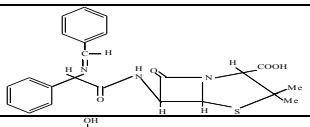
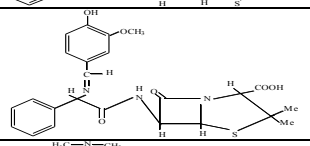
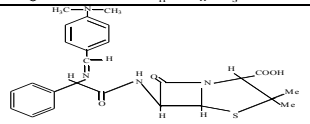
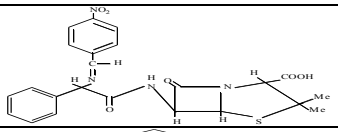
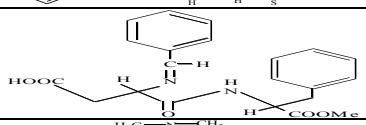
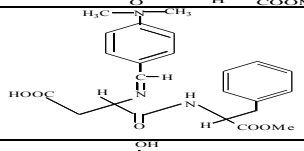
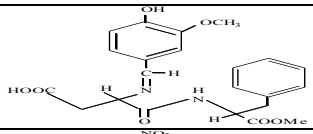
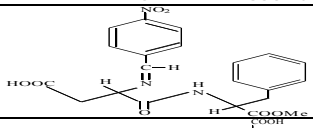
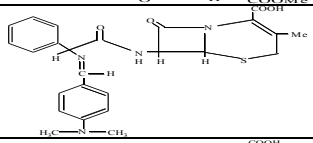
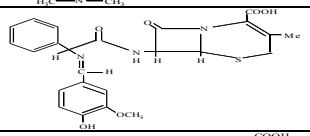
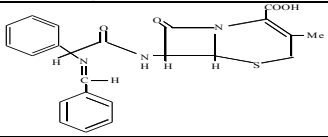
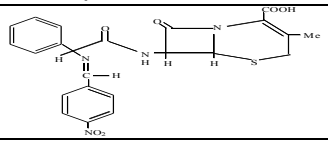
يعرف الاسم الشائع للانزيم المؤكسد لحامض اللاكتيك (E.C.1.1.1.27) بأنزيم نزع هيدروجين اللاكتيت وينتمي الى مجموعة أنزيمات الاكسدة والاختزال ويعمل في مسارات تحلل الكلوكوز اللاهوائية وفي مسارات تخليق الكلوكوز[8] ويوجد في العديد من الكائنات الحية النباتية منها والحيوانية [9] اما في الانسان فيلاحظ نشاطه في جميع خلايا وانسجة الجسم ، تحتوي الأنسجة على خمس متناظرات لأنزيم LDH ، ففي العضلة القلبية وكريات الدم الحمراء يكون LDH1، بينما في كريات الدم البيضاء يكون LDH2 ، في حين تحتوي الرئة على المتناظر LDH3 ويظهر المتناظر LDH4 في البنكرياس والكلية والمشيمة، وأما المتناظر LDH5 الذي يكون بطئ الحركة فيتواجد في العضلات الهيكلية والكبد[10]. ان التركيز النسبي للمتناظرات في مصل الدم الطبيعي يترتب ترتيبا تنازليا من LDH5 الى LDH1 هناك طرائق عديدة لفصل المتناظرات مثل الترحيل الكهربائي[11] وكروموتوغرافيا التبادل الايوني لقد وجد ان التراكيز العالية من المواد الاساس (البايروفيت – اللاكتيت) تسبب تثبيطا في نشاط الانزيم كما لوحظ ان الادوية الخافضة للحرارة والادوية المضادة للالتهاب تؤثر ايضا على فعالية الانزيم[12].

طرائق العمل

تحضير قواعد شف المشتقة من الادوية الامينية: يؤخذ (0,01) مول من أحد الادوية (الامبسلين $C_{16}H_{19}N_3O_4S$، الاسبارتام

$C_{16}H_{17}N_3O_4S$، السيفالكسين $C_{14}H18N_2O_5$) مع (0,01) مول من أحد الالديهايدات الاروماتية (N،N-4 -ثنائي مثيل بنزالديهايد، 4- ميثوكسي-3- هيدروكسي بنزالديهايد، 3- نايتروبنزلديهايد وبنزالديهايد) توضع المادتان في دورق دائري ويضاف اليها 25 مل من الايثانول المطلق وقطرات من حامض الخليك الثلجي كعامل محفز .يصعد المزيج لمدة 3 ساعات بعدها يوقف التصعيد ويبرد حيث يتكون راسب يرشح وتعاد بلوته بالايثانول المطلق[13] . كما موضح في الجدول (1) الذي يبين الصفات الفيزياوية للمركبات المحضرة .

جدول (1) الاسم والصيغة التركيبية والخواص الفيزيائية للمركبات المحضرة (1-12)

no.	Structure Formula	Compound name	Colour	M.P ,C°	yield
1		(6)-6- (α-phenylglycyl Benzyledine amino) Penciillanic acid	اصفر	176-178 Decomp	33
2		(6)-6- (α-Phenylglycyl -4-hydroxy-3-methoxy Benzyledine amino) Penciillanic acid	اصفر باهت	178-180 Decomp	65
3		(6)-6- (α-Phenylglycyl -4-N,N-dimethyl Benzyledine amino) Penciillanic acid	اصفر غامق	165-170 Decomp	43
4		(6)-6- (α-Phenylglycyl-4-nitro benzyledine amino) Penciillanic acid	اصفر ليموني	110-115 Decomp	54
5		(3S)-3- benzyledine Amino-^-[(α-б)-(α-ethoxy carbonyl Phenethy)] Succinamic acid	اصفر فاتح	138-140 Decomp	76
6		(3S)-3-(-4-N,N-dimethyl Benzyledine Amino - - [(α- б)-(α-methoxy carbonyl Phenethy)] Succinamic acid	اصفر فاتح	160-165 Decomp	75
7		(3S)-3- -4-hydroxy-3-methoxy Benzyledine Amino)-^-[(α-б)-(α-methoxy carbonyl Phenethy)]Succinamic acid	اصفر فاتح	158-160 Decomp	67
8		(3S)-3- (-4-nitro benzyledine Amino) -^ - [(α- б)-(α-methoxy carbonyl Phenethy)] Succinamic acid	اصفر	116-118 Decomp	74
9		3-Methyl-7-(α-D-Phenylglycyl (-4-N,N-dimethyl Benzyledine amino)-3-Cephem-4-Carboxylic acid	اصفر غامق	162-165 Decomp	32
10		3- Methyl-7-(α-D- Phenylglycyl-4-hydroxy-3-methoxy Benzyledine amino)-3- Cephem-4-Carboxylic acid	اصفر داكن	102-105	24
11		3- Methyl-7-(α-D- Phenylglycyl benzyledine amino)-3- Cephem-4-Carboxylic acid	اصفر	90-93	31
12		3- Methyl-7-(α-D- Phenylglycyl -4-nitro benzyledine amino)-3- Cephem-4-Carboxylic acid	اصفر ليموني	89-91	35

