تنقية إنزيم الرودينيز RHD من دم مرضى داء النقرس

م م. ياسر خالد خليل ابراهيم

م م. كلسن طلال كمال

أ . د. عبدالكريم فتاح عمر

كلية القلم الجامعة – العراق

Purification of Rhodenase (RHD) enzyme from the blood of gout patients

Yasir Khaled Khalil Ibrahim

Klsen Talal Kamal

Abdelkrim Fattah Omar

Al-Qalam University College

الملخص

داء النقرسGout هو اضطراب يتميز بارتفاع مستويات حامض البوليك Uric acid باعتباره الناتج النهائي من العمليات الايضية لتقويض البيورينات في الدم Hyperuricemia (فرط حامض بوليك الدم) وذلك نتيجة زيادة حامض البوليك حيث يمكن ان يؤدي الى ترسيب بلورات احادي يورات الصوديوم Monosodium urate (MSU) في المفاصل وحولها[1] . يعد إنزيم الرودينيز Rhodenase (RHD) من الإنزيمات الموجودة في الكائنات الحية, إذ يلعب دوراً مركزياً في إزالة سمية السيانيد, ويعمل على نقل ذرة الكبريت من الثايوسلفات إلى السيانيد الذي يعد مستقبل نيوكلوفيلي قوي لذا يصنف RHD ضمن الأنزيمات الناقلة.تم تنقية جزئية لأنزيم RHD بوساطة عدة خطوات منها الترسيب باستخدام كبريتات الامونيوم بتركيز 45% وكروماتوغرافيا الترشيح الهلامي باستخدام Sephadex G-75 وفصل متناظرات الإنزيم بطريقة كروماتوغرافيا التبادل الأيوني باستخدام الراتنج DEAE-Cellulose A-50 ، إذ تم الحصول على متناظرين والتأكد من التنقية وفصل المتناظرين I,II بوساطة الترحيل الكهربائي على هلام الاكريل امايد (Sodium dodecyl sulfate-polyacryl amide gel electrophoresis (SDS-PAGE الذي ظهر حزمة منفردة.الكلمات المفتاحيه: داء النقرسGout,انزيم الرودينيز Rhodenase(RHD), إنزيم اللاكتيت ديهايدروجينيز Lactate Dehydrogenase(LDH),إنزيم ناقل أمين الإسبارتيت Aspartate Aminotransferase(AST).

Abstract

Gout is a disorder characterized by high levels of uric acid as the final product of metabolic processes to undermine purines in the blood (Hyperuricemia) this is due to the increase in uric acid ،as it can lead to sedimentation of Monosodium urate (MSU) and around the joints.

The Rhodenase (RHD) is considered as one of the enzymes which are existed in all living organisms, and it plays a central role in removal of cyanide toxicity. It transfers the sulfate atom from Thiosulfate into cyanide which is considered as a strong neochlophyl receptor, RHD is classified as transferase enzyme. a

The enzyme was purified by many steps including Precipitation by Ammonium Sulfate salt then Chromatography Gel Filtration. using Sephadex G-75, and Iso-Enzymes were separated using Ions exchange with DEAE - Cellulose, Two isomers were detected by Sodium dodecyl sulfate on polyacryl amide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

المقدمة

يعد أنزيم الرودينيز Rhodenase (EC.2.8.1.1 Thoslphate: cyanid sulfurtransferase) (RHD) من الإنزيمات الموجودة في كل الكائنات الحية من البكتيريا الى الانسان[2]. يصنف ضمن الإنزيمات الناقلة, إذ يحفز انتقال ذرة الكبريت من المادة الواهبة للكبريت (ثايوسلفات) إلى مستقبل نيوكلوفيلي قوي (سيانيد) مؤديا إلى تكوين الثايوسيانيت وايون الكبريتيت[3]. إذ أنّ كلمة Rhodenase مشتقة من الكلمة الألمانية(Rhodanid) والتي تعني ثايوسانيت (thyiocyanate).

