

دراسة الثايوردوكسين المعزول من مصلى دم الإنسان

لؤي عبد الهلالي ، أميرة احمد حمدون

قسم الكيمياء ، كلية العلوم ، جامعة الموصل ، الموصل ، العراق

E-mail:Ahmadameera927@yahoo.com

E-mail: Luayhelaly@yahoo.com

المخلص

تضمن البحث فصل الثايوردوكسين من مصلى دم الإنسان باستخدام التقنيات الحياتية المختلفة، إذ تم فصل قمة بروتينية واحدة للثايوردوكسين بتقنية الترشيح الهلامي نوع سيفادكس G-50 باستخدام الراسب البروتيني الناتج من عملية الترسيب بكبريتات الامونيوم (65%) بعد عملية الديليزة. وعند استخدام الناتج من عمود الترشيح الهلامي في عمود التبادل الأيوني من نوع DEAE- سليولوز لوحظ ان هناك قمتين بروتينية للثايوردوكسين المفصول.

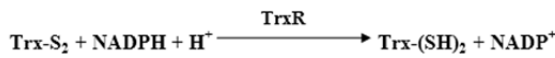
قدر الوزن الجزيئي التقريبي للثايوردوكسين المعزول باستخدام تقنية الترشيح الهلامي (سيفادكس G-50) وتقنية الهجرة الكهربائية وكانت بحدود 12305 + 190 دالتون و 12461 دالتون على التوالي.

أظهرت النتائج أن المركبات الدوائية لها تأثير تثبيطي أو تنشيطي بنسب مختلفة على عمل الثايوردوكسين، إذ لوحظ ان للمركبات للباراسيتامول وديكساثامازون وداي فينهايدرامين- هايدروكلورايد وثيوفيلين اللامائي وسيدوفيرين وسيراميد والكافيين اللامائي تأثير تثبيطي وصل 44.59% ، وان ميترونيدازول وكلورفينرامين ماليت لها تأثير تنشيطي وصل الى 110.8% و 21.62 على التوالي.

الكلمات الدالة: عزل، ثايوردوكسين، مثبطات، منشطات.

المقدمة

الثايول/ثنائي الكبريت (Disulfide/dithiol) الذي يتواجد في الموقع الفعال (-Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys-) (2) .



يشارك Trx في اداء تفاعلات عدة منها مساهمته في عملية إزالة بيروكسيد الهيدروجين من أوساط مختلفة وتحوله الى ماء عن طريق إنزيم الثايوردوكسين بيروكسيداز Trx peroxidase وكذلك استخدام Trx المختزل في عملية بناء الـ DNA خلال تفاعلات إنزيم رايونيوكلوتيد رديكتاز Ribonucleotide reductase (كما في المعادلة الأتية)، ولوحظ أيضاً ان للـ Trx دور مع عوامل الاستنساخ Transcription factors عند عملية استنساخ الجين Gene transcription لأداء مهام مختلفة داخل الجسم (3) .

يعد الثايوردوكسين (Trx) Thioredoxin بروتين (ذو وزن جزيئي 12 كيلو دالتون) من المواد الأساس التي يعمل عليها إنزيم الثايوردوكسين رديكتاز Thioredoxin reductase (EC.1.6.4.5) بوجود المرافق الإنزيمي NADPH، إذ يعمل هذا الإنزيم على اختزال Trx المؤكسد وتحوله بالشكل الفعال (كما في المعادلة ادناه) (1). إذ يعد Trx احد مركبات نظام الثايوردوكسين Thioredoxin system الذي يتألف من (الثايوردوكسين - إنزيم TrxR- والمرافق الإنزيمي NADPH) (NADPH-TrxR-) (2) نظام واسع الانتشار من البدائيات Archea إلى الإنسان ويعد احد أنظمة مضادات الأكسدة الخلوية الرئيسية، إذ يشارك في العديد من الوظائف البايولوجية وتنظيم الأكسدة والاختزال من خلال ثنائي

Ribonucleotide reductase



يهدف هذا البحث الى عزل الثايوردوكسين من مصلى دم الانسان ودراسته باستخدام تقنيات مختلفة ومن ثم دراسة تأثير المركبات الدوائية المختلفة على نشاط الـ Trx.

المواد وطرائق العمل

قياس كمية الثايوردوكسين في العينة

استخدمت طريقة الباحث Holmgren (7) لقياس كمية Trx في العينة، إذ تعتمد عملية القياس على الثايوردوكسين في العينة الذي يعمل على اختزال اواصر ثنائية الكبريت Disulphide التي تتواجد

أن Trx يلعب دور مهم في الفسلجة المرضية Pathphysiologic للأمراض المزمنة مثل الروماتيزم الرثوي Rheumatoid arthritis، العوز المناعي AIDS وبعض الأورام الخبيثة (4)، فضلا عن دوره المهم في تنظيم عمليات الأكسدة والاختزال داخل الخلية وفي نمو الخلية وموت الخلية المبرمج Apoptosis (5). نظام الثايوردوكسين واسع الانتشار في الأصناف الحقيقية وبدائية النواة (6).

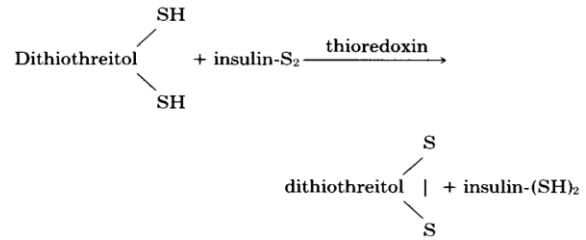
الغشائي لإزالة كل البروتينات التي لها أوزان جزيئية اقل من 10000 دالتون وكذلك ايونات ملح كبريتات الامونيوم الناتج من عملية الترسيب. تمت عملية الديليزة عند درجة 4 مئوية مع التحريك بالمحرك المغناطيسي مع ضرورة تبديل محلول بيكاربونات الامونيوم لمدة ثلاث مرات واستمرت العملية لمدة 24 ساعة . وبعد الانتهاء من عملية الفرز الغشائي تم حساب الحجم النهائي للمحلول الناتج وتقدير كمية البروتين بطريقة لوري المحورة إضافة الى تقدير تركيز Trx ثم حفظ المحلول في درجة -20 م° لحين الاستعمال.

4. كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي باستخدام سيفادكس G-50

استخدم عمود الفصل ذو الأبعاد (2.4 × 85) سم⁽¹¹⁾ والذي يحتوي على هلام السيفادكس من نوع G-50 (Sephadex G-50) المخصص لفصل المركبات ذات الأوزان الجزيئية لغاية 30 كيلو دالتون⁽¹²⁾. وبلغ ارتفاع الهلام في العمود 76 سم، وحسب الحجم الداخلي للعمود (V_i) باستخدام التريتوفان (Trp) والحجم الخارجي للعمود (V_o) باستخدام الدكستران الأزرق Blue dextran التي حقنت في العمود لغرض تحديد صفات العمود⁽¹³⁾ إذ تم حقن العمود بكمية 4 مل من المحلول الناتج من عملية الديليزة (الخطوة رقم 3) . فضلاً عن ذلك حدد حجم الروغان للمواد القياسية التي حقنت في العمود لغرض تحديد صفات العمود وإيجاد منحنى قياسي لتحديد الوزن الجزيئي التقريبي (للحزمة البروتينية ذات الفعالية العالية الناتجة من حقن المواد في عمود الترشيح الهلامي والتي حددت حجوم روغانها أيضاً) من خلال رسم العلاقة الخطية بين حجوم روغانها ولوغاريتم أوزانها الجزيئية المعلومة⁽¹²⁾ .

المواد والمحاليل المستخدمة في عمود الفصل: محلول الفوسفات المنظم ذو أس هيدروجيني 7 وبتركيز 0.1M، المحلول البروتيني (المحلول الناتج من عملية الديليزة) الناتج من الخطوة رقم 3 ، الحامض الاميني التريتوفان (Trp) لحساب الحجم الداخلي للعمود (V_i) Internal volume، الدكستران الأزرق Blue dextran لحساب الحجم الخارجي للعمود (V_o) Void volume ومواد قياسية مستخدمة لتحديد الوزن الجزيئي للـ TrxR وهي (إنزيم الهكسوكاينيز Hexokinase ، ألبومين مصلى البقر (BSA) Bovine serum albumin، الببسين Pepsin والباباين Papain). حضرت المحاليل القياسية بإذابة 0.1 غرام (من المواد القياسية) في 10 مل من الماء المقطر ومن ثم أجريت عملية حقن المواد القياسية المذكورة آنفاً بحجم 3 مل في عمود الفصل وعلى جدران عمود الفصل تبعها الغسل بالمحلول المنظم pH 7 والذي استخدم أيضاً كمحلول روغان Elution solution. أجريت عملية الجمع من العمود الفصل نوع Sephadex G-50 بمعدل جريان 60 مل /ساعة وبفاصل زمني مقداره ثلاث دقائق لكل جزء باستخدام جهاز جامع الأجزاء Fraction collector الذي يعمل بنظام الدقائق. تمت متابعة المحتوى البروتيني من خلال قياس الامتصاصية للأجزاء المفصولة بجهاز المطياف (UV-Vis Spectrometer-PD 303UV) عند طول موجي 280

في هورمون الانسولين (بتركيز 0.75 ملغم/مل) وبوجود مركب ثنائي ثايوثريتول Dithiothreitol (بتركيز 0.33 ملي مول /لتر) عند أس هيدروجيني 7.0 لمحلول الفوسفات المنظم (0.1 مول) وبدرجة حرارة 25 م° كما في المعادلة الآتية:



اذ يكون الناتج ذات لون ابيض متعكر تقاس شدة امتصاصه عند طول موجي 650 نانوميتر، وشدة الامتصاص تتناسب مع كمية Trx في العينة.

جمع عينات المصل للفصل

تم الحصول على مصل الدم من متبرع صحيح البنية ظاهرياً وبكمية 100 مل (وقد اخذت هذه الكمية من مصل الدم للحصول على اكبر قدر ممكن من Trx ودراسته في الخطوات اللاحقة) من مصرف الدم المركزي في محافظة نينوى بعد التأكد من عدم أصابته بأي أمراض تذكر وتم التأكد من ذلك عن طريق أطباء متخصصين في مصرف الدم وبعد جمع العينة تم قياس كمية Trx باستخدام طريقة الباحث Holmgren⁽⁷⁾ وقدرت كمية البروتين فيه بطريقة لوري المحورة⁽⁸⁾ ومن ثم أجريت خطوات التنقية عليه بشكل مباشر وهي كالآتي:

1. ترسيب البروتين بالإزاحة الملحية Protein precipitation by salting out

استخدمت كبريتات الامونيوم الصلبة لترسيب البروتين من المصل بالإزاحة الملحية⁽⁹⁾ وبدرجة تشبع 65% ، بصورة تدريجية مع التحريك المستمر بالمحرك المغناطيسي عند درجة حرارة 4 م°، ومن ثم ترك المحلول مدة 24 ساعة في التلاجة لتترسب جميع البروتينات.

2. فصل الراسب بالتردد المركزي المبرد (Cooling centrifuge)

بعد الترسيب فصل الراسب عن السائل الرائق بجهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة 9000 x g ولمدة 45 دقيقة، ثم أضيف الى الراسب المفصول اقل كمية من الماء المقطر، وبعد حساب حجم محلول الراسب البروتيني والسائل الرائق الناتج قدرت كمية البروتين بطريقة لوري المحورة⁽⁸⁾، وقيست كمية الثايورودوكسين Trx في محلول الراسب البروتيني والسائل الرائق باستخدام طريقة الباحث Holmgren⁽⁷⁾. ثم حفظ محلول الراسب البروتيني والسائل الرائق في درجة حرارة -20 م° لحين استخدامه في الخطوات اللاحقة.

3. الفرز الغشائي (الديليزة) Dialysis

أجريت عملية الفرز الغشائي للراسب الناتج من الخطوة (2) باستخدام محلول بيكاربونات الامونيوم (NH₄HCO₃) بتركيز 0.1 m⁽¹⁰⁾ وذلك لتجنب تأثير دونان Donnan effect واستخدمت عملية الفرز

على إحاطة شحنات المجاميع المختلفة ضمن المركبات البروتينية مما يفسح المجال للفصل بصورة رئيسة على أساس الفرق في الوزن الجزيئي بين المركبات البروتينية المختلفة ضمن النماذج المطبقة (14). طبقت عملية الهجرة الكهربائية على كل من النموذج والبروتينات القياسية Marker proteins ذات الأوزان الجزيئية المعلومة كمؤشرات لتقدير الوزن الجزيئي التقريبي وبعد التعرف على بقع البروتينات المفصولة، المجهولة والقياسية، أعتمد المنحنى القياسي الذي يمثل العلاقة بين لوغاريتم الوزن الجزيئي للبروتينات القياسية المستخدمة والمسافة التي يقطعها كل بروتين للتعرف على الوزن الجزيئي للنماذج المجهولة.