قياس نشاط انزيم LDH في أمصال الدم للأشخاص الأصحاء:

تم جمع (15) عينة للأشخاص الاصحاء من منتسبي الشركة العامة لصناعة الادوية في سامراء وطلبة كلية التربية في سامراء والتي تتراوح اعمارهم بين(20–45) سنة من الذكور والاناث ،اتبعت الطريقة الاسكندنافية في قياس نشاط انزيم LDH التي تعتمد على قياس كمية NADH المستهلكة في طول موجي (340) نانوميتر ، واس هيدروجيني (7.4) وبدرجة حرارة (37)، المحاليل المستعملة هي:

1- المحلول الدارئ يحضر باذابة (6.8) غرام من مادة Tris في 800 سم^3 من الماء المقطر ثم تثبت درجة الاس الهيدروجيني بدرجة (7.4) وذلك بمعادلة محلول الـ Tris مع (1) مول / لتر من حامض الهيدروكلوريك (HCL) مع مراعاة اكمال الحجم الى (1000) سم^3 بالماء المقطر

2- محلول Tris-NADH يحضر باذابة (6.5) ملغرام من NADH في 45 سم^3 من المحلول الدارئ Tris بتركيز (0.056) مول/ لتر . يبقى المحلول مستقرا لمدة (72) ساعة في درجة حرارة (4) م.

3- محلول بايروفات الصوديوم للتفاعل (13.5) ملي مول / لتر . يحضر باذابة (148,5) ملغرام من مادة بايروفات الصوديوم ($C_3H_3NaO_3$) في (100) سم^3 من الماء المقطر . يبقى المحلول مستقرا لمدة (20) يوما وبدرجة حرارة (4) م.

يمزج (1) سم^3 من محلول (Tris buffer) ذي الاس الهيدروجيني (7.4) مع (1) سم^3 من محلول NADH في انبوبة قياس ذات حجم (3) سم^3 يضاف (100) مايكروليتر من مصل الدم، ويمزج ثم يوضع في الحمام المائي لمدة (10) دقائق وبدرجة حرارة (37) م.

يبدأ التفاعل باضافة (200) مايكروليتر من محلول البايروفات بتركيز (13.5) ملي مول / لتر وتمزج سريعا ومن ثم تقرأ الامتصاصية (A) في طول موجي (340) نانوميتر عند كل دقيقة ولمدة (6) دقائق ، وذلك بأستعمال جهاز المطياف ، ويحسب نشاط الانزيم باستعمال المعادلة الاتية:-

$$U/L = \Delta A/min \times \frac{2300\ \mu l}{100\ \mu l} \times \frac{1}{6220} \times 10^6$$

قياس تركيز البروتين في أمصال دم الأشخاص الأصحاء : يتم قياس تركيز البروتين في مصل الدم طبقا للطريقة اللونية التي تعتمد على تكوين مركب أزرق– بنفسجي وذلك من خلال تفاعل البروتين مع ايونات النحاس القاعدية وباستعمال البيوريت مصل الدم كبروتين قياسي، المحاليل المستعملة هي: محلول A (Reagent A) يتكون من Sodium hydroxide و Potassium iodide و Copper II sulfate و Sodium potassium tartarate و المحلول القياسي (Standard)

يتم تحضير ثلاثة انابيب اختبار الاولى تحتوي على (20) مايكروليتر (blank) ،والثانية تحتوي على (20) مايكروليتر من مصل الدم، الثالثة تحتوي على (20) مايكروليتر من المحلول القياسي (Standard) . يأخذ (1) ملليلتر من المحلول A (Reagent A) ويمزج مع كل من الانابيب الثلاثة ويترك لمدة (10) دقائق في درجة حرارة الغرفة وبعدها تقاس الامتصاصية عند الطول الموجي (550) نانومتر .

$$\text{تركيز البروتين (g/dl)} = \frac{\text{Abs. (Sample)}}{\text{Abs. (Standard)}} \times \text{Standard Conc.} \quad \text{Standard Conc.} = 6\text{g /dl}$$

فصل انزيم LDH باسخدام الترشيح الهلامي:

المحلول العالق للهلام (sephadex G–200) : يحضر بإذابة (4) غرام من مسحوق الهلام في (120) سم ^{3} من المحلول الدارئ (Tris) وبتركيز (0.05) مول / لتر وبأس هيدروجيني (7.4) ويترك ذلك المحلول لمدة (24–48) ساعة وبدرجة حرارة (4) م ويبدل المحلول الدارئ عدة مرات خلال هذه الفترة .

المحلول الدارئ (Tris) (0.05) مول / لتر: يحضر باذابة (6.05) غرام من (hydroxyl methl amino ethan) Tris في (800) سم^3 من الماء المقطر، ويضبط الاس الهيدروجيني عند (7.4) بواسطة (1) مول/ لتر من حامض الهيدروكلوريك HCL مع مراعاة اكمال الحجم الى (1000) سم^3 .