$$CN^- + S_2O_3^{-2} \xrightarrow{\text{Rhodenase}} SCN^- + SO_3^{-2}$$

يوجد انزيمRHD بشكلين , المفسفر وغير المفسفر, وهذان الشكلان متماثلان فيما يتعلق بالمتغيرات الحركية ، وتركيب الأحماض الأمينية و محتوى مجموعة الثايول (SH^-)[4] . ويعد أنزيم RHD من الأنزيمات واسعة الانتشار في الطبيعة إذ يوجد في الأنسجة المختلفة للبائن بتراكيز عالية في مايتوكندريا الكبد وقشرة الكلية ، وبتراكيز واطئة في العضلة الهيكلية والملساء و نخاع العظم و الطحال والدماغ[5] .يعمل أنزيم الرودينيز خارج الجسم على مواد أساسية مختلفة واهبة للكبريت منها : ثايوسلفات الصوديوم ، ثايوسلفونات الصوديوم ، ثايوسلفونات ايثان ، 3- ميركابتو بايروفيت وبوجود السيانيد كمستقبل نيوكلوفيلي قوي[6] . أما داخل الجسم فإن أنزيم الرودينيز يعمل مركبات تدعى Sulfane sulfur وهي مركبات تحتوي على ذرة كبريت فعالة جداً غير مستقرة ، في حالة تكافؤ (صفر أو سالب واحد) ترتبط تساهمياً بذرة كبريت أخرى وبهذه الصفات فإنها تنتقل إلى مستقبلات مثل: (CN^-) Cyanide ، (SO_3^{-2}) Sulfates ، Sulfenic acid (R-SO-H) . ومن المركبات الفسيولوجية التي تقع ضمن مجموعة مركبات Sulfane sulfur: Per sulfides (R – S – SH) , Thiosulphate ($S = SO_3^{-2}$) , polythionates ($^-O_3S-Sn-SO_3^-$).[7] أظهرت العديد من الدراسات حصول تغيرات في تركيب إنزيم الرودينيز خلال العملية التحفيزية التي ترافق البروتين خلال التحفيز وذلك لامتلاك

البروتين مرونة تركيبية ، ويعد هذا مهم في تحديد خطوة الارتباط[8]. يعمل أنزيم الروديـنيز من خلال ميكانيكية الإزاحة المضاعفة (double displacement) التي تتضمن خطوتين:

الخطوة الأولى : تتضمن تفاعل أنزيم الرودينيز مع مركب Sulfane sulfur (ثايوسلفات) إذ ترتبط ذرة الكبريت مع الأنزيم لتكوين مركب وسطي تساهمي[الكبريت – الأنزيم] [E–S] وجذر الكبريتيت (SO_3^{-2}) كناتج أولي .

الخطوة الثانية : في هذه الخطوة فإن الأنزيم المرتبط بالكبريت يعمل على نقل ذرة الكبريت إلى المستقبل النيوكلوفيلي (السيانيد) لتكوين ناتج ثانٍ من الثايوسيانيت والأنزيم الحر[9].هنالك العديد من الطرائق التي استخدمت لتقدير فعالية إنزيم الرودينيز في مختلف المستخلصات ، وأكثرها شيوعاً هي التي تعتمد على التقدير اللوني للثايوسيانيت أذ ينتج الثايوسيانيت بفعل الأنزيم على السيانيد والثايوسلفات الذي يتفاعل مع كاشف نترات الحديديك لينتج معقد ثايوسيانيت الحديديك – الأحمر اللون الذي يقاس عند الطول الموجي (460 nm) [10]. إن هذه الطريقة مناسبة لقياس فعالية أنزيم الرودينيز المحضر بأية درجة من النقاوة ولكنها غير مناسبة لتقييم الأنزيم في بعض الأنسجة والعضيات ، لذلك طورت طريقة محورة تتضمن عاملاً مرسباً للبروتين [11] .

إن طرائق التقدير المستخدمة للمستخلصات من أنسجة الحيوان غير قابلة للتطبيق على النبات والأحياء المجهرية[12].هدف البحث الى تنقية أنزيم الرودينيز وفصل متناظراته لدى مرضى السكري من النوع الاول.