النتائج والمناقشة Results and Discussion

يعد نظام الثايروروكسين الذي يتألف من (Trx, TrxR, NADPH) من انظمة مضادات الأكسدة ومنظم الأكسدة والاختزال خلال عمل الخلية (16). إذ يلعب الـ Trx دور مهم في الحفاظ على البروتين بشكله المختزل وكذلك له دور في حماية الجسم من عملية الكرب التأكسدي Oxidative stress (17, 18)، عزل الـ Trx من عدة أسجة في الثدييات وكذلك عزل من البكتريا ومن النباتات ايضا وفي هذه الدراسة تم عزله من مصد دم الانسان، إذ تشير النتائج الموضحة في الجدول (1) الى خطوات تنقية الثايروروكسين Trx من مصد دم الإنسان، إذ وجد زيادة في تركيز Trx خلال عمليات التنقية للراسب الناتج من عملية الترسيب مقارنة بتركيزه في المصل كما ارتفعت أكثر بعد عملية الفرز الغشائي وذلك بسبب إزالة المركبات البروتينية ذات الأوزان الجزيئية الصغيرة (التي تقل عن 10000 دالتون) فضلا عن ايونات ملح كبريتات الامونيوم (13) وكذلك ازادت بعد استخدام عمود الفصل الترشيح الهلامي نوع سيفاديسكس G-50 لفصل المركبات ذات الأوزان الجزيئية المختلفة للحصول على نقاوة للـ Trx مقارنة بالبروتين الكلي والتي وصلت 20 مرة. إذ تم الحصول على تلك النقاوة من عملية جمع النضوح للقيمة ذات التركيز العالي للـ Trx والكمية القليلة للبروتين وعند استخدام المبادل الأيوني نوع DEAE-cellulose وجد ان هناك قمتين للـ Trx والتي وصلت عدد مرات تنقيتها 23 مرة للقيمة A و 29 مرة للقيمة B.

الجدول 1: خطوات تنقية الثايروروكسين Trx من مصد دم الإنسان.

خطوات التنقية	الحجم (مل)	تركيز البروتين الكلي (ملغم/مل)	تركيز Trx (مايكرومول/مل)	التركيز الكلي للـ Trx (مايكرومول/مل)	التركيز النوعية الكلي للـ Trx (مايكرومول/ملغم بروتين)	الاستعادة %	عدد مرات التنقية
مصد الدم	100	65.17	0.0024	0.24	0.00368	100	1.0
الترسيب بكبريتات الامونيوم 65%	35	43.34	0.0066	0.231	0.00533	96.3	1.45
الديليزة للراسب	38	21.93	0.006	0.228	0.0104	95	3
القيمة الناتجة من عمود الفصل الترشيح الهلامي سيفاديسكس G-50	55.5	0.451	0.0006	0.0333	0.0738	13.9	20
القيمة (A) الناتجة من عمود الفصل التبادل الأيوني نوع DEAE-سيليلوز	21.8	0.13	0.0005	0.0109	0.08384	4.5	23
القيمة (B) الناتجة من عمود الفصل التبادل الأيوني نوع DEAE-سيليلوز	19.2	0.11	0.0006	0.01152	0.105	4.8	29

نانومتر. فضلاً عن متابعة كمية Trx في كل جزء من الأجزاء المفصولة، ومن ثم جمعت الأجزاء البروتينية الحاوية على أعلى كمية للثايروروكسين.

5. تقنية التجفيد Lyophilization

تم تجفيد الحزمة البروتينية التي أظهرت كمية عالية للـ Trx والناتجة من عمود الفصل نوع Sephadex G-50 الى ثلث حجمها، ثم أخذت العينة وحفظت عند درجة حرارة -20 °م حتى يتم تهيئتها للخطوة التالية .

6. كروماتوغرافيا التبادل الأيوني Ion exchange chromatography

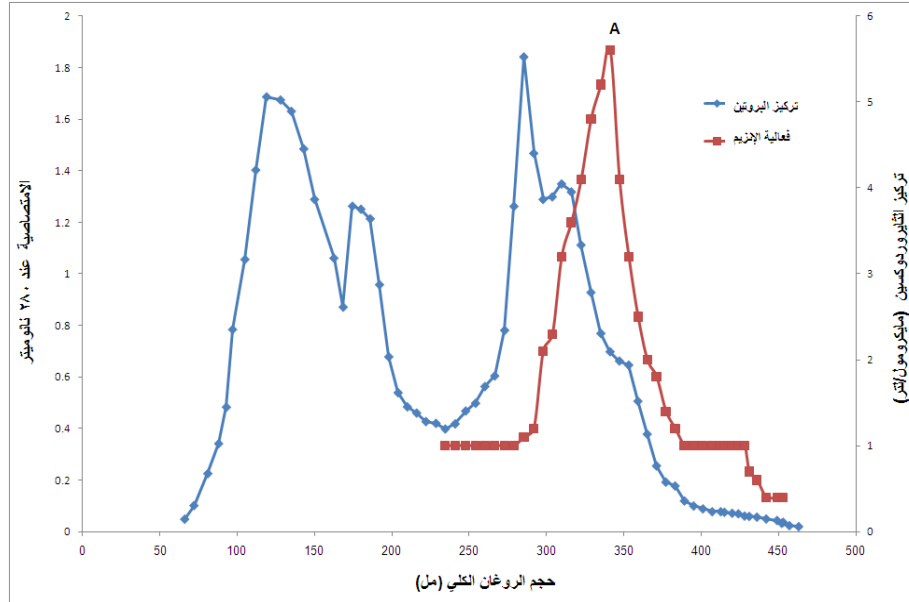
مرر الحزمة البروتينية الناتجة من عمود الفصل الاول (Sephadex G-50) بعد عملية التجفيد الى المبادل الأيوني السالب إذ استخدم في هذه التقنية عمود ذو الإبعاد (3.2 × 40) سم (15) والذي يحتوي على المبادل الأيوني السالب نوع Diethyl amino ethane - cellulose (DEAE-Cellulose) وباستخدام المحلول الفوسفاتي المنظم واس هيدروجيني pH (7) وكانت سرعة جريان المحلول Flow rate 1 مل/ دقيقة) متابعة الأجزاء البروتينية المنفصلة بقياس الامتصاصية عند الطول الموجي 280 نانوميتر لمحتوى الأجزاء المترشحة في كل من أنابيب الاختبار باستخدام جهاز المطياف الضوئي (UV-Vis Spectrometer-PD 303UV) وتم الاستدلال على القيمة البروتينية الحاوية على Trx من خلال قياس كميتها لكل أنبوب اختبار باستخدام طريقة الباحث Holmgren (7) إذ لوحظ ان هناك قمتين بروتينية ناتجة من عملية التبادل الأيوني . وبعد جمع الحزم البروتينية الناتجة من عملية التبادل الأيوني جفدت للحصول على الإنزيم بشكله الصلب .