يستعمل عمود زجاجي بقطر (1.5) سم وطول (50) سم ويوضع في نهاية العمود قليل من الصوف الزجاجي لمنع تسرب حبيبات الهلام خارج العمود ، يسكب المحلول العالق للهلام (sephadex G – 200) في العمود بصورة بطيئة ومتجانسة لمنع تسرب فقاعات هوائية يغسل بعد ذلك عمود الهلام بكميات كافية من المحلول الدارئ (Tris) وباس هيدروجيني (7.4) حتى يتم الحصول على سرعة تدفق (Flow rale) بمقدار (20) سم / ساعة يضاف (2) سم^3 من مصل الدم ببطء فوق سطح الهلام ويترك مصل الدم في داخل العمود لدقائق قليلة الى ان يتشرب في عمود الهلام ،تبدأ عملية الفصل باضافة المحلول الدارئ (Tris) وباس هيدروجيني (7.4) حيث يتم جمع الاجزاء الناضحة وبحجم (2) سم^3 لكل انبوبة اختبار .تقاس الفعالية وكمية البروتين لكل جزء من الاجزاء الناضحة.

تنقية متناظرات LDH باستخدام كروموتوغرافيا التبادل الايوني (تدرج الاس الهيدروجيني):

تستخدم محاليل دارئة متدرجة الاس الهيدروجيني التي تتراوح بين (7.0–8.9) لغرض فصل متناظرات الانزيم حيث تضاف الاجزاء الناضحة التي جمعت من الترشيح الهلامي ذات الفعالية الانزيمية العالية الى عمود كروموتوغرافيا التبادل الايوني لفصل متناظرات الانزيم، المحاليل المستعملة هي:

1- محلول الراتنج العالق (DEAE-cellulose A-50) : يوضع (2.75) غرام من مسحوق الراتنج في (250) سم^3 من محلول (Tris) وبتركيز (0.05) مول / لتر، واس هيدروجيني (8.0) يترك لمدة (24-48) ساعة وبدرجة حرارة (4)م° ويبدل خلالها المحلول الدارئ لعدة مرات خلال هذه الفترة.

2- المحلول الدارئ (Tris) (0.05) مول / لتر: يحضر باذابة (6.05) غرام من Tris (hydroxyl methl amino ethan) في حجم معين من الماء المقطر ويكمل الحجم الى لتر .

3- محاليل (Tris-HCL) الدارئة ذات الاسس الهيدروجينية المختلفة : تحضر عدة محاليل بتركيز (0.05) مول / لتر من هذا المحلول وذلك بمزج (50) سم^3 من المحلول (2) أعلاه مع احجام مختلفة من (0.05) مول/لتر من حامض الهيدروكلوريك ثم يكمل الحجم الى (2000) سم^3 باستخدام الماء المقطر للحصول على محاليل دارئة مختلفة الاس الهيدروجيني وحسب الجدول(2)

جدول (2) احجام المحاليل الدارئة (Tris-HCL) مختلفة الاس الهيدروجيني

pH	(X) ml
7.0	40.3
7.2	38.7
7.5	32.0
7.8	24.0
8.1	16.5
8.5	6.9
8.9	1.9

يستعمل عمود زجاجي بقطر (2.2) سم وطول (21) سم ثم يسكب المحلول العالق للراتنج (DEAE-cellulose A-50) في العمود بصورة بطيئة ومتجانسة الى ان يصل ارتفاع (18) سم ، يغسل بعد ذلك عمود الراتنج بكمية كافية من المحلول الدارئ (Tris) وبأس هيدروجيني (8.0) حتى يتم الحصول على معدل سرعة تدفق بمقدار (2) سم/دقيقة .يضاف (2) سم^3 من الاجزاء الناضحة التي جمعت في تقنية الترشيح الهلامي فوق سطح الراتنج. تبدأ عملية الفصل باستخدام المحلول الدارئ (Tris) وبأس هيدروجينية مختلفة تتراوح من (8.9-7.0) وتتم العملية حسب الجدول (3) بعدها تقاس الفعالية وكمية البروتين لكل الاجزاء الناضحة.

جدول (3) أحجام المحاليل الدارئة (Tris) مختلفة الاس الهيدروجيني

حجم الاجزاء الناضحة (سم^3)	عدد الانابيب	pH	حجم المحلول الدارئ(سم^3)
2	8	8.9	16
2	14-9	8.5	12
2	19-15	8.1	10
2	24-20	7.8	10
2	31-25	7.5	14
2	36-32	7.8	10
2	45-37	7.0	22

الدراسات الحركية لمتناظرات انزيم LDH المفصولة من أمصال دم الاشخاص الاصحاء:

تأثير تركيز المادة الاساس (بايروفات الصوديوم): تمت دراسة تأثير التراكيز المختلفة من بايروفات الصوديوم في سرعة تفاعل المتناظرات الخمسة والتراكيز(10,5,4,2,0.7)ملي مول/لتر لحساب التركيز الامثل للمتناظرات.

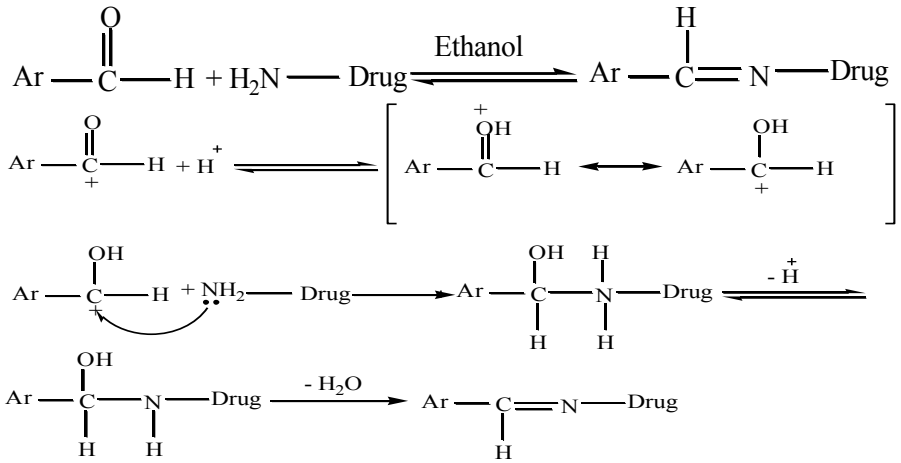
تعيين قيم ثابت ميكايلس منتن (Km) : لتعيين قيم الثابت (Km) للمادة الاساس بايروفات الصوديوم يتم الحصول على قيم (Km) باستعمال طريقة لينوفر – بيرك :