المواد وطرائق العمل

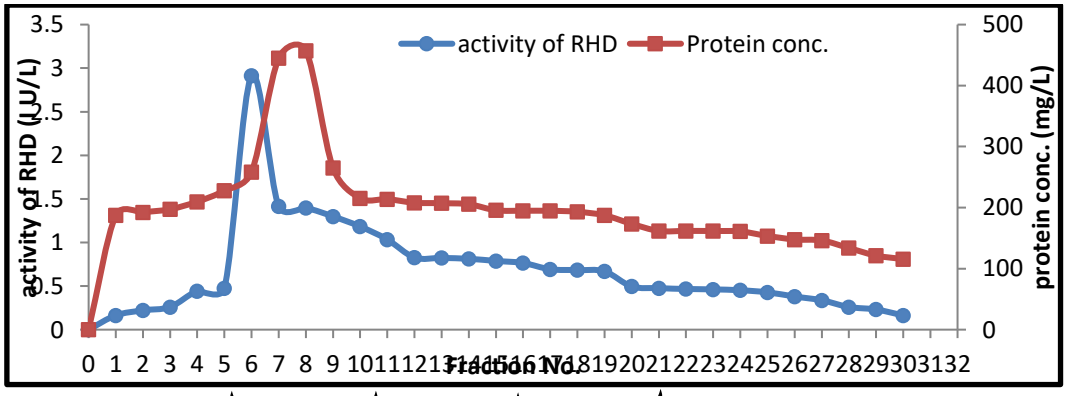
قدرت فعالية إنزيم الرودينيز حسب الطريقة المحورة من قبل الباحث (URBANSKA.2002[13]). لطريقة عدة الكت, إذ يعمل الإنزيم على نقل ذرة الكبريت من المادة الواهبة للكبريت (ثايوسلفات) إلى مستقبل نيوكلوفيلي (سيانيد) كما في المعادلة أدناه :

$$CN^- + S_2O_3^{-2} \xrightarrow{\text{Rhodenase}} SCN^- + SO_3^{-2}$$

وتم قياس شدة الامتصاصية عند طول موجي (460nm) لمادة الثايوسيانيت الناتجة , أذ قدرت الفعالية, على أنها عدد وحدات الإنزيم الموجود في مللتر من مصل الدم .تم تنقية أنزيم RHD من دم مرضى السكري من النوع الاول بعدة خطوات وفصل متناظراتهُ ، اذ تم ترسيب بروتين الانزيم باستخدام كبريتات الأمونيوم بنسبة 45% ، وتنقيته باستخدام هلام Sephadex G75 , وفصل متناظراته بتقنية كروماتوغرافيا التبادل الأيوني باستخدام عمود الراتنج DEAE–Cellulose A50 .