7. تقدير الوزن الجزيئي بتقنية الهجرة الكهربائية

Estimation of Molecular Weight by Electrophoresis

قدر الوزن الجزيئي للقيمة الناتجة من سيفاديسكس G-50 بتطبيق الهجرة الكهربائية نوع Slab-electrophoresis على هلام البولي أكريلاميد بوجود مادة Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) التي تعمل

فعالية عالية لـ Trx المفصول من عمود الفصل (نوع G-50) (الشكل 1) والذي كان حجم روغانه Elution volume 341.1 مل (الشكل 1) ووصل التركيز النوعي لها الى 0.0738 مايكرومول /ملغم بروتين وعدد مرات التنقية 20 مرة مقارنة بالخام المستخدم (المصل) (الجدول 1).



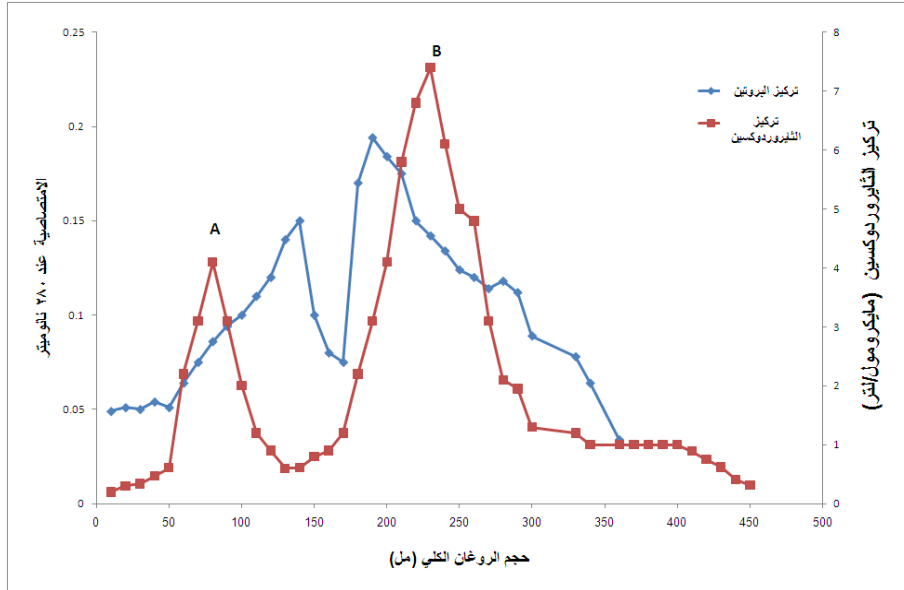
الشكل 1: المظهر الجانبي بين روغان الحزمة البروتينية لـ Trx الناتجة من عمود الفصل Sephadex G-50 والعادة لمصل دم الانسان بواسطة تقنية الترشيح الهلامي.

بأختلافات بسيطة على سبيل المثال في التشكل الفراغي او في احد الأحماض الامينية⁽¹⁹⁾. وهذا مطابق لما وجدته الباحث Park وآخرون ان هناك شكلين Isoform للـ Trx المفصول من السمك الصخري الاسود نوع *Sebastes schlegelii*⁽²⁰⁾ وكذلك مطابق مع ما وجدته الباحث Horecká وآخرون ان هناك شكلين للتثايروردوكسين المفصول من بكتيريا *Streptomyces aureofaciens*⁽²¹⁾. ولقد لوحظ ذلك أيضا في بعض انواع النباتات انه تحوي على شكلين من التثايروردوكسين^(22, 23)، اذ لكل شكل لها وظائف مختلفة فيعضها لها دور في عملية التركيب الضوئي والأخر له دور في اختزال البروتينات المؤكسدة بأواصر ثنائية الكبريت⁽²⁴⁾.

كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي: استخدمت هذه التقنية في عملية فصل المركبات البروتينية التي تم الحصول عليها من الترسيب بكبريتات الامونيوم (بعد أن اجري لها عملية الفرز الغشائي). وقد استخدم فيها عمود الفصل الحاوي على هلام نوع Sephadex G-50 وقد لوحظ ان هناك حزمة واحدة ذات

تقنية التبادل الأيوني Ion Exchange Technique :

تم الحصول على قمتين (A و B) (الشكل 2) للتثايروردوكسين عند عملية الفصل بتقنية كروماتوغرافيا التبادل الأيوني السالب نوع DEAE - سليولوز عند حجم روغان 80 مل للقمة A وحجم روغان 230 مل للقمة B لـ Trx اذ لوحظ ان التركيز النوعي للقمة A هو 0.08384 مايكرومول /ملغم بعدد مرات تنقية وصلت الى 23 مرة و للقمة B هو 0.105 مايكرومول /ملغم بعدد مرات تنقية وصلت الى 29 مرة. ان وجود قمتين عند الفصل بهذه التقنية إشارة واضحة ان التثايروردوكسين يحتوي على شكلين اذ يعد من البروتينات من نوع Isoform التي لها أشكال مختلفة لنفس البروتين اذ تختلف فيما بينها



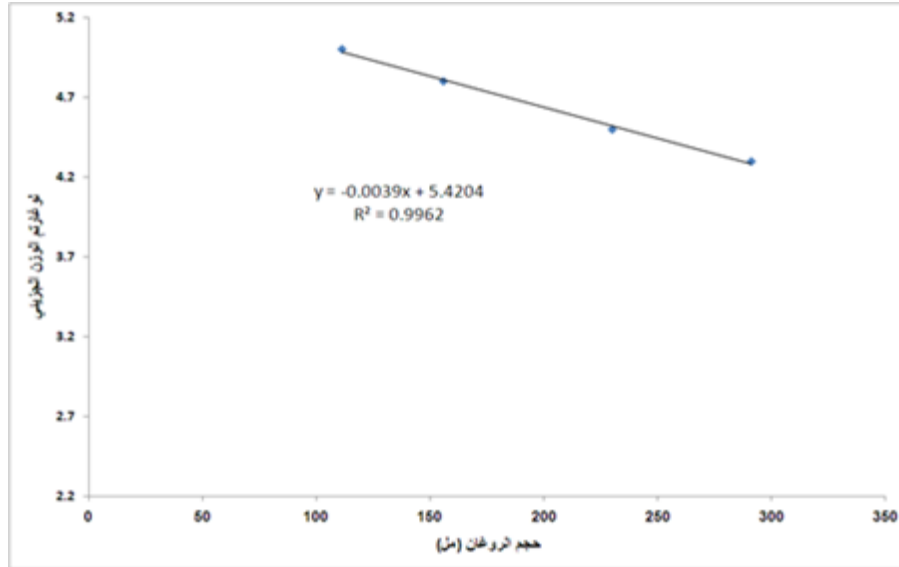
الشكل 2 : المنحني المظهر الجانبي يبين روغان الحزمة البروتينية لـ Trx الناتجة من عمود التبادل الأيوني نوع DEAE-Cellulose والعائدة لمصل الدم .