$$\frac{1}{V} = \frac{Km}{Vmax} x \frac{1}{[S]} + \frac{1}{Vmax}$$

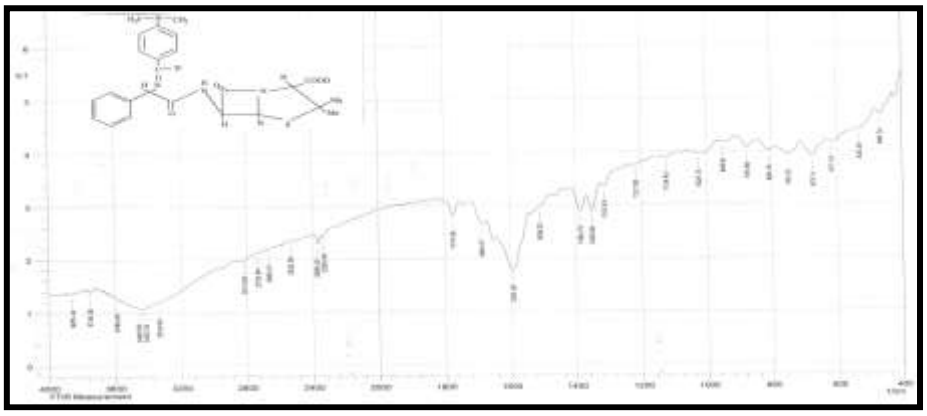
تثبيط LDH1 و LDH2 : درس الاثر الذي احدثه المركب المحضر(3) في نشاط كل من المتناظرين LDH1 و LDH2 حيث استعملت التراكيز(60,50,35,25,10)ملي مول/لتر من المركب مع تراكيز مختلفة من بايروفات الصوديوم(5,2,0.7) ملي مول/لتر، يقاس النشاط الانزيمي للمتناظرين.

النتائج والمناقشة

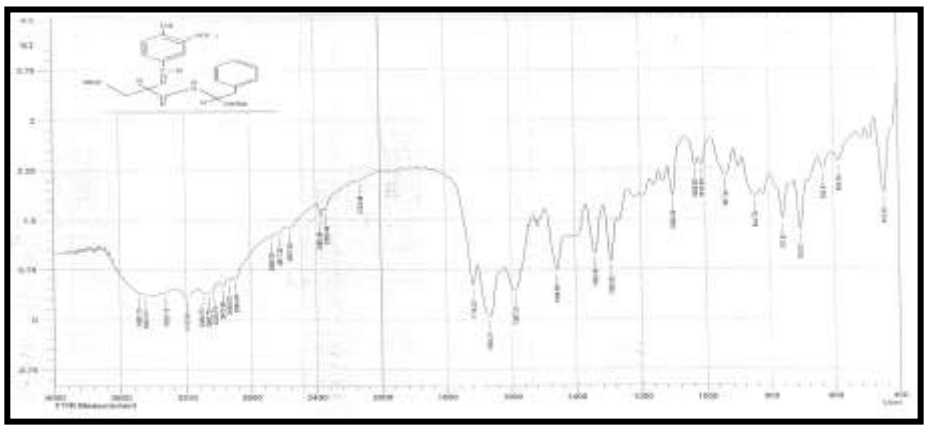
تحضير وتشخيص قواعد شف المشتقة من الادوية الامينية: تم تحضير قواعد شف من خلال تفاعل التكاثف للأدوية (امبسلين ،اسبارتام، سيفالكسين) مع الديهايدات اروماتية وباستخدام الايثانول المطلق كمذيب وبضع قطرات من حامض الخليك الثلجي كعامل محفز والمعادلة العامة التالية تبين ذلك:



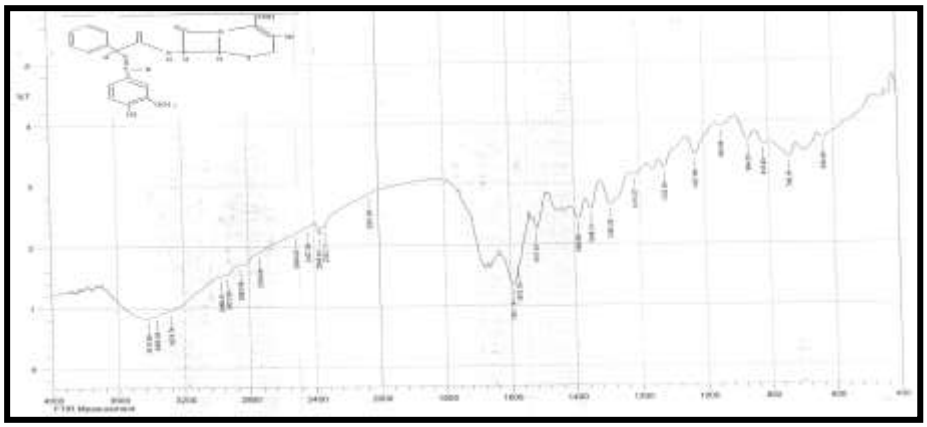
تبدأ الميكانيكية المقترحة ببرتنة اوكسجين مجموعة الكاربونيل الالديهايد مما يجعل ذرة الكاربون اكثر موجبية (الكتروفيلية) مما يسهل الهجوم النيوكلوفيلي للمزدوج الالكتروني على ذرة النتروجين لمجموعة الامين المرتبطة بالدواء مكونة المركب الوسطي غير المستقر (كاربينول امين) الذي يعاني من فقدان جزيئة الماء ليعطي قواعد شف، تم تشخيص المركبات المحضرة من خلال قياس بعض الخواص الفيزيائية حيث تم قياس درجات الانصهار وكانت عالية نسبيا مما يدل على كون هذه المركبات ذات نقاوة عالية وتمتلك قوى ما بين الجزيئات كبيرة نسبيا مثل (الاصرة الهيدروجينية) تجاذب ثنائي القطب– ثنائي القطب والذي يفسر درجات الانصهار العالية وكذلك تم تشخيص هذه المركبات باستخدام الطرائق الطيفية المتاحة حيث شخصت المركبات بمطيافية الاشعة تحت الحمراء حيث لوحظ اختفاء الحزم الامتطاطية العائدة لمجموعة الكاربونيل عند المنطقة ($1700\ cm^{-1}$)وكذلك اختفاء الحزم المتماثلة وغير المتماثلة العائدة لمجموعة NH_2– والعائدة للدواء وكذلك اظهرت الاطياف حزم قوية عند المنطقة ($1600\ cm^{-1}$) والعائدة الى مجموعة الازوميثين (C=N) وهذا يعطي دليلا لحدوث عملية التكاثف بين الالديهايد والدواء . الاشكال توضح أطياف I.R لبعض للمركبات المحضرة.