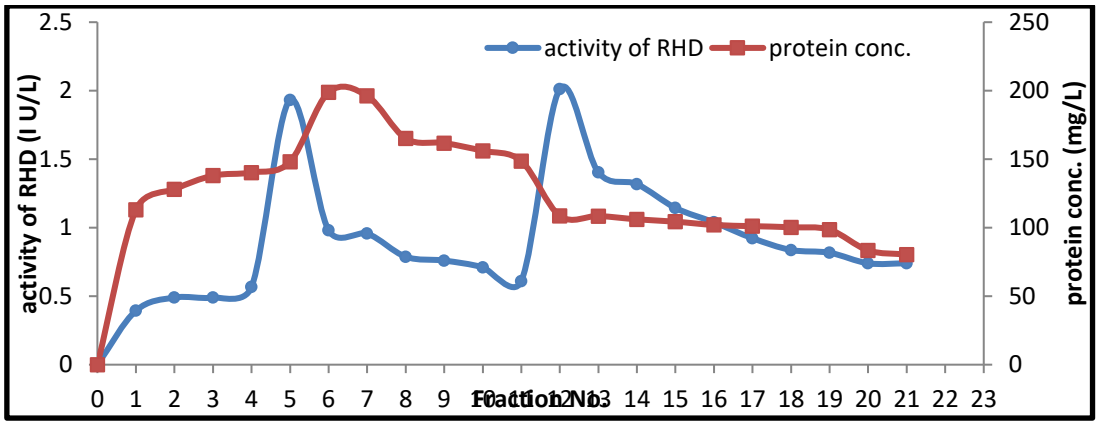
النتائج والمناقشة

يتم عادة تركيز البروتينات في مراحل التنقية الأولى للإنزيمات وذلك بالتخلص من نسبة كبيرة من الماء والحصول على درجة من النقاوة وغالبا ما يستخدم لهذا الغرض الأملاح مثل كبريتات الامونيوم بسبب ذوبانها الجيد في الماء إذ يحدث الترسيب بالأملاح نتيجة لمعادلة شحنات البروتين بفعل الملح مما يؤدي إلى خفض ذائبية البروتين وترسبه وهذا ما يسمى بالتمليح الخارجي Salting out[14]. لذا تمت عملية فصل وتنقية جزئية لإنزيم الرودينيز ومتناظراته من مصل مرضى السكري من النوع الاول بمراحل عدة ، ففي خطوات التنقية الأولى رُسب الإنزيم باستخدام ملح كبريتات الأمونيوم بتركيز 45% لتركيز الإنزيم والحصول على درجة من النقاوة بلغت (0.79) مرة، وتم التخلص من الملح الزائد خلال عملية الفصل الغشائي dialysis بوساطة Tris–HCl(0.001M) ذو pH 8.6 إذ بلغت درجة تنقية الإنزيم بهذه المرحلة (0.862) مرة وبحصيلة إنزيمية (35.5%) وبعدها تم تنقية الإنزيم بطريقة الترشيح الهلامي باستخدام Sephadex G–75) إذ بلغت درجة تنقية الإنزيم بهذه الخطوة (1.25) وبحصيلة إنزيمية (22.5%) وكما هو موضح بالشكل (3–4) والجدول(3–5).



الشكل (3-4): تنقية الإنزيم بواسطة كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي

وبعدها تم فصل متناظرات إنزيم RHD بطريقة كروماتوغرافيا التبادل الأيوني باستخدام الراتنج DEAE-Cellulose A50 كمادة تعبئة للعمود ومحاليل متدرجة من كلوريد البوتاسيوم إذ تعد كروماتوغرافيا التبادل الأيوني إحدى الطرق المتبعة لفصل وتنقية الإنزيمات التي تعتمد على مبدأ اختلاف الشحنة للمتناظرات إذ تم الحصول على متناظرين كما موضح في الشكل (3-5) وبدرجات نقاوة متفاوتة إذ بلغت درجة التنقية للمتناظر I (1.36) مرة ، والمتناظر II(1.87) كما موضح في الجدول (3-5) ، والحصول على متناظرين يتعارض مع ما توصل إليه Okonji وجماعته (2011)[15] واحمد(٢٠١٤)[2] بفصل متناظر واحد لإنزيم RHD من نسيج كبد سمكة المسماة Mudskipper (*Periophthalmus Barbarus*) .



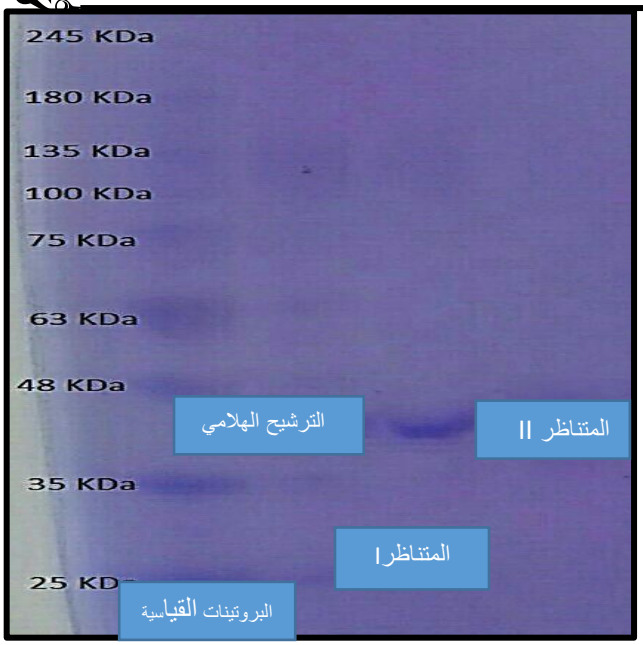
الشكل (3-5): فصل متناظرات إنزيم RHD من مرضى MI باستعمال كروماتوغرافيا التبادل الأيوني

وكما مبين في الجدول (3-5) والذي يوضح خلاصة خطوات التنقية الجزئية.

الجدول (3-5): فصل وتنقية متناظرات RHD جزئيا من أمصال دم مرضى احتشاء العضلة القلبية

Step	*Elute (ml)*	*Activity (I U/L)*	*Total activity (I U)*	*Protein conc. (mg/L)*	*Total protein mg)(*	*Specific activity (I U/mg)*	*Purification (Fold)*	*Yield %*
Crude serum	4.5	8.769	0.04	923.22	4.1545	0.00963	-	100
Ammonium sulphate	5	4.493	0.0225	590.33	2.952	0.0076	0.79	56.25
Dialysis	4	3.550	0.0142	427.865	1.7115	0.0083	0.862	35.5
(Gel filtration) Sephadex G-75	3	2.9126	0.009	258.374	0.78	0.012	1.25	22.5
(Ion exchange) DEAE-Cellulose A50 Iso enzyme – I	5	1.9326	0.0097	148.2	0.741	0.0131	1.36	24.25
Iso enzyme-II	5	2.0126	0.01	108.6	0.543	0.018	1.87	25