تقدير الوزن الجزيئي التقريبي بتقنية الترشيح الهلامي :
 قدر الوزن الجزيئي التقريبي للحزمة البروتينية الناتجة من عمود الفصل باستخدام تقنية الترشيح الهلامي للعمود Sephadex G-50 من خلال إمرار عدد من المركبات معلومة الوزن الجزيئي والتي تتراوح أوزانها الجزيئية بين (204 – 2000000 دالتون) على عمود الفصل لغرض تعيين خواص العمود من حيث الحجم الداخلي (V_i) وكذلك الحجم الخالي أو الفارغ من الحبيبات (V_0) والجدول (2) يبين المواد التي تم إمرارها على عمود الفصل الحاوي على هلام (Sephadex G-50) مع أوزانها الجزيئية وحجوم روغانها. وعند رسم حجم الروغان لكل مادة مقابل لوغاريتم وزنها الجزيئي ظهر خط مستقيم كما في الشكل (3) والذي حدد من خلاله الوزن الجزيئي التقريبي للـ Trx الذي بلغ 190 ± 12305 دالتون وهي قريبة لما وجدته الباحث Wang وآخرون ان الوزن الجزيئي للثايورودوكسين المفصول من بكتريا *Pseudoalteromonas sp.* AN178 بلغت 11880 دالتون⁽¹⁸⁾. وكذلك مع ما ذكره كل من الباحثين Ben Bacha و Mejdoub ولكن لوحظ ان الوزن الجزيئي للثايورودوكسين المفصول من بكترياس الجمل بحدود 11302 دالتون⁽²⁵⁾. اما الـ Trx المفصول من بكتريا *Bacillus acidocaldarius* فقد وجدته الباحث Bartolucci وآخرون انه بحدود 11577 دالتون، اما عند الثايورودوكسين المفصول من بكتريا *Helicobacter pylori* فقد وجد الباحث Windle وآخرون انه يمتلك وزن جزيئي 12000 دالتون⁽²⁶⁾، وللثايورودوكسين المفصول من السمك الصخري الاسود نوع *Sebastes schlegelii* يمتلك وزن جزيئي 13000 دالتون⁽²⁰⁾ أما في النباتات فقد وجد الباحثين Wang و Dai ان الوزن الجزيئي للـ Trx المفصول من الطماطة نوع *Solanum lycopersicum* كانت بحدود 13600 دالتون⁽²⁷⁾.

الجدول 2: الوزن الجزيئي وحجم الروغان للمواد القياسية المستخدمة في تقنية الترشيح الهلامي باستخدام هلام Sephadex G-50.

حجم الروغان (مل)	الوزن الجزيئي (دالتون)	أسم المادة
93	2000000	الدكستران الأزرق Blue dextran (الحجم الخالي V_0)
111.5	100000	هيكسو كاينيز Hexo kinase
156	67000	ألبومين مصل البقر Bovine serum albumin
230	36000	الببسين Pepsin
291	21000	البابين Papain
431	204	التربتوفان Tryptophan (الحجم الداخلي V_i)
*341.1	12305	المجهول (القمة ذات فعالية عالية A)

*أخذت هذه القيمة من الشكل رقم (2) الذي يظهر فيه حجم روغان القمة المفصولة للإنزيم من مصل الدم بواسطة تقنية الترشيح الهلامي لعمود الفصل G-50.

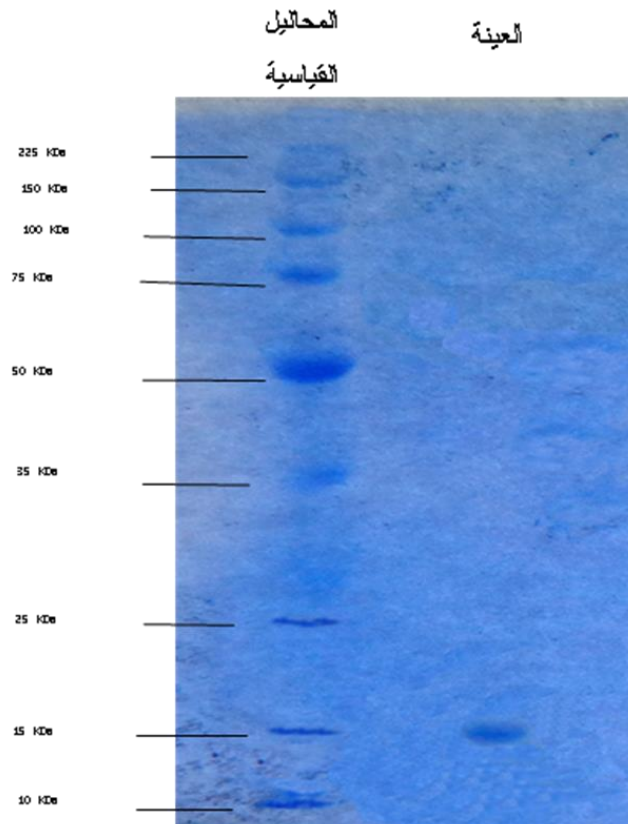


الشكل 3 : المنحني القياسي لتحديد الوزن الجزيئي بتقنية الترشيح الهلامي باستخدام عمود الفصل نوع Sephadex G-50.