شكل (1) طيف IR للمركب المحضر رقم (3)

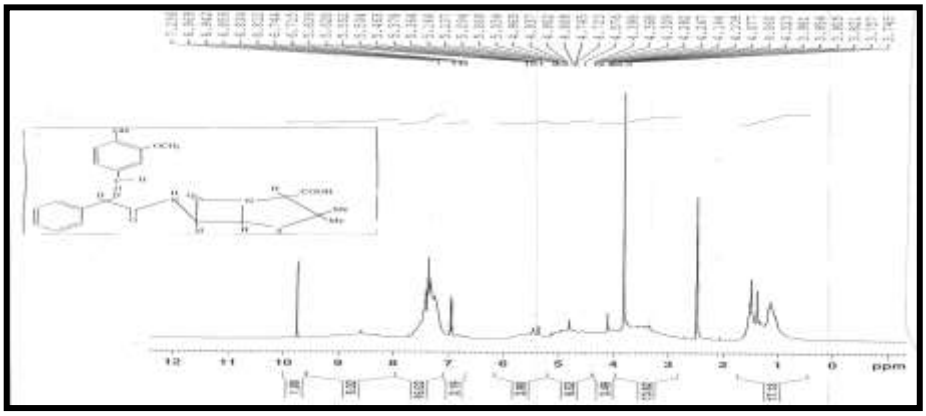


شكل (2) طيف IR للمركب المحضر رقم (7)



شكل (3) طيف IR للمركب المحضر رقم (10)

اما عند دراسة طيف الرنين النووي المغناطيسي (H^1-NMR) للمركب (2) وباستخدام DMSO كمذيب وترامثيل سيلان [TMS]$(CH_3)_4Si$ كمرجع قياسي (يعطى له تردد صفر)، تشير الحزمة المفردة عند (9.8PPm) الى بروتونات مجموعة الكاربوكسيل-COOH، ان موقع الحزمة المفردة عند 7.1 يشير الى وجود بروتونات اروماتية حيث يدل وجود حزمة مفردة لخمس بروتونات على وجود حلقة بنزين احادية التعويض كذلك يشير موقع القمة عند (7.2–7.8) الى وجود بروتونات اروماتية ولعل التعددية في هذه الحزمة يعود الى وجود المجاميع المعوضة OH ، OCH_3 ، N=CH على حلقة البنزين العائدة للشق الالديهايدي (Vanaline) كما وتشير مواقع الحزمة في 3.6 الى وجود المجاميع الوظيفية التالية-(OH,HC-COOH,CH-N) كذلك لوحظ وجود حزمة منفردة وحادة عند (3.8) تعود الى بروتونات مجموعة CH_3 العائدة لمجموعة الميثوكسي OCH_3 والمرتبطة بالشق الالديهايدي اما الحزمة الواقعة في المنطقة 1.3–1.7 والموجودة على شكل حزم مزدوجة ثنائية فهي تعود الى بروتونات HC-CH اما البروتونات الستة العائدة لمجموعة -CH_3 C-CH_3 فقد ظهرت عند 1.2. الشكل المرقم (4) يوضح طيف -H^1 NMR للمركب المحضر رقم (2).



شكل (4) طيف (H^1-NMR) للمركب المحضر رقم (2)

اختبار التأثير التثبيطي للمركبات المحضرة تجاه انزيم LDH: تم دراسة تأثير المركبات المحضرة (1–12) وبتركيز (60)ملي مول/لتر تجاه انزيم LDH وباستخدام المادة الاساس بايروفات الصوديوم بتركيز (13.5) ملي مول/ لتر، وكما موضح في الجدول (4):

جدول (4) يوضح التأثير التثبيطي للمركبات المحضرة (1–12)

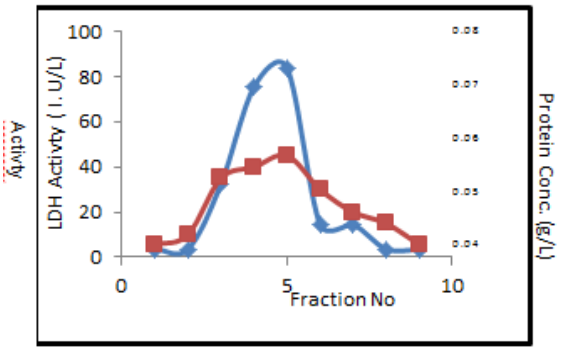
التسلسل	رقم المركب	فعالية الانزيم	نسبة التثبيط
1	بدون مثبط	14.4	–
2	[1]	7.2	50%
3	[2]	7.2	50%
4	[3]	10.8	25%
5	[4]	8.2	43%
6	[5]	5.4	63%
7	[6]	7.2	50%
8	[7]	3.6	75%
9	[8]	3.6	75%
10	[9]	3.6	75%
11	[10]	7.2	50%
12	[11]	8.2	43%
13	[12]	7.2	50%

وعلى ضوء النتائج اعلاه تم اختيار المركب (3) لدراسة تأثير التراكيز المختلفة على فعالية أنزيم LDH من مصل دم الاشخاص الاصحاء وكما موضح بالجدول (5) .