وتم تقييم التنقية بواسطة الفصل بالترحيل الكهربائي على هلام SDS-PAGE بتركيز 10% وباستعمال صبغة CBB R250 أظهر المتناظر المفصول بطريقة التبادل الأيوني. إن الإنزيم يحمل شحنة سالبة إذ انجذب نحو القطب الموجب وتعتمد حركة البروتين في الهلام بالدرجة الرئيسية على الشحنة التي يحملها ويلي ذلك حجم وشكل البروتين حيث تمت هجرة بروتين الإنزيم في رقم هيدروجيني 8.3 ضمن مجال كهربائي بين القطب الموجب والسالب بالاعتماد على العوامل المذكورة[16].



(1) البروتينات القياسية
(2) الترشيح الهلامي
(3) متناظرI إنزيم RHD المنقى بخطوة الترشيح الهلامي
(4) متناظر II إنزيم RHD المنقى بخطوة الترشيح الهلامي

الشكل (3-6): الترحيل الكهربائي لإنزيم RHD المفصول

References

1.Harvey, Richard A. (2011) "Lippincott Illustrated Reviews: Biochemistry ", 5th Edition. P. 299

٢.أحمد, وليد خالد (٢٠١٤). "دراســـــات حركية لإنزيم الريـــــدينيز المنقـــــى جزيئاً من مرضـــى العجز الكلوي المزمن" , رسالة ماجستير , كلية التربية للبنات – جامعة تكريت.

3. Papenbrock , J., Guretzkis, S., and Henne, M. (2017). "Latest news about the Sulfur transferase protein family of higher plants- Amino acids", 41,43-57.

4. Blumenthal, K.M. and Heinrikson, R.L. (1971). "Structural studies of bovine liver rhodanese : 1. Isolation and characterization of two active forms of the enzymes", J. Biol. Chem. 246,8: 2430 - 2437.

5. Sylvester, M. and Sander, C. (1990). "Immunohistochemical localization of rhodanese", Histochem. J. 22,4: 197-200.

6. Iciek, M. and Wlodek, L. (2018). "Biosynthesis and biological properties of compound containing highly reactive reduced sulfane sulfur", pol. J. pharmacol., 53: 215 - 225 .

7. Anton, H. , Guzel, F. , Thomas, M. , and Weigner, S. ,(2012). "Gasotransmitters : physiology and pathophysiology", Biol. Pharm. Bull. , 17:1535-1542.

8. Horowitz, P.M. and criscimagna , N.L. (1983). "Astudy of the polar interaction of the enzyme rhodanese with octyl substituted agarose gel", Biochem. Biophys. Res. Commun., 111 ,2: 595 - 601 .

9. Saidu, Y. (2004). "Physicochemical features of rhodanese" , Afr. J. Biotechnol , 3,4: 370 - 374 .

10. Markku, L., Juhani, V. and Jari, H. (1999). "spectrophotometric determination of thiocyanate in human saliva", J. Chem. Educ., 76,9: 1281 - 1282 .

11. Scott, E.M. and Wrigh, R.C. (1980). "Identity of β - Mercaptopyuvate sulfurtransferase and rhodanese in human erythrocytes", Bichem. Biophs. Res. Commun,97,4: 1334 - 1338 .

12. Lieberei, R. and Selmar, D. (1990). "Determination of rhodanese in plants", phytochem , 29,5: 1421 - 1424 .

13. Urbanska, A., Lezczynski, B., Matok, H., and Dixon, A. (2002). "Cyanide Detoxification Enzymes of Bird Cherryoat aphid", Electronic. J., 5,2: 334-337.

14. Nelson, D. L. and Cox, M. M. (2000). "Lehninger principles of biochemistry", 3rd ed. New York , USA, P:130.

15. Okonji, R.E. , Adewole, H.A. , Kuku, A. and Agboola F.K.(2016)."Physicochemical properties of Mudskipper (Periphthalmus Barbarus Pallas) liver Rhodanese", Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 5,8:507-514.

16.Aberomand, M., Rahim, F., and Hosseini, S. A. (2018). "Study of alkaline phosphatase from human Hydatidiform mole", Pak J. Med. Sci.,24,3: 471 – 474.