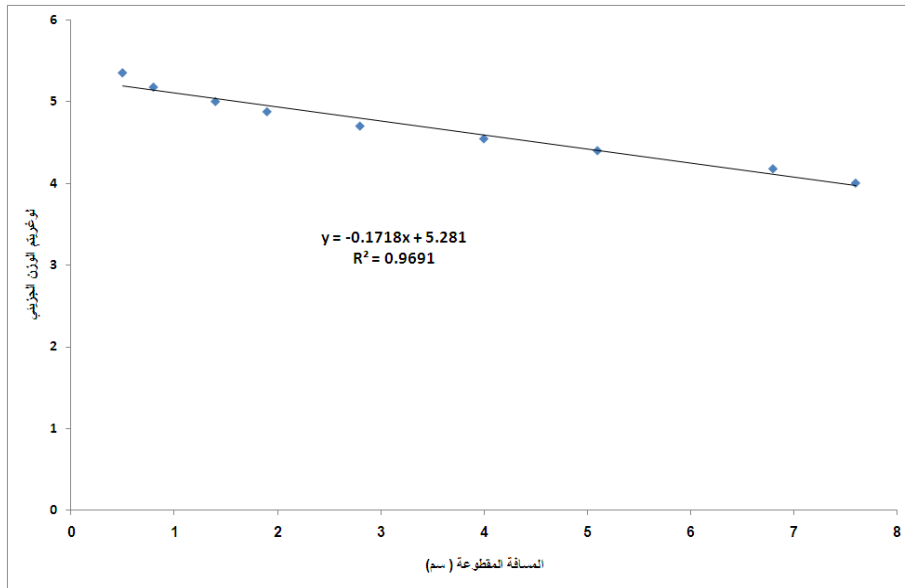
سيفادكس G-50، ذات وزن جزيئي تقريبي 12461 دالتون وهذا مقارب لما وجدته الباحثة Horecká وآخرون للتأثيروروكسين المفصول من بكتيريا *Streptomyces aureofaciens* الذي كان بحدود 1100 عند استخدامه تقنية الهجرة الكهربائية (SDS-PAGE) لتحديد الوزن الجزيئي⁽²¹⁾.

تقدير الوزن الجزيئي بالهجرة الكهربائية

كما مبين في الشكل 4 فقد تم الحصول على حزمة بتطبيق تقنية الهجرة الكهربائية نوع (SDS-PAGE) وقد تم التعرف على أوزانها الجزيئية بالاستعانة بالمنحني القياسي المبين في الشكل 5. إذ أشارت نتائج التقية الى وجود حزمة واحدة ناتجة من تقنية الترشيح الهلامي نوع



الشكل 4 : يوضح عملية الهجرة الكهربائية لعينة التأثيروروكسين المفصلة من مصل الدم والناتجة من عمود الترشيح الهلامي نوع سيفادكس G-50 مقارنة مع المحاليل القياسية.



الشكل 5 : المنحني القياسي لتحديد الوزن الجزيئي باستخدام تقنية الهجرة الكهربائية SDS-PAGE.

مجموعة الزانثينات Xanthine ويثبط الناقلات العصبية ويستعمل في علاج الربو⁽³⁰⁾ والكلورفينرامين Chlorpheniramine-malate وهو مضاد الهستامين يستعمل لحالات تحسس الجهاز التنفسي العلوي التي تتضمن الجيوب الأنفية⁽³¹⁾ والـ Diphenhydramine-HCl الذي يستعمل لعلاج التهاب البنكرياس⁽³²⁾ والـ Metoclopramide-HCl يستخدم في الاضطرابات الهضمية لتخفيف ومنع الغثيان والاقياء بعد العمليات الجراحية⁽³³⁾، أما الكساميثازون فهو دواء ينتمي الى فئة الادوية الهرمونية الستيرويدية وهو مضاد للالتهابات⁽³⁴⁾. أشارت النتائج الموضحة في الجدول (3) ان هناك نسباً مختلفة في تثبيط او تنشيط لعمل التايورودوكسين، اذ لوحظ ان للمركبات الباراسيتامول وديكساميثازون وداي فينهايدرامين- هايدروكلورايد وثيوفيلين اللامائي وبسيدوفيرين وسيراميد والكافيين اللامائي تأثير تثبيطي وصل ما بين 28.38 - 44.59% . أما ميترونيدازول وكلورفينرامين ماليت لها تأثير تثبيطي وصل الى 110.8% و 21.62 على التوالي.

تأثير المواد الدوائية المختلفة على تركيز التايورودوكسين المفصول من مصلى الدم:

يوجد عدد من المركبات التي تعمل على التأثير في عمل التايورودوكسين اثناء اختزاله المركبات المؤكسدة وذلك من خلال إما أن تقلل من فعاليته او لبعضها الآخر لها اثر تنشيطي. وقد استخدمت في هذه الدراسة عدد من المركبات الدوائية المعروفة والمستخدمة على نطاق واسع لمعرفة تأثيرها على عمل التايورودوكسين. اذ تم الحصول على هذه الأدوية بشكل نقي من الشركة العامة لصناعة الادوية ومن شركة الحكماء لصناعة الادوية والمستلزمات الطبية في محافظة نينوى. فكل دواء مستخدم له تأثيرات علاجية مختلفة على الجسم فعلى سبيل المثال هناك أدوية تستخدم كمضادات حيوية مثل (السيراميد Ceramide, فلاجيل Flagyl)⁽²⁸⁾ او منشط للنظام العصبي المركزي ومنشط ايضاً مثل الكافيين⁽²⁹⁾ او مسكن للألام المختلفة مثل الباراسيتامول وبسيدوفيرين Pseudoephedrine⁽²⁸⁾ وثيوفيلين اللامائي Theophyllin anhydrous الذي يعتبر من

الجدول 3 : تأثير بعض المركبات الدوائية على تركيز التايورودوكسين المفصول من مصلى الدم.

النسبة المئوية للتثبيط (-) او التنشيط (+)	تركيز Trx (مايكرومول/لتر)	الأدوية (بتركيز 0.33 ملي مول)
110.8 +	15.6	ميترونيدازول Metronidazole
40.54-	4.4	ديكساميثازون Dexamethasone
44.59-	4.1	باراسيتامول Paracetamol
21.62 +	9	كلورفينرامين ماليت Chlorpheniramine Malate
35.13 -	4.8	داي فينهايدرامين - هايدروكلورايد Diphenhydramine-HCl
28.38 -	5.3	الكافيين اللامائي Caffeine anhydrous
35.13 -	4.8	ثيوفيلين اللامائي Theophyllin anhydrous
33.78 -	4.9	بيسيدوفيرين Pseudoephedrine
32.43-	5.0	سيراميد Ceramide

* علماً ان كمية التايورودوكسين القياسية هي 7.4 مايكرومول/لتر.

السيراميد وكذلك له دور حماية عصبية في مختلف أنواع الخلايا والذي من الممكن ان يقلل تركيز الثايورودوكسين نتيجة استخدامه في الحماية⁽³⁷⁾.