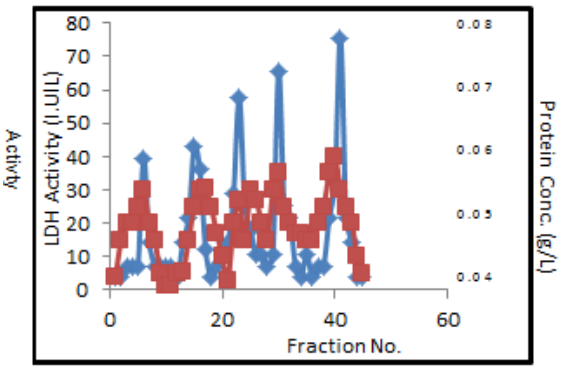
جدول (5) تأثير التراكيز المختلفة للمثبط (مركب رقم 3) على فعالية انزيم LDH بالدم

تركيز المثبط (مركب رقم 3)	فعالية الانزيم	نسبة التثبيط
بدون مثبط	14.4	–
10 mM/L	10.8	%25
25 mM/L	8.2	%43
35 mM/L	7.2	%50
50 mM/L	5.4	%63
60 mM/L	3.6	%75

تنقية انزيم LDH وفصل متناظراته: تم تنقية انزيم LDH من امصال دم الاشخاص الاصحاء باستعمال طريقة كروموتوغرافيا الترشيح الهلامي اذ يشير وكما بالشكل (5) الى فصل نشاط LDH بقمة واحدة شملت الاجزاء الناضحة (4–5) والتي اظهرت هذه نشاط انزيمي بحدود (82.8) وحدة دولية / لتر اي ان الجزء الاكبر من LDH تم فصله خلال عمود الفصل، وكذلك أمكن فصل متناظرات LDH بواسطة كروموتوغرافيا المبادل الايوني وباستعمال محاليل متدرجة الاس الهيدروجيني حيث عند وضع الاجزاء الناضحة الناتجة من الترشيح الهلامي (القمة التي تمثل اعلى فعالية للانزيم) في عمود التبادل الايوني كان ناتج الفصل خمسة قمم تمثل متناظرات LDH في امصال دم الاشخاص الاصحاء كما موضح بالشكل(6)، تمثل القمة الاولى المتناظر LDH5 وذلك لانه موجب الشحنة لا يرتبط بالمجاميع الموجودة على سطح الهلام وانما ينزل في بداية عملية الفصل بالمحلول الدارئ الـ Tris عند الاس الهيدروجيني (8.9)، اما المتناظرات الاخرى فهي تتدرج في ازدياد سالبيتها ومن ثم تتدرج في عملية فصلها حيث تمثل القمة الثانية المتناظر LDH4، القمة الثالثة تمثل المتناظر LDH3 ،القمة الرابعة لـ LDH2 أما القمة الخامسة فتمثل المتناظر LDH1 وتنفصل هذه المتناظرات خلال العملية بالمحلول الدارئ الـ Tris باس هيدروجيني (8.1)، (7.8)، (7.5)، (7.0) على التوالي.

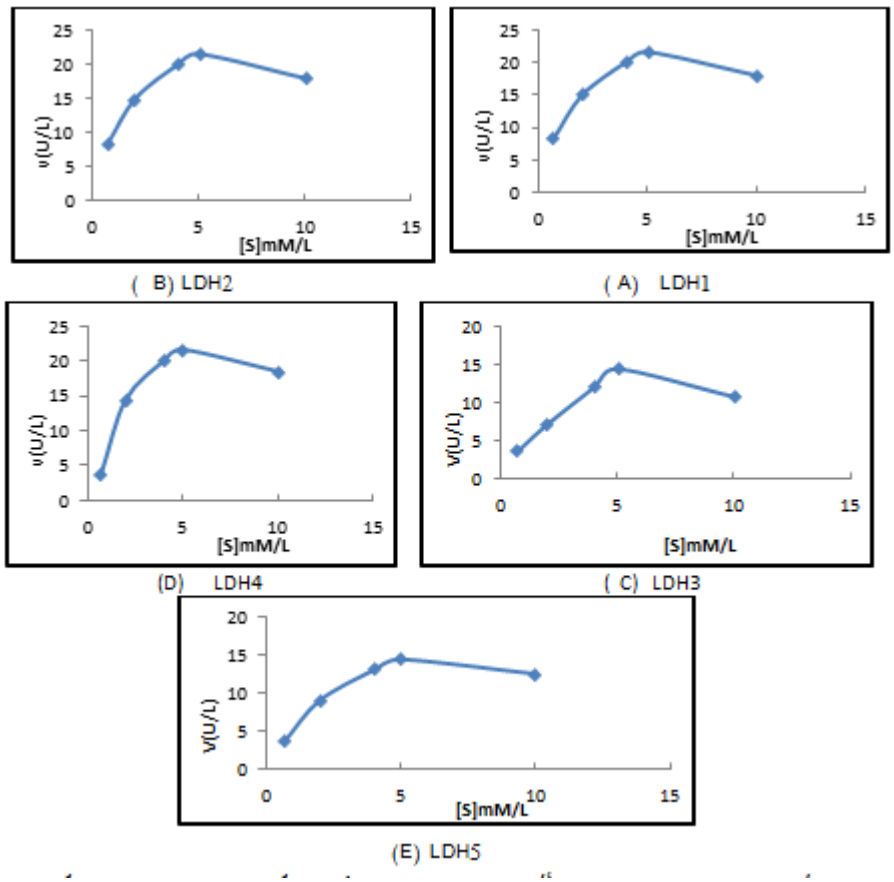


شكل (5) فصل انزيم LDH



شكل (6) فصل متناظرات انزيم LDH

تأثير تركيز المادة الاساس (بايروفات الصوديوم): تمت دراسة تاثير تراكيز مختلفة لبايروفات الصوديوم (0.7– 10) ملي مول/لتر للمتناظرات الخمسة وتعيين التركيز الامثل للمادة الاساس الذي يعطي اقصى سرعة تفاعل ،يتضح من الاشكال الاتية ارتفاع في سرعة تفاعل المتناظرات بارتفاع تركيز بايروفات الصوديوم الى حد الوصول الى السرعة القصوى عند التركيز (5) ملي مول/لتر لجميع المتناظرات ومن ثم تبدا سرعة التفاعل بالانخفاض عند التراكيز العالية من بايروفات الصوديوم نتيجة لحدوث التثبيط.