اذ يستخدم الثايورودوكسين لإغراض علاجية مختلفة كما لاحظ ذلك الباحث Asami وآخرون⁽³⁸⁾، فضلا عن ذلك فإنه يعد من العلاجات الآمنة بدون تأثيرات جانبية ولكن ان استخدام بعض المضادات الحيوية المختلفة قد يؤثر على فعاليته لأداء وظائفه المختلفة كما لوحظ ذلك من دراسة تأثير الأدوية عليه (الجدول 3) وان انخفاض فعاليته يؤدي ذلك الى زيادة حدوث حالات الكرب التأكسدي كونه من مضادات الاكسدة المهمة التي لها ادوار مختلفة داخل الجسم⁽¹⁸⁾ وبالتالي فزيادة انخفاض فعاليته داخل الجسم ممكن ان يزيد من حالات حدوث الاكسدة داخل الخلايا. خاصة وان للثايورودوكسين دور مهم في تنشيط فعالية الخلايا العدلة Neutrophil لفعاليتها الأساسية في عملية البلعمة في قتل انواع مختلفة من الاجسام الغريبة الداخلة الى الجسم (39، 40).

أوضحت دراسة على دواء ميترونيدازول Metronidazole بان الدواء يعمل كواهب للالكترونات للمجاميع المختلفة وبالتالي يزيد من الثايورودوكسين بشكله المختزل وبالمقابل يزيد من فعالية وعمل الـ Trx⁽³⁵⁾ مما يزداد تنشيطه (الجدول 3)، فالمنشطات Activators تعرف بأنها هي عبارة جزئيات صغيرة (اما أيونات لاعضوية او مركبات عضوية) تحتاجها البروتينات لتحفيز عملها وزيادة نشاطها لاداء تفاعلاتها المختلفة ومن ثم يسهل في إعطاء الناتج النهائي⁽¹³⁾.

وفي دراسة اجريت من قبل الباحث Hua jan وآخرون أوضحوا ان الباراسيتامول (الذي يسمى ايضا Acetaminophen) يتم تأييده في الكبد وتحوله الى N -acetyl-p-benzoquinone imine وهذه المادة تعد من المركبات الباحثة عن الالكترونات ولها القابلية على الارتباط ببروتينات الكبد مثل الثايورودوكسين والذي يؤدي بالتالي الى تقليل من عمل الـ Trx وانخفاض كميته وتزيد بذلك على حث حدوث حالة الكرب التأكسدي Oxidative stress⁽³⁶⁾. وفي دراسة أخرى لوحظ ان المعاملة بالثايورودوكسين الخارجي له تأثير حماية ضد

المصادر

- 1-Williams, JS.C.H. (1995). "Chemistry and Biochemistry of Flavonezymes" (Muller, F., ed). CRC Press. Baco Raton. Pp.121-211.
- 2-Hashemy,S.I.(2011). The human thioredoxin system: modifications and clinical applications. Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 14(3),191-204
- 3- Hashemy, S.; Ungerstedt, J.; Zahedi Avval, F.; Holmgren, A. (2006). Motexafin gadolinium, a tumor-selective drug targeting thioredoxin reductase and ribonucleotide reductase. J. Biol. Chem. 281 (16): 10691-7.
- 4- Mustacich, D.; Powis, G.(2000). Thioredoxin reductase. Biochem. 267, 6102.
- 5-Arner, E.S.; Holmgren, A. (2006). The thioredoxin system in cancer. Semin Caner Biol. 16(6), 420-6.
- 6- Watson, W. H., Yang, X., Choi, Y.E., Jones, D.P., and Kehrer, J. P.(2004). Thioredoxin and its role in toxicology. Toxicol Sci.78,3-14.
- 7- Holmgren ,A.(1979). Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. J. Biol. Chem. 254(19), 9626-9632.
- 8- Schacterle, G. R.; Pollack, R. L. (1973). A simplified method for the quantitative assay of small amount of protein in biological material. Anal. Biochem. 51, 654-655.
- 9- Maggioli, G.;Piacenza,L.; Carambula, B.; Carmona, C. (2004). Purification characterization and immunolo calization of a thioredoxin reductase from adult Fasciola Hepatica. J .Paraitol.,90(2), 205-211.
- 10- Plummer, T.D. (1978). An introduction to practical biochemistry. 2nd. Ed., McGraw-Hill Book Comp., U.K.
- 11-Holmgren, A.(1977). Bovine thioredoxin system. Purification of thioredoxin reductase from calf liver and thymus and studies of its function in disulfide reduction. J. Biol. Chem., 252, 4600-4606.
- 12- Robyt, F.J.; White, J.B. (2001). "Biochemical Techniques, Theory and Practice", books/cole publishing company, Monterey, California.
- 13- Burtis, C. A.; Ashwood, E. R.; Bruns, D.E.(2012). "Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics". By Saunders, an imprint of Elsevier Inc. USA. pp.356, 368.
- 14- Murray, R. K.; Bender, D. A.; Botham, K. M.; Kennelly, P. J.; Rodwell, V. W. (2009)." Harper's Illustrated Biochemistry". 28 ed. The McGraw-Hill Companies, Chapter 8.
- 15- Gromer, S.; Arscott, L.D.; Williams, C.H.J.; Schirmer, R.H. (1998). Human placenta thioredoxin Reductase. Isolation of the selenoenzymes, steady state kinetics and inhibition by therapeutic gold compounds. J. Biol. Chem., 273, 20096-20101.
- 16- Rackham, O.; Sheanwood, A. M.; Thyer,R.;Mc Namara, E.;Davies,SM; Callus,BA; Miranda-Vizuete,A. (2011). Substrate and inhibitor specificities differ between human cytosolic and mitochondrial reductase : Implication for development of specific inhibitors. Radic .Biol. Med. 50(6), 689-99.
- 17- Wang, Q., Hou, Y., Qu, J., Hong, Y., Lin, Y., Han, X.(2013) Molecular cloning, expression, purification and characterization of thioredoxin from Antarctic sea-ice bacteria Pseudoalteromonas sp. AN178. Mol. Biol. Rep. 40(12):6587-91.
- 18- Harris C., Hansen, J.M.(2012). Oxidative stress, thiols, and redox profiles. Methods Mol Biol. 889:325-46.
- 19- Harvey, R. A.; Ferrier, D. R. (2014). " Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry" 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins, a Wolters Kluwer business, China. P.20,

- 20- Park, C.I., Jung, J.H., Shim, W.J., Kim, J.W., Kim, E.G., Jeong, J.M., Kim, D.H. (2012). Molecular characterization, expression, and functional analysis of two thioredoxins in the black rockfish (*Sebastes schlegelii*). *Fish Shellfish Immunol.* 32(5):808-15.
- 21- Horecká, T., Perecko, D., Kutejová, E., Muchová, K., Kollárová, M. (1996). Purification and partial characterization of two thioredoxins from *Streptomyces aureofaciens*. *Biochem Mol. Biol. Int.* 40(3):497-505.
- 22- Arsova, B., Hoja, U., Wimmelbacher, M., Greiner, E., Ustun, S., Melzer, M., Petersen, K., Lein, W. and Bornke, F. (2010) Plastidial thioredoxin z interacts with two fructokinase-like proteins in a thiol-dependent manner: evidence for an essential role in chloroplast development in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*, *Plant Cell*, www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.110.2.20512.
- 23- Hall, M., Cabana, A.M., Akerlund, H., Florencio, F.J., Schröder, W.P., Lindahl, M. and Kieselbach, T. (2010) Thioredoxin 33 targets of the plant chloroplast lumen and their implications for plastid function. *Proteomics*, 10: 987–1001.
- 24- Serrato, A.J. and Cejudo, F.J. (2003) Type-h thioredoxins accumulate in the nucleus of developing wheat seed tissues suffering oxidative stress. *Planta*, 217: 392–399.
- 25- Ben Bacha, A.G., Mejdoub, H. (2012). Purification and biochemical characterization of an organic-solvent-tolerant thioredoxin from dromedary pancreas. *Protein J.* 31(1):1-7.
- 26- Windle, H. J., A'ine F., De'irdre, N. E., Kelleher, D. (2000). The thioredoxin system of *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* 275(7):5081–5089.
- 27- Dai, Ch., Wang, M. (2011). Isolation and characterization of thioredoxin and NADPH-dependent thioredoxin reductase from tomato (*Solanum lycopersicum*). *BMB reports* 44(10): 692-697.
- 28- Horak, F.; Zieglmayer, P.; Zieglmayer, R.; Lemell, P.; Yao, R.; Staudinger, H.; Danzig, M. (2009). A placebo-controlled study of the nasal decongestant effect of phenylephrine and pseudoephedrine in the Vienna Challenge Chamber". *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 102 (2), 116.
- 29- Nehlig, A.; Daval, J. L.; Debry, G. (1992). Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Research Reviews.* 17 (2), 139 –170.
- 30- Barnes, P.J.; Pauwels, R.A. (1994) . Theophylline in the management of a sthma: time for reappraisal. *Eur. Respir J.* 7,579-591.
- 31- Sagara, I.M.; Ozak, T.; Morioka, E.; Wada, K.; Hondia, K.; Hori, A.; Matsuya, Y. (2012). Induced of prolonged continuous slow wave sleep by blocking cerebral H1-histamine receptors in rats. *Br. J. Pharmacol.* 165(1), 167-182.
- 32- You, N.; Tao, K.; Zhao, W.; Bao, P.; Li, R.; You, H.; Zhang, M. (2010). Diphenhydramine modulates cytokins and induced apoptosis in experimental acute pancreatitis. *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.* 32(5), 3011-8.
- 33- Aloorkar, N.H.; Bhatia, M.S. (2011). Rapidly disintegrating tablets of metoclopramide-HCl using novel chemically modified cellulose. *Ars. Pharm.* 52(3), 26-34.
- 34- Luster, I.; Friedland, I. R.; Jafri, H.S.; Wubbel, L.; Ahmad, A.; Trujillo, M.; McCoig, C.C., and McCracken, G.H. (2003). Factors influencing the anti-inflammatory effects of Dexamethasone therapy in experimental pneumococcal meningitis. *J. Antimicrob. Chemotherapy.*, 52, 651-655.
- 35- Leitsch, D., Kolarich, D., Duchene, M. (2010). The Flavin inhibitor diphenyleiodonium renders *Trichomonas Vaginalis* resistant to metronidazole, inhibits thioredoxin reductase and Flavin reductase, and shuts off hydrogenosomal enzymatic pathways . *Mol. Biochem. Parasitology.* 171,1:17-2
- 36- Hua jan, Y., Heck, D. E., Dragomir, A., Gardner, C. R., Laskin, Debra L. (2014). Acetaminophen reactive intermediates target hepatic thioredoxin reductase. *Chem. Res. Toxicol.* 4;27(5):882-94.
- 37- Sreekumar, P. G., Ding, Y., Hinton, D R. (2009). Regulation of thioredoxin by ceramide in retinal pigment epithelial cells. *Exp. Eye Res.* 88(3)410-417.
- 38- Asami, K., Inagaki, A., Imura, T., Sekiguchi S., Fujimori K. (2013). Thioredoxin-1 Attenuates early graft loss after Intraportal Islet transplantation in Mice. *PLoS ONE* 8(8): e70259.
- 39- Hoshino, T., Nakamura H., Okamoto, M., Kato, S., Araya, S. (2003) Redoxactive protein thioredoxin prevents proinflammatory cytokine- or bleomycin induced lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 168: 1075–1083.
- 40- Ueda, S., Nakamura, T., Yamada, A., Teratani, A., Matsui, N. (2006). Recombinant human thioredoxin suppresses lipopolysaccharide-induced bronchoalveolar neutrophil infiltration in rat. *Life Sci.* 79: 1170–1177

Study of Thioredoxin Isolated from Human Blood Serum

Luay A. Al-Helaly , Amera A. Hamdon.

Department of Chemistry , College of Science , University of Mosul , Mosul, Iraq

Abstract

The research included the separation of thioredoxin (Trx) from human blood serum using different biochemical techniques. One proteinous peak had been isolated by gel filtration using sephadex (G-50) that produced by ammonium sulphate precipitation(65%) after dialysis. It was noted that there are two peaks of Trx when using ion exchange-type DEAE-cellulose for the product of gel filtration column.

The approximately molecular weight of the isolated Trx using gel filtration chromatography (G-50) and electrophoresis technique type SDS-PAGE were (12305 ± 190) Dalton and 12461 Dalton respectively .

The results showed that inhibited and activated effects of drugs on Trx working. The results showed that inhibited to 44.59% for paracetamol, dexathamazone, diphenhydramine-HCl, theophlline anhydrous, pseudoephedrine, ceramide and caffeine anhydrous, but metronidazole and chlorpheniramine malate have activated effect to 110.8% and 21.62 respectively.

Keywords: Isolation, Thioredoxin, Inhibitors, Activators.