شكل (7) A ، B، C ، D ، E تأثير تركيز المادة الاساس في سرعة التفاعل للمتناظرات الخمسة

جدول (6) A، B، C، D،E تأثير تركيز المادة الاساس في سرعة التفاعل للمتناظرات الخمسة

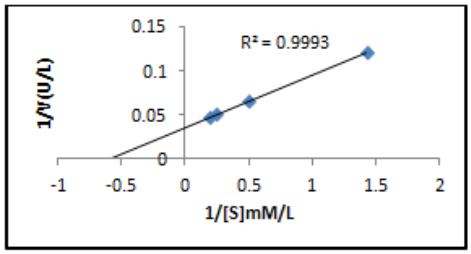
[S]mM/L	V(U/L) LDH1	V(U/L) LDH2	V(U/L) LDH3	V(U/L) LDH4	V(U/L) LDH5
0.7	8	8	3.5	4	3.8
2	15	15	7	14.5	9
4	20	20	11.9	20	13.3
5	22	22	14.1	22	14.9
10	18	18	10.6	19	12.8

حساب قيم ثابت ميكايلس منتن (Km) لبايروفات الصوديوم: تم رسم لينوفر–بيرك وكما موضح بالشكل (8).

حساب قيم الثابت Km للمادة الاساس ولجميع المتناظرات باستعمال

a (LDH1)

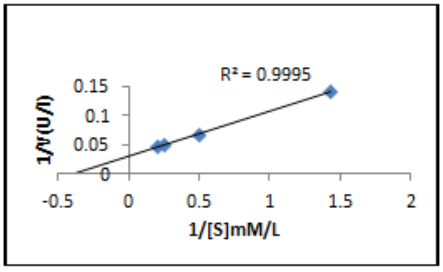
1/V(U/L)	1/[S]mM/L
–	−0.595
0.048	0.2
0.051	0.25
0.067	0.5
0.12	1.45



A (LDH1)

b (LDH2)

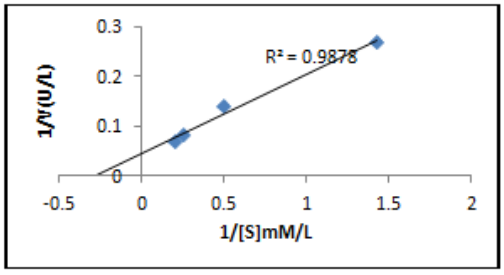
1/V(U/L)	1/[S]mM/L
–	−0.41
0.047	0.2
0.052	0.25
0.068	0.5
0.14	1.45



B (LDH2)

c (LDH3)

1/V(U/L)	1/[S]mM/L
–	−0.26
0.074	0.2
0.085	0.25
0.144	0.5
0.275	1.45

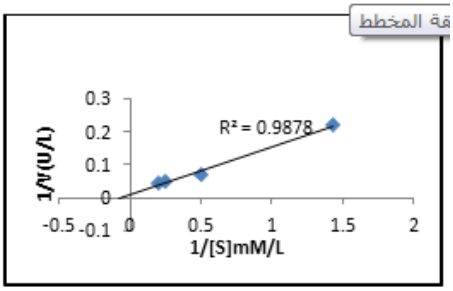


C (LDH3)

\

d (LDH4)

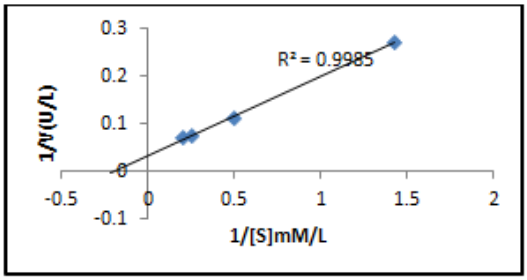
1/V(U/L)	1/[S]mM/L
–	−0.074
0.05	0.2
0.055	0.25
0.07	0.5
0.23	1.45



D (LDH4)

e (LDH5)

1/V(U/L)	1/[S]mM/L
–	−0.25
0.065	0.2
0.07	0.25
0.11	0.5
0.23	1.45



E (LDH5)

شكل (8) A ، B، C ، D ، E رسم لينوفر–بيرك لحساب ثابت ميكاليس منتن للمتناظرات الخمسة

جدول (7) e,d,c,b,a قيم معكوس تركيز المادة مع معكوس السرعة

جدول (8) قيم ثابت ميكايلس منتن (Km) باستعمال معادلة لينوفر – بيرك

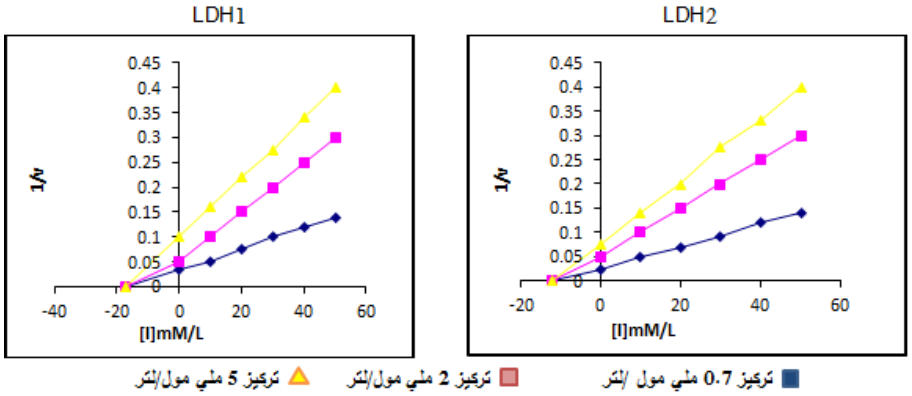
المتناظر	ثابت ميكايلس منتن (Km)
LDH1	2.08
LDH2	2.63
LDH3	3.45
LDH4	12.5
LDH5	5.0

تثبيط المتناظرين LDH1 و LDH2 باستعمال قواعد شف: تم استعمال عدة تراكيز من المركب المحضر رقم (3) ولوحظ تأثيره التثبيطي على فعالية المتناظرين LDH 1 و LDH2 وبنسب مختلفة تتزايد مع ازدياد تركيز المادة المحضرة وكما موضح في الجدول (9).

جدول (9) يوضح تأثير التراكيز المختلفة للمثبط على فعالية متناظرات أنزيم LDH

تركيز المثبط mM/L	فعالية LDH 1	نسبة التثبيط	فعالية LDH 2	نسبة التثبيط
بدون مثبط	28.6	–	33.3	–
10 mM/L	18	37%	21.6	35%
25 mM/L	11.1	61%	18.0	46%
35 mM/L	10.8	62%	10.8	68%
50 mM/L	7.2	75%	7.2	75%

وعند دراسة تأثير التراكيز المختلفة للمركب المحضر (3) وجد انه يثبط المتناظرين LDH1 و LDH2 تثبيطا لا تنافسيا non-Competitiv، يوضح الشكل (9) الاشكال البيانية حسب طريقة Dixon-plot الذي يوضح العلاقة بين 1/V ضد [I].



شكل (9) رسم ديكسون والذي يبين الاثر التثبيطي للمتناظرين باستخدام عدة تراكيز من(مركب رقم 3)

جدول (10) قيم ثابت التثبيط Ki

المتناظر	ثابت التثبيط Ki
LDH 1	18
LDH 2	12

يمكن ان نستنتج من خلال نتائج التثبيط اللاتنافسي للمركب ان الفعالية التثبيطية تعود الى مجموعة الكاربوكسيل الموجودة في المركب حيث تكون اواصر ايونية مع الاحماض الامينية Arg171, Arg109

الموجودة في الموقع النشط لأنزيم LDH . والحلقة غير المتجانسة للمركب تصطف بشكل متوازي مع حلقة النيكوتين أمايد في المرافق الانزيمي NAD^+ وكذلك فان المزدوج الالكتروني الموجود في ذرة النتروجين يزيد من نيوكليوفيلية الحلقة غير المتجانسة وبالتالي يقوم بمهاجمة بروتون مجموعة الهيدروكسيل من السيرين Ser 245 بالموقع النشط للانزيم، وهذا ما يسبب في تثبيط عمل الانزيم[14] .

المصادر

1- Katarzyna Brodowska and Elżbieta ŁODYGA-CHRUŚCIŃSKA. (2014). Institute of General Food Chemistry, **68, 2, 129–134**.

2. A. M. Barrios, S. M. Cohen and M. H. Lim. (2013).Chemical Communications, **49, 5910**.

3. Ramachandran, E.; Thomas, S.P.; Poornima, P.; Kalaivani, P.; and Prabhakaran, (2012). European Journal of Medical Chemistry. **50, 405–415**.

4. Yasmeen, S.; Sumrra, S; Akram, M. and Zahid H. Choh. (2017). Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. **32.1, 106–112**.

5. M. Ganeshpandian, R. Loganathan, S. Ramakrishnan, A. Riyasdeen, and M. Palaniandavar. (2013). Polyhedron. 52,924..

6- A. Ciobanu, F.Zalaru, C. Zalaru ,F. Dumitrascus and C. Draghici. (2003). Acta Chimica Slovenica. **(50),441**.

7- لطيف، براء حسين و احمد، عبد الحسن احمد. (2016). تفاعلات الاضافة لقواعد شف وتحضير مركبات الثايويوريز الجديدة. مجلة تكريت للعلوم الصرفة، **21 (4): 73-78**.

12- سيف الله، د.بري حبيب. (2009). دراسة حركية عن تأثير بعض الادوية الخافظة للحرارة والمضادة للالتهابات على فعالية انزيم اللاكتيت ديهايدروجنيز. مجلة علوم الرياضة. العدد الاول :30-45.

13-M. Mezher.(2012) Preparation of some Schiffs Bases Compounds and Study Their Liquid Crstalline Properties , Thesis Master Applide Science, Tikrit University, Tikrit ,Iraq.

14-الصميدعي، اخلاص محي الدين (2000) التوصيف الكيميائي الحياتي لانزيم التاكسد والاختزال ان اي دي في امصال دم المصابين باحتشاء العضلة القلبية الحاد. رسالة ماجستير. كلية التربية للبنات – جامعة تكريت، تكريت– العراق.

8-Jevery M. Berg, John L. Tymoczko, L. Stryer. (2003). Biochemistry , 5th ed . W.H. Freeman and company, New York , 274-275.

9- Thomas, L. Labor und Diagnose, Aufl-rankfurt/ Main:THBooks-Verl.-Ges.-1998.

10- Burtis, C.A. Ashwood, E.R. Tietz .(1994). Text Book of Clinical Chemistry, Second edition ,saunders company.

11- جاد الله، د. كندة عبد الجبار. (2007). دراسة تغيرات LDH و HBDH في مجموعات مرضية محددة . رسالة ماجستير. جامعة تشرين. ص7.

Synthesis of some Schiff bases derived from Amino drugs and evaluation of their effect on LDH Enzyme

Zeinab H. Mohammed[1] , Ayad S. Hameed[2] , Ferah G. Al-Salihi[3]

[1] Applied Chemistry Department , College of Applied Sciences , University of Samarra , Samarra , Iraq

[2] Chemistry Department , College of Sciences , University of Tikrit , Tikrit , Iraq

[3] Chemistry Department College of Education for Women– University of Tikrit , Tikrit , Iraq

Abstract

The work include synthesis of Schiff bases (1-12) compounds were prepared in good yield via condensation reaction of bioactive drug contain amino group namely Ampicillin, Cefalexin , Aspartame, with four aromatic aldehydes: 4,N,N- dimethyl benzaldehyde,4-methoxy-3-hydroxy benzaldehyde, benzaldehyde and 3-nitrobenzaldehyde respectivelly , the structure of the synthesized compounds is suggested using (IR, H^1-NMR) spectroscopy. LDH isoenzymes were isolated and partially Purified from healthy blood serum , by using gel filtration (Sephadex G – 200) and ion – exchange chromatography(DEAE-cellulose A – 50). Kinetic Studies of (LDH)isoenzyme were carried out, which included the effect of different concentrations of substrates(Sodium pyruvate) and determination the Km Values for that isoenzymes .The study also included the effect of the prepared Compound (3) on the activity of LDH isoenzymes in which non - Competitive Inhibition was shown by the Compounds .